●特集 日本膜学会膜学研究奨励賞 (2005 年) 受賞論文

両性荷電膜の界面物性に関する研究

松本英俊

東京工業大学 大学院 理工学研究科 有機・高分子物質専攻 〒152-8552 東京都目黒区大岡山 2-12-1 S8-27

Interfacial Properties of Amphoteric Charged Membranes

Hidetoshi Matsumoto

Department of Organic and Polymeric Materials, Tokyo Institute of Technology,
S8-27, 2-12-1 Ookayama, Meguro-ku, Tokyo 152-8552, Japan

Amphoteric charged membranes are expected as an antifouling or antithrombogenic material that prevents adsorption of organic molecules and proteins due to their neutral surface charge and hydrophilicity. In addition, if their charge groups are weak electrolyte, they have a pH-responsibility. The interfacial charge structure of these membranes, which contain both acidic groups and basic groups, is so complex that their interfacial properties have not been clarified in detail. Particularly, there have been few systematic studies on the correlations between their interfacial properties and their interaction with organic molecules and proteins. In the present study, we prepared two types amphoteric charged membranes by surface modification using poly (ethylene glycol) (PEG) derivatives with pendant ionizable groups: the amphoteric ion-pair side chain (ASC) type and the mixed grafted chain (MGC) type. Our ζ -potential measurements and adsorption experiments revealed the pH dependence of their interfacial charge, and their interaction characteristics with organic molecules and proteins.

Key words : amphoteric charged membrane / polyelectrolyte / zeta potential / adsorption / antifouling

1. はじめに

分子中に正・負両方の荷電基を有する物質は、アミノ酸、タンパク質、細胞膜表面のリン脂質をはじめ生体内に多く見られるだけでなく¹⁾、界面活性剤、ラテックスなど人工的にも多く合成されている。近年、このような両性荷電 (アンフォテリック、あるいはツヴィッターアイオニック) 分子は機能性材料として、高分子科学、コロイド科学、電気化学など広い分野において注目を集めている²⁻⁶⁾。両性荷電分子を用いた膜の表面修飾は、表面電荷の低減 (理想的には電気的に中性な表面の形成) と表面の親水性の向上を可能にする。また、分子中の荷電基が弱電解質であれば、外部溶液の pH による荷電状態の制御も可能になる。このような膜界面では、溶質分子との間にはたらく静電相互作用や疎水性相互作用が抑制されると考えられ、膜の耐ファウリング性や抗血栓性の向上が期待される (Fig. 1)⁷⁻¹⁵⁾。

耐ファウリング性・抗血栓性界面の構築には、膜界面の物理化学的な性質に関するキャラクタリゼーションと界面における分子吸着機構の解明が必要である。正負両方の荷電基を持つ両性膜、特に弱電解質を荷電基とする膜の界面荷電構造は非常に複雑であるため、このような膜の界面物性に関する体系的な研究は、これまでほとんど行われていなかった¹¹⁻¹⁵⁾。本稿では、ポリエチレングリコール (PEG) 系高分子電解質を固定した両性荷電膜界面における有機分子・タンパク質吸着性について、界面物性、特にゼータ電位測定に基づく界面荷電特性との関係を中心に解説する。

2. 高分子電解質を用いた両性荷電膜界面の構築

ポリエチレングリコール (PEG) 系高分子電解質は、主鎖部分の水溶性、低い毒性、柔軟性に由来す

Fig. 1 Surface modification using amphoteric charged molecules.

Fig. 2 Synthesis of the PEG derivatives with pendant ionizable groups.

る生体適合性や立体反発効果によるタンパク質の非特異吸着排除能と¹⁶⁾、側鎖上の荷電基に由来する機能性を併せ持つ高分子である^{17, 18)}。ここでは、側鎖上にアミノ基を持つカチオン性高分子電解質 (PEG-A)、カルボキシル基を持つアニオン性高分子電解質 (PEG-C)、アミノ酸残基 (システイン残基) を持つ両性高分子電解質 (PEG-Cys) の3種類の高分子電解質を合成し、膜の表面修飾に使用した。PEG系高分子電解質の合成スキームをFig. 2に示す。出発物質としてアリルグリシジルエーテル/エチレンオキシド共

