

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固定化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】

ドラッグデリバリーシステム(薬物送達システム, 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ッ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)を高分子基質とし, 酸素プラズマ前処理により表面を活性化し, モノマー水溶液中で光グラフト重合を行うことにより, アクリル酸(AAc)をフィルムの片側表面に導入している。さらにグルコースオキシダーゼ(GOD)を固定化し, グルコースを感知し, インスリンを供給できる刺激応答性膜を調製した²⁾。前報³⁾で酵素固定化量を増加するためにグラフト鎖を AAc とアクリルアミドの共重合により構成した試みは成果が得られず, 生体適合性を優先するためグラフト鎖へのアクリルアミドの共重合化はとりやめた。酵素 GOD はグルコースを酸化してグルコン酸を生成するため, フィルム周辺の pH を低下させ, それに伴ってポリアクリル酸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。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(H_2O_2)が発生するため, これを無毒化する必要もあると考えられる⁴⁾ので, 酵素カタラーゼを用いて過酸化水素を分解することは意義があるものと考えられる。さらに, グルコン酸とともに生成する H_2O_2 をカタラーゼが消費することにより, グルコースと固定化 GOD との反応を促進できることが確認された。しかし, このカタラーゼが使い捨てになることに対し, 再利用をすることを目的として, GOD と同様にグラフト化 PTFE 膜への固定化と新しくゲル膜への包括固定化を行うことを検討した。

【実験】

1. ePTFE-g-PAAc フィルムの調製

前報と同様に酸素プラズマ処理をした ePTFE 膜にベンゾフェノン塗布し、AAc モノマー水溶液中で、反応温度 60℃、反応時間 30 分から 150 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、重量を測定してグラフト量を算出した。

2. GOD のグラフト化 PTFE 膜への固定化

NHS(*N*-hydroxysuccinimide) 0.5012g を pH 6.30 のリン酸緩衝溶液 200cm³ に溶解し、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緩衝溶液で洗浄した後、GOD 2000unit と縮合剤である CMC(1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl) carbodiimide metho-*p*-toluene sulfonate) 0.2512g を溶解したリン酸緩衝溶液 100cm³ 内に 4 時間浸漬して固定化を行った。

固定化量は、TOC(全有機体炭素)量を用いた検量線から算出した。

3. カタラーゼのグラフト化 PTFE 膜への固定化

カタラーゼのグラフト化 PTFE 膜への固定化も 2. と同様に行った。使用したカタラーゼ量は 5mg である。固定化量の算出方法も 2. と同様に TOC 測定を用いた。

4. カタラーゼの PAAc ゲル膜への包括固定化

カタラーゼを包括するゲルを PAAc ゲルとした。AA モノマー 2.00g と架橋剤 Methylenebisacrylamide (MBAAm) 0.08g (または 0.12, 0.16 g)、促進剤 Tetramethylethylenediamine (TMEDA) を純水 5cm³ に溶解する。また、開始剤 Ammonium peroxodisulfate (APS) 0.02g、およびカタラーゼ 20mg を純水 5cm³ に溶解し、両者を混合後、直ちに冷却しておいた 1mm のスペーサーを挟んだ 2 枚のガラス板の間に流し込み、冷蔵庫内で約 12 時間かけてゲル化させた。

5. 固定化 GOD の酵素活性測定

測定方法については、前報³⁾に記す。

6. 固定化カタラーゼの酵素活性測定

カタラーゼの酵素活性は、4-アミノアンチピリン、フェノール、ペルオキシダーゼを pH 7.80 のリン酸緩衝溶液で 200cm³ とした溶液 (溶液 A) と H₂O₂ を精秤しリン酸緩衝溶液で 200cm³ とした溶液 (溶液 B) を用い、酵素反応により生成する赤色色素を吸光度測定して評価する。溶液 B にカタラーゼ 20.04mg を加え、5 分間隔で溶液 A 1cm³ と溶液 B 2cm³ を混合し、5 分間経過した後、溶液中の残存する H₂O₂ 量に対応する赤色色素量を 505 nm における吸光度から決定した。これを native カタラーゼの酵素活性とした。固定化カタラーゼの酵素活性は、溶液 B に固定化膜を浸漬して上記と同様に 5 分ごとに吸光度を測定して決定した。

7. インスリンの透過制御

pH 7.80 に調整したリン酸緩衝溶液中に 24 時間浸漬させた GOD 固定化フィルムおよびカタラーゼ固定化フィルムを透過装置に固定し、供給側に 10μmol 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℃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 276.5 nm で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供給側に加えて引き続き 30 分ごとに吸光度測定を行った。

