

限外濾過法とポリエチレングリコール沈殿法の 組合せによるヒト血漿蛋白質の精製

小 山 憲 治
大 野 省 太 郎
福 田 三 寿
木 原 啓 一

Purification of Human Plasma Proteins by a Combination of Ultrafiltration and Polyethylene Glycol Precipitation Methods

Kenji KOYAMA
Shotaro OHNO
Mitsutoshi FUKUDA
Keiichi KIHARA

Human plasma proteins were purified by a combination of ultrafiltration and polyethylene glycol (PEG) precipitation methods. First, human plasma proteins were fractionally precipitated with PEG-4000 into crude fibrinogen, γ -globulin, and albumin. Then, proteins of high molecular weight were removed from crude γ -globulin and albumin fraction by ultrafiltration using a TS-3000 membrane to obtain highly pure γ -globulin and albumin respectively.

The purity of the albumin thus obtained was above 95% and γ -globulin contained no aggregate. Large-scale purification of albumin by this method was discussed, making comparison with that based on the ion exchange chromatography.

1. はじめに

限外濾過と PEG 沈殿法を組み合わせる血漿 γ -グロブリンとアルブミンの分離精製を検討した。

限外濾過法は高分子物質の濃縮、脱塩の操作に工業的に用いられている技術であるが、その分離の粗さ、分離技術の未熟ゆえに比較的分子量の接近している高分子間の分離には用いられていない。しかし高分離能膜、及び分離装置の開発により、ゲル濾過法、イオン交換法同様、分子量分画手段として利用され、このとき膜法の最大の特徴である大量処理性が生かされるであろうと思われる。

さて、血漿蛋白質の工業的な分離精製法に冷エタノール法（コーン法）¹⁾がある。しかしこの方法は低温での

操作、防爆装置が必要なこと、また操作の複雑さ、回収率の低さの欠点を指摘されている。

そして最近、ゲル濾過法²⁾、イオン交換法³⁾などがこの分離精製に検討されている。しかしゲル濾過法では時間がかかること、スケールアップが困難などの欠点があり、イオン交換法では操作が複雑、大量の純水を必要とするなどの欠点を指摘されている。

この報告は短時間にかつ容易に高純度の血漿蛋白質を分画する目的で、比較的シャープな分離性能を持つ東洋曹達製限外濾過システムと PEG 沈殿法⁴⁾を組み合わせ、血漿蛋白質のうちで多量に存在し需要の多い γ -グロブリンとアルブミンの分離精製法を検討したので報告する。さらにその結果とイオン交換法とを経済性の面から比較した。

2. 方 法

〔1〕 試 料

期限切れヒト血液1パック (内容量 200 ml) を日本赤十字社より購入し、遠心分離によって血球成分 (100 ml) と血漿成分 (100 ml) に分離した。

〔2〕 PEG沈殿法

血漿のPEG粗分画は Fig. 1 に示した方法に従い、 γ -グロブリンについては P-2 成分、アルブミンについては P-3 成分をそれぞれ 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 6.8) で 150 ml に希釈し出発原料とした。 γ -グロブリンは 1% 溶液、アルブミンは 3% 溶液である。ここで用いた PEG の分子量は 4×10^3 である。

PEG 沈殿法により得た各画分の蛋白組成を Table 1 に示す²⁾。

〔3〕 膜及び装置

限外濾過膜、装置は東洋曹達製 UF 膜システム⁵⁾、モデル SC-60、膜面積 60 cm² を使用した。膜分離は Fig.

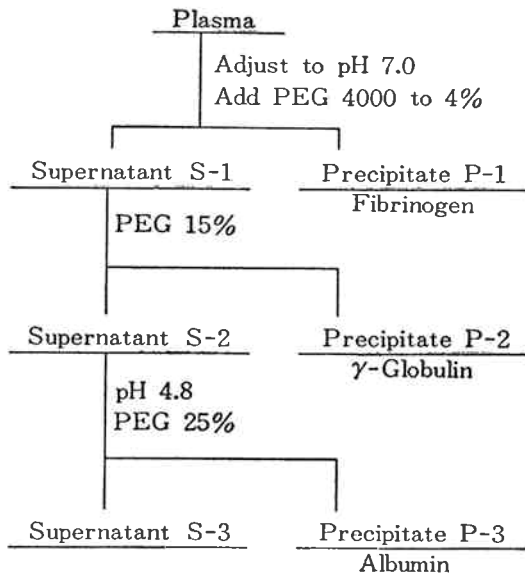


Fig. 1 Schematic diagram of PEG precipitation method

Table 1 Composition of PEG precipitated fraction (wt%)

