論文特集「表面・界面の機能化」

(日本化学会誌, 1985, (6), p.1278~1284)

© 1985 The Chemical Society of Japan

医療用化学吸着剤——尿素をアンモニアとして除去する

“ジアルデヒドデンプン”-ウレアーゼ複合体——

(1984 年 10 月 22 日 受理)

清水敏美*・山崎嘉彦**・伊佐 功**・田中芳雄

尿素除去は、多量の透析液などを用いることができない装着型または埋込型人工腎臓の開発のうえで、最大急務の課題である。そこで著者らは、生理条件下での有効な尿素除去剤として“ジアルデヒドデンプン”(DAS)に着目し、今回、新たに、DAS-ウレアーゼ複合体からなる尿素分解型化学吸着剤を開発した。調製法としては、DAS 粒子表面に分布するホルミル基の一部をジアゾ誘導体に変換したのちウレアーゼを固定化する方法 [(i) 法] と、DAS に直接、ウレアーゼを固定化する方法 [(ii) 法] の二法を用いた。その尿素除去原理は、DAS に固定化したウレアーゼによって尿素をアンモニアに分解し、その生成アンモニアを残存するホルミル基で化学的に吸着除去することからなる。DAS-ウレアーゼ複合体のウレアーゼ活性は、酸化度が 80% 前後の DAS に、pH 5 付近でウレアーゼを固定化したとき、もっとも大きくなった。(i) 法で得た複合体のウレアーゼ活性の至適 pH は約 7 であり、pH 安定性は遊離ウレアーゼにくらべて低下した。(ii) 法で得た複合体の尿素除去容量は 18.9 mg/g、除去率は 94% (初期濃度 $2.00 \times 10^3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ 、透析液中、37°C、24 時間)であった。この結果は DAS 単独の場合の 1.4 倍であり、他の尿素除去例の結果よりはるかに優秀であった。

1 緒 言

吸着剤を医療用途に適用する場合には、その吸着容量、吸着速度とともに、生体適合性、無毒性、安定性などを総合的に評価する必要がある。たとえば、活性炭は急性腎不全、急性肝不全、薬物中毒などの疾病の原因となる生体内有機物質を効率よく吸着できる¹⁾。しかし、この活性炭を血液浄化剤として用いる場合、一般にその外殻は、血液適合性のよい高分子材料で被包化されている²⁾。こうした医療用活性炭の開発にともない、透析以外に、限外濾過、血漿分離、吸着などの原理を応用した人工腎臓の研究もすすんでいる。しかしながら、これらの将来型人工腎臓は、活性炭が不得意とする 1) 尿素除去、2) 電解質平衡の是正、3) 除水の三つの性能を満足しないかぎり、慢性腎不全治療法として確立しえない。とくに尿素は尿中に排泄される有機物質の中で量的に最大(14~35 g/d)のものであり、その体内蓄積は、生体内酵素などの変性障害をひき起こすといわれる³⁾。したがって、生理条件下で有効に作用する尿素除去剤の一刻もはやい開発が内外を問わず望まれている。

著者らはこれまでに、無毒性の二つのホルミル基をもつユニットを含む高分子化合物⁴⁾として、“ジアルデヒドデンプン”(以下

DAS と略記する)⁵⁾(図 1)に着目し、その尿素およびアンモニアなどの化学的親和性⁶⁾を利用して医療用尿素除去剤としての有効性を検討してきた^{7)~10)}。その中で、DAS を膨潤させ、その表面に分布するホルミル基のみを生体適合性のよいアルブミンやゼラチンで不活性化させた、表面化学処理 DAS を開発した⁷⁾。この DAS の、生理条件下、 $1.2 \times 10^3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ の尿素溶液に対する 24 時間後の単位結合容量は約 8 mg/g に達し、今までの尿素除去例¹¹⁾の結果よりはるかにすぐれていた。この尿素除去剤の開発途中、著者らは、尿素除去実験系に DAS 重量の 0.5% の粗ウレアーゼ (0.17 Units/g) を添加するだけで、見かけ上、残存尿素濃度が無添加系にくらべて飛躍的に減少する現象を見いだした。この観点から、少量のウレアーゼと DAS を複合一体化した化学吸着剤が、尿素から分解したアンモニアを除去できれば、さ

5) P. J. Borehart, *Kunststoffe*, 51, 137(1961).6) J. W. Sloan, B. T. Hofreiter, R. L. Millies, I. A. Wolff, *Ind. Eng. Chem.*, 48, 1165(1956).

