

ナノテクノロジーによる機能的・構造的生体代替デバイスの開発

I バイオニックナノメディスンによる循環調節機能代替デバイスの開発研究

複合酵素を用いるグルコース燃料電池の開発

分担研究者 末永智一（東北大学大学院環境科学研究科 教授）

研究協力者 西澤松彦（東北大学大学院工学研究科 教授）

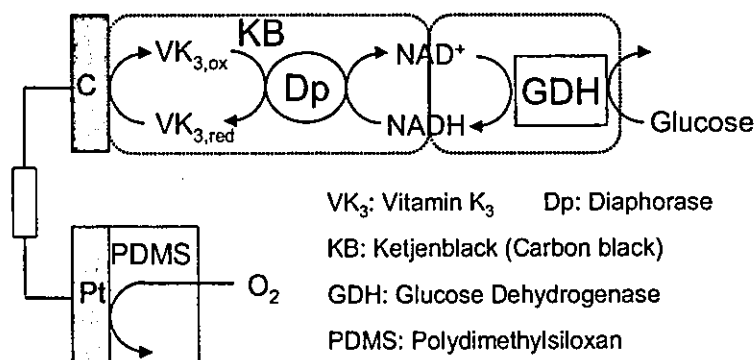
研究要旨：

超小型心臓ペースメーカの駆動電源として機能する生体内埋め込み型の「バイオ燃料電池」の研究開発である。本年度は、ビタミンK<sub>3</sub>ポリマーの調製に成功し、それを用いてNADHに対する酵素電極活性を大幅に改善できた。ビタミンK<sub>3</sub>とジアフォラーゼによる複合薄膜上に、グルコースデヒドロゲナーゼの薄膜を被せて2層構造とし、グルコースを酸化するためのアノード極とした。カーボン粉末を添加するなどの工夫を凝らし、空気飽和37°CのPBS水溶液（10mMのグルコース+0.5mMのNADH）から、15  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ の出力を得た。この初期出力は数日で30%程度（約4  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ）に低下してしまうが、その後は安定で、2週間後も同様の出力（約4  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ）が得られている。これらの結果は十分に再現性があり、含血清溶液中での実験など、実用を意識した実験系に移行する準備が整ったと考えている。

A.研究目的

本研究は、生体内で長期使用が可能なグルコース/O<sub>2</sub>型のバイオ燃料電池の構築を目的としており、特に、生体毒性が懸念される物質を一切使用しないことに関する。昨年度は、ナフトキノン類の一種であるビタミンK<sub>3</sub>がジアフォラーゼ（NADHを酸化する酵素）の良好な電極メディエータであることを突き止めた。このメディエータとジアフォラーゼ、およびグルコースデヒドロゲナーゼ（NAD<sup>+</sup>依存

性のグルコース酸化酵素）を電極上に固定してこれらの電気化学的関係が為されれば、グルコースを連続的に酸化するアノード極としてバイオ燃料電池に用いることが出来る。これを実現するのが本年度の目的である。ビタミンK<sub>3</sub>を再現性良く固定するためにポリマー化する取り組みからスタートし、試行錯誤の結果、ジアフォラーゼとデヒドロゲナーゼを別個に積層する構造に行き着いた。出力密度や再現性について格段の向上が得られた。



図A グルコース/O<sub>2</sub>型バイオ燃料電池

## B. 研究方法

### B-1. ビタミン K<sub>3</sub> ポリマーの調製

ビタミン K<sub>3</sub>(VK<sub>3</sub>)のポリマー化は、第一化学薬品(株)にて行われた。まず、カルボキシル基を導入した VK<sub>3</sub> を合成し、N-ヒドロキシスクシイミド (NHS) および EDC と混合して、活性化エステルとする。これを分子量 70000 のポリアリルアミンのアミノ基と結合させてアミド結合による固定化を行った。全アミノ基の 20% に VK<sub>3</sub> を修飾した。得られた高分子の分子構造を図 B-1 に示し、以後 PAA-VK<sub>3</sub> と称する。

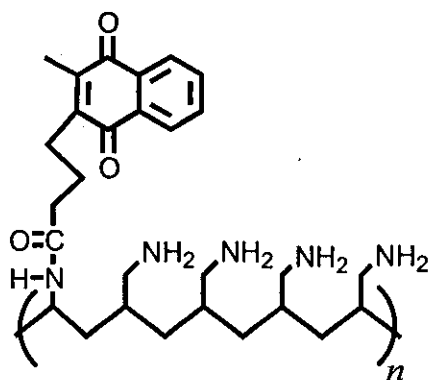


図 B-1 PAA-VK<sub>3</sub> の構造式

### B-2. アノード電極の調製

ディスク形状のグラッシーカーボン電極(電極表面積: 0.07cm<sup>2</sup>)を各種薄膜で被覆して評価した。

PAA-VK<sub>3</sub> とジアフォラーゼ (Dp) との混合薄膜は、以下の手順で調製した。

- 1) Poly(ethylene-glycol) diglycidyl ether (PEGDGE, MW 526) の 6.3mg/ml の溶液 10  $\mu$ l と VK<sub>3</sub> 基のモル数で 24mM の PAA-VK<sub>3</sub> 溶液 10  $\mu$ l とを混合。
- 2) 40  $\mu$ g の Dp を溶かす。
- 3) この混合溶液 4  $\mu$ l を電極に塗布して 5 時間室温で乾燥させる。

乾燥の過程で、PEGDGE のエポキシ基が

PAA-VK<sub>3</sub> および酵素のアミノ基と反応して架橋し、ゲル状の膜になる。膜厚は、乾燥状態で 4  $\mu$ m であった。膜中にカーボンブラックを添加する際には、1) の混合溶液に 70  $\mu$ g の Dp を溶かし、それと 8  $\mu$ l のケッチェンブラック (KB) 分散液を混ぜて用いた。KB はカーボンブラックの一種であり、リチウムイオン電池電極の導電助剤として汎用されている無害な添加物である。

PAA-VK<sub>3</sub> と Dp によるゲル状膜をグルコースデヒドロゲナーゼ (GDH) の膜で覆った。90  $\mu$ g の GDH を、7mg/ml の Poly-L-lysine と 6.3mg/ml の PEGDGE を含む溶液に溶かし、4  $\mu$ l を塗布して乾燥させた。

以上の過程で構成される修飾電極の模式図を図 B-2 に示した。

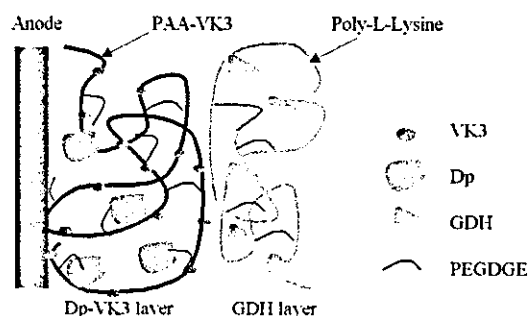


図 B-2 酵素二重膜によるアノード電極

### B-3. カソード電極の調製

白金板を PDMS で被覆して O<sub>2</sub> 選択性カソードとした。3wt% の PDMS エマルジョン (Toray Dow Corning Silicone, Type DC 84) を 36  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> 塗布し、室温で 4 時間乾燥させた。

### B-4. 電極の評価

図 B-3 に示すジャケットタイプの電気化学セルを用い、測定溶液の液温を 37°C に保って三極式の電気化学計測を行った。溶存酸素を除去する場合には、高純度の N<sub>2</sub> ガスで十分バブリングを行った。参照電極は Ag/AgCl (sat.

