

ハイドロキシアパタイトを用いたエンドトキシン吸着除去法の検討

Study of endotoxin removal method using hydroxyl apatite

田中 孝国・渡辺 勇太*

Takakuni TANAKA, Yuta WATANABE

【緒言】

生体発熱性物質(Pyrogen)として知られているエンドトキシン(Et)は、種々のグラム陰性菌の外膜に存在しているリポ多糖(LPS)である。LPSを構成している糖鎖部分(多糖、糖鎖)、脂質部分(リピドA)は、完全な構造ではない破片の状態であっても強い発熱性を示すことが知られている。そのため、Etの分子量は数千~数万と幅広くなり、除去対象が絞りきれない問題が生じている。更にEtは耐熱性毒素としても知られており、250℃、1時間以上の乾熱滅菌操作による失活操作(不活化)が必要であるため、主な除去対象を水溶液中とするEtを除去することは極めて難しい^{1,2)}。

従って、Et除去ターゲットとなっている注射用水や透析水、注射用薬剤などの医療用水からEtを除去するには、ろ過操作が有効であるとされている³⁾。

現在、エンドトキシンを除去する方法として逆浸透膜(RO)や限外ろ過膜(UF)によるろ過法が用いられている⁴⁾。これらのフィルターは高いEt除去性能を持っているが、高価であること、高分子素材であること(Et失活に必要な熱処理が不可能、使い捨てである)などの点から、医療費高騰や産業廃棄物を増加させる欠点をもっている。熱処理による再利用可能なEt除去法として活性炭充填カラムによる除去が試みられているが、Et除去能は前述の2種のフィルターほど高くなく信頼性が低いのが現状である³⁾。

そこで我々は生体親和性が強い無機材質ハイドロキシアパタイト(HAp)による除去法に着目した。HApの粉体粒子は表面積が広く(Fig. 1)、親水性基(OH)、疎水性基(PO₄)を持つことから、タンパク質(特にアルブミンの報告例多数あり)、

脂質、糖などの生体物質の持つ官能基と幅広く結合することが知られている⁵⁾。この結合性を生かし、粉末状HApをカラムに充填して、溶液中の不純物のろ過を行う製品がある(使用後の粉末状HApは使い捨てである)⁶⁾。

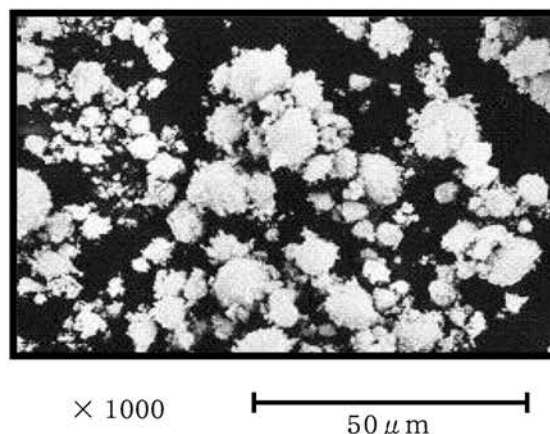


Fig.1 粉末状HApの電子顕微鏡写真

このカラムに充填した粉末状HApは、微量溶液のろ過を対象としているが、医療用水は短時間で大量の水の生産が必要であるため、この方法は通水性の点から実利用は難しいと考えられる⁶⁾。更に、粉末状HApは強度が極めて低いことから大量の水のろ過を行う際の水圧に耐えられない欠点もあると考えられる^{5, 7)}。

強度の欠点を持つ一方でHApは、セラミックスであるため熱耐性が高く、Et失活温度である250℃程度の加熱では性質を変化させない特長がある。我々は、この性質及び前述の生体物質吸着特性を利用したエンドトキシン吸着除去法の検討を行うことにより、再利用の可能な新規Et除去法が開発できると考えた。

我々は以前、粉末状HApを用いたEt吸着実験及び、250℃、2時間以上の滅菌処理後に複数回のEt再吸着実験を行った。その結果、HApのEt

*小山高専 物質工学専攻2年 (2008年度)

