

# 学 位 論 文 の 要 旨

Preparation and characterization of the Protein A-immobilized PVDF and PES microporous membranes activated by the atmospheric pressure low temperature plasma

(大気圧低温プラズマにより活性化した PVDF および PES 細孔膜への Protein A 固定化と評価)

氏 名 明石尚久 印

In the first work, I have established a synthetic way to graft acrylic acid (AA) polymer on the surface of polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes activated with the atmospheric pressure low temperature plasma. As a first step, the surface of PVDF membrane was treated with argon plasma. On the plasma-treated PVDF membrane, it was revealed that degradation reactions such as polymer chain scission were proceeded. On the other hand, functional groups for example hydroperoxide and carboxy were formed on the polymer surface. As the important efforts, I elucidated the activation mechanism that the initiator of graft polymerization was mainly hydroperoxide, which decomposed into free radicals by thermal treatment, and polymerization reactions proceeded. The C1s high resolution spectrum of plasma-treated PVDF membrane was decomposed into five peaks at BEs of 286.4, 287.4, 288.5, 289.5 and 290.9 eV. Likewise, the O1s high resolution spectrum of the plasma-treated PVDF membrane was curve-fitted with three peaks. On the other hand, the C1s high resolution spectrum of the PVDF membrane grafted with PAA (PVDF-g-PAA membrane) was decomposed into characteristic three peaks attributable to AA graft polymerization. The 3-D scaffolds of membranes in this work are intended for biotechnology application in order to maintain the area capable of interacting with the objective, so it is important that plasma treatment and subsequent AA grafting reactions minimize the interference with their porosity. As the results of the SEM measurements, the porosity of the PVDF membrane scaffold with pore size of 0.45  $\mu\text{m}$  was preserved after the plasma treatment. The cross sectional view of the PVDF membrane grafted with AA was measured by SEM-EDX. These results estimated that the PAA was densely grafted onto the upper of the membrane and the inside was with comparative uniform. After EDC/Sulfo-NHS reaction step, Bovine serum albumin (BSA) as a protein was conjugated on the PVDF-g-PAA membrane surface. The presence of BSA immobilized on the membranes was measured by the high resolution XPS. On the PVDF-g-PAA membrane, atomic nitrogen percentage decreased as low as 0.1%. After covalently immobilizing BSA onto the PVDF-g-PAA membranes, atomic nitrogen percentage increased as high as 3.6%. Therefore, it was confirmed that BSA was successfully conjugated on the polymer-modified PVDF membranes. AFM operating in dynamic force mode

was performed to study the surface topography of untreated PVDF, plasma-treated PVDF and PVDF-g-PAA membrane. The Ra of argon plasma-treated PVDF membrane surface (46.6 nm) was a little decreased against that of untreated PVDF membrane surface (49.8 nm). The findings implied that the plasma condition for introducing functional groups was mild treatment against the membrane surface.

In the second work, I have established the procedures for preparing Protein A-immobilized PVDF and polyether sulfone (PES) membranes to capture human IgG antibody, and characterized these membranes. PES has also been widely available commercially, and has excellent mechanical strength and is a thermally stable polymer. However, PVDF and PES have the issue of being intrinsically and severely hydrophobic. It was highly plausible to minimize nonspecific adsorption by using the hydrophilic membranes. The C1s, O1s and S2p high resolution spectrum of the plasma-treated PES membrane was decomposed into three, four and six peaks, respectively. As the results of surface properties on the membranes activated by argon plasma, several functional groups such as hydroperoxide, sulfide and sulfo groups were confirmed. Furthermore, the peak area ratio of the  $\pi$ - $\pi^*$  shake-up was comparable before and after plasma treatment. It was also suggested that there was low damage and disruption to the benzene ring by treating with plasma under this condition. Based on these data, I elucidated the activation mechanism on polymeric substrates. The significant findings suggest that the phenyl radical and radicals originated from hydroperoxide groups by thermal treatment are one of the important initiators to induce graft polymerization with AA on the PES membranes. The SEM images were obtained that the samples of PVDF for pore sizes of 0.45  $\mu\text{m}$  and 5.0  $\mu\text{m}$ , and the PES membrane for a pore size of 0.45  $\mu\text{m}$ , respectively. The plasma-treated PVDF and PES membrane fibers for a pore size of 0.45  $\mu\text{m}$  had grown slightly thicker than those for each untreated membrane surface. The porosity of the PES membrane scaffold was also preserved after the plasma treatment. The PVDF/PES-g-PAA membranes with a pore size of 0.45  $\mu\text{m}$  were densely modified with PAA. The PVDF membrane with pore size of 5.0  $\mu\text{m}$  was definitely retained the macrovoid formation after the graft polymerization. These findings clearly indicate that it is effective to apply membranes with a pore size of 5.0  $\mu\text{m}$  to maintain the high porosity and accessibility as affinity membranes. Adsorption isotherms of the PVDF/PES membranes immobilized with Protein A were constructed to investigate the capacity as affinity membranes. Simultaneously, nonspecific adsorption tests were performed with the PVDF/PES-g-PAA membranes prior to immobilization with Protein A. The adsorption isotherms constructed with the PVDF/PES membranes immobilized with Protein A were fitted with the monolayer Langmuir model. On the other hand, as the result of the nonspecific protein adsorption test, the equilibrium capacities of human IgG adsorbed on the membranes of the PVDF membranes with pore sizes of 0.45 and 5.0  $\mu\text{m}$  and PES membranes with a pore size 0.45  $\mu\text{m}$  were indicated to have relatively low levels. Finally, Protein A was successfully immobilized on the

