

GODの固定化グラフト化ポリテトラフルオロエチレン膜を用いた
インスリンの放出制御とカタラーゼによる促進

松田 清美・柏田 歩・山田 和典・平田 光男 (応用分子化学科)

【緒言】

薬物を使用した化学療法は古来からの草木や動物の成分の利用をはじめとして、19世紀の化学工業の発展による化学新薬の開発にあわせて進歩してきた。薬物の薬理効果を追及する合成化学技術ばかりでなく、薬物をいかに投与するかの研究も重要である。そのような製剤学の中で、より安全に、効果的に薬物化学療法を行う手段として“必要最小限の薬物を、必要な場所に、必要な時に供給する”という概念が生まれた。これがドラッグデリバリーシステム(薬物送達システム, DDS)である。DDSは薬物の血中濃度を長期間一定に保つことを目的とした薬物徐放化と、生体リズムにあわせて血中濃度を調節する制御放出、および薬物を患部に選択的に輸送するターゲティングに分類することができる¹⁾。より理想的な薬物療法を目的とする場合にはDDS, コントロールドリリースシステムにおいて、まさに薬物の動きを時間的, 空間的に制御することにより達成される。とりわけ時間的制御には, 様々な刺激応答材料などが利用され, 自己制御型のコントロールドリリースシステムデバイスが実現されつつある。

生体組織の機能を代替する人工臓器の開発は1950年代より本格的に始まり, 失われた生体の機能を代替する数々の人工臓器が開発されているが, 現在使用されている人工臓器の素材は, 工業用汎用性材料を医療用に加工したものに過ぎず, 機械的特性は優れているものの, 生体にとっては異物となる。そのため, 生体に優しくかつ安全性の高い人工臓器の開発が強く望まれている。近年, 膜自体が置かれた環境変化を敏感に感知して膜の透過特性を変化させる, すなわちセンサー機能とバルブ機能を有する開発が行われるようになってきている。

酵素はそれらの機能を触媒する作用を

持っており, 常温, 常圧での穏和な条件下で優れた触媒活性を示し, 反応を高効率に触媒し, さらに基質, 立体, 反応などの作用特異性が高いのが特徴である。しかし, 熱や強酸, 強塩基, 有機溶媒などに不安定であり, 酵素反応を行うのに適した環境においても比較的早く失活してしまうという欠点がある。さらに, 反応溶液中から酵素を変性させずに回収し, これを再利用することは技術的に困難であり, 一反応ごとに酵素を捨てることになるので非常に不経済な使用方法である。この酵素が特異的な触媒活性を保持し, 連続的に酵素反応を行うことができ, 再利用できる状態にあるものが固定化酵素である。

本研究では, 人工血管などの医用材料に多く用いられているポリ(テトラフルオロエチレン)(PTFE)を延伸して得られる多孔質膜(ePTFE フィルム)を酸素プラズマ処理し, 光グラフト重合によってアクリル酸とアクリルアミドを共重合させてフィルムの片側表面に導入した。さらにグルコースオキシダーゼを固定化し, グルコースを感知する刺激応答性膜を調製した。GODと反応したグルコースはグルコン酸となり, フィルム周辺のpHを低下させ, それにともなってポリ(アクリル酸-アクリルアミド)グラフト鎖が収縮するのでインスリンを透過させることができる(Fig. 1)。

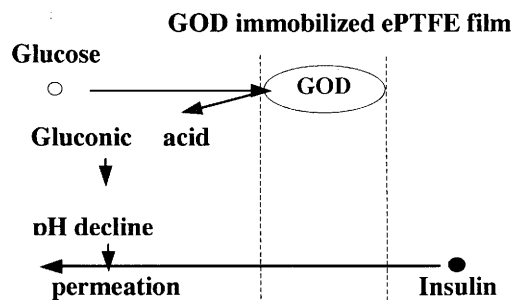


Fig. 1 Scheme of insulin permeation by enzymatic reaction

そこで、糖尿病治療への DDS の応用を目的として、固定化 GOD のグルコースに反応した pH 変化を外部環境とするインスリンの透過性、固定化 GOD の酵素活性や再利用性などについて検討した。また、グルコースと GOD の反応では人体に有害である過酸化水素が発生するため、これを無毒化する必要がある、カタラーゼを用いて過酸化水素を分解してグルコースと固定化 GOD との反応の促進に対する可能性についても検討した。

