

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23360094

研究課題名(和文) 生体の常温乾燥保存を目指した耐乾燥保護物質の結合水ダイナミクスの測定・解析

研究課題名(英文) Measurement and Analysis of Bound Water Dynamics in Lyoprotective agents for Preserving Desiccated Biomaterials at Room Temperature

研究代表者

白樫 了 (SHIRAKASHI, Ryo)

東京大学・生産技術研究所・教授

研究者番号：80292754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円、(間接経費) 4,290,000円

研究成果の概要(和文)：検体や生体試料の機能を常温の乾燥状態で維持して保存するために不可欠な耐乾燥保護物質の特定として考えられる、誘電緩和時間、水分活性、ガラス転移点の測定・解析技術を開発し、幾つかの保護物質の特性を明らかにした。また、これらの保護物質を用いて、タンパク質を乾燥保存した際の劣化の程度の時間変化を測定し、保護物質に必要な特性を推察した。

研究成果の概要(英文)：Biomolecules, cells and other biomaterials, such as scaffold, are widely used in clinical biopsy and tissue engineering. The quality of these biomaterials is of importance because they degrade very rapidly. Recent report suggests that some protective agents have a large potential of adding desiccation tolerance to these biospecies even at the room temperature. In this study, the characteristics of several protective agents that are associated with lyoprotective ability have been measured. These characteristics include the relaxation time of bound water, water activity and glass transition temperature. In addition, the desiccation tolerance of protein and phospholipid with the several protective agents has been evaluated to find out the essential characteristics for better lyoprotective ability.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・熱工学

キーワード：結合水 誘電分光 耐乾燥保護物質 ガラス化 水分活性 不凍水

1. 研究開始当初の背景

先端医療分野では、プロテインチップの開発や幹細胞を利用した再生医学等の発展が著しいが、これら技術で使用する生体や生体分子を広く流通させるためには、安定した長期保存技術が求められる。現状では、細胞の場合、膜透過性の耐凍結保護物質を用いて極低温で保存されているものの、幹細胞等の多くは保存率が低い。また、タンパク質は、水溶液中で冷蔵保存すると多くは数日程度で失活してしまい、チップ等の人工物に付着した状態や脂質膜に埋め込まれた状態で長期保存できる種類は限られており、一般的な保存技術も確立していない。一方、常温の乾燥状態で代謝を事実上停止させて、長期間生命機能を維持する(休眠)生物の細胞内外に共通して、非膜透過性の耐凍結・乾燥性を付加する保護物質があること、その耐乾燥保護物質を別種の細胞に人工的に導入して凍結乾燥することで、保存期間を飛躍的に伸ばすことができたこと(5日から1年)、耐乾燥生体保護物質を添加した生体分子近傍には結合水やガラス化水が存在し、分子の高次構造や機能の維持に重要な機能を果たしていること、が明らかになってきた。このことから、適切な生体保護物質を選択することで、理想的には常温乾燥プロセスで、長期間の耐乾燥性を細胞やタンパク質に付加できる可能性がでてきた。

2. 研究の目的

常温乾燥保存を実現するためには、保存に適切な生体保護物質の保護機序を明らかにすると共に、保護物質に必要な特性を定量化し、簡便に測定できることが望ましい。本研究では、種々の生体保護物質の水溶液中で生じる水(結合水や自由水)の状態や、保護物質を添加した生体機能の変化を実験的に調査して、保護物質の特性と比較することで、耐乾燥性に必要な条件を見出すことを目指した。具体的には、

(1) 種々の含水率の生体保護物質について、結合水の緩和時間と存在量、乾燥・低温領域のガラス転移を含めた相変化、水分活性を測定し、生体保護物質特有の結合水のダイナミクス、ガラス化能力、耐乾燥性に関する定量的な知見を得る。

(2) 種々の保護物質を添加して常温乾燥した生体(タンパク質やリン脂質膜、可能であれば細胞)の生体機能(酵素活性、リポソームのサイズ数分布、増殖能)の経時変化を測定して劣化速度を推定する。

3. 研究の方法

(1) 保護物質(トレハロース、デキストラン)

の特性と保護効果

従来の研究から、生体分子に耐乾燥を付加する保護物質の機序として、生体分子周囲の水分をガラス化して水を媒体とした劣化反応を抑止する効果と生体分子に分子レベルで結合をして生体分子の高次構造の変化を抑止する効果があることが知られている。しかし、それぞれの効果を保護物質の定量的な特性から予見するには至っていない。そこで、本研究では、タンパク質や脂質と分子レベルで干渉して高い保護効果を示すものの、乾燥条件次第では、二水和物結晶を生成して生体分子を破壊するトレハロースと、水和物結晶を生成せず、トレハロースよりガラス転移温度が高い性質があるが、分子量がトレハロースの100倍程度もあるデキストランを、両効果を代表する保護物質としてえらび、その質量比、1:0、1:2、2:1、0:1の混合物の特性を測定した。また、混合物の耐乾燥効果を評価することで、保護物質に必要な要件を考察した。

