

G-3 新聞報道

なし

H. 知的所有権の取得状況

「なし」

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器調節機能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 西澤松彦（東北大学大学院工学研究科 教授）

末永智一（東北大学大学院環境科学研究科 教授）

研究要旨：

超小型心臓ペースメーカー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。昨年度はビタミン K₃/ ジアフォラーゼ / グルコースデヒドロゲナーゼからなるグルコース酸化極（アノード）を用いたバイオ燃料電池の体液発電や小型燃料電池の作製を行ってきた。本年度は更なる電極性能の向上のためにメディエータポリマーの合成を行うことで、飛躍的な性能の向上を達成し、さらにマイクロ流路を用いた小型燃料電池についても検討を進めた。また、酵素を用いたカソード、耐久性向上のための生分解性高分子を用いた時差式発電についても検討した。

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/O₂ 型のバイオ燃料電池の構築を目的としている。特に、生体毒性が懸念される物質を一切使わないことを開発方針とする。

これまで、ナフトキノン類の一種であるビタミン K₃ をポリマー化し、ジアフォラーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼを二層構造の酵素膜とすることで、再現性のよいグルコースの酸化を実現してきた（図 A-1）。その電極をアノードに白金電極をカソードに用い、前回の報告では実際に体液発電をおこなうことで、その問題点を明らかにした。さらに微細加工技術により作製したマイクロ流路型燃料電池の試作を行い、その実験系を確立してきた。ここで体液からの発電においては、少ない燃料（5 mM glucose, 0.1 mM O₂）を効率よく利用することや、体液中に多量に含まれる妨害物質の影響を低減するために電極の反応選択性を高めることが必要である。今回その対策と

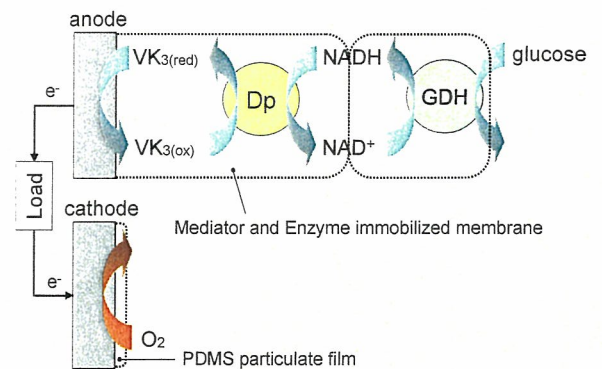


図 A-1 本研究におけるバイオ燃料電池

して、まずアノード性能の向上のため、メディエータ固定化の改良を行い、カソードには白金の代わりに酵素を利用した電極を作製することで、体液発電に耐える電極の検討を行った。

また、それぞれの電極の電池としての評価は、マイクロ流路型バイオ燃料電池により行い、コントロールされた燃料送液環境における定量評価、また流路ならではの動作環境に

における電極配置の検討による性能向上の検討を行った。

バイオ燃料電池は生物由来の酵素や、有機物のメディエータを利用するため、安全であるという利点を有すが、一方で有機物であるがゆえに耐久性に限界ができてしまう。酵素の遺伝子操作や固定化環境の改良による耐久性向上の取り組みは様々に行われているが、どれも決定的な物ではない。我々は電極に生分解性高分子を被覆したものをアレイ化し、時差的に電極を露出させることで、電池システムとして耐久性を有する時差式バイオ燃料電池の開発を行った。

B. 研究方法

B-1. 新規アノード修飾膜の作製・評価法

合成した VK_3 誘導体の 2-(3-Carboxypropyl)-3-methyl-1,4-naphthoquinone を N-hydroxy-succinimide により活性化した後、約 40 % の修飾率で Poly-L-Lysine (PLL) に結合させることで、メディエータポリマー (PLL- VK_3) を得た。

作製したメディエータポリマー水溶液 (PLL- VK_3 , 4.83 mM VK_3), NADH 酸化酵素のジアフオラーゼ (Dp), カーボンブラックの分散液 (ca. 13 mg mL⁻¹) の混合溶液を直径 3 mm のグラッシーカーボン (GC) 電極上に 4 μ l 塗布し空气中で乾燥 (第一層)。その後 Poly-L-Lysine (PLL) とグルコースデヒドロゲナーゼ (GDH) の混合溶液を第一層修飾膜上に 4 μ l 塗布, 乾燥させ (第二層), 二層構造のグルコース酸化用の複合酵素修飾電極を調製した。

作製したアノード電極の評価には, 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_2 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。

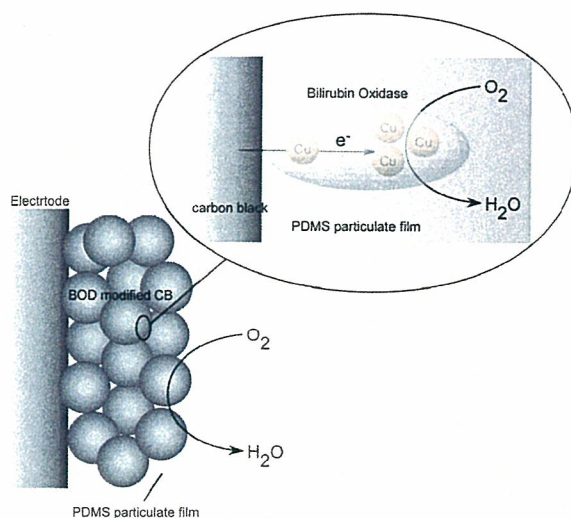


図 B-1 酵素(BOD)カソードの構造

B-2. カソードの作製法

以下のような三種類のカソードを作製した。

- ・PDMS 懸濁水溶液 (2 mg mL⁻¹) を Pt 電極上に塗布し, 空气中で乾燥させることで, 白金電極上に微細孔を有す PDMS の薄膜を形成し, PDMS 修飾 Pt カソードを作製した。

- ・Ag|AgCl カソードは市販の Ag|AgCl インクを白金電極上に塗布, オープンにて乾燥させることで作製した。

- ・酸素還元酵素として Bilirubin oxidase (BOD) を用いた。BOD は中性条件下で酸素の 4 電子還元反応を行い, 反応速度, 電位などが優れた酵素であり, バイオ燃料電池のカソード触媒として有望である。この酵素はメディエータを利用せずとも電極との電子の授受が可能であることが知られており, 今回はその特性を利用した BOD カソードを作製した。具体的には図 B-1 のように BOD を吸着させたカーボンブラック (CB) を, 微細孔を有する PDMS のフィルム中に固定化した。

B-3. マイクロ流路型バイオ燃料電池

マイクロ流路型バイオ燃料電池セルの作製には各種微細加工技術を利用する。PDMS 製流路の鋳型には, 3 次元成形したプラスチックや, 厚膜フォトレジスト (SU-8) のパターンニング

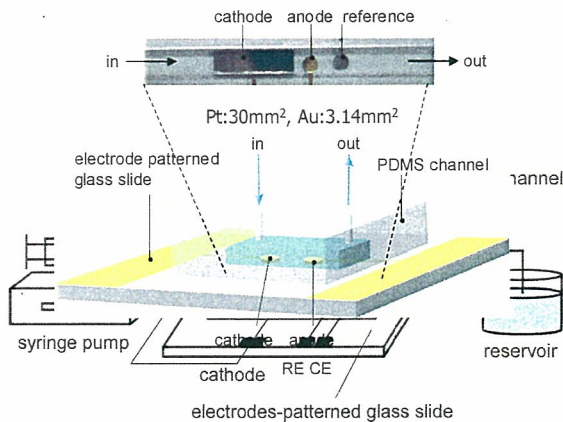


図 B-2 マイクロ流路型バイオ燃料電池

を用いた。電極基板についてはスライドガラス上に、フォトリソグラフィ及びスパッタリングを行うことにより作製した。電極基板にはアノード、カソードに加え、参照極、対極も組み込みこんでいるため様々な電気化学測定が可能である。PDMS 流路と酵素を修飾した電極基板を接着させ、図 B-2 のような実験系を組み、様々な作動条件におけるマイクロ流路中でのバイオ燃料電池の性能を評価した。

B-4. 生分解性高分子を用いた時差式発電

バイオ燃料電池の長期利用を目指した取り組みとして、我々は生分解性高分子を利用した時差式発電を検討している。まず、予備実験として図 B-3 のような実験系を組み、生分解性高分子である PLGA (Copoly lactic acid/glycolic acid)が順次分解することで電極が露出する様子を三極式の電気化学測定により評価した。ここで用いた PLGA は平均分子量の異なる二種類のものを用いた。なお PLGA は平均分子量の違いで崩壊速度が異なる。

次に同じような実験系で、実際にバイオ燃料電池の時差式発電を行った。ここで溶液には 30mM グルコース、1 mM NAD^+ を含むリン酸緩衝液を用いた。アノードには B-1 で作製したものを、カソードには表面積の大きな白金電極を用いた。