KCl)である。

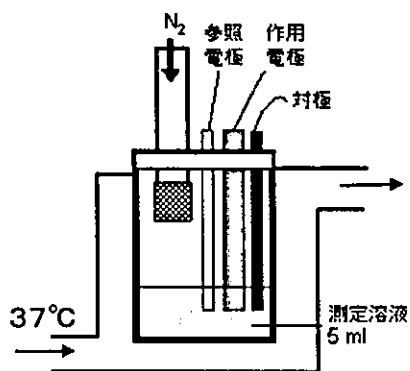


図 B-3 電極評価用の電気化学セル

### B-5. 電池特性の評価

スライドガラスを基板としてフォトリソグラフィとスパッタリングでPt(カソード用)とAu(アノード用)の電極を作製した。電極面積は共に  $0.56\text{cm}^2$  である。Pt電極にはPDMSを被覆し、また、燃料溶液の導入と排出を行うためのプラグをつけた。Au電極表面にはB-2の方法で酵素2重膜を作成した。これら2枚の電極基板で0.05mm厚のシリコンラバー

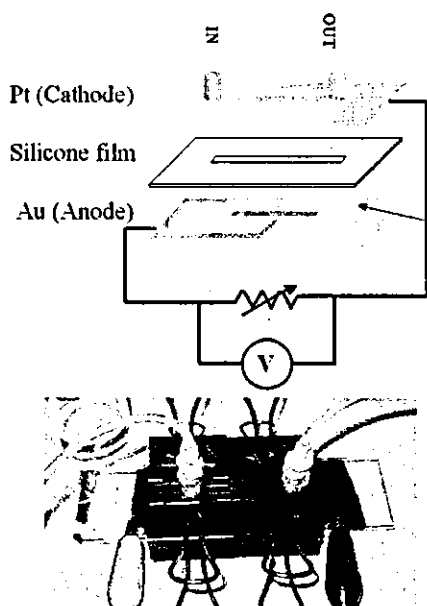


図 B-4 電池特性評価用の流路セル

を挟み込む(図B-4)。シリコンラバーには  $2 \times 28\text{mm}$  のスリットが入っており、”流路”が形成される。外部負荷を  $10\text{k}\Omega$ - $3\text{M}\Omega$  の間で変化させて電池電圧と電流を記録し、出力特性を評価した。

## C. 研究結果と D. 考察

### C-1. PAA-VK<sub>3</sub> の特性評価

新規に合成したPAA-VK<sub>3</sub>の基礎特性を評価した。図C-1は、PAA-VK<sub>3</sub>被覆GC電極のサイクリックボルタモグラム(CV)である。明瞭で可逆な酸化還元波が観測され、その酸化還元電位(-0.25 V vs. Ag/AgCl)は遊離のVK<sub>3</sub>の酸化還元電位(-0.28 vs. Ag/AgCl)とほぼ同じである。酸化ピーク電流・還元ピーク電流共に電位掃引速度の1/2乗に比例して増加し、電極反応が反応種の拡散律速であることがわかった。すなわち、PAA鎖に修飾された隣接するVK<sub>3</sub>分子間での電子交換が可能であり、それによって膜内での電子伝導が起こっていることが示唆される。これは、酵素と複合化してメディエータ機能を担うために必要な特性であり、20%の修飾率および薄膜化の手法が、応用に適した薄膜物性を与えたといえる。

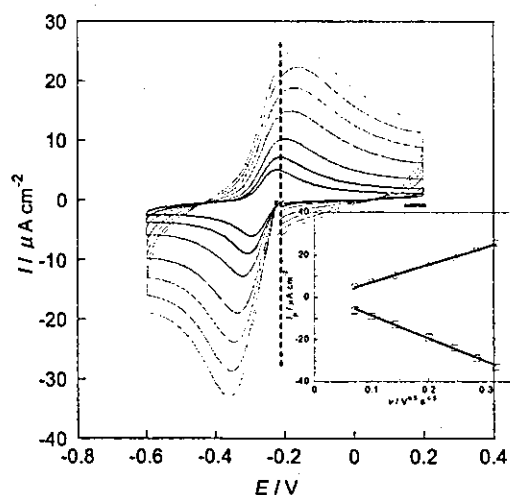


図 C-1 PAA-VK<sub>3</sub> 被覆電極の CV. 挿入図はピーク電流値の電位掃引速度依存性

### C-2. PAA-VK<sub>3</sub>-Dp の特性評価

図 C-2 は、PAA-VK<sub>3</sub> と Dp との複合膜の CV であり、除酸素した PBS 溶液中で測定した。NADH を含まない溶液中での CV (----) は、ほぼ図 C-1 と同じであり、Dp と複合化することによる影響は認められない。NADH を測定溶液中に添加すると、CV の還元電流が減少した。これは、Dp による NADH の酸化と共役して VK<sub>3</sub> が還元された結果、電極反応としての還元活性が低下した結果であり、VK<sub>3</sub> が Dp のメディエータとして機能し得ることを示唆している。一方、酸化電流値は NADH 濃度に比例して増加し、図 A に示した電極-NADH 間の電子移動スキームが機能していることが示された。

さらに PAA-VK<sub>3</sub> 内の電子移動をサポートして大きな電極活性を得るために、カーボンブラック (KB) を添加してみたところ、NADH の酸化電流値が 100 倍以上に増加した。これは、膜内で KB 粒子がネットワーク化して実質的な電極面積を桁違いに向上させたためと考えられる。

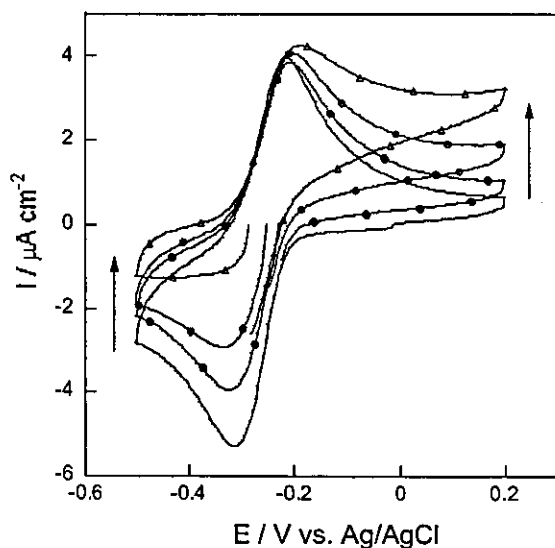


図 C-2 PAA-VK<sub>3</sub>-Dp の CV. NADH の濃度 : 0 mM (----), 0.5 mM (-●-), 1.0 mM (-○-), 2.0 mM (-△-), 5 mM (-▲-), 5 mV/s.

### C-3. PAA-VK<sub>3</sub>-Dp / GDH 酵素 2 層膜の評価

図 C-3 は、前述の KB を含む Dp 膜を GDH 膜で被覆して得た CV である。測定は空気飽和の溶液で行った。一見して、KB を用いていない場合 (図 C-2) よりも 100 倍以上も電流値が増大しているのが分かる ( $\mu\text{A}$  と  $\text{mA}$ )。0.5mM の NADH を添加し、さらにグルコースを加えていくと、酸化電流が増加し、図 A で示したグルコースの酸化反応の進行が確認できた。グルコース濃度に対する触媒酸化電流値の依存性は 10mM 以上で飽和する酵素反応に特徴的なプロファイルとなった。

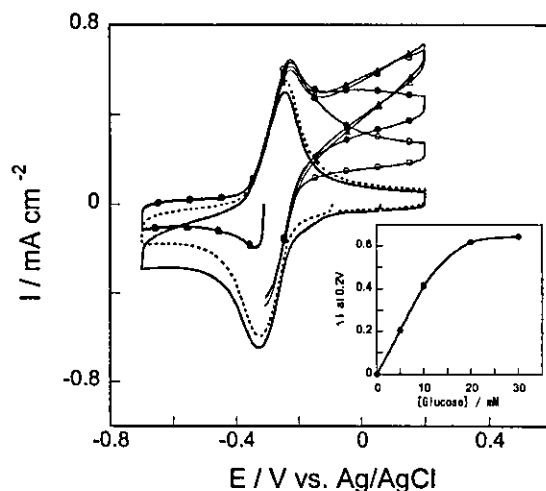


図 C-3 PAA-VK<sub>3</sub>-Dp / GDH 二重膜修飾電極の CV (5 mV/s). 空気飽和 PBS 溶液 (----), 0.5mM NADH 添加 (-.-), + 5.0 mM (-○-), 10 mM (-●-), 20 mM (-△-), 30 mM (-▲-) グルコース. 挿入図は、0.2V における酸化電流のグルコース濃度依存性.

