

# 『酵素を固定化したポリアクリル酸グラフト化 ePTFE 膜の複合化による DDS の構築』

日大生産工 ○松田清美・柏田 歩・山田和典・平田光男

## 1. 緒論

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<sup>1)</sup>。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、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。特に時間的制御には、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<sup>2)</sup>。

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。

一方、水溶性高分子(中性または電解質)をグラフト化した延伸ポリテトラフルオロエチレン(ePTFE)膜は高強度・高含水性であり、これらを酵素固定化基盤として活用し、酵素が有する基質特異性、穏和な反応条件といった特徴を生体外において高効率で反復して行うことは本テーマとして重要であると考えられる。グラフト鎖から酵素の遊離・脱着を抑えるために、不動化法として共有結合法を適用するが、これはグラフト鎖の高い易動性で固定化時の酵素の変性を低減できるという固定化基質としての優れた特徴を利用しようとしたものである。固定化酵素は反復利用が可能となり、酵

素の耐酸性、耐塩基性、熱安定性なども向上するので、バイオリクターの構築、特定物質との選択的反応と物質除去(例えば水質浄化)、固定化酵素による低コストの有機合成方法、基質特異性を利用した DDS への展開も期待される。

固定化 GOD を用いたグルコース感応型のインスリン透過に関しては、カタラーゼがインスリンの透過を促進することが確認されたため、さらにこのカタラーゼの再利用を考慮して、GOD と同様に固定化を試みた結果、十分可能となった。そこで、生体内での高血糖値を感知してインスリンの放出を繰り返し行うことができる装置の設計を試みた。平行して、透過膜としてゲル膜を用いることでゲルの網目の調節により酵素を固定化できること、共有結合で固定化した酵素に比べ高い活性を維持できることの利点を活かした複合膜の調製を検討する。さらに、2種類の酵素を1枚のグラフト膜に同時に固定化して複合化膜と同様の薬物透過促進が行われるかについても検討する。

## 2. 実験

### 2.1 アクリル酸グラフト化 ePTFE 膜の調製

ePTFE 膜(ADVANTEC 社製, 直径 47mm, 孔径 0.5 $\mu$ m, 空隙率 78%, 膜厚 65 $\mu$ m)を前報<sup>3)</sup>同様に洗浄後、常温で減圧乾燥した。乾燥重量を測定後、島津製作所製 LCVD-20 型プラズマ装置を使用して前報同様に酸素プラズマ処理を行った。プラズマ処理後、ePTFE 膜を常温・常圧の酸素雰囲気下に 30 分間放置して、酸素含有基を形成させた。光グラフト重合は、リコー科学産業製リコーロータリー光化学反応装置 RH400-10W を用いた。反応条件は前報同様である。重合後、反応管より ePTFE-g-PAAC 膜を取り出し、水道水および純水で手洗した。さらにホモポリマーを除去するため、純水中に 24 時間浸漬した後さらに純水で洗浄した後、減圧乾燥した。二重グラフトフィルムは、乾燥後再びベンゾフェノン溶液に浸漬した後、同条件でグラフト重合を行った。グラフト量はグラフト重合前後の重量変化から求めた。

## 2.2 ePTFE-g-PAAC膜への酵素GODおよびCatalaseの固定化<sup>4),5)</sup>

### 2.2.1 ePTFE-g-PAAC膜へのGODの固定化

調製した ePTFE-g-PAAC 膜をリン酸緩衝溶液で十分膨潤させた後、*N*-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)によりグラフト鎖を活性化させた後、GODと1-シクロヘキシル-3-2-(モルフオリノエチル)カルボジイミド-メソ-*p*-トルエンスルホネート(CMC; 縮合剤)を反応させた。固定化量は、GODの最大吸収波長である277nmにおけるUV吸光度測定により決定した。

