

グラフト化 PTFE 膜に固定化した酵素の複合化による活性促進

日大生産工 ○松田 清美・柏田 歩
山田 和典・平田 光男

1 まえがき

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)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) を固定化することにより、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^{1),2)}。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 (H₂O₂) 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 H₂O₂ 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。本研究では、このカタラーゼが使い捨てになることに対し、再利用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。

2 実験

1. ePTFE-g-PAAc フィルムの調製

従来の方法¹⁾に加えて光重合を2回重ねる方法でグラフト量の増加を図った。

2. ePTFE-g-PAAc フィルムへの酵素の固定化

GOD とカタラーゼの固定化は既報^{1), 2)}と同様に行った。

3. カタラーゼの PAAc および PEI ゲル膜への包括固定化

PAAc ゲル膜は、AAc モノマーを架橋剤として Methylenebisacrylamide, 促進剤として Tetramethylethylenediamine, 開始剤として Ammonium peroxodisulfate を用い純水に溶解した後、スペーサーを挟んだ2枚のガラス板の間に流し込み約 4°C で 12 時間以上かけてゲル化させた。カタラーゼはモノマーとともに純水に溶解し、ゲル化と同時に包括をさせた。枝分かれ Polyethylenimine (BPEI) ゲルは BPEI を Ethyleneglycoldiglycidylether (EGDGE) を用いて 3~5°C で 24 時間かけて架橋することによりゲル化させた。カタラーゼは BPEI 溶液に加え、ゲル化と同時に包括させた。

Acceleration of Enzymatic Activity by Composing Grafted PTFE Films Immobilized Enzyme

Kiyomi MATSUDA, Ayumi KASHIWADA, Kazunori YAMADA and Mitsuo HIRATA

4. 酵素活性測定

GOD およびカタラーゼの酵素活性測定も既報^{1),2)}に記載の方法を用いた。

5. インスリン透過

既報^{1),2)}と同様に円筒状セルの中間に GOD およびカタラーゼ固定化 ePTFE 膜または GOD 固定化 ePTFE 膜およびカタラーゼ包括固定化ゲルを挟みインスリンの透過量を測定した。

3 結果および考察

固定化量を増加させるため、光重合を2回行ったところ、Table 1に示すように、1回目で約75~82mgのグラフト量が2回目には140~160mgとほぼ2倍となり、確実にグラフト量の増加がみられた。この膜に酵素を固定化したところ、固定化量の増加も達成された。このことから酵素固定化ePTFE膜のグルコース感知能力の増加が期待される。

Table 1 Amount of PAAc grafted onto ePTFE films

Film No.	First mg	Second mg	Amount of grafted PAAc (g/g)
1	75.108	162.135	1.159
2	76.334	146.279	0.916
3	82.565	139.853	0.694
4	82.846	153.584	0.854
5	82.056	153.384	0.869
6	78.639	140.884	0.792
7	78.521	141.475	0.802
8	82.295	157.464	0.917

しかし、酵素を共有結合で固定化すると活性の低下が著しいため、他の方法としてゲルへの酵素の包括固定化を試みた。使用したゲルははじめPAAcゲルを選択し、低温レドックス重合によりカタラーゼを同時に包括固定した。ゲルに包括された酵素の活性は、共有結合で固定化した場合に比べ、格段に良好であった。そこで、GOD固定化ePTFE膜とPAAcゲル膜を組み合わせ、透過量測定装置のセルの中間に挟み、インスリン透過量を測定した。結果をFig. 1に示す。実験開始から150分後にグルコースを添加したところ、インスリンの透過量の増加がみられた。この状況はGODとカタラーゼによる酵素固定化ePTFE膜の場合と同様である。しかし、期待したようなインスリン透過促進がみられなかったことから、支持体としてのゲルの検討を行った。使用するゲルは、生体適合性が要求されることと、GODとの反応による酸性状態への変化によってもカタラーゼが酵素活性を発揮することが必要である。そのため、酸性下で膨潤状態となるPEIをゲル化させて用いることにした。架橋剤

にはEGDGEを用い、BPEIをゲル化させ、カタラーゼを同時に包括させた。インスリン透過実験はPAAcと同様に行った。結果はFig. 1に追加した。PAAcゲルを用いた場合に比べ、

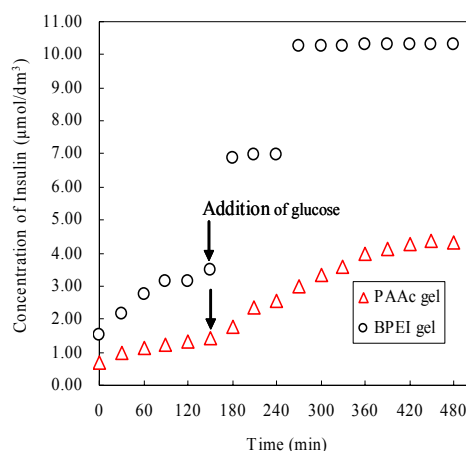


Fig. 1 Change in the Insulin permeabilities through ePTFE-g-PAA-i-GOD film and Catalase trapped in gels

グルコース添加前にインスリンの漏れ出しがあるが、グルコースの添加によるインスリンの透過量の増大は速やかであり、GODとの反応の後に更なるインスリン透過量の増大がみられ、カタラーゼによる促進作用であると推定される。現在までの段階ではゲル化の際のEGDGE量が多いと酵素の活性が低下することが確認されているので、最適な包括条件の検討が必要である。

4 今後の展望

透過膜として実用化へ向けての展開を図るために、固定化酵素膜の基質としてePTFE膜以外にもPE膜およびゲル膜の利用も検討している。ゲル膜については、ゲルの網目の調節により共有結合で固定化したものより高い活性を維持できる膜の調製を図る。ゲルの網目構成を通常の共重合高分子鎖の架橋によるもの他に対応の早いグラフト鎖をもつ高分子鎖の架橋によるものを考え、このゲル膜への酵素の包括あるいは固定化を行い、繰返し使用可能な膜リアクターとしての適応性をグラフト化膜に固定化したものと比較検討する。

「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) K. Matsuda, T. Makino, A. Kashiwada, K. Yamada and M. Hirata, J. Photopoly. Sci. Technol. 17, (2004) 165.