

## TSK-限外濾過システム Model SC-60

大野省太郎  
 小山憲治  
 松岡亨  
 福田三寿  
 木原啓一

### TSK Ultrafiltration System, Model SC-60

Shotaro OHNO  
 Kenji KOYAMA  
 Tohru MATSUOKA  
 Mitsutoshi FUKUDA  
 Keiichi KIHARA

High performance ultrafiltration membranes and systems have been developed, which can efficiently separate a macromolecular mixture into fractions. Of the range of TSK-UF systems, the smallest model SC-60 designed for laboratory uses is introduced here together with the TSK-UF membranes.

The model SC-60 consists of a thin channel type cell with a membrane area Ca. 64 cm<sup>2</sup> and a peristaltic pump. The standard operation manual for SC-60 is given.

Three examples for the macromolecular fractionation obtained using this TSK-UF system are described:

- 1) Separation of dextran, a polysaccharide of a very wide molecular weight distribution, into fractions of sharp molecular weight distribution.
- 2) Fractionation of a mixture of bovine serum albumin and poly(ethylene glycol) 4000 into each pure component.
- 3) Prepurification of  $\beta$ -galactosidase from cell autolysate.

### 1. はじめに

限外濾過はここ10数年のあいだに急激に普及した分離技術である。分離対象は主として高分子-水の混合系、すなわち高分子水溶液であり、高分子(蛋白質・酵素・水溶性高分子・コロイドなど)は通さず、水分子・無機イオン・低分子有機物などを通過させる半透膜を用いて低分子と高分子とを分離する。使用目的は高分子溶液の濃縮・脱塩、あるいは脱高分子水の製造などである。限外濾過法の駆動力に通常 0.5~3.0 kg 重/cm<sup>2</sup> の圧を用いるのみで熱は用いず、また分離時に相変化を起こさないことから、ドラム乾燥・スプレードライ・凍結乾燥に

比較して省エネルギー的であるとともに、熱によって本来の性質を失い易い生理活性物質の処理に適している。現在の主用途は医薬・発酵生成物の濃縮・脱塩、塗料廃液よりの塗料回収、純水製造プロセスの前処理などである。

上に述べたように従来の限外濾過技術は高分子水溶液の除水を主用途とする比較的粗い分離を目的として発達してきた。すなわち極端にサイズの異なる分子を微細孔を持つ限外濾過膜によって篩い分けることは得意であるが比較的サイズの近い分子同志を篩い分けるのは困難とされていた<sup>1)</sup>。サイズの近い高分子を分離する手段には古典的な手法としてゲル濾過法・塩析法・有機溶剤沈澱

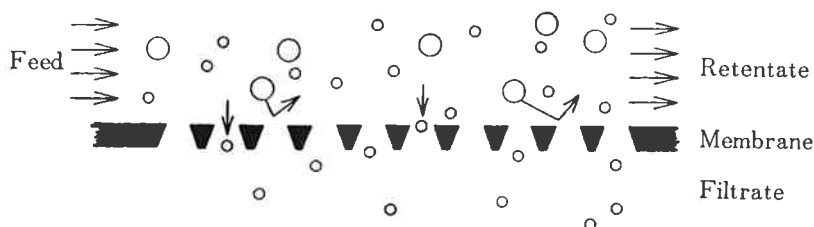


Fig. 1 Mechanism of ultrafiltration

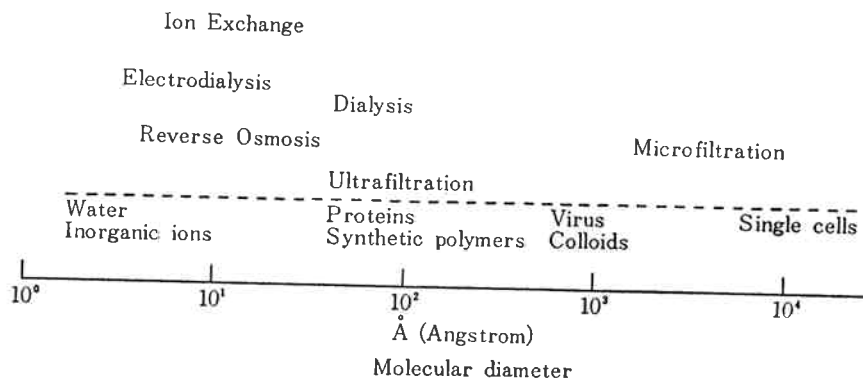


Fig. 2 Diameters of molecules and particles vs. related fractionation methods

法・イオン交換法などがあり現在も高分子の主要分離手段として実験室はおろか工業的規模においても多用されている。これら古典的分離法はその分離精度は満足できるが最大の欠点として(1)大量処理に適さない、(2)遠心分離などの固-液分離操作をとらぬ、の2点を有し、新たな大量精密分離法の出現が望まれている。