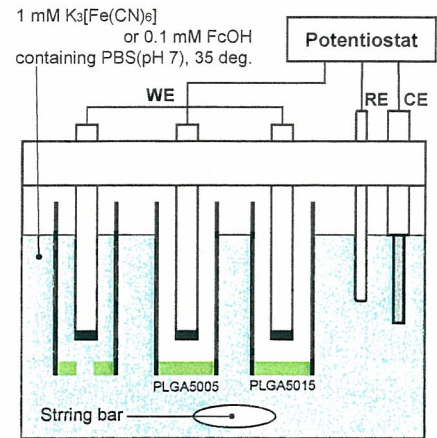


図 B-3 時差式発電の予備実験の模式図

C. 研究結果と D. 考察

C-1. アノードの評価

先ずサイクリックボルタンメトリーにより、グラッシーカーボン (GC) 電極上に固定化したアノード修飾膜の評価を行った。燃料であるグルコース (および補酵素の NAD^+) を添加することにより得られた酸化電流はこれまでの PAA-VK₃ を用いたものに比べ格段に上昇した (図 C-1)。これはメディエータを固定化するポリマーのバックボーンを PAA から PLL に変えたことにより、VK₃ の自由度が増したためであると考えられる。さらに溶液を攪拌することで、 2 mA cm^{-2} 程度とバイオ燃料電池の電極としては大きな電流を得ることができた。

以上のように、メディエータ固定法の改良

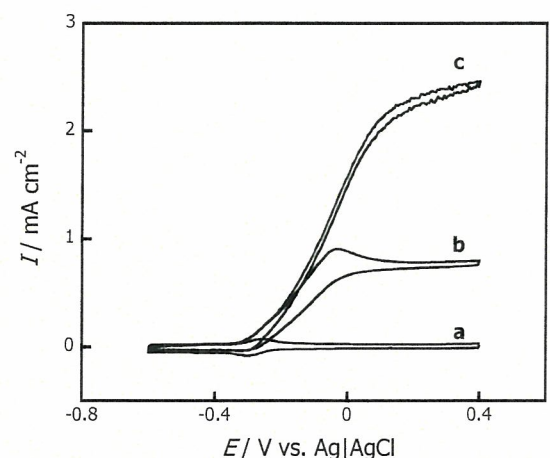


図 C-1 KB/PLL-VK₃/Dp/GDH 修飾 GC 電極の CV 図 N_2 飽和 PBS (pH 7.0) at 37 °C (a), 1.0 mM NAD^+ and 20 mM グルコース (b), 1.0 mM NAD^+ , 30 mM グルコース, 攪拌子にて溶液を攪拌 (c). 掃引速度: 5 mV s^{-1} .

により、メディエータの自由度を向上させ、電流値を飛躍的に向上させることに成功した。

C-2. マイクロ流路型バイオ燃料電池の性能評価

図 B-2 に示すような実験系でバイオ燃料電池の評価を行った。アノードには B-1 で作製したものを、カソードには Ag|AgCl 電極と Pt 電極を用いた。燃料溶液はヒトの正常血糖値を意識し、グルコース濃度を 5 mM とした。

外部抵抗を変化させることで得た電池の I-V (P-V) 特性曲線を図 C-2 に示す。カソードはアノードに比べて十分に面積を大きくしているため、カソードの種類によらず最大電流値はアノード性能に律される。Ag|AgCl をカソード用いた場合に比べ Pt カソードを用いた場合では、最大電流は変わらないが、大きな電圧が得られるため、結果として大きな電力(P)が得られた。ここで、中性条件下において白金電極の酸素還元過電圧は大きいいため、0.6 V 程度と比較的小さな電圧しか得られなかったが、酸素還元能を有す酵素を用いることで、よりポジティブな電位での酸素還元が可能であり、酵素カソードの研究も重要である。ここで、窒素飽和下にて測定を行った図 C-2(a)

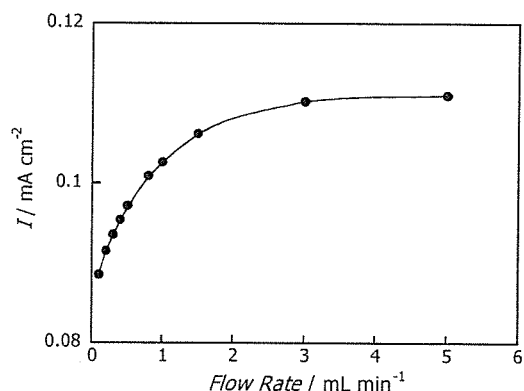


図 C-3 放電電流の流速依存性 (R=100kΩ). カソードは PDMS 修飾 Pt 電極. 1.0 mM NAD⁺, 5.0 mM グルコースを含む空気飽和 PBS (pH 7).

では空気飽和下の(b)よりも大きな電圧が得られている。これは(b)の状態ではアノード構成物が酸素に酸化されてしまったためと考えられる。次の C-3 でも示すが、アノード近傍における酸素の除去はアノード本来の性能を発揮させるためには重要な検討課題である。

次に燃料の供給速度の影響を評価したものを図 C-3 に示す。前述のとおり、電流値はアノードに律されており、これはアノードにおける燃料供給の様子を示していると考えられる。燃料供給速度が大きくなるほど電極へのグルコースの流束が大きくなることで、電流値が上昇している様子がわかる。

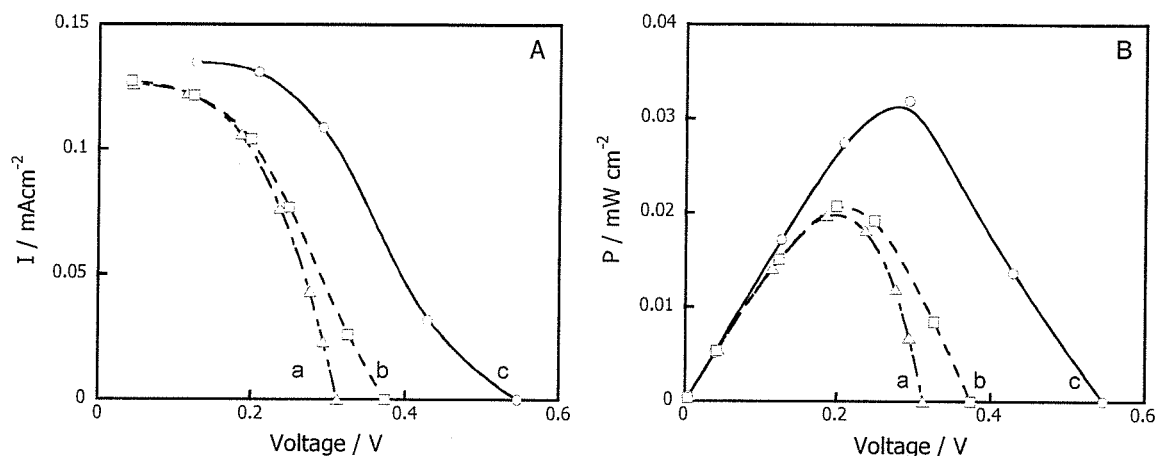


図 C-2 マイクロ流路型バイオ燃料電池の(A) 電流電圧曲線, (B) 電力電圧曲線. 流速: 1 mL min⁻¹. 5.0 mM グルコース, 1.0 mM NAD⁺ を含む PBS (pH 7). アノードは KB/PLL-VK₃/Dp/GDH-Au 電極, カソードは (a)(b) Ag|AgCl 電極, (c)PDMS 修飾 Pt 電極. (a)では窒素飽和溶液を用い,(b)(c)では空気飽和溶液を用いた。

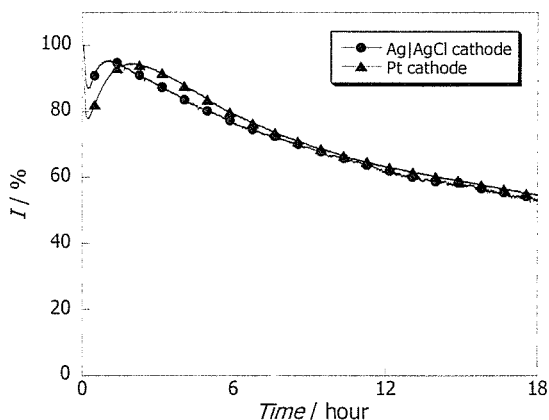


図 C-4 バイオ燃料電池の耐久性 (R=100 k Ω). カソードには Ag|AgCl electrode (●), PDMS 修飾 Pt 電極 (▲)を用いた. 1.0 mM NAD⁺, 5.0 mM グルコースを含む空気飽和 PBS(pH 7.0), 流速: 1.0 mL min⁻¹.

