

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：84421

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26820324

研究課題名(和文)キノン架橋ゼラチンを用いた生体組織用接着剤の開発と耐水接着の原理解明

研究課題名(英文)Tissue adhesive using quinone-crosslinked gelatin

研究代表者

山内 朝夫(YAMAUCHI, Asao)

地方独立行政法人大阪市立工業研究所・生物・生活材料研究部・研究主任

研究者番号：80416304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：酵素を触媒とするポリフェノールの酸化反応を用いて、ゼラチンの接着力を改良した。これはポリフェノールの酸化で生成するキノンによってゼラチンタンパク質が共有結合で架橋し、ゼラチンが不溶化する現象を利用している。カフェ酸を用いた架橋でゼラチン接着剤の耐水性が著しく改善し、ホルムアルデヒドを含まない生体組織用の接着剤として利用できることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The gelatin adhesive was improved by conjugating tyrosinase-catalyzed oxidation of phenolic compounds. The gelatin protein molecules were covalently crosslinked by the phenol oxidation products, the quinones, to form an insoluble polymeric substance. Indeed, the crosslinked adhesive using a natural polyphenol, caffeic acid, remarkably enhanced moisture resistance and waterproof property. The present quinone crosslinking reaction hence may be potentially useful for fabricating new formaldehyde-free gelatin glue for tissue.

研究分野：タンパク質工学

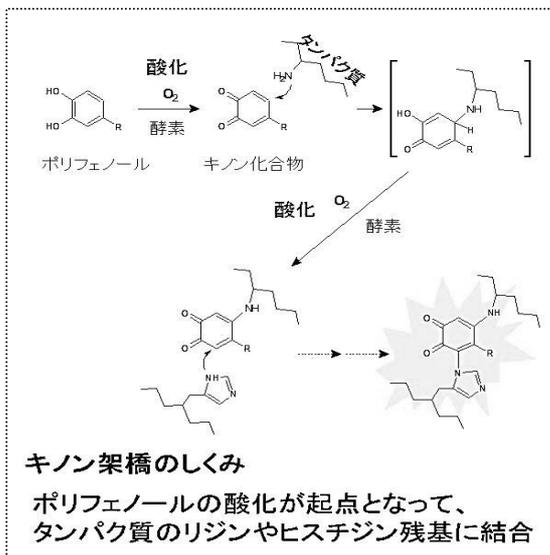
キーワード：接着タンパク質 ポリフェノール 酸化 キノン ゼラチン 耐水

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体の軟組織用接着剤としてゼラチンが期待されている。最近の外科手術では患部の簡便・迅速な閉鎖に、シアノアクリレート系の合成接着剤(瞬間接着剤)が使用されているが、患部の炎症を惹起する事例が頻繁に起きている。毒性を示すアルデヒドが合成ポリマーから分解・生成することが原因であり、代替品の開発が急務になっている。ゼラチンは、下記の特徴をもつため有力な候補に挙げられる。動物の皮膚や骨を構成するコラーゲン繊維の分解タンパク質であり、生体親和性や分解・吸収性が高い。工業的に量産されている。木工や製紙等の用途で古くから接着剤として使用されている。

しかし、ゼラチンの接着力は湿度や温度に敏感で、体液や血液で塗れた組織を接着できない。ゼラチン接着層はポリペプチド鎖同士の部分的な相互作用で固化(ゲル化)するが、水素結合によるもので弱いからである。現在、接着層を耐水化する策として、ホルムアルデヒドによるゼラチンの化学架橋がある。得られる架橋ゼラチンは耐水接着力を有するが、毒性が強いホルムアルデヒドを使用しているため実用は困難となっている。

(2) 当研究所では、安全性の高いタンパク質の架橋法として、水生生物(イガイなど)の接着タンパク質で見られる仕組み「キノン架橋」を利用した技術を開発している。天然のキノン架橋反応は、酸化酵素を触媒とする特殊なフェノール性化合物(M-アセチルドーパミン等)の酸化で開始する。生成したキノン化合物が、タンパク質のアミノ基(リジンやヒスチジン残基)に結合することで架橋が形成する。これまで、ポリフェノールをタンパク質に添加することで人工的にキノン架橋する実験を行っており、次に示す結果を得ている。