われわれは限外濾過法が大量分離に適していることから、その分離性能を向上させて先に挙げた古典的高分子分離法に匹敵させることができれば、これら古典的手法に替わって限外濾過法が大量分離手段として有利な立場に立つと考え、限外濾過膜の精密化及び膜性能を最大限に発揮させることのできる装置とその運転法の開発について検討を重ね、比較的分離性能の良いシステムを得ることができた。現在までに膜面積数  $m^2$  の装置の試作を

終了しているが本報では実験室における分離テスト用の装置、TSK-UF System Model SC-60 についてその概要およびこれを用いて得られた分離結果について紹介する。

## 2. TSK-UF System に用いる限外濾過膜

TSK-UF システムに用いる限外濾過膜は合成高分子を材料とし、膜はポリエチレン不織布によって裏側を補強してある。膜材質は蛋白質の吸着性や殺菌用薬剤への耐性などを考慮して選択してある。その構造は一般に“非対称構造”と呼ばれるもので Fig. 3 に模式的に示す形態をしている。実際に分離を担当するのは膜表面でその微細孔はここで最小径をとる。したがっていったん膜の中に侵入した溶質は膜内部でトラップされることな

Table 1 Characteristics of several fractionation methods

Methods	Molecular cut off	Cost	Speed	Capacity
$NH_4Cl$ precipitation	△	High		
Organic solvent precipitation	○	High		
Gel filtration	◎	Low	Low	Low
Membrane fractionation	○	Low	High	High

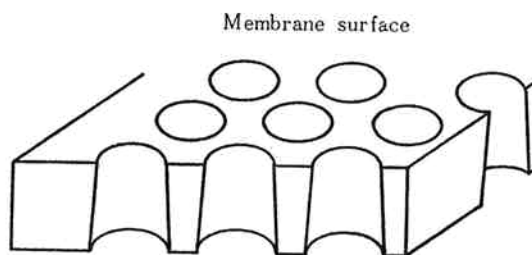


Fig. 3 Asymmetric membrane. Pore diameter is smallest at membrane surface where filtration is carried out. A particle once enters into the pore of membrane never clogs in the membrane.

Table 2 List of TSK-UF membranes

Membrane	Nominal* cut off molecular weight	Uses
TS-10	$10^4$	Desalting and concentration of macromolecular solution
TS-30	$3 \times 10^4$	
TS-50	$5 \times 10^4$	Concentration of serum proteins
TS-100	$10^5$	
TS-300	$3 \times 10^5$	Separation of Gamma globulin and albumin from their mixture at low pH region (below 4.3)
TS-1000	$10^6$	
TS-3000	$3 \times 10^6$	Removal of DNA and coaggregated proteins from solution

\* Globular proteins were used to determine the nominal cut off molecular weights.

く膜透過できる。このことは特に限外濾過では重要なポイントであり、膜表面の目詰まりさえ防止すれば長時間安定な分離操作が可能となるわけである。この点で限外濾過は固-液分離手段としての濾過と大きく異なる。

TSK-UF 膜にはその微細孔を変えた7種類がある。この微細孔は電子顕微鏡による観察でも観測できず、したがってその孔のサイズを直接に記述できない。よって膜が分離対象とする分子の分子量によって微細孔の孔径を表すのが普通である。これを分画分子量と呼ぶ。TSK-UF 膜では98%以上の分子が膜を通過しない時、その分子の分子量を分画分子量としている。Table 2に TSK-UF 膜の分画分子量と主たる用途を挙げた。

膜は9cm角の正方形で、Model SC-60に合わせてある。Model SC-60に装着した場合の有効膜面積は約64cm<sup>2</sup>である。

### 3. 実験室用限外濾過装置 Model SC-60

Model SC-60は薄層流路 (thin channel) 型の分離セルとペリスタルティックポンプよりなるシステムである。薄層流路型セルとは処理液を膜面に形成された薄い溝に沿って高速で流し、その一部を膜透過させるタイプの膜装着用セルで膜表面を高速で流れる処理液が膜面攪拌すなわち目詰まり防止の役割を果たす。限外濾過装置の膜面攪拌方法は主として攪拌子による機械的なものと、SC-60のような膜面循環式と2種類あるが、われわれはその表面攪拌効率を比較検討した結果後者がより

