

# GOD および Catalase を同時固定化した ePTFE-g-PAAc 膜による インスリン透過制御

日大生産工 松田 清美・柏田 歩  
山田 和典・平田 光男

## 1 緒論

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なか、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。

高分子基質として、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)が耐熱性、耐薬品性などのため、多く用いられている。この 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。

このポリアクリル酸 (PAAc) グラフト鎖に酵素を共有結合により固定化し、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した膜システムの構築を行ってきた。

固定化する酵素にグルコースオキシダーゼ (GOD) を用いることにより、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<sup>2)</sup>。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 PAAc グラフト鎖が収縮するため、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<sup>4)</sup>ため、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この  $H_2O_2$  をカタラーゼが消費することにより、酸素が生成するため、グルコースと固定化 GOD との酸化反応を促進できることが確認された。

本研究では、このカタラーゼも使い捨てにせず、再利用をすることを目的として、グラフト化 ePTFE 膜への固定化を個々に行わず、GOD と同時に固定化することを検討した。

## 2 実験

### 2.1 ePTFE-g-PAAc膜の調製

従来の方法<sup>1)</sup>に加えて光重合を2回重ねる方法および反応温度を40°Cに設定し、2から7時間のグラフト重合を行った。

### 2.2 ePTFE-g-PAAc膜への酵素の固定化

GODとカタラーゼの固定化は既報<sup>1)-3)</sup>と同様にCMCを用いた縮合反応により、同一膜への同時固定化を行った。

### 2.3 固定化酵素のグルコース応答性

固定化したGODの酵素活性は、残存するグルコースをベーリンガー・マンハイム社製の食品分析酵素試薬F-キットグルコースを用いて定量し、確認した。一方、カタラーゼの酵素活性は残存する $H_2O_2$ をペルオキシダーゼの作用によりフェノールと4-アミノアンチピリンの酸化縮合に使い、赤色の色素を生成させ、吸光度測定により定量して確認した。

### 2.4 ePTFE-g-PAAc-i-GOD&Catalase膜の

#### 赤外分光分析

ePTFE 膜、ePTFE-g-PAAc 膜および ePTFE-g-PAAc-i-GOD&Catalase 膜表面を赤外ATR法で測定した。測定には、フーリエ変換赤外分光光度計(日本分光(株)製、FT/IR-4200A)を用い、非偏光赤外線を用い、積算回数は100回で行った。また、赤外検出器にはDTGS検出器を用い、スキャンスピードは、2 mm/s、分解能は4 cm<sup>-1</sup>とした。

### 2.5 走査型電子顕微鏡による

#### ePTFE-g-PAAc-i-GOD&Catalase膜表面

ePTFE 膜、ePTFE-g-PAAc 膜および ePTFE-g-PAAc-i-GOD&Catalase 膜表面を走査型電子顕微鏡( (株)キーエンス製、VE-9800)により、加速電圧5 kV、倍率4000倍、分解能8 nmの条件で測定した。

---

## Permeation Control of Insulin through PAAc Grafted ePTFE Films Immobilized Glucose Oxidase and Catalase

Kiyomi MATSUDA, Ayumi KASHIWADA, Kazunori YAMADA and Mitsuo HIRATA

## 2.6 インスリンの透過制御

既報<sup>1)-3)</sup>と同様に Fig. 1 に示すような円筒状セルの中間に ePTFE-g-PAAc-i-GOD&Catalase 膜を挟みインスリンの透過量を測定した。供給側にインスリン ( $1.0 \times 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>) を含む pH 7.40 のリン酸緩衝溶液、透過側には pH 7.40 に調整したリン酸緩衝溶液のみを入れ、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、グルコースに反応したインスリンの透過制御実験の際は、90 分経過後にグルコース 0.18 g を透過側セルに添加した。さらに、ePTFE-g-PAAc-i-GOD&Catalase 膜の PAAc グラフト鎖が収縮状態でインスリンを透過させることを確認するため、pH 6.50 のリン酸緩衝溶液を用いて同様の実験を行った。

