

『酵素を固定化したグラフト化 ePTFE 膜の複合化による薬物の透過促進』

日大生産工 ○松田清美・柏田 歩・山田和典・平田光男

1. 緒論

薬物を使用した化学療法は、古来からの草木や動物の成分の利用をはじめとして、19世紀の化学工業の発展による化学新薬の開発にあわせて進歩してきた。薬物の薬理効果を追及する合成化学技術ばかりでなく、薬物をいかに投与するかの研究も重要である。そのような製剤学の中で、より安全に、効果的に薬物化学療法を行う手段として“必要最小限の薬物を、必要な場所に、必要な時に供給する”という概念が生まれた。これがドラッグデリバリーシステム(薬物送達システム, DDS)である。DDSは薬物の血中濃度を長期間一定に保つことを目的とした薬物徐放化と、生体リズムにあわせて血中濃度を調節する制御放出、および薬物を患部に選択的に輸送するターゲティングに分類することができる¹⁾。より理想的な薬物療法を目的とする場合にはDDS, コントロールドリリースシステムにおいて、薬物の動きを時間的、空間的に制御することにより達成される。特に時間的制御には、様々な刺激応答材料などが利用され、自己制御型のコントロールドリリースシステムデバイスが実現されつつある²⁾。

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。

一方、水溶性高分子(中性または電解質)をグラフト化した延伸ポリテトラフルオロエチレン(ePTFE)フィルムは高強度・高含水性であり、これらを酵素固定化基盤として活用し、酵素が有する基質特異性、穏和な反応条件といった特徴を生体外において高効率で反復して行うことは本テーマとして重要であると考えられる。グラフト鎖から酵素の遊離・脱着を抑えるために、不動化法として共有結合法を適用するが、これはグラフト鎖の高い易動性で固定化時の酵素の変性を低減できるという固定化基質としての優れた特徴を利用しようとしたものである。固定化酵素は反復利用が可能となり、酵素の耐酸性、耐塩基性、熱安定性なども向上するので、バイオリアクターの構築、特定物質との選択的反応と物質除去(例えば水質浄化)、固定化酵素による低コストの有機合成方法、基質特異性を利用したDDSへの展開も期待される。

固定化GODを用いたグルコース感応型のインスリン透過に関しては、カタラーゼがインスリンの透過を促進することが確認されたため、さらにこのカタラーゼの再利用を考慮して、GODと同様に固定化を試みた結果、十分可能となった。そこで今回は、生体内での高血糖値を感知してインスリンの放出を繰り返し行うことができる装置の設計を試みた。平行して、透過膜としてゲル膜を用

Acceleration of Drug Permeation through Combination of Enzyme Immobilized g-ePTFE Films

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

いることでゲルの網目の調節により酵素を固定化できること、共有結合で固定化した酵素に比べ高い活性を維持できることの利点を活かした複合膜の調製を検討する。

2. 実験

2.1 アクリル酸グラフト化延伸PTFE膜の調製

延伸 PTFE 膜 (ePTFE 膜 ; ADVANTEC 社製, 直径 47mm, 孔径 0.5 μ m, 空隙率 78%, 膜厚 65 μ m) を前報³⁾同様に洗浄後, 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前報同様に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。反応条件は前報³⁾同様である。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。

2.2 ePTFE-g-PAAc膜への酵素GODおよび Catalaseの固定化^{4), 5)}

2.2.1 ePTFE-g-PAAc 膜への GOD の固定化

前報同様, 調製した ePTFE-g-PAAc 膜をリン酸緩衝溶液で十分膨潤させた後, *N*-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)によりグラフト鎖を活性化させ後, GOD と 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 ; 縮合剤) を反応させた。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。

2.2.2 ePTFE-g-PAAc 膜への Catalase の固定化

2.2.1 の GOD と同様に ePTFE-g-PAAc 膜を NHS で活性化した後, Catalase と CMC を pH 6.30 リン酸緩衝溶液中で反応させた。