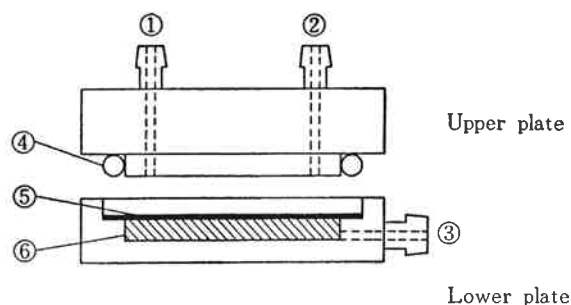


Fig. 4 Ultrafiltration cell of model SC-60 1, 2. Inlet and outlet for circulation of sample solution. 3. Outlet for filtrate. 4. Rubber packing. 5. Membrane. 6. Sintered polyethylene plate.

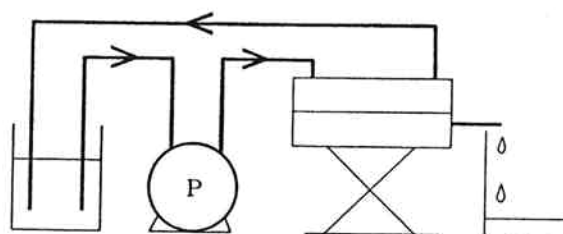


Fig. 5 Schematic diagram of ultrafiltration by TSK-UF system model SC-60.

良い分離結果を与えることを確認して薄層流路型を採用した。また薄層流路型の利点は大型膜分離装置にまでそのままスケールアップできることで、実験室における小形装置の分離結果をある程度大型装置による分離に際しての基礎データとすることが可能である。

Fig. 4に Model SC-60のセル部分の概略図を示した。セル本体はアルリル樹脂製で透明である。セルは上蓋と下蓋に分かれ、このあいだに膜を装着する。上蓋の膜に対する面にはジグザグ型の厚さ0.6mmの流路がある。下蓋の底にはポリエチレン製多孔板(厚さ約3mm)が敷かれているが、これは膜を透過した液の流路となる。膜はポリエチレン多孔板上に置きその上に上蓋を置いて上蓋と下蓋とをボルトで締めつけることにより装着される。膜表面には上蓋に形成された流路があり、この流路に沿って処理液は循環されることになる。流路厚みは0.6mmに設計されているが膜を押えた時の実際の厚みは0.3~0.4mmとなる。

セルとポンプとを組み合わせたシステムのダイアグラムを Fig. 5に示す。通常処理液は100~300ml程度が適当であり、これをポンプでセル中を循環させてその一部を透過液として得る。

### 4. Model SC-60による分画操作

以下に述べる分画操作は Model SC-60を使用するう

えで基本的なものである。経験的にこの操作が最も安全であり特に対象とする高分子混合水溶液の膜による分画が可能か否かを確かめるのに適していると言える。この操作で満足のゆく分離結果が得られない場合には膜分離がその系には適さないと判断してもよい場合が多い。ただし対象とする高分子混合水溶液の pH やイオン強度を調節することによって分離が極めて鋭敏になる場合もある<sup>2)</sup>。以下に述べる基本的な分離方法で比較的満足できる結果が得られた場合には分離速度を改良する検討を

行い、最大の分離効率をあげる条件を探索すべきである。

#### 〔1〕 膜の選択

膜の選択は分離の成否を決定する最大の要因である。原理的に膜分離は1回の分離操作で二つの画分に分けることしかできず、見当違いの膜を用いたのでは良い結果は得られない。そのため各分画分子量の膜の分離能力と分離範囲をよく確認しておくことが必要である。

