

生体適合性に優れたバイオセンサー被覆用高分子膜の合成

Synthesis of polymer membrane with excellent biocompatibility for coating on biosensor surface

代表研究者 東京医科歯科大学助教授

石原 一彦

Assoc. Prof., Institute for Medical and Dental Eng., Tokyo Medical and Dental Univ.

Kazuhiko ISHIHARA

Biosensors are widely studied to measure an active compound in a living system. They are composed of an electrode or photon counter and immobilized enzyme, and a target compound reacts with the enzyme as a substrate and a product of this enzymatic reaction is detected by a suitable electrode. Therefore, biosensors are highly selective and sensitive for the target compound in a mixture of biocomponents. However, the sensitivity and responsibility of the biosensor is reduced when the sensor is used in living body. The main problem is the lack of biocompatibility of the sensor surface. It is well known that proteins and cells adsorb on the surface of artificial material when the material comes in contact with blood or living fluid. The adsorption layer of these biocomponents interfere the permeation of the target compound. To solve this problem, the membrane covering the sensor surface which must have not only good biocompatibility but also the permeability for low molecular-weight compounds so immunoglobulins, whose molecular weight is about 1.5×10^5 , cannot permeate, thus preventing undesired immunoreactions.

In this study, the membrane covering the sensor surface was prepared from a polymer having a phospholipid polar group, 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) copolymerized with *n*-butyl methacrylate (BMA), which shows excellent blood compatibility. Thus, cell adhesion and activation are completely inhibited on the poly(MPC-co-BMA) surface. Furthermore, it is also found that the adsorbed amount of protein decreased with an increase in the MPC mole fraction of the copolymer. The effects of the poly(MPC-co-BMA) membrane as a covering membrane of the biosensor on the sensitivity and responsibility of the sensor were investigated in the presence of plasma proteins. According to the results, the sensor which covered with the poly(MPC-co-BMA) membrane could work completely over 30 h in the protein solution whereas the responsibility of the sensor covered with cellulose dialysis membrane for clinical use reduced about 60% after 30 h.

研究目的

本研究では、長期間にわたり体内に埋入し、生体内微量成分の変動を連続的かつ鋭敏に計測することのできるバイオセンサーの開発において、最重要課題である生体適合性の付与に不可欠な被覆用高分子膜素材の分子設計及び機能評価を目的とした。

今日、医療技術は周縁領域における技術革新とともに目覚ましい勢いの進歩を示している。例え

ば、医療の一分野である臨床検査は、単なる診断、治療のための情報収集から、予防医学へと発展してきている。その内容も質、量ともに確実に豊富になり、医療行為の及ぶ範囲は格段に広がった。バイオセンサーは、1960年代から研究が進められており、種々の生体触媒を固定化したセンサーが開発され、実用化段階の現状である。さらに血液成分の連続計測を行うために、微小な生体内埋入型バイオセンサーが開発されるに当たり、医療

分野への応用も次第に拡大している。生物学的親和性を作動原理とするバイオセンサーは、従来の臨床検査において主流であった比色法やクロマトグラフィーに比較して、検体の前処理や分離操作が不要であることを特徴とするため、臨床検査の迅速化、高精度化に極めて重要な役割を担っている。さらに今後は生体内に埋入して直接情報を得ることが強く望まれている。しかしながら、現在のバイオセンサーは生体適合性に関してほとんど対策がなされておらず、生体内に埋入するとタンパク質や細胞など生体成分の表面への吸着・活性化を生起する。このため感度が著しく低下し計測不能になるばかりか血栓形成、免疫反応など生体側に対する影響も避けられない。したがってバイオセンサーの表面を優れた生体適合性と物質透過性を有する高分子膜で被覆しなければ、生体内に埋入可能なバイオセンサーの実現は不可能である。現在、センサーの被覆用高分子膜として既存のポリウレタン膜やシリコン膜を利用しているだけであり、これを生体内に埋入した場合、2時間程度で感度の著しい低下が認められる。ここでは生体適合性と物質透過性を兼ね備える生体膜構造に着目し、新規な高分子膜の分子設計を行った。生体膜の主要な構成成分であるリン脂質の極性基構造を有する単量体と疎水性の単量体から得られる共重合体膜表面には、生体由来のリン脂質分子が高度に配向して吸着するため、安定な生体膜類似構造の形成が可能である。

研究経過

リン脂質分子との特異的相互作用する高分子としてリン脂質極性基の一つであるホスホリルコリン基を有するメタクリル酸誘導体、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC, Fig. 1) を一成分とする共重合体を合成した。MPC 共

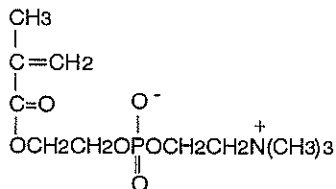


Fig. 1. Structure of MPC.

