

限外濾過法による 2 成分系タンパク質溶液の  
分画操作に関する研究

向井康人

名古屋大学図書	
和	1277321

# 目 次

目 次	-----	i
序 章	-----	1
第 1 章 タンパク質溶液の限外濾過に関する既往の研究		
1-1 緒言	-----	5
1-2 限外濾過の基礎	-----	6
1-2-1 膜分離法における限外濾過の位置づけ	-----	6
1-2-2 限外濾過挙動を表すモデル	-----	6
1-2-3 ケーク濾過理論	-----	10
1-3 タンパク質分子間の静電的相互作用	-----	12
1-3-1 電気二重層と電位	-----	12
1-3-2 DLVO 理論	-----	14
1-4 単一成分のタンパク質からなる濾過ケーキの構造	-----	15
1-5 限外濾過における濾過速度の理論推定	-----	18
1-6 濾過ケーキに作用する外力の影響	-----	21
第 2 章 濾過ケーキの構造に及ぼすタンパク質の荷電状態の影響		
2-1 緒言	-----	24
2-2 実験装置および方法	-----	25
2-3 実験結果および考察	-----	26
2-3-1 試料タンパク質の荷電特性	-----	26
2-3-2 濾過ケーキ諸特性値の決定法	-----	30
2-3-3 濾過ケーキと荷電状態との相関	-----	33
2-4 結言	-----	37

第 3 章	2 成分系タンパク質溶液の限外濾過における濾過ケーキの構造	
3-1	緒言 -----	39
3-2	実験装置および方法 -----	40
3-3	実験結果および考察 -----	42
3-3-1	濾過操作の休止の影響 -----	42
3-3-2	濾過ケーキの構造に及ぼす pH の影響 -----	46
3-3-3	濾過ケーキの構造に及ぼすタンパク質の混合割合の影響 -----	52
3-4	結言 -----	63
第 4 章	2 成分系タンパク質溶液の限外濾過特性に及ぼす溶液環境の影響	
4-1	緒言 -----	64
4-2	実験装置および方法 -----	64
4-3	実験結果および考察 -----	65
4-3-1	異符号の電荷を持つ異種タンパク質の濾過特性 ----	67
4-3-2	同符号の電荷を持つ異種タンパク質の濾過特性 ----	76
4-4	結言 -----	76
第 5 章	2 成分系タンパク質溶液の限外濾過における分画特性	
5-1	緒言 -----	80
5-2	実験装置および方法 -----	81
5-3	実験結果および考察 -----	83
5-3-1	膜面に作用する剪断力の影響 -----	83
5-3-2	異種タンパク質間の相互作用の影響 -----	88
5-3-3	膜のタンパク質吸着性の影響 -----	92
5-3-4	超音波照射の影響 -----	94

5-4 結言	102
総括	103
主要記号表	107
引用文献	110
研究発表論文	113
謝辞	114

## 序 章

限外濾過法は、最近進歩のめざましい高度分離技術の一つとして大いに注目されており、相変化を伴わず省エネルギーであるほか、大量処理が可能であるなど数多くの利点を持ち合わせている。とりわけタンパク質溶液の限外濾過操作は、その重要性が極めて高く、食品工業、医療、バイオテクノロジーなど、適用分野が広範にわたっている。そのため、これまで数多くの研究がなされ、かなりの成果が報告されているが、そのほとんどは単一のタンパク質のみを含む溶液を対象としている。実際の濾過操作では、単一成分の物質を含む溶液を濾過することは極めてまれであり、通常多成分の物質を含む溶液が濾過の対象となる。タンパク質は溶液中で荷電を持つため、分子間には静電的な相互作用が働き、結果としてその濾過特性に複雑な影響を与えるが、2つ以上の成分を含む場合にはその相互作用が異種成分間にも及ぶため、さらに影響は複雑となり、濾過現象の理解はますます困難となる。そのため、工業的重要性が極めて高いにもかかわらず、2成分以上を含む溶液の限外濾過における分離機構は、現在のところまだほとんど明らかにされていない。

本研究では、多成分系溶液の濾過現象を理解するための基礎的知見を得ることを目的として、2成分系タンパク質溶液の分画特性について検討した。まず、濾過速度などの濾過特性を大きく左右すると考えられる濾過ケーキに着目し、複雑な濾過機構を解明するための基礎となるその構造について明らかにした。次いで、2成分系溶液の分画特性を支配する種々の因子を明らかにし、それらの影響を詳細に検討することにより、効率的な分画を行うための操作指針を提出した。

本論文の第 1 章では、まず初めに、限外濾過挙動を記述するためによく用いられる代表的な 3 つのモデル、すなわちゲル分極モデル、浸透圧モデル、境界層抵抗モデルと、本論文において解析に使用したケーキ濾過モデルについて、それぞれの概念および特徴を概説した。次いで、タンパク質は水溶液中で荷電を帯び、これが濾過特性に大きな影響を及ぼすので、荷電状態に密接にかかわる電気二重層、 $\zeta$  電位および表面電荷密度について述べ、電気二重層の重なりによって生じる分子間の相互作用について説明した。さらに、タンパク質溶液の限外濾過に関する既往の研究の中から、特に本論文における研究の背景となるいくつかの研究について概説し、それらの問題点を指摘した。

第 2 章においては、単成分系タンパク質溶液の限外濾過における濾過ケーキの平均空隙率および平均濾過比抵抗を種々の pH に対して測定し、タンパク質分子の  $\zeta$  電位および表面電荷密度との相関を考察した。タンパク質からなるケーキの構造の pH 依存性に関するこれまでの定性的な説明をさらに推し進め、タンパク質の荷電状態を示すこうした物理化学的特性値に着目することで、より定量的な説明を与えた。すなわち、各 pH に対する濾過ケーキの諸特性値をタンパク質分子の  $\zeta$  電位や表面電荷密度に対してプロットすることにより、これまでの定性的な説明の妥当性を裏付けることができた。また、濾過ケーキの構造はタンパク質の荷電の正負には依存しないことを明らかにした。

第 3 章においては、2 成分系タンパク質溶液の限外濾過を行い、濾過特性を支配すると考えられる濾過ケーキの諸特性値を求めた。まず、溶液の pH の影響、すなわち含まれるタンパク質成分の荷電状態の影響を検討した。2 成分のタンパク質からなる濾過ケーキの平均空

隙率および平均濾過比抵抗は、溶液の pH によって大きく変化することが明らかとなり、異種タンパク質間の静電的相互作用に着目することにより、その挙動を合理的に説明することができた。次いで、各タンパク質成分の混合割合の影響を検討した。各タンパク質が同符号に帯電する場合と異符号に帯電する場合とでは、ケーキの諸特性値に対する混合比の依存性はまったく異なることが明らかとなった。こうした濾過ケーキの諸特性値の解析はケーキ濾過モデルに基づいて行われるが、濾過を一旦休止し、しばらくして再び開始するデッドエンド濾過実験の結果から、2成分系タンパク質溶液の限外濾過に対するこのモデルの適用の妥当性が証明された。

第4章においては、限外濾過による2成分系タンパク質溶液の分画特性に及ぼす pH や電解質濃度などの溶液環境の影響を検討した。すなわち、各タンパク質成分が互いに同符号の電荷を持つ場合と、異符号の電荷を持つ場合の2種の pH 環境下について、それぞれ電解質の添加量あるいは各成分の濃度を種々に変化し、上向流型限外濾過における分画性能および濾過速度を比較した。いずれの pH においても、電解質を加えない場合には分画性能は著しく低いが、電解質を添加することによって改善されることが明らかとなった。

第5章においては、2成分系タンパク質溶液の効率的な分画の実現を目指し、濾過速度や溶質の阻止性（透過性）を支配すると考えられる種々の因子の影響を詳細に検討した。すなわち、第4章で示した溶液環境も含め、膜面に作用する剪断力や膜と溶質との相互作用も分画特性に対する影響因子であると考えられるため、種々の濾過方式で、種々の膜を用い、種々の pH および電解質濃度の条件下で、2成分系タンパク質溶液の限外濾過試験を行い、これらの実験データを比較・検討することにより、効率的な分画操作法を提案した。ま

た、最近、濾過器への超音波の照射が濾過速度の増大に顕著な効果をもたらすとして注目されていることから、分画操作に対しても効果的であるかどうかを検討したところ、超音波を照射することにより、高い分画性能を維持した状態で濾過速度を著しく増大させることが可能となり、その有効性が示された。



# 第1章 タンパク質溶液の限外濾過に関する 既往の研究

## 1-1 緒言

近年にみるバイオインダストリーやファインセラミック産業のようないわゆる高度先端技術産業の急速な発展に伴い、要求される分離精製技術の水準もかなりの高まりを示しているが、限外濾過をはじめとする膜分離操作がその要求に対応できる高度分離操作の一つであることは今や定説となっている。さらに限外濾過法は、熱を用いないことから、熱変性を引き起こすタンパク質の分離に有効であると考えられ、従来のタンパク質分離法に比べ、装置が単純で比較的安価であるほか大量処理が可能であり、しかもメンテナンスが簡便であるなど多くの特長を有している。しかし、操作の進行とともに濾過速度が低下するといった濾過全般に共通する欠点を持ち合わせており、これまで速度低下のメカニズムをより正確に記述するモデルの開発や、高効率な分離を目指した操作手法の開発が、多くの研究者によってなされてきた。最近では、多成分系タンパク質溶液の分画が注目を浴びているが、これまで主だった成果は得られていない。

本章では、初めに、従来より用いられてきた限外濾過に関する主要なモデルおよび本研究の解析に使用したケーキ濾過モデルについて説明する。次いで、タンパク質の特性として、タンパク質分子の荷電状態に関する定量的な記述を示す。さらに、タンパク質溶液の限外濾過に関する既往の研究を概述し、その問題点に触れつつ、2成分系タンパク質溶液の限外濾過に関する本研究の目的およびその背景を示す。

## 1-2 限外濾過の基礎

### 1-2-1 膜分離法における限外濾過の位置づけ

機械的な圧力を加え、種々の溶液中から特定の大きさ以上の固体をふるいの機構により分離する手法を濾過と称する。近年、高性能な分離膜の開発によって、かなり精密な分離が可能となり、濾過の応用範囲が驚くほど拡大した。膜分離法は、精密濾過、限外濾過、逆浸透法（超濾過）の3種類に分類され、分離対象となる粒子（溶質）の大きさによってそれぞれ使い分けられる。ふるいの目の大きさを比較すると、限外濾過は3種類の膜分離法の中で中間に位置し、主に粒径が非常に小さなコロイドや高分子量物質の分離に用いられる。限外濾過膜の細孔は極めて微細であり、電子顕微鏡などを用いても正確には測定できないことが多いため、その膜性能は一般に分画分子量をもって表示される。現在使用されている限外濾過膜の分画分子量の範囲は、およそ1,000から300,000である。

上述の分類は理論的取扱いの上においても極めて重要な意味を持っている。精密濾過においては、分離膜で捕捉される対象を粒子と考え、従来のケーキ濾過の延長上に位置づけられるのに対し、限外濾過では分子を分離対象物と考え、逆浸透法の延長上に位置づけられている。しかしながら、精密濾過と限外濾過とでは、その現象面において類似している点も多く、両者の限界や理論的取扱いの基本的な違いについては、現在のところまだ明らかにされていない。最近では、特に精密濾過と限外濾過との境界領域の分離技術が重要となっており、この理論的取扱いの解明が望まれている。

### 1-2-2 限外濾過挙動を表すモデル

限外濾過では、膜を透過する流れによって膜面に運ばれた溶質は、膜によって阻止されそこに蓄積するため、膜面の溶質濃度は原液本体の濃度よりも高くなる。この現象は濃度分極と呼ばれ、Fig. 1-1

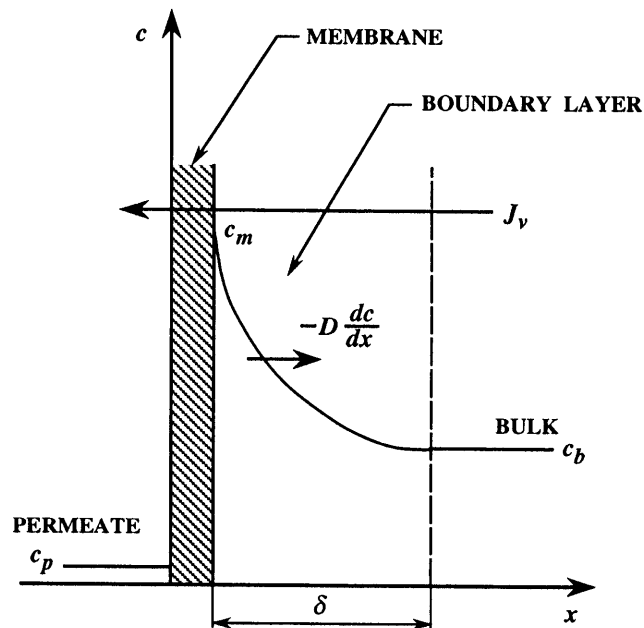


Fig. 1-1 Concentration polarization

のように膜面と原液本体との間の境界層に濃度勾配を生じる<sup>1)</sup>。このため、膜によって阻止された溶質は拡散によって原液本体へと戻っていく。溶質が見掛け上堆積しなくなる定常状態では、膜面に運ばれる溶質量は、拡散によって戻る量と膜を透過する量との和に等しくなるので、物質収支より次式が得られる。

$$J_v \cdot c = D(dc/dx) + J_s \quad (1-1)$$

ここに、 $J_s$ は溶質の透過流速であり、透過液流速  $J_v$ と  $J_s = J_v \cdot c_p$ の関係にある。この関係を用い、境界条件 ( $x=0$ で  $c=c_m$ ,  $x=\delta$ で  $c=c_b$ )のもとで Eq. (1-1)を積分すると、一般に濃度分極式と呼ばれる次式を得ることができる。

$$J_v = k' \ln \left\{ \frac{(c_m - c_p)}{(c_b - c_p)} \right\} \quad (1-2)$$

ここに、 $k'$  ( $=D/\delta$ ) は溶質の境膜物質移動係数で、物質移動の相関式から求められる<sup>2)</sup>。濃度分極は、透過流速の減少や限界流速の挙動に大きな影響を及ぼす。それらを説明するため、濃度分極モデルに基づき、種々のモデルが提案されている。以下に、その主なモデルとして(a)ゲル分極モデル、(b)浸透圧モデル、(c)境界層抵抗モデルを説明する。

(a) ゲル分極モデル<sup>3)</sup>

限外濾過法では、通常、高分子溶液を処理するが、高分子溶質の拡散係数は非常に小さく、濃度分極において膜面から原液本体へ拡散によって戻る溶質量は少ないため、結果として膜面濃度は非常に高くなる。この上昇した濃度が溶質のゲル濃度に達すると、膜面上にゲル層と呼ばれる非流動性の層が形成される。このゲル層は大きな透過抵抗を持つため、膜透過流速は著しく減少する。一度ゲル層が形成されると、その後圧力をさらに加えても、結局ゲル層の厚みが増加するので、膜透過流速は増加しない。このゲル分極モデルに基づくと、限界流速  $J_{lim}$  は、濃度分極式(1-2)において  $c_m$  をゲル層濃度  $c_g$  に置き換えることによって次式で表される。

$$J_{lim} = k' \ln \left\{ \frac{(c_g - c_p)}{(c_b - c_p)} \right\} \quad (1-3)$$

一般に、高い溶質阻止率の条件下で操作されることが多いため、Eq. (1-3)は次のように表すことができる。

$$J_{lim} = k' \ln(c_g / c_b) \quad (1-4)$$

ゲル分極モデルでは、ゲル濃度は溶質によって決まる一定値であり、操作条件には依存しないと考えられる。

(b) 浸透圧モデル<sup>4)</sup>

ゲル分極モデルにおいては、透過流速の減少はゲル層の透過抵抗によって説明されるが、浸透圧モデルにおいては、ゲル層は形成されないものと考え、浸透圧による有効圧力差の減少によって膜透過流速の減少および限界流速が説明される。

浸透圧モデルの基本となる膜透過流速式は、透過液の膜内流動において透過液の粘度  $\mu$  の影響を考慮すると、次式で表される。

$$J_v \equiv dv/d\theta = (p - \Delta\pi) / \mu R_m \quad (1-5)$$

一般に、限界流速が得られるような高分子溶質の浸透圧は、濃度に対して指数関数的に急激に上昇し、透過液の浸透圧は膜面のそれに比べて無視することができる。したがって、浸透圧差  $\Delta\pi$  は膜面濃度  $c_m$  のみの関数として与えることができる。

(c) 境界層抵抗モデル<sup>5)</sup>

浸透圧モデルでは、濃度分極によって生ずる境界層が膜透過流速に及ぼす影響を、膜表面での浸透圧によって説明しているが、これを境界層が有する水力学的透過抵抗によって説明しているのが、境界層抵抗モデルである。

境界層抵抗モデルにおける膜透過流速式は次式で与えられる。

$$J_v = (p - \Delta\pi) / \mu (R_m + R_{bl}) \quad (1-6)$$

Eq. (1-6)が示すように、境界層の透過抵抗  $R_{bl}$  は膜の抵抗  $R_m$  と直列に作用し、膜透過流速を減少させる。通常の限外濾過では、 $\Delta\pi$  は  $p$  に比べて十分小さく、Eq. (1-6)は次式に書き換えられる。

$$J_v = p / \mu (R_m + R_{bl}) \quad (1-7)$$

### 1-2-3 ケーク濾過理論

最近では、限外濾過挙動を説明するために、しばしばケーク濾過理論が適用される<sup>6-9)</sup>。ケーク濾過モデルでは、1-2-2において濃度分極層あるいはゲル層と呼ばれた膜面上の高濃度層を、濾過ケークであると捉え、従来のケーク濾過の場合と同様の理論的取り扱いを行う。タンパク質溶液の限外濾過に関するいくつかの研究によって、ケーク濾過理論が限外濾過挙動を説明するモデルとして妥当なことが裏付けられている<sup>6,7,10)</sup>。その点を踏まえ、本論文では、第2章以降、すべてケーク濾過モデルに基づいて考察を行った。

ケーク濾過については、Ruthが詳細な検討を行っており<sup>11,12)</sup>、特殊な場合を除いて、実用的にはRuthの提案した濾過理論によって濾過過程を説明することができる。Ruthのケーク濾過理論によると、透過液流速は次式で表される。

$$\frac{d\theta}{dv} = \frac{2}{K_v} (v + v_m) \quad (1-8)$$

ここに、 $v_m$ は濾材を仮想的ケークと置き換えたときの単位濾過面積あたりの仮想的濾液量である。また、 $K_v$ はRuthの定圧濾過係数で、次式により定義される。

$$K_v = \frac{2p(1 - ms)}{\mu\alpha_{av}\rho s} \quad (1-9)$$

Eq. (1-8)は、定圧濾過において、 $(d\theta/dv)$ 対 $v$ が $(2/K_v)$ の勾配をもった直線となることを示している。直線勾配から得られるEq. (1-9)中の $\alpha_{av}$ は平均濾過比抵抗と呼ばれ、濾過の効率を左右する極めて重要なパラメータである。 $\alpha_{av}$ と操作圧力 $p$ との関係は、実験式(1-10)で表される。

$$\alpha_{av} = \alpha_1 p^n \quad (1-10)$$

ここに、 $n$  は圧縮性指数と呼ばれ、ケーキの圧縮性の程度を示す指標となる。

実際の濾過ケーキは一般に均質ではなく、ケーキ表面付近は底部に比べてかなり湿潤であり、厳密にはケーキの内部状態を考慮して濾過過程の解析を行う必要がある。こうした濾過ケーキの圧縮性を考慮に入れたいわゆる近代濾過理論に関する研究は、白戸ら<sup>13)</sup>や Tiller ら<sup>14)</sup>など多くの研究者によって行われた。定圧濾過進行中の濾過ケーキを、模式的に Fig. 1-2 に示した。濾液は、濾過ケーキ内の各粒子の流動抵抗を受けつつ濾材面に向かって流れ、液圧  $p_L$  は次第に低下する。一方、ケーキ内の各粒子は、流動抵抗に相当したケ

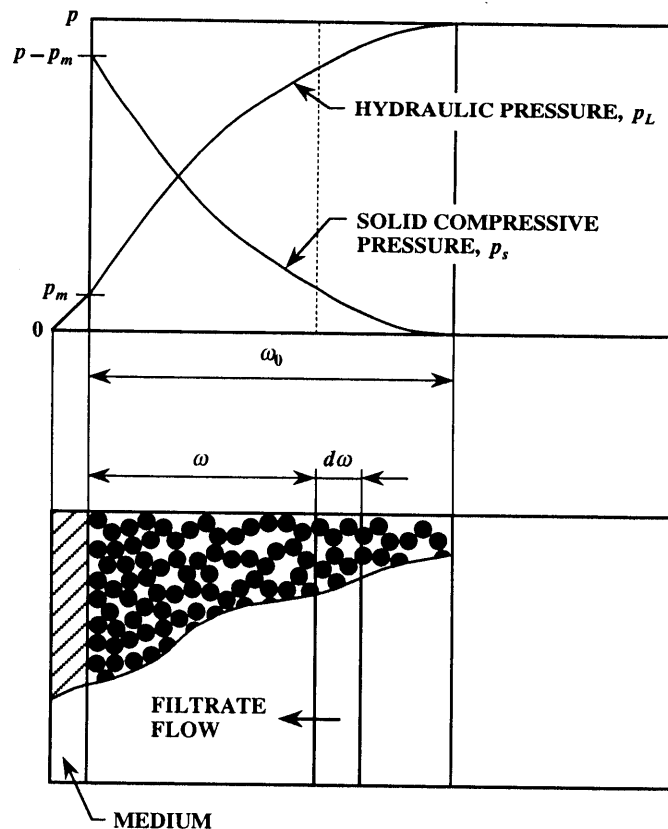


Fig. 1-2 Schematic diagram of cake

ーク圧縮圧力  $p_s$  を受け、この圧縮圧力は次々に加算されるため、濾材に近づくにつれて大きくなり、次式の関係が保たれる。

$$P = P_L + P_s \quad (1-11)$$

その結果、濾材に近づくにつれ、ケーキの空隙率は減少し、濾過比抵抗が増大する。この空隙の減少分だけ各位置で濾液が絞り出されるため、ケーキ内部の濾液流速は濾材に近づくほど増加する。

### 1-3 タンパク質分子間の静電的相互作用

タンパク質溶液中では、同種または異種のタンパク質間に静電的な相互作用が働き、これが第2章以降で検討する濾過ケーキの構造や分画特性に大きな影響を及ぼすと考えられる。この静電的相互作用について、コロイド科学の観点から以下に概説する。

#### 1-3-1 電気二重層と電位

帯電した粒子が水溶液中に存在すると、粒子の表面電荷と反対符号の対イオンが粒子近傍に集まり、そこに電気二重層が形成される。その様子を模式的に Fig. 1-3 に示した。

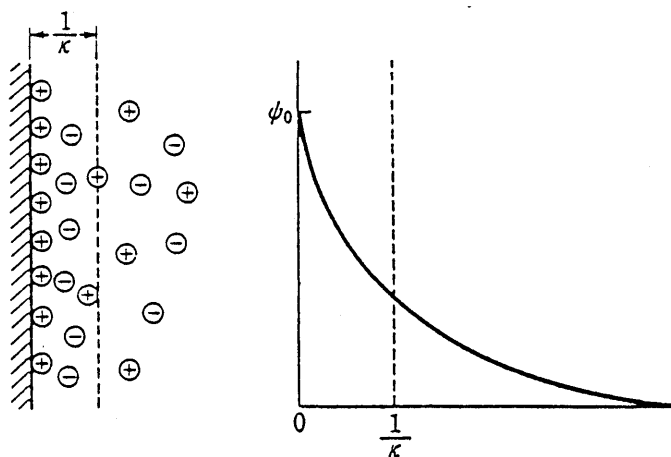


Fig. 1-3 Electrical double layer



図中の $(1/\kappa)$ は電気二重層の厚さを意味し、二重層効果の目やすに用いられる。ここに、

$$\kappa = \sqrt{\frac{8\pi n_0 z^2 e^2}{\epsilon k T}} \quad (1-12)$$

である。また、図中の $\psi_0$ は表面電位である。

粒子が界面動電現象を起こすとき、実際には、粒子を覆うある厚みをもった液層の外側の面において、溶液に対する相対運動（すべり）を起こしている。このすべり面における電位を $\zeta$ 電位と呼ぶ。 $\zeta$ 電位は、電気泳動移動度 $u$ を測定することにより、Eq. (1-13)で表される Smoluchowski の式から得ることができる<sup>15)</sup>。

$$u = \frac{\epsilon \zeta}{4\pi\mu} \quad (1-13)$$

Smoluchowski の式は、 $\kappa a \gg 1$ 、すなわち粒子径が電気二重層の厚さよりずっと大きな場合に適用される。タンパク質では、 $\kappa a$ が1より小さくなる場合もあり、この場合には、電気泳動を妨げる遅延効果の影響が無視できなくなるため、タンパク質の $\zeta$ 電位の計算に対しては、この点を考慮した次の Henry の式がよく使用される<sup>16)</sup>。

$$u = \frac{\epsilon \zeta}{6\pi\mu} f(\kappa a) \quad (1-14)$$

ここに、

$$f(\kappa a) = 1 + \frac{\kappa^2 a^2}{16} - \frac{5\kappa^3 a^3}{48} - \frac{\kappa^4 a^4}{96} + \frac{\kappa^5 a^5}{96} - \left( \frac{\kappa^4 a^4}{8} - \frac{\kappa^6 a^6}{96} \right) e^{\kappa a} \int_{\infty}^{\kappa a} \frac{e^{-t}}{t} dt \quad (1-15)$$

$\zeta$ 電位は、コロイド粒子の荷電状態を表す重要な物理化学的特性値

の一つであるが、表面電荷密度  $\sigma_0$  ( $=Ze/4\pi a^2$ ) もその一つである。 $\sigma_0$  は前述した  $\kappa$  あるいは  $\psi_0$  と次式の関係にある。

$$\sigma_0 = \frac{\epsilon\psi_0}{4\pi a}(1 + \kappa a) \quad (1-16)$$

粒子表面を近似的にすべり面と考え、 $\psi_0$  を  $\zeta$  に置き換えることが可能であれば、Eq. (1-16) は表面電荷密度と  $\zeta$  電位の相関を表す式ということにもなる。

### 1-3-2 DLVO 理論

帯電した二つの粒子が接近し、電気二重層が重なり合ったときに作用する力を定量的に取り扱った理論が、いわゆる DLVO (Derjaguin-Landau-Verway-Overbeek) 理論である<sup>17)</sup>。

タンパク質のように、表面電荷が表面解離基の解離に起因する球状粒子に対して、同種の粒子間に作用する静電的反発ポテンシャルエネルギー  $V_R$  は、粒子表面間距離  $H$  の関数として以下のように与えられる。

$$V_R(H) = -\frac{\epsilon a \psi_0^2}{2} \ln\{1 - \exp(-\kappa H)\} \quad (1-17)$$

一方、粒子間には London-van der Waals 引力と呼ばれる普遍的な引力が働いている。DLVO 理論では、この引力のポテンシャルエネルギー  $V_A$  と前述の  $V_R$  との和、すなわち全相互作用ポテンシャルに基づき、粒子懸濁液の分散・凝集の状態を検討している。Derjaguin<sup>18)</sup> や Wiese ら<sup>19)</sup> は、さらに DLVO 理論を拡張して、2種の異なる球状粒子間の相互作用のポテンシャルエネルギーを誘導した。

タンパク質の場合には、これらの作用力のほか、表面の水和層による分子間の立体障害的作用力も加わり、状況はさらに複雑となる。

#### 1-4 単一成分のタンパク質からなる濾過ケーキの構造

入谷ら<sup>8,20)</sup>は、タンパク質として等電点 5.1 の牛血清アルブミン (BSA) を使用し、その溶液を限外濾過したときに形成される濾過ケーキの諸特性値を実験的に測定した。以下に、彼らが検討したケーキの空隙率に及ぼす溶液環境の影響について述べる。

Fig. 1-4 に、濾過ケーキの平均空隙率  $\epsilon_{av}$  を pH に対して示した。等電点の pH 5.1 近傍で  $\epsilon_{av}$  は最小となり、等電点から離れるほど  $\epsilon_{av}$  は大きくなった。これは、BSA 分子間の静電的相互作用から説明することができる。等電点では BSA は電荷を持たず、BSA 分子間に静電的反発力が働かないので、ケーキは密な構造をとることができ、空隙率は小さくなる。また、等電点から離れると電荷が増大するため、分子間の静電的反発力の影響を受けて空隙率は大きくなる。タンパク質の限外濾過において、等電点で最も濾過速度が小さくなることはよく知られた事実であるが、以上の結果から、それはケーキの構造に由来するものであることがわかった。

Fig. 1-5 に、ケーキの平均空隙率  $\epsilon_{av}$  に及ぼす電解質 (NaCl) の濃度  $c_s$  の影響を示した。等電点以外の pH ではタンパク質はある実効電荷を持つが、NaCl を添加すると、電気二重層の圧縮により分子間の静電的反発作用が小さくなるため、ケーキはより緻密な構造となり、空隙率は低下する。しかし、等電点では逆の傾向を示し、NaCl 濃度の増大とともにわずかではあるが空隙率は増加する。等電点では実効電荷が 0 となるが、これはタンパク質分子に正と負の電荷が等しい数だけあるということで、分子の持つ総荷電量は最大となる。したがって、現象にタンパク質のミクロな構造が関与する場合には、この局所的な荷電の影響を考慮する必要がある。等電点の BSA に NaCl を添加すると、 $\text{Na}^+$  に比べ、 $\text{Cl}^-$  の方が BSA の正の荷電の部位に結合しやすく<sup>21)</sup>、分子は実効電荷を持つようになるため、分子間の静電的反発力により空隙率が徐々に増大するものと推察される。

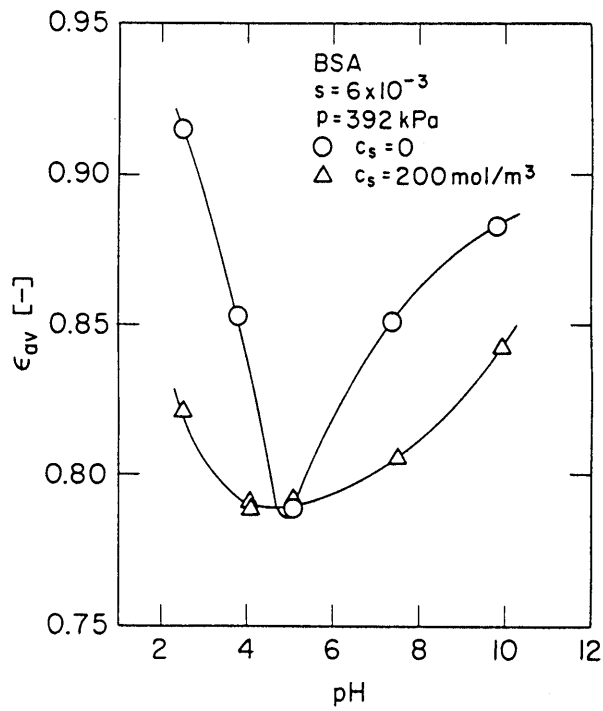


Fig. 1-4 Effects of pH on average porosity

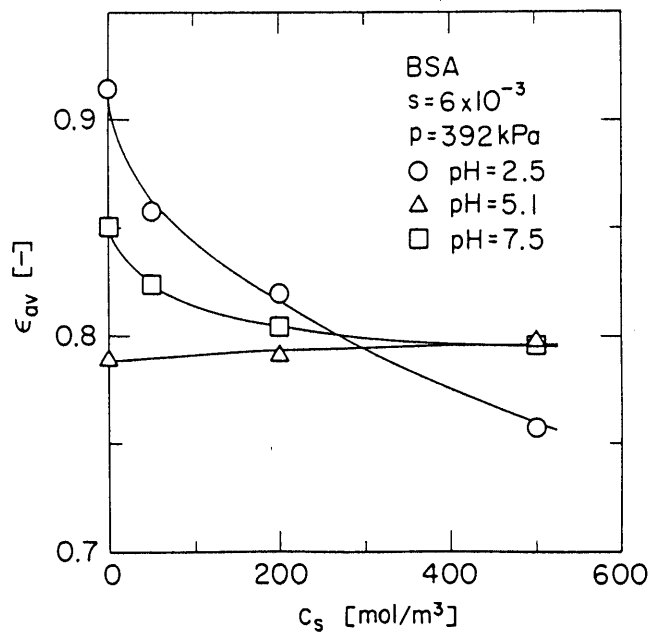


Fig. 1-5 Effects of NaCl concentration on average porosity

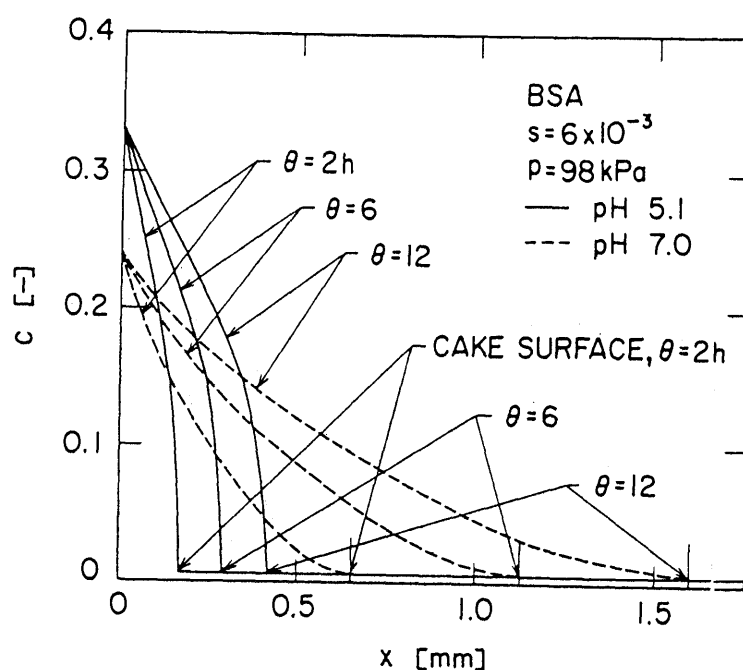


Fig. 1-6 Distribution of solute concentration in filter cake

以上の説明の妥当性を検証するため、タンパク質の電荷量や $\zeta$ 電位の測定に基づく定量的な考察が必要となる。本論文の第2章では、この点を考慮し、こうしたタンパク質分子の物理化学的特性値とケーキ構造との相関を検討した。

入谷ら<sup>8-10)</sup>はさらに、1-2-3で述べた近代濾過理論に基づき、限外濾過実験の結果を用いて、BSAからなる濾過ケーキの内部における濃度分布を計算した。また、BSA溶液の超遠心沈降試験から得られたデータを利用することによって、同様にケーキ内の濃度分布を解析したところ、限外濾過の実験データを用いた場合の計算結果とほぼ一致した。超遠心沈降データを利用した場合の解析結果をFig. 1-6に示した。タンパク質によって構成される濾過ケーキも、白戸ら<sup>13)</sup>が従来のケーキ濾過で得たケーキと同じく圧縮性を示し、膜面上でかなり緻密になり、ケーキ表面でかなり湿潤となった。

