

キノン架橋ゼラチンを用いた生体組織用接着剤の開発



研究ノート

山内 朝夫*

Tissue adhesive using quinone-crosslinked gelatins

Key Words : Adhesive, Gelatin, Polyphenol, Oxidation, Crosslinking

はじめに

当研究所は企業や業界団体の研究開発を支援することを目的に、微力ながら技術相談から受託研究まで様々な手段で社会に協力している。その方法として、独自の研究または技術の獲得を予め進めておき、成果を学会等で報告することでニーズに合った企業に採用して頂くことがある。今回この場をお借りして、一例を紹介できれば幸いである。

まず私の研究は、昆虫が持つ固い外骨格や水生生物（フジツボ、イガイなど）が濡れた岩盤に強く固着する仕組みを模倣することから始まっている。これら生物は「キノン架橋」と呼ばれる反応で、分泌タンパク質の改変を起こしている。具体的には、酸化酵素が触媒となって特殊なフェノール性化合物（*N*-アセチルドーパミンやタンパク質分子内のチロシン残基）の酸化反応が起きる。生成したキノン化合物が、タンパク質のアミノ基に結合することでタンパク質間に架橋が形成される¹⁾。

肝心なことは、キノン架橋が形成することと、外骨格の硬化や接着力が誘起（増加）することが相関するのか？なのだが、全くわかっていない。ただ、タンパク質が架橋すると、不溶化し固くなることは想像に難くない。このようなイメージを頼りに、手頃なタンパク質と化合物でキノン架橋を模倣することを始めている。

ポリフェノールを用いたキノン架橋

キノン架橋の模倣は、フェノール性化合物として化学構造が単純なヒドロキノンを用いて行った。ゼラチンをタンパク質として、ラッカーゼ（酸化酵素）を加えて放置すると、ゼラチンゲルの軟化点が上昇した。種々の実験を進めた結果、図1に示すような反応でゼラチンタンパク質間の架橋が形成し、ゲル軟化点が上昇することがわかった²⁾。

ヒドロキノンの代わりに植物ポリフェノールであるカテキンを用いても架橋が形成した。植物抽出物を用いたキノン架橋はタンパク質の物性変化も良好で、麺類のコシを向上させる食感改良剤として企業に利用頂けることになった³⁾。一方、チロシナーゼ等の酵素以外に、酢酸銅(II)といった金属塩を用いても、キノン架橋反応の触媒として機能することがわかり、タンパク質素材の機械的強度は著しく増加した⁴⁾。また、タンパク質の代わりにキトサンといった多糖でもアミノ基を有するのでキノン架橋が形

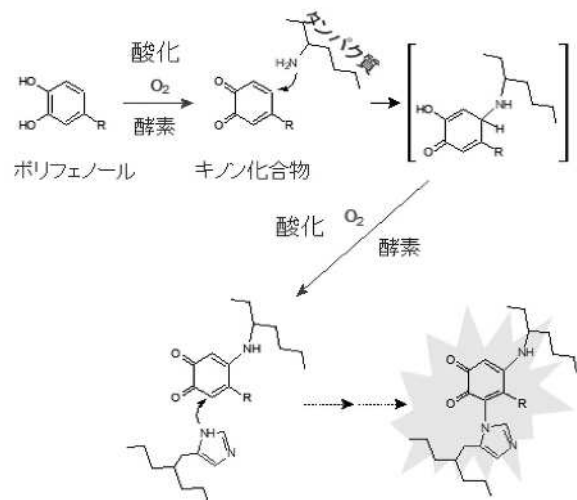


図1 キノン架橋の仕組み

ポリフェノールの酸化が起点となって、タンパク質のリジンやヒスチジン残基に結合



* Asao YAMAUCHI

1974年7月生まれ
 大阪大学大学院 工学研究科 応用生物
 工学専攻博士後期課程 (2002年)
 現在、(地独)大阪産業技術研究所
 生物・生活材料研究部 主任研究員
 工学博士 専門/タンパク質工学
 TEL : 06-6963-8063
 FAX : 06-6963-8079
 E-mail : yamauchi@omtri.or.jp

成することがわかった。基本的に高分子とポリフェノール、酸化触媒の三者を加えて放置するだけの簡便な操作で反応が進むため、食品以外の利用用途も期待できた。その利用用途の一つに、生体の軟組織用接着剤を考えた。


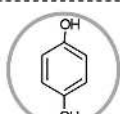
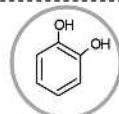
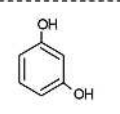
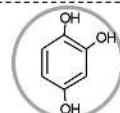
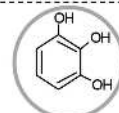
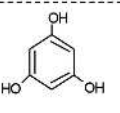
接着剤としての利用