重合体 (Copoly (AGE/EO), $M_w = 3260$, AGE/EO = 13.6 : 86.4 in moles) を用い、室温、メタノール中で2-アミノエタノール、3-メルカプトプロピオン酸、L-システインを側鎖に付加することによって、各高分子電解質を得た¹²⁾。本研究では、空孔表面に両性高分子電解質 (PEG-Cys) をグラフトした膜 (amphoteric ion-pair side chain, ASC型) とカチオン性高分子電解質 (PEG-A) とアニオン性高分子電解質 (PEG-C) を同時にグラフトした膜 (mixed grafted chain, MGC型) の2種類の両性膜を調製した (Fig. 3)。また比較の為、PEG-A, PEG-Cを用いた単独荷電膜 (Basic型, Acidic型) の調製も行った。製膜は、ポリエチレン (PE) 多孔膜 (平均孔径50nm, 膜厚25 μ m) を基材とし、各高分子電解質水溶液中に浸漬した多孔膜に γ 線を照射し、多孔膜の空孔表面に高分子電解質をグラフトした^{12, 13)}。Table 1に調製した膜の物理化学的な性質を示す。PEG系高分子電解質グラフト前後での孔径と接触角の変化は、グラフトにより空孔表面に親水性高分子鎖が導入されたことを支持している¹²⁻¹⁴⁾。

3. ゼータ電位測定による膜界面のキャラクタリゼーション

調製した膜の界面荷電特性を明らかにするために、流動電位法により膜のゼータ電位測定を行った^{12, 13)}。Fig. 4に10 mM KCl水溶液中 (pH調整剤としてHCl, KOHを使用) で測定したゼータ電位から求めた膜表面荷電密度のpH依存性を示す。ASC型膜はpH 6-11の広い領域において安定な荷電特性を示した。このpH依存性は、グラフト鎖上の両性イオンペア (システイン残基) の双極子イオン構造に起因すると考えられる。一方、MGC型膜は、Basic型膜とAcidic型膜の中間的な荷電特性を示した。また、今回基材として使用したPE多孔膜の表面にも解離性の負電荷が存在することが明らかになった。ここでは、実験的に得られた膜表面荷電密度のpH依存性について、

(a) amphoteric ion-pair side chain (ASC) type (b) mixed grafted chain (MGC) type

Fig. 3 Schematic representation of amphoteric charged membranes using polyelectrolytes : (a) ASC type and (b) MGC type amphoteric charged membranes.

Table 1 Physicochemical properties of prepared membranes

Membrane	DG ^a (w/w%)	Pore size ^b (nm)	Contact angle ^c (deg)	ζ potential ^d (mV)
ASC type	4.5	31	86	-5.4
MGC type	4.5	28	85	-0.2
Acidic type	2.7	32	85	-7.9
Basic type	5.7	24	79	+2.8
Unmodified PE	-	40	102	-4.8

^a DG, Degree of graft polymerization, $DG = (W_2 - W_1)/W_1$, where W_1 and W_2 are the weights of dried membrane before and after graft polymerization, respectively.

^b Estimated from hydraulic permeability measurements.

^c Dynamic sessile drop method, measured with distilled water at pH 5.6.

^d Measured in 1 mM KCl at pH 5.6.

グラフト鎖上の各イオン性基およびPE膜上の電荷の解離挙動に基づいたモデルによる計算を行い、実験結果との比較を行った（計算結果はFig. 4の実線部分）^{19, 20)}。ASC型膜では、実験結果と計算結果は良い一致を示した。この結果はASC型膜の広いpH領域における安定な荷電特性がシステイン残基の双極子イオン構造に由来することを裏付けている。一方、MGC型膜では、pH > 5で実験結果と計算結果の間にずれが生じた。MGC型膜の実験結果がBasic型膜とAcidic型膜を重ね合わせたようなpH依存性を示さないのは、膜の空孔表面においてpH変化に伴う高分子電解質鎖のコンフォメーション変化が起きているためであると考えられる¹⁹⁾。

4. 膜界面における有機分子吸着挙動^{14, 21)}

溶質分子の膜への吸着性は、膜の界面物性に大きく左右される。従って、溶質分子吸着機構の理解には、溶質分子と膜界面の間にはたらく相互作用を明

らかにすることが重要である。ここでは、PEG系高分子電解質を固定した膜界面にはたらく基本的な相互作用を明らかにするために、疎水性のピレン、アニオン性のピレンスルホン酸、カチオン性のピレンメチルアミン、極性基（アミノ基）を有するアミノピレンの4種類の有機分子を用いてpH 5.6の条件で吸着実験を行った。Fig. 5に各膜への有機分子吸着量-時間曲線を示す。疎水性のピレンでは、全てのグラフト膜への吸着は短時間側で著しく低減された（< 3h, Fig. 5a）。このような吸着の時間依存性は、親水性のグラフト鎖によって疎水性分子であるピレンが排除されるため、ピレンがグラフト層中をPE基材膜の表面まで拡散していく段階が律速となって生じると考えられる。この結果はPEG系高分子電解質鎖が疎水性分子の排除に有効であることを示している。強酸性のピレンスルホン酸は負電荷を持つ。この有機分子では、pH 5.6において反対符号の表面電荷（正のゼータ電位）を示すBasic型膜への吸着が見られた（Table 1, Fig. 5b）。一方、弱塩基性のピレンメチルア

(a) ASC type

(b) MGC type

Fig. 4 The pH-dependence of apparent surface charge density for (a) the ASC type and (b) MGC type amphoteric charged membranes.

