

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	ウイルス除去フィルターでのファウリング現象に対する解析技術の開発とメカニズム解明への展開
Title(English)	
著者(和文)	濱本 亮
Author(English)	Ryo Hamamoto
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10828号, 授与年月日:2018年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:林 智広,原 正彦,北村 房男,北本 仁孝,柘植 丈治
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10828号, Conferred date:2018/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

博士学位論文

ウイルス除去フィルターでのファウリング
現象に対する解析技術の開発とメカニズム
解明への展開

濱本 亮

2018年3月

東京工業大学総合理工学研究科
物質電子化学専攻

目次

1. 序論	1
1.1. 諸言	1
1.2. ウイルス不活化とウイルス除去フィルター	1
1.3. ウイルス除去フィルターと現状の課題	2
1.4. ファウリング	3
1.5. ファウリング解析技術	4
1.6. 本研究目的と構成	8
2. ファウリング解析技術の確立	9
2.1. 序論	9
2.2. 実験条件	11
2.3. 結果と考察	12
2.4. 結論	30
3. ファウリングメカニズム解明への展開① (塩濃度に依存した Flux 低下)	31
3.1. 序論	31
3.2. 実験条件	32
3.3. 結果と考察	35
3.4. 結論	47
4. ファウリングメカニズム解明への展開② (凝集体による Flux 低下)	48
4.1. 序論	48
4.2. 実験条件	50
4.3. 結果と考察	52
4.4. 結論	60
5. ファウリングメカニズム解明への展開③ (pH による Flux 低下)	61
5.1. 序論	61
5.2. 実験条件	62
5.3. 結果と考察	63
5.4. 結論	69
6. 結言	70
引用文献	72
謝辞	80

1. 序論

1.1. 諸言

医薬品の歴史は人々の病気を克服しようとする努力の結晶である。古来より人々は、草木などの植物を食べながら、病気を治すものを選び分けていた。その後、それら天然物から有効成分を抽出し、医薬品として用いるようになった。さらに合成技術が発展することで、特定の医薬品を製造することも可能になった。ここまでの医薬品は分子量の比較的小さな物質(低分子医薬品)であるが、近年では、より分子量の大きな医薬品として、人の血液成分から分離した血漿分画製剤や、動物細胞や微生物の培養技術の発達によりタンパク質製剤や抗体医薬品などが登場してきている。これら分子量の大きな医薬品は低分子医薬品と比べて副作用が少ないなどの利点があり、近年医薬品の中で大きな市場を形成しつつある。しかし、これらの医薬品の懸念点としては、生産系がヒト由来および生物由来なので、原料中にウイルスなどの混入が危惧されている。実際に、1980年代中頃には、血友病患者が投与された血液凝固製剤によって後天性免疫不全症候群(AIDS)に感染するという事件が起こり、これら医薬品についての感染性ウイルス対策が大きな関心事となった。現在では医薬品規制調和国際会議(ICH)は、日本、欧州、アメリカにおいて共通の認識に基づくガイドラインを策定しており、少なくとも2つ以上の互いの作用機構の異なるウイルス除去・不活化工程を導入することを義務付けている。

1.2. ウイルス不活化とウイルス除去フィルター

血漿分画製剤やタンパク製剤中のウイルス不活化方法としては、界面活性剤による不活化 [1]、熱やUV照射による不活化 [2]、低pH処理による方法 [3]などが挙げられる。しかし、ウイルスの物理的および化学的特性によっては、上記方法だけでは必ずしもウイルスを不活化できるわけではない。さらにいずれの方法においても製剤であるタンパク質への影響は避けられないという問題点もあった。そのような背景の下、ウイルスを大きさによって除去できるフィルター(ウイルス除去フィルター)の登場によって、タンパク製剤のウイルスに対する安全性は大きく高まった。ウイルス除去フィルターの特性としては、サイズに依存した捕捉が可能なので、ウイルスの物理的・化学的特性にも影響されずに捕捉できること。またタンパク製剤を含む溶液を化学的、物理的処理が必要ないことからタンパク製剤の変性が起こらず、製剤の回収率も高いことがメリットとして挙げられており、多くのタンパク製剤や血漿分画製剤の製造工程にて採用されるに至った [4]。

1.3. ウイルス除去フィルターと現状の課題

ウイルス除去フィルターの構造は、製剤として有用なタンパク質は透過させ、感染性のあるウイルスを除去するために設計された。しかし、タンパク質とウイルスは同程度の大きさを有することから、分離することは非常に困難であった [5]。例えば、血漿のタンパク質は数 nm から約 10nm であるのに対し、工程に混入する最小のウイルスであるパルボウイルスの大きさは約 20 nm と、非常に両者のサイズが近いことが理解できる。そのため、ウイルス除去フィルターでは、ウイルスとタンパク質をサイズ分画する層を膜厚方向に多層に重ねるといった膜設計によって、高いウイルス除去性能および高いタンパク透過性能を達成することが可能となっている。各ウイルスとタンパク質をサイズ分画する層は 100 nm 以上の大きな孔径の空洞型の構造(ポイド構造)と数 10 nm 程度の小さな孔径の構造(キャピラリー構造)から構成されており、これらが 3 次元的にネットワークを構成している [6] [7]。これらの構造設計によって、ウイルス除去フィルターによるろ過後の溶液中には、タンパク質の透過率は 90% 以上なのにも関わらず、ウイルスは 10,000 分の 1 から 1,000,000 分の 1 にまで除去することが可能となっている。以上のような理由からウイルス除去フィルターは、タンパク製剤中からのウイルス除去方法として、1980 年代に登場してから現在に至るまで、製造工程に標準的に使用されるようになったが、近年いくつかの問題点が指摘されている。1 つの問題点は、まさにウイルス除去性能に関する問題点であり、ウイルス除去フィルターにてろ過する際の運転条件 [8] [7] や溶液組成 [9] [10] によってウイルス除去性能が影響を受けることが知られてきた。さらに 2 つ目の問題点としては、タンパク製剤に依存したフィルターのろ過性能の低下である [11] [12] [13]。特にウイルス除去フィルターは他の工程に用いられるフィルター(MF 膜や UF 膜など)よりも高価でかつ、繰り返し使用しないシングルユースの製品のため、ウイルス除去フィルターのろ過性能低下は、そのまま工程の生産性やコストに大きく影響する。特に 2 つ目の問題については、用いる製剤がタンパク質であること、および膜の孔径がタンパク質の大きさと同程度なことなどから、タンパク質による膜へのファウリングが主な原因であると考えられている。

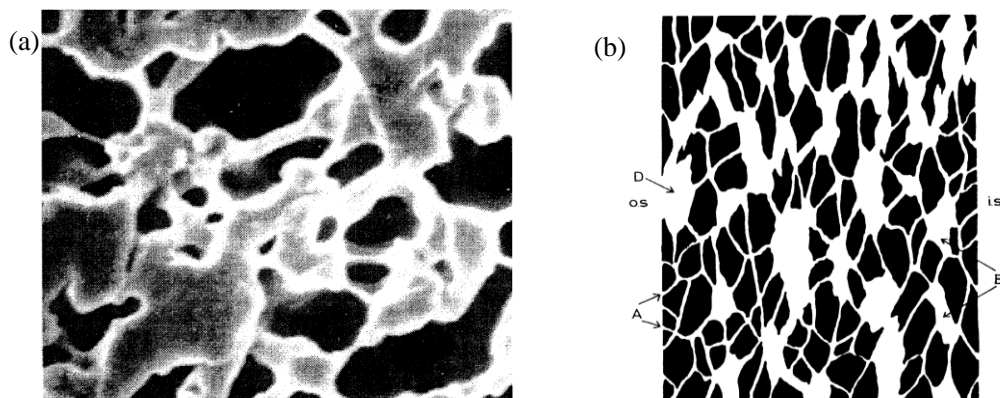


図 1-1 ウイルス除去フィルター Planova の中空糸膜の(a)ネガティブ SEM 観察像と(b)ポイドキャピラリー構造の概略図 (出典： [14] [6]より引用)

1.4. ファウリング

ファウリングとは、ろ液中の物質が分離膜に付着することを指し、ろ液中から不純物を分離する膜にとっては、処理量の低下を引き起こすなどの性能面に大きく影響するために非常に大きな問題である。中でもタンパク質などが原因で引き起こされるバイオフィアウリングは、洗浄などで回復することができず [15]、大きな問題であると認識されている。タンパク質による膜のファウリングについてはこれまでいくつかの様式が提唱されており [16]、その要因は大きく2つに分類される(図 1-2)。1つは、フィルターの膜材料表面にタンパク質が吸着する様式であり [17] [18] [19] [20] [21] [22] [23] [24] [25] [26] [27]、膜内部に付着することで孔の孔径を減少させること、および膜の入り口表面に付着し、ケーキ層を形成することによって、フィルターの性能を低下させることが知られている。Lim [26]らの研究では、食品産業で使用される限外ろ過膜(UF 膜)におけるファウリング現象について考察している。彼らはゼラチンの親水性のセルロースアセテート UF 膜を用いた処理において、溶液の pH がゼラチンの等電点付近(pH 5.3)であると、膜の Flux が大きく低下することを示し、この原因として、膜の表面にゼラチンが堆積することでゼラチンの層を形成しているためであると述べている。特に、溶液の pH が等電点から離れた条件であれば、膜の Flux は高い値を示すことから、膜表面とタンパク質との電荷の違いが関係している可能性があり、電荷に基づいた両者間の相互作用が重要であると述べている。2つ目の様式として、膜表面へのタンパク凝集体の堆積が報告されており、これによっても膜の性能が大きく低下する [28] [29] [30] [31]。Kelly らは [28]、ポリスルホン製の精密ろ過膜(MF 膜、孔径 0.16 μm)を用いて、いくつかの市販のウシ血清アルブミン(BSA)を対象としたろ過実験を行い、ろ過時の Flux 変化と各 BSA 溶液の性質との関係を調査している。その結果、ろ過時に Flux が低下した BSA サンプルは、プレフィルター(分画分子量 1,000,000 および 300,000)を用いることで、Flux が大きく回復した。さらに、Flux が低下した BSA 溶液について、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)による評価を行ったところ、BSA の単量体と二量体の他に三量体以上の凝集体が存在することが分かった。さらに Flux の低下度合と BSA の二量体と凝集体との量に相関関係があり、凝集体によって MF 膜の Flux が低下していることが示されている。上述した通り、膜のファウリング現象には、膜表面とタンパク質との相互作用の解析と、タンパク質の凝集状態の解析が重要である。これまでファウリング現象の解明や抑制を目的として、多くの解析例が報告されている。

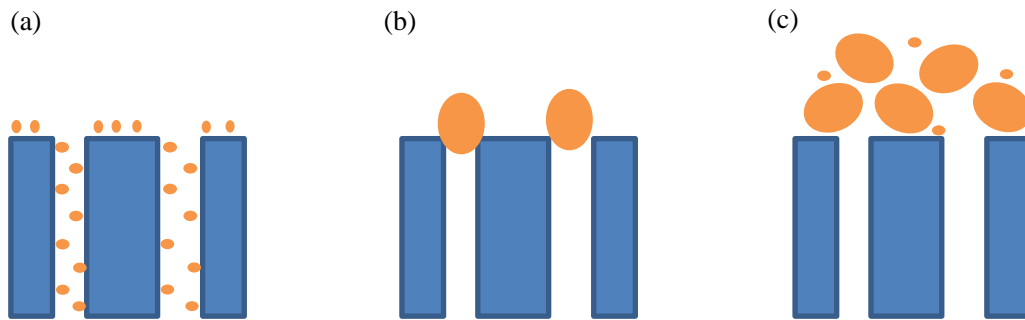


図 1-2 タンパク質による膜ファウリングの概略(a) 標準閉塞 (b)完全閉塞 (c)ケーキ層
(出典： [16]を基に筆者作成)

1.5. ファウリング解析技術

膜材料とタンパク質との相互作用については、放射性同位体元素によってタンパク質を標識し、材料表面への吸着量を測定する方法 [32]や、原子間力顕微鏡(AFM)を用いて、高分子材料とタンパク質との吸着力を直接測定する方法 [33]、膜材料へのタンパク質の吸着量を測定する手法など数多く存在する。本研究では、ラベリングや化学修飾などの前処理がなく簡便に測定できる手法として、表面プラズモン共鳴(SPR)法と水晶振動子マイクロバランス法(QCM)に着目し、これらを用いた膜材料とタンパク質との相互作用について解析を行った。また、タンパク質の凝集体の評価方法についても、いくつか評価手法は存在するが [34] [35] [36] [37]、最も汎用性が高く、かつ操作が簡便なことからサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を選択した。

1.5.1. 表面プラズモン共鳴(SPR)法

表面プラズモン共鳴法とは、背面に金属薄膜を蒸着したガラスに P 偏光レーザーを全反射条件にて入射し、分子吸着等によるプラズモン共鳴角のシフトを観察する手法である [38](図 1-3a)。測定法の特徴としては、リアルタイムでの表面への分子吸着速度の測定を分子へのラベリングなしで行えることや、 1 mm^2 当たり 1 pg と測定精度が高いことから、近年ではバイオマテリアル表面の評価方法として用いられている [39]。上記、感度とラベリングが不要な点から、フィルターの材料表面とタンパク質との相互作用についても広く研究がおこなわれている。例えば、Chang らは [40]、ファウリングを抑制する材料設計として、正電荷と負電荷を同じ分子内に持つ双性イオンの高いタンパク吸着抑制能に着目し、正電荷を持つモノマーと負電荷をもつモノマーを共重合したポリマーブラシを SPR センサー表面に作製し、血漿タンパク質の吸着特性を SPR 法を用いて評価している。結果は正電荷と負電荷を両方することで、タンパク質および血球の付着が抑制できることを示し、バイオマテリアル材料表面のコート材として有用であることを示している。さらに、Minehara

らは [41]、SPR を用いて様々なフィルター材料に対するファウリング物質の吸着特性を評価している。具体的には、膜材料に対して、ファウリングの原因物質のモデルであるウシ血清アルブミン(BSA)やデキストランの吸着量を測定し、吸着量が少ない材料ほど、実際のそれらの材料で構成されたフィルターのファウリングが少ないために膜間差圧が少ないことを示している(図 1-3b)。

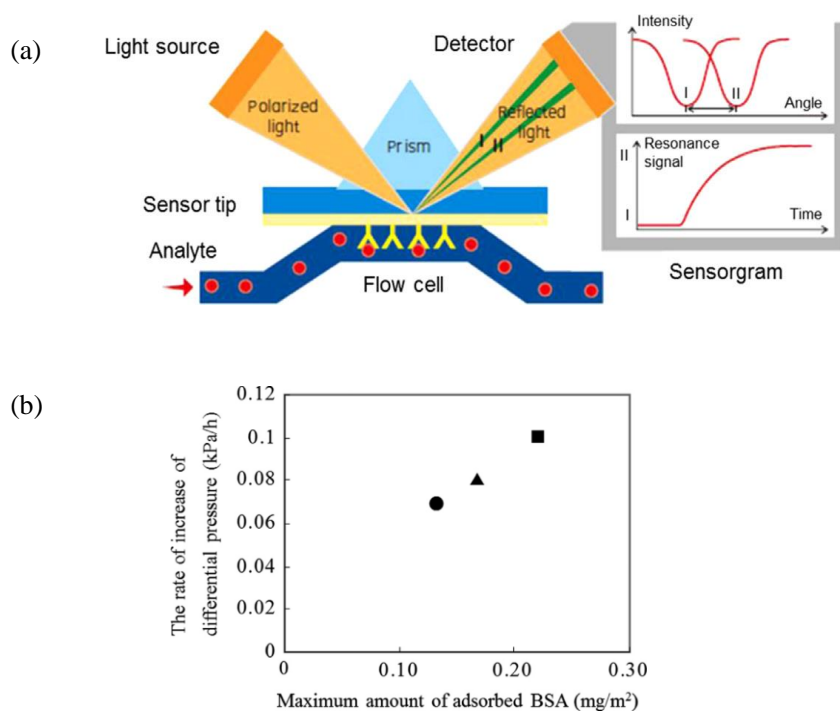


図 1-3 SPR 測定(a)装置概要と(b)BSA 吸着量と膜間差圧との関係
(出典： [41]より引用)

1.5.2. 水晶振動子マイクロバランス(QCM)法

AT カットした水晶板の両側に電圧をかけると圧電効果によって、水晶板がせん断方向に共鳴振動を起こす。また水晶板の電極上における単位面積値の微小質量変化と共振周波数変化には一定の比例関係が存在する。この現象を用いて、共振周波数の変化から表面に吸着した分子の吸着量を測定する方法が QCM 法であり、様々な表面への吸着現象の評価に用いられている [42] [43] [44]。吸着分子としてタンパク質に着目した例も盛んであり、近年では、吸着量のみならず、周波数の減衰の度合いを評価することによって、表面に吸着したタンパク質分子の粘弾性の評価も行われており、タンパク質の吸着現象について詳細な情報を得ることが可能であると報告されている [45] [46] [47] [48] [49] [50]。例えば、Jia らは、いくつかのポリマー材料表面に対する BSA の吸着挙動を QCM-D によって評価している(図 1-4)。特に、QCM-D から得られる共振周波数変化(Δf)と減衰の変化(ΔD)との比から、特定のポリマー材料表面では、BSA が初期は化学的に吸着した後に、構造変化や配置変化を起こすこととで、不可逆的な吸着形態になることを指摘している [50]。このように、QCM-D による測定では、材料表面への吸着量だけではなく、吸着後の分子の吸着状態についても明らかにできるという利点がある。

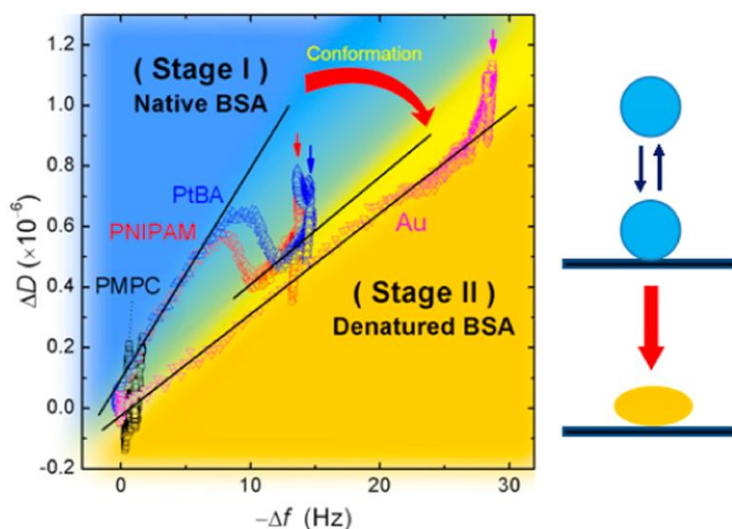


図 1-4 QCM-D によって測定した各ポリマー材料表面への BSA 吸着時の共振周波数変化 (Δf)に対する減衰の変化(ΔD) (出典： [50]より引用)

1.5.3. サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)

SECとは、液体クロマトグラフィーの分離モードの一つであり、液体中の溶質を溶質の大きさに応じて分離する方法である。装置の構成としては、主に溶液を輸送するポンプと溶質の分離を行うカラム、溶質を検出する検出器から構成されている。近年の測定対象物質としては、生体分子への応用が盛んであり、特に2006年に欧州医薬品品質部門がタンパク質の凝集体を測定する標準的な手法であると述べるなど、タンパク質製剤の品質評価や精製方法としても広く用いられている [51] [52] [53] [54] [55]。例えば、Yeらは [52]、BSAをモデルタンパク質として用いて、溶液中の界面活性剤の有無、pH条件、タンパク濃度の変化や加熱処理の有無によって、どのような凝集状態をとるかをSECによって評価している。また、Ahrerらは、SECの検出器として、光散乱計を使用することで、凝集体検出の検出感度が向上し、それによって、タンパク製剤である免疫グロブリン(IgG)について、2種類の精製プロセス条件における、生成する凝集体の違いについて評価している [54](図 1-5)。このようにタンパク質の凝集体を分析する手法として、SECは標準的な手法となっており非常に有用である。

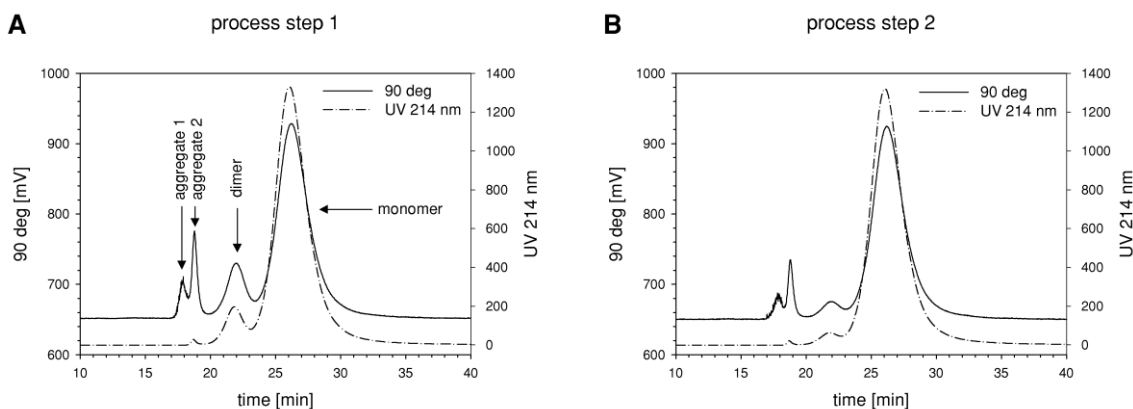


図 1-5 2 種類の方法にて調整した IgG 溶液の SEC スペクトル(出典： [54]より引用)

1.6. 本研究目的と構成

以上、近年の医薬品の推移としてタンパク製剤の台頭とそれに伴うタンパク製剤中でのウイルスの混入リスク、およびそのウイルスの不活化・除去のための新しい方法としてウイルス除去フィルターについて述べた。さらに、現状のウイルス除去フィルターには、ろ過性を低下させるファウリング現象が問題であり、従来までに行われている他のフィルターでのファウリングを解析する具体的な解析手法について述べた。

続く第 2 章では、本研究にて有用なファウリングの解析手法として、ウイルス除去フィルター膜材料とタンパク質との相互作用解析のための **SPR** 測定、およびタンパク凝集体の作製および評価のための **SEC** 測定について検討した。第 3 章では、ウイルス除去フィルターのファウリング現象について、主に膜材料とタンパク質との相互作用に着目し、膜表面へのタンパク質の吸着とフィルターのろ過性低下との関係について検討した。第 4 章では、ウイルス除去フィルターの凝集体によるファウリング現象について、**Flux** が低下する要因分析を行った。第 5 章ではウイルス除去フィルターのファウリング現象について、**pH** に依存した **Flux** 変化についての要因分析を行った。最後に第 6 章では、本論文を総括する。特に本研究では、上述したファウリング解析技術を駆使し、ウイルス除去フィルターでのファウリング現象について、特にウイルス除去フィルターの膜内部にてどのような機構でファウリングが起こり、フィルターのろ過性が低下しているのかを明確にすることを目的としている。本研究の達成により、ウイルス除去フィルターのファウリングのメカニズムが明らかとなり、今後のさらなる製品開発への知見が得られるものと期待している。

2. ファウリング解析技術の確立

2.1. 序論

前章ではウイルス除去フィルターについて、タンパク質によるファウリング現象によって、フィルターのろ過性能が低下していることを問題点として挙げた。特に顕著な例としては、Hongo-Hirasaki らは [56]、溶液のイオン強度によって、ろ過時の Flux が大きく異なることを報告している。具体的には、再生セルロースからなるウイルス除去フィルター(Planova 20N)のろ過時の Flux は、モデルのタンパク製剤である免疫グロブリン G (IgG)の溶液中の NaCl 濃度に依存して大きく変化することが報告されている(図 2-1)。またこの要因としては、膜材料表面とタンパク質とのゼータ電位の結果から、両者の相互作用が重要であると述べられている。しかし、膜材料表面とタンパク質との相互作用を直接評価したわけではなく、タンパク質が吸着するファウリング現象が実際に起こっているかは推測の域をでない。また同じく Hongo-Hirasaki [57]らは、凝集体によってウイルス除去フィルターのろ過性が低下することも報告している。具体的には、同じく Planova 20N のウイルス除去性を評価する実験において、評価用のウイルスの中に含まれる三量体以上の凝集体によってフィルターの Flux が低下することを示唆している。しかし、直接的に凝集体に関する評価はされておらずこちらも詳細は明らかにされていない。以上の背景から、再生セルロースからなるウイルス除去フィルターである Planova 20N はタンパク質の吸着による影響も凝集体による影響も受けることから、本研究の対象に適切であると考えた。よって、本章では、まず Planova 20N の膜材料であるセルロースとタンパク質との相互作用を解析するために SPR 法を選択し、両者の相互作用を解析するための測定系を確立することを目指した。具体的には、SPR 法を用いて、膜表面とタンパク質との相互作用を測定するためには、センサー上に膜表面をモデル的に作製する必要がある。従来までに、単分子膜によるモデル表面の作製 [58]や高分子ブラシによる作製 [33]などが報告されているが、本研究では操作が簡便で再現性が高いことからスピコート法 [59]によるモデル表面の作製法を選択した。また、Planova 20N とタンパク質凝集体による影響を評価するために、モデルとなるタンパク質凝集体を作製する方法の確立およびその凝集体を溶液中で評価する方法として SEC による分析方法の確立を検討した。さらに作製したモデル凝集体がウイルス除去フィルターである Planova 20N のろ過性へ影響するかも合わせて評価した。