### 1-5 限外濾過における濾過速度の理論推定

限外濾過速度に及ぼす pH の影響については、浸透圧モデルに基づく Vilker ら<sup>22-24)</sup>の理論計算がよく知られている。BSA 溶液の浸透圧の pH 依存性を測定した彼らの結果によると、Fig. 1-7 に示すように、pH が BSA の等電点（ここでは 4.7）より大きくなるに従い、浸透圧は増加する傾向を示した。浸透圧モデルに基づく、図中の 3 種の pH の中で濾過速度が最も大きくなるのは、浸透圧の影響を最も受けにくい pH 4.5 ということになる。これは等電点において濾過速度が最小になるという、一般によく知られた傾向とは逆である。そこで彼らは、BSA の拡散係数が濾過速度に影響を与えているものと考え、その pH 依存性を考慮して濾過速度を推定した。その結果が Fig. 1-8 である。図では実測値と比較しているが、必ずしも計算値は実測値に一致しているわけではなく、濾過速度の pH 依存性を説明したとは言いがたい。

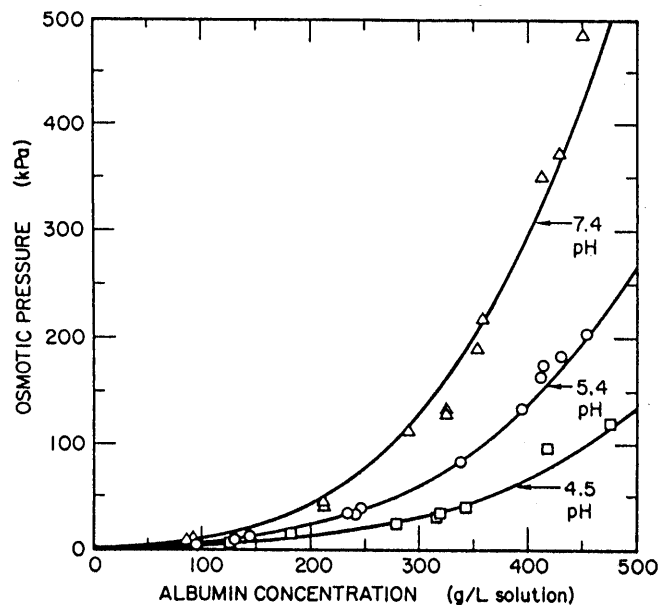


Fig. 1-7 Osmotic pressure as a function of BSA concentration

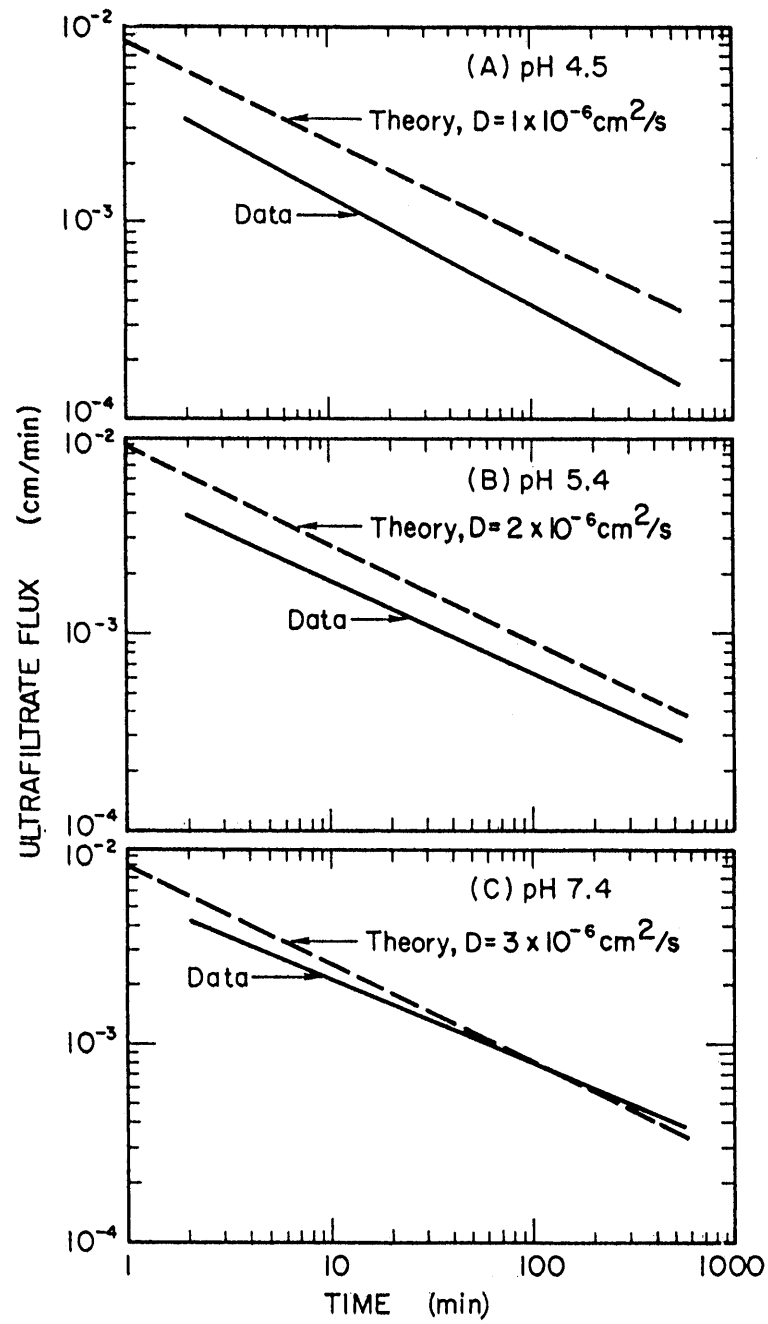


Fig. 1-8 Comparison between theoretical and experimental data of flux decline

Opong ら<sup>25)</sup>は、等電点で沈降速度が最も大きくなるという超遠心沈降データに基づき、濾過と沈降の相関から、等電点で濾過速度も最大となると述べている。しかし、これも事実とは逆である。この矛盾は結局のところ、1-4で説明した静電的相互作用の影響を考慮していないことに起因する。入谷ら<sup>10)</sup>はこの影響を踏まえた上で、超遠心沈降データを用いて、ケーキ濾過モデルに基づく理論計算を行った。Fig. 1-9はBSA溶液の限外濾過に対する計算結果であるが、実線で表される計算値は実測値と概ね一致しており、しかも濾過速度のpH依存性をよく説明している。彼らの研究成果は限外濾過の研究に対するケーキ濾過モデルの適用の妥当性を証明しているともいえるので、本論文においてもケーキ濾過モデルを適用した。

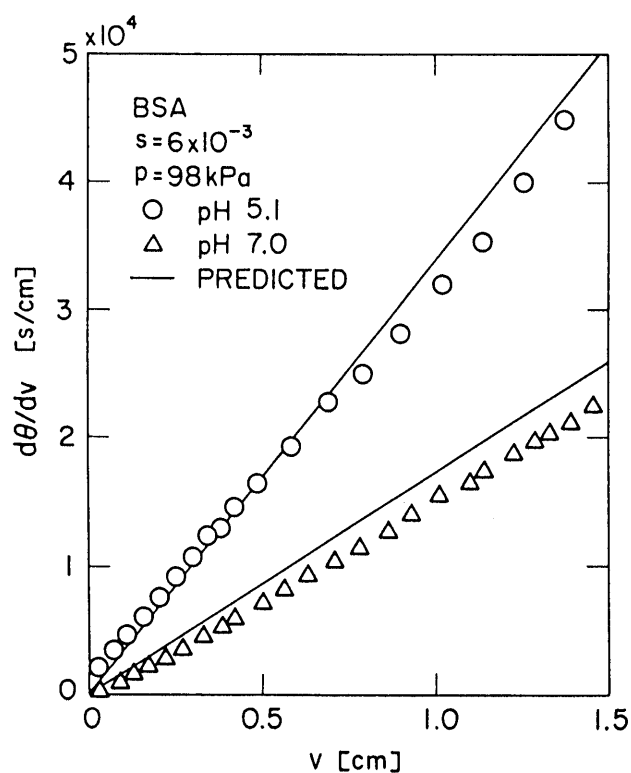


Fig. 1-9 Evaluation of reciprocal filtration rate in ultrafiltration of BSA solution based upon cake filtration model



最近では、Bowenら<sup>26)</sup>による濾過速度の推定をはじめ、タンパク質分子間に働く相互作用力を考慮した取り扱いも試みられるようになってきている。こうした相互作用力とケーキ構造との関連など、さらに詳細な考察が必要とされる。

### 1-6 濾過ケーキに作用する外力の影響

中塚ら<sup>27)</sup>は、タンパク質としてミオグロビンを用い、分画分子量から判断すると十分ミオグロビンを透過するとされる限外濾過膜を使用して、攪拌型および非攪拌型の濾過を行い、フラックスおよびミオグロビンの膜透過性について検討した。Fig. 1-10にその結果を

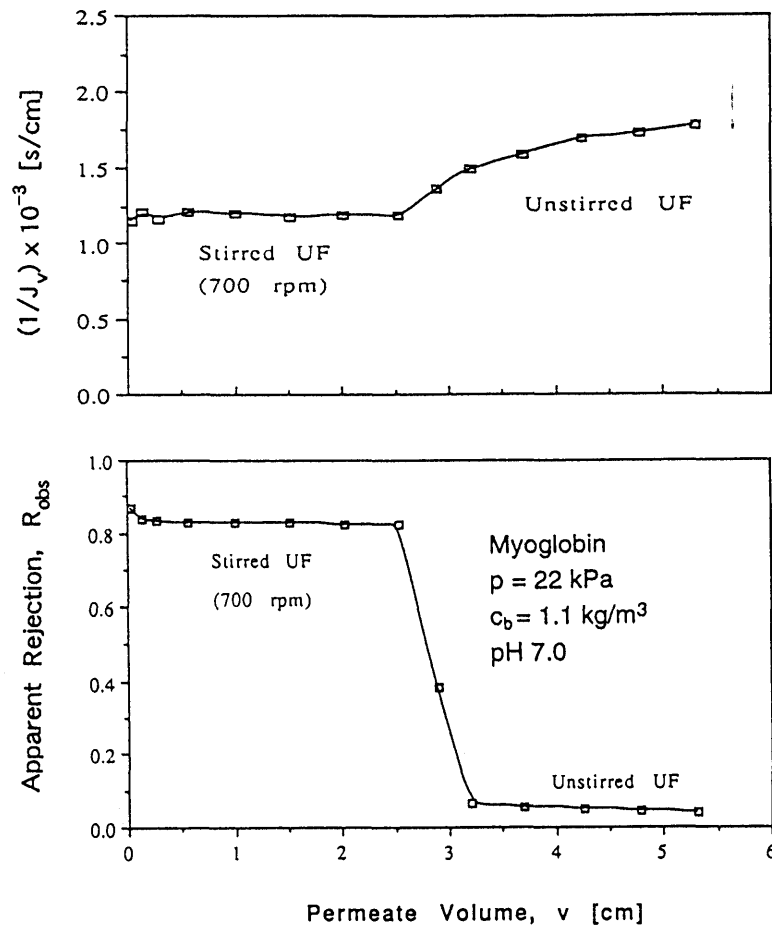


Fig. 1-10 Variation of reciprocal flux and apparent rejection as function of permeate volume during stirred and unstirred ultrafiltration

示す。700rpm の攪拌速度で濾過を行ったところ、透過液流速は極めて大きくなり、純水透過流速とほぼ同じ程度になった。一方、ミオグロビンの阻止率はおよそ 0.8 となり、ミオグロビンの膜透過が著しく妨げられた。さらに、濾過の途中で攪拌を休止した結果、フラックスは低下し、ミオグロビンはほとんど透過するようになった。本論文では、2 成分系タンパク質溶液の分画操作を扱うが、彼らの結果は、効率的な分画を行うためには膜面に及ぼす剪断力を制御することが重要となるであろうことを示唆している。本論文の第 5 章において、これに関連する研究成果を述べる。

最近、限外濾過流速の著しい低下を引き起こす透過抵抗の大きな膜面堆積層（ケーキ、ゲル）に超音波を照射し、その振動エネルギーにより流速の改善を試みる研究が行われ始めている。国眼ら<sup>28)</sup>は、セラミック膜モジュールを用いて、卵白アルブミン、ポリビニルア

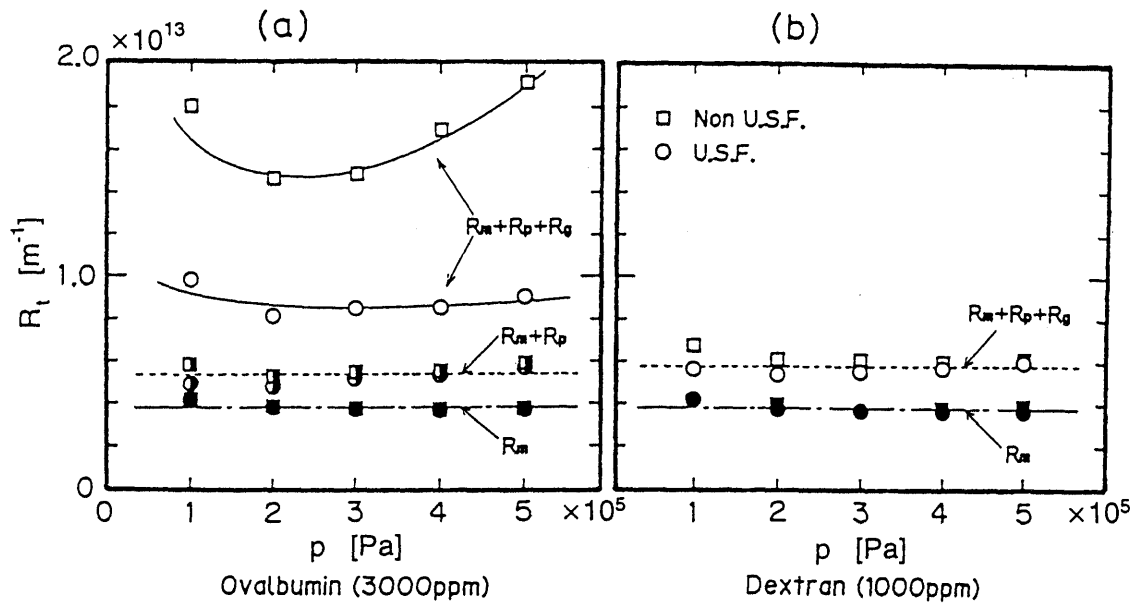


Fig. 1-11 Effects of ultrasonic irradiation on permeation resistance for ovalbumin solution (a) and dextran solution (b)

ルコール、デキストランの各溶液の限外濾過試験を行い、モジュールの一部に超音波を照射したとき濾過特性に与える影響について検討した。Fig. 1-11 は、それぞれ卵白アルブミン(a)およびデキストラン(b)を使用したときに生じる透過抵抗を、超音波を照射した場合(丸形のプロット)と照射しない場合(四角形のプロット)とで比較したものである。卵白アルブミンのゲル抵抗  $R_g$  は超音波の照射によって著しく低下したが、ゲル層が生じにくいとされるデキストランにはほとんど超音波の効果は表れなかった。また、膜細孔内のファウリングによる抵抗  $R_p$  は、超音波を照射してもほとんど減少することはなかった。このように、彼らの研究は、ゲル層を形成するタンパク質溶液の限外濾過に対して、超音波の照射が有効であることを指摘しているが、2成分系タンパク質溶液の分画操作に対する超音波照射の有効性についてはこれまで明らかにされていない。そこで、本論文の第5章において、2成分の分画に対する超音波照射の効果を説明する。

## 第2章 濾過ケーキの構造に及ぼすタンパク質の荷電状態の影響

### 2-1 緒言

タンパク質溶液の限外濾過操作は実用上ますます重要さを増しつつあり、各種の分野において適用されている。そのため、タンパク質溶液の限外濾過特性について数多くの研究が行われ、現在までにかなりの知見が明らかにされている。しかし、これらの研究は定性的な検討を扱ったものがほとんどであり<sup>8,29-35)</sup>、濾過現象を物理化学的見地から定量的に考察することに関しては、その複雑さから、これまで十分になされていないのが現状である。最近では、限外濾過速度をタンパク質の電荷に関係づける試みもいくつか報告され始めているが<sup>36,37)</sup>、その成果は十分とはいえない。

濾過法を適用する上で常に問題視される濾過速度の著しい低下は、主に膜面上における濾過ケーキの形成に起因するものであることから、その構造を把握することが極めて重要となる。ケーキ構造の基礎的特性値である平均空隙率や平均濾過比抵抗は、濾過面積が途中で急縮小する濾過実験装置を用いることによって精度良く測定することができ<sup>38)</sup>、タンパク質の限外濾過に対しても適用することが可能である<sup>8)</sup>。タンパク質からなるこうした濾過ケーキの諸特性値はpHの影響を顕著に受けることが既に明らかにされている<sup>8,9,20)</sup>。そこで本章でも同様に、種々のpH条件下でタンパク質溶液のデッドエンド定圧限外濾過試験を行い、濾過面積の急縮小効果を利用してケーキの平均空隙率および平均濾過比抵抗を求めた。さらにタンパク質分子の荷電状態を定量的に取り扱うための物理化学的特性値である電位や表面電荷密度を種々のpHについて測定し、濾過ケーキの構造とタンパク質の荷電状態との相関を検討した。

## 2-2 実験装置および方法

本章の研究で使用するモデルタンパク質試料は、分子量が 67,000 の牛血清アルブミン(BSA)(フラクシオン V, 純度 96-99%, 片山化学工業(株))である。粉末状の BSA を純水に溶解し、マグネットスターラーで 2 時間攪拌することにより均一な濃度の試料溶液を調製した。さらに溶液を目的の pH に調整するため、0.1N 塩酸 (pH を酸性側に調整) あるいは 0.1N 水酸化ナトリウム水溶液 (pH をアルカリ性側に調整) を添加した。すべての濾過実験に対して、BSA の質量分率  $s$  は  $6 \times 10^{-3}$  である。実験に用いた純水は、水道水をミリポア(株)製の MILLI-RO 逆浸透純水装置に通した後、同社製の MILLI-Q SP UF 超純水製造装置に通して作製した。得られた純水の比抵抗値は、 $18 \text{M}\Omega \cdot \text{cm}$  以上である。分離膜には、疎水性のポリスルホン製限外濾過膜 (PTGC, ミリポア(株)) を使用した。PTGC 膜の公称分画分子量は 1 万であり、分子量 67,000 の BSA をほぼ完全に阻止することができる。

pH による BSA の荷電状態の変化を定量的に見積もるため、その指標となる  $\zeta$  電位および表面電荷密度  $\sigma_0$  をそれぞれ種々の pH について測定した。 $\sigma_0$  を求めるため、自動滴定装置 (COMTITE-101, 平沼産業(株)) を用いて、BSA 溶液を 0.1N 塩酸および 0.1N 水酸化ナトリウム水溶液で滴定した。得られた滴定曲線から BSA 1 分子あたりの電荷量  $Z$  を算出し<sup>22)</sup>、BSA 分子が  $14 \times 4 \times 4 \text{nm}$  の回転楕円体であることを考慮して  $\sigma_0$  に換算した。また、電気泳動光散乱光度計 (ELS-800, 大塚電子(株)) を用いて BSA 分子の電気泳動移動度  $u$  を測定し、 $\zeta$  電位に変換した。BSA の場合、電気泳動時に生じる遅延効果を考慮する必要があるため、変換式として Henry の式(1-14)を使用した<sup>16)</sup>。

$$u = \frac{\varepsilon\zeta}{6\pi\mu} f(\kappa a) \quad (1-14)$$

Fig. 2-1 に実験装置の概要を示す。限外濾過膜を装備し BSA 溶液を満たした有効濾過面積  $24.6\text{cm}^2$  のバッチ式濾過試験器に、窒素ガスで  $294\text{kPa}$  の一定圧力を作用させ、非攪拌のデッドエンド限外濾過試験を行った。タイマー付き電子プリンター (EP-50, 島津製作所株) が接続された上皿電子天秤 (LIBROR EB-3200H, 島津製作所株) を使用し、タイマーの時間間隔を任意に設定することにより濾液質量の経時変化を測定した。データ整理の便宜上、得られた濾液質量は密度を用いて体積に換算した。実験終了後、濾液の一部を吸光度測定用セルに採取し、デジタルダブルビーム分光光度計 (UV-150-02, 島津製作所株) による測定結果から濾液への BSA の漏出がないことを確認した。Fig. 2-2 に、実験進行中におけるバッチ式濾過器の内部の状態を図示する。このバッチ式濾過器は特殊な構造になっており、図に示されるように内部に多孔板が組み込まれている。膜面からこの多孔板の底面までの距離  $h$  は  $0.4\text{mm}$  である。ケーキ厚みが  $0.4\text{mm}$  を越えない濾過初期においては、図の(a)のように、有効濾過面積は一定に保たれるが、ケーキ表面が多孔板底面に達した瞬間濾過面積は急縮小し、その後濾過は(b)に示される状態で進行する。この濾過面積急縮小実験の結果から、濾過ケーキの平均空隙率を計算することができる (2-3-2 において詳述)。

## 2-3 実験結果および考察

### 2-3-1 試料タンパク質の荷電特性

測定した BSA の  $\zeta$  電位および表面電荷密度  $\sigma_0$  を、pH に対して Fig. 2-3 に示した。pH 5.1 において  $\zeta=0$ ,  $\sigma_0=0$ 、すなわち BSA の実効電荷が 0 となることから、使用した BSA の等電点 (pI) は約 5.1 であることがわかる。また、BSA 分子は等電点より酸性側の pH 領域で

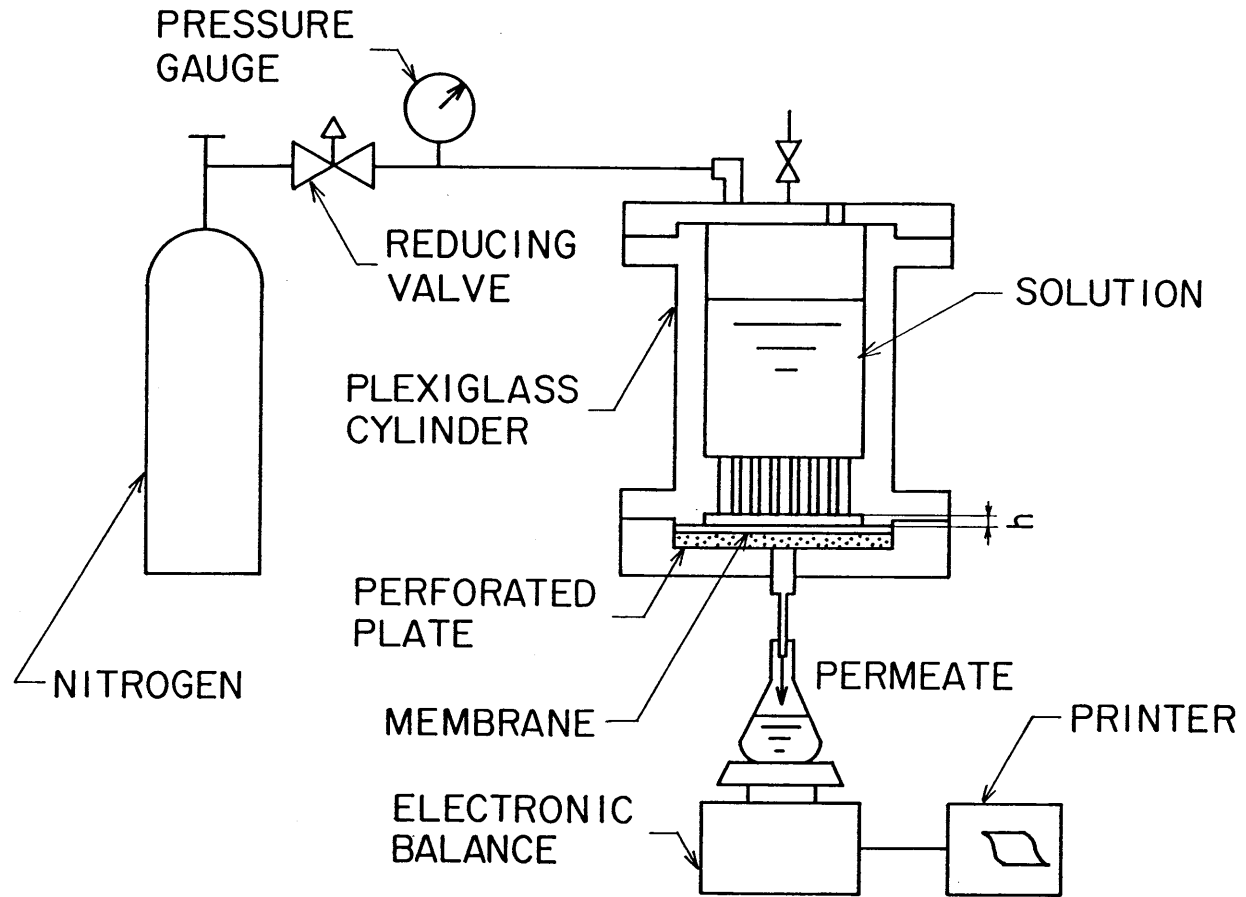
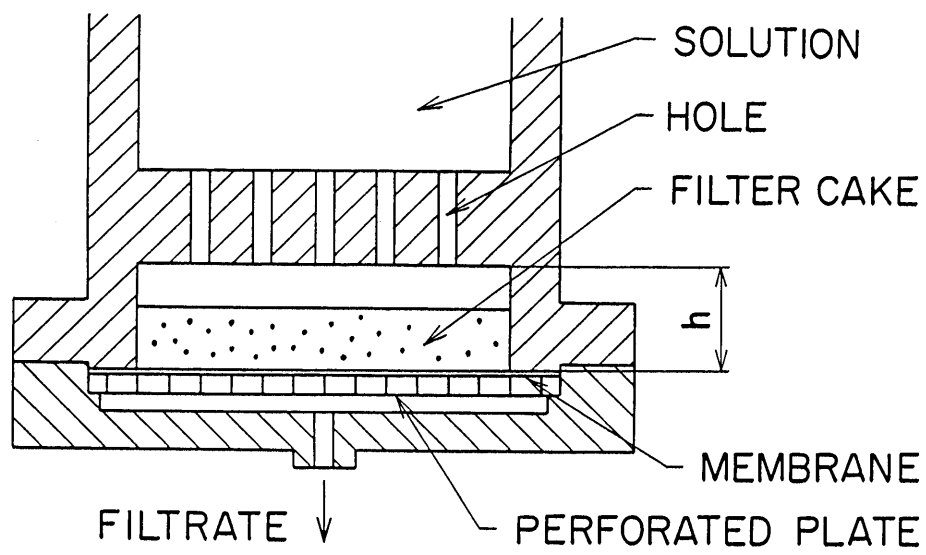
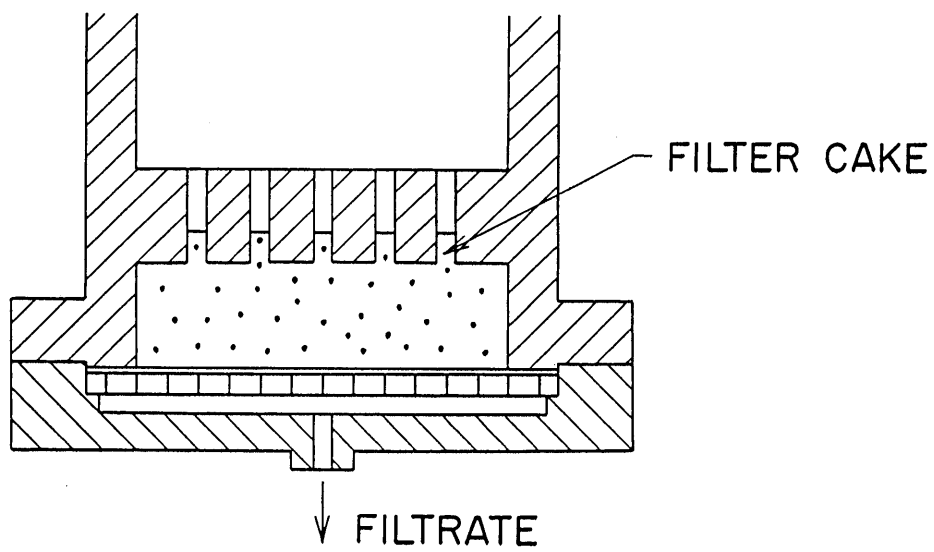


Fig. 2-1 Schematic diagram of ultrafiltration apparatus having sudden reduction in its filtration area



(a) CONSTANT FILTRATION AREA



(b) SUDDEN REDUCTION  
IN FILTRATION AREA

Fig. 2-2 Mechanism of measurement of properties of filter cake



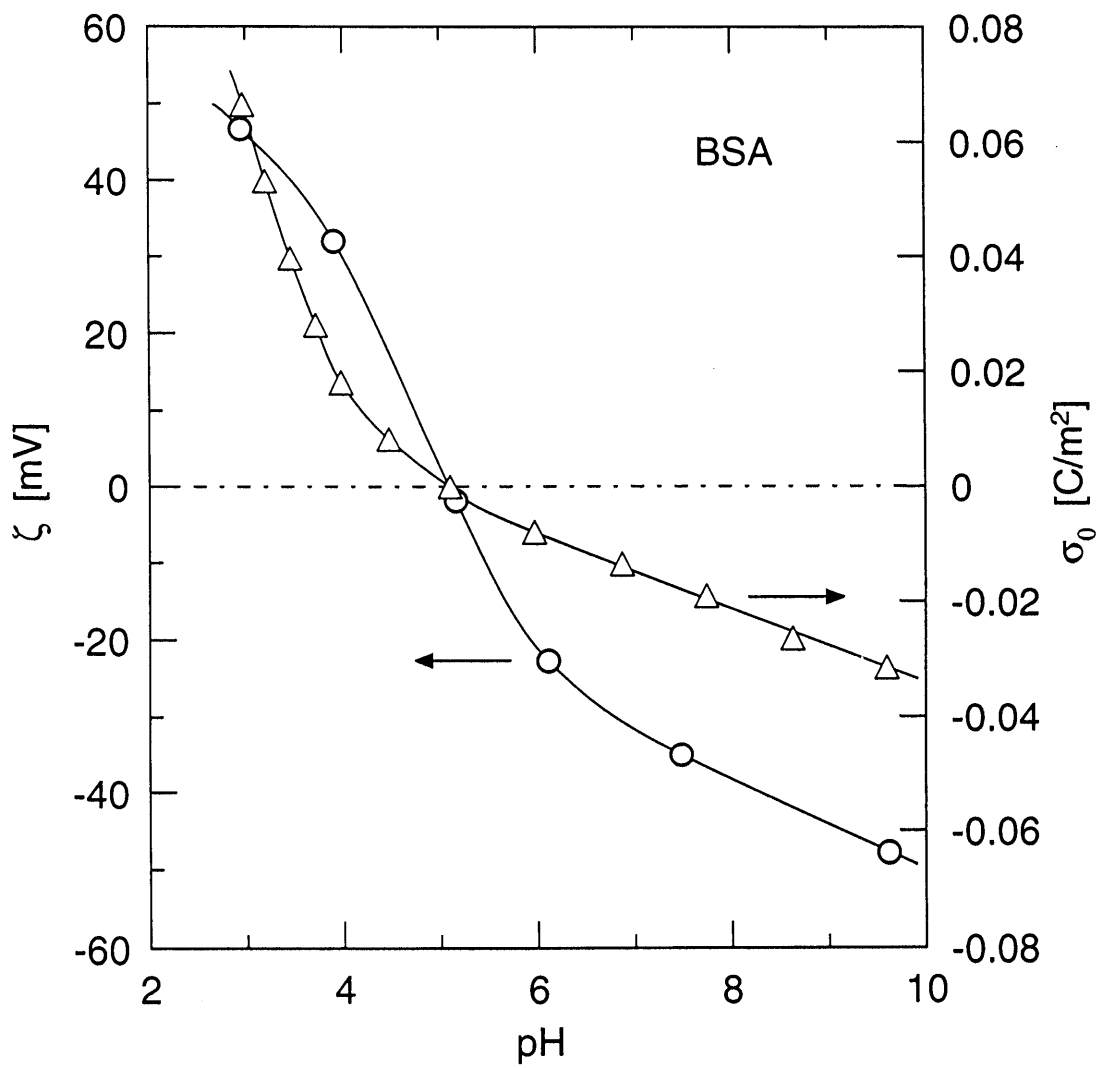


Fig. 2-3 Zeta potential and surface charge density of BSA

正、アルカリ性側の pH 領域で負の実効電荷を持ち、その絶対値は等電点から離れるにしたがって増加する。その曲線の傾向と Eq. (1-17) (表面電位  $\psi_0$  は近似的に  $\zeta$  電位に等しい) から、溶液中における BSA 分子間の静電的反発力は等電点から離れるほど大きくなることが予想される。1-3-1 で述べたが、 $\zeta$  電位は Eq. (1-16) の表面電位  $\psi_0$  を  $\zeta$  に置き換えて整理した Eq. (2-1) を用いて  $\sigma_0$  から変換することによっても得ることができる。

$$\zeta = \frac{4\pi a \sigma_0}{\epsilon(1 + \kappa a)} \quad (2-1)$$

しかし、その計算値と実測された  $\zeta$  電位とは実際には一致しなかった。例えば、pH 6.1 において実測された値は Fig. 2-3 より  $\zeta = -23\text{mV}$  であるのに対し、Eq. (2-1) から計算した値は  $\zeta = -37\text{mV}$  であった。同様の傾向が de Rooy ら<sup>39)</sup>によっても報告されている。滴定法によって求めた表面電荷  $Z$  は、実際には表面の電荷量だけでなく BSA 分子の内部に存在する電荷量をも含んでいる可能性があり、 $\zeta$  電位の計算値が実測値より大きくなった原因は主にその点にあるのではないかと考えられるが、詳細は不明である。以下の検討では、実測した  $\zeta$  電位および  $\sigma_0$  を使用する。

### 2-3-2 濾過ケーキ諸特性値の決定法

Fig. 2-4 に濾過面積急縮小型限外濾過の一例として、等電点近傍の pH 5.2 における実験結果を示す。この図は濾過速度の逆数 ( $d\theta/dv$ ) を単位膜面積あたりの濾液量  $v$  に対してプロットしたものである。ケーキ表面が多孔板の底面、すなわち濾過面積の急縮小面に達するまでの濾過の初期段階においては、ケーキ濾過モデルに基づく Eq. (1-8) に従い、通常为非攪拌型デッドエンド定圧濾過の場合と同様、ほぼ直線関係を示す<sup>8,9)</sup>。