A : Albumin
F : Fibrinogen
 $\alpha_1, \alpha_2, \beta, \gamma$: Globulin (%)

	F	A	α_1	α_2	β	γ
Plasma	4.8	64.2	3.8	6.2	7.4	13.4
P-2	—	26.3	2.6	13.1	9.0	49.1
P-3	—	90.9	3.8	1.9	3.4	—

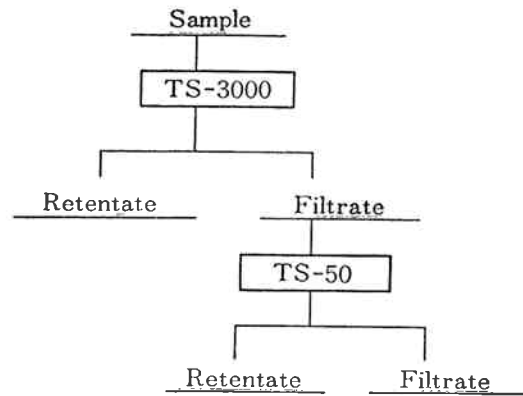


Fig. 2 Schematic diagram of membrane fractionation method

2 に示した方法に従い、分画用に TS-3000 膜 (公称分画分子量 3×10^6)、膜透過液の濃縮用に TS-50 膜 (5×10^4) を用いた。

〔4〕 分画操作

分画方法は原液の容量が 2 分の 1 になるまで濃縮し (この実験では 150 ml を 75 ml まで濃縮) その時点で緩衝液でもとの容積に希釈し、再濃縮、希釈を繰り返す回分式で行った。この場合、膜の目詰まり、濃度分極現象を極力避けるために、膜透過速度を約 10~15 l/m².hr にコントロールした。

膜の阻止率は(1)式により求めた。

$$R(\%) = (1 - C_P / C_0) \times 100 \quad \dots\dots(1)$$

ここで C_0 は原液の溶質濃度、 C_P は膜透過液の溶質濃度を表す。

〔5〕 濃度測定

原液、膜透過液、膜阻止液の溶質の濃度は、液体クロマトグラフィー (HLC) 測定を行いピークの高さで決定した。

HLC の測定条件

- 装置 HLC 802 UR
- カラム G 3000 SW (0.75 × 60 cm) 1 本
- 溶離液 1/15M リン酸緩衝液 (pH 6.8)
- 検出 UV 280 nm

3. 結果と考察

ヒト血漿の液体クロマトグラムを Fig. 3 に示す。大別すると Fig. 3 中に示したフィブリノーゲン+マクログロブリン画分 (分子量 3×10^5 以上)、 γ -グロブリン画分 (1.6×10^5)、アルブミン画分 (6.7×10^4) に分けることができる。もちろん、これらのピーク中には微量の成分も混入している。

前報⁶⁾ でヒト血清蛋白質の分離が可能であることを指摘した。これは上で分類した三つの蛋白質群 (血漿の場

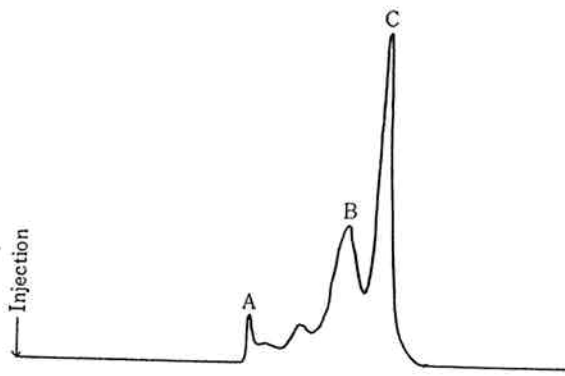


Fig. 3 Chromatogram of human plasma
 A : Fibrinogen+Macroglobulins
 B : γ -globulin
 C : Albumin