さらに図 C-4 のように 12 時間の連続発電を行うことで, 本研究におけるバイオ燃料電池の耐久性を評価した. カソード面積を十分に大きくすることで, 電池性能をアノード律速とし, 実質はアノードの耐久性が評価されている. アノードの耐久性は修飾膜の膨潤に起因するものと考えられ, 架橋剤の導入など化学的処理により向上できると考えた.

C-3. アノード近傍の酸素除去

C-2 の結果からアノードでは酸素による影響を受けてしまうことがわかった. これを解決するための方法として, 流路型のバイオ燃料電池であるという特性を生かし, 上流にカソードを配置させ, 酸素を十分に還元することでアノード近傍の酸素を除去する取り組みを行った. その結果を図 C-5 に示す. 上流カソードにおける酸素還元電流値が上昇するほど下流に配置しているアノードにおける電流値が上昇している様子がわかる. このことから, 上流にカソードを配置することで, アノード近傍における酸素濃度を低減することができ, 電池性能を向上できることがわかった. 得られる電流値のためのみならず, 溶存酸素は構成物を不可逆的に酸化してしまう可能性

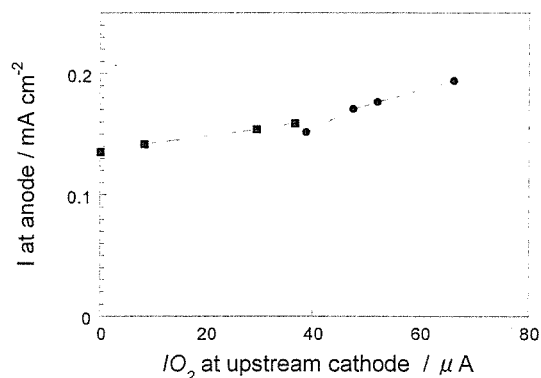


図 C-5 下流アノードにおけるグルコース酸化電流 vs.上流カソードにおける酸素還元電流.

もあるため, 電池の耐久性という観点からもこの研究は重要である. 現在, さらなる酸素除去のための取組みなど, 詳細について検討中である.

C-4. 酵素カソードを用いたバイオ燃料電池

C-2 で作製したバイオ燃料電池において, カソードを B-2 に示した酵素(BOD)カソードとしたときの電池出力測定を行った(図 C-6). 酵素カソードを用いたことで, 酸素還元過電圧を小さくすることができ, 電池電圧が大きくなり, その結果として大きな電力を得ることができた. このようにメディエータを用いない酵素カソードを作製できたことから, シンプルかつ高性能, 有機物のみのバイオ燃料電池が実現できる. 今後この電極の最適化や反応選択性について検討を加えていく予定で

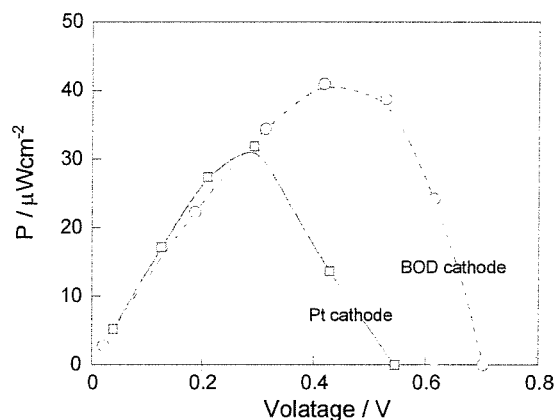


図 C-6 BOD 修飾電極をカソードに用いた流路型バイオ燃料電池の出力と Pt カソードの比較

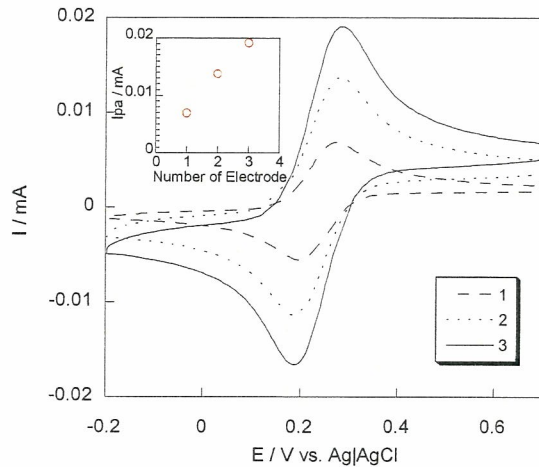
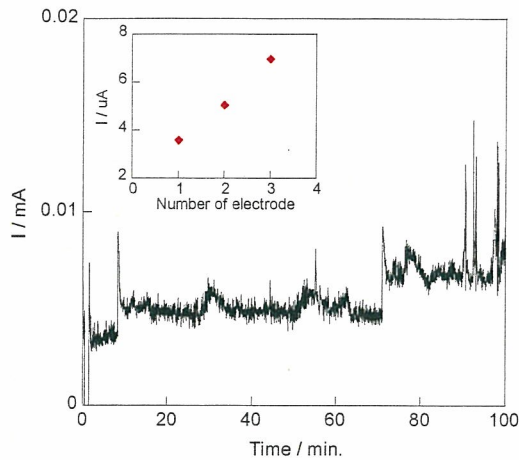


図 C-7 生分解性高分子を用いた予備実験. (A)定電圧測定における $K_3[Fe(CN)_6]$ の還元電流, 1 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ を含む PBS(pH7),35 度 (B)FeOH のサイクリックボルタンメトリー, 0.1mM FeOH を含む PBS(pH7),35 度.

ある.

C-5. 生分解性高分子を用いた時差式発電

図 B-3 に示すような実験系で実験を行った. まず溶液を攪拌した状態で定電位測定を行ったものを図 C-7(A)に示す. 10 min 後に認められる電流の増加は平均分子量の小さな PLGA が崩壊し, 二本目の電極が露出し全体として電極面積が増加したことによるものである.

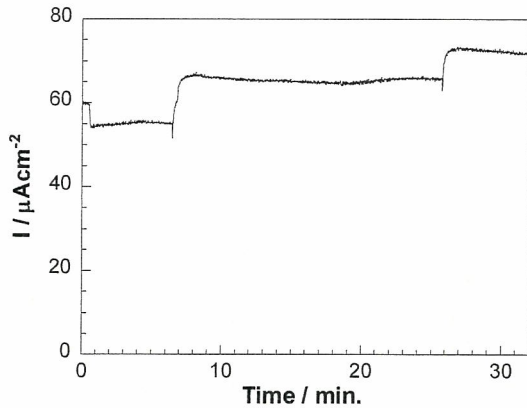


図 C-8 時差式バイオ燃料電池の放電曲線(100 kohm). 30 mM グルコース, 1 mM NAD^+ を含む PBS (pH7),35 度.

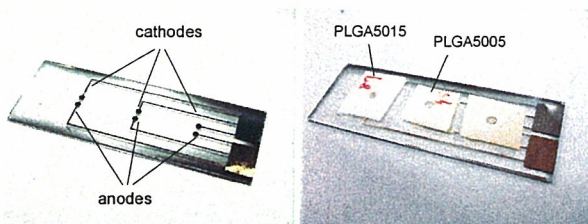


図 C-9 小型集積化へ向けた時差式バイオ燃料電池の試作. 電極基板(左)と生分解性高分子を被覆した電極基板.

70 min 後にはさらに電流値が上昇し, このように時差的に電極を露出するようなシステムを構築することに成功した. ここで, CV 測定を行ったものを図 C-7(B)に示す. 溶液を攪拌せずに CV 測定を行ったところ露出した電極面積にほぼ比例したピーク電流値の増加が見られた. これらの結果から, こういった時差式の電極露出はバイオセンサなど幅広い応用が期待できる.

この予備実験から時差式発電が可能であることがわかったため, 実際にバイオ燃料電池を用いた実験を行った. 図 C-8 に示すように, PLGA の崩壊とともに電流値の上昇が見られ, さらに平均分子量の異なる二種類の PLGA を用いることで, 多段階に時差をつけることができた. 今後は図 C-8 に示すように, この時差式バイオ燃料電池の小型化を進め, より多段階に時差をつけるための集積化を行っていく予定である.

