

# 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	<a href="http://hdl.handle.net/10291/22632">http://hdl.handle.net/10291/22632</a>

明治大学大学院理工学研究科

2022 年度

博士学位請求論文

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

( Preparation of antimicrobial biomaterials and  
development of analytical methods using  
proteins derived from marine resources )

学位請求者 応用化学専攻

小泉 大輔

## 要旨

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。

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。

歯や骨の主成分はリン酸カルシウムである。リン酸カルシウムは、骨伝導性、生体親和性、機械的強度を有しており、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きた。一方で、バイオマテリアルの移植では、細菌感染が問題となっている。特に、歯科や代用骨の移植での感染症例が多いことが報告されている。感染の主な原因菌は、*Staphylococcus* 属であり、*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) や *Staphylococcus epidermidis* である。しかしながら、化学合成した抗生物質は、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。本研究では、上記課題を解決するため、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、世界人口の2-3%以上が何らかの食物アレルギーを有すると推定されている。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、加工食品中に含まれる食物アレルゲンに関する適切で、信頼できる情報の提供が必要であるが、これまでに加工食品中のエビ・カニを迅速且つ簡便にモニタリング可能な、十分に検証されたラテラルフローアッセイ法に関する科学的な報告はない。また、過去に構築した酵素結合免疫測定 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) 法は「アレルゲンを含む食品の検査方法を評価するガイドライン」に準じて十分に検証された検査法ではあるが、抽出系に毒物を含むため、毒物の取り扱いが可能な特定の施設でのみ使用が可能であった。そのため、より多くの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 法が開発が望まれている。本研究では、上記課題を解決するため、エビの筋肉から精製したアレルゲンタンパク質であるトロポミオシンを利用して、ラテラルフローアッセイ法およ

び、毒物を使用しない ELISA 法の 2 種類の検査法を構築し、加工食品中のエビ・カニを検出するための、食物アレルギー検査法としての性能を評価した。

各章の要約を以下に述べる。

第 1 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 2 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て、評価した。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<sup>-1</sup> 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 *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である。

第 3 章では、オーラルケア素材の基礎研究として、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 MG-63 細胞の増殖試験を行ったところ、いずれの複合粉体も増殖阻害を示さなかった。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である。

第 4 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/L, 1 µg タンパク質/g 食品に相当) を示し、簡便か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。

第 5 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 ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) を使用した。ELISA-II は高感度 (定量限界:  $0.66 \mu\text{g}$  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。

第 6 章では、第 2 章から第 5 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細菌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。

## 目次

第1章 緒言	
1.1 はじめに	1
1.2 プロタミン	4
1.3 リン酸カルシウム	9
1.4 トロポミオシン	11
1.5 研究目的	12
引用文献	19
第2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	
2.1 はじめに	24
2.2 実験方法	
2.2.1 各種リン酸カルシウムの調製	25
2.2.2 各種リン酸カルシウムのキャラクタリゼーション	26
2.2.3 各種リン酸カルシウムへのプロタミン吸着	26
2.2.4 各種プロタミン吸着リン酸カルシウムのキャラクタリゼーション	27
2.2.5 抗菌性試験	27
2.2.6 統計解析	28
2.3 結果と考察	
2.3.1 各種リン酸カルシウムの調製とその粉体特性	28
2.3.2 各種プロタミン吸着リン酸カルシウムのキャラクタリゼーション	37
2.3.3 抗菌性試験	40
2.4 まとめ	47
引用文献	49
第3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	
3.1 はじめに	51
3.2 実験方法	
3.2.1 フッ化物イオン含有または不含有リン酸八カルシウムの調製	52
3.2.2 調製したリン酸カルシウムへのプロタミンとフッ化物イオンの吸着	52
3.2.3 調製したリン酸カルシウム複合粉体のキャラクタリゼーション	53
3.2.4 細胞増殖試験	54
3.2.5 抗菌性試験	54
3.2.6 統計解析	55
3.3 結果と考察	

3.3.1 調製したリン酸カルシウム複合粉体のキャラクタリゼーション	55
3.3.2 細胞増殖試験	64
3.3.3 抗菌性試験	67
3.4 まとめ	72
引用文献	75
第4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	
4.1 はじめに	77
4.2 実験方法	
4.2.1 食品サンプル	77
4.2.2 エビタンパク質抽出液とモデル加工食品の調製	78
4.2.3 測定溶液の調製	78
4.2.4 テストストリップの作製	78
4.2.5 ラテラルフローアッセイ法の評価	79
4.2.6 再現性の評価	81
4.3 結果	
4.3.1 ラテラルフローアッセイ法の最適化	81
4.3.2 エビタンパク質抽出液に対する検出限界	82
4.3.3 反応性及び特異性	82
4.3.4 モデル加工食品に対する検出限界と再現性	82
4.3.5 市販加工食品への応用	87
4.4 考察	87
4.5 まとめ	92
引用文献	93
第5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測定法の構築と評価	
5.1 はじめに	95
5.2 実験方法	
5.2.1 食品サンプル	95
5.2.2 ブラックタイガータンパク質標準液の調製	96
5.2.3 モデル加工食品の調製	96
5.2.4 食品抽出液の調製	97
5.2.5 酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA-II) の構築と測定	97
5.2.6 甲殻類タンパク質に対する反応性	99
5.2.7 検査法の再現性、検出限界、定量限界の評価	99

5.3 結果と考察	
5.3.1 ELISA-II の最適化	100
5.3.2 標準曲線	100
5.3.3 検出限界と定量限界	100
5.3.4 反応性と特異性	102
5.3.5 モデル加工食品の回収率と再現性	104
5.3.6 加工食品への応用	109
5.4 まとめ	113
引用文献	116
第6章 結言	117
本論文に関連した公表論文および学会発表ほか	122
謝辞	124

## 第1章 緒言

### 1.1 はじめに

日本は世界でも有数の好漁場に恵まれ、古くから多種多様な旬の魚介類を利用してきた。国民1人当たりの年間水産物消費量は23.8 kg(2019年)と世界の中で上位にあり、消費される生鮮魚介類の種類は1位サケ、2位マグロ、3位ブリ、4位エビ(2020年)である[1]。日本近海(200海里以内)では、33,629種の生物の存在が科学的に認識されている[2]。世界の1人当たりの年間水産物消費量は、欧米での健康志向の高まりや、中国等の経済発展により年々増加を続けており、過去半世紀で約2倍に増加している[1]。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。

水産物には様々な機能性成分が含まれており、人々の生活の質(quality of life: QOL)の向上に活用されている。例えば、青魚などに多く含まれるn-3系多価不飽和脂肪酸(DHA, EPA)は心血管疾患予防効果や抗肥満効果など、甲殻類に含まれるキチン・キトサンは抗菌作用や抗炎症効果など、藻類に含まれるカロテノイドは皮膚改善効果や抗酸化作用などを有することが報告されている[3]。また、水産物由来タンパク質を酵素分解することで得られるペプチドは、アンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害活性や抗酸化作用などを有することが報告されている[3, 4]。

サケ・マスとはサケ科に属する魚のことであり、サケ属(シロザケ、ギンザケ、カラフトマス、ベニザケ、ニジマスなど)、タイセイヨウサケ属(タイセイヨウサケ、ブラウントラウトなど)、イワナ属(イワナ、カワマスなど)などからなる。天然サケの漁場は北太平洋の日本、ロシア、米国、カナダの4か国の沿岸部

に限定されている。国連海洋法条約で定められた母川国主義により、200 海里以内でも沖獲りが事実上不可能となっており、どの地域においてもごく沿岸部での漁業しか行われていない。経年変動はあるものの、全体では約 80-90 万トン程度の漁獲量があり、このうち米国が 35-40 万トン、日本が 20-30 万トン程度である。日本ではシロザケの漁獲量が多く、ロシアではカラフトマスが多い、米国ではベニザケとカラフトマスの漁獲量が多い[5]。サケの加工工程で除去された白子は、その一部は食用や飼料用として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[6]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活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。

機能性素材としてのタンパク質は、タンパク質と他の機能性素材を組み合わせ、複合素材としても活用される。例えば、コラーゲンとリン酸八カルシウム ( $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; octacalcium phosphate: OCP) の複合素材が開発され、臨床研究において安全性と代用骨としての有用性が認められている[7, 8]。骨欠損は世界的に重要な健康問題であり、骨は血液に次いで移植される頻度の高い組織である。欧米では、毎年 50 万人以上の患者が骨欠損の修復を受けている[9]。また、超高齢社会で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[10]、バイオマテリアルの必要性が益々高まっている。歯や骨の主成分はリン酸カルシウムである。リン酸カルシウムは、骨伝導性、生体親和性、機械的強度を有しており、コーティング、セメント、足場材などのバイオマテリアルとして広く利用されてきた[11-13]。また、リン酸カルシウムは先述したリン酸カルシウム/コラーゲン複合体のように、機能性タンパク質と組み合わせることで、バイオマテリアルとしての機能をより高めることができる。リン酸

カルシウムと機能性タンパク質であるプロタミンを組み合わせることで、特に歯科や代用骨向けの、新規の高機能バイオマテリアルを開発できる可能性がある。

水産物由来のタンパク質は人々の QOL 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[14]。食物アレルギーとは、食物を摂取した後に免疫を介して蕁麻疹や呼吸困難など、体にとって不利益な症状がおこることである。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、世界人口の 2-3%以上が何らかの食物アレルギーを有すると推定されている[14, 15]。食物アレルギー発症のメカニズムとしては、皮膚・腸粘膜・気管支粘膜・鼻粘膜、結膜などに存在するマスト細胞に免疫グロブリン E (IgE) が結合し、そこに食物アレルギー抗原が結合することで、マスト細胞から化学伝達物質(ヒスタミン、ロイコトリエンなど)が放出され、アレルギー反応が惹起されると考えられている[16-18]。食物アレルギーに対する経口、舌下、経皮免疫療法の有効性は評価されているものの、有効かつ安全であることが示された、確立された単一のプロトコルはない[19, 20]。食物アレルギーの最も問題な点は、有効な治療法が確立されていないことである。そのため、現在のところ、食物アレルギーを回避することが、食物アレルギー反応を防ぐことができる唯一の手段である[20-22]。一方で、重篤なアレルギー反応は、食物アレルギーを含む食品の誤食により引き起こされることが様々な研究で報告されている[23, 24]。そのため、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、信頼できる情報の提供が必要である。

食物アレルギー表示は、食物アレルギーを持つ消費者が、アレルギー反応を引き起こす可能性のある食品を避けるための、重要な検討事項である。食物アレルギー表示に関する取組みは各国で異なっているが、多くの国では、コーデックス

委員会 (Codex Alimentarius Commission (CAC)) で推奨されるような一般的な品目である、乳、卵、ピーナッツ、穀物、甲殻類、魚、大豆、木の実が食物アレルギー表示の対象品目 (表 1-1) となっている [25-27]。日本では、消費者により適切な情報提供を行うために、2002 年 4 月より、アレルギーの原因となる食品原材料について、表示制度が施行された。本表示制度では 7 品目 (えび、かに、小麦、そば、卵、乳、落花生 (ピーナッツ)) が特定原材料として表示を義務付けられ、さらに、大豆などを含む 21 品目が特定原材料に準ずるものとして表示を推奨されている [28, 29]。食物アレルギーとしては (表 1-2)、乳に含まれるカゼインや、卵に含まれるオボムコイドなどが知られているが、えび・かきのメジャーアレルギーとしては、トロポミオシンが知られている [18, 30]。

以下では、「プロタミン」、「リン酸カルシウム」、「トロポミオシン」の構造や性質、これまでの研究について述べる。

## 1.2 プロタミン

プロタミンは、分子量約 5 kDa、等電点は 12-13、アルギニン残基に富むカチオン性タンパク質である。別名 Clupeine や Salmine とも呼ばれ、魚類、鳥類、哺乳類の精細胞内で DNA と結合している。グラム陽性菌だけでなくグラム陰性菌などに対する広い抗菌スペクトルを有し、食品保存料として使用されている [6, 31-33]。サケ由来のプロタミン (サルミン) のアミノ酸配列を図 1-1 に示す [34]。アミノ酸配列が類似した 4 種の分子種の存在が知られている。

プロタミンの抗菌メカニズムは対象菌種によって異なり、包括的な説明はされていないものの、以下の 2 つのメカニズムが提唱されている [35]。ひとつは、正電荷のプロタミンが細胞外上皮の負電荷と静電的相互作用により結合し、 $K^+$ 、ATP、細胞内酵素を放出するというものであり、もうひとつは、細胞膜をターゲ

表 1-1 諸外国での食物アレルギー表示対象品目<sup>[27]</sup>

品目	日本	CODEX <sup>※1</sup>	米国	EU	中国	韓国
小麦 / 穀物	○ 小麦	○ <sup>※2</sup>	○ 小麦	○ <sup>※2</sup>	△ <sup>※2</sup>	○ 小麦
甲殻類	○ えび・かに	○	○ かに・ロブスター・えび等	○ えび・かに等	△ えび・ロブスター・かに等	○ えび・かに
卵	○	○	○	○	△	○ 家禽に限る
魚類	△ さけ・さば	○	○ バス・ヒラメ・タラ等	○	△	○ さば
落花生 (ピーナッツ)	○	○	○	○	△	○
大豆	△	○	○	○	△	○
乳	○	○	○	○	△	○
木の実類	△ アーモンド・くるみ・カシューナッツ	○	○ アーモンド・ピーカン・くるみ等	○ <sup>※3</sup>	△	○ くるみ
亜硫酸塩		○		○		○
そば	○					○
軟体動物	△ あわび・いか			○		○ タコ・カキ・あわび・ムール貝を含む
魚卵	△ いくら					
フルーツ	△ オレンジ・キウイ フルーツ・バナナ・もも・りんご					○ もも
肉類	△ 牛肉・鶏肉・豚肉					○ 牛肉・鶏肉・豚肉
その他	△ ごま・まつたけ・やまいも・ゼラチン			○ (ごま・マスタード・セロリ・ルピナス)		○ トマト

※1 CODEX…FAO/WHO が合同で設立した国際政府間組織が策定した食品の国際規格

※2 小麦 / 穀物の範囲…CODEX：小麦、ライ麦、大麦、オート麦、スペルト

EU：小麦、ライ麦、大麦、オート麦、スペルト、カムート

中国：小麦、ライ麦、大麦、スペルト

※3 木の実類の範囲 (EU) …アーモンド、ヘーゼルナッツ、くるみ、カシューナッツ、ペカンナッツ、ブラジルナッツ、

ピスタチオ、マカダミア、クイーンズランドナッツ

表 1-2 植物性食品と動物性食品のアレルゲンファミリー<sup>[18]</sup>

Family	Function	Selected allergens (names/sources)
Plant food allergen families		
Prolamins	Seed storage proteins	Sec c 20/Rye; Tri a 19/wheat; Tri a 36/wheat
Nonspecific lipid transfer proteins	Involved in lipid transport, plant defense	Act d 10/Kiwi; Api g 2/celery; Ara h 9/peanut; Cas s 8/chestnut; Cor a 8/hazelnut; Jug r 3/walnut; Lyc e 3/tomato; Mus a 3/banana; Pru du 3/almond; Pru p 3 /peach; Tri a 14/wheat; Zea m 14/maize
2S albumins	Seed storage proteins	Ana o 3/cashew nut; Ara h 2/peanut; Ber e 1/Brazil nut; Fag e 2/buckwheat; Gly m 8/soybean; Jug r 1/walnut; Ses i 1/sesame; Sin a 1/mustard
Bet v 1 family	Pathogenesis-related proteins	Api g 1/celery; Ara h 8/peanut; Cor a 1/hazelnut; Dau c 1/carrot; Gly m 4/soybean; Mal d 1/apple; Pru p 1/peach
Cupin superfamily		
7S (vicilin-like) globulins	Seed storage proteins	Ana o 1/cashew nut; Ara h 1/peanut; Gly m 5/soybean; Jug r 2/walnut; Pis v 3/pistachio
11S (legumin-like) globulins	Seed storage proteins	Ana o 2/cashew nut; Ara h 3/peanut; Ber e 2/Brazil nut; Cor a 9/hazelnut; Gly m 6/soybean; Jug r 4/walnut; Pru du 6/almond
Cysteine protease C1 family	Cysteine proteases	Act d 1/kiwi; Gly m Bd 30K/soybean
Profilins	Actin-binding proteins	Act d 9/kiwi; Api g 4/celery; Ara h 5/peanut; Cuc m 2/melon; Dau c 4/carrot; Gly m 3/soybean; Lyc e 1/tomato; Mus a 1/banana; Ory s 12/rice; Pru av 4/cherry; Pru du 4/almond; Pru p 4/peach; Tri a 12/wheat
Animal food allergen families		
Tropomyosin family	Actin-binding proteins in muscle	Pen m 1/shrimp
Parvalbumin family	Muscle proteins, involved in muscle contraction	Cyp c 1/carp; Gad c 1/cod; Ran e 2/frog; Sal s 1/salmon; Seb m 1/redfish; Xip g 1/swordfish
Caseins	Mammalian milk proteins, form stable micellar complexes	Bos d 8–Bos d 12/cow's milk
Transferrin family	Sulfur-rich iron-binding glycoproteins from milk and hen's egg white	Bos d Lactoferrin/cow's milk; Gal d 3/hen's egg
Serpins	Serine protease inhibitors	Gal d 2/hen's egg
Arginine kinases	Adenosine triphosphate: guanido phosphotransferases	Pen m 2/shrimp
Lipocalins	Carrier proteins	Bos d 5/cow's milk
Lysozyme family	Enzymatic activity, lactose synthesis in milk	Bos d 4/cow's milk; Gal d 4/hen's egg
Ovomucoids	Kazal inhibitors, contain Kazal-type inhibitor repeats	Gal d 1/hen's egg
Albumins	Serum albumins, transport proteins	Bos d 6/cow's milk; Gal d 5/hen's egg

配列 1: PRRRRRSSSRPIRRRRRPRASRRRRRGGRRRR

配列 2: PRRRRSSRRPVRRRRRPRVSRRRRRRGGRRRR

配列 3: PRRRRSSSRPVRRRRRPRVSRRRRRRGGRRRR

配列 4: PRRRRASRRIRRRRRRPRVSRRRRRRGGRRRR

R:アルギニン S:セリン P:プロリン G:グリシン V:バリン A:アラニン I:イソ  
ロイシン

図 1-1 サケ由来プロタミンのアミノ酸配列<sup>[34]</sup>

ットとし、エネルギー輸送や栄養摂取機能を阻害するというメカニズムである。また、プロタミンは、水酸アパタイト( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ; hydroxyapatite: HAp)の結晶形成能を有する骨シアロタンパク質(BSP)の転写を調節すること[36]や、3-methyl-4-isopropylphenol と併用することにより抗菌作用の相乗効果が得られることが報告されている[37]。化学合成した抗生物質は、耐性菌の発生に関わる憂慮すべき問題に直面している。例えば、ラクタム系薬剤(ペニシリンやメチシリンなど)は、細胞壁ペプチドグリカンの架橋反応を担うペニシリン結合タンパク質(PBPs)と親和性が高く、これらの酵素活性を阻害して抗菌活性を示す。黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*: *S. aureus*)においては、薬剤の分解酵素であるラクタマーゼを産生する菌や、ラクタム系薬剤に低親和性のペニシリン結合タンパク質(PBP2A)を持つ菌が問題となっている。PBP2Aは *mecA* gene にコードされ、この遺伝子を持ちかつ機能している菌がメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)と定義されている[38, 39]。MRSAは病院内で非常に多く見られ、感染率が高い(50%以上)のは、北米、南米、アジア、マルタ、中程度(25~50%)は、中国、オーストラリア、アフリカ、いくつかのヨーロッパ諸国(ポルトガル(49%)、ギリシャ(40%)、イタリア(37%)、ルーマニア(34%))であり、ほとんどのヨーロッパ諸国は有病率が低いことが報告されている[39]。一方、プロタミンのように、抗菌メカニズムが動的流体である病原体の生体膜への作用に関わるものは、ラクタム系薬剤のような特定のタンパク質への作用に関わる抗菌材と比較して、耐性菌の問題は比較的少ないと考えられている[40]。具体的には、プロタミンの抗菌作用について、Hansenらは、グラム陰性菌の *Escherichia coli* と、グラム陽性菌の *Listeria monocytogenes* を用いて、各pHにおけるプロタミンの両細菌への結合率の関係を調査し、プロタミンはpH 6.5以上で両細菌により多く結合し、より強い抗菌性を発現するこ