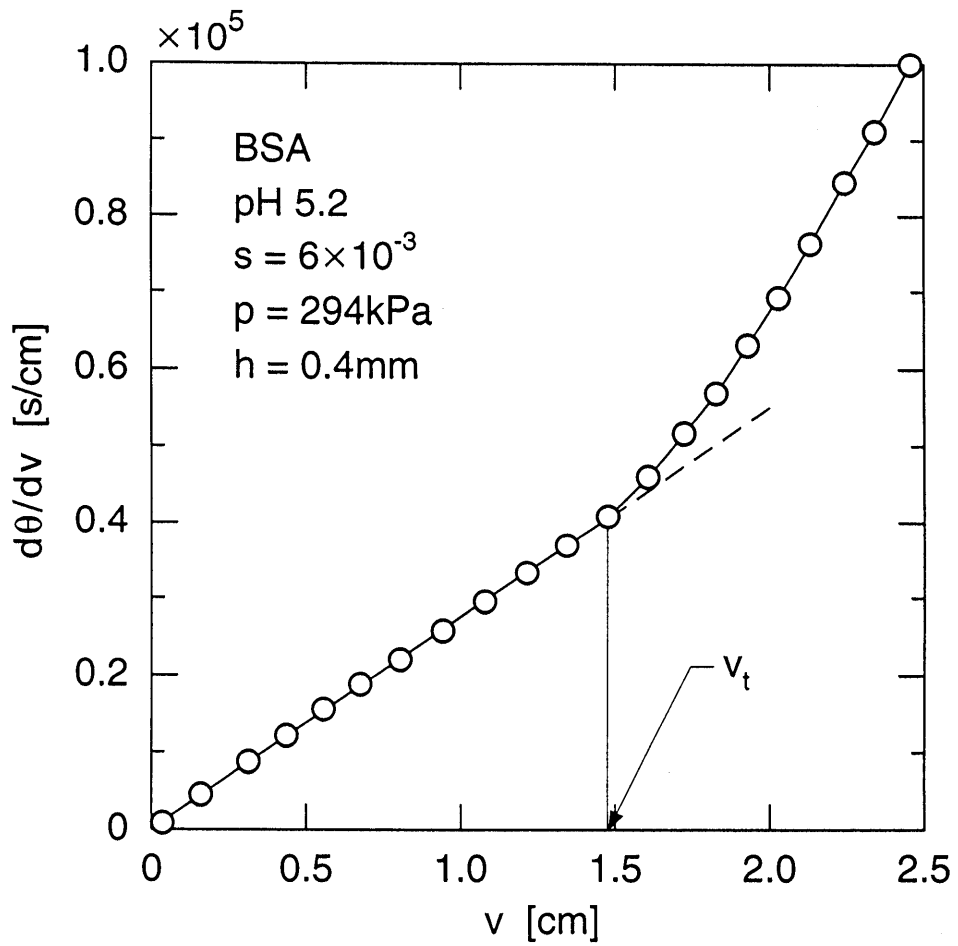


Fig. 2-4 Relation between reciprocal filtration rate and filtrate volume per unit membrane area

$$\frac{d\theta}{dv} = \frac{2}{K_v}(v + v_m) \quad (1-8)$$

ここに、 $K_v$ はRuthの定圧濾過係数で、次式により定義される。

$$K_v = \frac{2p(1 - ms)}{\mu\alpha_{av}\rho s} \quad (1-9)$$

Eq. (1-9)の  $m$  はケーキの湿乾質量比であり、ケーキの平均空隙率  $\varepsilon_{av}$  と次式の関係が成り立つ。

$$m = 1 + \frac{\rho\varepsilon_{av}}{\rho_s(1 - \varepsilon_{av})} \quad (2-2)$$

さらに濾過が進行し、形成される濾過ケーキの表面がちょうど濾過面積急縮小面に達すると、図に示されるようにプロットは直線から大きく偏倚し、 $(d\theta/dv)$ 値は著しく増大する。この移行点での  $v$  の値を  $v_t$  とし、このときのケーキ厚さが多孔板底面までの高さ  $h$  に等しいことを考慮すれば、物質収支より Eq. (2-3)が導かれ、濾過ケーキの平均空隙率  $\varepsilon_{av}$  が計算できる<sup>8,9)</sup>。

$$\varepsilon_{av} = \frac{\rho_s h(1 - s) - \rho s v_t}{\rho_s h(1 - s) + \rho s h} \quad (2-3)$$

さらに、求めた  $\varepsilon_{av}$  の値を Eq. (2-2)に代入することによって得られる湿乾質量比  $m$  と、濾過初期の直線勾配の値から求められる定圧濾過係数  $K_v$ を用いて、Eq. (1-9)により濾過ケーキの平均濾過比抵抗  $\alpha_{av}$  を計算することができる。

本章ではケーキ濾過モデルに基づいて検討したが、濾過初期における  $(d\theta/dv)$ 対  $v$  のプロットの直線性は浸透圧モデルによっても<sup>4,23)</sup>、あるいはゲル分極モデルによっても<sup>40)</sup>説明することができる。ケーキ濾過モデルでは濾過の進行に伴う濾過速度の減少傾向を、膜面に

運ばれた溶質の堆積による水力的抵抗の増大に起因するものとして  
いる。これに対し、浸透圧モデルでは、膜面上に溶質による濃度分  
極層が形成されることによって浸透圧が作用圧力と逆向きに働き、  
結果として濾過の推進力が実質的に低下するため流速低下が起こる  
と捉えている。膜面に堆積したタンパク質分子の層をケーキとみな  
して物質収支による解析を行う場合、一旦層を形成したタンパク質  
分子は再び溶液本体中に拡散移動しないことが前提となる。このこ  
とは既に実験的に証明されているため<sup>6,7)</sup>、本章における実験結果の  
解析に際し、ケーキ濾過モデルを適用するのは妥当である。このこ  
とについて、さらに 3-3-1 で詳細に述べる。

### 2-3-3 濾過ケーキと荷電状態との相関

以上の測定法に従って求めた濾過ケーキの平均空隙率  $\epsilon_{av}$  および平  
均濾過比抵抗  $\alpha_{av}$  を、pH に対して Fig. 2-5 にプロットした。 $\epsilon_{av}$  の値  
は 0.83 から 0.95 の範囲に分布しており、かなり大きな値を示した。  
BSA 分子は実際には水和しているため、溶媒が自由に動くことがで  
きる空間という意味での空隙はこれより小さくなる<sup>10,20)</sup> (本研究で  
いう空隙とは溶質の乾燥固体以外の空間を指し、 $s$  および  $\rho_s$  は溶質  
の乾燥質量を基準とした値である)。また、 $\epsilon_{av}$  はケーキ全体の総括  
的な平均値であり、実際には Fig. 1-6 に示されるように、かなり高  
濃度となる膜面近傍から本体濃度に近いケーキ表面にかけて空隙率  
は大きく変化している<sup>8,10)</sup>。さらに、他の多くの研究者によっても同  
程度の空隙率が観測されている(3-3-2 参照)。したがって、図に示  
された  $\epsilon_{av}$  の値は決して大きすぎることはない、十分に起こり得る値  
であるといえる。また、 $\alpha_{av}$  の値も BSA の濾過実験より得られたい  
くつかの文献値<sup>41,42)</sup>と同程度であることが確認された。

図に示されるように  $\epsilon_{av}$ 、 $\alpha_{av}$  のいずれも pH によって大きく変化し  
ており、タンパク質の限外濾過特性は pH の影響を顕著に受けること

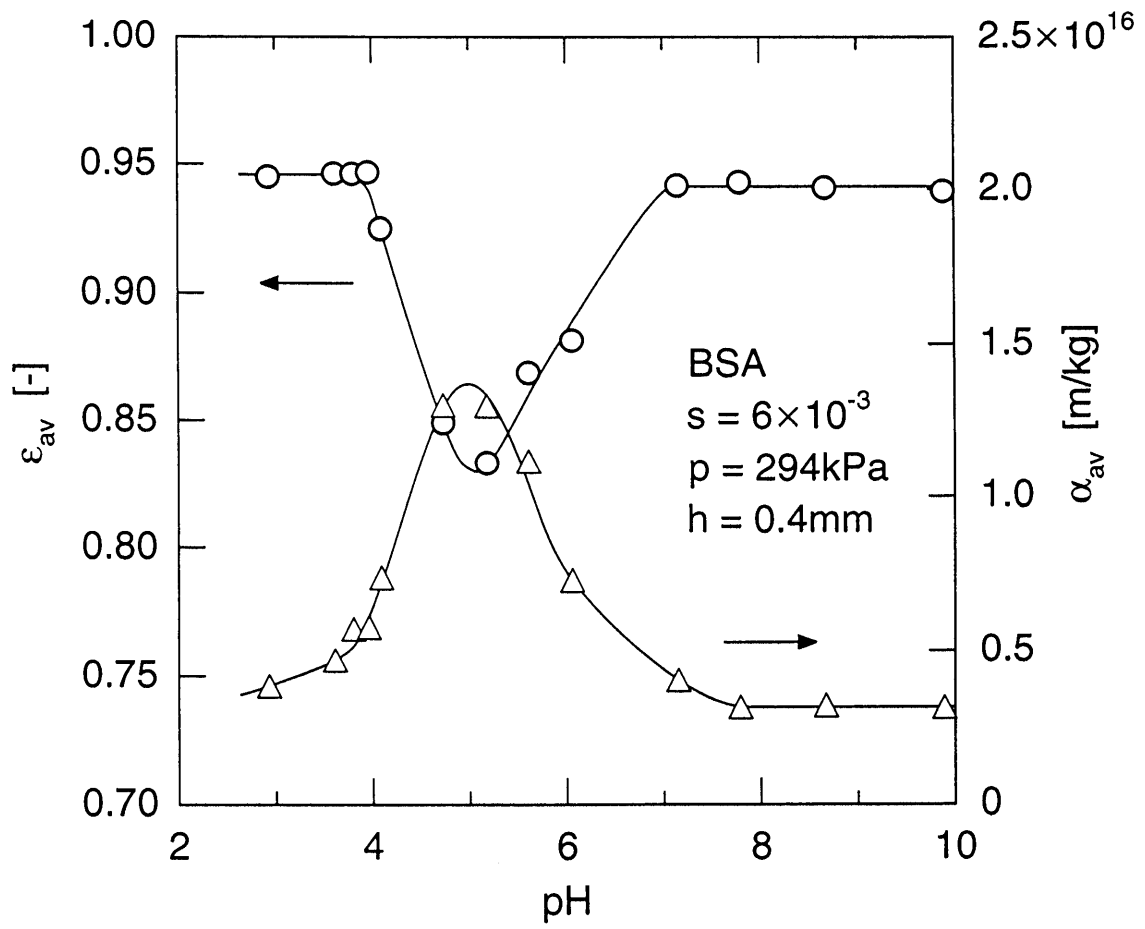


Fig. 2-5 Effect of pH on average porosity and average specific filtration resistance

が裏付けられた。 $\epsilon_{av}$ はBSAの等電点であるpH 5.1近傍で最小となり、濾過ケーキはここで最も緻密な構造をとった。等電点ではBSAの正味の電荷が0となるため、BSA分子間に静電的反発力が働かず、しかも、表面の水和層がBSA分子を保護しているため、その立体障害的作用によりBSAは凝集を起こさず、結果的に密なケーキ構造となる。等電点より酸性側になるほど正電荷が増大し、またアルカリ性側になるほど負電荷が増大するため、BSA分子間の静電的反発力は次第に大きくなり、 $\epsilon_{av}$ は等電点から離れるほど増大する傾向を示した。さらにpHが等電点から離れると、 $\epsilon_{av}$ はほぼ一定値を示すようになった。これはケーキにおけるBSAの充填構造が最も疎な状態に達したためであると推察される。一方、 $\epsilon_{av}$ とは対照的に $\alpha_{av}$ は等電点近傍で最大値をとり、等電点から離れるほど減少する傾向を示した。 $\alpha_{av}$ はケーキを透過する溶媒の流れにくさを示すものであり、濾過速度の指標となる値である。一般にケーキが緻密になるほど流動抵抗は増大する傾向を示すことが知られており、図の $\epsilon_{av}$ と $\alpha_{av}$ のプロットは、その点でよく対応しているといえる。

以上の $\epsilon_{av}$ および $\alpha_{av}$ の値を、Fig. 2-3に基づき、各pHに対応する $\zeta$ 電位の絶対値に対してFig. 2-6にプロットした。等電点すなわち $\zeta=0$ で $\epsilon_{av}$ が最小となり、かつ $\alpha_{av}$ が最大となることがこの図からもよく理解できる。さらに、BSA分子が電荷を持つようになり $\zeta$ 電位の絶対値が大きくなるにつれ、同符号の電荷を持ったBSA分子間の静電的反発力が増加することを受けて $\epsilon_{av}$ は増大、 $\alpha_{av}$ は減少し、やがて一定値を示すようになる。その $\epsilon_{av}$ の増加傾向と $\alpha_{av}$ の減少傾向は非常によく対応している。ここで、 $\epsilon_{av}$ および $\alpha_{av}$ のプロットにあまりばらつきがなく、いずれもほぼ一本の曲線上に沿っているところは特に注目すべきである。このことから、タンパク質の濾過における濾過ケーキの構造は構成分子の $\zeta$ 電位の絶対値に大きく依存し、その正負には無関係であるものと考えられる。DLVO理論<sup>17)</sup>によれ

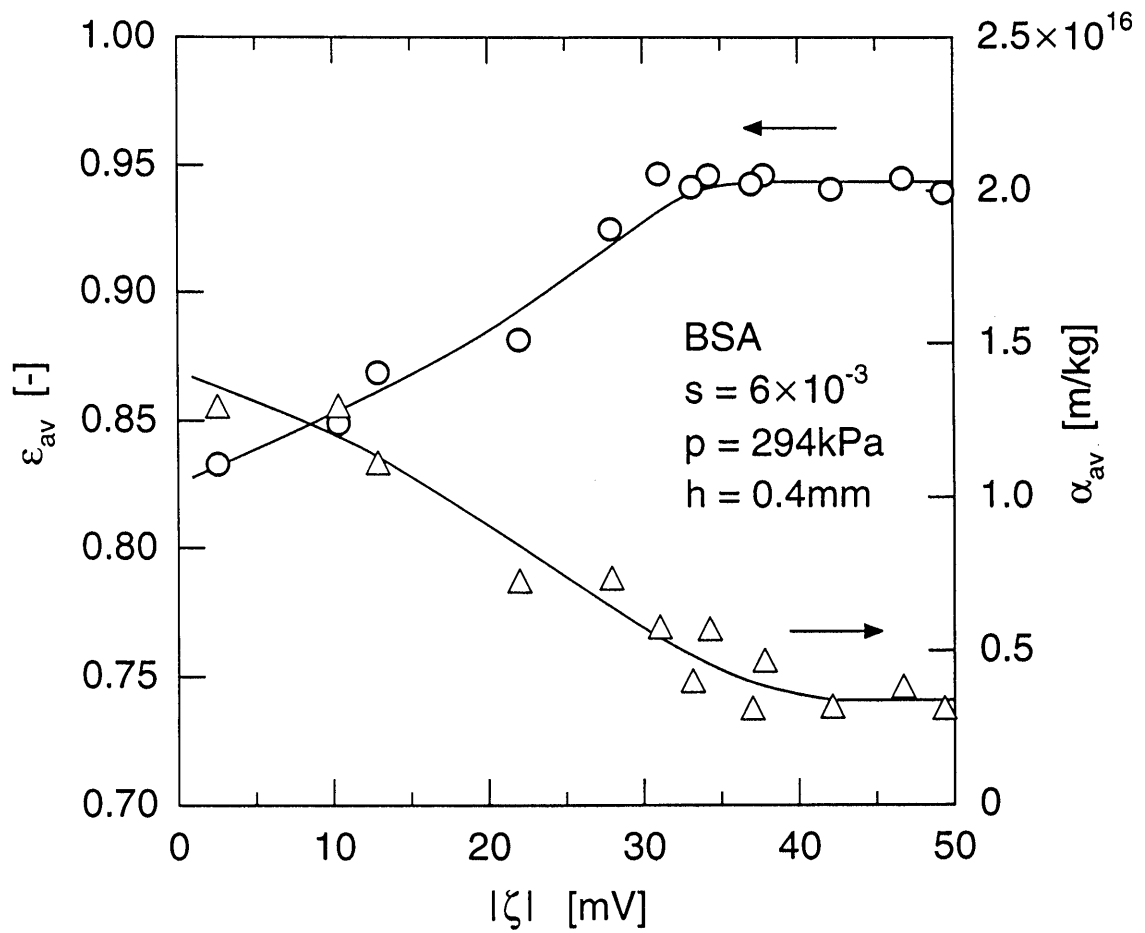


Fig. 2-6 Effect of absolute value of zeta potential on average porosity and average specific filtration resistance



ば、濾過ケーキの構造を左右すると思われるタンパク質間の静電的反発ポテンシャルエネルギー $V_R$ は、表面電位 $\psi_0$ の2乗に比例する(Eq. (1-17))。  $\psi_0 \doteq \zeta$ とすると、 $V_R$ は $\zeta$ 電位の2乗に比例することになり、濾過ケーキの構造がタンパク質の $\zeta$ 電位の絶対値によって決定され、その正負には無関係であるということを示唆している。

次に、 $\varepsilon_{av}$ および $\alpha_{av}$ の値を、Fig. 2-3に基づき表面電荷密度 $\sigma_0$ の絶対値に対してFig. 2-7にプロットした。 $\alpha_{av}$ のプロットに多少のばらつきは見られるものの、 $\zeta$ 電位の場合と同様、プロットはいずれも $\sigma_0$ の正負にかかわらずほぼ一本の曲線で表すことができた。このことから、濾過ケーキの構造は構成分子の電荷の絶対値によって決定されるものと考えられる。

#### 2-4 結言

タンパク質溶液のデッドエンド定圧限外濾過を種々のpH条件下で行い、濾過特性を検討する上で極めて重要な濾過ケーキの構造を濾過面積の急縮小効果を利用して測定した。さらに、タンパク質の荷電状態の指標となる $\zeta$ 電位および表面電荷密度をそれぞれ種々のpHに対して測定し、濾過ケーキの構造とタンパク質の荷電状態との相関を検討した。濾過ケーキの諸特性値である平均空隙率および平均濾過比抵抗を $\zeta$ 電位の絶対値または表面電荷密度の絶対値に対してプロットした結果、いずれの場合も一本の曲線で表され、ケーキの構造はタンパク質の荷電の正負には依存しないことが明らかになった。以上の結果は、タンパク質溶液の複雑な濾過機構の解明を推し進めるにあたり、それらを簡略的に取り扱うための一助となり得るものである。

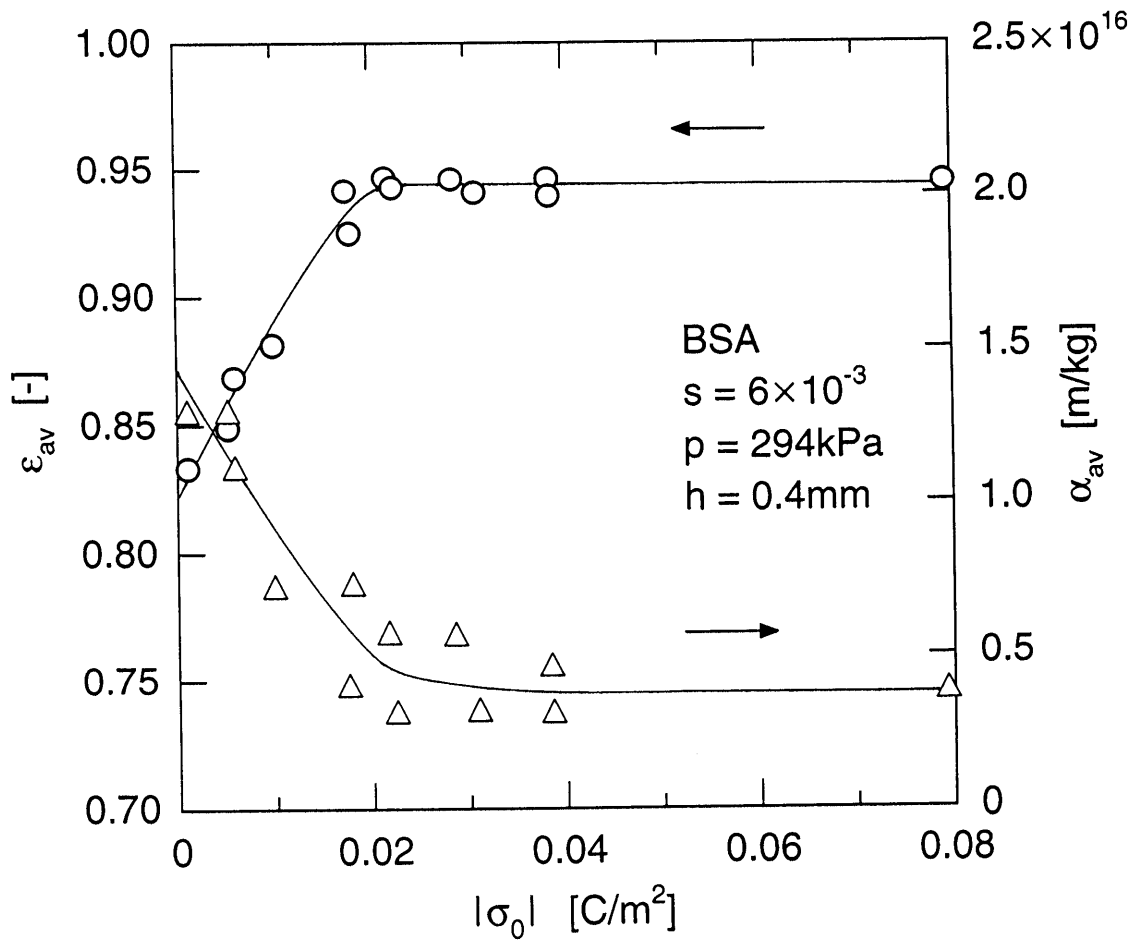


Fig. 2-7 Effect of absolute value of surface charge density on average porosity and average specific filtration resistance

## 第3章 2成分系タンパク質溶液の限外濾過における濾過ケーキの構造

### 3-1 緒言

一般にタンパク質は両性電解質であり、pHやイオン強度の変化によって種々の荷電状態を取り得ることが知られている。このため、タンパク質溶液の限外濾過では、pHなどの溶液環境の影響が重要な問題となる<sup>8,10,20,29-35</sup>)。特に2成分以上のタンパク質を含む場合には、異種タンパク質間の静電的相互作用を考慮する必要があり、単成分系の場合に比べて濾過機構はさらに複雑となる。

タンパク質溶液の濾過速度に対するpHの依存性について、これまで種々のモデルに基づく説明がなされてきた。例えば浸透圧モデルに基づいて濾過速度のpH変化を推定したところ<sup>22,23</sup>)、濾過実験における濾過速度のpH依存性とは反対の傾向を示し、矛盾を生じる結果が得られている。これに対して、ケーキ濾過モデルに基づく解析によって濾過速度の理論推定を行ったところ<sup>10</sup>)、濾過速度のpH依存性について合理的に説明することが可能となった。前章においてケーキ構造を解析する際に用いた実験的手法は、基本的にケーキ濾過理論に基づくものであるが、単成分系タンパク質溶液の限外濾過特性の解析に対するケーキ濾過モデルの信頼性は、上述の事実も含めこれまでいくつか証明されている<sup>6,7</sup>)。本章では2成分系タンパク質溶液を扱うが、その限外濾過特性の解析に対してケーキ濾過モデルを適用することの妥当性を明らかにした例はまだ報告されていないので、本章において改めて確認する必要がある。特に本章では前章と同様に濾過面積を急縮小させる限外濾過を行うので、ケーキ濾過理論を適用するためには、ケーキとして運ばれたタンパク質分子が可逆的に溶液本体中へ拡散移動することはないことを証明しなければならない。そこで、通常のデッドエンド濾過を行い、その途中

で濾過圧力を加えない濾過休止期間を設け、再び加圧した後の濾過挙動を検討することにより生成ケーキの拡散性の有無を評価した。

ケーキ濾過理論によると、濾過速度などの分離特性は形成される濾過ケーキの性状に支配されると考えられるため、2成分系タンパク質溶液の限外濾過における複雑な分離機構を解明するためには、この濾過ケーキの構造を明らかにすることが基礎になる。そこで、2成分系タンパク質溶液の限外濾過試験を両成分とも阻止する限外濾過膜を用いて行い、濾過面積の急縮小効果を利用することにより濾過ケーキの平均空隙率および平均濾過比抵抗を測定した。これらの諸特性値の pH 依存性および各溶質濃度依存性を明らかにし、ケーキ構造と異種タンパク質間の静電的相互作用との関係を検討した。

### 3-2 実験装置および方法

本章では、分子量と等電点が大きく異なり、物理化学的性質が比較的よく知られている BSA と卵白リゾチームをモデルタンパク質として使用した。BSA は前章で用いたものと同じである。塩基性タンパク質である卵白リゾチームはナガセ生化学工業(株)より購入した。これらの主要な物性値を Table 3-1<sup>43-45)</sup>にまとめる。

Table 3-1 Physical properties of proteins used

物性値	BSA	リゾチーム
分子量	67,000	14,300
分子サイズ [nm]	14×4×4	4.5×3×3
ストークス半径 [nm]	3.64	2.00
等電点	4.9	11.0
偏比容(= $\rho_s^{-1}$ ) [cm <sup>3</sup> /g]	0.733	0.726

BSA の等電点は 3-3-2 で述べると電位の pH 変化から求めた。前章で求めた値 (pI 5.1) とは多少異なっているが、これは前章で使用した BSA とは製品ロットが異なるということと、本章では溶媒として緩衝液を用いたことによる影響であると考えられる。試料溶液を調製するために、まず溶媒となる緩衝液を調製する。使用する緩衝液は目的の pH に応じて 2 種類あり、一つは pH を 4 から 5 の範囲に調整するための 0.01mol/l 酢酸緩衝液、もう一つは pH を 5 から 8 の範囲に調整するための 0.01mol/l リン酸緩衝液である。2 成分系混合溶液を調製するにあたり、まず各単成分系溶液を調製する。あらかじめ pH を調整しておいた緩衝液に各粉末タンパク質を適量加え、完全に均一な濃度になるようにマグネット・スターラーで 2 時間攪拌して溶解した。これらを混合し、スターラーで 30 分間攪拌することにより、混合溶液を作製した。各タンパク質の混合割合は実験に応じて種々に変化させたが、試料溶液におけるタンパク質全体の質量分率  $s$  はすべての実験に対して  $6 \times 10^{-3}$  の一定値にした。実験用純水は、水道水を純水製造装置 PURIC-model R (オルガノ(株)) に通して一次処理したものを、さらに卓上型超純水装置 Milli-Q Jr. (ミリポア(株)) に通して作製した。この純水の比抵抗値は  $18\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$  以上であった。分離膜には、BSA、リゾチームをとともに阻止することができる公称分画分子量 1 万のポリスルホン製限外濾過膜 (PTGC, ミリポア(株)) を使用した。タンパク質間の静電的な相互作用を知るため、酸・アルカリの滴定試験から各タンパク質の表面電荷密度を測定し、電気泳動法による移動度の測定から  $\zeta$  電位を測定した。

濾過実験操作は基本的に前章と同じであり、実験装置の概要および使用した濾過器の形態は Figs. 2-1, 2-2 で既に示したとおりである。濾過ケーキの平均空隙率および平均濾過比抵抗を測定するため、膜面から  $h=0.4\text{mm}$  の高さに多孔板が組み込まれたバッチ式濾過器を使用した。窒素ガスを作用させて濾過面積急縮小型のデッドエンド

定圧限外濾過試験を行い、濾液量の経時変化を測定した。操作圧力はすべての実験に対して 98kPa に設定した。実験終了後、分光光度計で濾液の吸光度を測定し、タンパク質がほぼ完全に阻止されていることを確認した。濾過面積急縮小型濾過実験に対する比較実験として、多孔板が組み込まれていない通常の濾過器を用いたデッドエンド濾過も行った。さらに、濾過ケーキを構成するタンパク質分子のブラウン拡散の影響を明らかにするため、操作の途中で濾過の休止期間を設ける濾過実験を行った。通常のバッチ式濾過器を使用してデッドエンド濾過を 3 時間行った後、濾過器内の圧力を開放した状態で 3 時間静置し、その後再び同じ圧力を加えて濾過実験を再開した。

### 3-3 実験結果および考察

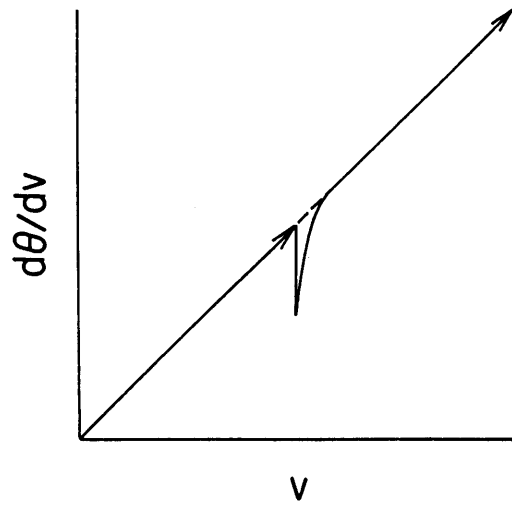
#### 3-3-1 濾過操作の休止の影響

前章でも説明したように、濾過面積急縮小効果を利用したケーキ構造の解析法では、濾液量から物質収支によりケーキ量を推定するため、一度ケーキとして膜面上に捕捉された粒子は再び溶液本体には戻らないことが前提となる。このことは、従来のケーキ濾過では確認されているが<sup>46)</sup>、高分子などのコロイド溶液を取り扱う場合においては、コロイド粒子のブラウン拡散の影響がしばしば問題となる。実際、本研究で使用する BSA およびリゾチームはその希薄溶液中で拡散運動することが知られている。本研究において、ケーキを構成するタンパク質分子の拡散現象が無視できないものとするなら、導き出される平均空隙率は大きな誤差を含んだものとなる。そこで、通常のデッドエンド濾過を行い、途中で一時的に操作を休止した後再び濾過を開始する実験を行った。

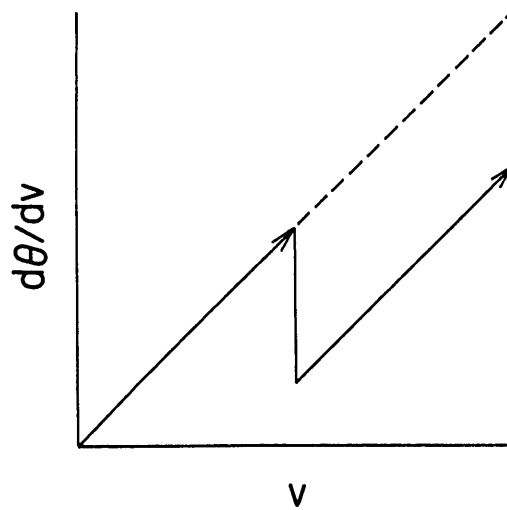
拡散現象により濾過ケーキの一部が再分散するという可能性の有無は、濾過圧力の開放による濾過操作の休止後、再び加圧した後の

濾過速度の経時変化を追跡することによって判断できる。濾過操作の休止期間中における膜面堆積層の挙動として考えうる 2 つの形態を想定し、各々の場合について濾過速度がどのように変化するかを Fig. 3-1 に模式的に示した。図はケーキ濾過理論に基づく Ruth プロット<sup>11,12)</sup>、すなわち濾過速度の逆数( $d\theta/dv$ ) 対 単位膜面積あたりの濾液量  $v$  の形で与えた。図(a)は膜面堆積層中の物質は拡散移動しないと仮定した場合で、休止期間中堆積層の量は変化しないので、濾過再開後の結果は休止以前の直線の延長上にプロットされる。このとき、濾過再開直後から少しの間( $d\theta/dv$ )値が小さくなるのは、拡散による影響ではなく、堆積層が膨張するためである<sup>47)</sup>。図(b)は堆積層の一部が拡散し溶液本体中へ戻っていくと仮定した場合で、休止期間中に堆積層の量が減少し、濾過抵抗が小さくなるため、再開後の濾過速度は休止直前の濾過速度より大きくなる。

濾過休止実験における( $d\theta/dv$ )対  $v$  の結果を、濾過を休止しない通常のデッドエンド濾過の結果と併せて Fig. 3-2 に示す。溶液の pH は 4.2 に調整し、BSA とリゾチームは等量ずつ混合した。通常のデッドエンド濾過におけるプロットは直線関係を示し、休止実験についても休止期間に至るまでの初期段階において、通常の濾過実験のプロットと一致する直線関係を示した。この直線性はケーキ濾過モデル<sup>8,9)</sup>ばかりでなく、浸透圧モデル<sup>4,23)</sup>やゲル分極モデル<sup>40)</sup>によっても説明することが可能である。休止実験において休止期間を経た濾過再開直後、( $d\theta/dv$ )値は通常の濾過に比べて小さくなったが、その後急な勾配をもって通常の濾過のプロット上に至るまで上昇し、やがて両者は再び同一直線上に沿った挙動を示すようになった。このように濾過再開後のプロットが濾過休止以前の直線の延長線に一致したことから、Fig. 3-1(a)の仮説に合致し、膜面に供給され堆積したタンパク質分子の拡散現象は無視できることが証明された。以上の結果から、タンパク質溶液の限外濾過において膜面に形成される堆