単純フェノール化合物(ヒドロキノン)を使ったキノン架橋法を確立している。

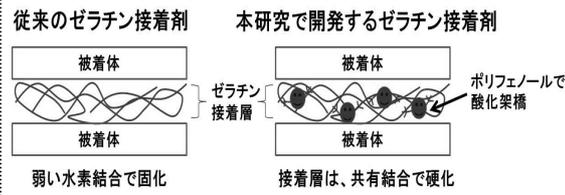
カテキン等の植物ポリフェノールが、架橋剤として利用できることを明らかにしている。

ヒドロキノンで酸化架橋したゼラチンは、木材に対する接着力が約3倍(2.6MPa)高まること、そして30度の温水中に浸漬しても接着力が3MPaまで保持することを明らかにした。

しかし、カテキンで架橋すると、接着力はヒドロキノンと同様に6MPa程度まで高まるが、30度の浸水条件では接着力を示さないことを確認した。従って、耐水接着力を獲得するには、単にゼラチンを架橋するだけでは不十分で、架橋剤のポリフェノール種を選び出す必要があった。

(3) ポリフェノールとタンパク質を材料にした研究は、現在までに多くの研究者・企業によって進められている。ほとんどが分子量の高いポリフェノール(タンニン等)とタンパク質との収斂(吸着)作用を使っており、皮なめし材、染色の媒染剤、抗酸化剤、有害金属の除去材などが開発されているが、接着剤としての実用例はない。唯一、タンニンの吸着によるゼラチンの接着改良が試みられているが、接着力も耐水性も改善は見られない。

これらの背景から本提案では、ポリフェノールのキノン架橋によるゼラチンの耐水接着化を行うことで、生体組織用の接着剤を開発するとともに、その接着メカニズムの解明を目指す。



2. 研究の目的

ゼラチンは接着性を備えた天然由来の繊維状タンパク質であり、生体親和性が高いことから組織用接着剤として利用が期待できる。しかし、水や30度以上の温度に曝すと接着力がなくなるといった問題がある。この耐水接着性を改善するために、天然物のポリフェノールを用いてゼラチンをキノン架橋する。接着特性の獲得に必要な条件から接着のメカニズムを探索すると共に、組織接着剤に応用する。

3. 研究の方法

(1) 耐水接着の評価系の確立

接着の耐水性を評価する方法として、JIS規格における木材の引張せん断試験(K6851)が一般法とされており、キノン架橋ゼラチンについて評価を行ってきた。この方法は本研究でも有効であるが、被着材である木材およびサンプル調製に煩雑さが伴うため、少数パラメータ条件で試験N数を大きくする必要が

ある。本研究では、多種類のポリフェノールの同時評価が必要なため、簡便に耐水接着性を評価する方法を確立することから始めた。

(2) ポリフェノールの選定

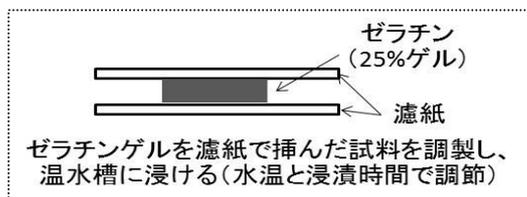
先に確立した評価系を用いて、耐水接着力が高いポリフェノールを選定した。また、ポリフェノールの水酸基の位置や6員間の配置などによる分類が接着特性に帰着可能かを試みた。さらに、種々のポリフェノールで架橋を用いたゼラチンの変化を表面張力から調べ、耐水接着に起因する要素を分析した。

(3) 生体組織用の接着剤としての評価

選定したポリフェノールを用いて、ゼラチンの生体組織に対する接着性を改良した。具体的には、ATSM規格(米国試験材料協会)の試験法(F2255-05)を参考に構築したブタ皮に対する接着試験で、接着強度の増強や接着反応の時間短縮が達成できる反応条件や組成濃度を最適化した。生体組織接着剤としては1時間程度の接着時間で接着強度は10kPa以上の性能が必要であり、実用に耐えうる性能まで改良を目指した。