とを報告している。また、アルカリ側の pH では、細菌の細胞表面とプロタミンの静電的親和性が高まることから、その要因と推察している[41]。また、Aziz らは、*Pseudomonas aeruginosa* に対するプロタミンの抗菌メカニズムを調査し、プロタミンが細胞膜を破壊することなく細胞内に透過し、蓄積することで抗菌性を発現することを報告している[42]。一方、Koo らは、プロタミンは *S. aureus* の細胞膜を透過して細胞内に蓄積することを確認したが、当該試験条件下では抗菌性を認めなかったことから、プロタミンの *S. aureus* に対する抗菌性は、細胞内蓄積のみに起因しているわけではないと推察している[43]。プロタミンの抗菌メカニズムを包括的に解明するためには更なる研究が必要であるが、特定のターゲットではなく、細胞膜との静電的相互作用による結合が抗菌性発現の主要なメカニズムの一つであることから、既存の抗生物質に代わる抗菌性素材として期待される。

### 1.3 リン酸カルシウム

リン酸カルシウムは、ヒトの骨や歯に存在する主要な無機物質である。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、機械的強度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[11-13]。骨には 60-70 mass% 程度のミネラルが含まれており、その大部分は HAp である[44]。歯の象牙質には 70mass% 程度、歯のエナメル質には 97mass% 程度の HAp が含まれている[13]。また、骨や歯の無機層は、HAp と類似した構造を持つ結晶性の低いイオン置換されたリン酸カルシウムを含む[45]。生物学的環境では HAp は六方晶の構造を取り、室温、pH 4-12 において最も安定なリン酸カルシウムとして知られている[11, 46]。非晶質リン酸カルシウム (amorphous

calcium phosphate: ACP) と OCP は HAp の前駆物質であり、HAp と比較して骨再生能に優れているとの報告もある[47-49]。さらに、ACP は Posner's clusters と呼ばれる直径 0.95 nm、化学組成  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$  のイオンクラスターが集まった非晶質構造であると提唱されている。ACP は飽和リン酸カルシウム溶液から生じる最初の固相であり、次第により安定な固相である OCP や HAp に転化する。ACP は溶解性や吸収性が高く、生理活性が高い[48, 50]。OCP はアパタイト層と水和層が重なり合った構造であり、HAp に似た構造である。しかし、骨伝導性や生分解性の観点から、代用骨としての特性は HAp と異なる。例えば、粒状の OCP を頭蓋冠の上に設置した際に、ACP や HAp など他のリン酸カルシウムと比較して、マウスの骨組織反応において、より高い骨伝導性が観察されたとの報告がある[49]。

生体内の骨は、骨吸収と骨形成を繰り返し、古い骨組織を新しいものに入れ替えている（リモデリング）。リモデリングを繰り返すことで、石灰化度を増し、その強度を維持している[51]。脊椎動物では、「膜性骨化」と「内軟骨性骨化」の 2 種類の骨形成過程が知られている。膜性骨化では、骨芽細胞が自らの周囲に石灰質を蓄えながら骨を形成していく。一方、内軟骨性骨化では、軟骨細胞から分化した肥大軟骨細胞がアポトーシスを起こして死滅し、そこに骨芽細胞が石灰化組織（骨基質）をつくる。破骨細胞は骨質表面に付着し、酸（塩酸）とプロテアーゼを放出し、骨を溶解する[52]。インプラント治療においては、スレッドの初期固定で圧迫された骨で一度吸収が起こった後に、スレッド形状に合わせて骨が形成されるリモデリングが生じる[51]。

生体内のリン酸カルシウムの原料となるカルシウムは、食事から吸収される。1 日のカルシウム摂取量を 600 mg とすると、小腸で正味約 150 mg/日が吸収される。尿中への排泄量も約 150 mg/日であるから、カルシウム代謝のバランスは

ほぼ均衡が保たれる。高齢者においては、カルシウム吸収効率が低下するため排泄量が吸収量を上回り、加齢に伴い徐々に骨が失われる一つの要因と考えられている[51]。

#### 1.4 トロポミオシン

トロポミオシンは筋原線維タンパク質の一種で、筋収縮に関与しているタンパク質として知られている。塩水溶性であり、熱安定性が高い。 $\alpha$ -ヘリックスのホモ2量体からなり、分子量は34-38 kDaである。エビの全タンパク質の約20%を占めている。エビアレルギーのうち、約80%はトロポミオシンが原因で誘発される[53]。アミノ酸配列による系統解析では(図1-2)、トロポミオシンは節足動物と軟体動物に大別され、両グループの相同性は平均61.4%(54.5-65.5%の範囲)であり、甲殻類間の相同性は93.8%(82.0-100%の範囲)である[17]。ある種の甲殻類のトロポミオシンを認識する患者のIgEは他の種の甲殻類のトロポミオシンにも反応する(交差性を有する)ことが知られている。また、臨床現場では、エビにのみアレルギーを示す患者や、カニにのみアレルギーを示す患者の存在が知られている。これは、アレルギー患者によってIgE結合エピトープ(抗原決定基)が異なるためと考えられる[30]。なお、無脊椎動物由来のトロポミオシンは主要なアレルギーとして報告されているが、脊椎動物由来のトロポミオシンは非アレルギー性として知られている[53]。各種トロポミオシンに対する抗原交差性は食物アレルギー患者によって異なることから、食物アレルギー患者の食品選択の幅を狭めないためにも、甲殻類アレルギーの検査法には高い特異性が求められる。加工食品に含まれる食物アレルギーの検査法には、定量検査法の酵素結合免疫吸着測定(enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA)法、定性試験法のポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction: PCR)法

やウエスタンブロット法、簡便な測定が可能なラテラルフローアッセイ法などがあり、日本の公定法として、ELISA 法がスクリーニング検査に、PCR 法とウエスタンブロット法が確定検査に使用されている[29, 54, 55]。

## 1.5 研究目的

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[1]。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。

医療分野においては、各種リン酸カルシウムを原料としたバイオマテリアルは、病気やケガの治療において非常に重要である。一方で、バイオマテリアルの移植では、細菌感染が問題となっている[56]。特に、歯科や代用骨の移植での感染症例が多いことが報告されている。感染の主な原因菌は、*Staphylococcus* 属であり、*S. aureus* や *Staphylococcus epidermidis* である[56]。しかしながら、化学合成した抗生物質は、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[40]。

食品分野においては、食物アレルギーが先進国において重要な健康問題の一つとなっている。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[23, 24]。そのため、加工食品中に含まれる食物アレルゲンに関する適切で、信頼できる情報の提供が必要であるが、これまでに加工食品中のエビ・カニを迅速且つ簡便にモニタリング可能な、十分に検証されたラテラルフローアッセイ法に関する科学的な報告はない。また、過去に開発された ELISA 法は「アレルゲンを含む食品

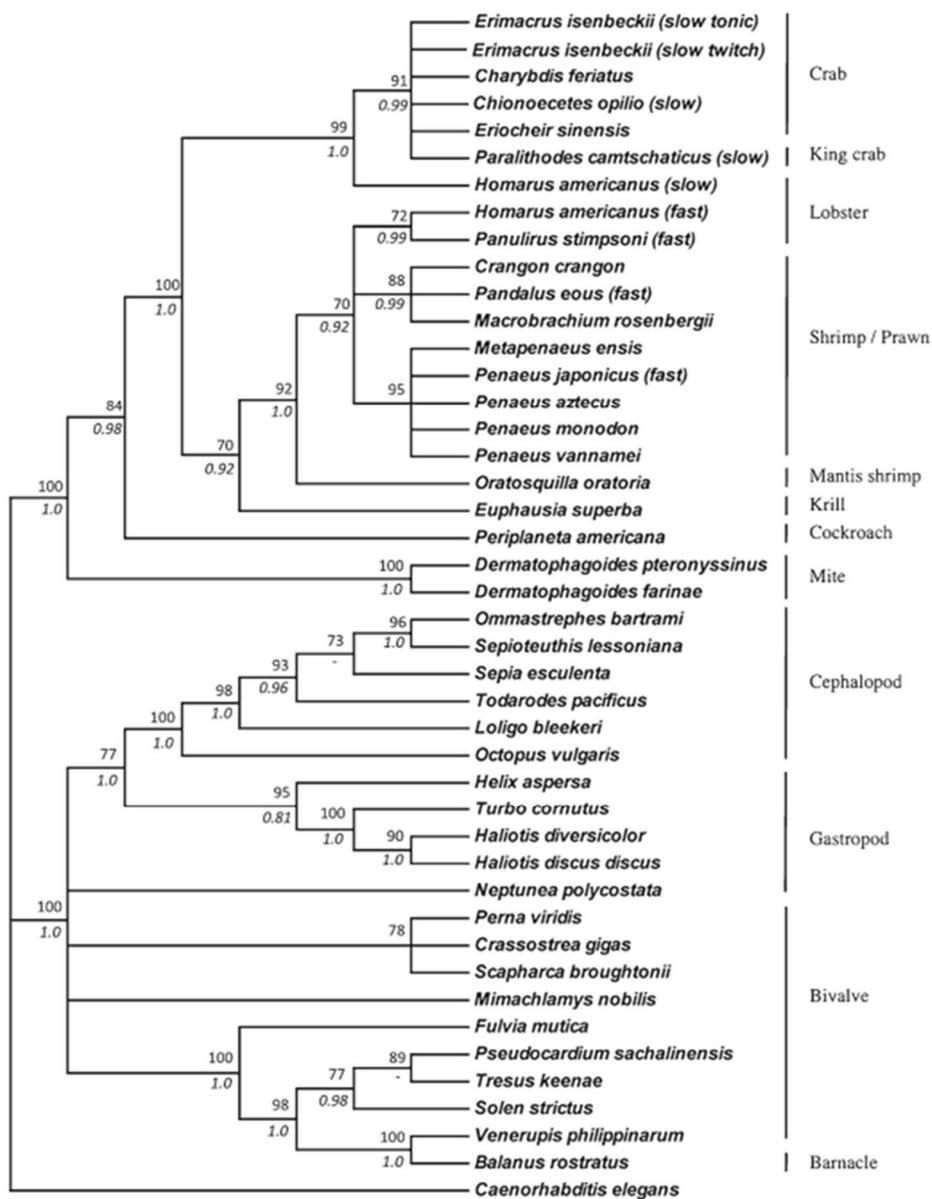


図 1-2 アレルゲンとして同定されたトロポミオシンのアミノ酸配列をもとに  
 近傍結合 (neighbor joining, NJ) とベイズ推定 (Bayesian inference, BI)  
 により作成した系統樹<sup>[17]</sup>

各枝には、NJ によるブートストラップ値と BI による事後確率(イタリック体)  
 を記載 (70%以上の値のみ)。

の検査方法を評価するガイドライン」に準じて十分に検証された検査法ではあるが[57]、抽出系に毒物を含むため、毒物の取り扱いが可能な特定の施設でのみ使用が可能であった。そのため、様々な施設でエビ・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 法の開発が望まれている。

本研究では、水産物由来のタンパク質であるサケプロタミンとエビトロポミオシンの 2 種類のタンパク質を活用することで、上記課題の解決を試みた。すなわち、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。また、エビの筋肉から精製したアレルギータンパク質であるトロポミオシンを利用して、ラテラルフローアッセイ法および、毒物を使用しない ELISA 法の 2 種類の検査法を構築し、加工食品中のエビ・カニを検出するための、食物アレルギー検査法としての性能を評価した。

なお、抗菌性バイオマテリアルの創製および、食物アレルギー検査法の構築を実現した際の、天然資源の有効活用の観点から、「現状の廃棄量」と「有効活用 (QOL 向上)」への貢献度を定量的に算出すると、以下の数値が想定される。

## 1. 抗菌性バイオマテリアルの創製

### 【現状の廃棄量】

抗菌性バイオマテリアルの創製に利用するプロタミンは、サケの白子から得られる。日本のサケの漁獲量を 20 万トン[5]、そのうちオスが 50%、サケに占める白子の割合が 5%と仮定すると、年間 5 千トン程度の白子が回収されていると推定される。また、回収された白子の一部は飼料として利用されるものの、白子に限らず食品の加工残渣は一般的に飼料として利用されることを考慮すると、飼料用途としての白子は他の加工残渣と容易に代替可能であり、必ずしも有効

活用されているとは言い難い。そのため、抗菌性バイオマテリアル用途に利用することで、年間5千トン程度の白子が有効に活用できる。

#### 【有効活用（QOL向上）】

日本では年間12万件以上の人工関節置換術が行われており、手術部位感染の発生率を1%と仮定すると、年間1,200例が発生していることになる[58]。また、日本顎顔面インプラント学会はアンケート調査を実施し、インプラント手術に関する重篤な医療トラブル360例のうち、上顎洞炎の発生が最も多く（73例、20.3%）、上顎洞炎の原因として「サイナスリフトにおける自家骨、骨補填材の露出、感染」が35%と最も多いことを報告している[59]。歯科用機器・材料の市場規模は約2,683億円（2019年度）であり、そのうち歯科材料市場は約1,219億円、歯科用インプラント市場は約208億円である[60]。プロタミンを利用した新規抗菌性バイオマテリアルは、年間数十万件実施されている歯科・口腔外科および、整形外科のインプラント治療に関わる感染予防や、年間数千件発生している細菌感染の改善に貢献することが可能であり、患者のQOL向上に寄与できる。

## 2. 食物アレルギー検査法の構築

#### 【現状の廃棄量】

食品リコールにより自主回収された加工食品は、そのまま廃棄されるのが一般的である。また、2018年度に発生した815件の食品リコールのうち、662件が製造者の責任で発生したものであり、そのリコール原因の約3割（209件）がアレルギーに関わるもの（表記の間違い・欠落、コンタミネーション）であった[61]。仮に、1件あたりの製品重量を300g、回収個数を3,000個と仮定すると年間188トン、回収量を10,000個と仮定すると年間627トンが廃棄されていることになる。この廃棄量は、えび類の国内消費仕向量（約3.4万トン）[62]や、

かに類の国内消費仕向量(約1.2万トン)[62]と比較すると小さい値ではあるが、貴重な資源を食品として有効活用するためにも、食品表示ミスはなくす必要がある。食物アレルギー検査法を用いて、製造工程や最終製品をモニタリングすることで、食品リコールを未然に防ぎ、上述のフードロス削減に貢献できる。

#### 【有効活用(QOL向上)】

食物アレルギー患者数の頻度分布(有病率)は未だあきらかとなっていない。松原らは、政府統計等利用可能な資料を用いて食物アレルギー患者数を推計し、乳幼児期では「自己申告」で約80万人、学齢期では「自己申告」で約60万人と推計したが、成人の患者数については、調査対象が限定されており、推計には至っていない[63]。日本の小規模調査で2%前後の有病率と報告されていること[63, 64]や、世界人口の2-3%以上が何らかの食物アレルギーを有すると推定されていること[14, 15]から、海外の有病率をそのまま日本に当てはめることは難しいが、仮に日本人(約1億2千万人)の有病率が2%と仮定すると、約240万人が何かしらの食物アレルギーを有すると推定される。また、「即時型食物アレルギーによる健康被害に関する全国実態調査」では、6,080例の解析対象のうち、初発例が3,905例(64.2%)、誤食例が2,175例(35.8%)であり、誤食の理由として、食品表示ミスが153例(7.0%)あることが明らかとなっている[65]。食物アレルギー検査法を用いて正しい食品表示を行うことで、食物アレルギー患者(推定240万人程度)の健康被害を防ぎ、患者のQOL向上に貢献できる。

本論文は上記の目的を達成するために行った研究を纏めたものであり、以下のように構成されている。

第2章では、ACP, OCP, HAp粉体を調製し、各粉体のキャラクタリゼーションを行った。さらに、各粉体を出発原料として、プロタミンとの複合粉体(ACP-

Protamine, OCP-Protamine, HAp-Protamine) を調製し、キャラクタリゼーションと抗菌性試験を行い、プロタミン/リン酸カルシウム複合粉体の抗菌性バイオマテリアルとしての性能を評価した。

第 3 章では、第 2 章で高い抗菌性を示した OCP-Protamine に着目し、本粉体の高性能化を目的として、リン酸カルシウムの結晶化促進能を有するフッ化物イオンを含有した複合粉体の調製を行い、評価した。すなわち、OCP、プロタミン、フッ化物イオンを出発原料として、フッ化物イオン含有プロタミン/リン酸カルシウム複合粉体を調製し、キャラクタリゼーション、細胞増殖試験、抗菌性試験を実施し、抗菌性バイオマテリアルとしての性能を評価した。

第 4 章では、トロポミオシンと反応性を示す 2 種類の抗体を用いてラテラルフローアッセイ法を構築した。また、食品原材料や市販加工食品を用いて、特異性、反応性、再現性、過去に検証された ELISA 法との相関を評価し、食物アレルギー検査法としての性能を評価した。

第 5 章では、毒物を含まない抽出系を用いた、加工食品中のエビ・カニを検出するための ELISA 法を構築した。また、食品原材料や市販加工食品を用いて、特異性、反応性、再現性、過去に検証された抽出系に毒物を含む ELISA 法との相関を評価し、食物アレルギー検査法としての性能を評価した。

第 6 章では、第 2 章から第 5 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細菌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、食物アレルギー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。

## 引用文献

1. 「令和2年度水産の動向」及び「令和3年度水産施策」. 令和3年6月4日. 水産庁.
2. Fujikura K, Lindsay D, Kitazato H, Nishida S, Shirayama Y. Marine biodiversity in Japanese waters. PLoS ONE. 2010;5(8):e11836. doi: 10.1371/journal.pone.0011836
3. Atef M, Seyed, Ojagh MS. Health benefits and food applications of bioactive compounds from fish byproducts: a review. Journal of Functional Foods. 2017;35:673–681. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.034>
4. Hamed I, Özogul F, Özogul Y, Regenstein MJ. Marine bioactive compounds and their health benefits: A review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2015;14(4):446–465. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12136>
5. 井田齊, 河野博, 茂木正人. 食材魚介大百科 別巻2 サケ・マスのすべて. 2007年9月18日. 平凡社.
6. Gill TA, Singer DS, Thompson JW. Purification and analysis of protamine. Process Biochem. 2006;41 (8):1875–1882.
7. Kim JS, Jang TS, Kim SY, Lee WP. Octacalcium phosphate bone substitute (Bontree®): from basic research to clinical case study. Appl Sci. 2021;11:7921. <https://doi.org/10.3390/app11177921>
8. Kawai T, Shinji Kamakura S, Matsui K, Fukuda M, Takano H, Iino M, et al. Clinical study of octacalcium phosphate and collagen composite in oral and maxillofacial surgery. J Tissue Eng. 2020;11:1–15. <https://doi.org/10.1177/2041731419896449>
9. Håvard Jostein Haugen, Ståle Petter Lyngstadaas, Filippo Rossi, Giuseppe Perale, Bone grafts: which is the ideal biomaterial?. J Clin Periodontol. 2019;46(S21):92–102. doi: 10.1111/jcpe.13058.
10. Hisamori N. Introduction of biomaterials for beginners. Journal of the Society of Materials Science Japan. 2014;63(5):417–423.
11. Jeong J, Kim JH, Shim JH, et al. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. Biomater Res. 2019;23(1):1–11.
12. Eliaz N, Metoki N. Calcium phosphate bioceramics: a review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications. Materials. 2017;10(4):334.
13. Enax J, Epple M. Synthetic hydroxyapatite as a biomimetic oral care agent. Oral Health Prev Dent. 2018;16(1):7–19.
14. Ebisawa M. Epidemiology of food allergy (its comparison between Japan and other countries). Arerugi. 2007;56:10–17.
15. Rona RJ, Keil T, Summers C, Gislason D, Zuidmeer L, Sodergren E, Sigurdardottir ST, Lindner T, Goldhahn K, Dahlstrom J, McBride D, Madsen C. The prevalence of