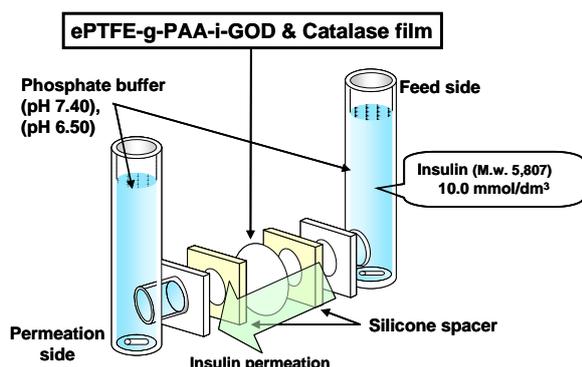


Fig. 1 Schematic diagram of permeation experiments

## 3 結果および考察

### 3.1 ePTFE-g-PAAc 膜

2.1 で調製した ePTFE-g-PAAc-膜のグラフト率と反応時間の関係を Fig. 2 に示す。40°C で 1 回グラフト重合を行った膜のグラフト率は 6~7 時間でほぼ一定となることが分かった。また、60°C で 1 回グラフト重合した膜のグラフト率は 2~7 時間とも一定であった。さらに 60°C で 2 回グラフト重合をした膜のグラフト率は 1 回の膜に比べて約 3 倍であった。

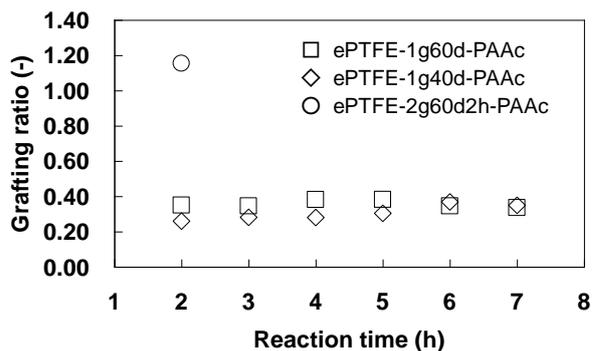


Fig. 2 Relation between grafting ratio and reaction conditions

### 3.2 固定化 GOD およびカタラーゼの酵素活性

固定化 GOD およびカタラーゼの酵素活性は、2.2 および 2.3 により native 酵素に比べ、小さいが活性を維持していること確認した。

### 3.3 ePTFE-g-PAAc-i-GOD&Catalase 膜表面の赤外分光分析

未処理の ePTFE 膜、ePTFE-g-PAAc 膜、および ePTFE-g-PAAc-i-GOD&Catalase 膜表面の赤外 ATR スペクトルを Fig. 3 に示す。

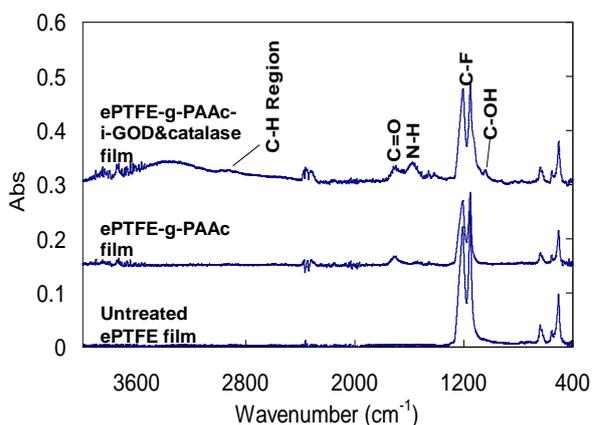


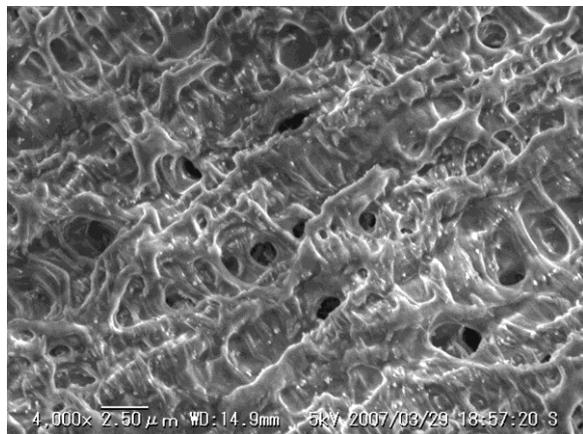
Fig. 3 IR-ATR spectra of untreated ePTFE, ePTFE-g-PAAc and ePTFE-g-PAAc-i-GOD&catalase films

未処理の ePTFE 膜には、1200 cm<sup>-1</sup> 付近に C-F のピークが 2 本のみ確認された。また、ePTFE-g-PAAc 膜には、2900 cm<sup>-1</sup> 付近の C-H 領域のピークは小さいが、1700 cm<sup>-1</sup> 付近に C=O のピークが