polymer-modified membranes. Adsorption capacities of the Protein A-immobilized membranes were determined and dependent on the pore size. Ligand density of the Protein A-immobilized PES membranes was approximately two times higher than that of the Protein A-immobilized PVDF membranes. The ligand density was determined using a BCA protein assay. One of the explanations is that the O/C atom ratio of the plasma-treated PES membrane was 0.66, which was 3.9 times higher than that of the plasma-treated PVDF membranes. Therefore, it was considered that the functional groups necessary for initiating graft polymerizations were generated more on the plasma-treated PES membranes relative to the PVDF membranes. In the results of the stability test, it was confirmed that the ligand densities were comparable, and Protein A was immobilized on the membrane surface rigidly. Taken together, I concluded that the atmospheric pressure low temperature plasma is an excellent tool for activating on the membranes to produce PVDF and PES-devices for biotechnological applications, and these polymers are candidates as affinity media for human IgG antibody separation.

(和訳)

最初の研究において、私は大気圧低温プラズマにより活性化したポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜表面へのアクリル酸重合の合成方法を構築した。最初の工程では、PVDF 膜表面にアルゴンプラズマを照射した。プラズマ照射膜上において、分子鎖切断のような劣化反応の進行を確認した。一方、ヒドロペルオキシドやカルボキシ基のような官能基が膜表面に生成された。重要な取り組みとして、グラフト重合の開始因子は主にヒドロペルオキシドであり、熱処理によりフリーラジカルに分解され、重合反応が進むという活性化機構を解明した。プラズマ照射膜の C1s 高分解能スペクトルにおいては、286.4eV、287.4eV、288.5eV、289.5eV 及び 290.9 eV の 5 つの帰属ピークに分解された。同様に、プラズマ照射膜の O1s 高分解能スペクトルでは、3 つの帰属ピークに分解された。一方、ポリアクリル酸がグラフト重合した PVDF 膜の C1s 高分解能スペクトルでは、アクリル酸に特徴的な 3 つの帰属ピークに分解された。膜の 3 次元構造を維持することは、目的物質との相互作用を維持する上で生物工学的応用のためにも意味がある。そのため、プラズマ照射や後のアクリル酸グラフト処理膜では、多孔性の阻害を最小限にすることは重要である。SEM 測定の結果、孔径  $0.45 \mu\text{m}$  の PVDF 膜構造の多孔性は、プラズマ照射後においても保持されていた。グラフト重合処理した PVDF 膜の断面図を SEM-EDX で測定した。その結果、ポリアクリル酸は照射面に高い密度でグラフトされており、膜内部は比較的均一に存在していることが示された。EDC/スルホ NHS 反応後、タンパク質としての血清アルブミン (BSA) はグラフト重合処理された PVDF 膜に固定化された。膜上に固定化された BSA は、高分解能 XPS を用いて測定した。グラフト処理した PVDF 膜において、窒素原子比率はわずか 0.1% に減少した。グラフト処理した PVDF 膜にの BSA 固定化後、窒素原子比率は 3.6% にも増加した。従って、BSA がポリマー修飾した PVDF 膜にうまく固定化されたことを確認した。ダイナミックフォースモードでの原子間力顕微鏡において、PVDF 未処理膜、プラズマ照射 PVDF 膜、グラフト処理 PVDF 膜の表面トポロジーの調査を行った。プラズマ照射 PVDF 膜の平均面粗さ (46.6 nm) は、PVDF 未照射膜の平均面粗さ (49.8 nm) に対してほとんど低下していなかった。この発見は、官能基を導入するためのプラズマ照射条件が、膜表面に対して優しい処理であることが示唆された。