### C-4. PDMS 被覆 Pt のカソード特性

PDMS で被覆した Pt 電極の空気飽和溶液中での CV は、0.25V 付近にピークを有する還元波を示した。開回路電位は約 0.4V だったので、複合酵素アノード (-0.25 V) と組み合わせた場合の起電力は 0.65 V 程度と予測できる。

### C-5. 電池特性の評価

C-3 で評価した酵素 2 層膜によるアノード電極と、C-4 で検討した PDMS 被覆 Pt カソードを組み合わせて、電池を構成した。図 C-4a は外部負荷を  $10\text{k}\Omega$ - $3\text{M}\Omega$  の間で変化させて電池電圧と電流を記録し、電圧-出力プロットで示したものである。測定溶液はグルコース  $10\text{mM}$  と  $\text{NADH}$   $0.5\text{mM}$  を含む空気飽和の PBS で、 $37^\circ\text{C}$  で計測した。開回路における起電力は予想通り  $0.62\text{V}$  であった。最大出力密度は  $14.5\ \mu\text{W}/\text{cm}^2$  ( $0.36\text{V}$ ,  $40.7\ \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) であった。同様の測定を異なる電極で 4 回行ったところ、平均値は  $12.8\ \mu\text{W}/\text{cm}^2$  となり、定量的な再現性も満足できるレベルであった。図 C-4b は、 $150\text{k}\Omega$  の負荷で計測した出力密度の推移である。はじめの 4 日間で初期出力密度の 30% 程度まで低下してしまっただが、その出力値はその後 2 週間以上保持された。現在も計測中である。

### E. 結論

各種バイオセンサで必要とされる出力が  $4\ \mu\text{W}$  程度であるから、今回得られた出力密度  $12.8\ \mu\text{W}/\text{cm}^2$  (平均値) は実用を期待させる値である。しかし  $1\text{cm} \times 1\text{cm}$  は埋め込みを考えると大き過ぎるので、電池サイズの微小化のためにも更に出力密度の向上に取り組む必要性が残されている。今回、Dp の層と GDH の層を積層した構造でアノード電極を構成し、良好な結果を得た。酵素間の関係を効率的に行うためには両酵素が混在し、分子レベルで隣接しているのが望ましいけれども、最適化すべきファクターが多すぎて收拾がつかずに頓挫した。結局 2 層構造に行き着いたわけであるが、最適化した Dp 層を他のデヒドロゲナーゼ層とも組み合わせられる利点は大きいと考えている。それぞれの層の膜厚については (今回は  $4.0\ \mu\text{m}$ )、最適値を求める検討を行う予定である。本年度購入したシミュレーションソフトで理論的に理解しながら、系統的に調べたい。

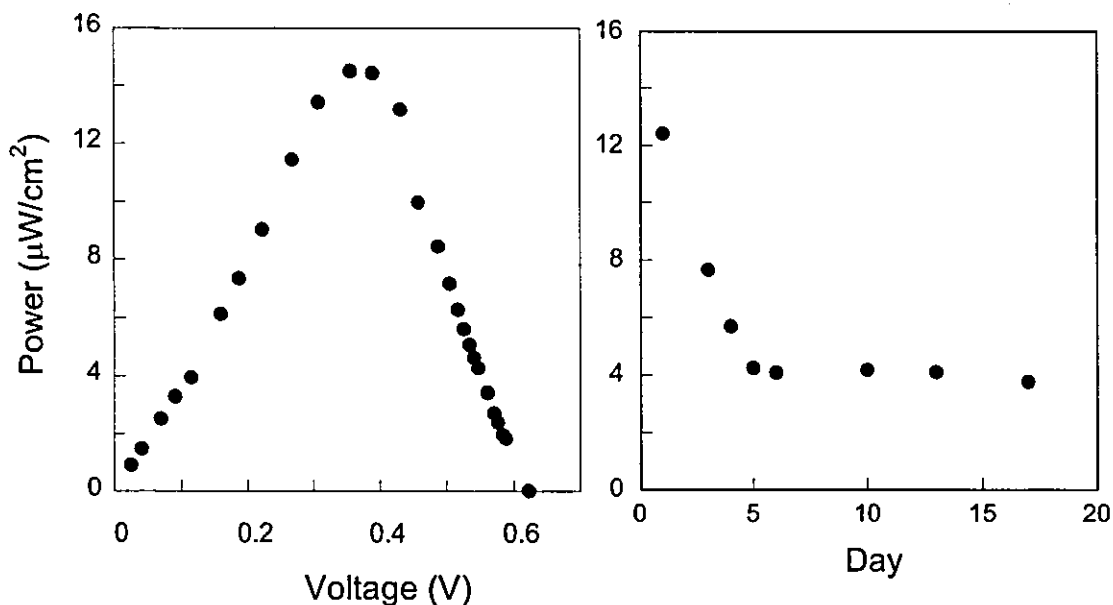


図 C-4 PAA-VK<sub>3</sub>-Dp/GDH アノードと PDMS 被覆 Pt カソードによる電池で得られた出力特性。NADH の濃度 :  $0.5\text{mM}$ , グルコース濃度 :  $10\text{mM}$ ,  $37^\circ\text{C}$ 。

## F.健康危険情報

なし

## G.研究発表

### G-1.論文

1. Miniaturized Enzyme-Based Glucose / O<sub>2</sub> Fuel Cell Using Vitamin K<sub>3</sub> as Electron Mediator. F. Sato, M. Togo, T. Abe, T. Ohashi, I. M. Kamrul, T. Matsue, J. Kosuge, N. Fukasaku and M. Nishizawa, *Technical Digest PowerMEMS 2004*, **2004**, 158-161.
2. バイオ燃料電池の高性能化に向けた電極表面および電極形状のナノ・マイクロ加工（解説記事）. 佐藤冬樹, 都甲真, 西澤松彦, エコインダストリー, **2005**, 3, 印刷中.

### G-2.学会発表

1. Miniaturized Enzyme-Based Glucose / O<sub>2</sub> Fuel Cell Using Vitamin K<sub>3</sub> As Electron Mediator, F. Sato, M. Togo, T. Abe, T. Ohashi, I. M. Kamrul, T. Matsue, J. Kosuge, N. Fukasaku and M. Nishizawa, International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM), (2004年11月24日)
2. Miniaturized Enzyme-Based Glucose / O<sub>2</sub> Fuel Cell Using Vitamin K<sub>3</sub> As Electron Mediator, F. Sato, M. Togo, T. Abe, T. Ohashi, I. M. Kamrul, T. Matsue, J. Kosuge, N. Fukasaku and M. Nishizawa, PowerMEMS 2004, (2004年11月29日)

### G-3.新聞報道

なし

## H.知的所有権の取得状況

特願 2003-309946・西澤松彦, 末永智一, 小菅順一, 深作昇「電子メディエーター, 電子メディエーター固定化電極およびこれを用いた生物燃料電池」・第一化学薬品(株)・平成 15 年 9 月 2 日

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進事業）  
平成16年度分担研究報告書

ナノテクノロジーによる機能的・構造的生体代替デバイスの開発  
Ⅱ ナノ分子操作技術による血液界面代替デバイスの開発研究  
To Surface テクノロジー開発、微細加工工学デバイスの開発

分担研究者 妙中義之（国立循環器病センター研究所人工臓器部 部長）

研究要旨：本研究ではナノテクノロジーを用いることにより新しい循環器用医療デバイスを開発する。ナノサイズの超分子ユニットを集合、接合、生長させることで、医療デバイスの表面構造をナノレベルで自在に操作し、生体適合性やドラッグデリバリー性などの表面機能を極めて柔軟に設計できる革新的技術である。この技術をもとに循環器用医療デバイスを開発する。特に本分担研究では、To Surface テクノロジー開発、および微細加工工学デバイスの開発として、抗血栓性のナノ分子ユニットを表面固定した血液接触デバイス（人工血管、カテーテル、人工弁、心肺補助装置など）を開発する。プロトタイプのパフォーマンスを動物実験により評価し、最終年度までに、ナノテクノロジーから発信された上記の医療デバイスを前臨床段階にまで引き上げ、製品化をめざす。本年度はこのナノテクノロジーがもたらす優れた抗血栓性の発現機序を解析することを目的とし、このコーティングを施した細胞培養皿への線維芽細胞の接着状態について血清タンパク質の吸着が及ぼす影響について検討した。また、対象となる医療機器のひとつである人工肺のうち、特に小児用の人工肺に関して動物実験で検討した。その結果、本ナノテクノロジー技術によりヘパリン表面固定技術を施行することで、ガス交換性能、抗血栓性のいずれにおいても優れた人工肺の可能性を示唆することができた。