7) 清水敏美, 山崎嘉彦, 植田政良, 本田 敏, 田中芳雄, 津田圭四郎, 高分子論文集, 39, 629(1982).

8) 清水敏美, 下田敬子, 田中芳雄, 佐々木寛治, 津田圭四郎, 秋沢忠男, 越川昭三, 高分子論文集, 39, 637(1982).

9) 衣笠えり子, 秋沢忠男, 児島弘臣, 田村克彦, 関口 孝, 中山文義, 高橋 健, 佐藤昌志, 北岡健樹, 出浦照国, 越川昭三, 清水敏美, 佐々木寛治, 中林宣男, 人工臓器, 11, 40(1982).

10) T. Shimizu, S. Fujishige, *J. Biomed. Mat. Res.*, 17, 597(1983).11) U. R. Shettigar, *Proc. Eur. Soc., Artif. Organs*, 7, 102(1980).

繊維高分子材料研究所, 305 茨城県筑波郡谷田部町東

** 日本カーリット株式会社, 377 茨城県半田

1) 吉田忠昭, “80年代の医用材料”, テクマート (1980) p. 97.

2) 中林宣男, 化学工業, 28, 505(1983).

3) C. Tanford, *Adv. Protein Chem.*, 24, 1(1970).4) R. H. Wilson, *Proc. Soc., Exp. Biol. Med.*, 102, 735 (1959).

Fig. 1 Structure of "dialdehydestarch" (DAS)

Fig. 2 Schematic representation of the action of DAS-Urease conjugate on the removal of urea

きの表面化学処理 DAS よりさらに効率のよい尿素分解型除去剤が得られる可能性があると考えた。すなわち、DAS の表面に分布するホルミル基の一部を利用して、尿素分解酵素であるウレアーゼを固定化し、残存ホルミル基で、尿素分解によって生成したアンモニアを除去するのである(図2)。ちなみに、DAS は尿素の他にアンモニア除去剤としての性能も高く、その除去速度も尿素に対するよりも速いといわれる¹²⁾。また、ウレアーゼの固定化は、生体内にウレアーゼが遊離するのを防止でき、好ましくない生体内アンモニア濃度の上昇をおさえることができる。これまでに、人工腎臓用の尿素処理システムとして、ウレアーゼ固定化担体を含むカラムで尿素をアンモニアに分解し、それを、直列するアンモニア吸着剤で除去する二段の方法¹³⁾、ウレアーゼとアンモニア吸着剤をマイクロカプセル化した例¹⁴⁾、またはアンモニア吸着剤にウレアーゼを固定化した系¹⁵⁾が知られている。しかし、尿素およびアンモニアの除去能が高い化学吸着剤にウレアーゼを固定化した系の報告例はない。

2 試料および実験方法

2.1 材料

ホルミル基2個をもつユニットの含量(以下、酸化度とよぶ)が異なる4種のDASは、バレイショデンプンの過ヨウ素酸酸化により得た。酸化度の規制は、デンプンと過ヨウ素酸との仕込みモル比を変化させて行なった。水素化ホウ素ナトリウム法¹⁶⁾によ

り定量した酸化度は、それぞれ29.9%、45.2%、69.5%、80.8%であった。ウレアーゼ(Uと略記する)(シグマ社製)はタイプⅢ、凍結乾燥標品で、活性3.2 Units/mg(測定条件、pH 7.0、30°C)と称するものを使用した。