第 2 の研究において、私はヒト IgG 抗体を捕捉するための Protein A 固定化 PVDF 及びポリエーテルスルホン (PES) 膜の調製方法を構築し、評価した。PES も広範囲において商業的に利用されており、優れた機械的強度を有し熱安定性の高いポリマーである。但し、PVDF 及び PES は本質的に高い疎水性を有するという課題がある。そこで、親水化処理膜を使うことによって、非特異的吸着を最小化することは非常に妥当な考えであった。プラズマ照射膜の C1s、O1s、S2p 高分解能スペクトルでは、それぞれ 3 つ、4 つ、6 つの帰属ピークに分解された。アルゴンプラズマで活性化した膜表面の特性を評価した結果、数種類の官能基、例えばヒドロペルオキシド、スルフィド基、スルホ基等を確認した。更に、 $\pi$ - $\pi^*$  シェークアップピークのピーク比率は、プラズマ処理前後で同等な値であった。これ

は、このプラズマ照射条件では PES に対しダメージが低く、PES を構成するベンゼン環への崩壊も低いことが示された。これらの根拠をもとに、ポリマー基質上の活性化機構を解明した。その重要な発見は、熱処理によってヒドロペルオキシドから生じるラジカルやフェニルラジカルが、PES 膜にアクリル酸グラフト重合を誘導する上で重要な開始因子のひとつであることを示した。孔径  $0.45 \mu\text{m}$  と  $5.0 \mu\text{m}$  の PVDF 膜と孔径  $0.45 \mu\text{m}$  の PES 膜サンプルについて、それぞれ SEM 測定した。孔径  $0.45 \mu\text{m}$  のプラズマ照射 PVDF 及び PES 膜のファイバーは、それぞれの未処理膜のファイバーと比較してやや厚い形状を示した。孔径  $0.45 \mu\text{m}$  の PES 膜構造の多孔性については、プラズマ照射後においても保持されていた。グラフト処理した孔径  $0.45 \mu\text{m}$  の PVDF 及び PES 膜は、ポリアクリル酸によって高密度に修飾された。孔径  $5.0 \mu\text{m}$  の PVDF 膜は、グラフト重合後においてもマクロポイド構造を確実に保持していた。これらの知見は、アフィニティ膜としての高い多孔性とアクセス性を維持する上で、孔径  $5.0 \mu\text{m}$  の膜を採用することは効果的であることを明確に示した。アフィニティ膜としての能力を調査するために、Protein A を固定化した PVDF 及び PES 膜の吸着等温線を作成した。同時に、非特異的吸着試験について Protein A 固定化前のグラフト重合処理した PVDF 及び PES 膜に対して実施した。Protein A を固定化した PVDF 及び PES 膜から得られた吸着等温線は、単分子層の Langmuir モデルにフィットしていた。一方、非特異的吸着試験の結果、孔径  $0.45 \mu\text{m}$  と  $5.0 \mu\text{m}$  の PVDF 膜と孔径  $0.45 \mu\text{m}$  の PES 膜サンプルにおけるヒト IgG の平衡吸着量は相対的に低い値を示した。最終的に、Protein A はポリマー修飾膜に首尾よく固定化された。Protein A 固定化膜の吸着能力を決定し、その吸着能力は膜孔径に依存していた。Protein A 固定化 PES 膜のリガンド密度は、Protein A 固定化 PVDF 膜のリガンド密度より約 2 倍高い値であった。リガンド濃度は BCA アッセイを用いて決定した。Protein A 固定化 PES 膜のリガンド密度が高い説明として、プラズマ照射 PES 膜の O/C 比率が 0.66 であり、プラズマ照射 PVDF 膜の O/C 比率より 3.9 倍高い値を示していた。従って、グラフト開始に必要な官能基が、プラズマ照射 PVDF 膜に比べてプラズマ照射 PES 膜のほうがより多く形成されていることが考えられた。安定性試験の結果、リガンド密度は同等であり、Protein A は膜表面にしっかりと固定化されていることが確認された。まとめると、大気圧低温プラズマは、生物工学的応用のための PVDF 及び PES 装置を作製するため、膜活性化に対する優れた手段であり、そして PVDF 及び PES はヒト IgG 抗体分離のためのアフィニティ媒体候補であると結論づけた。