(a) NON-DIFFUSIBLE CAKE



(b) DIFFUSIBLE LAYER

Fig. 3-1 Two hypothetical cases for interrupted flow experiments



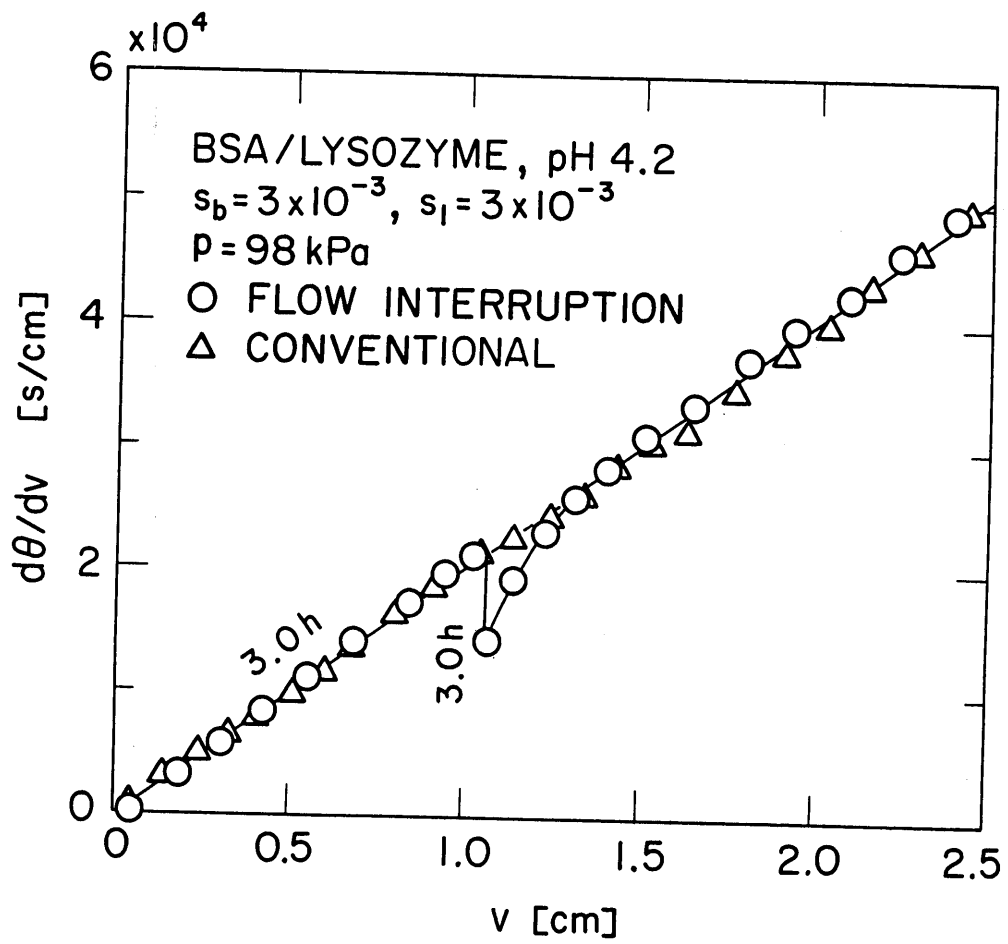


Fig. 3-2 Comparison between an interrupted flow experiment and a conventional unstirred dead-end ultrafiltration experiment

積層は従来濾過ケーキと呼ばれているものと本質的に同じものとして取り扱うことができ、2-3-2で説明したケーキ濾過モデルに基づく解析を本章における実験結果に適用しても差し支えないことが明らかとなった。単成分系タンパク質溶液を用いた濾過休止実験でも同様の現象が確認され<sup>6,7)</sup>、さらに限外濾過操作中に濾過圧力をステップ変化させる実験結果からも、ケーキ濾過モデルを適用することの妥当性が実証された<sup>6,7)</sup>。

### 3-3-2 濾過ケーキの構造に及ぼす pH の影響

Fig. 3-3 に、BSA とリゾチームの表面電荷密度  $\sigma_0$  および電位を pH に対してプロットする。図より BSA の等電点は 4.9 であることがわかる。BSA 分子はこの等電点より小さい pH で正、大きい pH で負の実効電荷を持つ。一方、リゾチームは等電点が 11.0 であるため、図の pH 範囲においては常に正の実効電荷を持つ。BSA の等電点より酸性側の pH 領域では、BSA、リゾチームは互いに同符号の実効電荷を持つため、両分子間には静電的反発力が作用するものと予想される。また、BSA の等電点からリゾチームの等電点にわたる pH 領域では、各タンパク質は互いに異符号の実効電荷を持つため、両分子間には引力が働くものと予想され、その結果、これらの混合溶液中では正に帯電した BSA とこれに引きつけられた負電荷を持つリゾチームとの相互作用を考える必要がある。

種々の pH に対する濾過ケーキの平均空隙率および平均濾過比抵抗を測定するため、BSA とリゾチームをそれぞれの質量分率が  $3 \times 10^{-3}$  になるように等量ずつ混合して濾過面積急縮小型の限外濾過試験を行った。その実験結果の一例として、pH 4.2 および pH 6.9 における濾過速度の逆数 ( $d\theta/dv$ ) 対 単位膜面積あたりの濾液量  $v$  を Fig. 3-4 に示した。また比較のため、濾過面積を急縮小しない通常のデッドエンド濾過試験の結果も同時にプロットした。通常の濾過では、

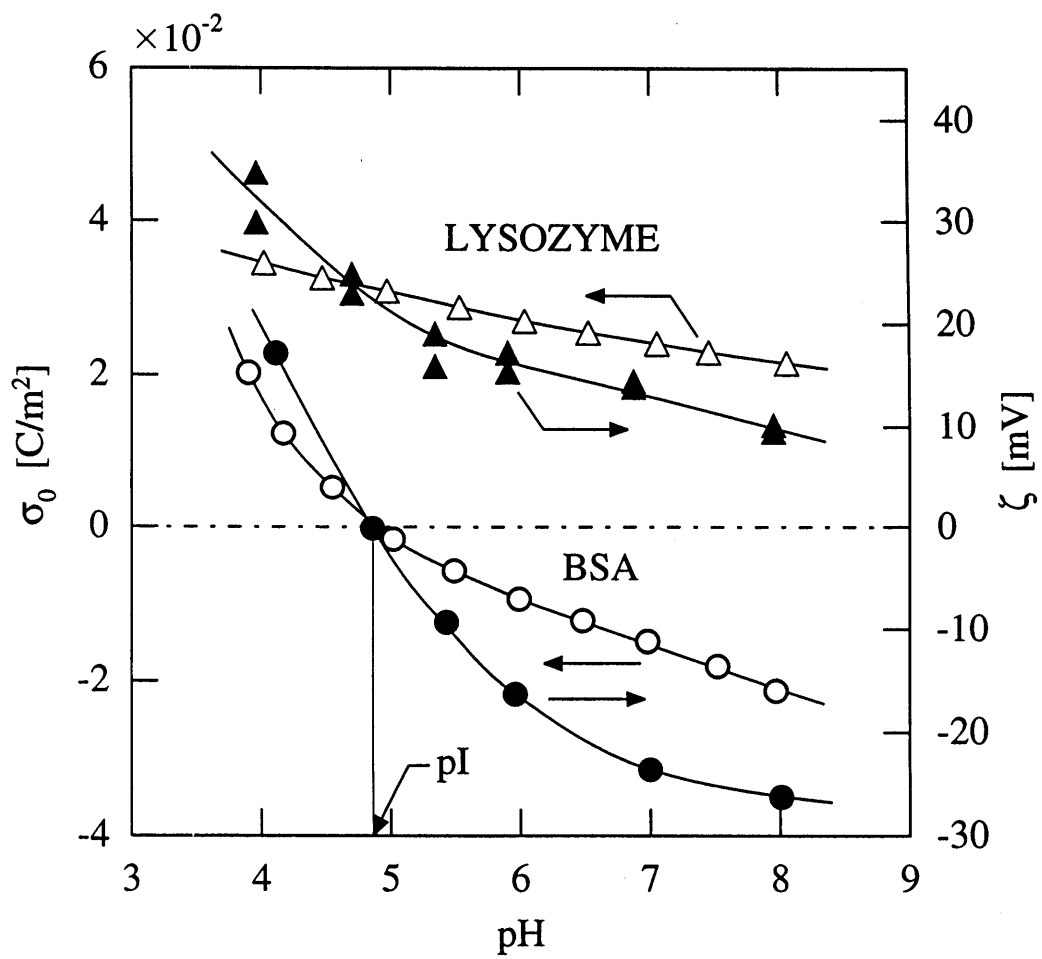


Fig. 3-3 Surface charge density and zeta-potential of BSA and lysozyme

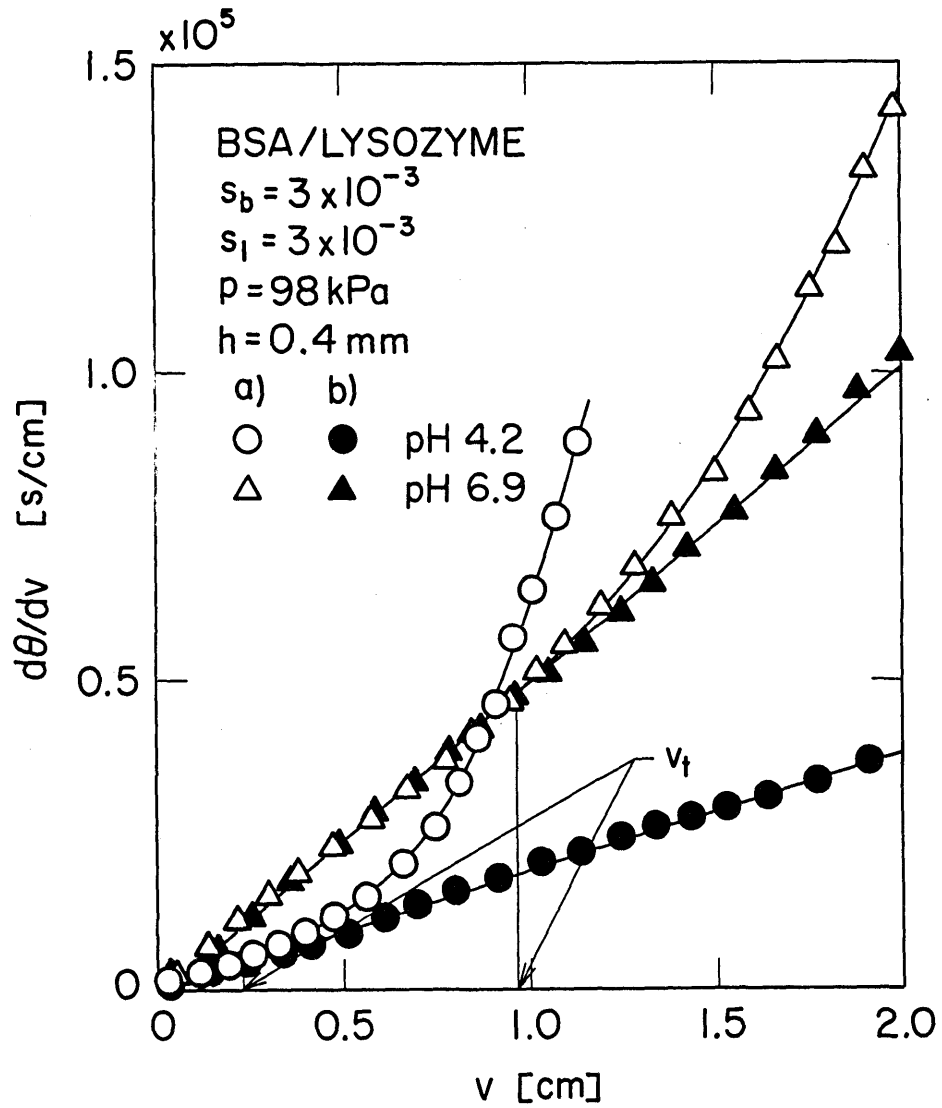


Fig. 3-4 Relation between reciprocal filtration rate and filtrate volume per unit membrane area at different pH values: (a) Filtration area is suddenly reduced during filtration, (b) Filtration area is constant

ケーキ濾過モデルに従い終始直線関係が保持されるのに対し、濾過面積急縮小型濾過では、濾過の初期段階では通常の濾過と一致した直線関係を示すが、濾過ケーキの表面が急縮小面に達した瞬間、プロットは直線から偏倚し、 $(d\theta/dv)$ 値が急激に増大しはじめる。この移行点での  $v$  の値を  $v_t$  として Eq. (2-3)よりケーキの平均空隙率  $\epsilon_{av}$  を求めることができる。

$$\epsilon_{av} = \frac{\rho_s h(1-s) - \rho_s v_t}{\rho_s h(1-s) + \rho_s h} \quad (2-3)$$

ここでは、2成分系タンパク質溶液を取り扱っているので、溶質濃度  $s$  およびタンパク質の固体密度  $\rho_s$  は、それぞれ次のように与えられる。

$$s = s_b + s_l \quad (3-1)$$

$$\frac{s}{\rho_s} = \frac{s_b}{\rho_{s,b}} + \frac{s_l}{\rho_{s,l}} \quad (3-2)$$

ここに、添字  $b, l$  はそれぞれ BSA、リゾチームを意味する。また、 $\epsilon_{av}$  の値を用いて Eq. (2-2)から求められる湿乾質量比  $m$  と濾過初期の直線勾配  $(2/K_v)$  から、Eq. (3-3) (Eq. (1-9)を  $\alpha_{av}$  について整理したもの) によりケーキの平均濾過比抵抗  $\alpha_{av}$  を求めることができる。

$$\alpha_{av} = \frac{2}{K_v} \frac{p(1-ms)}{\mu \rho_s} \quad (3-3)$$

2種の pH の場合を比較すると、pH 4.2 の場合に比べて pH 6.9 の場合の方が濾過初期における直線勾配は大きくなった。すなわち濾過初期における濾過速度が小さくなった。また、移行点における濾液量  $v_t$  の値は pH 4.2 より pH 6.9 の方がかなり大きくなった。これは

pH 6.2 より pH 4.2 の方がケーキの成長速度がはるかに大きいことを意味する。このように pH の違いによって直線勾配や移行点の位置が大きく異なることから、濾過ケーキの平均空隙率や平均濾過比抵抗は大きく異なると考えられる。

2 成分のタンパク質からなるケーキの平均空隙率  $\epsilon_{av}$  を、pH に対して Fig. 3-5 にプロットした。実験したすべての pH に対して  $\epsilon_{av}$  は 0.8 を超えており、非常に空隙の大きなケーキを形成していることがわかる。図に示されるように、 $\epsilon_{av}$  のプロットは pH によって大きな変化を示した。これは Fig. 3-3 に示すように、pH によって各タンパク質の荷電状態が大きく変化することに起因する。まず、BSA の等電点 (pI 4.9) より酸性側の pH 領域では、BSA、リゾチームはともに正の電荷を持つため、これらの 2 成分系溶液中では BSA 分子間、リゾチーム分子間、あるいは BSA・リゾチーム分子間のすべてに静電的反発力が作用する。また、pH がより酸性側になるほど各分子の電荷が大きくなるため、この反発力の効果はより一層顕著になる。この影響を受けてケーキ構造は非常に緩やかになり、 $\epsilon_{av}$  はこの pH 領域において 0.9 を超える極めて大きな値となった。このような高い空隙率は従来のケーキ濾過でもいくつか報告されている。Tiller ら<sup>48,49)</sup> は、ポリスチレンラテックスやシリカ懸濁液の濾過ケーキは通常 0.9 以上の空隙率を持ち、なおかつ操作圧力を増加してもケーキはその空隙率を保持する傾向にあることを示した。また、彼らは排水中に存在する高凝集性スラリーや活性汚泥の濾過ケーキについても、空隙率が 0.9~0.95 であることを示唆した。川崎ら<sup>50)</sup> は余剰活性汚泥の濾過によって形成されるケーキの湿乾質量比  $m$  を測定し、 $m=24.1$  と報告した。これは空隙率に換算すると 0.97 に相当する。タンパク質の濾過でも同様の結果が最近報告されており、中倉ら<sup>51)</sup> は、BSA 溶液のデッドエンド限外濾過における濾過ケーキの電気伝導度を測定することにより、0.9 以上の空隙率を得た。

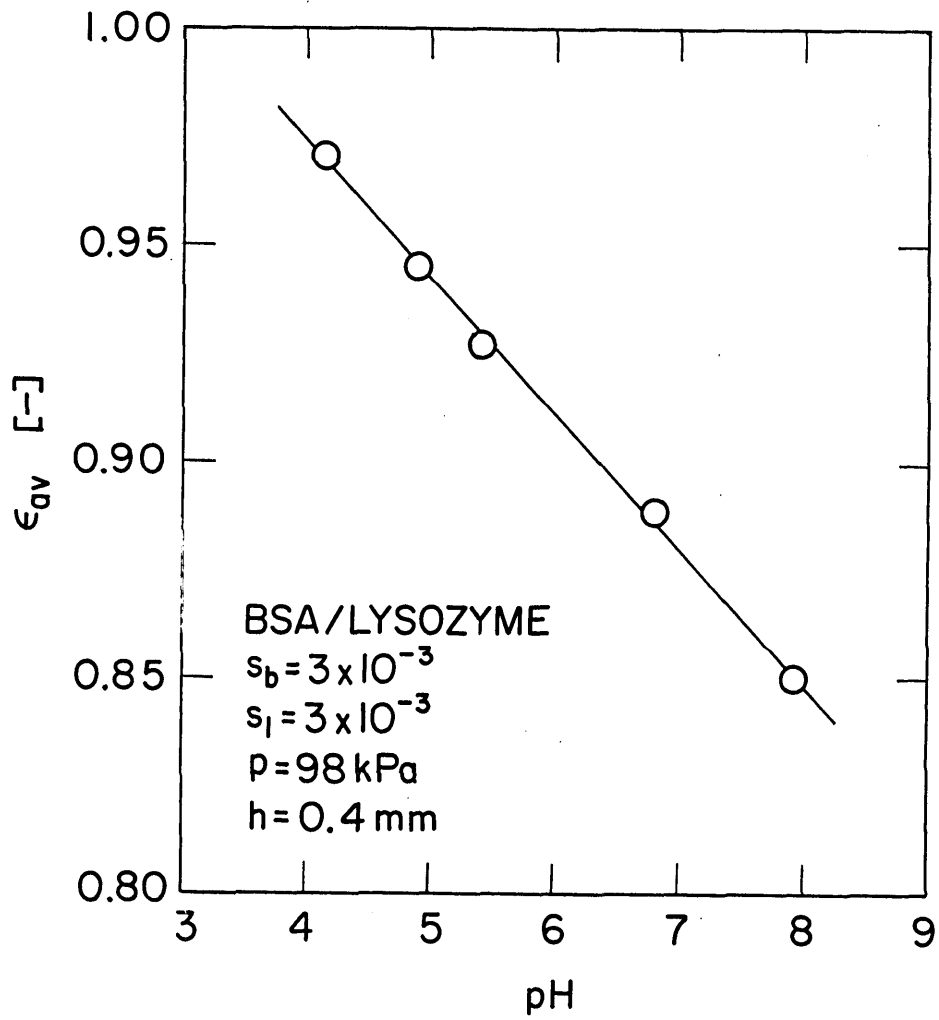


Fig. 3-5 Dependence of average porosity on solution pH

一方、BSAの等電点よりアルカリ性側のpH領域では、BSAは負、リゾチームは正の電荷を持つため、これらの2成分系溶液中では、BSA分子間、リゾチーム分子間に斥力が働く一方で、BSA・リゾチーム分子間に引力が作用する。この効果によりケーキ構造は緻密になり、 $\epsilon_{av}$ は酸性側のpH領域に比べて小さな値になった。よりアルカリ性側になるほど $\epsilon_{av}$ の値が小さくなるのは、分子間引力の効果が顕著になるためと考えられる。結果的に図のpH範囲における $\epsilon_{av}$ のすべてのプロットは、一様に右下がりの曲線となった。

Fig. 3-6に、濾過ケーキの平均濾過比抵抗 $\alpha_{av}$ をpHに対して示した。一般に粗な構造を持つケーキは濾過の流動抵抗が小さくなる傾向があり、この場合にもケーキの空隙が大きくなる酸性側のpH領域において $\alpha_{av}$ は小さくなった。一方、BSAの等電点よりアルカリ性側では、ケーキが緻密になるため、 $\alpha_{av}$ は増大する傾向を示した。特にこのpH領域では、わずかなpHの違いによる $\alpha_{av}$ の変化の仕方が $\epsilon_{av}$ の変化の仕方に比べて顕著であるのが特徴的である。結果的に、図のpH範囲において $\epsilon_{av}$ が右下がりの曲線になったことに対応して、 $\alpha_{av}$ は常に右上がりの曲線となった。

### 3-3-3 濾過ケーキの構造に及ぼすタンパク質の混合割合の影響

pHを固定し、全溶質濃度一定の条件下でBSAとリゾチームの混合割合を種々に変えて濾過ケーキの平均空隙率および平均濾過比抵抗を測定し、ケーキ構造に及ぼすタンパク質の混合割合の影響を考察した。

まず、pH 4.2の場合について検討した。Fig. 3-7に濾過速度の結果の一例を示す。2種のプロットはそれぞれBSAとリゾチームの混合比が2:1および1:2の場合である。このように、全体の濃度が一定でも、混合比を変化させると直線勾配や移行点の位置が変化し、ケーキ構造に違いが生じていることがわかる。



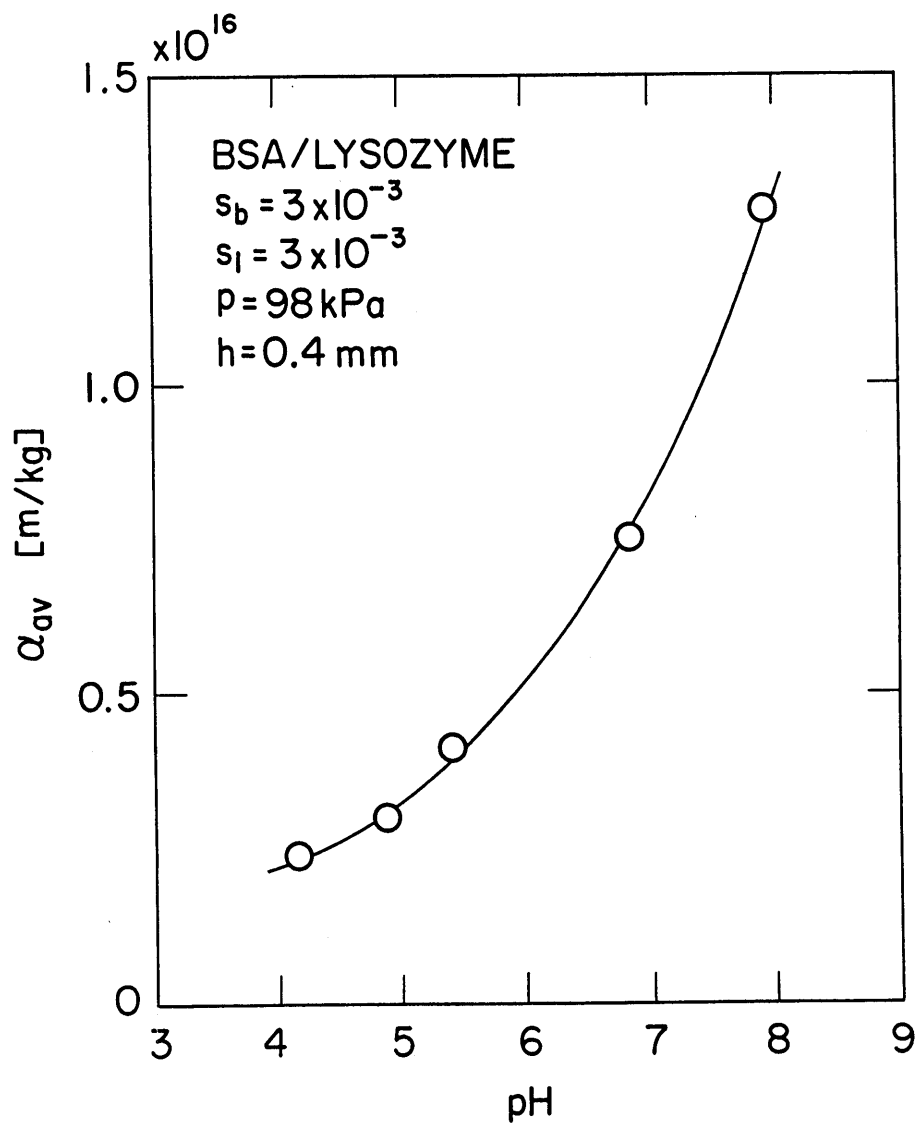


Fig. 3-6 Dependence of average specific filtration resistance on solution pH

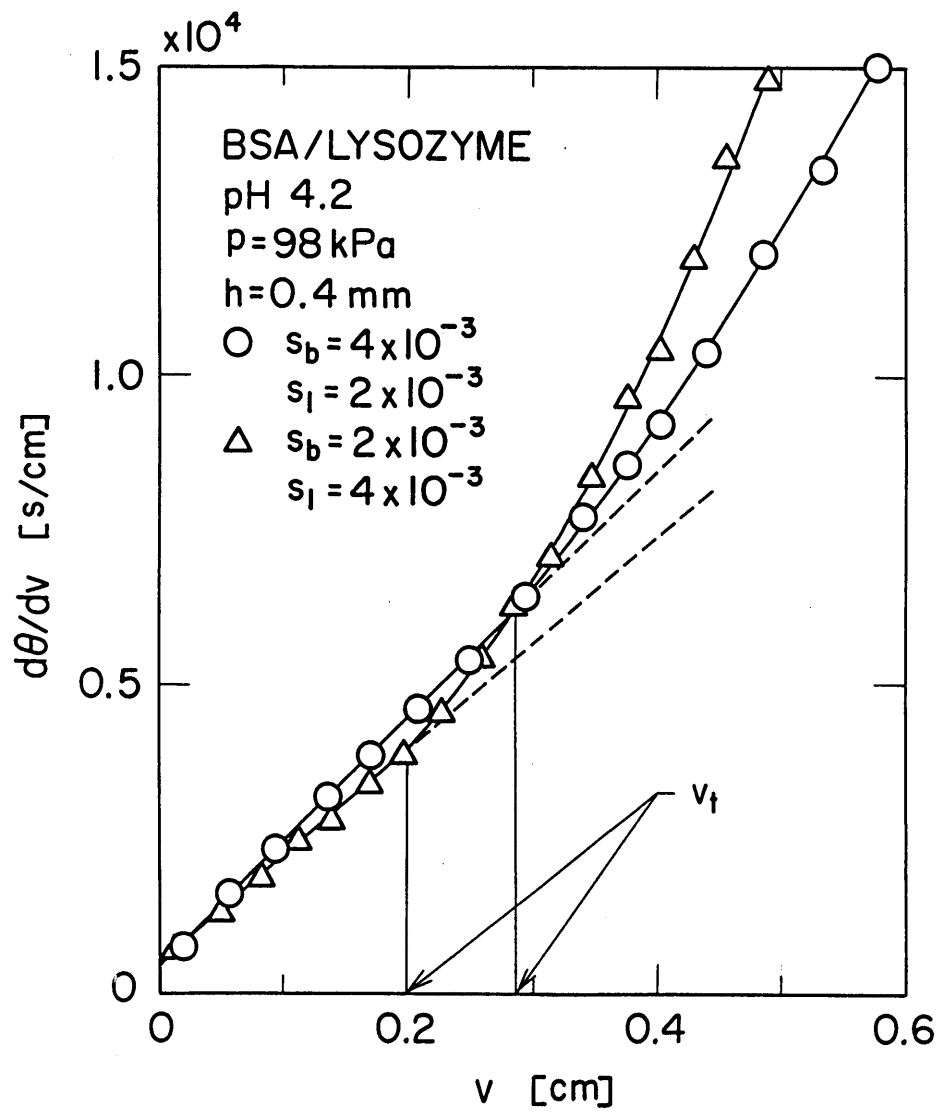


Fig. 3-7 Relation between reciprocal filtration rate and filtrate volume per unit membrane area for different mixing ratios of proteins at pH 4.2

種々の混合比に対する平均空隙率  $\epsilon_{av}$  の測定結果を Fig. 3-8 にプロットした。図の横軸  $s_b/s$  は溶質全体の質量分率に占める BSA の質量分率の割合を示し、0 はリゾチーム単成分系の場合、1.0 は BSA 単成分系の場合に相当する。pH 4.2 の環境下では、BSA およびリゾチームはともに正に帯電し、すべてのタンパク質分子間に静電的反発力が作用するため、 $\epsilon_{av}$  は全体的にかなり高い値を示した。BSA 単成分系とリゾチーム単成分系におけるプロットを比較すると、リゾチーム単成分系の方が  $\epsilon_{av}$  は大きくなった。このため、BSA の割合が増加するにつれ、すなわち  $s_b/s$  が大きくなるにつれ、 $\epsilon_{av}$  は単調に減少する傾向を示した。特に BSA の比率が高い範囲において  $\epsilon_{av}$  の変化の仕方が顕著であり、リゾチームの比率がわずかに大きくなるだけで  $\epsilon_{av}$  の値はかなり増大した。それとは逆にリゾチームの比率が高い範囲においては、BSA の比率が多少増大しても、 $\epsilon_{av}$  の値にはあまり影響しない。

これまでも BSA 単成分系溶液の濾過における膜面堆積層の空隙率が、様々な手法とモデルに立脚して、いくつか報告されている。そこで、これらの値と Fig. 3-8 における BSA 単成分系 ( $s_b/s=1$ ) の  $\epsilon_{av}$  とを比較してみる。Chudacek ら<sup>41)</sup> は、BSA 溶液の攪拌型濾過における限界流速 対 供給原液濃度の対数プロットを外挿することにより、ゲル分極モデルに基づきゲル濃度を導出し、この値を用いて空隙率が 0.6~0.7 の範囲にあることを示した。しかし、Vilker ら<sup>23)</sup> の指摘にもあるように、この方法によって得られるゲル濃度が膜面堆積層の濃度として適切な値か否かは大いに疑問である。Reihanian ら<sup>6)</sup> は、Kozinski ら<sup>52)</sup> によって決定された溶解度限界における BSA の濃度を用いて、平均空隙率を 0.51 と推定した。しかし、膜面に堆積する溶質の平均濃度が溶解度限界における濃度に等しいということは、まだ実験的に明らかにされていない。以上のデータと比較すると、我々が実験的に求めた BSA 単成分系の  $\epsilon_{av}$  は著しく大きな値

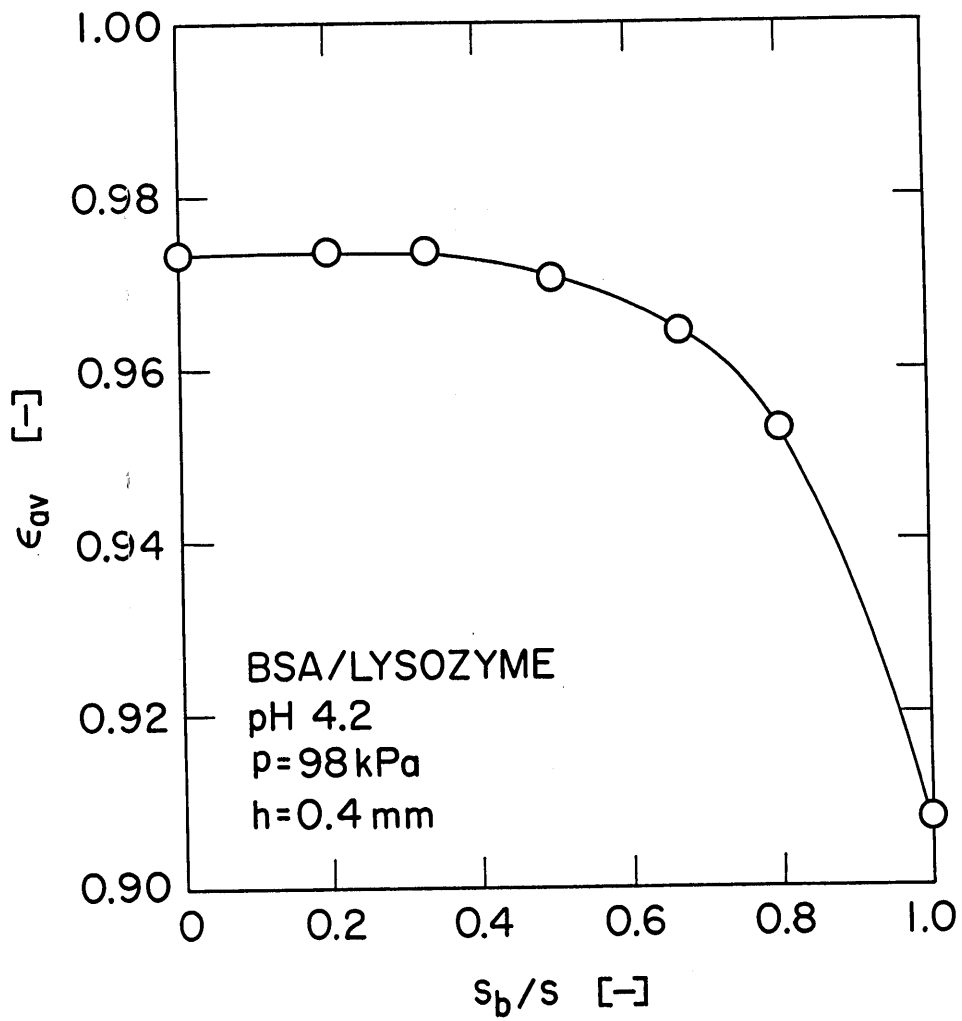


Fig. 3-8 Dependence of average porosity on mixing ratio of proteins at pH 4.2

である。3-3-2でも述べたが、中倉ら<sup>51)</sup>も我々とは異なる測定方法によって0.9を超えるBSAの濾過ケーキの空隙率を算出した。さらに、中尾ら<sup>53)</sup>は卵白アルブミンの限外濾過を行い、管状膜の表面に堆積した層の一部をかき取ることにより、ゲル濃度が質量分率で0.02~0.1の範囲にあることを明らかにした。本章で示したデータは、物質収支を利用して導き出されたEq. (2-3)から得られる実験値であり、この式の妥当性は3-3-1で実証されている。本研究で用いた手法はいかなるモデルや仮定も必要としない上、比較的簡単な測定原理により直接的に値が求められるため、その測定値は高い信頼性を持っていると考えられる。また、 $\epsilon_{av}$ はケーキ全体の空隙の平均値であり、局所的な値ではないことにも注目しなければならない。ゲル分極モデルでは、ゲル層内部の濃度は均一であると仮定されているが<sup>43)</sup>、ケーキ濾過モデルを限外濾過の解析に用いる場合にも、同様にケーキ内は一定濃度であると仮定されることが多い<sup>5,6,41,43)</sup>。しかし、実際にはケーキは空隙率に分布があり、均質ではない<sup>9,49)</sup>。濾過ケーキは一般に圧縮性であるため、膜面近傍で密になり、ケーキ表面で粗になる傾向を示す<sup>8)</sup>。同様の傾向がBSA溶液の超遠心沈降過程に基づく解析によっても得られた(Fig. 1-6)<sup>9,10)</sup>。以上の観点から、ここに測定された濾過ケーキの空隙率の値は適切であるものとみなすことができる。

pH 4.2における平均濾過比抵抗 $\alpha_{av}$ を、BSAの混合割合に対してFig. 3-9にプロットした。一般に、濾過の対象となる粒子の大きさが大きくなるほど比抵抗は小さくなる傾向にあるが、Table 1に示されるように、BSAの方がリゾチームより分子径が大きいにもかかわらず、BSA単成分系における $\alpha_{av}$ はリゾチーム単成分系における $\alpha_{av}$ より大きな値を示した。タンパク質の場合、分子の持つ電荷や水和層などの影響も複雑に絡んでくるため、分子の大きさだけで比抵抗の比較はできない。 $\alpha_{av}$ のプロットは、BSAの比率が低い範囲ではほ