- food allergy: a meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120:638–646. doi:10.1016/j.jaci.2007.05.026
16. 海老澤元宏. 食物アレルギー. からだの化学. 2007;252:61–65.
  17. Leung HYN, Wai YYC, Shu S, Wang J, Kenny PT, Chu HK, Leung CSP. Current immunological and molecular biological perspectives on seafood allergy: a comprehensive review. *Clinic Rev Allerg Immunol.* 2014;(3):180–197. doi: 10.1007/s12016-012-8336-9
  18. Valenta R, Hochwallner H, Linhart B, Pahr S. Food allergies: the basics. *Gastroenterology.* 2015;148(6):1120–1131.e4. doi: 10.1053/j.gastro.2015.02.006
  19. Natsume O, Kabashima S, Nakazato J, Yamamoto-Hanada K, Narita M, Kondo M, Saito M, Kishino A, Takimoto T, Inoue E, Tang J, Kido H, Wong GW, Matsumoto K, Saito H, Ohya Y. Two-step egg introduction for prevention of egg allergy in high-risk infants with eczema (PETIT): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2017;389:276–286. doi:10.1016/S0140-6736(16)31418-0
  20. Song TW. A practical view of immunotherapy for food allergy. *Korean J. Pediatr.* 2016;59:47–53. doi:10.3345/kjp.2016.59.2.47
  21. Sampson HA. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2004;113:805–819. doi:10.1016/j.jaci.2004.03.014
  22. Wang J, Sampson HA. Food allergy. *J Clin Invest.* 2011;121:827–835. doi:10.1172/JCI45434
  23. Furlong TJ, DeSimone J, Sicherer SH. Peanut and tree nut allergic reactions in restaurants and other food establishments. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2001;108:867–870.
  24. Yu JW, Kagan R, Verreault N, Nicolas N, Joseph L, St. Pierre Y, Clarke A. Accidental ingestions in children with peanut allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2006;118:466–472.
  25. Allen KJ, Turner PJ, Pawankar R, Taylor S, Sicherer S, Lack G, Rosario N, Ebisawa M, Wong G, Mills EN, Beyer K, Fiocchi A, Sampson HA. Precautionary labelling of foods for allergen content: are we ready for a global framework?. *World Allergy Organ J.* 2014;7:10. doi:10.1186/1939-4551-7-10
  26. Taylor SL, Baumert JL. Worldwide food allergy labeling and detection of allergens in processed foods. *Chem Immunol Allergy.* 2015;101:227–234.
  27. 加工食品の食物アレルギー表示ガイドブック. 令和3年3月. 消費者庁.
  28. アレルゲンを含む食品に関する表示について(令和元年9月19日消食表第322号). 消費者庁.
  29. Akiyama H, Adachi R. Japanese food allergy-labeling system and comparison with the international experience; detection and thresholds. *Food Safety* 2021;9(4):101–

116. doi: 10.14252/foodsafetyfscj.D-21-00008
30. 塩見一雄, 佐伯宏樹. 魚介類アレルギーの科学. 恒星社厚生閣.
  31. Islam NM, Itakura T, Motohiro T. Antibacterial spectra and minimum inhibition concentration of clupeine and salmine. *Bull Jpn Soc Sci Fish.* 1984;50(10):1705–1708.
  32. Suzuki K, Ando T. Studies on protamines: XVII. the complete amino acid sequence of clupeine YI. *J Biochem.* 1972;72(6):1433–1446.
  33. Miller BF, Abrams R, Dorfman A, et al. Antibacterial properties of protamine and histone. *Science.* 1942;96(2497):428–430.
  34. Hoffmann AJ, Chance ER, Johnson GM. Purification and analysis of the major components of chum salmon protamine contained in insulin formulations using high-performance liquid chromatography. *Protein Expr Purif.* 1990;1(2):127–33. doi: 10.1016/1046-5928(90)90005-j.
  35. Kim YH, Kim SM, Lee SY. Antimicrobial activity of protamine against oral microorganisms. *Biocontrol Sci.* 2015;20:275–280. <https://doi.org/10.4265/bio.20.275>
  36. Zhou L, Matsumura H, Mezawa M, Takai H, Nakayama Y, Mitarai M, Ogata Y. Protamine stimulates bone sialoprotein gene expression. *Gene.* 2013;516:228–237. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.12.056>
  37. Fujiki M, Honda M. The investigation of synergistic activity of protamine with conventional antimicrobial agents against oral bacteria. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;523:561–566. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.01.002>
  38. Hashizume H. Studies for the development of novel anti-MRSA/VRE drugs. *The Pharmaceutical Society of Japan.* 2012;132(1):59–67.
  39. Kelly M. Craft, Johny M. Nguyen, Lawrence J. Berg, Steven D. Townsend. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): antibiotic-resistance and the biofilm phenotype. *Medchemcomm.* 2019;10(8):1231–1241.
  40. Marshall SH, Arenas G. Antimicrobial peptides: a natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electron J Biotechnol.* 2003;6(3):271–284.
  41. L. Truelstrup Hansen and T.A. Gill. Solubility and antimicrobial efficacy of protamine on *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* as influenced by pH. *Journal of Applied Microbiology.* 2000;88:1049–1055.
  42. Aziz, M, Garduno R, Mirani AZ, Baqai R, Sheikh SA, Nazir H, Raza Y, Ayaz M, Kazmi US. Determination of antimicrobial effect of protamine by transmission electron microscopy and SDS PAGE on *Pseudomonas aeruginosa* isolates from diabetic foot infection. *Iran J Basic Med Sci.* 2019;22(7):827–832.
  43. Koo PS, Bayer SA, Yeaman RM. Diversity in antistaphylococcal mechanisms among membrane-targeting antimicrobial peptides. *Infect Immun.* 2001;69(8):4916–4922.

44. Boskey AL. Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. *BoneKEy Rep.* 2013;2:447.
45. Dorozhkin SV, Epple M. Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angew Chem Int Ed.* 2002;41(17):3130–3146.
46. Koutsopoulos S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods. *J Biomed Mater Res.* 2002;62 (4):600–612.
47. Vecstaudza J, Gasik M, Locs J. Amorphous calcium phosphate materials: formation, structure and thermal behaviour. *J Eur Ceram Soc.* 2019;39 (4):1642–1649.
48. Zhao J, Liu Y, Sun WB, et al. First detection, characterization, and application of amorphous calcium phosphate in dentistry. *J Dent Sci.* 2012;7(4):316–323.
49. Suzuki O, Shiwaku Y, Hamai R. Octacalcium phosphate bone substitute materials: comparison between properties of biomaterials and other calcium phosphate materials. *Dent Mater J.* 2020;39(2):187–199.
50. Posner AS, Betts F. Synthetic amorphous calcium phosphate and its relation to bone mineral structure. *Acc Chem Res.* 1975;8(8):273–281.
51. Yoshimura K, Suzawa T, Suzuki D, Kamijyo R. Involvement of systemic calcium metabolism on treatment with oral implants. *Journal of Japanese Society of Oral Implantology.* 2016;29(1):4–11. <https://doi.org/10.11237/jsoi.29.4>
52. Nomura S, Higashibata Y. Biology of bone. *Kagaku to Seibutsu.* 2003;41(5):293–297. <https://doi.org/10.1271/kagakutoseibutsu1962.41.293>
53. Laly JS, Sankar VT. Crustacean allergens and impact of different processing techniques on its allergenicity: a review. *Fishery Technology* 2021;58:63–76.
54. 食品表示基準について(平成 27 年 3 月 30 日消食表第 139 号). 消費者庁.
55. 食品表示基準 Q&A について(平成 27 年 3 月 30 日消食表第 140 号). 消費者庁.
56. Wekwejt M, Dziaduszevska M, Pałubicka A. The problem of infections associated with implants – an overview. *Eur J Med Technol.* 2018;4(21):19–26.
57. Sakai, S., Matsuda, R., Adachi, R., Akiyama, H., Maitani, T., Ohno, Y., Oka, M., Abe, A., Seiki, K., Oda, H., Shiomi, K., & Urisu, A. Interlaboratory evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay kits for the determination of crustacean protein in processed foods. *Journal of AOAC International.* 2008;91:123–129.
58. 小立鉦彦. 骨・関節術後感染予防ガイドライン 2015. 2017 年 5 月 15 日第 2 版第 2 刷. 南江堂.
59. 臼田慎, 河奈裕正, 加藤仁夫, 城戸寛史, 佐藤淳一, 式守道夫, 関根秀志, 高橋哲, 藤井俊治, 矢島安朝, 瀬戸暁一. 「インプラント手術関連の重篤な医療トラブルについて」第 2 回調査報告書. *日本顎顔面インプラント学会誌.* 2017;16 (2):89–100.
60. プレスリリース No. 2509 歯科機器・材料市場に関する調査を実施(2020 年). 矢野経済研究所. 2020 年 9 月 30 日. [https://www.yano.co.jp/press-release/show/press\\_id/2509](https://www.yano.co.jp/press-release/show/press_id/2509)

61. 松本隆志. 国内における食品リコール低減のための対策に関する考察. フードシステム研究. 2020;26(4):367–372.
62. 平成 26 年度 水産の動向 平成 27 年度水産施策. 水産庁.
63. 松原優里, 阿江竜介, 大矢幸弘, 穂山浩, 今井孝成, 松本健治, 福家辰樹, 青山泰子, 牧野伸子, 中村好一, 斎藤博久. 日本における食物アレルギー患者数の推計: 疫学調査の現状と課題. アレルギー. 2018;67(6):767–773.
64. Fujimori A, Yamashita T, Kubota M, Saito H, Takamatsu N, Nambu M. Comparison of the prevalence and characteristics of food hypersensitivity among adolescent and older women. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2016;25:858–862.
65. 令和 3 年度 食物アレルギーに関連する食品表示に関する調査研究事業報告書. 消費者庁. 令和 4 年 3 月.

## 第2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

### 2.1 はじめに

これまでに我々は、プロタミンの抗菌性を歯科や骨再生領域で活用するために、無水リン酸水素カルシウム (dicalcium phosphate anhydrous: DCPA) と水酸アパタイト (hydroxyapatite: HAp) を出発原料としてプロタミン吸着リン酸カルシウムを調製し、う蝕の原因菌の一種である *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) やバイオマテリアルの移植感染の原因菌の一種である *S. aureus* 等の微生物に対する抗菌性を確認している [1, 2]。非晶質リン酸カルシウム (amorphous calcium phosphate: ACP) は非晶質構造[3]、リン酸八カルシウム (octacalcium phosphate: OCP) は板状形態[4]を有するため、生体内での挙動だけでなく構造も HAp とは異なり、原料粉体としてのプロタミン吸着特性や、プロタミン吸着リン酸カルシウムの抗菌特性が HAp より優れている可能性がある。加えて、ACP と銀の複合材料[5]や銀配合 OCP 粉体[6]など、ACP や OCP を原料とした抗菌性バイオマテリアルも開発されているが、プロタミンの抗菌性や薬剤耐性菌が生じにくい抗菌メカニズム[7, 8]を考慮すると、ACP や OCP を出発原料として調製したプロタミン吸着リン酸カルシウムは、これまでに開発された抗菌性バイオマテリアルよりも、望ましい抗菌性バイオマテリアルとなる可能性がある。しかし、ACP や OCP を出発原料としたプロタミン吸着リン酸カルシウムの調製や評価については、これまでに報告がない。そこで本研究では、抗菌性を有する新たなバイオマテリアルの創製を目指して、HAp に加えて、ACP, OCP を出発原料としてプロタミン吸着リン酸カルシウムを調製し、それらの粉体性状および抗菌性を評価した。

## 2.2 実験方法

### 2.2.1 各種リン酸カルシウムの調製

メジアン径が  $\mu\text{m}$  オーダーの微粉体を得るために、三種類のリン酸カルシウム粉体 (ACP, OCP, HAp) を自家調製した。

ACP は、既報[9]を参考にして調製した。すなわち、予め  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  に冷却しておいた  $0.75\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  水溶液  $200\text{ cm}^3$  に、同じく冷却した  $0.25\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  水溶液  $350\text{ cm}^3$  を加え、氷冷下で 1 分間攪拌した。なお、どちらの溶液もアンモニア水で pH 10.0 に調整しておいた。生成したスラリーを吸引濾過し、アンモニア水 (pH = 10) で 2 回、蒸留水で 3 回洗浄した。凍結乾燥後、瑪瑙乳鉢で粉碎して ACP 粉体とした。粉体は使用時までデシケータで保管した。

OCP は、既報[10]を参考にして調製した。すなわち、 $0.0335\text{ mol}$  の  $\text{CaCO}_3$  と  $0.1\text{ mol}$  の  $\text{CaHPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (dicalcium phosphate dihydrate: DCPD) を  $1000\text{ cm}^3$  の蒸留水中で混合し、10 分間超音波処理を行った後、 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  で 4, 6, 15 時間攪拌した。その後、スラリーを吸引濾過し、蒸留水で 3 回洗浄した。凍結乾燥後、瑪瑙乳鉢で粉碎して OCP 粉体とした。粉体は使用時までデシケータで保管した。

HAp は、既報[11, 12]を参考にして調製した。すなわち、 $0.50\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{Ca}(\text{OH})_2$  の懸濁液を  $1000\text{ cm}^3$  調製し、攪拌しながら  $1000\text{ cm}^3$  の  $0.30\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{H}_3\text{PO}_4$  を 3 時間かけて滴下した。全量を滴下した後、アンモニア水を用いて pH を 8.70 に調整した。さらに、3 時間攪拌し、その後 pH を 8.70 に再度調整した。得られたスラリーを  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  のインキュベータで 3 日間熟成した。熟成後、スラリーを吸引濾過し、蒸留水で 3 回洗浄した。その後、スラリーを  $110\text{ }^{\circ}\text{C}$  の乾燥オーブンで 2 日間乾燥し、瑪瑙乳鉢で粉碎して HAp 粉体とした。粉体は使用時

までデシケータで保管した。

### 2.2.2 各種リン酸カルシウムのキャラクタリゼーション

調製したリン酸カルシウムの結晶相は X 線回折装置 (XRD, MiniFlex, リガク製) を用いて、30 kV, 15 mA で Cu-K $\alpha$  線を照射して同定した。さらに、KBr 法を用いたフーリエ変換赤外分光法 (FT-IR, NICOLET iS10, サーモフィッシャー製) により、調製したリン酸カルシウムの官能基を明らかにした。カルシウム：リンのモル比 (Ca/P モル比) は誘導結合プラズマ (ICP, ICPE-9000, 島津製作所製) で決定した。メジアン径はレーザー式粒度分布測定機 (LA-960, 堀場製作所製) を用いて確認した。比表面積 (SSA) は、Brunauer-Emmett-Teller (BET) 表面積分析器 (FlowSorb III, Micromeritics Instrument 製) を用いて、BET 法にもとづいて測定した。SSA 分析では、結晶相の変化を防ぐために 70 °C で脱ガスを行った。粒子形態は、i) 走査型電子顕微鏡 (SEM, TM4000Plus, 日立ハイテクフィールドディング製) (白金蒸着なし) および、ii) 透過型電子顕微鏡 (TEM, JEM-2100 F, 日本電子製) (加速電圧 200 kV) で観察した。TEM 観察用の試料は、粉体をエタノールに分散させ、その溶液をカーボン強化銅グリッド (400 メッシュ, 日本電子製) に滴下することにより作製した。

各種リン酸カルシウムは複数回調製し、複数回の評価から得られた代表的な XRD パターン、FT-IR スペクトル、メジアン径のデータを、図および表に示した。

### 2.2.3 各種リン酸カルシウムへのプロタミン吸着

過去の研究においてプロタミン溶液の仕込み濃度を検討し、仕込み濃度 500  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  において、リン酸カルシウムへのプロタミン吸着と抗菌性を認め、試験

管内および生体内において明らかな細胞毒性が無いことを確認したことから[1, 2]、本研究でもプロタミン溶液の仕込み濃度は  $500 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$  で実施した。すなわち、各種リン酸カルシウム (ACP, OCP, HAp) 1.0 g に  $500 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$  のプロタミン (サケ由来プロタミン塩酸塩, マルハニチロ製) 溶液  $45 \text{ cm}^3$  を加え、チューブローテータ (RCC-100, 岩城硝子製) で 48 時間、室温で攪拌して吸着させた。  $8,600 \times g$ 、10 分間遠心分離した後、上清を回収した。沈殿物を超純水で 3 回洗浄し、凍結乾燥した。プロタミン吸着リン酸カルシウムは使用時までデシケータで保管した。

#### 2.2.4 各種プロタミン吸着リン酸カルシウムのキャラクタリゼーション

プロタミン吸着リン酸カルシウムの結晶相を XRD と FT-IR によって同定した。プロタミン吸着後の上清中のプロタミン含量は高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography: HPLC, Alliance, 日本ウォーターズ製) により定量した。リン酸カルシウムに吸着したプロタミンは以下の手順で定量した。各種プロタミン吸着リン酸カルシウム粉体  $100 \text{ mg}$  と  $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  HCl  $0.45 \text{ cm}^3$  を 1 時間攪拌し、  $13,000 \times g$ 、10 分間遠心分離した後、上清を回収した。上清中のプロタミン含有量を HPLC で定量し、リン酸カルシウムに吸着したプロタミンの量を算出した。

#### 2.2.5 抗菌性試験

各種リン酸カルシウム粉体を滅菌バッグ (HM-3002, ホギメディカル製) に入れ、エチレンオキシドガスで滅菌した。リン酸緩衝液 (PBS;  $9 \text{ cm}^3$ ,  $9.57 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ , タカラバイオ製) 滅菌水に懸濁した各種リン酸カルシウム粉体のスラリー ( $100 \text{ mm}^3$ ; 終濃度:  $1 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ ,  $2 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ )、PBS に懸濁した *S. aureus*

FDA209 (1 cm<sup>3</sup>; 終濃度: 10<sup>5</sup> CFU·cm<sup>-3</sup>) を試験管に添加した。各試験管を 180 rpm で振盪しながら 30 °C で 6 時間培養し、コロニーカウントを行った。上清を孔径 0.22 μm のフィルターでろ過し、上清中のプロタミン含有量をブラッドフォード法 (富士フィルム和光純薬製) により定量した。

## 2.2.6 統計解析

データは一元配置分散分析後、Tukey post-hoc test で統計解析した。結果は「平均値 ± 標準偏差」で示した。

## 2.3 結果と考察

### 2.3.1 各種リン酸カルシウムの調製とその粉体特性

調製したリン酸カルシウムの結晶相を確認するため、XRD パターンおよび FT-IR スペクトルを測定した (図 2-1, 2-2)。

ACP の XRD パターンでは、ACP に特徴的なブロードなピークを認めた (図 2-1a) 。さらに、FT-IR スペクトルでは、1000 cm<sup>-1</sup> 付近および 550 cm<sup>-1</sup> 付近に、それぞれ ν<sub>3</sub>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>由来、ν<sub>4</sub>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>由来の非晶質のバンド[13]を観測した(図 2-2a)。

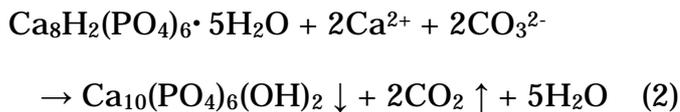
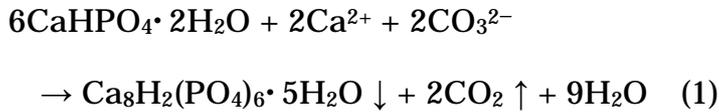
OCP は、既報[10]を参考にして DCPD と CaCO<sub>3</sub> を水中で反応させる方法で調製した。この方法では、結晶性が良く、純度の高い OCP 粉体が再現性良く合成できるためである。本研究では、十分な量の試料を得るために、既報の研究と比較してより大きなスケールで合成した。そのため、攪拌時に原料が十分に分散しない問題が生じた。そこで、攪拌前に 10 分間の超音波処理を行い、攪拌時に十分に分散するように改善した。また、既報[10]では、60 °C の反応において、1 時間で OCP の生成が開始したが、本研究では反応スケールを大きくしたため、反応時間の検討を行った。