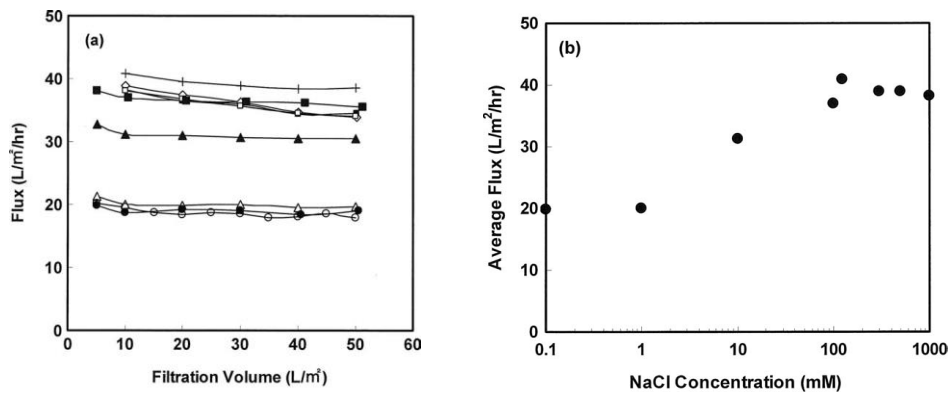


図 2-1 Planova 20N の塩濃度に応じたろ過時の Flux 比較 (出典： [56]より引用)

2.2. 実験条件

2.2.1. 試薬

実験には市販の免疫グロブリン G(IgG)溶液(Venoglobulin[®] IH, 50 mg/mL, Japan Blood Products Organization)、トリアセチルセルロース(Scientific Polymer Product, Inc.)、超純水(Cascade, Pall Co.)、塩化ナトリウム(Wako)を用いた。また実験に使用する IgG 溶液の pH の調整は、市販の 100 mM の塩酸(Wako)および 100 mM の水酸化ナトリウム水溶液(Wako)を用いて行った。また塩濃度の調整は、1 M の塩化ナトリウム水溶液を作製し、IgG 溶液に加えることで任意の塩濃度の溶液を調整した。

2.2.2. セルロースモデル表面の作製

市販の SPR センサー(SIA kit Au, GE Healthcare)上にフィルター材料のモデル表面を作製した。具体的にはまず、トリアセチルセルロース(Polymer Scientific Products, Inc.)をクロロホルム(Wako)に溶解させた溶液(0.3 wt%)をスピncerコート(ACT-220D, 株式会社アクティブ)にてセンサー上にスピncerコートした(回転数は 2000 rpm、保持時間は 30 秒)。センサー表面を任意の濃度の水酸化ナトリウム水溶液で 30 分間浸漬させ、トリアセチル基を加水分解することで、セルロース表面を作製した。表面の同定は X 線光電子分光法(XPS, ESCALAB 250, Thermo Fisher Scientific Inc.)にて行った。また表面のモルフォロジーは原子間力顕微鏡(AFM, Dimension Icon, Bruker)にて測定した。

2.2.3. SPR 測定

表面プラズモン共鳴(SPR)スペクトル測定は、セルロースをコートしたセンサーと市販の SPR 装置(Biacore 2000, GE Healthcare)を用いて行った。センサー表面は、測定前にタンパク質を測定溶液と同じ NaCl 濃度 (0, 100 mM)と pH (4.5)の水溶液にて 1 時間浸漬させた。SPR の測定は流速を 1 μ L/min で設定し、タンパク質を含有する溶液と含有しない水溶液を交互に導入し、不可逆的なタンパク質の吸着量を測定した。タンパク質溶液の導入量は 30 μ L とした。

2.2.4. AFM 測定

作製したセルロース表面は AFM (Dimension Icon, Bruker)測定にて表面形状を測定した。測定モードは大気中にてコンタクトモードで行い、測定範囲は 10 μ m \times 10 μ m 視野で行った。

2.2.5. SEC 測定

タンパク質溶液の単量体、二量体、三量体以上の存在量を測定するために、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)測定を行った。測定は、市販の装置(Nexera HPLC, Shimadzu)とカラム(UltraSW aggregate column, Tosho Bioscience)を用いて行った。移動相は 300 mM のリン酸緩衝液(pH = 6.9)を用い、測定時の流速は 0.4 mL/min として、40 分間測定を行った。

2.2.6. ろ過

ウイルス除去フィルター(Planova 20N, Asahi Kasei Medical Co.Ltd.)のろ過は、デッドエンドの方式で定圧ろ過(78.4 kPa)にて行った。フィルターのろ過時のファウリングの評価としては、ろ過流速(L/m²/h)を指標として用いた。ろ過流速の値としては、ろ液を任意の量回収し、この量に対して、回収するのに必要とした時間と用いたフィルターの膜面積にて除した値を用いた。またフィルター表面への吸着量としては、回収したろ液を紫外可視 (UV-vis) 分光光度計にて、280 nm のピークの強度からタンパク質濃度を算出し、フィルターの膜面積で除した値を用いた。

2.3. 結果と考察

2.3.1. SPR によるフィルター材料への吸着評価系の確立

2.3.1.1. フィルター材料のモデル表面の作製

SPR によるタンパク質の吸着挙動を測定するためには、SPR センサー上にフィルターのモデル表面を作製する必要がある。本項では、基板上にモデル表面の作製するための方法の確立を目指した。一般的に、SPR 上に高分子の材料表面を作製する際には、スピンドコートなどの方法が用いられるが [59]、今回使用するウイルス除去フィルターの材料はセルローズであり、一般的にスピンドコートなどに用いられるセルローズは溶媒にほとんど溶解しない。よって、予め溶媒に溶解しやすいように修飾されたアセチル化セルローズを出発原料として、センサー上にスピンドコートにて膜を作製した後に、水酸化ナトリウムによる加水分解によって、表面組成をアセチル基から水酸基へと変えることでセルローズ表面を作製することにした。スキームは図 2-2 に示すとおりである。

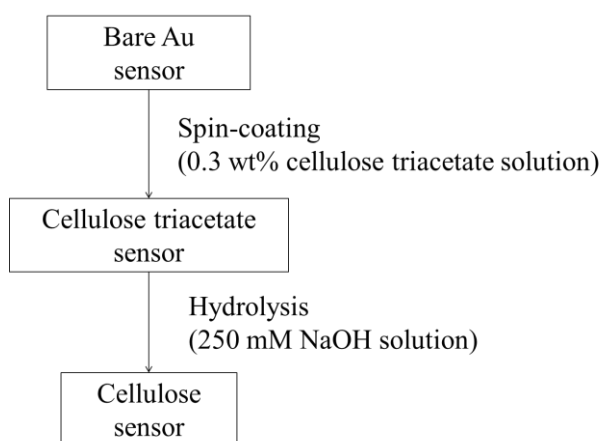


図 2-2 セルローズ表面の作製スキーム

まずは、スピコート膜に対して、適切な水酸化ナトリウム水溶液の濃度を設定するための予備実験を行った。今回用いた水酸化ナトリウムの濃度は、表 2-1 に示す通りである。またスピコート膜は、0.3 wt%のトリアセチルセルロースのクロロホルム溶液を約 1 cm×1 cm にカットしたシリコンウエハーにスピコートした後、表 2-1 に示す濃度の水酸化ナトリウム水溶液にて、30 分間処理した。加水分解後は超純水にて洗浄し、加水分解の進行は XPS によって評価した。

表 2-1 XPS 測定サンプルの処理条件

サンプル名	NaOH 濃度(mM)	処理時間
未処理	-	-
①	100	30 分
②	250	30 分
③	500	30 分

表 2-2 に各水酸化ナトリウム濃度にて加水分解した後の、XPS で測定した表面の各原子の相対元素濃度、また図 2-3 に得られた XPS の C1s のスペクトルを示している。

表 2-2 XPS 測定結果(定量値)

試料名	水酸化ナトリウム濃度 (mM)	相対元素濃度(atomic%)			
		[C]	[O]	[Na]	[Si]
未処理	-	54	37	0.2	8.8
100 mM	100	57	39	N.D.	4.1
250 mM	250	58	39	0.8	2.5
500 mM	500	33	27	0.1	39

表 2-2 からは、まず、未処理の表面上の Si 元素の割合と比べると、500 mM の試料では大幅に Si 元素の割合が増えていることが分かった。これは、水酸化ナトリウムの濃度が濃いため反応が非常に速く進行してしまい、表面のトリアセチルセルロースがほとんど分解されてしまったためであると考えている。一方、試料 100 mM, 250 mM のとはおおよそ未処理の表面と等しい Si 元素の割合を示しており、表面に膜が残っていることが示された。なお、Na の濃度もいずれのサンプルも未処理のものと同程度であることから、水酸化ナトリウムは洗浄操作によって除去できていると確認できた。さらに、加水分解がどの程度進んでいるのかを確かめるために、XPS 測定から得られた、C1s のスペクトルの形状を比較した(図 2-3)。

こちらでは、3 つのピークが得られており、それぞれのピークをカルボニル基の炭素(289 eV)、エーテル基の炭素(285 eV)、アルキル基の炭素(283 eV)と同定した [60] [61] [62]。加水分解の進行の確認指標として、カルボニル基の炭素のスペクトルのピークの減少について比較

した。未処理の試料と比べて、100 mM の試料はほとんど変化がみられないのに対して、250 mM の試料ではほとんどのカルボニル基のピークが消失していることが示され、アセチル基が分解することによって、表面が水酸基で覆われたセルロースになっていることが示唆された。よって、今回の膜の条件では、250 mM の水酸化ナトリウム水溶液にて処理するのが適切であることが示された。なお、500 mM の試料については、上記でも指摘したようにカルボニル基やエーテル基のピークはわずかであり、表面のトリアセチルセルロースがほとんど分解されており、表面にほとんど残存していないことが改めて確認された。

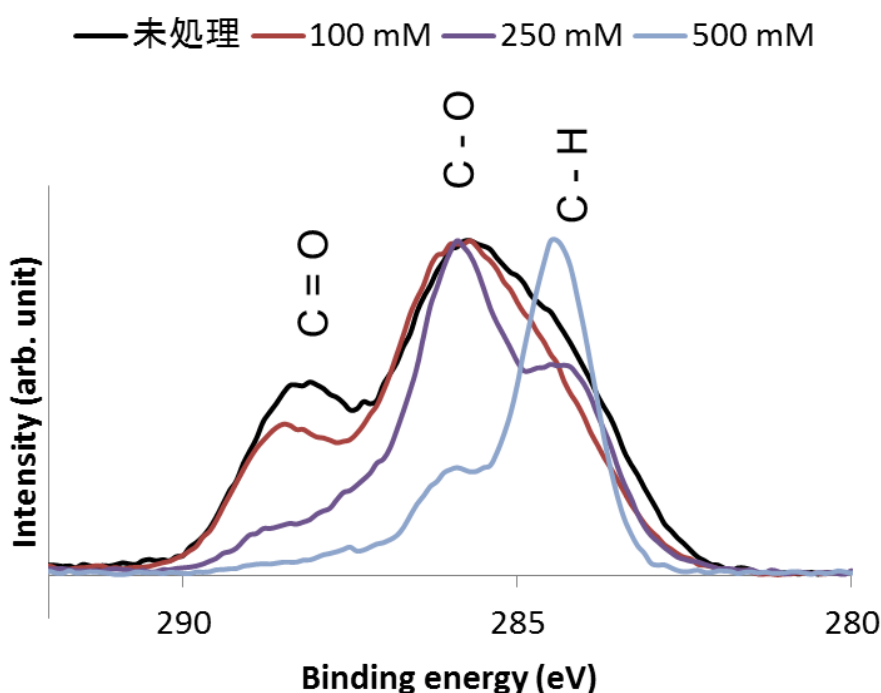


図 2-3 水酸化ナトリウム水溶液にて加水分解した前後のトリアセチルセルロース表面の C1s の XP スペクトル

続いて、SPR や QCM-D 測定用の表面には平滑性が必要である。よって、作製した表面の平滑性を AFM 測定によって評価した(図 2-4)。こちらに示すように、表面は大きな凹凸もなく平滑な平面であることが示き、SPR や QCM-D の測定にて十分に測定可能な表面であることが示された。

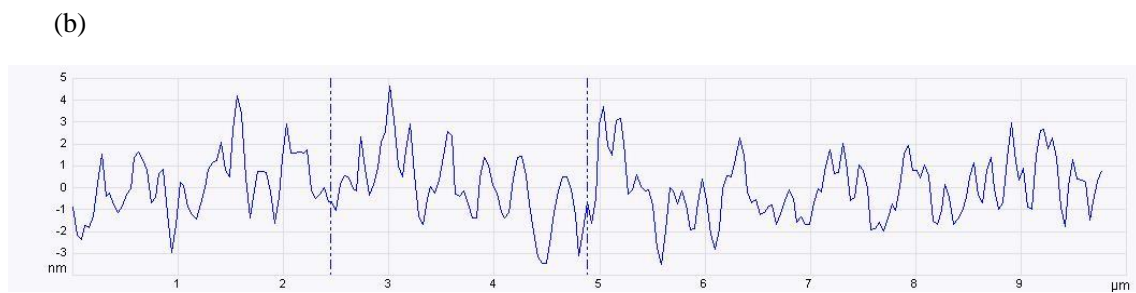
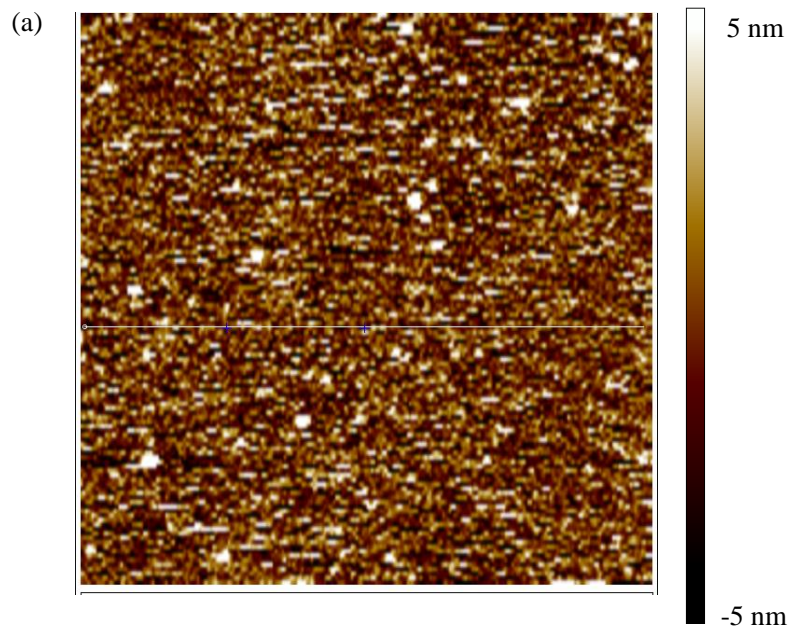


図 2-4 トリアセチルセルロース表面の加水分解後の AFM 観察
(a) $10\ \mu\text{m} \times 10\ \mu\text{m}$ 視野の二次元凹凸像 (b) ラインプロファイル

2.3.1.2. SPR でのタンパク吸着挙動の評価とフィルターへの吸着挙動との比較

2.3.1.1 より、基板表面へのフィルターの材料であるセルロース表面を作製する方法を確立できた。本項では、実際に SPR 測定用のセンサー上にセルロース表面を作製し、ウイルス除去フィルターのモデル表面として、適切であるか評価を行った。評価の方法として、ウイルス除去フィルターでのタンパク質吸着の挙動と SPR 測定でのモデル表面上へのタンパク質の吸着挙動が同じ挙動を示すかどうかを基準とした。

まず、SPR センサー表面に 2.3.1.1 の方法にて、セルロース表面を作製した。作製した表面は同じく、XPS 測定によって確認した(図 2-5)。こちらに示すとおり、SPR センサー基板上においても、水酸化ナトリウムにて処理することで、アセチル基のピークの減少を確認した。なお、比較として、ウイルス除去フィルターのセルロース中空糸膜の表面も XPS にて測定しており、ほとんど同じスペクトルが得られていることから、SPR センサー表面はセルロースの中空糸と同等であると判断できる。

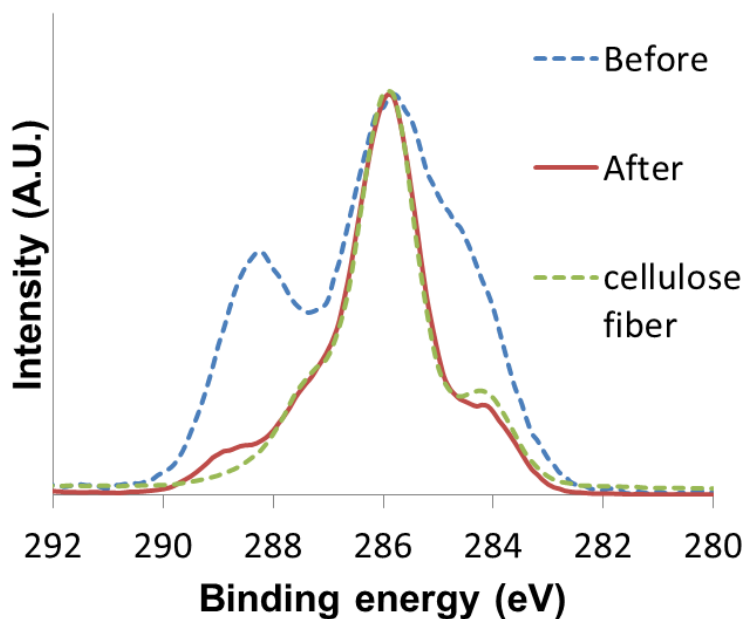


図 2-5 水酸化ナトリウム水溶液にて加水分解した前後のトリアセチルセルロース表面とセルロース中空糸膜表面の C1s の XP スペクトル

続いて、フィルター表面へのタンパク質吸着挙動の評価を行った。用いた溶液の条件は表 2-3 に示すとおりである。

表 2-3 ろ過条件

溶液条件	pH=4.5 NaCl = 0,100 mM
IgG 濃度	0.1 mg/mL
フィルター	Planova 20N
ろ過圧力	78.4 kPa

一定時間上記の溶液をフィルターでろ過した後のろ液を回収し、そのろ液中の IgG 濃度を UV-vis 分光光度計にて測定した。UV-vis 分光光度計で測定した溶液中のタンパク量について、ろ過前の液からろ過後の液を除することで、フィルター内の膜に吸着した量を算出した。膜へのタンパク吸着量をろ過時間に対して示したのが図 2-6a であり、表面に対する 20 分間の総タンパク吸着量を示したのが、図 2-6b である。こちらに示すように、低い塩濃度条件(0 mM NaCl)の方が、高い塩濃度条件(100 mM NaCl)よりもタンパク吸着量が多いことが示された。今回の pH の条件(pH 4.5)では、フィルター材料表面は負に、また IgG 分子は正に強く帯電している [56]。よって、塩濃度が低い条件では、フィルター表面と IgG 分子との間に静電相互作用が強く働くことで吸着量が増えるが、一方で塩濃度が高い条件では、静電相互作用の力が遮蔽されるために吸着量が少なくなると推定される。

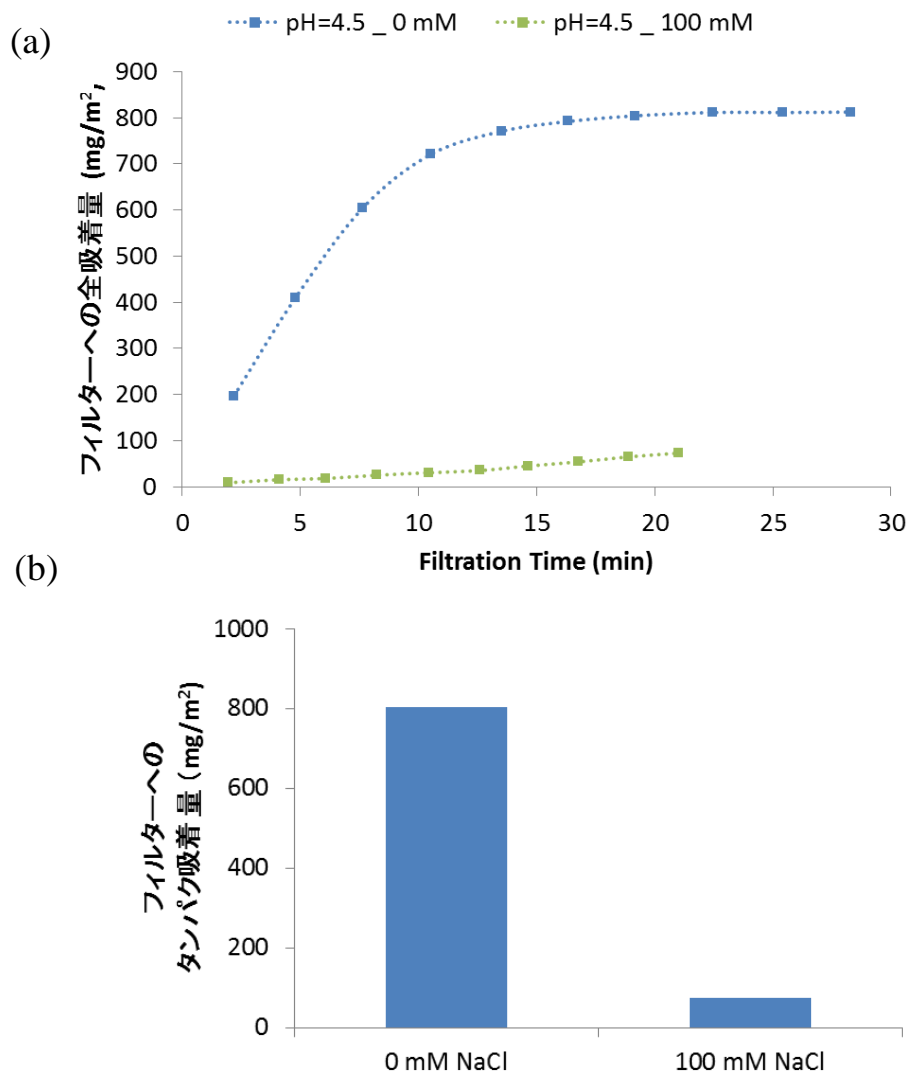


図 2-6 フィルター内の膜へのタンパク吸着量の測定結果比較
 (a)ろ過量に対する吸着量変化 (b)20 分後の総タンパク吸着量

続いて、SPR センサー上にフィルターと同じ材料であるセルロース表面を作製し、フィルター表面への IgG 分子の吸着挙動と同じ挙動が得られるのかを評価した。実験条件は表 2-4 に示すとおりであり、IgG 溶液はフィルターをろ過した溶液と同条件である。図 2-7 に NaCl 濃度の異なる溶液に対する SPR スペクトル結果と 30 分後の吸着量の比較を示している。こちらに示すように、低い塩濃度条件(0 mM NaCl)の方が、高い塩濃度条件(100 mM NaCl)よりもタンパク吸着量が多いことが示され、フィルター表面への IgG の吸着挙動と同等の結果を得ることができた。以上より今回 SPR センサー上に作製したセルロース表面は、フィルターの表面への IgG 分子の溶液条件に依存した吸着挙動についても同等の結果が得られ、タンパク質吸着量の増減を評価する方法として確立できたと考えている。

表 2-4 SPR 測定条件

溶液条件	pH=4.5 NaCl = 0,100 mM
IgG 濃度	0.1 mg/mL
センサー表面	セルロース
測定流速	1 μ L/min

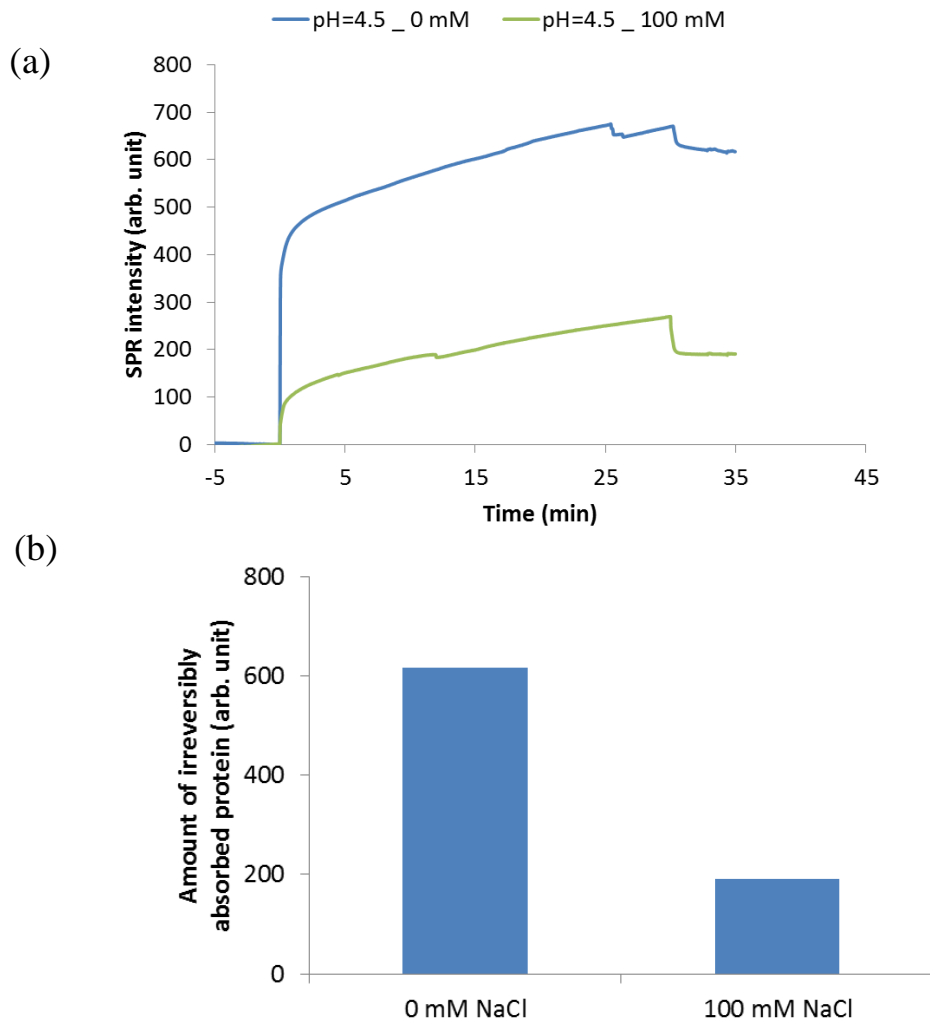


図 2-7 SPR 測定でのセルロース表面へのタンパク吸着量の測定
(a)時間に対する吸着量変化 (b)30 分後の総タンパク吸着量

2.3.2. SECによるタンパク凝集体の評価系確立

2.3.2.1. 凝集体の作製方法の確立

タンパク質の凝集体とフィルターの Flux 低下挙動との関係进行评估するためには、モデルのタンパク質凝集体を安定的に作製する方法が必要である。本項では、IgG をモデルタンパク質として用いて、凝集体の作製方法についての検討を行った。タンパク質の凝集体は熱や酸化などの外部的な刺激や溶液条件に応じて生成されることが知られており、それぞれの条件によって凝集体の状態も様々である [63]。特にウイルス除去フィルターが主に用いられる抗体医薬品の製造工程においては、ウイルス除去工程の前段のプロセスにおいて、低 pH の液性条件にて凝集体が生成することが知られている [64]。よって、本実験でも溶液の pH を変化させることによって、IgG 分子の凝集体を作製することを試みた。