A. 研究目的

本研究の目的はナノサイズの分子構造を自在に操作できるナノ分子アーキテクチャー技術を開発し、それをもとに循環器疾患克服のための新しい医療デバイスを開発することである。これまでも医療デバイスが開発

されてきたが、従来の技術ではデバイス表面の生体適合性や抗血栓性に限界があり長期使用時の信頼性が完全ではない。医療デバイスの表面構造を自在に設計して生体適合性を高めることは、循環器疾患の根本治療につながる医療デバイスを開発する上で欠

かすことができない技術である。本研究を通じて、産官学が密接に連携を図りながら集約的に研究開発することで、循環器疾患制圧のための新しい治療戦略の確立をめざす。医療デバイスの生体適合性を高め、循環器疾患の根本治療につながる医療デバイスを開発する意義は大きい。

## B. 研究方法

ナノ分子アーキテクチャー技術を確立し、5年間で臨床段階にまで到達できる革新的循環器用医療デバイスの開発を研究初年度、2年度に引き続いて行った。特に、血液界面代替デバイスの開発の観点から、各デバイスの臨床応用に向けてデバイスの改良と設計の最適化を行った。対象技術としては基材表面と生理活性物質ヘパリンとのカップリング剤の分子鎖長を制御した表面処理法について検討した。

血液凝固反応のカスケードの進行により活性化されるトロンビンはそのインヒビターであるアンチトロンビンⅢと複合体を形成することで不活化され、血栓化を防止できる。ヘパリンはアンチトロンビンⅢと複合体を形成することで、前述のトロンビンとアンチトロンビンⅢとの結合反応を触媒的に促進させ、抗凝血剤として働く。ヘパリン分子内にはアンチトロンビンⅢに対して特異的に結合する活性部位が存在しており、この部位に如何に自由度を与えてやるかがヘパリン固定化技術のキーポイントになる。従来はヘパリンを

共有結合にて固定化させる方法とイオン結合にて固定化させる方法とが用いられてきた。共有結合では長期間にわたり材料表面にヘパリンが存在するものの、ヘパリンの自由度が制限され、その活性が低く十分な抗血栓性を確保することができなかった。イオン結合方式はヘパリンの有するマイナス電荷にプラス電荷を有するアンモニウム塩を結合させて水に不溶化、有機溶媒に可溶化し、材料表面に塗布する方法である。この際、アンモニウム塩とヘパリンのイオン結合は血液中で解離して、ヘパリンが血液中に溶出することによって高い活性を維持していた。しかしこの方法では早期にヘパリンが溶出して材料表面が血栓化することおよびアンモニウム塩も血液中へ溶出するというように安全性に問題があった。

本研究ではアンモニウム塩のアルキル基の炭素鎖長を制御することによって、結合してもヘパリンの自由度、すなわち活性が発揮できる疎水性のアンモニウム塩と、結合したときにヘパリンに自由度を与えず、材料表面から溶出させない疎水性の高いアンモニウム塩とを組み合わせることでヘパリンを結合させることで長期間にわたり極めて高い活性を維持可能な新しいヘパリン固定化技術を開発する。このアンモニウム塩は長鎖ジアルキル基を二本有しており、血液接触時には疎水性の医療機器の基材表面に2本の長鎖ジアルキル基が、血液側にヘパリンの親水性部分が露出することになり、これは長鎖ジアルキル基を内部に有し、血液接触面



に親水性の高いホスファチジルコリン部分が露出している細胞膜の構造に類似している。この微細構造もこのナノテクノロジー技術が他に類を見ない、非常に優れた抗血栓性を有していることの一要素となると考えられる。

#### 1) ナノ分子アーキテクチャー表面処理技術の効果発現メカニズムに関する研究

血液接触面への血清タンパク質吸着状態に関しては、表面処理したポリスチレン製 ELISA プレートにウシ血清を充填し、37℃、24 時間静置後、器材表面に吸着した血清タンパク質の質量を計測し、また電気泳動にてその分子量を計測した。

#### 2) 高信頼性人工心臓の開発

本表面処理技術を応用した人工心臓が、システムに組み込んだ際のポンプ機能、ガス交換機能に影響することなく、長期使用のための抗血栓性ナノ操作が可能かどうかを動物実験により確かめた。この表面処理技術を使用することにより長期耐久性および抗血栓性に優れた小児 ECMO システムの実現を目標として、新規開発した人工肺 Platinum Cube NCVC を用いたシステムで動物実験を行った。仔ヤギ (20~30kg) を用いて頸動脈送血および頸静脈より右心房脱血の部分体外循環モデルを作成した。人工肺は Platinum Cube NCVC 2000 (外部灌流型、特殊ポリオレフィン中空糸膜、膜面積 0.4 m<sup>2</sup>、充填量 45ml)、遠心ポンプは Jostra 社

RotaFlow<sup>®</sup>を採用した。ポンプ、送脱血管および回路はすべて表面処理を施したものを使用した。以下の諸条件で 24 時間急性実験 (n=2) および慢性実験 (n=2) を行った。

測定条件は血流量 (Q) = 1.0~1.5 L / min (50 ml/kg/min)、ガス血流量比 (V/Q) = 1、3、5 とし、測定項目としては酸素移動量 (VO<sub>2</sub>)、炭素ガス移動量 (VCO<sub>2</sub>)、血小板数、ACT、APTT、血中ヘパリン濃度を測定した。抗凝血療法としてはヘパリン等の抗凝血剤は不使用、慢性実験では送脱血管挿入時と圧ライン維持のため極少量のヘパリンを使用した。

#### C. 研究結果

生体の細胞膜と同様に 2 本のアルキル鎖を有する構造を基本とし、ナノメートルオーダーでこのジアルキル基の鎖長を制御することにより、先端に結合させた生理活性物質、ヘパリンを親水性環境下であたかも血中に溶出したような状態でその活性を十分に発揮させるとともに、実際にはヘパリンが血中に溶出して行くことなく材料表面に留まるための疎水性環境をも同時に維持する技術について検討を行った。人工肺と血液ポンプを用いた心臓・肺機能の代替装置を成ヤギに装着し、慢性動物実験を継続できた。

#### 1) ナノ分子アーキテクチャー表面処理技術の効果発現メカニズムに関する研究

低濃度の表面処理群では、無処理群と比べて表面に吸着したタンパク質量は少なかったものの、高濃度処理群では無処理群より吸着したタンパク質量が多い結果となった。また、これら吸着したタンパク質は、無処理群ではアルブミン分画を含む 68.5、64.7、61.0 および 54.9 kDa にバンドを形成する分画が観察されたのに対し、表面処理群では同様の分画が観察されず、より低分子領域の 17.2 kDa 以下に分画を形成していた。

血液接触面への線維芽細胞の接着性に関しては、表面処理したポリスチレン製培養皿にヤギ由来線維芽細胞を播種し、皿底に接着、伸展する状態を経時的に観察を行った。対照群の無処理培養皿では、線維芽細胞は、12 時間後ではほぼすべての細胞が基質面に接着し、仮足を伸展させた形態で観察されたが、一方、表面処理を施した培養皿では、播種後 12 および 24 時間後においても基質面に接着する細胞は観察されず、播種時の球形形態を保持したままであった。また、これらの結果は、フィブロネクチンおよびビトロネクチンを添加した条件においても変化は認められなかった。

これらにより、本表面処理の抗血栓性機序には、生体との界面における直接的な細胞接着阻害作用が大きく関与していると考えられた。

## 2) 高信頼性人工心臓の開発

24 時間の急性実験では灌流初期の表面からのヘパリン溶出を疑う血中ヘパ

リン濃度の上昇は認めなかった。また慢性実験では全実験期間 (67 および 50 日間) にわたって抗凝血療法を行わなかったにもかかわらず血小板数、凝固機能は生理的範囲内を保つことができた。6 週間後頃より人工肺血液流入部側表面の中空糸束に遠心ポンプに起因すると思われる血栓の付着を認めたが、内部での血栓形成は観察されなかった。また、ガス交換能は実験期間中にわたって良好に経過した。