【実験】

1. ePTFE-g-P(AAc-co-AAm)フィルムの調製

アセトン、メタノールで洗浄した ePTFE フィルム(直径 47mm, 孔径 0.5 μ m, 膜厚 65 μ m, 空隙率 78%)の片面に 2 分間酸素プラズマ処理を施し、酸素雰囲気下に放置することでフィルム表面に酸素含有基を形成させた。その後、増感剤であるベンゾフェノンを塗布したフィルムをアクリル酸(AAc)とアクリルアミド(AAm)を混合したモノマー水溶液中に浸漬させ、反応温度 60 $^{\circ}$ C, 反応時間 30 分から 120 分の間で高圧水銀灯からの紫外線照射によって光グラフト重合を行った。反応後のフィルムは水道水および純水で洗浄し、乾燥させた後に重量を測定してグラフト量を算出した。

2. GOD の固定化

NHS(*N*-hydroxysuccinimide)を溶解した pH 6.30 のリン酸緩衝溶液に上記で調製したフィルムを浸漬させ、2 時間放置してグラフト鎖を活性化させた後、GOD と縮合剤である CMC(1-cyclohexyl-3-(2-morpholino ethyl) carbodiimide metho-*p*-toluene sulfonate)を溶解したリン酸緩衝溶液内で固定化を行った。まず固定化時間を決定するために、酵素溶液を固定化前と開始してから 1 時間ごとに採取し、それぞれの TOC(全有機体炭素)量を測定して GOD 濃度に換算し、GOD 固定化量を算出した。固定化時間決定後は固定化前と固定化を終了した酵素溶液の TOC 測定を同様に行い、GOD 固定化量を求めた。

3. インスリン透過実験

pH 7.80 に調整したリン酸緩衝溶液に 24 時間浸漬させた GOD 固定化フィルムを透過装置に固定し、供給側に 10 μ mol のインスリンを含む pH 7.80 のリン酸緩衝溶液を、透過側には供給側と同じ pH のリン酸緩衝液を入れて 30 $^{\circ}$ C の恒温槽内で実験を開始した。30 分ごとに透過側の溶液の吸光度を測定してインスリンの透過量を求めた。また、150 分後にはグルコースを、300 分後にはカタラーゼを透過側に加えて引き続き実験を行った。

4. 固定化 GOD の酵素活性測定

グルコースを溶解した pH 7.80 のリン酸緩衝溶液に GOD 固定化フィルムを入れ、この溶液をグルコース測定キット(ペーリンガー・マンハイム社製)で反応させた際に生成される NADPH 量を吸光度から定量し、さらにグルコース濃度を算出した。また、60 分後にカタラーゼを加え実験を行った。

【結果および考察】

1. ePTFE-g-P(AAc-co-AAm)フィルムの調製

ePTFE-g-P(AAc-co-AAm)フィルムへの光照射時間に対する生成されたグラフト量の関係を Fig. 2 に示す。光照射時間 90 分までは大幅にグラフト量が増加したが、それ以降はあまり大きな増加がみられなかった。紫外線照射によって酸素含有基とモノマーに重合開始点であるラジカルが発生して重合が開始されるので、初めのうちは次第に重合が進行し、照射時間とグラフト量は比例関係になるが、約 90 分で酸素含有基あるいはモノマーにラジカルが発生しなくなるために重合が進まなくなり、グラフト量の増加があまりみられなくなったと考えられる。

2. GOD の固定化

調製したグラフト化 ePTFE フィルムに GOD を固定化させ、酵素溶液の TOC 値から GOD 濃度を換算して固定化量を算出した。はじめに、固定化時間を決定するために固定化を 6 時間行い、1 時間ごとに算出した GOD 固定化量を Fig. 3 に示す。

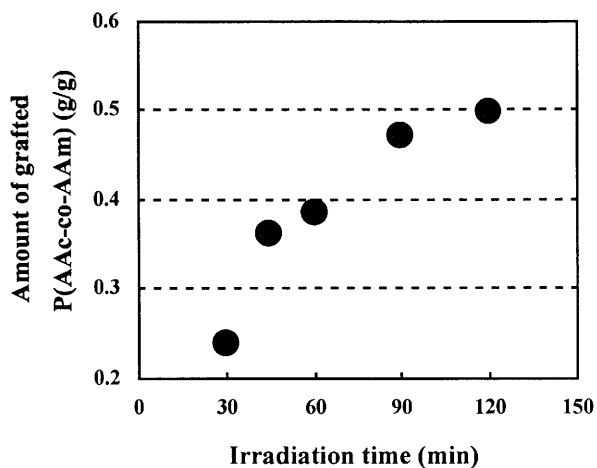


Fig. 2 Changes in the amount of P(AAc-co-AAm) grafted onto ePTFE films with irradiation time