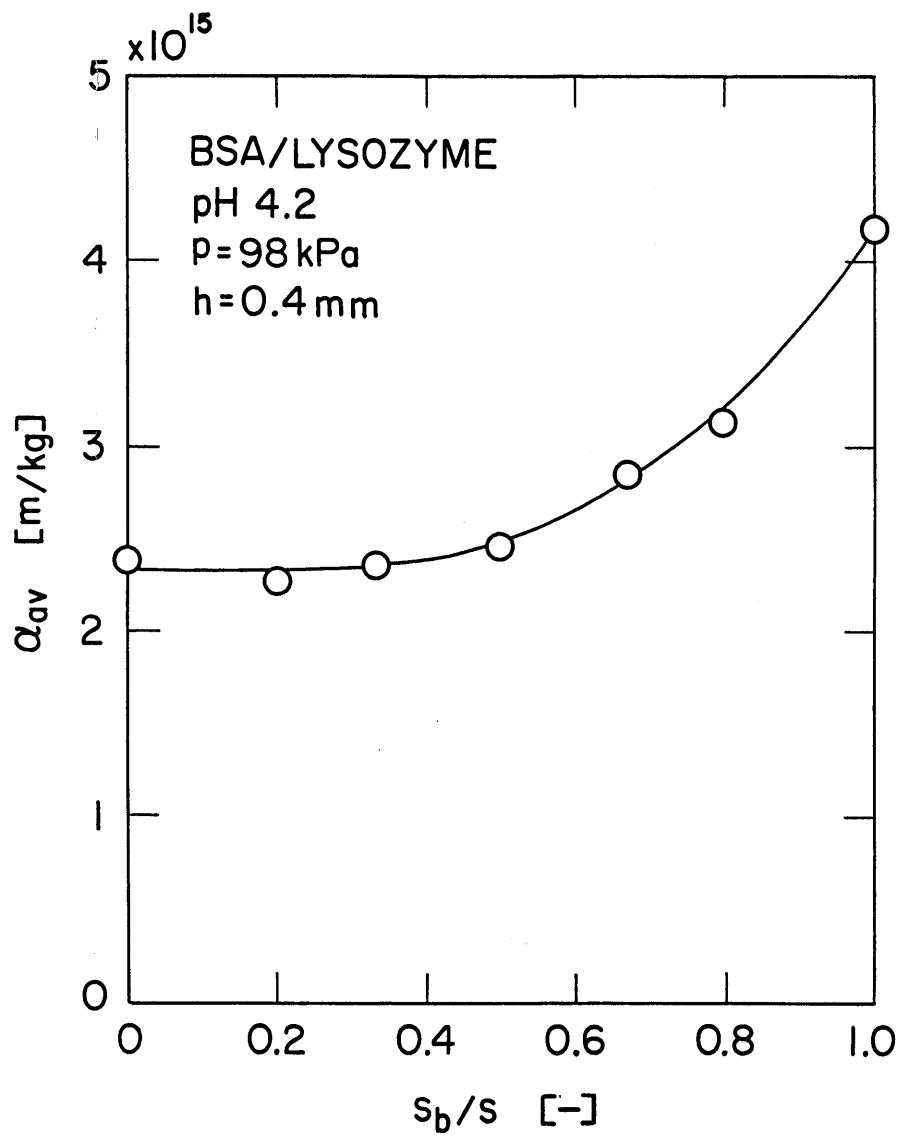


Fig. 3-9 Dependence of average specific filtration resistance on mixing ratio of proteins at pH 4.2

とんど変化しなかったものの、さらに BSA の混合割合が増加するに伴い、単調に増大する傾向を示した。この  $\alpha_{av}$  の増加の仕方は、Fig. 3-8 における  $\epsilon_{av}$  の減少傾向と比較すると、非常によく対応しているといえる。

次に、pH 6.9 の場合について、タンパク質の混合割合の影響を検討した。Fig. 3-10 に濾過速度の結果の一例を示す。2 つの曲線はそれぞれ BSA とリゾチームの混合比が 2:1 および 1:2 の場合のプロットである。この pH 環境下でも 2 種のプロットの間で直線勾配や移行点の位置が異なることから、全体の濃度が一定でも、混合比が変わるとケーキ構造はかなり異なるものと考えられる。

Fig. 3-11 に平均空隙率  $\epsilon_{av}$  に及ぼすタンパク質の混合割合の影響を示した。pH 6.9 の環境下では、BSA は負、リゾチームは正の電荷を持つため、両者を混合した 2 成分系溶液中ではこれらの相互作用により、その濾過ケーキは分子間に反発力のみが作用する単成分系の場合の濾過ケーキより緻密になる傾向を示す。その結果、 $\epsilon_{av}$  のプロットは図に示されるように極小値を持つ曲線となった。図によると、最も緻密なケーキが形成されるのは、BSA の混合割合が 0.6 付近のときである。pH 4.2 の場合には、 $\epsilon_{av}$  のプロットは混合比の変化に対して単調な曲線となったのに対し、pH 6.9 の場合には、ある混合比で極小値を持つ挙動を示した点が際立った特徴であり、極めて興味深い。

pH 6.9 における平均濾過比抵抗  $\alpha_{av}$  を、 $s_b/s$  に対して Fig. 3-12 にプロットした。ケーキが最も緻密になるということは、換言すれば最も濾液がケーキ内を流動しにくくなるということである。確かに  $\alpha_{av}$  のプロットは  $s_b/s=0.6$  付近で最大となり、Fig. 3-11 のプロットに非常によく対応している。

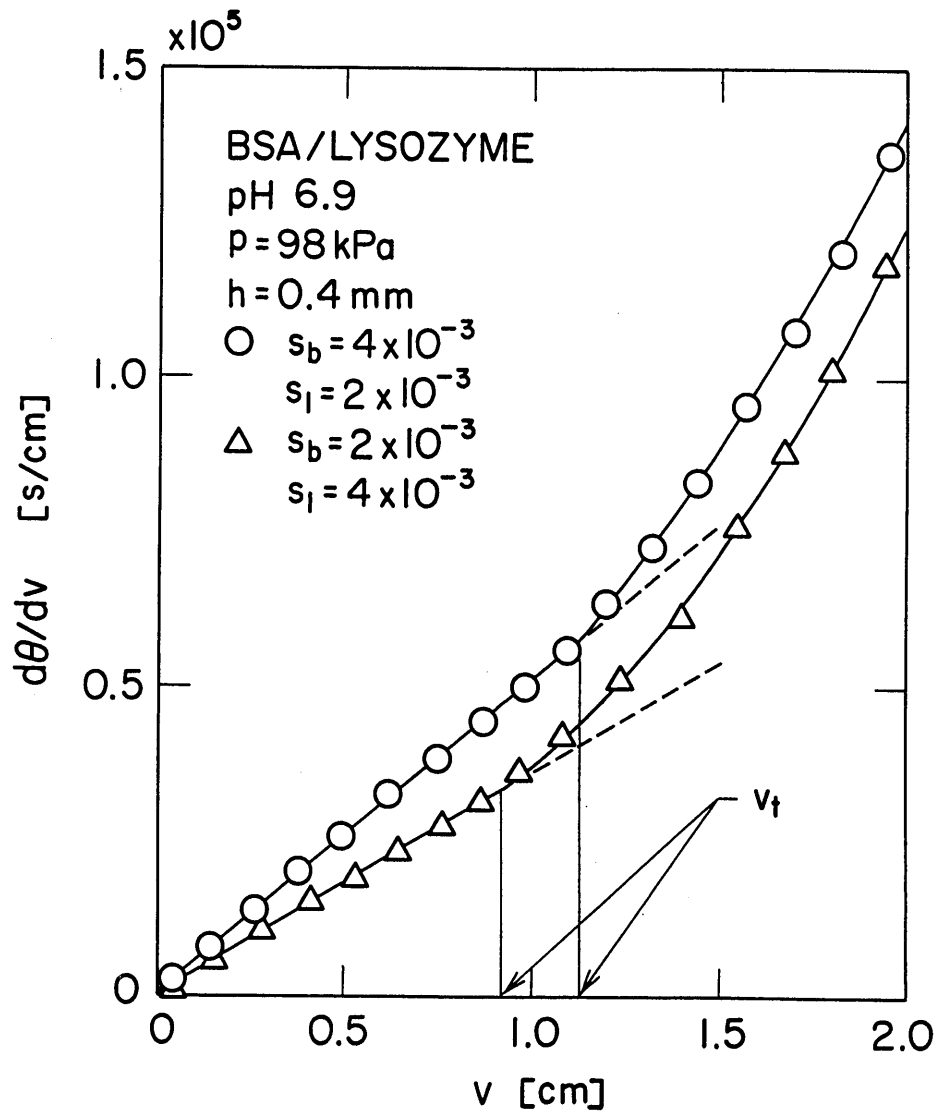


Fig. 3-10 Relation between reciprocal filtration rate and filtrate volume per unit membrane area for different mixing ratios of proteins at pH 6.9



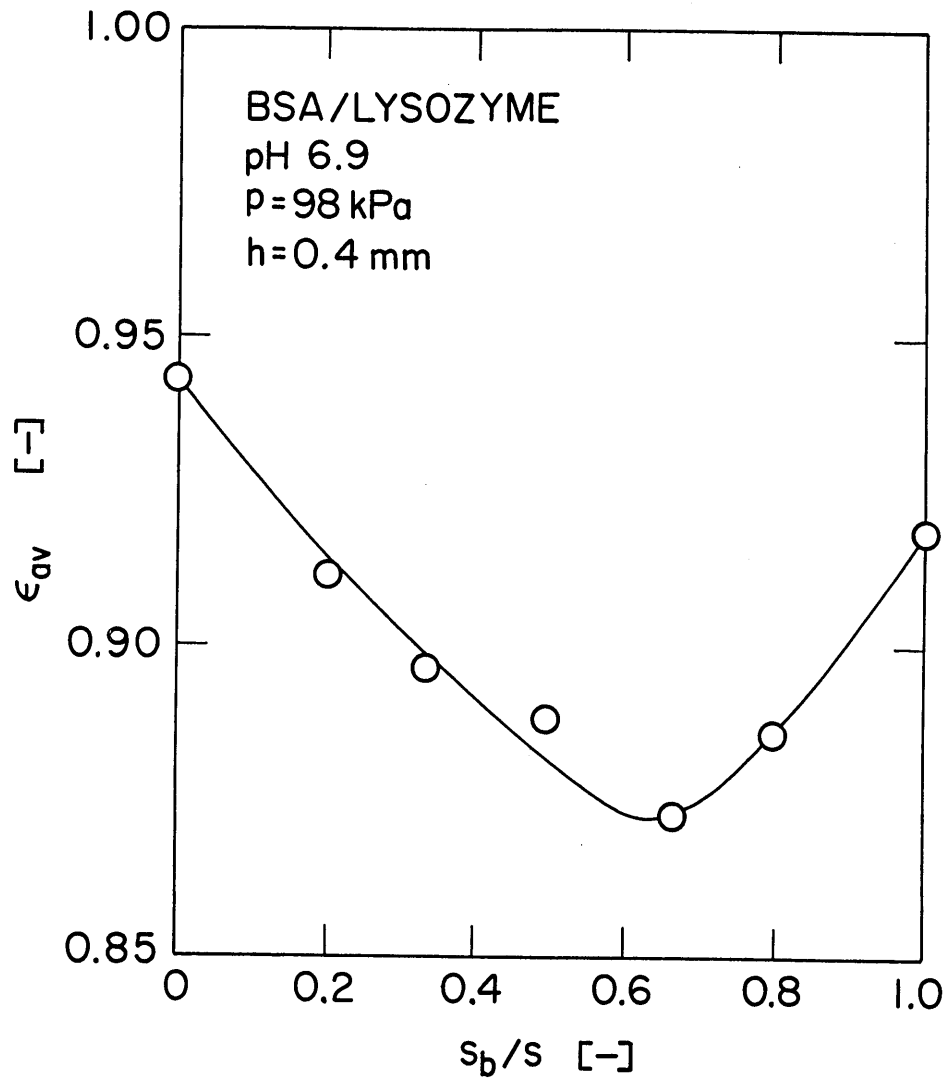


Fig. 3-11 Dependence of average porosity on mixing ratio of proteins at pH 6.9

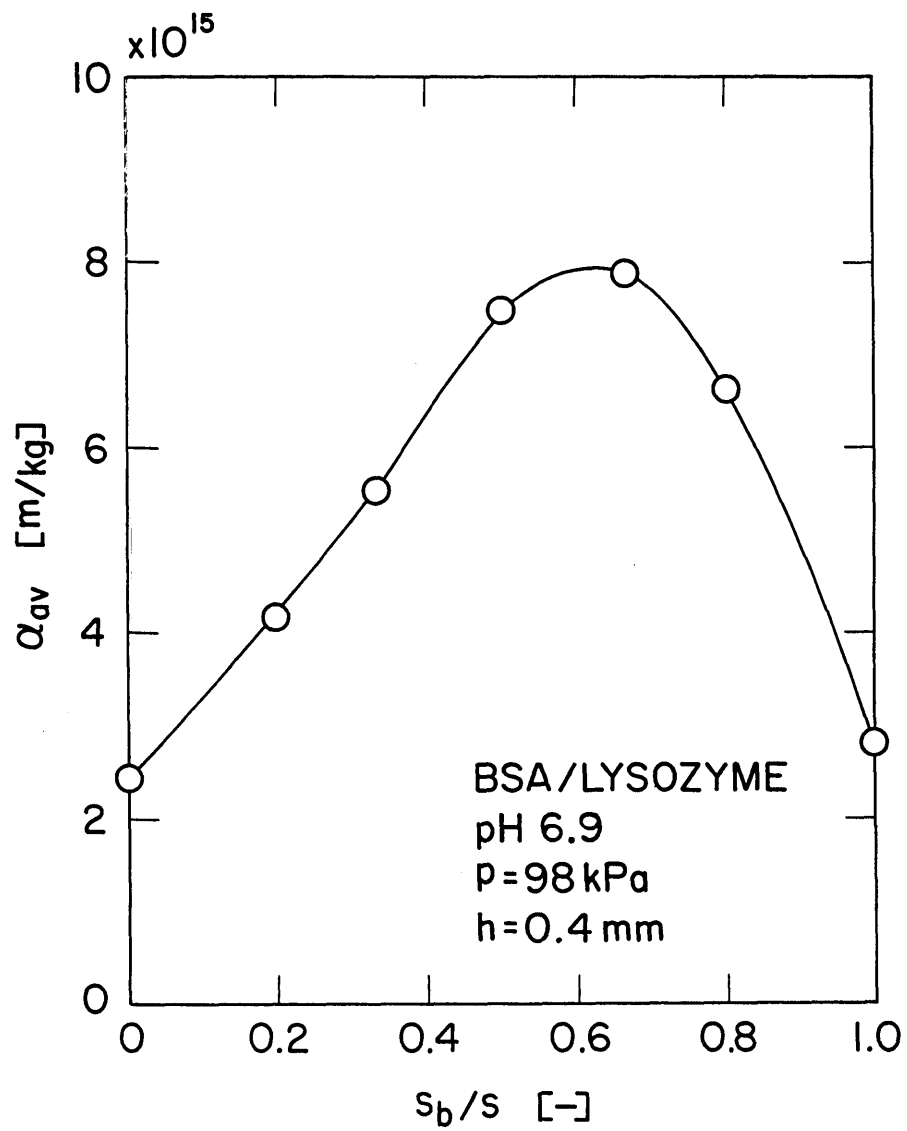


Fig. 3-12 Dependence of average specific filtration resistance on mixing ratio of proteins at pH 6.9

### 3-4 結言

濾過操作を途中で一時的に休止する限外濾過試験の結果から、ケーキを構成したタンパク質分子は再び溶液本体中へ戻らないことを明らかにした。このことから、2成分系タンパク質溶液の限外濾過を解析するためのモデルの一つとして、ケーキ濾過モデルを適用することは妥当であると判断した。

次に、濾過面積の急縮小効果を利用して、2成分系タンパク質溶液の限外濾過における濾過ケーキの平均空隙率や平均濾過比抵抗を求め、諸因子の影響を考察した。その結果、ケーキにおけるこれらの諸特性値は、pHの影響を大きく受けることが明らかとなった。これはpHによってタンパク質の荷電状態が変化し、結果として異種タンパク質間の静電的相互作用が種々に変化することに起因する。また、ケーキ構造はそれを構成する異種タンパク質の比率に大きく依存し、その依存性は各成分が同符号である場合と異符号である場合とでまったく異なる傾向を示すことが明らかとなった。

以上の結果は、次章より述べる2成分系タンパク質溶液の分離特性を検討する上で、極めて重要な知見を与えた。

## 第4章 2成分系タンパク質溶液の限外濾過特性に及ぼす溶液環境の影響

### 4-1 緒言

タンパク質は一般に pH によって種々の荷電状態を取り得ることから、pH や塩濃度などの溶液環境は、タンパク質溶液の限外濾過特性に大きな影響を及ぼす<sup>8,10,20,29-35</sup>。特に2成分系タンパク質溶液の限外濾過では、pH や塩濃度が異種タンパク質間の静電的相互作用に大きく影響し、その結果、濾過速度や溶質の膜透過性などの濾過特性にも複雑な影響を与える<sup>54-56</sup>。こうした2成分系タンパク質溶液の限外濾過特性を明らかにすることは工学的見地からも極めて重要であるにもかかわらず、研究例が少ないため、その詳細についてはこれまであまり把握されていないのが現状である。本章では、その限外濾過特性に関する基礎的な知見を得るため、2成分系タンパク質溶液の上向流型限外濾過試験を、一方の成分は阻止するがもう一方の成分は透過する分画分子量の限外濾過膜を用いて行い、濾過速度や分画性能に及ぼす pH や塩濃度などの溶液環境の影響を検討した。

### 4-2 実験装置および方法

本章では前章に引き続き、BSA および卵白リゾチームを試料タンパク質として使用した。これらの主な物性値および静電的特性は、Table 3-1 および Fig. 3-3 で既に示した通りである。試料溶液として使用する単成分系および2成分系タンパク質溶液は、前章 3-2 で説明した方法に従い、緩衝液を用いて調製した。各タンパク質成分の質量分率は一部の実験を除いて  $s_b=s_1=5 \times 10^{-4}$  とし、溶液の pH は 7 (0.01mol/l リン酸緩衝液) あるいは 4 (0.01mol/l 酢酸緩衝液) のいずれかに調整した。本研究ではイオン強度を種々に調整するため、添加塩として塩化ナトリウム (NaCl) を使用した。分離膜はすべて

の実験に対して疎水性のポリスルホン製限外濾過膜（PTTK, ミリポア株）を使用した。PTTK膜の公称分画分子量は3万であり、これより分子量の大きなBSAは阻止するが、分子量の小さなリゾチームは基本的には透過する。

Fig. 4-1に濾過実験装置の概略図を示した。バッチ式濾過器を濾液の流れ方向が鉛直上向きになるようにアングルプレートに設置し、上向流方式で2成分系タンパク質溶液の定圧限外濾過試験を行った。操作圧力は窒素ガスを作用させることにより98kPaに設定した。濾過器の有効膜面積は12.6cm<sup>2</sup>であり、常に試料溶液が供給されるよう上流側に供給タンクを接続した。濾液量の経時変化を測定するとともに、濾液を採取するフラスコを適当な時間間隔で交換して濾液中の各成分の濃度の経時変化も測定した。濃度の測定には、濾液中にBSAが漏洩する可能性を考慮して、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を使用した。まず、採取した濾液の一部を旭化成工業株製のHPLC用充填カラムAsahipak GS-520に通してBSAとリゾチームを分離し、ジーエルサイエンス株製のHPLC用分光光度計MODEL 502Uによる吸光度の測定結果から濾液中の各成分濃度を決定した。単成分系溶液の濾過実験では、島津製作所株製の分光光度計UV-150-02を用いて濾液濃度を測定した。吸光度の測定波長は、すべての測定に対して280nmである。

#### 4-3 実験結果および考察

2成分系タンパク質溶液の分離特性を評価するため、リゾチームの見掛けの阻止率と濾過速度の経時変化を求めた。リゾチームの見掛けの阻止率 $R_{obs,1}$ は、供給原液のリゾチーム濃度を $s_1$ 、濾液のリゾチーム濃度を $c_{p,1}$ として、Eq. (4-1)により定義される。

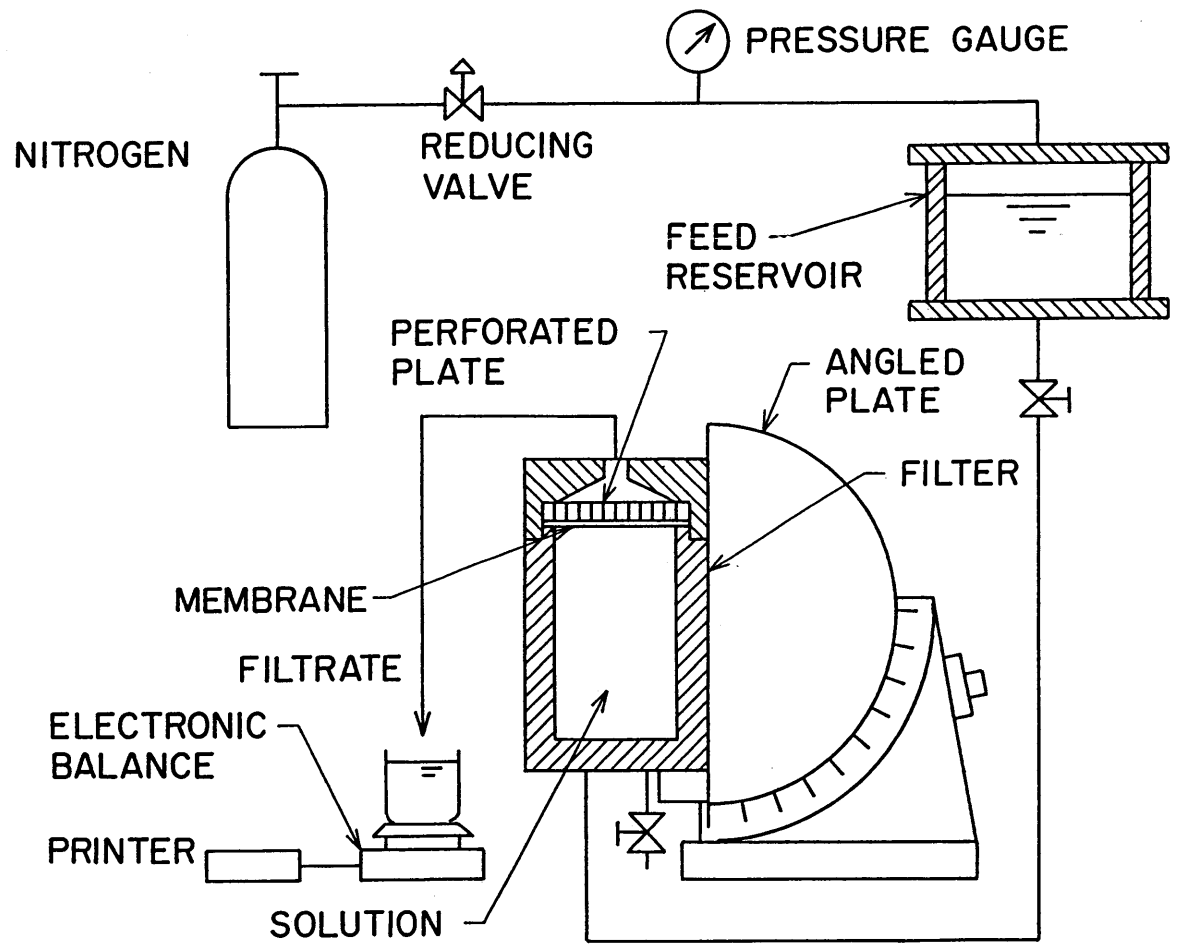


Fig. 4-1 Schematic diagram of upward ultrafiltration apparatus

$$R_{obs,l} = 1 - \frac{c_{p,l}}{s_l} \quad (4-1)$$

$R_{obs,l}=0$  はリゾチームの全透過を意味し、 $R_{obs,l}=1$  はリゾチームの全阻止を意味する。なお、クロマトグラフィーによる分析の結果、濾液への BSA の漏洩はほとんど無視できる程度であったため、BSA の阻止率  $R_{obs,b}$  は常に 1 であることを前提として実験結果の考察を行うことができる。膜によって阻止された溶質はそのままそこに蓄積するため、膜面における溶質濃度は供給原液の濃度よりも高くなる。したがって、膜は実際には膜面濃度  $c_m$  の溶液を阻止したことになるため、膜の本来の溶質阻止性能は、次式で定義される真の阻止率  $R$  を用いて表さなければならない。

$$R = 1 - \frac{c_p}{c_m} \quad (4-2)$$

しかし、膜面濃度  $c_m$  は通常実験的に求めることは不可能とされているので、一般的には実測可能な濃度のみで表される Eq. (4-1) で阻止性能を評価することが多く、工業的にはこの阻止性能の方が重要である。

本章では、2 種の代表的な pH 条件で実験を行った。一つは BSA が負、リゾチームが正の電荷を持ち、両者の間に引力が働く pH 7、もう一つは BSA、リゾチームがともに正の電荷を持ち、両者の間に静電的反発力が働く pH 4 である。

#### 4-3-1 異符号の電荷を持つ異種タンパク質の濾過特性

Fig. 4-2 に、pH 7 におけるリゾチームの阻止率  $R_{obs,l}$  を単位膜面積あたりの濾液量  $v$  に対してプロットし、種々の NaCl 濃度  $c_s$  について比較した。膜の分画分子量はリゾチームの分子量より大きいにもかかわらず、リゾチームはむしろ阻止される傾向にあり、その阻止

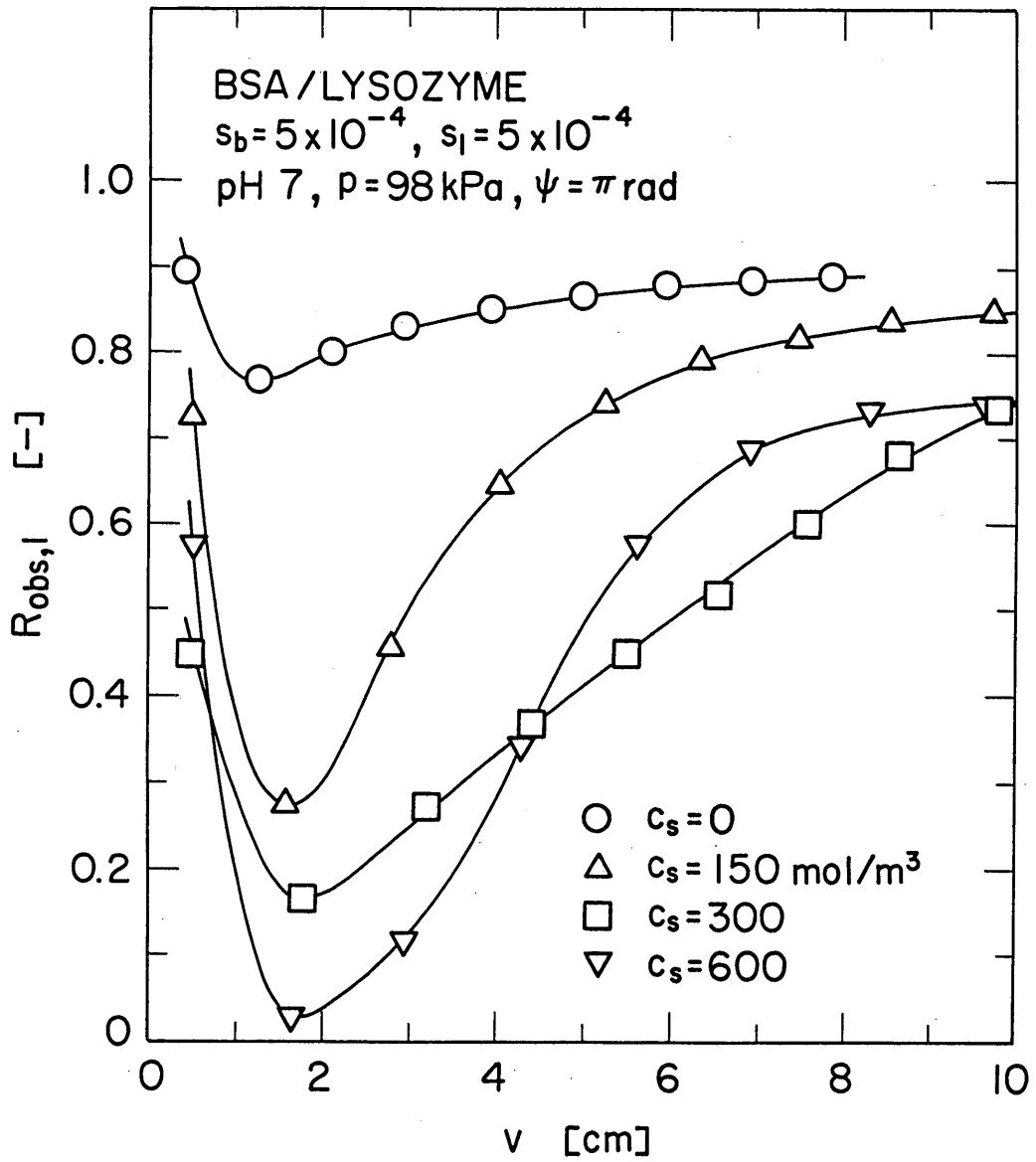


Fig. 4-2 Apparent lysozyme rejection variation with permeate volume per unit membrane area at pH 7



率は濾過の進行に伴い大きな変化を示した。濾過の初期段階において、いずれも高い阻止率を示したが、これは膜表面の疎水性の影響によりリゾチーム分子が膜に吸着したためである<sup>57,58)</sup>。この pH 環境下では、BSA・リゾチーム間に働く引力の影響で、BSA に強く引きつけられたリゾチーム分子は BSA とともに膜面で阻止される傾向を示し、特に NaCl を添加しない場合 ( $c_s=0$ ) にその影響が顕著に現れた。しかし、NaCl を添加すると、その添加量の増加に伴いリゾチームの阻止率は減少した。これは NaCl の影響で BSA・リゾチーム分子間に働く引力が弱められたためである。タンパク質分子間の静電的相互作用に及ぼす添加電解質のこの影響を説明するためには、電気二重層の厚さ (Debye の長さ)  $\kappa^{-1}$  について触れなければならない。電気二重層の厚さは Eq. (1-12) で定義される Debye のパラメータ  $\kappa$  の逆数である。

$$\kappa = \sqrt{\frac{8\pi n_0 z^2 e^2}{\epsilon k T}} \quad (1-12)$$

Eq. (1-12) から明らかなように、電気二重層の厚さは電解質濃度  $n_0$  ( $=N_A \cdot c_s$ ) の増大に伴って減少する。すなわち、電解質イオンの遮蔽効果により電気二重層は圧縮を受ける。これは 1 個のコロイド粒子から広がる電場が遠くまで及ばなくなることを意味し、結果的にコロイド粒子間の静電的相互作用が抑制される。その結果、タンパク質の  $\zeta$  電位は電解質濃度の増加に伴い減少する。以上の理由でリゾチームは透過しやすくなるが、濾過が進行するにつれ、リゾチームは膜面に堆積する BSA のケーキ層に保持されるようになり、阻止率のプロットは  $v$  の増加とともに著しく増大する傾向を示した。 $c_s=300 \text{ mol/m}^3$  程度までは NaCl 濃度が大きいほどリゾチームの阻止率は小さくなったが、それ以上濃度を大きくしても阻止率はそれほど変化しない。

Fig. 4-2 と同じ実験から得られた濾過速度の逆数( $d\theta/dv$ )を、 $v$  に対して Fig. 4-3 に示した。一般に上向流型濾過では、濾過初期における( $d\theta/dv$ )対  $v$  のプロットは、濾過ケーキの成長により下向流型濾過の場合と同様に直線的に増大するが<sup>9)</sup>、ある程度ケーキが形成されると濾液の流れ方向とは逆向きに作用する上向流型濾過に特有の重力の影響によりケーキの成長が抑制され、結果として濾過速度の低下が防げる<sup>20,59)</sup>。図のいずれのプロットも、この傾向に従う挙動を示した。NaCl を添加しない場合には、リゾチームの阻止の影響が顕著となり、第 3 章で述べたように、互いに異符号の電荷を持つ BSA とリゾチームの混合物からなる緻密で濾過比抵抗の大きな濾過ケーキが形成されるため、濾過速度はかなり小さくなった。一方、NaCl を添加した場合、電気二重層の圧縮によりリゾチームの阻止率が小さくなるため、それだけケーキ内に含まれるリゾチーム分子が少なくなり、ケーキ構造が緩やかになる。このため NaCl 濃度の増大とともに濾過速度は大きくなり、阻止率が同程度となる  $c_s=300\text{mol/m}^3$  以上で濾過速度はほとんど一致した。また、重力によるケーキの剥離効果により濾過速度の著しい低下は抑えられたが、その効果が表れた後もなお( $d\theta/dv$ )値は徐々に増加する傾向を示した。これは濾過の進行に伴いリゾチームの阻止率が増大し、ケーキ中にリゾチーム分子が取り込まれるようになったためである。

Figs. 4-2, 4-3 において説明したリゾチーム分子の挙動をさらに明確にするため、NaCl を添加しない場合と添加した場合のそれぞれについて、BSA 単成分系溶液と BSA・リゾチーム 2 成分系溶液の濾過速度の結果を Fig. 4-4 で比較した。塩を添加しない場合の結果 (●, ○) を比較すると、2 成分系溶液は BSA 単成分系溶液に比べて濾過速度が 1/5~1/4 程度小さくなった。これは、BSA 分子のみの粗いケーキを形成する単成分系溶液の場合に比べ、2 成分系溶液では濾過の初期段階からかなりのリゾチーム分子が BSA 分子とともに膜面に阻