合成した OCP の XRD パターン (図 2-1b-d) では、検証した全ての反応時間 (4, 6, 15 時間) において、OCP に特徴的な  $2\theta = 4.9^\circ, 9.6^\circ, 9.9^\circ$  の回折線を確認した。4 時間では、DCPD 特有の  $2\theta = 11.8^\circ$  に回折線を認めたことから、OCP 合成の出発原料として使用した DCPD が残存していたと考えられる (図 2-1b)。6 時間および 15 時間においては、概ね OCP 単一相の XRD パターンを示した (図 2-1c, d)。特に、15 時間では OCP の最強線である  $2\theta = 4.9^\circ$  の回折線の相対強度が最も高かった。図 2-2b-d に示すように、FT-IR スペクトルでは、1125, 1076, 1037, 1025  $\text{cm}^{-1}$  付近に OCP に特有な 4 つの P-O バンドと、560-600  $\text{cm}^{-1}$  付近に結晶性リン酸カルシウムの  $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$  に由来する 2 つのシャープなバンドを認めた [4, 10]。

HAp では、XRD パターンにおいて、 $2\theta = 31.9^\circ, 32.9^\circ, 39.9^\circ$  の代表的な回折線を確認、単一相であることがわかった (図 2-1e)。さらに、図 2-2e に示すように、FT-IR スペクトルでは、 $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$  由来と  $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$  由来のバンドをそれぞれ 1034  $\text{cm}^{-1}$  付近と 962  $\text{cm}^{-1}$  付近に、 $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$  由来のバンドを 604  $\text{cm}^{-1}$  付近と 565  $\text{cm}^{-1}$  付近に認めた [10, 14]。また、 $\text{CO}_3^{2-}$  由来のバンドを 1455  $\text{cm}^{-1}$  付近に認めたことから、今回調製した HAp のリン酸サイトの一部は炭酸イオンに置換したと考えられる [14]。リン酸カルシウム結晶中に存在する水に由来する 3000-3500  $\text{cm}^{-1}$  のブロードなバンドが存在したため、HAp に由来する OH バンドは確認できなかった。

各種リン酸カルシウムの Ca/P モル比、メジアン径、SSA を表 2-1 に示す。ACP と HAp の Ca/P モル比は、それぞれの理論値である 1.50 [3] と 1.67 [14] に近い値であったが、OCP はいずれの反応時間 (4, 6, 15 時間) においても、理論値である 1.33 [10] よりも大きい値であった。これは、OCP の生成過程で、HAp が一部生成したためと考えられる。すなわち、今回の調製法では OCP は以下の

逐次反応により生成すると推定されていることから[10]、反応溶液内の一部の OCP が、HAp に転化したと考えている。



タンパク質がリン酸カルシウムに結合するメカニズムは複雑であり解明されていないが、タンパク質のサイズ、電荷、構造安定性、変性割合や、リン酸カルシウムの形状、組成、疎水性、不均質性、電位など、複数のパラメータが関係している[15]。一般に SSA が大きくなるとタンパク質の吸着量が増加すると言われており、材料の粒径は SSA と関係があることから、プロタミン結合能の代表的な指標として、粒子径と SSA を測定した。また、調製した粉体の粒径には分布があるため、粒径としてメジアン径を使用した。調製した ACP, OCP, HAp のメジアン径は 14-21  $\mu\text{m}$  の範囲であった。ACP, OCP, HAp の SSA は 26-60  $\text{m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  であり、HAp > ACP > OCP の順に SSA が大きかった。SSA 測定の際、一般に 100  $^\circ\text{C}$  以上の温度で脱ガスが行われる。しかし本研究では、調製したリン酸カルシウムの結晶相が 100  $^\circ\text{C}$  以上の温度で変化する可能性を避けるため、70  $^\circ\text{C}$  で脱ガスを実施した。メジアン径が大きいにも関わらず HAp の SSA が最大となった理由は不明であるが、SSA はメジアン径だけでなく、リン酸カルシウムの粗さ、気孔率、細孔径にも関係しているため[15]、これらのパラメータも SSA に寄与したと考えられる。

前述したように、OCP の反応時間 (4, 6, 15 時間) について検討した。XRD パターンにおいて、反応時間 4 時間では原料である DCPD 由来の回折線を認め、 $2\theta = 4.9^\circ$  の回折線の相対強度は反応時間 15 時間で最も高かった。Ca/P モル比、

メジアン径，SSA は反応時間による大きな差は無かったことから、以降の試験では、反応時間 15 時間の試料を用いることとした。

調製したリン酸カルシウムの形態を SEM で観察した（図 2-3）。大きな粒子では、観察視野中で数個の粒子しか見えないため、より多くの粒子を観察するため、メジアン径よりも小さい粒子を含む領域を観察した。また、TEM（明視野画像）および制限視野電子回折（selected area electron diffraction: SAED）の画像を取得した（図 2-4）。ACP については、SEM では粒状の形状を認めた（図 2-3a）。TEM では、直径 50 nm 以下の球状の粒子が凝集した様子を認めた（図 2-4a）。また、SAED は非晶質に特有なハローパターンを示した（図 2-4a'）。いずれも ACP に特徴的な形態であった[16]。ハローパターンの中に、数点スポットを認めた。XRD パターンと FT-IR スペクトルが ACP の特徴を示したこと、電子線照射により OCP から HAp へ転化が生じる[17]ことを考慮すると、このスポットは SAED 取得の際に、電子線照射により ACP の一部が結晶化したことに由来すると考えられる。以上の結果から、本研究で調製した粉体は ACP であると判断している。

OCP については、SEM（図 2-3b）および TEM（図 2-4b1,b2）において、針状と板状の結晶を認めた。SAED（図 2-4b1', b2'）では、針状結晶では OCP の(002), (260)面を観察し、板状結晶では OCP の(002), (201), ( $\bar{1}42$ )面を認めた。図 2-4b1'に示したように、針状結晶は同心円状のリングが認められたことから多結晶であることが分かった。一方、板状結晶は同心円状にスポットが観察された。この結果は多結晶から単結晶に成長している様態を示しており、本研究で確認された板状結晶は「単結晶に近い多結晶体」と考えられる。

HAp については、SEM（図 2-3c）では粒状の形状を認めた。TEM（図 2-4c）では長さ 50-100 nm 程度のフレーク状の粒子を認め、SAED（図 2-4c'）では

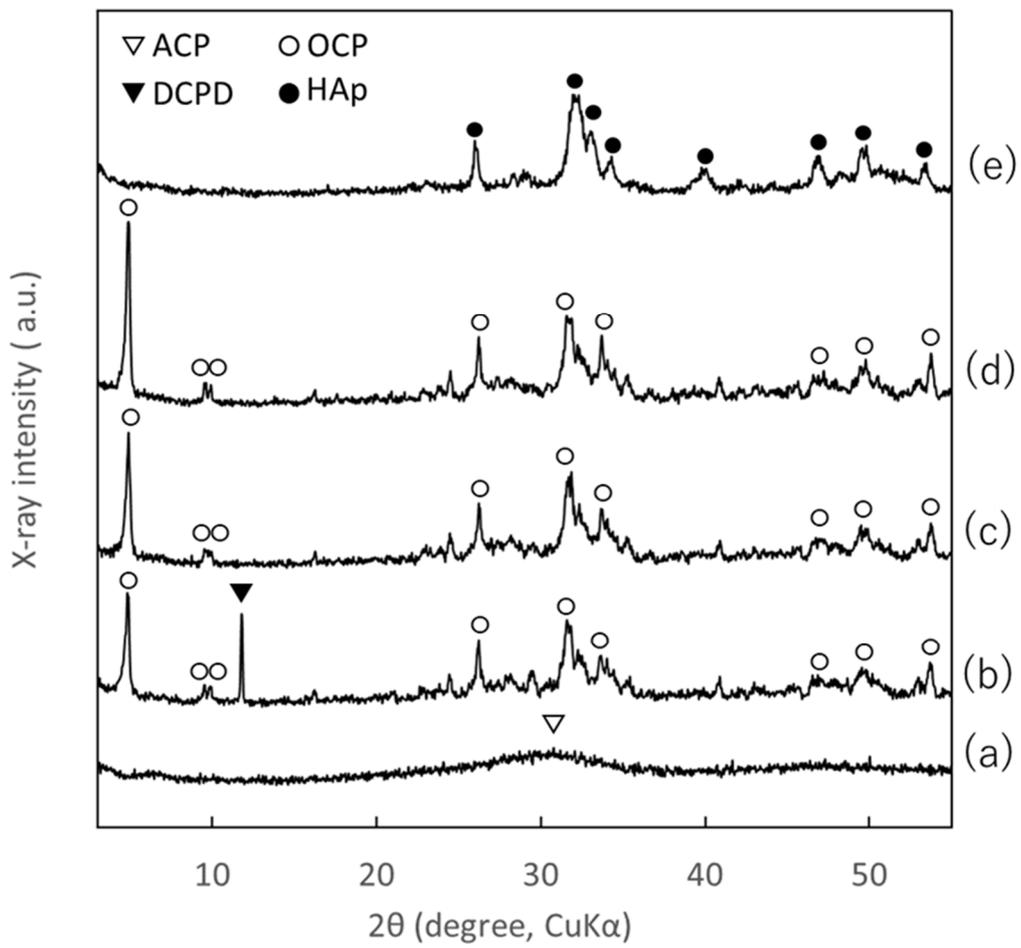


図 2-1 調製した各種リン酸カルシウムの XRD パターン：  
 (a) ACP, (b) OCP-4h, (c) OCP-6h, (d) OCP-15h, and (e) HAp

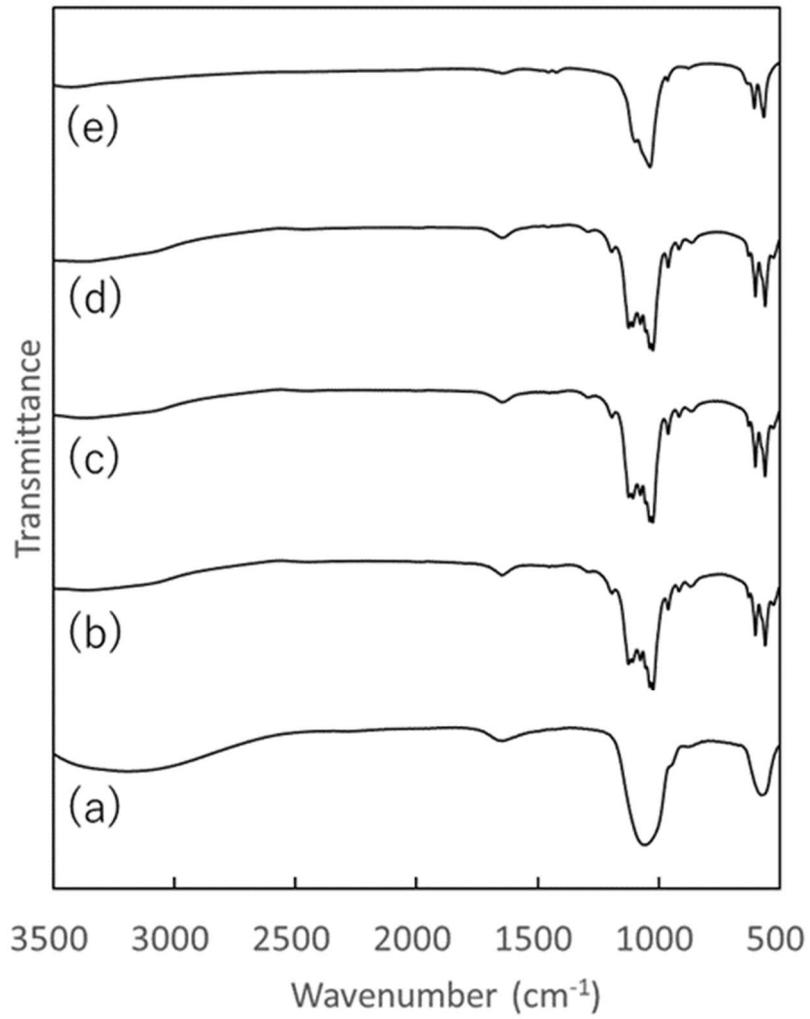


図 2-2 調製した各種リン酸カルシウムの FT-IR スペクトル：  
(a) ACP, (b) OCP-4h, (c) OCP-6h, (d) OCP-15h, and (e) HAp

表 2-1 調製した各種リン酸カルシウムの Ca/P モル比、メジアン径、比表面積

Calcium phosphates	Theoretical Ca/P molar ratio <sup>a</sup>	Analytical Ca/P molar ratio <sup>b</sup>	Median size (μm)	Specific surface area (m <sup>2</sup> ·g <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>
ACP	1.50	1.50 ± 0.01	18	41 ± 6.3
OCP-4 h	1.33	1.42 ± 0.01	16	26 ± 5.4
OCP-6 h	1.33	1.40 ± 0.00	14	29 ± 4.8
OCP-15 h	1.33	1.42 ± 0.01	20	27 ± 5.3
HAp	1.67	1.63 ± 0.01	21	60 ± 7.6

<sup>a</sup>理論値は文献から引用 [3, 10, 14] ; <sup>b</sup> 平均値 ± 標準偏差 ( $n = 3$ )

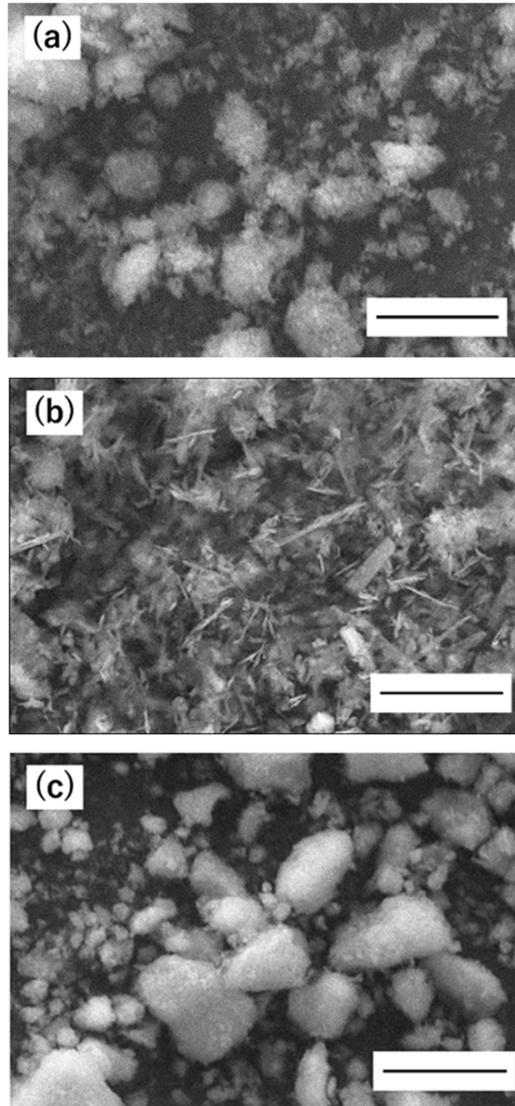


図 2-3 調製した各種リン酸カルシウムの SEM 像：

(a) ACP, (b) OCP, and (c) HAp

( 図中のスケールバーは 10  $\mu\text{m}$  )

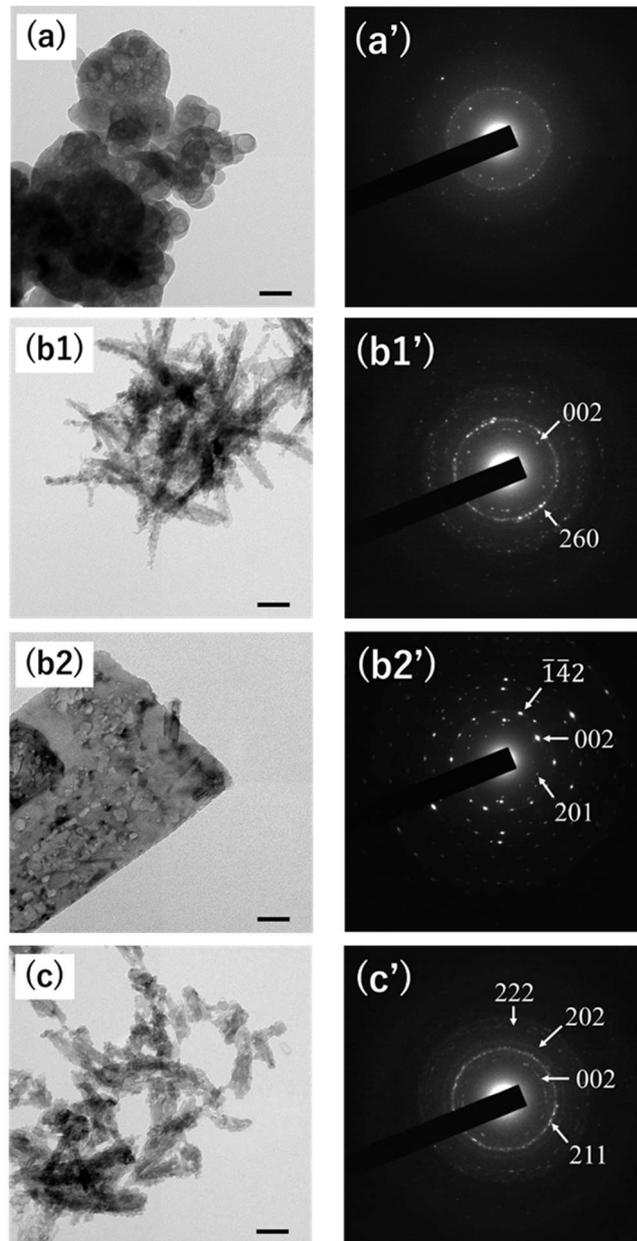


図 2-4 調製した各種リン酸カルシウムの TEM 像(a, b1, b2, c)と SAED パターン (a', b1', b2', c') : (a, a') ACP, (b1, b1') OCP (針状), (b2, b2') OCP (板状), and (c, c') HAp ( 図中のスケールバーは 50 nm )

HApの(002), (202), (211), (222)面を認めた。スポットが同心円状に認められたことから、本研究で調製したHApは多結晶体であると判断できる。

### 2.3.2 各種プロタミン吸着リン酸カルシウムのキャラクタリゼーション

プロタミン吸着リン酸カルシウムの結晶相をXRDおよびFT-IRで確認した(図2-5, 2-6)。

図2-5aに示すように、ACP-ProtamineのXRDパターンでは、HAp(図2-1e)と同様に、 $2\theta = 31.9^\circ, 32.9^\circ, 39.9^\circ$ に回折線を認めた。ただし、HAp(図2-1e)と比較してその回折線がよりブロードなことから、HApよりも結晶性は低いと考えられる。FT-IRスペクトル(図2-6a)では、HApと同様に、 $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$ 由来のバンドを $1034\text{ cm}^{-1}$ 付近に、 $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ 由来のバンドを $962\text{ cm}^{-1}$ 付近に、 $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$ 由来のバンドを $604\text{ cm}^{-1}$ 付近と $565\text{ cm}^{-1}$ 付近に認めた。さらに、 $\text{CO}_3^{2-}$ のバンドを $1455\text{ cm}^{-1}$ 付近に認めた。HApの前駆物質であるACPやOCPは、そのメカニズムはまだ完全には解明されていないが、水溶液中で結晶相が転化すること、結晶相の転化はタンパク質やミネラルなどの共存物質の影響を受けることが報告されている[16, 18, 19]。今回プロタミン吸着反応中に転化が生じたメカニズムは不明であるが、XRDとFT-IRの結果から、ACPはHApに転化したと考えられる。

図2-5bに示すように、OCP-ProtamineのXRDパターンでは、 $2\theta = 4.9^\circ, 9.6^\circ, 9.9^\circ$ にOCPの回折線を認めた。図2-6bに示すFT-IRスペクトルでは、 $1125, 1076, 1037, 1025\text{ cm}^{-1}$ 付近にOCPに特有の4つのP-Oバンド、 $560\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ 付近に2つのシャープなバンドを認めた[4, 10]。したがって、OCPは水中でのプロタミン吸着反応後も、その結晶構造を維持したと考えられる。