4. 研究成果

(1) 耐水接着の評価系の確立

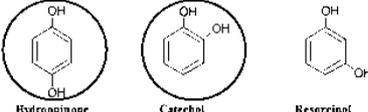
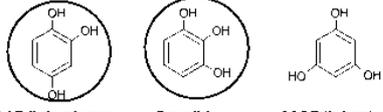


新たに構築した方法では、濾紙に挟んで接着したゼラチンサンプルを調製後、一定温度の温水槽に浸漬する作業を行って、自然剥離の有無を調べた。この濾紙を用いた評価法の有効性は、木材の引張せん断試験(JIS K 6851 7-2 耐温水試験)において耐水接着性を示すキノン架橋ゼラチン(ヒドロキノンで架橋したゼラチン)と未架橋のゼラチンの濾紙サンプルを調製し、浸漬温度を比較することで確認した。

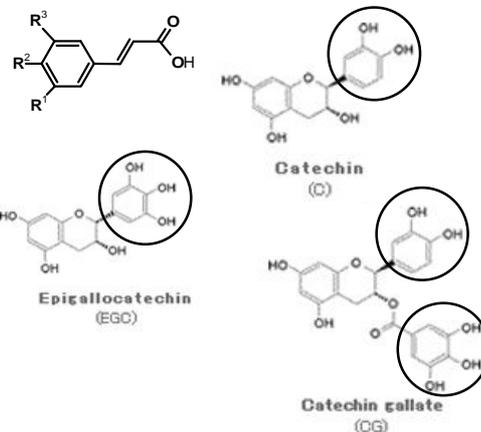
(2) ポリフェノールの選定

市販や企業より供与された高純度のポリフェノールから、確立した評価系を用いてポリフェノールの選定を行った。

単純ポリフェノールの水酸基の数と位置が異なる条件で比較したところ、酸化反応でキノン体と成りうるポリフェノール(オルト位とパラ位に水酸基が配位するポリフェノール)が耐水接着性を有し、水酸基の数が2個のポリフェノールが高い耐水接着性を示した。また、基本骨格が同じで分子量の異なるポリフェノールの耐水接着性を比較したところ、低分子量のポリフェノールが高い耐水接着性を示し、カテキン等の高分子量になると耐水接着性が弱まることがわかった。

| OH基数 | 構造 |
|------|--|
| 1 |  Phenol |
| 2 |  Hydroquinone Catechol Resorcinol |
| 3 |  1,2,4-Trihydroxybenzene Pyrogallol 1,3,5-Trihydroxybenzene |

| 化合物名 | R ₁ | R ₂ | R ₃ |
|--|------------------|------------------|------------------|
| カフェ酸 3,4-dihydroxy cinnamic acid | OH | OH | H |
| 4-hydroxy cinnamic acid | H | OH | H |
| 3-methoxy-4-hydroxy cinnamic acid | OCH ₃ | OH | H |
| 3,5-dimethoxy-4-hydroxy cinnamic acid | OCH ₃ | OH | OCH ₃ |
| 4-methoxy-cinnamic acid | H | OCH ₃ | H |



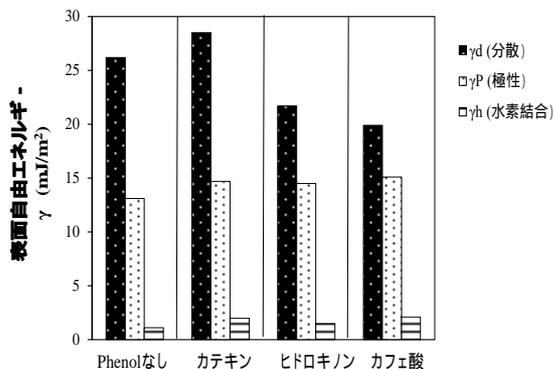
ポリフェノール構造による分類を基に種々のポリフェノールを選別したところ、カテコールや植物ポリフェノールのカフェ酸等の分子種が選定できた。カフェ酸でキノン架橋したゼラチンは、耐水温度が50以上まで接着力を有し、木材の引張せん断試験(JIS K 6851 7-2 耐温水試験)での引張り強度は約4.2MPaを有していた。(比較; 未架橋ゼラチンの耐水温度は10以下、JIS規格では測定前の浸漬で合板が剥離するため測定不能。)