2.2 DAS へのウレアーゼ固定化

DAS へのウレアーゼ固定化法として、(i)4,4'-ジアミノジフェニルメタン(以下DADPMと略記する)を用いたGoldsteinらのジアゾ法¹⁷⁾の改良法、(ii)Schiff塩基構造形成法¹⁸⁾の二法を試み、DAS-ウレアーゼ複合体としてそれぞれ、DAS-DADPM-UとDAS-Uを得た。(i)法、(ii)法の調製スキームを図3に示す。二法に共通する調製上の特徴は、DASとDADPM、またはDASとウレアーゼの反応後形成されるSchiff塩基の還元処理を行なわないことで、ホルミル基を活性状態のまま残存させていることである。というのは、ホルミル基は生成アンモニアの結合官能基であるからである。また、DASへのDADPM導入量、DAS-DADPMおよびDASへのウレアーゼ導入量は元素分析のN含量から求めた。

Fig. 3 Scheme of preparation of DAS-Urease conjugate

(i): The coupling of diazotized DAS derivatives with urease

(ii): The condensation of DAS with urease

12) L. S. Meriwether, H. M. Kramer, *Kidney Int.*, **10**, S-259(1976).

13) T. M. S. Chang, "Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins", Vols. I and II, Plenum Publishing Corp., New York (1977).

14) T. M. S. Chang, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, **12**, 13(1966).

15) C. Kjellstrand, H. Borges, C. Pru, D. Gardner, D. Fink, *ibid.*, **27**, 24(1981).

16) 渡野辺哲郎, 渋谷盛興, 分析化学, **15**, 176(1966).

17) L. Goldstein, M. Pecht, S. Blumberg, D. Atlans, Y. Levin, *Biochemistry*, **9**, 2322(1970).

18) F. B. Weakley, C. L. Mehlretter, *Biotech. Bioeng.*, **15**, 1189(1973).

2.2.1 DAS-DADPM-U の調製: 2.1 で調製した、酸化度が異なる 4 種の DAS を各 1 g 用いて、Goldstein らの方法¹⁷⁾により DADPM (東京化成製特級試薬) 3 g を反応させ、DAS-DADPM 1.5~1.6 g を得た。このときの DADPM の導入率は 35~46% であった。この 4 種の DAS-DADPM 100 mg をそれぞれ酢酸と亜硝酸ナトリウムで処理し、生成したジアゾニウム塩を蒸留水、つづいて反応液と同じ pH の緩衝液で数回洗浄した。得られた沈殿物を各種の pH の緩衝液 4 ml に懸濁し、ウレアーゼ 10 mg を含む水溶液 3 ml を加え、4°C で 24 時間かきまぜた。沈殿物をガラス濾過器で濾過し、1 mol·dm⁻³ 塩化ナトリウム水溶液 100 ml、蒸留水 100 ml で洗浄し、最終的に凍結乾燥によって、褐色粉末の DAS-DADPM-U 複合体を得た。このとき、各複合体の DAS-DADPM からの収率は 89~94% であった。

2.2.2 DAS-U の調製: ウレアーゼ 100 mg を各種の pH の緩衝液 2 ml に溶解し、これにかきまぜながら、酸化度 81% の DAS 200 mg を加え、4°C で 24 時間反応させた沈殿物をガラス濾過器で濾過し、1 mol·dm⁻³ 塩化ナトリウム水溶液 100 ml、蒸留水 100 ml で洗浄し、最終的に凍結乾燥によって白色粉末の DAS-U 複合体 199 mg (収率 99%) を得た。

