

# グルコースオキシダーゼを固定化した PAAc-g-ePTFE 膜を用いた グルコースセンサーの効率化

○松田 清美・柏田 歩・山田 和典・平田 光男（応用分子化学科）

## 【緒言】

生活習慣病の一つである糖尿病は、持続的な高血糖を特徴とする。その原因の多くは、肥満・高脂肪食・運動不足によるインスリンの作用が低下するためとされている。その結果、グルコースを利用できなくなり、血中のグルコース濃度が高くなる症状である。高血糖が持続すると網膜症・腎症・神経症や動脈硬化による虚血性心疾患・脳血管疾患を引き起す。糖尿病の治療は血糖値のコントロールが基本である。その手段としては、食事療法、運動療法、薬物療法がある。しかし、薬は作用点で薬理効果を発揮するだけでなく、副作用を引き起こす。その問題点を解決する新しい薬剤投与技術として薬物送達システム（DDS）が研究されている<sup>1),2)</sup>。

本研究では、DDS として血糖値の上昇によってインスリンを供給できるグルコース刺激応答性膜の調製を目的とした。PTFE を延伸した多孔質膜を使用し、プラズマ開始光重合により表面に PAAc をグラフト鎖として導入する。さらに、このグラフト膜にグルコースに応答するグルコースオキシダーゼ（GOD）を固定化し、インスリンの透過を図る。続いて、グルコースセンサーとしての効率化を図るため、カタラーゼを用いた二重応答性システムの構築を検討した。

## 【実験】

### 2.1 ePTFE-g-PAAc 膜の調製

延伸 PTFE 膜（ePTFE 膜；ADVANTEC 社製、直径 47mm、孔径 0.5 $\mu$ m、空隙率 78%、膜厚 65 $\mu$ m）を、超音波洗浄機を用いて、メタノールおよびアセトン中でそれぞれ 10 分間ずつ洗浄後、常温で減圧乾燥した。乾燥重量を測定後、島津製作所製 LCVD-20 型プラズマ装置を使用して酸素プラズマ処理を行った。ePTFE 膜をベルジャー内のサンプルホルダーに両面テープを用いて固定し、ベルジャー内を 1.33Pa まで減圧した。その後、酸素ガスを流速 20cm<sup>3</sup>/min で 6.67 Pa まで流入した。サンプルホルダーを 60 rpm で回転させながら、出力 200W で 120 秒間、酸素プラズマ処理を行った。プラズマ処理後、ePTFE 膜を常温・常圧の酸素雰囲気下のデシケーター内に 30 分間放置して、酸素含有基を形成させた。光グラフト重合は、リコー科学産業製リコーロータリー光化学反応装置 RH400-10W を用いた。10 本の反応容器内に 2.0mol/dm<sup>3</sup> アクリル酸水溶液 50 cm<sup>3</sup> ずつを入れ、窒素ガスを流入させ酸素を除いた。その溶液内に、

酸素プラズマ処理後、ベンゾフェノンのアセトン溶液に浸して表面に増感剤を塗布した ePTFE 膜を浸漬して、400W 水銀灯からの近紫外光を 60 $^{\circ}$ C で 120 分間照射した。重合後、反応管より ePTFE-g-PAAc 膜を取り出し、水道水および純水で手洗いした。さらにホモポリマーを除去するため、純水中に 24 時間浸漬した後さらに純水で洗浄した後、減圧乾燥した。グラフト量はグラフト重合前後の重量変化から求めた。また、ePTFE 膜の孔を塞ぐため、光重合を 2 回行った。

### 2.2 ePTFE-g-PAAc 膜への酵素 GOD の固定化<sup>3),4)</sup>

調製した ePTFE-g-PAAc 膜を pH 6.30 リン酸緩衝溶液に 24 時間浸漬させた後、リン酸緩衝溶液に溶解した *N*-ヒドロキシスクシンイミド(NHS) に 2 時間浸漬し、グラフト鎖を活性化させた。この膜を pH 6.30 緩衝溶液で洗浄した後、GOD 2000 unit、縮合剤として 1-シクロヘキシル-3-(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）0.2512g を溶解した pH 6.30 リン酸緩衝溶液中に浸漬し、4 $^{\circ}$ C で 4 時間反応させた。固定化量は、GOD の最大吸収波長である 277nm における UV 吸光度測定により決定した。