### 2.2.2 ePTFE-g-PAAC膜へのCatalaseの固定化

2.2.1のGODと同様にePTFE-g-PAAC膜をNHSで活性化した後、CatalaseとCMCをpH 6.30リン酸緩衝溶液中で反応させた。

### 2.2.3 ePTFE-g-PAAC膜へのGODおよびCatalaseの同時固定化

ePTFE-g-PAAC膜をNHSで活性化させた後、GODおよびCatalaseをCMCとpH 6.30リン酸緩衝溶液中で反応させた。

## 2.3 PAACゲル膜の作成とCatalaseの包括

AAcモノマー、架橋剤メチレンビスアクリルアミドおよび促進剤テトラメチルエチレンジアミンを純水に溶かし、冷却しておく。一方、開始剤過硫酸アンモニウムとCatalaseを純水に溶解し、モノマー溶液と混合し、直ちに冷却しておいたガラス板の間に流し込み、3°Cから5°Cで低温重合により調製した。

## 2.4 酵素活性測定

### 2.4.1 GOD

反応溶液中のグルコース(基質)濃度を測定し、減少したグルコース量から活性を評価した。測定には、ベーリンガー・マンハイム社製F-キットグルコースを用い、340nmの吸光度変化から評価した。

### 2.4.2 Catalase

溶液中の残存過酸化水素を、4-アミノアンチピリン、フェノール、ペルオキシダーゼにより

発色させ、505nmの吸光度測定により評価した。

## 2.5 Glucose添加によるInsulinの透過実験

### 2.5.1 ePTFE-g-PAAC-i-GOD膜とePTFE-g-PAAC-i-Catalase膜を用いたInsulinの透過

Fig. 1に示す透過装置の中央にpH 7.80リン酸緩衝溶液中で24時間膨潤させたePTFE-g-

PAAC-i-GOD膜およびePTFE-g-PAAC-i-Catalase膜をシリコンゴムスペーサーを用いて固定した。供給側セルにはInsulinを含むpH 7.80リン酸緩衝溶液を入れ、透過側のセルには緩衝溶液だけを入れ、30°Cの恒温槽中で実験を開始した。30分ごとに透過側のセル中の溶液を採取して、Insulinの最大吸収波長である276.5nmで吸光度を測定し、透過量を求めた。Insulinの透過状態を150分間観察後、グルコースを2枚の膜の間のセルに加え、引き続き吸光度の測定を30分ごとに行った。

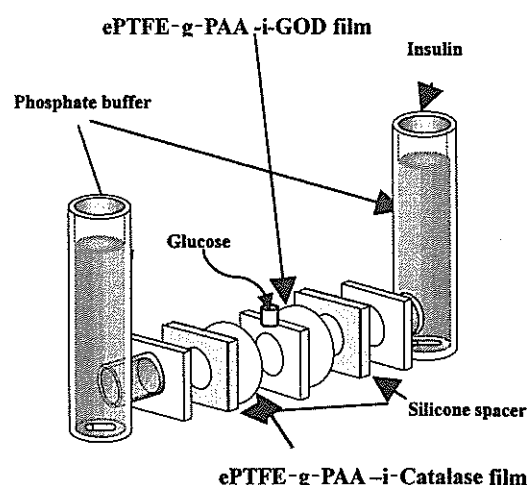


Fig. 1 A new apparatus for Insulin permeation experiments

### 2.5.2 ePTFE-g-PAAC-i-GOD膜とCatalase包括PAACゲル膜を用いたInsulinの透過

2.5.1のePTFE-g-PAAC-i-Catalase膜の代わりにCatalase包括PAACゲル膜を用いて、中間のセルを除いて従来通りの方法でグルコース添加によるInsulinの透過実験を行った。

二重グラフト膜への同時固定化により調製したePTFE-g-PAAC-i-GOD&Catalase膜を用いたInsulin透過実験も2つのセルの中間にシリコンゴムで膜を固定して行った。

## 3. 結果および考察

### 3.1 ePTFE膜のPAACグラフト量

調製したePTFE-g-PAAC膜のPAACグラフト量を、Fig. 2に示す。一重グラフト膜に比べ、二重グラフト膜のグラフト量は3倍近くなり、フィルムをよりよく塞ぐことができると考えられる。