【結果および考察】

1. ePTFE-g-PAAc フィルムの調製

ePTFE-g-PAAc フィルムへの光照射時間に対する生成された AAc グラフト量の関係を Fig. 1 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得られなかったと考えられる。

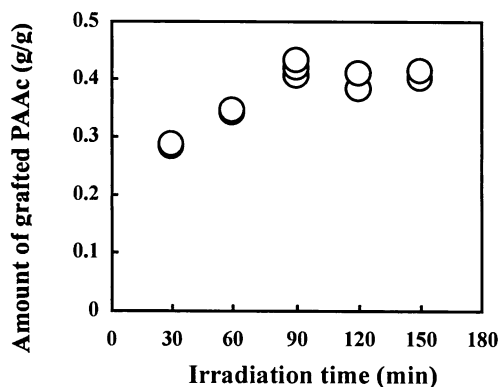


Fig. 1 Changes in the amount of PAAc grafted onto ePTFE films with irradiation time

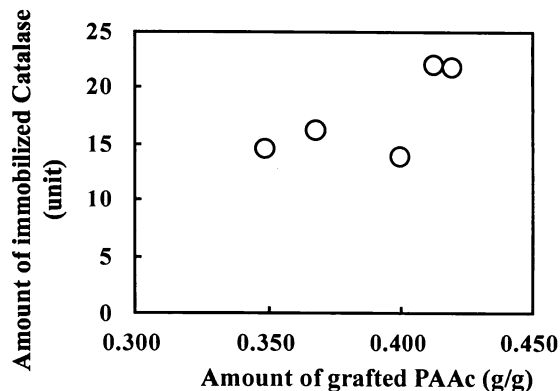


Fig. 3 Amount of immobilized Catalase as a function of the amount of grafted PAAc

2. GOD およびカタラーゼの固定化

調製した ePTFE-g-PAAc フィルムに GOD あるいはカタラーゼの固定化を 4 時間行ったときの AAc グラフト量と GOD 固定化量との関係を Fig. 2 に、カタラーゼの固定化量との関係を Fig. 3 に示す。グラフト量と GOD 固定化量の間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。グラフト量とカタラーゼ固定化量の間もグラフト量の増加に伴い、固定化量も増加した。

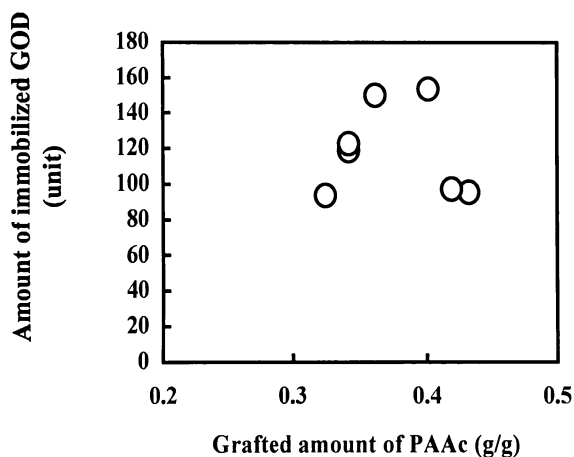


Fig. 2 Amount of immobilized GOD as a function of the amount of grafted PAAc

3. 固定化カタラーゼの酵素活性

ePTFE-g-PAAc フィルムに共有結合法で固定化したカタラーゼを基質 H_2O_2 と反応させ、 H_2O_2 濃度の減少に伴う赤色色素の吸光度の減少から固定化カタラーゼの酵素活性を検討した。 H_2O_2 濃度の経時的な変化を Fig. 4 に示す。時間の経過に伴って H_2O_2 濃度が低下したことから、固定化したカタラーゼが活性を持っているため、基質の H_2O_2 が消費されていることが確認できた。また、固定化 10 日後にも酵素活性を測定したところ、ほぼ同様な結果が得られた。このことから、固定化したカタラーゼは再利用が可能であることが明らかとなった。

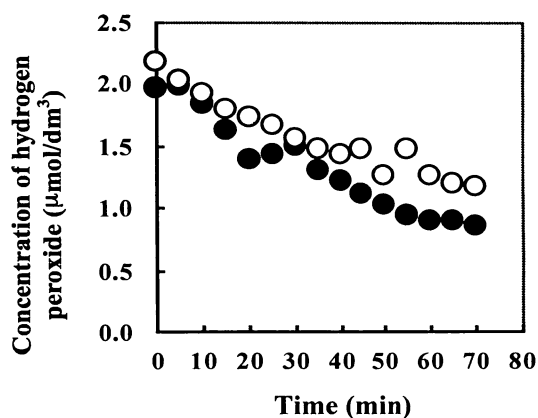


Fig. 4 Enzymatic activity (first; shaded, second; open) of immobilized GOD onto ePTFE-PAAc