Platinum Cube NCVC 2000 と表面処理を施した遠心ポンプ、送脱血管を組み合わせた本システムは抗血栓性に優れ、ヘパリン溶出などの危険性が無く長期にわたり良好なガス交換性能を維持し、小児用 ECMO として高い安全性と耐久性を持つことが明らかとなった。この結果、この人工肺は小児の心臓手術、重症呼吸循環不全に対する ECMO に、安全かつ有効に使用できる可能性が示唆された。

## D. 考察

細胞培養実験の結果から、本コーティング法の抗血栓性機序には、培養細胞の初期接着過程の顕著な抑制が関与していると考えられた。これらの結果をふまえ本コーティングに対する細胞接着時の細胞膜上接着蛋白の動態について今後も検討を行い、さらに本コーティングの用途をより広げる目的で、様々な血液接着デバイスへの応用を検討し、特に現在では抗細胞接着性に優

れた人工血管の開発などを行う予定である。

人工肺に関しては、いずれの試験人工肺においても血漿漏出等の問題点は認められず、長期間にわたり安定したガス交換性能を示していた。また、小児用の人工肺としての観点から考えると、表面からのヘパリンの溶出が極めて低く押さえられていることを示唆するデータが得られ、優れた人工肺となりうる可能性が高まった。

本研究は長期ECMOによるバイパス期間中、ヘパリンを含む抗凝固療法を一切行わないという極めて厳しい条件下で施行したにもかかわらず、安定した状態で連続灌流が可能であった。従来のイオン結合型のヘパリンコーティングは、ヘパリンの溶出がその抗血栓性発現の機序とされ、コーティングから徐放されるヘパリンによるACTの延長や、それに伴う出血傾向も観察され、長期耐久性に問題を有していた。T-NCVC<sup>®</sup>も従来の分類からするとこのイオン結合型に属するが、上記のような血液中へのヘパリンの溶出は検出可能閾以下という極めて軽微なものであり、ACTの延長も全く観察されないにも関わらず、極めて優れた抗血栓性を長期間示すという従来のイオン結合型とは全く異なる特性を有することがわかった。共有結合型のヘパリンコーティングは、従来から長期耐久性に優れる抗

血栓性を有するものが存在するが、T-NCVC<sup>®</sup>はこれらに比較しても同等以上の抗血栓性を有すると考えられた。共有結合型はそのヘパリンコーティング工程が複雑であるため、コーティング対象に制限があり、かつ高コストであるという短所を有するものが多いが、T-NCVC<sup>®</sup>は非常に多様な材料、デバイスへのヘパリンコーティングを簡便かつ低コストで施行し得るといった長所も有している。さらに本研究にて明らかになったT-NCVC<sup>®</sup>の特徴として、血液成分、特に血小板への影響が極めて軽度であることがあげられる。従来のヘパリンコーティングを施行したシステムでは、長期灌流を施行した際に、血小板の著しい消費は不可避であり、臨床使用上の大きな問題点の一つであった。従って、本ECMOシステムを使用した長期の動静脈バイパスにおいて、血小板の消費が極めて軽度であるという特徴は、臨床使用上非常に高い有用性を持つものと考えられた。

#### E. 結論

本研究により、この技術は、優れた細胞接着の抑制性能も有しており、今後諸種のデバイスへの応用の可能性が示唆された。また、本ナノテクノロジー技術によりヘパリン表面固定技術を施行することで、ガス交換性能、抗血栓性のいずれにおいても優れた人工肺の可能性を示唆することができた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Mizuno T, Tatsumi E, Nishinaka T, Katagiri N, Oshikawa M, Naito H, Shirakawa Y, Tsukiya T, Homma A, Takewa Y, Takano H, Kitamura S, Taenaka Y: Observation of alveolar fibrosis in the goat following up-to-five-months venoarterial bypass using an extracorporeal membrane oxygenation. JAO, in press, 2004.
- 2) 水野敏秀, 巽 英介, 西中知博, 片桐伸将, 佐藤正喜, 田中秀典, 酒井一成, 松田智昌, 武輪能明, 築谷朋典, 本間章彦, 北村惣一郎, 高野久輝, 妙中義之: 長期 VA-ECMO が生体に与える影響の病理組織学的検討。膜型肺, 27: 53-56, 2004。
- 3) 白川幸俊, 西中知博, 巽 英介, 片桐伸将, 川瀬浩二, 松田智昌, 田中秀典, 佐藤正喜, 妙中義之: T-NCVC coating 小児用人工肺 (Platinum-Cube NCVC 2000) を用いた安全性についての検討。膜型肺, 27: 46-49, 2004。

### 2. 学会発表

- 1) Katagiri N, Funakubo A, Tsukiya T, Tatsumi E, Taenaka Y, Takewa Y, Homma A, Fukui Y, Takano H, Kitamura S. Investigations of

distributions of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> concentration in a blood layer and gas transfer performance of a partial oxygenator model with computational fluid dynamics (CDF). ASAIO(50) Washington DC 6.17-19, 2004

- 2) Mizuno T, Tatsumi E, Nemoto Y, Saito S, Okamoto Y, Tsukiya T, Homma A, Takewa Y, Kitamura S, Takano H, Taenaka Y. A novel tissue-compatible materials for coating an implantable artificial heart outer surface. ASAIO(50), Washington DC 6.17-19. 2004
- 3) Tatsumi E, Taenaka Y, Takewa Y, Katagiri N, Mizuno T, Tsukiya T, Homma A, kamimura T, Takano H, Kitamura S. Recent progress in the development of heparinless ECMO systems at the National Cardiovascular Center of Japan. ASAIO(50) Washington DC 6.17-19. 2004
- 4) Tatsumi E, Taenaka Y, Katagiri N, Tsukiya T, Takano H, Kitamura S, Sakai K, Matsuda T. Development of an ultra-compact heart-lung assist device as the next generation cardiopulmonary support system. HEART FAILURE & ROTARY BLOOD PUMP SUMMIT Cleveland, 10.7-10. 2004
- 5) Mizuno T, Tatsumi E, Nemoto Y, Saito S, Okamoto Y, Tsukiya T,

- Takewa Y, Homma A, Kitamura S, Takano H, Taenaka Y. A novel development of a newly covering material for the destination therapy with implantable VAD system. HEART FAILURE & ROTARY BLOOD PUMP SUMMIT. Cleveland 10.7-10. 2004
- 6) Tsukiya T, Tatsumi E, Nishinaka T, Katagiri N, Takewa Y, Homma A, Taenaka Y, Takano H. Development of the integrated heart lung assist devices. The International Symposium on Bio-Inspired Systems. kitakyushu 1.23-24. 2004
- 7) 水野敏秀、巽 英介、西中知博、片桐伸将、佐藤正喜、田中秀典、酒井一成、松田智昌、武輪能明、築谷朋典、本間章彦、北村惣一郎、高野久輝、妙中義之。5ヶ月以上連続使用可能な長期耐久性、生体適合性に優れた T-NCVC コーティング PCPS システムの開発。PCPS (経皮的心肺補助装置) 研究会 博多区 3.6. 2004
- 8) 片桐伸将、舟久保昭夫、築谷朋典、巽 英介、妙中義之、武輪能明、本間章彦、福井康裕、高野久輝、北村惣一郎。人工肺用中空糸膜充填体モデルの血中ガス濃度分布に関する血液ガス反応を組み込んだ CFD 手法による解析。生体医工学 シンポジウム 2004 札幌市 9.28-29. 2004
- 9) 太田 圭、片桐伸将、築谷朋典、本間章彦、巽 英介、妙中義之、武輪能明、高野久輝、松田智昌、酒井一成、田中秀典、佐藤正喜、ヘパリンコーティング人工肺 Platinum Cube NCVC シリーズ開発の現状-Platinum Cube NCVC 2000 の慢性動物実験による検討-、膜型人工肺研究会 (33) 新宿区 10.1 2004
- 10) 片桐伸将、舟久保昭夫、築谷朋典、巽、妙中義之、武輪能明、本間章彦、福井康裕、高野久輝、北村惣一郎。数値流体解析による中空糸膜径が外部灌流人工肺の酸素・炭素ガス濃度分布に与える影響の検討。膜型人工肺研究会 (33) 新宿区 10.5. 2004