Fig. 6 に試薬として市販されている蛋白質の混合溶液を TSK-UF 膜で分離した場合の液体クロマトグラムを示

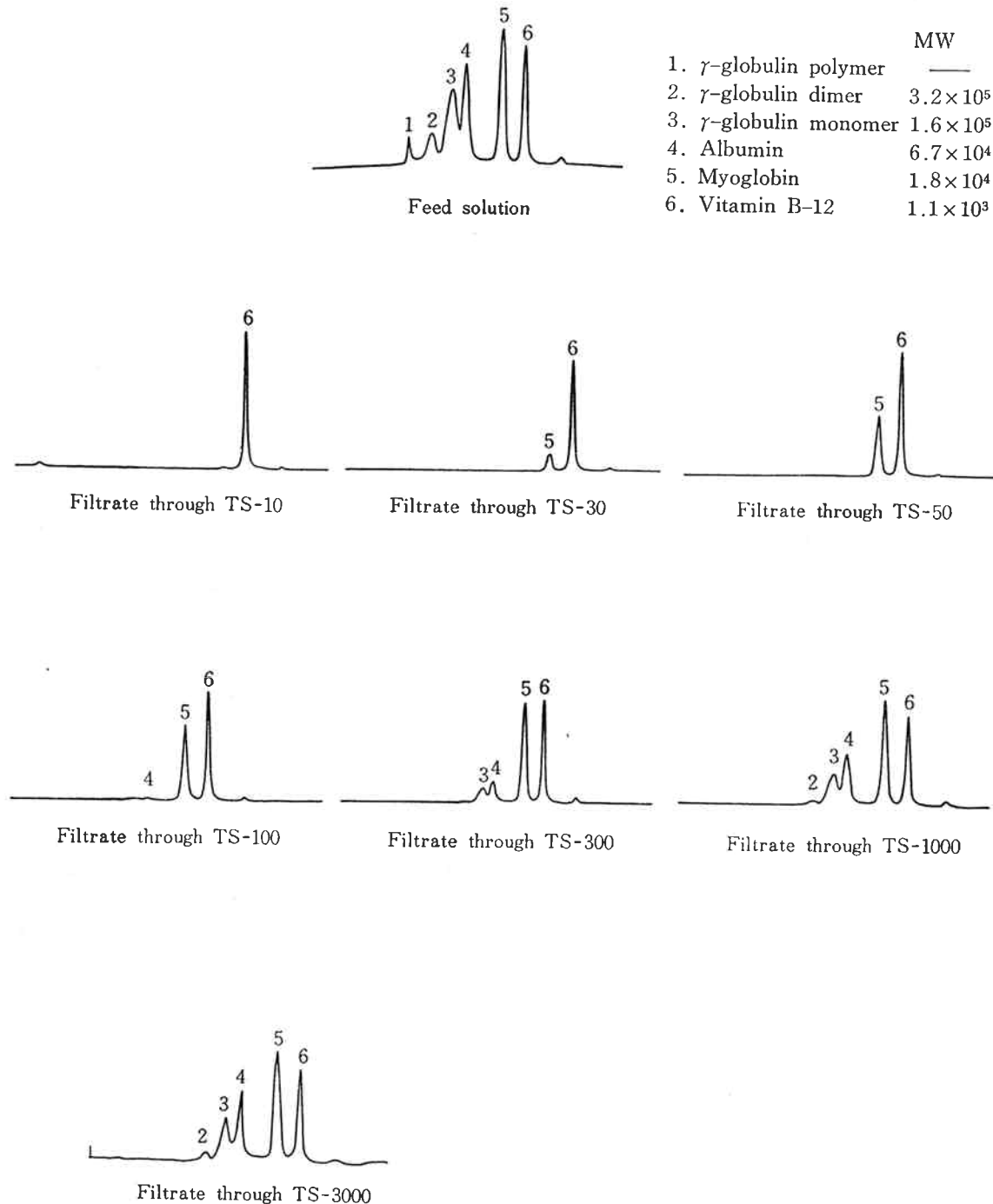


Fig. 6 Typical fractionation patterns of TSK-UF membranes.

す。分離操作は後に述べる標準的なものによっている。もちろん蛋白質溶液の濃度やイオン強度あるいは pH によって、得られる結果は多少変わってくるのでこの分離例はあくまで一定条件下での分離結果であるが、このことを考慮しても、これから始めようとする膜分画には十分参考になるであろう。Fig. 5 から最も適当と思われる膜を選択して得られた結果より最適の膜の選択が可能となる。

多糖や水溶性高分子の場合には残念ながら適当な指標がない。線状高分子の分子サイズは pH やイオン強度によって大きく変わることが多くこの種の高分子の膜分画は試行錯誤によって最適な膜を見つけねばならない。一般に非電解質線状高分子の場合にはその分子サイズは同じ分子量の蛋白質のそれとはほぼ同じと見て良いが電解質線状高分子の場合には同じ分子量の蛋白質に比較して極めて分子サイズが大きいように挙動する。