凝集体の作製方法としては図 2-8 に示すスキームに従って行った。まず、市販の IgG 溶液を超純水にて、所定の濃度まで希釈した。続いて、100 mM の塩酸を加えることで、溶液の pH を所定の値まで下げ、室温にて 1 時間静置した。その後、100 mM の水酸化ナトリウム水溶液を加えて、溶液の pH を 4 以上にし、その後 12 時間以上静置した。IgG の濃度と pH の条件を変えて、再現性良く凝集体を作製できる条件を模索した(表 2-5)。また凝集体の存在の有無は SEC 測定にて評価した(図 2-9)。

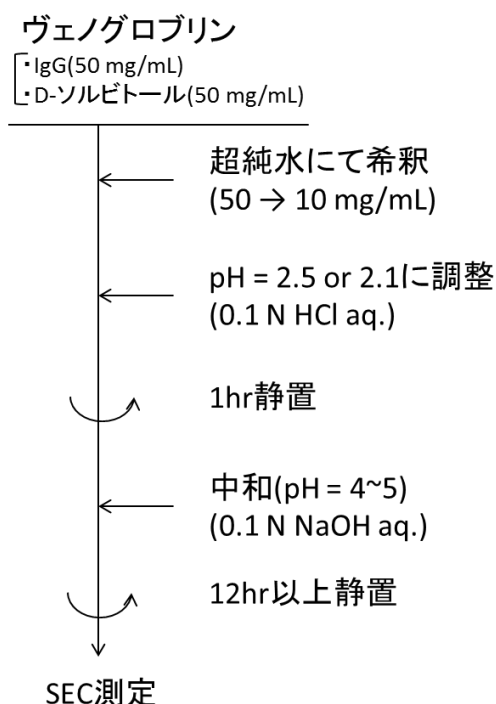


図 2-8 タンパク質凝集体の作製スキーム

表 2-5 SEC 測定サンプル条件

サンプル	処理 pH	静置時間	処理後の 濃度 (mg/mL)	中和後の pH	最終的な タンパク濃度 (mg/mL)
①	3	3 時間	21.4	4.6	21.4
②	2.5	3 時間	21.7	5.6	21.7
③	2.5	1 時間	8.9	4.8	8.9
④	2.5	1 時間	8.7	5	8.7
⑤	2.1	1 時間	7.6	5.2	7.6
⑥	-	-	10	4	10

図 2-9 に表 2-5 の条件に基づいて作製した各サンプル溶液の SEC によるスペクトルを示している。pH による処理前の IgG 溶液(サンプル⑥)は、保持時間が 23 分付近に単量体に由来する大きなピークが確認でき、保持時間が 20 分付近に二量体に由来するピークが観測され、三量体以上の凝集体を含まないサンプルであることが分かっている。この IgG 溶液に対して、pH による処理を行ったサンプル①～⑤については、いずれも単量体のピークが減少しており、単量体の多くが凝集体へと変化したことを示唆する結果である(図 2-9a)。さらに、これらのサンプルのスペクトルを拡大してみると、通常の IgG 溶液中では観察されなかった、三量体以上のピークが観察されていることが確認できた(図 2-9b)。つまり、我々のモデルタンパク質でも溶液の pH を変化させた今回の処理条件によって、凝集体を作製することが確認できた。

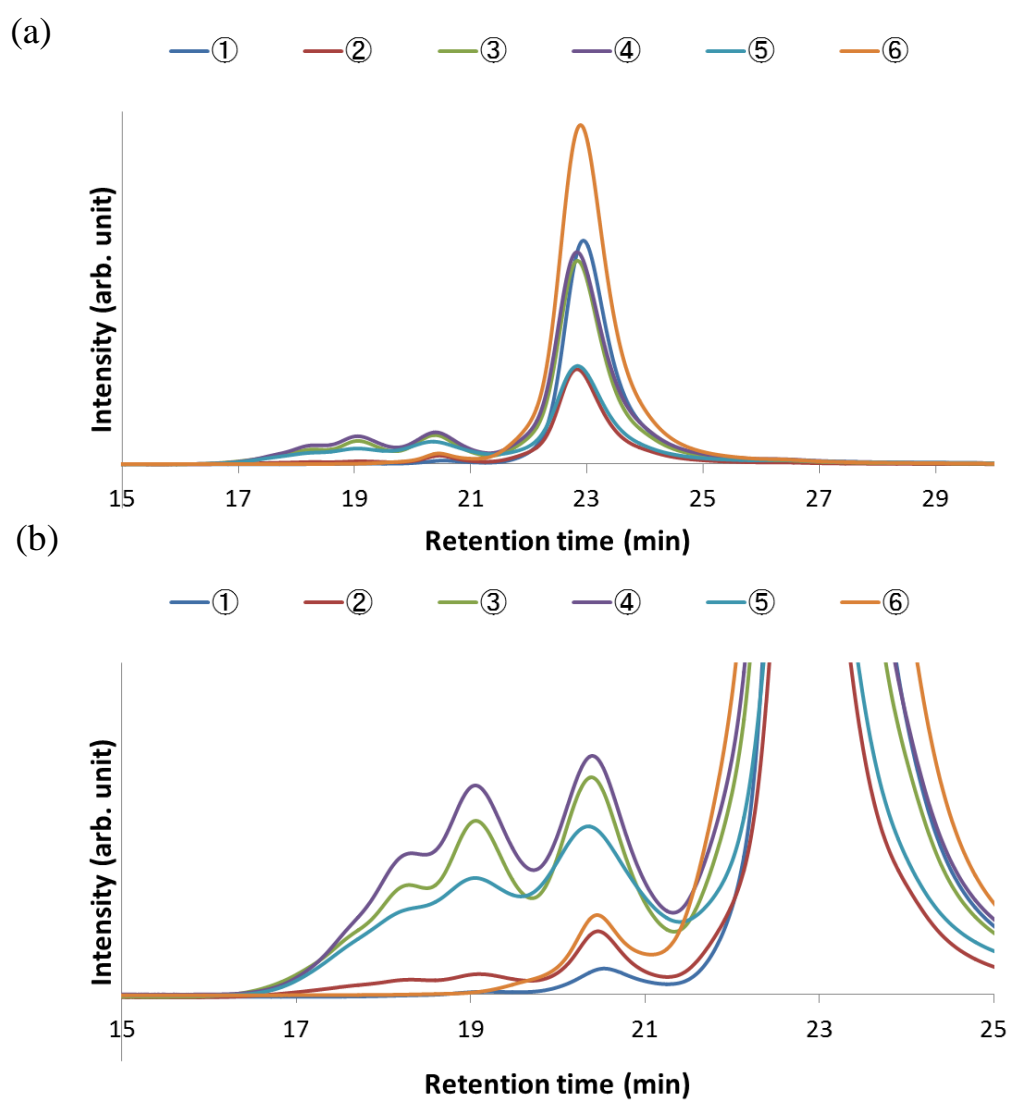


図 2-9 作製した凝集体含有溶液の SEC スペクトル (a)全体図 (b)拡大図

続いて、凝集体作製方法の条件について比較してみたい。図 2-10 には、各サンプルごとの SEC のスペクトルから得られた単量体、二量体、三量体、四量体以上のピークの面積値の比較を示している。こちらに示すように、作製時の IgG 濃度がより濃い条件であるサンプル①、②は三量体以上のサンプルをほとんど含まないことが確認され、凝集体の作製方法としては、不適切であることが示された。この原因としては、濃度が高いことで凝集体が大きな分子になりやすく、SEC 測定時の前処理である不純物を除去するガードカラム(0.1 μm)にて捕捉されてしまった可能性があると考えている。一方で、作製時の IgG 濃度がより薄い条件であるサンプル③、④、⑤は、リファレンスのサンプル⑥と比べて、多くの三、四量体を含んでいることが確認できた。サンプル③、④と⑤について比較すると、サンプル③、④の方が三、四量体の量が多いことが確認できた。この原因としては、サンプル⑤の方が設定した pH の値が低く、これによって、凝集体が大きな分子になりやすく、一部が SEC 測定時のガードカラム(0.1 μm)にて捕捉されてしまった可能性があると考えている。以上の結果より、サンプル③、④の条件が IgG 分子の凝集体を作製する方法として、適切であると考えた。

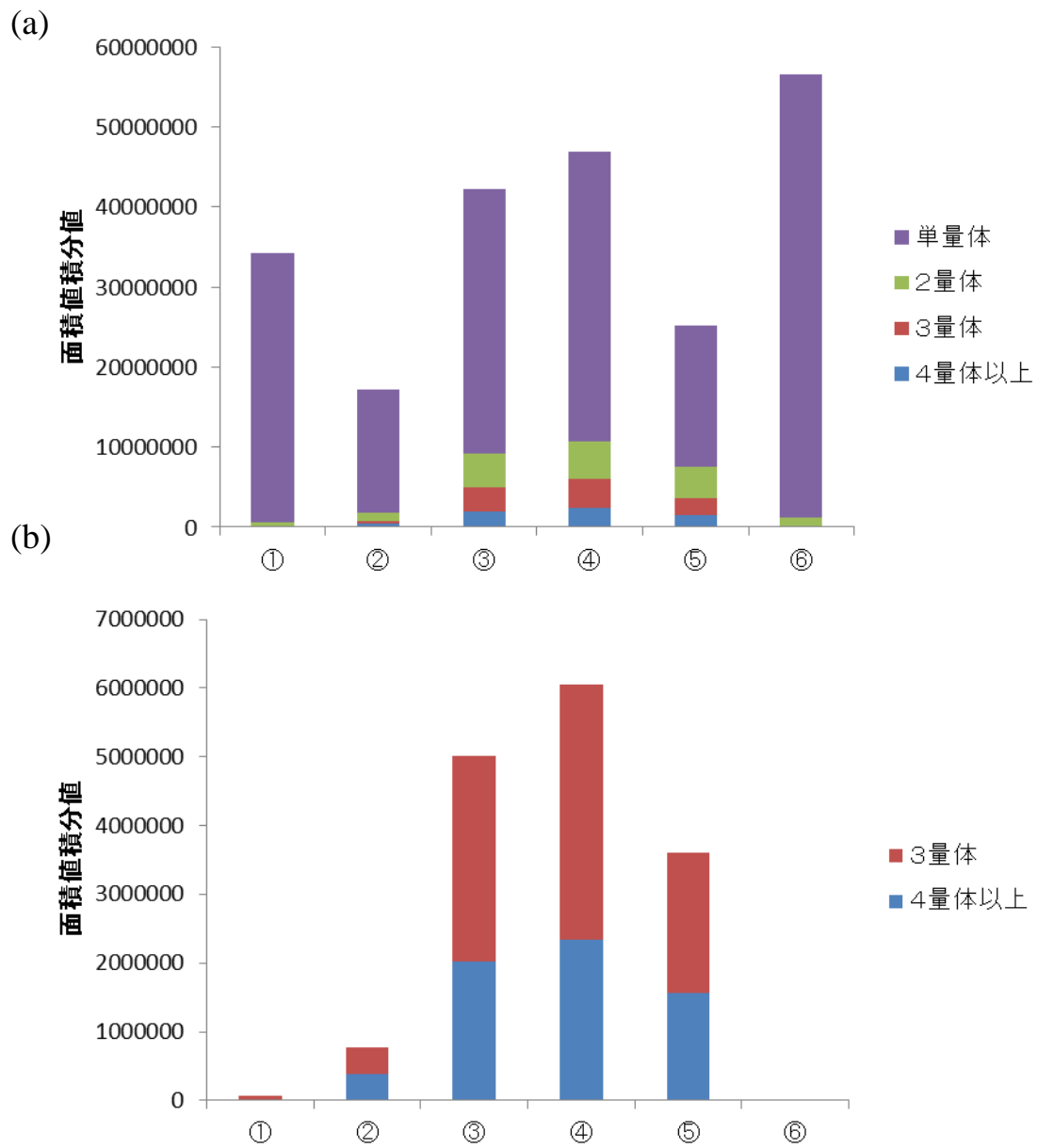


図 2-10 SEC スペクトルからの各サンプルの(a)単量体、二量体、三量体、四量体以上の面積値と(b) 三量体、四量体以上の面積値

続いて、作製した凝集体の安定性について評価した。上記方法にて、作製した IgG の三、四量体が室温にて静置し、どの程度含有量が変化するかを同様に SEC にて評価した(図 2-11)。結果、作製した IgG の三、四量体は室温にて、5 日間後も大きなスペクトル変化はなく安定しており、モデル凝集体として評価に用いることができると判断した。

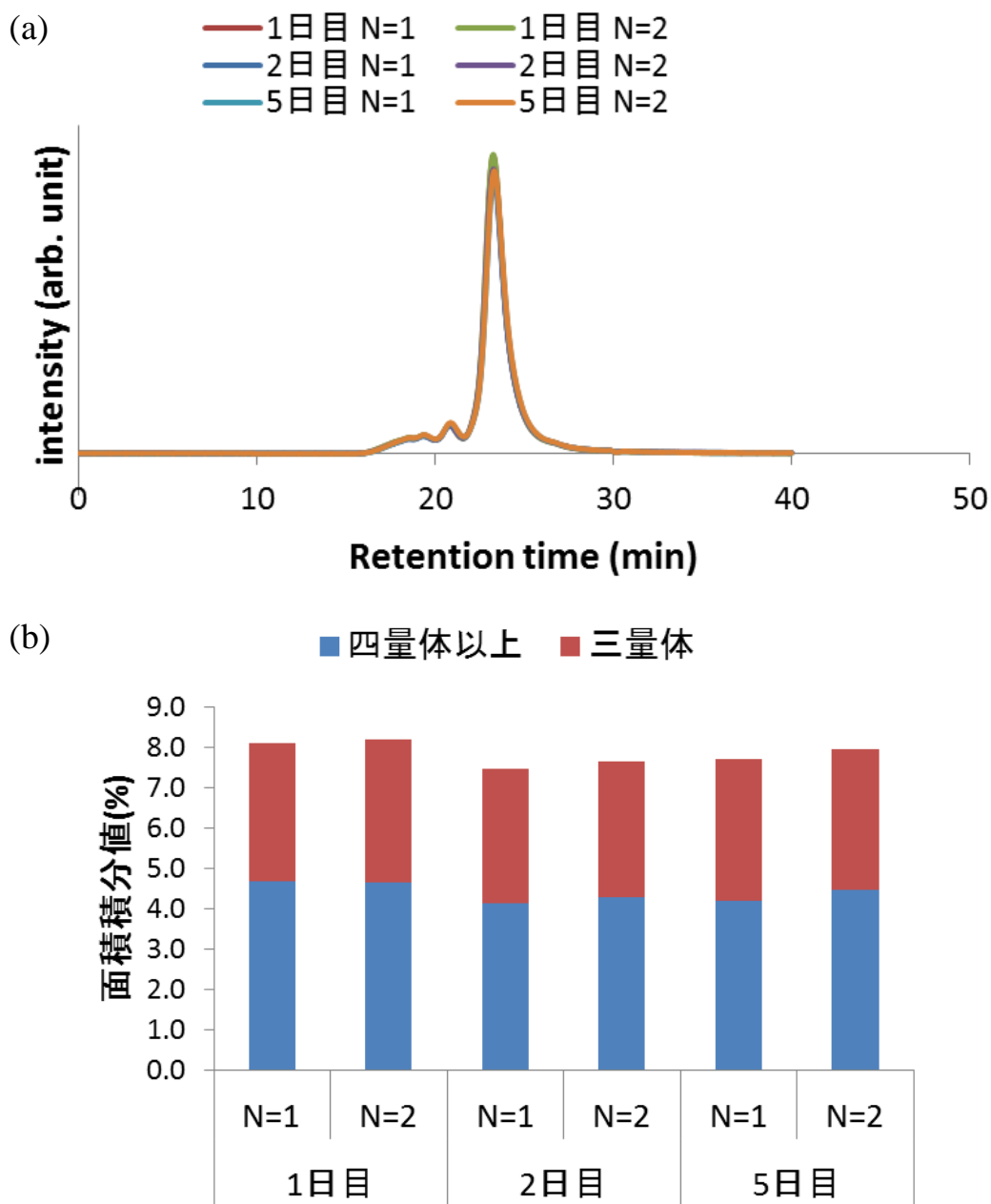


図 2-11 凝集体の日間差での測定結果

(a)各測定日でのスペクトル (b)凝集体である三、四量体以上のピーク面積比の比較

2.3.3. 凝集体のろ過結果

続いて、作製した IgG の三、四量体がウイルス除去フィルターの Flux に影響を及ぼし得るのかを評価した。作製した三、四量体を一定量含む IgG 溶液を調整し、その溶液をろ過することで、作製した IgG 分子の三、四量体による Flux 低下がどの程度あるのかを評価した。ろ過の条件は表 2-6 に示すとおりである。

表 2-6 ろ過条件

溶液条件	pH=4 10 mM NaCl
IgG 濃度	1 mg/mL
フィルター	Planova 20N
凝集体含有濃度	0, 2, 6 %

図 2-12 にウイルス除去フィルターの Flux 低下挙動を示す。作製した IgG の凝集体を含むサンプルは、含まないサンプルよりもろ過量の増加に伴う Flux の低下が大きいことが確認できた。つまり、作製した IgG の凝集体は Flux 低下に影響を及ぼすモデル分子として有効であると判断できる。

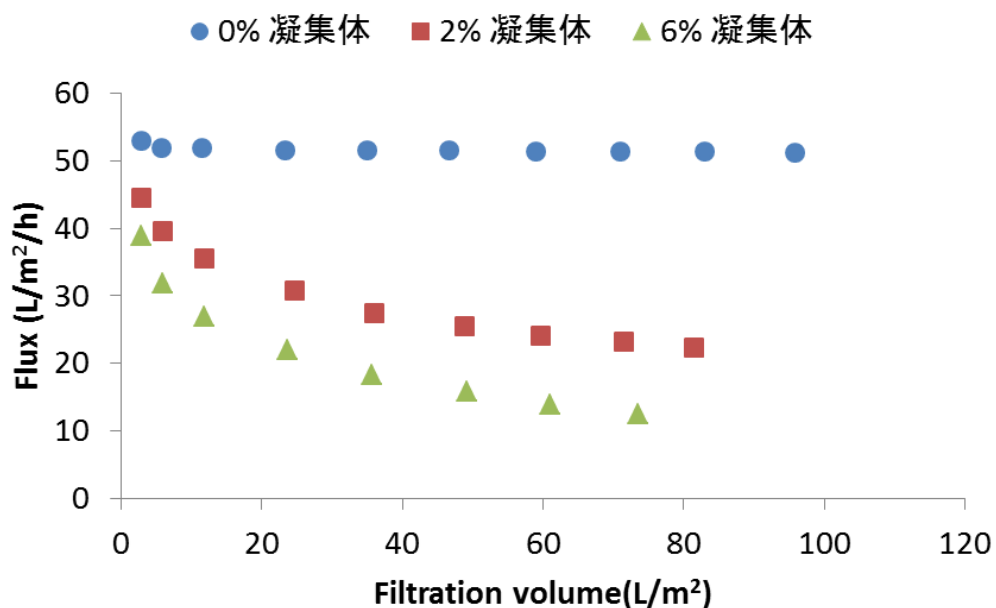


図 2-12 凝集体含有溶液のろ過結果

さらに、IgG 凝集体の存在量の異なるサンプルについて、IgG 凝集体をフィルターのろ過面積当たりどの程度ろ過したかを示す、凝集体負荷量(Total multimer weight)と Flux 低下との関係を示したのが図 2-13 である。こちらに示すように、ろ過前の溶液中における IgG 凝集体の濃度が異なっても(2%と 6%)、凝集体負荷量に応じて Flux の低下の挙動は同一であることが確認できる。つまり、凝集体による Flux 低下は、ろ過前の溶液中にどのくらいの凝集体が存在しているのかに依存していると推定できる。

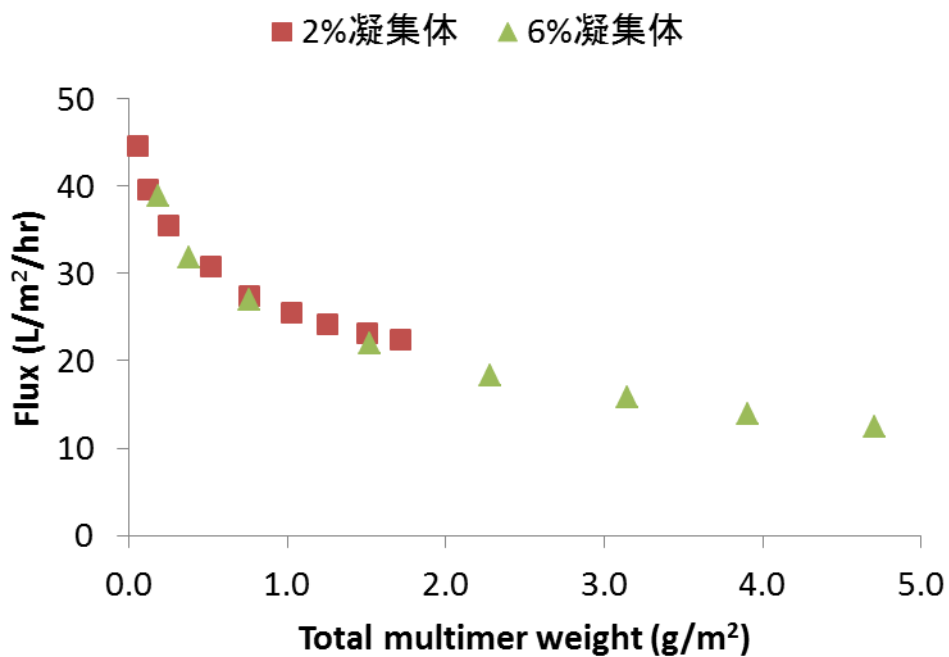


図 2-13 フィルターへの凝集体量負荷量と Flux との関係

最後に、調整した溶液の SEC のスペクトル測定結果を図 2-14 に示す。こちらに示すように、Flux が低下したサンプルには三、四量体が含まれており、Flux が低下していないサンプルについては三、四量体が含まれないことが示された。以上の結果より、Flux 低下に大きく影響を及ぼしているのは三、四量体であると考えられ、溶液中にこれらがどの程度含まれるかによって、Flux 低下への影響を把握できると考えられる。

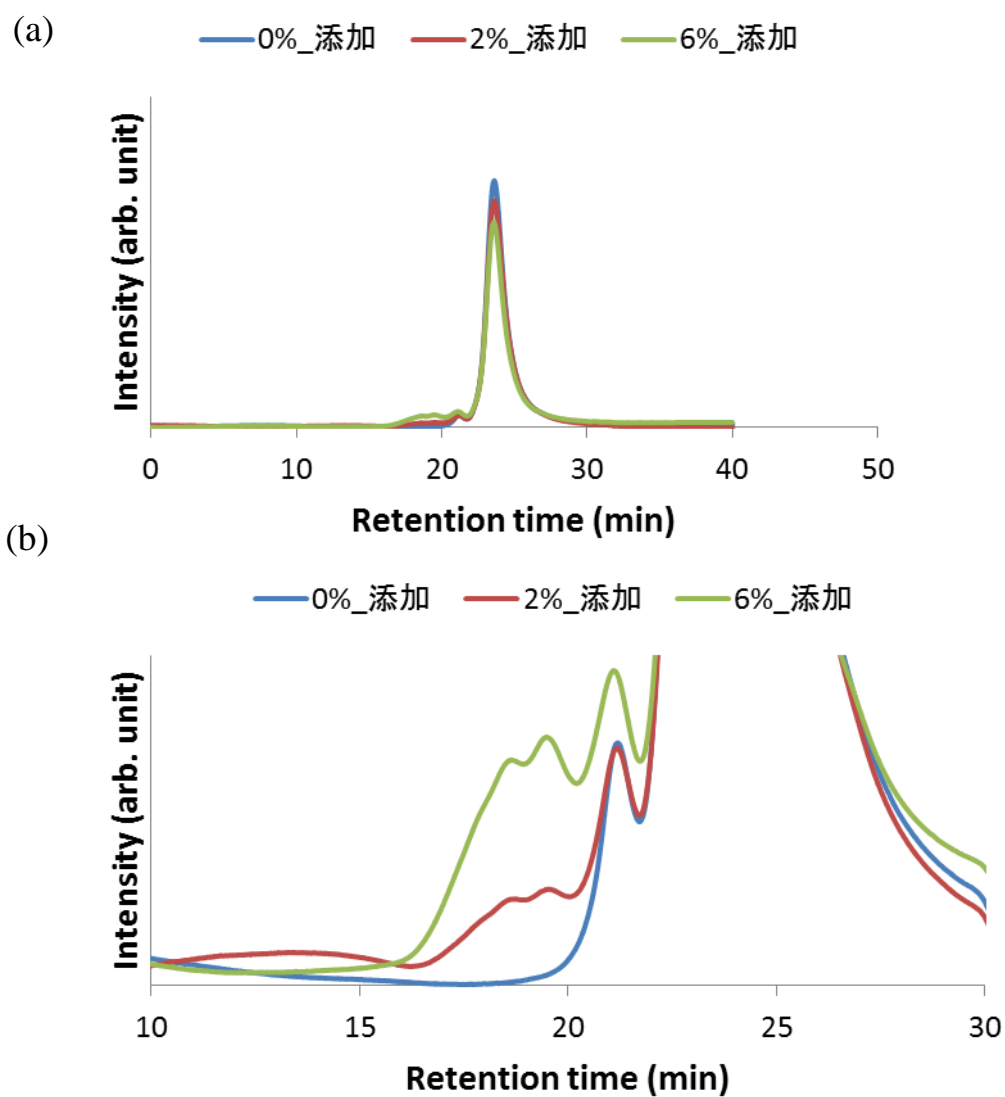


図 2-14 調整した溶液の SEC スペクトル(a)全体図 (b)拡大図

2.4. 結論

本章では、再生セルロースからなるウイルス除去フィルターである Planova 20N フィルターに対して、タンパク質によるファウリングを解析するための手法の開発を行った。まず、SPR 法を用いてフィルターの膜表面とタンパク質との相互作用を解析するために、SPR センサー表面に膜材料と同じセルロースのモデル表面を作製した。このモデル表面は、Planova 20N フィルターと同等のタンパク質吸着挙動を示したことから、膜表面とタンパク質との相互作用、具体的には膜表面に対するタンパク質の吸着量を解析する手法としての有効性が示された。続いて、タンパク質の凝集体によるファウリングを解析するために、再現性良くモデル凝集体を作製する手法を確立し、かつこの凝集体は SEC にて定量することを確認できた。さらに、作製した凝集体はフィルターのろ過性を低下させることも確認され、SEC による分析がタンパク質の凝集体によるファウリング評価方法として確立することができた。