#### H. 知的財産の出願・登録状況

本年度は特になし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進事業）  
分担研究報告書

III. ナノ生化学系による非細胞性代謝機能代替デバイスの開発研究  
装置化へ向けた各種素材および基盤技術の統合

分担責任者 絵野沢 伸 国立成育医療センター研究所 移植・外科研究部 室長

研究要旨：生体組織の構造的機能的特徴は区画間の協調性を保った物質移動である。この原動力としては拡散、吸着などの物理現象と、酵素やトランスポーターといった機能性高分子と高エネルギー結合を原動力とする化学的な力が作用している。人工材料のみを用いた区画化では、物理現象に基づく物質移動のみが行われ、これを利用し成功した例は人工透析である。しかしながら、本来の生体機能である選択的な能動輸送ではない為に、必要物質までも除去するという無駄が行われている。本研究の目的は、ナノレベルの機能性高分子を人工膜と組み合わせることで再構築し、本来の生体組織を模した機能膜を作成することにある。昨年度までの研究により、リン脂質と有機アニオントランスポーターMDR1を組み合わせたプロテオリポソームを構築し、エネルギー依存性の基質輸送ができることを確認した。本年度は、その輸送効率の上昇をめざした脂質成分の最適化及び輸送エネルギーである ATP の再利用系との融合を検討した。中性リン脂質であるフォスファチジルコリン単独でもプロテオリポソームは形成でき、活性も検出できるが、生体膜と同様にコレステロールを混合させることにより、その活性は1.65倍まで上昇することがわかった。一方、化学エネルギー源としての ATP を再利用し、膜の自律性を高める技術に一步乗り出した。高エネルギーリン酸化合物のポリリン酸とポリリン酸キナーゼを組み合わせることによって、MDR1の基質輸送がADPの存在下で行われ得ることを確認した。一方、長期人工透析の副作用として問題になっている透析アミロイドーシスの原因物質、 $\beta$ -2-microglobulinの除去を目的として生理的リガンドである Megalinの機能部位のリコンビナントタンパクの合成が完了した。同じくリコンビナントで作成した $\beta$ -2-microglobulinとの結合の確認などを行った。最後に機能性膜構築への技術的要素を抽出し、今後の方針や問題点について考察を加える。

A. 研究目的

肝・腎機能がそなわれた患者に施される血液浄化法は、限外膜を使った人工透析が主流である。人工腎臓としての透析技術の研究は1900年代から行われており、現在にいたるまで様々な形を変えてきた(表1)。しかし、生化学反応が複雑に組み合わさった臓器の補助としては、物理的作用に頼る人工透析では

性能が十分とはいえず、特に様々な物質の代謝を行う肝臓の機能代替はまだ達成できていない。これを克服するためにリガンド固定カラムなどの人工材料による毒性物質の選択的除去が図られて来たが、それでも静電相互作用による吸着などの物理化学的作用に頼るところが大きく、選択的・能動的な物質除去能の付与は不十分である。そこで、生きた細胞

をそのまま体外血液浄化に利用し、選択的・能動的物質除去能を高めたハイブリッド人工臓器の開発が取り組まれている。これにより代謝機能は向上するものの、細胞利用によるウイルス感染のリスクや莫大なコストなどの問題があり、いまだに臨床例もわずかで、今後の汎用化は困難と考えられる。そこで、我々は細胞の代わりに、特定の細胞機能を持つ人工細胞（リポソーム）を用いた血液浄化システムの開発を始めている。リポソームは化粧品に配合されるなど、すでに実用化がなされており、今後の開発の発展により高度な品質管理や量産化もねらえると考えている。このように細胞の必要要素であるナノレベルの生理機能分子を抽出し、再構築することを目的としている。（表1）。

現在行われている血液濾過透析や血漿交換を組み合わせた血液浄化法は、劇症肝炎をは

表1 代謝系人工臓器開発のあゆみ

人工臓器		
1913	Abel	コロジオン膜を用いて血液の体外循環による透析を実験
1938	Thalhimer	セロファン製透析膜を用い透析効率向上
1943	Kolff	回転円筒型透析装置を開発、臨床へ
1960	Kill	Kill型人工腎臓の完成
1967	Lipps	中空糸型の人工腎臓の開発
1976	Opolon	PAN膜による透析の実施
バイオ人工臓器		
1956	杉江・堀	イヌ肝灌流システムとイオン交換樹脂の併用
1958	三上・水戸	イヌ肝スライスを用いた装置の試作
1958	Otto	ブタ摘出肝を用いた体外灌流の開発
1994	Rozga	ブタ肝細胞を付着させたマイクロキャリアと中空糸膜、活性炭による肝疾患患者の治療
1994	Sussman	ヒト肝細胞を固定した中空糸膜を用いた治療の開発

じめ様々な疾患に対する治療法の基幹といえる。しかしながら、ひとりの患者に対し大量の血漿が必要であることや亜急性劇症肝炎では昏睡からの一時的な覚醒効果はみられるも

の最終的な救命率の向上は得られないなど問題点も多い。この血液浄化法の限界の背景には、中空糸カラムによる血中物質の除去が単に膜の孔径にのみ依存し、生体にとって要不要の別なく排除してしまうという原因が考えられる。病期の体液には為害性物質だけでなく疾患に反応して治癒を促す物質も存在し、これらも透析・濾過によって排除されてしまう。理想的な血液浄化は生体が行っているように毒性物質のみを選択的に取り除くシステムである。

そこで我々は細胞表面に存在し細胞内外の物質輸送を行うチャンネルタンパク分子を人工膜に固定化するという新規な発想を検討している。薬物代謝酵素系や細胞膜上のチャンネルタンパクは分子種群をなし、新しい分子が続々と遺伝子レベルで同定されている。これらの機能性タンパクは、それぞれ異なった基質特異性を有するので肝・腎不全の病態を改善するために必要な分子種を選び出すことができる。こうして再構成された人工合成膜であるナノ代謝代替デバイスに生きた細胞のように統合した選択的・能動輸送を行わせることが我々の目標である。

## B. 研究方法

### 1) ATP再生系を利用したMDR1リポソームによる基質取込

MDR1タンパクは植田分担者（京都大学大学院農学研究科）から供与を受けたバキュロウイルス-昆虫（sf9）細胞系で強制発現させた細胞ペレットから、昨年の報告書に記載の方法で精製した。回収率は1mlの細胞ペレットから約150μgの精製標品が取れた。この精製標品を同じく植田分担者が確立した調製法に

従い、プロテオリポソームを調製した。質量比で脂質（フォスファチジルコリン）10：タンパク 1 となるように混合し、超音波槽で氷冷しながら 30 秒超音波をかけた。次いでタンパクに残留している界面活性剤（ $\beta$ DDM）を SM2 バイオビーズ（Biorad）で除き実験に供した。

ポリリン酸キナーゼは黒田分担者（広島大学大学院先端物質科学研究科）からプラスミドの供与を受け、大腸菌に発現させ常法に従い精製の後に使用した。

MDR1 プロテオリポソームの放射性 verapamil 取込能の測定は、1mM ATP、4mM  $MgCl_2$ 、40  $\mu$ M verapamil (74kBq/assay) で行った。ATP 再生系と組み合わせた場合は、ATP の代わりに 1mM ADP と 2mM ポリリン酸、20  $\mu$ g/ml ポリリン酸キナーゼ (0.2  $\mu$ g/assay) で行った。アッセイ当たりの MDR1 タンパク量はおよそ 0.5  $\mu$ g 使用した。リポソームの分離はゲル濾過 (Sephacryl S4B) で行い、リポソーム画分の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