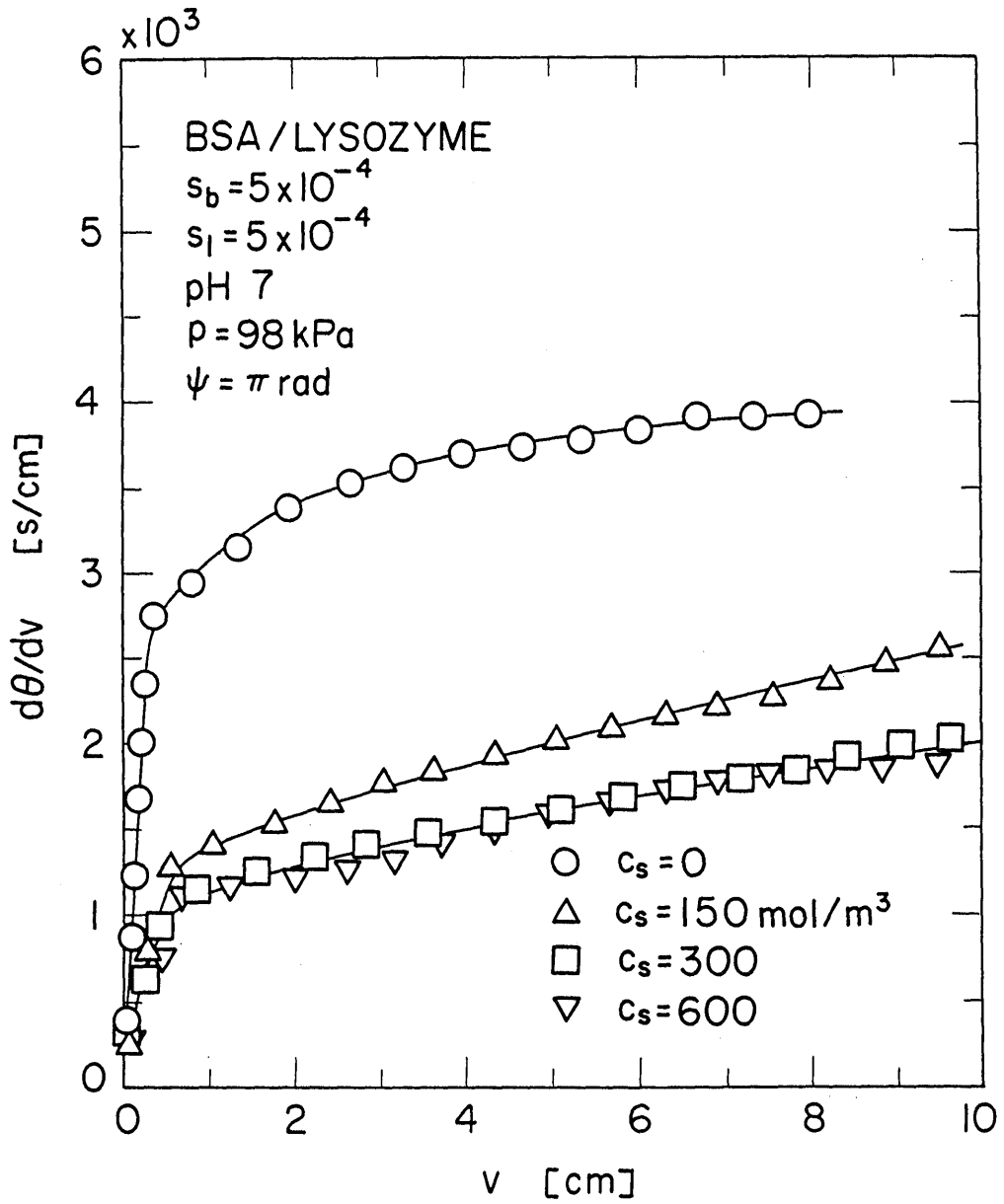


Fig. 4-3 Filtration rate variation with permeate volume per unit membrane area at pH 7

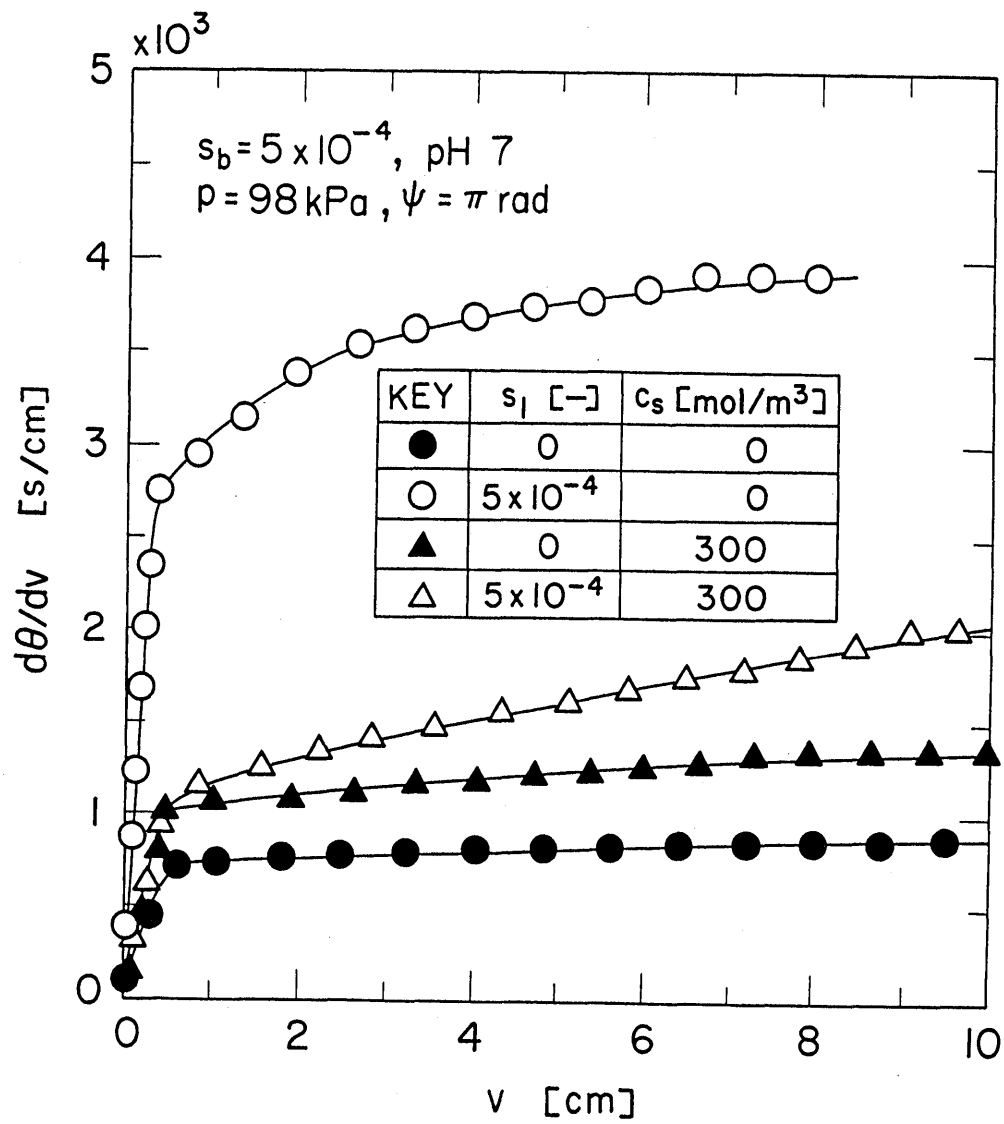


Fig. 4-4 Effect of lysozyme concentration on filtration rate variation at pH 7

止され、緻密な濾過ケーキを形成していることを裏付けている。一方、塩を添加した場合（▲、△）、濾過の初期段階では両者の濾過速度にそれほど差がなく、2成分系溶液においても濾過ケーキの大部分はBSA分子で占められていることを示唆している。しかし、やがて2成分系溶液では濾過速度が徐々に低下し、2つのプロットの差は大きくなる。これは2成分系溶液においてリゾチームの阻止率が増大し、ケーキ中にリゾチーム分子が含まれるようになったことを意味する。なお、単成分系同士で比較すると、塩を添加した方が濾過速度は小さくなったが、これはNaClによる電荷の遮蔽効果によりBSA分子間の反発作用が弱められ、ケーキ構造がより緻密になったからである<sup>8)</sup>。

pH 7で塩を添加しない条件におけるBSA・リゾチーム2成分系溶液について、リゾチーム濃度を一定にし、BSA濃度を種々に変化させた場合のリゾチームの阻止率および濾過速度の結果をそれぞれFigs. 4-5, 4-6に示した。リゾチーム単成分系溶液の濾過では、膜の分画分子量が示す通り、リゾチームの大部分が透過した。このことから、本研究で見られるリゾチームの阻止性は主に共存するBSAによるものであることが改めて証明された。リゾチーム濃度の1/50の濃度になるようにBSAを混合した2成分系溶液の場合、濾過の比較的初期段階ではリゾチームはある程度膜を透過するが、濾過が進行するにつれてリゾチームの阻止率は急激に増大し、やがてかなりのリゾチーム分子が阻止されるようになった。このように、リゾチーム濃度に対してBSA濃度がかなり小さくても、膜面に堆積するBSAのケーキ層は多くのリゾチーム分子を引きつけ、その透過を妨げる役割を果たすという点には特に注意を払う必要がある。リゾチーム濃度に対してBSA濃度が1/5になるように混合した溶液およびリゾチームと等量のBSAを混合した溶液では、ともに濾過の初期からかなりのリゾチーム分子が膜面で阻止された。リゾチームの阻止率に

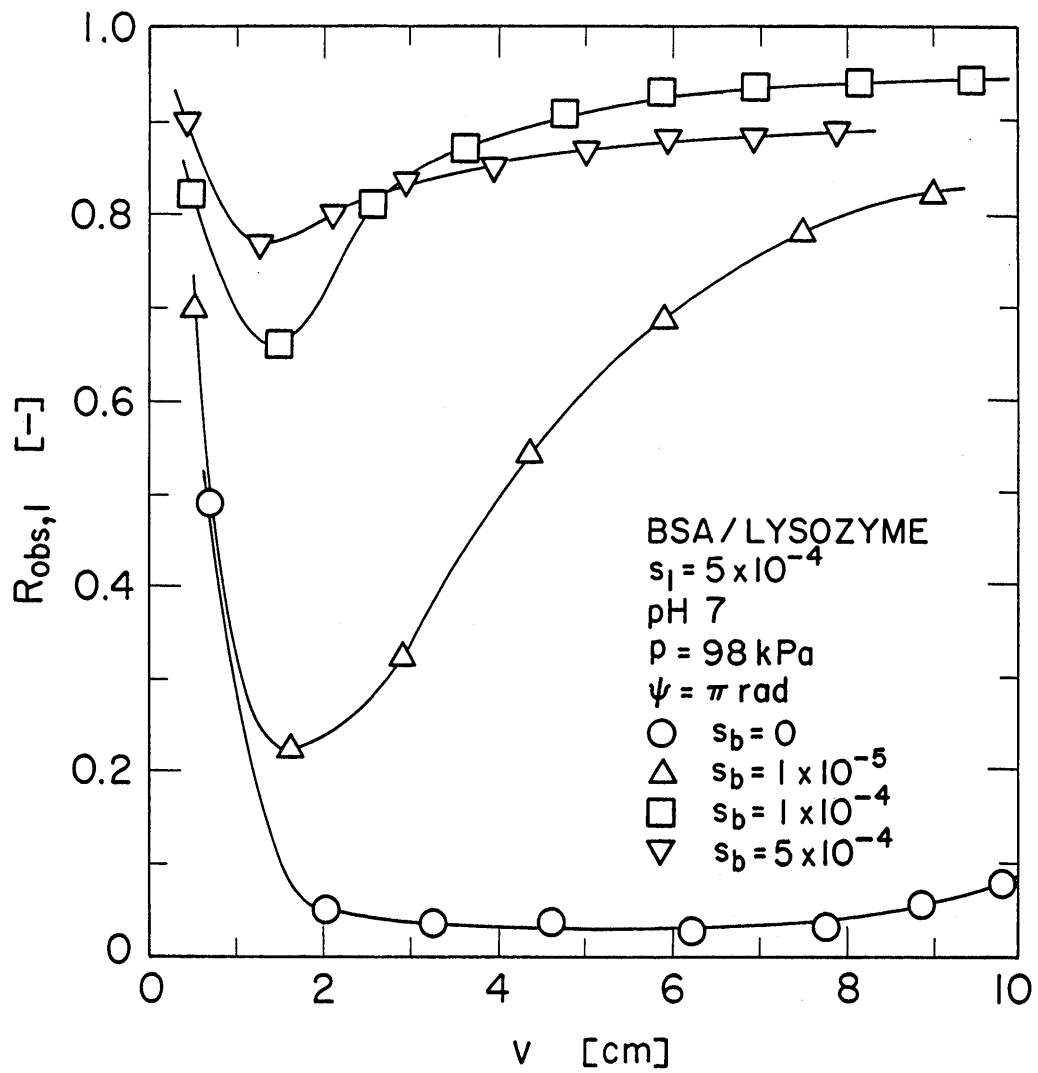


Fig. 4-5 Effect of BSA concentration on apparent lysozyme rejection variation at pH 7

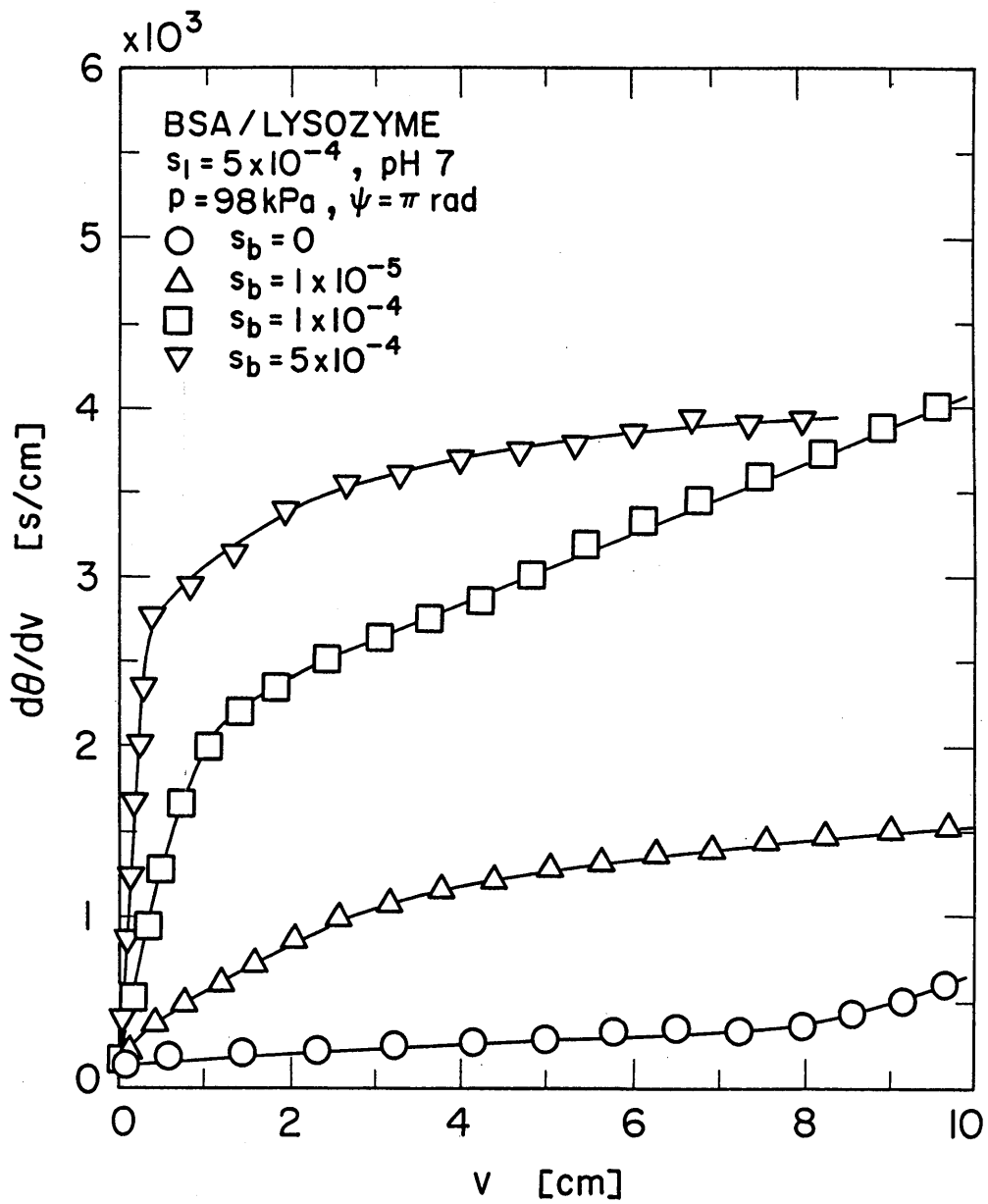


Fig. 4-6 Effect of BSA concentration on filtration rate variation at pH 7

対する以上の BSA 濃度の依存性の結果からも、リゾチームの阻止性を支配しているのは共存する BSA であることが明白である。濾過速度は BSA 濃度の増加とともに減少したが、これはスラリー濃度の増加のためであることもさることながら、ケーキ中にリゾチーム分子が多く含まれるようになったこともその重要な要因の一つであることは強調しておかなければならない。

#### 4-3-2 同符号の電荷を持つ異種タンパク質の濾過特性

Figs. 4-7, 4-8 に pH 4 におけるリゾチームの阻止率および濾過速度の結果をそれぞれ示した。注目すべきは塩を添加しない場合の阻止率で、pH 7 のときよりさらに高い値を示した。この驚くほど高いリゾチームの阻止性は、BSA・リゾチーム間に働く静電的反発力によって説明することができる。すなわち、リゾチームがほとんど膜を通過することができないのは、リゾチーム分子が膜面に近づいたとき、濾過ケーキを形成する BSA の反発力を受けるからであると考えることができる。このような条件下で形成されたケーキは、第 3 章でも説明したように、非常に湿潤で濾液の流動抵抗が小さいため、濾過速度は比較的大きくなった。一方、塩を添加すると電気二重層の圧縮により BSA・リゾチーム両分子の荷電が遮蔽され、こうした反発力が弱まるため、リゾチームは膜を透過しやすくなり、阻止率は小さくなった。また、反発力が弱まることにより、形成される濾過ケーキはより密な構造となるため、濾過速度は小さくなった。

#### 4-4 結言

2 成分系タンパク質溶液の上向流型限外濾過試験を、一方の成分は阻止するが、もう一方の成分は透過するとされている限外濾過膜を用いて行い、溶質の阻止率や濾過速度に及ぼす pH や塩濃度などの溶液環境の影響を検討した。その結果、溶液環境は異種タンパク質間



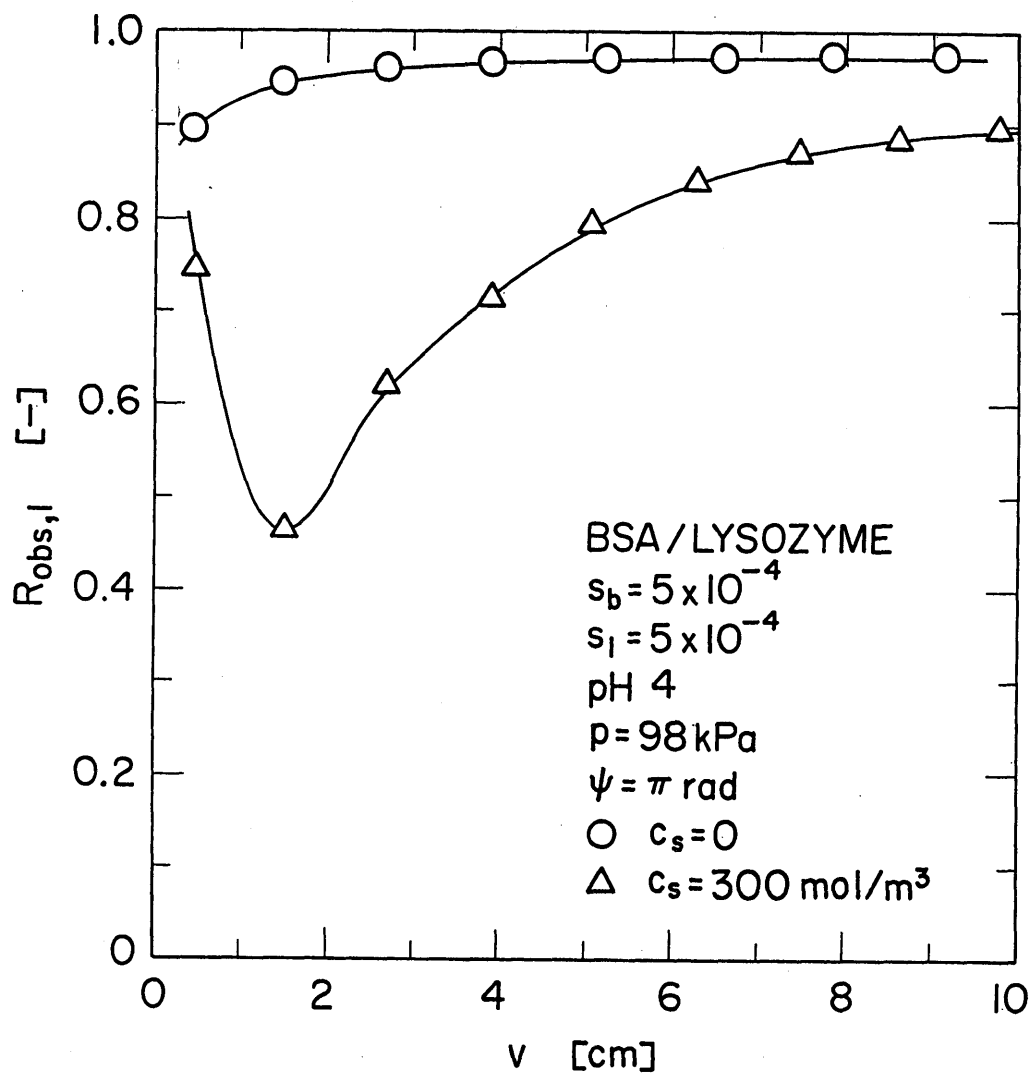


Fig. 4-7 Apparent lysozyme rejection variation with permeate volume per unit membrane area at pH 4

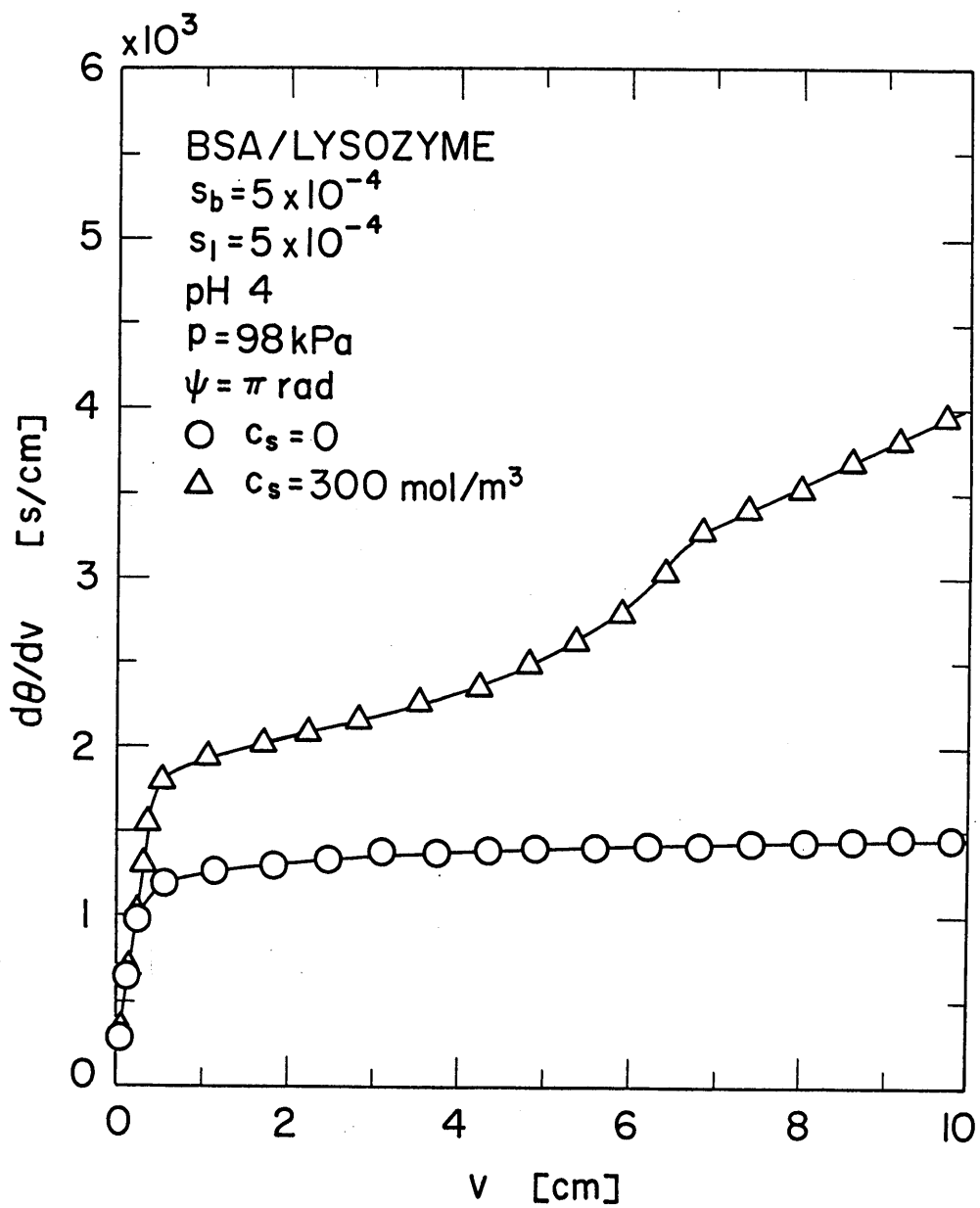


Fig. 4-8 Filtration rate variation with permeate volume per unit membrane area at pH 4

の静電的相互作用に影響を及ぼし、それが 2 成分系溶液の限外濾過特性を支配する主要な因子となることを明らかにした。各タンパク質の電荷が互いに異符号であるとき、両成分間に働く引力の影響により、本来膜を透過するはずの小さい方の成分も大きい方の成分とともに膜によって阻止される。各タンパク質がともに同符号に帯電しているときも、濾過ケーキを形成する大きい成分の反発を受け、小さい成分は膜を透過しにくくなる。これらの電氣的な影響は電解質の添加によって和らげられ、結果として溶質の膜透過性は高くなる。濾過速度は小さい方のタンパク質成分がケーキ中にどれくらい含まれるか、また、これに伴い濾過ケーキがどのような構造となるかに依存する。

## 第5章 2成分系タンパク質溶液の限外濾過における分画特性

### 5-1 緒言

最近、2成分以上のタンパク質を含む溶液の限外濾過による分画操作が、工業的に極めて重要となり、分離機構の解明への期待が急速に高まりつつある。しかし、その機構は極めて複雑なため、これまで大きな成果は報告されていない。より詳細な検討を行うためには、限外濾過特性を支配する因子を明らかにし、その影響について考察することが必至である。溶液環境がその支配的因子の一つであることは、単成分系タンパク質溶液を使用したこれまでの多くの研究例から、比較的良好に知られた事実である。そこで、第3章および第4章では、溶液環境の影響について検討を行った。その他の因子については研究例が稀少なため、現在のところ十分な知見が得られていない。その他の因子として考えるものに、膜面に作用する剪断力や膜の親・疎水性効果がある。これは単成分系タンパク質溶液を使用した限外濾過の研究によって指摘された<sup>27)</sup>。2成分系においても、これらの因子が濾過特性を支配するものと予想される。そこで、2成分系タンパク質溶液の限外濾過試験を、一方の成分は阻止するがもう一方の成分は透過する種々の膜を用いて様々な濾過方式で行い、濾過速度や分画性能に及ぼす膜面への剪断力および膜-分子間相互作用の影響を検討した。また、最近、卵白アルブミン溶液などの限外濾過操作中に濾過器に超音波を照射することにより、生成ケーキによる流動抵抗が抑制されたという効果が報告されている<sup>28)</sup>。しかし、2成分系タンパク質溶液の分画操作に超音波照射を応用した例はこれまで皆無である。そこで超音波を照射しつつ限外濾過を行い、分画効率に対する超音波照射の有効性について検討した。以上の結果をもとに、効率的な分画操作を行うための操作指針を考察した。

## 5-2 実験装置および方法

本章における試料タンパク質、試料溶液の調製法、濾過実験の基本操作は第4章と同じである。

タンパク質試料としてBSAおよび卵白リゾチームを使用し、すべての実験に対して各タンパク質成分の質量分率が $s_b=s_l=5 \times 10^{-4}$ となるようにリン酸緩衝液(pH 7)あるいは酢酸緩衝液(pH 4)に溶解し、2成分系タンパク質溶液を調製した。また、一部の実験ではNaClを $c_s=300 \text{ mol/m}^3$ の濃度になるように添加し、イオン強度の調整を行った。膜とタンパク質との相互作用の影響を検討するため、分離膜としてアミコン製のYM30およびPM30の2種を使用した。前者は親水性のポリサッカライド製でタンパク質が吸着しにくく、後者は疎水性のポリスルホン製でタンパク質が吸着しやすいという特徴を有する。公称分画分子量はいずれも3万で、これより分子量の大きなBSAは阻止し、分子量の小さなリゾチームは単成分で濾過したときには透過する。

本章では、生成する濾過ケーキに与えられる種々の外力の影響を検討するため、様々な濾過方式で実験を行った。それらを模式図で表し、Fig. 5-1にまとめた。(a)は濾液の流れ方向が鉛直上向きとなる上向流型限外濾過の概略であり、第4章で説明したものと同一である。(b)は濾液の流れ方向が重力の向きと一致するように(a)と同じ濾過器を設置した下向流型濾過の概略である。(c)は内部に攪拌翼を装備した有効濾過面積 $28.0 \text{ cm}^2$ のバッチ式攪拌セルMODEL UHP-62(アドバンテック東洋株)の概略であり、攪拌型の限外濾過を種々の回転速度に設定して行った。なお、攪拌翼はその底面が膜面から6mmの高さになるように設置されている。さらに超音波照射の効果を評価するため、底部に超音波の発生源を備えた超音波洗浄器(LTH 610-6, ブランソン株)を使用し、(d)で表されるように水を満たした洗浄槽内に(a)で使用した濾過器を浸し、超音波を照射しつつ上向流

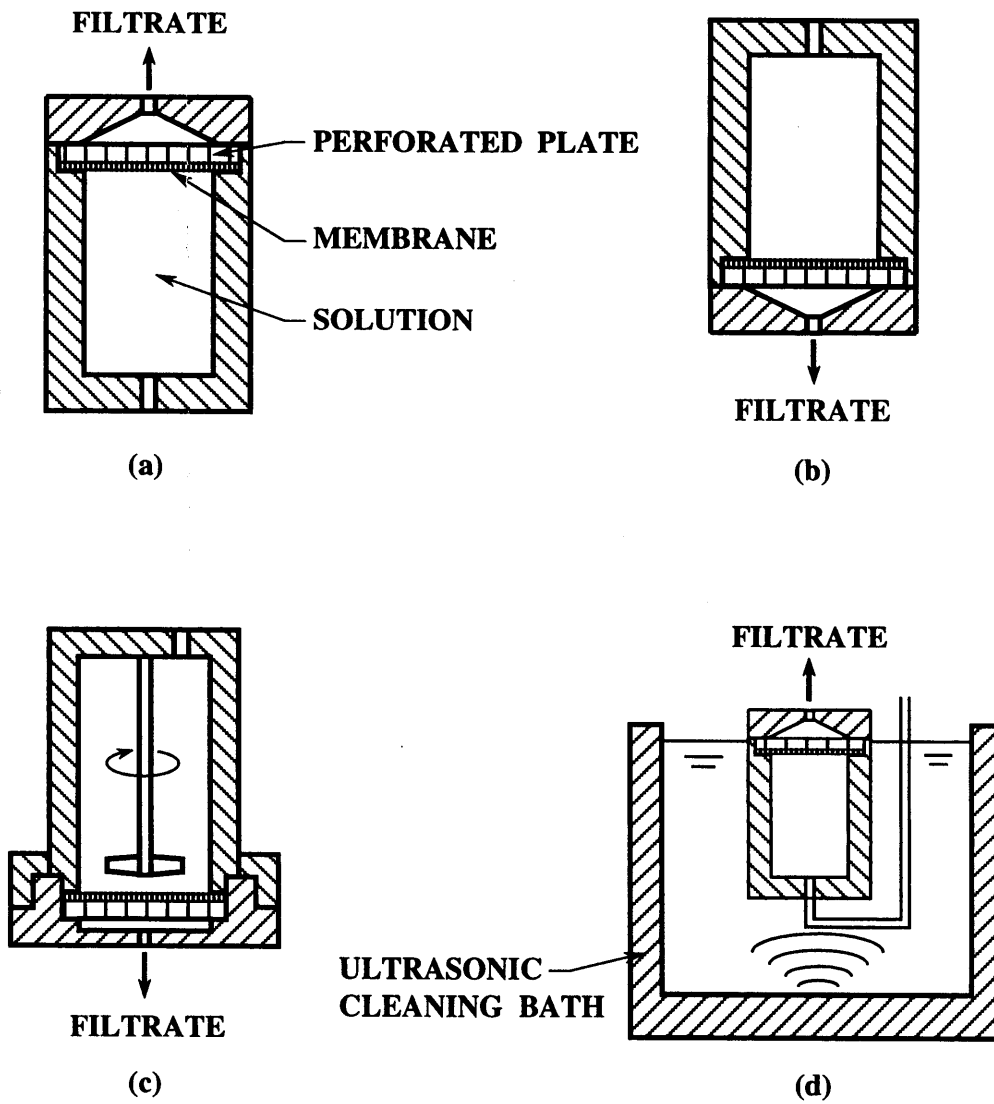


Fig. 5-1 Schematic view of filtration apparatus

型および下向流型濾過を行った。このとき、超音波の進行方向は膜面に対して垂直になる。超音波の発振周波数は 25kHz であり、出力電力は特に説明がない限り 180W である。以上の濾過実験はすべて 98kPa の一定圧力下で行い、濾液量と濾液中の各溶質濃度の経時変化を測定した。

### 5-3 実験結果および考察

本章でも前章と同様、濾過速度とリゾチームの阻止率によって濾過性能を評価した。

#### 5-3-1 膜面に作用する剪断力の影響

2 成分系タンパク質溶液の分画特性に及ぼす膜面への剪断力(あるいは重力)の影響について検討するため、非攪拌の下向流型濾過、上向流型濾過、攪拌型の下向流型濾過を行った。これらの実験ではタンパク質が吸着しにくい YM 膜を使用し、BSA とリゾチームとの相互作用がなるべく小さくなるように、pH 7 で塩を含む溶液環境に調整した。

Fig. 5-2 に、濾過速度の逆数( $d\theta/dv$ ) 対 単位膜面積あたりの濾液量  $v$  を示した。下向流型濾過では、濾過の進行に伴いケーキが成長し続けるため濾過速度が著しく減少し、プロットはケーキ濾過モデルに従う直線関係を示した<sup>8,9)</sup>。上向流型濾過では、濾過初期において下向流型濾過と一致した濾過速度の減少傾向を示したが、やがて重力の影響によりケーキが剥離されるため、濾過速度の低下が抑制されるようになった。攪拌型濾過では、攪拌速度が大きいほどケーキの掃流効果が大きくなるため、濾過速度は顕著に増大した。上向流型濾過における濾過速度は攪拌速度 5.2rad/s における濾過速度よりもやや小さいことから、上向流型濾過において膜面上のケーキに作用する重力の影響は、極めて小さな剪断力に相当するものと考え