ガラス転移温度

示差走査熱量測定(DSC)により、乾燥保存で到達する、含水率が10wt%以下の混合物のガラス転移温度を測定した。

誘電緩和時間

含水率40wt%以上の同混合物水溶液について、ペクトルネットワークアナライザーを用いた反射法により誘電スペクトルを測定して、混合物周囲の水分子の回転緩和時間を算定した。

自然乾燥によるタンパク質高次構造変化

混合物をリゾチームに質量比1:1で添加した水溶液を自然乾燥保存して、保存前後で赤外分光を行い、スペクトルのアミノ基ピークの変化から2次構造の変化(α ヘリックス、 β シート等)を推定した。

(2) タンパク質内の結合水の特性

生体分子を乾燥・凍結保存する際に、含有する水分の蒸発速度あるいは凍結の有無を予見することは、プロセスを設計する際に重要である。特にタンパク質は、結合水により高次構造を保持していることから、本研究では、ゼラチンゲルを例にとり、ゲルに含まれる結合水量とゲル自体の凍結・蒸発特性を調べた。即ち、種々の含水率のゼラチンゲルを誘電分光して、誘電緩和時間が8psec以上になる緩和の緩和強度より結合水量を推定した。また、同じ含水率の試料を-70℃まで下げて水分を凍結させ、0℃で融解する熱量をDSCで測定することで凍結水量をもとめ、この値を全水分量より減じて不凍水量を算出した。さらに、水分活性計により水分活性を測定して、ゲルの凍結や蒸発の特性を評価した。

(3) 極微小・薄試料用の誘電分光プローブの開発

乾燥過程でゲルから乾燥状態に変化する

生体や保護物質に含まれる結合水は、誘電分光により定量測定できるが、酵素や希少タンパク質のように測定試料が希少であったり、乾燥過程で試料内の含水率分布が不均一になりやすいことから、極少量の試料で測定できることや、測定箇所を試料表層に限定することが必要となる。本研究では、試料量 10 μ L 程度で測定できる外径 0.3~0.8mm の極微小同軸プローブと、コプレーナ導波回路の線幅と間隔を変えて、試料の表層数 100 μ m の箇所の誘電分光ができるコプレーナ型プローブを開発した。

(4) LEA ペプチドのリポソーム保護効果

自然界の休眠生物や植物にある LEA タンパク質の最小単位ペプチドについて、リン脂質に対する乾燥保護効果を調査するために、L- α phosphatidylcholine を原材料とする巨大リポソームを作成し、種々の濃度の同ペプチドを添加して自然乾燥させ、乾燥前後の粒子数と体積分布の変化を測定することで、膜融合や膜破壊の程度を評価した。

4. 研究成果

(1) 保護物質(トレハロース, デキストラン)の特性と保護効果

ガラス転移温度

図 1 に種々の混合比のトレハロース - デキストランの溶質濃度(=(100-含水率)%)に対するガラス転移温度を示す。図中の垂直な破鎖線は、混合物中にある水が全てトレハロース二水和物の結合水であった場合の溶質濃度を示す。図より明らかなように、トレハロース水溶液のトレハロース二水和物濃度(破鎖線)におけるガラス転移温度が、室温に近い 30 程度であることから、トレハロースだけを含む水溶液を常温で乾燥させた場合、急速な乾燥をさせない限り、二水和物が生じることを示している。一方、同じ濃度におけるデキストランのガラス転移温度は、90 程度で室温より十分に高いことから急速乾燥でなくとも、ガラス化することが推察できる。また、両者を混合させると、混合比率に応じて、ガラス転移温度を変化させることができることがわかった。

誘電緩和時間

図 2 に室温における種々の混合比のトレハロース - デキストランの溶質濃度(=(100-含水率)%)に対する誘電緩和時間を示す。図中の水平破鎖線は、純水の緩和時間(~8psec)である。どの水溶液の水も溶質濃度が高くなるにつれて緩和時間が長くなっており、水分子の運動が緩慢になっていることがわかる。また、デキストラン水溶液中の水は、低濃度では純水と同じ緩和時間であるが、トレハロース水溶液は低濃度でも純水よりやや長い緩和時間であることがわかる。これは、トレハロースは水の分子運動を阻害しやすいが、デキストランは阻害の程度が低いことを示していると考えられる。また、トレハロースとデキ