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⁵⁾。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、代替品の開発が求められている。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。①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。②工業的に量産されている。③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。

そこで、ゼラチンをキノン架橋する反応方法は先述に示した研究過程で確立していたので、ゼラチンの耐水接着性を調べてみた。JIS規格における木材の引張せん断試験（K6851 7-2耐温水試験）を参考に、ゼラチンサンプルで合板した木材片を30℃の温水に浸漬させた後、引張り試験を行った⁶⁾。その結果、ヒドロキノンで架橋したゼラチンは、木材に対する接着力が乾燥状態で約3倍高まること、そして30℃の温水に浸漬しても接着力が保持することを明らかにした（一方、未架橋のゼラチンは温水に浸漬中に剥離）。このことから接着力は改善の余地はあるものの、ゼラチンをキノン架橋することで耐水接着性が誘起することがわかった。

耐水接着力の最適化を行うために、添加するポリフェノールを選定することにした。多種類のポリフェノールを同時に評価するために、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。表1に示すとおり、単純な構造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、酸化反応でキノン構造に成りうるポリフェノール

表1 単純な構造のポリフェノールと耐水接着性の関係

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

丸で囲んだ構造は、耐水接着性を示した。

（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、高分子量になると耐水接着性が弱まることが判明した。この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、JIS規格に準拠した木材の引張せん断試験での引張り強度は約4.2MPaを有していた。

木材を基材として最適化した接着剤が生体の皮でも有効か調べるために、ブタ皮表皮を基材とする接着試験で接着力を測定した。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。木材で選定したポリフェノールでキノン架橋した結果を図2に示した。カテコールおよびカフェ酸でキノン架橋したゼラチンは、未架橋のゼラチン（2.6kPa）と比較して約30倍まで接着力を増強することがわかった（約90kPa）。また、食肉用の結着剤として使用されているトランスグルタミナーゼと比較しても、キノン架橋による耐水接着力は高いことがわかり、生体組織用の接着剤として利

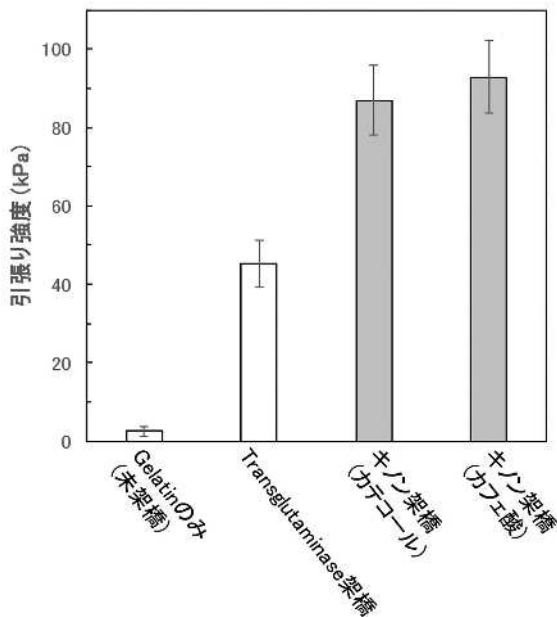


図2 プタ皮表皮に対する接着強度

用の可能性を示すことができた。

ここでの条件では、接着時間（架橋反応時間）が24時間となっており、例えば裂傷を塞ぐ場合などの状況では利用が難しい。架橋度の分析を基に、反応条件を改良したところ接着時間を室温で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ている。ただ、現状では表皮以外の接着として臓器などの水分が豊富な環境で反応させても、架橋（固化）する前にゼラチン分子が水に希釈されてしまい上手く接着することができない。本反応が実用化レベルといえるまでには、炎症誘発性や細胞毒性も含めて様々な点の確認が必要である。

おわりに

弊所の取り組みの一例として、キノン架橋によるタンパク質の改質技術について紹介させていただいた。本技術は食感改良剤や接着剤の他に、未紹介ながらも企業と別用途で活用を目指している。ここでは生体組織用接着剤としての現状を示したが、実用化まで乗り越える山はまだあるように思われる。この記事を通して、ご助言とご指導を頂くことを望んでいる。

参考文献

- 1) Schaefer J, *et al.* Science. 235:1200-1204. 1987.
- 2) 山内朝夫：植物フェノールの酸化による食品の物性改良，食品の試験と研究，Vol.42, pp148-149 (2007)
- 3) 食感の改良された麺類の製造方法（特開2009-050205）
- 4) Yamauchi A, *et al.* Macromol. Biosci. 9: 875-883. 2009.
- 5) Taguchi T, *et al.* Artificial Blood. 14:118-123. 2007.
- 6) 山内朝夫：ポリフェノールの酸化架橋を利用したゼラチン接着剤，科学と工業，Vol.88, pp223-228 (2012)