(a)

(b)

(c)

(d)

Fig. 5 Adsorbed amount of organic molecules on the membrane surfaces at pH 5.6: (a) hydrophobic molecule (pyrene), (b) anionic molecule (1-pyrenesulfonic acid), (c) cationic molecule (1-pyrenemethylamine), and (d) polar molecule (1-aminopyrene).

ミンはpH5.6において正電荷を持つ。この有機分子では、反対符号の電荷（負のゼータ電位）を示すASC型、MGC型、Acidic型膜への吸着が見られた (Table 1, Fig. 5c)。これらの結果は、グラフト膜への

イオン性有機分子の吸着において静電相互作用が重要な因子であることを示している。アミノピレンはpH 5.6において中性であり、極性基を持つ有機分子としてふるまう。この有機分子では、全てのグラフ

Fig. 6 Adsorbed amount of BSA on the membrane surfaces in (a) 10 mM acetate buffer (pH 3.3), (b) 10 mM phthalate buffer (pH 4.1), (c) 10 mM phosphate buffer (pH 7.2), and (d) 10 mM carbonate buffer (pH 10.2).

ト膜において一様な吸着挙動が見られた (Fig. 5d). ここでは, ピレンのように吸着一時間曲線の立ち上がりに遅れ時間がみられないことから, 吸着は主にグラフト鎖とアミノピレンの極性基 (アミノ基) の間の相互作用によると推測される. このことを確認するために, グラフト鎖の主鎖と同じ化学構造を持つポリエチレンオキシド (PEO) ゲル用いて, ピレンおよびアミノピレンの吸着実験を行った結果, アミノピレンのみが PEO ゲルに吸着した. これらの結果は, PEG 系高分子電解質が水素結合形成能を持つことを示している.

5. 膜界面におけるタンパク質吸着挙動¹⁵⁾

タンパク質 (ウシ血清アルブミン, BSA) の両性荷電膜表面への吸着量を測定し, 膜の表面電荷 (ゼータ電位) との関係調べた. 結果を Fig. 6 に示す. タンパク質の等電点付近 (pH 4.1) で, 全ての膜のアルブミン吸着量は最大となった (Fig. 6b). ここでは, アルブミンのゼータ電位がほぼゼロであること, 各

膜の吸着量はゼータ電位によらずほぼ一定であることから, 静電相互作用の寄与は小さく, タンパク質の吸着は水素結合や Van der Waals 相互作用によると考えられる. また, 等電点の両側 (pH 3.3, pH 7.2) では, アルブミンの膜への吸着性は, 概ねゼータ電位と良い相関を示した (Fig. 6a,c). これらの結果は, 膜表面へのタンパク質の吸着において静電相互作用が重要な因子であることを裏付けている. 尚, アルブミンの MGC 型膜への吸着に見られるゼータ電位との矛盾は, 3 節で述べたこの膜の界面荷電構造 (グラフト鎖のコンフォメーション) に起因すると考えられる. アルカリ条件下 (pH 10.2) では, アルブミンの吸着性にゼータ電位との相関は見られなかった (Fig. 6d). ここでは, タンパク質の高次構造変化による影響が考えられる.

6. おわりに

分離膜表面におけるファウリングの抑制には, 膜界面の物理化学的性質に関するキャラクターゼーシ

オンと分子吸着機構の解明が必要である。本研究では、膜表面にPEG系高分子電解質を固定した両性荷電膜界面を構築し、その界面荷電特性と溶質分子質吸着性を明らかにした。このような膜は、耐ファウリング性分離膜、医療用デバイス、薬物徐放膜、水処理膜への応用が期待される¹¹⁻¹⁵⁾。一方、高分子電解質を固定した“やわらかい”界面²²⁾の荷電特性については、界面構造(グラフト鎖のコンフォメーション)の取り扱いという課題が残された。このような界面のキャラクタリゼーションについては、今後さらに研究を進めていきたい。