2.3 ウレアーゼ活性の pH 依存性と pH 安定性

DAS-DADPM-U 複合体のウレアーゼ活性を測定して、活性の pH 依存性と pH 安定性を検討した。ウレアーゼ活性の測定は、尿素を基質に用いて複合体を作用させ、その分解生成物のアンモニアを Kaplan の方法¹⁹⁾にしたがって行なった。pH 依存性と pH 安定性の測定における反応操作を表 1 に示す。遊離ウレアーゼについては、pH 依存性測定の場合、12.7 mg を緩衝液 14 ml に、pH 安定性測定の場合、18.2 mg を緩衝液 2 ml にそれぞれ溶解し、複合体を用いたときと同様な操作によってウレアーゼ活性を求めた。図 4~9 には、DAS-ウレアーゼ複合体および遊離ウレアーゼのそれぞれについて、全測定の最大値を 100 として、その相対活性値 (%) を示してある。

2.4 尿素除去能の測定

DAS または DAS-ウレアーゼ複合体からなる化学吸着剤 100 mg を、透析液 (武田薬品工業(株)製の TM-SOLITA の 30 倍希釈液) で調製した、濃度 1.00×10^3 mg·dm⁻³, 2.00×10^3 mg·dm⁻³, 3.00×10^3 mg·dm⁻³ の尿素溶液 1 ml 中に加え、37°C で 24 時間かきまぜて、尿素除去実験を行なった。そのあと、化学吸着剤を遠心分離し、それを濾過して濾液 0.1 ml を蒸留水で 80 倍希釈した。しかし、この希釈液中の残存尿素濃度を、ジアセチルモノオキシム法を用いて直接、比色定量する方法は再現性が悪く、この系に対して不適であると判断した。そこで、系中のアンモニアを定量し、尿素濃度に換算した。すなわち、さきの希釈液 0.8 ml にウレアーゼ溶液 (2 Units/ml) 0.2 ml を加え、37°C で 15 分間反応させて残存尿素を特異的に分解した。そして系中に存在する全アンモニアを Kaplan の方法¹⁹⁾により比色定量した。こうして、ウレアーゼ添加前と添加後のアンモニア窒素量の差から残存尿素濃度 (ただし、複合体に固定化されたウレアーゼによって、系中の尿素が 100%, アンモニアに分解された場合、実質的には、残存アンモニア濃度を意味する) を算出した。尿素除去容量は初期尿素濃度と 24 時間後の残存尿素濃度との差から

19) A. Kaplan, *Meth. Biochem. Anal.*, 17, 311(1969).

Table 1 Procedure for measurement of urease activity

pH dependence	pH stability
A suspension of DAS-DADPM-U (15 mg) in a various buffer solution ^{a)} (1 ml)	
↓	
Stirring at 37°C for 4 h	
↓	
Centrifugation	
↓	
Removal of supernatant (0.8 ml)	
Addition of the same buffer solution containing urea as that used at the beginning (0.21 mmol·dm ⁻³ , 0.8 ml)	Addition of a buffer solution (pH 6.5 ^{b)} , 0.8 ml)
↓	↓
Stirring at 37°C for 15 min	Stirring at 37°C for 30 min
↓	↓
Measurement of activity	Centrifugation
	↓
	Removal of supernatant (0.8 ml)
	↓
	Addition of a buffer solution containing urea (pH 6.5 ^{b)} , 0.21 mmol·dm ⁻³ , 0.8 ml)
	↓
	Stirring at 37°C for 15 min
	↓
	Measurement of activity

- a) pH 2~4: Prepared from 0.2 mol·dm⁻³ potassium dihydrogenphosphate and 0.2 mol·dm⁻³ potassium chloride.
 pH 5~13: Prepared from 0.2 mol·dm⁻³ potassium dihydrogenphosphate and 0.2 mol·dm⁻³ potassium hydroxide.
 b) Prepared from potassium dihydrogenphosphate and disodium hydrogenphosphate and added 1% of EDTA disodium salt.