C-6. バイオ燃料電池の利用

バイオ燃料電池は安全性が高く, 小型化が容易であり且つ血液(血糖)から発電できるため埋め込み型医療機器の電源として期待される. 例えば埋め込み型人工筋肉用の電源としての利用が考えられる. そこで今回, 人工筋肉として研究されている導電性高分子ポリ

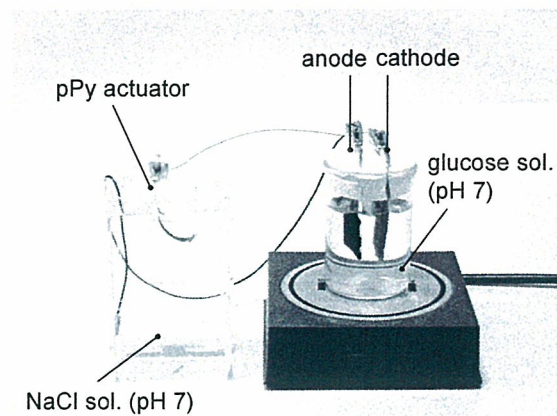


図 C-10 生理食塩水中の PPy アクチュエータ（人工筋肉）をバイオ燃料電池によって駆動

ピロール (PPy) で作製したアクチュエータのバイオ燃料電池の電力による駆動を試みた (図 C-10)。バイオ燃料電池により発生した電圧により、PPy が酸化、もしくは還元され伸縮することで、PPy アクチュエータが動作でき、その動作速度は発電量と相関関係があった。このようにバイオ燃料電池の電力で実用的なデバイスを駆動させることができることを確認した。

E. 結論

今回アノードの高性能化のため、メディエータポリマーを合成しその性能の大幅な向上を実現した。さらにその電極の電池性能を評価するためにマイクロ流路型のバイオ燃料電池を作製し、その電池性能の定量評価を行った。このマイクロ流路型バイオ燃料電池は定量評価のためのみならず、実際の埋め込みを考えたときの予備実験に用いることができる。さらに耐久性の評価を行った結果、12 時間で 50% の電流を保つことができた。より耐久性を向上させるためには、架橋剤の導入などの化学的な処理などによるものも考えられるが、それにも限界がある。そこで我々は生分解性高分子を用いた時差式発電を考案し、それについての基礎実験を行った。より長期的に使用するためには小型・集積化を進める必要があり、今後さらに検討していきたい。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1. 論文など

1. An enzyme-based microfluidic biofuel cell using vitamin k3-mediated glucose oxidation. M.Togo, A.Takamura, T.Asai, H.Kaji, M.Nishizawa, *Electrochim. Acta*, in press (2007)
2. バイオ電気化学の実際-バイオセンサ・バイオ電池の実用展開-(書籍, 分担)
16章 MEMS バイオ電池技術
安部隆, 西澤松彦
シーエムシー出版, 2007
3. 界面分子制御の応用で人工物と生体パーツを融合(解説記事)
バイオニクス 2006 年3月号 22-24
西澤松彦
4. バイオ燃料電池-生体や環境に溶け込む安全電源-(解説記事)
西澤松彦, 化学と工業, 2006, 768-771.

G-2. 学会発表

1. 日本化学会第 86 春季年会, 3 月 27 日~30 日 日本大学
「医療用マイクロ生物燃料電池への取り組み」
西澤松彦, 都甲真
2. 2006/4/1-3 電気化学会第 73 回大会, 首都大学東京
「NAD 依存性酵素を用いたバイオマイクロ燃料電池の開発と体液発電」
都甲真, 高村亮匡, 浅井達也, 安部隆, 小菅順一, 深作昇, 西澤松彦
3. 209th Meeting of The Electrochemical Society, May 7-12, 2006 (Denver, Colorado)
「Vitamin K₃-Mediated Electrooxidation of Glucose in Biofluids」
M. Nishizawa, M. Togo, H. Kaji and T. Abe
4. 第45回 日本生体医工学会大会 5月15日, 福岡
「グルコース燃料電池の開発と体液発電」
西澤松彦・都甲 真・梶 弘和

5. 2006/09/14 電気化学秋季大会 同志社大
「体液発電を目指したバイオマイクロ燃料電池
用電極の性能評価」
都甲 真,高村亮匡,浅井達也,梶 弘和,安部
隆,小菅順一,深作 昇,西澤松彦
6. 2006/09/14 電気化学秋季大会 同志社大
「流路型バイオ燃料電池における作動条件の
最適化に関する研究」
高村亮匡,都甲 真,浅井達也,梶 弘和,安部
隆,小菅順一,深作 昇,西澤松彦
7. 生体医工学シンポジウム 2006 9/23-24 新潟
大学
「体液発電を目指したバイオマイクロ燃料電池
用電極の性能評価」
浅井達也,都甲 真,高村亮匡,梶 弘和,安
部 隆,小菅順一,深作 昇,西澤松彦
8. micro-TAS2006, Tokyo International Forum on
November 5 - 9, 2006.
「Microfluidic glucose biofuel cells for power
generation from biofluids」
Makoto Togo, Akimasa Takamura, Tatsuya
Asai, Takashi Abe and Matsuhiko Nishizawa
9. 日本機械学会バイオエンジニアリング部門
第28回バイオサロン 2007年1月6日, 仙台
国際センター
「バイオデバイスと電気化学技術」
西澤松彦
10. ナノメディスン公開講座, 2007年2月22日,
東京コンファレンスセンター
「体の材料で発電する」
西澤松彦

G-3.新聞報道

河北新報 2006年11月5日

「命の仕組みで機械動く」

(東北大学の行事「サイエンスカフェ」での講演が
報じられました)

H.知的所有権の取得状況

なし

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

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

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長

研究要旨：

T-NCVC コーティングの有する細胞接着抑制機序には、従来の抗血液凝固性機序とは異なった新しい機序が存在する可能性が想起されている。本年度の研究では、血液を T-NCVC コーティングプレートで種々の時間インキュベーションし、溶血、好中球の活性化および吸着タンパク質量の経時的変化を検討した。好中球の活性化はインキュベーション中に好中球から遊離した Lf を指標とした。9 hr のインキュベーション中に無処理プレートにおいては溶血ならびに好中球の活性化は殆ど起こらなかったが、1% および 3% T-NCVC プレートにおいては 6 hr および 9 hr 後に明らかな溶血ならびに好中球の活性化が認められた。T-NCVC プレートにおいて溶血と好中球の活性化の間には経時的に平行な関係が存在し、また、1% T-NCVC プレートの方が 3% T-NCVC プレートより溶血および好中球の活性化は軽度であった。9 hr のインキュベーション後のプレート吸着タンパク質量は 3% T-NCVC プレートより 1% T-NCVC プレートの方が有意に少なかった。

これらの結果から、T-NCVC コーティングの細胞接着阻害の機序には好中球の活性化や溶血などに関連する細胞膜刺激性が関与する可能性が示された。

A.研究目的

我々は従来から開発を行ってきたナノサーフェステクノロジーを応用し、コーティング剤のナノ分子構造を制御し、最適化を図ることにより、血液界面における長期間の血液凝固防止作用の維持を可能とした T-NCVC コーティングを開発し得た (Fig. 1)。本技術は、既存の人工心臓 (国循環型 VAD, 東洋紡社製, Fig. 2) および膜型人工肺 (Platinum Cube NCVC シリーズ, 大日本インキ社製, Fig. 3) に採用され、長期的な抗血栓性を飛躍的に向上させ、その長期使用における安全性の維持に大きく貢献している。しかしながら、この T-NCVC コーティング手法を発展させ、より高性能且つ高機能な次世代型生体適合性表

面処理法の開発を行う上では、本コーティングの抗血液凝固機序の解析が不十分であり、不明な部分が多く認められている。

本研究は、従来法より生体適合性に優れた T-NCVC コーティングの抗血液凝固機序を細胞科学的および生化学的に解明し、かかる研究より明らかになった結果をもとに、新たにナノサーフェステクノロジーを応用した合成多糖類による抗血液凝固性素材を作製し、生物製剤を使用しないより高性能且つ高性能な次世代型生体適合性表面処理法の開発を行い、より長期的に安定した新規抗血栓手法を確立することを目的とする。

現在の研究では、本コーティングが、器材表面に接触する細胞の接着作用を著しく阻害

する効果を有することが見いだされているものの、この細胞接着阻害作用は、従来提唱されていた作用機序とは異なる結果が多く認められた。従って、T-NCVC コーティングの有する細胞接着抑制機序には、従来の抗血液凝固性機序とは異なった新しい機序が存在する可能性が想起されている。

B. 研究方法

本年度の研究では血液を T-NCVC に長時間接触させたときの溶血、好中球の活性化および血漿タンパク質の吸着について検討した。

試薬および材料

ゼラチン、トリトン X-100、エチレンジアミン四酢酸 2Na (EDTA) および *p*-ニトロフェニルリン酸 2Na は和光純薬工業社、Tween 20、グリシン、硫酸アンモニウム (硫安) およびシアン化カリウムは関東化学社、ヘキサシアノ鉄 (III) 酸三カリウム (フェリシアン化カリウム) はナカライテスク社、ウシ血清アルブミン (BSA) は Roche 社の製品を用いた。T-NCVC コーティング用ポリスチレン製イワキアッセイプレートは旭テクノグラス社、ELISA 用マイクロタイタープレート Immuno Plate Maxisorp F96 は Nunc 社、マイクロチューブ Safe Lock は Eppendorf 社、Acid citrate dextrose (ACD) 採血管は日本ベクトン・ディッキンソン社の製品を用いた。