## [2] 分離条件の設定

以下に述べる分離条件は我々の実験室で経験的に得られたものでこれまでのところ最も安心して推奨できるものである。この条件では分離速度が比較的遅くなるという欠点はあるがさし当たって現在問題となっている系の膜分離が可能か否かを判断するうえには最も確実な材料となる。この操作で分離が可能であることが確認された後に透過率や透過流量を上げる検討をすれば良い。

基本的分離条件を以下に示す。条件設定には試料として純水を用いる。

- (1) ポンプによる純水の循環量を 250 ml/min 前後にセットする。
- (2) セルの循環液出口（透過液出口ではない）のチューブをピンチコックでしぼり、膜透過液の流量を室温ならば 2.5 ml/min, 4°C ならば 2 ml/min に調節する。

これで分離条件の設定は終了である。あとは設定した条件で実液を分離に供する。実際の場合には当然膜透過流量は設定した純水膜透過量を下回る。

## [3] 実液の分離

実際の処理される液体には遠心分離などによっても完全に除去できない不溶物が存在することがある。このような場合にはマイクロフィルターであらかじめ不溶物を取り除いておくことが望ましい。

処理液中の高分子濃度は低い方が良い結果を与える。通常 4 g/dl を最大値として考えるのが安全である。

Model SC-60 で分離をおこなう場合、処理量は 100 ~ 250 ml 程度が適当である。

以下実際の分離手法について説明する。

分離法には大別して連続定容濾過法および回分濾過法

の2法がある。溶液中の高分子濃度が高い場合には連続定容濾過法、低い場合には回分濾過法が推奨される。

### ・連続定容濾過法

処理すべき溶液の容量を変化させずに常に膜透過による処理液の減少を処理液側に緩衝液を補給することで防ぐ方法である。この方法は処理液中の高分子濃度が初濃度より高くなるので膜の分離性能が劣化しにくいという利点があり、特に高分子濃度が 4 g/dl に近い場合に有効なことが多い。

理想的に分離が進行した場合、膜透過流速は常に一定値を示し、また膜を透過すべき溶質の処理液中の濃度は膜透過量に対して次式に従って減少する。

$$C/C_0 = \exp(-W/V_0)(1-R) \quad (1)$$

ここで  $C_0$ ,  $C$  はそれぞれ膜透過すべき溶質の初濃度と膜処理途中の濃度,  $V_0$  は処理液の容積,  $W$  は後に加えた緩衝液の量 (膜透過液量に等しい),  $R$  は膜の対象とする溶質に対する阻止率である。ここでは  $R$  を次式で定義する。

$$R = 1 - (\text{膜透過液濃度}) / (\text{膜阻止液の濃度})$$

分離途中に膜性膜に変化が生じたか否かは膜透過流速<sup>2)</sup>の変化を追うか、 $\ln C/C_0$  と  $W/V_0$  とのプロットが直線で表されるかどうかで判断できる。

### ・回分濾過法

溶質濃度が低い場合には回分濾過法が効率的である。回分濾過法は最初の液量  $V_0$  を  $V$  になるまで濃縮し (膜を透過すべき溶質はこの時透過液側へ移る), この後濃縮された阻止液側に緩衝液を加えて初期容積  $V_0$  にもどす。この液を再び  $V$  まで濃縮する, という操作を繰り返す。この場合,  $C/C_0$  の変化は次式で表され, 膜の目詰まりによる分離性能 (阻止率) の劣化が無ければ  $\ln C/C_0$  と  $W/V_0 (=n(1-V/V_0))$  の関係は直線で表される。

$$C/C_0 = (V/V_0)^{n(1-R)} \quad (3)$$

ここで  $n$  は回分回数である。

$V$  のとり方は次式に従い, 濃縮時の溶液中の高分子濃度が 4 g/dl を越さぬように設定することが望ましい。

$$(\text{溶液中の高分子初濃度}) \times V_0/V < 4 \text{ g/dl} \quad (4)$$

以上述べた条件は経験的に膜分離の成功の確率が高いものであり, 分離速度を速めるためにはこの条件から逸脱することもしばしばある。

### ・単純な脱塩濃縮の場合

この場合には条件をそれ程厳密に設定する必要はない。加圧循環するのみで目的は達成される。

## [4] 分離後

TSK-UF 膜はセルにセットしてある状態での破損は

無いがセルから取りはずす際に損傷を受けることがしばしばある。よって膜をセルから取りはずして洗浄するのは再使用の際危険である。膜を再使用する場合にはセルにセットしたまま洗浄保存することが望ましい。