算出した。

3 実験結果と考察

3.1 ウレアーゼ活性におよぼす複合体の調製条件の影響

3.1.1 pH の影響: ウレアーゼ活性におよぼす DAS-ウレアーゼ複合体の調製条件の影響を調べるために、まずウレアーゼ固定化時の pH の影響を検討した。その結果を図 4 に示す。DAS-U, DAS-DADPM-U ともに、pH 5 付近で、それぞれウレアーゼ活性が極大値を示している。また、DAS-DADPM を担体とする (i) 法では、DAS を担体とする (ii) 法にくらべて広範囲の pH 領域でウレアーゼ固定化を行なっても、複合体のウレアーゼ活性が保持されているのがわかる。一般のウレアーゼ固定化反応における最適 pH は、ウレアーゼの失活をできるだけ防止するために pH 6~9 の間で行なわれており²⁰⁾、今回の最適の pH 処

Fig. 4 Effect of pH of urease solution on the activity of DAS-Urease conjugate

—●—: DAS-U, —○—: DAS-DADPM-U

理条件は若干酸性側に移行しているのが特徴といえる。DAS-Uの場合、担体 DAS が中性から弱アルカリ性条件で膨潤して活性化し²¹⁾、それがウレアーゼ活性を阻害していると推察できる。すなわち、ウレアーゼの活性中心に存在する遊離メルカプト基が DAS の活性ホルミル基と結合し、活性が低下した可能性が高い。この結果は、ケラチンへのウレアーゼ固定化において、橋かけ剤グルタルアルデヒドが顕著な活性阻害を起こす結果²²⁾をよく説明できる。これに対し、DAS-DADPM-U の場合、DADPM が DAS の分子間または分子内に橋かけを形成し、これによって、同じ pH では、DAS 単独にくらべ膨潤が抑制されると考えられる。そのため、弱アルカリ性条件下でウレアーゼを固定化しても、さきの DAS のような活性ホルミル基による阻害が少ないため、ウレアーゼ活性が保持されていると推測できる。

表2は異なった pH 条件で調製したときの、DAS-U, DAS-DADPM-U, それぞれのウレアーゼ含量とウレアーゼ活性を示している。このときの活性値は、DAS-ウレアーゼ複合体を尿素に作用させて系の pH が 6.7 から 7.7 に達するまでの時間から算出した Sumner 単位²³⁾で表示してある。両者の複合体のウレア

Fig. 5 Effect of weight of urease on the activity of DAS-Urease conjugate

—●—: DAS-U, —○—: DAS-DADPM-U

ーゼ含量に大きな相違は認められない。これに対し、ウレアーゼ活性に大きな差が認められるのは、さきに述べた橋かけによる DAS 分子の高分子構造の安定化とそれによる活性阻害の抑制効果を反映しているといえる。

3.1.2 ウレアーゼ使用量の影響：つぎに、ウレアーゼ使用量の活性におよぼす影響を検討した。ウレアーゼ固定化時の pH 条件としては、(i) 法では pH 5.0, (ii) 法では pH 5.2 を用いた。相対活性値を各担体 100 mg に対するウレアーゼ使用量に対してプロットしたのが図5である。DAS-DADPM と DAS のいずれを担体とする場合も、本ウレアーゼ使用量範囲では、使用量が増加するにつれウレアーゼ活性が増大している。本研究の最終目的は DAS-ウレアーゼ複合体のウレアーゼ活性の大小ではなく、尿素分解によって生成するアンモニアの結合能の大小である。そのため、ウレアーゼ使用量を制限した。しかし、図5は、さらに大きいウレアーゼ使用量で、複合体のウレアーゼ活性が向上することを示唆している。また、表2の結果も考慮すると、DAS-DADPM を担体とする場合、DAS を用いる場合とくらべ

Table 2 Effect of pH of urease solution on the content of urease and the activity of DAS-Urease conjugate^{a)}

	DAS-U			DAS-DADPM-U		
Weight of urease ^{b)} (mg)	50	50	50	10	10	10
pH	5.8	6.0	6.5	5.0	6.0	8.0
Content of urease (%)	6.0	6.1	9.1	11.0	7.6	8.3
Activity (Sumner Units/g)	9.5	3.9	0.7	48.3	28.0	10.2

a) Prepared from DAS having 81% of diformyl unit content.

b) To 100 mg of DAS.

