

学 位 論 文

エンドトキシン吸着剤としての
ポリ (ϵ -リジン) 固定化セルロース
球状粒子の設計と開発

2002 年 3 月

熊本大学大学院自然科学研究科

戸所 正美

目次

	項
序章	1
第 1 章 緒論	5
1.1 エンドトキシンの概要	5
1.2 エンドトキシンの研究の歴史的経過	6
1.3 LPS の構造	6
1.4 LPS の会合構造	12
1.5 LPS の活性	12
1.5.1 発熱性	12
1.5.2 エンドトキシンショック	14
1.5.3 血液凝固系に対する活性	14
1.5.4 その他の活性	14
1.6 LPS の除去	15
1.6.1 LPS 除去の意義	15
1.6.2 LPS の不活化方法	15
1.6.3 LPS の除去方法	16
(1) ろ過法	16
(2)ゲルろ過法	16
(3)吸着法	17
1.7 本研究の目的	21
1.8 第 1 章の論文	23
第 2 章 吸着剤の評価方法	24
2.1 ポアサイズ	24
2.2 膨純度	26
2.3 リガンド導入量	26
2.3.1 イオン交換容量の測定	26
2.3.2 元素分析あるいは窒素含有量の測定	27
2.3.3 1 級アミノ基定量	27
2.4 エンドトキシン吸着能の評価	28

2.4.1	器具の前処理	28
2.4.2	緩衝液	28
2.4.3	バッチ法	29
2.4.4	カラム法	29
2.4.5	解離定数の算出	30
2.5	エンドトキシンの定量方法	31
2.5.1	比濁時間法	33
2.5.2	発色合成基質法	35
2.6	タンパク質の定量方法	37
2.7	第2章の論文	37
第3章 吸着剤の設計と合成		38
3.1	アミノ化 PMLG 球状粒子	38
3.1.1	PMLG 球状粒子の調製	38
3.2	橋かけ <i>N,N</i> -ジメチルアミノプロピルアクリルアミド(DMP)吸着剤の調製法	42
3.2.1	吸着剤の設計	42
3.3	橋かけポリ(ε-リジン)吸着剤の調製法	50
3.3.1	吸着剤の設計	50
3.3.2	橋かけポリ(ε-リジン)吸着剤の調製	53
3.4	ポリリジン固定化多糖粒子(PL-Cellulose)の調製法	56
3.4.1	吸着剤の設計	56
3.4.2	セルロース球状粒子	56
3.4.3	その他の粒子	57
3.4.4	ポリリジン固定化粒子吸着剤の調製	58
3.5	第3章の論文	62
第4章 各種架橋型エンドトキシン吸着剤の合成の確認とその特性		63

4.1 橋かけ <i>N,N</i> -ジメチルアミノプロピルアクリルアミド (DMP) 吸着剤	63
4.1.1 合成の確認	63
4.1.2 粒子の疎水性	64
4.1.3 タンパク質、LPS 吸着の基本的挙動	66
(1) アミノ基含有量の効果	66
(2) pH 及びイオン強度効果	71
4.2 橋かけポリ (ϵ -リジン) 吸着剤の調製法	73
4.2.1 合成の確認	73
4.2.2 ポリリジン粒子吸着剤の特性	73
4.2.3 タンパク質、LPS 吸着の基本的挙動	76
(1) ポリ (ϵ -リジン) 含有量の効果	76
(2) pH 及びイオン強度効果	79
(3) 細孔径及びアミノ基含有量の効果	83
4.3 第 4 章の総括	86
第 5 章 ポリ (ϵ -リジン) 固定化吸着剤の合成の確認とその特性	88
5.1 合成の確認	88
5.2 ポリリジン固定化多糖粒子の特性	90
5.3 タンパク質、LPS 吸着の基本的挙動	94
5.3.1 アミノ基含有量の効果	94
5.3.2 ベースマトリックスの効果	96
5.3.3 pH 及びイオン強度、細孔径の効果	96
5.4 第 5 章の総括	102
第 6 章 吸着剤のエンドトキシン選択除去能の評価	103
6.1 精製 LPS 添加タンパク質溶液からの LPS 選択除去	103
6.1.1 DMP 粒子	103

6.1.2 ポリ (ε-リジン) 架橋吸着剤	105
6.1.3 ポリ (ε-リジン) 固定化セルロース粒子	108
6.1.4 合成ポリカチオンポリマー固定化セルロース粒子	111
6.2 タンパク質を汚染しているエンドトキシンの選択除去	113
6.2.1 DMP 粒子	113
6.2.2 ポリ (ε-リジン) 架橋吸着剤	115
6.2.3 ポリ (ε-リジン) 固定化セルロース粒子	117
6.2.4 各吸着剤の比較と吸着容量、解離定数の比較	119
6.3 カラム法による BSA を汚染しているエンドトキシンの除去	121
6.3.1 ポリ (ε-リジン) 固定化セルロース粒子	122
(1) PL-Cellulose-10 ³	122
(2) PL-Cellulose-10 ⁶	124
6.3.2 ポリミキシン固定化粒子	126
(1) Affi-prep PolymyxinB	126
(2) Detoxi-gel	126
6.4 第 6 章の総括	129
第 7 章 総括	131
7.1 本研究の背景	131
7.2 本研究の成果	132

序論

エンドトキシンを血管内に直接注入すると、発熱症状やエンドトキシンショックと呼ばれる症状を示し、重篤な場合は死に至る。従って、注射用の薬剤に混入しているエンドトキシンの量は法的に規定されている。典型的な例では、日本薬局法で定める注射用蒸留水の場合は0.25EU/ml以下である。

エンドトキシンはグラム陰性細菌の細胞外膜に存在している。グラム陰性菌は代表例として大腸菌類が挙げられるが、環境中に広く存在分布しており、エンドトキシンも環境中に広く存在している。従って、エンドトキシンは医薬品の製造原料中の混入、製造工程での混入がある。特に、近年研究開発が盛んなバイオ医薬の場合、発酵、細胞培養、遺伝子組み替えなどの技術で製造されており、培地成分や宿主細胞壁成分からのエンドトキシンの混入が懸念される。

このような背景からバイオ医薬で製造されるタンパク質（ワクチン、抗体、酵素、ホルモンなど）からのエンドトキシン除去剤の必要性、需要があり、ヒスチジン固定化粒子、ポリミキシン固定化粒子が販売されてきたが吸着性能、選択性などが不十分であり工業的にはあまり用いられていない。本研究では以上の背景から、より高性能で工業的使用が可能なエンドトキシン吸着剤の設計と開発を目的とした。

本論文は7章から構成され、第1章は緒論であり、第7章に総括として結論と総括と結論をまとめた。以下本論文の構成と各章の要約を述べる。

第1章では、緒論を述べている。エンドトキシンの概要とその化学的構造および生物学的活性についてと、従来のエンドトキシンの不活化、除去吸着方法についての概説をし、本研究の目的について論じた。

第2章は、エンドトキシン吸着剤の物性評価方法、および吸着剤の性能評価方法、関連する重要な技術としてエンドトキシンの定量方法について詳述した。

第3章は、エンドトキシン吸着剤の設計とその合成について論述した。

第4章は、ポリ(ε-リジン)とクロロメチルオキシラン架橋吸着剤やジメチルアミノプロピル基含有アクリルアミド-架橋剤共重合体などの架橋型エンドトキシン吸着剤の物理的、化学的特性とその性能について論じた。特に橋架け剤の種類を選択することで吸着剤の親水性、疎水性、アミノ基含有量および $pK_{a,app}$ の制御が可能であることについて述べている。本章の内容は、主として下記の論文に基づいて論じた。

Chuichi Hirayama, Masayo Sakata, Mariko Nakamura, Hirotaka Ihara, Masashi Kunitake, Masami Todokoro

"Preparation of poly(ε-lysine) adsorbents and application to selective removal of lipopolysaccharides."
Journal of Chromatography B, Vol. 721, pp.187-195(1990)

Masayo Sakata, Masami Todokoro, Hideyuki Hata, Masashi Kunitake, Kunio Ohkuma, Hirotaka Ihara, Chuichi Hirayama
"Effects of amino-group content and hydrophobicity of cross-linked *N,N*-dimethyl-aminopropylacrylamide adsorbents on selective removal of lipopolysaccharides."
Journal of Chromatography & Related Technologies, Vol. 23, No. 12, pp.1887-1902(2000)

Masayo Sakata, Masami Todokoro, Tomohiro Kai, Masashi Kunitake, Chuichi Hirayama
"Effect of cationic polymer adsorbent pK_a on the selective removal of endotoxin from an albumin solution."
Chromatographia, Vol. 53, No. 11/12, pp.619-623(2001)

第5章は、リガンドとしてポリ(ε-リジン)などのポリカチオンを球状セルロースなどの市販クロマト剤に固定化した吸着剤について物理的、化学的特性とその性能について論じた。ここでは特に、基材となる球状粒子のポアサイズ、そして環境因子である溶液のイオン強度がエンドトキシン吸着の選択性に影響を与えることが明らかにされた。

また、リガンドの種類により $pK_{a,app}$ が変わるとによってもエンドトキシン吸着の選択性に影響が与えられることについても述べている。

本研究で採用した球状セルロース粒子はセルロファインの商品名で販売されており、既に工業的スケールで使用されている実績がある。架橋型の吸着剤と比べて、市販のクロマト剤にリガンドを固定化する方法は、吸着剤を多量に製造するが可能であり、工業生産に有利である。本章の内容は主として下記の論文に基づいて論じた。

Masami Todokoro, Masayo Sakata, Satoshi Matama, Masashi Kunitake, Kunio Ohkuma, Chuichi Hirayama
"Pore-size controlled and poly(ε-lysine)-immobilized cellulose spherical particles for removal of lipopolysaccharides."
Journal of Chromatography & Related Technologies
平成14年発行に掲載決定

Masayo Sakata, Masami Todokoro, Chuichi Hirayama
"Removal endotoxin from protein solution using poly(ε-lysine)-immobilized cellulose beads."
American Biotechnology Laboratory
Vol.20, No.1, pp36-38(2002)

第6章は、第4章、第5章で特性評価した吸着剤を用いて、タンパク質とLPSの選択吸着について検討を行った。市販のタンパク質を汚染しているエンドトキシンの除去につ

いて検討した結果について述べた。バッチ法による検討では、アルブミンの回収率は96%以上でエンドトキシンは10pg/ml以下の低減が可能であることが示された。またクロマトグラフィー法によるアルブミンからの天然エンドトキシン除去の検討では、約100EU/mlあったエンドトキシンを処理後に0.07EU/mlに低減でき、アルブミンは97%以上の回収が可能であること示し、精製されたエンドトキシンのみならず、自然に混入した汚染エンドトキシンの除去も十分可能であることについて論じた。

第7章は、以上の結果をまとめて総括とした。

以上、本研究では新規エンドトキシン吸着剤として架橋型吸着剤とリガンド固定化型吸着剤について設計、合成しその応用結果について詳述した。特に、ポリ(ε-リジン)をエンドトキシン吸着剤への応用した研究は他に例がなく先駆的な研究と言える。また、ポリ(ε-リジン)固定化セルロースにおいては従来の市販吸着剤に比べて、非常に優れたエンドトキシン吸着能、選択的吸着が見られチッソ株式会社において、セルロファイン EtクリーンPLの商品名で販売が開始されており、医薬品製造の分野に貢献するものと期待できる。

また本研究で得られた知見は、医薬品製造のみならず、細胞培養や組織培養の培地からのエンドトキシン除去や、敗血症患者の血液からのエンドトキシン除去により体外循環治療のため基礎データを与えるものであり、学術分野や医療、治療の分野への応用も期待できるものである。

第1章 緒論

1.1 エンドトキシンの概要

細菌の生産する毒素は、外毒素（エキソトキシン）と内毒素（エンドキシン）の大きく2に分類することができる。

病原菌を *in vitro* で培養すると毒性物質を培地中に放出する。毒素が菌体外に放出されるため外毒素＝エキソトキシンと呼ばれる。このようなエキソトキシンは、例えば黄色ブドウ球菌のエンテロトキシン（腸管毒）や破傷風菌や赤痢菌の毒素などが上げられる。病原菌が感染した場合、それぞれに特徴的な症状が現れるが、これはエキソトキシンが特定の活性を人体に示すためである。

一方の内毒素は、グラム陰性細菌の細胞膜の成分であり、*in vitro* の培養を行っても培地中に毒素を放出しない。そのため内毒素＝エンドトキシンと呼ばれている。エンドトキシンはグラム陰性細菌の膜成分であるため、菌が死滅・溶菌しないと菌体外へはほとんど溶出してこない。エキソトキシンは病原菌が生産する毒素であるのに対して、エンドトキシンは特に病原菌に限らずグラム陰性菌であれば生産されるものであり、環境中や生体に広く分布していると考えられる。

グラム陰性とは1884年 Christian Gram が発見したクリスタルバイオレットーヨード染色（グラム染色）によって染色されないことを示す。グラム陰性菌の膜構造は、細胞膜とそれを包むペプチドグリカン層、さらに最外殻を外膜が覆う三重構造になっている。グラム陽性菌は外膜を持たずペプチドグリカン層が剥き出しになっている。

エンドトキシンは外膜に存在しているリポポリサッカライド（LPS）がその本体であり、その中でも、リピッドAと呼ばれる糖脂質が活性を示す重要な構造であることが明らかにされている。一方、グラム陽性菌は、外膜が存在していない、その代わりにペプチドグリカン層が厚くなっており細胞を保護している。グラム陽性菌

は外膜を持たないことから、エンドトキシンも生産しない。

Fig.1-1 にグラム陰性細菌の細胞膜・壁の構造を模式的に示した。

1.2 エンドトキシンの研究の歴史的経過

エンドトキシンの生体に対する作用の最初の記述は1865年の Billroth によるもので、生菌、あるいは死菌を含んだ水を犬に注射すると体温が上昇する事を報告している。1892年には Pfeiffer によって、この発熱性物質（パイロジェン）がエンドトキシンと名づけられた。

エンドトキシンの精製については、1933年の Boivin によるトリクロロ酢酸による抽出の試みがあったが、多糖、リン脂質、蛋白質の複合体であることが後に明らかにされた（Morgan, 1941年）。エンドトキシンの単離に重要な研究を行ったのは、Westphal 等による。彼等は1952年に、熱フェノール・水を用いた抽出法で、多糖と脂質からなる、現在知られている形のエンドトキシンを単離し、その活性の本体が脂質（リピッドA）であることを明らかにした。以上のような歴史的背景から、パイロジェン、エンドトキシン、LPS は同意義語として用いられる。

1.3 LPS の構造

エンドトキシンはグラム陰性菌が死滅し細胞が崩壊された際に遊離してくるものである。したがって、さまざまな断片・構造の集合体が天然のエンドトキシンには含まれている。前述した Westphal 等による精製法の確立により純度の高い標品が得られるようになり、その構造解析が進められてきた。

LPS の構造はその名が示す通り、糖質と脂質からなる糖脂質の一種類と言える。Fig.1-2 に LPS の模式図を示した。

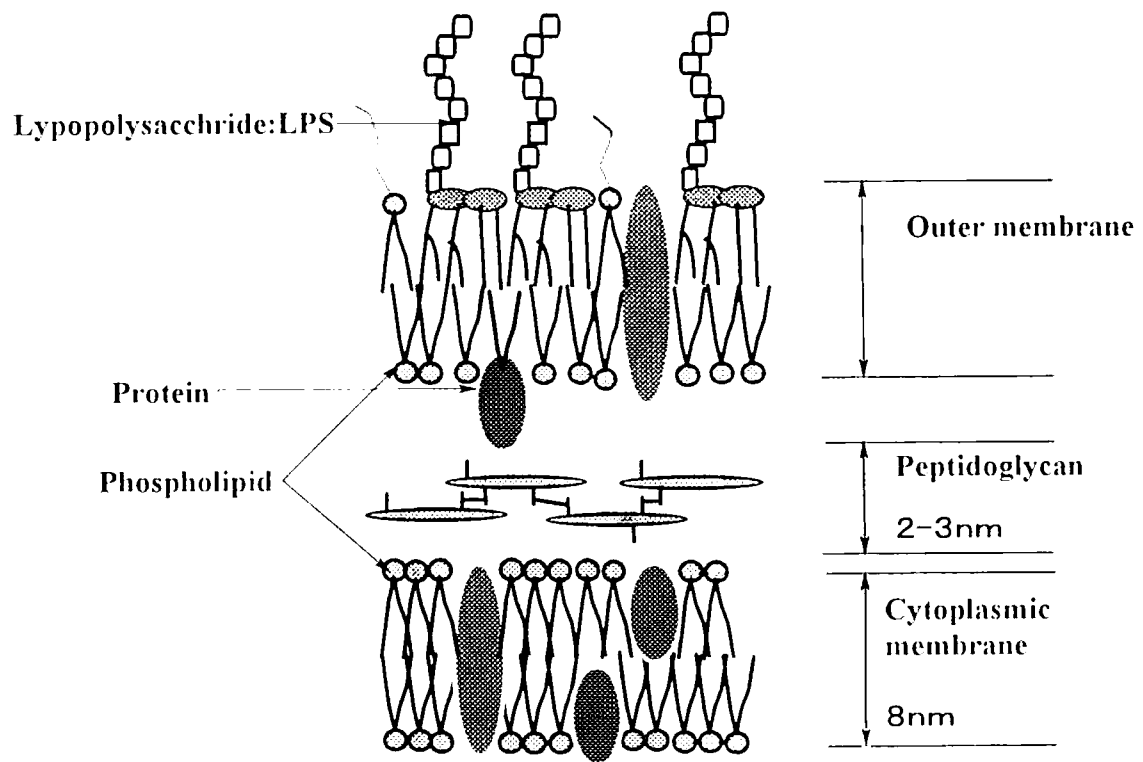


Fig.1-1

Structure of the cell wall of a Gram negative bacteria

LPSの糖質の部分は、O多糖、Rコア糖鎖（外部コア糖鎖、内部コア糖鎖）から構成されている。菌の変異株を用いた研究から、O多糖を持っているものは、見かけ上滑らかなコロニーを形成するのでS型菌（smooth colony）、O多糖を持たないものは光沢のない辺縁が不揃いのR型菌（rough colony）になることがわかっている。LPSの糖部分は最小で内部コア2分子があれば外膜が形成されることが知られている。

O多糖は、一般的に3～5個の単糖の繰り返し単位が、数十個結合した直鎖状多糖であり、時に単糖の側鎖が結合している。この繰り返し単位は必ずしも一定ではなく、精製されたLPSは分子量が不均一な分子の混合物になる。またO多糖は、菌の株の違いはもちろん、種類によって異なっておりさまざまな構造が存在すると考えられる。またその事はO型多糖がO抗原性（血清型）を示す原因になっており、免疫学的に重要な性質である¹。

外部コア糖鎖は、グラム陰性菌全体では共通とは言えないが、腸内細菌に限って見れば共通していることがわかっており、O多糖のような多様性は少ない。² サルモネラ菌では2000以上の血清型の菌株すべてで、外部コア糖鎖は共通している。また大腸菌や赤痢菌でも共通性が見られ、主にヘキソースとN-アセチルグルコサミンから構成されている。

内部コア糖鎖は最も、菌種間で共通した構造が見られる。² 内部コア糖鎖は、3-デオキシ-D-manno-オクツロン酸（2-ケト-3-デオキシオクトン酸）（KDO）とL-glycero-D-manno-ヘプトース（L-D-Hep）などの特殊な糖で構成されているため、解析が難しく今なお不明な点が残されている。（Fig.1-3）これまで知られているLPSのほとんどは、リピッドAのグルコサミンC6位とKDOのC₁位がケトシド結合でつながっている。ケトシド結合は酸加水分解されやすいため、弱酸加水分解で、LPSからリピッドAが容易に遊離される。

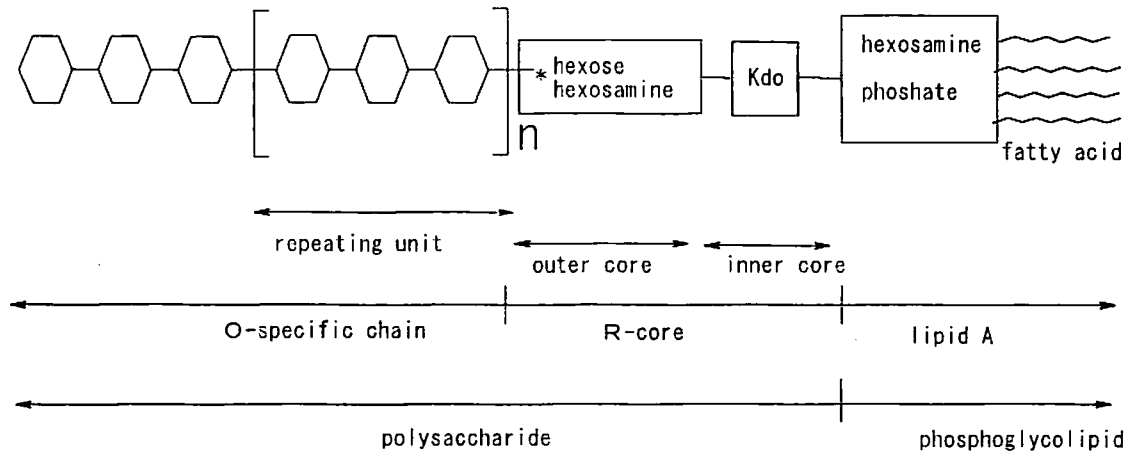


Fig.1-2 Schematic structure of typical lipopolysaccharide

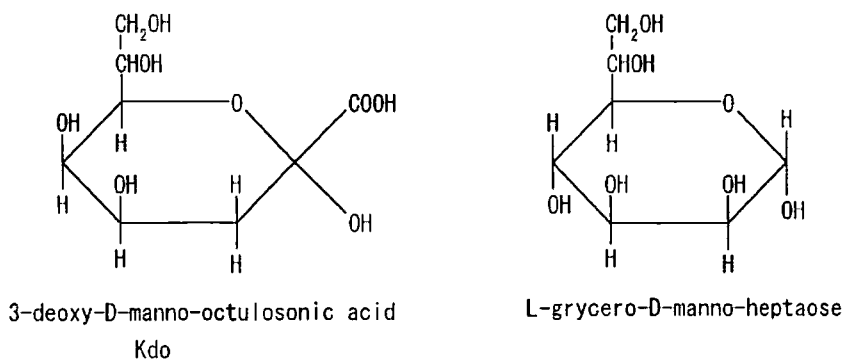


Fig.1-3 Structure of the sugar that constitutes the inner core

Fig.1-4は大腸菌リピッドAの構造示したものである³。リピッドAは、バックボーンと呼ばれる β -1,6結合でつながったグルコサミン(GlcN) 2糖に、脂肪酸が結合したものである。大腸菌のバックボーンはGlcNであるが、2,3-ジアミノグルコース(GlcN3N)が使われている菌種類(*Pseudomonas sp. Rhodopseudomonas*, *Thiobacillus*)や、GlcN, GlcN3Nのヘテロダイマーが使われている菌種(*Campylobacter jejuni*)もある。

バックボーンのC1, C4'位の水酸基はリン酸エステルとなっており、マイナスのチャージを帯びている。

脂質は、バックボーンのC2, C2'のアミノ基とアミド結合しており、さらにC3, C3'の水酸基とはエステル結合している。大腸菌の場合はバックボーンに直接結合している脂質は3-ヒドロキシミリスチン酸(3-OH-C_{14:0})が結合している。バックボーンの非還元末端(Fig.1-4 向かって左)のヒドロキシ脂肪酸はさらに、エステル結合でミリスチン酸(C_{14:0})あるいはラウリン酸(C_{12:0})がエステル結合して分岐した構造を取っている。リピッドAに使われている脂質は、菌種類によって異なっているが、炭素数は10~17程度のものが多い。

以上のようにLPSは、長鎖の糖鎖とリピッドAから構成されている。Shandsらによれば、*Salmonella typhimurium*のLPSの分子量は、8700である⁴。

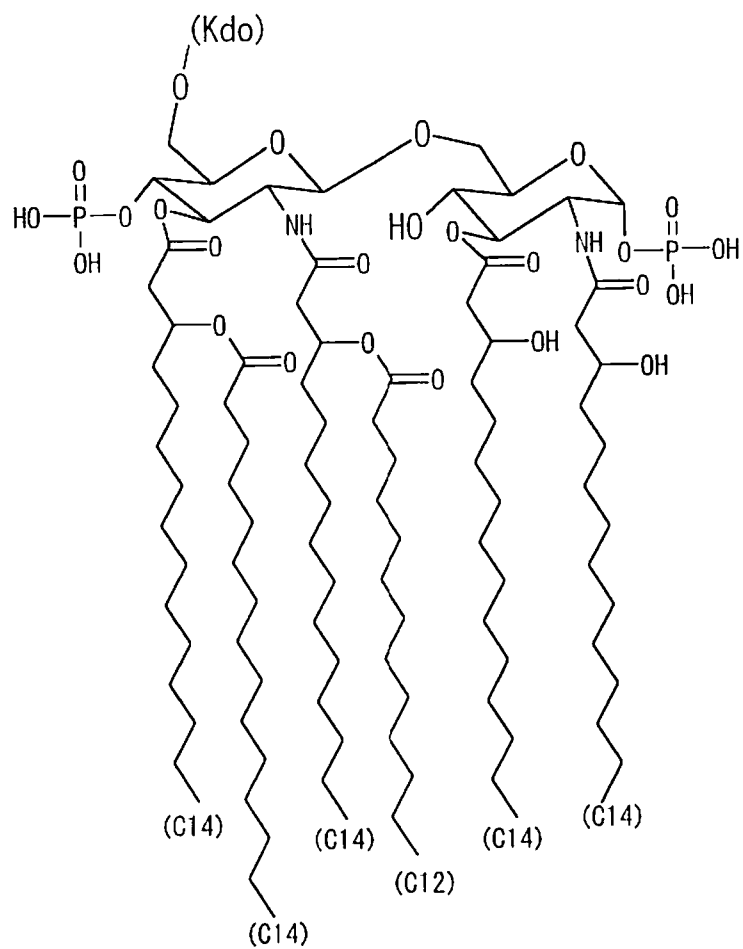


Fig. 1-4 Structure of Lipid A from *E. coli*

1.4 LPS の会合構造

LPS はリン脂質と同様に、ミセル構造や小胞（ベシクル）の構造を取りうる^{5,6}。これらの会合構造は、溶液中の界面活性剤（例えば胆汁酸、合成界面活性剤）や2価の陽イオン（ Ca^{2+} , Mg^{2+} ）やキレート剤（EDTA など）の存在によって影響を受ける。LPS は Fig1-5 に示したようにミセルを形成するが、通常の界面活性剤で知られている臨界ミセル形成濃度（CMC）は明確な値が知られていない。LPS の会合状態は前述した界面活性剤、2価カチオン以外にタンパク質や pH、イオン強度によっても影響を受ける。

Liping Li らの報告⁷によれば LPS 単独で水に分散させた場合は分画分子量 30 万の限外ろ過膜を通過しないが、LPS とタンパク質が共存することで、LPS が分画分子量 30 万の限外ろ過膜を通過することが示されている。したがってタンパク質を汚染している LPS の見かけ上の分子量は 30 万以下のものが存在している。

また、NMR による研究では、ラフ LPS をフィルム上にキャストした際の構造として、1 分子のリピッド A の脂肪酸鎖が 3 角柱状に構造を取り、更に 6 分子のリピッド A が集まり 6 角形（ピザ型）の安定構造を取る事がしめされている⁸。

1.5 LPS の活性

LPS は生物に対していろいろな活性を示す。その中でも最も有名で問題となる活性は、血液に混入した際の発熱性、血管・血液凝固系への影響、ショック症状が上げられる。

1.5.1 発熱性

LPS は古くから発熱性物質（パイロジェン）の代表的な物質とされてきた。非常に微量の LPS（0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）をウサギに静脈注射した場合でも発熱が起こる。これは、LPS が大脳の視床下部に作用する

反応と、白血球に作用し内因性発熱物質 (IL-1) による発熱が起こる2つの系が知られている。

LPS による発熱応答は、動物種により異なるがヒトは最も敏感である。1.5ng/kg~4ng/kg の静脈注射で 1.6~2℃ の体温上昇が観察されている^{9,10}。

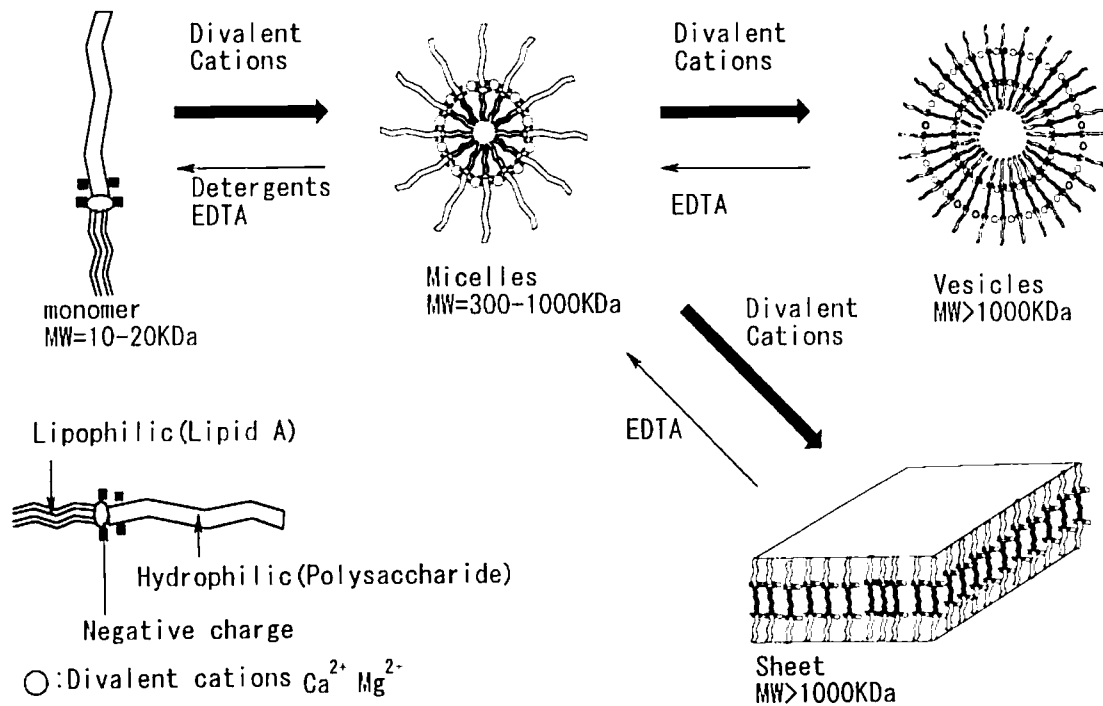


Fig. 1-5 Model structures of LPS aggregates in aqueous solutions^{5,6)}

1.5.2 エンドトキシンショック

動物に致死量以上の LPS を静脈注射すると、血圧低下を引き起こし死に至る。

イヌで観察された症状では、LPS の静脈注射の数分後に 1 回目の血圧低下が起こり、一時回復する。しかし 1 ～ 2 時間後に再び血圧低下が起こり死に至る。1 回目の血圧低下は肝臓や腸の毛細血管の収縮により引き起こされ、これが回復した後には細静脈の収縮と血管透過性の亢進により循環血流量が減少しショック症状が引き起こされる。

ヒトの場合でも最終的には血管透過性の亢進で血管外へ体液が漏出し、血圧低下により低心拍出性の状態となり心不全で死亡する。

1.5.3 血液凝固系に対する活性

ウサギに LPS を皮内注射（準備注射）し、24 時間後に LPS を静脈注射（惹起注射）すると、数時間後に皮内注射局所に出血、壊死が見られる。これは局所シュワルツマン反応と言う¹¹。一方、準備注射、惹起注射ともに静脈に行うと肺、腎臓などに出血、壊死が起こる全身性シュワルツマン反応も知られている¹²。これらの反応は、組織学的な所見では血管内血液凝固を呈する。

LPS は血液凝固系の外因性凝固系を活性化する。LPS は単球やマクロファージに作用し、外因性凝固因子を活性化する組織因子を新生誘導し血液凝固を引き起こす¹³。

1.5.4 その他の活性

菌の感染を宿主が認識することは、宿主の防御機構にとって重要であり、LPS 特に O 多糖は菌表層に存在するため、これを抗原とした免疫反応が防御反応として引き起こされる。この反応は O 多糖がマッチングする特定菌の体内進入を防止する特異的な免疫反

応である。一方リピッド A によって引き起こされる防御機構は、グラム陰性菌、グラム陽性菌、真菌、ウイルス、寄生虫を含む広範囲の感染へ働く、非特異的感染抵抗性増強作用が付与される¹⁴。

1.6 LPS の除去

1.6.1 LPS 除去の意義

注射用に用いる医薬品に LPS が混入した場合は、前述した発熱反応、混入量が多ければエンドトキシンショックが引き起こされる。以前の注射剤は、使用後の発熱や悪寒が問題となっていたが、これがエンドトキシンによるものと判明した。従って、このような注射剤のエンドトキシンは法的に規制されており、例えば日本では日本薬局法の中で、注射剤はエンドトキシン試験法若しくは発熱性物質試験法に適合することが定められている¹⁵。代表的な例は、注射用水のエンドトキシン規格値 0.25EU/ml が上げられる。アメリカ、ヨーロッパでも注射剤への混入は法的な規制が定められている。

このようにエンドトキシン=LPS が注射剤に混入することは問題であり、安全な医療を行うために、注射剤から LPS を除去する方法は重要な技術である。

1.6.2 LPS の不活化方法

LPS の不活化方法は幾つかの方法が知られている。LPS は一般的な生化学的な分子に比べて非常に熱安定性が高い事が知られている。そのためガラス器具、金属器具は乾熱滅菌（例えば 250℃で 2 時間）を行う物理的な方法で不活化する事ができる。しかしもちろん、この方法は熱に不安定なタンパク質溶液には応用できない。その他に物理的な方法は、ガンマ線処理や超音波処理が知られている。

化学的な方法としては、アルカリによる処理が最も汎用されている

る。アルカリのほかにも、過酸化水素、希酸による処理も知られている。このような化学的方法は、精製に使用する分離剤や分離装置（カラム）や付随するラインの洗浄、不活化に行われる。

これらの不活化方法は、LPSのみならず目的物質も同時に不活化（タンパク質等が分解、変成）されてしまう。

1.6.3 LPS の除去方法

注射用医薬品から LPS を除去するには、乾熱滅菌やアルカリ処理などの不活化処理は使用できない。そのため、不活化処理の他に LPS を温和な条件で除去する方法が必要となる。

(1) ろ過法

ろ過による方法は高分子である LPS を限外ろ過膜や逆浸透膜で補足し清浄なろ過液として目的物質を回収する方法である。限外ろ過膜は分画分子量として1,000程度から数万のものまで多種類が販売されている。この方法では、LPS と同程度の分子量もつ成分からは LPS を除去する事はできない。LPS の一分子の分子量がおよそ10,000 である事を考慮すれば、分子量 10,000 以下の成分はこの方法が適用可能である。一方、逆浸透膜は、水分子のみがろ過可能であるため、現在では注射用水の製造に使用されるが水より高分子の成分からの LPS 除去に使用できない。

(2) ゲルろ過法

分子量の違いに基づくもうひとつの分離方法はゲルろ過法が挙げられる。LPS は会合体を形成している場合は、通常市販されているゲルろ過剤の排除限界分子量よりもほとんどが高分子であることが期待でき、目的成分が排除限界分子量よりも十分低分子である場合は、LPS と目的成分を分離することが可能であるかもしれない。

しかし、LPS の会合状態はさまざまであり、比較的分子量のものも混在している、また LPS と目的成分が相互作用し複合体を形成する場合は両者を分離することは難しい。

(3)吸着法

不安定なしかも分子量が1,000以上程度ある高分子量の成分を含む溶液からの LPS 除去方法として、吸着法は現在考えられる除去方法としては、最も有効である。しかしこの方法では、LPS に高選択的な吸着力をもつ吸着が必要となる。

(3-1) 活性炭

1964年 Yatzidis らは活性炭を使用したエンドトキシン除去の報告をしている。その他にも数件の報告^{16,17}がされているが活性炭は非常に多くの物質を吸着する性質があり LPS 選択性ではなく、吸着してほしくない有用成分も同時に吸着されてしまう欠点がある。そのため高価なもので、除去後の目的成分の回収が非常にすくなく注射薬などには利用できない。活性炭と同様に疎水性の高い吸着剤としては Dowex (未置換粒子)、Amberlite XAD-2 などのポリスチレン系の合成樹脂による報告¹⁸もあるが、これも活性炭と同様に選択性がわるい。