また、架橋剤量の異なる 3 種の PAAc ゲル膜に包括固定したカタラーゼの酵素活性の経時変化を Fig. 5 に示す。架橋剤量に関係なくほぼ同程度の活性を保持していたことが示された。ゲル膜に固定化したカタラーゼは約 20 分で溶液内の H_2O_2 を分解したが、先のグラフト膜に固定化したカタラーゼは、 H_2O_2 の 1/2 量を分解するために 60 分を要したことから、カタラーゼ固定化ゲル膜の酵素活性の方が高いことが確認された。このことは、グラフト化膜への固定化には共有結合を用いているため酵素の活性部位への影響があり、ゲル膜への包括固定化では、酵素の構造への影響がないためと考えられる。

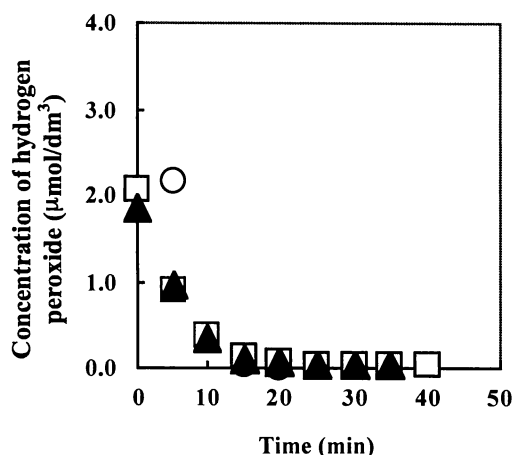


Fig. 5 Enzymatic activity of Catalase trapped in gels with various amounts of crosslinker (○; 0.08, □; 0.12, ▲; 0.16 g)

4. インスリンの透過

GOD を固定化したフィルムとカタラーゼを固定化したフィルムを 2 枚用いてインスリンの透過実験を行った結果を Fig. 6 に示す。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り 180~210 分後には放出量が急激に増加した。このことは、グルコースと GOD の酵素反応によるグルコン酸の生成のため PAAc グラフト鎖が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、次のカタラーゼ固定化膜のカタラーゼが H_2O_2 を消費した結果、GOD の酵素反応が促進され、

さらにグラフト鎖が収縮して孔が開き、インスリン透過量を増加させることができたと考えられる。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考えられる。

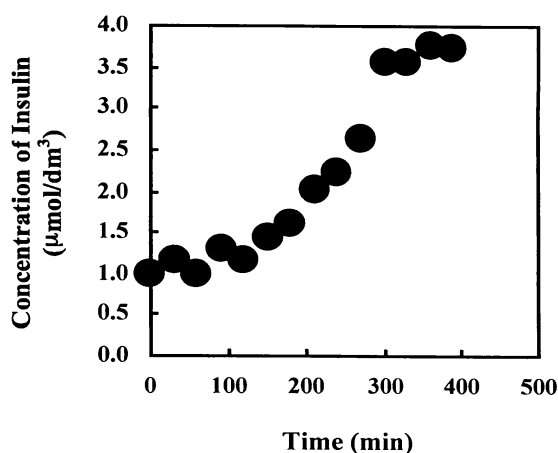


Fig. 6 Change in the Insulin permeabilities through ePTFE-g-PAAc-i-GOD film and ePTFE-g-PAAc-i-Catalase film

【結論】

以上の結果から、ePTFE-g-PAAc に GOD とカタラーゼを固定化した 2 枚の膜を用いると、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固定化した膜を使用すると透過量を増加できる。また、GOD の酵素活性は少なくとも 1 ヶ月間保持できる sustainable 膜となる。カタラーゼ固定化膜の活性維持は短期間（2~3 日）可能である。カタラーゼをゲル膜に包括固定した場合には、共有結合法による固定化に比べて高い酵素活性を維持できる。

【参考文献】

- 1) 嘉悦 勲, ドラッグデリバリーシステム, (株) シーエムシー, (1986), 137
- 2) 日本大学生産工学部ハイテク・リサーチ・センター平成 15 年度研究報告書, (2004), 2-1
- 3) K. Matsuda *et al.*, Photopolymer Sci, Tech., **17** (2004), 165
- 4) S. Serksen, J. Weat, Adv. Drug Delivery Reviews, **54** (2002), 1226