

水産物由来タンパク質を利用した抗菌性医療材料の創製と分析法の構築

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2022-09-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小泉, 大輔 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10291/22632

2022年度 理工学研究科

博士学位請求論文（要旨）

水産物由来タンパク質を利用した抗菌性医療材料の創製と分析法の構築

応用化学専攻

小泉 大輔

1 問題意識と目的

近年、世界人口の増加や気候変動などに起因する天然資源の枯渇が懸念されている。水産資源についても、世界の年間水産物消費量は、過去半世紀で約2倍に増加しており、水産資源の持続的利用に向けて、水産資源の適切な管理や、廃棄されている未利用資源の有効活用がますます重要になっている。例えば、サケの加工工程で除去された白子は、食用や飼料用として一部利用されているものの、残りは廃棄されている。サケの白子に含まれるタンパク質のプロタミンは抗菌性を有することが知られており、食品保存料として使用されることで、未利用資源の有効活用の一助となっている。しかしながら、プロタミンの抗菌性が食品保存料以外で利用された報告は少なく、食品領域以外での更なる有効活用が望まれる。

超高齢社会にある日本においては、骨や関節などの障害を発症する患者数は増加傾向であり、機能的な人工骨などのバイオマテリアルの必要性が益々高まっている。また、リン酸カルシウムは、生体適合性が高い、骨伝導性を有するなどの特長を有することから、コーティング、セメント、足場材などとして、整形外科や歯科・口腔外科分野でバイオマテリアルとして広く利用されている。

一方、バイオマテリアルの利用にあたっては、移植時の細菌感染が問題となっている。感染対策のアプローチとして抗生物質の利用が主流であるが、抗生物質の利用には薬剤耐性や耐性菌の発生に関わる憂慮すべき問題に直面している。そのため、耐性菌が生じにくい素材を用いた、抗菌性バイオマテリアルの開発が望まれている。そこで、本研究では、未利用資源であるサケ白子に含まれる抗菌性タンパク質であるプロタミンを利用した抗菌性医療材料の開発を第一の目的として、プロタミンリン酸カルシウム複合粉体を調製し、抗菌性バイオマテリアルとしての性能を評価した。

水産物由来のタンパク質は人々のQOL（Quality of life；生活の質）向上に活用されている。一方で、水産物に含まれる一部のタンパク質は、食物アレルギーの原因物質（アレルゲン）としても知られている。食物アレルギーは、先進国において重要な健康問題の一つとなっており、また、重篤なアレルギー反応は、食物アレルゲンを含む食品の誤食により引き起こされていることが様々な研究で報告されている。そのため、加工食品に含まれる食物アレルゲンに関する適切且つ、信頼できる情報の提供が必要である。しかしながら、従来の甲殻類アレルゲン検査法は、科学的な検証や毒物使用の観点において問題を有していた。そこで、本研究では、上記問題を解決するため、加工食品に含まれる甲殻類タンパク質の新規検査法の開発を第二の目的とした。すなわち、エビのメジャーアレルゲンとして知られているトロポミオシンタンパク質を利用して、食品中の甲殻類タンパク質を簡便且つ迅速に検出するためのラテラルフローアッセイ法を構築した。また、毒物を使用しない酵素結合免疫測定（enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）法を構築し、両検査法について、食物アレルゲン検査法としての性能を科学的に評価した。

本研究で得られた成果を統合し、水産物由来原料の有効活用および人々のQOL向上に繋げていく。

2 構成及び各章の要約

本研究ではプロタミンとトロポミオシンの2種類の水産物由来タンパク質に着目し、各タンパク質を利用

した抗菌性医療材料の創製と分析法の構築を行い、それぞれの性能を評価した。したがって、本博士学位請求論文は、以下の6つの章から構成されている。

第一章 緒言

第二章 プロタミンを吸着した種々のリン酸カルシウム粉体の調製とその抗菌性

第三章 リン酸八カルシウムを原料としたフッ化物イオン含有抗菌性プロタミン吸着リン酸カルシウム粉体の調製とその評価

第四章 加工食品に含まれる甲殻類タンパク質検出のためのラテラルフローアッセイ法の構築とバリデーション

第五章 加工食品に含まれる甲殻類タンパク質検出のための毒物不含有抽出系を用いた酵素結合免疫吸着検査法の構築と評価

第六章 結言

各章の要約を以下に述べる。

第一章では、本研究の対象である、プロタミン、リン酸カルシウム、トロポミオシンについて概説し、本研究の背景および目的について示した。

第二章では、リン酸カルシウムの生体適合性とプロタミンの抗菌性を兼ね備えた、抗菌性バイオマテリアルの創製を目指して、種々のリン酸カルシウム原料およびプロタミン吸着リン酸カルシウム粉体を調製し、それらの粉体性状を明らかにした。具体的には、リン酸カルシウム原料として、水酸アパタイト (hydroxyapatite, HAp) とその前駆物質である非晶質リン酸カルシウム (amorphous calcium phosphate, ACP)、リン酸八カルシウム (octacalcium phosphate, OCP) を調製した。次に、各種リン酸カルシウム原料に対して水中でプロタミンを48時間吸着させ、プロタミン吸着リン酸カルシウム粉体 (ACP-Protamine, OCP-Protamine, HAp-Protamine) を調製した。各粉体のプロタミン吸着量はそれぞれ 25.2, 5.28, 19.2 mg·g⁻¹であった。バイオマテリアルの移植感染の主な原因菌の一種である *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) に対するプロタミン吸着リン酸カルシウム粉体の抗菌性を評価した結果、いずれの粉体も抗菌効果を発現した。本章で調製したプロタミン吸着リン酸カルシウムは、有望な抗菌性バイオマテリアルと考えた[1]。