3. ファウリングメカニズム解明への展開① (塩濃度に依存した Flux 低下)

3.1. 序論

ウイルス除去フィルターに関するタンパク質ファウリングの研究例はいくつか報告されている。しかし、その多く研究例はタンパク質の凝集体に関するものである [65] [66] [67] [68] [69]。例えば、Brown らは [69]、イオン交換膜を用いたプレろ過によって、ウイルス除去フィルターのろ過性能が向上することを確認している。またイオン交換膜に捕捉されたものを採取して、SEC によって分析したところ、半径が 8 ~13 nm の凝集体が含まれていることが示されており、これら凝集体が膜の孔を塞ぐことでウイルス除去フィルターのろ過性能を低下させていると指摘している。一方、フィルター内の膜へのタンパク吸着現象については数例しか報告例がない [70] [71]。例えば、Bolton らは [70]、同じくプレフィルターによってウイルス除去フィルターのろ過性能が向上することを見だし、かつプレフィルターに捕捉された成分を調べると凝集体ではなくモノマーであることが示された。さらにこのモノマー成分は、疎水性が高いことが分かり、この成分がフィルターに吸着することでろ過性を低下させているのだと指摘している。しかし、上記例を含めて、ウイルス除去フィルターの研究例において、間接的に膜材料とタンパク質との相互作用について指摘した例はあるが、直接それらの関係を評価した研究例は存在しない。つまり、ウイルス除去フィルターがタンパク吸着によってろ過性が低下するという仮説は未だに立証されたとは言えない。よって、本章では、膜材料とタンパク質との相互作用に着目し、それらとウイルス除去フィルターのろ過性との関係を明らかにすることを目的とした。

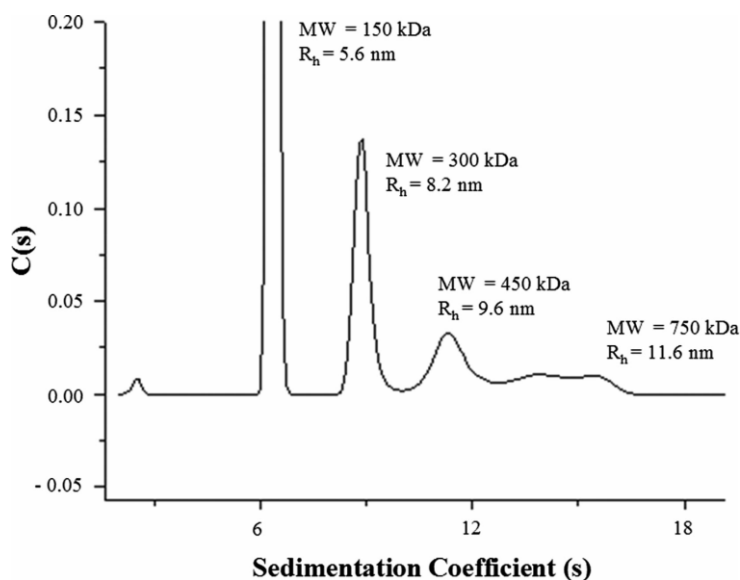


図 3-1 イオン交換膜に捕捉されたタンパク質の超遠心分析法によるサイズ評価

3.2. 実験条件

3.2.1. 試薬

実験には市販の免疫グロブリン G(IgG)溶液(Venoglobulin[®] IH, 50 mg/mL, Japan Blood Products Organization)、トリアセチルセルロース(Scientific Polymer Product, Inc.)、超純水(Cascada, Pall Co.)、塩化ナトリウム(Wako)を用いた。また実験に使用する IgG 溶液の pH の調整は、市販の 100 mM の塩酸(Wako)および 100 mM の水酸化ナトリウム水溶液(Wako)を用いて行った。また塩濃度の調整は、1 M の塩化ナトリウム水溶液を作製し、IgG 溶液に加えることで調整した。本実験での IgG の溶液は実際の工程でよく用いられる濃度(10 mg/mL)と pH 7 に設定し、塩濃度を 3 種類(0, 10, 100 mM NaCl)変えたサンプルを調整した。

3.2.2. ろ過

ウイルス除去フィルター(Planova 20N, Asahi Kasei Medical Co.Ltd.)のろ過は、デッドエンドの方式で定圧ろ過(78.4 kPa)にて行った。フィルターのろ過時のファウリングの評価としては、ろ過流速(L/m²/h)を指標として用いた。ろ過流速の値としては、任意のろ液を回収し、回収するのに必要とした時間と用いたフィルターの膜面積にて除した値を用いた。

なお、ろ過方法として、IgG を含む溶液を 25°C、一定圧(78.4 kPa)でろ過した様式(Steady Filtration、図 3-2a)と IgG を含む溶液(以下、IgG 溶液と省略)と含まない溶液(以下、NaCl 溶液と省略)を任意のろ過量ごとに交互に変えた様式(Switching Filtration、図 3-2b)の 2 種類のろ過を行った。なお、Switching Filtration は以下の要領で行った。1)まず、フィルターを IgG 溶液と同じ塩濃度の NaCl 溶液で満たし、任意の量をろ過した。2)次に、NaCl 溶液を IgG を含む溶液に切り替え、任意の量の IgG 溶液をろ過した。3)その後、再び IgG を含まない NaCl 溶液と交換し、膜の内面及び内部を洗浄した。この操作を任意の容量の IgG 溶液が濾過されるまで、この手順を 4 回繰り返した。各溶液の切り替え後に IgG および NaCl 溶液の両方について Flux を計算した。

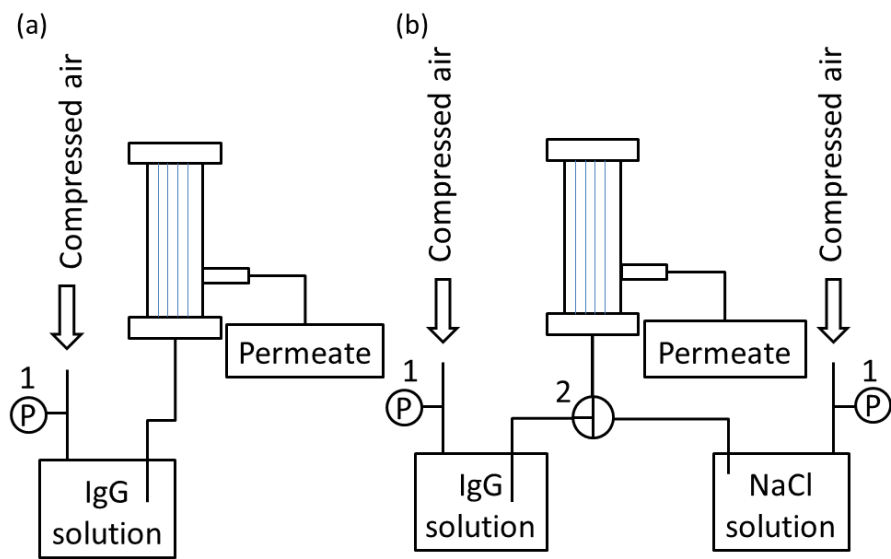


図 3-2 ろ過図 (a)Steady Filtration, (b)Switching Filtration

3.2.3. センサー上へのセルロースモデル表面の作製

SPR センサー(SIA kit Au, GE Healthcare)および QCM-D センサー(Q-Sensor (Au), Q-Sense AB)へのセルロースのモデル表面の作製方法は、2.2.2 セルロースモデル表面の作製での作製方法と同様の方法にて行い、XPS 測定によりセンサー表面がセルロースであることを確認した [60] [61] [62]。

3.2.4. SPR 測定

IgG 溶液の溶液条件として、塩濃度(0, 10, 100 mM NaCl)と pH 7、また実験条件として、IgG 溶液と NaCl 溶液を任意の時間で交互に変えることで不可逆吸着量を測定した。上記操作を 3 回繰り返し、各溶液の導入量は IgG 溶液の導入量は 5, 30, 60 μ L、NaCl 溶液の導入量は一定量の 5 μ L とした。吸着量の評価指標としては、NaCl 溶液に変えた後の SPR スペクトルの強度の平均として算出した。それ以外は 2.2.3 SPR 測定と同様の方法にて測定した。

3.2.5. QCM-D 測定

市販の QCM-D 装置(Q-Sense E1, Q-Sense AB)を用いて、セルロース表面に吸着した IgG 分子の粘弾性の評価を行った。セルロースをコートしたセンサー表面は、測定前に NaCl 溶液(0, 100 mM NaCl)にて 1 時間浸漬させベースラインを安定化させた。ベースラインの安定化後に、IgG 溶液(10 mg/mL)を導入し、センサーの共振周波数(Δf)とエネルギー散逸(ΔD)の変化を測定した。IgG 溶液とセンサーとの接触時間は 30 分間とし、その後 NaCl 溶液を導入した。

3.2.6. SEC 測定

タンパク質溶液の単量体、二量体、三量体以上の存在量を測定するために、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)測定を行った。測定は、市販の装置(Nexera HPLC, Shimadzu)とカラム(UltraSW aggregate column, Tosho Bioscience)を用いて行った。移動相は 300 mM のリン酸緩衝液(pH = 6.9)を用い、測定時の流速は 0.4 mL/min として、40 分間測定を行った。

3.2.7. FT-IR 測定

フーリエ変換赤外分光光度計(FT-IR)に膜表面へのタンパク吸着の評価を行った。装置は市販の FT-IR 装置(Nicolet Continuum / iS50 Infrared Microscope, Thermo Fisher Scientific Inc.)を用いた。塩濃度が 100 mM と 0 mM の IgG 溶液をろ過した後のフィルターから、膜を取り出し、膜の内表面を切り出し、プリズム(Ge)上に固定して測定を行った。

3.3. 結果と考察

3.3.1. ろ過結果

まず、塩濃度を変えて調整した IgG 溶液の Planova 20N フィルターによるろ過を行った。各塩濃度(0, 10, 100 mM NaCl)のろ過量に対する Flux を図 3-3 に示す。こちらに示すようにフィルターの Flux は塩濃度に大きく依存しており、塩濃度が低いほど Flux のレベルが低いことが確認できる。またろ過量が増えるに従って Flux が低下する挙動も得られている。特に、塩濃度に依存した Flux レベルの違いはろ過量が少ない最初から観察されており、ウイルス除去工程への大きな影響が予想される。よって、この塩濃度に依存した Flux レベルの低下原因を明らかにする必要があると思われる。

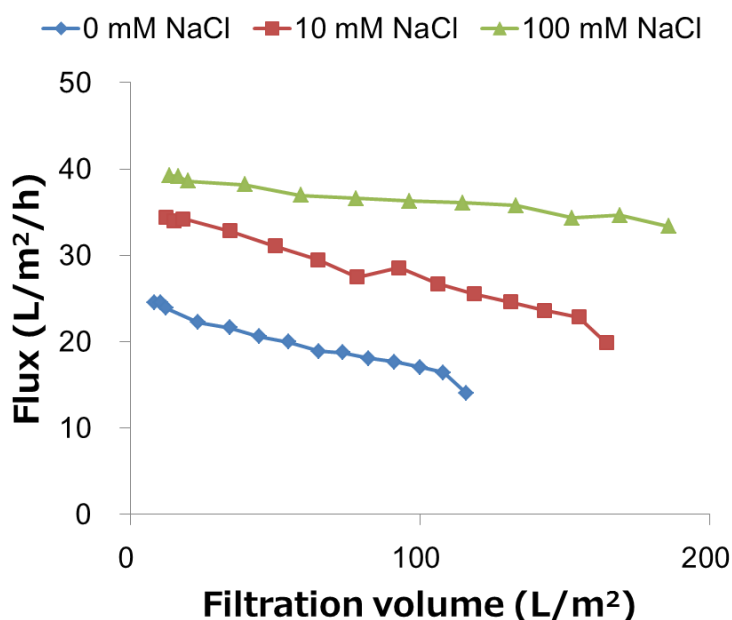


図 3-3 Steady Filtration での塩濃度違いの IgG 溶液のろ過量に対する Flux 変化

Brown らの検討によると [69]、二量体や三量体以上のタンパク質凝集体がウイルス除去フィルターの孔を塞いで、Flux を低下させるという研究例がある。よって、今回調整した IgG 溶液にどの程度の二量体や三量体以上のものがあるのかを SEC 測定によって、評価してみた。

図 3-4 と表 3-1 に SEC にて測定した結果を示してある。まず、図 3-4 には、全体のスペクトルを示しているが、調整した溶液はほとんどが単量体であり、二量体がわずかに含まれる程度であることが分かった。しかし、三量体以上のピークは検出されず、単量体と二量体で構成されていることが示された。また表 3-1 には、図 3-4 で得られたスペクトルの面積比から、各成分の含有割合を示している。この結果からは、塩濃度が異なっても単量体

と二量体の含有割合はほぼ等しく、塩濃度に依存した含有割合の変化は確認できなかった。以上の結果から、Brown らが指摘した条件とは異なり、今回の低塩濃度ほど Flux が低下する現象は、二量体や三量体以上のタンパク質がフィルターのを塞いでいることが原因ではないと考えられる。つまり、膜へタンパク質が吸着することによって、Flux が低下しているという可能性が高いと考えられる。

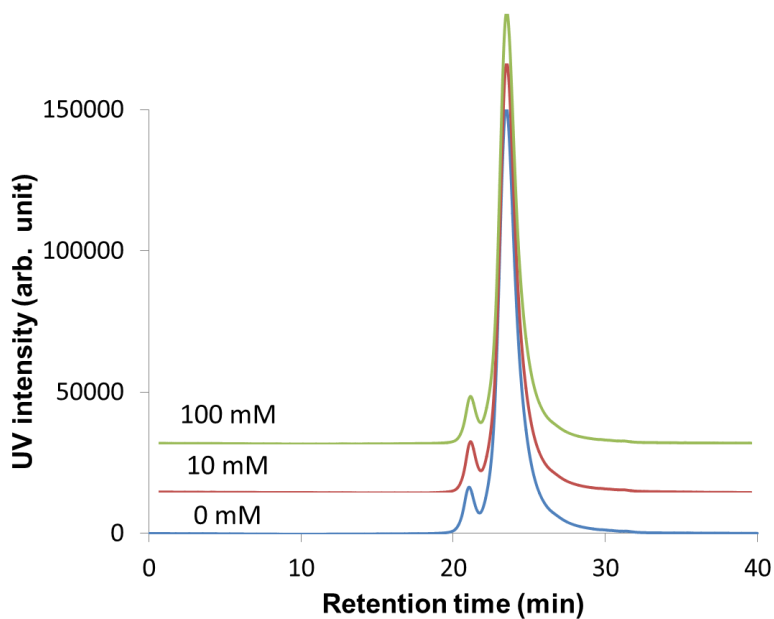


図 3-4 調整した各塩濃度の IgG 溶液の SEC スペクトル

表 3-1 調整した各塩濃度の IgG 溶液単量体、二量体、三量体以上の含有割合

NaCl concentration (mM)	単量体 (%)	二量体 (%)	凝集体 (%)
0	94.5	5.5	N.D.
10	94.1	5.9	N.D.
100	94.9	5.1	N.D.

過去の研究例より [72]、不可逆的なタンパク質の吸着は、バッファー溶液でも除去することができず、Flux 低下の原因になると述べられている。よって、Flux の変化が不可逆的かどうかを確かめるために、IgG 溶液を任意量のろ過した後に、同じ塩濃度の NaCl 溶液にてフィルター内の膜の内表面と膜内部を洗浄した後に Flux の変化を確認した(図 3-5)。図 3-5 には、任意の IgG 溶液をろ過した後に、NaCl 溶液で洗浄し、その後 NaCl 溶液にて測定した Flux を示している。こちらに示すように、IgG 溶液のみのろ過結果と同様に塩濃度に依存した Flux レベルの差が見られている。また、NaCl で洗浄後も Flux が IgG 溶液ろ過前の最初のレベルに戻ることはないことも確認でき、Flux 変化が不可逆的なものであると確認できた。なお、図 3-6 には、IgG 溶液のろ過量体にする Flux の変化を Steady Filtration と Switching Filtration とで比較した図を示している。こちらに示すように、どちらのろ過方法によっても、ろ過量に対して Flux 変化は同等の変化を示すことから、どちらも同じ原因にて Flux が低下していることが示されている。

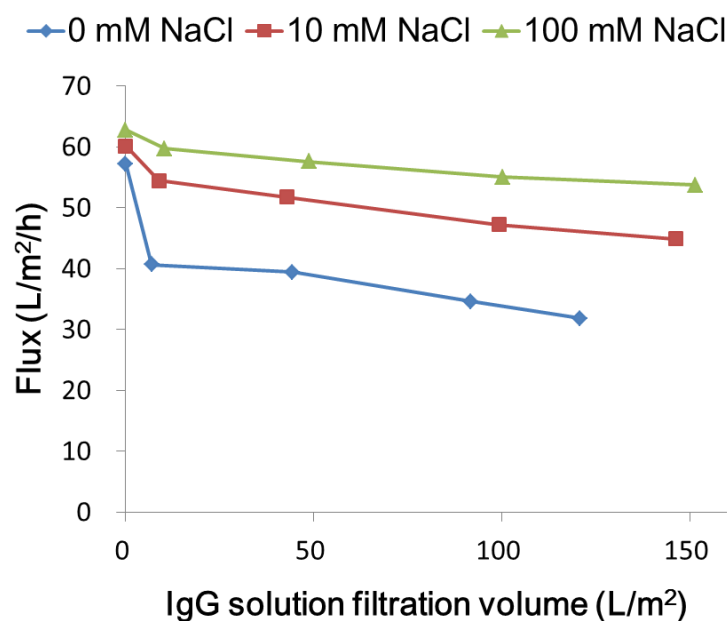


図 3-5 Switching Filtration での塩濃度違いの IgG 溶液のろ過量に対する Flux 変化

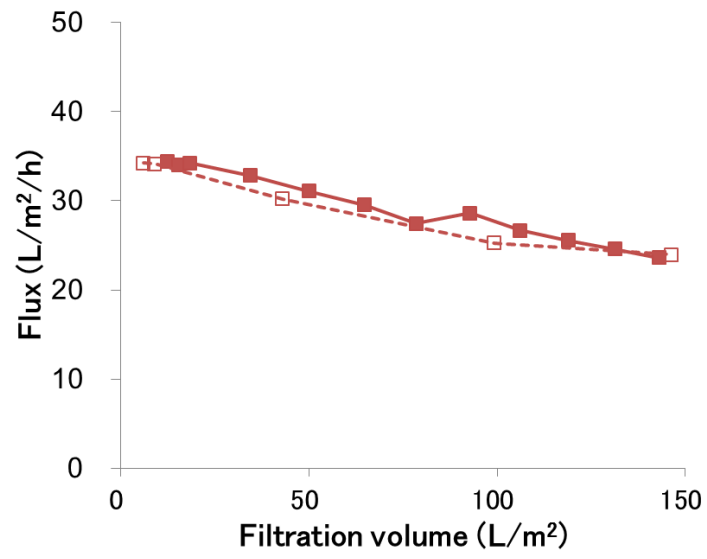


図 3-6 Steady Filtration と Switching Filtration の比較(10 mM NaCl, pH 7)
 点線は Switching Filtration 実線は Steady Filtration

続いて、膜表面にタンパク質が吸着していることを確認するために FT-IR 測定を行った。測定サンプルは塩濃度が 0 と 100 mM の IgG 溶液をろ過した後のフィルター内の膜の内表面を測定した。図 3-7 に測定した FT-IR のスペクトルを示している。1800-1400 cm^{-1} の範囲において、2つのピークが観察され、それぞれ吸着した IgG のアミド I、II バンドであると推定している [73]。さらに、塩濃度が 0 mM の IgG 溶液をろ過したサンプルの方が 100 mM のそれよりも吸光度が高く、表面に多くの IgG 分子が存在していることが確認された。以上より、塩濃度に依存して、IgG の吸着量が増加していることが確認された。

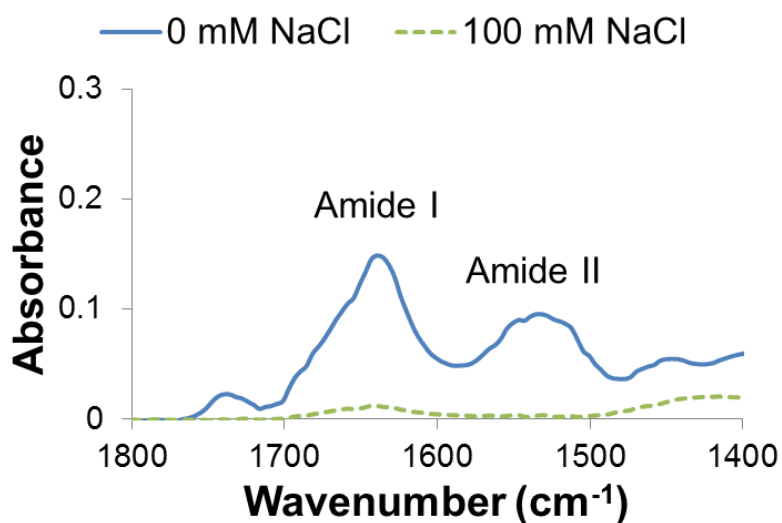


図 3-7 ろ過後のフィルター内の膜内表面の FT-IR スペクトル

最後に、塩濃度を変えた際の NaCl 溶液のみのろ過を行った。図 3-8 に塩濃度を変えた NaCl 溶液(0, 10, 100 mM)のろ過量体に対する Flux 変化を示している。IgG 溶液を用いたろ過結果とは異なり、塩濃度に依存した Flux レベルの差異は観察されなかった。この結果より、塩濃度に依存した IgG 溶液の Flux レベルの差異は、膜の膨張や収縮による孔径の減少によって起こっているわけではないことが示された。

以上の結果より、塩濃度の違いによってウイルス除去フィルターの Flux レベルが大きく異なることが示された。またこの結果は、従来より指摘されているタンパク質の二量体や三量体以上の凝集体が孔を塞ぐことによって起こっているというよりは、フィルターにタンパク質が吸着することで Flux レベルの差が見られているのではないかと考えられる。

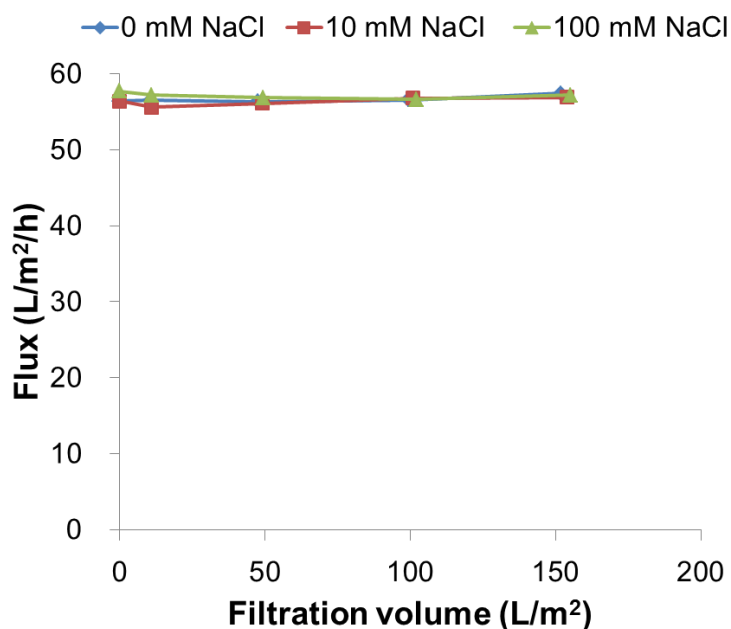


図 3-8 NaCl 溶液のろ過結果

3.3.2. SPR 測定結果

前節にて、IgG 分子がフィルター表面と吸着することが Flux 低下に影響しているのはいかとの見解を得た。本稿では、より詳細に IgG 分子とフィルター材料であるセルロースとの相互作用の評価を SPR 測定にて解析を行った。