(3-2) イオン交換樹脂

Nelan ら¹⁹はアニオン交換樹脂であるコレスラミンを用いてエンドトキシンの吸着を試みて、ラットにより試験でその除去を確認している。しかしこのようなアニオン交換樹脂は、プラスにチャージした物質からのエンドトキシン除去にある程度対応可能であるが、マイナスにチャージした物質は吸着してしまうため選択的な除去はできない。

(3-3) アミノ酸、アミノ酸系抗生物質固定化粒子

ポリミキシン B はグラム陰性菌、緑膿菌に対して有効な抗生物質である。その構造は Fig.1-6 に示した。構造式からわかるように、環状のペプチドであり、アミノ基をもつ塩基性のアミノ酸と疎水性のアミノ酸から構成されている。

Issekutz²⁰はポリミキシン B を CNBr 活性化セファロース 4 B²¹ に固定化した吸着剤を用いて 1 μ g/ml から 30pg/ml へエンドトキシン濃度を低減できたと報告している。(Fig.1-7)

CNBr 活性化セファロースに固定化されたリガンドは Fig.1-8 にしめしたように、アルカリにより脱離²²することが知られているため、NaOH を用いた汎用的な吸着剤の洗浄ができない。これは、エンドトキシン除去剤としては非常に好ましくない性質であり、工業的な実用化は難しい。

ポリミキシン B をポリスチレン系のフォロファイバーに固定化した吸着剤²³ (商品名トレミキシン) が発表されている。これは、敗血症患者の血中エンドトキシンを体外循環 (人工透析的な治療) によって吸着除去する目的で開発されたものである。

ヒスタミン^{24, 25}あるいはヒスチジン^{26, 27}をアミノヘキシル活性化多糖粒子に固定化したものが (商品名 パイロセップ) 販売されていたが、現在では販売は中止されている。この吸着剤は、イオン強度が 0.1mol/L 以下の低い環境では LPS 選択的な吸着除去が可能であったが、高塩濃度では LPS が吸着しなく、実際の使用には適さない。

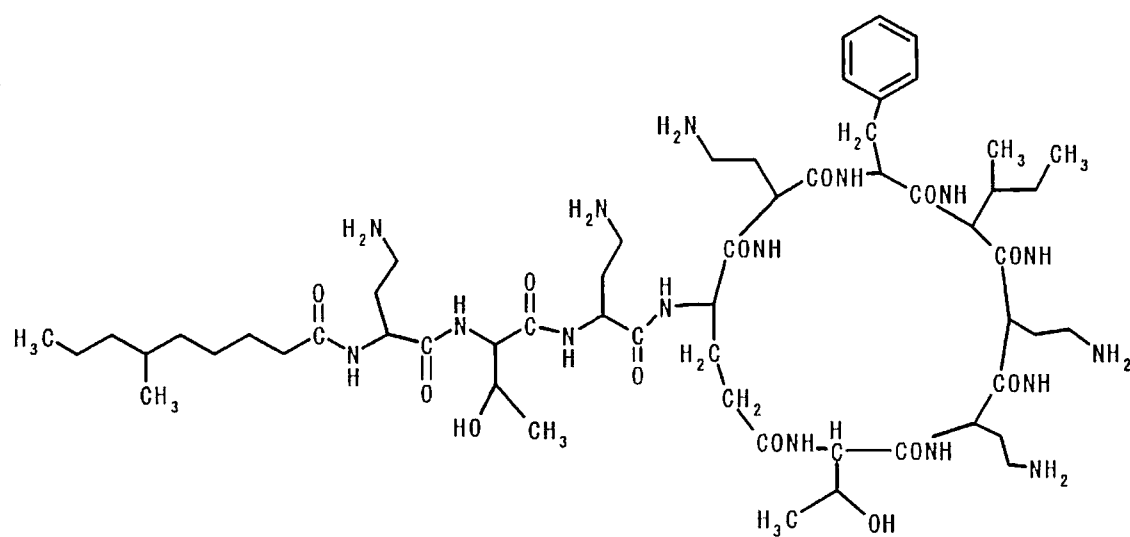


Fig. 1-6 Structure of Polymyxine B

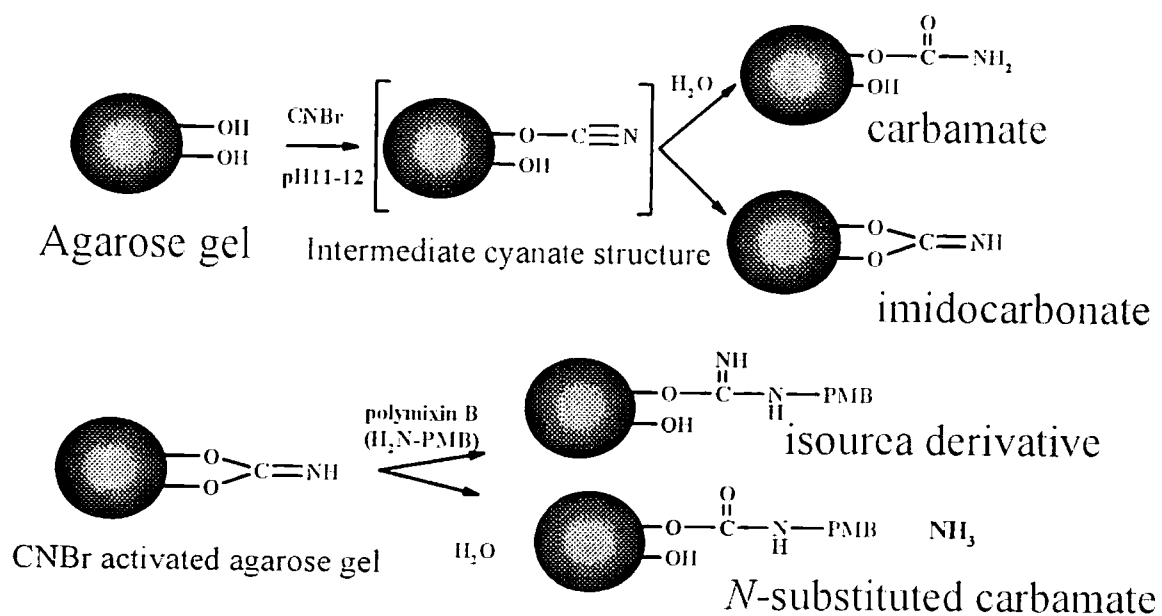


Fig.1-7 Preparation of PolymixinB immobilized agarose

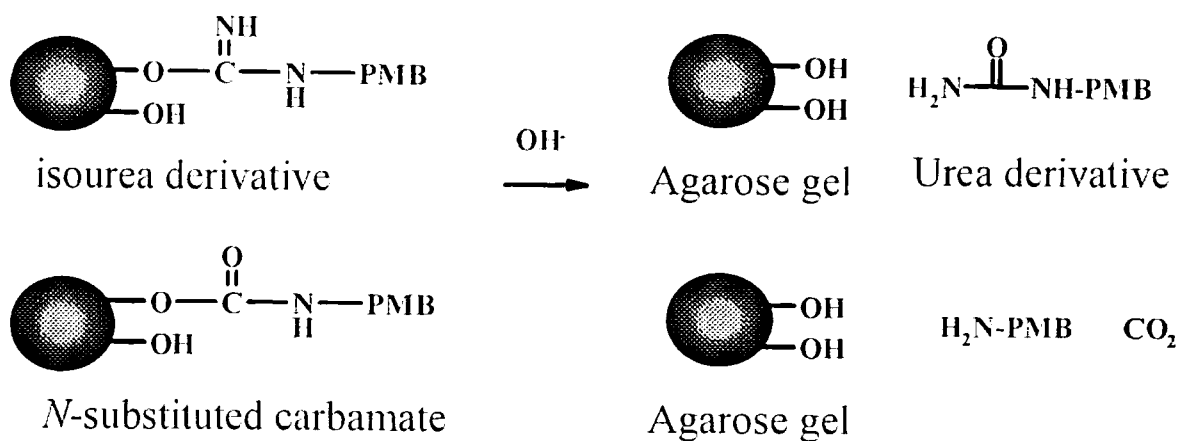


Fig.1-8 The decomposition mechanism of PolymixinB immobilized agarose

3-4) キトサン系吸着粒子

キトサンはキチンを脱アセチル化して得られる多糖類で、その構造はセルロースと類似しているが、セルロースを構成するグルコースの2位がアミノ基に置換されたポリカチオンである。これを球状化した粒子（商品名クリームバ）が開発された。この粒子は牛血清アルブミン中のエンドトキシンを 0.02ng/mL まで減少する事が可能である²⁸。

(3-5) ポリアミノ酸系粒子

アミノ化 PLMG 球状粒子^{29, 30}は、アミノ酸ポリマーであるポリγ-メチル L-グルタメート (PMLG) を平山らの方法^{31, 32}で球状粒子化したものに、ジアミノアルカン類を用いてアミノ基を導入したものである。イオン強度が 0.2~0.44 の範囲では、効率的に BSA から LPS を除去することが可能である。しかし、原料である PMLG に含まれているメチルエステルからのメタノールの脱離の問題があり実用にはいたってない。

1.7 本研究の目的

本研究では、注射用の医薬品、特にタンパク質のような高分子の生体物質の溶液からエンドトキシン=LPS を選択除去するための吸着剤の開発と実用化を目的としている。

LPS は、リン酸エステルに由来するマイナスチャージ、リピッド A の疎水的な脂肪鎖、親水的な糖鎖など多くの吸着ターゲットを有するものである。従来の多くの吸着剤では、使用できる塩濃度が低い、使用できる pH が限られているなどの使用上の制約があったが、これは、単に吸着の駆動力を静電的な相互作用求めているためである。本研究では、LPS との吸着の駆動力を静電的相互作用以外にも疎水的な相互作用も加味し、複合的な吸着を行う吸着剤の開発を行

う。その為には、リガンドの探索、選択が重要であり、特にカチオンポリマーは分子内にイオン交換基と疎水性領域を合わせもつ事が可能であるので、LPSの吸着に重要なリガンドとなる。

選択性の発現としては、リガンドの構造、リガンドの塩基性、リガンドの疎水性などが影響する、リガンド以外では細孔径が重要な要因として挙げられる。これらの各要因の影響を調査し、LPS選択性の高い吸着剤の開発を行う。

このような吸着剤は医薬品のみならず、細胞培養のための培地からのLPS除去、敗血症患者の血液からのLPSの除去等へ応用可能であり、医薬品製造及び医療に貢献しようとするものである。

1.8 第1章の論文

- ¹ Jann, K. et al. *Handbook of Endotoxin*, Vol.1, Ed. R. Proctor, Elsevier, 188, 1984
- ² Holst, O. et al. *Bacterial Endotoxic Lipopolysaccharides*, Vol.1. Eds. D. C. Morrison et al., CRC Press, 135, 1992
- ³ Rietschel, E. T. et al. *Handbook of Endotoxin*, Vol.1, Ed. R. Proctor, Elsevier, 197, 1984.
- ⁴ J. W. Shands, R. W. Chun, *J. Biol. Chem.* **255**, 1221 (1980)
- ⁵ J. W. Shands, et al., *J. Mol. Biol.* **25**, 15, (1967)
- ⁶ F. B. Anspach, D. Pestch, *Process Biochem.* **35**, 1005-1012 (2000)
- ⁷ Liping Li and Robert G. Luo, *Biotechnology Letters*, Vol.19, No.2, 1997
- ⁸ Wang, Y., R. I. Hollingsworth, *Biochemistry*, **35**, 5647-5634 (1996)
- ⁹ Westphal, O., *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **49**, 1, 1975
- ¹⁰ Michie, H. R. et al., *N. Engl. J. Med.* **318**, 1433, 1988
- ¹¹ R. M. Becker, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **69**, 247 (1948)
- ¹² C. A. Stetson, R. A. Good, *J. Exp. Med.*, **93**, 49 (1951)
- ¹³ Edginton, T. S. et al. *Thromb. Res.* **66**, 67 (1991)
- ¹⁴ Cluff, L. E., *Microbial Toxins*, Vol.5, Eds. S. Kadis et al., Academic Press, 399, (1971)
- ¹⁵ 第13改定 日本薬局法
- ¹⁶ 山崎義弥ら, *外科*, **39**(7), 714 (1997)
- ¹⁷ 江端俊彰, 小林謙二, 伝野隆一, 戸塚守夫, 早坂滉, *麻酔*, **29**, 542 (1980)
- ¹⁸ J. P. Nolan, et al., *Am. J. Digest. Dis.*, **17**, 161 (1972)
- ¹⁹ J. P. Nolan, M. V. Ali, *Clin. Res.*, **18**, 386 (1970)
- ²⁰ A. C. Issekutz, *J. Immunol. Methods*, **61**, 275 (1983)
- ²¹ R. Axen, J. Porath, S. Ernback, *Nature*, **214**, 1302 (1967)
- ²² G. I. Tesser, H. U. Fisch, R. Schwyzer, *FEBS Letters*, **23**, 56 (1972)
- ²³ 花沢他, *人工臓器*, **13**(2), 825, 1984
- ²⁴ S. Minobe, T. Watanabe, T. Sato, T. Tosa, I. Chiba, *J. Chromatogr.*, **248**, 401 (1982)
- ²⁵ S. Minobe, T. Sato, T. Tosa, I. Chiba, *J. Chromatogr.*, **262**, 193 (1983)
- ²⁶ S. Minobe, T. Watanabe, T. Sato, T. Tosa, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **10**, 142 (1988)
- ²⁷ H. Matumae, S. Minobe, K. Kindan, T. Watanabe, T. Sato, T. Tosa, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **12**, 129 (1990)
- ²⁸ J. Ida, T. Adachi, M. Hashimoto, H. Ihara, C. Hirayama, *Polym. Preprints JPN.*, **40**, 1082 (1991)
- ²⁹ C. Hirayama, H. Ihara, X. Li, *J. Chromatogr.*, **530**, 148-153. (1990)
- ³⁰ C. Hirayama, M. Sakata, H. Ihara, K. Ohkuma, M. Iwatsuki, *Anal. Sci.*, **8**, 805-810 (1992)
- ³¹ C. Hirayama, H. Ihara, *J. Chromatogr.*, **347**, 357 (1985)
- ³² H. Ihara, T. Yoshinaga, C. Hirayama, *J. Chromatogr.*, **362**, 197 (1986)

第2章 吸着剤の評価方法

2.1 ポアサイズ

吸着剤の性能に影響する要因の一つとして、ポアサイズの大きさが考えられる。吸着剤が多孔質であれば、同等の粒子径の無孔質のものに比べて、表面積が広くなり吸着に有利である。一方、タンパク質溶液からエンドトキシンの選択的な吸着にはポアサイズが大きく影響していることが知られている。従って、吸着剤のポアサイズを測定することが物性評価のために重要である。

吸着剤のポアサイズ測定は、Size Exclusion Chromatography^{1,2}(SEC)による排除限界分子量 (M_{lim}) の測定によって行った。 M_{lim} の測定は以下の方法によって行った。吸着剤を純水に懸濁させ減圧による脱気を2時間行った後、カラム ($\phi 4.6 \times 100\text{mm}$ あるいは $\phi 8.2 \times 300\text{mm}$) に充填した。

分子量標準の溶出体積の測定は、充填カラムを高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) システムにセットし、純水を移動相に使用し 0.5ml/min の流速で分子量標準物質 ($0.1\text{gwt}\%$) を 0.1ml をインジェクションした。検出器は視差屈折計を用いて、インテグレータ (データ処理器) によって溶出時間を求めた。分子量標準は、プルラン MW5800 ~ 853000 (昭和電工)、あるいはマルトース MW342 ~ 1153 (片山化学工業)、重水、低級アルコールを使用した。

M_{lim} の算出は、分子量標準の溶出体積と分子量のプロット (校正曲線) を作成し、式 2-1 に示した直線の式を排除限界体積 V_0 の値まで外挿して M_{lim} を求めた。Fig.2-1 に典型的な校正曲線を示した。

$$\text{Log } M = \beta - \alpha(\text{Ve}/\text{Vt}) \times 100 \quad \text{-----} \quad \text{eq.2-1}$$

Ve : 分子量 M の標準物質の溶出体積

Vt : カラム床の体積

α : 直線の傾き

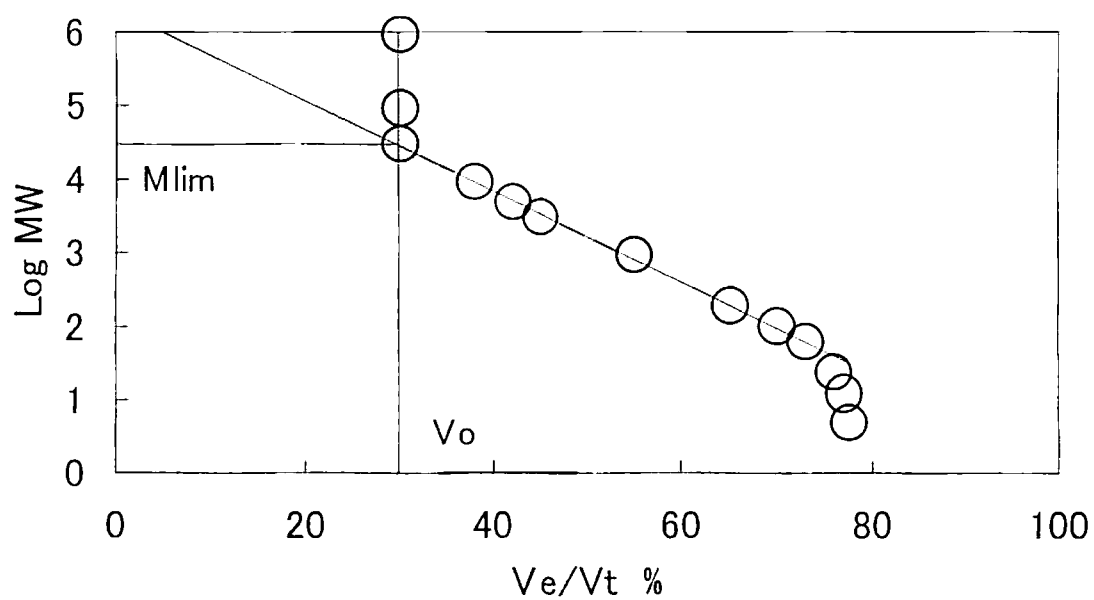


Fig.2-1 Typical calibration curve of SEC

2.2 膨純度

約 2g の吸着剤を 10ml のメスシリンダーに入れ、純水を加えて膨潤させたのち、その容積が変化しなくなるまで沈降させて容積 (V ml) を測定した。その後、吸着剤全量を容器に入れ 48 時間真空乾燥させ重量を測定した。乾燥吸着剤 1 g 当たりの水膨潤体積 = 膨純度 (Sd) は式 2-2 から求めた。

$$Sd(\text{wet-ml/g-dry})=V/(W-W_0) \quad \text{----- eq.2-2}$$

W : 乾燥後の容器の全重量 (容器と乾燥吸着剤)

W₀ : 容器の風袋

V : 膨潤吸着剤の体積

2.3 リガンド導入量

2.3.1 イオン交換容量の測定

吸着剤のイオン交換容量は pH 滴定法³によって定量した。まず吸着剤 5ml をガラスフィルター上でメタノール、アセトンおよびエーテルで洗浄後、24 時間減圧乾燥した。得られた乾燥吸着剤 0.5g を秤量し 100ml の三角フラスコに入れ、0.1N-塩酸水溶液を正確に 25ml 加えた。2 時間攪拌後、試料液を 100ml のメスフラスコにろ取し、蒸留水で 100ml に定容した。この希釈液から 25ml をとり、0.05N-水酸化ナトリウムを用い、フェノールフタレインを指示薬として滴定した。滴定は 3 回繰り返して平均値を求めた。イオン交換容量 (IEC) は式 2-3 により求めた

$$\text{IEC}(\text{meq/g}) = (0.1f_{\text{HCl}} \times V_{\text{HCl}} - f_{\text{NaOH}} \times V_{\text{NaOH}} \times 100/25) \div W$$

-----eq.2-3

f_{HCl} : 0.1N-塩酸水溶液のファクター

f_{NaOH} : 0.05N-水酸化ナトリウムのファクター

V_{HCl} : 0.1N-塩酸の添加量 (ml)

V_{NaOH} : 0.05N-水酸化ナトリウムの滴定量 (ml)

W : 吸着剤の重量 (g)

2.3.2 元素分析あるいは窒素含有量の測定

吸着剤の窒素含量は、元素分析あるいはケールダール法⁴によって定量した。

2.3.3 1級アミノ基定量

吸着剤に導入された1級アミノ基の定量はニンヒドリン法⁵によって定量した。吸着剤 0.1g を 50ml 広口メスフラスコに秤量し蒸留水で定容した。その後マグネチックスターラーで均一なスラリー状態に攪拌しつつ 1ml を取り、20ml の栓付試験管へ入れた。ニンヒドリン試液ワコー（和光純薬製）1ml を加えて沸騰水浴中で 20 分加熱した後、水道水で冷却した。この液に 8ml の 2 メトキシエタノールを加え良く混合し、可視部（570nm）の吸光度を測定した。標準物質として 2 アミノエタノールを 2, 4, 8 μmol/ml を使用して検量線を作成し、アミノ基量を定量した。

2.4 エンドトキシン吸着能の評価

2.4.1 器具の前処理

実験に使用する器具はすべてエンドトキシンフリーのものを使用した。ガラス器具及び金属器具は、清浄に洗浄後乾燥させた後に、アルミ箔で器具が汚染されないように蓋もしくは包装した後に 250℃で3時間の乾熱滅菌を行った。ピペットチップやマイクロプレートなどのプラスチック類の器具はメーカーのエンドトキシンフリーを保証した製品を使用した。

2.4.2 緩衝液

緩衝液は pH 範囲に応じて、酢酸緩衝液 (CH₃COOH-CH₃COONa:pH4-5)、リン酸緩衝液 (Na₂HPO₄-NaH₂PO₄:pH6-7)、トリス緩衝液 (Tris-HCl:pH8-10) を適宜使用した。イオン強度の調節は NaCl を添加することで調節した。イオン強度の算出は式 2-4 によって行った。

$$\text{イオン強度} \quad (\mu) = 1/2 \sum Mi Zi^2 \quad \text{-----eq.2-4}$$

Mi: イオン種のモル濃度

Zi: イオン種の正味の電化数

緩衝液の調整には、注射用蒸留水 (大塚製薬)、あるいは精製水 (ミリQリージェントウォーターシステム) を使用した。試薬が溶解した後に 121℃、20 分の加熱蒸気滅菌を行った。

2.4.3 バッチ法

吸着剤 5ml をガラスフィルター上で、200ml メタノール、0.1M NaOH、2M NaCl 水溶液及びエンドトキシンプリー水で洗浄後、200ml の緩衝液で平衡化した。所定量の吸着剤を 20ml 三角フラスコに移し取り、これに所定量のエンドトキシン溶液を加え、アルミ箔（乾熱滅菌済）をフラスコの口に被せ、25℃で 2 時間攪拌した。攪拌後、上澄をディスポーザブルシリンジ（テルモ 株式会社 2.5ml、ガンマ線照射済）で吸い取り、0.45 または 0.8 μ m のメンブランフィルター（アドバンテック 東洋 株式会社 25CS045AS または 25CS080AS、ガンマ線照射済）でろ過し、試料中の吸着剤を除去した。得られたろ過液中のエンドトキシンの残存濃度を定量することにより、吸着剤のエンドトキシン吸着能を評価した。

2.4.4 カラム法

吸着剤をカラム（例えば日本ミリポア社製のバンデージカラム ID1.1cm）に 1ml 充填した。クロマトグラフィーシステムは、日本バイオラッド社のバイオロジックシステムを用いた。クロマトグラフィー装置全体（Fig.2-2）の、エンドトキシンプリー化は、0.2M 水酸化ナトリウムで洗浄することによって行った。標準的な方法を以下に示す。

クロマトグラフィーシステムの配管類、バルブ類、送液ポンプ、検出器類は事前に 0.2M 水酸化ナトリウムを通液し、次いでエンドトキシンプリー水（PF 水）で洗浄中性まで洗浄し、その洗浄液のエンドトキシンを測定し洗浄の確認を行い、エンドトキシンが検出されなくなるまで（最低でも 0.1EU/ml 以下になるまで）洗浄した。次に、吸着剤を

充填したカラムをシステムにつないで、0.2M 水酸化ナトリウムをカラム体積の2倍以上通液しその後、16時間以上放置した。その後再び、0.2M 水酸化ナトリウムをカラム体積の2倍以上通液し、次いで PF 水で中性になるまで洗浄を行い、更に使用するバッファーで平衡化を行い、平衡化後のカラム出口の溶出液からエンドトキシンが検出されないこと（最大で 0.05EU/ml）を確認後に使用した。

2.4.5 解離定数の算出

吸着剤のエンドトキシン吸着容量と解離定数はバッチ法を用いて評価した。吸着剤の量を一定にし、エンドトキシン濃度の異なる試料溶液を用いてバッチ処理をおこなった。吸着処理前後の試料溶液中のエンドトキシン濃度を比較することにより、吸着剤のエンドトキシン吸着等音線を作成した。同吸着等音線より scatchard plot^{6,7}を算出した。同プロットより得られた直線式より、吸着剤とエンドトキシンの見かけ上の解離定数を算出した。

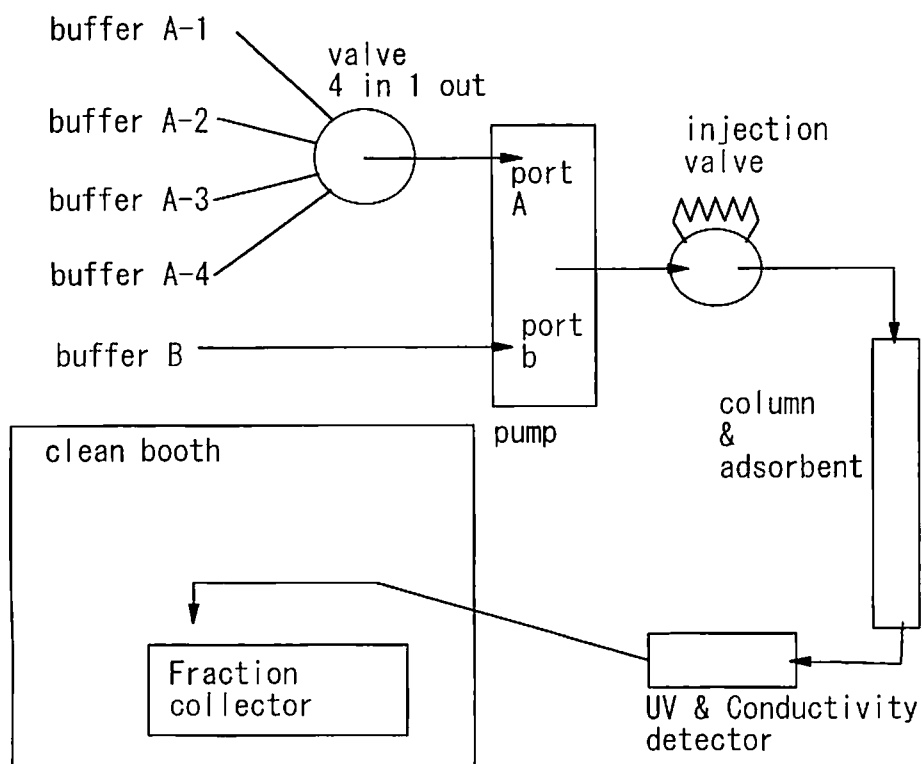


Fig.2-2
Chromatography system for LPS adsorption experiment.

2.5 エンドトキシンの定量方法

エンドトキシンの定量はリムルス試験によって行った。リムルス試験は、カブトガニ (*Limulus polyphemus*: 北米産カブトガニ) の血球抽出液 (amebocyt lysate) がエンドトキシンにより凝固する現象を利用したものである。この試験はカブトガニに因んで、リムルス試験あるいは LAL 試験 (*Limulus amebocyt lysate*) と呼ばれている。この凝固のメカニズムは、岩永ら⁶に明らかにされた。Fig. 2-3 にゲル化の機構を示す。

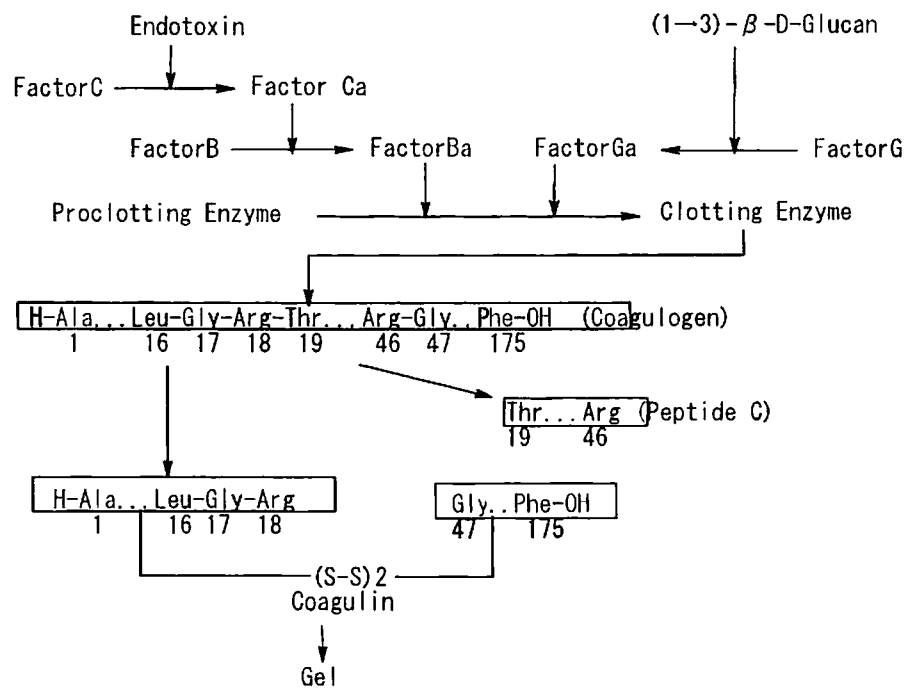


Fig.2-3 Gelation mechanism in limulus test

リムルス試験の凝固反応は、哺乳類の血液凝固系に類似したカスケード反応系で起こる。従って少量のエンドトキシンのシグナルを増幅して凝固が引き起こされるもので、非常に高感度な測定系である。まずエンドトキシンが C 因

子を活性化し Ca 因子とし、これが B 因子を活性化し Ba 因子を生成する。Ba 因子はプレ凝固酵素を凝固酵素に活性化し、これが凝固タンパク質（コアギュロゲン）を加水分解する。凝固タンパク質の分解物はジスルフィド結合をしてコアギュリンとなり、これがさらに集まりゲル化する。一方、微量の β -D-グルカンは G 因子を活性化し、Ga 因子を生成する。Ga 因子は Ba 因子と同様な働きをして、結果的にゲル化を引き起こす系⁹が知られている。

本実験では、比濁時間法と発色合成基質法を適宜使い分けてエンドトキシンの定量を行った。

2.5.1 比濁時間法

和光純薬製の ES-II -Test Wako とトキシノメータ 208 型を用いて比濁時間法によりエンドトキシン濃度を定量した。リムルス試薬（ES-II -Test Wako）を 100 μ l 入れたトキシノメータ専用試験管に、検体 100 μ l を添加し、2～3 秒間泡立てないように攪拌した。試験管にアルミキャップをして、トキシノメータシステムにセットしてゲル化時間を測定した。

比濁時間法は、リムルス試薬のゲル化時間とエンドトキシンの濃度が比例することを測定原理としている。本システムでは、ゲル化時間の測定を透過光の変化として捕らえて試料の反応開始から一定の濁度に達するまでの反応時間としてエンドトキシン量を定量する。

反応初期の透過光量 (I_0) に対する t 時間の透過光量を $I(t)$ とし、その比を $R(t)$ とすと、 $R(t)$ の時間変化は Fig.2-4 に示したようになる。そこでその変化に対して閾値 R_{th} を設定し、スタートから $R(t)$ が R_{th} になるまでの時間 T_g をゲル化時間とする。Fig.2-5 に示したように、 T_g とエンドトキシンの対数プロットは、相関を示す。

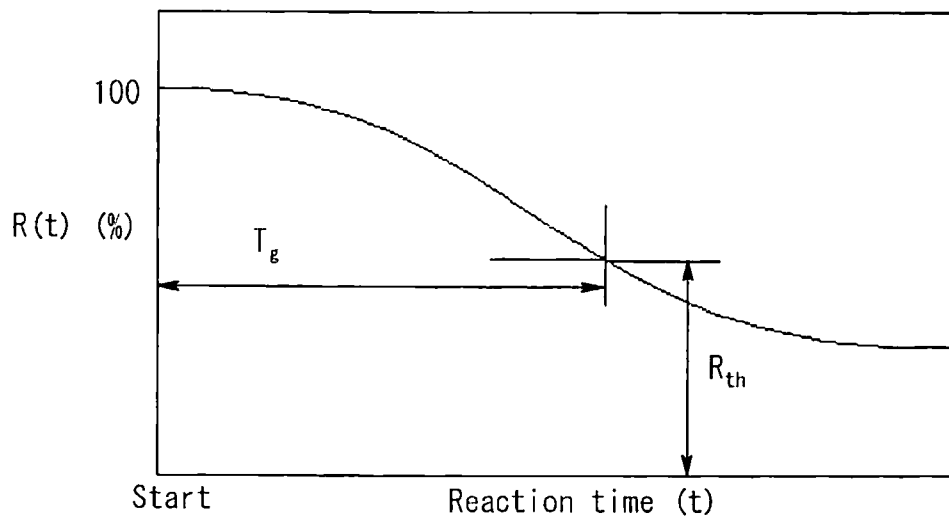


Fig. 2-4 Transmitted light intensity curve

R_t : $[I_t/I_0] \times 100(\%)$

I_t : Transmitted light intensity

R_{th} : Decision value of (R_t)

T_g : Gelation time

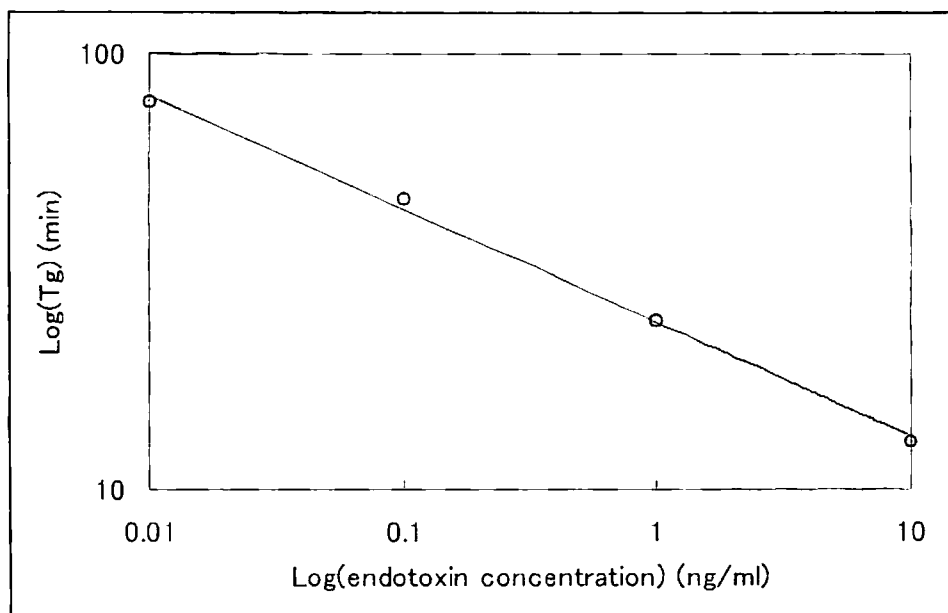


Fig.2-5 Typical calibration curve in determination of endotoxin concentration

2.5.2 発色合成基質法

生化学工業製のエンドスペーシーとウエルリーダーSK603（マイクロプレート用自動吸光度計）を用いてカイネチック比色法によりエンドトキシンの定量をした。エンドトキシンプリーのマイクロプレートに50 μ の検体を入れ次いで、リムルス試薬（エンドスペーシー）50 μ lを加えた。その後、すぐにウエルリーダーSK603にマイクロプレートをセットして吸光度変化を測定した。