合、マクログロブリン画分にフィブリノーゲンが存在している)の膜による篩分けを試みたものである。しかし、ヒト血漿を原料とする場合、フィブリノーゲンが膜表面で凝固し易く、この現象によって膜の目詰まりを生じ、血漿から直接膜分離するのは困難であった。また、アルブミンと γ -グロブリンの膜分離は膜の穴の大きさによる分子篩ではなく蛋白質と膜表面の電荷の相互作用を利用したものであり、アルブミン画分に γ -グロブリンが混入して高純度のものは得にくい。そこで比較的操作の簡単な PEG 沈殿法により、アルブミンと γ -グロブリンをあらかじめ粗分画しておくことにより、最終精製度の高いアルブミン及び γ -グロブリンが得られると考えた。PEG 沈殿分画法は最終精製物に PEG 残留の問題はあるが、PEG は一応、残留毒性の問題は無いとされており⁷⁾、また、残留 PEG は膜法によってほぼ完全に蛋白質と分離することも可能である⁸⁾。

[1] アルブミン (P-3 成分) の精製

PEG 粗分画した P-3 成分の液体クロマトグラムを Fig. 4 に示した。Table 1 と Fig. 4 から明らかなようにアルブミン以外の混入蛋白質はマクログロブリン類

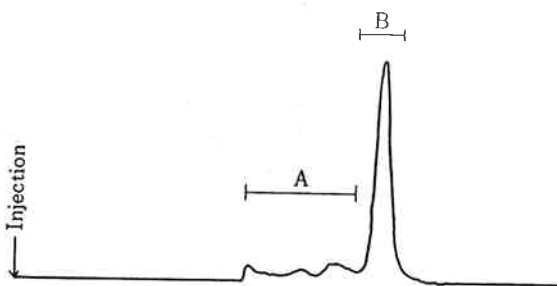


Fig. 4 Chromatogram of albumin fraction precipitated by PEG-4000
 A : Macroglobulins
 B : Albumin

であり γ -グロブリンは混入していない。この P-3 成分は γ -グロブリンが混入しないことが特徴的である。この P-3 成分から TS-3000 膜でアルブミン成分のみを膜透過させて得た溶液 (TS-50 膜で濃縮) の液体クロマトグラムを Fig. 5 に示した。ほぼ単一のピークのアルブミンが得られている。アクリルアミドゲル電気泳動測定より、微量のトランスフェリン (分子量 6×10^4) は混入しているが純度95%以上である。アルブミンとトランスフェリンのわずかな分子量の差は現状の限外濾過膜による分離の能力外にあり、両者の分離は不可能である。比較として静脈注射用として市販されているアルブミンの液体クロマトグラムを Fig. 6 に示した。静脈注射用アルブミン中にはアルブミン2量体を主とする高分子量物が多いが、これに比較して膜分離によって得られたアルブミン中の混入物は、はるかに少ない。Fig. 7 はアルブミンの回収率のプロットを示す。n は回分回数、 C_R/C_0 は原液のアルブミン濃度に対する原液に残存しているアルブミンの濃度の比を示し、両者の関係は(2)式で表される⁹⁾。

$$C_R/C_0 = \left\{ \left(\frac{1}{X} \right)^{1-R} \right\}^n \quad \dots\dots(2)$$

ここで X は濃縮倍率でこの実験では 2、R は(1)式で定義した阻止率、n は回分回数である。実際の回収率は $1 - C_R/C_0$ で表される。Fig. 7 のプロットが直線であることより、分画操作中に阻止率の変化はない。すなわ