図 3-9 にセルロース表面への IgG 分子の吸着挙動の評価結果を示している。図 3-9a では、各塩濃度(0, 10, 100 mM)の IgG 溶液と NaCl 溶液を交互に導入した際の SPR スペクトルの結果を示している。こちらに示すように、NaCl 溶液を導入した後もスペクトルは IgG 溶液導入する以前のレベルには戻らず、セルロースセンサー表面に IgG 分子が吸着して残ることが推定される。さらに、ろ過結果と同じように塩濃度が低い条件程、SPR スペクトルの強度が強く、表面に多くの IgG 分子が残っていることが推定される。さらに図 3-9b には、NaCl 溶液導入後の SPR スペクトルの強度を不可逆的なタンパク質の量として算出した値を、タンパク質の接触時間に対して示している。こちらに示すように、IgG 溶液との接触時間とともに吸着量は増加していき、こちらも図 3-3 のろ過結果と同様の結果が得られている。なお、塩濃度に依存した SPR による IgG 分子のセルロース表面への吸着量の測定結果は、タンパク質溶液の接触時間が 5 分間の条件については、3 回測定しており、再現性の高い結果であることを確認している(図 3-10)。

以上の SPR の測定結果から、IgG 分子はフィルターに吸着することで Flux を低下させるといふ仮説を支持する結果を得ることができた。

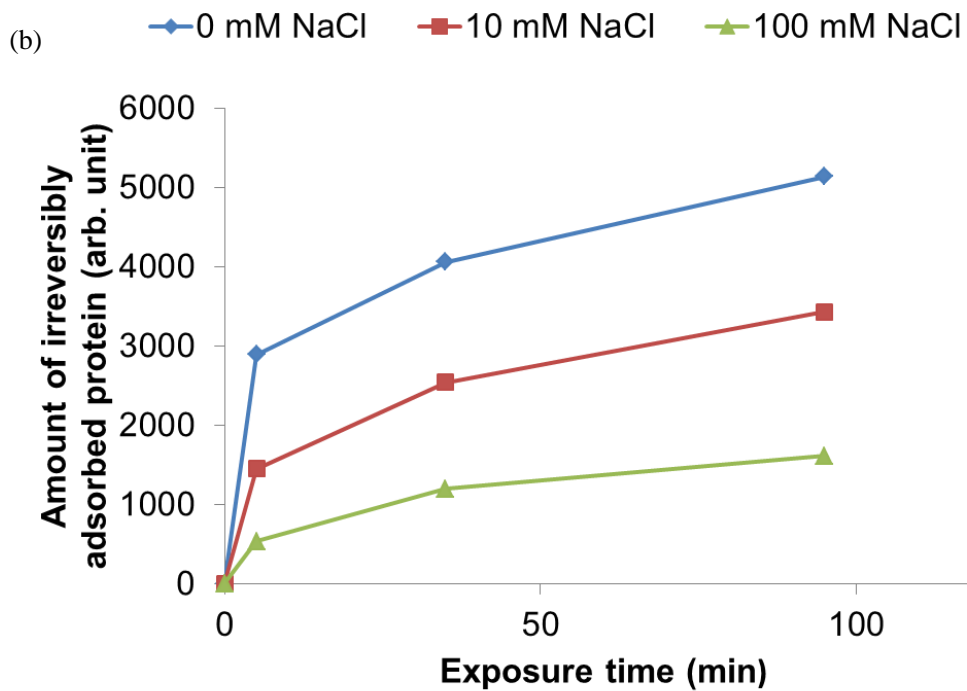
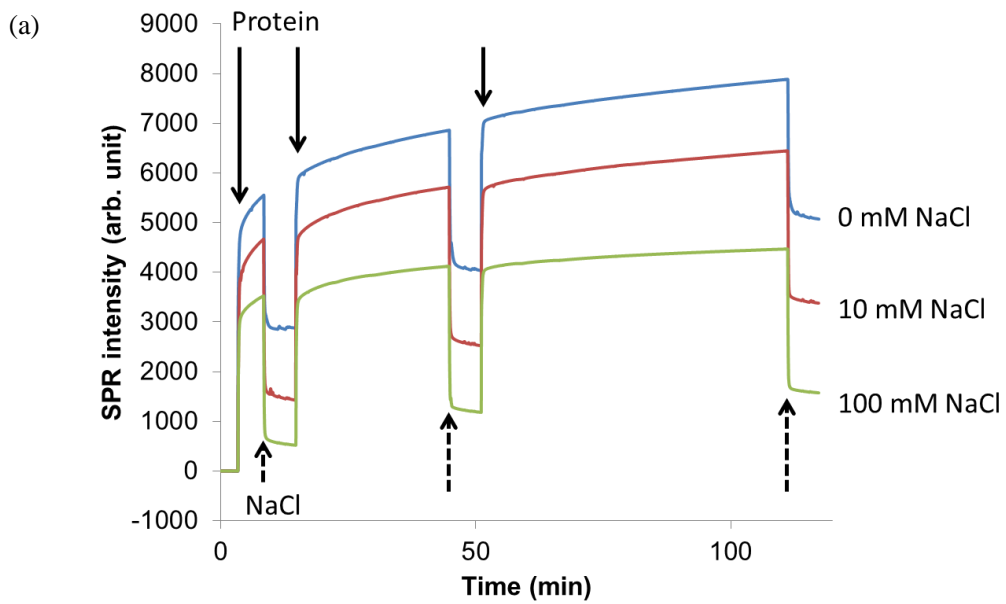


図 3-9 セルロース表面に対する IgG 分子吸着の各塩濃度における SPR スペクトル
 (a) スペクトル全体 (b)タンパク溶液との接触時間に対する吸着量

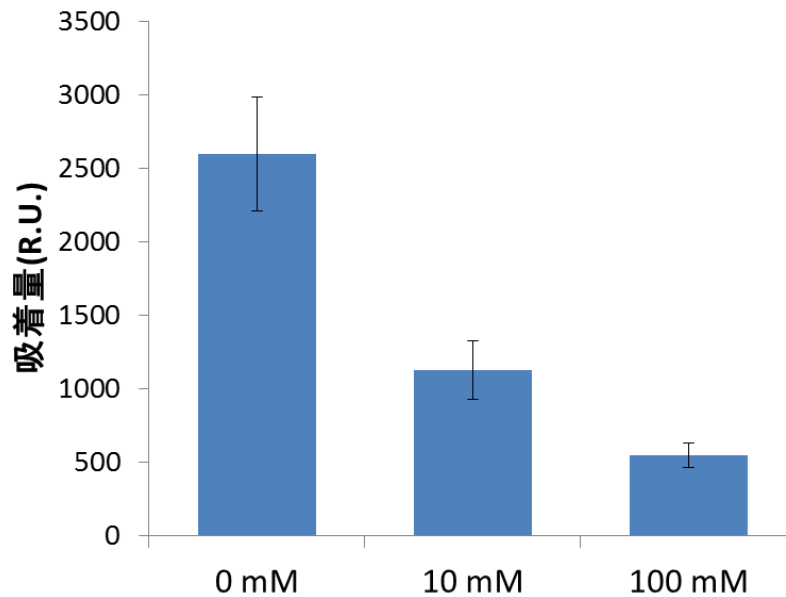


図 3-10 SPR 測定 of 吸着量の再現性確認
(エラーバーは 3 回測定 of 標準偏差 of 値)

3.3.3. DLVO

前項までに IgG 分子とセルロース表面との相互作用力が塩濃度に依存しており、それによって、フィルター of Flux レベルに違いが現れていることが強く支持された。本項では、塩濃度に応じた相互作用 of 違いがどこから生じているのかを検討してみたい。Hongo-Hirasaki らによると IgG 分子とフィルター of 表面では、静電的な力が作用していると指摘している [56]。よって、IgG 分子とフィルター表面との相互作用について、DLVO 理論によって計算することにした。DLVO 理論は、水中での生体分子やコロイド粒子と材料表面との相互作用 of 評価を行うのによく用いられている (Eq. 1) [74]。

$$U = -\frac{A_H R}{6D} + 2\pi R \epsilon [2\psi_s \psi_T e^{-D/\lambda_D} - \frac{1}{2}(\psi_s^2 + \psi_T^2) e^{-2D/\lambda_D}] \quad (1)$$

式中 of A_H , R , D , ϵ , ψ_s , ψ_T , λ_D の意味としては、 A_H は Hamaker 定数であり [75] [76] [77, 78]、 R は IgG 分子 of 半径 (5.29 nm [79])、 D は IgG 分子とセルロース表面との距離 (nm)、 ϵ は誘電率、 ψ_s , ψ_T はそれぞれ、セルロースと IgG 分子 of ゼータ電位 of 値 [56]、デバイ長である。式中 of 最初 of 項は van der Waals 力を、残り of 項は静電的な力を示している。各塩濃度条件について式 1 を用いて、IgG 分子とセルロース表面との両者 of 距離に対するエネルギー U について計算した結果を図 3-11 に示した。こちらに示すように IgG 分子とセルロースとの距離

が近づくにつれて、どの塩濃度においても、エネルギー U が負に大きくなる、すなわち引力が強くなっている結果が得られている。それぞれの項に着目すると、静電的な力は塩濃度に強く依存しており、塩濃度が低いほど両者の引力が強くなっているという Hongo-Hirasaki らの指摘した通りである [57]。一方で、van der Waals 力は塩濃度の影響をほとんど受けていないことも示されており、これらを合計した全体的な両者の相互作用力は、塩濃度が 0 mM 場合のみ強い引力が働き、10, 100 mM では大きな違いがないことが DLVO 理論による計算から示された。つまり、上記 SPR 測定にて示された、IgG 分子とセルロース表面との塩濃度に依存した不可逆吸着量の差異は、単純な相互作用のみでは説明できないことが分かった。

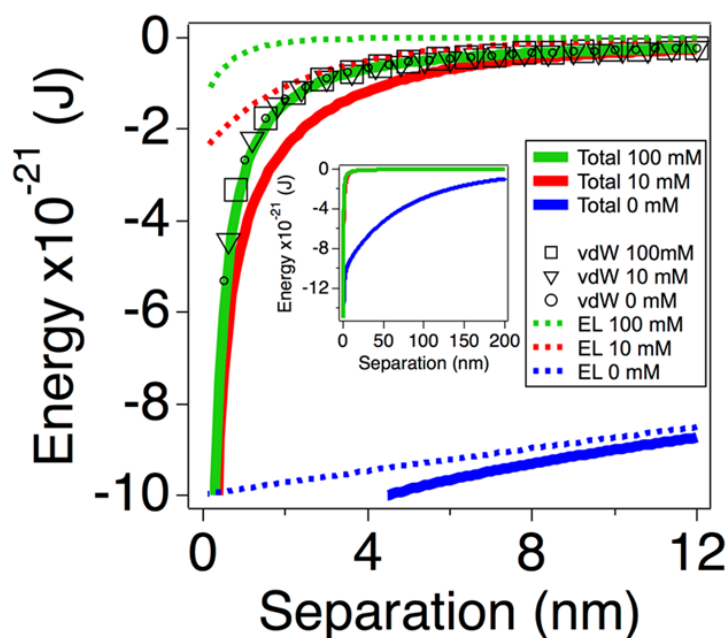


図 3-11 各塩濃度での DLVO によるセルロース表面と IgG との相互作用計算結果

3.3.4. QCM-D の測定

SPR 測定にて観察されたセルロース表面への IgG 分子の吸着量の塩濃度に対する依存性は、DLVO 理論から計算した両者の相互作用力では説明できなかつた。よって、吸着した後の IgG 分子の状態が異なるのではないかと推定し、それら評価するために QCM-D を用いた測定を行った。図 3-12a は QCM-D で測定した共振周波数変化を示している。ここでいう共振周波数変化は IgG 分子の吸着量の変化を意味する。図 3-12a では、IgG 溶液を導入することで、大きな周波変化が得られ、タンパク質が表面に吸着している様子が観察されている。また IgG 溶液を NaCl 溶液に戻した後も一定量の IgG がセンサー表面に残っている様子が観察されている。さらに、センサーへの吸着量は低濃度の条件ほど大きいことが示されている。これらの傾向は SPR の測定と同様であり、同じ現象を測定できている証拠である。さらに、QCM-D 装置の特徴として、吸着後の分子の粘弾性を解析することで、吸着後の構造変化の有無を評価することが可能である [80] [81] [82]。構造変化の度合いを評価する指標として、 $\Delta D/\Delta F$ (共振周波数変化に対するエネルギー散逸の変化) を用い、 $\Delta D/\Delta F$ の絶対値が大きいほど吸着分子当たりのエネルギー散逸量が大きい、つまり吸着した分子はより柔らかい構造をとっていることを示し、構造変化をしていないと判断できる。一方、 $\Delta D/\Delta F$ の絶対値が小さいほど吸着分子当たりのエネルギー散逸量が小さい、つまり吸着した分子はより硬い構造をとっていることを示し、構造変化をしていると判断できる [82]。よって、図 3-12b には上述した指標にて、塩濃度違いの結果を示している。この結果からは、塩濃度に依存した $\Delta D/\Delta F$ の値の差が観察されており、低濃度 (0 mM NaCl) の条件ほど、 $\Delta D/\Delta F$ の絶対値が小さく、吸着した IgG が塩濃度条件より構造変化していることが推定される。この低い塩濃度条件程、IgG 分子の構造変化が促されるという結果は過去報告とも一致する [83]。さらに、IgG 溶液を導入している場合の共振周波数変化 (ΔF_{re}) と NaCl 溶液に切り替えた後の共振周波数変化 (ΔF_{ire}) との比を不可逆吸着割合 (irreversibility = $\Delta F_{ire}/\Delta F_{re}$) と定義し、 $\Delta D/\Delta F$ と不可逆吸着割合との関係を図 3-12c に示している。ちなみに不可逆吸着割合とは、吸着した分子の内どの程度が不可逆吸着としてセンサー表面に残るかを示す値である。図 3-12c より、 $\Delta D/\Delta F$ の絶対値の値が小さいほど、不可逆吸着量比が大きい、つまり構造変化が大きいほど不可逆吸着量が増えることを示唆している。以上の QCM-D の測定結果より、塩濃度が低いほど、吸着後の構造変化が促され、構造変化することで、不可逆吸着量が増えるという関係が示唆された。つまり、塩濃度に応じてセルロース表面での IgG 分子の不可逆吸着量の増加には、単純な両者の相互作用力よりも、吸着後の構造変化が大きな要因であると結論付けられる。

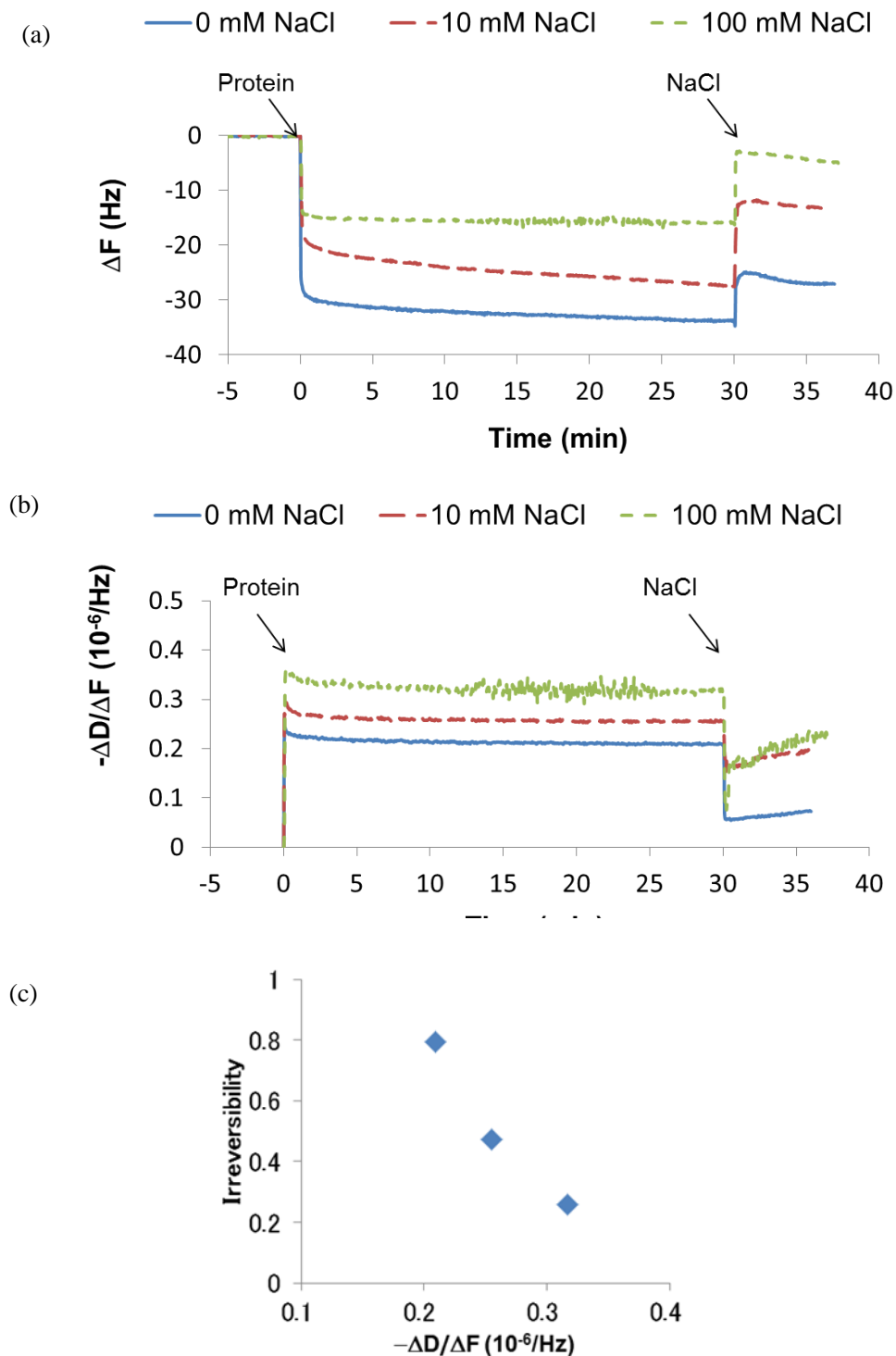


図 3-12 各溶液条件における QCM-D の測定結果

- (a) 周波数の時間変化(ΔF) (b) 共振周波数変化に対するエネルギー散逸の変化($\Delta D/\Delta F$)
 (c) 共振周波数変化に対するエネルギー散逸と不可逆吸着割合の比較

3.4. 結論

以上、本章においては、前章で確立したウイルス除去フィルターPlanova 20N に対するファウリング解析手法である SPR 法と SEC、および新たな解析手法である QCM-D を用いて、実際の工程で使用される条件でのフィルターのろ過性能の低下についての原因説明を行った。Planova 20N は溶液の塩濃度に依存して Flux が大きく変化する傾向が見られた。またこの Flux 低下には、タンパク溶液の SEC の測定結果より凝集体は関わっておらず、主にフィルターの膜表面や内部へのタンパク質の吸着が原因であると SPR から推察された。また DLVO 理論によるセルロースとタンパク質との相互作用力の計算と QCM-D による吸着後の塩濃度に応じたタンパク質の構造変化の結果を考慮すると、タンパク質は膜に吸着し、その後構造変化によって不可逆的に吸着することで、フィルターのろ過性を低下させているという結論に至った。本結果は、これまで明らかにされていなかった、ウイルス除去フィルターの膜表面とタンパク質との間に相互作用があることを示し、それがフィルターのろ過性能に大きく影響することを直接的に示した初めての結果であると考えており、今後の新たなウイルス除去フィルターの開発やフィルターを用いる工程への知見になりうると期待している。

4. ファウリングメカニズム解明への展開② (凝集体による Flux 低下)

4.1. 序論

前章で述べたとおりウイルス除去フィルターはタンパク質の凝集体によつてろ過性が低下することが確認されている。しかし、いずれの研究もろ過の結果やプレフィルターの効果によつて推定した研究 [66] [67] [69]、またはろ過前の溶液中に凝集体の存在を確認したものの [68] [65]であり、凝集体がろ過性の低下を招くものであることは明らかになったが、実際にどのような様式でフィルターのろ過性を低下させているのかは未だに明確にされているとは言い難い。近年では、ろ過結果をこれまでに提唱されているフィルターの閉塞モデルを元にシミュレーションすることで、膜内部でどのようなファウリングが起こっているのかを推定する研究例もある [84] [85] [86] [87] [88]。例えば、Wichramasinghe [84]らは、2種類のウイルス除去フィルターに対して、タンパク質として BSA を用い、ウイルスを添加した溶液に対してろ過実験を行った。その結果、いずれのフィルターも BSA を有する溶液にて Flux の低下が確認され、このろ過性の低下挙動は、凝集体により孔が閉塞する完全閉塞のモデルと一致したと報告している。しかし、ウイルス除去フィルターの構造は複雑であり、他の膜構造によつてモデル化した理論が完全に適応できるとは考えにくい。一方でタンパク質の凝集体は単量体よりも吸着しやすくなることが指摘されている [89] [90] [91] [92]。例えば、Zsom らは、5種類の単量体、二量体、三量体以上の凝集体の、割合の異なる BSA サンプルを用いて、ポリスチレンラテックス上へ、BSA の総吸着量および単量体、二量体、凝集体各成分の吸着量を比較していた。その結果、二量体や凝集体の割合が多いサンプルはポリスチレンラテックス上への総タンパク吸着量が増加しており、かつラテックス上には単量体よりも二量体や凝集体の方が吸着しやすいことを確認している [92]。以上の点から、凝集体は確かにウイルス除去フィルターのろ過性を低下させるが、フィルター内部で膜吸着しているのか、それとも膜の孔を塞いでいるのかは定かではない。もし上記ファウリングの形態が明確になれば、凝集体に耐性のある膜開発への知見ともなり、有益な情報であると考えられる。

(a) TABLE II
Adsorption Dependence on BSA-type^a PS Latex-3 (Surface Charge Density^b: $-3.9 \mu\text{C cm}^{-2}$)

Type	BSA added in solution		Adsorbed protein		
	Dimer ^c (%)	Polymer ^c (%)	Total (mg m ⁻²)	Dimer ^c (%)	Polymer ^c (%)
1	4.8	—	1.04	8.2	—
2	10.9	—	1.13	16.2	—
3	16.3	6.7	1.22	21.4	13.9
4 ^d	85.5	—	1.44	84.3	—
5	25.8	24.5	1.67	35.1	32.7

^a Adsorption in phosphate buffer (0.0667 M), pH 7.4, ads. time 1 h, temp. 20°C. PS concentration 18.9–19.2 g dm⁻³ (surface area 1.1–1.2 m²). Initial BSA concentration $\sim 4 \text{ mg m}^{-2}$ (1.2–1.4 g dm⁻³).

^b All $-\text{O}-\text{SO}_3^-$.

^c Monomer + dimer + polymer = 100%.

^d Initial BSA concentration 3.3 mg m^{-2} .