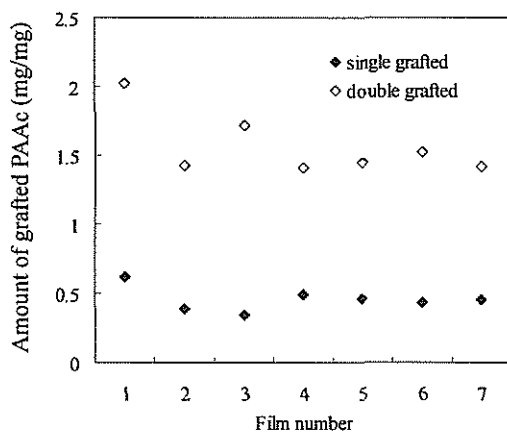


Fig. 2 Amount of grafted PAAc onto ePTFE film

### 3.2 ePTFE-g-PAAc 膜固定化酵素の活性

#### 3.2.1 Catalaseの酵素活性

ePTFE-g-PAAc-i-Catalase膜のCatalaseの酵素活性を吸光度測定から求めた。反応時間の経過に伴い、酵素Catalaseの基質である過酸化水素の減少が確認された。このことから、固定化されたCatalaseが活性を持っていることが確認された。

#### 3.2.2 GODの酵素活性

ePTFE-g-PAAc-i-GOD膜のGOD場合も同様に時間の経過とともに基質グルコースの濃度の減少により、活性の保持を確認した。しかし、GODのグルコース消費量は小さくCatalaseの促進作用が強く求められる状態であった。

### 3.3 ePTFE-g-PAAc-i-GOD膜およびePTFE-g-PAAc-i-Catalase膜を用いたインスリンの透過

Fig. 1に示した装置を用い、2.5に従い実験した結果をFig. 3に示す。PAAcグラフト量が0.5g/gと小さかったため、グルコース添加前にインスリンが連続的に放出される結果となった。150分経過後グルコースを添加した時点でインスリンが減少した現象は、グルコース溶液の注入により透過側の溶液が増加したためではないかと考えられる。その後インスリンの増加が観察されたが、240分後には減少に転じた。このことはインスリンの透過セル内の濃度の減少を意味している。その原因は、膜のPAAcグラフト鎖が収縮することによりグルコースが透過側に移動し相対的にインスリンの濃度の低下になったものと解釈される。

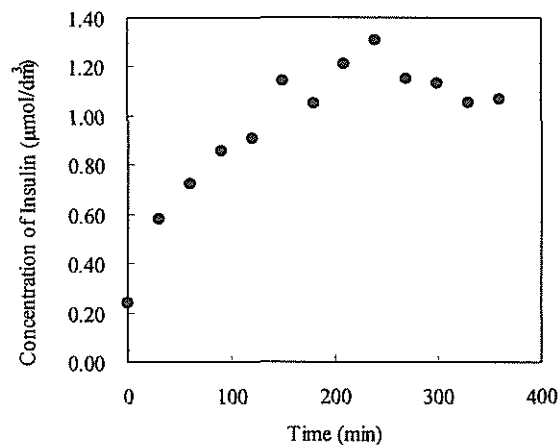


Fig. 3 Changes in the Insulin permeabilities through ePTFE-g-PAAc-i-GOD and ePTFE-g-PAAc-i-Catalase films

### 3.4 ePTFE-g-PAAc-i-GOD膜およびCatalase包括PAAcゲル膜を用いたインスリンの透過

従来通りの装置でゲル膜を用いて、グルコースの添加によるインスリンの透過促進実験を行った結果をFig. 4に示す。

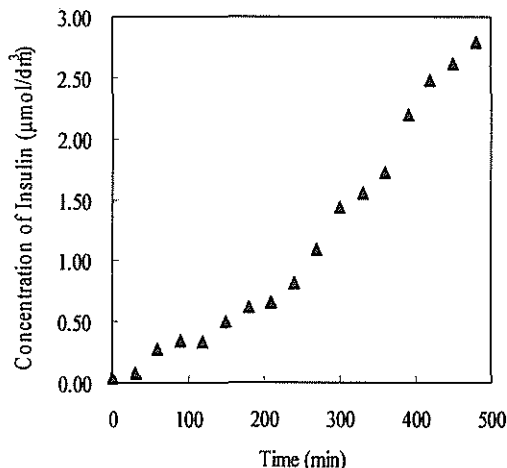


Fig. 4 Changes in the Insulin permeabilities through ePTFE-g-PAAc-i-GOD film and Catalase trapped PAAc gel film