比濁時間法ではリムルス試薬中のコアギュリンが加水分解しゲル化＝濁度増加を測定している。発色合成基質はコアギュリンの代わりに発色合成ペプチドを使用しその加水分解速度からエンドトキシン濃度を求める。ここで使用する発色合成基質は、コアギュリンのアミノ酸配列の一部であるLeu-Gly-ArgのArgのカルボキシル基に*p*ニトロアニリン(*p*NA)がペプチド結合したものである。クロティンゲ酵素はこの発色合成基質を加水分解し、*p*NAを遊離する（Fig.2-6）

発色合成基質法の測定原理は、エンドトキシン濃度と合成基質の加水分解により生じる*p*NAの濃度が比例することによる。測定方法には、一定時間後の吸光度を用いるエンドポイント法と加水分解反応の初速度を用いるカイネチック法（Rate法）があるが、本実験ではRate法を採用した。Rate法の典型的な反応曲線をFig.2-7に示した。反応の初速度は反応曲線の立ち上がり部分における接線の傾きとして得られ、単位時間当たりの吸光度変化（Abs./min）として表す。各濃度のエンドトキシンの測定した初速度とエンドトキシン濃度をプロットは、相関を示す。

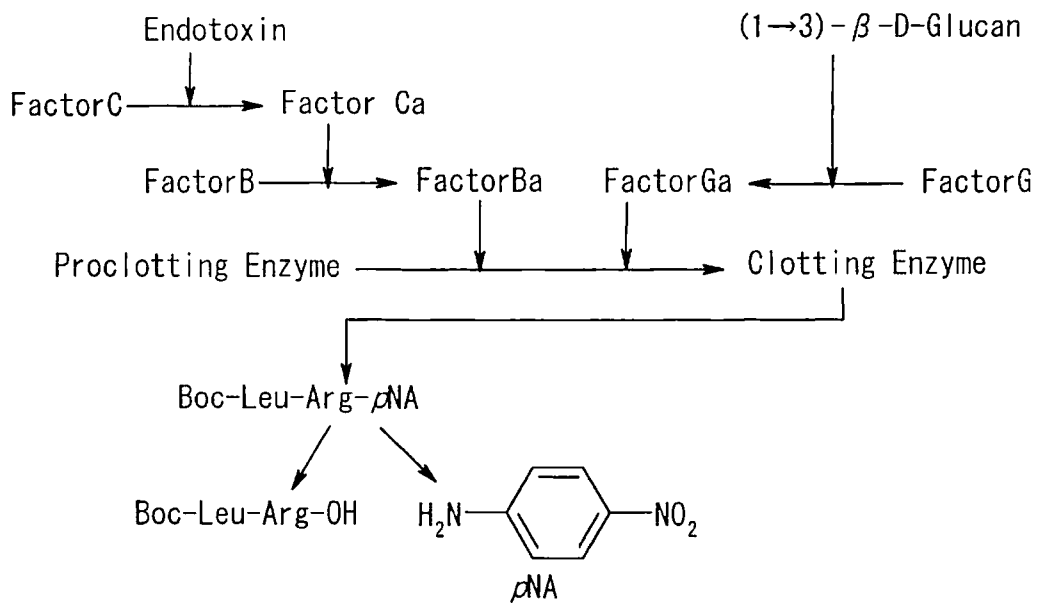


Fig.2-6 Chromogenic mechanism in limulus test

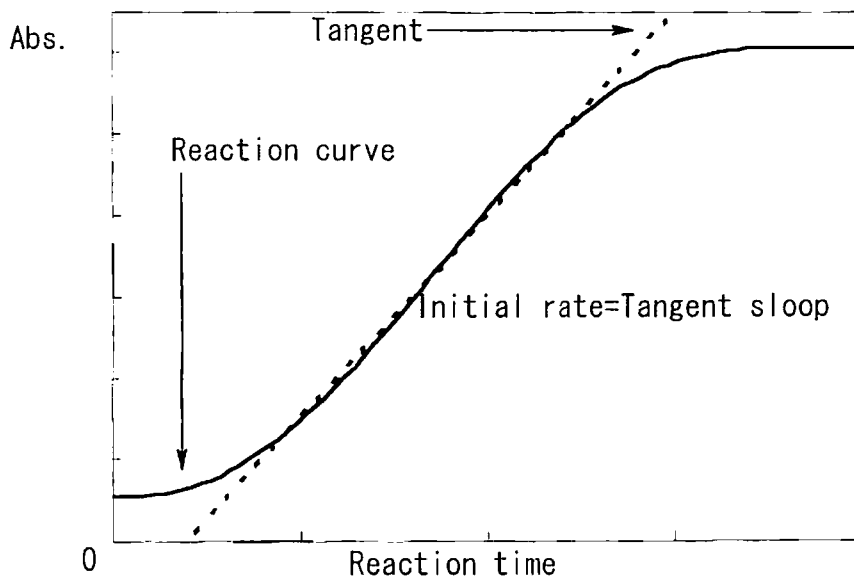


Fig.2-7 Chromogenic reaction curve of LAL test

2.6 タンパク質の定量方法

タンパク質はフェニルアラニン、トリプトファンなどの芳香環を有するアミノ酸を含有するため紫外部に吸収を持つことが知られている。特に精製した純品のタンパク質は固有に分子吸光係数を持ち、タンパク質の定量が可能である。このためタンパク質の定量法の一つとしてUV測定法がある¹⁰。但し、UV測定法は紫外線を吸収する他の物質によって妨害される。しかし、本実験のうちで、純品のタンパク質を使用する場合は他の妨害物質はほとんどなく問題なく測定が可能である。

測定方法は、島津製作所製UV-160スペクトロメータを用いて、セルは石英セル（光路長1cm）を使用した。吸光度は280nmで測定したが、サイトクロームCだけは415nmで測定した。測定は各々3回繰返し、平均値を求め測定値とした。

2.7 第2章の論文

-
- ¹ K.A. Cranath, P. Flodin, *Makromol. Chem.*, **48**, 160 (1961)
 - ² 平山忠一, 本里義明, 日本化学会誌, 1975(8), 1352(1975)
 - ³ C.Hirayama, H.Ihara, X.Li, *J.Chromatogr.Biomed.Appl.*, **530**, 148 (1990)
 - ⁴ P.C.Williams, *J.Sci.Fd Agric.*, **24**, 343 (1973)
 - ⁵ S.Moore, W.H.Stein, *J.Biol.Chem.*, **176**, 367(1954)
 - ⁶ S.Minobe, T.Watanabe, T.Sato, T.Tosa, *Biotechnol.Appl.Biochem*, **10**, 142(1988)
 - ⁷ H.Matsumae, S.Minobe, K.Kindan, T.Watanabe, T.Sato, T.Tosa, *Biotechnol.Appl.Biochem*, **12**, 129(1990)
 - ⁸ S.Iwanaga, T.Morita, T.Harada, S.Nakamura, M.Niwa, K.Tanaka, T.Kimura, S.Sakakibara, *Haemosrasis*, **7**, 183(1981)
 - ⁹ A.Kakinuma, T.Asano, H.Torii, Y.Sugino, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 434(1981)
 - ¹⁰ A.Bensadoun, D. Weinstein, *Anal. Biochem.*, **70**, 241 (1976)

第3章 吸着剤の設計と合成

3.1 アミノ化 PMLG 球状粒子

平山らは、1986年にポリアミノ酸の一種であるポリ(γ-メチル L-グルタメート)(PMLG)を球状粒子化にすることに成功し、PMLG 粒子表面の2次構造や空孔径に基づくタンパク質への特異吸着が認められること、さらに同粒子のグルタミン酸の側鎖にジアミノアルカン類をリガンドとして導入したアミノ化 PMLG 球状粒子^{1,2}が、高いエンドトキシン吸着能を保有することを報告してきた。本研究においてもアミノ化 PMLG を比較するために調製し、実験に供した。Fig.3-1 にアミノ化 PMLG 吸着剤の調製法と構造を示した。

3.1.1 PMLG 球状粒子の調製

PMLG の粒子化は、ポリマーを粒子化する方法の一つである溶媒除去法によって行った。同法は、適当な媒体中に懸濁されたポリアミノ酸溶液の液滴中から溶媒を除去する方法で平山らにより開発された懸濁蒸発法^{3,4,5}である。

(1) 試薬

アミノ化 PMLG 球状粒子の調製に用いた PMLG (Type F-8000 重合度 1,000) は、味の素(株)より提供を受けた。同 PMLG は 1,2 ジクロロエタン中でγ-メチル L-グルタメートの Nカルボキシ無水物の縮合重合によって合成されたものである。また、懸濁媒体として用いた部分酢化ポリビニ

ルアルコール GH-20 は、日本合成（株）より購入した。リガンドとして用いたジアミノエタン（無水物、特級）は関東化学（株）より、希釈剤として用いたジ（2エチルヘキシル）フタレート（特級）はナカライテスク（株）より購入した。

(2) 懸濁媒体の調製法

2.5%部分酢化ポリビニルアルコール水溶液 1800ml を調製し、セパラブルフラスコに入れ、恒温槽を用いて温度を 60℃ に保ちながらステンレス製の攪拌羽根及びパワーミキサー PN-40 型（テラオカ製）を用いて 2 時間攪拌した。

(3) ポリマー溶液の調製法

細孔径が $M_{lim}300$ 以下の粒子を調製する場合は、PMLG-F-8000 溶液に 2wt%PMLG 溶液になるように 1,2-ジクロロエタン（特級、ナカライテスク（株））を加え 300ml とし、オイルバスを用いて 100℃ に保ちながら 6 時間攪拌したものをポリマー溶液とした。多孔性粒子（ $M_{lim}2,000-400,000$ ）を調製する場合には、上記の PMLG 溶液にさらに希釈剤としてジ（2エチルヘキシル）フタレートを 8-16ml（1-2ml/dry-g PMLG）になるように添加し、同様な条件で攪拌したものをポリマー溶液とした。

(4) 懸濁蒸発法

先に調製した懸濁媒体 1800ml の入ったセパラブルフラスコ中に、ポリマー溶液 300ml を室温まで温度を下げた後、いっきに加え（ポリマー溶液：懸濁媒体 = 1 : 6）、60℃ を保ちながら 1,2-ジクロロエタンの臭いがなくなるまで、

24-36 時間攪拌した。1-2 時間毎に懸濁溶液をサンプリングし、顕微鏡で観察しながら、液滴の粒径が $70\mu\text{m}$ 前後になるように攪拌速度 (500-560rpm) を調節した。

(5) 粒子の洗浄、分級

得られた粒子はろ布 (東レシルク #8700) を張ったブフナーロートを用いて、ろ取することにより回収し、粒子の 300 倍量の熱水 (60°C) を用いて、ろ布上で洗浄した。その後粒子の 50 倍量のメタノール (1 級、ナカライテスク (株)) で同様な洗浄を行った。多孔質粒子の場合は、メタノール洗浄の前に、アセトン (1 級、ナカライテスク (株)) を用いたソクスレー抽出法により、希釈剤を除去した。得られた膨潤粒子を $44\mu\text{m}$ 及び $105\mu\text{m}$ の網目サイズのふるい器上で水を流しながら分級し、粒径 $44\mu\text{m}$ - $105\mu\text{m}$ の粒子を得た。得られた粒子はメタノール中に保存した。

(6) アミノ化

PMLG 球状粒子 30ml をろ布 (東レシルク #8700) を張ったブフナーロート上で、メタノールを用いて十分洗浄後、軽く減圧ろ過した状態で湿潤粒子として回収した。同湿潤粒子をサンプル管にとり、室温下で 72 時間真空乾燥させた。得られた乾燥粒子 5g を還流冷却管に取り付けた 300ml 用三つ口フラスコに入れ、これに 25-75vol% ジアミノエタンのメタノール溶液を 100ml 添加した。ウォーターバスで 60°C に保ちながら粒子が沈まない程度攪拌した。

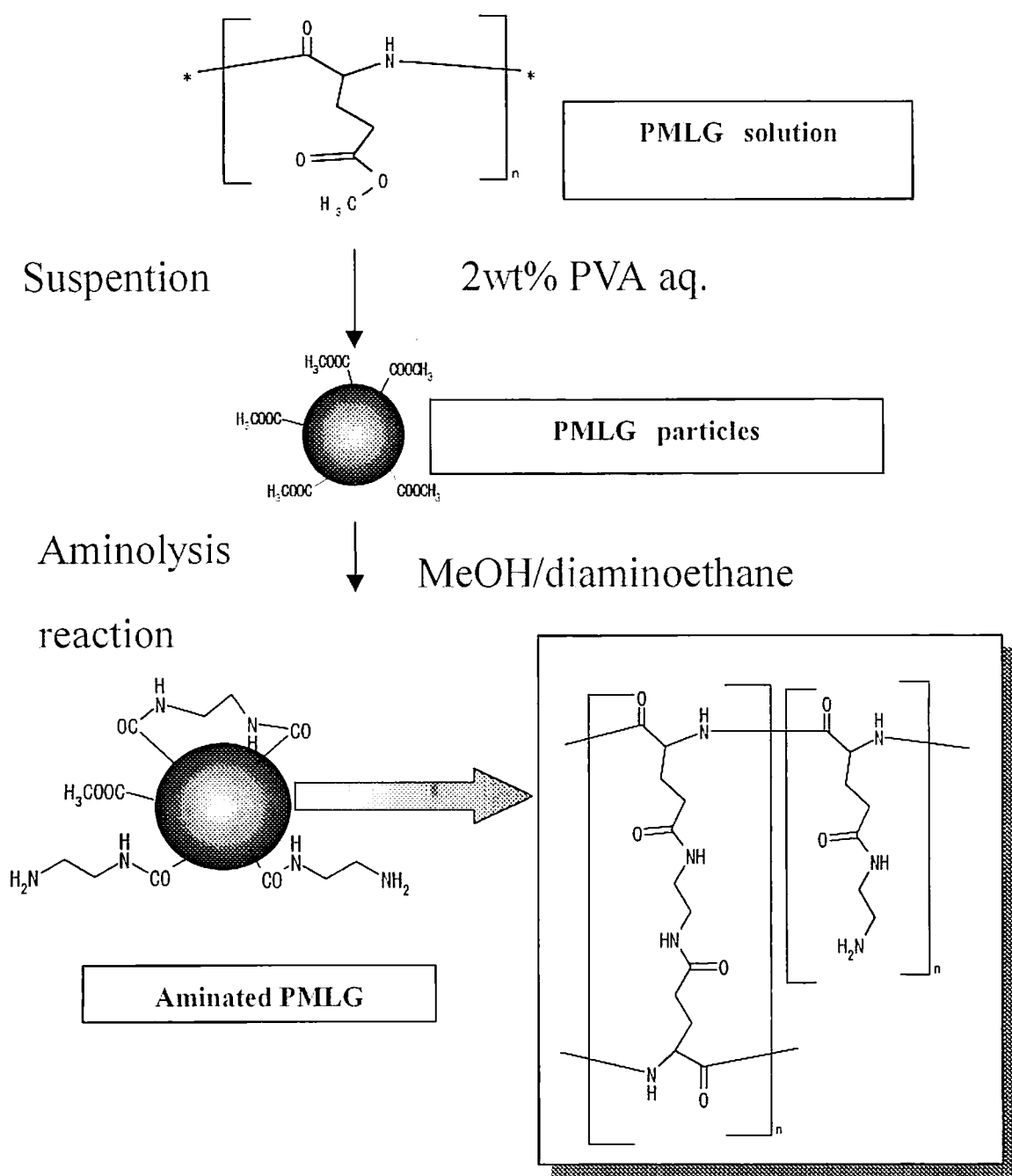


Fig.3-1 Preparation of aminated PMLG adsorbents

アミノ基導入量は、メタノールとジアミノエタンの混合比と反応時間を調節することによって制御した。アミノ化終了後ろ布上で回収し、メタノールで十分洗浄した後、メタノール中で保存した。

3.2 橋かけ *N,N*-ジメチルアミノプロピルアクリルアミド (DMP)吸着剤の調製法

3.2.1 吸着剤の設計

アミノ化 PLMG 粒子は、幅広いイオン強度で高いエンドトキシン吸着能を持つが、同吸着剤は化学構造としてメチルエステルを含有しており、吸着剤の再生に用いるアルカリ洗浄時に加水分解を起こし、メタノールの遊離とカルボキシル基の生成が起こる問題点がある。

これらの欠点を補う新規なエンドトキシン吸着の設計、合成を試みた。そこで、アミノ基含有アクリルアミド系モノマーを素材とした吸着剤の合成を検討した。同モノマーは①種々の橋かけ剤との共重合が可能であり、橋かけ剤の種類を変えることで吸着剤の疎水性に変化を持たせることが可能である、②モノマー自体がカチオン性のリガンドを持っており、粒子化後のアミノ化反応は不要である。③モノマーの仕込み比を調節することで吸着剤のアミノ基含量を容易に調節できる、④希釈剤を用いることで多孔化が容易にできるため、比表面積および細孔径の制御ができる、⑤リガンドはアミド結合であるため、耐アルカリ性を示す、等の利点が挙げられる。

本研究では、上記の利点を有するアクリルアミド系モノマーと種々の橋かけ剤との共重合を行い、塊状体および球状粒子を合成した。得られた合成物のエンドトキシンおよ

びタンパク質の吸着能を調査し、新規エンドトキシン選択吸着剤の検索を行った。Fig.3-3 に DMP 吸着剤の調製方法と構造を示す。

(1) モノマーの合成と精製

吸着剤合成に使用したモノマーは（株）興人より提供を受けた。合成に用いた試薬を Table3-1 に示す。また種々のモノマーおよび橋かけ剤の構造を Fig.3-2 に示す。

・ *N*-allylacrylamide(AA)の合成

温度計 (-50~50℃)、攪拌装置 (テフロンパドル)、滴下ロート、NaOH 管 (HCl 吸収用) をセットした 4 口丸底フラスコ (1 L) にアリルアミン 127.1 g (2.21 mol)、フェノチアジン 1.13 g、クロロホルム 400 ml を加え、攪拌下で -10℃ まで冷却した。冷却した後、アクリル酸クロライド 100 g (1.10 mol) を滴下した。滴下は反応温度が -10℃ 以下になるように行った。滴下後、温度を -10℃ に保ち 2 時間攪拌した。得られた合成物をろ過し、析出した結晶 (アリルアミン塩酸塩) を除去した。ろ過液を水洗 (抽出) し、クロロホルム中のアリルアミン塩酸塩を除去した後、エバポレーターでクロロホルムを除去し、反応混合物を濃縮した。さらに濃縮物を減圧蒸留にて精製し目的物を得た。

・ *N,N*-butylene-bis-methacrylamide(BBMA)

BBMA の合成も 1,4 ジアミノブタンとアクリル酸クロライドから、AA の方法と同様にして行った。

・ メチルヒドロキノン (MHQ) の除去

市販モノマーからの MHQ の除去は減圧蒸留によって行った。蒸留条件を Table3-2 に示す。

Table 3-2 Remove condition of MHQ .

Reagents	Temp. (°C)	Pressure (mmHg)
<i>N,N</i> -dimethylacrylamide(DMAA)	38.5	0.50
<i>N,N</i> -dimethylaminopropylacrylamide(DMP)	101.0	0.20
<i>N,N</i> -dimethylaminoethylacrylate(DMAEA)	32.5	0.30
Acryloyl chloride	25.0	35

(2) その他の試薬の精製

・ divinylbenzen(DVB)の精製

0.1N NaOH にて重合禁止剤 *tert*-ブチルカテコールを抽出した。その後イオン交換水でアルカリ性を示さなくなるまで洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水したものを使用した。

・ *N,N*-methylen-bis-acrylamide (MBAA) の精製

エタノール中に MBAA を溶解させ、一夜冷蔵庫内で冷却し、析出した結晶をガラスフィルターでろ過後真空乾燥した。

・ 2,2-azobis-isobutyronitrile(AIBN)の精製

メタノール中に AIBN を溶解させ、一夜冷蔵庫内で冷却し、析出した結晶をガラスフィルターでろ過後真空乾燥した。

・ Triallylcyanurate(TAC)の精製

エーテルに TAC を溶解後、0.1N NaOH 溶液で抽出、イオン交換水で洗浄を行った。無水硫酸ナトリウムで脱水後、減圧濃縮した。

(3) 橋かけ *N,N*-ジメチルアミノプロピルアクリルアミド (DMP) 球状粒子の調製

DMP モノマーは親水性で且つ、ほとんどの有機溶剤に溶解する両親媒性の化合物であるため、通常の水系懸濁蒸留を行うことができない。本研究では、このようなモノマーの水系懸濁重合のひとつである、無水硫酸ナトリウムを過飽和に溶解させた懸濁媒体を用いる方法により球状粒子を得た。同重合法による橋かけ DMP 粒子の調製法を Fig.2-10 に示す。

(4) 分散媒の調製

500ml 三角フラスコ中の熱水 250ml に無水硫酸ナトリウム 90g を完全に溶解させた。その後、カルボキシメチルセルローズ (CMC)2.5g を徐々に加え、溶解させ分散媒を調製した。

(5) モノマー液の調製

30ml サンプル管中に DMP と橋かけ剤 (AA, DVA, BBMA)

を所定のモル比で仕込、十分に攪拌した。多孔質粒子調製の場合にはこのとき、所定量の希釈剤（1-ヘキサノール、ジエチルベンゼンあるいはクロロホルム）を加え十分に攪拌した。この液をモノマー液とし、重合開始前の1時間窒素ガス通気を行った。

(6) 懸濁重合

還流冷却管を付けた 500ml セパラブルフラスコ中に、分散媒を加え 60℃で、窒素ガスを通気しながら 300rpm で1時間攪拌した。モノマー液に対して 1wt% の AIBN を加えて完全に溶解させた。この液 30ml を分散媒に滴下した。60℃を保ちながら攪拌し、1～2時間毎に懸濁液を微量抜き取り、顕微鏡で観察しながら、平均粒径が 70 μ m になるように攪拌速度（500-650rpm）を調製した後、温度を 80℃まで昇温し、18時間反応を行った。

(7) 粒子の洗浄・分級

得られた粒子はろ布（東レシルク #8700）を用いてろ別し、粒子の 300 倍量の熱水を用いて洗浄した。洗浄後、CMC は除去されにくいので更に 80℃で攪拌、温浸した。この操作を数回繰返した。多孔質粒子の場合は希釈剤除去のためにここでアセトン温浸を行った。その後粒子の 50 倍量のメタノール、エタノール、アセトンを用いて洗浄し未反応モノマーの除去を行った。得られた湿潤粒子を 44 μ m 及び 105 μ m の網目サイズの篩器上で水を流しながら分級し、粒径 44～105 μ m の粒子を吸着剤として用いた。

Table3-1 Reagents for preparation of adsorbent

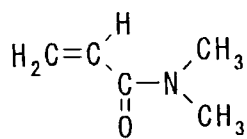
Reagent	Grade	Maker
<i>N,N</i> -dimethylacrylamide		Ko
<i>N,N</i> -dimethylaminopropylacrylamide		Ko
<i>N,N</i> -dimethylaminoethylacrylate		Ko
<i>N,N</i> -butylene-bis-methacrylamide		Ko
Divinylbenzene		Ki
Piperazine diacrylamide		B
<i>N,N</i> -methylene-bis-acrylamide	GR	Ka
Triallylcyanurate	GR	W
Allylamine	EP	W
Carboxymethyl cellulose sodium salt		W
Chloroform	EP	W
2,2-azobis-isobutyronitrile	GR	W
Acryloyl chloride	EP	T
Phenothiazine	EP	T
1-butanol	GR	N
1-hexanol	GR	N
Sodium sulfate anhydrous	GR	N
Acetone	EP	N
Methanol	EP	N
Ethanol	EP	N
Sodium hydroxide	GR	N

Abbreviation

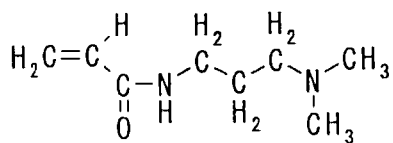
Grade , GR : Guaranteed Reagent , EP : Extra Pure

Maker , Ko : Kohjin , Ki : Kishida Chemical , B : Bio-Rad Laboratories ,

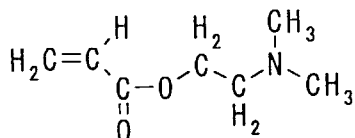
W : Wako Pure Chemical , T : Tokyo Kasei Kyogyo , N : Nacalai Tesque



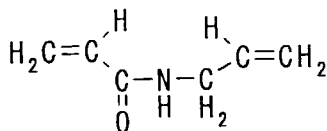
DMAA
N,N-dimethylacrylamide



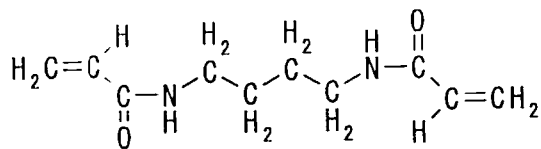
DMP
N,N-dimethylaminopropylacrylamide



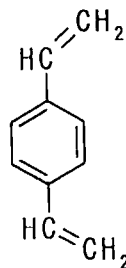
DMAE
N,N-dimethylaminoethylacrylate



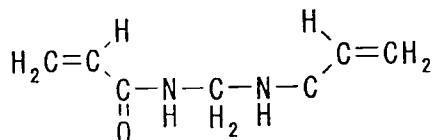
AA
N-allylacrylamide



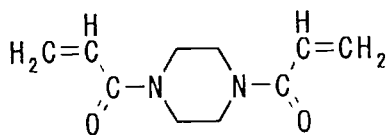
BBMA
N,N-butylene-bis-methacrylamide



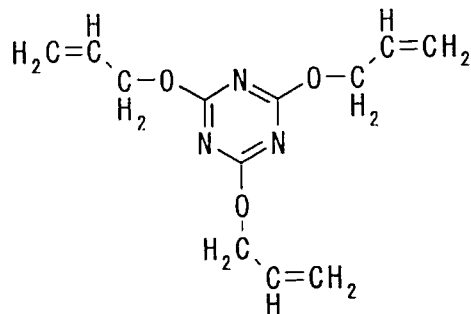
DVB
Divinylbenzene



MBAA
N,N-methylene-bis-acrylamide



PDA
Piperazine diacrylamide



TAC
Triallylcyranurate

Fig.3-2 Structures of monomers.

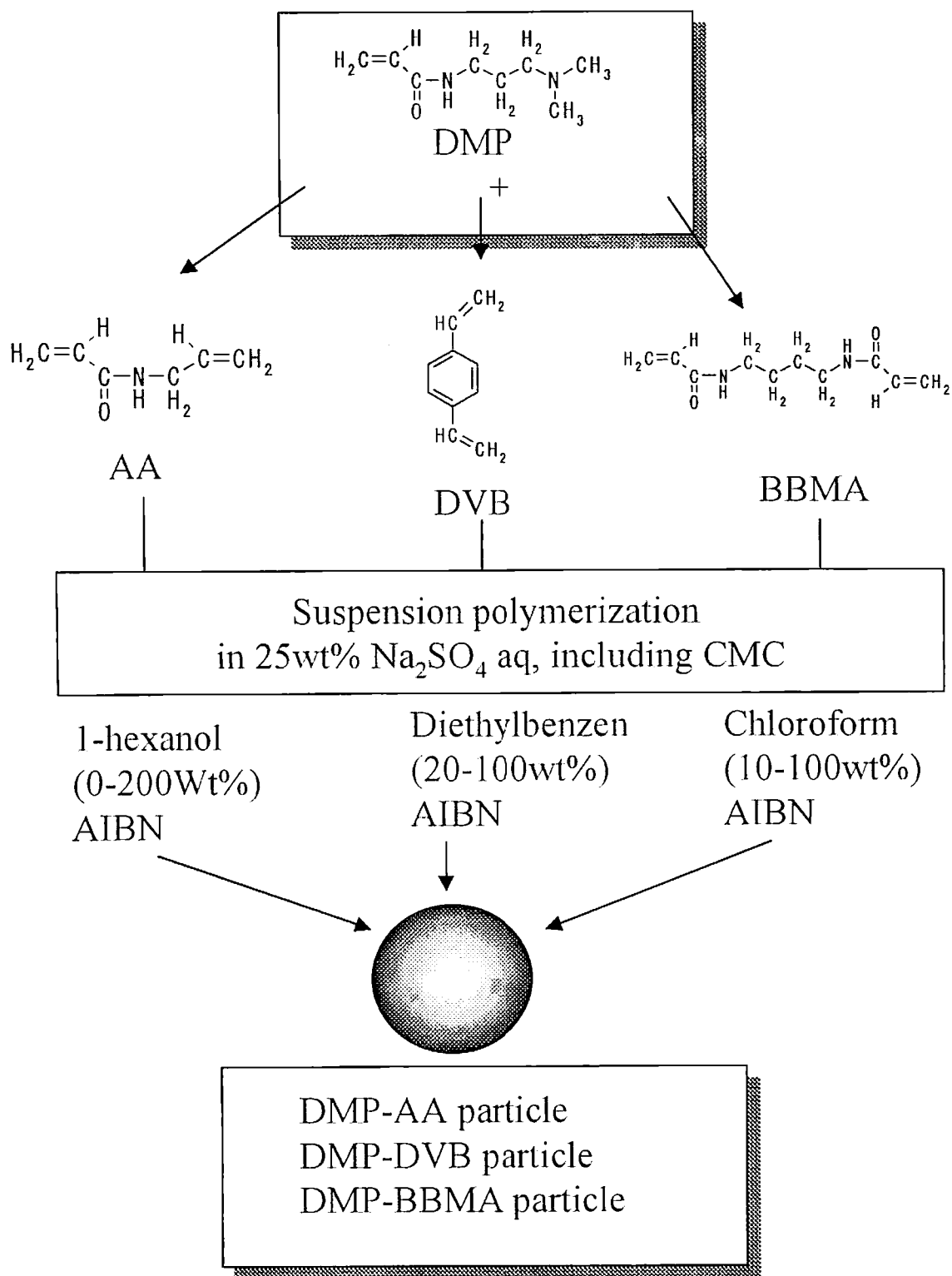


Fig.3-3

Preparation of various cross-linked DMAPAA spherical particles.

3.3 橋かけポリ(ε-リジン)吸着剤の調製法

3.3.1 吸着剤の設計

本研究では、LPSの吸着剤としてポリ(ε-リジン)を使用している。ポリ(ε-リジン)は次の理由でLPS吸着剤の材料として適すると考えられる。(1)アミノ基含有の天然アミノ酸ポリマーであり、球状化のみでカチンオン性の吸着剤の調製が可能である。(2) pK_a が低い(7.5)ため酸性物質の吸着が緩和される。(3)アミノ酸のポリマーであり生体親和性が高いことが期待される。(4)合成品のポリ(α-リジン)に比較して安価である。

ポリ(ε-リジン)はShimaとSakai⁶によって発見された新規なL-リジンのホモポリマーであり^{7,8}、土壌から分離された微生物 *Streptomyces albulus* の生産する生理活性二次代謝産物である。

ポリ(ε-リジン)はFig.3-4に示したように、リジンのε位のアミノ基がペプチド結合を形成しており、そのためα位のアミノ基が遊離している。ポリ(ε-リジン)の平均重合度はおよそ35-40程度ある。

一方、αポリリジンは、LysのNカルボキシ酸無水物(NCA)を重合させて作られる⁹。アミノ酸のNカルボキシ酸無水物は、α位のアミノ基とカルボキシル基で形成されるため、この方法ではポリ(ε-リジン)は合成できない。Fig.3-5にポリ(α-リジン)の合成法を示した。ポリ(α-リジン)は、NCAを重合させる時の重合剤を水、アルカリ、アミン、アルコキシドなどを適宜用いることで重合度が数十～数千のものが得られる。

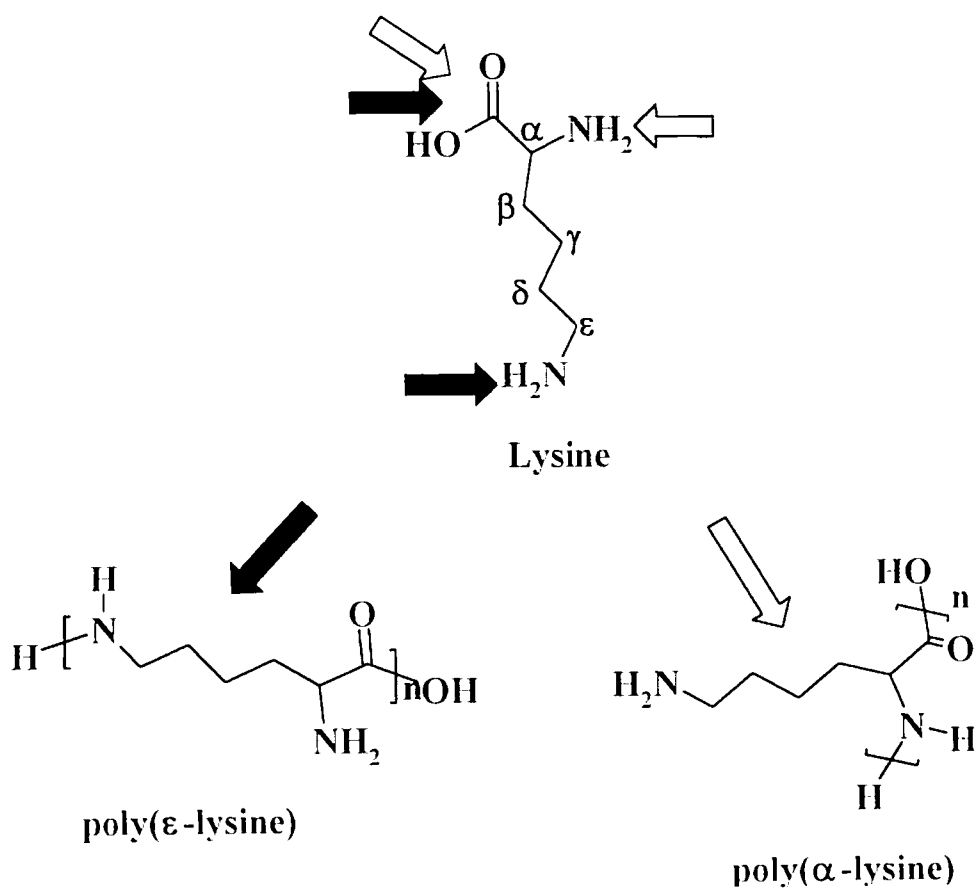
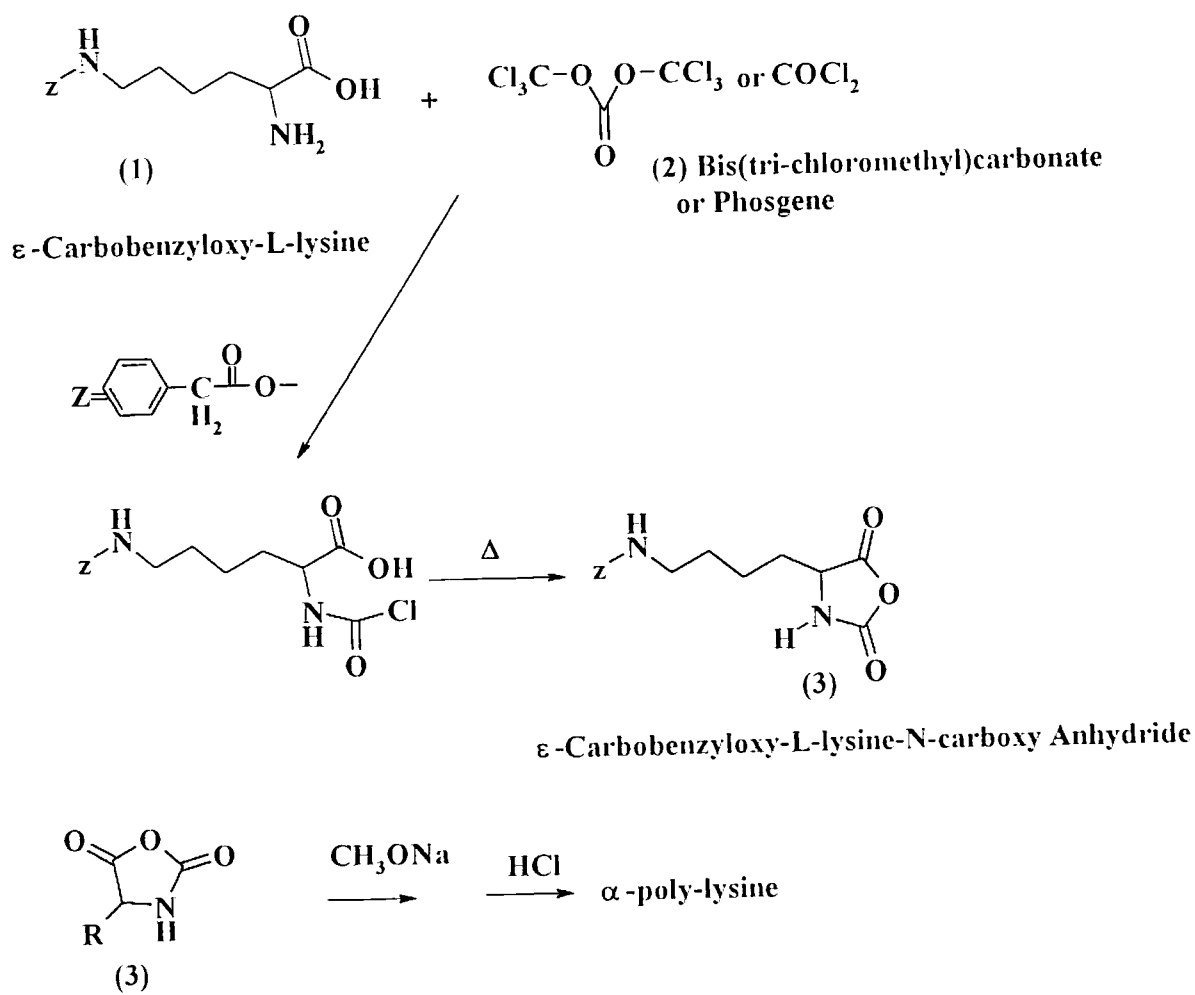