第三章では、オーラルケア素材開発の基礎研究として、有機化合物をインターカレートする「OCP」、抗菌性を有する「プロタミン」、さらにアパタイト結晶の形成を促進する「フッ化物イオン」に着目し、OCP、プロタミン、フッ化物イオンを出発原料とした「リン酸カルシウム複合粉体」を調製した。フッ化物イオンのOCPへの添加方法および仕込み濃度を検討した結果、添加方法によらず、仕込み濃度が高いほどより多くのフッ化物イオンを添加できた。また、仕込み濃度が高いほどOCPがフッ素アパタイト (fluorapatite, FAp) に転化することを確認した。調製した複合粉体を用いて株化骨芽細胞である MG-63 細胞の増殖試験を行なったところ、いずれの複合粉体も増殖阻害を示さず、細胞毒性がないことが分かった。さらに、抗菌性試験を実施したところ、プロタミンとフッ化物イオンの二成分を含有させたリン酸カルシウム複合粉体は、プロタミン吸着 OCP と比較してより高い抗菌性を示した。本章で調製したリン酸カルシウム複合粉体は、有望な抗菌性バイオマテリアルの素材として期待できる[2]。

第四章では、加工食品中に含まれる食物アレルギーに関する適切かつ信頼できる情報提供のために、加工食品中の甲殻類タンパク質を検出するための新規ラテラルフローアッセイ法を構築して検証した。本検査法は、高い感度 (エビタンパク質抽出液に対する目視の検出限界は 25 µg/dm³, 1 µg タンパク質/g 食品に相当) を示し、簡便且つ高価な装置を必要とせず 20 分で結果を得られた。また、本検査法と過去に検証済みの ELISA 法との加工食品における検査結果の一致率は 97%であった。本章で構築したラテラルフローアッセイ法は、迅速、簡便、信頼性が高く、検証済みの ELISA 法と高い相関を示すことから、特に食品加工施設における食品のモニタリングに適している[3]。

第五章では、様々な施設で加工食品に含まれるエビ・カニの検査が可能となるように、抽出系に毒物を必

要としない ELISA 法 (ELISA-II) を構築して評価した。具体的には、過去に検証済みの ELISA 法 (ELISA-I) では、タンパク質抽出系に還元剤として、2008 年に毒物指定された 2-メルカプトエタノール (2-ME) を使用したが、ELISA-II では、2-ME の代わりに亜硫酸ナトリウム (Na_2SO_3) を使用した。ELISA-II は高感度 (定量限界 : 0.66 μg 甲殻類タンパク質/g 食品) であり、甲殻類の中でも十脚目に対する高い特異性を示した。モデル加工食品における回収率は 83.8-100.8% であり、高い再現性 (日内及び日間の変動係数, 8.2%以下) を示した。さらに、過去に検証済みの ELISA-I と高い相関 (相関係数, 0.996) を示した。本章で構築した ELISA-II は毒物を使用せず、十分な精度を示したことから、加工食品に含まれる甲殻類アレルゲンの検査に有用な検査法である[4]。

第六章では、第二章から第五章で得られた知見を総括し、研究全体を結論付けた。本研究で調製したプロタミン/リン酸カルシウム複合粉体は、バイオマテリアル移植における感染の原因菌の一種である *S. aureus* に対する抗菌性を有しており、有望な抗菌性バイオマテリアルである。また、本研究で構築したラテラルフローアッセイ法と ELISA 法は、食物アレルゲン検査法に求められる高い性能を有しており、有望な検査法である。本研究で得られた成果は、未利用水産資源や、水産由来原料と無機原料の複合素材が、医療領域や食品領域に幅広く活用できることを示しており、水産資源の有効活用に関する研究の発展に寄与できるものと思われる。

引用文献

- [1] D. Koizumi, K. Suzuki, H. Minamisawa, R. Togawa, K. Yasui, K. Iohara, M. Honda, and M. Aizawa. Preparation of protamine-adsorbed calcium phosphate powders and their antibacterial property. J Asian Ceram Soc. 2022;10:230–240. doi: 10.1080/21870764.2022.2035488
- [2] D. Koizumi, K. Suzuki, R. Togawa, K. Yasui, K. Iohara, M. Honda, and M. Aizawa. Preparation of antimicrobial calcium phosphate/protamine composite powders with fluoride ions using octacalcium phosphate. J Mater Sci Mater Med. 2022;33:35. doi: 10.1007/s10856-022-06656-5
- [3] D. Koizumi, K. Shirota, R. Akita, H. Oda, and H. Akiyama. Development and validation of a lateral flow assay for the detection of crustacean protein in processed foods. Food Chem. 2014;150:348–352. doi:10.1016/j.foodchem.2013.10.130
- [4] D. Koizumi, K. Shirota, H. Oda, R. Adachi, S. Sakai, H. Akiyama, T. Nishimaki-Mogami, and R. Teshima. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay using a nonpoisonous extraction system for the determination of crustacean protein in processed foods. J AOAC Int. 2018;101(3):798-804. doi: 10.5740/jaoacint.17-0324