図2-5cに示すように、HAp-ProtamineのXRDパターンでは、 $2\theta = 31.9^\circ,$

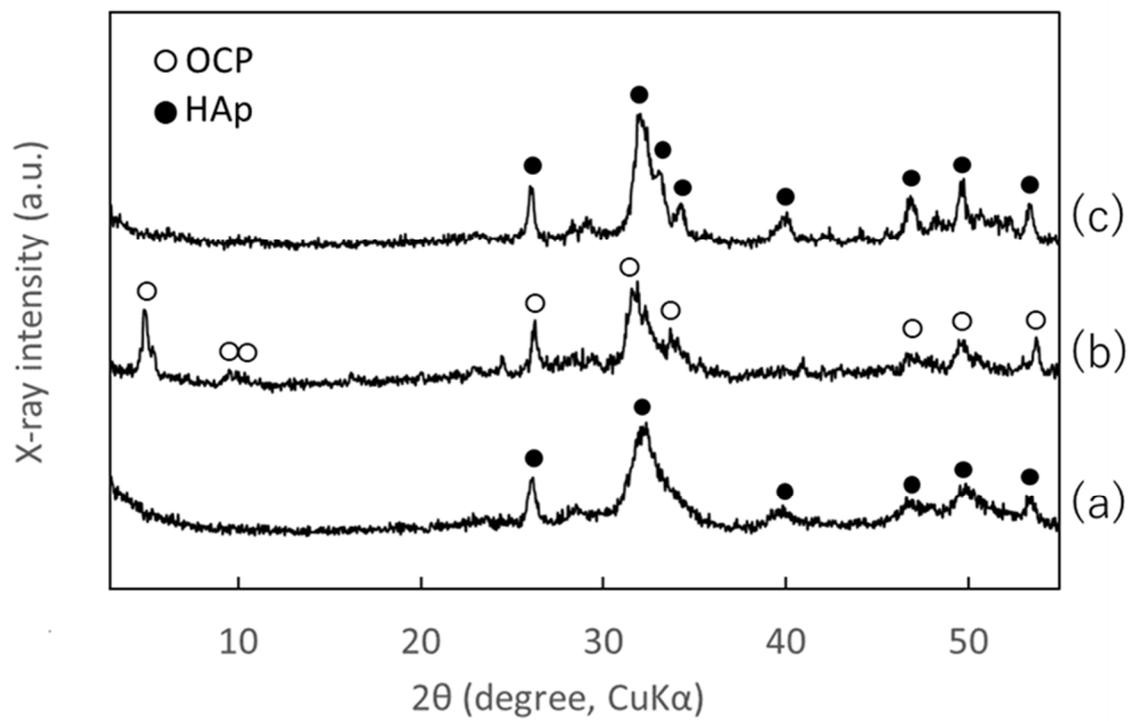


図 2-5 各種プロタミン吸着リン酸カルシウムの XRD パターン：  
 (a) ACP-Protamine, (b) OCP-Protamine, and (c) HAp-Protamine

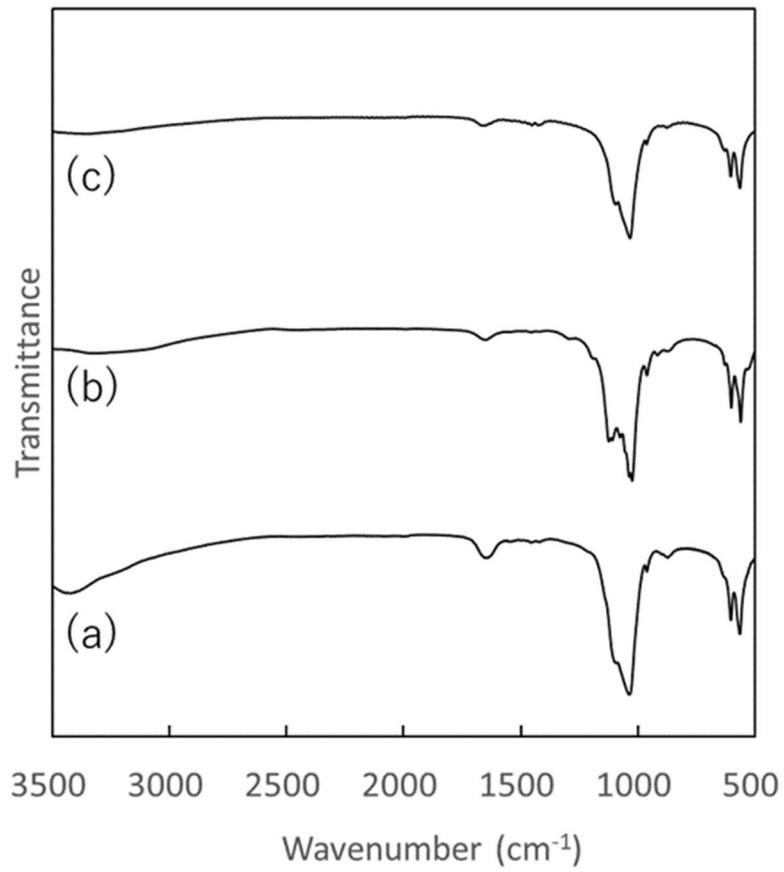


図 2-6 各種プロタミン吸着リン酸カルシウムの FT-IR スペクトル：  
(a) ACP-Protamine, (b) OCP-Protamine, and (c) HAp-Protamine

32.9°, 39.9°に HAp の回折線を認めた。図 2-6c に示す FT-IR スペクトルでは、1034 cm<sup>-1</sup> 付近に  $\nu_3\text{PO}_4^{3-}$  由来、962 cm<sup>-1</sup> 付近に  $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$  由来、604 cm<sup>-1</sup> 付近と 565 cm<sup>-1</sup> 付近に  $\nu_4\text{PO}_4^{3-}$  由来のバンドを認めた[10, 14]。HAp は水中でのプロタミン吸着反応後も、その結晶構造を維持したと考えられる。

リン酸カルシウム粉体に吸着したプロタミン量を表 2-2 に示す。いずれの粉体にも 5.28 mg·g<sup>-1</sup> 以上のプロタミンが吸着しており、ACP を出発原料とした粉体が最もプロタミン吸着量が多かった。ACP を出発原料とした場合には、プロタミン吸着反応中に ACP が HAp に転化した。HAp を出発原料とするよりも、より多くのプロタミンを吸着できることがわかった。OCP を出発原料とした場合には、ACP や HAp を出発原料とした場合よりもプロタミン吸着量は少なかったが、OCP の結晶構造が維持されており、OCP 特有の骨再生能[20]を發揮できる可能性が考えられる。先述したように、リン酸カルシウムへのプロタミンの吸着には複数のパラメータが関与しているが、OCP よりも SSA が大きい ACP や HAp により多くのプロタミンが吸着したことを考慮すると、SSA が重要であった。さらに、各出発原料の特徴がプロタミン吸着にある程度関係していたと考えられる。ACP は非晶質構造で高い溶解度を持ち[3, 21]、OCP は針状および板状結晶で、層間に有機化合物を取り込むことができ[22, 23]、HAp は高い結晶性と安定性を有している[14, 24]。本研究では、自家調製した ACP, OCP, HAp を用いてプロタミンの吸着を確認した。市販の DCPA や HAp へのプロタミン吸着は既に確認していることから[1, 2]、プロタミンは様々な種類のリン酸カルシウムに吸着させることが可能と考えられる。

### 2.3.3 抗菌性試験

*S. aureus* に対する各種リン酸カルシウム粉体の抗菌性試験結果を図 2-7 に示

表 2-2 調製した各種リン酸カルシウムへのプロタミン吸着量

Sample	Charged solution ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ )	Supernatant ( $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ) <sup>a</sup>	Adsorbed protamine ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) <sup>a</sup>
ACP-Protamine	500	Trace	$25.2 \pm 0.15$
OCP-Protamine	500	$382 \pm 4.1$	$5.28 \pm 0.11$
HAp-Protamine	500	$95.2 \pm 6.0$	$19.2 \pm 0.13$

<sup>a</sup> 三回の独立した試験から得た値の平均値  $\pm$  標準偏差 ( $n = 3$ ).

す。リン酸カルシウム原料 (ACP, OCP, HAp) は抗菌性を示さなかったが、プロタミン吸着リン酸カルシウム粉体 (ACP-Protamine, OCP-Protamine, HAp-Protamine) は濃度  $1 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$  と  $2 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$  のいずれの濃度においても抗菌性を示した。なお、図 2-7 の縦軸は常用対数であり、数値が 5 から 4 へ減少すると、菌数が 100,000 個から 10,000 個に減少したことを意味する。したがって、今回調べた結果では、プロタミンを担持したリン酸カルシウムはいずれも十分な抗菌性を発現していると判断できる。

図 2-8 に抗菌性試験における培養上清中のプロタミン濃度を示す。いずれのプロタミン吸着リン酸カルシウムからも培養上清中へのプロタミンのリリースを認めた。ACP-Protamine ( $<9.7 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ) と HAp-Protamine ( $<6.2 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ) の培養上清中のプロタミン濃度は、OCP-Protamine ( $<1.3 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ) よりも高かった。

プロタミン吸着リン酸カルシウムからのプロタミンのリリースは、前述のタンパク質吸着メカニズムと同様に、プロタミンとリン酸カルシウムの複数のパラメータが複雑に関係していることが推測される。プロタミン吸着時に ACP が HAp に転化した ACP-Protamine の結晶化度は HAp-Protamine よりも低かったことから、検討した試料の中で ACP-Protamine のプロタミンリリース量が最も多かった要因の一つとして、結晶化度を考えている。さらに、OCP による層間への有機化合物の取り込みがプロタミンの固定化に寄与したことで、OCP-Protamine は検討した試料の中で最も少ないプロタミンリリース量であったと考えている。

プロタミン吸着リン酸カルシウム粉体の抗菌性は、i) 溶液中にリリースされた液性因子としてのプロタミンの作用と、ii) リン酸カルシウムに吸着したプロタミンと細菌の相互作用の双方に起因していると考えられる。バルク板と粒子

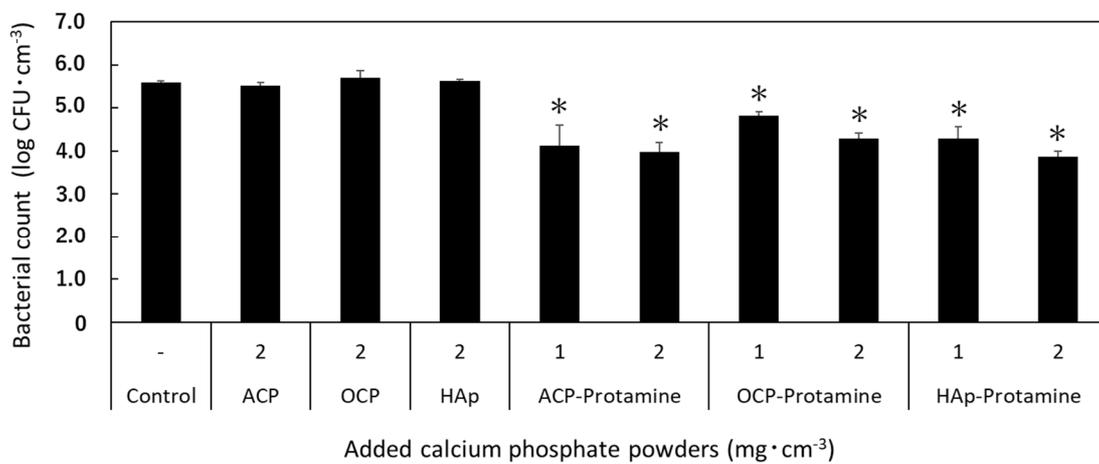


図 2-7 *Staphylococcus aureus* に対する  
各種プロタミン吸着リン酸カルシウムの抗菌性 ( $n = 3$ )

ACP, OCP, HAp は  $2 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$  で試験した。ACP-Protamine, OCP-Protamine, HAp-Protamine は  $1 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$  と  $2 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$  で試験した。

\* $p < 0.05$  : コントロールと比較

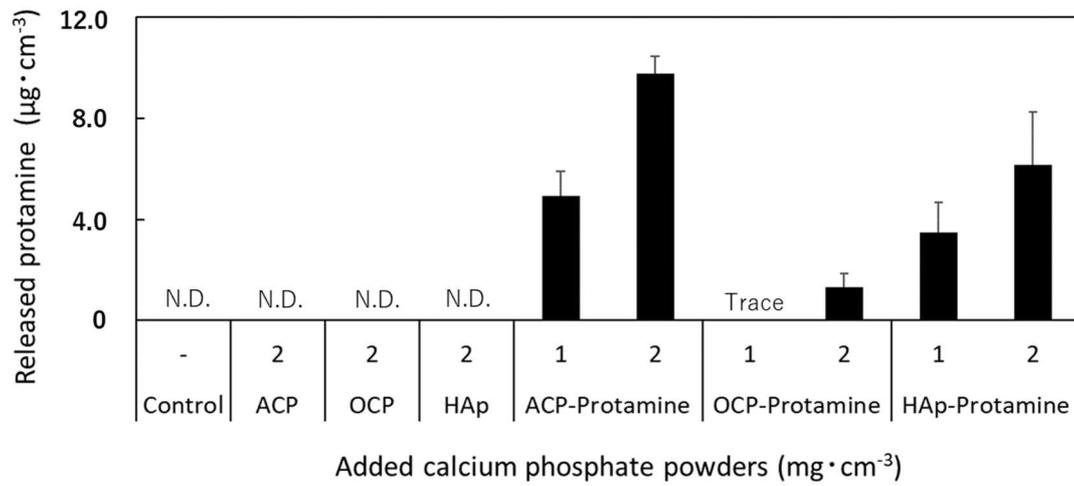


図 2-8 抗菌性試験の培養上清にリリースされたプロタミンの濃度 ( $n = 3$ )

ACP, OCP, HAp は  $2 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$  で試験した。ACP-Protamine, OCP-Protamine, HAp-Protamine は  $1 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$  と  $2 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$  で試験した。

では材料形態が異なるが、本田らは、HAp を担体とした実験系において、抗菌性の発現が主にリリースされたプロタミンに起因することを報告している[2]。今回の実験では、OCP-Protamine はプロタミンのリリース量が ACP-Protamine および HAp-Protamine よりも少なかったにも関わらず、ACP-Protamine および HAp-Protamine と同等の抗菌性を発現している。これらの結果は、OCP-Protamine は「リリースしたプロタミン(ルート(i))」よりも「OCP 粒子上に固定化されたプロタミン(ルート(ii))」により抗菌性が発現したと考えれば説明できる。

OCP は、HAp 層と DCPD 層からなる層間化合物としても知られており、有機化合物をその層間に取り込むことが知られている[22, 23]。図 2-4 に示した TEM の観察結果では、OCP のみ、「多結晶体」と「単結晶に成長しつつある多結晶体」の 2 つの状態が存在していた。この「単結晶に成長しつつある多結晶体」は「多結晶体」よりも層間構造が発達しているため、プロタミンの官能基がインターカレーションにより層間に取り込まれたことで強固に結合した可能性がある。プロタミンは等電点 12-13 のタンパク質で、表面にカルボキシル基などの官能基を含んでいる。図 2-4b2 に示す TEM 像から、今回調製した OCP は高度に発達した結晶面を有していることがわかった。このような発達した結晶面は、タンパク質が吸着しやすい[25]。つまり、OCP では、ACP や HAp とは異なる様態でプロタミンの一部が OCP により強固に固定化された結果、リリースとは異なるルートで抗菌性が発現したものと推察される(図 2-9)。

本研究では、プロタミン吸着リン酸カルシウムの調製に成功し、バイオマテリアルとして評価した。調製した粉体は、そのままでは患部に直接塗布できないため、他の原材料と混合し、圧縮や加熱などの加工を施して成形し、患部に塗布する必要がある。プロタミンは圧縮成形や、医療材料で広く利用されている滅菌方

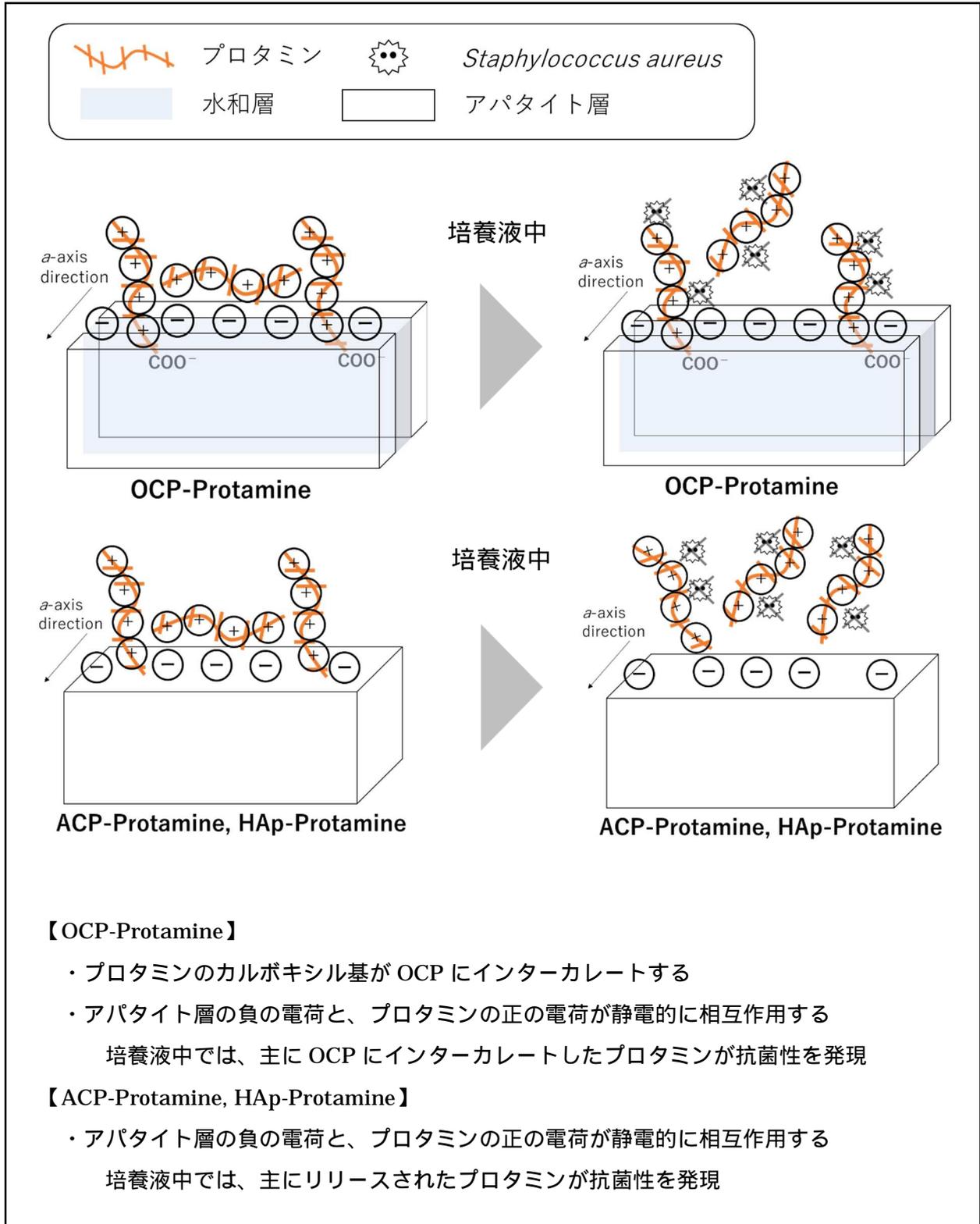


図 2-9 各種プロタミン吸着リン酸カルシウムの結合様式と培養液中でのプロタミンの吸着・リリースに関するモデル図

法である、ガンマ線滅菌やエチレンオキシドガス（EOG）滅菌処理後も抗菌性を維持することから、この粉体を用いて成形したバイオマテリアルも抗菌性を維持することが期待される。臨床応用に必要なプロタミンのリリースや吸着の期間については、生体内での抗菌性に関するデータが十分でないため不明であるが、抗菌性はリリースされたプロタミンと吸着されたプロタミンの双方に起因すると考えられるため、プロタミンが患部に存在する限り、抗菌性は発揮されると考えられる。