20) たとえば、豊田春和、松永あや子、長南康正、皮革化学, 23, 139(1977).

21) J. F. Haskins, M. T. Hogesd, *J. Org. Chem.*, 15, 1264(1950).

22) 吉川正義、杉浦正昭、豊田春和、皮革化学, 23, 8(1977).

23) 赤堀四郎編, “酵素研究法 Vol. 2”, 朝倉書店 (1956) p. 230.

Fig. 6 Effect of time of treatment with urease solution on the activity of DAS-Urease conjugate

—●—: DAS-U, —○—: DAS-DADPM-U

Fig. 7 Effect of diformyl unit content of DAS on the activity of DAS-Urease conjugate

—●—: DAS-U, —○—: DAS-DADPM-U

てかなり低いウレアーゼ使用量で、同等なウレアーゼ活性をもつことがわかる。

3.1.3 固定化時間の影響: 第三に、固定化時間のウレアーゼ活性におよぼす影響を図6に示す。DAS-DADPM-Uの調製では24時間で活性がほぼ一定値になっている。DAS-Uの調製では時間とともにウレアーゼ活性が増大している。この結果は、ジアゾ法((i)法)による固定化法の方がSchiff塩基構造形成法((ii)法)より短時間でウレアーゼとの反応が完了することを示している。

3.1.4 酸化度の影響: 最後に、ウレアーゼ活性におよぼす原料DASの酸化度の影響を検討した。その結果を図7に示す。DASまたはDAS-DADPMを担体とするウレアーゼの固定化において、ウレアーゼ活性の酸化度依存性は両者はほぼ同様な傾向を示し、いずれも酸化度が50~60%以上になると急激にウレアーゼ活性が増大する。表3は、酸化度が異なるDASを原料としたときの、担体DAS-DADPM中のDADPM含量、および最終複合体のウレアーゼ含量とウレアーゼ活性(Sumner単位²⁴⁾)を示している。興味あることに、酸化度すなわちホルミル基2個をもつユニットの含有量が増加しているにもかかわらず、DAS-DADPM中のDADPM含量は若干増加が認められるだけである。また、DAS-DADPM-U中のウレアーゼ含量はほぼ一定か、80.8%酸化度では逆に低下している。この結果は、DAS粒子表面に分布する活性ホルミル基量は、この酸化度範囲ではほぼ一定であることを示唆する。デンプンの酸化反応が粒子表面すなわち、Meyerのいうミセル²⁴⁾外部から進行していくことを考えれば、このことをよく説明できる。しかも、DASとDADPMとの反応はメタノール中で行なっているため、DAS粒子は膨潤しないで密な構造²⁴⁾をとっている。そこで、DADPMはDAS粒

Table 3 Effect of diformyl unit content of DAS on the content of urease and the activity of DAS-Urease conjugate

	DAS-DADPM-U			
Content of diformyl unit (%)	29.9	49.2	69.5	80.8
Content of DADPM in DAS-DADPM (%)	35.2	38.2	39.7	45.8
Content of urease (%)	13.2	13.0	15.5	11.0
Activity (Sumner Units/g)	14.8	14.7	33.4	48.3

子表面のホルミル基とだけ反応したため、DADPMの含有量は酸化度に依存せずほぼ一定になったと考えられる。また、そのDADPMのジアゾニウム塩誘導体と結合するウレアーゼは、この理由から同様に、導入量が酸化度の影響をうけなかったと推測できる。しかしながら、ウレアーゼ活性はウレアーゼ含量に依存せず、酸化度が高いDASを使用したときほど、大きくなっている。これは酸化度が低いDASを使用したときに、なんらかのウレアーゼ活性の阻害が起こっていることを示唆している。