精製ウシ Lf は北里大学獣医畜産学部獣医学科獣医生化学教室渡辺清隆教授により精製されたものを、また、アフィニティ精製ウサギ抗ウシ Lf 抗体およびアルカリホスファターゼ (ALP) 標識抗ウシ Lf 抗体は同生化学教室山田らにより調製されたものを用いた。その他の試薬類は特級あるいは高純度のものを使用した。

ウシ血液

血液は健常な牛から採取し、ACD 処理後実験に用いた。血漿は ACD 処理血液を、室温、1,670 x g で 20 min 遠心して分離した。血漿には防腐剤としてアジ化ナトリウム (NaN_3) を最終濃度 0.1% になるように加え、使用時まで 4°C で冷蔵保存した。

ヘパリン化材料 T-NCVC の合成およびプレートへの塗布

T-NCVC は、ポリスチレン製の 96 穴イワキアッセイプレートに塗布された。まず、カップリング剤である長鎖ジアルキルアンモニウムクロリドを水/エタノールの混合溶媒に溶解してこれをヘパリン水溶液に滴下混合し、沈殿物を得た。次に、これを水とエタノールで交互に洗浄し、未反応のヘパリンおよびアンモニウム塩を除去することにより T-NCVC を得た。このように精製した T-NCVC をテトラヒドロフラン/エタノール混合溶媒に溶解して 1% および 3% の溶液を作製し、プレートに塗布した。

T-NCVC と血液との反応

無処理プレートならびに 1% および 3% T-NCVC コーティングプレートの各ウェルに血液を 300 μl ずつ添加し、サーモミキサーコンフォート (Eppendorf 社製) を用いて 37°C で 1, 3, 6 および 9 hr 震盪しながらインキュベーションした。その後、血液をマイクロチューブに回収し、4°C で 730 x g にて 15 min 遠心し血漿を分離した。この血漿はヘモグロビン (Hb) およびプレート非吸着 Lf の測定のために用いた。プレートをリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS : 20 mM リン酸ナトリウム, 150 mM NaCl, pH 7.2) で 9 回洗浄後、イオン強度を高めてプレートに吸着している Lf を遊離させるために 0.5 M 硫安を含む ELISA 緩衝液 (硫

安加 ELISA 緩衝液) (ELISA 緩衝液の組成: PBS, 0.1%ゼラチン, 0.1%ツィーン 20, 0.02% NaN₃, pH 7.2) を 300 μ l ずつ添加し, 4°Cで一晩放置した. 翌日マイクロチューブに回収し, プレート吸着 Lf の測定のために用いた.

統計処理

二群間の有意差検定はデータを TWO-WAY ANOVA で分析してから Tukey test を用いて多重比較を行った.

B-1. 溶血率の測定

血液 60 μ l を溶血試薬 (40 mM K-Na リン酸緩衝液, 0.6%トリトン X-100, pH6.8) 3 ml に添加し, 溶血させた. 次に 5%フェリシアン化カリウム, 5%シアン化カリウムをそれぞれ 30 μ l ずつ添加し, Hb をシアンメト Hb に変換した. これを DDW で 5 倍希釈し, シアンメト Hb の波長 540 nm における吸光度を測定した. 血漿中の Hb を測定する場合は先に述べた項目 4 で回収した血漿 150 μ l を溶血試薬 1,350 μ l に添加した. 次に 5%フェリシアン化カリウムおよび 5%シアン化カリウムをそれぞれ 15 μ l ずつ添加し, 生じたシアンメト Hb を上述のように測定した. Hb 濃度はシアンメトヘモグロビンのモル吸光係数 ($\epsilon_{540\text{nm}} = 44,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) より算出し, 溶血率は下式により算出した [17].

$$\text{溶血率 (\%)} = \text{血漿 Hb 濃度} / \text{血液 Hb 濃度} \times 100$$

B-2. プレートに吸着した血漿あるいは血液タンパク質の定量

無処理プレート, 1%および 3%T-NCVC コーティングプレートの各ウェルに血漿または血液を 300 μ l ずつ添加し, サーモミキサーコンフォートを用いて 37°C で血漿の場合は 1, 3, 6 および 9 hr, 血液の場合は 1 および 9 hr 震盪しながらインキュベーションしてタンパク質

をプレートに吸着させた. その後 PBS で 9 回洗浄した. 吸着タンパク質の定量は BSA を標準タンパク質として用い, Lowry らの方法に従って行った.

B-3. サンドイッチ ELISA による Lf の測定

PBS で 2.5 μ g/ml に希釈した精製抗ウシ Lf 抗体を ELISA 用マイクロタイタープレートの各ウェルに 100 μ l ずつ分注し, 4°Cで一晩放置して抗体をプレートに吸着させた. 0.05%ツィーン 20 を含む PBS (PBST) を用いてプレートを 3 回洗浄後, ELISA 緩衝液を各ウェルに 300 μ l ずつ分注し, 室温で 1 hr 放置してプレート表面をゼラチンでマスキングした. 次に, 上述したように調製した希釈済みの各サンプルおよび硫酸安加 ELISA 緩衝液で希釈調製したウシ Lf 標準液をプレートの各ウェルに 100 μ l ずつ添加し, 37°C で 2 hr 反応させた. PBST で 3 回洗浄後, ELISA 緩衝液で 200 ng/ml に希釈した ALP 標識抗ウシ Lf 抗体を各ウェルに 100 μ l ずつ添加し 37°C で 2 hr 反応させた. PBST で 3 回洗浄後, ALP 基質溶液 (3 mM *p*-ニトロフェニルリン酸, 100 mM グリシン/NaOH 緩衝液, 1 mM ZnSO₄, 1 mM MgSO₄, pH 10.0) を各ウェルに 200 μ l ずつ添加し, 37°C で約 30 min 反応させた. 200 mM EDTA (pH 7.0) を各穴に 50 μ l ずつ添加して酵素反応を停止後, MAXline マイクロプレートリーダー (モレキュラーデバイス社製) を用いて, 酵素反応により遊離した *p*-ニトロフェノールの波長 405 nm における吸光度を測定した.

C. 結果

C-1. T-NCVC による溶血

血液を無処理プレートならびに 1%および 3%T-NCVC コーティングプレートで種々の時間インキュベーションしたときの溶血率の経時変化を図 1 に示す. 無処理プレートにおい

ではインキュベーション前に比べて9 hrのインキュベーションの間に溶血率の有意な増大は認められなかった。1%および3%T-NCVCプレートにおいては経時的な溶血率の増大が見られ、特にインキュベーション6 hrおよび9 hr後の溶血率はインキュベーション前に比べて有意に高値を示した。インキュベーション6 hr後における3%T-NCVCプレートおよび9 hr後における1%ならびに3%T-NCVCプレートにおける溶血率は無処理プレートに比べて有意に高値を示したが、それぞれのインキュベーション時間において1%と3%T-NCVCプレート間に有意差は見られなかった。

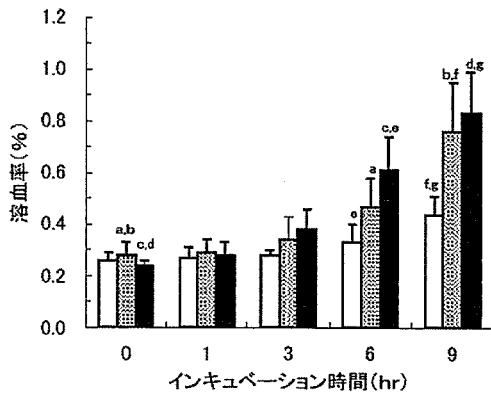


図1. T-NCVCコーティングプレートで血液をインキュベーションした時の溶血率の経時的変化

血液を無処理(□)、1%T-NCVC(▨)および3%T-NCVC(■)プレートで種々の時間インキュベーション後、プレートから血液を回収した。その後血漿を分離し、溶血率を測定した。値は6頭のウシ血液を用いたときの平均値±S.D.を示す。0 hrの値はプレートでインキュベーションする前の溶血率を示す。図中のアルファベットは同じ文字間に有意差があることを示す(a: $p < 0.05$ b-g: $p < 0.01$)。

C-3. プレート吸着タンパク質

血漿を無処理プレートならびに1%および3%T-NCVCコーティングプレートで種々の時間インキュベーションしたときのプレートに吸着したタンパク質量の経時的変化を図3に示す。無処理および1%T-NCVCプレートに吸着したタンパク質量に経時的に有意な変化は見られなかったが、インキュベーション9 hr後の3%T-NCVCプレートに吸着したタンパク質量は1 hr後のものと比べ有意に増大して

いた。1%T-NCVCプレートにおける吸着タンパク質量は、6 hrインキュベーションを除き無処理プレートに比べ有意差はないものの低い傾向を示した。3%T-NCVCプレートにおける吸着タンパク質量は、インキュベーション時間に関わらず無処理プレートあるいは1%T-NCVCプレートに比べ有意に高値を示した。