以上より、調製した ACP-Protamine および OCP-Protamine は十分な抗菌性を示し、*S. aureus* の菌数は 1/10 以上減少した。今後、更なる検証が必要であるが、DCPA-Protamine や HAp-Protamine が *S. mutans* や *Escherichia coli* に対して抗菌性を示したことを考慮すると[1, 2]、調製した粉体は幅広い細菌に対して抗菌性を発現すると推察できることから、抗菌性バイオマテリアルとして有望である。

## 2.4 まとめ

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、ACP と OCP を出発原料としてプロタミン吸着リン酸カルシウムを調製して、評価した。

ACP を出発原料とした場合には、プロタミン吸着反応中に ACP が HAp に転化したが、HAp を出発原料とした場合よりも、より多くのプロタミンを吸着できることがわかった。OCP を出発原料とした場合には、ACP や HAp を出発原料とした場合よりもプロタミン吸着量は少なかったが、OCP の結晶構造が維持されており、OCP-Protamine は ACP-Protamine や HAp-Protamine と同等の抗菌性を示した。ACP-Protamine と OCP-Protamine は共に抗菌性を示したこ

とから、有望な抗菌性バイオマテリアルである。

## 引用文献

1. Fujiki M, Abe K, Hayakawa T, et al. Antimicrobial activity of protamine-loaded calcium phosphates against oral bacteria. *Materials*. 2019;12(17):2816.
2. Honda M, Matsumoto M, Aizawa M. Potential application of protamine for antimicrobial biomaterials in bone tissue engineering. *Int J Mol Sci*. 2020;21(12):4368.
3. Zhao J, Liu Y, Sun WB, et al. First detection, characterization, and application of amorphous calcium phosphate in dentistry. *J Dent Sci*. 2012;7(4):316–323.
4. Shiwaku Y, Anada T, Yamazaki H, et al. Structural, morphological and surface characteristics of two types of octacalcium phosphate-derived fluoride-containing apatitic calcium phosphates. *Acta Biomater*. 2012;8(12):4417–4425.
5. Cheng L, Weir MD, Hhk X, et al. Effect of amorphous calcium phosphate and silver nanocomposites on dental plaque microcosm biofilms. *J Biomed Mater Res Part B*. 2012;100B(5):1378–1386.
6. Sugiura Y, Obika H, Horie M, et al. Aesthetic silver-doped octacalcium phosphate powders exhibiting both contact antibacterial ability and low cytotoxicity. *ACS Omega*. 2020;5(38):24434–24444.
7. Miller BF, Abrams R, Dorfman A, et al. Antibacterial properties of protamine and histone. *Science*. 1942;96(2497):428–430.
8. Kim YH, Kim SM, Lee SY. Antimicrobial activity of protamine against oral microorganisms. *Biocontrol Sci*. 2015;20:275–280. <https://doi.org/10.4265/bio.20.275>
9. Aizawa M. Processing of biocompatible apatite particles with well-controlled morphology and its application. *Cosmetology*. 2006;14:16–21.
10. Ban S, Hasegawa J, Maruno S. Synthesis of octacalcium phosphate and its transformation to apatite. *Jsdmd*. 1996;15(3):210–217.
11. Yokota T, Nakano K, Nagaya M, et al. In vivo evaluation of porous hydroxyapatite ceramics including bone minerals using pig model. *Mater Technol*. 2018;33(10):689–697.
12. Yokota T, Miki T, Honda M, et al. Fabrication and biological evaluation of hydroxyapatite ceramics including bone minerals. *J Ceram Soc Jpn*. 2018;126(2):99–108.
13. Vecstaudza J, Gasik M, Locs J. Amorphous calcium phosphate materials: formation, structure and thermal behaviour. *J Eur Ceram Soc*. 2019;39 (4):1642–1649.
14. Koutsopoulos S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods. *J Biomed Mater Res*. 2002;62 (4):600–612.
15. Wang K, Zhou C, Hong Y, et al. A review of protein adsorption on bioceramics.

Interface Focus. 2012;2(3):259–277.

16. Pan H, Liu XY, Tang R, et al. Mystery of the transformation from amorphous calcium phosphate to hydroxyapatite. *Chem Commun.* 2010;46(39):7415–7417.
17. Xin R, Leng Y, Wang N. In situ TEM examinations of octacalcium phosphate to hydroxyapatite transformation. *J Cryst Growth.* 2006;289(1):339–344.
18. Kojima Y, Hayashi T, Yasue T, et al. Adsorption of bovine serum albumin on amorphous calcium phosphate in ringer solution. *Phosphorus Res Bull.* 1998;8:59–63.
19. Petrakova NV, Teterina AY, Mikheeva PV, et al. In vitro study of octacalcium phosphate behavior in different model solutions. *ACS Omega.* 2021;6(11):7487–7498.
20. Suzuki O, Shiwaku Y, Hamai R. Octacalcium phosphate bone substitute materials: comparison between properties of biomaterials and other calcium phosphate materials. *Dent Mater J.* 2020;39(2):187–199.
21. Posner AS, Betts F. Synthetic amorphous calcium phosphate and its relation to bone mineral structure. *Acc Chem Res.* 1975;8(8):273–281.
22. Monma H, Nishimura Y, Okura T. Characterization of layer-structured octacalcium phosphate/dicarboxylate composite. *Phosphorus Res Bull.* 2005;18:127–134.
23. Yokoi T, Goto T, Hara M, et al. Incorporation of tetracarboxylate ions into octacalcium phosphate for the development of next-generation biofriendly materials. *Commun Chem.* 2021;4(1):1–9.
24. Jeong J, Kim JH, Shim JH, et al. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. *Biomater Res.* 2019;23(1):1–11.
25. Zhuang Z, Aizawa M. Protein adsorption on single-crystal hydroxyapatite particles with preferred orientation to *a(b)*- and *c*-axes. *J Mater Sci Mater Med.* 2013;24(5):1211–1216.

### 第3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

#### 3.1 はじめに

第2章では、歯科や骨再生領域におけるプロタミンの抗菌性を調べるため、各種リン酸カルシウム（ACP, OCP, HAp）を出発原料としてプロタミン吸着リン酸カルシウムを調製し、バイオマテリアル移植時の細菌感染の原因菌の一種である *S. aureus* に対する抗菌効果を確認した[1, 2]。また、プロタミン吸着リン酸カルシウムの抗菌効果は、i) 溶液中にリリースされた液性因子としてのプロタミンの作用と、ii) リン酸カルシウムに吸着したプロタミンと細菌との相互作用の双方に起因すると考えられるが、プロタミン吸着 OCP は、OCP の層間にプロタミンの一部をインターカレートすることで、主に ii) を作用機序とした抗菌性を発現する可能性が示唆された[2]。

フッ化物イオンは、地殻に13番目に多く含まれる元素であるフッ素のイオンである。体内に含まれるフッ素の約99%は歯や骨に含まれている[3]。フッ化物イオンは、脱灰の抑制、再石灰化促進、アパタイト結晶の形成促進、抗菌効果などを有し、バイオマテリアルに広く利用されている[4, 5]。フッ化物イオンの抗菌メカニズムとしては、細胞内に流入したフッ化物イオンが細胞内の酵素活性や生理学的プロセスに直接または間接的に作用し、代謝を抑制することが報告されている[6]。フッ化物イオンは添加濃度に応じて、HAp や OCP へのタンパク質の吸着量を増加することも報告されている[7, 8]。

本章では、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」および、抗菌性を有する「プロタミン」、さらにアパタイト

結晶の形成促進効果を有する「フッ化物イオン」に着目し、各原料を出発原料として、加水分解反応を利用し、フッ化物イオン含有リン酸カルシウム/プロタミン複合粉体を調製した。また、調製した粉体のキャラクタリゼーション、細胞増殖試験、抗菌性試験を実施した。

## 3.2 実験方法

### 3.2.1 フッ化物イオン含有または不含有リン酸八カルシウムの調製

OCP およびフッ化物イオン含有粉体は既報[9, 10]を参考にして調製した。 $\text{CaCO}_3$  0.0335 mol と  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1 mol とフッ化物イオン（終濃度: 0, 10, 100, 500  $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$  (NaF を使用) ) を、蒸留水 1000  $\text{cm}^3$  中で混合した後 10 分間超音波処理し、その後 60 °C で 15 時間攪拌した。生成したスラリーを吸引ろ過し、蒸留水で 3 回洗浄した。これを凍結乾燥し得られた粉体を瑪瑙乳鉢で粉碎し、OCP 粉体およびフッ化物イオン含有リン酸カルシウム粉体 ( OCPF10, OCPF100, OCPF500; 数字はフッ化物イオンの仕込み液の濃度を示す ) を得た。

### 3.2.2 調製したリン酸カルシウムへのプロタミンとフッ化物イオンの吸着

OCP1.0 g に、500  $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$  のプロタミン溶液( サケ由来プロタミン塩酸塩, マルハニチロ製 ) もしくは、500  $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$  のプロタミンとフッ化物イオン( 終濃度: 10, 100, 500  $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$  (NaF を使用) ) の混合溶液 45  $\text{cm}^3$  を加え、チューブローテータ ( Fisher scientific 製 ) で 48 時間、室温条件下で攪拌し、吸着を行った。次に、8,600 ×  $g$  で 10 分間遠心分離し、沈殿を回収した。沈殿を超純水で 3 回洗浄し、凍結乾燥し、プロタミン吸着リン酸カルシウム粉体 ( OCP-P ) およびフッ化物イオン含有プロタミン/リン酸カルシウム複合粉体 ( OCP-F10P, OCP-F100P, OCP-F500P; 数字はフッ化物イオンの仕込み液の濃度を示す ) を得た。

フッ化物イオン含有リン酸カルシウム粉体( OCPF10, OCPF100, OCPF500 )  
1.0 g に、 $500 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$  のプロタミン溶液  $45 \text{ cm}^3$  を加え、チューブローテータで  
48 時間、室温条件下で攪拌し、吸着を行った。次に、 $8600 \times g$  で 10 分間遠心  
分離し、沈殿を回収した。沈殿を超純水で 3 回洗浄し、凍結乾燥し、フッ化物イ  
オン含有プロタミン/リン酸カルシウム複合粉体 ( OCPF10-P, OCPF100-P,  
OCPF500-P; 数字はフッ化物イオンの仕込み液の濃度を示す ) を得た。

### 3.2.3 調製したリン酸カルシウム複合粉体のキャラクタリゼーション

調製したリン酸カルシウム複合粉体の結晶相は X 線回折装置( XRD, MiniFlex,  
リガク製 ) を用いて、30 kV, 15 mA で Cu-K $\alpha$  線を照射して同定した。さらに、  
KBr 法を用いたフーリエ変換赤外分光法 ( FT-IR, NICOLET iS10, サーモフィ  
ッシャー製 ) により、調製したリン酸カルシウム混合粉体の官能基を明らかにし  
た。カルシウム : リンのモル比 ( Ca/P モル比 ) は誘導結合プラズマ ( ICP, ICPE-  
9000, 島津製作所製 ) で決定した。メジアン径はレーザー式粒度分布測定機( LA-  
960, 堀場製作所製 ) を用いて確認した。フッ素含量はキャピラリー電気泳動( PA  
800 Plus, Beckman Coulter 製 ) を用いて定量した。

リン酸カルシウム複合粉体に吸着したプロタミン量は以下の手順で定量した。  
各種プロタミン吸着リン酸カルシウム粉体 100 mg と  $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  HCl  $0.45 \text{ cm}^3$   
を 1 時間攪拌した。遠心分離 (  $13,000 \times g$ , 1 分間 ) を行い、上清を回収した。  
上清中のプロタミン含有量を高速液体クロマトグラフィー ( HPLC, Alliance 日  
本ウォーターズ製 ) で定量した。

粒子形態は、走査型電子顕微鏡 ( SEM , JSM-6390LA, 日本電子製 ) ( 加速電  
圧 15 kV ) で観察した。リン酸カルシウム複合粉体をカーボンテープでステー  
ジに固定し、白金蒸着した。複合粉体表面のフッ素の局在と元素組成をエネルギー

分散型 X 線分光法 (EDX, EX-54175JMU, 日本電子製) で確認した。

#### 3.2.4 細胞増殖試験

細胞増殖試験は既報[10]を参考にして実施した。各種リン酸カルシウム複合粉体を超純水に溶解し、1 ウェルあたり 1 mg の複合粉体が含まれるように、スラリーを細胞培養プレート (353072, CORNING 製) に添加した後、60 °C で一晩乾燥した。プレートを滅菌バッグ (HM-3004, ホギメディカル製) に入れ、エチレンオキサイドガスで滅菌した。MG-63 細胞 (IFO50108, 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所より分譲) を  $1 \times 10^4$  cells·well<sup>-1</sup> となるようにプレートに播種し (E-MEM(富士フィルム和光純薬製), MEM Non-essential Amino Acid Solution (Sigma-Aldrich 製), 10% fetal bovine serum (FBS, ニチレイバイオサイエンス製), penicillin-streptomycin solution (富士フィルム和光純薬製))、CO<sub>2</sub> インキュベータ (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) で 2 日間培養した。細胞播種 1、2 日後に WST-8 アッセイ (同仁化学研究所製) により、細胞増殖を評価した。

#### 3.2.5 抗菌性試験

各種リン酸カルシウム複合粉体を滅菌バッグ (HM-3002, ホギメディカル製) に入れ、エチレンオキサイドガスで滅菌した。リン酸緩衝液 (PBS; 9 cm<sup>3</sup>, 9.57 mmol·dm<sup>-3</sup>, タカラバイオ製) 滅菌水に懸濁した各種リン酸カルシウム粉体のスラリー (100 mm<sup>3</sup>; 終濃度: 1 mg·cm<sup>-3</sup>)、PBS に懸濁した *S. aureus* FDA209 (1 cm<sup>3</sup>; 終濃度: 10<sup>5</sup> CFU·cm<sup>-3</sup>) を試験管に添加した。各試験管を 180 rpm で振盪しながら 30 °C で 6 時間培養した。培養液を生菌数測定プレート (Rapid Aerobic Count Plates, 3M 製) に播種した後、35 °C で 24 時間培養し、コロニ

ーカウントを行った。また、培養液を孔径 0.22  $\mu\text{m}$  のフィルターでろ過し、培養上清中のプロタミン含有量をブラッドフォード法（富士フィルム和光純薬製）により定量した。

### 3.2.6 統計解析

データは一元配置分散分析後、Tukey post-hoc test で統計解析した。結果は「平均値  $\pm$  標準偏差」で示した。

## 3.3 結果と考察

### 3.3.1 調製したリン酸カルシウム複合粉体のキャラクタリゼーション

OCP, OCP-P および、吸着法によりフッ化物イオンを添加したフッ化物イオン含有プロタミン/リン酸カルシウム複合粉体（OCP-F10P, OCP-F100P, OCP-F500P）の XRD パターンを図 3-1 に、FT-IR スペクトルを図 3-2 に示す。

XRD パターン（図 3-1）において、OCP, OCP-P, OCP-F10P, OCP-F100P では、OCP 特有の  $2\theta = 4.9^\circ, 9.6^\circ, 9.9^\circ$  の回折線を認めた。一方、OCP-F500P では、フッ素アパタイト（fluorapatite, FAp）特有の  $2\theta = 31.9^\circ, 32.9^\circ, 39.9^\circ$  の回折線を認めた。FT-IR スペクトル（図 3-2）において、OCP, OCP-P, OCP-F10P, OCP-F100P では、1125, 1076, 1037, 1025  $\text{cm}^{-1}$  付近に OCP に特有な 4 つの P-O バンドと、560-600  $\text{cm}^{-1}$  に結晶性リン酸カルシウムの  $\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$  由来の 2 つのシャープなバンドを認めた。一方、OCP-F500P では FAp に特有なバンド（1034  $\text{cm}^{-1}$  付近に  $\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$  由来のバンド、962  $\text{cm}^{-1}$  付近に  $\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$  由来のバンド、604  $\text{cm}^{-1}$  付近と 565  $\text{cm}^{-1}$  付近に  $\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$  由来のバンド）を認めた。

XRD パターンおよび FT-IR スペクトルから、OCP-P, OCP-F10P, OCP-F100P はフッ化物イオンおよびプロタミン吸着後も OCP の結晶相を維持して

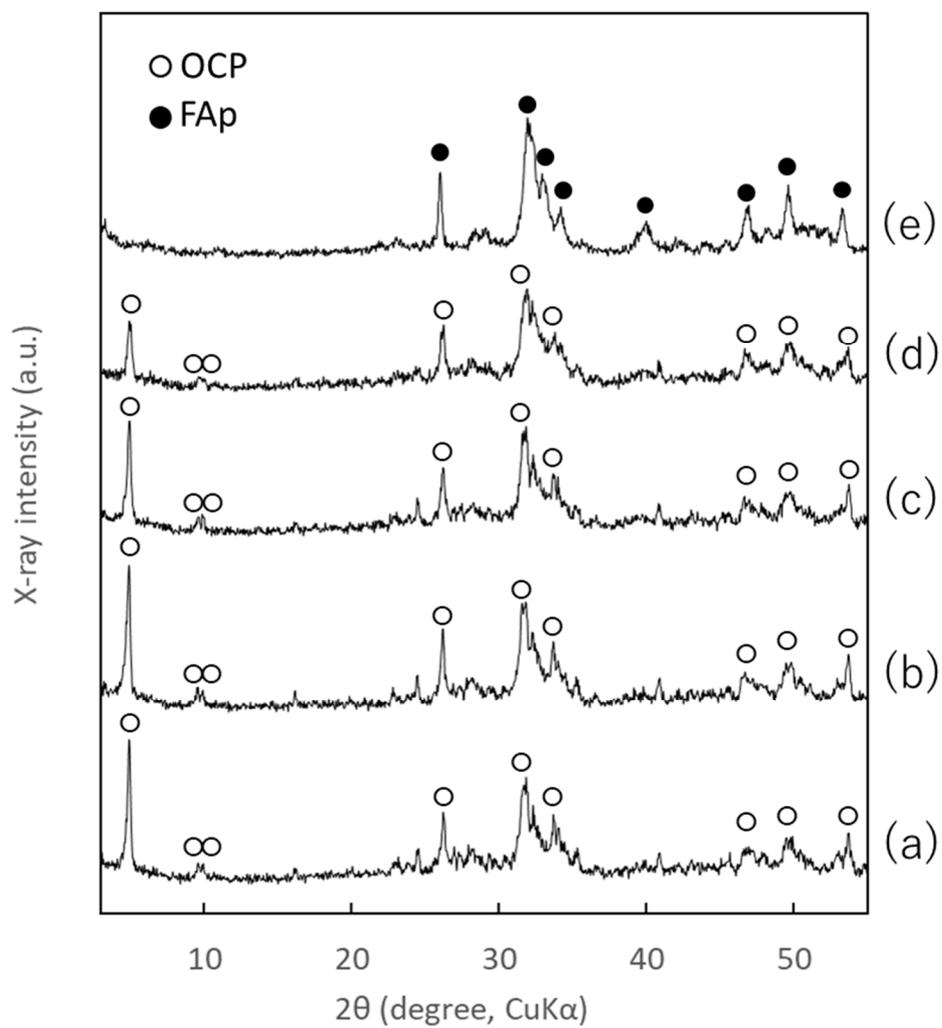


図 3-1 フッ化物イオンを含まないもしくは、吸着法によりフッ化物イオンを

添加した各種リン酸カルシウムの XRD パターン：

(a) OCP, (b) OCP-P, (c) OCP-F10P, (d) OCP-F100P, and (e) OCP-F500P

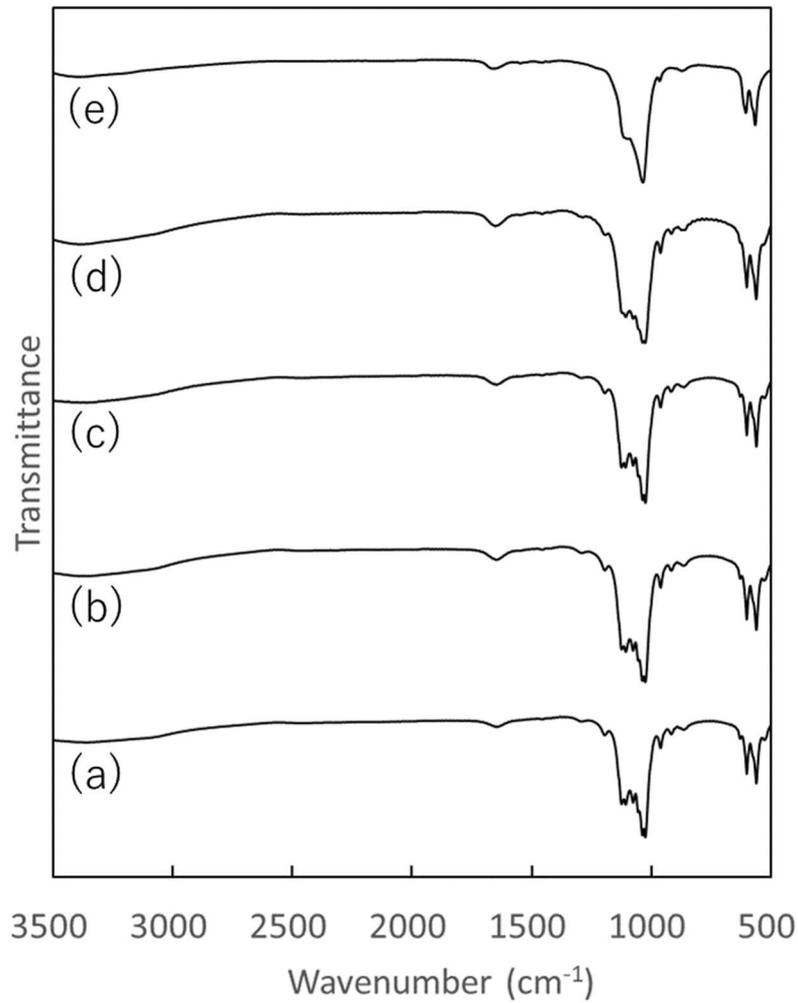


図 3-2 フッ化物イオンを含まないもしくは、吸着法によりフッ化物イオンを

添加した各種リン酸カルシウムの FT-IR スペクトル：

(a) OCP, (b) OCP-P, (c) OCP-F10P, (d) OCP-F100P, and (e) OCP-F500P

いたが、OCP-F500P では OCP が FAp に転化したと考えられる。

沈殿法によりフッ化物イオンを添加した OCPF10, OCPF100, OCPF500 および、それらに吸着法でプロタミンを添加した OCPF10-P, OCPF100-P, OCPF500-P の XRD パターンを図 3-3 に、FT-IR スペクトルを図 3-4 に示す。XRD パターン(図 3-3)において、OCPF10, OCPF10-P では、OCP 特有の  $2\theta = 4.9^\circ, 9.6^\circ, 9.9^\circ$  の回折線を認めたと、OCPF100, OCPF100-P では OCP 特有の  $2\theta = 4.9^\circ$  の回折線のみ認めた。一方、OCPF500, OCPF500-P では、FAp 特有の  $2\theta = 31.9^\circ, 33.1^\circ, 40.0^\circ$  の回折線を認めた。