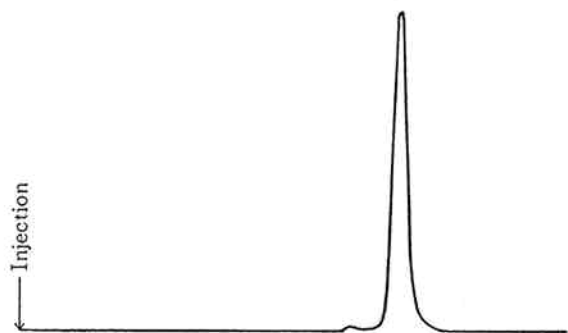


Fig. 5 Chromatogram of purified albumin by TS-3000 membrane

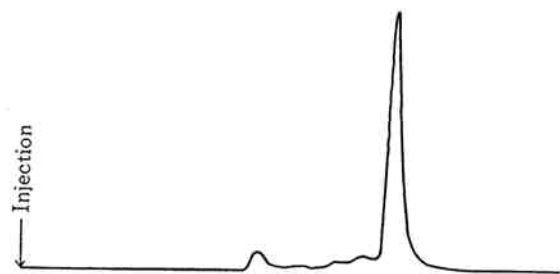


Fig. 6 Chromatogram of commercial intravenous albumin

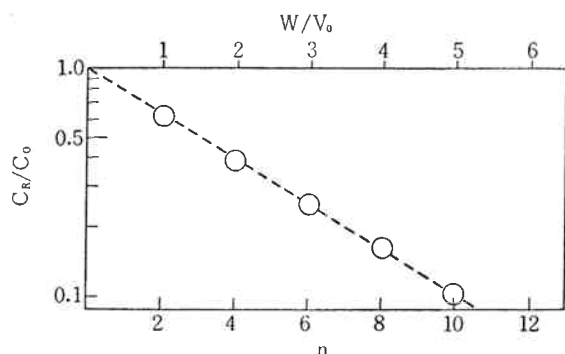


Fig. 7 Relationship between the concentration of albumin and number of repetition

C_0 : Initial concentration of albumin in the feed solution

C_R : Concentration of albumin in the feed solution at nth batch

n : Number of repetition

V_0 : Initial volume of the feed solution

W : Volume of filtrate=volume of added water

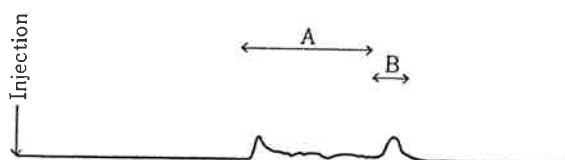


Fig. 8 Chromatogram of retained fraction of P-3 by TS-3000 membrane after 10 th repetition

A : Macroglobulins

B : Albumin

ち膜分画するうえで障害になる濃度分極、目詰まりなど本操作中には問題にならず、ほぼ理想的な条件下で膜分離していることを示している。この操作条件下ではアルブミンを90%回収するに必要な回分回数は **Fig. 7** より10回、すなわち2倍濃縮回分法であるので原液の容量の5倍量を膜透過させればよいことになる。**Fig. 8** に回分回数10回後の TS-3000 膜に阻止された画分の液体クロマトグラムを示す。ほぼアルブミンは回収されていることがわかる。

[2] イオン交換法との比較

イオン交換法を使用したアルブミン精製工程³⁾を **Fig. 9** に示した。出発原料に本報告と同様 PEG 粗分画アルブミンを用い、UNIT 1 でアルブミンより等電点の高い蛋白質を溶出、UNIT 2 でアルブミンより等電点の低い蛋白質を溶出、UNIT 3 で脱塩する3工程よりなる。この工程で4%アルブミン 14ℓ (560g) を90%回収するに必要なゲル量、純水の量、時間を **Table 2** に示した。得られるアルブミン純度は97%以上である。膜分

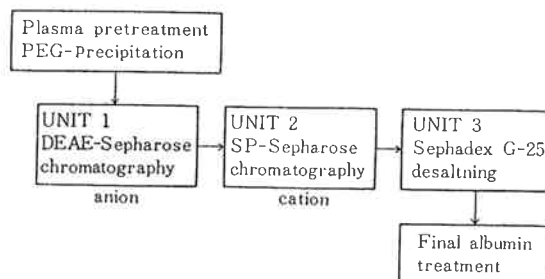


Fig. 9 Block diagram of ion exchange chromatography for purification of albumin

Table 2 Utilities required for ion exchange chromatography method for albumin purification. Total gel volume, pure water consumed for eluents and time required for one cycle.

Sample : 14 ℓ of 4% albumin solution (560g)

UNIT	Gel volume(ℓ)	Water volume (ℓ)	Time (hr)
1	16	110	2.5
2	16	80	3
3	75	100	1
Total		290	6.5

Table 3 Volume of water and membrane area required by membrane method for albumin purification

Sample : 18.7 ℓ of 3% albumin solution (560g)