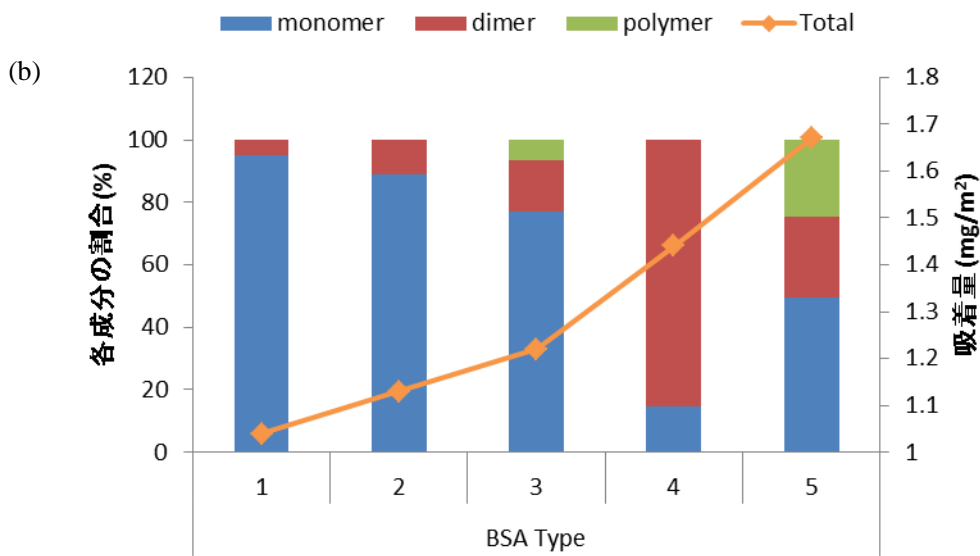


図 4-1 5 種類の異なる二量体、凝集体を含む BSA サンプルのポリスチレン表面への吸着量の測定結果 (a)吸着量のまとめ(出典: [92])と(b)各成分と吸着量の図(出典: [92])を基に筆者作成)

4.2. 実験条件

4.2.1. 試薬

実験は、市販の免疫グロブリン G(IgG)溶液(Venoglobulin® IH, 50 mg/mL, Japan Blood Products Organization)、トリアセチルセルロース(Scientific Polymer Product, Inc.)、超純水(Cascada, Pall Co.)、塩化ナトリウム(Wako)を用いた。また実験に使用する IgG 溶液の pH の調整は、市販の 100 mM の塩酸(Wako)および 100 mM の水酸化ナトリウム水溶液(Wako)を用いて行った。また塩濃度の調整は、1 M の塩化ナトリウム水溶液を作製し、IgG 溶液に加えることで調整した。本実験での IgG の溶液は実際の工程でよく用いられる濃度(10 mg/mL)と pH 4 に設定し、IgG 凝集体を任意の量添加することで凝集体を含む測定サンプルを作製した。

4.2.2. 凝集体含有サンプルの調整

凝集体含有サンプルの作製方法としては図 4-2 に示すスキームに従って行った。まず 2.3.2.1 の方法に従って IgG の凝集体を作製した。まず市販の IgG 溶液を超純水にて、所定の濃度(10 mg/mL)まで希釈した。続いて、100 mM の塩酸を加えることで、溶液の pH を所定の値(pH 2.5)まで下げ、室温にて 1 時間静置した。その後、100 mM の水酸化ナトリウム水溶液を加えて、溶液の pH を 5 以上にし、その後 12 時間以上静置した。その後、0.1 μm のフィルターにてろ過を行い、100 mM の塩酸を加えることで pH を 4 に設定し、所定の塩濃度(10, 20, 100 mM)になるまで、1 M の NaCl 水溶液を加えた。同様の操作にて、凝集体を含まない IgG の溶液を調整した。両者の溶液を混合することで、所定の量の凝集体を有するサンプル溶液を作製した。凝集体の含有量は SEC 測定にて評価した。

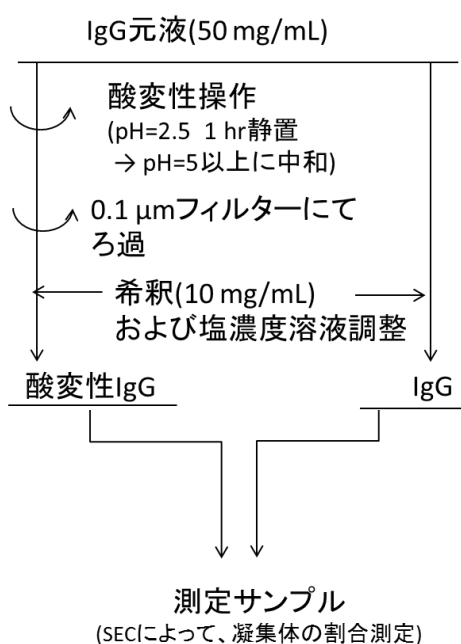


図 4-2 凝集体含有サンプル作製スキーム

4.2.3. ろ過

調整した溶液に対して、ウイルス除去フィルター(Planova 20N, Asahi Kasei Medical Co.Ltd.)のろ過を行った。ろ過はデッドエンドの方式で定圧ろ過(78.4 kPa)にて行った。フィルターのろ過時のファウリングの評価としては、ろ過流速(L/m²/h)を指標として用いた。ろ過流速の値としては、任意のろ液を回収し、回収するのに必要とした時間と用いたフィルターの膜面積にて除した値を用いた。

4.2.4. SPR 測定

SPR センサー(SIA kit Au, GE Healthcare)上には 2.2.2 項と同様の方法にてセルロース表面を作製した。また調整したサンプルの導入量は 5 μ L と固定し、それ以外は 2.2.3 SPR 測定と同様の方法にて測定した。

4.2.5. SEC 測定

タンパク質溶液の単量体、二量体、三量体以上の存在量を測定するために、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)測定を行った。測定は、市販の装置(Nexera HPLC, Shimadzu)とカラム(UltraSW aggregate column, Tosho Bioscience)を用いて行った。移動相は 300 mM のリン酸緩衝液(pH = 6.9)を用い、測定時の流速は 0.4 mL/min として、40 分間測定を行った。

4.3. 結果と考察

4.3.1. 凝集体溶液のろ過と吸着評価①

IgG 分子の凝集体による影響を評価するために、凝集体を含む溶液と含まない溶液を作製し、ろ過性への影響と吸着量の比較を行った。

4.3.1.1. 凝集体溶液のサンプル調整

作製した凝集体のサンプルの SEC 測定結果を表 4-1 と図 4-3 に示す。こちらに示すように、SEC スペクトルの面積値から算出して、おおよそ 10 % 程度の凝集体を含む溶液であることが確認できた。

表 4-1 作製した凝集体含有 IgG 溶液の SEC スペクトルからの各成分の面積割合

単量体 (%)	二量体 (%)	凝集体 (%)
83.1	6.1	10.8

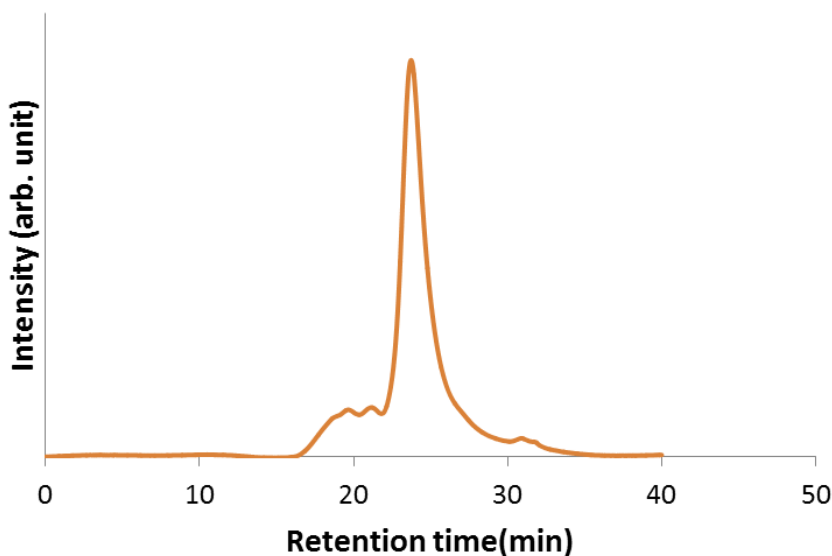


図 4-3 調整した凝集体含有 IgG 溶液の SEC スペクトル

続いて、作製した凝集体溶液と通常の溶液を表 4-2 の割合になるように混合し、ろ過及び SPR 測定評価サンプルを作製した。なお、各サンプルは SEC にて凝集体の量を確認している。

表 4-2 ろ過用調整液中の凝集体の仕込み比

サンプル	凝集体仕込み比 (%)
①	0 %
②	0.3 %
③	1 %
④	5 %

4.3.1.2. 凝集体溶液のろ過

続いて、作製したサンプルについて、Planova 20N を用いたろ過を行った。なお、凝集体の仕込み比が 5% の溶液は凝集体の量が多すぎるため、ろ過できなかった。ろ過の結果としては、少量の凝集体添加にて、Flux の低下が確認された(図 4-4)。このように凝集体を含むことで Flux が低下する挙動は、これまでのウイルス除去フィルターと同様に影響があることが確認された。

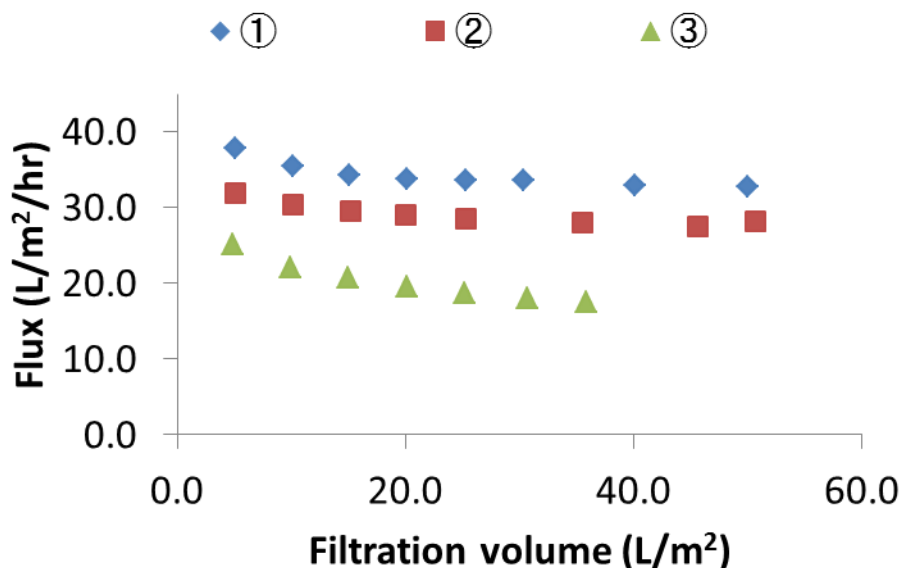


図 4-4 凝集体を含む IgG 溶液のろ過結果

4.3.1.3. SPR 測定による吸着量の評価

続いて、SPR 測定によって、セルロース表面へのタンパク吸着量が増加するかどうかを評価した。図 4-5 に測定結果を示した。今回調整しろ過実験を行ったサンプル①～③では、吸着量に大きな差異は見られなかった。過去の知見から、凝集体は材料に吸着しやすいことが知られているので [92]、凝集体の存在によって吸着量が増加する可能性があったが、本条件ではそれほどの吸着量増加は観察されなかった。原因としては、凝集体の量が仕込み比で 1%以下と非常に少ないことが原因として挙げられる。実際に、凝集体の量が 5%程度含むサンプルについて吸着量の評価を行ったところ、吸着量の増加が観察されており(図 4-5 のサンプル④)、凝集体が単量体よりも吸着しやすい傾向は過去の報告通りであった。以上より、凝集体による Planova 20N フィルターの Flux 低下は、吸着量の増加よりも凝集体がフィルターの孔を塞ぐという要因によって引き起こされていることが示唆された。

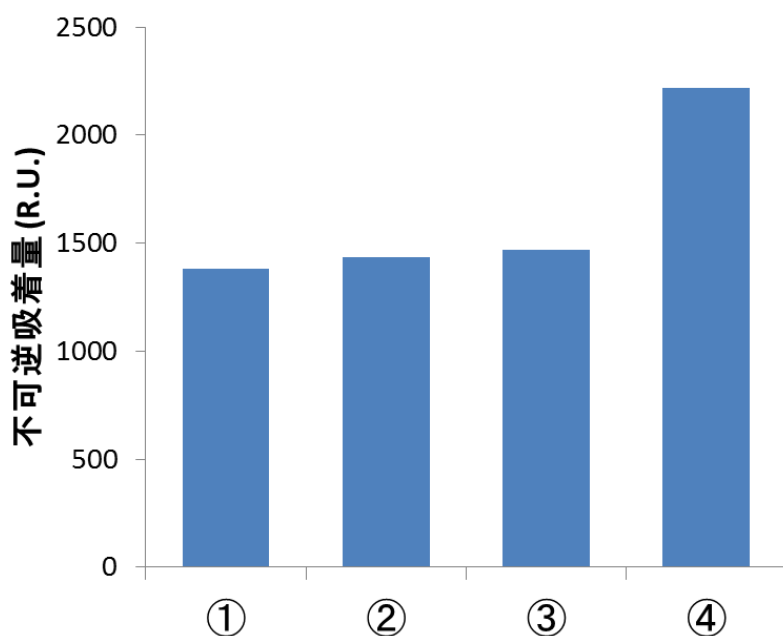


図 4-5 SPR 測定によるセルロース表面への吸着量の比較

4.3.2. 凝集体溶液のろ過と吸着評価②

前項にて、凝集体を含む溶液は吸着よりも孔を塞ぐ閉塞によって Flux の低下を引き起こしているとは推定できた。より上記仮説を確かめるためにも、単量体の吸着量が異なる溶液条件下でも同じように凝集体による Flux 低下が起こるのかを検証した。凝集体によるフィルターの Flux 低下の要因として、孔を塞ぐという影響が大きいのであれば、タンパク質が膜に吸着しにくい溶液条件においても、Flux 低下を引き起こす可能性が高いと予想できるからである。

4.3.2.1. 凝集体溶液のサンプル調整

前項と同様に凝集体を含む溶液を作製した。なお、前項のろ過結果および顧客での実際に起こりうる上限を元に凝集体の仕込み比は 1% で固定した。さらに、前章のセルロース表面とタンパク質との塩濃度に依存した吸着量の変化から、溶液の塩濃度を高いサンプルと低いサンプルを作製し、タンパク質の膜への吸着量を変化させることにした。以上から、表 4-3 に示した条件にて、ろ過及び SPR 測定評価サンプルを作製した。なお、各成分の面積比は SEC によって確認した。

表 4-3 調整したサンプルの液条件および凝集体の面積比

サンプル	pH	NaCl 濃度 (mM)	凝集体面積比 (%)	二量体面積比 (%)	単量体面積比 (%)
⑤	4	10	0 %	2.4	97.6
⑥			0.9 %	2.5	96.6
⑦		100	0 %	2.6	96.3
⑧			1.0 %	2.3	96.8

4.3.2.2. 凝集体溶液のろ過

続いて、作製したサンプルについて、Planova 20N によるろ過実験を行った。ろ過の結果としては、まず凝集体を含まないサンプルについては、これまで通り塩濃度に依存した Flux の変化が見られており、塩濃度が低い条件ほど Flux が低くなっていた。これらの条件では、SEC の測定から凝集体は観察されなかったため、前項同様フィルター膜表面に吸着することで、Flux が低下していると推定できる。またこの塩濃度による傾向は、凝集体を含む溶液でも同様に観察された。一方、溶液の塩濃度が同じで凝集体を有するおよび有さない溶液の結果を比較してみると、前項の結果と同様に凝集体の添加によって、Flux が大きく低下することが確認された(図 4-6)。

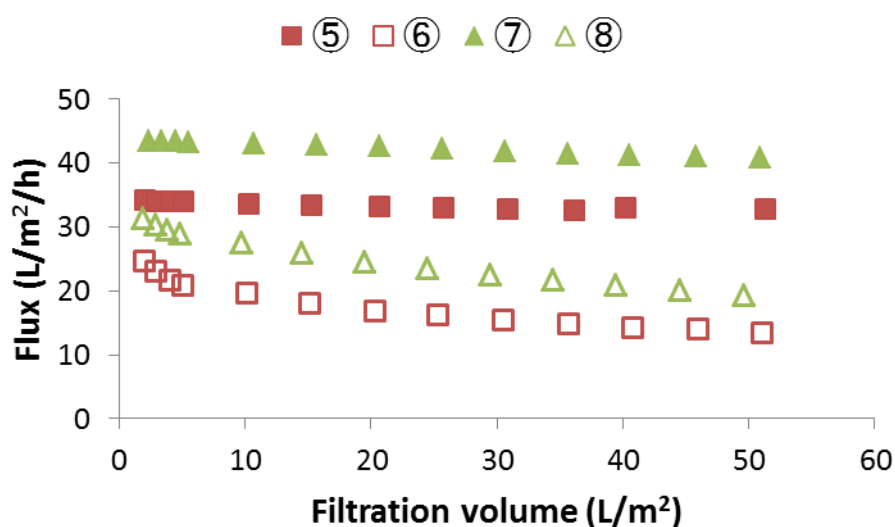


図 4-6 各溶液条件における IgG 溶液のろ過結果

また図 4-7 には、各溶液のろ過初期の Flux の値を基準として、各溶液での Flux の低下割合を示している。こちらに示す通り、凝集体を含まない溶液(⑤、⑦)は、ろ過量が増えてもほとんど初期の Flux と同等であり、Flux は低下しないが、凝集体を含む溶液(⑥、⑧)はろ過量が増加するに従って Flux が大きく低下することが示された。さらに⑥と⑧の溶液の Flux 低下挙動は、塩濃度条件が異なるものの、両者の Flux 低下傾向が同じであることから、凝集体はやはり吸着よりも孔を塞ぐことによって、Flux を低下させていると推察できる。

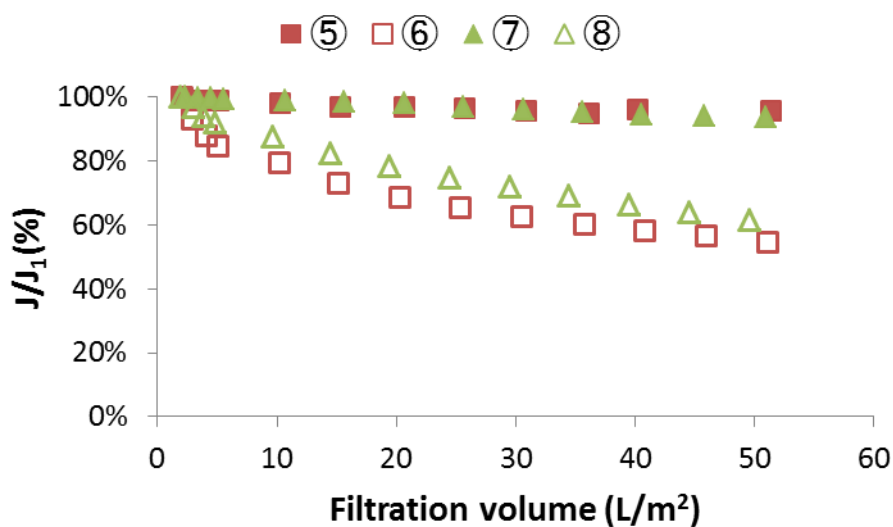


図 4-7 各溶液条件における凝集体を含む IgG 溶液のろ過結果
(各溶液での初期 Flux を基準とした Flux の変化率の比較)

4.3.2.3. SPR 測定による吸着量の評価

続いて SPR 測定によって、凝集体有無の条件において、セルロース表面へのタンパク吸着量に差があるか評価した。塩濃度違いの条件については、これまでと同様に吸着量に差があることが示された(図 4-8)。つまり、塩濃度によって、Flux が異なるのはセルロース膜にタンパク質が吸着することで、Flux が低下すると推察できる。一方で凝集体を含むサンプルと含まないサンプルについては、それぞれの吸着量に大きな差異は観察されなかった。これは前項の結果と一致する。つまり、特に塩濃度が異なるが凝集体の量が等しいサンプル⑥と⑧に着目してみると、吸着量が少ないサンプル⑧においても、吸着量の多い⑥と同等の Flux の低下を示していることから、やはり凝集体による Flux の低下は吸着よりも孔の閉塞によって引き起こされているのだと改めて確認できた。

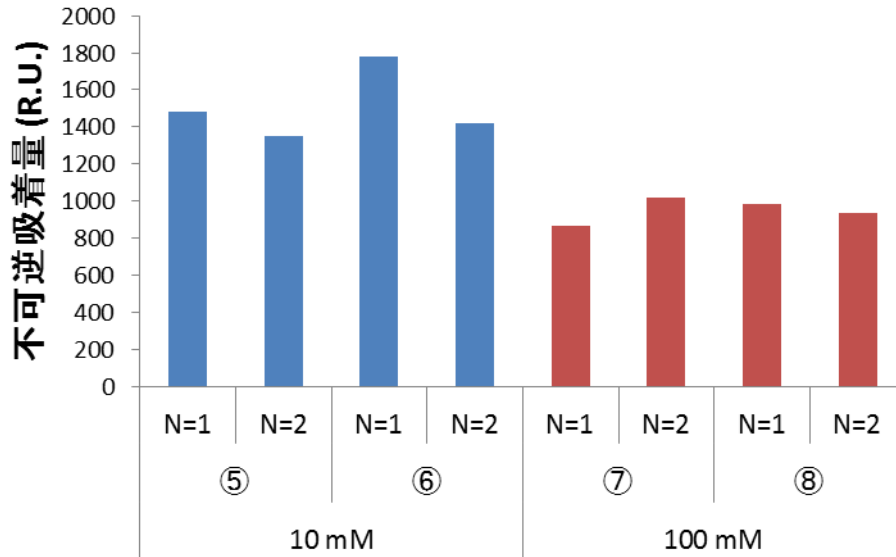


図 4-8 SPR 測定によるセルロース表面へのタンパク吸着量の比較

4.3.3. 考察

凝集体によるろ過時の Flux について、要因を分析する目的で、図 4-9 に今回得られた SPR 測定からの不可逆吸着量と 10 L/m^2 ろ過時の Flux との関係を示している。なお、比較対象として、塩濃度が 0 mM で凝集体無のサンプルの結果についても追加実験を行い、図 4-9 に示している。凝集体無のサンプルでは、塩濃度低下に伴う吸着量の増加に比例して、Flux が大きく低下している。しかし、凝集体が約 1% 存在することで、同程度の吸着量でも、Flux が大きく低下している様子がうかがえる。つまり、凝集体が存在することで起こる Flux の低下は、膜表面への不可逆吸着量の増加では説明できず、よって凝集体が孔を塞ぐことで閉塞し、Flux が低下していると推定できる。

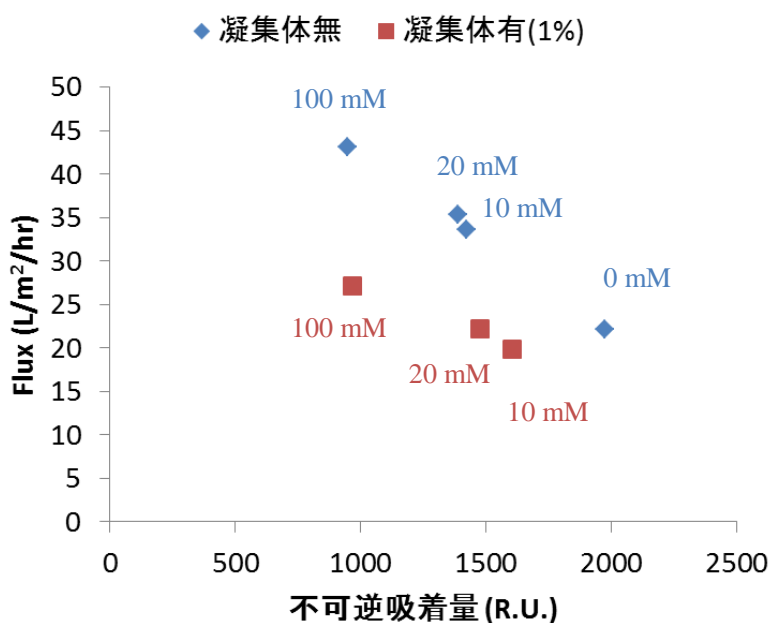


図 4-9 SPR 測定からの不可逆吸着量と 10 L/m^2 ろ過時の Flux との関係

4.4. 結論

以上、本章においては、前章と同様にウイルス除去フィルターPlanova 20N に対するファウリング解析手法である SPR 法と SEC を用いて、凝集体によるウイルス除去フィルターの Flux 低下の原因解明を行った。凝集体はその大きさがフィルターの孔径と同程度であることから、孔を閉塞させることで Flux を低下させると考えられていた。一方で、凝集体は吸着量にも影響を及ぼすことが過去の知見から指摘されており、いずれの効果が Flux に影響するかを見極めることにした。まず、2.3.2 項での方法を用いたモデルのタンパク質凝集体を作製した。この凝集体の存在によるフィルターのろ過性への影響と SPR を用いたフィルター材料であるセルロース表面への吸着の影響を評価した。その結果、凝集体は少量存在することでフィルターの Flux を大きく低下させることが示されたが、一方、SPR 測定からのセルロース表面への吸着量では、凝集体の有無で大きな差異は観察されなかった。セルロース表面への吸着量と Flux との相関関係から、凝集体の存在による大きな Flux 低下は、フィルター表面に吸着することによって引き起こされているとは考えにくく、これは凝集体が孔を塞ぐことで Flux が低下しているのだと推察できる。

5. ファウリングメカニズム解明への展開③ (pHによる Flux 低下)

5.1. 序論

これまで述べた条件以外にもウイルス除去フィルターにろ過性が影響する溶液条件として、pH の依存性がある。具体的には、Hongo-Hirasaki らによると [56]同一の塩濃度条件において、pH が異なるとろ過時の Flux に大きな違いがあることが報告されている。この pH に依存した Flux 低下の要因として、Hongo-Hirasaki らは、低 pH 条件でのタンパク質自身の変性や pI 付近でのタンパク質同士の相互作用による凝集体の生成が影響していると考察している。このように pH に依存した Flux の変化は、他分野でのろ過結果でも報告されている [22] [25] [93] [94] [95]。例えば、Nakamura らは、BSA 溶液を孔径 0.1 μm のガラス多孔質フィルターにてろ過した際の pH に依存した Flux の違いについて考察している。上記研究では、フィルターの表面へのタンパク吸着と Flux との関係について考察していた。具体的には、溶液の条件が BSA の pI 付近(pI = 4.8)において、ろ過量が増加してもフィルターへの吸着量が飽和しないことおよび Flux の低下が観察されることから、フィルター表面上にタンパク質が多層的に吸着することで、Flux が低下すると指摘している [25]。他の報告例でもタンパク質の pI に近いほど吸着量が増加し、ろ過性に影響することが指摘されており、pH に依存したフィルターへの吸着量の変化が及ぼす影響も無視できない。以上、ウイルス除去フィルターでの pH に依存した Flux の変化は、凝集体による影響が大きいと考えられてきた。しかし、他のフィルターでの例でも指摘されているように、pH に依存したフィルターへの吸着にも影響があることから、本研究ではこれまで同様に pH に依存した Flux 低下の要因が凝集体またはフィルター表面への吸着によるものなのかを見極めることとした。

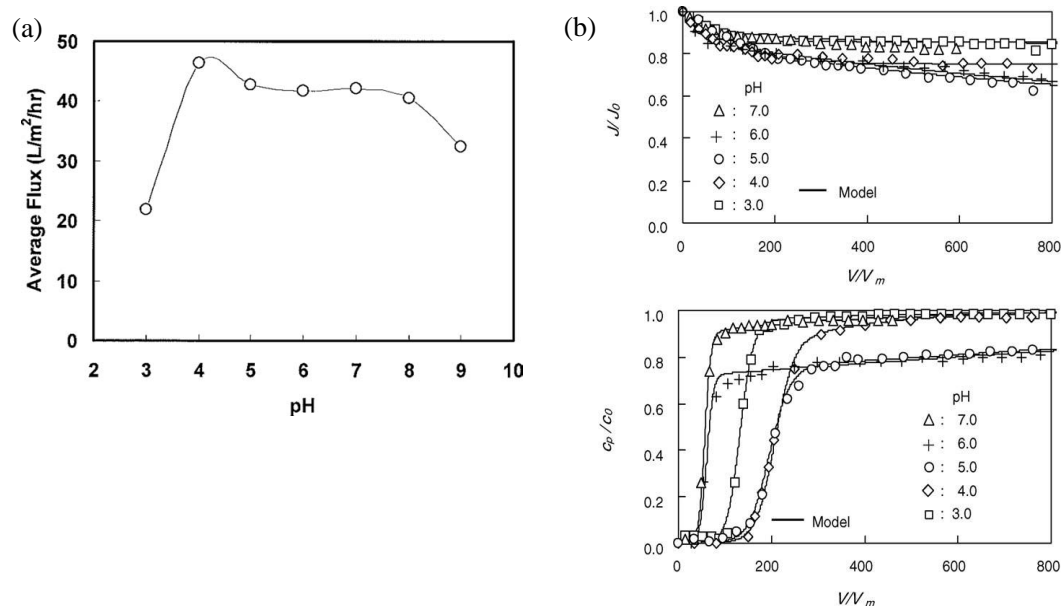


図 5-1 (a)ウイルス除去フィルターの pH に依存した Flux 変化 (出典： [56]より引用)
(b)ガラス多孔質フィルターの pH に依存した吸着量と Flux 変化 (出典： [25]より引用)