血液を無処理プレートならびに1%および3%T-NCVCコーティングプレートで1 hrないし9 hrインキュベーションしたときのプレートに吸着したタンパク質量を図4に示す。いずれのプレートにおいても、インキュベーション9 hr後のプレート吸着タンパク質量はインキュベーション1 hr後に比べ有意に増大した。インキュベーション1 hr後においては、それぞれのプレート間で吸着タンパク質量に有意な差は存在しなかったが、インキュベーション9 hr後では、1%T-NCVCプレートに吸着したタンパク質量は無処理および3%T-NCVCプレートに比べ有意に低値を示した。

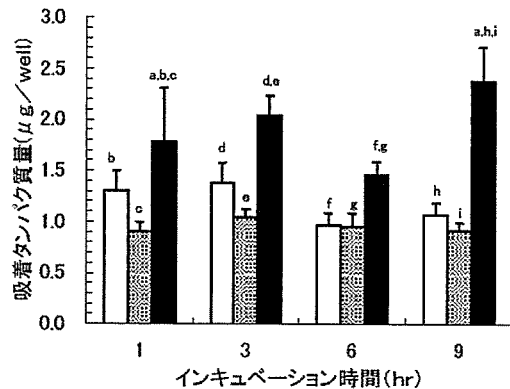


図2. T-NCVCコーティングプレートで血漿をインキュベーションした時のプレート吸着タンパク質の経時的変化

血漿を無処理(□)、1%T-NCVC(▨)および3%T-NCVC(■)プレートで種々の時間インキュベーション後、プレートに吸着したタンパク質を測定した。値は6頭のウシ血漿を用いたときの平均値±S.D.を示す。図中のアルファベットは同じ文字間に有意差があることを示す(b,f: $p < 0.05$, a,c-e,g-i: $p < 0.01$)。

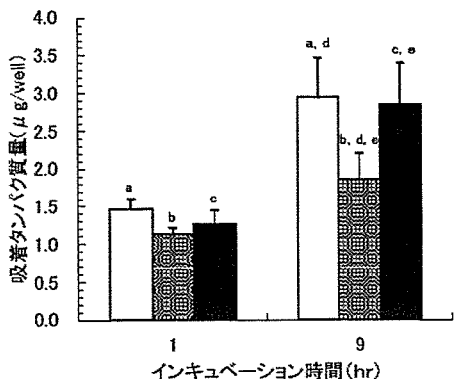


図3. T-NCVCコーティングプレートで血液をインキュベーションした時のプレート吸着タンパク質の経時的変化

血液を無処理(□)、1%T-NCVC(▨)および3%T-NCVC(■)プレートで1または9 hrインキュベーション後、プレートに吸着したタンパク質を測定した。値は6頭のウシ血液を用いたときの平均値±S.D.を示す。図中のアルファベットは同じ文字間に有意差があることを示す(b: $p < 0.05$, a, c-e: $p < 0.01$)。

C-2. T-NCVCによる好中球の活性化

無処理プレートにおいては全てのインキュベーション時間でプレートに吸着した Lf は ELISA の検出限界以下 ($< 1.6 \text{ ng/ml}$) であった。1%および3%T-NCVC プレートにおいては、吸着 Lf はほとんどが検出限界以下から 10 ng/ml 以下の範囲であり、特にインキュベーション時間と吸着 Lf との間に関連性は認められなかった。また、1%と3%T-NCVC プレートの間で吸着 Lf 量にはっきりした相違は認められなかった。

次いで血液を各種プレートで種々の時間インキュベーション後回収し、血漿を分離して Lf を測定した結果を表2に示す。無処理プレートならびに1%および3%T-NCVC プレートのいずれにおいても、インキュベーション時間の経過とともに血漿 Lf 量は上昇する傾向を示し、また、無処理プレートより T-NCVC プレートの方が血漿 Lf 量は高値を示す傾向が認められた。しかしながら、血漿 Lf 量のウシ個体間のばらつきが大きく、いずれのプレートにおいてもインキュベーション時間に伴う血漿 Lf 量の上昇は有意なものではなく、また、無処理プレートと T-NCVC プレートとの間にも血漿 Lf 量には有意な差は見られなかった。

無処理プレートにおいてはインキュベーション前に比べて9 hr のインキュベーションの間に血漿 Lf の有意な増大は認められなかった。T-NCVC プレートにおいては経時的な Lf 量の増大が見られ、1%T-NCVC プレートでのインキュベーション9 hr 後、3%T-NCVC プレートでのインキュベーション6 hr および9 hr 後の Lf 量は各々インキュベーション前の値に比べて有意に増大した。1%T-NCVC プレートにおいては、いずれのインキュベーション時間においても無処理プレートに比べて血漿 Lf 量の有意な上昇は認められなかったが、3%T-NCVC プレートにおいてはインキュベーション6 hr および9 hr 後の Lf 量は無処理プレートに比べて有意に高値を示した。いずれのインキュベーション時間においても1%と3%T-NCVC プレート間に血漿 Lf 量に有意差は見られなかった。

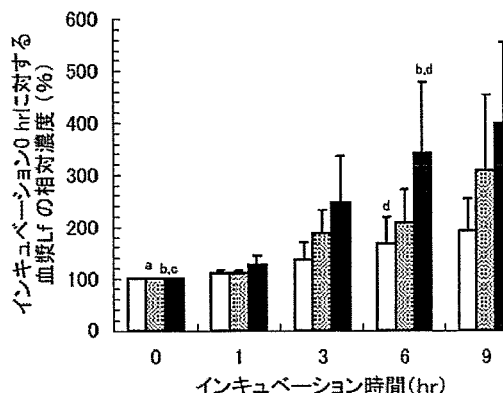


図2. T-NCVCコーティングプレートで血液をインキュベーションした吸着血漿Lfの経時的変化

血液を無処理(□)、1%T-NCVC(▨)および3%T-NCVC(■)プレートの時間インキュベーション後回収し、血漿を分離した。血漿Lfはインキュベーション0 hrの値に対するパーセンテージとして算出した。値は6頭を用いたときの平均値±S.D.を示す。図中のアルファベットは同じ文字間に有意差があることを示す(d: $p < 0.05$, a-c, e: $p < 0.01$)。

D.考察

血漿 Lf 量を個体ごとにインキュベーション前の値に対するパーセンテージで算出したところ、T-NCVC プレートではインキュベーション前に比べ6 hr または9 hr 後に統計的に有意な Lf 濃度の増大が見られ、また、同時間に

において無処理プレートに比べ 3%T-NCVC プレートではLf量の有意な増大が見られたことから、血液を T-NCVC に長時間接触させることにより好中球は活性化されると結論付けることができる。

好中球は活性化されると NADPH オキシダーゼおよびミエロペルオキシダーゼの作用によりヒポハライドを生成し、引き続きこれが内因性アミンと反応しクロラミンが生成する。このクロラミンは顆粒球エラスターゼのインヒビターである $\alpha 1$ -プロテナーゼインヒビターの活性基である Met-358 を酸化し、これを失活させる。また、ヘパリンは *in vitro* では白血球を活性化し、活性酸素産生の増加、顆粒球エラスターゼの放出増加、凝集能の亢進がおこる。これらの事象から図 1 より経時的に、そして T-NCVC 濃度が高いほど溶血が起こったのは T-NCVC が好中球を活性化し、生成されたクロラミンをはじめとする酸化剤が $\alpha 1$ -プロテナーゼインヒビターを失活させることにより膜タンパク質の障害から血球が破壊されたものと考察した。あるいはまた、活性化した好中球から放出される活性酸素が直接溶血を引き起こしたかも知れない。いずれにせよ、溶血率と好中球からの Lf 遊離率の間にはパラレルな関係が見られたことから、好中球の活性化が溶血に関与しているのではないかと考えられる。

これまでの研究では、ヘパリン血漿を T-NCVC コーティングプレートで 1 hr インキュベーションしたとき 1%T-NCVC プレートは無処理プレートに比べタンパク質の吸着を抑制するが、3%T-NCVC プレートは逆に吸着を促進することを見出した。ACD 血漿を用いた本研究においても 1 hr のインキュベーションではほぼ同様の結果が得られた (図 3)。血液を各種プレートで 1 hr および 9 hr インキュベーションしたときには、いずれのプレートに