2.3 PAAc ゲル膜の作成と Catalase の包括

AAc モノマー, 架橋剤メチレンビスアクリルアミドおよび促進剤テトラメチルエチレンジアミンを純水に溶かし, 冷却しておく。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°C から 5°C で低温重合により調製した。

2.4 酵素活性測定

2.4.1 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。

2.4.2 Catalase

溶液中の残存過酸化水素を, 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 の吸光度測定により評価した。

2.5 Glucose添加によるInsulinの透過実験

2.5.1 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

Fig. 1 に示す透過装置の中央に 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 膜および ePTFE-g-PAAc-i-Catalase 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°C 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 2 枚の膜の間のセルに加え, 引き続き吸光度の測定を 30 分ごとに行った。

2.5.2 ePTFE-g-PAAc-i-GOD 膜と Catalase 包括 PAAc ゲル膜を用いたインスリンの透過

2.5.1 の ePTFE-g-PAAc-i-Catalase 膜の代わりに Catalase 包括 PAAc ゲル膜を用いて、中間のセルを除いて従来通りの方法でグルコース添加によるインスリンの透過実験を行った。

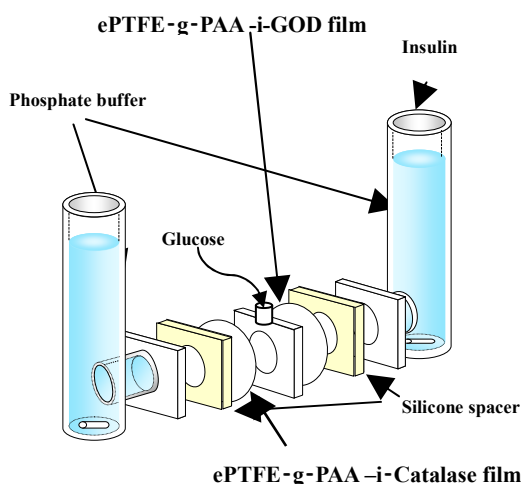


Fig. 1 A new apparatus for Insulin permeation experiments

3. 結果および考察

3.1 ePTFE 膜の PAAc グラフト量

今回使用した ePTFE-g-PAAc 膜の PAAc グラフト量は、平均 0.5g/g であった。

3.2 ePTFE-g-PAAc 膜固定化酵素の活性

3.2.1 Catalase の酵素活性

ePTFE-g-PAAc-i-Catalase 膜の Catalase の酵素活性を吸光度測定から求めた結果を Fig. 2 に示す。反応時間の経過に伴い、酵素 Catalase の基質である過酸化水素の減少が確認された。このことから、固定化された Catalase が活性を持っていることが確認された。

3.2.2 GOD の酵素活性

ePTFE-g-PAAc-i-GOD 膜の GOD 場合も同様に時間の経過とともに基質グルコースの濃度の減少に

より、活性の保持を確認した。しかし、GOD のグルコース消費量は小さく Catalase の促進作用が強く求められる状態であった。

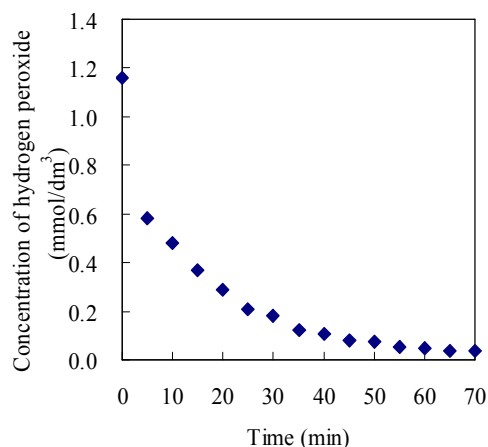


Fig. 2 Enzyme activity of immobilized Catalase on PAAc-g-ePTFE film

3.3 ePTFE-g-PAAc-i-GOD 膜および ePTFE-g-PAAc-i-Catalase 膜を用いたインスリンの透過

Fig. 1 に示した装置を用い、2.5 に従い実験した結果を Fig. 3 に示す。PAAc グラフト量が 0.5g/g と小さかったため、グルコース添加前にインスリンが連続的に放出される結果となった。