Fig.3-4 Structure of Poly-lysine

Fig.3-5 Synthesis of poly(α -lysine)

ポリ(α -リジン)は、試薬メーカーで販売されているが、非常に高価であり大量に使用するにはコストが高くなり過ぎる。工程を簡単に考えてもリジンの ϵ 位の保護、NCAの合成、重合、脱保護基、精製と煩雑である。一方、ポリ(ϵ -リジン)は発酵法で製造されておりその価格はポリ(α -リジン)に比べて非常に安価である。その為、工業スケールで使用可能なリガンドとしてはポリ(ϵ -リジン)がコスト的に有利である。

ポリ(ϵ -リジン)のもう一つの利点としては、 pK_a 値がポリ(α -リジン)に比べて低い点が上げられる。 pK_a は塩基性の強さを示す尺度と考えられ、 pK_a が高過ぎるとタンパク質の吸着も強くなり、LPSの選択除去に影響を与える。ポリリジンでは遊離するアミノ基の位置に起因し、単量体リジンの pK_a 値¹⁰は ϵ 位 9.74 > α 位 8.95のようになっている。従って ϵ 位の遊離アミノ基を持つポリ(α -リジン)は、ポリ(ϵ -リジン)よりも pK_a が高い。Fig.3-6に橋かけポリリジン吸着剤の調製方法と構造を示した。

3.3.2 橋かけポリ(ϵ -リジン)吸着剤の調製

ポリ(ϵ -リジン)は水溶性であるため、架橋反応によって不溶性の粒子を得た。ポリリジン水溶液を非水溶性の分散媒中に入れ、界面活性剤により液滴を形成しそこに架橋剤を加える方法によって球状粒子を得た。

(1) 試薬

橋かけポリ(ϵ -リジン)吸着剤の調製に用いた試薬をTable.2-3に示した。

Table.3-3 Reagents for preparation of adsorbents

Reagent	Grade	Maker
25% Poly(ϵ -lysine) solution		Chisso corp.
Chloromethyloxirane	EP	Nacalai Tesque
Liquid Paraffin	EP	Nacalai Tesque
Hexane	EP	Nacalai Tesque
Sorbitan Monooleate (NOFABLE SO-851S)		NOF corp.
Methanol	EP	Nacalai Tesque
Ethanol	EP	Nacalai Tesque

EP:Extra Pure

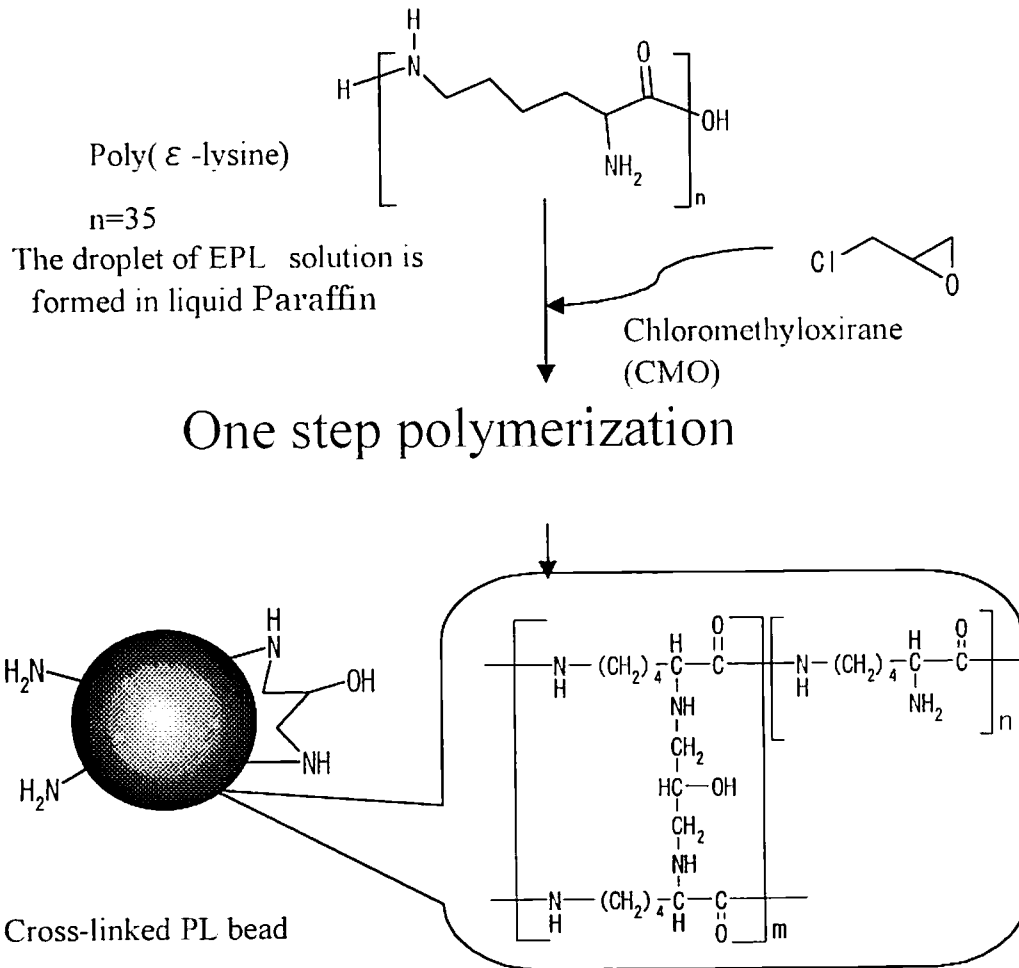
(2) 橋かけポリ (ϵ -リジン) 粒子の造粒方法

2000 ml のセパラブルフラスコに分散媒として流動パラフィン を 1000 ml 入れ、界面活性剤としてソルビタンモノオレート (商品名 NOFABLE SO-851S) 2 g を加え、攪拌して溶解させた。温度を 80℃ に調節し、ポリ (ϵ -リジン) 25% 水溶液 50 ml を加え液滴を形成させた。その後 80℃ を保ちながら攪拌し、顕微鏡で観察しながら、平均粒径が 70 μ m になるように攪拌速度 (300~500 rpm) を調製した後、クロロメチルオキシラン 3 g を加えて 18 時間反応を行った。

(3) 粒子の洗浄・分級

得られた粒子はろ布 (東レシルク #8700) を用いてろ別し、粒子の 300 倍量の熱水を用いて洗浄した。洗浄後、その後粒子の 50 倍量のメタノール、エタノール、アセトンを用いて洗浄を行った。得られた湿潤粒子を 44 μ m 及び 105 μ m の網目サイズの篩器上で水を流しながら分級し、粒径 44~105

μm の粒子を吸着剤として用いた。



EPL is the abbreviation for poly(ϵ -lysine)

Fig.3-6

Schematic illustration of cross-linked PL adsorbent.

3.4 ポリリジン固定化多糖粒子(PL-Cellulose)の調製法

3.4.1 吸着剤の設計

本研究では、ポリ(ε-リジン)自身を球状化する以外にも、球状多孔性粒子に固定化する方法で、LPS吸着剤を調製する方法を試みた。ポリリジン粒子に比べて、固定化する方法は(1)ポアサイズは、固定化する多孔性粒子に依存するためポアサイズのコントロールの必要が無い。(2)構造を支える骨格が多孔性粒子であるため、ポリリジンの使用量が少なくすむ。(3)リガンドの導入量は反応時のポリリジン仕込量を変化させる事で用意にコントロールできる。

Fig.3-7にポリリジン固定化多糖粒子の調製方法と構造を示した。

3.4.2 セルロース球状粒子

ポリリジンを固定化するためのセルロース球状粒子は、チッソ株式会社で製造された商品名セルロファイン(またはセルファイブ)を用いた。セルロファインはクロマトグラフィー用の分離剤として工業的な規模で使用されている。セルロファインの製造方法は、本里等の発明した方法と、空閑等の発明した方法の2方法がある。

本里等は、三酢酸セルロースを1,2ジクロロエタンに溶解しこれを水系分散媒中(PVA、界面活性剤含有)に懸濁させた後、1,2ジクロロエタンを蒸発させ粒子を得る懸濁蒸発法を開発した¹¹。ここで得られた三酢酸セルロース粒子は、アルカリ水溶液-メタノール混合液中でケン化されセルロース粒子が得られる。この系で製造されるセルロース粒子は膨純度が低く(2-4ml/g)機械的強度が非常に高いものが

得られる。しかし粒子の排除限界分子量が小さく、希釈剤を入れない場合でプルランの排除限界分子量で 10^3 程度あり、オクタノールなどの希釈剤を入れた場合でもプルランの排除限界分子量は最大で 10^4 程度ある。

空閑等は、セルロースを60%チオシアン酸カルシウム水溶液中で 110°C に加熱溶解後、1,4ジクロロベンゼンの分散媒中（界面活性剤含有）へ投入し液滴を形成後、温度を室温まで下げセルロースを析出させ、さらにメタノールを加え粒子を安定化することでセルロース粒子を得る方法を開発した¹²。この系で製造されるセルロース粒子は膨純度が比較的高く（約 13-14ml/g）機械強度は前述の系の粒子よりも若干劣るが排除限界分子量は 2×10^6 以上であり、非常に高分子量の物質が粒子内に拡散可能である。なお、アガロース粒子もクロマト剤として利用されているが、本系のセルロース粒子と比べて排除限界分子量も小さいし、機械強度も劣るものである。

3.4.3 その他の粒子

本研究はセルロース粒子以外にも、デキストラン粒子、アガロース粒子を使用しポリリジン固定化粒子を調製した。Table3-4 に今回使用した粒子を示した。

Table3-4 Beads for preparation of adsorbent

Bead	Material	Size (μ m)	S_d (ml/g)	M_{lim}	Maker
Cellufine GC15	Cellulose	45-105	2.3	$<10^3$	C
Cellufine GC700	Cellulose	45-105	3.5	10^4	C
Cellufine CPC	Cellulose	53-125	13.0	$>2 \times 10^6$	C
Sephadex G10	Dextran	55-165	2.3	$<10^3$	APB
Sephadex G75	Dextran	59-285	16.6	10^4	APB
Sepharose CL6B	Agarose	40-165	14.0	4×10^5	APB

Maker ; C:Chisso Corp. ; APB : Amersham Pharmacia Biotech

3.4.4 ポリリジン固定化粒子吸着剤の調製

ポリリジンを粒子に固定化する方法として、エポキシ活性化法を採用した。エポキシ活性化法は(1)ポリリジンと粒子の結合が安定な2級アミンの共有結合である点、(2)結合に利用されたポリリジンのアミノ基は2級アミンになるが、その静電的特性は変化しない点(3)エポキシ活性化に使用するクロロメチルオキシランはクロマト剤の架橋剤として広く使用されている実績のある試薬である点などが利点として挙げられる。

(1) 試薬

本研究に用いた試薬を Table3-5 に示した。

Table3-5 Reagents for preparation of adsorbent

Reagent	Grade	Maker
25% Poly(ϵ -lysine) solution		Chisso corp.
Chloromethyloxirane	EP	Nacalai Tesque
Sodium hydroxide	EP	Nacalai Tesque
Beads		See Tabel.3-4

EP: Extra Pure

(2) ポリリジンの固定化方法

500m l のセパラブルフラスコに、セルロース粒子 10g 湿重量を量りとり、純水 128m l と 20% 水酸化ナトリウム 21m l を加え 30℃ で攪拌した。温度を 30℃ に保ちながらクロロメチルオキシラン 21m l を加えて 2 時間攪拌した。得られたエポキシ活性化ゲルを純水でクロロメチルオキシラン臭がなくなるまでろ過洗浄を行った。少量をエポキシ導入手量測定用にサンプリングした。

次にエポキシ活性化ゲルの全量を再びセパラブルフラスコに入れ、25% ポリ(ϵ -リジン)水溶液を 22m l 加え攪拌し、温度を 45℃ に昇温してから 2 時間さらに攪拌を続けた。その後、粒子を純水でろ過洗浄し、ついでメタノールで洗浄した後メタノール中で保存した。

本研究ではすでに分級された粒子を使用しているため、それ以上の分級操作は加えなかった。また調製条件を検討する場合は、アルカリ濃度、クロロメチルオキシラン添加

量及びポリリジン添加量を変化させて調製を行ったが、反応時間、温度は上記と同様に行った。

(3) 合成ポリカチオンの固定化方法

本研究ではポリリジン以外にもポリカチオンを固定化し比較検討した。ポリカチオンとしては、ポリアリルアミンとポリアリルアミン-ジアリルアミン共重合体を選択した。ポリアリルアミンは、脂肪鎖先端の1級アミンを側鎖にもつ化合物で、ポリ(ϵ -リジン)の遊離 α 位のアミンと比較して pK_a が高い。またポリアリルアミン-ジアリルアミン共重合体は更に pK_a の高い化合物として比較のために選択した。

これらの合成ポリカチオンの固定化方法はポリリジンの固定化方法と同様にして行った。Fig.3-8にこれらの合成ポリカチオンの構造を示した。

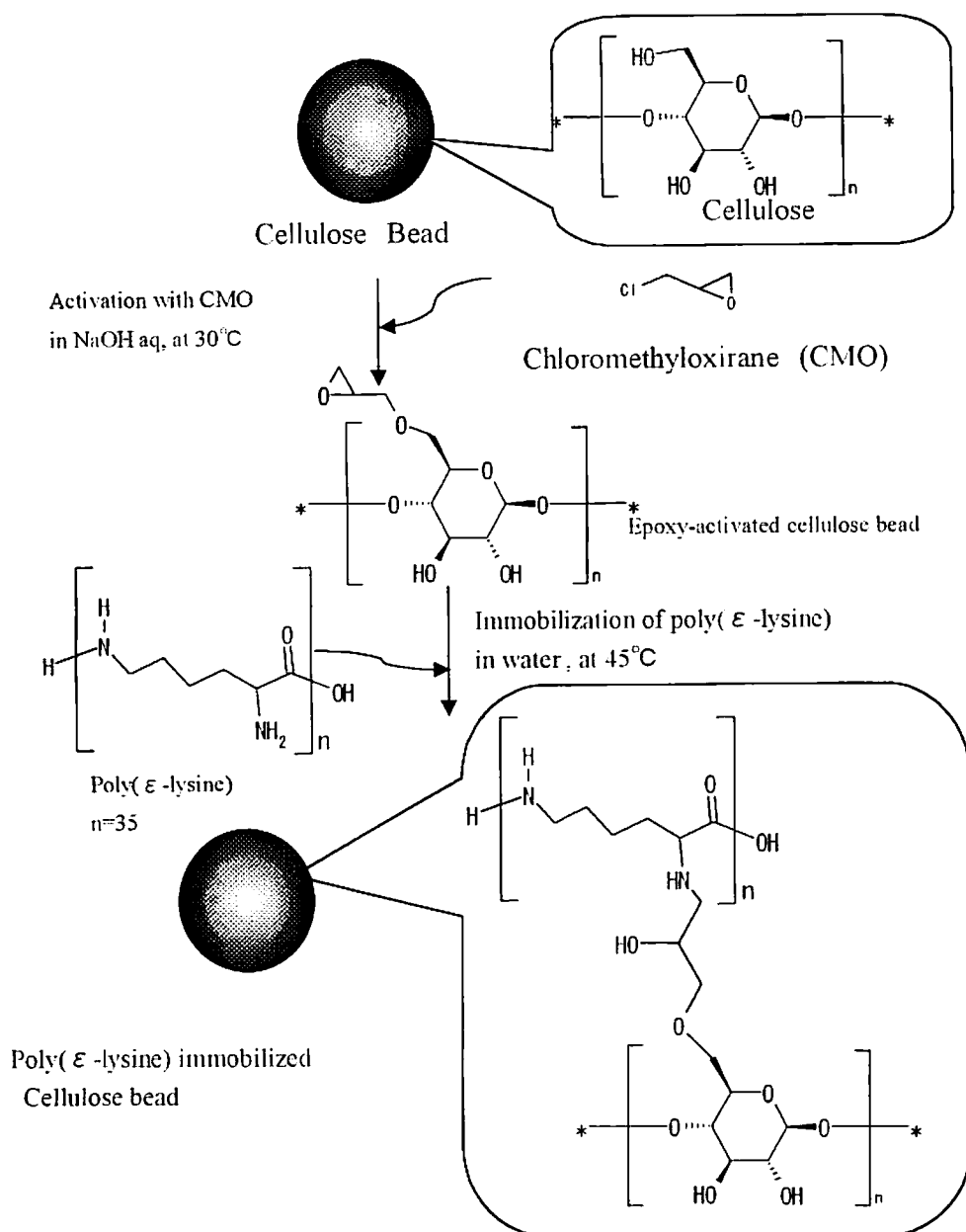


Fig.3-7
Schematic illustration of immobilized PL-Cellulose
adsorbent.

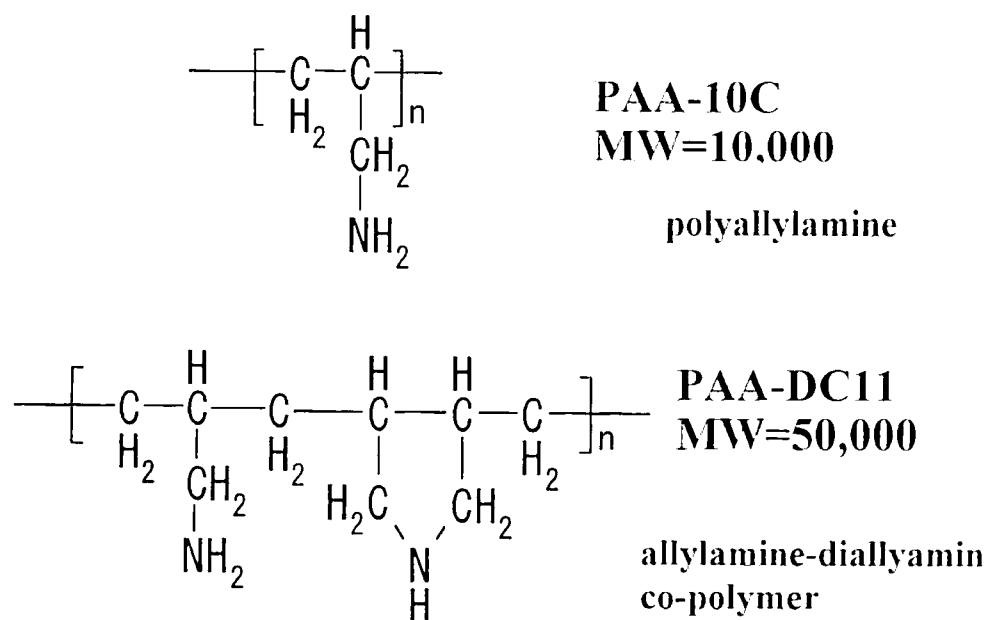


Fig.3-8 Structure of polycationic polymer.

3.5 第3章の論文

¹ C.Hirayama, H.Ihara, X.Li., *J. Chromatogr.*, **530**, 148-153. (1990)

C. Hirayama, M. Sakata, H. Ihara, K. Ohkuma, M. Iwatsuki, *Anal. Sci.*, **8**, 805-810 (1992)

³ C. Hirayama, H. Ihara, *J. Chromatogr.*, **347**, 357 (1985)

⁴ H. Ihara, T. Yoshinaga and C. Hirayama, *J. Chromatogr.*, **362**, 197 (1986)

⁵ 平山 忠一, 液体クロマトグラフィー用ポリマー充填剤材料開発技術, pp. 34-35 (1992)

⁶ Shima, S., Sakai, H. *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 1807-1809 (1977)

⁷ Shima, S., Sakai, H. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2497-2502 (1981)

⁸ Shima, S., Sakai, H. *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 2503-2508 (1981)

⁹ G. D. Fasman, M. Idelson, E. R. Blout, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 709-712 (1961)

¹⁰ 小林恒夫, 生体成分の化学, pp. 82 (1979)

¹¹ Y. Motozato, K. Matsumoto, C. Hirayama, *J. Chem. Soc. Jpn.*, 1981 (1883-1889)

¹² S. Kuga, *J. Colloid Interface Sci.*, **77**, 413-417 (1981)

第4章 各種架橋型エンドトキシン吸着剤の合成の確認とその特性

本章においては、橋かけ剤を用いて粒子化されたDMP粒子と架橋ポリリジン粒子（架橋型のエンドトキシン吸着剤）の合成の確認として物性の測定と吸着の基本特性について調査した。

4.1 橋かけ *N,N*-ジメチルアミノプロピルアクリルアミド（DMP）吸着剤

4.1.1 合成の確認

本実験ではDMPモノマーと橋かけ剤の仕込み比を変えることによって、アミノ基含有量、膨純度の異なる吸着剤を調製した。一方、粒子の多孔性は排除限界分子量2,000以下になる条件で調製した。得られたDMP粒子の合成の確認は、アミノ基含有量を測定することによって行った。

Table4-1に粒子のアミノ基含有量と膨純度と原料の仕込みモル比の関係を示した。アミノ基含有量はDMPの仕込みモル%が多いほど高くなる傾向で、重合反応は問題なく進行したことを示している。DMP吸着剤の膨純度は、モノマーと橋かけ剤の仕込み量によって変化し橋かけ剤が多いほど膨純度が小さくなる傾向が見られた。特に橋かけ剤にAAを用いた場合は、この傾向が顕著であった。これはAAが水溶性であり水和しやすい為であると考えられる。一方、BBMA,DVBは疎水性が強い橋かけ剤は仕込み量が少ない場合でも水和しにくいので、膨潤しにくく膨純度も極端には大きくなる。膨潤度は粒子の機械強度を示す一因子であり、この値が小さいほど粒子は硬くクロマトグラフィーを行う場合に有利な性能を示す。

Table4-1 Properties of cross-linked DMPadsorbents.

Adsorbent	Molar ratio(mol %)				^a Amino-Group	^b S _d
	DMP	AA	BBMA	DVB	content Meq g ⁻¹	Wet-mLDry-g ⁻¹
DMP/AA-3.6	50	50	0	0	3.6	2.7
DMP/AA-4.1	60	40	0	0	4.1	4.0
DMP/AA-4.5	70	30	0	0	4.5	4.3
DMP/AA-5.1	80	20	0	0	5.1	7.9
DMP/BMA-2.5	50	0	50	0	2.5	2.2
DMP/BMA-3.1	60	0	40	0	3.1	2.5
DMP/BMA-3.7	70	0	30	0	3.7	3.2
DMP/BMA-4.0	80	0	20	0	4.0	3.8
DMP/DVB-3.2	50	0	0	50	3.2	2.5
DMP/DVB-4.0	60	0	0	30	4.0	3.2
DMP/DVB-5.0	80	0	0	20	5.0	3.8

^aContent of amino group in the adsorbent. ^bDegree of swelling in water.

4.1.2 粒子の疎水性

DMP/AA 粒子、DMP/BBMA 粒子とそして DMP/DVB 粒子の疎水性を比較するために粒子をカラムに充填し直鎖アルコール同属体（メチル、エチル、プロピル、ブチル）の保持挙動を測定した。その結果 Fig.4-1 に示すように、粒子の疎水性が高いほどアルコールの保持時間が長いことが予想される。DMP/A-3.6 においては、アルコール炭素鎖数の差による保持挙動の変化が少ないの対し、DMP/DVB-3.6 と

DMP/BBMA-2.5 粒子ではアルコール炭素鎖が増加するにつれて、その保持時間が長くなっている。これらの結果は、粒子の疎水性の制御は、橋かけ剤の種類、仕込み割合を調整する事によって可能である事を示している。

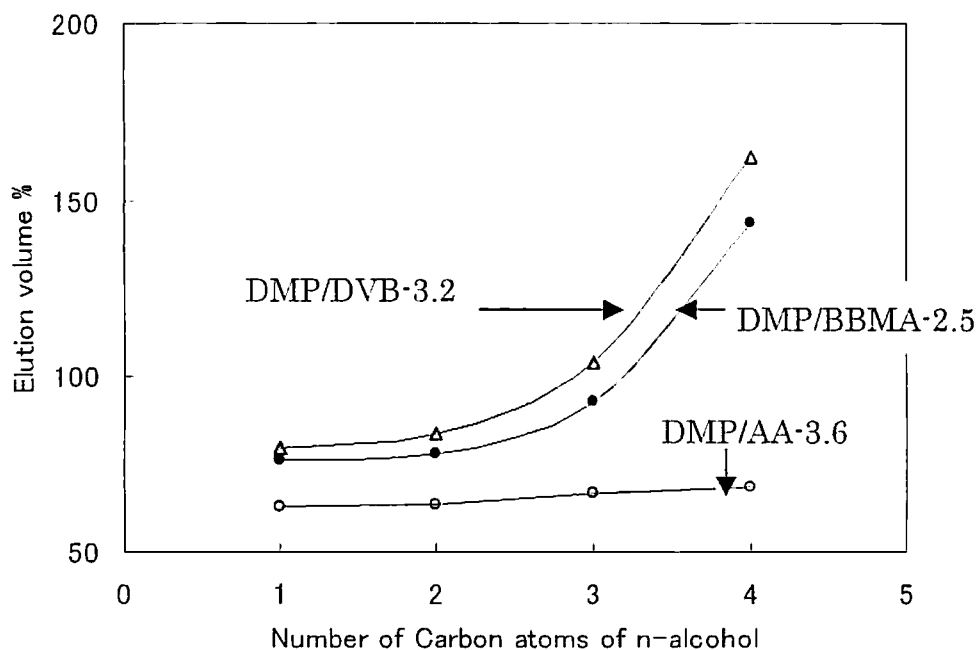


Fig.4-1 Elution behaviors of 1- alcohol with various cross-linked DMP columns (DMP/AA-3.6 , DMP/BBMA-2.5 , and DMP/DVB-3.2). A $5\mu\text{L}$ portion of 1-alcohol dissolved in water (2mg mL^{-1}) was injected to the column (L100- 4.6 mm I.D.) at 0.5 mL min^{-1} and at $25\text{ }^\circ\text{C}$. The elution volume of 1-alcohol is expressed as a percentade of the column volume. Number of carbon atoms of 1-alcohol : 1 = methanol , 2 = ethanol , 3 = propanol , 4 = butanol. Pore size and content of the cross-linking arent of the adsorbent : $M_{lim} 2 \times 10^3$ and 50 mol %.

4.1.3 タンパク質、LPS 吸着の基本的挙動

(1) アミノ基含有量の効果

本実験では、エンドトキシンの標準として大腸菌 O111:B4 株由来 LPS を用いた。標準タンパク質としては、酸性タンパク質の牛血清由来アルブミン (BSA)、中性タンパク質の γ -グロブリン、塩基性タンパク質としてチトクローム C (Cyt. C) を用いた。

Fig.4-2 にイオン強度 $\mu=0.05$, pH7.0 の条件下での種々の吸着剤のエンドトキシン及びタンパク質の吸着能を示す。DMP系吸着剤のエンドトキシンの吸着量はアミノ基含有量と比例して増加した。特に DMP/BBMA と DMP/DVB はアミノ基含有量が 4.0-5.1meq/g の範囲ではエンドトキシン吸着能が 99% 以上であった。しかし DMP/AA はエンドトキシン吸着量が少なく、アミノ基含有量 3.6-5.1meq/g の範囲でエンドトキシンの吸着量は 34-86% であった。(Fig. 4-2-a)

BSA の吸着挙動は Fig. 4-2-b に示した。BSA の吸着量もエンドトキシンと同じくアミノ基含有量に比例して増加した。DMP/DVB, DMP/AA はアミノ基含有量 4.0meq/g 以上で急激に BSA 吸着量が上昇し、5.0meq/g の時に DMP/DVB で 68%、DMP/AA で 44% が吸着した。しかし、アミノ基含有量が 2.5meq/g から 4.0meq/g の範囲で BSA 吸着量は 1% 以下であった。

DMP/BBMA は 4.0meq/g 以下の吸着剤のみを合成しているため BSA の吸着量は 1% 以下であった。

一方、 γ -グロブリンの吸着挙動は Fig. 4-2-c に示した様に BSA と反対の傾向を示した。アミノ基含有量が 3.5meq/g 以下で、その含有量に逆比例して γ -グロブリンの吸着量が増加した。アミノ基含有量が 2.5meq/g の DMP/BBMA で 20% の γ -グロブリンが吸着した。アミノ含有量が少ない吸着剤ほど含有される橋かけ剤が多いが、その結果吸着剤の疎水性

が高くなる。吸着剤の疎水性は、Fig.4-1 に示した様にアルコール類の吸着傾向と一致し、 γ -グロブリンの吸着傾向とも一致した。

チトクローム C の吸着挙動は Fig. 4-2-d に示した。チトクローム C は塩基性のタンパク質であり、pH7.0 の環境ではプラスにチャージしており、アミノ基含有の吸着剤へ通常吸着されないと予測され、DMA/BMAA, DMA/AA では全てのアミノ基含有量でチトクローム C を吸着しない結果となった。しかし DMA/DVB は、アミノ基含有量に反比例して Cty.C が吸着された。アミノ基含有量が 3.2meq/g-5.0meq/ml に増加するにつれて、チトクローム C の吸着量は 56%-20% へ減少した。この傾向は、吸着剤中の橋かけ剤である DVB の含有量に比例している。このようなチトクローム C の吸着の原因としては Fig.4-3 に示した DVB 単独重合構造の存在が考えられる。チトクローム C は架橋構造に組み込まれた DVB とは相互作用する事が難しいが、DVB が単独で重合した部分ではヘムと DVB のベンゼン環の相互作用が可能であると推測できる。そのため、DVB の仕込み割合が多い吸着剤ほどチトクローム C が吸着されるものと考えられる。

Table4-2 はアミノ基含有量が 4.0meq/mL-4.1meq/mL の範囲にある橋かけ剤含量の異なる DMP 粒子のさまざまな等イオン点 pI をもつ生体由来物質の吸着について調査したものである。タンパク質の吸着は pI が低いほどより吸着する傾向であり、全ての DMP 粒子で同じであった。ただし、Myoglobin とチトクローム C は DVB を橋かけ剤とした粒子で吸着される傾向であり、他の橋かけ剤を用いた DMP 粒子の 20 ~ 30 倍以上の吸着量であった。これは、何れもヘムタンパクであり、DVB のベンゼン骨格がヘムと相互作用して吸着するものと考えられる。

DNA、RNA の吸着は比較的 DMP/BBMA 系の粒子で吸着量

が高い結果であった。一方 LPS は、*E.coli* の株、サルモネラ菌と由来が変化しても 98% 以上の吸着量が何れの粒子でも観察された。

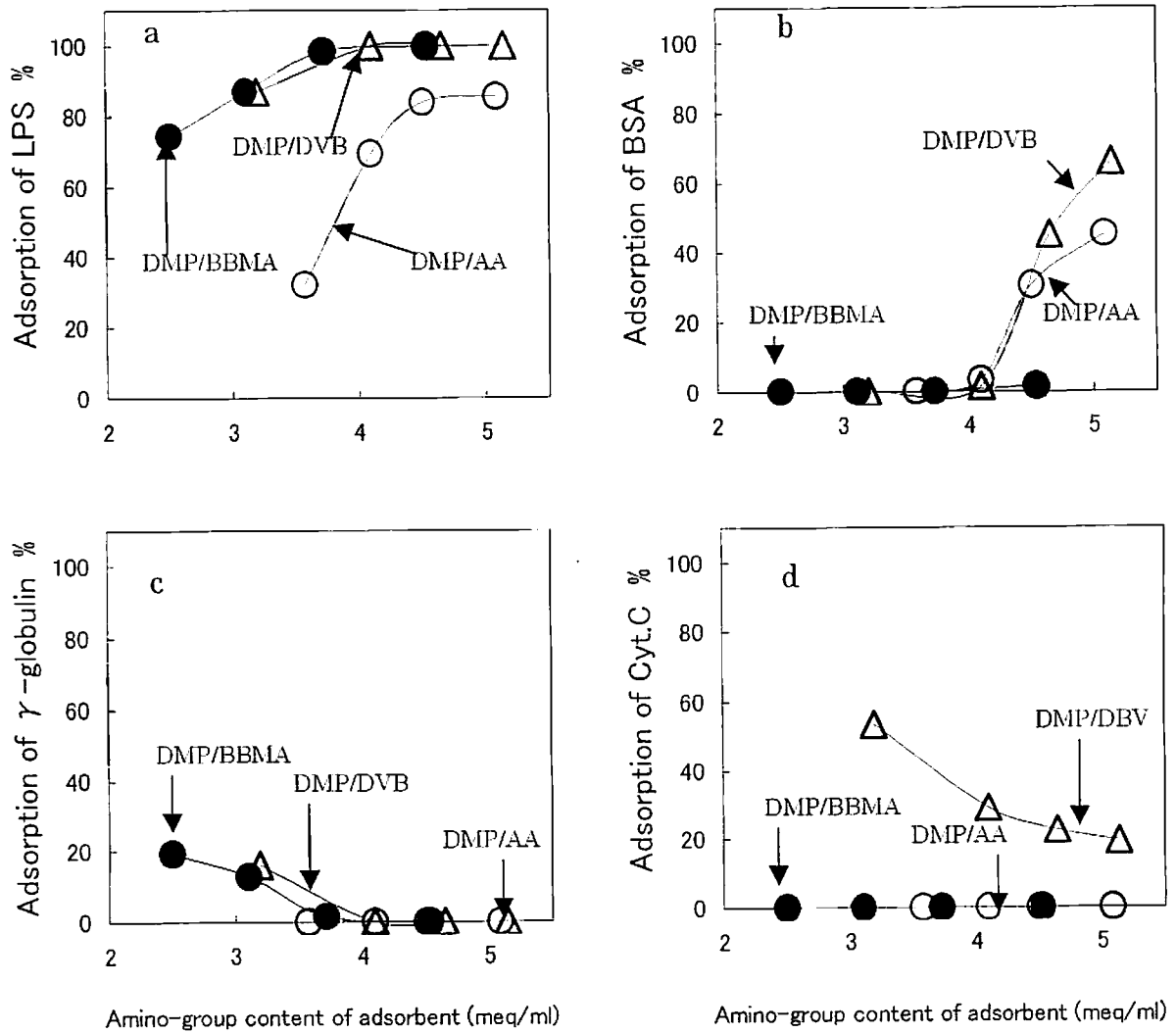


Fig.4-2 Effect of amino-group content of the adsorbent on adsorption of a cell product (LPS or protein) by various cross-linked DMP adsorbents. The adsorption of a cell product was determined by a batchwise methods with 0.2g of the wet adsorbent and 2mL of a cell product solution ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$, pH7.0, ionic strength of $\mu = 0.05$).