## 2) $\beta$ -2-microglobulin- megalin 系の構築.

### 2) -1. $\beta$ -2-microglobulin 発現ベクターの作製と精製.

実験系としての便宜を考え、また市販品で得られないことからラットの同タンパクを作成した。

Glutathione-S-transferase (GST) Gene Fusion System を用い、T7 プロモーター、カナマイシン耐性遺伝子および GST を含んだ環状プラスミド pET-42(+) (5.93kb) の T7 プロモーターの下流に、ラット  $\beta$ 2-M アミノ酸をコードする DNA を組み込むことにより大量発現系を作製した。培地中に

isopropyl-1-thio-beta-D-galactoside (IPTG) を加えることにより、T7 プロモーターを負に制御している lac リプレッサーを外した。すなわち、リプレッサー部位に RNA ポリメラーゼが結合し、T7 プロモーターはその下流に位置する  $\beta$ 2-M 遺伝子の発現を強く活性化し、目的タンパク質が大量に産生されることになる。細胞破碎液からの GST- $\beta$ 2-M 融合タンパク質の精製は Grutathion Sepharose 4B ビーズにより行った。トロロンビンの認識配列が pET ベクターのマルチクロニングサイトの上流側に組み込まれているため、アフィニティー担体に結合した GST- $\beta$ 2-M 融合タンパク質を、トロロンビンを用いて GST から  $\beta$ 2-M タンパク質を切り出すことができるというものである。

### 2) -2. Megalin Cluster II 発現ベクターの作製と精製.

Megaline は膜タンパク質であるため、大腸菌での大量発現は困難である。そこで、バキュロウイルスを用いたタンパク質発現系の構築を試みた。また、 $\beta$ -2-microglobulin がラットのものであるため、Megaline 発現系においてもラット遺伝子を用いた。

Invitrogen 社の Bac-N-Blue Baculovirus Expression System とトランスファーベクター pBlueBacHis2 を用いた。Bac-N-Blue DNA は lacZ の 3'側を含む線状の AcMNPV DNA で lacZ の 5'側を含むベクターと組換えが起こると、X-gal の存在下で青色プラークを生じるため容易にスクリーニングができる。AcMNPV は約 130kb の 2 本鎖 DNA を含み、目的遺伝子を直接このウイルス DNA に組込むことは非常に困難なため、トランスファーベクターに目的遺伝子を組込んだ後、AcMNPV のポリヘドリン遺伝子と目的遺伝子を相同組換えによ



り置換した。ベクターのクロニング部位の両側にウイルス DNA のポリヘドリン遺伝子あるいは lacZ 遺伝子のフラグメントと同一の塩基配列があり、Bac-N-Blue とトランスファーベクターと同時にトランスフェクションすることにより相同組換えが起こり、目的遺伝子を含んだ組換えウイルスを生じた。本系では N 末端に 6×His タグをもつタンパク質を発現するため Ni-NTA アガロースにより精製を行った。

## 2) -3. ウェスト-ウェスタン法による $\beta$ -2-microglobulin- megalin 相互作用の検討.

放射性 [ $^{35}$ S] cysteine-methionine で標識した  $\beta$ -2-microglobulin と膜にトランスファーした Megalin との結合を RI で検出する方法と、逆に  $\beta$ -2-microglobulin を膜にトランスファーし、Megalin と結合させた後、抗 Megalin 抗体で検出する 2 通りの方法を行った。放射性標識は、大腸菌培養の際に [ $^{35}$ S] cysteine-methionine を加え、その後は常法に従って精製して用いた。

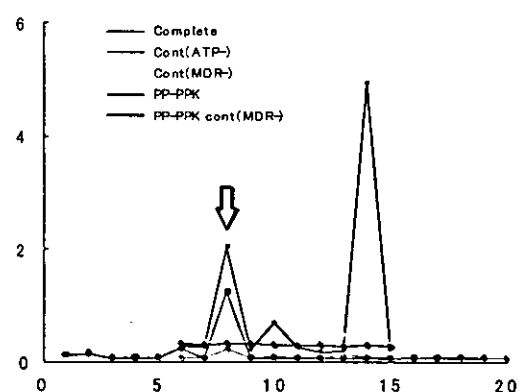
## C. 研究結果

### 1) ATP 再生系を利用した MDR1 リポソームによる基質取込.

実験に先立ち、ポリリン酸-ポリリン酸キナーゼ系が働いているかをルシフェラーゼ反応で調べた。全量 10  $\mu$ l の反応系で、2mM ポリリン酸、1mM ADP、4mM MgCl<sub>2</sub> で反応させると、30 分で 14nmol、60 分で 34nmol の ATP が産生された。次いで、種々の条件下で verapamil の取込能を調べた。図 1 の矢印で示される位置にリポソームは溶出される。この部分の放射活性を調べると、完全な反応系では図中赤で示されるように、放射活性が検出されるが、エネルギー源である ATP を除いた

場合や MDR1 を含まないリポソーム単独では全く放射活性はなく、MDR1 によるエネルギー依存的な特異吸収であることがわかった。一方、ポリリン酸-ポリリン酸キナーゼを用いた ATP 再生系下でも良好な取込が観察された (図中青線)。この場合も MDR1 を含まないリポソームでは取込がないことから (紫線)、エネルギー依存的な輸送が行われたものと推察された。

図 1 ポリリン酸-ポリリン酸キナーゼ系を用いた MDR1 リポソームによる基質取込能。リポソームはゲル濾過によって分離した。矢印はリポソーム溶出位置。



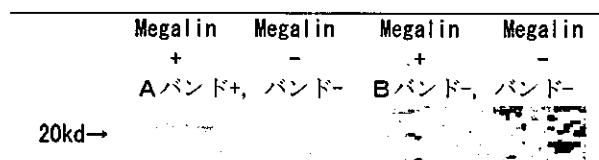
### 2) $\beta$ -2-microglobulin- megalin アフィニティ-吸着系の確立.

$\beta$ -2-microglobulin のリコンビナントタンパクの精製標品は、ウェスタンブロット法で 18kD と 14kD の 2 本のバンドが検出された。これは pET ベクターのマルチクロニングサイトの上流側にトロンビンの認識配列が 2ヶ所あるためと考えられた。しかしながら、特に実験的に支障はないと考えられたので、これ以上の切り出し、あるいは精製は行わないことにした。一方、Megalin cluster II は、ウェスタンブロット法で約 20kD の His-Megalin の

バンドを確認した。His タグは精製の便宜の為に組み入れられているペプチド配列であり、本来のタンパクには存在しないが、低分子であり、また多くの他の組換タンパク質の機能や分布に影響を与えるおそれが少ないため、His タグを融合タンパク質から切断する操作は行わなかった。

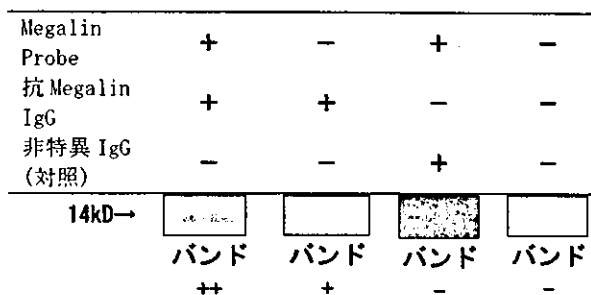
図2は、放射標識したβ-2-microglobulinを用いた Megalin cluster II との結合の確認である。Megalin を発現させた sf9 細胞から粗精製したタンパク画分を電気泳動した後に、放射化β-2-microglobulin と反応させたところ、Megalin cluster II の位置である 20kD に、放射活性がバンドとして検出された。Megalin を発現させていない sf9 細胞のタンパクではこのバンドは見出されなかった。

図2 A: His-Megalin 融合タンパク質を SDS-PAGE により分離した後、PVDF メンブレンに転写した後 [<sup>35</sup>S] β-2-microglobulin と hybridization させた。B: His-Megalin 融合タンパク質を SDS-PAGE により分離した後、PVDF メンブレンに転写した後 [<sup>35</sup>S] で標識していない β2-M と反応させてから [<sup>35</sup>S] β-2-microglobulin と hybridization させた。Megalin + は Megalin を発現させた Sf9 から精製したタンパク質。Megalin - は発現させていない Sf9 から抽出したタンパク質。



次の図3に示す結果は、逆にβ-2-microglobulin を電気泳動した後、Megalin と反応させ、その Megalin に対する抗体でバンドを検出したものである。この場合も、Megalin を反応させた場合に強いバンドが検出された。