ストランを混ぜると、高溶質濃度で緩和時間が両者の中間の値に調整できることがわか

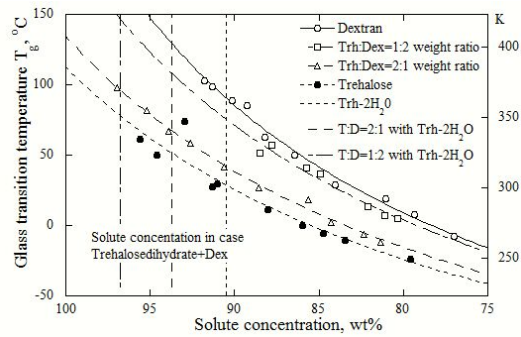


図 1 トレハロース-デキストラン混合物ガラス転移温度

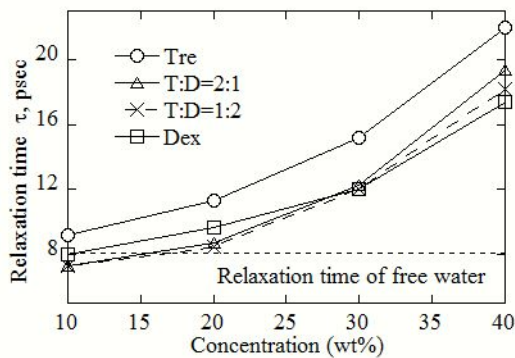


図 2 トレハロース-デキストラン混合水溶液の誘電緩和時間

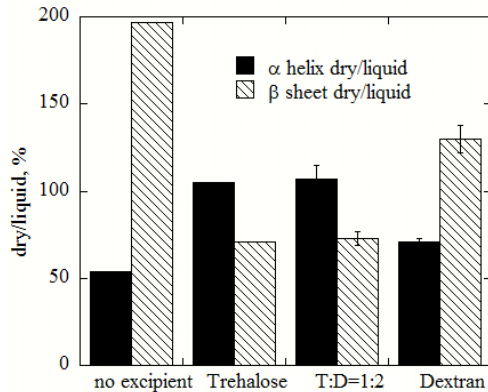


図 3 リゾチーム自然乾燥前後の 2 次構造の変化割合

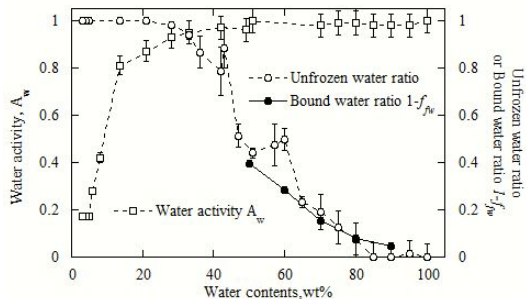


図 4 ゼラチンゲルの不凍水率・水分活性, 結合水率

った。

自然乾燥によるタンパク質高次構造変化

図3に種々の混合比の5wt%トレハロース-デキストランを同濃度のリゾチーム水溶液と1:1で混ぜて1日常温自然乾燥(25 相対湿度5%以下)した後の2次構造の変化を乾燥前との比率で示した。図より、保護物質がない場合やデキストランのみを保護物質とした場合は、2次構造が大きく変化してしまっていることが分かる。一方、トレハロースが添加された保護物質は、変化が小さく、2次構造が維持されていることがわかる。このことは、常温自然乾燥によるタンパク質の高次構造の保持には、トレハロースが不可欠であることを示しており、保護機序としてガラス化だけでは不十分であることを示唆している。

(2) タンパク質内の結合水の特性

図4に種々の含水率の常温(25)のゼラチンゲルの凍結水率と水分活性を、結合水率と共に示した。水分活性は、試料の平衡水蒸気圧を純水の飽和水蒸気圧で除した値なので、自由水が試料中にある場合は、必ず1になり、1を下回ると試料中の水は試料により蒸発が抑制されていること(結合水)になる。ゼラチンゲルは含水率60wt%程度で水分活性が下がりはじめ、20wt%以下で急激に低下する。また、不凍水率は、含水率が下がるにつれて徐々に増え、20wt%でほぼ1となる。この凍結率は、緩和時間解析から得られた結合水率と含水率50wt%程度までは、ほぼ一致する傾向がみられたことから、不凍水は結合水と同じ状態の水とみなせるものと思われる。また、水分活性の低下がはじまる含水率では凍結水が存在することから、蒸発が阻害されている水でも一部は凍結している可能性がある。これは、結合水に複数の状態が存在していることを示唆している。

(3) 極微小・薄試料用の誘電分光プローブの開発

図5に直径800 μm の同軸型誘電プローブとアクリルで水液薄液膜を挟みこみ1GHzの誘電率を測定し、水の誘電率の真値との偏差率を示す。この比率が0に近い値である最小の液膜厚さが測定できる深さに相当する。図より同プローブの測定深度は、600 μm 程度であることがわかった。また、試料として必要な量は、最低10数 μL で十分であることもわかった。さらに、コプレーナ導波線を用いたプローブで同様の測定をしたところ、製作した最も微細なプローブ(線幅280 μm 間隔150 μm)で測定できる深度は、500 μm 程度であった。