Flux : 10 ℓ/m²-hr

Water volume (ℓ)	Membrane area (m ²)
93.5	1.5

離の実験から計算した膜法での同量、同回収率、同時間で処理するに必要な膜面積、純水の量を **Table 3** に示した。ここで、溶液濃度は本報告と同じ3%とし膜透過速度を 10 ℓ/m²・hr と計算した。すなわち3%溶液 18.7 ℓ (560g) から出発し、90%回収するに必要な膜透過液量は5倍、すなわち 93.5 ℓ 膜透過 (必要とする純水 93.5 ℓ) させればよい。この膜透過液量を膜透過速度と必要とする処理時間で割れば膜面積が計算できる。**Table 2, 3** から明らかなように、イオン交換法と比較して1/3の水の量でよく、また、装置的にもコンパクトであり経済的には、膜法がより優れていると考えられる。このように膜法では P-3 成分を膜透過させるだけで非常に高純

度のアルブミンが容易に、かつ短時間で得られる。ただし、膜法によれば、アルブミン中に存在するトランスフェリンを除くことはできない。

[3] γ -グロブリン (P-2 成分) の精製

PEG 粗分画した P-2 成分の液体クロマトグラムを Fig. 10 に示した。P-3 成分と比較して大量のマクログロブリン類が存在するが、これは PEG 分画をより注意深くおこなうことで減ずることは可能である。アルブミンの場合と同様、TS-3000 膜を用い γ -グロブリン画分を膜透過させて得た溶液 (TS-50 で濃縮) の液体クロマトグラムを Fig. 11 に示した。比較的純度の良い γ -グロブリンが得られている。Fig. 12 に回収率のプロットを示した。 C_R/C_0 と回分回数 n は直線関係にあり、操作中に阻止率の変化はないことがわかる。この操作条件下では回分回数20回、すなわち原液の容量の10倍量を膜透過させることで約90%の γ -グロブリンが回収される。分画にアルブミン画分と同様、TS-3000 膜を使用した

プロットの勾配) が低い。これは γ -グロブリンがアルブミンより分子量が大きいこと、マクログロブリンが大量に混入したことによって阻止率が高いためと考えられる。Fig. 13 は回分回数14回後の TS-3000 膜阻止液の液体クロマトグラムを示した。Fig. 10 との比較により γ -グロブリンが70%程度回収されているのがわかる。

冷エタノール法で γ -グロブリンを分離精製する場合、分離条件の厳しさから凝集体を形成する傾向が多い。この凝集体が静脈注射した時のアレルギーの一種であるアナフィラキシー反応の原因といわれており、酵素修飾、化学修飾、及び凝集体を PEG 沈殿法で分別除去等の

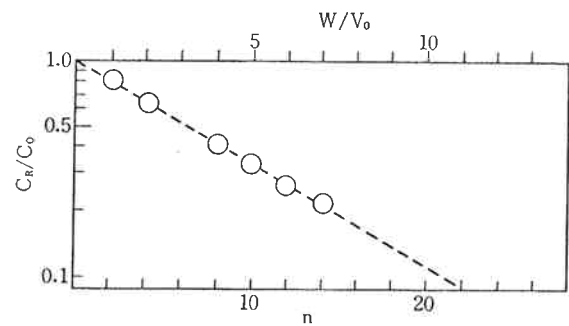


Fig. 12 Relationship between the concentration of γ -globulin retained by TS-3000 membrane and number of repetition

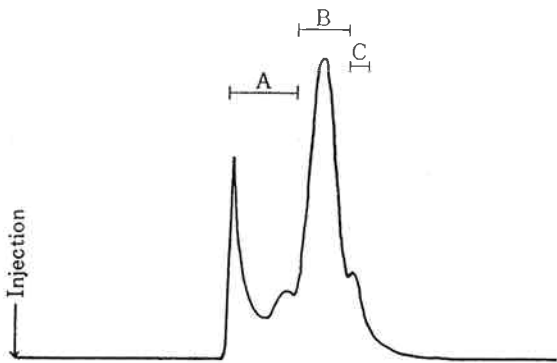


Fig. 10 Chromatogram of γ -globulin fraction precipitated by PEG-4000
A : Macroglobulins
B : γ -globulin
C : Albumin

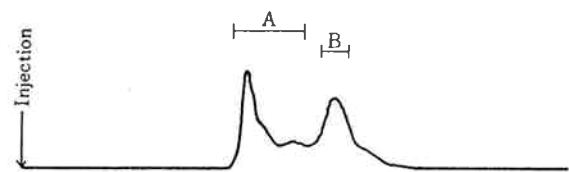


Fig. 13 Chromatogram of retained fraction of P-2 by TS-3000 membrane after 14th repetition

