

—平成18年度 岐阜薬科大学特別研究費（奨励）—

プラズマ技術によるバイオセンサー構築のための 生体分子固定化用高分子表面の設計

笹井 泰志

1. 緒言

タンパクなど生体由来の機能性高分子は、生体内においてそれぞれの基質と特異的に相互作用し、機能を発現している。近年、そのような生体分子の分子認識能をバイオセンサーに利用しようとする試みが盛んである。そのうち、プロテインチップなど各種バイオチップは、超高齢化社会を迎えつつある今日、予防医学、あるいはテーラーメイド医療の観点から、その研究開発の動向が注目されている。バイオチップの開発においては、定量性や感度とともに、汎用診断ツールとして普及させるためには、低価格化や小型化も重要な課題である。そこで、近年、チップ基材には、従来のガラスに代わり成型加工性がよく安価な高分子が注目されており、その表面に生体分子を固定化する方法の開発が求められている。その技術開発の最重要ポイントは、基板表面において生体分子がうまく機能するようインターフェイスを設計することである。

我々は、弱電離気体（低温プラズマ）を利用した医薬学的応用研究の一環として、これまでに、プラズマ照射により疎水性の汎用高分子表面にカルボキシル基含有高分子（vinylmethylether-maleic acid copolymer (VEMAC))を固定化することによる持続的な表面親水化法を開発している。

1) その方法に従い、本研究では、高分子基材に低密度ポリエチレン(LDPE)を用い、その表面にVEMACを固定化し、LDPE/VEMACシートを調製した。そして、その表面カルボキシル基を利用し、原子移動ラジカル重合法(ATRP)により、ポリメタクリル酸グリシジル(pGMA)の高分子グラフト層をLDPE表面に構築し、GMAのエポキシ基を介したモデル生体分子 Urokinase(UK)の固定化について検討した。そして、その活性評価から本方法により構築される pGMA グラフト層のバイオインターフェイスとしての有用性について考察した。ATRPでは、高度に分子量および分子量分布が制御された高分子の合成が可能である。2) したがって、本方法では、pGMA グラフト鎖長が精密に制御され、UKの機能発現に最適なインターフェイスの構築が可能であると期待される。

2. 実験

LDPE/VEMAC シートの調製 LDPEシートをビニルメチルエーテル無水マレイン酸共重合体(VEMA)のシクロヘキサノン溶液に所定条件下浸漬し、LDPE表面層にVEMAを収着させた。次に、13.56 MHzの高周波電源装置を用いた誘導結合方式によりアルゴンプラズマ照射を行い、LDPEのプラズマ架橋反応を惹起しVEMAを固定化した。そして、VEMAの無水マレイン酸部位を加水分解し、マレイン酸に変換することでLDPE/VEMACシートを調製した。

ATRPによるpGMAグラフト層の調製 図1に反応スキームを模式的に示す。LDPE/VEMAC表面のカルボキシル基を介してATRP開始剤である2-bromoisobutyryl bromideを固定化した。そのシートを[GMA]:[CuCl]:[CuCl₂]:[2,2'-bipyridyl]のモル比が100:1:0.2:2であるDMF/H₂O(1/1(v/v))溶液に加え、系内を窒素置換後、室温にて所定時間反応させ、pGMA-grafted LDPEシートを調製した。

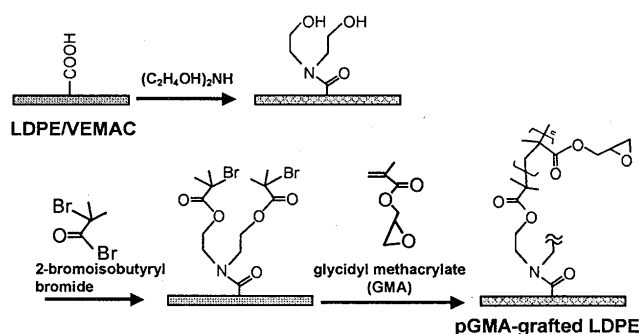


Fig. 1 Schematic illustration for fabrication of pGMA-grafted LDPE sheet.

UKの固定化とその評価 UKを含むリン酸緩衝液中にpGMA-grafted LDPEシートを浸漬し、4℃にて24時間インキュベートし、GMAのエポキシ基を介したUKの固定化を行った。UKの固定化量は、bovine gamma globulinをstandardとしたBradford法により求めた。固定化UKの活性は、UKのペプチド基質に対するアミドリシス活性から求めた。

3. 結果・考察

ATRPによるGMAグラフト層の調製： ATRPはリビングラジカル重合法の一種であり、分子量の整った、すなわち分子量分布が極めて狭い高分子を得ることが可能である。図2は、ATRPによるpGMAグラフト層の生長をIRにより評価した結果である。c-eの比較により、ATRP時間に伴い、GMAのカルボニル基に由来するピーク(1733 cm⁻¹)強度の増加が認められた。この結果は、GMAの重合がATRPにより進行し、LDPE/VEMACシート表面に、鎖長の制御されたpGMAグラフト層が構築されていることを強く示唆している。