吸着特性は再利用後も失われないことが判明した。しかし粉末状HApは繰り返し使用を行うと微細粉化が進み、試験水と粉末状HApの分離が出来なくなる欠点があることが判明している⁷⁾。今回我々は、ステンレス(SUS)フィルターを支持体とし、HAp粉末をプラズマ溶射することで、粉末状HApを固化した新規フィルターを作製した。このEt除去フィルターのEt吸着特性について分析し、フィルターの有効性について検討を行ったので報告する。

【実験操作】

本実験ではEtの定量法として、比色法であるエンドポイント法（エンドスペーシ、生化学工業社製）を採用した。実験に使用したガラス器具類は乾熱滅菌を250℃・2時間行い、Et失活操作とした。HApは、太平化学産業社の白色粉末製品を用いた（以降HApと略す）。HApの化学式は、 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 、式量は1004.64、平均粒径4～6 μm であった。HApは、使用前に器具類と同様の条件で乾熱滅菌を行ってから実験に用いた。Etを含む試験液（以降、試験液と略す）として、医療用水製造装置における蒸留水を想定した煮沸水道水（10分煮沸を行って室温まで自然冷却）を以降の実験に用いた。

比色定量時のゼロブランクとしては、Etフリーの注射用水（大塚製薬社製）を用いた。比色法における濃度測定は分光光度計（UV1240、島津製作所）を用いた。Etの検量線の作成には、Et標準品（*E. coli* 113:H10株由来、生化学工業社製）を採用した。

続いて、新規Et除去フィルター作製法について述べる。Et除去フィルターは、サンドプラストにより1分間処理を行ったステンレスフィルター（ADVANTEC社製）にチタン(Ti)をプラズマ溶射し、その後HApをプラズマ溶射することで作製した⁷⁻⁹⁾。Ti溶射は、アルゴン(Ar)ガスをキャリアガスとし、溶射電流400A、溶射距離120mm条件下で行った。続いて行ったHAp溶射は、溶射時間を30sとし、他はTi溶射と同条件で行った。溶射後、HApの結晶性を回復させるために作製した試料の熱処理を行った¹¹⁾。熱処理の条件は、Ar雰囲気の下600℃で1時間保持し、新規Et除去フィルターを得た。得られたフィル

ターを専用のステンレスフィルターホルダーにセット後、乾熱滅菌を行い、試験液である煮沸水道水のろ過を行った。ろ液のEt濃度を測定し、Et吸着特性を測定した。ろ過後のフィルターを乾熱滅菌処理によって再利用し、再びEt吸着特性を測定した。フィルターの表面観察は電子顕微鏡(SEM)を用いた。

【実験結果及び考察】

Fig. 2に作製したEt除去フィルターの写真を示した。フィルターの溶射後の厚さは0.55mmとなり、0.30mmのHAp層が形成されていた。HApが溶射されたフィルターの表面は、ほぼ均一にコーティングされているように観察された。しかし、今回作成したフィルターはEtの吸着現象が無くなってしまふことが判明した（Fig. 3）。この他にも同条件下で作製したフィルター全てにおいても同じ現象が見られた。作製したフィルターは、複数回の試験水への浸漬、乾熱滅菌を繰り返しても破損は起こらなかった。

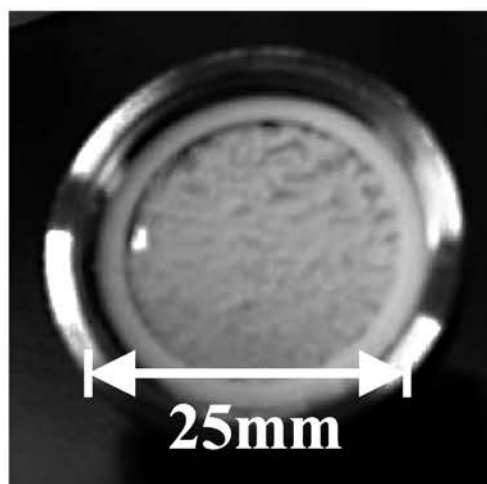


Fig. 2 プラズマ溶射によって作製した新規HApフィルター⁷⁾

次にSEMを用いてフィルター表面の観察を行った(Fig. 4)。Fig. 4より、プラズマ溶射を行うことでHAp粉末（Fig. 2）に見られる表面の粗さが平滑化されてしまうことが観察できた。プラズマ溶射は3万度程度まで温度が上昇する¹⁰⁾ ことが報告されている。