重合体、特に疎水性の *n*-ブチルメタクリレート (BMA) との共重合体は血液細胞の粘着・活性化を抑制し、血栓を形成させないことが見いだされた。MPC が含まれない重合体 (ポリブチルメタクリレート) では血小板が粘着し、活性化するためフィブリンが多量に生成しているが、MPC が 32 mol% 含まれた MPC-BMA 共重合体では全く血小板の粘着及びフィブリンの生成が認められないことが示された。ヒト全血を抗凝血剤を使用しない状態で共重合体と接触させた場合にも抗血栓性発現が確認されている。すなわち、ガラス表面では 8~9 分で血液凝固が起こる条件で、これに MPC-BMA 共重合体を被覆した場合には 25~30 分と凝血時間が 3 倍にも遅延することが見いだされた。MPC 共重合体は、優れた血液適合性表面を与える他、共重合モノマーを種々選択できるため基材に対する親和性や機械的強度にも十分に付与することができる。また、MPC-BMA 共重合体膜は分子量 1 万程度の溶質まで透過する物質透過性を有していることが明らかとなった。このことは、生体適合性と物質透過性の両方が必要とされる医用膜素材として応用可能であることを示している。

MPC-BMA 共重合体のエタノール溶液に血液透析用セルロース膜を浸した後、乾燥し被覆膜を作製した。酸素電極に酸素透過性テフロン膜、その外側に GOD 固定化膜を取り付け、さらにその外側を限外口過膜の代わりにセルロース膜で覆ってグルコースセンサーを作製した。酢酸ナトリウム緩衝液中にグルコースセンサーを入れ、37°C に保ちながら酸素を 5 分間導入し、その後グルコース水溶液を注入した時の出力電位の変化をレコーダーで記録した。この測定を、MPC 共重合体での被覆の有無それぞれの場合について行った。作製したグルコースセンサーは、浸漬された溶液中の酸素濃度に対応したある一定の値を示す。そこでグルコース溶液を注入すると、グルコース-GOD 間の酵素反応により消費される酸素量が電位の変化として記録される。この時の電位変化と最終的な電位差がグルコース濃度に依存する。グルコース濃度が 50~300 mg/dl の範囲で

グルコース濃度と電位差との間に直線関係が得られた。すなわち、この範囲においては未知のグルコース濃度を定量できることがわかった。また MPC 共重合体を被覆したセルロース膜を適用しても、この電位応答性が変化しないことがわかった。リン酸緩衝液 (PBS, pH 7.4) に、アルブミン (4.5 g/dl) と γ -グロブリン (1.6 g/dl) を溶かし、血中濃度に等しいタンパク質溶液を調製した。この溶液にグルコースセンサーを入れ、グルコース濃度が 250 mg/dl とした時の電位の変化を測定した。この擬似生体環境下での実験を 30 時間続けて、センサーの安定性について検討した。実験終了後、センサー被覆膜の透過型電子顕微鏡

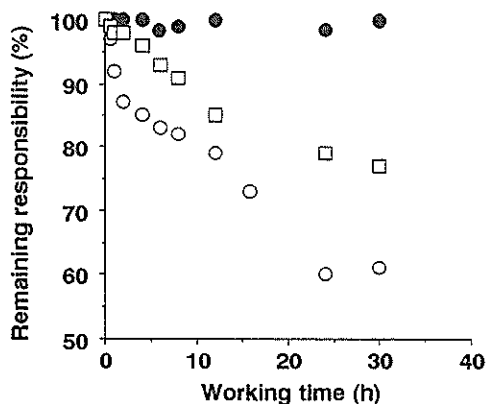


Fig. 2. Change in responsibility of glucose electrode covered with (●) poly(MPC-co-BMA), (□) poly(HEMA), and (○) cellulose membrane in protein solution.

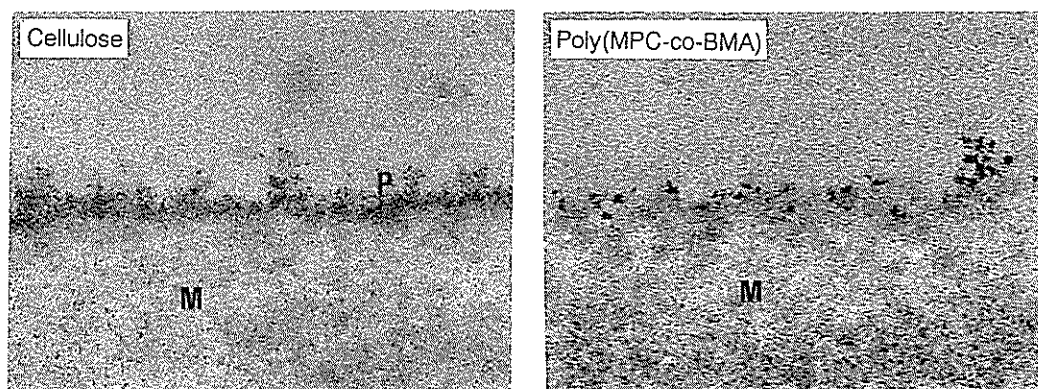


Fig. 3. TEM pictures of cross-section of cellulose and poly(MPC-co-BMA) membrane after contact with the protein solution for 30 h. M and P represent membrane and protein adsorbed, respectively.