においても 9 hr 後の吸着タンパク質量は 1 hr 後に比べ有意に増大し、血漿の場合とは明らかに異なることが見出された。

血液を長時間インキュベーションしたときには吸着タンパク質量が増大したのに対し、血漿を長時間インキュベーションしたときには吸着タンパク質量は増大しなかった。これは血液タンパク質の方が経時的にプレートに吸着しやすいことを示している。吸着タンパク質が変性すると血小板の結合部位が露出され高い血小板粘着を引き起こすとされている。よって血球の存在下では長時間のインキュベーションで吸着タンパク質が変性し、吸着タンパク質量が増大したものと考えられる。また血液の場合の吸着タンパク質量の増大にはインキュベーション中の溶血による血球タンパク質が関与しているものと思われる。9 hr の血液のインキュベーションにおいて 1% T-NCVC は 3%T-NCVC に比べタンパク質の吸着を効果的に抑制することが見出されたことから、タンパク質の吸着という視点からもコーティング材としての T-NCVC 濃度は 3% より 1%の方が適していると考えられる。

血液を 1 hr インキュベーションしたときプレート間で吸着タンパク質の有意な差は見られなかったが、血液を 9 hr インキュベーションすることにより、1%T-NCVC プレートはタンパク質の吸着を抑制したが遊離Lf量は無処理プレートより上昇傾向にあった。従って、9 時間までのLf値の上昇は吸着タンパク質によるものではなく、T-NCVC 中のヘパリン濃度に依存するものであり、またヘパリンとの接触時間が長いほど好中球の活性化が進むものと考えられる。ヘパリン化材料を含む人工材料表面は血液が接触すると血中のタンパク質が吸着し、このタンパク質は逸脱・吸着を繰り返しながら、経時的に積層してゆくものと考えられている。従って、インキュベーション

時間をさらに延ばせば吸着タンパク質によりヘパリンの活性が抑制され、Lf値の上昇はプラトーに達するものと予想される。

T-NCVCをはじめとするヘパリン化コーティング材料の良好な血液適合性の報告が多い中でLf値と溶血率の上昇が生じた原因としては血液が循環系でなくプレートのウェルに留まっていたこと、また、*in vivo*における血管内皮細胞による循環動態の調整がないことが挙げられる。今後、好中球からの活性酸素の産生に着目して好中球活性化を再検討するとともに、溶血因子、T-NCVCコーティングプレートに吸着するタンパク質の質的分析を進める必要がある。

E. 結論

これらの結果から、T-NCVCコーティングの細胞接着阻害の機序には好中球の活性化や溶血などに関連する細胞膜刺激性が関与する可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

1. 水野 敏秀, 西中 知博, 片桐 伸将, 佐藤 正喜, 田中 秀典, 柏原 進, 酒井 一成, 松田 智昌, 築谷 朋典, 本間 章彦, 巽 英介, 妙中 義之: ナノサーフェステクノロジーによる新規生体適合性表面処理 TOYOBO-NCVC コーティングの開発と補助人工心臓および膜型人工肺への応用. 分子心血管病, (7): 375-381, 2006.

G-2. 学会発表

1. 妙中義之, 水野敏秀, 巽 英介, 西中知

博, ナノ表面操作技術による血液界面を有する人工臓器の開発研究, 日本生体医工学会大会(45), 福岡市, 5.15-17, 2006

2. 片桐伸将, 舟久保昭夫, 築谷朋典, 巽 英介, 妙中義之, 福井康裕, 人工肺内の血液層酸素・炭酸ガス濃度分布に対するガス層濃度変化の影響に関する数値流体解析を用いた検討. 日本機械学会流体工学部門講演会(84), 川崎市, 10.28-29, 2006
3. 片桐伸将, 水野敏秀, 巽 英介, 田中秀幸, 築谷朋典, 本間章彦, 西中知博, 妙中義之, 舟久保昭夫, 福井康裕. 中空糸膜型人工肺ガス流出部における結露水による有効膜面積減少に関する検討. 膜型人工肺研究会(35), 横浜市, 10.31, 2006
4. Katagiri N, Funakubo A, Tsukiya T, Tatsumi E, Homma A, Nishinaka T, Taenaka Y, Fukui Y. COMPUTATIONAL ANALYSIS FOR INVESTIGATING THE EFFECTS OF O₂ AND CO₂ CONCENTRATION CHANGES IN THE GAS LAYER ON GASEOUS TRANSFERS IN AN OXYGENATOR.. Annual Conference of American Society for Artificial Internal Organs(52), Washington D.C., 6.8-10, 2006

G-3. 新聞報道

本年度は特になし

H. 知的財産の出願・登録状況

本年度は特になし

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：小腸や脳、腎尿細管に広く存在する MDR1 タンパクは、細胞内に取り込まれた薬剤などの脂溶性低分子異物を、ATP をエネルギーとして細胞外に排出する。昨年度までの研究で、この分子を含むプロテオリポソームは、生理的な配向と逆の向きにタンパクが配位し、リポソーム内に基質分子を取り込むことを確認してきた。研究最終年度である本年度は、研究開始時に計画として掲げた人工膜上にリン脂質を基材として MDR1 タンパクを固定化する機能性膜の作成と機能評価を行い、僅かではあるが、ATP 依存性の輸送が検出された。これにより、現在の透析装置と同様な方法によって機能性膜を用いた血液浄化法を実現することに一步近づいたといえる。一方、腎近位尿細管に存在するメガリンを透析アミロイドーシスの原因タンパクであるベータ2ミクログロブリン除去の生理的リガンドの候補として検討している。昨年までの研究により、同タンパクのクラスターII 領域にベータ2ミクログロブリンが結合することがわかった。本年度はこの中の結合配列の同定に着手した。

A. 研究目的

肝・腎機能が損なわれた患者に施される血液浄化法の新しいデバイスとして、非細胞系バイオ血液浄化システムの開発を行っている。現在、血液浄化法として人工透析や持続的血液濾過透析、血漿交換があるが、これらは濾過膜のポアサイズに依存した分子ふるい効果を利用している。従って、取り除くには必要成分も一緒に取り除かなくてはならないなどの問題点がある。そこで我々は MDR1 トランスポータータンパクとリポソームに目をつけ、ナノテクノロジー技術によって人工細胞膜を作製し、特定の不要物質を選択的に除去可能な新たな血液浄化法への第一歩とし、研究を行っている。

移植医療の普及とともに、移植を支える補助的手段の必要性が増している。腎移植後の無尿

期を透析によって乗り切れることはよく知られている。移植手術にともなう保存や阻血再灌流によって障害された移植腎の機能が徐々に再生、回復すると考えられている。肝移植には補助療法として血漿交換があるが、肝移植後の機能補助としてさほど活用されていない。大量の血漿を必要とし、患者に対し治療自体の負荷も大きいからである。そこで、新たな肝機能補助療法の開発が望まれている。特に、我が国で年々増加している成人間生体部分肝移植では、レシピエントに十分量の肝を移植できず、また生体ドナーであるが故に再移植も簡単なことではない。このためひとつの新しい医療技術として、肝実質細胞を組み込んだバイオ人工肝が開発されている。当グループでも、第一世代型として回流式培養装置「キグナス」、第二世代

型として2区画式培養装置「DCCA」を開発し、細胞組み込み型人工臓器の生物学的治療効果を確認している。しかしながら、生きた細胞を組み込む人工臓器は、取り扱いに高度な技術を要し、汎用化に不向きである。そこで、細胞の有する特性を人工膜に付与し、機構的に簡素化した新しいバイオ血液浄化装置を開発することが本プロジェクトの目的である。すなわちナノレベルの機能性生体高分子を人工膜上で再構築し、人工膜に選択的・能動的な毒性物質の輸送を行わせるというものである。ジゴキシンなどの有機アニオン物質の輸送を行うトランスポーターMDR1を組み込んだ人工リン脂質膜は、ATPの存在下にジゴキシン、ベラパミルといった基質を輸送する。その原理を透析膜上に現出するために、分子そのものと周囲の環境の最適化を行っている。

B. 研究方法

1) 透析カラム化に向けた機能性膜構築と評価

機能性膜構成の基材として、膜面に対し垂直な微細孔を有する Whatman 社製のアノディスク (Anodisc、孔径 20nm、全体外径 13mm) を用いた。アノディスクへの脂質膜形成は脂質-クロロホルム溶液でコーティング後に脂質-界面活性剤を加えた水溶液中加入し、透析処理で界面活性剤を除去させ自己組織的に脂質膜を構築した (図1)。評価は、放射性 Digoxin の輸送能によった。

2) MDR1 リポソームによる Digoxin 輸送へのアルブミンの影響

MDR1 リポソームの Digoxin 取込実験系の反応溶液中に 50mg/ml の濃度で牛血清アルブミンを加えた。あるいは反応をラット血漿中で行った (血漿の最終濃度は 73%)。