3.2 pH 依存性

DAS-DADPM-Uのウレアーゼ活性のpH依存性を図8に示す。ウレアーゼ活性は複合体化することで、遊離ウレアーゼにくらべて、至適pHが2単位ほど酸性側へ移行して約pH7となり、至適pH範囲は6~8とやや狭くなった。これはDAS分子の活性阻害が中性から弱アルカリ性条件になるにつれ顕著になるためと考えられる。しかし、尿素除去はpH7.3~7.4の生理条件下で行なうことを考慮すると、DAS-DADPM-Uの至適pHは好都合な条件といえる。

3.3 pH 安定性

DAS-DADPM-Uのウレアーゼ活性のpH安定性を図9に示す。複合体の場合、遊離ウレアーゼにくらべてとくにアルカリ性側での安定性が悪くなった。これはさきに述べたように、DAS

24) R. W. Kerr, "Chemistry and Industry of Starch", 2nd ed., Academic Press Inc. (1950) p.7.

Fig. 8 pH-activity curves for native urease and DAS-Urease conjugate

—●—: Native urease, —○—: DAS-DADPM-U

粒子がアルカリ性条件において膨潤し、活性化したホルミル基²²⁾がウレアーゼの活性中心にある遊離メルカプト基と結合して活性を低下させた結果を反映していると思われる。

3.4 尿素除去能

酸化度が 80.8% の DAS, およびそれを用いて調製した DAS-U 複合体と DAS-DADPM-U 複体の 3 種類の化学吸着剤を用いて、初期濃度が異なる 3 種の尿素溶液に対する尿素除去実験を行なった。それぞれの化学吸着剤の 24 時間後の尿素除去率と単位除去容量を表 4 に示す。参考のため、それぞれの化学吸着剤のウレアーゼ活性も合わせて示す。いずれの化学吸着剤も初期尿素濃度が増加するにつれ、ほぼ比例して単位除去容量は増大している。また、尿素除去率は、初期尿素濃度に関係なくほぼ一定となっている。つぎに、DAS-U に注目すると、尿素除去容量は DAS 単独にくらべ、約 1.4 倍に増加している。この除去容量は、いままでに報告された尿素除去例¹¹⁾よりはるかに大きい値を示している。また、尿素除去率は 95% に達し、著者らがさきに開発した表面化学処理 DAS⁷⁸⁾を用いたときのほぼ同条件下での除去率を上回る。これに対し、DAS-DADPM-U の場合、単位除去容量は DAS 単独の場合の 60~70% に低下している。

DAS-U のウレアーゼ活性が 2.3 Units/g ということは、この

Fig. 9 pH-stability curves for native urease and DAS-Urease conjugate

—●—: Native urease, —○—: DAS-DADPM-U

化学吸着剤 1 g が 5 分間で分解できる尿素は約 4.9 mg であることを意味する。したがって、DAS-U 複合体と尿素含有試験液との浴比が 0.1 であり、除去時間が 24 時間の場合、DAS-U は尿素濃度 $3.00 \times 10^3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ の溶液に含まれる尿素をすべてアンモニアに分解し、そのアンモニアを結合除去していると考えられる。同様に、DAS-DADPM-U はウレアーゼ活性が DAS-U より非常に高いことから、尿素からアンモニアへの分解効率は 100% と考えられる。DAS-DADPM-U を使用したときの残存尿素濃度を定量したさい (実験 2.4 参照), ウレアーゼ溶液の添加前と添加後とで定量したアンモニア濃度には差が見られなかった。この結果はさきに述べた推定が正しいことを裏づける。しかし、DAS-DADPM-U の場合、ホルミル基がまず DADPM との反応に消費されたため、アンモニア除去のための活性ホルミル基数が相対的に減少し、尿素除去能 (この場合、アンモニア除去能) が低くなったと考えられる。こうして、ジアゾ化法によって尿素除去用 DAS-ウレアーゼ複合体を調製する場合、ウレアーゼ活性を高め、しかもより多くの活性ホルミル基を残存させる工夫が必要であることがわかる。現在、その条件を検討中である。