(TEM) 観察を行い、表面の変化を検討した。

血中濃度に等しいタンパク質溶液に長時間センサーを浸した時のグルコース応答電位の変化を測定した結果、MPC 共重合体で被覆した膜を使用した方では実験開始 4 時間後まで、全く電位変化量の低下が見られなかったのに対し、被覆をしていないセルロース膜では実験開始直後から電位変化量が減少し、MPC 共重合体被覆膜とは明らかに違う挙動を示した。また親水性のポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート) (HEMA) を被覆した膜の場合でも、やはり開始直後から電位変化量の低下が見られた。30 時間後の値を見ても、未被覆、HEMA 被覆の膜がそれぞれ初期値の 12%, 32% まで低下したのに対し、MPC 共重合体被覆膜では 65% と高い応答性を維持していた。これら電位変化量の原因として考えられることは、第一に、センサー被覆膜へのタンパク質の吸着による物質透過性の低下が挙げられる。またもう一つの原因として、長時間、GOD を 37°C で維持したことによる酵素活性の低下が考えられる。そこでタンパク質溶液中での測定値と PBS 中での測定値との差をとり Fig. 2 に示す。これらの値はタンパク質溶液中での電位変化量の減少のうち、センサー表面へのタンパク質吸着による物質透過性の低下だけを表わしている。セルロース膜で被覆したセンサーでは応答性の経時的低下が著しく、30 時間後には初期値の 60% 程度になった。HEMA を被覆した場合、低下の度合いは抑

制され約73%であった。一方、MPC共重合体を被覆した膜を用いるとセンサーの応答性は全く低下しなかった。さらに膜表面のTEM観察写真(Fig. 3)を見るとセルロース膜の表面にはタンパク質の厚い吸着層が形成されているのに対し、MPC共重合体の表面にはタンパク質の吸着はほとんど見られなかった。なお、予備的段階であるが、ウサギ全血を用いてMPC-BMA共重合体膜で被覆したグルコースセンサーの安定性を検討した結果、3時間後においても全く感度の低下が認められなかった。以上の結果から、MPC共重合体被覆膜を利用したセンサーでは、血液中からのタンパク質や細胞成分の被覆膜表面への吸着あるいは粘着を原因としたセンサー機能の低下は皆無であることがわかった。したがってMPC共重合体をセンサー被覆膜として用いることにより、バイオセンサーでの生体内連続計測が可能になると期待される。

今後の課題と発展

本研究では代表的なバイオセンサーとしてグルコースセンサーについて検討したが、ここで示したように血液適合性の問題が解決されると標的物質に対して特異的な酵素を使用することにより、多くの物質のセンサーが作製できる。これは今後、臨床検査領域や人工臓器の開発に大きく寄与し、21世紀に向けて明るい見通しを与えると確信している。

本研究の成果を学会などで報告したことにより、東大先端研軽部研究室や熊本大医学部七里研究室などとの協同研究もスタートした。これらの研究室はバイオセンサーの研究では世界的であり、有意義な討論を通じて大きな発展が期待できるとともに、臨床評価をすぐできる体制が整いつつある。

発表論文

論文発表

- 1) Synthesis of Blood Compatible of Cellulose Dialysis Membranes 1. Grafting of 2-methacryloyloxyethyl Phosphorylcholine onto Cellulose Membrane. *Biomaterials*, in press (1992).
- 2) Synthesis of Blood Compatible of Cellulose Dialysis Membranes 2. Blood Compatibility of Phospholipid Polymer Grafted Cellulose Membrane. *Biomaterials*, in press (1992).
- 3) Protein Adsorption from Human Plasma is Reduced on Phospholipid Polymer. *J. Biomed. Mater. Res.*, 25, 1397~1407 (1991).
- 4) Protein Adsorption Resistible Membrane for Biosensor Composed of Polymer with Phospholipid Polar Group. *J. Polym. Sci., Part A, Polym. Chem.*, in press (1992).

口頭発表

- 1) リン脂質高分子による生体適合性センサー被覆膜の作成と機能評価。日本化学会第61春季年会, 1991年4月, 横浜。
- 2) 血液適合性膜で被覆したバイオセンサーの生体環境下での安定性。高分子学会第20回医用高分子シンポジウム, 1991年6月, 東京。