従って、溶射によってHApが溶解し、結晶性が変化してEtの吸着が起こりにくくなったことが予想された¹²⁾。溶射後に行ったHAp結晶性回復の熱処理条件⁹⁾では、今回のHApフィルターは、Etが吸着する結晶状態に戻らなかったことがFig.3 より判明している。

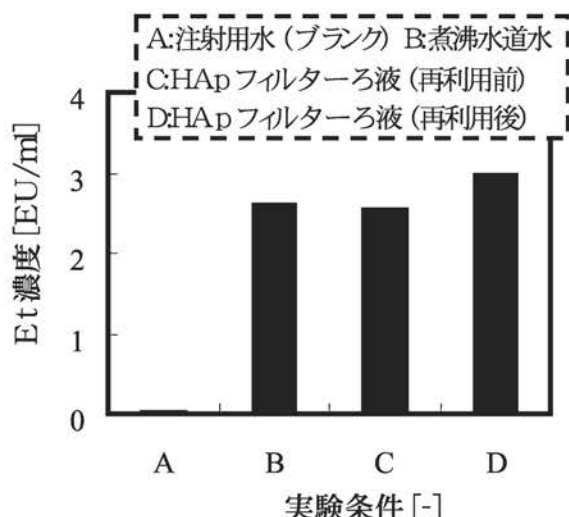


Fig. 3 HApフィルターのEt吸着特性

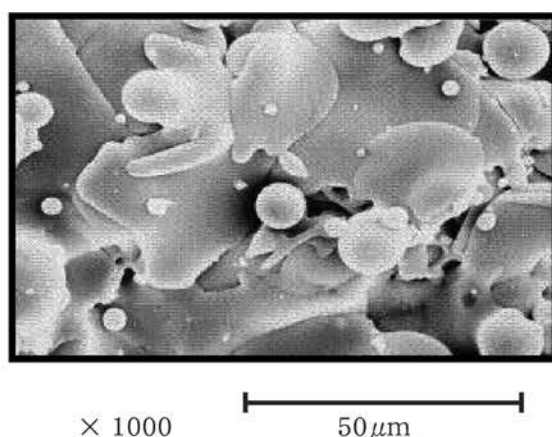


Fig. 4 作製したHApフィルターの表面写真

以上の結果より、Etは素材のイオンや結晶性に特異的な吸着を示すのではなく、HApの表面粗さに物理吸着することで除去されていることが示唆された。HApの吸着特異性に関する報告例によれば、HAp表面の吸着点は、 Ca^{2+} サイトと PO_4^{3-} により構成されており、ここにBSA(牛

血清アルブミン)などの酸性タンパク質が吸着する場合、その表面電荷に左右されると報告されている¹⁴⁾が、今回実験に用いた試験液のpHは中性領域であるため、HAp表面電荷によるEt吸着には直接影響を及ぼしていないと思われる。

そこで、Etが物理吸着すると仮定し、作製したHApフィルター表面をサンドブラストにより再び1分間粗化を行うことで表面積を広げた。そのフィルターの表面写真をSEMによって観察したところ (Fig. 5)、フィルター表面が再粗化されていることが判明した。このサンドブラスト処理によるフィルターの物理的な破損は見られなかった。現在、サンドブラストの処理時間とフィルター表面粗さ、及び表面粗さとEt吸着性能との関連について検討を行っている。