洗浄は通常次亜塩素酸ソーダの約1%水溶液を用いる。これを5~10分間循環した後純水でよく再洗浄しておく。次亜塩素酸ソーダはセル内に残った高分子を分解するばかりではなく滅菌の役割りも果たす。

## 5. その他

### [1] 膜の耐溶剤性

Table 3 に TSK-UF 膜の耐溶剤性をまとめた。処理液中への有機溶剤の混入はたとえ膜が侵されなくても分画結果に大きな変化を与えることが多く、注意を要する。例えば血清中の  $\gamma$ -グロブリンとアルブミンとを分離する場合<sup>2)</sup>、処理液中にエタノールが5%混入すると分離は不能となる。ポリエチレングリコールなどの高分子物質の混入はそれ程大きな影響を与えることはない。

Table 3 Chemical compatibility of TSK-UF membranes

Solvent		Solvent	
Water	◎	Acetone	×
Phosphate buffer	◎	Other ketones	×
Tris-HCl buffer	◎	Aromatic solvents	×
3% Urea	◎	Aliphatic solvents	×
IN NaOH	◎	Anionic surfactants	○
IN HCl	◎	Cationic surfactants	○
Methanol 10%	○	Nanionic surfactants	○
Methanol 50%	×	Poly (ethylene glycol)	◎
Ethanol 10%	○	DMF	×
Ethanol 50%	×	DMSO	×
Propanol 10%	○		
Glycerine 10%	○		

◎ Good ○ Usable, but not recommended when a sharp molecular cut off is expected. Concentration and desalting is capable in these system.  
× No

### [2] Model SC-60 及び TSK-UF 膜の耐熱性

先にも述べたように Model SC-60 のセルはアクリル樹脂製で使用上限温度は 60°C である。膜も現在のところオートクレーブに耐えない。したがって滅菌は薬剤を用いることになる。滅菌剤には次亜塩素酸ソーダ水溶液や50%エタノール水溶液でおこなう。

## 6. 実際の分離例

Model SC-60 を用いて我々の研究室において得られ

た分離例を挙げる。分離操作はいずれも回分過法によった。この場合  $V_0/V=2$  とし、室温でおこなった。分離結果の検定は液体クロマトグラフィーでおこなった。使用装置は HLC-802 UR (東洋曹達製)、カラムは蛋白質が分離対象の場合 TSK GEL G-3000 SW 1本、蛋白質と線状高分子との混合物、あるいは線状高分子のみの場合には TSK GEL G-4000 PW 1本あるいは2本用いた。検出には UV280 および示差屈計を用いた。溶液中の高分子濃度は液体クロマトグラムのピーク高より決定した。

以下の分離例は先に述べた基本的な分離法で分離が可能であることを確認したのち分離速度の改良をした結果であり、いきなりこれらの結果が得られたものでないことを付記しておく。

### [1] デキストラン混合物の分子量分画

線状高分子の例としてデキストランを挙げる。デキストランは医療用や食品用に使われる微生物由来の多糖である。本実験に使用したのは分別された分子量分布の狭い試薬 (Pharmacia Fine Chem 社製) を多種混合したものである。



Fig. 7 Dextran mixture solution. Concentration of dextran is 6 g/dl.

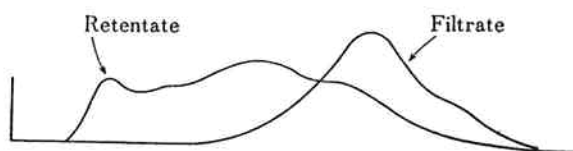


Fig. 8 Fractions of dextran mixture by a TS-100 membrane. Filtrate was concentrated by TS-50 membrane.

Fig. 7 に原液のクロマトグラムを示す。溶媒は純水でデキストラン濃度は6%である。分子量分布の狭い試薬を混合したのでクロマトグラムには各成分のピークが見られる。原液 200 ml を TS-100 膜により 100 ml にまで濃縮した後純水を原液側へ加えて 200 ml とする操作を3回行い、得られた透過液を TS-50 膜で 100 ml にまで濃縮したのち3回回分精製した。最終的に TS-100 膜に阻止された溶液及び TS-100 膜を透過した液を TS-50 膜で濃縮した溶液のクロマトグラムを Fig. 8 に示す。Fig. 8 に示した濾液は比較的狭い分子量分布を