初期にインスリンの少量の漏れは観察されたが、150分後にグルコースを添加した後、徐々にインスリンの透過が観察され、240分以降には透過が促進されていることが確認された。従って、GODとCatalaseを組み合わせることでインスリンの透過を促進できることは明らかとなった。

### 3.5 ePTFE-g-PAAc-i-GOD&Catalase 膜を用いたインスリンの透過

一重および二重アクリル酸グラフト化膜へ GOD および Catalase 同時固定化膜を用いて行ったインスリンの透過実験の結果を Fig. 5 に示す。実験開始から 120 分までインスリンの透過は抑制されている。120 分後にグルコースを添加することにより、徐々にインスリンの透過が始まった。これは、添加されたグルコースが GOD の基質であるため、酵素反応が起こり、グルコン酸が生成したために膜の周辺の pH が低下した結果、膜の孔を塞いでいたアクリルグラフト鎖が収縮をし、孔が開いたものと解釈される。また、一重グラフト膜より二重グラフト膜の方がインスリン透過量が大きくなった。この原因としてはグラフト量の大きい膜の方が酵素の固定化量が多い結果ではないかと考えられる。Catalase による GOD の酵素反応の促進効果は、一重グラフト膜において、反応開始後 300 分以降の時点で顕著に現れている。

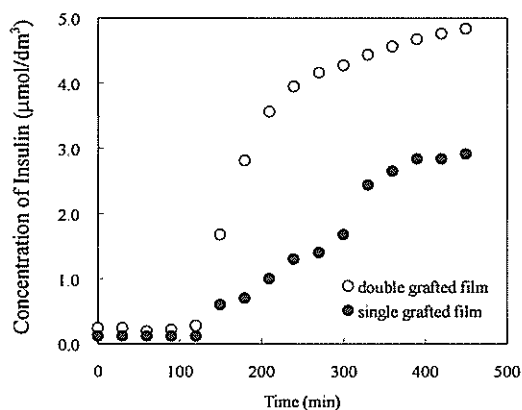


Fig. 5 Changes in the Insulin permeabilities through ePTFE-g-PAAc-i-GOD & Catalase film

### 4. 結論

糖尿病対策として、その治療薬であるインスリンをグルコースの増加を検知して提供でき、グルコース値が正常に戻ればその提供を中止できるシステムの構築を目指し、インスリンを補充できる新装置の有用性を検討するとともに、GOD と Catalase を同一膜に固定化し、グルコースセンサーのさらなる効率化を図った結果、

- 1) グラフト重合を 2 回行うことにより、ePTFE 膜の孔を十分に塞ぐことができた。
- 2) GOD 固定化膜と Catalase 包括ゲルの複合化は、インスリンの透過にゆうこうであった。
- 3) 二重グラフト ePTFE 膜に GOD と Catalase を同時に固定化した膜は、グルコースに敏感に応答してインスリンの透過ができた。

さらに、敏感な応答性を得るため、基質膜の孔の形状を延伸した孔ではなく、膜を貫通する孔をもつものに変えることを検討する。現在、入手している膜はポリカーボネート製で強度に問題があるが、外的環境変化への応答が早いという報告<sup>9)</sup>があり、本研究への適用は大いに期待できるものと考えている。

### 【参考文献】

- 1) Kai Zhang, Xiao Yu Wu, *J. Controlled Release*, **80** (2002), 169
- 2) S. Sershen, J. West, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **54** (2002), 1226
- 3) Lei Ying, E. T. Kang, K. G. Neoh, *J. Membrane Sci.*, **208** (2002), 361
- 4) K. Podual, F. J. Doyle III, N. A. Peppas, *J. Controlled Release*, **67** (2000), 9
- 5) 松田清美・柏田 歩・山田和典・平田光男, 日本大学生産工学部ハイテク・リサーチ・センター平成 17 年度研究報告書(2005), 13-16
- 6) H. Ohashi, N. Miyaoi, and T. Yamaguchi, *J. Photopolym. Sci. Tech.*, **19** (2006), 251