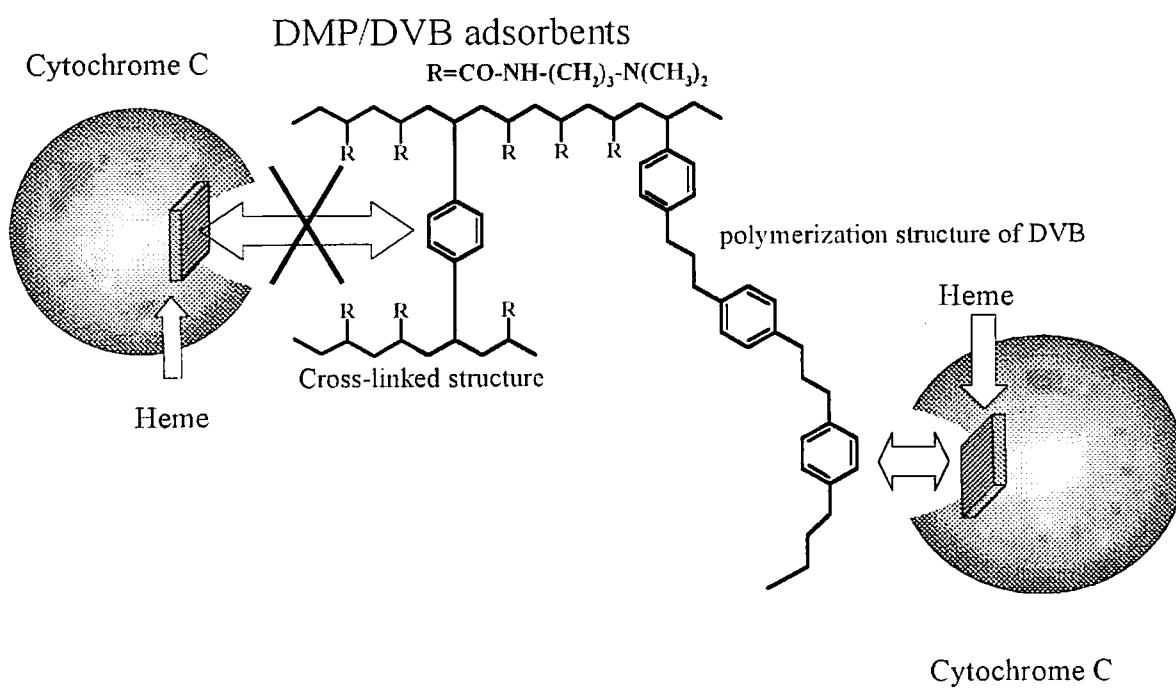


Fig.4-3

The hypothetical model by which Cytochrome C adsorption of DMP/DVB adsorbent.

Table4-2
Adsorption of various cell products by cross-linked DMP adsorbents

Cell Product	pI	Adsorption ※ (%)		
		DMP/AA-4.1	DMP/BBMA-4.0	DMP/DVB-4.0
Pepsin	<1	81	85	90
BSA	4.9	3	2	2
Insulin	5.3	5	4	3
Myoglobin	5.5	<1	<1	22
γ -globulin	6.8	2	3	2
Cytochrome C	10.6	<1	<1	34
DNA		70	83	70
RNA		68	78	70
<i>E.coli</i> O111:B4 LPS		99	99	99
<i>E.coli</i> UKT-B LPS			98	99
<i>S.typhosa</i> 0901 LPS		98	99	99

※ The adsorption of cell product was determined by a batchwise method with 0.2 mL of wet adsorbent and 2mL of cell product solution (100 μ g/mL, pH7.0, μ =0.05).

(2) pH 及びイオン強度効果

Fig.4-4 は DMP 粒子のエンドトキシン吸着能のイオン強度による変化を橋かけ剤の違いで比較したものである。橋かけ剤の種類が変わるとイオン強度の上昇に対するエンドトキシン吸着能に変化が見られた。橋かけ剤が AA である場合、イオン強度が上昇すると共に急激にエンドトキシンは吸着しなくなり、イオン強度 $\mu=0.2$ 以上で吸着量はほぼ0%となった。一方、BBMA、DVB が橋かけ剤の粒子では、イオン強度 $\mu=0.2$ まではエンドトキシン吸着量がおおよそ100%を維持し、その後イオン強度 $\mu=1$ まではエンドトキシン吸着量が減少した。Fig.4-1 に示したように、疎水性の順位は $DVB>BBMA>>AA$ であり、この順位とエンドトキシン吸着能のイオン強度耐性順位は同じであることから、イオン強度が与えるエンドトキシン吸着能への影響は、橋かけ剤の疎水性の強弱によるものと思われる。

Fig.4-5 は DMP 粒子のエンドトキシン吸着に pH がどのように影響するか調査したものである。橋かけ剤が AA の粒子は pH6 から pH7 に最大値をもつベル型の曲線を示し、それ以外の pH、特に pH8 以上では急激の吸着量が減少した。このような吸着挙動は、AA 系粒子が主にイオン交換に基づきエンドトキシンを吸着しているためと考えられる。一方、BBMA、DVB 系の粒子は pH5 から pH9 の範囲で 90% 以上の吸着が見られ、広範囲の pH でエンドトキシン吸着が可能であり、イオン交換以外に疎水性相互作用による吸着が働いているものと考えられる。

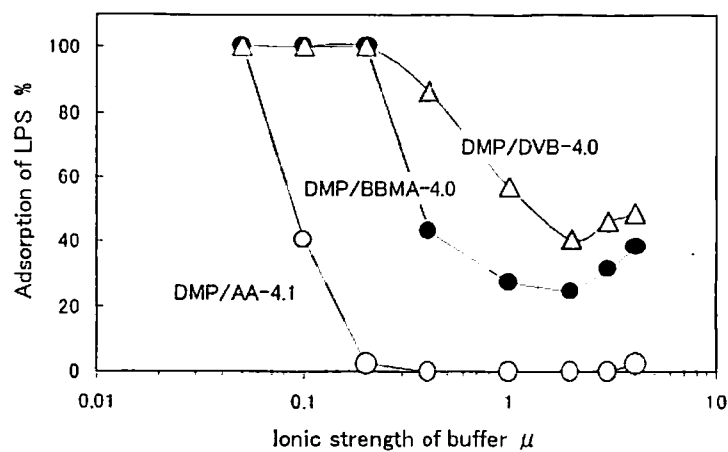


Fig.4-4 Effect of ionic strength on adsorption of LPS by various cross-linked DMP adsorbents. The adsorption of LPS was determined by a batchwise methods with 0.2g of the wet adsorbent and 2 mL of a LPS solution ($1\mu\text{g/mL}$, pH 7.0, $\mu = 0.05\text{-}4.0$). Amino-group content of adsorbent : 4.0-4.1 meq/g .

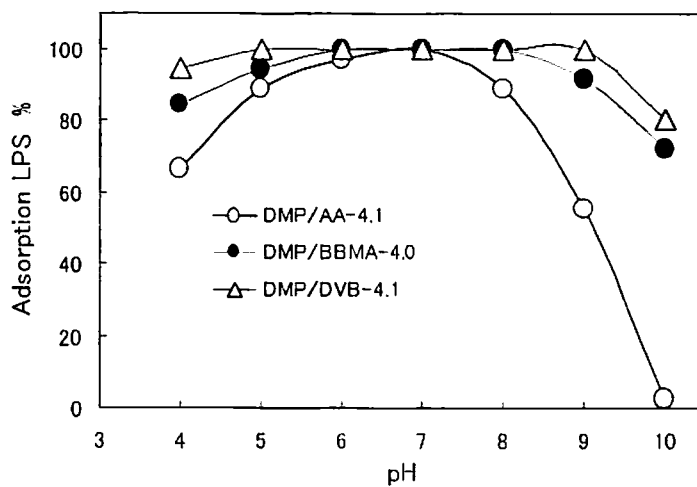


Fig.4-5 Effect of pH on adsorption of LPS by various cross-linked DMP adsorbents. The adsorption of LPS was determined by a batchwise methods with 0.2g of the wet adsorbent and 2 mL of a LPS solution ($1\mu\text{g/mL}$, pH 4.0-10.0, $\mu = 0.05$). Amino-group content of adsorbent: 4.0-4.1 meq/g.

4.2 橋かけポリ(ε-リジン)吸着剤の調製法

4.2.1 合成の確認

前述した方法でポリ(ε-リジン)吸着剤を調製し、Table4-3に種々の調製条件で得られたポリリジン粒子の元素分析値とアミノ基含有量を示した。ポリリジン粒子のアミノ基含有量は、橋かけ剤とポリリジンの仕込量を変えることによって制御することが可能であった。ポリリジン粒子のC/N値は理論値と測定値でほぼ同じ値を示し、反応が仕込通り進行していることがわかった。

Table4-3 Characteristics of poly(ε-lysine) bead

Name	Molar ratio (mol%)		Elemental analysis					AEC
	poly(ε-lysine)	CMO	H (%)	C (%)	N (%)	C/N		meq/g
						Calcd.	Found	
PL-90	90	10	8.9	50.7	18.7	2.71	2.71	5.3
PL-75	75	25	8.7	48.8	16.6	2.94	2.98	3.8
PL-50	50	50	7.9	47.1	12.5	3.78	3.89	1.3

EPL:poly(ε-lysine),unit-mol% of EPL in the adsorbent(1unit = (Lys-H₂O)),degree of polymerization=35)

AEC : Anion-exchange capacity of the adsorbent.

4.2.2 ポリリジン粒子吸着剤の特性

Table4-4に示したように、橋かけ剤を10mol%から50mol%に増加させることにより、粒子のアニオン交換容量が5.3meq/mlから1.3meq/mlに低下し、pKa値が7.4から6.1に低下した。このように、アニオン交換容量が、橋かけ剤の増加により減少する傾向は、もちろん粒子中のポリリジン含量

が少なくなることによると考えられる。

Fig.4-5 に、アミノ基含有量と $pK_{a,app}$ の関係をポリリジン粒子、アミノ化 PMLG について示した。両粒子ともにアミノ基含有量と $pK_{a,app}$ が比例して大きくなる傾向が示されたが、アミノ化 PMLG の $pK_{a,app}$ はポリリジン粒子に比べて常に約1.5程度高い値となった。これは、含有するアミノ基の状態、つまり α 位のアミノ基と $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ のアミノ基の違いに起因しており、特にポリリジン粒子のアミノ基が pK_a の低い α 位のアミノ基が主成分であるため低い値となっていると考えられる。

また Table4-6, Fig.4-7 に示した様に、橋かけ剤の割合が増えることで、膨潤度 (S_d) が減少しているが、橋かけ反応の進行に伴って、より強固な網目構造が形成されるためと考えられる。網目構造を表す値として排除限界分子量 (M_{lim}) が上げられるが、橋かけ剤を増やすことによって8,000 から1700 へ減少している。このことから、橋かけ反応によって、より緻密な網目構造が形成され、 S_d と M_{lim} の低下がもたらされたものと考えられる。

$pK_{a,app}$ が架橋の度合いによって小さくなる傾向が見られたが、これは架橋による緻密な網目によりイオン交換基が水和しにくい環境に置かれるために引き起こされるものと考えられる。

Table4-4 Characteristics of PL adsorbents

Name	AEC		$-\text{NH}_2$ mM/g	$pK_{a,app}$	S_d ml/g	M_{lim}
	meq/dry-g	meq/ml				
PL-90	5.3	0.34	3.4	7.4	15.3	8,000
PL-75	3.8	0.63	2.3	6.7	6.0	1,800
PL-50	1.3	0.29	0.4	6.1	4.5	1,700

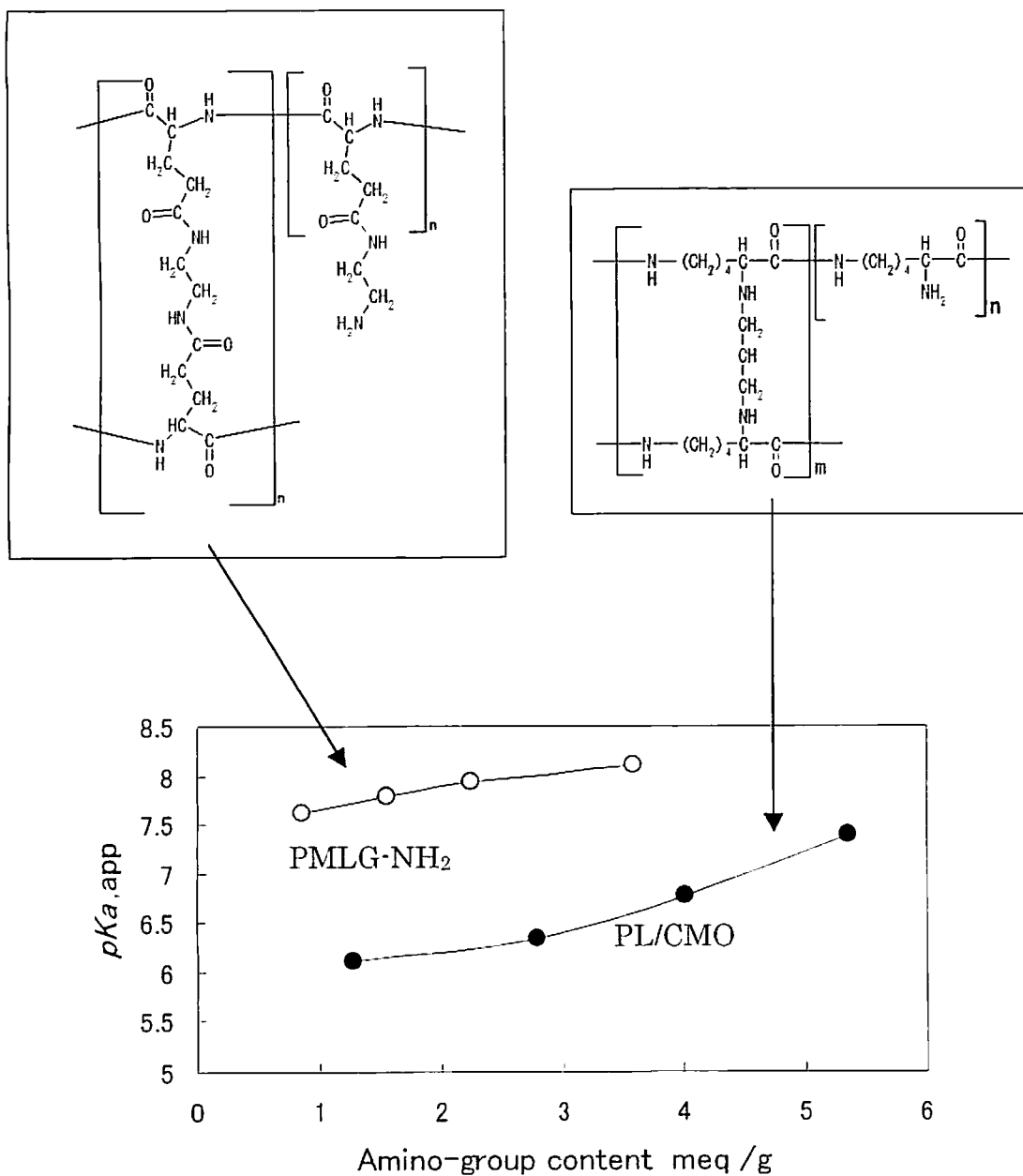


Fig.4-6 Relationship between the amino-group content of cationic polymer particles (PL/CMO and PMLG-NH₂) and their apparent pKa (pKa,app).

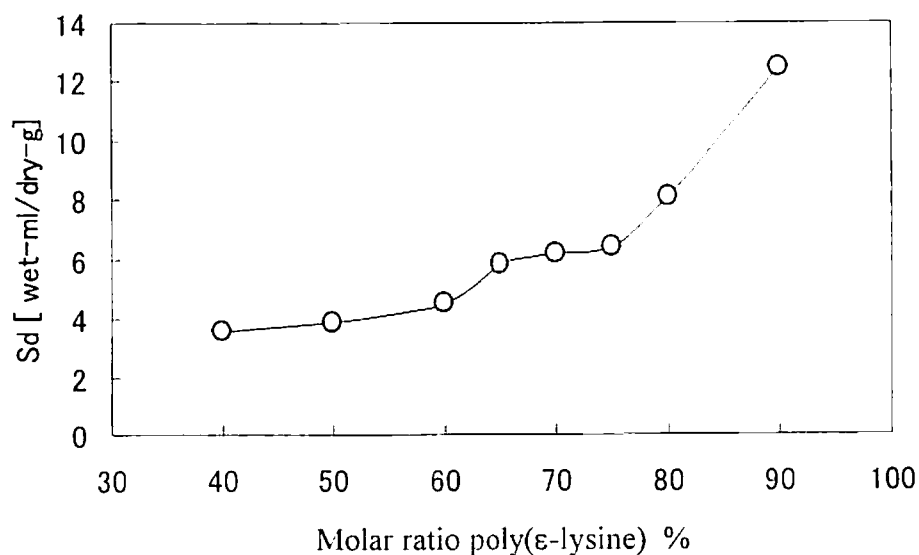


Fig.4-7 Relationship between the poly(ε-lysine) molar ratio of cationic polymer particles (PL/CMO) and their degree of swelling in water.

4.2.3 タンパク質、LPS 吸着の基本的挙動

(1) ポリ(ε-リジン)含有量の効果

次に、橋かけポリリジン吸着剤の生体関連物質に対する吸着能を調査した。Fig.4-8 はポリリジン粒子への橋かけ剤(クロロメチルオキシラン)導入量とエンドトキシンの吸着能の関係について調査した結果を示した。試験方法は 2ml のエンドトキシン水溶液 (LPS 濃度 0.5, 5, 50, 500 μg/ml, pH 7.0, イオン強度 $\mu = 0.05$) の各条件の試験液と 0.2g の湿重量の吸着剤を用いたバッチ法で行った。

混合する橋かけポリリジン中のポリリジンモル比が高いほどエンドトキシンの吸着能が高い傾向であった。エンドトキシン濃度が $0.5\mu\text{g/ml}$ から $5.0\mu\text{g/ml}$ の水溶液では何れの吸着剤でも 93% 以上のエンドトキシンが吸着された。試験液のエンドトキシン濃度が $50\mu\text{g/ml}$, $500\mu\text{g/ml}$ と増加すると、吸着能が低下する。その際の、吸着能の曲線はポリリジンのモル比 60% を極小としてその両側で高くなる傾向を示した。またポリリジンのモル比が 60% より高くなる方向では著しいエンドトキシン吸着能の増加を示した。これはアミノ基含有量の増加に伴う静電的の吸着が増加するためと考えられる。

一方、ポリリジンのモル比が 60% 以下の方向ではエンドトキシン吸着能がわずかに高くなっているが、これは橋かけ剤（クロロメチルオキシラン）の含有量増加による疎水性基の増加によるものと考えらる。

Fig.4-8 はタンパク質吸着能について同様に pH7.0, イオン強度 $\mu=0.05$ のバッチ法で測定した結果である。BSA はポリリジンのモル比が 70% 以上で急激に吸着量が増加し、モル比が 90% の場合 99% の BSA が吸着された。γ-グロブリンはポリリジンのモル比が低いほど吸着されモル比 40% の時に最大になり 20% が吸着された。この傾向は橋かけ剤の含有量と比例していた。チトクローム C は、ポリリジンのモル比が変化してもほとんど吸着されなかった。

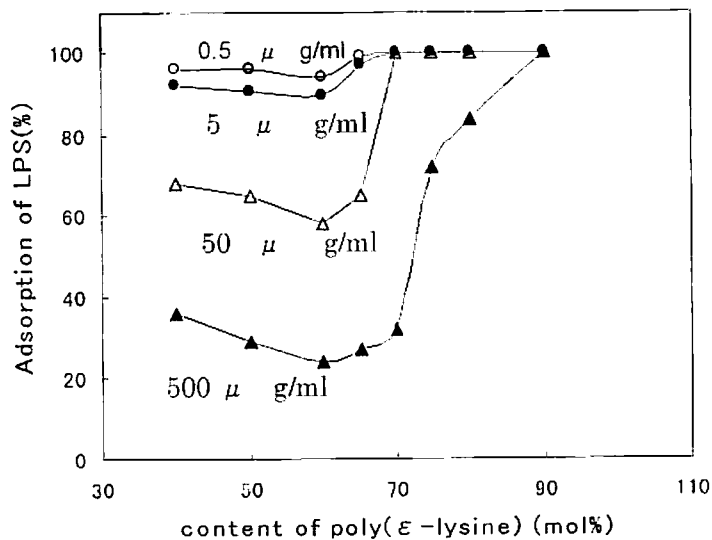


Fig.4-8 Effect of molar ratio of poly(ϵ -lysine) in adsorbents on adsorption of LPS.

The adsorption of LPS was determined by batchwise methods with 0.2 ml of wet adsorbent and 2ml of a LPS (*E.coli* O111:B4) solution (pH7.0, $\mu = 0.05$)

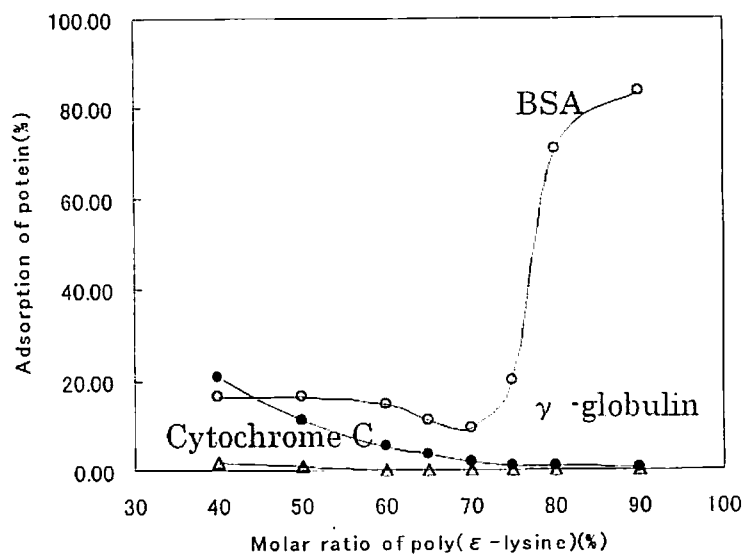


Fig.4-9 Effect of molar ratio of poly(ϵ -lysine) in adsorbents on adsorption of proteins.

The adsorption of protein was determined by batchwise methods with 0.2 ml of wet

adsorbent and 2ml of a protein(500 μ g/ml) solution (pH7.0 , $\mu = 0.05$)

(2) pH及びイオン強度効果

Fig.4-10(a) は架橋ポリリジン粒子とアミノ化 PMLG 粒子のイオン強度の変化と LPS の吸着について調査したものである。

PL-70 はイオン強度 $\mu = 0.2$ 以下ではエンドトキシン吸着量が、ほぼ 100% であるが、それ以上ではイオン強度の上昇にともなってエンドトキシン吸着量が減少する傾向であった。一方、アミノ化 PMLG は、より高いイオン強度でも吸着量を維持しており、イオン強度 $\mu = 0.6$ でもおよそ 90% の吸着量を保った。しかしそれ以上のイオン強度では吸着量は減少し、 $\mu = 1$ で約 50% 程度の吸着となった。

Fig.4-10(b) は pH の影響について調査したものである。PL-70 は pH6 から pH7 で吸着量が約 100% であるがそれ以外の pH 領域ではエンドトキシン吸着量が減少し最小で約 60% まで低下した。一方、アミノ化 PMLG は pH5 から pH9 までほとんど 100% 近い吸着量を示したが、pH5 以下では吸着量は減少した。これら 2 種の吸着剤を比較すると、アミノ化 PMLG がほぼ全域で吸着量が高い結果となった。

Fig.4-11(a) は、架橋ポリリジン粒子とアミノ化 PMLG 粒子のイオン強度の変化と BSA の吸着について調査したものである。

PL-70 はイオン強度 $\mu = 0.05$ と $\mu = 1.0$ で 10% 以下の吸着が見られたが、それ以上では吸着は見られなかった。一方、アミノ化 PMLG は低いイオン強度で BSA を吸着する傾向が見られ、イオン強度 $\mu = 0.05$ で約 60% の BSA 吸着がみられた。しかしイオン強度 $\mu = 0.4$ 以上では BSA の吸着はない。

一方、Fig.4-11(b)に、 γ -グロブリンについて同様にイオン強度の影響を調べた結果を示した。PL-70は、イオン強度が低いほうがわずかに吸着する傾向が見られたが、ほぼ全域のイオン強度で2%以下であった。アミノ化 PMLG はイオン強度の変化に関わらず、 γ -グロブリンを 10% 程度吸着した。

BSA は、この実験を行った pH7 ではマイナスにチャージしているため塩基性の強い吸着剤により吸着される傾向がある。一方、 γ -グロブリンは、pH7 ではほぼ等イオン点であるため見かけ上チャージしていない。そのためイオンによる吸着はないと考えられ、アミノ化 PMLG に吸着されるの疎水性相互作用によるものである可能性が考えられる。

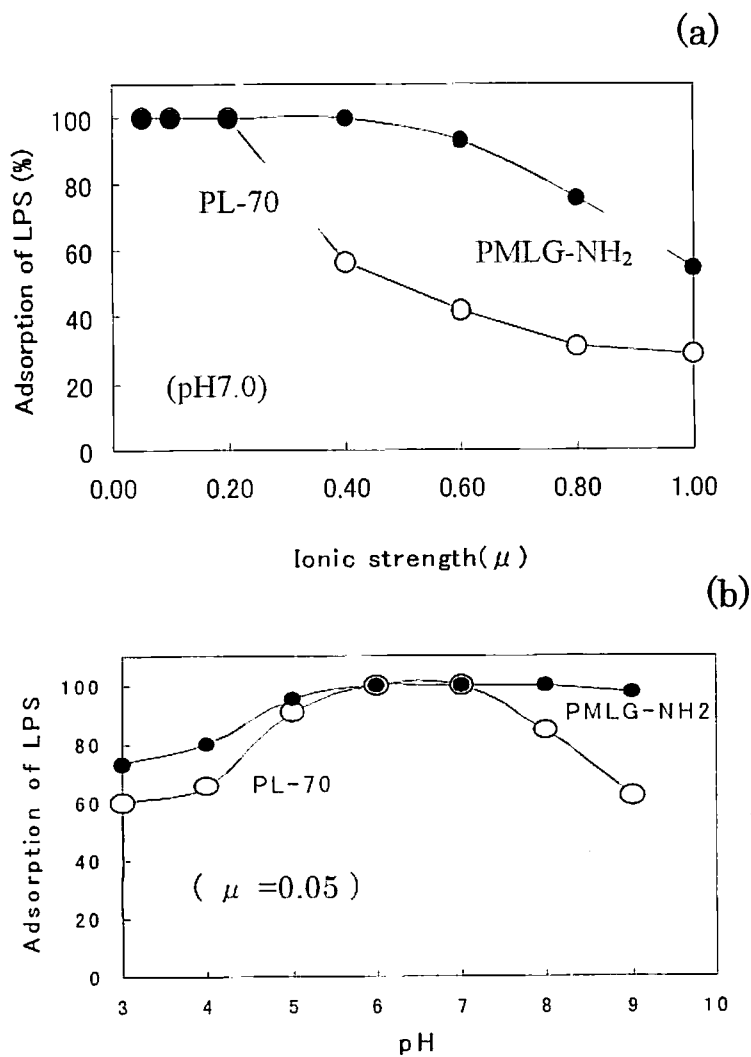


Fig.4-10 Effects of ionic strength (a) and pH (b) the buffer on adsorption of LPS by PL-70 and PMLG-NH₂ adsorbents. The adsorption of LPS was determined by a barchwise method with 0.2 mL of wet adsorbent and 2 mL of an LPS solution [LPS (*E.coli* O111:B4),5 μ g/mL].

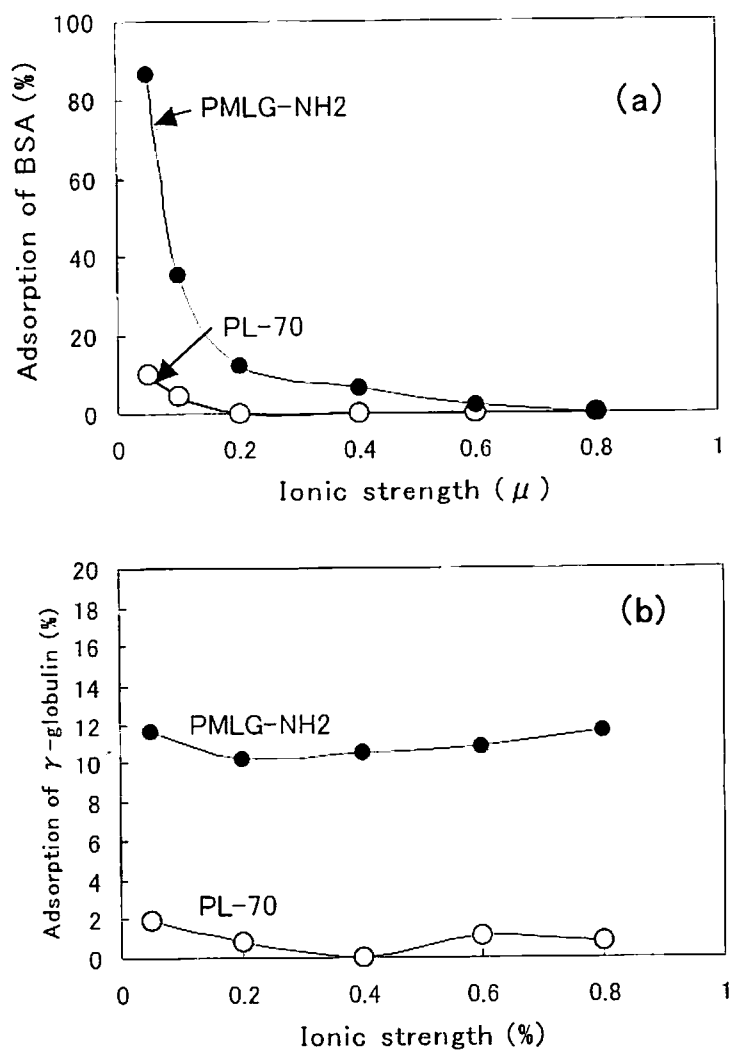


Fig.4-11 Effects of ionic strength on the adsorption of BSA (a) and γ -globulin (b) by PL-70 and PMLG-NH₂ adsorbents. The adsorption of a protein was determined by a batchwise methods with 0.2 mL of wet adsorbent and 2 mL of a protein solution (protein : 500 μ g/ml , pH7.0).

(3) 細孔径及びアミノ基含有量の効果

Fig4-9に架橋ポリリジン粒子とアミノ化 PMLG 粒子の細孔径とエンドトキシンおよび BSA の吸着挙動について調査した結果を示した。Fig.4-9-a は架橋ポリリジンについて示しているが、BSA の吸着は $M_{lim}2,000$ では約0%付近であるが、 $M_{lim}8,000$ になると急激に吸着量が増加し 90% 近い吸着を示した。エンドトキシンは $M_{lim}2,000$ の場合、アミノ基含有量に比例して吸着量が増加し、アミノ基含有量 4meq/g 以上では $M_{lim}2,000$ でも $M_{lim}8,000$ でもほぼ 100% 近い吸着量を示した。

一方、Fig.4-9-b に示したアミノ化 PMLG 粒子は $M_{lim}2,000$ 付近でも BSA が 10% から 20% 程度吸着され、 $M_{lim}8,000$ では 90% 以上が吸着された。 M_{lim} が大きくなるにつれて BSA がより吸着される傾向は架橋ポリリジン粒子と同じであった。エンドトキシンの吸着は、アミノ化 PMLG 粒子では $M_{lim}2,000$ 以下の場合でもほぼ 100% 近い吸着を示し、架橋ポリリジンと異なっていた。

BSA 吸着量と細孔径との関係は、吸着剤細孔に BSA が拡散しうるか否かで大きく影響されることが明らかであり、細孔へ拡散した場合は単純に吸着し得る点が増加して吸着されると考えられる。一方エンドトキシンの吸着は細孔径に影響されると言うよりも、 $pK_{a,app}$ の差による効果であると考えられる。 $pK_{a,app}$ の高いアミノ化 PLMG 粒子は、架橋ポリリジン粒子に比べてより強く酸性物質を吸着できるため、細孔に入り込めない酸性物質を表面で吸着していると推測する。

Fig.4-10 に $M_{lim}1,500$ から $M_{lim}2,000$ の架橋ポリリジン粒子とアミノ化 PMLG 粒子について、その $pK_{a,app}$ 値とエンドトキシン、BSA の吸着挙動について調査した結果を示した。 $pK_{a,app}6$ から $pK_{a,app}7$ までは BSA の吸着はほぼ0%近くほとんど吸着しない。 $pK_{a,app}7$ 以上では BSA は $pK_{a,app}$ の増加に従い

吸着量が増加した。エンドトキシンは $pK_{a,app6}$ から $pK_{a,app7}$ の範囲では $pK_{a,app}$ に比例して吸着量が増加するが、 $pK_{a,app7}$ 以上ではほぼ100%の吸着となった。この結果から酸性物質の吸着は、吸着剤の $pK_{a,app}$ に比例して増加することがわかった。エンドトキシンと BSA で、吸着量が大幅に異なる点は、BSA が分子量一定の球状タンパク質であり、決まった一定の構造をとっているため、粒子表面での相互作用が少ないこと、反対にエンドトキシンが分子量 10,000 程度の単量体が集合して形成される構造体（見かけの分子量 300,000 以下から 2000,000 以上）であり、比較的その集合状態がフレキシブルに変化することが可能であり、表面での相互作用点を多数持つことが可能であることが影響しているものと考えられる。

a) Adsorbent: PL/CMO

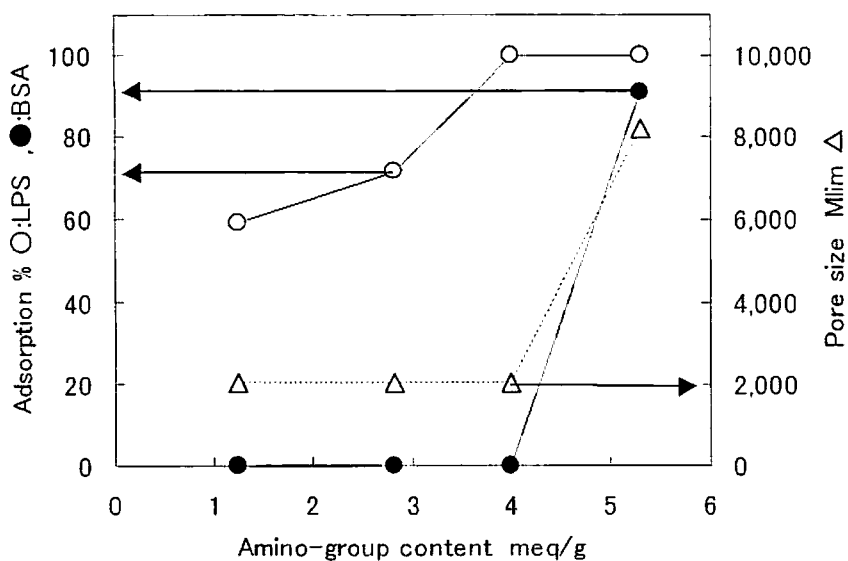
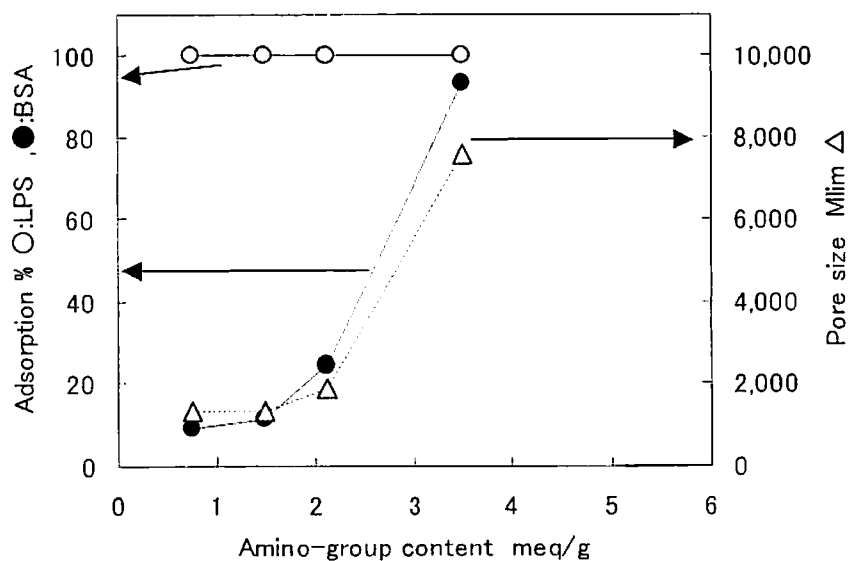
b) Adsorbent: PMLG-NH₂

Fig.4-9 Effects of adsorbent amino-group content and pore size on adsorption of cell products by (a) PL/CMO and (b) PMLG-NH₂ adsorbent. The adsorption of cell product (LPS (*E.coli*. O111:B4) or BSA) was determined by a batchwise method with 0.2 g wet adsorbent and 2 mL sample solution (100 μg/mL, pH7.0, μ = 0.05). Adsorbent pore size (M_{lim}, expressed as polysaccharide molecular mass) was calculated by means of SEC calibration curves obtained from aqueous solutions.