持っており膜による線状高分子の分画が有効であることがわかる。

線状高分子の分子量分画は実験室的にはカラムクロマトグラフィー、工業的には有機溶剤沈澱によるのが一般的であるが、カラムクロマトグラフィーでは処理量が極めて少なくまた長時間を要するし、有機溶剤沈澱では沈澱物を遠心分離する操作が加わると同時に有機溶剤回収プロセスが必要である。これらの点から線状高分子を膜分画するプロセスは決して非現実的ではない。

〔2〕 アルブミンとポリエチレングリコール-4000との分離

蛋白質と線状高分子との分離例である。蛋白質は代表的な血清蛋白であるウシ血清アルブミン (分子量 $6.7 \times 10^4$ )、線状高分子には医薬の添加剤として用いられるポリエチレングリコール (PEG)-4000 (分子量 $4 \times 10^3$ ) を用いた。

サンプル溶液は2gのウシ血清アルブミンと4gのPEG-4000とを200mlのリン酸緩衝液に溶解して作製した。原液のクロマトグラムを Fig. 9 に示す。この場合アルブミンとPEG-4000との分子量差が大きいことから分離は極めて容易である。アルブミンを実質的に完全阻止するTS-50膜によって試料の回分濾過を10回繰り返した。この時の平均の膜透過流速は約 $30 \text{ l/m}^2 \cdot \text{hr}$ であった。10回の回分濾過後の膜阻止液と膜透過液とのクロマトグラムを Fig. 10 に示す。ほぼ完全に二つの成分が分画されている。Fig. 11 はPEG-4000の $C/C_0$ とn(回分回数)とのプロットである。両者のあいだに

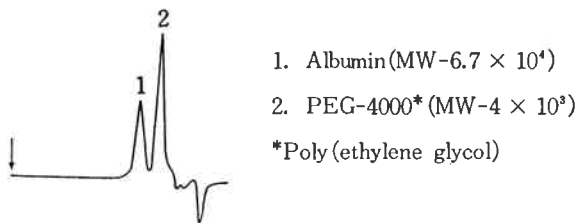


Fig. 9 Mixture of bovine serum albumin (1 g/dℓ) and PEG-4000 (2 g/dℓ) in pure water.

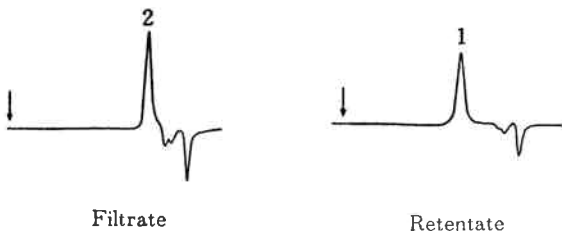


Fig. 10 Filtrate (PEG-4000) and retentate (bovine serum albumin) ultrafiltrated with TS-50 membrane.

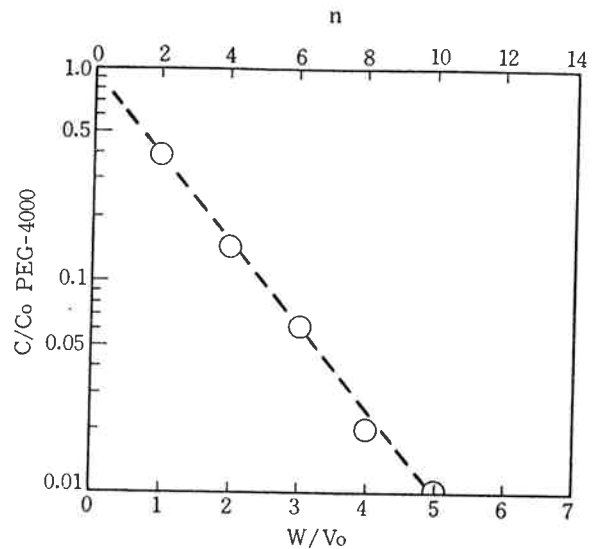


Fig. 11 Relationship between  $C/C_0$  and  $W/V_0$  in the case of mixture of bovine serum albumin and PEG-4000 by TS-50 membrane.