### 2.3 ePTFE-g-PAAc 膜への酵素 Catalase の固定化

2.2 の GOD と同様に ePTFE-g-PAAc 膜を NHS で活性化した後、Catalase 5 mg と CMC 0.2512 g を溶解した pH 6.30 リン酸緩衝溶液中で固定化を行った。

### 2.4 ゲル膜の作成と Catalase の包括

2.4.1 PAAc ゲル：アクリル酸モノマーを架橋剤メチレンビスアクリルアミドと促進剤テトラメチルエチレンジアミンを純水に溶かし、冷却しておいた。一方、開始剤過硫酸アンモニウムと Catalase を純水に溶解し、モノマー溶液と混合し、直ちに冷却しておいたガラス板の間に流し込み、3 $^{\circ}$ C から 5 $^{\circ}$ C で低温重合により調製した。

2.4.2 BPEI ゲル：枝分かれポリエチレンジアミン（BPEI）水溶液と Catalase を純水に溶解し、架橋剤としてエチレンジアミンジグリシジルエーテルを加えた後、ガラス板の間に流し込み、2-3 $^{\circ}$ C で 24 時間かけてゲル化させた。

## 2.5 酵素活性測定

### 2.5.1 GOD

反応溶液中のグルコース(基質)濃度を測定し、減少したグルコース量から活性を評価した。

測定には、ベーリンガー・マンハイム社製 F-キット グルコースを用い、340nm の吸光度変化から評価した。

### 2.5.2 Catalase

基質である過酸化水素の減少量を、4-アミノアンチピリン、フェノール、ペルオキシダーゼにより発色させ、505nm の吸光度から評価した。

## 2.6 インスリン透過実験

### 2.6.1 ePTFE-g-PAAc-i-GOD 膜と ePTFE-g-PAAc-i-Catalase 膜を用いたインスリンの透過

透過装置の中央に pH 7.80 リン酸緩衝溶液中で 24 時間膨潤させた ePTFE-g-PAAc-i-GOD 膜 ePTFE-g-PAAc-i-Catalase 膜の 2 枚の膜をシリコンゴムスペーサーを用いて固定した。供給側セルにはインスリンを含む pH 7.80 リン酸緩衝溶液を入れ、透過側のセルには緩衝溶液だけを入れ、30℃ の恒温槽中で実験を開始した。30 分ごとに透過側のセル中の溶液を採取して、インスリンの最大吸収波長である 276.5nm で吸光度を測定し、透過量を求めた。インスリンの透過状態を 150 分間観察後、グルコースを供給側セルに加え、引き続き吸光度の測定を行った。

### 2.6.2 ePTFE-g-PAAc-i-GOD 膜と Catalase をトラップしたゲルを用いたインスリンの透過

透過装置の中央に pH 7.80 リン酸緩衝溶液中で 24 時間膨潤させた ePTFE-g-PAAc-i-GOD 膜/ゲル(PAAc ゲルまたは BPEI ゲル)/ePTFE-g-PAAc 膜を、シリコンゴムスペーサーを用いて固定し、2.6.1 と同様にインスリンの透過状態を 150 分間観察後、グルコースを供給側セルに加え、引き続き吸光度の測定を行った。

### 2.6.3 2 回光グラフト重合した膜を用いた透過実験

GOD とグルコースの反応以前に insulin が透過するのを防ぐ目的でグラフト量を増やした膜を用いて、2.6.1 と同様に insulin の透過実験を行った。