FT-IR スペクトル(図 3-4)において、OCPF10, OCPF10-P では、1125, 1076, 1037, 1025  $\text{cm}^{-1}$  付近に OCP に特有な 4 つの P-O バンドと、560-600  $\text{cm}^{-1}$  付近に結晶性リン酸カルシウムの  $\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$  由来の 2 つのシャープなバンドを認めた。一方、OCPF100, OCPF100-P, OCPF500, OCPF500-P では FAp 特有のバンド(1034  $\text{cm}^{-1}$  付近に  $\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$  由来のバンド、962  $\text{cm}^{-1}$  付近に  $\nu_1 \text{PO}_4^{3-}$  由来のバンド、604  $\text{cm}^{-1}$  付近と 565  $\text{cm}^{-1}$  付近に  $\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$  由来のバンド)を認めた。

XRD パターンおよび FT-IR スペクトルから、沈殿法でフッ化物イオンを添加した OCPF10, OCPF100 は OCP にフッ化物イオンが取り込まれているが、OCPF500 では FAp にフッ化物イオンが取り込まれたと考えられる。また、いずれの検体もプロタミン吸着前後では XRD パターンおよび FT-IR スペクトルに大きな変化が無かったことから、プロタミン吸着工程において結晶相に大きな変化は無かったと考えられる。

今回 OCP にフッ化物イオンを添加させる方法として、OCP 粉体にフッ化物イオン溶液を加え吸着させる方法(吸着法)と、フッ化物イオン存在下で OCP を調製する方法(沈殿法)の 2 種類の方法を検討した。また、フッ化物イオンの仕込み濃度について 3 濃度(10, 100, 500  $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ )の検討を行った。フッ化物

イオンは OCP からアパタイト結晶への転化を促進することが報告されているが[4]、今回検討したいずれの方法でも、仕込み時のフッ化物イオン濃度が 10、100  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  では  $2\theta = 4.9^\circ$  の回折線を認め、OCP の結晶相が維持されていたが、仕込み濃度 500  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  では  $2\theta = 4.9^\circ$  の回折線が認められず、OCP が FAp に転化した。今回の試験条件においては、フッ化物イオンによる OCP から FAp への転化には、添加方法よりもフッ化物イオン濃度の寄与が大きかったと考えられる。OCP の調製方法は異なるものの、沈殿法による OCP へのフッ化物イオンの添加を行った Shiwaku らの研究[10]でも、同様の結果が得られている。

各種リン酸カルシウム粉体の Ca/P モル比、メジアン径、フッ素含量、プロタミン含量を表 3-1 に示す。Ca/P モル比については、OCP は理論値である 1.33[9] よりも大きい値であったが、これは既報[9]と同様に OCP の生成過程で、HAp が一部生成したためと考えられる。OCP にフッ化物イオンを添加した粉体では、吸着法 (OCP-F10P, OCP-F100P, OCP-F500P) および、沈殿法 (OCPF10-P, OCPF100-P, OCPF500-P) いずれの方法でも、フッ化物イオンの仕込み濃度増加に伴い、Ca/P モル比が増加した。これはフッ化物イオンの仕込み濃度増加に伴い、OCP (Ca/P モル比理論値, 1.33) から FAp (Ca/P モル比理論値, 1.67) への転化が促進されたためと考えられる。XRD パターンと FT-IR スペクトルにおいても、フッ化物イオンの仕込み濃度増加に伴い、OCP から FAp への転化が促進されることを確認しており(図 3-1-4)、本結果は XRD パターンと FT-IR スペクトルの結果を支持するものであった。

メジアン径はいずれのリン酸カルシウム粉体も 10.6 から 19.7  $\mu\text{m}$  の範囲であり大差はなかったが、OCPF500-P が最も小さかった。

フッ素含量については、OCP-F100P, OCP-F500P, OCPF100-P, OCPF500-P は、0.64-3.78 mass%のフッ素を含有していた。

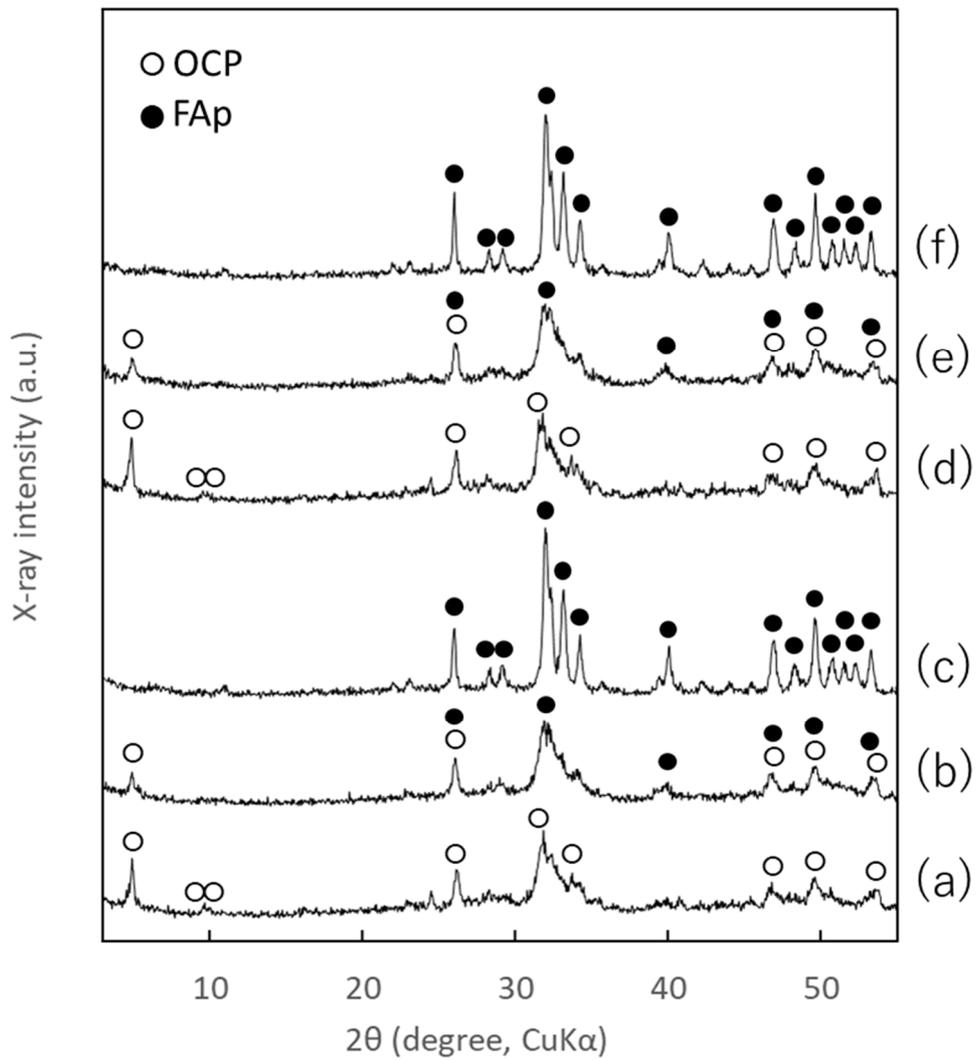


図 3-3 沈殿法によりフッ化物イオンを添加した各種リン酸カルシウムの XRD パターン : (a) OCPF10, (b) OCPF100, (c) OCPF500, (d) OCPF10-P, (e) OCPF100-P, and (f) OCPF500-P

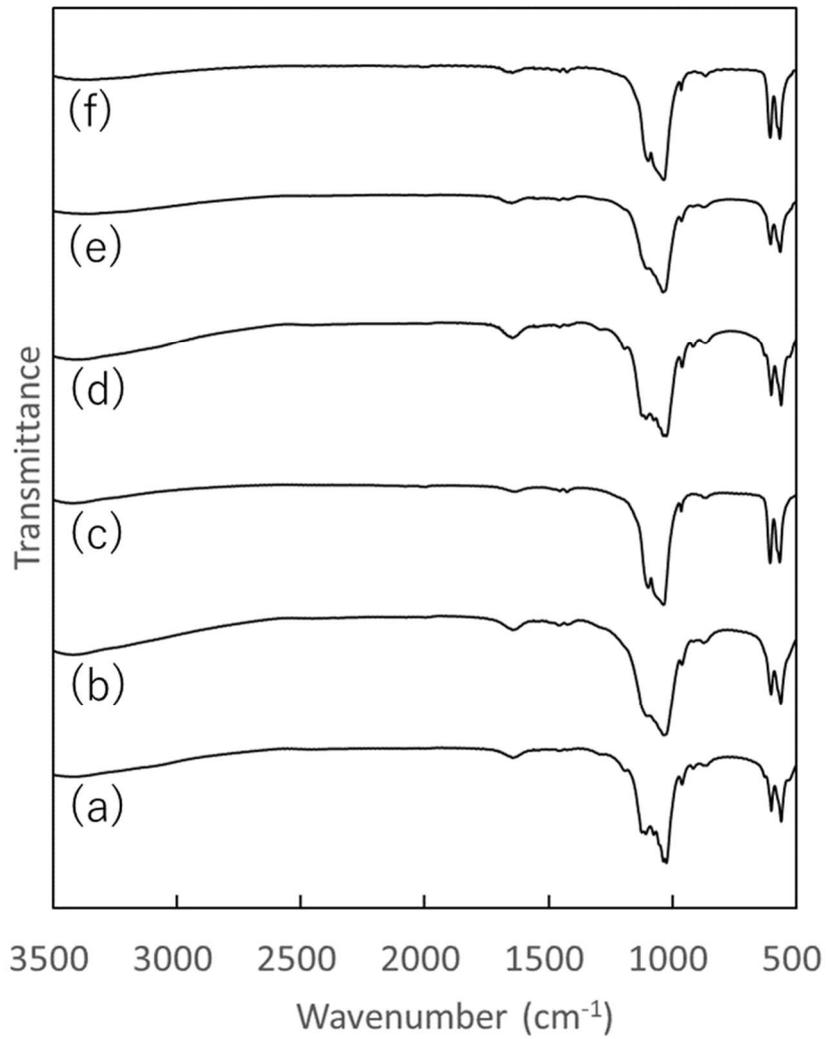


図 3-4 沈殿法によりフッ化物イオンを添加した各種リン酸カルシウムの FT-IR スペクトル : (a) OCPF10, (b) OCPF100, (c) OCPF500, (d) OCPF10-P, (e) OCPF100-P, and (f) OCPF500-P

プロタミン含量については、吸着法でフッ化物イオンを添加した OCP-F10P, OCP-F100P, OCP-F500P では、7.41-24.2 mg·g<sup>-1</sup>であったが、仕込み液中のフッ化物イオン濃度が高い粉体ほどより多くのプロタミンを含有していた。一方、沈殿法でフッ化物イオンを添加した OCPF10-P, OCPF100-P, OCPF500-P では、7.23-8.22 mg·g<sup>-1</sup> のプロタミン含量であり、フッ化物イオン含量とプロタミン含量との相関は認めなかった。

Qiao らは、ウシ由来の骨を用いた試験において、フッ化物イオンが骨へのタンパク質吸着量を増加させることを報告している[7]。また、Shiwaku らは、OCP へのシトクロム C タンパク質の吸着量の評価を行い、吸着法でフッ化物イオンを添加した場合はフッ化物イオン濃度に応じて吸着量が増加するが、沈殿法でフッ化物イオンを添加した場合はフッ化物イオン濃度とは関係なく一定量の吸着であったことを報告している[8]。沈殿法でフッ化物イオンを添加するよりも吸着法で添加する方がタンパク質の吸着量が増加する原因は明らかになっていないが、今回の研究においては、フッ化物イオンの局在が吸着法と沈殿法では異なったためだと考えられる。すなわち、吸着法で添加したフッ化物イオンは主にリン酸カルシウムの表面に局在している一方で、沈殿法で添加したフッ化物イオンはリン酸カルシウム結晶の内部にも局在しており、フッ化物イオン、プロタミン、リン酸カルシウムの三者の結合様式が異なることで、プロタミン吸着量に差が生じたと考えられる。

調製したリン酸カルシウム粉体の SEM 像を図 3-5 に示す。OCP, OCP-P ともに板状結晶と針状結晶が観察された(図 3-5a, b)。吸着法でフッ化物イオンを添加したリン酸カルシウム粉体の SEM 像(図 3-5c-e)では、フッ化物イオン濃度の増加とともに粒子が微細化し、凝集の度合いが大きくなっていった。また、OCP-F500P では(図 3-5e)、OCP で観察された板状結晶はほとんど観察されな

表 3-1 調製した各種リン酸カルシウムの Ca/P モル比、メジアン径、  
フッ素含量、プロタミン含量

Calcium phosphates	Ca/P molar ratio <sup>a</sup>	Median size (μm)	F content (mass%) <sup>a</sup>	Protamine content (mg·g <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>
OCP	1.42 ± 0.01	16.1	N.D. <sup>b</sup>	N.D. <sup>b</sup>
OCP-P	1.42 ± 0.01	17.3	N.D. <sup>b</sup>	5.77 ± 0.05
OCP-F10P	1.42 ± 0.01	14.9	N.D. <sup>b</sup>	7.41 ± 0.08
OCP-F100P	1.46 ± 0.01	18.1	0.65 ± 0.02	14.8 ± 0.14
OCP-F500P	1.58 ± 0.01	16.5	3.22 ± 0.15	24.2 ± 0.09
OCPF10-P	1.45 ± 0.00	19.7	N.D. <sup>b</sup>	7.26 ± 0.01
OCPF100-P	1.50 ± 0.01	17.6	0.64 ± 0.04	7.23 ± 0.01
OCPF500-P	1.63 ± 0.01	10.6	3.78 ± 0.17	8.22 ± 0.12

<sup>a</sup> 平均値 ± 標準偏差 ( $n = 3$ ) ; <sup>b</sup> Not detected

かった。沈殿法でフッ化物イオンを添加したリン酸カルシウム粉体の SEM 像 (図 3-5f-h) では、OCPF10-P と OCPF100-P はフッ化物イオン濃度が高くなるほど粒子が細かくなったが、OCPF500-P では細かい粒子はほとんど観察されなかった。OCPF100-P と OCPF500-P の SEM 像 (図 3-5g, h) では、大きな凝集体の表面に析出物のような物が観察された。OCP と比較すると、OCPF500-P が最も大きな形態変化を示した。これは、XRD パターンと FT-IR スペクトルから確認されたように、最も高い結晶化度に起因するものである。

図 3-6 に OCP-F500P (図 3-6a, b) と OCPF500-P (図 3-6c, d) のフッ素のマッピング像とそれに対応する EDX スペクトルを示す。両粉体は、吸着法および沈殿法でフッ化物イオンを添加した物の中で、それぞれ最もフッ素含量が多かったため、比較のために選んだ。マッピング像 (図 3-6a, c) から、いずれのリン酸カルシウム粉体も、フッ素が粒子表面に均質に分布していることがわかる。EDX スペクトル (図 3-6b, d)からは、両粉体とも C, O, F, S, P, Ca の元素組成を有することがわかる。検出された C ピークは、カーボンテープとプロタミンに由来するものと考えられる。検出された Na ピークは、フッ化物イオンの供給源として使用された NaF に由来するものと考えられる。P ピークは、調製した粉末に含まれる P 元素と、白金蒸着に使用した Pt 元素の可能性もあることから、P (Pt) と表記した。

### 3.3.2 細胞増殖試験

図 3-7 に細胞増殖試験結果を示す。プレートにリン酸カルシウムをコーティングしていないコントロールと比較して、今回調製した粉体は細胞の播種 1 日後、2 日後において、同等の生育を示しており、MG-63 細胞の増殖阻害は認めなかった。また、OCP と比較するとプロタミンやフッ化物イオンを添加したり