3) メガリン断片化部位とベータ 2 ミクログロブリンの結合の検討

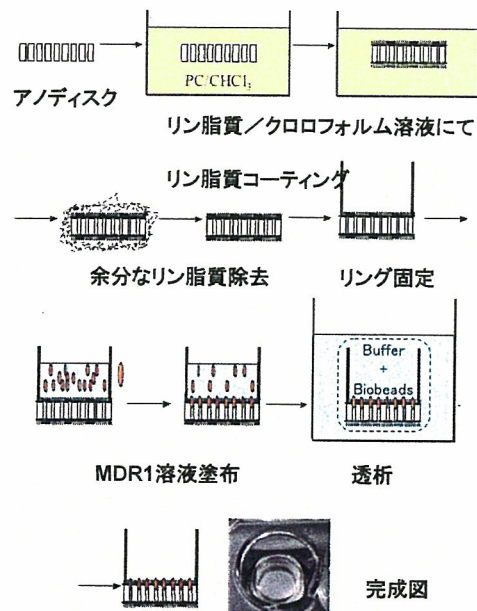
Lysyl Endopeptidase を用いてリコンビナント Megalin cluster II タンパク質を断片化したのち、免疫沈降法を用いてベータ 2 ミクログロブリンとの結合領域を検討した。

C. 研究結果

1) 透析カラム化に向けた機能性膜構築と評価

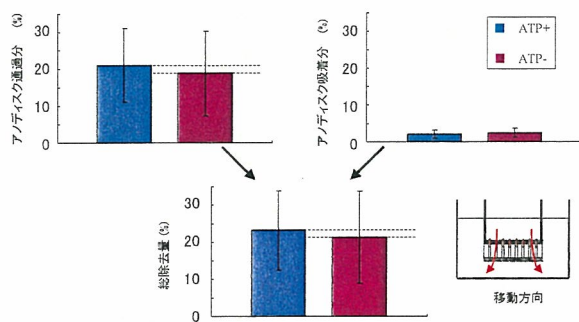
アノディスクは、アルミナベースの親水性膜である。アノディスクへの脂質膜形成の方法としては、1) まずチオール単分子膜を作製し、その上に自己組織的に脂質膜を構築する、2) リポソームを接触させて融合させる、3) 脂質-クロロホルム溶液でコーティング後に脂質-界面活性剤を加えた水溶液中加入し、透析処理で界面活性剤を除去させ自己組織的に脂質膜を構築、を検討した。このうち、3) が最も実効性があると考えられたので、技法の改良の結果、図1に示す方法を採用することとした。

図1 アノディスク上での機能性膜の作成



こうして得られた膜の上面に放射性ジゴキシンと ATP を加え、膜下面への輸送能を見た (図 2)。ATP の有無で、上面に加えた総量の $21.1 \pm 10.0\%$ あるいは $18.9 \pm 11.5\%$ が下槽に移動した (n=5)。この時、膜自体に吸着されたジゴキシンは、どちらの場合も $2.1 \pm 1.1\%$ 、 $2.5 \pm 1.2\%$ と極めて低かった。これらを合わせ、添加ジゴキシンの除去量としては、 $23.2 \pm 10.7\%$ 、 $21.3 \pm 12.4\%$ であった。

図 2 MDR1 固定機能性膜による MDR1 輸送能の検討

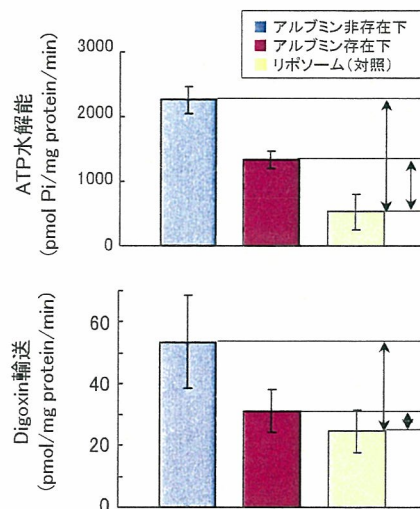


2) MDR1 リポソームによる Digoxin 輸送へのアルブミンの影響

実際の血液浄化では、血液中にアルブミンをはじめとしたたんぱく質が存在する。主要タンパク質のアルブミンを加えて放射性基質輸送の検討を行った。ATP 加水分解能では 50% 減、取り込みでは 80% 減の抑制が見られた (図 3)。図 3 のカラムは左から、アルブミンのない状態、アルブミンを加えた状態、MDR1 を有しないリポソームの場合 (対照) の Digoxin 取込を示している。ATP 依存的な取込は、それぞれの差であり、両端が矢印の線によって示した。この線の長さを見ると、ATP 水解能で見た場合に比べ、実際の取込量で評価した場合にアルブミンの抑制が顕著であることがわかった。ラット血漿

を用いた場合も同様な結果が得られた。

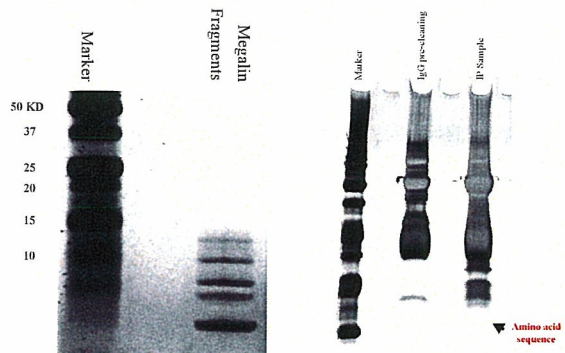
図 3 MDR1 リポソームの Digoxin 取込反応に対するアルブミンの影響。対照のリポソームとの差 (両端が矢印の線で表示) が実取込量となる。



3) メガリン断片化部位とベータ 2 ミクログロブリンの結合の検討

Megalin cluster II タンパク質を断片化したところ、明確な 9 本のバンドが得られた (図 4 右)。次いで、免疫沈降法を用いて $\beta 2$ -M と結合するバンドを探し出した (図 4 左、矢印)。

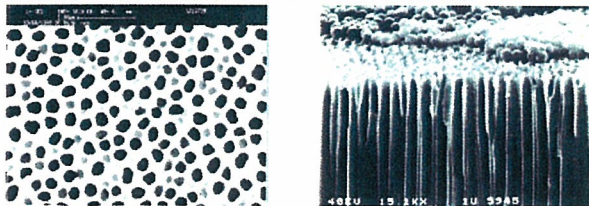
図 4 リコンビナントメガリンクラスターIIの断片化とリコンビナントベータ 2 ミクログロブリンとの結合の確認



D. 考 察

最終年度において、当初目的としていた機能性膜の構築に到達した。今回用いたアノディスクは、孔が垂直に伸び、空孔率が25-50%と高く、他の膜にはない特長を有し、本実験に適していた(図5)。機能性膜の性状は、輸送能はまだ低い、吸着がないことが利点と考えられる。輸送能の強化については、引き続き種々の改良、工夫を試みている。マクロ的な物性としては、アルミナベースのため、やや脆弱で、必ずしも医療機器として最適とはいえない。今後、機能を高めることとともに素材面の探索も必要である。

図5 アノディスクの微細構造(Whatman社ホームページより)。孔径は20nm、100nm、200nmの3種用意されている(今回使用は20nm)。直線性の孔と空孔率が高いのが特長。



アルブミンの存在がトランスポーター機能が抑制することは、将来の臨床応用のためには克服しなくてはならない。ジゴキシンは血中でアルブミンと20-30%程度が結合している。しかしながら、この程度の結合が、抑制の主原因とは考えられない。アルブミンが、リポソームを覆う、あるいは、MDR1の機能に直接影響を及ぼしている可能性がある。実際、ATP加水分解活性でみてもアルブミンによる抑制があることは、これらの可能性を示唆している。いずれにしろ、直接的な解決法は反応系からアルブミンを除去することである。これは本年度の久保井分担報告にあるDouble-flow系にして、一旦アルブミンのない状況を作り出して、反応後にアルブミン画分と合わせることで解決可能

と考えている。

長期透析者のほとんどが罹患している透析アミロイドーシスは、腎の廃絶によって起こるベータ2ミクログロブリンの体内蓄積が原因とされている。血中高値となったベータ2ミクログロブリンを除去するために、ハイパフォーマンス透析や疎水性タンパク吸着剤であるヘキサデシルアミンを用いたカラム、リクセルが使われる。この両者とも、ベータ2ミクログロブリン特異的な除去を行うわけではなく、血中のサイトカインなど、有用タンパクも除去している可能性がある。生体由来のナノパーツを医療機器に利用しようという目的で始めた本研究において、ひとつの標的がメガリンであった。メガリンは分子量60万超の巨大分子であるが、単鎖で繰り返しのドメイン構造を有するタンパクなので、リガンドとしての機能部位は短いものと考えられる。現段階ではその部位を特定するに至っていないが、特定への道筋が確立されたと言ってよい。

E. 結論

MDR1を組み込んだ機能性膜の構築ができ、膜を介する輸送が確認された。MDR1の活性をアルブミンが抑制することがわかった。Double-flow系の利用で解決可能と考えられる。透析アミロイドーシスの原因タンパクであるベータ2ミクログロブリンとその生理的リガンド、メガリンの結合部位を特定し得る実験系が確立できた。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表