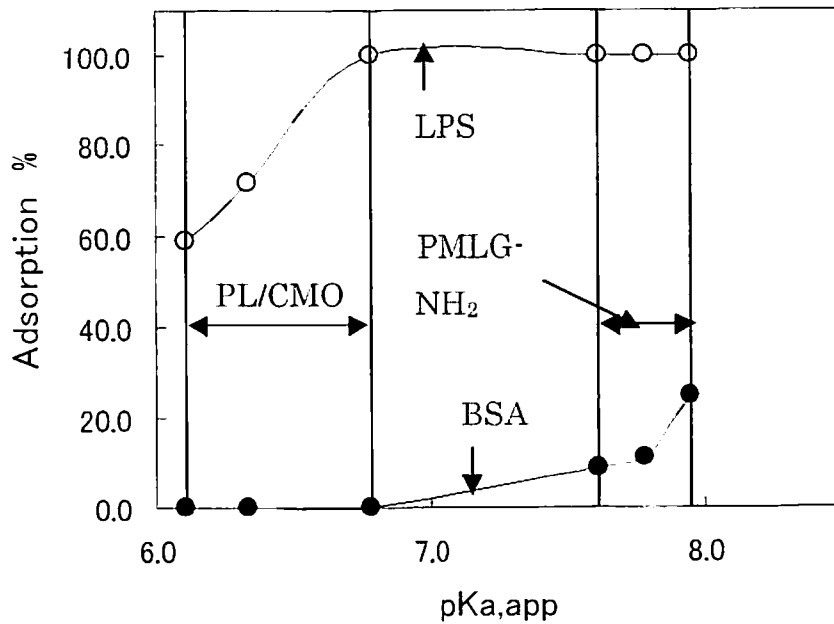


Fig.4-10 Effect of adsorbent $pK_{a,app}$ on the adsorption of LPS or BSA. The result was derived from adsorption of LPS or BSA by a variety of adsorbents with M_{lim} from 1500 to 2000 (from Figure 4-6.).

4.3 第4章の総括

本章では、架橋型と重合型の吸着剤について化学的、物理的な物性評価と吸着剤としての基本的評価を行った。架橋型吸着剤はアクリルアミド誘導体（DMP）の架橋重合粒子と、ポリ（ ϵ -リジン）の架橋不溶化粒子の2種類について検討を行った。

・ DMP系吸着剤は、ジメチルアミノプロピル基（3級アミン）を持つDMPと、イオンのに中性な架橋剤のモル比を調節することで、さまざまなアミノ基含有量と疎水性の吸着剤の調製が可能であった。

- ・ DMP系粒子のLPS吸着能はアミノ基含有量よりも架橋剤種類によって影響され、架橋剤の疎水性が高い方がLPSの吸着能が優れている。しかし、ベンゼン骨格のあるDVBはヘム蛋白を吸着する傾向が見られた。

- ・ 架橋ポリリジンのアミノ基含有量はポリリジンとCMOのモル比を調節することで制御できた。しかし、アミノ基含有量と、膨純度、 M_{lim} は連動して変化した。適当な希釈剤がなくポアをコントロールすることが難しい。

- ・ 架橋ポリリジンのLPS吸着能はアミノ基含有量が最も影響しており、架橋剤が少ない方がLPSの吸着能が高い。

- ・ 架橋ポリリジンのポアサイズと吸着能の関係をみると、 $M_{lim}8,000$ の粒子ではBSA,LPSともに吸着するが、 $M_{lim}2,000$ 以下ではBSAの吸着は見られなかった。

- ・ M_{lim} が2,000以下のポリリジン粒子とアミノ化PMLGを比較すると $pK_{a,app}$ が高いほどLPSとBSAが吸着した。

第5章 ポリ(ε-リジン)固定化吸着剤の合成の確認とその特性

本章においては、エポキシ活性化された多糖球状粒子に固定化されたポリ(ε-リジン)固定化吸着剤の合成の確認として物性の測定と吸着の基本特性について調査した。

5.1 合成の確認

セルロファイン CPC を用いて、ポリ(ε-リジン)を導入する条件を検討した。Table 5-1 にポリ(ε-リジン)の仕込み量と導入量の関係について示した。

セルロース粒子へのポリ(ε-リジン)導入は仕込み量とともに増加するが、セルロースとのモル比 ≈ 1 以上でほぼ一定の導入量になった。窒素含有量から反応の効率を見ると、反応の回収率はポリ(ε-リジン)の仕込み量が少ないほど大きくなり最大で 40% の利用であった。一方、導入量が一定となる仕込みではポリ(ε-リジン)の固定化効率は 17% から 19% であった。この反応で使用したポリ(ε-リジン)は反応後回収し使用することが可能である。

本反応方法では、ポリ(ε-リジン)の利用率が低いように見られる。本反応を、セルロファイン CPC に導入されたエポキシ基とポリ(ε-リジン)のモル比で見ると、25 倍以上でポリ(ε-リジン)の導入量はほぼ一定となった。反応しうるエポキシ基に対して大過剰のポリ(ε-リジン)が使用されているため回収率が低い結果となったと思われる。また、本反応が固液反応であるため反応効率が低いことも合わせて低い反応性の原因となったと推測できる。

able5-1 Elemental analysis of various poly(ϵ -lysine)-immobilized cellulose adsorbents.

Name	Molar ratio (mol%)		Elemental analysis			Efficiency of immobilized EPL %
	Cellulose (glucose unit)	EPL	EPL/Epoxy	Calcd. N%	Found	
C-P-6-7	93	7	2.2	1.3	0.5	40.2
C-P-6-14	86	14	4.4	2.4	0.8	33.6
C-P-6-24	76	24	8.5	4.4	1.0	22.9
C-P-6-39	61	39	17.7	7.3E	1.6	21.2
C-P-6-49	51	49	25.5	9.3	1.8	19.3
C-P-6-56	44	56	35.5	11.0	1.9	17.3
C-P-6-61	39	61	39.8	12.1	2.1	17.6

a: The amount of average introduction of epoxy group was $230\mu\text{mol/dry}\cdot\text{g}$

Efficiency of immobilized EPL % = $(\text{EPL fixed in gel/EPL used for the reaction}) \times 100$

EPL is the abbreviation of poly(ϵ -lysine).

5.2 ポリ(ϵ -リジン)固定化吸着剤の特性

本実験の結果からモル比として「多糖の構成最小単位(セルロースの場合 162) : ポリ(ϵ -リジン) \approx 40 : 60」(C-P-6-61)が最もポリ(ϵ -リジン)が導入できる条件であったため、他の多糖粒子にたいしても同様の反応でポリ(ϵ -リジン)を固定化した。Table5-2 に種々のポリ(ϵ -リジン)固定化多糖粒子の性質について示した。セルロース粒子はセルロファイン(チッソ(株)製)の $M_{lim}10^3 \cdot 10^4, \leq 2 \times 10^6$ のものを使用した。デキストラン粒子は(アマシャムファルマシアバイオテック製)の $M_{lim}10^3 \cdot 10^4$ のものを使用した。またアガロース粒子として $M_{lim}4 \times 10^5$ のものを使用した。またリガンドにはポリ(ϵ -リジン)のほかにポリアリルアミンを用いた。

元素分析値の窒素含有量は、多糖ゲルにはもともと窒素含有量がほとんどない事から、ポリ(ϵ -リジン)導入量として考えて良いまた窒素含有量と AEC はほぼ比例関係にあることから支持される。

エポキシ基は、多糖ゲルの構成糖質の種類により導入量の違いが見られた。これは、多糖基材の物質であるセルロース、アガロース、デキストランなどの反応性の差が影響しているものと考えられる。セルロース分子は繊維が数本平衡に集まった数種の結晶構造を取り強固な水素結合を形成し不溶化するが、その結晶部分の反応性が引くいと考えられる。アガロースは繊維が螺旋状構造を取りその螺旋構造内の水素結合により不溶化されているものである。一方デキストランは水溶性であり、粒子化にクロロメチルオキシランの架橋が不可欠であり、その2次構造はランダムなものである。これらの構造的違いがエポキシの反応性に差をもたらすものと考えられる。

ポリ(ϵ -リジン)固定化吸着剤の pK_a は、6.3 から 7.0 の範囲であった。吸着剤のポアサイズが小さいものほど pK_a が小さい傾向が見られた。このことは、網目構造が密である効果のために水和し難いためであると思われる。

一方、ポリアリルアミン、アリルアミン-ジアリルアミンの共重合体は $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 型のアミノ基を含有する合成ポリカチオンである。この合成ポリカチオンのアミンはポリ(ϵ -リジン)に含まれている α 位のアミノ基と比較して pK_a 高くリガンドの pK_a 値の比較をするために、ポリ(ϵ -リジン)固定化反応と同様の反応で固定化した。合成ポリカチオン固定化吸着剤の pK_a 値は 8.0-8.4 でありポリ(ϵ -リジン)固定化吸着剤に比べて高く、リガンドの元々の pK_a が反映された。

ポリ(ϵ -リジン)の固定化によるポアサイズの変化について調べた結果を Fig. 5-1 に示した。セルロファイブ CPC の場合、導入量の違いによっても分子量の校正曲線に差は見られなかった。その他の多糖粒子でも反応前後で、ポアサイズは変化しない結果であった。

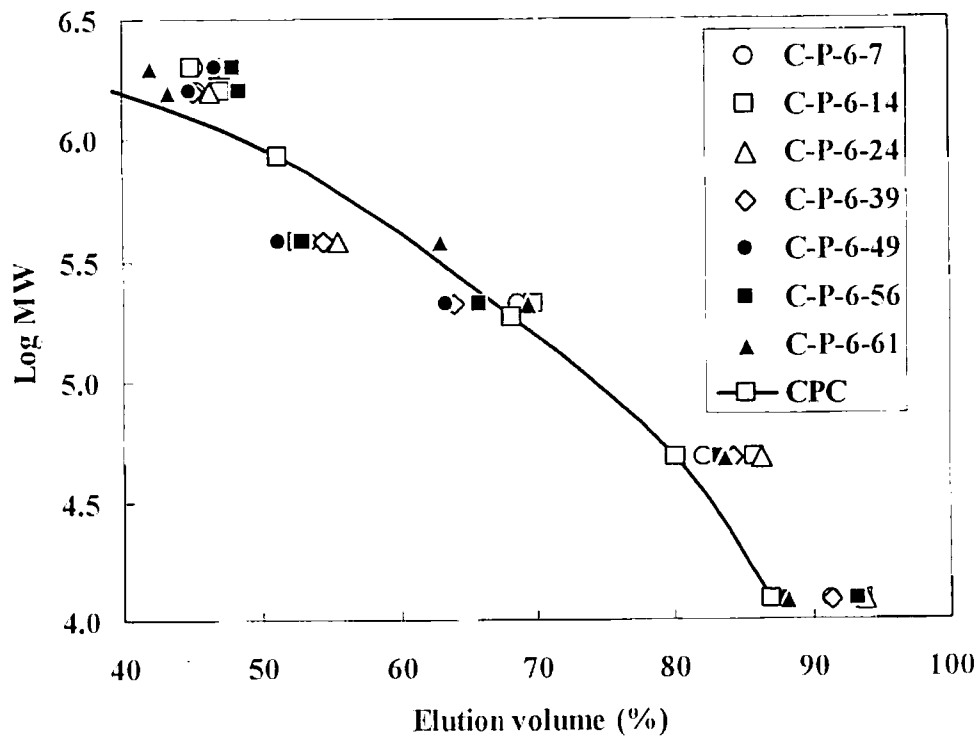


Fig.5-1
Comparison of calibration curve of
various poly(ϵ -lysine) immobilized Cellulofine-CPC.

Table 5-2 Characteristics of PL-immobilized adsorbents

Name/base gel	Matrix	Elemental analysis(%)			Epoxy group $\mu\text{mol/g}$	AEC meq/ml	pKa	Sd ml/g	
		H	C	N					
									meq/g
PL-Cellulose-10 ³ / (CellufineGC15)	Cellulose	6.9	45.4	2.4	300	0.6	0.20	6.3	2.6
PL-Sephadex-10 ³ / (SphadexG10)	Dextran	7.4	49.9	1.2	330	0.2	0.09	6.3	2.3
PL-Cellulose-10 ⁴ / (Cellufine GC700)	Cellulose	7.4	45.1	6.5	430	1.4	0.40	6.6	3.5
PL-Sephadex-10 ⁴ / (SphadexG75)	Dextran	7.2	46.3	4.7	120	1.9	0.10	7.0	16.6
PL-Sepharse / (SpharoseCL6B)	Agarose	7.4	48.5	5.2	390	1.8	0.10	6.8	14.1
PL-Cellulose-10 ⁶ / (Cellufine CPC)	Cellulose	6.7	43.5	2.1	235	0.6	0.04	6.4	14.9
PAA10C-Cellulose-10 ⁶ / (Cellufine CPC)	Cellulose	—	—	3.8	235	2.8	0.24	8.4	11.8
PAADC11-Cellulose-10 ⁶ / (Cellufine CPC)	Cellulose	—	—	2.6	235	2.3	0.21	8.0	11.1

5.3 タンパク質、LPS 吸着の基本的挙動

5.3.1 アミノ基含有量の効果

ポリ(ϵ -リジン)固定化セルロース粒子の生体関連物質の吸着能について調査した。Fig.5-2(a)は Table5-1 に示したポリ(ϵ -リジン)固定化量の異なる一連の吸着剤とエンドトキシン吸着について示した。試験方法は2mlのエンドトキシン試験液と0.2gの湿重量の吸着剤を用いたバッチ法で行った。

エンドトキシンの吸着能は、吸着剤に含有されたアミノ基0.2meq/gを境に著しく変化した。吸着剤に含まれたアミノ基含有量が0.2meq/g以上でエンドトキシンが99%以上吸着することがわかった。一方、吸着剤のアミノ基含有量が0.2meq/g以下ではエンドトキシン吸着量は20%以下となった。このようなエンドトキシン吸着能の急激な変化はアミノ基密度（あるいは電荷密度）がある一定量以上がエンドトキシンの吸着に必要なためと考える。

Fig.5-2(b)にタンパク質についても同様にバッチ法で試験した結果を示した。酸性タンパク質であるBSAは、エンドトキシンと同様の傾向を示した。アミノ基含有量が0.2meq/gまでは、比例してBSAが吸着され、0.2meq/g以上ではBSAは90%以上が吸着された。一方塩基性のタンパク質Cty.Cは、アミノ基含量が増加してもほとんど吸着しない結果であった。

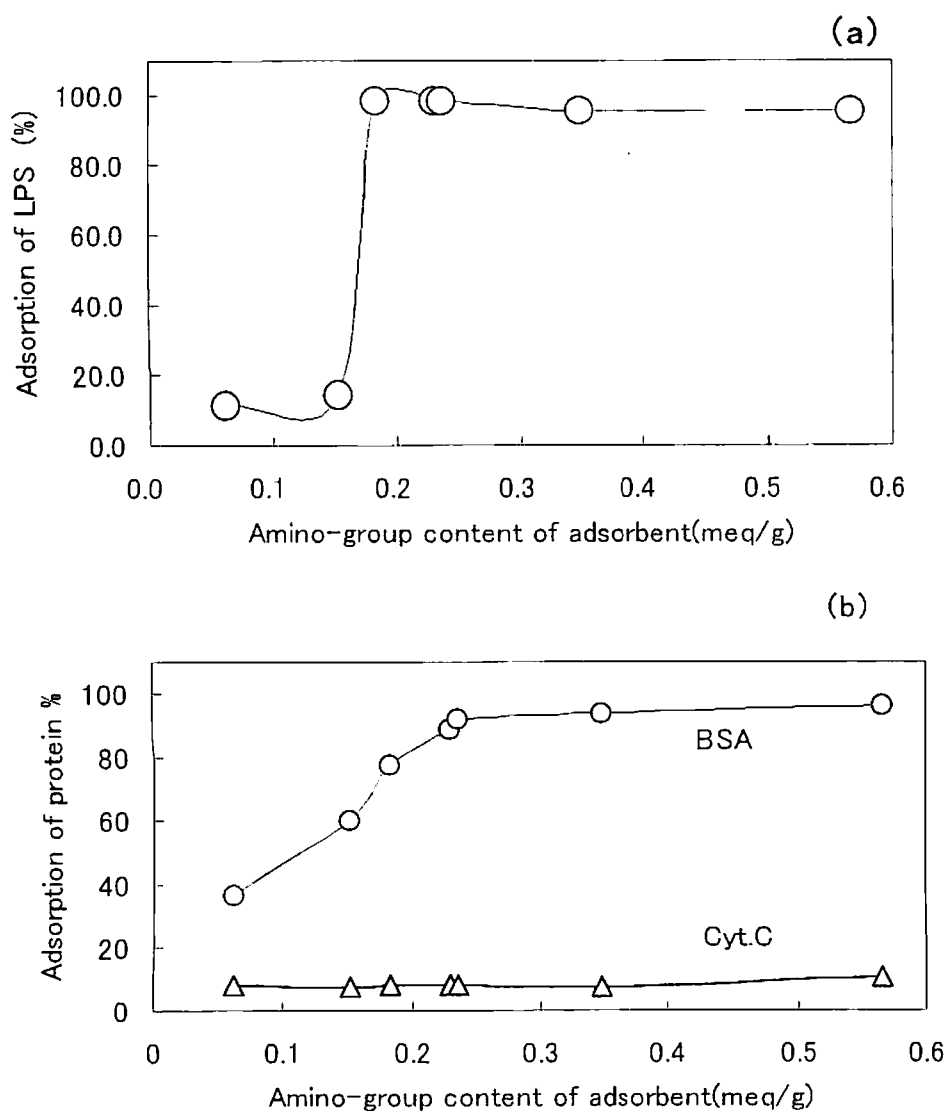


Fig.5-2 Effects of amino group-content of the adsorbents on adsorption of cell products (LPS ;(a) or protein;(b)) by various poly(ϵ -lysine) immobilized adsorbents. The adsorption of a cell product was determined by a batchwise method with 0.2g-wet of the wet adsorbent and 2mL of a cell product solution ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$, pH7.0, ionic strength of $\mu=0.05$).

5.3.2 ベースマトリックスの効果

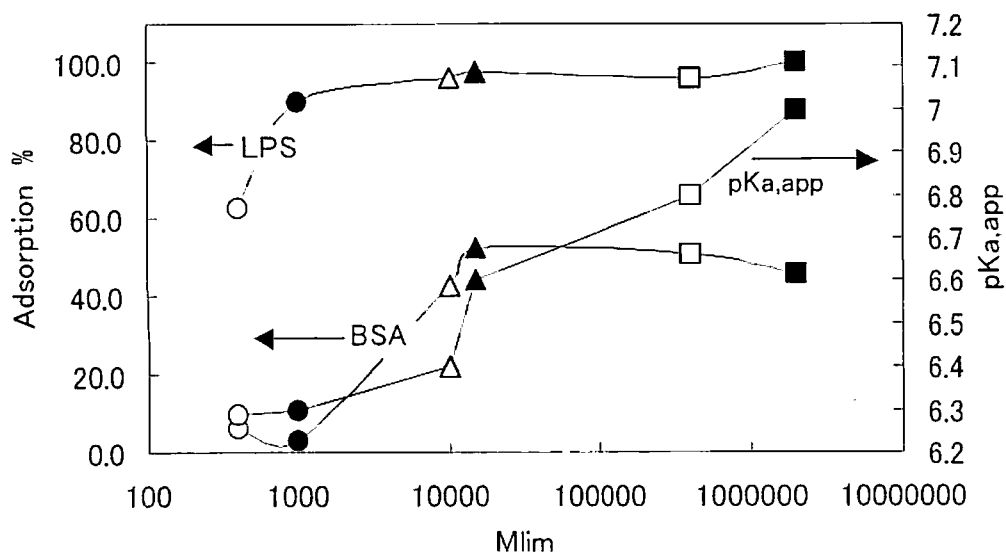
Fig.5-3 は、Table.5-2 に示したさまざまなポリ(ϵ -リジン)固定化多糖粒子についてポアサイズおよび $pK_{a,app}$ がエンドトキシン、BSA の吸着に及ぼす影響について調査したものである。

BSA は、吸着剤のポアサイズが 1,000 以下では吸着せず、それ以上ではほぼ同量の吸着が見られた。一方エンドトキシンはポアサイズが 400 以上ではほぼ同量の吸着量を示した。 $pK_{a,app}$ はポアサイズに比例して高い値になる傾向を示した。多糖粒子の種類(セルロース、デキストラン、アガロース) が吸着に与える影響はなく、それよりも粒子のポアサイズが最も影響を与えている。

5.3.3 pH 及びイオン強度、細孔径の効果

Fig.5-4 は、PL-Cellulose-10⁶、PL-Cellulose-10³ とそのベースゲルであるセルロファイン、DMP 粒子、ポリミキシンセファロースについてイオン強度の変化と LPS の吸着について調査したものである。

ポリミキシンセファロースはイオン強度の増加に対してエンドトキシンの吸着が著しく減少した。DMP 粒子はその次に、イオン強度の増加に対してエンドトキシンの吸着が影響された。PL-Cellulose の 2 種はイオン強度 $\mu=0.8$ まで 90%以上のエンドトキシン吸着量が確認された。イオン強度 $\mu=0.8$ 以上では PL-Cellulose-10³ は、吸着量が 70%程度に落ちたが、PL-Cellulose-10⁶ は吸着量が 90%程度を保ち、イオン強度に対して抵抗を示すことが示された。一方、PL-Cellulose-10³ の原料であるセルロファイン GC15 はイオン強度の増加と共に、エンドトキシン吸着量が増加する傾向が見られた。イオン強度の増加によりエンドトキシンの吸着が増加することから、疎水的な吸着が示唆されるがその詳細は更に検討を要する。



PL-Sephadex G-10 ○ , PL-cellulose-103 ● PL-cellulose-104 △ , PL-Sephadex-G75 ▲ , PL-Sepharose CL4B □ , PL-Cellulose-106 ■

Fig.5-3

Effects of particle size and $pK_{a,app}$ of the adsorbents on adsorption of cell products (LPS or protein) by various poly(ϵ -lysine) immobilized adsorbents. The adsorption of a cell product was determined by a batchwise method with 0.2g-wet of the wet adsorbent and 2mL of a cell product solution ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$, pH 7.0, ionic strength of $\mu=0.05$).

Fig.5-5 は PL-Cellulose-10⁶, PL-Cellulose-10³ とポリミキシンセファロースのエンドトキシン吸着量と pH の関係を調査したものである。

ポリミキシンセファロースは、pH7 でエンドトキシンを 100%近く吸着したが、pH8 から pH9 と上昇すると急激に吸着量は減少する。一方、pH7 より低い、酸性側では pH4 までに緩やかに吸着量が減少した。全体的にポリミキシンセファロースのエンドトキシン吸着の pH 依存性は釣鐘型の曲線を示し、イオン交換体の典型的なタンパク質吸着曲線に似ている。PL-Cellulose-10³ は、pH6 以上でほぼ 100%の吸着が見られたが、pH6 以下では緩やかに吸着量が減少した。PL-Cellulose-10⁶ は pH4 から pH9 までの範囲全てで、100%近い吸着が見られた。

Fig.5-6a,b はイオン強度およびポリ(ε-リジン)固定化多糖粒子の排除限界分子量の変化と、タンパク質吸着について調査した結果を示したものである。BSA は、 M_{lim} が 2,000 の場合、イオン強度に関係なく吸着しないが、 1×10^4 、 2×10^6 と M_{lim} が高くなるにつれて BSA の吸着量は増加した。一方、ポリミキシンセファロースは M_{lim} が 2×10^6 と高いが、BSA は吸着し難い傾向を示した。これは、リガンドの性質（環状構造）、導入量がポリ(ε-リジン)に比べて低いことなどが影響していると考えられる。一方、γ-グロブリンはイオン強度に影響されず、 M_{lim} とリガンド種類に影響された。 M_{lim} が 2,000 では吸着せず、 1×10^4 ではわずかに吸着され、 2×10^6 では更に吸着量が増加した。 2×10^6 ではポリミキシンよりもポリ(ε-リジン)の方がよりγ-グロブリンを吸着した。

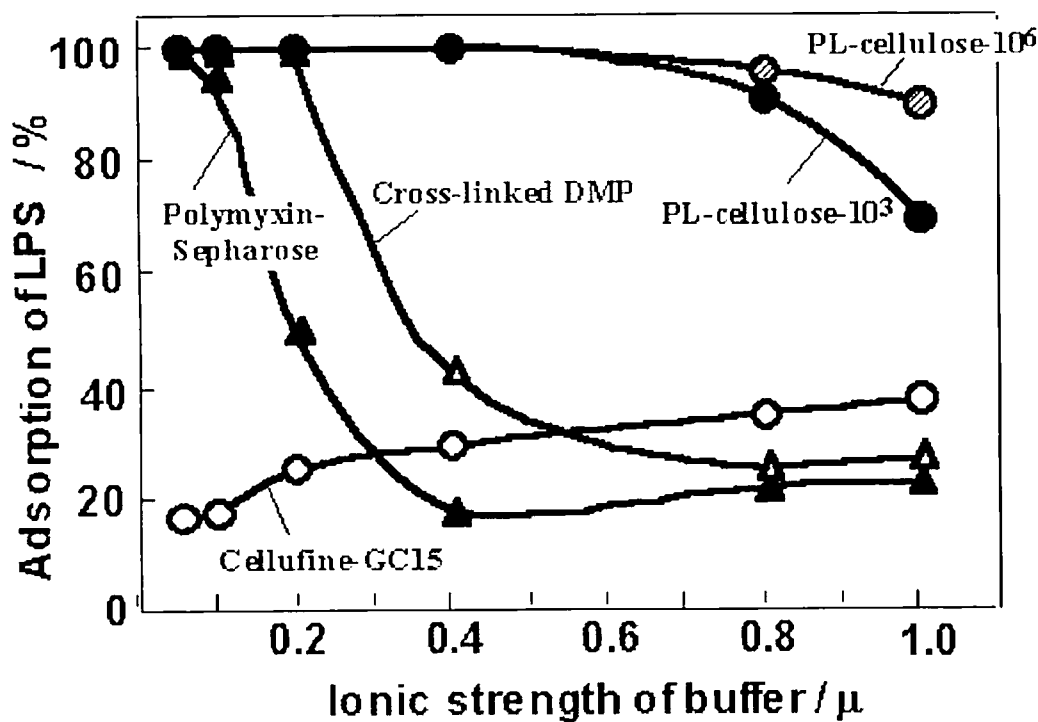


Fig.5-4 Effect of ionic strength on adsorption of LPS by various adsorbents. The adsorption of LPS was determined using a batchwise method with 0.2 g of the wet adsorbent and 2 ml of a LPS solution ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$, pH 7.0, $\mu = 0.05 - 1.0$). Cellufine-GC15 particles: Matrix before introduction of poly(ϵ - lysine).

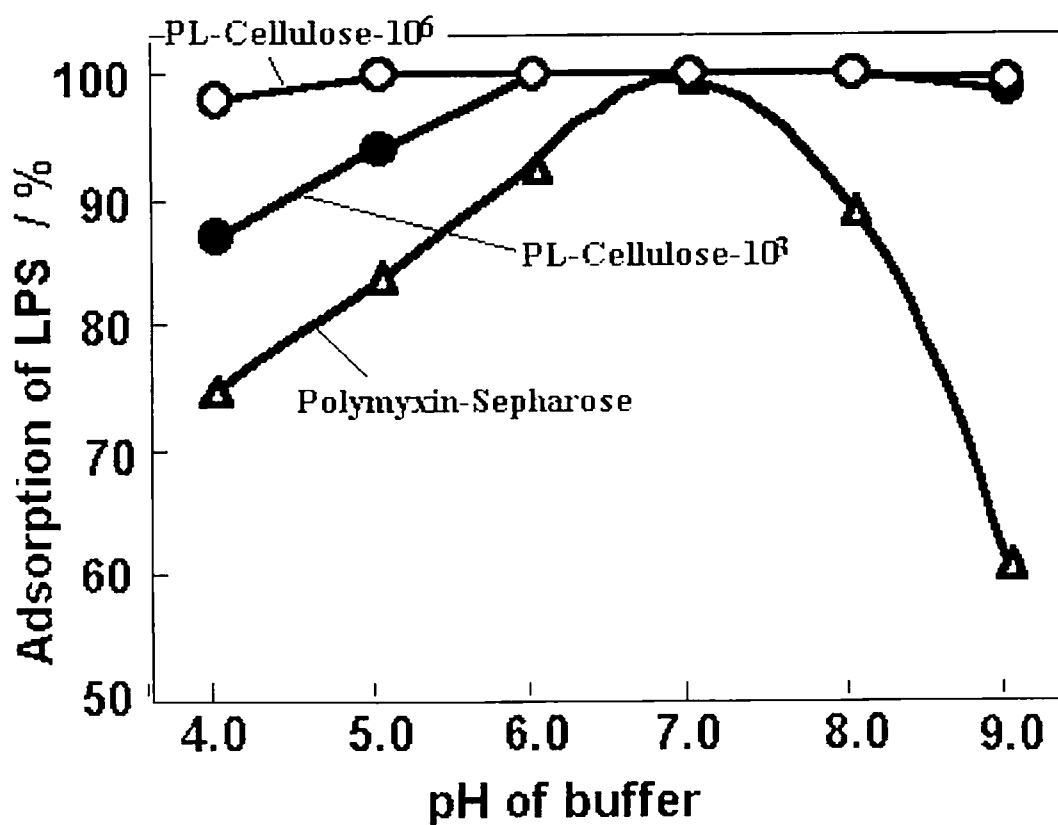


Fig.5-5 Effect of pH on adsorption of LPS by various adsorbents. The adsorption of LPS was determined using a batchwise method with 0.2 g of the wet adsorbent and 2 ml of a LPS solution ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$, pH 4.0 – 9.0, $\mu=0.05$).

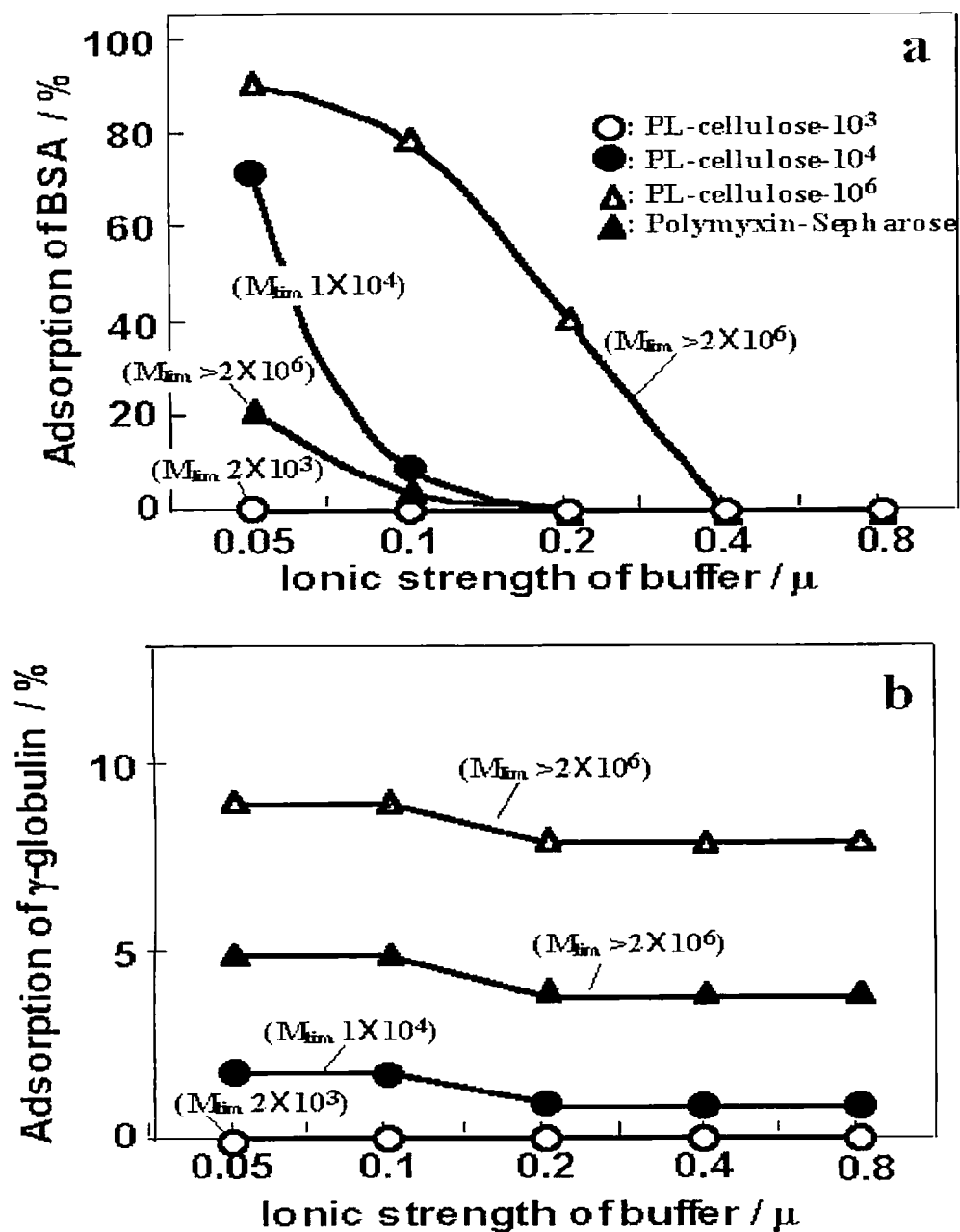


Fig.5-6 Effects of the buffer's ionic strength and the adsorbent's pore size (M_{lim}) on adsorption of BSA (a) and γ -globulin (b) by various adsorbents. The adsorption of protein was determined using a batchwise method with 0.2 g of the wet adsorbent and 2 ml of a protein solution ($500 \mu\text{g ml}^{-1}$, pH 7.0, $\mu = 0.05$).