#### 【結果および考察】

### 3.1 ePTFE 膜の PAAc グラフト量

酸素プラズマ前処理により PTFE 表面の酸素含有基を形成させ、ベンゾフェノン塗布した後、AAc モノマー溶液中で光重合を行って得た ePTFE-g-PAAc 膜のグラフト量とさらに膜の乾燥重量を測定後、再びベンゾフェノン塗布した後、AAc モノマー溶液中で光重合を行って得た

ePTFE-g-PAAc 膜のグラフト量を Fig. 1 に示す。グラフト量は、1 回の重合で 0.4 g/g ePTFE であったが、2 回光重合を行うことにより約 2 倍の 0.8 g/g ePTFE になり、今後この方法により高グラフト量の膜を調製できることが確認された。また、目的とした GOD とグルコースの未反応時におけるインスリンの透過抑制が期待された。

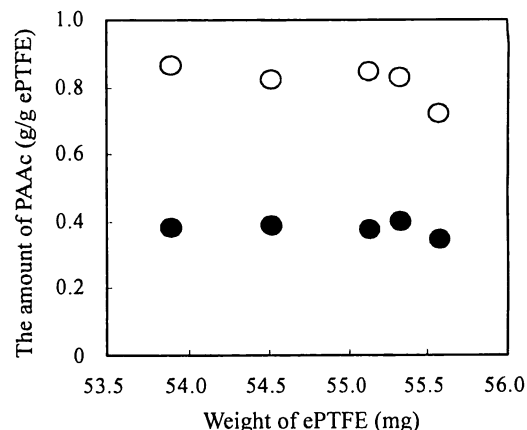


Fig. 1 The grafted amount of PAAc polymerized onto ePTFE (once; ● and twice; ○)

### 3.2 ePTFE-g-PAAc 膜への GOD の固定化

GOD の最大吸収波長における吸光度測定により得られた GOD の固定化量を、Fig. 2 に示す。グラフト量に対する GOD の固定化量はグラフト量の増加に伴い増加する傾向が認められた。

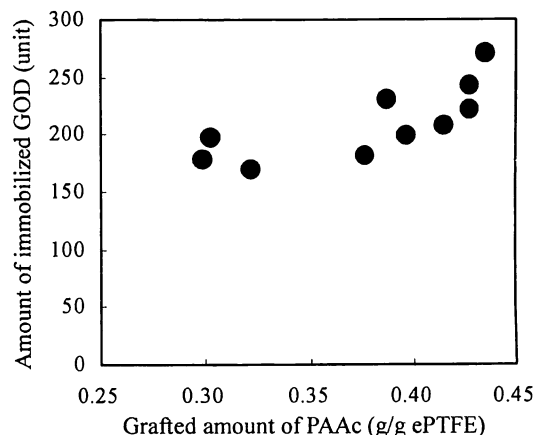


Fig. 2 The amount of immobilized GOD as a function of PAAc grafted amount

### 3.3 ePTFE-g-PAAc-i-GOD 膜の酵素活性

ePTFE-g-PAAc-i-GOD 膜の酵素活性測定結果を Fig. 3 に示す。ePTFE-g-PAAc 膜に固定化された GOD によるグルコース濃度の減少は小さく、酵素活性は非常に低いことが示された。従って、固

定化 GOD が活性を失っていることも推察されたが、80 分後に Catalase を添加したところ、グルコース濃度が急激に低下した。Catalase は過酸化水素を分解する酵素であり、直接グルコースを分解することはないので、GOD によるグルコースの酸化の際に生成する過酸化水素を分解することにより GOD の酵素反応が促進されたものであり、GOD が活性を持っていたことが確認された。

