

GOD と Catalase を同時固定化した 2 重グラフト(ePTFE-g-PAAc)膜による
インスリンの透過制御

日大生産工(院) ○鑑水 明生

日大生産工 柏田 歩・松田 清美・山田 和典

日大総研 平田 光男

【緒言】

現代病の 1 つである糖尿病は、血液中のブドウ糖濃度が慢性的に高くなる病気である。治療法として、薬物が投与された際、必要な部分に必要なだけ薬理効果を作用させて薬の副作用を抑えることのできる、Drug Delivery System (DDS) への期待がされている。

インスリン療法は、食後など血中のブドウ糖濃度が増大した時間に対応して適切に行われることが理想であり、このような生体要求に基づいて時間的に制御された DDS を構築するためには、生体要求を感知して薬物放出性を切り替える on-off 制御が必要である。本実験では汎用高分子の表面改質を利用し、生体適合性高分子であるポリテトラフルオロエチレンを延伸した多孔質膜 (ePTFE 膜) の表面に pH 応答性であるポリアクリル酸 (PAAc) を導入することで、基質の高分子材料にはない機能を付与させることにより pH 応答性高分子膜を作製した。また、インスリンを透過—不透過に切り替えられるようにするために、グルコースオキシダーゼ (GOD) とカタラーゼ (Catalase) を PAAc を介して膜に固定化させた。

今回我々は、光グラフト重合を 2 回行うことで、グラフト率の増加とグルコースの応答を促進させることを目標とした。この実験を通して、糖尿病患者を対象としたインスリン

療法での DDS の構築を目指している。

【実験】

1. ePTFE-2g-PAAc 膜の作成

酸素プラズマ処理を行い、表面に酸素含有基を形成させた ePTFE 膜に、増感剤であるベンゾフェノン塗布し、十分に脱気させた濃度 2.0 mol/dm^3 の AAc 水溶液中において 40°C で 6 時間、光グラフト重合を行った。この膜を ePTFE-1g-PAAc 膜として、さらに、 40°C で 6 時間、光グラフト重合した膜を ePTFE-2g-PAAc とした。

2. 酵素固定化

酵素を固定化させるため 24 時間 pH 6.3 のリン酸緩衝溶液に浸漬して十分膨潤させた後、グラフト鎖中のカルボキシル基を活性化させるため NHS (N-ヒドロキシコハク酸イミド) 溶液に 2 時間浸漬し、続いて GOD とカタラーゼを pH 6.3 のリン酸緩衝液に混合させた溶液中に 4 時間浸漬させた。

3. 酵素活性測定

ePTFE-2g-PAAc フィルムに固定化させた GOD の活性や保存性を検討するためにベーリンガー・マンハイム社製の一般、食品分析酵素試薬 F-キット グルコースを用いて活性測定を行った。この方法では、NADPH の定量によってグルコース濃度を求めることができる。

Permeation Control of Insulin using Double Grafted ePTFE film with PAAc and immobilized
GOD & Catalase

Akio YARIMIZU, Ayumi KASHIWADA, Kiyomi MATSUDA,
Kazunori YAMADA and Mitsuo HIRATA

4. インスリン透過制御実験

pH7.40 のリン酸緩衝溶液に 24 時間浸漬させた ePTFE-2g-PAAc-i-GOD&Catalase 膜を、酸素プラズマ処理、および光グラフト重合した側を透過側に向けて透過装置に固定し、供給側にインスリンを含むリン酸緩衝溶液、透過側には、同じ pH のリン酸緩衝溶液を入れて 36 °C の恒温水槽中で実験を開始した。30 分毎に透過側の溶液を 275 nm の波長で吸光度を測定してインスリン透過量を求める。また、グルコースに応答した透過制御実験をする場合には、実験開始 90 分後、インスリンが透過していないかを確認してからグルコース約 0.18 g を透過側に加える。なお、糖尿病と診断される血糖値が 1.26 g/dm³ 以上であることやグルコースの分子量(180 g/mol)から、実験でグルコースを入れる際は、グルコース濃度が 1.8 g/dm³ になるように設定した。

【結果および考察】

ePTFE-1g-PAAc-i-GOD&Catalase 膜よりグラフト率が 2 倍以上高い ePTFE-2g-PAAc-i-GOD&Catalase 膜を用いて GOD の酵素活性測定した結果を Fig. 1 に示す。グルコース濃度を低下させていることから膜に GOD が固定化されていることがわかった。

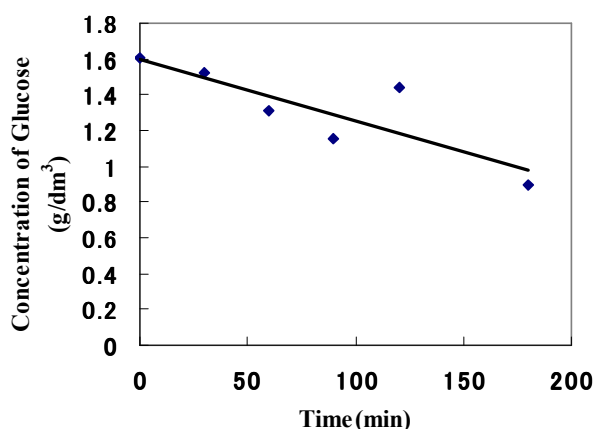


Fig. 1 Confirmation of enzyme activity of GOD

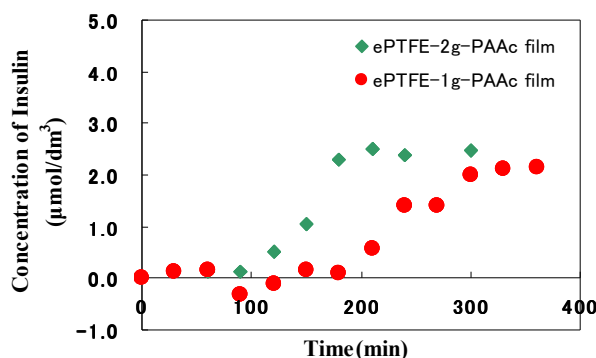


Fig. 2 Changes in the Insulin permeabilities through ePTFE-2g-PAAc-i-GOD&Catalase

次に ePTFE-1g-PAA 膜と ePTFE-2g-PAA 膜をそれぞれインスリン透過制御実験した結果を Fig. 2 に示す。両者ともにグルコースを加えるまでの 90 分はインスリンが抑制できていることが確認できた。さらに、グルコースを入れた際の透過しだす速さが 1 回グラフトした膜で 90 分かかるとのに対して 2 回グラフトした膜は、グルコースを入れた時から透過が始まる結果となり、2 回グラフトすることによりグルコースの応答を速めることができた。

このことより、40 °C で 2 回グラフト重合した際には、1 回グラフト重合より長い、枝分かれの少ない PAAc グラフト鎖ができていることが考えられる。今回の結果から、より実用的な膜の作成に近づいたと考えられる。

【参考文献】

- 1) S. Serksen, J. West : *Advanced Drug Delivery Reviews* **54** (2002), 1226.
- 2) M.J.Taylor, S.Tanna : *Journal of Drug Targeting* **3** (1995), 209.
- 3) 千畑一郎, 固定化酵素, (1975), 1, 5, 11, 41, 43, 45.