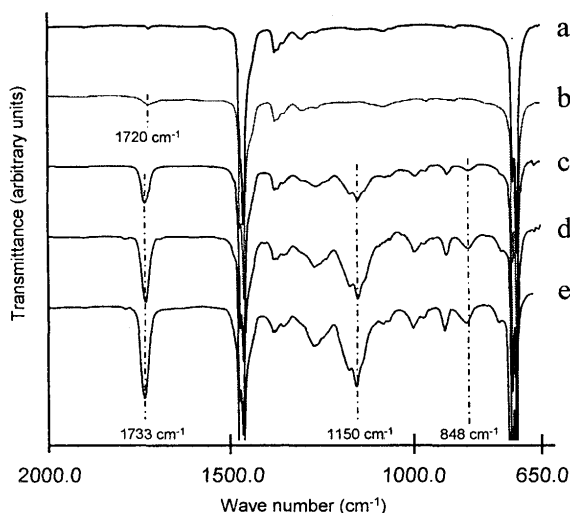


Fig. 2 ATR-FTIR spectra of surface-modified LDPE sheet: (a) LDPE, (b) LDPE/VEMAC, pGMA-grafted LDPE sheet prepared by ATRP for (c) 2 h, (d) 4 h and (e) 6 h.

pGMA-grafted LDPE シート表面へのUKの固定化：

種々の ATRP 時間により調製した pGMA-grafted LDPE シート表面における UK の standard に対する相対固定化量 (μg/cm²) および活性 (IU/cm²) を測定し、それら両値から固定化されている UK のうち活性発現に関与している UK の割合 (Relative Activity (RA), %) を算出した (表 1)。ATRP 時間による各値を比較した結果、固定化量は、GMA の重合量と共に顕著に増加したが、活性に関しては、いずれのシートにおいても有意差は認められなかった。そのため、RA 値は、2 時間の ATRP により調製したシートにおいて最も高い値が得られた。この結果は、固定化 UK の活性発現には、pGMA のグラフト鎖長が強く影響していることを示唆している。ところで、UK 固定化高分子材料としては、医療用抗血栓性カテーテルが市販されている。そこで、本研究と同様の方法によりその活性を測定したところ、6.17 ± 2.03 IU/cm² であった。この値は、製造後長期間経過した製品のものであるため、UK の経時的な失活も考えられるが、本方法による pGMA-grafted LDPE シート表面の GMA のエポキシ基を介した UK の固定化は、UK の活性発

現に有用であると考えられる。

Table 1 Activity of UK immobilized on pGMA-grafted LDPE sheet prepared with various ATRP time.

Polymerization time	Immobilized UK (μg/cm ²)	Activity of Immobilized UK (IU/cm ²)	Relative activity (%)
2 h	0.44 ± 0.08	35.66 ± 2.77	101.3
4 h	2.05 ± 0.08	31.34 ± 1.86	19.1
6 h	4.53 ± 0.15	32.96 ± 4.63	9.1

固定化 UK の保存安定性： 本方法により固定化された UK の 37 °C リン酸緩衝液中における活性の経時変化を比較の目的で溶液状態の UK、および縮合試薬を用い LDPE/VEMAC シートのカルボキシル基を介して直接固定化した UK のものと共に評価した。図 3 は、固定化および溶解直後に測定された UK の活性に対する活性の経時変化を示している。直接固定化した UK および溶液状態の UK においては、本実験条件下、保存開始直後に著しい活性の低下が認められた。一方、ATRP により調製した pGMA-grafted LDPE シートに固定化された UK については、保存初期に約 20 % の経時的な活性の低下が認められたが、その後、定常化する傾向にあり、長時間にわたり高い活性が持続した。これは、pGMA グラフト層の鎖長や密度、あるいはフレキシビリティが固定化された UK の活性の発現や安定性に対して有利に機能していることを示している。また、GMA のエポキシ基を介した UK の固定化が穏和な条件で進行することも本方法の利点である。

以上の結果より、本方法により構築される pGMA グラフト層は UK の固定化用インターフェイスとして有用であることが明らかとなった。現在、対象とする生体分子の適応拡大とともに、本方法を利用したバイオセンサーや医療材料の開発を行っている。

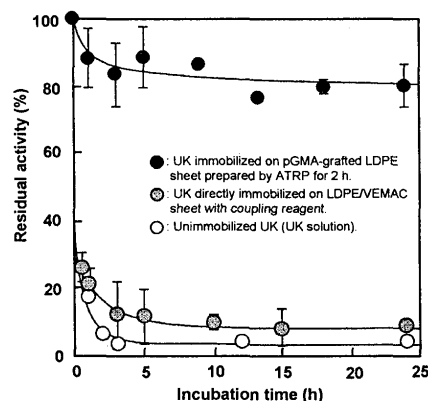


Fig. 3 Progressive changes in enzyme activity of immobilized UK in pH 7.0 phosphate buffer solution at 37°C.

4. 引用文献

- 1) M. Kuzuya, et al., *Plasmas and Polymers*, **2**, 133 (1997), *J. Photopolym. Sci. Technol.*, **14**, 87 (2001), *Sur. Coat. Technol.*, **169-170**, 587 (2003).
- 2) K. Matyjaszewski et al., *Science*, **272**, 866 (1996).