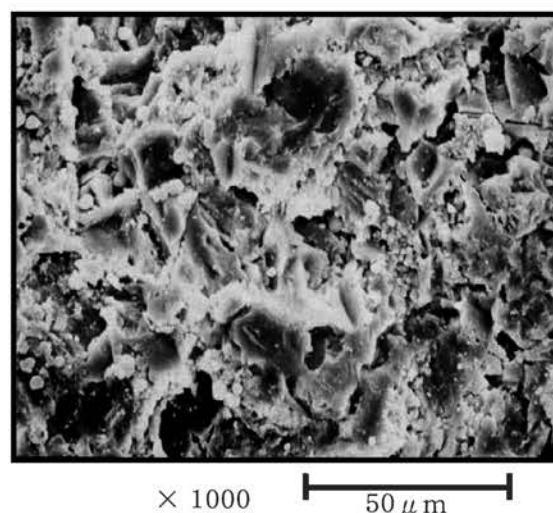


Fig. 5 サンドブラストで粗化を行ったHApフィルターの表面写真

次に、この粗化したHApフィルターを用いてEt吸着実験を行ったところ、吸着能力が復活したことが判明した (Fig. 6)。更に複数回ろ過を繰り返すことで吸着量が上昇したことから、試験液とHApフィルターの接触時間が今回のろ過時間では不足していることが考えられた。今後、フィルター1枚に対するEt吸着量と試験液の接触時間(試験液のろ過速度など)について解析を行いたいと考えている。

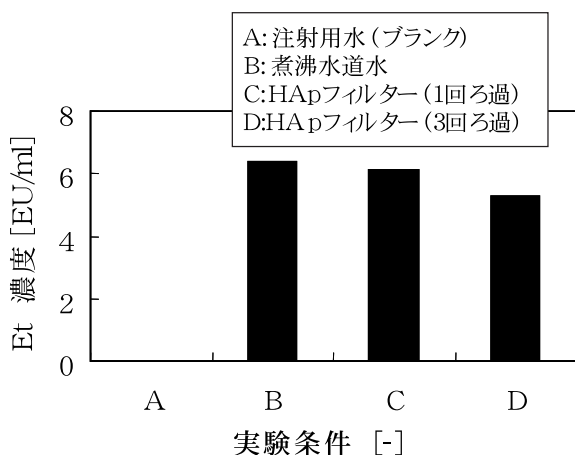


Fig. 6 サンドブラスト処理を行った
HApフィルターのEt吸着特性

- 10) 河辺隆也：“プラズマの科学”、日経サイエンス社、pp.154-155 (1994)
- 11) 笠原麻菜美他：第10回化学工学会学生発表会（群馬大会）要旨集、D20（2008）
- 12) 渡辺勇太他、第10回化学工学会学生発表会要旨集 p11 (2008.03)
- 13) 田中孝国他、分離技術会年会2008 技術・研究発表会講演要旨集 p.140 (2008.06)
- 14) 大久保和慶他、粉体および粉末冶金、Vol.52、No.5、pp.368-372 (2005)

小山工業高等専門学校 物質工学科

E-mail : tanakatakakuni@oyama-ct.ac.jp

「受理年月日 2008年8月18日」

【謝辞】

本研究は、財団法人 向科学技術振興財団の2006、2008年度研究助成金および、小山高専平成19年度重点配分経費によるものであることを記し謝意を表します。

【参考文献】

- 1) 中野昌康他：“エンドトキシン”、講談社サイエンティフィク、pp.8-27 (1995)
- 2) 小川義之、防菌防黴、Vol.17、No.8、pp.381-389 (1989)
- 3) 竹沢真吾他：“透析液エンドトキシンがよくわかる本”、東京医学社、pp.94-104 (1998)
- 4) 江口圭他、クリニカルエンジニアリング、Vol.17、No.5、pp.455-464 (2006)
- 5) 青木秀希：“アパタイト”、医歯薬出版、pp.9-12 (1999)
- 6) 例えば、BIO-RAD カタログ” ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー” 製品など
- 7) 田中孝国他、材料の科学と工学、Vol.44、No.5、pp.199-202 (2007)
- 8) 田中孝国、実用産業情報 第43-44合併号、pp.44-48 (2007)
- 9) 武成祥他、小山高専研究紀要、No.30、pp.151-156 (1998)