| ポリフェノール (mM) | ゲル融点 (°C) | 耐水温度(°C) | |
|--------------|-----------|----------|------|
| | | 乾燥濾紙 | 湿潤濾紙 |
| - | 0 | 30.5 | < 30 |
| ヒドロキノン | 6.0 | >100 | > 50 |
| | 30 | >100 | > 50 |
| カフェ酸 | 6.0 | 65 | 45 |
| | 30 | >100 | > 50 |
| カテキン | 6.0 | 62 | 35 |
| | 30 | >100 | 35 |

[Gelatin], 18%; [Tyrosinase], 300U/mL.

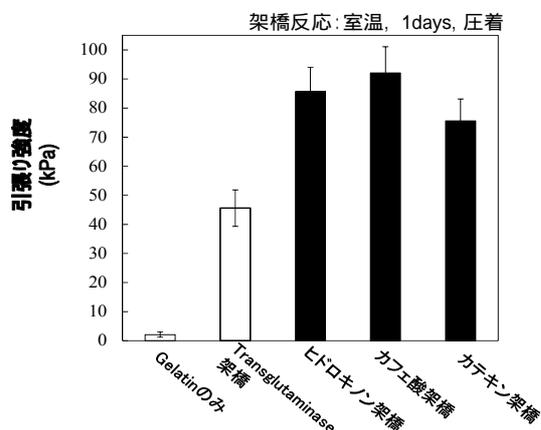
濾紙を使った耐水接着性の評価

架橋ゼラチンの接着面について接触角を測定し、表面張力を調べた。北崎・畑の理論から表面自由エネルギーを分散成分、極性成分、水素結合成分の3成分で構成されると仮定し、各成分が既知である水、ジヨードメタン、n-ヘキサデカンを使って算出した。その結果、耐水性を示すヒドロキノンあるいはカフェ酸架橋ゼラチンと、耐水接着性を示さないカテキン架橋ゼラチンでは、非極性の分散成分が異なることがわかった。接着面における非極性の分散成分が低下することで、耐水接着性が誘起することが示唆された。



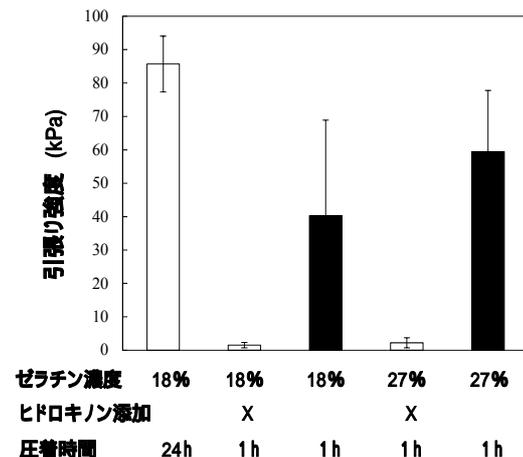
(3) 生体組織用の接着剤としての評価

耐水接着性を示すポリフェノールとして選定したヒドロキノンとカフェ酸を用いて、ブタ皮を基材とする接着試験で接着力を測定した。まず、ポリフェノールと酸化酵素であるチロシナーゼをゼラチンに加え、ブタ皮に挟んで試験片を調製した。室温で24時間放置することで架橋した試験片について引張りせん断強度を測定した。その結果、ヒドロキノンを架橋したゼラチンは、未架橋のゼラチン(3.2kPa)と比較して約3倍強力で接着することがわかった(約10kPa)。次に、ヒドロキノン濃度を変化させることで最適化を図ったところ、未架橋のゼラチンに比べて30倍まで接着力を増強することができた(約90kPa)。同様に、カフェ酸で架橋したゼラチンに加え、耐水接着性を示さないカテキンで架橋したゼラチンも接着力を高めることができた。