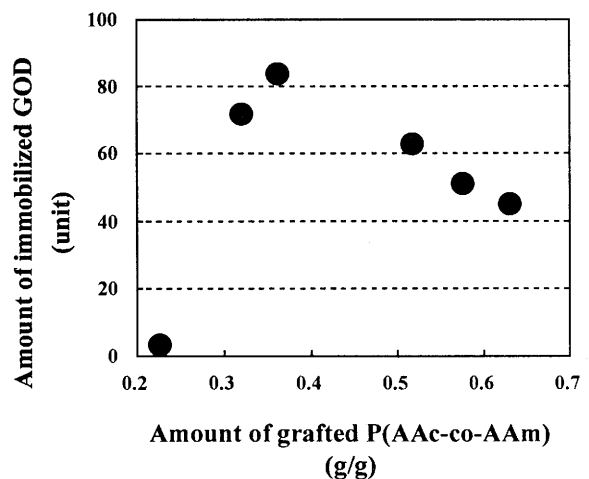


Fig. 4 Amount of immobilized GOD as a function of the amount of grafted P(AAc-co-AAm)

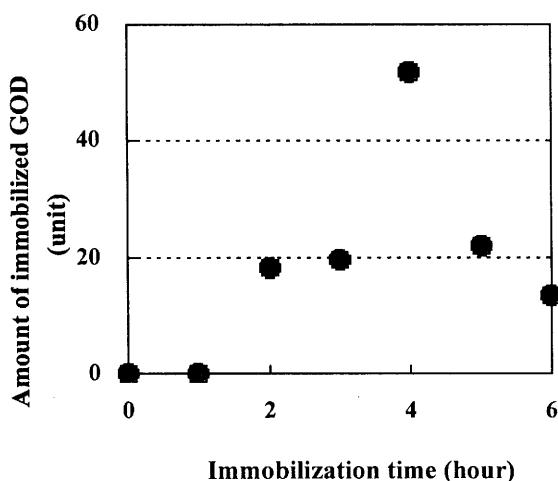


Fig. 3 Amount of immobilized GOD with the immobilization time

Fig. 3 の結果から、以後は最も多い固定化量が得られた 4 時間で固定化を行うこととした。

次に、固定化を 4 時間行ったときのグラフト量と得られた固定化量の関係を Fig. 4 に示す。グラフト量と GOD 固定化量の関係にはバラツキがあるがグラフト量の増加に伴い固定化量も増加するが、固定化量が大きすぎると固定化されにくくなる傾向がみられた。

3. インスリンの透過

GOD を固定化したフィルムを用いてインスリンの透過実験を行い、グルコースおよびカタラーゼの添加によるインスリンの透過性を検討した。Fig. 5 に示すように、グラフト膜を pH7.80 緩衝溶液中で膨潤状態に保つとインスリンの透過は抑えられた。150 分後にグルコースを添加するとインスリンの透過が始まった。次第に収縮するのでインスリンの透過が始まったと考えられる。このことは、添加されたグルコースが GOD により酸化されグルコン酸が生じたため膜近傍の pH 低下が起こり、カルボキシル基がプロトン化してグラフト鎖間の静電的反発がなくなり孔が開いたためであると考えられる。さらに 150 分経過してからカタラーゼを添加した結果、さらにインスリン透過量を増加させることができた。これは、カタラーゼが固定化 GOD とグルコースとの反応でグルコン酸とともに生成する過酸化水素を分解できるため、さらにグルコースの酸化を促進させることができたためであると考えられる。過酸化水素は人体に対して毒性があるので、カタラーゼによる消費はこの面でも好都合であると思われる。