近年、著者らは電場を利用した薄膜作製技術であるエレクトロスプレー・デポジション (Electrospray Deposition, ESD) 法を用いて、生理活性を維持したタンパク質の基板表面への固定化に成功している^{23, 24)}。究極の両性荷電分子ともいえるタンパク質を用いた界面制御は、膜表面への親水性タンパク質や酵素の固定化を可能にし、より高機能な両性荷電膜界面の創製につながるものと確信している。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導頂きました東京工業大学大学院理工学研究科・谷岡明彦教授に深謝致します。PEG系高分子電解質の合成については大妻女子大学・小山義之教授のご指導を賜りました。また、研究を進めるにあたり、お茶の水女子大学・仲西正助教授、宇宙航空研究開発機構・夏井坂誠博士、日本ゼオン株式会社・神保俊彦博士をはじめ多くの方々よりご助力・ご助言を頂きました。ここに厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Stryer L: "Biochemistry, 4th ed.", W. H. Freeman and Co., New York (1995)
- 2) Higgs PG, Joanny JF: *J. Chem Phys.*, **94** 1543-1554 (1991)
- 3) Ueda T, Ishihara K, Nakabayashi N: *J. Biomed. Mater. Res.*, **29** 381-387 (1995)
- 4) Viklund C, Irgum K: *Macromolecules*, **33** 2539-2544 (2000)
- 5) Fang SJ, Fujimoto K, Kondo S, Shiraki K, Kawaguchi H: *Colloid Polym. Sci.*, **278** 864-871 (2000)
- 6) Yoshizawa M, Hirano M, Ito-Akita K, Ohno H: *J. Mater. Chem.*, **11** 1057-1062 (2001)
- 7) Burns NL, Holmberg K, Brink C: *J. Colloid Interface Sci.*, **178** 116-122 (1996)
- 8) Jimbo T, Higa M, Minoura N, Tanioka A: *Macromolecules*, **31** 1277-1284 (1998)

- 9) Jimbo T, Tanioka A, Minoura N: *Langmuir*, **14** 7112-7118 (1998)
- 10) Jimbo T, Tanioka A, Minoura N: *Langmuir*, **15** 1829-1832 (1999)
- 11) Matsumoto H, Koyama Y, Tanioka A: *J. Colloid Interface Sci.*, **239** 467-474 (2001)
- 12) Matsumoto H, Koyama Y, Tanioka A: *Langmuir*, **17** 3375-3381 (2001)
- 13) Matsumoto H, Koyama Y, Tanioka A: *Colloids Surf. A*, **222** 165-173 (2003)
- 14) Matsumoto H, Koyama Y, Tanioka A: *Langmuir*, **18** 3698-3703 (2002)
- 15) Matsumoto H, Koyama Y, Tanioka A: *J. Colloid Interface Sci.*, **264** 82-88 (2003)
- 16) Harris JM: "Poly(ethylene glycol) chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications", Harris JM ed., pp. 1-14, Plenum Press, New York (1992)
- 17) Koyama Y, Umehara M, Mizuno A, Itaba M, Yasukouchi T, Natsume K, Suganaka A, Watanabe K: *Bioconjugate Chem.*, **7** 298-301 (1996)
- 18) Koyama Y, Ito T, Matsumoto H, Tanioka A, Okuda T, Aoyagi H, Niidome T: *J. Biomater. Sci. Polymer Ed.*, **14** 515-531 (2003)
- 19) Hunter RJ: "Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications", Academic Press, London (1981); Lyklema J: "Fundamentals of Interface and Colloid Science, Vol.2, Solid-Liquid Interfaces", Academic Press, London (1995)
- 20) 松本英俊: 膜, **26** 345-349 (2004)
- 21) 松本英俊, 谷岡明彦: 高分子加工, **51** 401-405 (2002)
- 22) Ohshima H: *J. Colloid Interface Sci.*, **164** 510-513 (1993)
- 23) 山形豊, 松本英俊: 高分子, **52** 829-832 (2003)
- 24) Uematsu I, Matsumoto H, Morota K, Minagawa M, Tanioka A, Yamagata Y, Inoue K: *J. Colloid Interface Sci.*, **269** 336-340 (2004)

(Received 6 June 2005;

Accepted 10 June 2005)

著者略歴

松本 英俊 (まつもと ひでとし) (顔写真は会報に掲載)
 1996年 東京工業大学大学院理工学研究科有機材料工学専攻修士課程修了
 1996年～1999年 株式会社トクヤマ化学技術研究所研究員
 2002年 東京工業大学大学院理工学研究科有機・高分子物質専攻博士課程修了 (博士 (工学))
 2002年 東京工業大学大学院理工学研究科有機・高分子物質専攻助手
 専 門 高分子界面物性, 高分子荷電膜, 電場を利用したナノ・マイクロファブリケーション