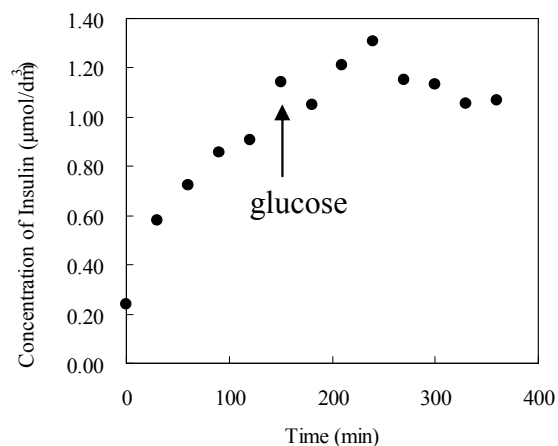


Fig. 3 Changes in the Insulin permeabilities through ePTFE-g-PAAc-i-GOD and ePTFE-g-PAAc-i-Catalase films

150分経過後グルコースを添加した時点でインスリンが減少した現象は、グルコース溶液の注入により透過側の溶液が増加したためではないかと考えられる。その後インスリンの増加が観察されたが、240分後には減少に転じた。このことはインスリンの透過セル内の濃度の減少を意味している。その原因は、膜のPAAcグラフト鎖が収縮することによりグルコースが透過側に移動し相対的にインスリンの濃度の低下になったものと解釈される。

3.4 ePTFE-g-PAAc-i-GOD膜およびCatalase包括PAAcゲル膜を用いたインスリンの透過

新しい装置の使用は、現在不調である。従来通りの装置でゲル膜を用いて、グルコースの添加によるインスリンの透過促進実験を行った結果をFig. 4に示す。初期にインスリンの少量の漏れは観察されたが、150分後にグルコースを添加した後、徐々にインスリンの透過が観察され、240分以降には透過が促進されていることが確認された。従って、GODとCatalaseを組み合わせることでインスリンの透過を促進できることは明らかである。

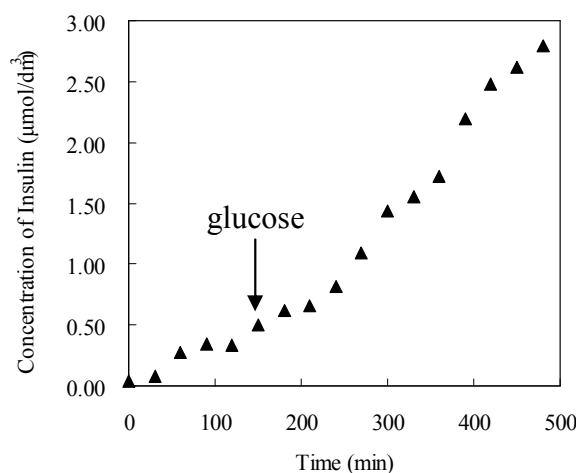


Fig. 4 Changes in the Insulin permeabilities through ePTFE-g-PAAc-i-GOD film and Catalase trapped PAAc gel film

5. 今後の課題

糖尿病対策として、その治療薬であるインスリンをグルコースの増加を検知して提供でき、グルコース値が正常に戻ればその提供を中止できるシステムが望まれる。今回用いた新装置への膜の設置方法を再検討するとともに、GODとCatalaseを同一膜に固定化し、更なる効率化を図る。また、基質膜の孔の形状を延伸した孔ではなく、膜を貫通する孔をもつものに変えることも検討する。現在、入手している膜はポリカーボネート製で強度に問題があるが、外的環境変化への応答が早いという報告⁹⁾があり、本研究への適用は大いに期待できるものと考えている。

【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
- 5) 松田清美・柏田 歩・山田和典・平田光男, 日本大学生産工学部ハイテク・リサーチ・センター平成17年度研究報告書(2005), 13
- 6) H. Ohashi, N. Miyaoi, and T. Yamaguchi, *J. Photopolym. Sci. Tech.*, **19** (2006), 251