

# グラフト化高分子のヒドロゲル化と酵素の固定化

日大生産工 ○松田 清美・柏田 歩  
山田 和典・平田 光男

## 1 当初の課題の意義, 目的およびその概要

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。

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(PTFE)を用いる。水溶性高分子(中性または電解質)をグラフトしたPTFEは高強度・高含水性である。PTFE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。ポリアクリル酸グラフト化ePTFEフィルム(ePTFE-g-PAAc膜)を酵素固定化基盤として活用する。酵素は, 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。その中でフィルム状のもの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, 穏和な条件下での反応性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を目指した。グラフト鎖から酵素の遊離・脱着を抑えるために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。

初年度(平成17年度)はサステイナブルな機能性酵素固定化複合膜の調製を行う。酵素グルコースオキシダーゼ(GOD)のグルコース応答性を利用してインスリンを透過させることができる。しかし, グルコースとGODの反応を促進させるため, 酵素カタラーゼを選択した。カタラーゼはグルコン酸とともに生成する $H_2O_2$ を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。GODとグルコースの反応では人体に有害である過酸化水素( $H_2O_2$ )を分解するため, これを無毒化することは意義があるものと考えられる。さらに本研究では, このカタラーゼが使い捨てにせず, 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。透過膜としてゲル膜を用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。

また, 基礎研究としてPTFE板を用いてグラフト鎖の形態を検討した。

2年度(平成18年度)は, グルコース応答膜としてGODのみならずカタラーゼをも固定化して用いる。また, 装置に改良を加えインスリンの補給をできるようにし, 膜の複合化とともDDSの構築を目指した。

---

## Hydrogelation of Grafted Polymer and Enzyme Immobilization onto Grafted Chains

Kiyomi MATSUDA, Ayumi KASHIWADA, Kazunori YAMADA and Mitsuo HIRATA

3年度（平成19年度）は、固定化する GOD とカタラーゼを同一のグラフト膜に固定化して用いることの有効性を確立する。さらに、高分子表面をヒドロゲル化してインスリンの透過をグルコース濃度の上昇に伴い効率的に制御できるようにするため、グラフト鎖の長さの調節を試みた。

2 研究成果（当初の目的にどれだけ達したか、新たに得られた知見）

糖尿病対策として、血糖値（グルコース濃度）の上昇を検知してその治療薬であるインスリンを提供でき、血糖値が正常に戻ればその提供を中止できるシステムの構築を目指した。

### 2.1 ePTFE 膜の PAAc グラフト量

ヒドロゲル化に用いられるグラフト鎖の量を増加させる工夫として、光重合を 2 回行ったところ、ePTFE 膜の PAAc グラフト量は、Fig. 1 に示すように、1 回目で約 50 mg/mg、2 回目には 150 mg/mg とほぼ 3 倍となり、確実にグラフト量の増加がみられた<sup>1,2)</sup>。この結果、二重グラフト鎖は OFF 状態でのインスリンの透過を抑制することができた。

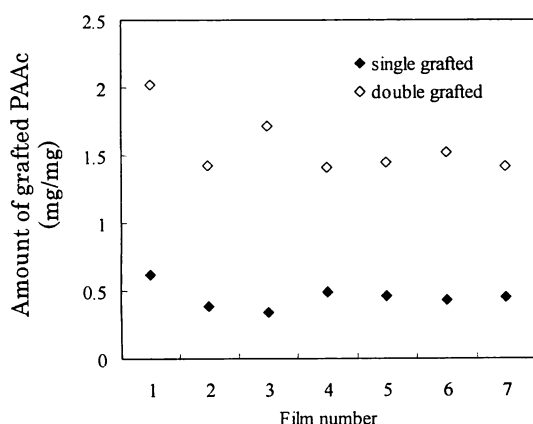


Fig. 1 Amount of grafted PAAc onto ePTFE film

### 2.2 カタラーゼ固定化ePTFE膜の酵素活性

ePTFE-g-PAAc-i-GOD膜の酵素活性の保持は確認されていたが、基質グルコースの消費量が小さいため、カタラーゼの添加による促進作用を利用していた。添加した場合、使い捨てとなるため、GOD同様にカタラーゼについても膜への固定化を行い、ePTFE-g-PAAc-i-Catalase膜の酵素活性は、Fig. 2に示すように確認された<sup>1)</sup>。