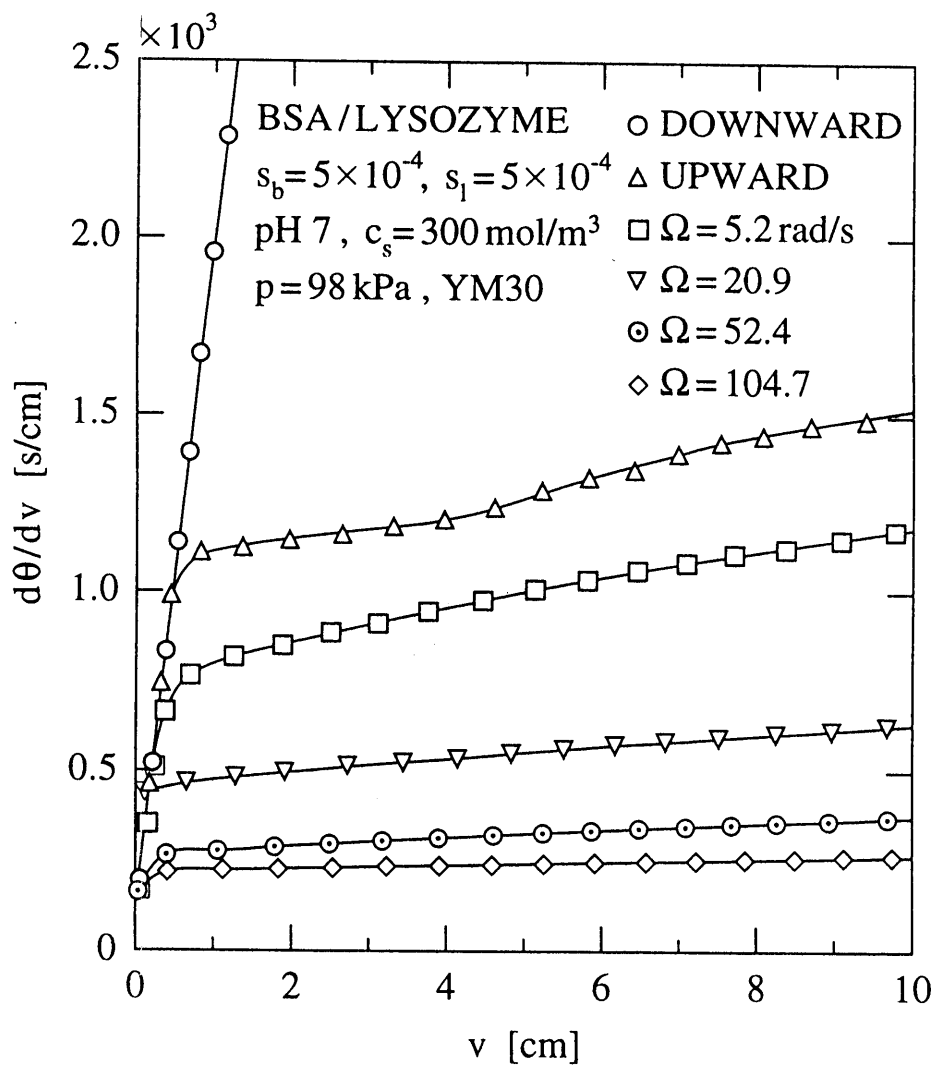


Fig. 5-2 Effect of hydrodynamics above membrane on filtration rate



られる。以上の結果から、濾過方式の違いによって生じる濾過速度の大きな差違は、主に形成されるケーキの量に起因するものであることがわかる。

Fig. 5-2 に対応するリゾチームの見掛けの阻止率  $R_{obs,1}$  の結果を、濾液量  $v$  に対して Fig. 5-3 にプロットした。なお、高速液体クロマトグラフィーの分析結果から、分離膜はすべての実験において BSA をほぼ完全に阻止していることがわかった。すなわち、すべての実験に対して  $R_{obs,b}=1$  である。リゾチームの阻止率は濾過の初期段階において特に大きくなったが、これは前章と同様、膜へのリゾチーム分子の吸着によるものと思われる。その後、下向流型濾過ではリゾチームはほぼ完全に透過し、上向流型濾過ではごくわずかに阻止された。また、攪拌を行うことにより阻止率は増大し、より攪拌速度が大きいほどリゾチームは阻止されやすくなった。この傾向は単成分系タンパク質溶液における既報の結果と同様である<sup>27)</sup>。濾過速度と阻止率の関係をより明確にするため、Fig. 5-4 に、 $v=10\text{cm}$  におけるリゾチームの阻止率( $R_{obs,1}$ )<sub>e</sub> をそのときの濾過速度  $q_e$  の対数値に対して示した。図のように、プロットはほぼ直線的に増加した。以上のように、膜面への剪断力の増加はより大きな濾過速度を得るには有効であるが、その反面、阻止率が増大し、分画性能の低下を引き起こす一因となってしまふ。リゾチームが阻止されるようになるのは、膜面に運ばれたリゾチーム分子が剪断力によって濾過ケーキとともに掃流され、リゾチームの透過が妨げられるためであると推察される。この点を考慮すると、2成分のタンパク質の分画をより完全に行うためには、ケーキの剥離を最小限に抑えて膜面へ溶質を十分に供給することが望ましいといえる。これには非攪拌型のデッドエンド下向流型濾過が最も適合するが、ケーキの成長による濾過速度の低下があまりにも著しく、工業的実用性には乏しい。また、濃縮操作の観点からすると、なるべく大きな剪断力を膜面に与え、

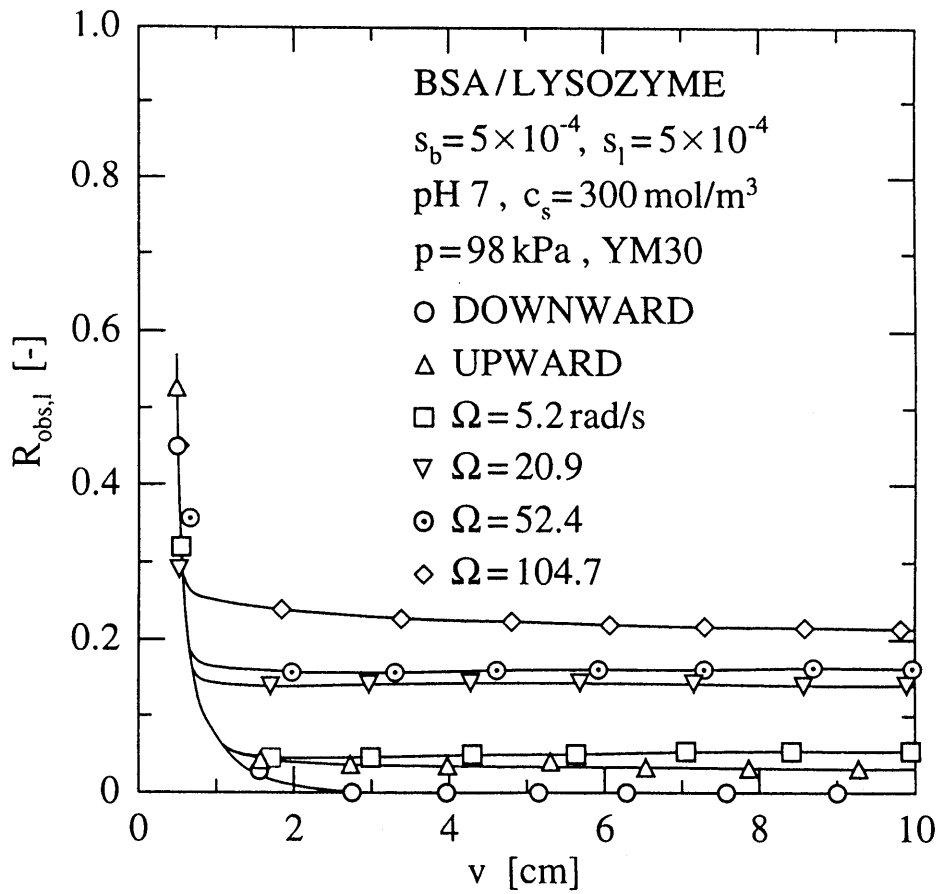


Fig. 5-3 Effect of hydrodynamics above membrane on apparent lysozyme rejection

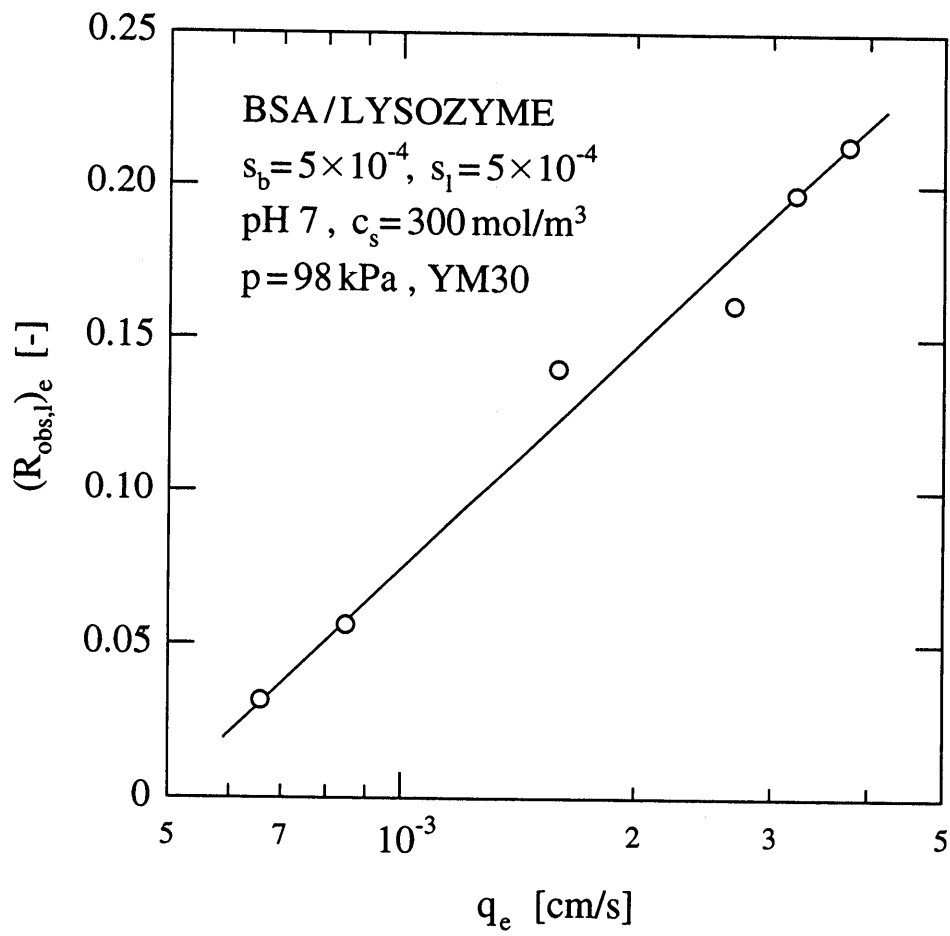


Fig. 5-4  $(R_{\text{obs},l})_e$  versus  $q_e$

濾過速度と溶質の阻止性を高めることが望ましいといえるが、分画操作としてはふさわしくない。以上の点を考え合わせると、2成分系タンパク質溶液の分画操作に対しては、濾過速度の低下を阻止しつつ、分画をより完全に行うことが可能な上向流型濾過や低攪拌型の濾過が効果的であると結論づけられる。

分離特性に対する膜面への剪断力の依存性を定量的に示すため、 $q_e$  の対数と  $(R_{obs,l})_e$  を、攪拌速度  $\Omega$  の対数值に対して Fig. 5-5 にプロットした。 $\log q_e$  対  $\log \Omega$  はほぼ直線関係を示し、 $(R_{obs,l})_e$  対  $\log \Omega$  も概ね直線となった。

### 5-3-2 異種タンパク質間の相互作用の影響

2成分系タンパク質溶液の分離特性を支配する主要な因子として、溶液環境が重要であることは既に第4章で説明したが、本章ではタンパク質が低吸着性のYM膜を用いて、改めてpHの影響について検討した。pH4とpH7の2種のpH条件下でそれぞれ上向流型濾過および攪拌型濾過を行い、Figs. 5-6, 5-7において濾過速度およびリゾチームの阻止率の結果を比較した。なお、塩は添加していない。pH4ではBSAとリゾチームの電荷は同符号であるため、溶液中のすべての分子間に静電的反発力が作用し、濾過ケーキの構造は緩やかになる。したがって、Fig. 5-6に示すように、図中のいずれの濾過方式においてもpH4における濾過速度は、異符号に帯電した異種タンパク質間に働く引力によってケーキ構造が緻密になるpH7の場合よりかなり大きくなった。また、pH4ではリゾチームはケーキを形成するBSAの反発を受け、これが結果的にリゾチームの掃流効果となって膜面へのリゾチームの供給量を顕著に減少するため、Fig. 5-7に示すようにリゾチームの阻止率はいずれの濾過方式についてもpH7の場合より大きくなった。なお、これらの図においても、先に示した結果と同様に、溶質が掃流されやすい攪拌型濾過の方が大きな濾

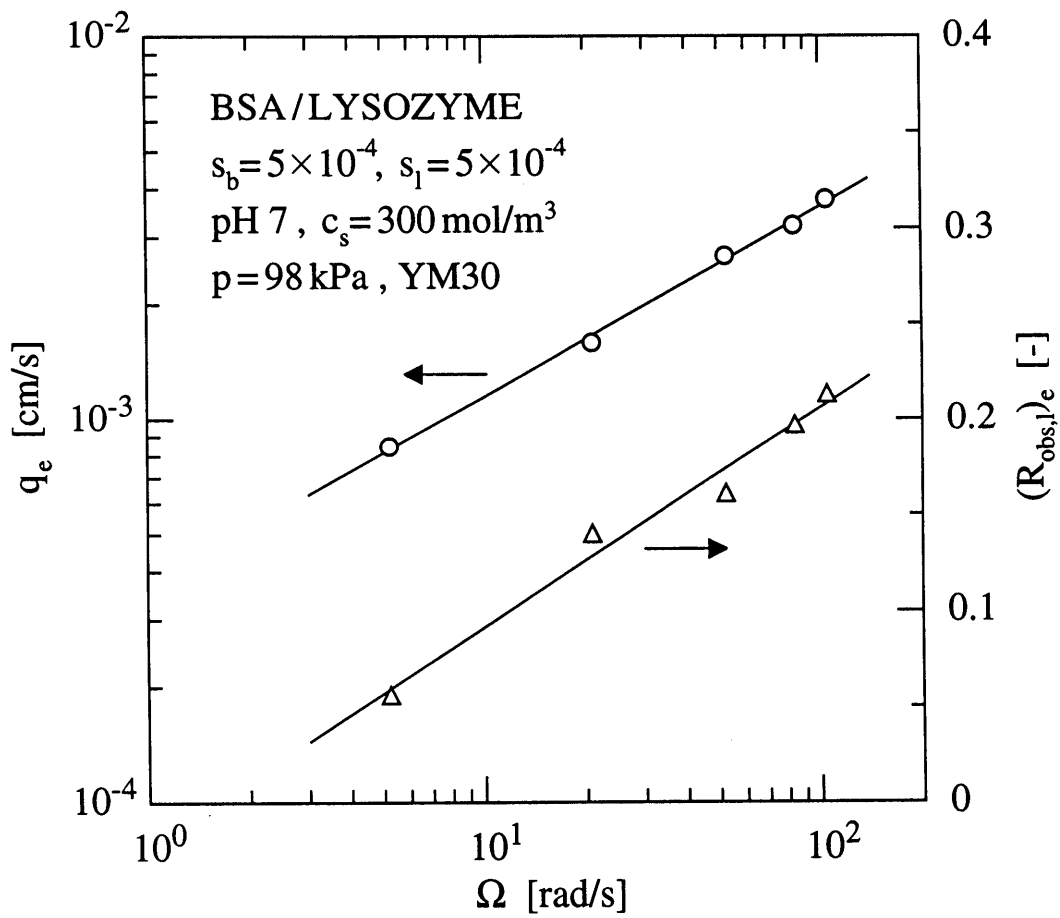


Fig. 5-5  $q_e$  and  $(R_{\text{obs},l})_e$  as function of  $\Omega$

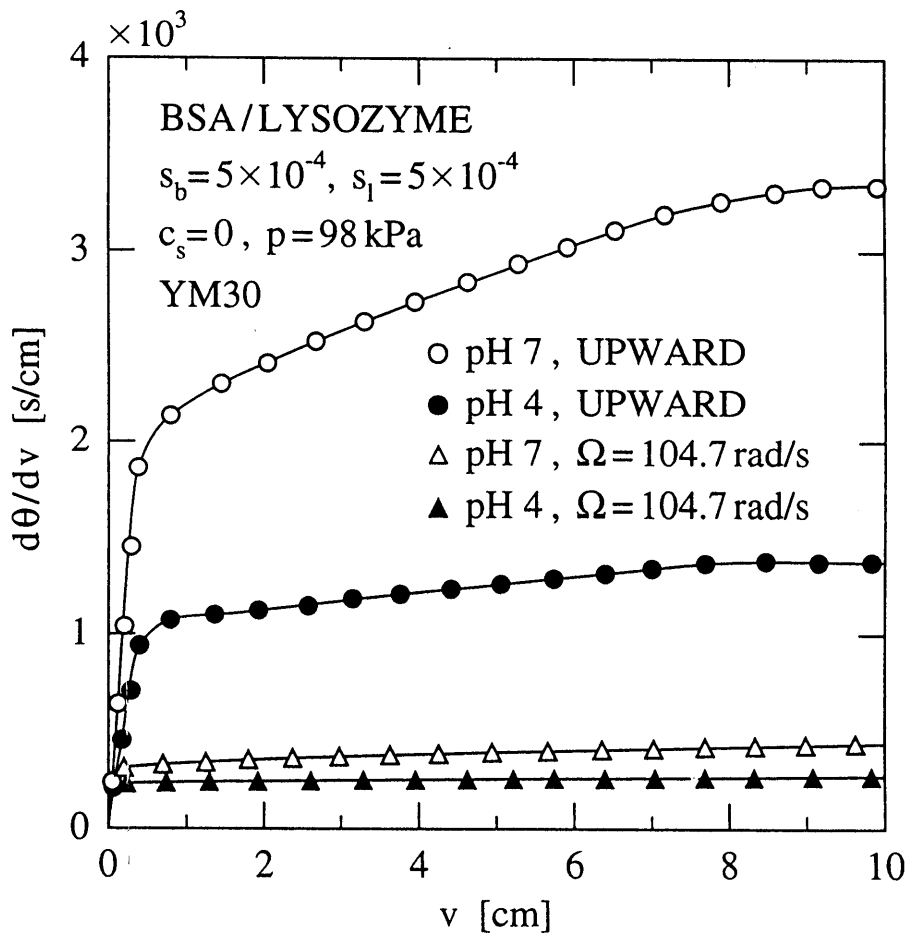


Fig. 5-6 Effect of pH on filtration rate

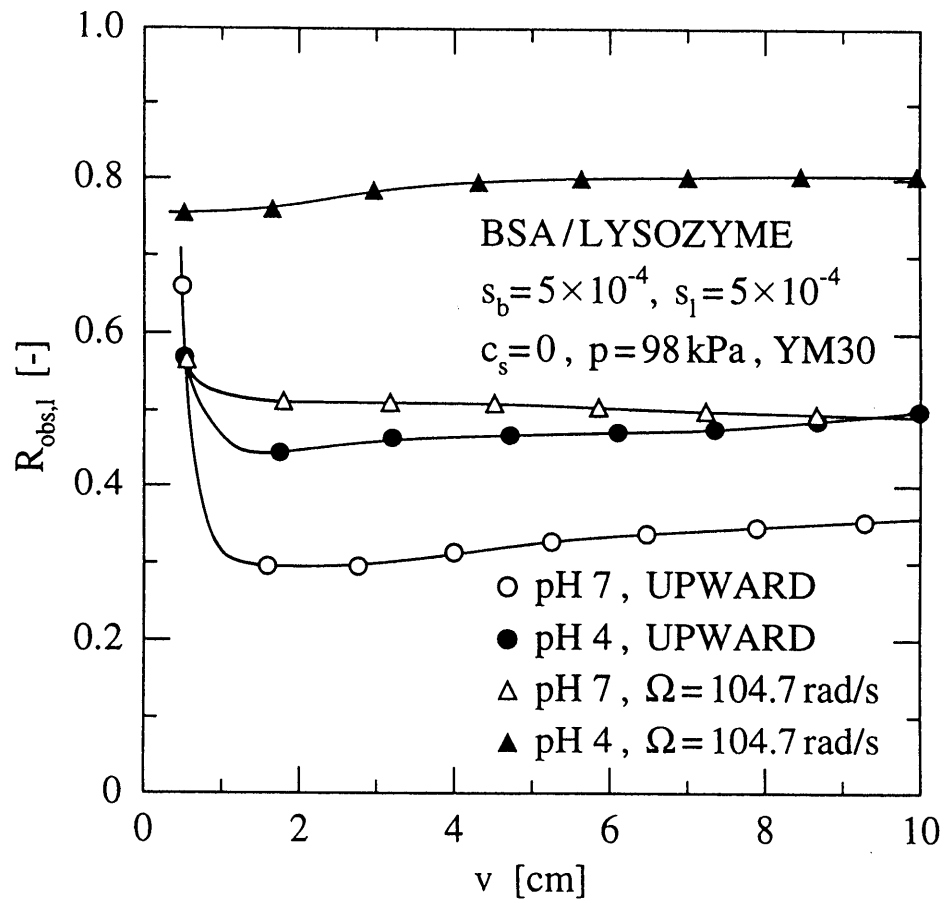


Fig. 5-7 Effect of pH on apparent lysozyme rejection

過速度が得られ、なおかつ阻止率が大きくなった。

### 5-3-3 膜のタンパク質吸着性の影響

上向流型濾過における濾過速度および阻止率の結果を、タンパク質が吸着しにくい YM 膜と吸着しやすい PM 膜の 2 種の膜を用いた場合について、Fig. 5-8 で比較した。溶液の pH は 7 に調整し、塩を添加した。PM 膜は YM 膜より膜表面および内部におけるタンパク質の吸着が著しいとされているにもかかわらず、両者の濾過速度には顕著な違いが現れなかった。これは、膜の親・疎水性の影響より、形成される濾過ケーキの影響の方が濾過速度に対して支配的であるためと考えられる。一方、リゾチームの阻止率は両者の膜で大きく異なる挙動を示した。YM 膜では濾過初期を除けばリゾチームは一様に高い透過性を維持しているのに対し、PM 膜では濾過の進行に伴い阻止率が徐々に増大する傾向を示すのが特徴的であり、リゾチーム分子の吸着が進行していることを示唆している。なお、YM 膜と PM 膜ではタンパク質の吸着性が大きく異なるにもかかわらず、吸着によると思われる初期段階でのリゾチームの阻止の程度が 2 つの膜で同じぐらいになったが、膜の親・疎水性だけでこの現象をすべて説明できるわけではなく、膜の荷電などの他の因子が初期のファウリング現象に関与しているものと推察される。以上のように、2 成分系タンパク質溶液の分画をより完全に行うためには膜の選択が極めて重要となり、タンパク質の種類にもよるが、一般に疎水性の膜の使用は避けたほうがよい。この場合、親水性の膜の使用は濾過の長期にわたってかなり効果的である。疎水性の膜の使用が避けられない場合には、親水性物質による表面修飾などの前処理を膜に施すと効果が期待できる。



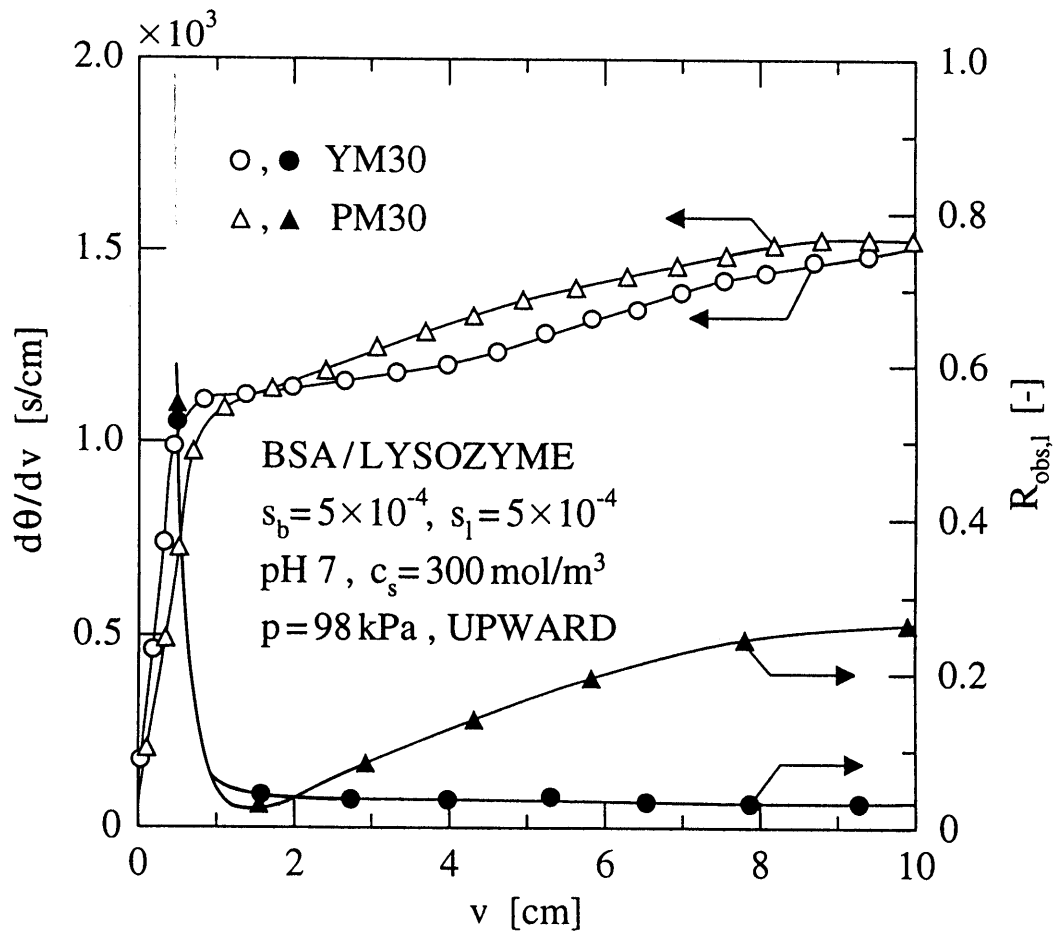


Fig. 5-8 Comparison between protein adsorptive and non-adsorptive membranes on filtration rate and apparent lysozyme rejection

#### 5-3-4 超音波照射の影響

濾過進行中において濾過器に超音波を照射する場合と照射しない場合を比較し、2成分系タンパク質溶液の分離性能に対する超音波照射の有効性について検討した。

Fig. 5-9 に、YM 膜を用い pH 7 の環境下で行った上向流型濾過試験における濾過速度の結果を示した。図に示されるように、超音波の照射は濾過速度のめざましい改善をもたらせた。これは非常に注目すべき効果であり、限外濾過を行う上で大きな障壁となるフラックスの低下を阻止する一手段として、超音波の照射が極めて有効であることを意味している。Fig. 5-10 に示すリゾチームの阻止率の結果から、さらに注目すべき超音波照射の効果が明らかになった。Figs. 5-2, 5-3 において、剪断力の増加は濾過速度の増大と同時に分画性能の低下を引き起こすことを明らかにしたが、超音波を照射した場合には、濾過速度が著しく増大したにもかかわらず、驚くべきことにリゾチームの透過性はほとんど低下しなかった。超音波の照射が阻止率にほとんど影響を及ぼさないことから、超音波の振動エネルギーは基本的にケーキを溶液本体中へ掃流することには寄与せず、膜面へのリゾチームの供給量は超音波を照射する場合としない場合とで同じであるという推察が可能である。このとき濾過速度が増大したことに対しては、超音波の振動エネルギーの影響で濾過ケーキがより一層膨潤した状態となり、溶液の流路となるケーキの空隙が非常に大きくなったためであると解釈することができる<sup>60)</sup>。また、これらの図では、超音波の有無によらず塩を添加した場合の方が添加しない場合より大きな濾過速度と高い分画性能が示され、第 4 章で明らかにした pH 7 における結果に一致する。

Fig. 5-11 において、濾過速度への超音波照射の影響を上向流型濾過と下向流型濾過とで比較した。これは YM 膜を用い、pH 7 で塩を添加した場合についての結果である。通常の下向流型濾過ではフラ

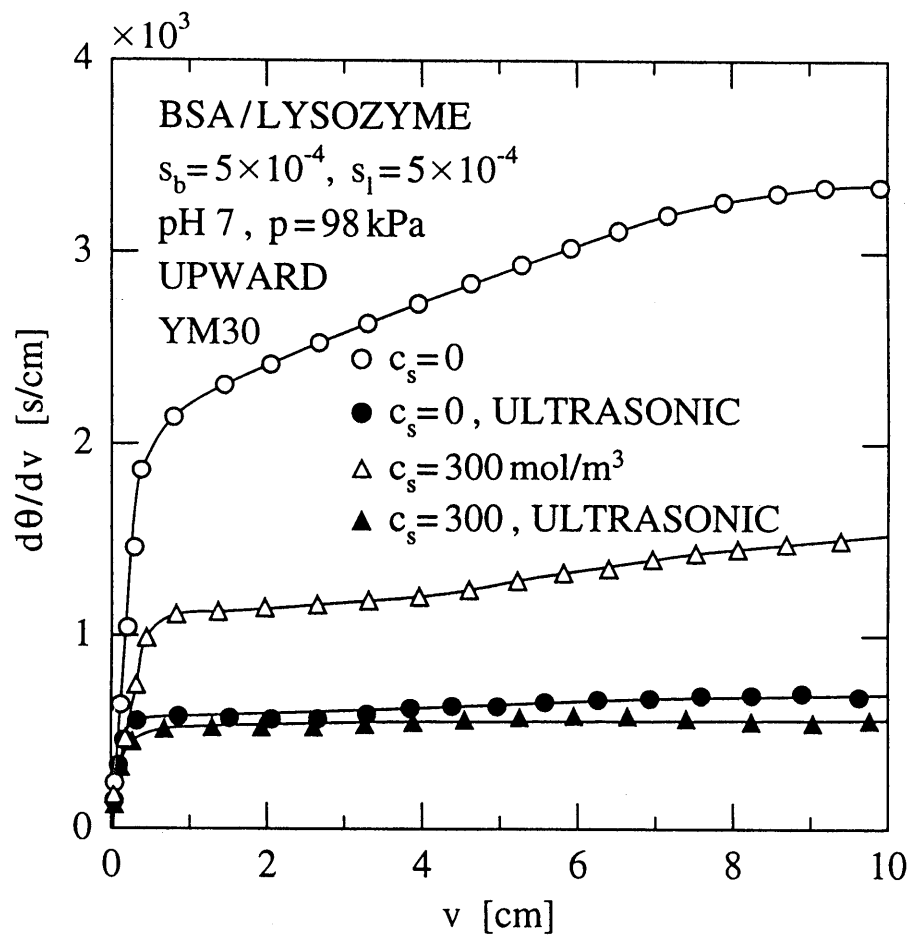


Fig. 5-9 Effect of ultrasonic irradiation on filtration rate in upward ultrafiltration for different NaCl concentrations

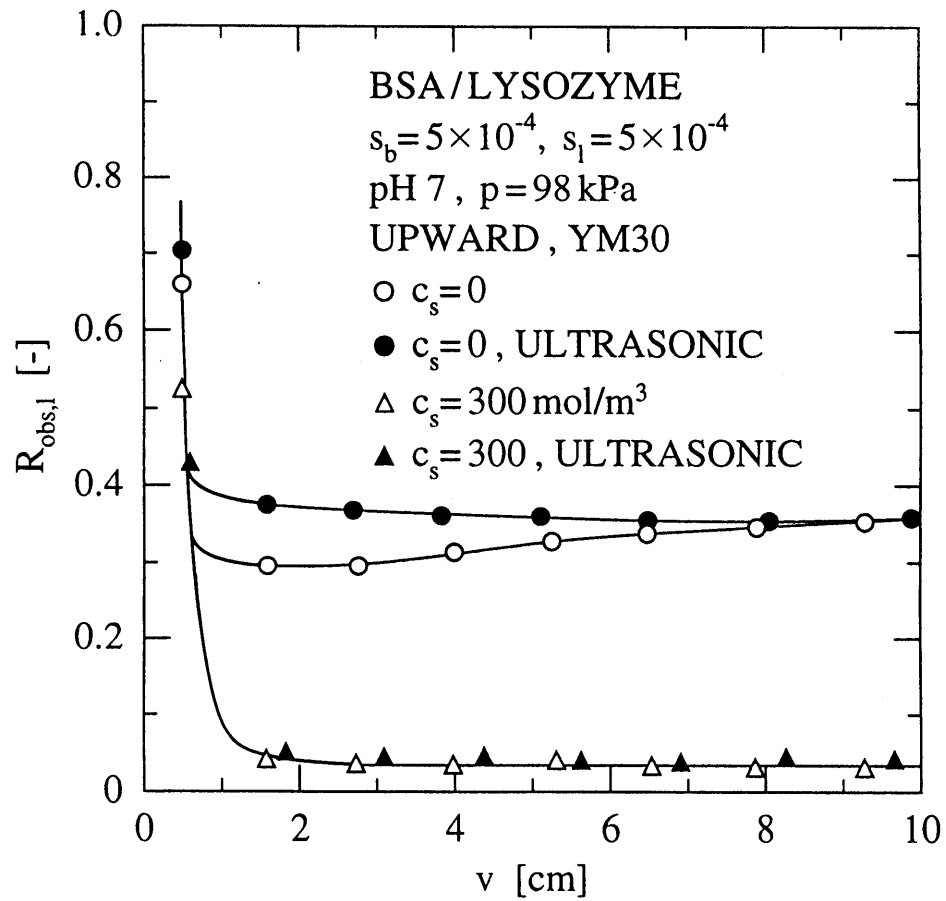


Fig. 5-10 Effect of ultrasonic irradiation on apparent lysozyme rejection in upward ultrafiltration for different NaCl concentrations