得られ、PAAc 由来と考えられる。最後に ePTFE-g-PAAc-i-GOD&Catalase 膜では、 $3400\text{ cm}^{-1}$  付近に OH、 $2900\text{ cm}^{-1}$  付近に C-H 領域、 $1600\text{ cm}^{-1}$  付近に N-H および  $1055\text{ cm}^{-1}$  付近に C-OH のピークがそれぞれ得られた。これらのピークは酵素がタンパク質であることの証拠となるアミノ酸由来と考えられ、 $1700\text{ cm}^{-1}$  付近の C=O のピークおよび  $1600\text{ cm}^{-1}$  付近の N-H のピークはアミド結合に由来するもので、酵素が膜上に固定化されていることを示している。

### 3.4 SEM による ePTFE-g-PAAc-i-GOD&Catalase 膜の観察

ePTFE-g-PAAc-i-GOD&Catalase 膜の SEM 写真を Fig. 4 に示す。図中の白く太い繊維状のものが PTFE であり、その周囲に PAAc があり、PAAc で覆いきれない孔が所々に観察された。これは真空状態で測定したため PAAc 鎖が収縮状態であったためと考えられる。

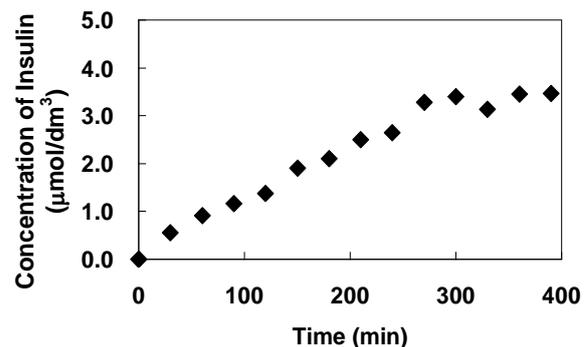


**Fig. 4 SEM image of ePTFE-g-PAAc-i-GOD &catalase film surface**

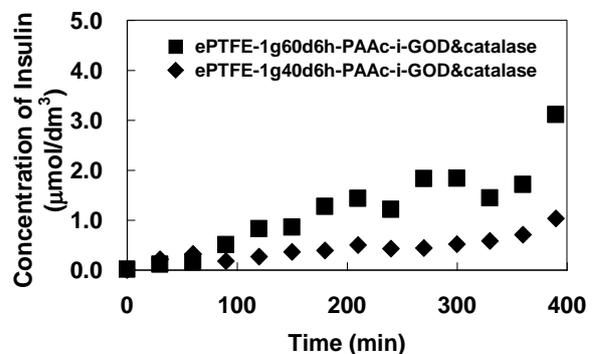
### 3.5 ePTFE-g-PAAc-i-GOD&Catalase 膜によるインスリンの透過制御

ePTFE-g-PAAc-i-GOD&Catalase 膜を用いて pH 7.40 の緩衝溶液中でインスリンの透過実験を行った結果を Fig. 5 に示す。実験条件を pH 7.40 に設定したのは、ヒトの血液中を考慮してのことである。使用した ePTFE-g-PAAc 膜は 2 回グラフト

重合をしたグラフト率の大きな膜を用いた。透過実験の結果、この膜はグルコースを添加していない状態でインスリンを透過させた。この膜は、pH 7.80 の緩衝溶液中では、インスリンを透過させることはなかったことから、PAAc グラフト鎖は pH 7.40 では膜の孔を塞げるほど膨潤状態ではないことを示している。そこでグラフト鎖の調製温度を  $40^{\circ}\text{C}$  に下げ、長い時間重合をして用いた。 $40^{\circ}\text{C}$  と  $60^{\circ}\text{C}$  で調製した ePTFE-g-PAAc-i-GOD&Catalase 膜のインスリン透過性の比較を Fig. 6 に示す。 $40^{\circ}\text{C}$  で 6 時間重合した膜は  $60^{\circ}\text{C}$  で 6 時間重合した膜に比べ、インスリンの透過を抑制した。PAAc を光グラフト重合する際の反応温度を  $60^{\circ}\text{C}$  から  $40^{\circ}\text{C}$  に低下させたことにより、グラフト率は低くても孔を塞ぐことができたのは、グラフト鎖 1 本 1 本が長くなったためではないかと推察している。