5.4 第5章の総括

本章では、ポリ(ϵ -リジン)固定化型の吸着剤の化学的、物理的な物性評価と吸着剤としての基本的評価を行った。特にポリ(ϵ -リジン)をリガンドとしてセルロース粒子(セルロファイン)に固定化した吸着剤について中心的に検討を行った。

- ・ポリ(ϵ -リジン)を固定化した吸着剤のポアサイズ(M_{lim})は固定化する前の粒子のポアサイズと変化ない。従って吸着剤のポアサイズは原料粒子のポアサイズを選定すればよい。

- ・アミノ基含有量はポリ(ϵ -リジン)の仕込み量によって制御できた。未反応のポリ(ϵ -リジン)は吸着剤とろ過分離することで容易に回収可能であった。

- ・ $pK_{a,app}$ はどのようなベース粒子を用いても6~7の範囲になった。これは固定化反応によって形成される2級アミン(固定化点)の生成量が少なく、固定化後もポリ(ϵ -リジン)の本来の pK_a に近い値となったためと考えられる。

- ・吸着挙動はポアサイズにより大きく影響受けたが、ベース粒子のマトリックスによる影響は無かった。特にタンパク質の吸着はポアサイズが大きいほど増加しており、吸着剤とタンパク質の吸着は粒子内部ポアに拡散できるか否かが重要であった。一方LPSは見かけの分子量が300,000~2,000,000程度と推定されるが、吸着剤のポアサイズが 10^3 、 10^6 でもほぼ変わらない吸着挙動を示し粒子内への浸入が必須条件とはならなかった。

第6章 吸着剤のエンドトキシン選択除去能の評価

第4章、第5章で各吸着剤のタンパク質、LPSの吸着についての基本的な挙動を調べた。本章ではタンパク質溶液からのLPSの選択除去能について調査した。

選択除去能の調査方法としては、精製されたLPSをタンパク質に添加する系と、元々タンパク質に含まれている天然のLPS除去する系が考えられる。本研究では、先ず酸性～塩基性の各種タンパク質に精製LPSを添加する系でバッチ法を用いて、LPSの選択除去に与えるイオン強度の影響について評価し、最適条件の設定を行った。

次いで、LPS添加系で設定した条件で、タンパク質を自然に汚染したLPSの選択除去について検討を行った。評価方法としてバッチ法とカラム法によって行った。

6.1 精製LPS添加タンパク質溶液からのLPS選択除去

6.1.1 DMP粒子

Fig.6-1は、DMP粒子とアミノ化PLMG粒子と既に市販されたが現在は販売中止となったヒスチジン固定化セファロース（パイロセップ；ダイセル社製）を用いてバッチ法により、イオン強度を $\mu=0.05$ から $\mu=1.0$ まで変化させた際のBSA溶液からのLPS選択除去についての比較を行った結果を示した。

DMP/BBMA-4.0とDMP/DVB-4.0はイオン強度が $\mu=0.05$ から $\mu=1.0$ の範囲でBSAが吸着しなかったが、エンドトキシンは $\mu=0.05$ から $\mu=0.2$ の範囲でほぼ100%の吸着があり、この範囲で効果的にエンドトキシン選択的な除去が可能であった。イオン強度 $\mu=0.2$ 以上ではエンドトキシン吸着量は減少していくが、DMP/BBMA-4.0の方

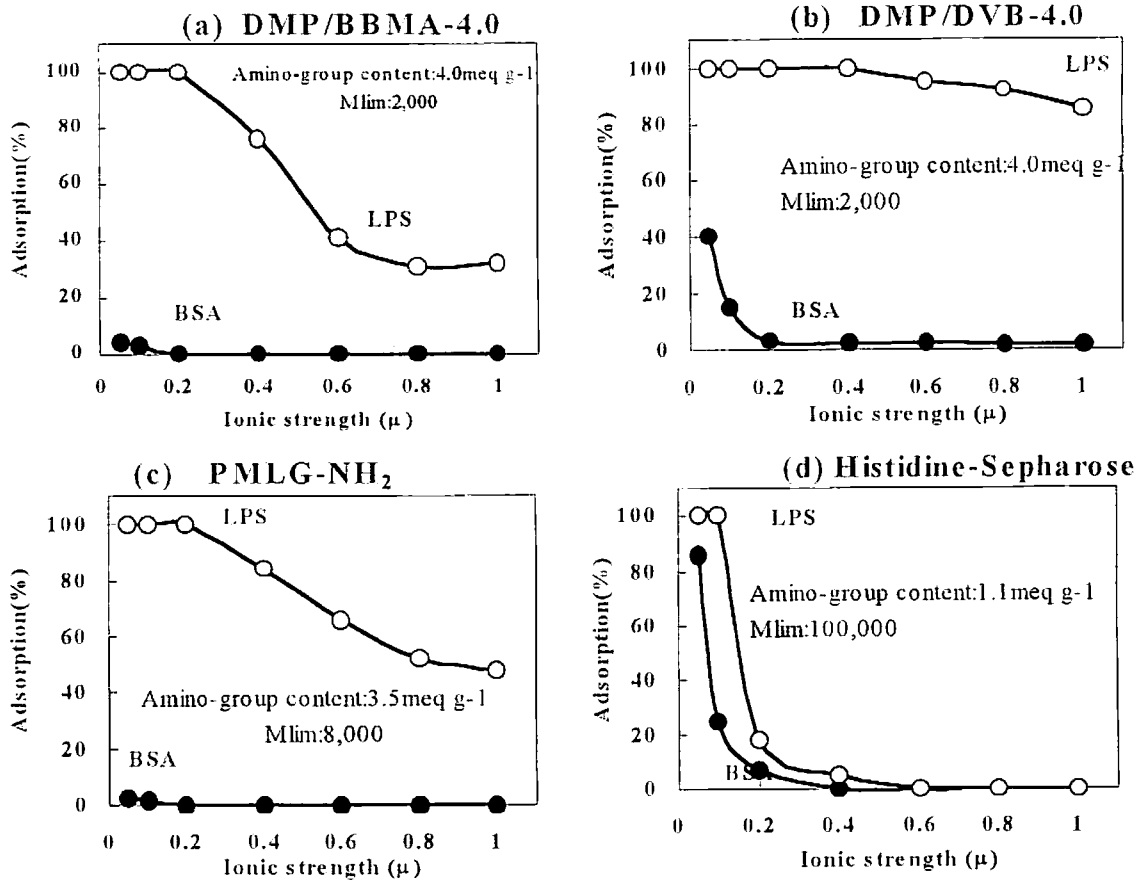


Fig.6-1 Effect of ionic strength on removal of LPS from a BSA solution (BSA :500 μ g/mL , LPS(*E.coli* O111:B4) :100 ng/mL , pH7.0) by various adsorbents. The removal of LPS was determined by a batchwise method with 0.2 mL of the wet adsorbent and 2 mL of a sample solution.

がより急激に減少する傾向が見られた。

アミノ化 PLMG 粒子はイオン強度 $\mu=0.2$ 以下で BSA の吸着がみられ $\mu=0.05$ で最大 40% の吸着がみられた。エンドトキシンは $\mu=0.05$ から $\mu=0.4$ の範囲でほぼ 100% の吸着であり、このイオン強度範囲では効果的に BSA 溶液からエンドトキシンの選択除去が可能である。イオン強度 $\mu=0.4$ 以上ではエンドトキシンの吸着は減少するが、その度合いは DMA 系の粒子に比べてわずかであり、 $\mu=0.4$ 以上の高イオン強度領域でもエンドトキシンの選択除去は可能である。

ヒスチジン-固定化セファロースの場合は BSA とエンドトキシンの吸着挙動がほぼ同じである。イオン強度 $\mu=0.1$ 以下でエンドトキシンが 100% 近く吸着されるが、 $\mu=0.05$ では BSA も 80% 以上吸着しほとんど選択除去できない。 $\mu=0.1$ では BSA は 20% 以上吸着しこのポイントがこの吸着剤でもっとも選択性が高い。しかし、このような狭い範囲でのみしか選択性が発揮されないならば、実用性は低い。

6.1.2 ポリ (ϵ -リジン) 架橋吸着剤

Fig.6-2 は、架橋ポリリジン粒子 2 種と、アミノ化 PMLG 粒子の、BSA 溶液からの LPS の除去にイオン強度が与える影響について調査した結果を示したものである。架橋ポリリジン粒子は、排除限界分子量が 2000 では BSA は全てのイオン強度 ($\mu=0.05$ から $\mu=0.8$) で BSA を吸着せず、LPS の吸着は $\mu=0.2$ 以下では 100% 近くあり、この範囲では LPS の選択除去が可能であった。一方、 $M_{lim}8000$ の架橋ポリリジン粒子は低イオン強度でより高い BSA の吸着がみられ、 $\mu=0.1$ 以下では選択的な除去はできない、またそれ以上のイオン強度では BSA、LPS 両者の吸着量が

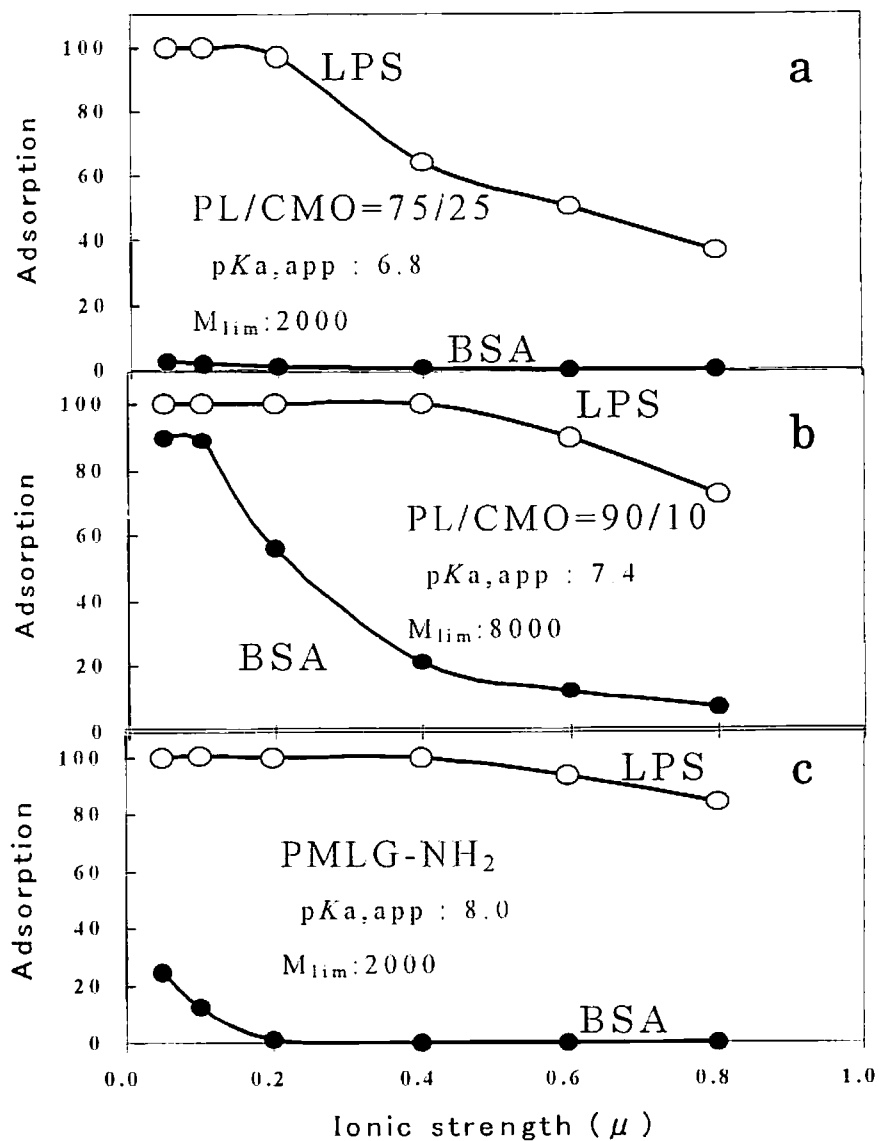


Fig.6-2 Effects of buffer ionic strength on the selective adsorption, by a variety of adsorbents, of LPS from a BSA solution containing LPS. The selective adsorption of LPS was determined by a batchwise method with 0.2 g wet adsorbent and 2 mL sample solution (BSA $500 \mu\text{g mL}^{-1}$; LPS(*E. coli* O111:B4) 100ng mL^{-1} ; pH7.0; ionic strength, μ , =0.05-0.8).

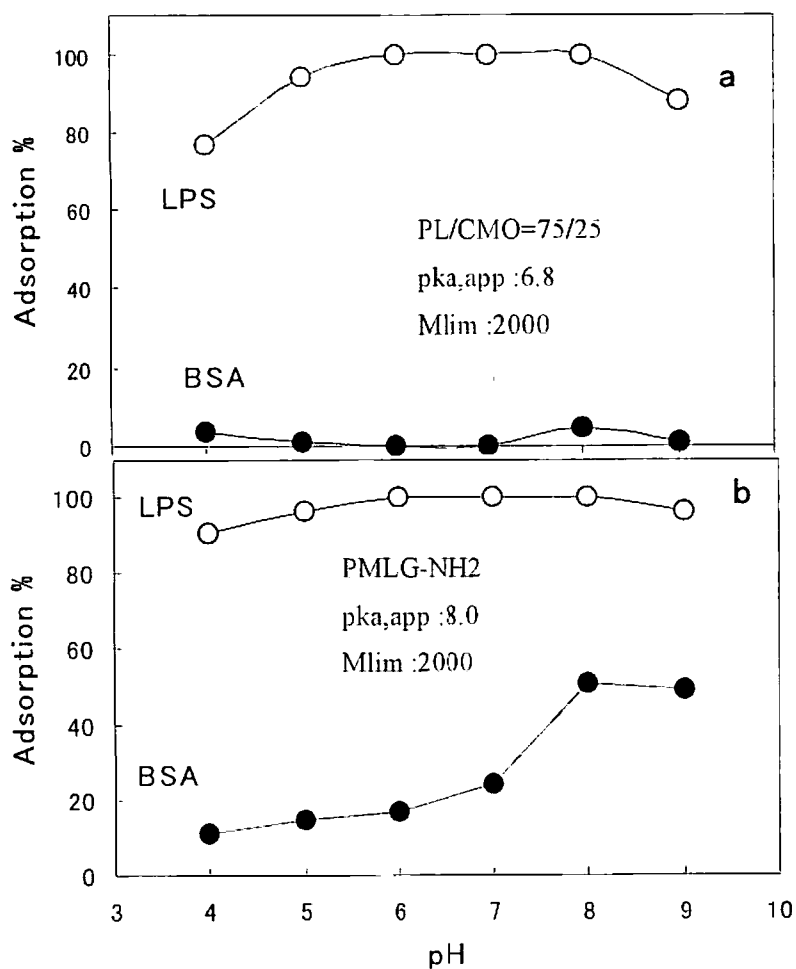


Fig.6-3 Effect of buffer pH on the selective adsorption of LPS from BSA solution containing PLS by (a) PL/CMO = 75/25 and (b) PMLG-NH₂ adsorbents. The selective adsorption of LPS was determined by a batchwise method with 0.2 g wet adsorbent and 2mL sample solution (BSA 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; LPS(*E.Coli* O111:B4)100 ng mL^{-1} ; pH4.0-9.0; ionic strength, μ ,=0.05).

減少するため LPS の効率的な選択除去は難しい。

$M_{lim}2000$ のアミノ化 PMLG 粒子は $\mu=0.2$ 以下で、BSA をわずかに吸着する傾向が見られたが、同じ M_{lim} の架橋ポリリジン比べて LPS の吸着が高イオン強度 ($\mu=0.2$ 以上) で 90~100% 近くあり、イオン強度 $\mu=0.2\sim 0.4$ の範囲では高い効率で BSA 溶液からの LPS 除去が可能である。これらの粒子は、 $M_{lim}2000$ は同じであるが、 $pK_{a,app}$ は異なっており、この値が高いアミノ化 PLMG がより塩基性が強く、酸性物質に対する吸着挙動が異なったものと考えられる。

Fig.6-3 は、 $M_{lim}2000$ の架橋ポリリジン粒子とアミノ化 PMLG について、BSA 溶液からの LPS 選択除去における pH の影響について調査したものである。イオン強度 $\mu=0.05$ で pH4.0~9.0 の範囲で比較した。

架橋ポリリジンは pH5.0~8.0 の範囲では効率的に BSA 溶液から LPS の選択除去が可能である。更に pH6.0~7.0 では LPS がほぼ 100% 吸着するが、BSA はほぼ吸着しない良好な結果が得られた。

アミノ化 PMLG 粒子は、全ての pH 域で LPS の吸着が 90% 以上あり、pH の影響はほとんど受けない結果を得た。しかし、BSA は最低でも 10% が吸着し、pH が上昇すると共に、最大で 50% 近い吸着を示した。

6.1.3 ポリ (ϵ -リジン) 固定化セルロース粒子

Fig.6-4 はポリリジン固定セルロース粒子の 2 種類と、ポリミキシンセファロースについて、BSA 溶液からの LPS 選択除去について、イオン強度が与える影響について調査したものである。

Fig.6-4(a) の PL-cellulose- 10^3 は、イオン強度 $\mu=0.05\sim 0.4$ の範囲で BSA が吸着せず LPS はほぼ 100% 吸着し、この

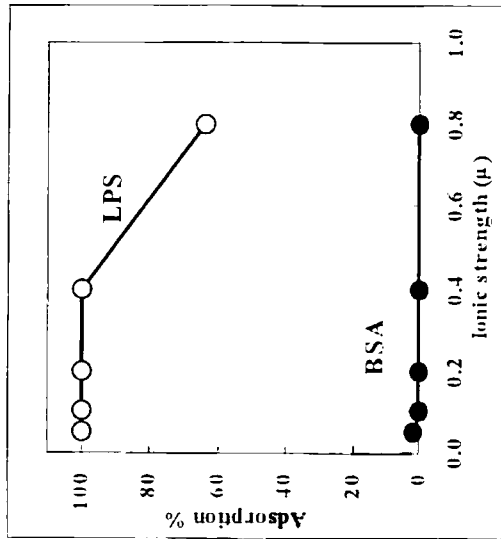
範囲で BSA 溶液からの LPS の選択的除去が可能であった。

Fig.6-4(b)の PL-cellulose-10⁶ は、イオン強度 $\mu=0.05\sim 0.2$ の範囲では BSA の吸着がみられ、LPS は $\mu=0.05\sim 0.4$ までほぼ 100%の吸着があり、これらの挙動からイオン強度 $\mu=0.4$ では効果的に BSA 溶液から LPS が選択的に除去できると考えられる。

Fig.6-4(c)のポリミキシンセファロースは、低イオン強度であっても LPS が 100%吸着せず、さらに $\mu=0.05\sim 0.1$ までではわずかに BSA が吸着しておりこの範囲での効果的な LPS の選択除去は難しいと思われる。一方、 $\mu=0.2$ 以上では BSA の吸着は見られないが LPS の吸着も著しく落ちるために、この領域でも選択的な LPS の除去が難しいと考えられる。

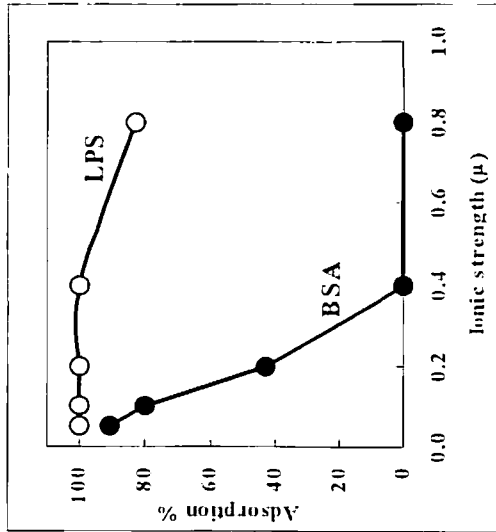
(a) PL-Cellulose-10³

Amino-group content: 0.6 meq g⁻¹
Mlim: 2 × 10³



(b) PL-Cellulose-10⁶

Amino-group content: 0.6 meq g⁻¹
Mlim: 2 × 10⁶



(c) Polymyxin-Sepharose

Amino-group content: 0.2 meq g⁻¹
Mlim: > 2 × 10⁶

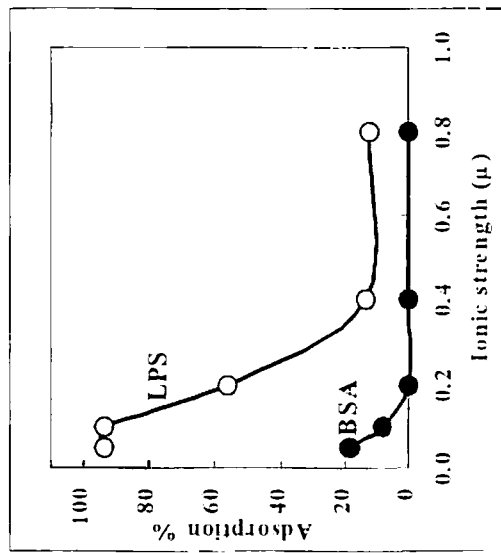


Fig.6-4 Effect of ionic strength on selective adsorption of LPS from a BSA solution containing LPS by the various adsorbents. The selective adsorption of LPS was determined using a batchwise method with 0.2 g of the wet adsorbent and 2 ml of a sample solution (BSA: 500 μg ml⁻¹, LPS (*E. coli* O111:B4): 100 ng ml⁻¹, pH 7.0, and ionic strength of μ = 0.05-0.8).

6.1.4 合成ポリカチオンポリマー固定化セルロース粒子

Fig.6-5 はリガンドの $pK_{a,app}$ が選択吸着に与える影響を調査したものである。リガンドのポリカチオンとしては、合成高分子であるポリアリルアミン、アリルアミン-ジアリルアミン共重合体（日東紡製）をポリリジンと同様な方法で固定化した吸着剤について BSA からの LPS の選択除去におけるイオン強度の影響を調査した。

Fig.6-5(B)に、PAADC11-Cellulose- 10^6 の選択除去性能を示した。PAA はポリアリルアミン-ジアリルアミンがリガンドであり、調製された粒子の $pK_{a,app}$ は 8.0 である。Fig.6-5(C)は PAA10C-Cellulose- 10^6 の選択除去性能を示した。PAA はアリルアミンがリガンドであり、調製された粒子の $pK_{a,app}$ は 8.4 である。一方 Fig.6-5(A)は PL-Cellulose- 10^6 であり $pK_{a,app}$ は 6.4 である。これらの選択吸着の比較をすると $pK_{a,app}$ が高くなると LPS の吸着がより高イオン強度でも保たれる傾向が見られた。一方 BSA の吸着も $pK_{a,app}$ が高いとイオン強度が高くなっても吸着する傾向がみられた。このように、吸着剤の $pK_{a,app}$ が高いとより高イオン強度でも酸性物質の吸着が保たれる現象がみられ、塩基性の強さが耐イオン強度の性能を与えることが解った。従って、LPS を除去する試料のイオン強度が高い場合は、 $pK_{a,app}$ が高い吸着剤を用いると有利であると思われる。

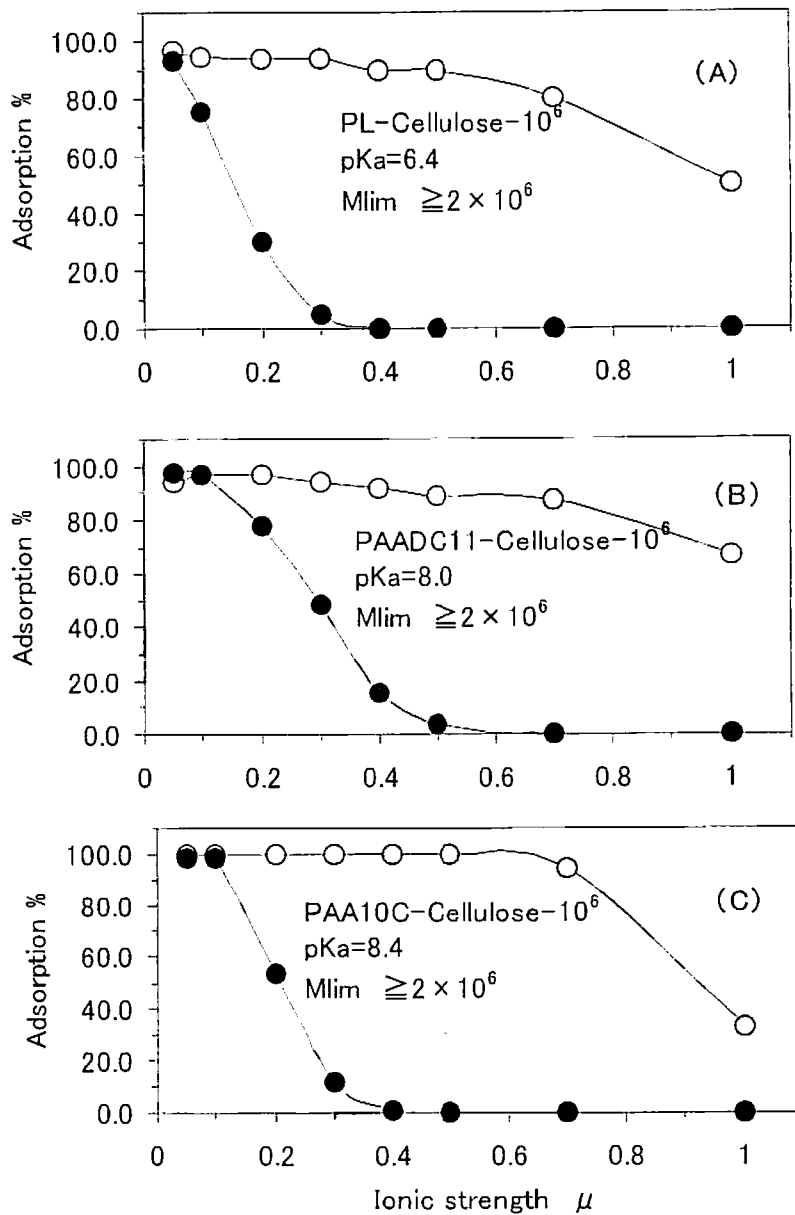


Fig.6-5 Effects of buffer ionic strength on the selective adsorption, by a polycationic polymer immobilized adsorbents, of LPS from a BSA solution containing LPS. The selective adsorption of LPS was determined by a batchwise method with 0.2 g wet adsorbent and 2 mL sample solution (BSA 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; LPS(*E. coli* O111:B4)100ngmL⁻¹; pH7.0; ionic strength, μ , =0.05-1.0).

6.2 タンパク質を汚染しているエンドトキシンの選択除去

6.2.1 DMP 粒子

Table6-1 は DMP/BBMA-4.0、DMP/DVB-4.0 について市販タンパク質を汚染しているエンドトキシンの選択除去を調査したものである。

1mg/mL のタンパク質溶液 2 mL (pH7.0, $\mu = 0.05$) に 0.2 mL の湿潤粒子を添加するバッチ法で処理前後のタンパク質回収率、LPS 残存量を調査した。

DMP/BBMA-4.0 は調査した全てのタンパク質で 97%以上の回収率があった。塩基性タンパク質 (pI 7.4 以上) からの LPS 除去は、酸性タンパク (pI 5.3 以下) に比べて効率が低い傾向が見られた。

一方、DMP/DVB-4.0 は Myoglobin, Cytochrome C の回収率が 80% 近くであったがそれ以外は 96% 以上の回収率であった。タンパク質の pI による LPS の除去の傾向は特に見られなかったが、Myoglobin, Cytochrome C から LPS の除去は 47.25 pg/mL で他のタンパク質に比べて高い値となった。一方 γ -Globulin は 8 pg/ml の LPS 残存量であり非常に効率よく除去できた。

Table 6-1 Removal of LPS from a Protein Solution by DMP/BMA-4.0 and DMP/DVB-4.0 Adsorbents

protein	Sample solution		DMP/BMA-4.0		DMP/DVB-4.0	
	pH	LPS con. in protein solution pg mL ⁻¹	Remain LPS pg mL ⁻¹	Recve. of Protein %	Remain LPS pg mL ⁻¹	Recve. of Protein %
BSA	4.9	42000	85	98	15	99
Insulin	5.3	3800	55	97	22	96
Myoglobin	7.4	1200	<10	99	47	82
γ -Globuline	8.4	5800	34	98	8	96
CytochromeC	10.6	350	<10	99	25	78

The removal of LPS was determined by a batchwise methods with 0.2 mL of wet adsorbent and 2mL of a protein solution containing natural LPS (protein: 1mg mL⁻¹, pH=7.0, μ=0.05). Amino-group content of adsorbent: 4.0 meq g⁻¹.

6.2.2 ポリ (ϵ -リジン) 架橋吸着剤

Table6-2 は $M_{lim}=2,000$ の PL/CMO=75/25, アミノ化 PMLG について市販タンパク質を汚染しているエンドトキシンの選択除去を調査したものである。

1mg/mL のタンパク質溶液 2mL (pH7.0, $\mu=0.05$) に 0.3mL の湿潤粒子を添加するバッチ法で処理前後のタンパク質回収率、LPS 残存量を調査した。

PL/CMO=75/25 はタンパク質の pI が 7.4 以上で LPS の残存量が 25 pg/ml 以下となるが、 pI が 4.9 以下では LPS が 65pg/ml 以上の残存量となり、塩基性タンパクの方が酸性タンパク質よりも LPS 除去がしやすい傾向がみられた。タンパク質の回収率は全て 96%以上であった。

アミノ化 PMLG は、この条件では酸性タンパク質 (pI 4.9 以下)を非常に吸着するため BSA, オブアルミンの回収率はそれぞれ 12%, 9%であった。しかし LPS の残存量はいずれの場合でも 20pg/ml 以下であり、特に pI 7.4 以上のタンパク質の場合 10pg/ml 以下であり、非常に高い除去性能を示した。またこのときのタンパク質の回収率は 96%以上であり、良好な LPS の選択除去が達成された。

Table 6-2 Removal of LPS from a Protein Solution by PMLG-NH₂ and PL/CMO=75/25 Adsorbents.

Protein	Sampel solution			PMLG-NH ₂			PL/CMO=75/25		
	pI	LPS con. in protein solution pg mL ⁻¹	LPS pg mL ⁻¹	Remain LPS pg mL ⁻¹	Recve.of Protein %	LPS pg mL ⁻¹	Remain LPS pg mL ⁻¹	Recve.of Protein %	
									Recve.of Protein %
Ovalbumin	4.6	22000	20	20	9	80	80	97	
BSA	4.9	42000	15	15	12	65	65	96	
Myoglobin	7.4	1100	<10	<10	98	10	10	97	
γ-Globuline	8.4	5600	<10	<10	96	25	25	97	
CytochromeC	10.6	1500	<10	<10	99	20	20	99	

The removal of LPS was determined by a batchwise methods with 0.3 mL of wet adsorbent(M_{int}2000) and 2mL of a protein solution containing natural LPS(protein:1mg mL⁻¹,pH=7.0,μ=0.05).

6.2.3 ポリ (ϵ -リジン) 固定化セルロース粒子

Table6-3 は PL-cellulose- 10^3 , PL-cellulose - 10^6 について市販のタンパク質を汚染しているエンドトキシンの選択除去を調査したものである。

1mg/mL のタンパク質溶液 2mL (pH7.0) に 0.3mL の湿潤粒子を添加するバッチ法で処理前後のタンパク質回収率、LPS 残存量を調査した。Fig.6-4 で明らかになった至適条件のイオン強度で評価した。

PL-cellulose- 10^3 は、イオン強度 $\mu=0.05$ においてもタンパク質の回収率は全て 99%であり、非常にタンパク質が吸着しない事がわかった。しかし、LPS の残存量は BSA の場合 45pg/ml あり比較的除去効率が悪い結果であった。

PL-cellulose- 10^6 は、イオン強度 $\mu=0.40$ においてタンパク質は 97%以上の回収量であった。LPS の残存量は全てのタンパク質で 10pg/ml 以下となり、非常に効率が良く LPS を除去することが可能であった。

Table6-3 Removal of LPS from a Protein Solution by PL-Cellulose Adsorbents.

Sampel solution		PL-cellulose-10 ³ ($\mu=0.05$, pH7.0)			PL-cellulose-10 ⁶ ($\mu=0.40$, pH7.0)		
protein	pI	LPS con. in protein solution pg mL ⁻¹	Remain LPS pg mL ⁻¹	Recve.of Protein %	Remain LPS pg mL ⁻¹	Recve.of Protein %	
BSA	4.9	32000	45	99	<10	97	
γ -Globuline	8.4	5600	20	99	<10	97	
CytochromeC	10.6	1500	15	99	<10	98	

The removal of LPS was determined by a batchwise methods with 0.3 mL of wet adsorbent and 2mL of a protein solution containing natural LPS(protein: 1mg mL⁻¹, pH=7.0, $\mu=0.05$ or 0.40).

6.2.4 各吸着剤の比較と吸着容量、解離定数の比較

Table6-4 は、各吸着剤のポアサイズ、アミノ基含有量、飽和吸着容量、解離定数について調査してまとめたものである。いままでに調製してきたさまざまなエンドトキシン吸着体について、バッチ法（イオン強度 $\mu=0.05$ 、 $\text{pH}7.0$ ）による吸着等温線の測定と Scatchard plots による解離定数の算出を行った。吸着容量を比較すると、アミノ化 PMLG > ポリリジン粒子 > PL-cellulose- 10^6 >

DMP > PL-cellulose- 10^4 > polymyxin-sepharose >

PL-cellulose- 10^3 という順番となり PMLG やポリリジンのようなアミノ酸粒子が高い吸着容量を示した。吸着容量とポアサイズ、アミノ基含有量に明確な相関関係は見出せないが、同じ系列であるポリリジン固定化セルファインでは、ポアサイズが大きくなるにつれて吸着容量も増加する傾向が見られた。

解離定数は、DMP 粒子（DVB, BBMA）、PL-cellulose- 10^4 、PL-cellulose- 10^6 が低い値を示しているが、解離定数が低いほど、低濃度に存在する LPS を吸着可能であるため、LPS の除去のためには有利である。本研究で調製した粒子はいずれも 10^{-10} 以上の値であり、従来品のポリミキシンーセファロースに比べて 10 から 100 倍低い値となっており、LPS の除去性能が高いと言える。

Table 6-4 LPS adsorption capacity and apparent dissociation constant between adsorbent and LPS

Name	Pore size of matrix <i>Mlim</i> ^a	Amino-group Content ^b Meq g ⁻¹	Adsorption	
			capacity of LPS ^c $\mu\text{g mL}^{-1}$	<i>Kd,app</i> of LPS ^c M
			adsorbent	
DMP/AA-4.1	2×10^3	4.1	360	2.7×10^{-10}
DMP/BBMA-4.0	2×10^3	4.0	380	7.2×10^{-11}
DMP/DVB-4.0	2×10^3	4.0	390	4.5×10^{-11}
PL-90	8×10^3	5.3	1800	2.6×10^{-10}
PL-75	2×10^3	4.0	1000	3.7×10^{-10}
PL-cellulose- 10^3	2×10^3	0.6	185	3.8×10^{-10}
PL-cellulose- 10^4	1×10^4	1.4	280	5.5×10^{-11}
PL-cellulose- 10^6	$>2 \times 10^6$	0.6	480	1.1×10^{-11}
PMLG-NH ₂	2×10^3	2.2	2700	1.0×10^{-10}
Polymyxin -sepharose	$>2 \times 10^6$	0.2	250	5.0×10^{-9}

^aValue deduced as a molecular weight of polysaccharide.

^bContent of amino groups in the adsorbent.

^cThe LPS adsorption capacity per mL adsorbent and the apparent dissociation constant (*Kd,app*) of LPS to adsorbent were estimated by adsorption isotherm. The adsorption isotherm was determined by a batchwise method with 0.1 mL wet adsorbent and 4 mL sample solution (LPS from *E. Coli* O111:B4 (Mw 1×10^6), $1 \cdot 10^5 \mu\text{g mL}^{-1}$, pH 7.0, $\mu=0.05$). *Kd,app* is expressed in mol L⁻¹(M) of molecular weight of LPS.

6.3 カラム法による BSA を汚染しているエンドトキシンの除去

吸着剤を利用した LPS の選択除去の工業的な実施方法としては、カラムクロマトグラフィー法が適用されると考えられる。その理由としては、製薬会社では精製方法としてカラムクロマトを多用しており、装置などのインフラストラクチャーが整備されている点、カラムの定置洗浄でエンドトキシンフリー化ができ、洗浄後は同じ装置でサンプルの処理が可能である点などが挙げられる。また、敗血症の治療へ応用する場合もカラム法が適用されるものと思われる。

以上の点からカラム法による LPS の選択的除去の検討は工業的応用や医療への応用のための基礎的なデータを与えるものである。本研究では、LPS の除去が難しい酸性タンパク質 (BSA) からの LPS 選択除去について検討した。

カラム操作方法は前述した通りに行った。本検討では BSA としてアルブミン、牛血清製 (和光純薬 1 級) を用いた。この BSA の 1mg/ml 溶液のエンドトキシンの汚染量は約 100EU/ml であった。なお本章では LPS の単位を重量からエンドトキシンユニット (EU) に変えて表現した。その理由は、天然エンドトキシンの重量と活性は一定でない点と法的 (日本薬局法) な規制では EU が用いられている点が挙げられる。本研究では、注射薬製造のための工程に使用される吸着剤の開発を主眼としているので、エンドトキシンの除去レベルは注射用蒸留水で規定されている 0.25EU/ml を目標とした。

以下に示すカラム法の操作は Table6-5 に示した条件に統一して行った。

Tabel6-5 The chromatography conditions for natural LPS removal from BSA solution.

Item	Value
Column size	ID 1.1cm-L1cm (\cong 1ml)
Flow rate	0.17ml/min (\cong 10cm/h / SV10)
Fraction size	3ml/tube
Buffer	0.05M Na ₂ HPO ₄ -NaH ₂ PO ₄ , pH7.0
Sample	BSA 1mg/ml / endotoxin 100EU/ml

SV; space velocity

Ionic strength was adjusted by NaCl.