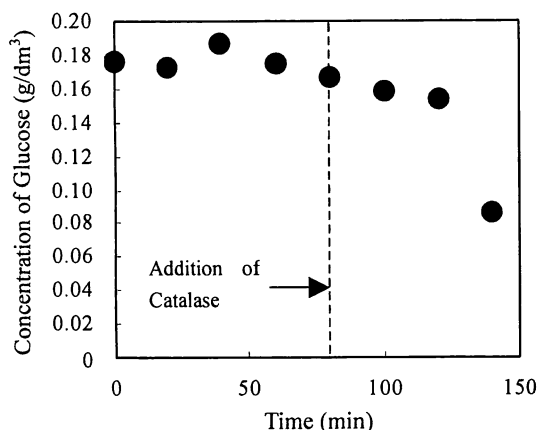


Fig. 3 Enzyme activity of GOD immobilized onto PAAc-g-ePTFE film

### 3.4 ePTFE-g-PAAc-i-Catalase 膜の酵素活性

過酸化水素を用いて行った ePTFE-g-PAAc-i-Catalase 膜の酵素活性測定の結果を Fig. 4 に示す。時間の経過と共に過酸化水素の濃度が減少することが確認でき、固定化 Catalase が活性を持っていることが分かった。さらに、1 ヶ月後まで活性を維持していることも確認された。従って、固定化 Catalase は再利用が可能であることが示された。

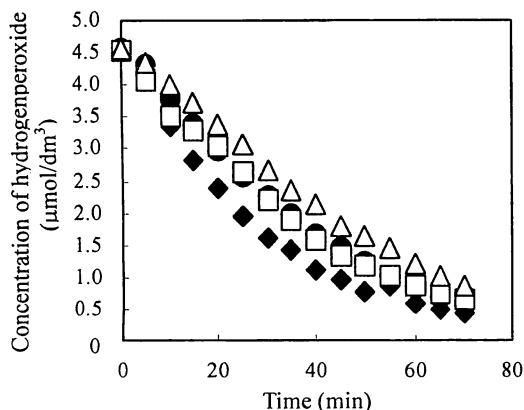


Fig. 4 Enzyme activity of ePTFE-g-PAAc-i-Catalase film with time ◆; first, ●; after 3 days, □; after 2 weeks and △; after 1 month

### 3.5 ePTFE-g-PAAc-i-GOD 膜と ePTFE-g-PAAc-i-Catalase 膜を用いたインスリンの透過制御

二重グラフト化処理を施した上で、酵素 GOD と Catalase をそれぞれ縮合剤で固定化した膜 2 枚を用いて、Glucose に応答するインスリンの透過状況を観察した。測定時間に対するインスリンの透過量を Fig. 5 に示す。インスリンの透過は、1 回グラフトした膜を用いた場合に比べ、低く抑えられた。150 分後に Glucose を添加すると徐々に透過量が増加してゆき、500 分を越えるとインスリン透過量は急激に増加した。このことから、始めの透過量の増加は、GOD により Glucose が酸化され、グルコン酸が生成したことにより膜付近の pH の低下が起こり、PAAc グラフト鎖が収縮し、その結果、膜の孔が開いたことによるものであると考えられる。また、インスリンが長時間にわたり放出がされたのは、グラフト量の増大によりインスリンの透過が緩やかになったためであると考えられる。さらにグルコン酸とともに生じる過酸化水素を 2 枚目の膜の Catalase が消費することにより、GOD の酸化反応が促進され、より大きな pH の低下をもたらし、孔の開きが大きくなったため、インスリンの透過量が大きくなったものと考えられる。

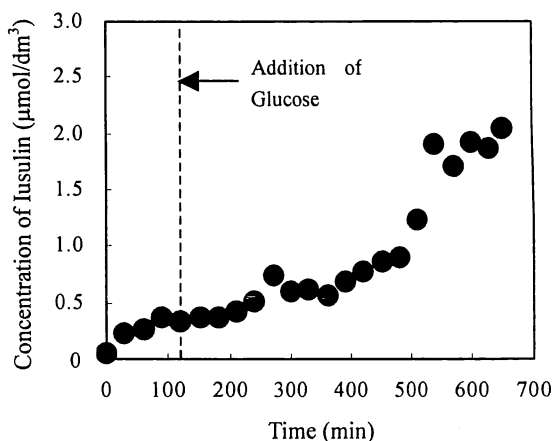


Fig. 5 Changes in the Insulin permeabilities through ePTFE-g-PAAc-i-GOD film and ePTFE-g-PAAc-i-Catalase film