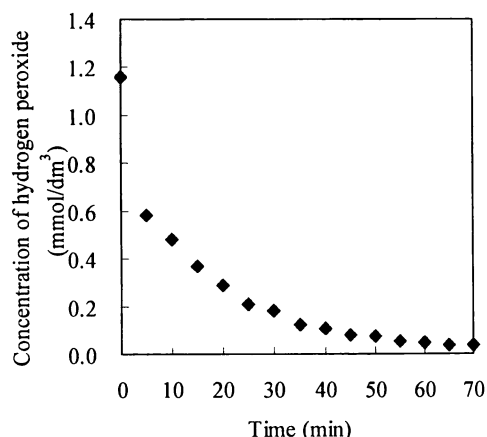


Fig. 2 Enzyme activity of immobilized Catalase on PAAc-g-ePTFE film

### 2.3 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制御

GOD およびカタラーゼをそれぞれ固定化したフィルム 2 枚を用いたインスリンの透過結果を Fig. 3 に示す。グラフト膜を pH 7.80 緩衝溶液中で膨潤状態に保つとインスリンの透過は抑えられた。150 分後にグルコースを添加するとインスリンの透過が始まり 180～210 分後には放出量が急激に増加した。

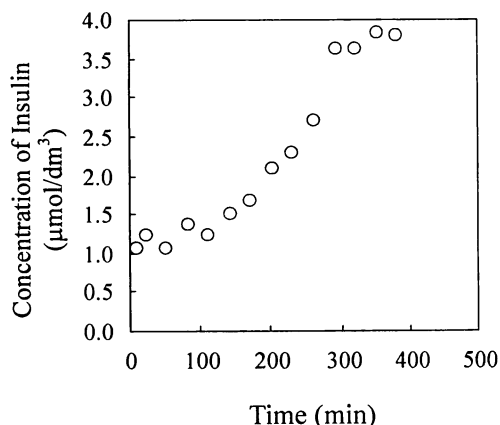


Fig. 3 Changes in the Insulin permeabilities through ePTFE-g-PAAc-i-GOD film and ePTFE-g-PAAc-i-Catalase film

このことは、グルコースと GOD の酵素反応によるグルコン酸の生成のため PAAc グラフト鎖が次第に収縮するのでインスリンの透過が始まったと考えられ、次のカタラーゼ固定化膜のカタラーゼが H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を消費した結果、

GODの酵素反応が促進され、さらにグラフト鎖が収縮して孔が開き、インスリン透過量を増加させることができたと考えられる。

#### 2.4 ePTFE-g-PAAc-i-GOD膜およびカタラーゼ包括PAAcゲル膜およびPEIゲル膜を用いたインスリンの透過

カタラーゼを膜に固定化する場合と、ゲル膜に包括することも検討した。ePTFE-g-PAAc-i-GOD膜およびカタラーゼ包括PAAcゲル膜およびPEIゲル膜を用いたインスリンの透過制御を検討した。PAAcゲル膜は、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。PEIゲル膜はBPEIを架橋剤にエチレングリコールジグリシジルエーテル(EGDGE)を用いてゲル化させ、カタラーゼを同時に包括させた。ePTFE-g-PAAc-i-GOD膜と2種のゲル膜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. 4に示す。

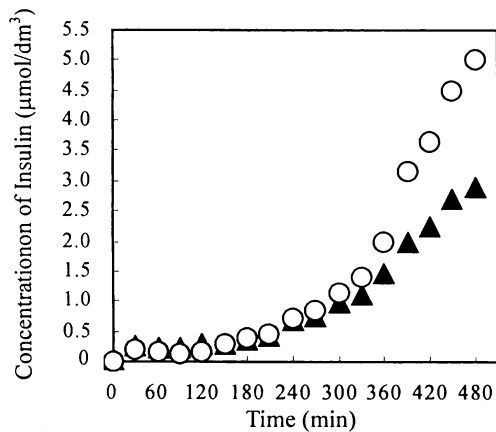


Fig. 4 Changes in the Insulin permeabilities through ePTFE-g-PAAc-i-GOD film and Catalase trapped in gels (▲; PAAc gel and ○; BPEI gel) and ePTFE-g-PAAc film

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分後にグルコース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カタラーゼがグルコースの酸化を促進し、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鎖が拡がり膜が膨潤するため、透過しやすいためと考えられる。グルコース添加後、インスリンの透過が始まるまで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。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。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<sup>1,2)</sup>。

#### 2.5 ePTFE-g-PAAc-i-GOD&カタラーゼ膜を用いたインスリンの透過

一重および二重アクリル酸グラフト化膜へGODおよびカタラーゼ同時固定化膜を用いて行ったインスリンの透過実験の結果をFig. 5に示す。実験開始から120分までインスリンの透過は抑制されている。120分後にグルコースを添加することにより、徐々にインスリンの透過が始まった。これは、添加されたグルコースがGODの基質であるため、酵素反応が起こり、グルコン酸が生成したために膜の周辺のpHが低下した結果、膜の孔を塞いでいたアクリルグラフト鎖が収縮をし、孔が開いたものと解釈される。また、一重グラフト膜より二重グラフト膜の方がインスリン透過量が大きくなった。この原因としてはグラフト量の大きい膜の方が酵素の固定化量が多い結果ではないかと考えられる<sup>3)</sup>。