図3 β-2-microglobulin タンパク質を SDS-PAGE により分離した後、PVDF メンブレンに転写し、プローブタンパク質である Megalin cluster II と一晩 hybridization させた後、抗プローブタンパク質の一次抗体と一時間反応させてから二次抗体の抗ウサギ IgG-HRP と反応させ、ECL Western Blotting Detection Reagents を用いて化学発光させた。



#### D. 考察

臓器機能の代替という発想の歴史は古く、人から人あるいは動物から人への移植という形で非常に原始的な手術から試みられてきた。外科的には20世紀前半の Alex Carrel の血管縫合手技の確立が革新的なステップアップが行われ、次いで1950年代からの移植免疫学の発展と1980年代に始まるカルシニューリン阻害という薬効を有する免疫抑制剤の登場で移植は大きく普及した。一方で、人工物による代替という考えも1900年代初頭から試みられてきた(本文および表1参照)。この技術分野の革新は、1970年代の限外膜の中空糸化技術である。また、ディスプレイプラスチック製品や血液ポンプ、あるいは抗血栓薬といった周辺技術の進歩によって、腎不全については人工透析という優れた治療法があたりまえのようになされている。しかしながら、前者の移植医療ではドナー不足という主に社会的要因による問題が、また透析では長期透析患者の透析アミロイドーシスという問題が浮上している。後者は明らかに現在の人工透析技術の限界を示しているが、前者も人工臓

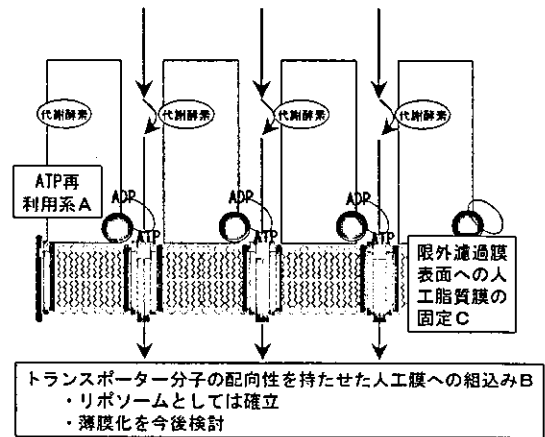
器の進歩が問題解消の鍵になると考えられる。特に、肝臓などの代謝臓器は移植後にある程度機能をサポートすることによって、移植直後に種々の外的要因によって傷害された臓器の負担を軽減し、再生を補助することが可能と考えられる。実際、腎移植では、術直後に完全な機能が復活することはむしろ稀で、透析を行うことによって移植腎が機能回復することを待つことができる。肝移植の場合は、血漿交換と血液濾過透析を組み合わせた血液浄化法が機能補助手段とされているが、それだけでは十分とはいえ、肝細胞を組み込んだバイオ人工肝の開発がなされている。しかしながら、細胞組込型機器は使用方法の難度が高く、品質管理が難しいなど、実用化には数々の障害がある。そこで本研究では細胞中の必要機能のみを抽出、再構成して血液浄化機能を発現させようとするものである。

そこで、本研究のエンドポイントと考える機能性膜の構築に必要な技術要素を図4にまとめた。図内に示すように、主要点は、a) ATP 再利用系、b) 配向性を持ったトランスポーターの人工膜への組み込み、c) 限外濾過膜表面への脂質人工膜の固定、である。これらのポイントに沿いながら、本年度成果を概観してみる。

まず、昨年度まではATPは系外からの供給を考えていたが、より自律的な機能をデバイスに付与する為、利用され生成したADPを、ポリリン酸を基質とするポリリン酸キナーゼによりATPとする系をMDR1と組み合わせた。ATP供給系は今までに幾つか確立されているが、それらは非常に高価かつ不安定な高エネルギーリン酸結合の化合物を利用している。一方、ポリリン酸はATPと同様の高エネルギ

ーリン酸結合によって結合した無機ポリマーで、リン酸を加熱して合成できる単純で非常

図4 機能性膜の構築に向けて必要とされる技術要素。A；ほぼ確立、B；半分程度確立、C；今後の課題



に安価な化合物である。ポリリン酸は多くの生物から検出されるものの、長い間分子生物学的な解析は行われてこなかった。しかし1990年代に入り、ポリリン酸合成酵素の遺伝子(ppk)がスタンフォード大学のArthur Kornberg研究室でクローニングされ、分子生物学的な解析が進みだした。その結果、ポリリン酸を作れない大腸菌変異株は定常期に死滅しやすく、緑膿菌のppk変異株では運動性が悪く感染力が低下することが分かってきた。このようにポリリン酸は特にバクテリアが過酷な環境になった時に必要とされる生命エネルギーの塊であることから、うまくすれば非常に安価なATPの代替として働かせることができる魅力的な分子として注目されている。大腸菌のポリリン酸合成酵素は、ATPの末端のリン酸基をポリリン酸に転移して約700個のリン酸がつながったポリリン酸を合成し、また逆に過剰のポリリン酸とADPが存在すると、大腸菌のポリリン酸合成酵素はATPを生産する。そこで、この系と昨年度までに確立

したMDR1によるATP依存性の基質取込系にポリリン酸-ポリリン酸キナーゼ系を組み合わせ測定を行ったところ、前述のようにATP再生産系はMDR1活性の発現に十分寄与できることがわかった。

今後の発展としては、黒田分担者の報告に詳述されているが、不溶性ポリリン酸の応用が考えられる。ポリリン酸はある種の状況下で不溶性になる。この不溶性ポリリン酸塩は半透膜を通り抜けることがないので、タンパク質-人工基材が複合した機能性膜を動かすために可溶性ポリリン酸よりも有効であると考えられる。本年度、グルコースキナーゼのATP消費系に於いて、不溶性ポリリン酸顆粒で活性測定をした結果、可溶性のポリリン酸に比べて速度は1/3に低下するものの、ATPを供給するエネルギー源になりえることがわかり、次はMDR1プロテオリポソームへの応用が期待される。

一方、MDR1活性における脂質環境については、久保井分担者と植田分担者が詳しく調べた。最近多くのABC蛋白質が脂質2重層中のコレステロールと相互作用することが示唆されている。そこで、さまざまな濃度のコレステロールを含有する人工リポソームを調製したところ、コレステロール濃度が30%に達するまで、濃度依存的にATP加水分解活性を増大させることがわかった。また、誘電分散解析法によっても負電荷脂質やコレステロールの添加による膜流動性の抑制が活性向上に重要かつ熱ストレスを維持することがわかった。

MDR1を組み込んだリポソームに関して言えば、研究の初期2年間で活性の発現や生理的配向性と逆向きのリポソーム内腔に向けた

基質移動の確認ができた。また、本年度、コレステロールの存在が、活性増加や安定化によく役立つこともわかった。今後、リポソームから、機能性人工膜へと形態を変えるためには、図4に示したように、限外膜への脂質膜コーティングと、その場合の分子配向性の均一化を実現しなくてはならない。次年度以降の重点テーマと考えている。

本プロジェクトにおける輸送ターゲットの一つであるビリルビンにアフィニティーのある代表的トランスポーターのMRP2はMDR1よりも膜貫通領域が多い複雑な構造を有し、活性を保ったまま精製することは非常に困難である。そこで、本研究の当初に発見した新規なビリルビン輸送トランスポーターであるABCA8について、藤村分担者は生理学的意義と大量生産系の確立という両面から検討を続けている。生理学的意義としては、本年度は胆管結紮で同タンパクの転写が促進されることをリアルタイムPCRによって見出した。一方、コレステロール負荷では転写活性の増加は起こらず、抱合型ビリルビンが増加する病態でのみ転写が誘導され、この排出に深く関わっていることが示唆された。さらに、輸送反応のKineticsやビリルビン輸送リポソームの構築、また将来的には結晶構造解析を行うことも視野に入れ、パキキュロウィルスによるABCA8タンパクの大量生産系の構築を行っている。

また、本研究では、透析アミロイドーシスの原因物質である $\beta$ -2-microglobulinを生理的リガンドであるMegalinを利用したバイオ血液浄化を検討している。その研究ツールとして、リコンビナントの $\beta$ -2-microglobulinおよびMegalin cluster II部位の作成を試み、本年度