5.2. 実験条件

5.2.1. 試薬

実験には市販の免疫グロブリン G(IgG)溶液(Venoglobulin® IH, 50 mg/mL, Japan Blood Products Organization)、トリアセチルセルロース(Scientific Polymer Product, Inc.)、超純水(Cascada, Pall Co.)、塩化ナトリウム(Wako)を用いた。また実験に使用する IgG 溶液の pH の調整は、市販の 100 mM の塩酸(Wako)および 100 mM の水酸化ナトリウム水溶液(Wako)を用いて行った。また塩濃度の調整は、1 M の塩化ナトリウム水溶液を作製し、IgG 溶液に加えることで調整した。本実験での IgG の溶液は実際の工程でよく用いられる濃度(10 mg/mL)とし、塩濃度は 10 mM と設定した。また pH は 4 と 7 をそれぞれ調整し、pH によるろ過性の差を測定した。

5.2.2. ろ過

調整した溶液に対して、ウイルス除去フィルター(Planova 20N, Asahi Kasei Medical Co.Ltd.)のろ過を行った。ろ過はデッドエンドの方式で定圧ろ過(78.4 kPa)にて行った。フィルターのろ過時のファウリングの評価としては、ろ過流速(L/m²/h)を指標として用いた。ろ過流速の値としては、任意のろ液を回収し、回収するのに必要とした時間と用いたフィルターの膜面積にて除した値を用いた。また pH 7 の溶液条件については、プレフィルター(孔径 0.1 μm)を用いたろ過を行った。プレフィルターとウイルス除去フィルターは直列に接続し、定圧(78.4 kPa)にてろ過を行った。

5.2.3. SPR 測定

SPR センサー(SIA kit Au, GE Healthcare)上には同様の方法にてセルロース表面を作製した。また吸着量の評価方法としては、測定の流速は 1 μl/min に固定し、タンパク質溶液のサンプルの導入量を 5, 15, 30, 60 μL と設定し、経時的な吸着量の差異を測定した。

5.2.4. SEC 測定

タンパク質溶液の単量体、二量体、三量体以上の存在量を測定するために、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)測定を行った。測定は、市販の装置(Prominence HPLC, Shimadzu)とカラム(TSKgel G3000SWXL, Tosho Bioscience)を用いて行った。移動相は 200 mM のアルギニン、100 mM の塩化ナトリウムの水溶液で pH を 6.9 に設定した。測定時の流速は 0.4 mL/min として、20 分間測定を行った。

5.3. 結果と考察

今回、pH の依存性を評価するために、過去の実験にて過量増加に伴う Flux 変化に差がある条件として、pH 4 と pH 7 の条件を選択し、これらの Flux 変化に伴う変化について要因の分析を SPR と SEC を用いて評価した。

5.3.1. SEC 測定

Hongo-Hirasaki らの報告の通り [56]、今回用いている IgG 分子の pI は 7~10 であり、今回調整した条件では pH 4 よりも pH 7 の条件の方が pI に近く、タンパク質が凝集しやすいと考えられる。よって、まずは調整した溶液の SEC 測定を行い、凝集体の量に差異があるのかを評価した。その結果、確かに pH 7 の条件において三量体以上の凝集体のピークがあることを確認した(図 5-2)。また表 5-1 に各成分のピーク面積比を示しているが、二量体の量も pH 7 の条件の方が pH 4 の条件よりも含有量が多かったことより、pH 7 では IgG 分子の pI に近いために、凝集しやすい条件であることが示唆された。ただし、凝集体の量としては、0.03 %と前章での凝集体の含有量に比べて非常に少ないため、凝集体だけが Flux 低下の要因だとは断言できない。

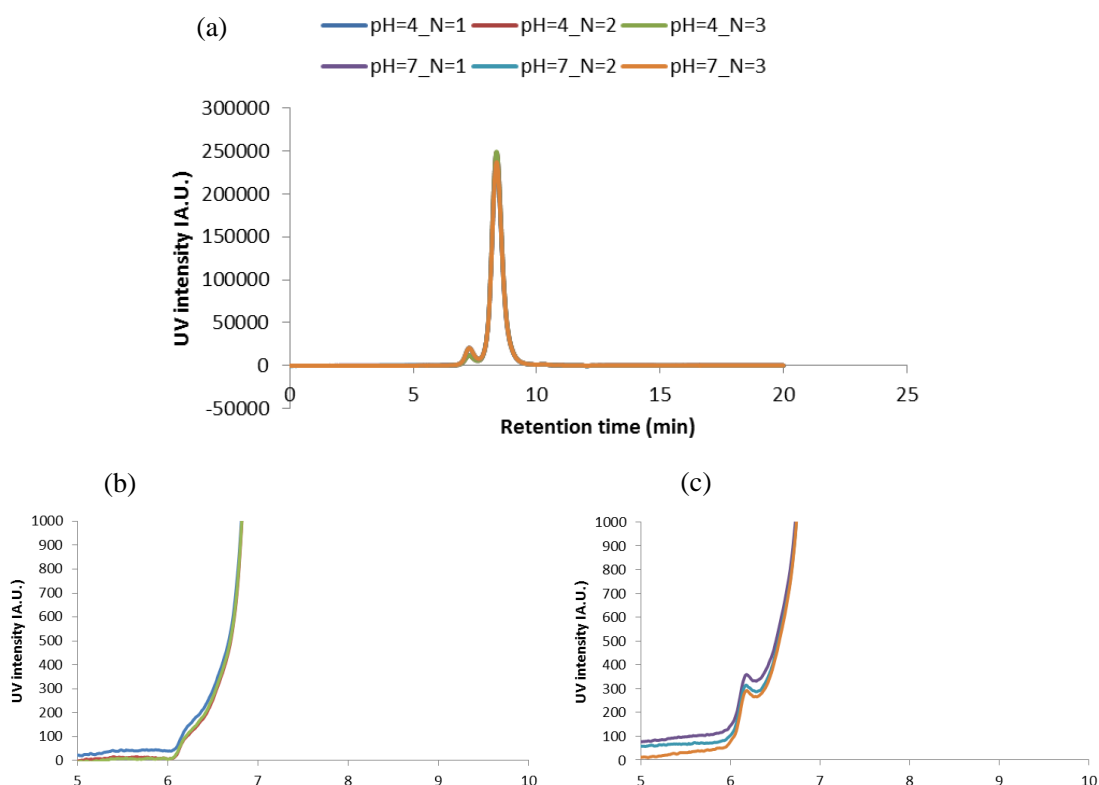


図 5-2 pH 4 と pH 7 の条件での SEC スペクトル(a) 全体図
および凝集体のピーク位置での拡大図 (b)pH 4 (c)pH 7

表 5-1 SEC スペクトルから算出した各成分のピーク面積比

サンプル		凝集体 (%)	二量体 (%)	単量体 (%)
pH 4	N=1	0.00	4.18	95.82
	N=2	0.00	4.09	95.91
	N=3	0.00	4.07	95.93
pH 7	N=1	0.03	7.10	92.90
	N=2	0.03	7.05	92.95
	N=3	0.03	7.07	92.93

5.3.2. ろ過実験

続いて、調整した溶液のろ過を行った。さらに、pH 7の溶液については、通常にろ過する方法に加えて、プレフィルターを用いたろ過を行った。これは、これまでにプレフィルターを用いることで凝集体が除去できることが報告されているため、もし凝集体が Flux 低下の要因であるならば、プレフィルターの効果によってろ過の Flux が向上すると考えたからである。

図 5-3 に示すように、pH 4 と pH 7 の条件を比較すると、pH 7 の条件の方が、ろ過量に応じて Flux が低下していく様子が観察され、これまでの結果と同様が得られた。この結果は、先ほどの SEC の測定において、pH 7 の条件において凝集体が検出されたことから、ろ過量が増えるごとに凝集体がフィルターの孔を塞ぐことで Flux が低下していると推測できる。しかし、プレフィルターを用いて凝集体を除去した溶液についても、ろ過量に伴った Flux の低下が観測されることが今回新たに示された(図 5-3)。つまり、今回の結果では、凝集体による影響以外の要因も、ろ過量に応じた Flux の低下に影響していると推察できる。

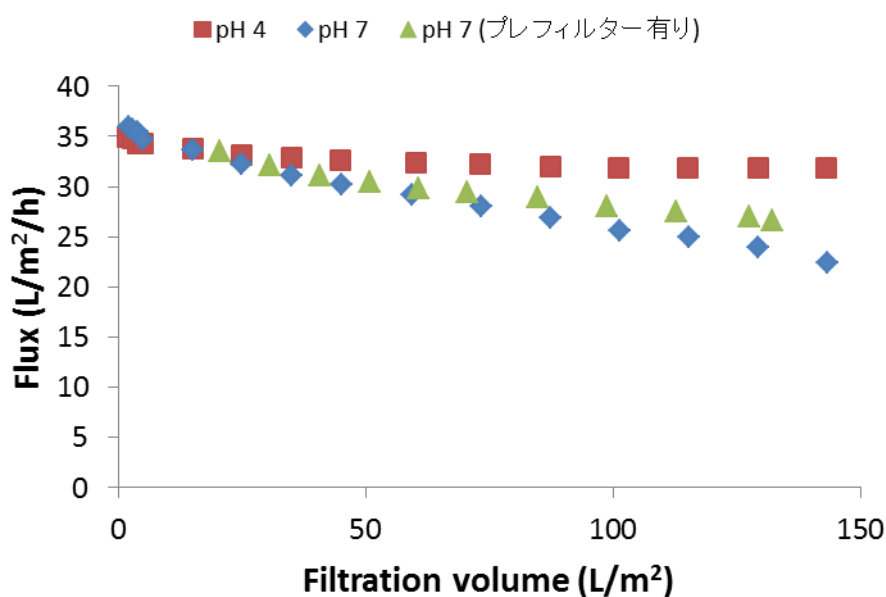


図 5-3 ろ過結果(pH 4 および pH 7 の通常ろ過とプレフィルターを接続したろ過)

5.3.3. SPR 測定

前項の結果から、pH 7 におけるろ過量に応じた Flux の低下挙動は、凝集体の影響だけでは説明できないことが示唆された。よって、SPR 測定によって吸着量の増加について比較した。特に、ろ過量に応じて Flux が低下するという挙動から、タンパク質溶液とセルロース表面の接触時間に対するタンパク吸着量の増加を評価することにした。以下に結果を示している。こちらに示すように、どちらの条件についてもセルロース表面への IgG の吸着量は、タンパク質の接触時間が増えることが示唆された。さらに pH 4 と pH 7 の差異を評価するために、接触時間に対する溶媒にて洗浄した後の吸着量を示したのが以下である。こちらに示すように、pH 7 の条件では、接触時間が増えるほど吸着量が増加するという傾向があることが分かった。つまり、pH 7 の条件では、セルロース表面への経時的な吸着量の増加があり、それによってろ過量に応じた Flux の低下を引き起こしていると推察できる。

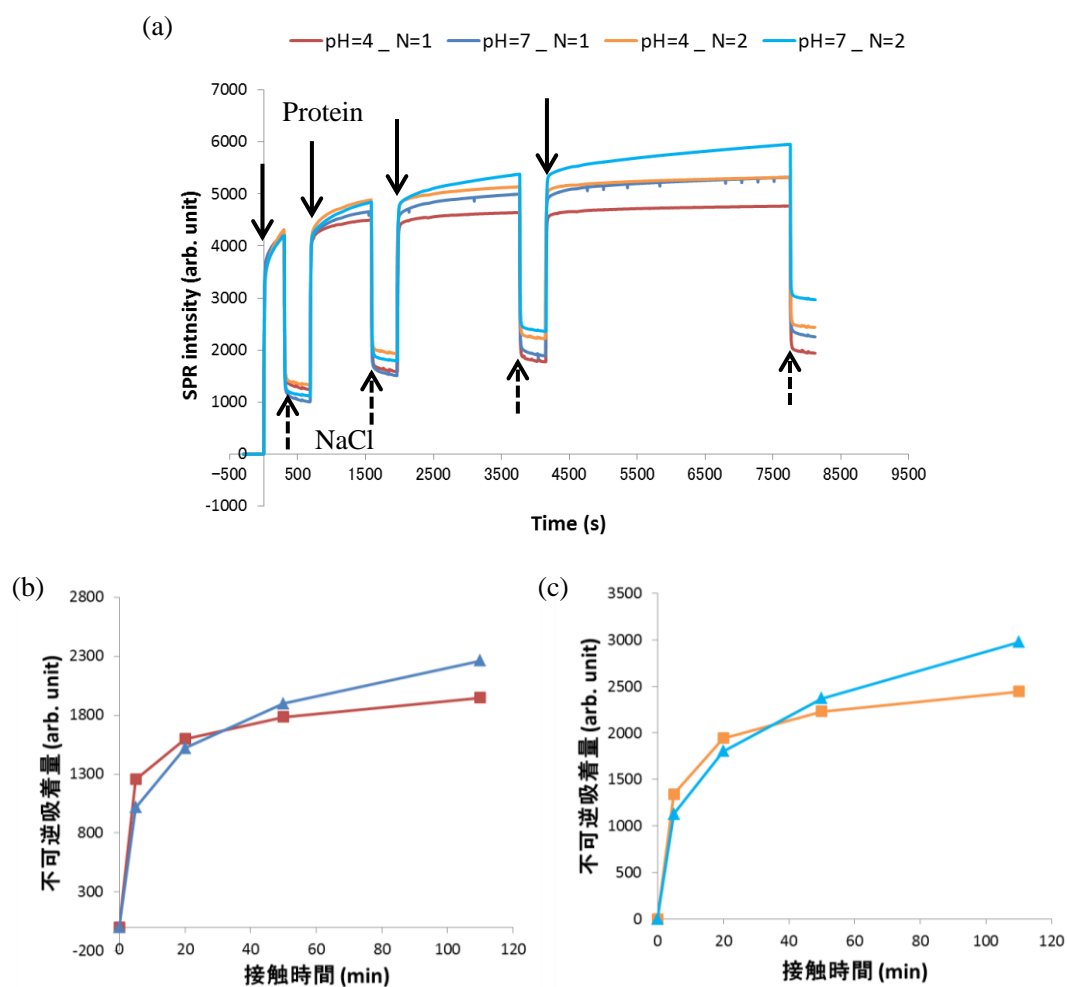


図 5-4 (a)各溶液条件における SPR スペクトル
およびタンパク溶液の接触時間に対するタンパク質の不可逆吸着量 (a)N=1 (b)N=2

5.3.4. 考察

pH 7 における経時的な Flux 低下は、第 3 章でも述べたとおり、他の塩濃度条件においても観察されている。よって、同様にタンパク溶液の接触時間を変えた際の経時的な吸着量の増加に差があるのかを評価した。図 5-5 に結果を示しているが、経時的な Flux 低下が起こる pH 7 の他の塩濃度条件(0 および 100 mM NaCl)においても経時的な Flux の増加が観察されていることが分かった。

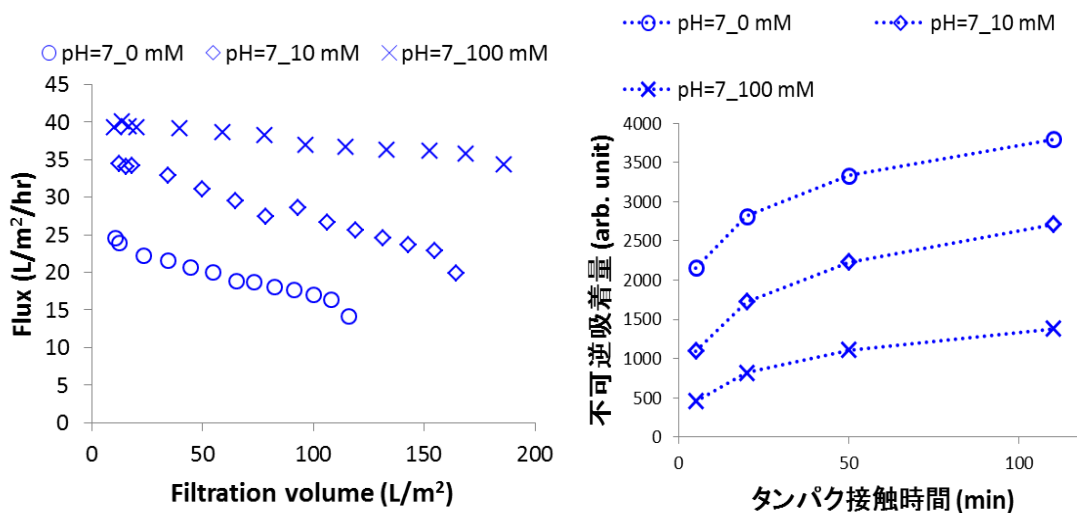


図 5-5 溶液条件が pH 7、0,10,100 mM NaCl における
(a)ろ過結果 (b)SPR 測定結果から得られたタンパク接触時間に対する不可逆吸着量

また、経時吸着と Flux 低下関係を示したのが、表 5-2 および図 5-6 である。具体的には、タンパクの接触時間が 50 分から 110 分間の増加の割合を経時的な吸着量の増加の指標として設定し、またろ過量に対する Flux 低下の傾きを Flux の低下の指標として設定した。これらの指標の数値が表 5-2 に、また図 5-6 には、これらの相関関係について示してある。図 5-6 から、経時的なタンパク吸着量の増加が大きいほど経時的な Flux 低下が大きいという相関関係が示され、ろ過量に応じたフィルターの Flux 低下は、凝集体の影響だけでなく、経時な吸着量の増加によっても起こり得ると考察できる。

表 5-2 ろ過時の Flux の傾きと経時吸着の増加割合の比較

pH	NaCl 濃度 (mM)	Flux の傾き [L/(m ² ・hr・s)]	経時吸着の増加割合
4	10	-0.016	3.5
	10	-0.085	10
7	0	-0.083	7.8
	10	-0.088	8.0
	100	-0.028	4.6

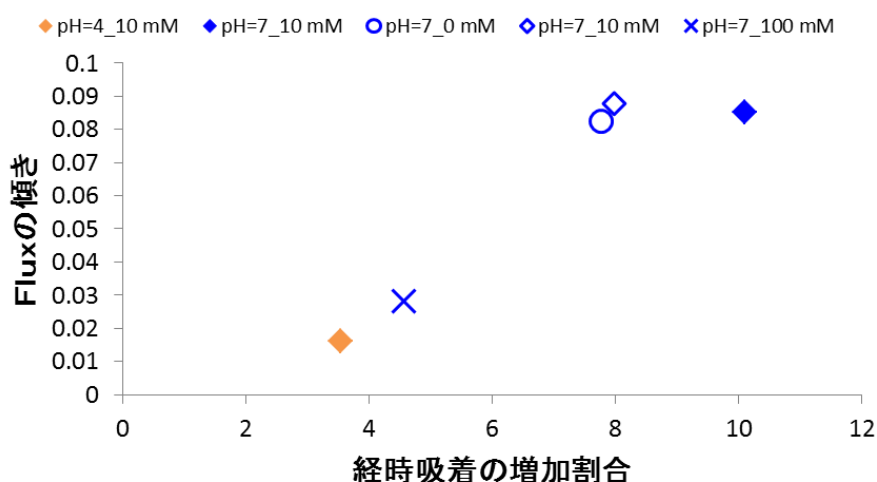


図 5-6 各溶液条件におけるセルロース表面への経時吸着の増加割合と Flux の傾きとの関係

最後に、今回の pH 4 よりも pH 7 の方が記事的な吸着量が多い要因としては、タンパク質の電荷の状態によるものだと考えている。今回用いているタンパク質である IgG は pH 4 と 7 は 10 mM NaCl の条件ではいずれも正の電荷を有することがゼータ電位測定から示されているが、pH 4 の方がより大きな電荷を有することが示唆されている [57]。つまり、pH 4 の条件では一度吸着した IgG 分子によって、静電的な反発が強く働くために経時的な吸着が起こりにくく、一方で pH 7 では、静電的な反発がより小さいために、経時的にフィルターの膜表面に吸着することができるのではないかと考察している。しかし、この仮説を証明するためには、IgG 分子とセルロース表面とのさらなる吸着挙動の評価が必要であると考えられ、今後の課題だと考えられる。

5.4. 結論

以上、本章においては、前章と同様にウイルス除去フィルターPlanova 20N に対するファウリング解析手法である SPR 法と SEC を用いて、溶液の pH に依存したウイルス除去フィルターの Flux 低下の原因解明を行った。ウイルス除去フィルターは、pH 4 よりも pH 7 の方がろ過量に応じた Flux の低下挙動が大きいことが知られている。まず両方の条件における凝集体の含有量の比較するために、SEC 測定を行った。その結果、pH 7 には凝集体が存在しており、凝集体の影響によって Flux が低下していることが示唆された。さらに凝集体の影響を明確にするために、プレフィルターを用いて凝集体を除去することで Flux にどのような影響があるかを評価した。その結果、pH 7 の溶液に対して、プレフィルターを用いて凝集体を除去したが、ろ過量に応じた Flux 低下が観測された。よって、SPR を用いて pH 4 と pH 7 の条件について、セルロース表面に対する吸着量の差異について比較した。その結果、pH 7 の条件では pH 4 の条件よりも、タンパク溶液との接触時間が増えるほど吸着量が増加するという傾向が見られた。以上の結果から、pH 7 における経時的な Flux の低下には経時的にタンパク吸着量が増加することも影響していることが示唆された。さらに経時的な Flux 低下が確認される他の溶液条件についても、上記同様に経時的なタンパク吸着量の増加が観察された。以上の結果より、ウイルス除去フィルターのろ過量に応じた Flux の低下には凝集体の影響に加えて、フィルター表面への経時的な吸着量増加も影響していることが推定できる。これまで、経時的なタンパク吸着量がウイルス除去フィルターの Flux に影響するという報告例はなく、非常に有益な研究結果であると考えている。

6. 結言

本研究では、ウイルス除去フィルターのファウリング現象に対して、表面プラズモン共鳴 (SPR)法やサイズ排除クロマトグラフィー (SEC)などの解析手法を用いて、フィルターの膜内部でのタンパク質のファウリング形態を明らかにすることを目的とした。以下、各章について総括する。

第2章では、再生セルロースからなるウイルス除去フィルターである Planova 20N フィルターに対して、タンパク質によるファウリングを解析するための手法の開発を行った。まず、SPR 法を用いてフィルターの膜表面とタンパク質との相互作用を解析するために、SPR センサー表面に膜材料と同じセルロースのモデル表面を作製した。続いて、タンパク質の凝集体によるファウリングを解析するために、再現性良くモデル凝集体を作製する手法を確立し、かつこの凝集体は SEC にて定量することを確認できた。さらに、作製した凝集体はフィルターのろ過性を低下させることも確認され、タンパク質の凝集体によるファウリング評価方法として確立できた。

第3章では、ウイルス除去フィルター Planova 20N に対するファウリング解析手法である SPR 法と SEC、および QCM-D 法を用いて、実際の工程で使用される条件でのフィルターのろ過性能の低下についての原因解明を行った。具体的には、Planova 20N は溶液の塩濃度に依存して Flux が大きく変化する傾向が知られている。この Flux 低下には、タンパク溶液の SEC の測定結果より凝集体は関わっておらず、主にフィルターの膜表面や内部へのタンパク質の吸着が原因であると SPR から推察された。また DLVO 理論によるセルロースとタンパク質との相互作用力の計算と QCM-D による吸着後の塩濃度に応じたタンパク質の構造変化の結果を考慮すると、タンパク質は膜に吸着し、その後構造変化によって不可逆的に吸着することで、フィルターのろ過性を低下させているという結論に至った。

第4章では、ウイルス除去フィルター Planova 20N に対するファウリング解析手法である SPR 法と SEC を用いて、凝集体によるウイルス除去フィルターの Flux 低下の原因解明を行った。凝集体はその大きさがフィルターの孔径と同程度であることから、孔を閉塞させることで Flux を低下させると考えられていた。しかし、凝集体は吸着量にも影響を及ぼすことが過去の知見から指摘されており、いずれの効果が Flux に影響するかを見極めることにした。具体的には、凝集体の存在によるフィルターのろ過性への影響と SPR を用いたフィルター材料であるセルロース表面への吸着の影響を評価した。その結果、凝集体は少量存在することでフィルターの Flux を大きく低下させることが示されたが、一方、SPR 測定からのセルロース表面への吸着量では、凝集体の有無で大きな差異は観察されなかった。セルロース表面への吸着量と Flux との相関関係から、凝集体の存在による大きな Flux 低下は、フィルター表面に吸着することによって引き起こされているとは考えにくく、これは凝集体が孔を塞ぐことで Flux が低下しているのだと推定できた。

第5章では、ウイルス除去フィルター Planova 20N に対するファウリング解析手法である SPR 法と SEC を用いて、pH に依存したウイルス除去フィルターの Flux 低下の原因解明を行っ

た。ウイルス除去フィルターは、pH 4 よりも pH 7 の方がろ過量に応じた Flux の低下挙動が大きいことが知られている。SEC 測定を行ったところ、pH 7 には凝集体が存在しており、凝集体の影響によって Flux が低下していることが示唆された。さらに凝集体の影響を明確にするために、プレフィルターを用いて凝集体を除去することで Flux にどのような影響があるかを評価した。その結果、pH 7 の溶液に対して、プレフィルターを用いて凝集体を除去したが、ろ過量に応じた Flux 低下が観測された。よって、SPR を用いて pH 4 と pH 7 の条件について、セルロース表面に対する吸着量の差異について比較した。その結果、pH 7 の条件では pH 4 の条件よりも、タンパク溶液との接触時間が増えるほど吸着量が増加するという傾向が見られた。以上の結果から、pH 7 における経時的な Flux の低下には経時的にタンパク吸着量が増加することも影響していることが示唆された。