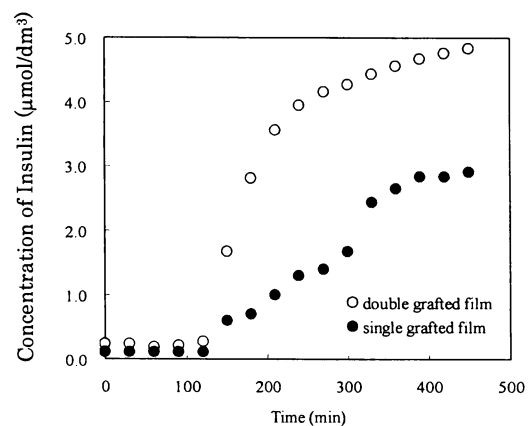


Fig. 5 Changes in the Insulin Permeabilities through ePTFE-g-PAAc-i-GOD & Catalase film

一方、表面に導入したグラフト鎖の形態変化を検討する基礎的な研究を平滑な PTFE 板の表面解析により実施した。グラフト鎖の導入の際の溶媒組成、モノマー濃度および反応温度の影響を ESCA および接触角により評価した。PTFE 表面のヒドロゲル化はグラフト量の増加に伴い PTFE 表面に機能性ヒドロゲルの付与を増進することが示された<sup>4,5,6,7)</sup>。

### 3 問題点および今後の展望

ヒドロゲル化ePTFE膜の調製は、酸素プラズマ処理後、増感剤ベンゾフェノン塗布し、アクリル酸溶液中で光重合を行っている。ヒドロゲル化ePTFE膜がOFF状態でモデル薬物であるインスリンを透過させてしまうことに対して、表面に多くの高分子鎖を導入させるために増感剤ベンゾフェノンを塗布するところから、光重合を再び行った。その結果、OFF状態でもインスリンの漏れ出しは防ぐことができるようになった。二重グラフト膜への酵素の固定化は、インスリンの透過量の増加をもたらした。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、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、酸性下で膨潤状態を示す、BPEIをEGDGEで架橋して使用したところ初期の目的は達成できた。しかし、ゲル膜は強度が不足しているため、繰り返し使用するには強度の付与が不可欠である。

酵素固定化量の決定に、吸光度、TOC 等を試みているが、吸光度を用いる場合には、縮合剤が酵素と同様の紫外領域に吸収があることと、固定化されて減少する酵素溶液の濃度低下を検出しようとするが、変化が小さく信頼性が低い。酵素活性測定から固定化量を推定しなければならない。TOC 値からの決定にもまだ問題が多いことが分かった。

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 膜を用いることが有望と考えられる。従って、酵素の固定化は共有結合を用いることになる。そこで共有結合で固定化した酵素にいかにより高い活性を維持できるようにするか、その調

製方法の開発を図る必要があると考えられる。繰返し使用可能な固定化酵素膜として活性の保持がなければ実用化の道は開けないものとする。

### 4 社会および学協会への貢献度

糖尿病、高脂血症、尿毒症などに親水性ポリマーを表面グラフト鎖として導入し、ヒドロゲル化した高分子膜を利用する前回の課題の中から糖尿病に特化した。その研究成果は、日本化学会、高分子学会および Photopolymer Conference で発表するとともに *J. Photopolymer Science and Technology* 誌等に掲載している。糖尿病は生活習慣病として社会的に対策を囑望されており、その一端を担うことには十分な意義があると考えられる。

#### 【参考文献】

- 1) Kiyomi Matsuda, Yasuhiro Kawahara, Shunsuke Shimada, Ayumi Kashiwada, Kazunori Yamada, and Mitsuo Hirata, *J. Photopolymer Science and Technology*, **19**, 225-230 (2006)
- 2) 松田清美, 柏田 歩, 山田和典, 平田光男, 日本大学生産工学部第 38 回学術講演会オーガナイズドセッション, 講演概要, 9 (2005)
- 3) Kiyomi Matsuda, Yasuhiro Takahashi, Ayumi Kashiwada, Kazunori Yamada, and Mitsuo Hirata, *J. Photopolymer Science and Technology*, **20**, 201 (2007)
- 4) Kiyomi Matsuda, Hirotaka Yamamoto, Ayumi Kashiwada, Kazunori Yamada, and Mitsuo Hirata, *J. Photopolymer Science and Technology*, **18**, 257-262 (2005)
- 5) 山本裕貴, 柏田 歩, 松田清美, *Polymer Preprints, Japan*, **54**, 4212 (2005)
- 6) 高橋靖宏, 松田清美, 柏田 歩, 山田和典, 平田光男, *Polymer Preprints, Japan*, **56**, 1769 (2007)
- 7) 安藤 輝, 高橋靖宏, 柏田 歩, 松田清美, 山田和典, 平田光男, *Polymer Preprints, Japan*, **56**, 4425 (2007)