4 結 論

“ジアルデヒドデンプン” (DAS) を原料にして、活性ホルミル

Table 4 Capacities of urea uptake by various “dialdehydestarch” derivatives^{a)} at 37°C, 24 h

Chemisorbent	Activity (Sumner units/g)		Initial concentration of urea $\times 10^{-3}$ ($\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$)		
			1.00	2.00	3.00
DAS	0	{ Uptake rate (%)	65.9	68.2	70.1
		{ Uptake capacities (mg/g)	6.6	13.7	21.0
DAS-DADPM-U	31.6	{ Uptake rate (%)	50.8	49.4	43.2
		{ Uptake capacities (mg/g)	5.1	9.9	12.9
DAS-U	2.3	{ Uptake rate (%)	95.0	94.3	94.3
		{ Uptake capacities (mg/g)	9.4	18.9	28.3

a) Prepared from DAS having 81% of diformyl unit content.

基を含有する DAS-ウレアーゼ複合体を調製した。そして、酵素化学的性質および医療用尿素分解型化学吸着剤としての性能を評価し、つぎの結論を得た。

1) DAS-ウレアーゼ複合体のウレアーゼ活性は、酸化度が 80% 前後の DAS を用いて、pH 5 付近でウレアーゼを 24~48 時間固定化したものが大きくなった。

2) ジアゾ化法により得た DAS-ウレアーゼ複合体のウレアーゼ活性の至適 pH は、遊離ウレアーゼにくらべて酸性側へ移行し、約 7 となった。また、至適 pH 範囲は 6~8 と狭くなった。

3) ジアゾ化法により得た DAS-ウレアーゼ複合体のウレアーゼ活性の pH 安定性は、遊離ウレアーゼにくらべてアルカリ性側で低下した。

4) Schiff 塩基構造形成法により得た DAS-ウレアーゼ複合体の単位尿素除去容量は 18.9 mg/g、尿素除去率は 94% (初期濃度 $2.00 \times 10^3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, 透析液中, 37°C, 24 時間) であった。この結果は DAS 単独の場合の 1.4 倍であり、これまでに報告された尿素除去例の結果をはるかに上回った。

Special Articles on Functional Surface and Interface

Chemisorbent for Medical Use—"Dialdehydestarch"-Urease Conjugate for Removal of Urea as Ammonia—

Toshimi SHIMIZU*, Yoshihiko YAMAZAKI**, Isao ISA** and Yoshio TANAKA

*Research Institute for Polymers and Textiles; Yatabe-Higashi,
Tsukuba-gun, Ibaraki 305 Japan*

*** The Japan Carlit Co., Ltd.; Handa, Shibukawa-shi 377 Japan*

The removal of urea from dialysate or hemofiltrate is one of major problems for developing implantable or wearable artificial kidney systems. "Dialdehydestarch"(DAS)-Urease conjugates (DAS-DADPM-U and DAS-U) have been prepared to provide an effective chemisorbent for urea under physiological conditions. Urease immobilized on the surface of DAS particle hydrolyzes urea into ammonia ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$). This ammonia then reacts with active formyl groups of DAS (Fig. 2). DAS-DADPM-U was prepared by the coupling of diazotized DAS derivative with urease (Fig. 3). DAS-U was prepared by the condensation of DAS with urease to form Schiff's base structure (Fig. 3). When DAS having 80% of diformyl unit content was treated with a mild acidic solution of urease (ca. pH 5), the most active conjugate was obtained (Fig. 4). The pH optimum of DAS-DADPM-U was at 7 (Fig. 8). Its pH stability decreased in high pH range, when compared with that of native urease (Fig. 9). Binding studies have shown that the capacity of urea uptake and the rate of urea uptake by DAS-U can reach 19.8 mg/g and 94%, respectively (initial concentration of urea, $2.00 \times 10^3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$; in dialysate; at 37°C; after 24 h) (Table 3). This capacity is 1.4 times greater than that of original DAS and far greater than that reported so far.