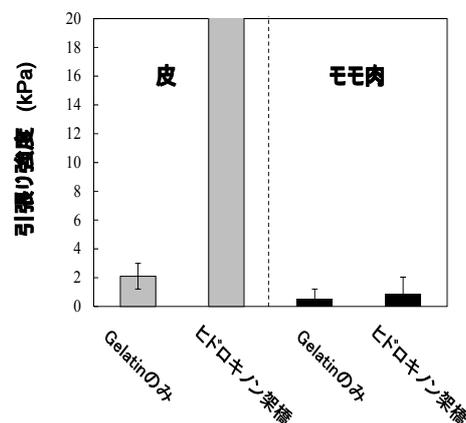


基材, ブタ皮表皮; n=5.
 [Gelatin], 18%; [Tyrosinase], 300U/mL; [HQ] 60mM;
 [Transglutaminase] 1wt% (Ajinomoto, Activa スーパーガード 豆腐用)

架橋反応時間(24時間)を短くすることで汎用性を高めることを試みた。方法として、これまでの架橋度の分析データからゼラチンタンパク質の架橋度が最大となるようにポリフェノールとタンパク質濃度を変化させることで反応条件を最適化した。これにより、接着時間(架橋反応時間)を室温で1時間まで短縮しても、架橋ゼラチンは60kPa程度まで接着強度を保持することができた。



これまでのブタ皮に対する接着試験では耐水接着性を示さないカテキン架橋ゼラチンでも接着が可能であり、臓器等の水分が豊富な環境で接着性を評価することが重要に考えられた。そこで、ブタ皮の代わりに水分を多く含むブタモモ肉に対する接着力を調べた。その結果、耐水接着性を示すカフェ酸を用いて架橋しても、ゼラチンがモモ肉の水分でゼラチンが溶解するため接着できなかった。この要因として、ゼラチン周囲の水分が多いため、架橋(固化)する前にゼラチン分子が水に希釈されることが推測された。ゼラチンを塗布する行程で予めある程度固化しておく等の操作的な変更が必要であると考えられた。



*モモ肉を接着した場合、引張り試験前に剥離してしまうサンプルが頻発した

(4) 今後の展望

以上より、水分含量等で接着基材の選別が必要であるが、本研究で開発したポリフェノール

ルによる酸化架橋したゼラチンは耐水接着性を備えたものとして組織用の接着剤に応用できることがわかった。また、組織接着剤の他に、シックハウス対策のノンアルデヒド接着剤、あるいはタンパク質の架橋技術として、衣食住の多用途で転用できる。

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2件)

静間基博、下村修、森脇和之、山内朝夫、佐藤博文、川野真太郎、小野大助、接触角を用いた表面自由エネルギー測定とその応用、科学と工業、査読有、88、2014、193-199。

〔学会発表〕(計13件)

山内朝夫、ポリフェノールを用いたバイオ接着剤、BioJAPAN2016、2016年10月12日、パシフィコ横浜(横浜市西区)

山内朝夫ら、ポリフェノールの酸化架橋を利用した生体組織用ゼラチン接着剤、ニホン農芸化学会2016年度大会、2016年3月30日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

山内朝夫、ポリフェノールを用いたタンパク質の酸化架橋に関する研究、第40回分析機器展、2016年2月17日、大阪市立工業研究所(大阪市城東区)

山内朝夫、キノン架橋ゼラチンを用いた生体組織用接着剤、府市合同発表会、2015年12月1日、大阪産業創造館(大阪市中央区)

山内朝夫ら、ポリフェノールの酸化架橋によるゼラチン接着剤の耐水化、第23回ポリマー材料フォーラム高分子学会、2014年11月6日、奈良県新公会堂(奈良県奈良市)

山内朝夫、バイオ系架橋方法、接着剤、BioJAPAN2014、2014年10月16日、パシフィコ横浜(横浜市西区)

〔図書〕(計1件)

山内朝夫、食品試験研究成績・計画概要集、植物ポリフェノールを使用したタンパク質系接着剤の開発、2016年、2

〔その他〕

地方独立行政法人大阪市立工業研究所
(地方独立行政法人大阪産業技術研究所
森之宮センター)

<http://www.omtri.or.jp/research/bio/fot>

山内 朝夫(YAMAUCHI, Asao)
地方独立行政法人大阪市立工業研究所
生物・生活材料研究部 食品工学研究室
研究主任
研究者番号: 80416304

6. 研究組織

(1) 研究代表者