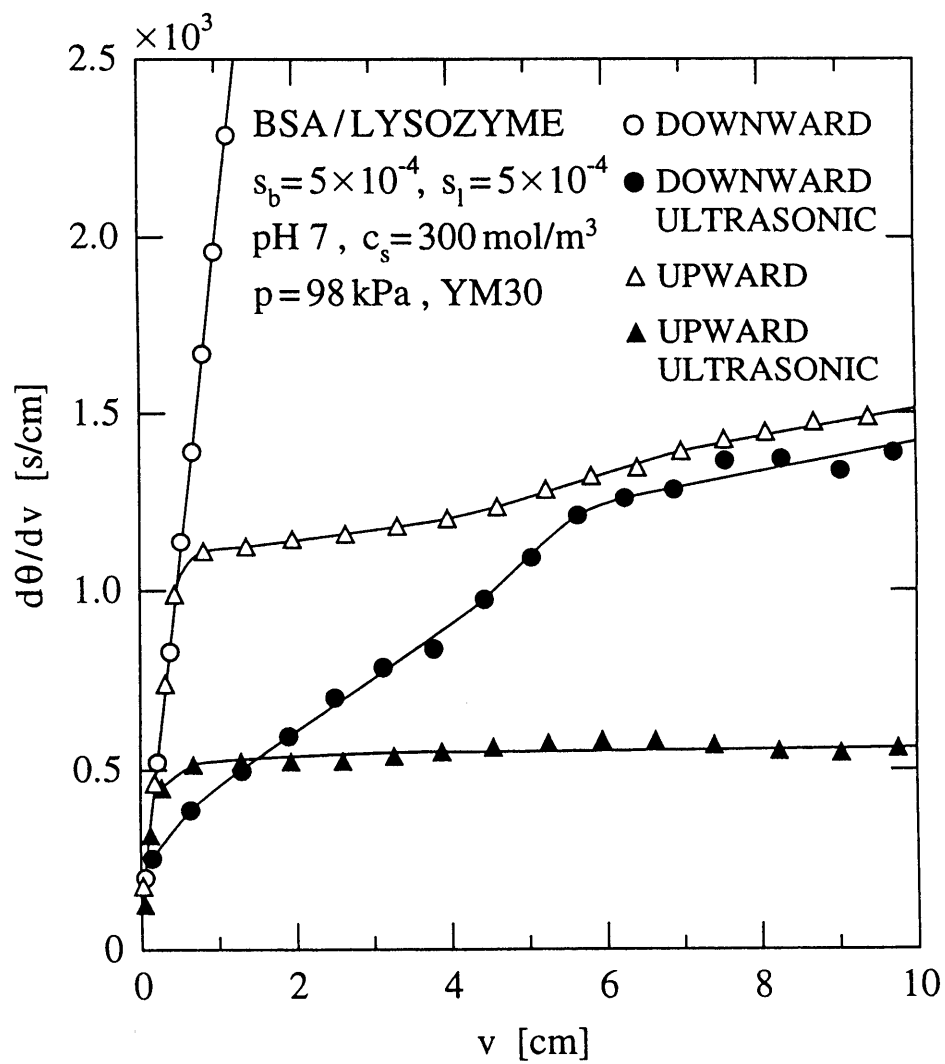


Fig. 5-11 Comparison of filtration rate between downward and upward ultrafiltration with and without ultrasonic irradiation

ックスの低下がかなり著しいが、超音波を照射することにより、濾過速度はかなり改善された。しかし、超音波を照射した場合でも、照射しない場合と同様、下向流型濾過より上向流型濾過の方が濾過速度は大きくなった。この図に対応するリゾチームの阻止率の結果を Fig. 5-12 に示したが、超音波を照射しても阻止率はほとんど増加せず、いずれも十分な分画性能を発揮した。この 2 種の濾過方式における分画性能の間にはそれほど大きな差はないため、濾過速度の大きさを考慮すれば、上向流型濾過の方が下向流型濾過より効率的であるといえる。

超音波の効果をさらに明確に示すため、超音波を照射した場合としない場合とで同程度の濾過速度が得られるとき、阻止率にどの程度の差が生じるかについて検討を試みた。Fig. 5-13 にその結果を示す。180W の出力電力で超音波を照射した場合の上向流型濾過における濾過速度は、超音波を照射しない攪拌速度 20.9rad/s で行った濾過における濾過速度とほぼ一致した。しかし阻止率に注目すると、両者の結果には明らかに差があり、超音波を照射した上向流型濾過の方が、リゾチームの透過性はずっと大きくなった。以上のように、超音波の照射はタンパク質の濃縮操作だけでなく<sup>28)</sup>、2 成分系タンパク質溶液の分画操作に対しても極めて有効な手段であることに疑う余地はない。

超音波強度の影響を定量的に表すため、上向流型濾過において超音波の出力電力  $P$  を 0~180W の範囲で種々に変化した場合のフラックスの平衡値  $q_e$  の対数およびリゾチームの阻止率の平衡値  $(R_{obs,l})_e$  を Fig. 5-14 に示した。 $\log q_e$  の値は出力電力の増大に伴い直線的に増加する傾向を示したのに対し、 $(R_{obs,l})_e$  は一定の値を示し、超音波の強度には依存しないことがわかる。

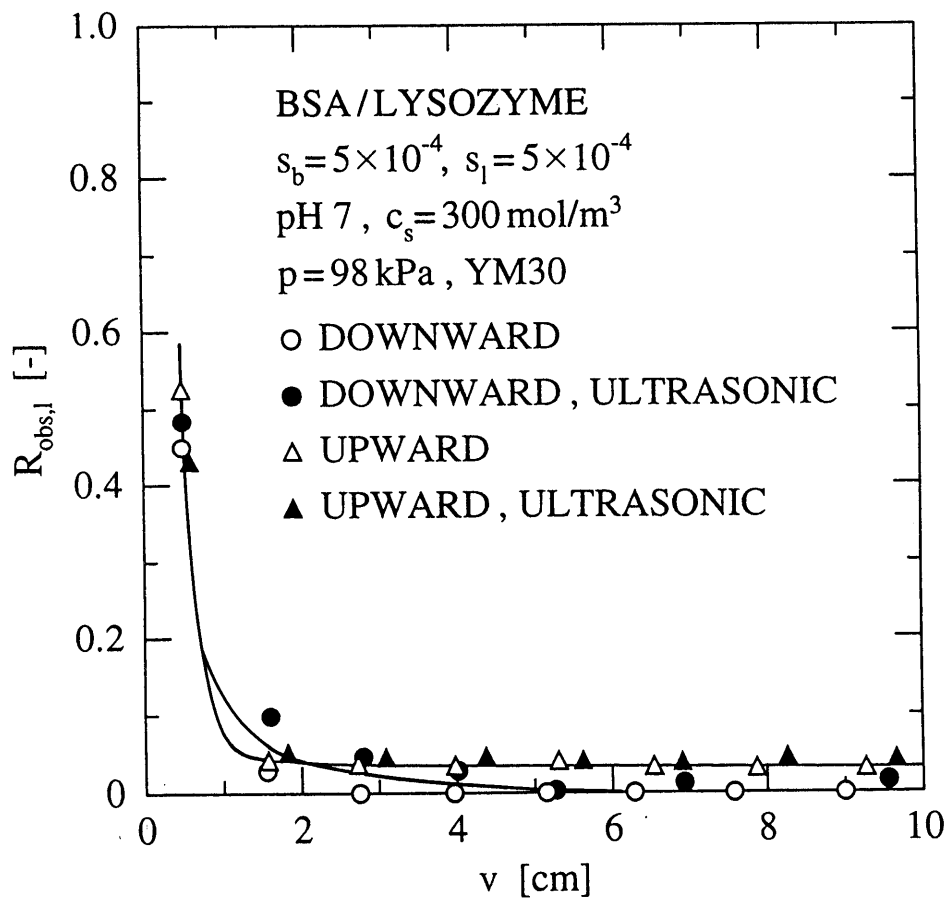


Fig. 5-12 Comparison of apparent lysozyme rejection between downward and upward ultrafiltration with and without ultrasonic irradiation

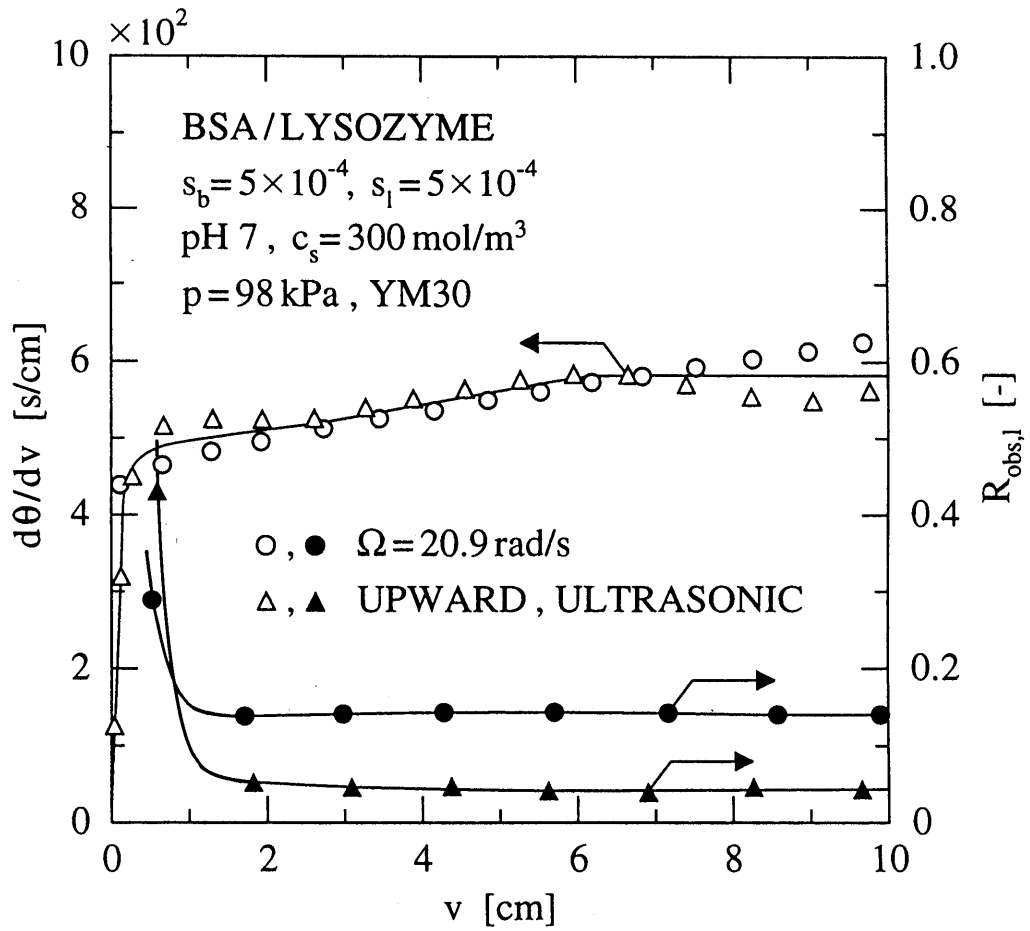


Fig. 5-13 Comparison of apparent lysozyme rejection between cases with and without ultrasonic irradiation in which similar filtration rates are observed



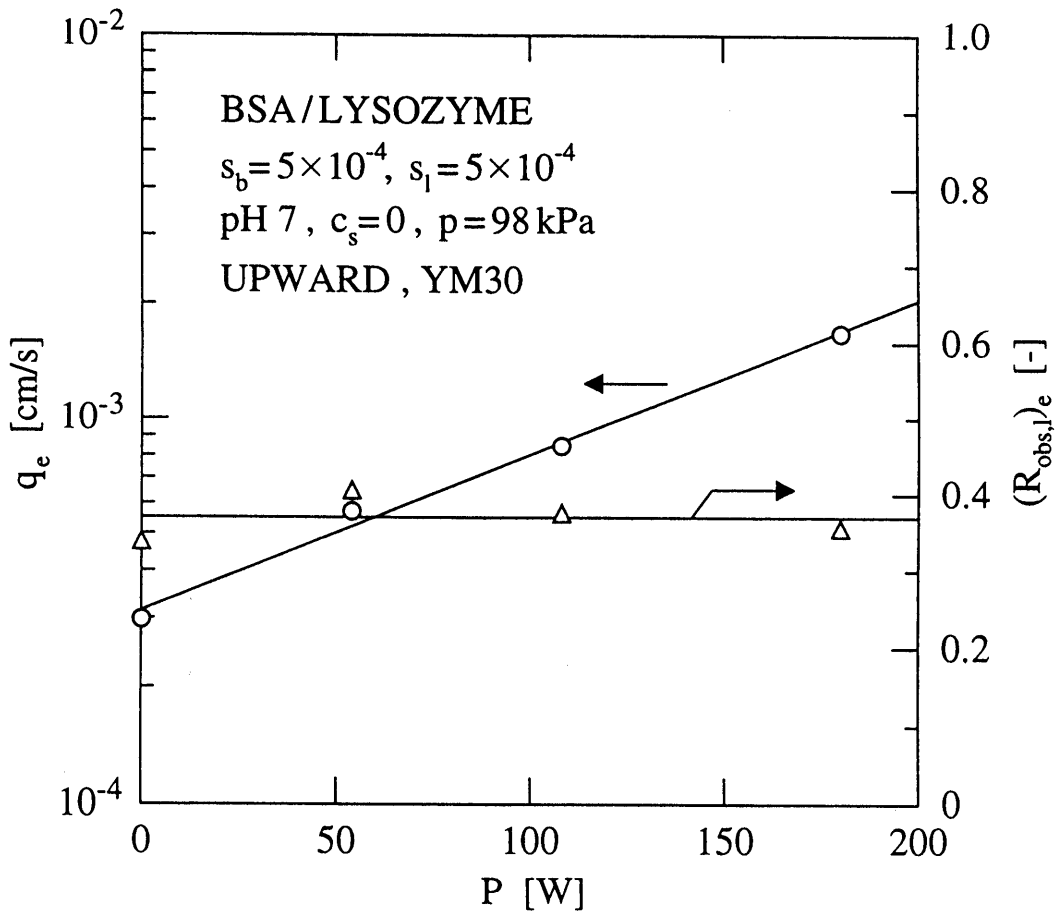


Fig. 5-14  $q_e$  and  $(R_{\text{obs},1})_e$  as function of output power of ultrasonic

#### 5-4 結言

2成分系タンパク質溶液の限外濾過試験を、一方の成分は阻止するがもう一方の成分は単成分系で濾過した場合に透過する限外濾過膜を用いて様々な濾過方式で行い、その分離特性を検討した。その結果、濾過速度や2成分の分画性能は膜面に作用する剪断力をはじめ、pHや塩濃度などの溶液環境や使用する膜の親・疎水性の影響を大きく受けることを明らかにした。特に、膜面への剪断力が増加すると、濾過速度が増加する一方で溶質の透過性は小さくなり、分画性能が低下するという結果は極めて重要であり、興味深い。また、濾過操作中において超音波を照射したところ、濾過速度は著しく増加し、しかも分画性能の低下を伴わないことから、超音波の照射が2成分の分画に対して極めて有効であることが明らかとなった。

本研究の結果から、2成分のタンパク質の分画をより効率的に行うための具体的な操作指針を提案し、以下にまとめる。

- (a) 膜面へ溶質を十分に供給し、なおかつ濾過速度の低下が過度に進行しない程度の剪断力を与える
- (b) 2成分間の静電的相互作用をできる限り小さくするような溶液環境に調整する
- (c) タンパク質の吸着をなるべく抑制する膜を使用する
- (d) 超音波を照射する

## 総 括

限外濾過法によるタンパク質溶液の分離操作は、その工業的実用性から、あるいは工学的価値の高さから極めて重要であると認識されており、これまで多くの研究者によって、単成分系タンパク質溶液の限外濾過挙動が研究されてきた。本研究では、最近特に注目されている 2 成分系タンパク質溶液の限外濾過による分画について、その挙動ならびに効率的操作法を明らかにすることを目的として、種々の検討を行った。すなわち、単一のタンパク質成分からなる濾過ケーキの構造とタンパク質分子の静電的特性値との相関を考察した上で、2 成分からなる濾過ケーキの構造に及ぼす溶液環境の影響を明らかにし、さらに、溶液環境や膜面への剪断力をはじめとした種々の因子が分画効率に及ぼす影響について詳細に示した。以上の結果を結論的に要約すると次の通りである。

1) 単成分系タンパク質溶液の限外濾過における濾過ケーキは、タンパク質の等電点の pH 値において最も密な構造となり、pH が等電点から離れるにつれ、より湿潤な状態となった。この傾向に対しては、等電点ではタンパク質分子間に静電的反発力が働かず、等電点から離れるほど反発力が大きくなるためであるという説明が可能であるが、タンパク質分子の $\zeta$ 電位あるいは電荷量の pH 依存性を測定し、ケーキの構造をこれらと関係づけることにより、その説明が妥当であることを明確にすることができた。また、 $\zeta$ 電位がある値に達したら、それ以上  $\zeta$  電位が大きくなっても、ケーキ構造は変化しないことがわかった。さらに、濾過ケーキの平均空隙率および平均濾過比抵抗のプロットは、 $\zeta$ 電位の絶対値あるいは表面電荷密度の絶対値に対してほぼ一本の直線となり、ケーキ構造はタンパク質が正負のいずれに帯電しているかということとは無関係であることが明

らかになった。(第2章)

2) デッドエンド限外濾過において形成された2成分のタンパク質からなるケーキを圧力を開放した状態でしばらく静置し、再び加圧して濾過を行ったところ、濃厚タンパク質の小さな拡散性のため、ケーキは原液本体中に戻って分散しないことが明らかとなった。このことから妥当性が明らかとなったケーキ濾過モデルに基づき、物質収支から2成分のタンパク質からなる濾過ケーキの諸特性値を検討した。これらはpHすなわち各成分の荷電状態によって大きく左右されることが明らかとなり、異種タンパク質が同符号の電荷を持つ場合は、互いに異符号に帯電する場合より空隙率が大きく透過抵抗の小さなケーキが形成された。これは、異種タンパク質間の静電的相互作用に基づいて説明することができ、前者では反発力が、後者では引力が働くことに起因する。また、各成分の混合割合を種々に変化したところ、各成分が互いに同符号の場合にはケーキ構造は単調な変化を示したが、異符号の場合には、ある混合比で平均空隙率は極小となり、平均濾過比抵抗はその混合比で極大となる極めて興味深い傾向を示した。平均濾過比抵抗は濾過速度の大小の指標となることから、本研究は濾過速度とケーキ構造との関係を検討したものであり、2成分系タンパク質溶液の限外濾過においてその関係を明らかにしたのは、本研究が初めてである。(第3章)

3) 2成分系タンパク質溶液の限外濾過における分画特性は、pHや塩濃度などの溶液環境の影響を大きく受けることが明らかとなった。これは、溶液環境が各タンパク質成分の荷電状態に大きな影響を及ぼし、結果として異種タンパク質間の静電的相互作用が種々に変化するためである。各タンパク質成分が互いに異符号に帯電しているときには引力の影響により、また、各成分が同符号に帯電して

いるときには反発力の影響により、それぞれ溶質の膜透過性すなわち分画性能は著しく低下した。これらに電解質を添加することにより、タンパク質分子の電気二重層が圧縮を受けるため、こうした静電的相互作用は小さくなり、いずれの場合も分画性能は向上した。すなわち、2成分間の静電的相互作用がより小さくなる溶液環境ほど、分画性能は高くなることが明らかとなった。一方、濾過速度はケーキ中に含まれる溶質の特性に依存した。以上の結果から、2成分系タンパク質溶液の分画操作においては、その支配的因子となる溶液環境すなわち荷電状態の制御が極めて重要であると結論づけられる。

(第4章)

4) 2成分系タンパク質溶液の限外濾過における濾過速度は、膜面に大きな剪断力を与え、濾過抵抗となるケーキを掃流することにより顕著に増大した。しかし、この掃流効果は、溶質の膜透過性を低下させることにも繋がり、結果的に分画性能の低下を引き起こすことが明らかになった。このことから、効率的な分画を行うためには、溶質の膜透過性をそれほど低下させない範囲の比較的小さな剪断力を膜面に与え、ケーキの形成を阻止して一定濾過速度を保つことが望ましいと考えられる。この観点から、例えば、上向流型濾過や低攪拌型の濾過などが有効である。また、疎水性の膜は親水性の膜に比べて一般にタンパク質の吸着が著しく、分画には適当でない場合が多い。以上のように、2成分系タンパク質溶液の分画操作に対しては、膜面への剪断力の制御や膜の選択が極めて重要となる。さらに、濾過操作中における超音波の照射は、濾過速度の著しい増加を引き起こし、なおかつ分画性能を低下させないことを明らかにした。このことから、超音波の照射は2成分の分画に対して極めて有効であると考えられる。(第5章)

以上ここに述べた研究結果が、限外濾過による 2 成分系タンパク質溶液の分画プロセスの設計において、また、さらに多成分系タンパク質溶液の限外濾過プロセスへの応用に対し、多少とも寄与することができれば幸いである。

## 主要記号表

$a$	= spherical particle (protein) radius	[m]
$c$	= concentration of solute in boundary layer (filter cake)	[kg/m <sup>3</sup> ]
$c_b$	= concentration of solute in bulk solution	[kg/m <sup>3</sup> ]
$c_g$	= concentration of solute in gel layer	[kg/m <sup>3</sup> ]
$c_m$	= concentration of solute in membrane surface	[kg/m <sup>3</sup> ]
$c_p$	= concentration of solute in filtrate	[kg/m <sup>3</sup> ]
$c_{p,l}$	= mass fraction of lysozyme in filtrate	[-]
$c_s$	= electrolyte concentration of bulk solution	[mol/m <sup>3</sup> ]
$D$	= diffusion coefficient	[m <sup>2</sup> /s]
$e$	= elementary charge	[C]
$H$	= distance between surface of particles	[m]
$h$	= distance from membrane surface to reduced surface	[m]
$J_{lim}$	= limiting volume flux through membrane	[m/s]
$J_s$	= solute flux through membrane	[kg/m <sup>2</sup> ·s]
$J_v$	= volume flux through membrane	[m/s]
$K_v$	= Ruth coefficient of constant pressure filtration	[m <sup>2</sup> /s]
$k$	= Boltzmann constant	[J/K]
$k'$	= mass transfer coefficient	[m/s]
$m$	= ratio of wet to dry cake mass	[-]
$N_A$	= Avogadro's constant	[mol <sup>-1</sup> ]
$n$	= compressibility coefficient	[-]
$n_0$	= ion number concentration in bulk solution	[m <sup>-3</sup> ]
$P$	= output power of ultrasonic	[W]
$p$	= applied filtration pressure	[Pa]
$p_L$	= local hydraulic pressure	[Pa]
$p_m$	= pressure loss across filter medium	[Pa]

$p_s$	= local cake compressive pressure	[Pa]
$q_e$	= dynamically balanced filtration rate	[m/s]
$R$	= intrinsic rejection of solute	[-]
$R_{bl}$	= permeation resistance of boundary layer	[m <sup>-1</sup> ]
$R_g$	= permeation resistance of gel layer	[m <sup>-1</sup> ]
$R_m$	= permeation resistance of membrane	[m <sup>-1</sup> ]
$R_{obs}$	= apparent rejection of solute	[-]
$R_{obs,b}$	= apparent rejection of BSA	[-]
$R_{obs,l}$	= apparent rejection of lysozyme	[-]
$(R_{obs,l})_e$	= dynamically balanced apparent rejection of lysozyme	[-]
$R_p$	= permeation resistance caused by fouling within pores	[m <sup>-1</sup> ]
$R_t$	= total permeation resistance	[m <sup>-1</sup> ]
$s$	= mass fraction of solute in bulk solution	[-]
$s_b$	= mass fraction of BSA in bulk solution	[-]
$s_l$	= mass fraction of lysozyme in bulk solution	[-]
$T$	= absolute temperature	[K]
$u$	= electrophoretic mobility	[m <sup>2</sup> /s·V]
$V_A$	= attractive interaction energy	[J]
$V_R$	= electrostatic repulsive interaction energy	[J]
$v$	= cumulative filtrate volume per unit effective membrane area	[m]
$v_m$	= fictitious filtrate volume per unit effective membrane area	[m]
$v_t$	= cumulative filtrate volume per unit effective membrane area collected until filter cake surface reaches reduced surface	[m]
$x$	= distance from membrane surface	[m]
$Z$	= charge number	[-]
$z$	= valency	[-]



## Greek letters

$\alpha_{av}$	= average specific filtration resistance	[m/kg]
$\alpha_1$	= empirical constant in Eq. (1-10)	[m <sup>1+n</sup> · s <sup>2n</sup> /kg <sup>1+n</sup> ]
$\delta$	= boundary layer (filter cake) thickness	[m]
$\epsilon$	= dielectric constant in free solution	[C <sup>2</sup> /J · m]
$\epsilon_{av}$	= average porosity	[-]
$\zeta$	= zeta potential	[V]
$\theta$	= filtration time	[s]
$\kappa$	= Debye-Huckel parameter	[m <sup>-1</sup> ]
$\mu$	= viscosity of filtrate	[Pa · s]
$\Delta\pi$	= osmotic pressure difference across membrane	[Pa]
$\rho$	= density of filtrate	[kg/m <sup>3</sup> ]
$\rho_s$	= density of solute	[kg/m <sup>3</sup> ]
$\rho_{s,b}$	= density of BSA molecule	[kg/m <sup>3</sup> ]
$\rho_{s,l}$	= density of lysozyme molecule	[kg/m <sup>3</sup> ]
$\sigma_0$	= surface charge density	[C/m <sup>2</sup> ]
$\psi$	= angle between filtrate flow and direction of gravity	[rad]
$\psi_0$	= surface potential	[V]
$\Omega$	= angular velocity of stirring	[rad/s]
$\omega$	= volume of cake solids per unit area up to an arbitrary position in cake	[m]
$\omega_0$	= volume of cake solids per unit area	[m]

## 引用文献

- 1) Kimura, S. and S. Sourirajan: *AIChE J.*, **13**, 497 (1967).
- 2) Porter, M. C.: *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Develop.*, **11**, 234 (1972).
- 3) Michaels, A. S.: *Chem. Eng. Prog.*, **64**, 31 (1968).
- 4) Wijmans, J. G., S. Nakao, J. W. A. van den Berg, F. R. Troelstra and C. A. Smolders: *J. Membrane Sci.*, **22**, 117 (1985).
- 5) Nakao, S., J. G. Wijmans and C. A. Smolders: *J. Membrane Sci.*, **26**, 165 (1986).
- 6) Reihanian, H., C. R. Robertson and A. S. Michaels: *J. Membrane Sci.*, **16**, 237 (1983).
- 7) Shirato, M., T. Murase, E. Iritani and S. Nakatsuka: *Filtration & Separation*, **28**, 104 (1991).
- 8) Iritani, E., S. Nakatsuka, H. Aoki and T. Murase: *J. Chem. Eng. Japan*, **24**, 177 (1991).
- 9) Iritani, E., K. Hattori and T. Murase: *J. Membrane Sci.*, **81**, 1 (1993).
- 10) Iritani, E., K. Hattori and T. Murase: *J. Chem. Eng. Japan*, **27**, 357 (1994).
- 11) Ruth, B. F.: *Ind. Eng. Chem.*, **27**, 708 (1935).
- 12) Ruth, B. F.: *Ind. Eng. Chem.*, **38**, 564 (1946).
- 13) Shirato, M., M. Sambuichi, H. Kato and T. Aragaki: *Kagaku Kogaku*, **27**, 470 (1963).
- 14) Tiller, F. M. and H. R. Cooper: *AIChE J.*, **6**, 595 (1960).
- 15) von Smoluchowski, M.: *Z. Phys. Chem.*, **92**, 129 (1918).
- 16) Henry, D. C.: *Proc. Roy. Soc. London*, **A133**, 106 (1931).
- 17) Verway, E. J. W. and J. Th. G. Overbeek: *Theory of the stability of lyophobic colloids*, Elsevier, Amsterdam (1948).
- 18) Derjaguin, B. W.: *Kolloid-Z.*, **69**, 155 (1934).
- 19) Wiese, G. R. and T. M. Healy: *Trans. Faraday Soc.*, **66**, 490 (1970).
- 20) Iritani, E., T. Watanabe and T. Murase: *J. Membrane Sci.*, **69**, 87 (1992).
- 21) Foster, J. F.: *The Plasma Proteins, Vol. 1 Isolation, Characterization, and Function*, Chap. 6 Plasma Albumin (ed. by F. W. Putnam),

- Academic Press, New York, p. 192 (1960).
- 22) Vilker, V. L., C. K. Colton and K. A. Smith: *J. Colloid Interface Sci.*, **79**, 548 (1981).
  - 23) Vilker, V. L., C. K. Colton and K. A. Smith: *AIChE J.*, **27**, 637 (1981).
  - 24) Vilker, V. L., C. K. Colton, K. A. Smith and D. L. Green: *J. Membrane Sci.*, **20**, 64 (1984).
  - 25) Opong, W. S. and A. L. Zydney: *J. Colloid Interface Sci.*, **142**, 41 (1991).
  - 26) Bowen, W. R. and P. M. Williams: *Biotechnol. and Bioeng.*, **50**, 125 (1996).
  - 27) Nakatsuka, S. and A. S. Michaels: *J. Membrane Sci.*, **69**, 189 (1992).
  - 28) Kokugan, T., Kaseno, S. Fujiwara and M. Shimizu: *Membrane*, **20**, 213 (1995).
  - 29) Fane, A. G. and C. J. D. Fell: *AIChE Symp. Ser.*, **73**, 198 (1977).
  - 30) Fane, A. G., C. J. D. Fell and A. Suki: *J. Membrane Sci.*, **16**, 195 (1983).
  - 31) Fane, A. G., C. J. D. Fell and A. G. Waters: *J. Membrane Sci.*, **16**, 211 (1983).
  - 32) Fane, A. G.: *Progress in Filtration and Separation, Vol. 4, Ultrafiltration: Factors influencing flux and rejection* (ed. by R. J. Wakeman), Elsevier, Netherlands, p. 134 (1986).
  - 33) Forbes, F.: *Chem. Eng.*, **257**, 29 (1972).
  - 34) Suki, A., A. G. Fane and C. J. D. Fell: *J. Membrane Sci.*, **21**, 269 (1984).
  - 35) Rodgers, V. G. and R. E. Sparks: *J. Membrane Sci.*, **78**, 163 (1993).
  - 36) Palecek, S. P. and A. L. Zydney: *J. Membrane Sci.*, **95**, 71 (1994).
  - 37) Palecek, S. P. and A. L. Zydney: *Biotechnol. Prog.*, **10**, 207 (1994).
  - 38) Murase, T., E. Iritani, J. H. Cho, S. Nakanomori and M. Shirato: *J. Chem. Eng. Japan.*, **20**, 246 (1987).
  - 39) de Rooy, N., P. L. de Bruyn and J. Th. G. Overbeek: *J. Colloid Interface Sci.*, **75**, 542 (1980).
  - 40) Trettin, D. R. and M. R. Doshi: *Ind. Eng. Chem. Fundam.*, **19**, 189 (1980).
  - 41) Chudacek, M. W. and A. G. Fane: *J. Membrane Sci.*, **21**, 145 (1984).
  - 42) van den Berg, G. B. and C. A. Smolders: *J. Membrane Sci.*, **40**, 149 (1989).

- 43) van den Berg, G. B. and C. A. Smolders: *Desalination*, **77**, 101 (1990).
- 44) Peters, T. Jr.: *Adv. Protein Chem.*, **37**, 161 (1985).
- 45) Balakrishnan, M., G. P. Agarwal and C. L. Cooney: *J. Membrane Sci.*, **85**, 111 (1993).
- 46) Shirato, M., M. Sambuichi, T. Murase, T. Aragaki, K. Kobayashi and E. Iritani, *Memoirs of the Faculty of Engineering, Nagoya University*, **37**, 38 (1985).
- 47) Murase, T., M. Iwata, M. Wakita, T. Adachi, N. Hayashi and M. Shirato: *J. Chem. Eng. Japan*, **22**, 195 (1989).
- 48) Tiller, F. M.: *Chem. Eng.*, **73**, 151 (1966).
- 49) Tiller, F. M., C. S. Yeh and W. F. Leu: *Sep. Sci. Technol.*, **22**, 1037 (1987).
- 50) Ide, T., K. Kawasaki, H. Yamashiro and A. Matsuda: *Gesuido Kyoukaishi*, **23**, 21 (1986).
- 51) Nakakura, H., A. Yamashita and K. Osasa: 58th Ann. Meeting of the Soc. of Chem. Engrs., Japan, **3**, 61 (1993).
- 52) Kozinski, A. A. and E. N. Lightfoot: *AIChE J.*, **18**, 1030 (1972).
- 53) Nakao, S., T. Nomura and S. Kimura: *AIChE J.*, **25**, 615 (1979).
- 54) Ingham, K. C., T. F. Busby, Y. Sahlestrom and F. Castino: *Polymer Science and Technology*, Vol. 13, *Ultrafiltration membranes and applications* (ed. by A. R. Cooper), Plenum Press, New York, p. 141 (1980).
- 55) Rodgers, V. G. J. and R. E. Sparks: *AIChE J.*, **37**, 1517 (1991).
- 56) Zhang, L. and H. G. Spencer: *Desalination*, **90**, 137 (1993).
- 57) Iritani, E., Y. Itano and T. Murase: *Membrane*, **17**, 203 (1992).
- 58) Iritani, E., S. Tachi and T. Murase: *Colloids Surf.*, **89**, 15 (1994).
- 59) Iritani, E., T. Watanabe and T. Murase: *Kagaku Kogaku Ronbunshu*, **17**, 206 (1991).
- 60) Mason, T. J. and J. P. Lorimer: *Sonochemistry: Theory, Applications and uses of ultrasound in chemistry*, Ellis Horwood Limited, New York, p. 240 (1988).

## 研究発表論文

### [学術誌]

1. Iritani, E., Y. Mukai and T. Murase: "Upward Dead-End Ultrafiltration of Binary Protein Mixtures," *Separation Science and Technology*, **30**, pp.369-382 (1995).
2. Iritani, E., Y. Mukai and T. Murase: "Properties of Filter Cake in Dead-End Ultrafiltration of Binary Protein Mixtures with Retentive Membranes," *Transactions of the Institution of Chemical Engineers, Part A, Chemical Engineering Research and Design*, **73**, pp.551-558 (1995).
3. Mukai, Y., E. Iritani and T. Murase: "Fractionation Characteristics of Binary Protein Mixtures by Ultrafiltration," *Separation Science and Technology*, **33** (1998).
4. Mukai, Y., E. Iritani and T. Murase: "Effect of protein charge on cake properties in dead-end ultrafiltration of protein solutions," *Journal of Membrane Science*, **137**, pp.271-275 (1997).

### [国際会議]

1. Iritani, E., Y. Mukai and T. Murase: "Role of Solution Environment in Flux and Rejection in Protein Ultrafiltration," *Proceedings of the 1996 International Congress on Membranes and Membrane Processes*, pp.369-382, Yokohama (Japan) (1996).
2. Iritani, E., Y. Mukai and T. Murase: "Separation Mechanism in Filtration of Binary Protein Mixtures," *Proceedings of the 7th World Filtration Congress, Vol.II*, pp.581-585, Budapest (Hungary)(1996).

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇切なる御指導・御教授を賜りました名古屋大学大学院工学研究科分子化学工学専攻教授・村瀬敏朗先生ならびに同助教授・入谷英司先生に衷心より深甚なる感謝を申し上げます。

本論文の作成に際しまして、貴重なご教示、ご援助を賜りました名古屋大学大学院工学研究科分子化学工学専攻教授・高橋勝六先生ならびに同教授・中村正秋先生に心より厚く感謝の意を表します。

また、本研究の当初に有益なる御助言を賜りました鈴鹿工業高等専門学校助教授・岩田政司先生、および終始御助言・御協力を賜りました名古屋大学大学院工学研究科分子化学工学専攻助手・曾維平先生に心より深く御礼申し上げます。

なお、本研究に際しましては、名古屋大学大学院工学研究科分子化学工学専攻の諸先生方をはじめ、第三講座の卒業生の皆様にも多大なる御支援・御協力を賜りました。ここに、改めて深く感謝の意を表します。