Co: Amount of PEG in the sample solution  
Vo: Initial Volume of feed solution  
C: Amount of PEG retained  
W: Amount of water added = Amount of water passed through the membrane

はほぼ直線的な関係があり、この膜分画操作中膜性能の変化がないことがわかる。この直線の傾きからTS-50によるPEG-4000の阻止率Rは約0.34であることがわかる。

〔3〕 菌体自己消化液中の酵素精製—β-ガラクトシダーゼ

多種類の蛋白質が混合している系から目的とする蛋白質の画分を取り出す操作の例である。β-ガラクトシダーゼを産生する菌を自己消化させた液より可溶分を抽出して試料とした。試料は遠心分離とマイクロ濾過によって固型浮遊物を除去してある。

Fig. 11 に菌体自己消化液抽出物のクロマトグラムを示す。高分子量側にDNAを含む超高分子量物が存在する。目的とするβ-ガラクトシダーゼは分子量 $10^5$ 前後

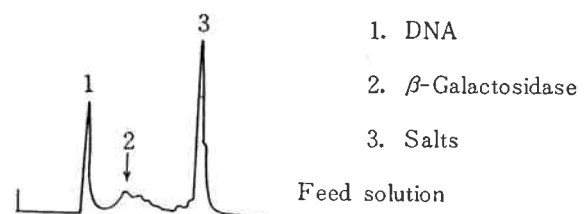


Fig. 12 Chromatogram of cell autolysate solution. There is β-galactosidase activity at peak 2.

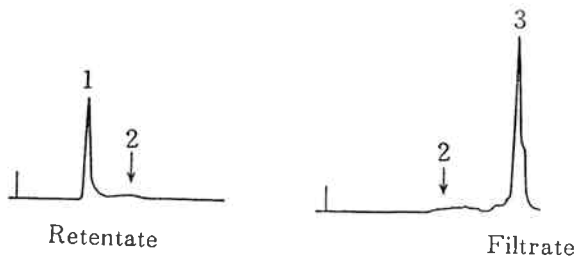


Fig. 13 Fractions obtained by TS-1000 membrane. Enzyme activity is in the filtrate.

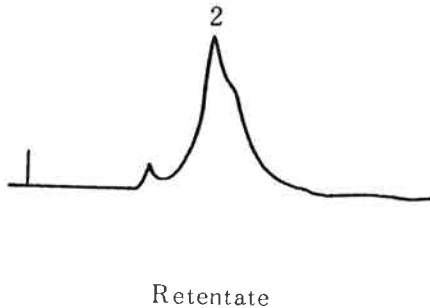


Fig. 14 Chromatogram of the retained solution on TS-100 membrane. The yield of enzyme activity was about 60% and the relative enzyme activity was about 3 times of the feed solution.

の位置にある。従って分画手順は第一段階で脱超高分子、第二段階で脱低分子蛋白および脱塩、が適当である。第一段階の脱超高分子は TS-1000 膜でおこなった。回分回数13回で Fig. 12 に見られる二つの画分を得た。目的とする画分は膜透過液側に存在する。TS-1000 膜透過液を TS-100 膜で脱塩、脱低分子蛋白をおこなって得られた  $\beta$ -ガラクトシダーゼ画分のクロマトグラムを Fig. 13 に示す。目的とする画分が得られていることがわかる。活性の回収率は約60%であり、また比活性は約3倍となった。

発酵液や組織培養液中より特定の高分子物質を分離する操作は系が複雑であるだけに多くの困難を伴うが膜分離によってあらかじめ粗精製した画分から出発して後のイオン交換等の精製をおこなうことで工程は簡略化できるとされる<sup>3)</sup>。

## 7. おわりに

TSK-限外濾過システムの中で実験室用に設計された Model SC-60 について紹介した。従来の限外濾過と違い高分子間の分離をも可能にしたところに本システムの特徴がある。高分子の分画手段として従来のゲル濾過法、塩析法、有機溶剤沈澱法と並び、膜分離法が工業的に使用であることを示した。

膜分離による高分子の分子量分画は膜分離が本質的に試料を2画分にしか分けないことから最適の分子量位置で分画する条件を設定することが特に重要である。それゆえ、実験室における単発の分離実験では失敗する確率が比較的高く、むしろ膜による分画は日常的に行う分離により適していると思われる。Model SC-60 は実験室用の装置であるが同様に日常的な試料処理に利用するのが得策だろう。

付記 菌体自己消化液の分離においてサンプル調整および酵素活性の測定をしていただいた新井信夫氏に感謝します。

## 文 献

- 1) 橋本・萩原編；“膜分離法”，講談社サイエンティフィック。
- 2) 小山，大野，福田，木原；“東洋曹達研究報告”，25，(2)，99 (1981)。
- 3) 小山，大野，福田，木原；“東洋曹達研究報告”投稿中。