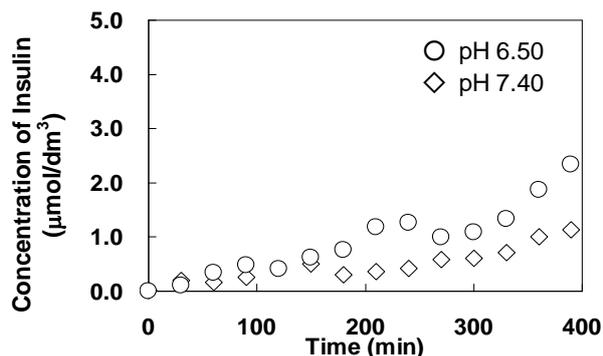


**Fig. 5 Changes in the Insulin permeabilities through ePTFE-2g60d2h-PAAc-i-GOD&catalase film in pH 7.40 phosphate buffer solution**



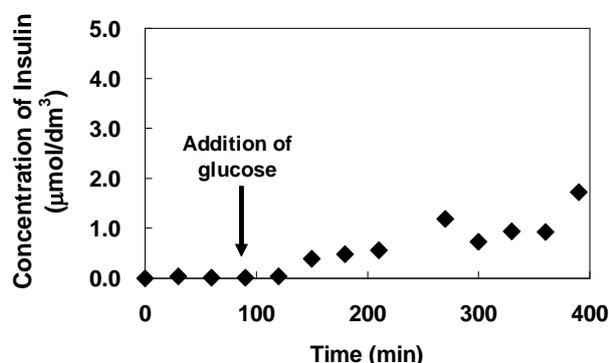
**Fig. 6 Changes in the Insulin permeabilities through ePTFE-(1g40d6h, 1g60d6h)-PAAc-i-GOD&catalase films in pH 7.40 phosphate buffer solution**

この40°Cで調製した膜を用いてpH低下によるインスリンの透過促進を確認するため、pH 6.50の緩衝溶液中でインスリンの透過実験を行った。両者の比較をFig. 7に示す。pH 6.50ではインスリンが透過されたので、このePTFE-g-PAAc-i-GOD&Catalase膜はpH応答性を示すことが確認された。



**Fig. 5 Changes in the Insulin permeabilities through ePTFE-1g40d6h-PAAc-i-GOD&catalase film in pH 6.50 and pH 7.40 phosphate buffer solutions**

最後に、pH 7.40においてインスリンの透過を抑制していたePTFE-g-PAAc-i-GOD&Catalase膜を用いて、グルコース添加によるインスリンの透過を確認した結果をFig. 8に示す。



**Fig. 6 Changes in the Insulin permeabilities through ePTFE-1g40d6h-PAAc-i-GOD&catalase film in pH 7.40 phosphate buffer solution**

使用したePTFE-g-PAAc-i-GOD&Catalase膜は40°Cで6時間、1回グラフトしたePTFE-g-PAAc膜にGODとカタラーゼを固定化した膜である。pH 7.40の緩衝溶液中で90分間インスリンの透過が抑制されていることを確認後、グルコースを添加した結果、添加30分後から徐々にインスリンの透過が起こったことが明らかとなった。従って、40°Cで6時間アクリル酸をグラフト重合したePTFE膜に酵素GODとカタラーゼを同時に固定化したePTFE-g-PAAc-i-GOD&Catalase膜はヒトの血液のpHであるpH 7.40においてグルコース応答性を持つことが確認された。

#### 4 結論

生体内での使用を考慮して、作動pHをヒトの血液に相当するpH 7.40に設定し、ePTFE-g-PAAc-i-GOD&Catalase膜を用いて、グルコースに反応してインスリンを提供できるDDSの構築を目指した結果、

- ① グラフト重合を従来の60°Cから40°Cに変更することにより、OFF状態でインスリンの透過を抑制することができた。
- ② この膜は、グルコース添加によりインスリンを透過させることができた。

以上のことから、ヒトの血液中中で作動できる糖尿病対策のDDSへの可能性が示された。

#### [参考文献]

- 1) 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), 2-1~2-4)
- 2) K. Matsuda, T. Makino, A. Kashiwada, K. Yamada and M. Hirata, *J. Photopolym. Sci. Technol.* **17**, (2004) 165.
- 3) K. Matsuda, Y. Kawahara, S. Shimada, A. Kashiwada, K. Yamada and M. Hirata, *J. Photopolym. Sci. Technol.* **19**, (2006) 225.