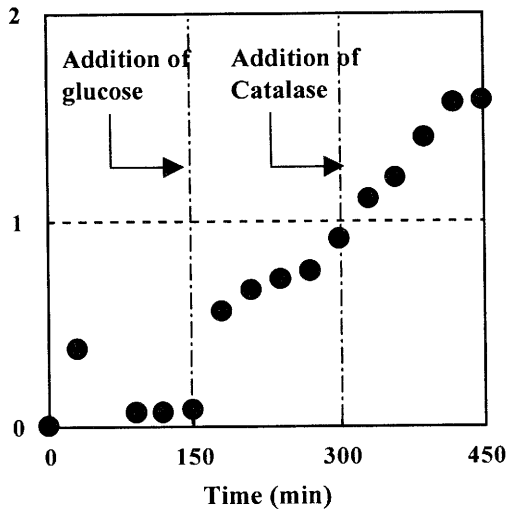


Fig. 5 Change in the insulin permeabilities through an ePTFE-g-P(AAc-co-AAm)-i-GOD film

4. 固定化 GOD の活性

固定化した GOD とグルコースを反応させ、グルコース濃度の減少量から固定化 GOD の活性を検討した。グルコース濃度の経時的な変化を Fig. 6 に示す。時間の経過に伴ってグルコース濃度が低下したことから、固定化した GOD が活性を持っていること、実際に酵素反応によってグルコースが消費されていることが確認できた。また、固定化 1 カ月後にも酵素活性を測定したところ、同様な結果が得られた。このことから、固定化した GOD は再利用性が可能であることが明らかとなった。固定化 GOD の活性と固定化していない GOD (native GOD) の活性とを比較すると、固定化 GOD の活性は native の 25% ほどに低下した。これは酵素と担体を共有結合で固定化したために、酵素タンパク質の活性中心の一部破壊や高次構造の変化が起こりやすいことや、担体の立体的障害によって、基質分子の接近が妨害されるためと考えられる。

5. 固定化 GOD のカタラーゼによる活性促進

Fig. 7 にカタラーゼの添加量の GOD の酵素活性促進に及ぼす影響を検討した結果を示す。カタラーゼ添加量を 5mg, 10mg

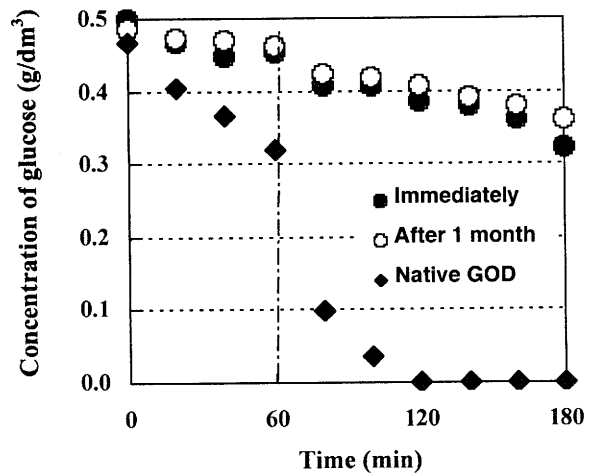


Fig. 6 Determination of enzymatic activity of immobilized GOD

および 15mg と変化させたところ、グルコースの酸化への影響は 10mg と 15mg では変化がなかった。従って、この 71.4 units の GOD の酵素反応にはカタラーゼは 10mg あれば十分であると考えられる。

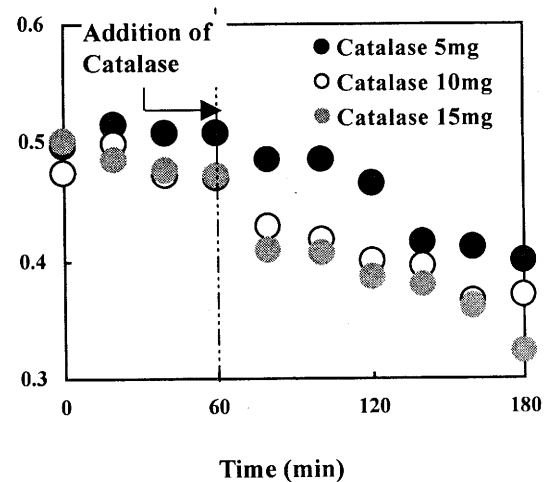


Fig. 7 Dependence on concentration of Catalase. Decrease in concentration of Glucose was plotted as a function of enzymatic reaction time

【結論】

以上の結果から、ePTFE-g-P(AAc-co-AAm) に GOD を固定化した膜は、グルコースに反応してインスリンを透過でき、さらにカタラーゼを添加すると透過量を増加できる。また、酵素活性は少なくとも 1 ヶ月間保持できる sustainable 膜となる。