### 3.6 ePTFE-g-PAAc-i-GOD 膜と Catalase をトラップしたゲルを用いたインスリンの透過

酵素を縮合法により固定化すると大きく活性が損なわれる。そこで、酵素を共有結合で固定化するのではなく、ゲルの網目にトラップして用いた。ゲル膜としては、PAAc ゲルと BPEI ゲルを用いた。PAAc ゲルは、低 pH において収縮し、BPEI ゲルは、高 pH において収縮する。ePTFE-g-PAAc-i-GOD 膜と 2 種のゲルを組み合わ

せた透過膜によるインスリンの透過の経時変化を Fig. 6 に示す。実験開始から 150 分までは、膨潤状態のグラフト鎖が膜の孔を塞いでいるため透過が抑えられていた。150 分後に Glucose を添加すると両者ともインスリンを透過させた。300 分後以降に透過量が増大したのは、ゲルにトラップされた Catalase が Glucose の酸化を促進し、pH のさらなる低下をもたらしたものと考えられる。ゲルの種類による透過量の差異は、酵素反応による膜周辺の pH の低下により、PAAc ゲルはカルボキシル基の解離が抑制され、陰イオン同士の静電反発が減少し収縮するため、インスリンが透過し難く、BPEI ゲルではイミノ基のプロトン化による陽イオン同士の静電反発により PEI 鎖が拡

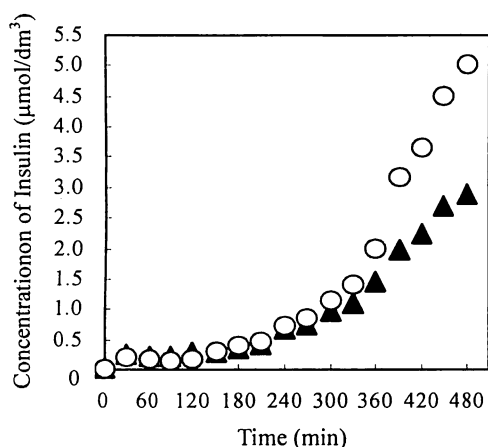


Fig. 6 Changes in the Insulin permeabilities through ePTFE-g-PAAc-i-GOD film and Catalase trapped in gels (▲; PAAc gel and ○; BPEI gel) and ePTFE-g-PAAc film

がりゲルが膨潤するため、透過しやすいためと考えられる。Glucose 添加後、インスリンの透過が始まるのに時間を要したのは、ゲルを挟み込んだ透過側の ePTFE-g-PAAc 膜の PAAc グラフト鎖の収縮に時間がかかったためと考えられる。

#### 【結論】

グルコースを感知してインスリンを供給する糖尿病対策システムの構築を目指し、pH に応答する PAAc を ePTFE 膜表面にグラフト鎖として導入し、酵素 GOD を PAAc グラフト鎖に固定化した。グラフト重合を 2 回行い ePTFE の孔をより完全に塞いだ。GOD はグルコースを酸化して酸性のグルコン酸を生成し、膜近辺の pH を低下させ PAAc グラフト鎖を収縮させるので膜の孔が開きインスリンが透過させることができた。徐放性としては有効であったが、インスリンの透過量の増加を図るため、さらに Catalase を固定化した ePTFE 膜および Catalase を包括したゲルを用いた。Catalase はグルコースの酸化の際に副生する過酸化水素を分解するため、GOD の酵素活性を高め、インスリンの透過量を増大させた。さらに、酵素は膜に固定化することにより繰り返し使用することが可能になった。

#### 【参考文献】

- 1) Kai Zhang, Xiao Yu Wu, *J. Controlled Release*, **80** (2002), 169
- 2) S. Sershen, J. West, *Advanced Drug. Delivery Reviews*, **54** (2002), 1226
- 3) Lei Ying, E. T. Kang, K. G. Neoh, *J. Membrane Sci.*, **208** (2002), 361
- 4) K. Podual, F. J. Doyle III, N. A. Peppas, *J. Controlled Release*, **67** (2000), 9