

pH 応答性酵素固定化膜によるインスリン透過制御の糖尿病治療への応用

日大生産工（院）○鎌水 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 応答性であるポリメタクリル酸 (PMAA) 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 PMAA を介して膜に固定化させた。

今回我々は、モノマーに MAA を用いることで、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-g-MAA 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 MAA 水溶液中において 40°C で 6 時間、光グラフト重合を行い、ePTFE-g-PMAA 膜を作製した。

この膜を常温、減圧下で 24 時間乾燥させた後、重量が一定になったことを確認して、グラフト重合前後の重量変化からグラフト率を式(1)から算出する。

$$\text{Grafting ratio} = \frac{\text{Amount of grafted PMAA}}{\text{Amount of untreated ePTFE film}} \quad (1)$$

また、PMAA が ePTFE 膜にグラフトされているかを確認するために KBr 法で IR スペクトルを測定した。

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、続いて縮合試薬

Application to diabetes therapy of Permeation Control of Insulin by pH responsive
enzyme-immobilized grafted PTFE film

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

である *N*-シクロヘキシル-*N'*-(2-モルフォリノエチル)カルボジイミド-メソ-*p*-トルエンスルホネート(CMC), GOD および Catalase を pH 6.3 のリン酸緩衝液に溶解させた溶液中に 4 時間浸漬させた。

3. 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-PMAA-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ことを確認してからグルコース約 0.18 g を透過側に加えた。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】

Fig. 1 は、ePTFE-g-PMAA 膜を IR で測定した結果である。

2960cm⁻¹ に MAA のメチル基、1725 cm⁻¹ に MAA のカルボキシル基が見られたことから、PTFE 膜表面に PMAA がグラフトされていることが確認できた。

Fig. 2 は、MAA をグラフト重合させて GOD と Catalase を同時固定化させた ePTFE 膜 (ePTFE-g-PMAA-i-GOD&Catalase film) を用いてインスリン透過制御をした結果である。90 分までインスリンの透過が抑制され

ていることを確認し、グルコースを加えるとインスリンが透過を始めた。この結果より、インスリン放出性を切り替える on-off の機能を持った、pH に応答する酵素固定化膜を作成することができた。グラフト率も 0.216 と高めであり、グラフト率の増加と共に酵素の固定化率も増加したと考えられる。このため、グルコースを加えた際の反応が促進され、より実用的な糖尿病に対する DDS が構築できた。

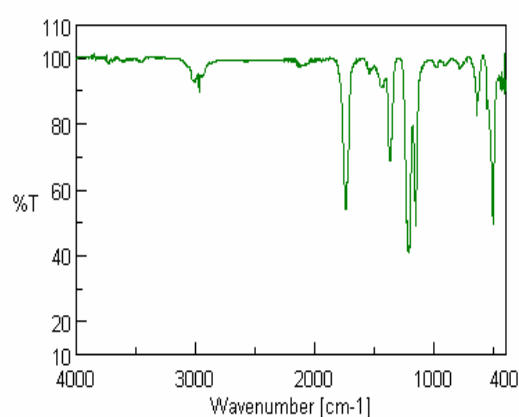


Fig. 1 IR spectrum of ePTFE-g-PMAA

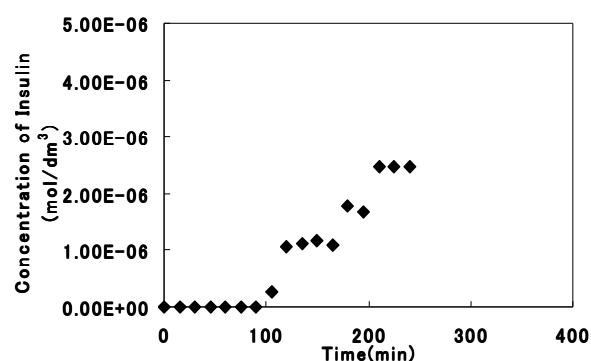


Fig. 2 Changes in the Insulin permeabilities through ePTFE-g-PMAA-i-GOD&Catalase

【参考文献】

- 1) M. Kidowaki, T. Kataoka, K. Ito, *Drug Delivery System*, **21** (2006) 592-598
- 2) L. Ying, E. T. Kang, K. G. Neoh, *J. Membr. Sci.*, **208** (2002) 361-374
- 3) 千畑一郎, 固定化酵素, (1975)1, 5, 11, 41, 43, 45.