(4) LEAペプチドのリポソーム保護効果

図6に種々の濃度のLEAペプチドやトレハロースを保護物質水溶液に懸濁した巨大リポソームを、常温乾燥させて3日間保存し

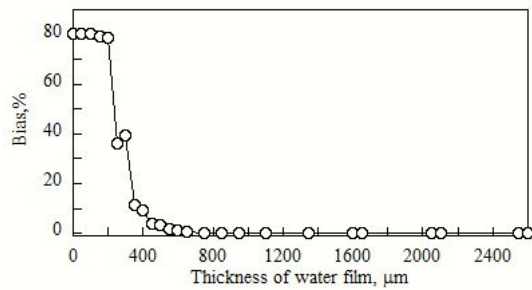


図5 水液膜厚さに対する1GHzにおける誘電率の偏差率

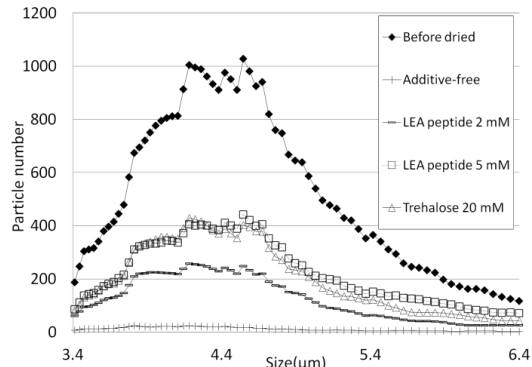


図6 巨大リポソームの自然乾燥前後の粒径分布

た後、復水した時の粒子径分布を示した。尚、ペプチド5mMの場合、巨大リポソームの原材料のリン脂質とペプチドの質量比は、1:14で、トレハロース20mMの場合の質量比1:13とした。図より保護物質が存在しない場合、リポソームは全て喪失されていたが、LEAペプチドやトレハロースを添加すると、乾燥前の半数程度のリポソームが保存されていることがわかる。また、保護対象と保護物質の質量比が等しいと、保護効果の程度が同じになることがわかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

白樫 了, 細胞・生体分子の保存操作における物理・化学的環境変化とその影響について, 臨床病理, 査読無, vol.61 補冊, 2013, 108-108

Ryo Shirakashi, Tsuyoshi Ogawa, Jun Yamada, Dielectric spectroscopy of thin surface layer by Differential Time Domain Reflectometry using a Coplaner Waveguide Circuit line probe, Measurement Science and Technology, 査読有, vol.24, No.2, 2013, 025501+10

DOI:10.1088/0957-0233/24/2/025501

白樫 了, 細沼賢太, 山田 純, 高周波帯域の誘電分光による角質層内の自由水量の測定, 第33回熱物性シンポジウ

△講演論文集，査読無，2012，242-244，
ISSN 0911-1743

渡辺貴大，古 隆生，櫻井 実，白樫 了，
LEA ペプチドによる巨大リポソームの
乾燥保存の試みと分子メカニズムの考
察，低温生物工学会誌，査読有，vol.58
No.2，2012，165-168，ISSN 1340-7902

岡 理一郎，白樫 了，高分子添加が生
体の耐凍結・乾燥保護を目的としたトレ
ハロース水溶液の特性に与える影響，第
24 回バイオエンジニアリング講演会講
演論文集，査読無，(CD-ROM)，2012，
ISSN 1348-2920

白樫 了，鈴木順也，山田 純，生体内
結合水の緩和時間分布の測定，第 32 回
熱物性シンポジウム講演論文集，査読無，
2011，533-535，ISSN 0911-1743

〔学会発表〕(計 7 件)

白樫 了，細胞・生体分子の保存操作に
おける物理・化学的環境変化とその影響
について，日本臨床検査医学会学術集会，
2013.11.3，神戸国際会議場

白樫 了，高周波帯域の誘電分光による
角質層内の自由水量の測定，第 33 回熱物
性シンポジウム，2012.10.4，大阪府立大
学

白樫 了，生体内の結合水と凍結・乾燥
特性，低温生物工学会セミナー，2011.7.7，
いわて県民情報交流センター

出願状況(計 1 件)

名称：細胞の乾燥保護剤

発明者：櫻井 実，古木隆生，渡辺貴大，白
樫 了

権利者：東京工業大学，東京大学

種類：特許

番号：特許願 2012-117616

出願年月日：2012 年 5 月 23 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白樫 了 (SHIRAKASHI RYO)

東京大学・生産技術研究所・教授

研究者番号：80292754

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

高野 清 (KIYOSHI TAKANO)

東京大学・生産技術研究所・助教

研究者番号：60302626