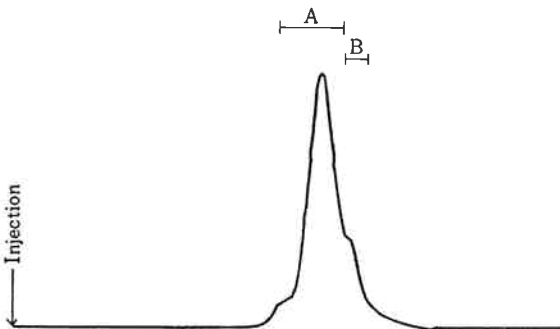


Fig. 11 Chromatogram of purified γ -globulin by TS-3000 membrane
A : Macroglobulins
B : Albumin

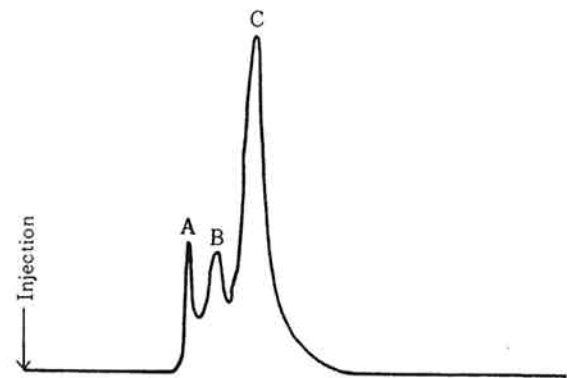


Fig. 14 Chromatogram of commercial intramuscular γ -globulin
A : Aggregate
B : Dimer
C : Monomer

操作をして静脈注射可能としている。Fig. 14 に市販の筋肉注射用 γ -グロブリンの液体クロマトグラムを示した。凝集体が非常に多い。膜法と PEG 沈殿法を組み合わせた γ -グロブリンの精製は、凝集体を形成していないことが Fig. 11 より明らかである。これは PEG が蛋白質の変性を防ぐ効果もあるが、膜法が比較的穏やかな分離操作であることを示している。

膜精製 γ -グロブリン中には少量のアルブミンが混入している。これは PEG 粗分画時に混入したものがそのまま残ったものである。従って PEG 分画をより注意深く行うことでこの混入アルブミンを減ずることは可能と思われる。

4. おわりに

分離手段としての限外濾過法は今まで分離の粗さ、分離技術の未熟のためもっぱら高分子の濃縮、脱塩といった用途に用いられ、ゲル濾過法、イオン交換法などのように分子量分画手段として用いられることは少ない。しかし高分離能膜及び膜分離装置の開発により、分子量の接近している高分子物質さえも分離可能になりゲル濾過法、イオン交換法等と肩を並べるまでに利用されると思われる。この時、膜法の最大の特長である大量処理性が生かされるであろう。

本報告では膜法のみでは分離しにくい試料を用いたが、PEG 粗分画法との組み合わせにより、短時間にかつ容易に高純度のアルブミンと γ -グロブリンを得るこ

とができた。PEG 粗分画をより注意深くすることでさらに高純度のものが得られる可能性もある。また、PEG 粗分画法以外、例えば、コーン法の S II + III 画分及び、P II + III 画分を出発原料としても同様の結果が得られると思われる。このように膜法では直接分離しにくい場合、あるいは分離可能でも高純度なものが得にくい場合、他法との組み合わせを考慮すればイオン交換法、ゲル濾過法等に劣らない分離手段として利用できるはずである。

文 献

- 1) E. J. Cohn et al; *J. Amer. Chem. Soc.*, **68**, 459 (1946).
- 2) A. Tomono et al; *Polym. Preprints, Japan*, **27**, (6), 952 (1978).
- 3) *Pharmacia Fine Chemicals. A process for human albumin, instrument manual.*
- 4) A. Polson et al; *Biochim. Biophys. Acta.*, **82**, 463 (1964).
J. M. Curling et al; *Vox Sang.*, **33**, 97 (1977).
- 5) *Toyo Soda UF system, SC-60 model, instrument manual and technical data.*
- 6) 大野他; “東洋曹達研究報告” **25**, (2), 99 (1981).
- 7) “ミドリ十字 ヴェノグロブリン—I 添付資料”
- 8) 萩原, 橋本; “膜による分離法”, 講談社, 79.