本論文では、ウイルス除去フィルターのろ過性能を低下させるファウリングという現象に対して、SPR と SEC を用いた原因解明を目指した。SPR と SEC の測定手法を並行して行うことで、ウイルス除去フィルターでのファウリングの原因が明確になることが示され、これらの手法の有用性を確認できた。またファウリングの原因として、これまで直接的に観察されていなかった、フィルター表面へのタンパク吸着の影響を実証することができ、この知見はフィルターの性能を最大限発揮するための工程条件の最適化や、新しいウイルス除去フィルターの開発への知見として活用できると期待している。

引用文献

- [1] B. Horowitz, R. Bonomo, A. M. Prince, S. N. Chin, B. Brotman, R. W. Shulman, “Solvent/detergent-treated plasma: a virus-inactivated substitute for fresh frozen plasma,” *Blood*, 卷 79, pp. 828-831, 1992.
- [2] P. Roberts, A. Hope, “Virus inactivation by high intensity broad spectrum pulsed light,” *Journal of Virological Methods*, 卷 110, pp. 61-65, 2003.
- [3] D. Low, R. O’Leary, N. S. Pujar, “Future of antibody purification,” *Journal of Chromatography B*, 卷 848, pp. 48-63, 2007.
- [4] T. Burnouf, M. Radosevich, “Nanofiltration of plasma-derived biopharmaceutical products,” *Haemophilia*, 卷 9, pp. 24-37, 2003.
- [5] 和. 奥山, “中空糸型ウイルス除去用プロセスフィルター「Planova」,” *Membrane*, 卷 27, pp. 52-54, 2002.
- [6] T. Turumi, N. Osawa, T. Hirasaki, K. Yamaguchi, S. Manabe, T. Yamashiki, “Mechanism of Removin Monodisperse Gold Particles from a Suspension Using Cuprammonium Regenerated Cellulose Hollow Fiber (BMM Hollow Fiber),” *Polymer Journal*, 卷 22, pp. 304-311, 1990.
- [7] A. Yamamoto, T. Hongo-Hirasaki, H. Hayashida, F. Nagoya, “Effect of hydrodynamic forces on virus removal capability of Planova™ filters,” *AIChE Journal*, 卷 60, 第 6, pp. 2286-2297., 2014.
- [8] S. K. Dishari, A. Venkiteshwaran, A. L. Zydney, “Probing effects of pressure release on virus capture during virus filtration using confocal microscopy,” *Biotechnology and Bioengineering*, 卷 112, pp. 2115-2122, 2015.
- [9] D. Strauss, J. Goldstein, T. Hongo-Hirasaki, Y. Yokoyama, N. Hirotsu, T. Miyabayashi, D. Vacante, “Characterizing the impact of pressure on virus filtration processes and establishing design spaces to ensure effective parvovirus removal,” *Biotechnol. Prog.*, 2017.
- [10] S. K. Dishari, M. R. Micklin, K.-J. Sung, A. L. Zydney, “Effect of solution conditions on virus retention by the Viresolve NFP filter,” *Biotech. Prog.*, 卷 31, pp. 1280-1286, 2015.
- [11] S. A. Rathore, V. Kumar, A. Arora, S. Lute, K. Brorson, “Mechanistic modeling of viral filtration,” *Journal of Membrane Science*, 卷 458, pp. 96-103, 2014.
- [12] G. R. Bolton, A. W. Boesch, M. J. Lazzara, “The effects of flow rate on membrane capacity: Development and application of adsorptive membrane fouling models,” *Journal of Membrane Science*, 卷 279, pp. 625-634, 2006.
- [13] Z. H. Syedain, D. M. Bohonak, A. L. Zydney, “Protein Fouling of Virus Filtration Membranes: Effects of Membrane Orientation and Operating Conditions,” *Biotechnol. Prog.*,

- 卷 22, pp. 1163-1169, 2006.
- [14] K. Okuyama, “中空糸ウイルス除去用プロセスフィルター 「Planova®」,” 膜 (MEMBRANE), 卷 27, pp. 52-54, 2002.
- [15] P. R. Babu , V. G. Gaikar, “Membrane characteristics as determinant in fouling of UF membranes,” *Separation and Purification Technology*, 卷 24, pp. 23-34, 2001.
- [16] W. R. Bowen, J. I. Calvo , A. Hernandez, “Steps of membrane blocking in flux decline during protein microfiltration,” *Journal of Membrane Science*, 卷 101, pp. 153-165, 1995.
- [17] A. D. Marhall, P. A. Munro , G. Tragardh, “The Effect of Protein Fouling in Microfiltration and Ultrafiltration on Permeate Flux, Protein Retention and Selectivity:A literature review,” *Desalination*, 卷 91, pp. 65-108, 1993.
- [18] J. L. Nilsson, “Protein Fouling of UF Membranes - Causes and Consequences,” *Journal of Membrane Science*, 卷 52, pp. 121-142, 1990.
- [19] A. G. Fane , C. J. Fell, “A Review of Fouling and Fouling Control in Ultrafiltration,” *Dealination*, 卷 62, pp. 117-136, 1987.
- [20] G. Belfort, R. H. Davis , A. L. Zydney, “The behavior of suspensions and macromolecular solutions in crossflow microfiltration,” *Journal of Membrane Science*, 卷 96, pp. 1-58, 1994.
- [21] K. L. Jones , C. R. O'Melia, “Protein and humic acid adsorption onto hydrophilic membrane surfaces: effects of pH and ionic strength,” *Journal of Membrane Science*, 卷 165, pp. 31-46, 2000.
- [22] K. Nakamura , K. Matsumoto, “Protein adsorption properties on a microfiltration membrane: A comparison between static and dynamic adsorption methods,” *Journal of Membrane Science*, 卷 285, pp. 126-136, 2006.
- [23] R. P. Babu , V. G. Gaikar, “Membrane characteristics as determinant in fouling of UF membranes,” *Separation and Purification Technology*, 卷 24, pp. 23-34, 2001.
- [24] J. Mueller , R. H. Davis, “Protein fouling of surface-modified polymeric microfiltration membranes,” *Journal of Membrane Science*, 卷 116, pp. 47-60, 1996.
- [25] K. Nakamura , K. Matsumoto, “Properties of protein adsorption onto pore surface during microfiltration: Effects of solution environment and membrane hydrophobicity.,” *Journal of Membrane Science*, 卷 280, pp. 363-374, 2006.
- [26] Y. P. Lim , A. W. Mohammad, “Effect of solution chemistry on flux decline during high concentration protein ultrafiltration through a hydrophilic membrane,” *Chemical Engineering journal*, 卷 159, pp. 91-97, 2010.
- [27] J. H. Hanemaaijer, T. Robbertsen, T. V. d. Boomgaard , J. W. Gunnink, “Fouling of Ultrafiltration Membranes. The Role of Protein Adsorption and Salt Precipitation,” *Journal of*

- Membrane Science*, 卷 40, pp. 199-217, 1989.
- [28] S. T. Kelly, W. S. Opong , A. L. Zydney, “The Influence of protein aggregates on the fouling of microfiltration membranes during stirred cell filtration,” *Journal of Membrane Science*, 卷 80, pp. 175-187, 1993.
- [29] D. M. Kanani, X. Sun , R. Ghosh, “Reversible and irreversible membrane fouling during in-line microfiltration of concentrated protein solutions,” *Journal of Membrane Science*, 卷 315, pp. 1-10, 2008.
- [30] H. E. Cutler, S. M. Husson , S. R. Wickramasinghe, “Prefiltration to suppress protein fouling of microfiltration membranes,” *Separation and Purification Technology*, 卷 89, pp. 329-336, 2012.
- [31] S. T. Kelly , A. L. Zydney, “Mechanisms for BSA fouling during microfiltration,” *Journal of Membrane Science*, 卷 107, pp. 115-127, 1995.
- [32] J. B. Lhoest, E. Detrait, P. Aguilar , P. Bertrand, “Fibronectin adsorption, conformation, and orientation on polystyrene substrates studies by radiolabeling, XPS, and ToF SIMS,” *J. Biomed. Mater. Res.*, 卷 41, pp. 95-103, 1998.
- [33] S. Sakata, Y. Inoue , K. Ishihara, “Molecular Interaction Forces Generated during Protein Adsorption to Well-Defined Polymer Brush Surfaces,” *Langmuir*, 卷 31, pp. 3108-3114, 2015.
- [34] B. Demeule, M. J. Lawrence, A. F. Drake, R. Gurny , T. Arvinte, “Characterization of protein aggregation: The case of a therapeutic immunoglobulin,” *Biochimica et Biophysica Acta* , 卷 1774, pp. 146-153, 2007.
- [35] T. K. Das, “Protein Particulate Deception Issues in Biotherapeutics Development-Current Status,” *PharmaSciTech*, 卷 13, pp. 732-746, 2012.
- [36] L. Wang , R. Ghosh, “Fractionation of monoclonal antibody aggregates using membrane chromatography,” *Journal of Membrane Science*, 卷 318, pp. 311-316, 2008.
- [37] J. H. Song, W. Kim, Y. H. Park, E. K. Yu , D. W. Lee, “Retention Characteristics of Various Proteins in Flow Field-Flow Fractionation : Effect of pH, Ionic Strength, and Denaturation,” *Bull. Korean Chem. Soc.* , 卷 20, pp. 1159-1164, 1999.
- [38] E. Stenberg, B. Persson, H. Roos , C. Urbaniczky, “Quantitative determination of surface concentration of Protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins,” *Journal of Colloid and interface Science*, 卷 143, pp. 513-526, 1991.
- [39] B. Walkowiank , W. Szymanski, “SPR Biosensor Technique Supports Development in Biomaterials Engineering,” *New Perspectives in Biosensors Technology and Applications*, pp. 63-82, 2011.
- [40] Y. Chang, S.-H. Shu, Y.-J. Shih, C.-W. Chu, R.-C. Ruaan , W.-Y. Chen, “Hemocompatible

- Mixed-Charged Copolymer Brushes of Pseudozwitterionic Surfaces Resistant to Nonspecific Plasma Protein Fouling,” *Langmuir*, 卷 26, pp. 3522-3530, 2010.
- [41] H. Minehara, K. Dan, Y. Ito, H. Takabatake, M. Henmi, “Quantitative evaluation of fouling resistance of PVDF/PMMA-g-PEO polymer blend membranes for membrane bioreactor,” *Journal of Membrane Science*, 卷 466, pp. 211-219, 2014.
- [42] C. Picart, P. Lavalley, P. Hubert, F. Cuisinier, G. Decher, P. Schaaf, J. Voegel, “Buidup mechanism for poly(L-lysine)/Hyaluronic acid films onto a solid surface,” *Langmuir*, 卷 17, pp. 7414-7424, 2001.
- [43] M. A. Plunkett, Z. Wang, M. W. Rutland, D. Johannsmann, “Adsorption of pNIPAM layers on hydrophobic gold surfaces, measured in situ by QCM and SPR,” *Langmuir*, 卷 19, pp. 6837-6844, 2003.
- [44] S. Okur, M. Kus, F. Ozel, M. Yilmaz, “Humidity adsorption kinetics of water soluble calix[4]arene derivatives measured using QCM technique,” *Sensors and Actuators B*, 卷 145, pp. 93-97, 2010.
- [45] M. Tagaya, “In situ QCM-D study of nano-bio interfaces with enhanced biocompatibility,” *Polymer Journal*, 卷 47, pp. 599-608, 2015.
- [46] C. Zhou, J.-M. Friedt, A. Angelova, K.-H. Choi, W. Laureyn, F. Frederix, L. A. Francis, A. Campitelli, Y. Engelborghs, G. Borghs, “Human Immunoglobulin Adsorption Investigated by Means of Quartz Crystal Microbalance Dissipation, Atomic Force Microscopy, Surface Acoustic Wave, and Surface Plasmon Resonance Techniques,” *Langmuir*, 卷 20, pp. 5870-5878, 2004.
- [47] S. Belegriou, I. Mannelli, P. Lisboa, F. Bretagnol, A. Valsesia, G. Ceccone, P. Colpo, H. Rauscher, F. Rossi, “pH-Dependent Immobilization of Proteins on Surfaces Functionalized by Plasma-Enhanced Chemical Vapor Deposition of Poly(acrylic acid)- and Poly(ethylene oxide)-like Films,” *Langmuir*, 卷 24, pp. 7251-7261, 2008.
- [48] C. Salas, O. J. Rojas, L. A. Lucia, M. A. Hubbe, J. Genzer, “Adsorption of Glycinin and β -Conglycinin on Silica and Cellulose: Surface Interactions as a Function of Denaturation, pH, and Electrolytes,” *Biomacromolecules*, 卷 13, pp. 387-396, 2012.
- [49] C. Salas, O. J. Rojas, L. A. Lucia, M. A. Hubbe, J. Genzer, “On the Surface Interactions of Proteins with Lignin,” *Appl. Mater. Interfaces*, 卷 5, pp. 199-206, 2013.
- [50] P. Jia, M. He, Y. Gong, X. Chu, J. Yang, J. Zhao, “Probing the Adjustments of Macromolecules during Their Surface Adsorption,” *Appl. Mater. Interfaces*, 卷 7, pp. 6422-6429, 2015.
- [51] P. Hong, S. Koza, E. Bouvier, “A review size-exclusion chromatography for the analysis of

- protein biotherapeutics and their aggregates,” *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 卷 35, pp. 2923-2950, 2012.
- [52] H. Ye, “Simultaneous determination of protein aggregation, degradation, and absolute molecular weight by size exclusion chromatography-multiangle laser light scattering,” *Analytical Biochemistry*, 卷 356, pp. 76-85, 2006.
- [53] D. Ejima, R. Yumioka, T. Arakawa, K. Tsumoto, “Arginine as an effective additive in gel permeation chromatography,” *Journal of Chromatography A*, 卷 1094, pp. 49-55, 2005.
- [54] K. Ahrer, A. Buchacher, G. Iberer, D. Josic, A. Jungbauer, “Analysis of aggregates of human immunoglobulin G using size exclusion chromatography, static and dynamic light scattering,” *Journal of Chromatography A*, 卷 1009, pp. 89-96, 2003.
- [55] J. F. Gabrielson, M. L. Brader, A. H. Pekar, K. B. Mathis, G. Winter, J. F. Carpenter, T. W. Randolph, “Quantitation of Aggregate Levels in a Recombinant Humanized Monoclonal Antibody Formulation by Size-Exclusion Chromatography, Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation and Sedimentation Velocity,” *Journal of Pharmaceutical Science*, 卷 96, pp. 268-279, 2007.
- [56] T. Hongo-Hirasaki, M. Komuro, S. Ide, “Effect of antibody solution conditions on filter performance for virus removal filter Planova 20N,” *Biotechnol. Prog.*, 卷 26, 第 4, pp. 1080-1087, 2010.
- [57] T. Hirasaki-Hongo, K. Yamaguchi, K. Yanagida, H. Hayashida, S. Ide, “Effects of Varying Virus-Spiking Conditions on a Virus-Removal Filter Planova 20N in a virus Validation Study of Antibody Solutions,” *Biotechnol. Prog.*, 卷 27, pp. 162-169, 2011.
- [58] V. Silin, H. Weetall, D. J. Vanderah, “SPR studies of the nonspecific adsorption kinetics of human IgG and BSA gold surfaces modified by Self-Assembled Monolayers (SAMs),” *Journal of colloid and interface science*, 卷 185, pp. 94-103, 1997.
- [59] H. A. Mellwee, C. L. Schauer, V. G. Praig, R. Boukherroub, S. Szunerits, “Thin chitosan films as a platform for SPR sensing of ferric ions,” *Analyst*, 卷 133, pp. 673-677, 2008.
- [60] E. Kontturi, H. Niemantsverdriet, P. C. Thune, “Cellulose Model Surfaces Simplified Preparation by Spin Coating and Characterization by X-ray Photoelectron Spectroscopy, Infrared Spectroscopy, and Atomic Force Microscopy,” 卷 19, pp. 5735-5741, 2003.
- [61] T. Mohan, R. Kargl, A. Doliska, A. Vesel, S. Kostler, V. Ribitsch, K. Stana-Kleinschek, “Wettability and surface composition of partly and fully regenerated cellulose thin films from trimethylsilyl cellulose,” 卷 358, pp. 604-610, 2011.
- [62] S. Yokota, T. Kitaoka, H. Wariishi, “Surface morphology of cellulose films prepared by spin coating on silicon oxide substrates pretreated with cationic polyelectrolyte,” *Applied Surface*

- Science*, 卷 253, pp. 4208-4214, 2007.
- [63] K. M. Joubert, Q. Luo, Y. Nashed-Samuel, J. Wypych , L. O. Narhi, “Classification and Characterization of Therapeutic Antibody Aggregates,” *Journal of Biological Chemistry*, 卷 286, pp. 25118-25133, 2011.
- [64] P. Arosio, G. Barolo, T. Muller-Span, H. Wu , M. Morbidelli, “Aggregation Stability of a Monoclonal Antibody During Downstream Processing,” *Pharm Res*, 卷 28, pp. 1884-1894, 2011.
- [65] A. Slocum, M. Burnham, P. Genest, A. Venkitechwaran, D. Chen , J. Hughes, “Impact of virus preparation quality on parvovirus filter performance,” *Biotechnology and Bioengineering*, 卷 110, pp. 229-239, 2013.
- [66] D. M. Bohonak , L. A. Zydney, “Compaction and permeability effects with virus filtration membranes,” *Journal of Membrane Science*, 卷 254, pp. 71-79, 2005.
- [67] G. R. Bolton, J. Basha , D. P. LaCasse, “Achieving high mass-throughput of therapeutic proteins through parvovirus retentive filter,” *Biotechnol. Prog.*, 卷 26, 第 6, pp. 1671-1677, 2010.
- [68] W. J. Rayfield , D. J. Roush, R. A. Chmielowski , N. Tugcu, “Prediction of Viral Filtration Performance of Monoclonal Antibodies Based on Biophysical Properties of Feed,” *Biotechnol. Prog.*, 卷 31, pp. 765-774, 2015.
- [69] A. Brown, C. Bechtel, J. Bill, H. Liu, J. Liu, D. McDonald, S. Pai , A. Radhamohan, R. Renslow, B. Thayer , S. Yohe , C. Dowd, “Increasing parvovirus filter throughput of monoclonal antibodies using ion exchange membrane adsorptive pre-filtration,” *Biotechnology and Bioengineering*, 卷 106, 第 4, pp. 627-637, 2010.
- [70] G. R. Bolton, S. Spector , D. LaCasse, “Increasing the capacity of parvovirus-retentive membranes: performance of the Viresolve Prefilter,” *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 卷 43, pp. 55-63, 2006.
- [71] B. F. Marques, D. J. Roush , K. F. Goklen, “Virus Filtration of High-Concentration Monoclonal Antibody Solutions,” *Biotechnol. Prog.*, 卷 25, pp. 483-491, 2009.
- [72] R. Babu , V. G. Gaikar, “Membrane characteristics as determinant in fouling of UF membranes,” *Separation and Purification Technology*, 卷 24, pp. 23-34, 2001.
- [73] T. Maruyama, S. Katoh, M. Nakajima, H. Nabetani, T. P. Abbott, A. Shono , K. Satoh, “FT-IR analysis of BSA fouled on ultrafiltration and microfiltration membranes,” *Journal of Membrane Science*, 卷 192, pp. 201-207, 2001.
- [74] H.-J. Butt, B. Cappella , M. Kappl, “Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications,” *Surface Science Reports*, 卷 59, pp. 1-152, 2005.

- [75] A. Cassidy, M. Grant, N. Provatas, “Modelling dielectric heterogeneity in electrophotography,” *Modeling Simul. Mater. Sci. Eng.*, 卷 12, pp. 91-107, 2004.
- [76] T. Fabritius, J. Saarela, R. Myllyla, “Dependence of the dielectric constant of electrolyte solutions on ionic concentration,” *International Conference on Lasers, Applications, and Technologies*, 2006.
- [77] N. Gavish, “Dependence of the dielectric constant of electrolyte solution on ionic concentration - a microfield approach,” *Phys Rev E*, 2016.
- [78] J. Saarela, S. Heikkinen, T. Fabritius, A. Haapala, R. Myllyla, “Refractive index matching improves optical object detection in paper,” *Measurement Science and Technology*, 卷 19, 2008.
- [79] J. K. Armstrong, R. B. Wenby, H. J. Meiseiman, T. C. Fisher, “The hydrodynamic radii of macromolecules and their effect on red blood cell aggregation,” *Biophys J.*, 卷 87, pp. 4259-4270, 2004.
- [80] T. Hayashi, Y. Tanaka, Y. Koide, M. Tanaka, M. Hara, “Mechanism underlying bioinertness of self-assembled monolayers of oligo(ethyleneglycol)-terminated alkanethiols on gold: protein adsorption, platelet adhesion, and surface forces,” *Phys Chem Chem Phys*, 卷 14, pp. 10196-10206, 2012.
- [81] T. Sekine, S. Asatyas, C. Sato, S. Morita, M. Tanaka, T. Hayashi, “Surface force and vibrational spectroscopic analyses of interfacial water molecules in the vicinity of methoxy-tri(ethylene glycol)-terminated monolayers: mechanisms underlying the effect of lateral packing density on bioinertness,” *J Biomater Sci Polym Ed.*, 卷 28, pp. 1231-1243, 2017.
- [82] J. L. Jordan, E. J. Fernandez, “QCM-D sensitivity to protein adsorption reversibility,” *Biotechnology and Bioengineering*, 卷 101, pp. 837-842, 2008.
- [83] A. Gerhardt, K. Bonam, J. S. Bee, J. F. Carpenter, T. W. Randolph, “Ionic strength affects tertiary structure and aggregation propensity of a monoclonal antibody adsorbed to silicone oil-water interfaces,” *J Pharm Sci*, 卷 102, pp. 429-440, 2013.
- [84] S. R. Wickramasinghe, E. D. Stump, D. L. Grzenia, S. M. Husson, J. Pellegrino, “Understanding virus filtration membrane performance,” *Journal of Membrane Science*, 卷 365, pp. 160-169, 2010.
- [85] P. Misra, A. Sinha, A. S. Rathore, A. Shukla, F. Q. Mir, “A Three Plus Three Parameter Mechanistic Model for Viral Filtration,” *Biotechnol. Prog.*, 2017.
- [86] G. Bolton, D. LaCasse, R. Kuriyel, “Combined models of membrane fouling: Development and application to microfiltration and ultrafiltration of biological fluids,” *Journal of Membrane*

- Science*, 卷 277, pp. 75-84, 2006.
- [87] G. R. Bolton, A. W. Boesch, M. J. Lazzara, “The effects of flow rate on membrane capacity: Development and application of adsorptive membrane fouling models,” *Journal of Membrane Science*, 卷 279, pp. 625-634, 2006.
- [88] A. S. Rathore, V. Kumar, A. Arora, S. Lute, K. Brorson, A. Shukla, “Mechanistic modeling of viral filtration,” *Journal of Membrane Science*, 卷 458, pp. 96-103, 2014.
- [89] S. Guha, J. Wayment, V. Rastogi, M. Li, M. Tarlov, M. R. Zachariah, “Competitive adsorption-desorption of IgM monomers-dimers on silica and modified silica surfaces,” *Journal of Colloid and Interface Science*, 卷 402, pp. 291-299, 2013.
- [90] M. Okubo, I. Azume, Y. Yamamoto, “Preferential adsorption of bovine serum albumin dimer onto polymer microspheres having a heterogeneous surface consisting of hydrophobic and hydrophilic parts,” *Colloid Polym Sci*, 卷 268, pp. 598-603, 1990.
- [91] V. Poor, W. Schwarzacher, “Potential dependence of ferritin monomer, dimer and oligomer adsorption on a polycrystalline Au surface,” *Electrochimica Acta*, 卷 100, pp. 329-332, 2013.
- [92] R. L. Zsom, “Dependence of Preferential Bovine Serum Albumin Oligomer Adsorption on the Surface Properties of Monodisperse Polystyrene latices,” *Journal of Colloid and Interface Science*, 卷 111, pp. 434-445, 1986.
- [93] H. Mo, K. G. Tay, H. Y. Ng, “Fouling of reverse osmosis membrane by protein (BSA): Effects of pH, calcium, magnesium, ionic strength and temperature,” *Journal of Membrane Science*, 卷 315, pp. 28-35, 2008.
- [94] C. Herrero, P. Pradanos, I. J. Calvo, F. Tejerina, A. Hernandez, “Flux decline in protein microfiltration: Influence of operative parameters,” *Journal of colloid and interface science*, 卷 187, 第 2, pp. 344-351, 1997.
- [95] S. P. Palecek, A. L. Zydney, “Hydraulic permeability of protein deposits formed during microfiltration: effect of solution pH and ionic strength,” *Journal of Membrane Science*, 卷 95, 第 1, pp. 71-81, 1994.

謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、直接ご指導いただきました東京工業大学物質理工学院材料系 林 智広 先生に深く感謝いたします。

フィルターの膜表面とタンパク質との相互作用解析のための、モデル表面の分析を伊藤秀己氏(旭化成)に、タンパク質の凝集体解析には、田中 卓志(旭化成)に大変ご協力頂きました。深く御礼申し上げます。

また膜表面とタンパク質との相互作用の解析には、張 嶺碩氏(東京工業大学)に、膜材料へのタンパク吸着実験については、廣原 周氏(東京工業大学)にご尽力頂きましたことに深く感謝いたします。

さらに実験結果の議論については、菊間 淳氏(旭化成)、小川 周一郎氏(旭化成)、吉田正弘氏(旭化成)、本郷 智子氏(旭化成)、岩崎 琢磨氏(旭化成)には有益なご助言を頂きましたことを心より御礼申し上げます。

最後に、本研究を支援して頂いた研究室の皆様および会社の同僚に深く感謝致します。

2017年1月 濱本 亮