6.3.1 ポリ (ϵ -リジン) 固定化セルロース粒子

(1) PL-Cellulose-10³

Fig.6-6 に PL-Cellulose-10³ の BSA 溶液からの汚染エンドトキシンの選択除去について調査した結果を示した。BSA はイオン強度 $\mu=0.05$ と $\mu=0.21$ で変化なく吸着しない。一方エンドトキシンは、何れのイオン強度でも目標である 0.25EU/ml を達成できない。また LPS はイオン強度 $\mu=0.21$ の条件の方が除去レベルは高くなったが、理由については不明である。この場合カラム体積 150 倍の溶出体積で 2-3EU/ml のエンドトキシン濃度であり、開始時の濃度 100EU/ml と比べて、1/30~1/50 に低減した。しかし、血管内に注射可能なエンドトキシンレベルである 0.25EU/ml までの低減は達成できなかった。

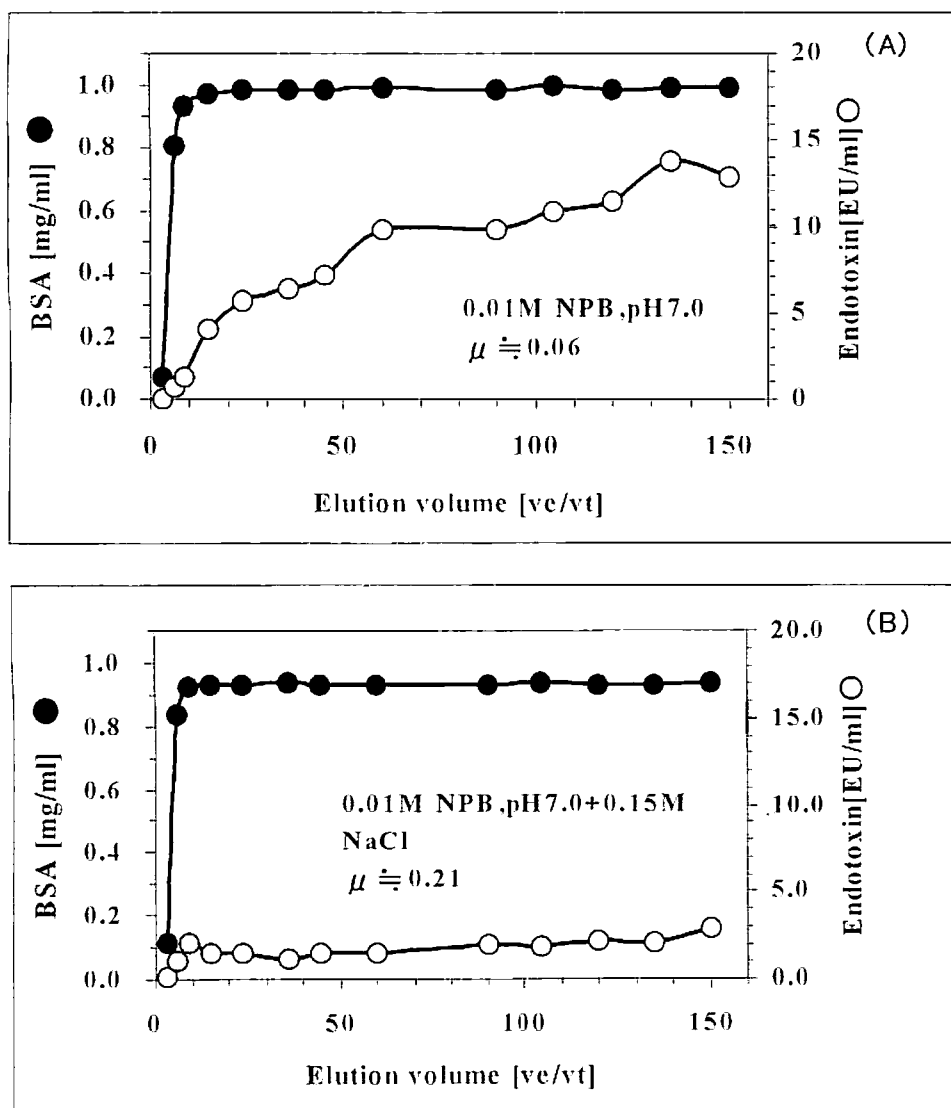


Fig.6-6 Selection removal by the chromatography on the PL-Cellulose- 10^3 of natural LPS which is contaminating BSA.

(2) PL-Cellulose-10⁶

Fig.6-7に PL-Cellulose-10⁶の BSA 溶液からの汚染エンドトキシンの選択除去について調査した結果を示した。(A)はイオン強度が $\mu=0.06$ の場合であるが、カラム体積の30倍までは完全に BSA と LPS が吸着している。その後 BSA は吸着容量を超えほぼ 100%溶出している。一方エンドトキシンはカラム体積40倍から溶出が始まりその後カラム体積150倍まで溶出体積に比例して EU/mlが増加している。この傾向は BSA が吸着サイトに飽和するまで吸着して LPS の吸着を妨げる為に引き起こされるものと考えられる。

(B)はイオン強度 $\mu=0.21$ の場合を示した。BSA は(A)に比べて早い溶出体積から溶出しており、イオン強度の効果により BSA が吸着し難い状態になっている事がわかる。一方 LPS は非常に高いレベルで除去されていることが示された。カラム体積150倍であっても 0.07EU/mlであり、添加原液の 100EU/ml に比べて 1/1400 倍にまで低減できた。このイオン強度の場合は BSA がほぼ吸着せず、ゲル内の吸着サイトがフリーとなっている。LPS はこの程度のイオン強度ではリガンドであるポリ (ϵ -リジン) へ吸着可能なため、非常に効率よく除去可能であると考えられる。

(C)はイオン強度 $\mu=0.46$ の場合を示した。BSA は(B)の場合よりも更に吸着しない傾向が示された。一方エンドトキシンはカラム体積10倍以降150倍までほとんど 0.4EU/ml のレベルであった。このイオン強度の場合は BSA が吸着しないが、LPS も吸着し難いものと思われた。しかし添加原液の 1/250 倍までエンドトキシンを低減できた。

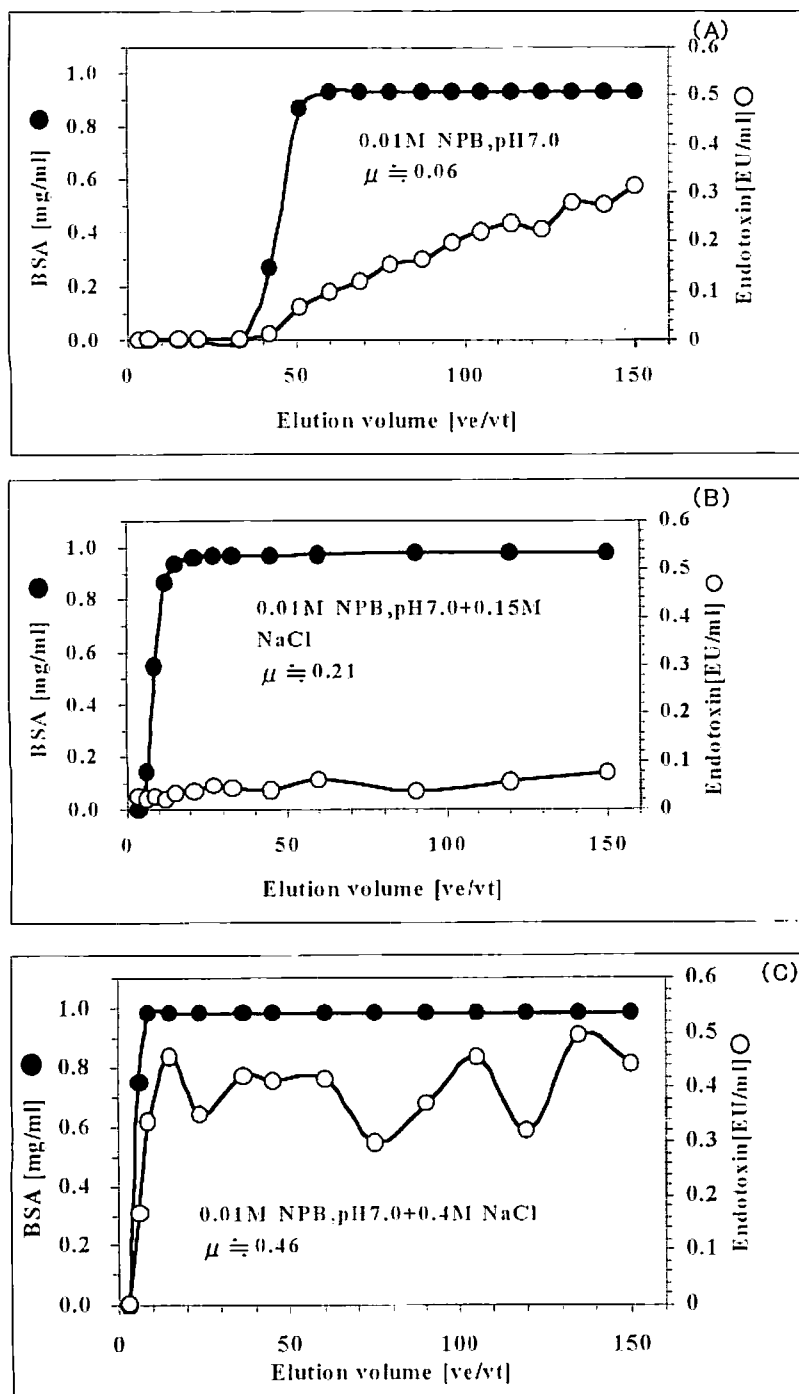


Fig.6-7 Selection removal by the chromatography on the PL-Cellulose-10⁶ of natural LPS which is contaminating BSA.

6.3.2 ポリミキシン固定化粒子

(1) Affi-prep PolymyxinB

Fig.6-8 はポリミキシン B 固定化粒子 (Affi-prep PolymyxinB 日本バイオラッド社製) の BSA 溶液を汚染しているエンドトキシンの選択除去について調査した結果を示した。

(A)はイオン強度 $\mu=0.06$ の場合、(B)はイオン強度 $\mu=0.21$ に場合を表している。両方のイオン強度でほとんど同じ傾向が見られ、BSA はほとんど吸着しない。LPS は両方のイオン強度で 40~50EU/ml が観察された。原液と比較して 1/2 ~ 1/2.5 倍のエンドトキシン濃度となった。

(2) Detoxi-gel

Fig.6-9 はポリミキシン B 固定化アガロース (デトキシゲル ピアス社製) について同様に調査した結果を示した。但し通常のアルカリを用いる代わりに、デトキシゲルは製品に同封されている取り扱い説明書に記載された方法 (再生-洗浄には 1%デオキシコール酸ナトリウムを用いる) に従って行った。

イオン強度 $\mu=0.06$ の場合を表している。Affi-prep PolymyxinB とほとんど同じ傾向が見られるが LPS の選択吸着は若干よい傾向を示した。LPS はおよそ 40EU/ml の溶出が観察された。原液と比較して 1/2.5 倍のエンドトキシン濃度となった。

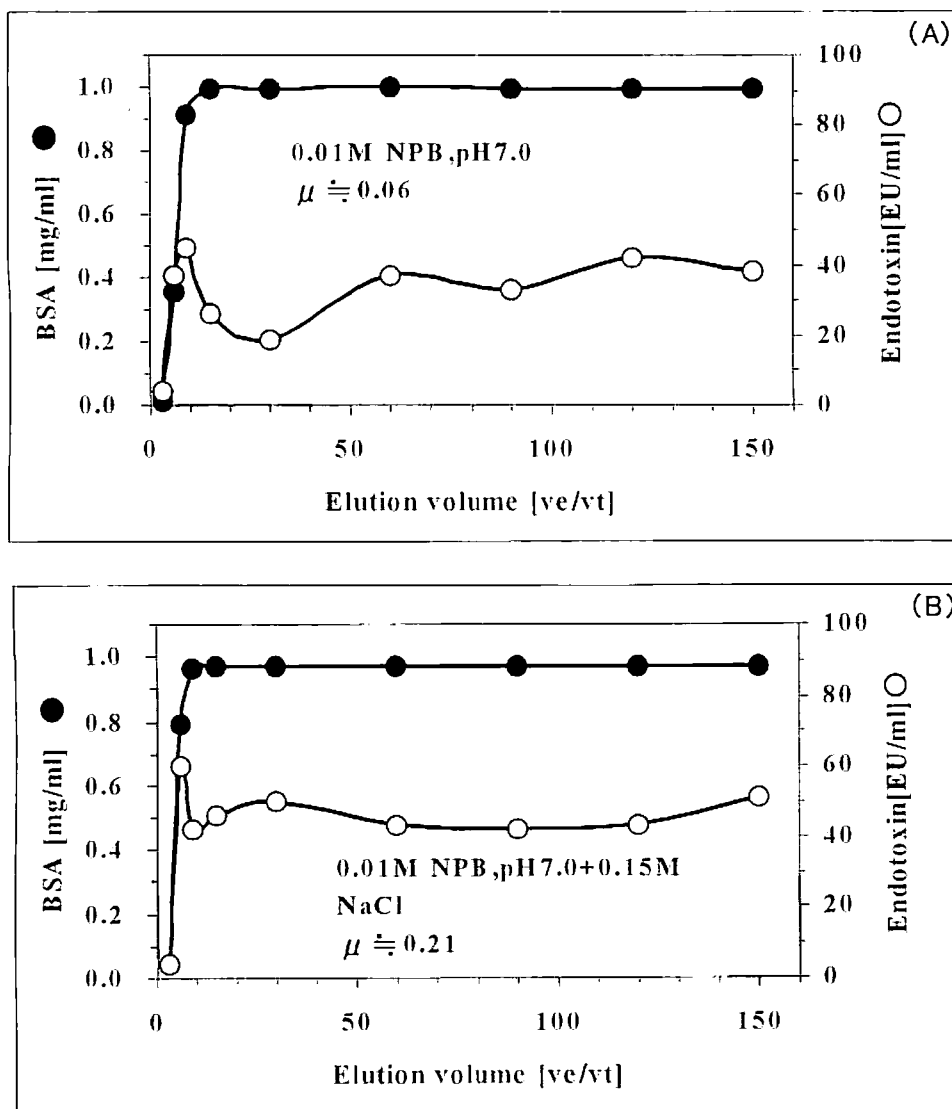


Fig.6- 8 Selection removal by the chromatography on the Affi-prep PolymyxinB of natural LPS which is contaminating BSA.

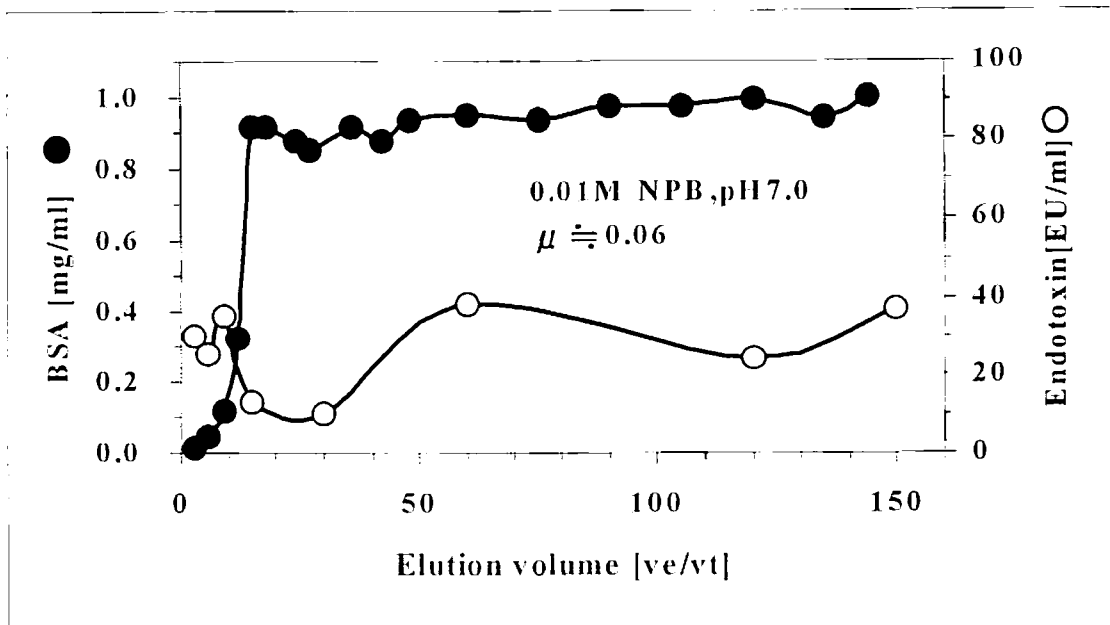


Fig.6-9 Selection removal by the chromatography on the Detoxi-Gel of natural LPS which is contaminating BSA.

6.4 第6章の総括

本章では、架橋型吸着剤と固定化型吸着剤についてタンパク質溶液からの LPS 選択除去の能力について比較検討を行った。

1) 精製 LPS 添加系 / バッチ法での検討結果

・ DMP 系粒子 ($M_{lim}2,000$) は BSA を低イオン強度から吸着しないが、LPS の吸着はイオン強度 $\mu=0.2$ から低下した。この低下の度合いは架橋剤の疎水性が高い方が少ない。

・ 架橋ポリリジン粒子は、 $M_{lim}2,000$ の場合は BSA を低イオン強度から吸着しないが LPS はイオン強度 $\mu=0.2$ 以上で吸着量が低下した。 $M_{lim}8000$ の場合はイオン強度 $\mu=0.4$ 以下で BSA を吸着したが、LPS はイオン強度 $\mu=0.6$ まで 90% 近い吸着を示した。

・ ポリリジン固定化セルロースは、 $M_{lim}2,000$ の場合 BSA を低イオン強度から吸着しない、またイオン強度 $\mu=0.8$ でも LPS は 60% 以上吸着した。 $M_{lim} \geq 2 \times 10^5$ ではイオン強度 $\mu=0.2$ 以下で BSA を吸着するが、イオン強度 $\mu=0.8$ でも LPS は 80% の吸着を保った。

・ ポリカチオンポリマー固定化セルロースは、 $M_{lim} \geq 2 \times 10^6$ で比較した場合 $pK_{a,app}$ の値が高いほど、高イオン強度域での吸着が観察された。

2) 各種タンパク質溶液からの天然 LPS 除去 / バッチ法による検討結果

・ DMP 粒子は $pI7$ 以上のタンパク質からの LPS 選択除去能

が優れているが、架橋剤が DVB の場合はヘムタンパク質の場合、LPS 低減の低下とタンパク質回収の低下が見られた。

・架橋ポリリジン粒子は pI7 以上のタンパク質からの LPS 選択除去能が優れている。しかしアミノ化 PMLG 粒子に比較して除去の効果は少ない結果であった。

・PL-Cellulofie-10⁶ は広い範囲の pI4.9~10.6 までタンパク質から 10pg/ml 以下まで LPS を低減でき非常に優れた性能を示した。一方、PL-Cellulofie-10³ は pI が高いタンパク質ほど LPS の低減が可能であったが、10pg/ml 以下は達成できなかった。

3) BSA に混入している天然 LPS のカラム法による選択除去の検討結果

・PL-Cellulofie-10³ はイオン強度が $\mu=0.06$ と低くても BSA が吸着しないが、LPS は目標の 0.25EU/ml を達成できなかった。

・PL-Cellulofie-10⁶ はイオン強度が $\mu=0.21$ の場合、BSA の吸着がほぼ解消され、カラム体積 10 倍からは約 100% の回収が見られた。LPS はカラム体積 150 倍まで 0.1EU/ml 以下であり目標の 0.25EU/ml を達成した。150 倍までで BSA の回収率 93% であるが、更に BSA 原液をフィードする事が可能であるので、回収率は 93% 以上も可能である。

・ポリミキシン固定化吸着剤を 2 種類試したが、何れも BSA の吸着についてはほとんど吸着しない結果であるが、LPS の除去は 50EU/ml 程度あり、目標の 0.25EU/ml に及ばない。

第7章 総括

7.1 本研究の背景

近年、バイオテクノロジーの発展に伴い、医薬品においてもタンパク質（組替えタンパク質、抗体医薬、ホルモン、ワクチン）製剤が製造されている。このような医薬品の製造技術としては、発酵、細胞培養、遺伝子工学などが上げられる。これらの技術は、元来非常に希少な成分であるタンパク質を多量に調製できる方法として、あるいは特別な抗原に対する抗体（モノクローナル抗体）の調製方法として非常に有用である。一方、血液製剤など人血液からの精製がいまも続けられているが、感染症の危険が払拭できず、これらを、組替え体として製造する計画もある。実際、アルブミンを遺伝子組み替え微生物で製造しアルブミン製剤とする研究開発が製薬会社により進められている。

これらのいわゆるバイオ医薬は、生物由来物質の混合物より精製されるため、ウイルス、核酸、エンドトキシンなどの混入が懸念され製品とする際はこれらを除去する事が必須となっており、医薬品の品質を保つことが義務付けられている。

エンドトキシンはグラム陰性菌の外膜に存在し広く環境中に分布している。エンドトキシンが医薬に混入し注射された場合、発熱、ショック症状が引き起こされ好ましくない。そのためエンドトキシンを選択的に除去する吸着剤は医薬業界に必要であるが、従来販売されてきたヒスチジンやポリミキシン固定化吸着剤は選択性や吸着量、耐イオン強度が悪く工業的使用には耐えられないものであった。事実、ヒスチジン固定化粒子は販売が中止された。

本研究では、以上の背景から工業的使用に耐えるエンドトキシンの吸着剤の開発を目的として、吸着剤の設計、合

成、評価を行った。

7.2 本研究の成果

1) エンドトキシンおよびタンパク質の吸着挙動

酸性タンパク質の吸着挙動は、低イオン強度の場合はポアサイズが最も影響する。これは全ての粒子で共通して言えることである。ポリリジン固定化セルロースについて見ると第5章の Fig.5-6 に典型例が示されている。タンパク質の吸着量は $2 \times 10^6 > 10^4 > 10^3$ の順となっている。一方、LPS はポアサイズの影響されず吸着される事が第5章の Fig.5-4 に示されている。このような吸着挙動の違いを模式的に Fig.7-1 に表した。変性しているゼラチンなどを除けば、タンパク質は、アミノ酸配列（一次構造）が決まっており、一定の分子量を持ち、水中では α -ヘリックスや β -シートなどの2次構造から構成される決まった3次構造をとる分子であるため、とりうる立体構造はある程度規制される。そのため、粒子表面だけでは吸着し得るポイントが弱いため吸着し難いが、粒子内部のポアへ拡散した場合は吸着ポイントが一点から、分子を取り囲むように多点となりうる。そのため、ポアが大きくなると吸着できないと考えられる。一方 LPS は、分子量が 10,000 程度の両親媒性物質が集合して存在している。タンパク質に比べて非常に自由に集合状態が変えられる。そのため、吸着剤表面だけであっても、集合状態が変わることで吸着が可能である。また LPS は自己集合可能な分子であるため、少ない量の分子が表面に吸着してもそこに LPS 分子が集合して吸着することが可能である。

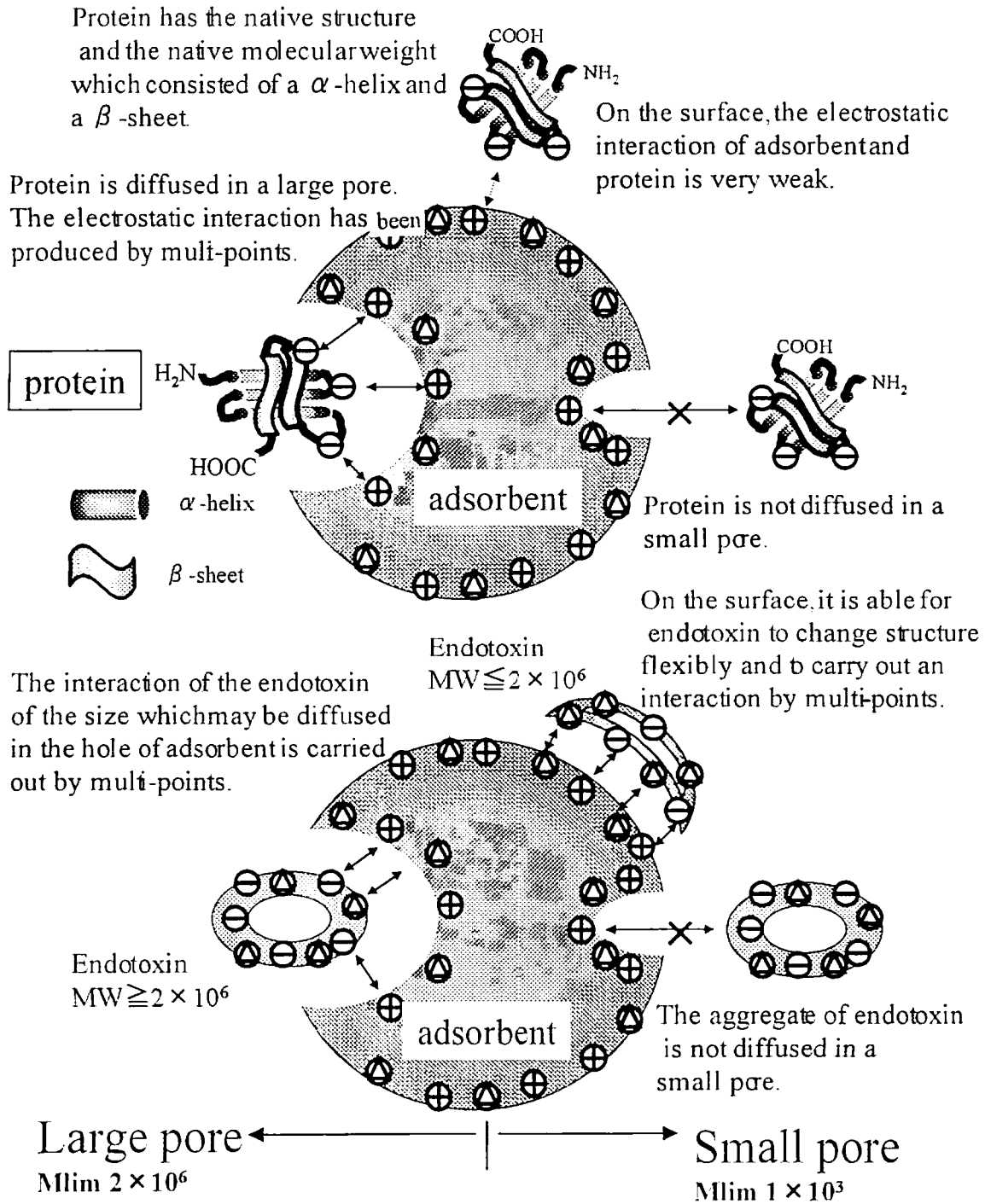


Fig.7-1 Adsorption behavior of protein and endotoxin by PL-Cellulose adsorbent with small and large pore-size.

吸着剤の $pK_{a,app}$ は塩基性の強さの指標となるが、 $pK_{a,app}$ が高くなると、高イオン強度でも酸性物質の吸着が保持される。第6章の Fig.6-1 に示した PMLG-NH₂ と PL/CMO を比較すると $pK_{a,app}$ が高い PMLG-NH₂ が高イオン強度域まで LPS 吸着を保つ事が示された。また第6章の Fig.6-5 に示した合成ポリカチオンとポリ(ϵ -リジン)固定化セルロースを比較した場合でも、 $pK_{a,app}$ が高いポリアリルアミン系のリガンドの粒子が高イオン強度であっても LPS 吸着能を保っている事が示された。しかし酸性タンパク質も同時に高イオン強度でも吸着するため選択除去範囲が高イオン強度域へシフトするものである。

2) タンパク質溶液からの LPS 選択除去

本研究で調製した種々の吸着剤について、タンパク質溶液からの LPS 選択除去能を評価した。

Fig.7-2 は、第6章で明らかにされたバッチ法による各種のエンドトキシン吸着剤の、タンパク質からのエンドトキシン選択除去の結果についてまとめたものである。

*低イオン強度での選択除去は M_{lim} が最も影響を与える。 M_{lim} が大きいとタンパク質と LPS の両方を吸着する。また pK_a が高い場合は、タンパク質がわずかであるが吸着される。

*高イオン強度での選択除去は、 pK_a 、あるいは疎水性の度合いが影響を与え、これらの値が高い方が選択性は高い。

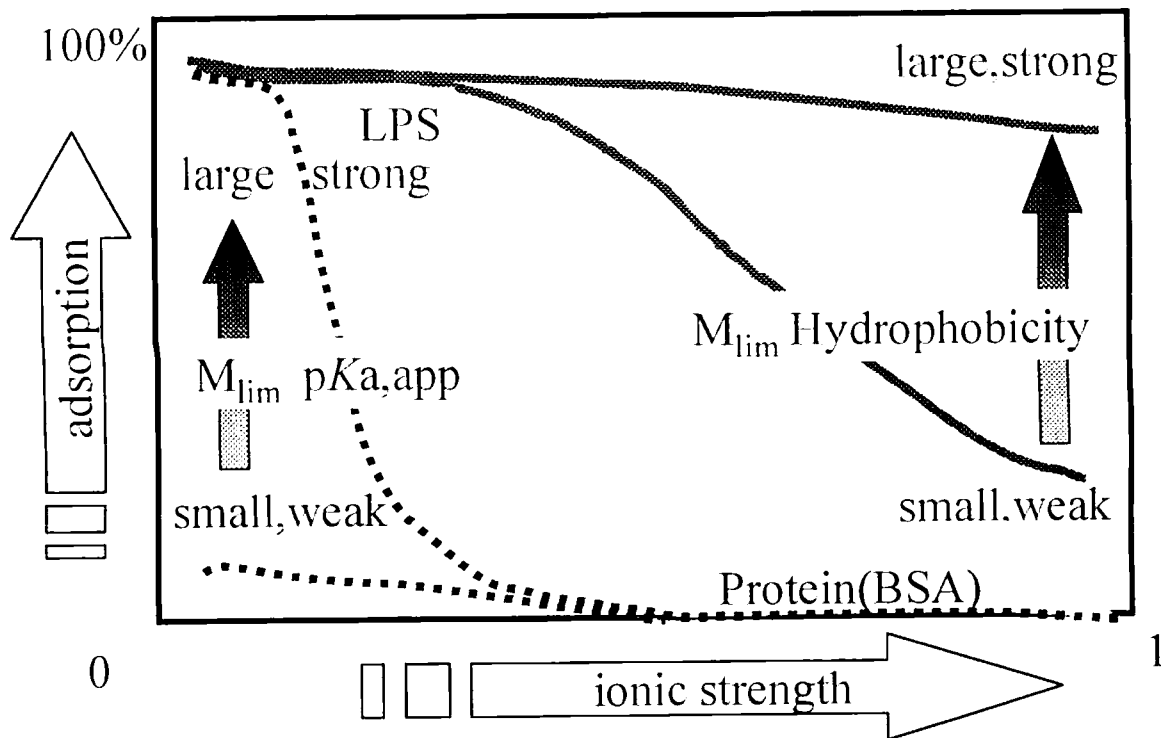


Fig.7-2 The factor which influences selection removal of LPS from protein solution.

3) タンパク質を汚染しているエンドトキシンの除去

市販のタンパク質を汚染しているエンドトキシンのバッチ法による除去についてまとめる。

*タンパク質の種類に関わらず 10pg/ml以下までに LPS を除去できた吸着剤は、PL-Cellulose-10⁶のみであった。

*その他の吸着剤では、主に pI が 7 以上のタンパク質からは 10pg/ml あるいはそれに近い値の LPS 除去が可能であった。

クロマトグラフィーによる、タンパク質を汚染しているエンドトキシンの除去についての検討は、PL-Cellulose と市

販のポリミキシン固定化粒子の2種類、4サンプルで行った。ポリミキシン固定化担体は現在市場で販売されているエンドトキシン吸着剤としては最も有名である。

*PL-Cellulose-10⁶は、用いる緩衝液のイオン強度を $\mu=0.2$ に調整することでカラム体積の150倍まで1mg/mlのBSAを添加し、BSAを93%以上の回収率でエンドトキシンは0.1EU/ml以下に低減できることが明らかにできた。注射用蒸留水のエンドトキシンの規格値は0.25EU/ml以下であることから、本法で調製されたBSA溶液は注射にたえる品質である。一方、イオン強度が $\mu=0.06$ ではBSAとLPSがともに吸着された。 $\mu=0.4$ ではエンドトキシンが0.5EU/ml程度までしか低減できない。

*PL-Cellulose-10³は、イオン強度 $\mu=0.06$ ではBSAが吸着されることは無いが、エンドトキシンがカラム10倍程度で1EU/mlを超えてしまった。イオン強度 $\mu=0.2$ でもエンドトキシンは2EU/mlまでの低減で、目標の0.25EU/mlは達成できなかった。

*市販されているポリミキシン固定化吸着剤2種は、イオン強度 $\mu=0.06, 0.2$ のいずれでもBSAは吸着しないが、エンドトキシンは50EU/mlであり原液の1/2程度までしか低減できなかった。

本研究では工業的に使用可能なエンドトキシン吸着剤の開発を目的として、架橋型吸着剤とリガンド固定化型について設計・合成・評価を行った。

吸着に影響する要因として M_{lim} と pK_a, AEC , 疎水性, リガンド自体がもつ性能が関わっていることを明らかにし、これらをコントロールすることで選択除去が可能な吸着剤の設計が可能となった。

市販のクロマト剤にリガンドを固定化し吸着剤を調製す

る方法は、ポアサイズの制御が不要な点と、粒子を架橋により得る方法に比べて簡単な装置で製造でき、その後の分球も不要であるので、本研究の吸着剤の中で最も工業生産が可能であると考えられる。

ポリ(ε-リジン)固定化セルロース粒子は、カラム法によるタンパク質からの天然エンドトキシンの除去能が従来製品に比べて優れていることが明らかにされた。特に PL-Cellulose-10⁶ は生理的食塩水程度のイオン強度で、注射可能な品質までにエンドトキシンを低減することが可能であり性能面での優秀性が明らかにできた。

4) 研究の成果と今後の展望

本研究では種々のエンドトキシン吸着剤の設計と合成、評価を行った。特にリガンドとして用いた発酵生産されるポリ(ε-リジン)は既に食品の日持ち剤として広く利用されており、安全が高いことが知られている。またポリ(ε-リジン)の食品に対する日持ち効果は、抗菌的な性質に起因している。本研究ではポリ(ε-リジン)の抗菌性以外の性質として、グラム陰性細菌の外膜成分である LPS の選択的吸着効果があることを見出しエンドトキシン選択除去剤のリガンドとして応用し工業的生産、工業的使用が可能な吸着剤を研究開発した。ポリ(ε-リジン)を用いた吸着剤では架橋型よりも固定化型の吸着剤が LPS 吸着能に優れていた。

ポリ(ε-リジン)固定化セルロースは市販のセルロース粒子(セルロファイン)を原料にしており吸着剤の製造は固定化反応のみで良く、製造のスケールアップも容易である。このような背景から、PL-Cellulose-10⁶ はセルロファイン Et クリーン PL の商品名で、チッソ株式会社で販売を開始した。

今後の課題として以下のことが考えられる。エンドトキ

ために、安全性に関するデータが必要である。安全性試験としては、例えば米国薬局法（USP）のプラスチック試験 Class VI などの試験が必要である。また医薬製造プロセスに使用するためには、アルカリに対する安定性、オートクレーブに対する安定性、長期保存安定性等の情報が必要となる。

また更なる吸着効率のよい吸着剤の設計としては、ポリ(ε-リジン)の固定化方法についての検討が考えられる。本研究ではエポキシ活性化したセルロース粒子に対して、ポリ(ε-リジン)がランダムに固定化されている。従って、ポリ(ε-リジン)の固定化方法において固定化部位の制御例えば、カルボキシル基末端のみを固定化するなど方法により制御されたりガンド状態の吸着剤の研究開発が挙げられる。一方、ポリ(ε-リジン)の分子量とLPSの吸着の関係についても興味ある検討項目であると思われる。例えば重合度の度合いがどの程度、LPSの吸着に影響するかは知られていない。

吸着剤の形態としては本研究では球状粒子のみを使用してきたが、膜状の吸着剤については未検討である。球状と膜状の違いがエンドトキシンの除去にどのように影響するかを比較検討することは興味深いと考えられる。

以上、本研究を通して調製した PL-Cellulose 吸着剤は安全性のデータなどを今後そろえる必要があるが、従来の製品に比べて、優位な性能を示すことを明らかにし、さらに商品化につなげ、社会へ貢献し得るものである。

謝辞

本研究の遂行、論文作成のあたり、諸事にわたり暖かいご指導、ご助言を賜りました平山忠一教授に心から感謝の意を表します。

本論文の論文審査委員としてご指導、ご助言を頂きました正泉寺秀人教授、木田健次教授、伊原博隆教授に厚く御礼申し上げます。また、本論文の審査協力者として、論文をまとめるに当たりご助言を頂きました国武雅司助教授へ感謝申し上げます。

実験を進める上での貴重なご助言、ご指導、論文作成のに当たりご助言を頂きました坂田真砂代助手へ心から感謝申し上げます。また当時大学院、学部に在籍し、日々実験に励んだ甲斐智洋氏、眞玉賢氏をはじめ平山研究室の学生諸氏に対し深く感謝致します。

また本論文作成のため進学の機会を与えて頂きましたチッソ株式会社ファインケミカル事業部ならびに水俣研究所長に感謝いたします。また、同研究所331チームの皆様にも感謝いたします。

大学院までを過ごした、山形大学農学部農芸化学科時代に生物化学の基礎をご教授して頂きました小田圭昭先生ならびに須藤誠一先生に御礼申し上げます。

最後に、本論文を完成させるにあたり、暖かいご支援を頂きました全ての皆様と両親に、そして常に叱咤激励してくれた妻に感謝します。