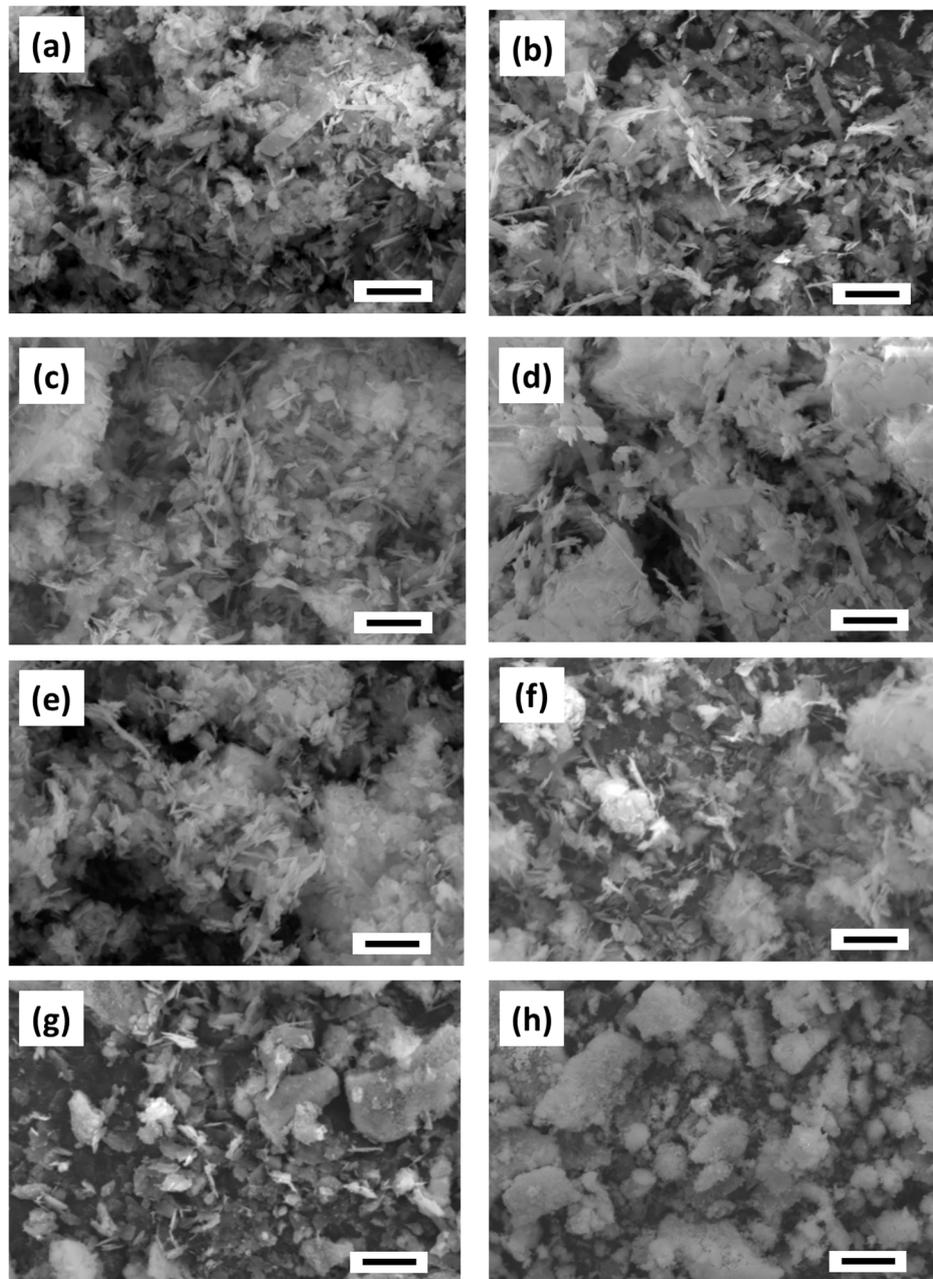


図 3-5 調製した各種リン酸カルシウムの SEM 像 : (a) OCP, (b) OCP-P, (c) OCP-F10P, (d) OCP-F100P, (e) OCP-F500P, (f) OCPF10-P, (g) OCPF100-P, and (h) OCPF500-P ( 図中のスケールバーは 5  $\mu\text{m}$  )

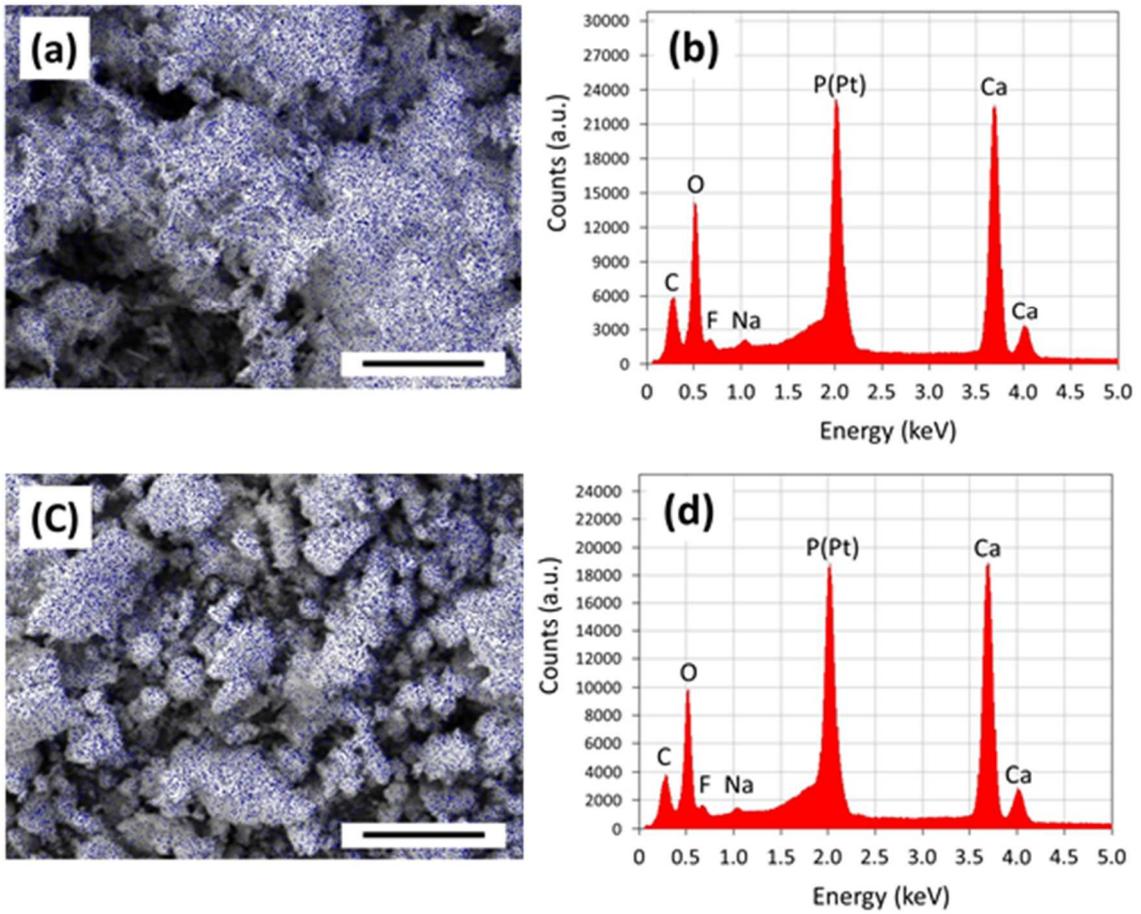


図 3-6 調製した各種リン酸カルシウム複合粉体のフッ素のマッピング像と EDX スペクトル : (a, b) OCP-F500P, and (c, d) OCPF500-P  
( 図中のスケールバーは 10  $\mu\text{m}$  )

ン酸カルシウム複合粉体は細胞増殖が有意に少なかったものの、コントロールとは同等の細胞増殖を示していたことから、リン酸カルシウムに抗菌性を付与するメリットの方が大きいと判断している。

### 3.3.3 抗菌性試験

抗菌性試験結果を図 3-8 に示す。図 3-8 の縦軸は常用対数であり、値が 5 から 4 に減少すると、100,000 個の細菌が 10,000 個に減少したことを意味する。OCP ではコントロールと比較して菌数の減少を認めなかったが、プロタミンやフッ化物イオンを含有した粉体では菌数の減少を認めた。特に、OCPF500-P で最も強い抗菌性を認めた。また、プロタミンのみを含有する OCP-P と比較して、プロタミンとフッ化物イオンの両者を含有するリン酸カルシウム複合粉体では菌数がより多く減少していた。フッ化物イオンの抗菌性[3, 6]を考慮すると、リン酸カルシウムへのフッ化物イオンの添加は、結晶性を高めるだけでなく、抗菌性も高めたと考えられる。

培養上清中のプロタミン濃度を図 3-9 に示す。プロタミンを含むリン酸カルシウムの培養上清中のプロタミン濃度は、1.1 から 18.4  $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$  の範囲であった。粉体中により多くのプロタミンを含有する OCP-F100P, OCP-F500P は、他のリン酸カルシウム粉体よりも、より多くのプロタミンをリリースしていた。興味深いことに、OCP-P, OCP-F10P, OCPF10-P, OCPF100-P と比較してより多くのプロタミンを含有する OCPF500-P は、プロタミンリリース量が最も少なかった。

リン酸カルシウム混合粉体の抗菌効果は、i) 溶液中にリリースされたプロタミンとフッ化物イオンの液性因子としての作用と、ii) リン酸カルシウムに吸着したプロタミンとフッ化物イオンの細菌との相互作用の双方に起因すると考えら

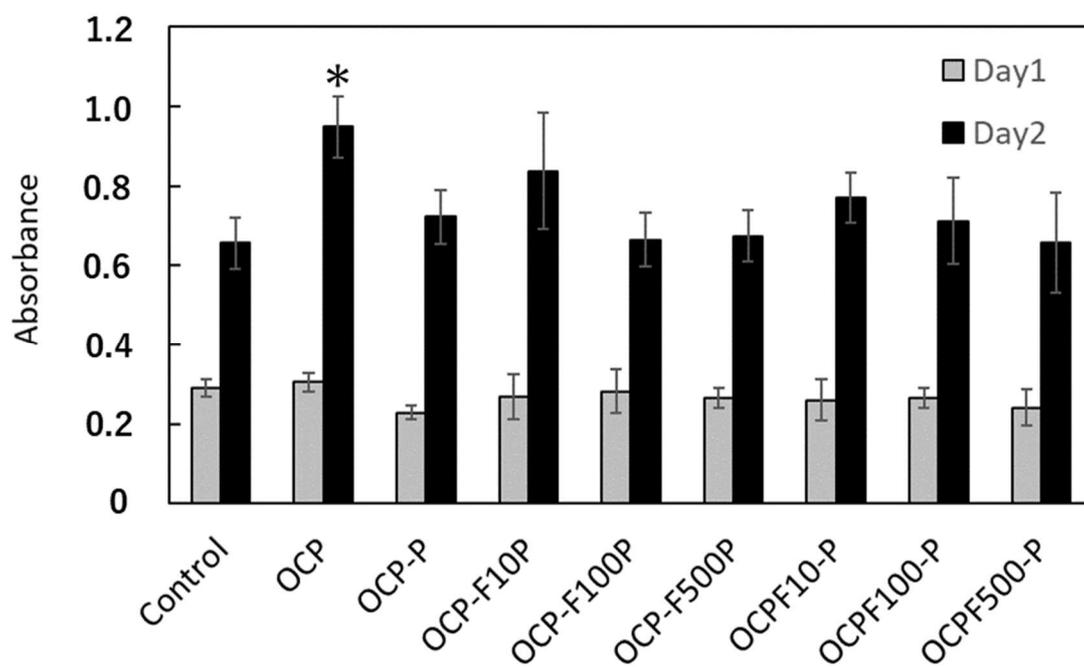


図 3-7 調製した各種リン酸カルシウムを用いた細胞増殖試験 ( $n = 4$ )

\* $p < 0.05$  : コントロールと比較

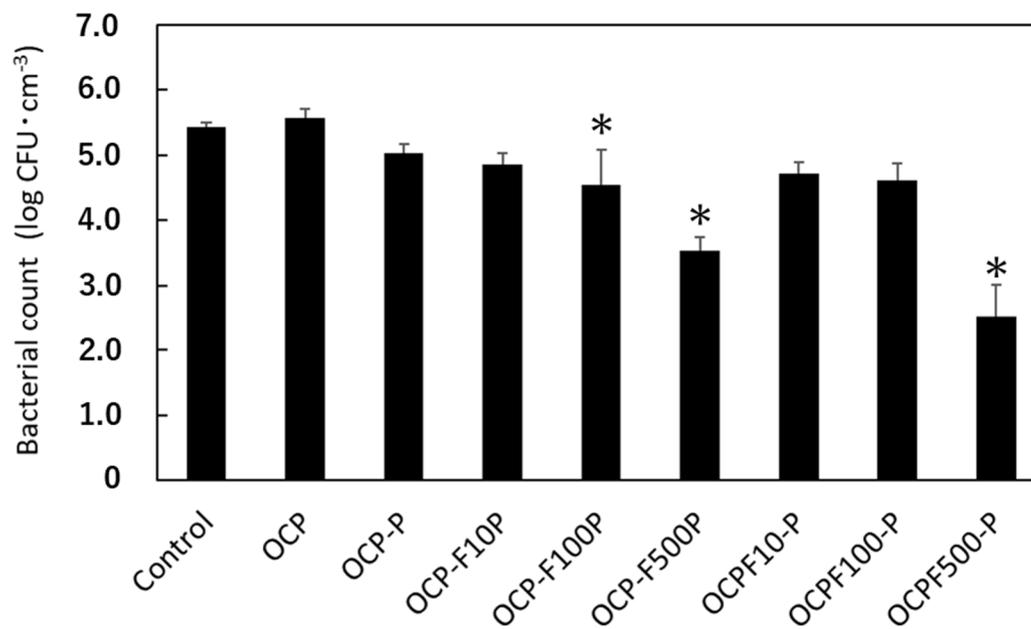


図 3-8 *Staphylococcus aureus* に対する  
調製した各種リン酸カルシウムの抗菌性 ( $n = 3$ )

\* $p < 0.05$  : コントロールと比較

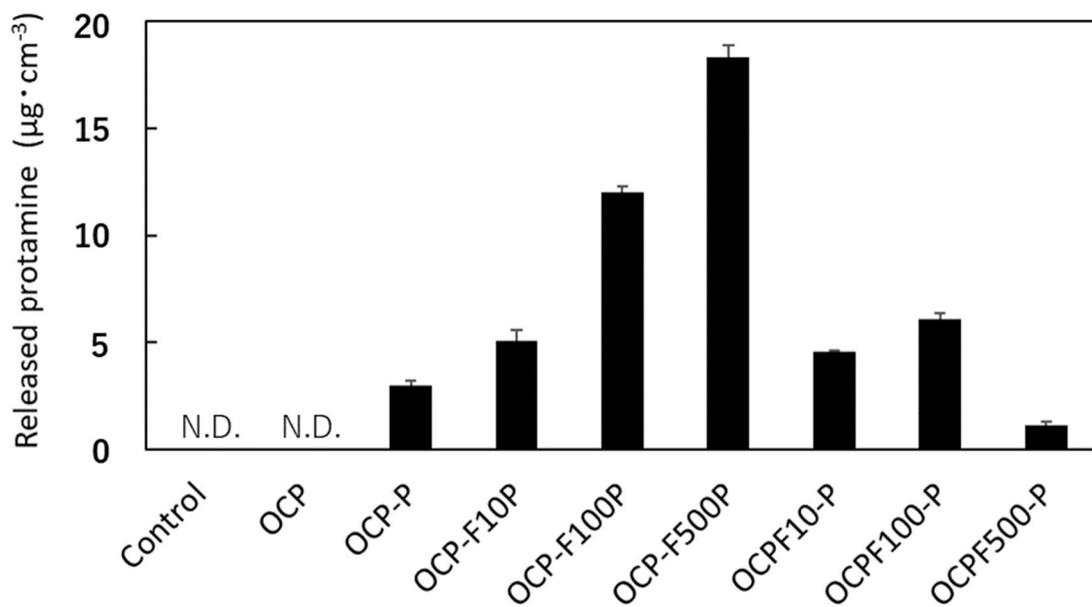


図 3-9 抗菌性試験の培養上清にリリースされたプロタミンの濃度 ( $n = 3$ )

れる。OCPF500-P が最も高い抗菌性を示した理由は明らかになっていないが、フッ化物イオンがリン酸カルシウムの結晶性を変えたことで、プロタミンやフッ化物イオンの結合様式や吸着リリース特性に違いが生じたことが要因と考えられる(図 3-10)。すなわち、本研究で作製した複合粉体のうち、OCPF500-P が XRD パターン(図 3-1, 図 3-3)の回折線が最もシャープであり、フッ化物イオンの添加により最も結晶性が高まったことがわかる。また、フッ化物イオンは HAp 中の水酸基と置換することで、フッ化物イオンの置換率に依存して  $a$  軸の格子定数を低下することが知られており、これはフッ化物イオンのイオン径(132 pm)が水酸基のイオン径(168 pm)よりも短いためだと考えられている[11, 12]。本研究においては、OCPF500-P が複合粉体中に最も多くのフッ化物イオンを含むことから、OCPF500-P は  $a$  軸の格子定数が最も短い可能性が推察される。また、リン酸カルシウムへのタンパク質吸着は、静電的な力が重要な役割を果たしていると考えられており[13]、アパタイトの  $a(b)$  面は  $\text{Ca}^{2+}$  イオンが多く存在して正に帯電し、 $c$  面は  $\text{OH}^-$  イオンと  $\text{PO}_4^{3-}$  イオンが多く存在して負に帯電している[14]。OCPF500-P は最も結晶性が高くかつ、 $a$  軸の格子定数が最も短いと推察されることから、他の複合粉体と比較して複合粉体表面の電子密度がより高いため、正電荷に帯電したプロタミンが負電荷に帯電したアパタイトの  $c$  面により強固に結合したと考えられる。また、その結果として、抗菌性試験においてプロタミンのリリースが少なく(図 3-9)、主にリン酸カルシウムに吸着したプロタミンが抗菌性を発現したと考えられる。一方、OCP-F500P は OCPF500-P と同程度のフッ化物イオンを含有するが(表 3-1)、複合粉体中のプロタミン含量(表 3-1)や抗菌性試験でのプロタミンリリース量(図 3-9)は OCPF500-P とは大きく異なった。この理由としては、吸着法で調製した OCP-F500P では、プロタミン吸着時にフッ化物イオンが共存していたことから、プ

ロタミンのアミノ基(正に帯電)と一部のフッ化物イオン(負に帯電)が結合し、プロタミンの正の帯電が弱まったことが原因と考えれば説明できる。すなわち、OCPF500-P ではプロタミン中の多くのアミノ基とアパタイトが広い接着面積で強固に吸着したが、OCP-F500P ではプロタミンの一部のアミノ基とアパタイトが弱い吸着で、かつ少ない接着面積で結合したことにより、より多くのプロタミンがアパタイトに結合し、また培養液中では容易にプロタミンがリリースされたものと考えられる。

OCP、プロタミン、フッ化物イオンを出発原料として調製したリン酸カルシウム複合粉体は、特に OCPF500-P について、OCP-P と比較してより高い抗菌性を示したことから、オーラルケアを対象とした抗菌性素材として有望であると期待できる。

### 3.4 まとめ

オーラルケア素材開発の基礎研究として、i) 有機化合物をインターカレートする OCP、ii) 抗菌性を有するプロタミン、iii) アパタイト結晶の形成促進効果を有するフッ化物イオンに着目した。上記出発原料を用いて沈殿法及び吸着法によりリン酸カルシウム複合粉体を調製し、それらのキャラクタリゼーション、細胞増殖試験、抗菌性試験を実施した。フッ化物イオンの仕込み濃度が高い方がより多くのフッ化物イオンを配合でき、かつ OCP から FAp への転化がより促進した。細胞増殖試験では、MG-63 細胞の増殖阻害は認めなかった。抗菌性試験において、プロタミンとフッ化物イオンを含有するリン酸カルシウム複合粉体は、OCP-P と比較してより高い抗菌性を発現した。以上の結果から、フッ化物イオン含有プロタミン/リン酸カルシウム複合粉体は、有望な抗菌性素材である。

プロタミンを利用した新規抗菌性バイオマテルは、インプラント治療に関わる感染予防に広く貢献できると考えられるが(第1章)、本研究で創製したフッ化物イオン含有プロタミン/リン酸カルシウム複合粉体は、*S. aureus* に対して抗菌性を発現することや、リン酸カルシウムとの複合素材であることを考慮すると、特に人工骨素材として利用が期待できる。人工骨の国内市場規模については、販売金額は約 65 億円、販売量は約 1.4 トン(2018年)[15]である。また、人工骨で採用されている素材とその使用量の内訳は、リン酸カルシウム系素材が 1.3 トン(96.3%)、コラーゲン他が 50 kg(3.7%)、チタン他が僅少(2018年)[15]である。現在人工骨に使用されているリン酸カルシウム系素材がフッ化物イオン含有プロタミン/リン酸カルシウム複合粉体に置き換わると仮定した場合には、最大で年間 1.3 トンの使用量になる。また、今回最も強い抗菌性を発現し、有望なバイオマテリアルであると判断した OCPF500-P のプロタミン吸着量は  $8.22 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (表 3-1)であった。そのため、OCPF500-P を 1.3 トン製造する際のプロタミン使用量は、約 10 kg と推定される。白子中のプロタミン含量は原料によって大きく異なるが、5 mass%と仮定すると、プロタミン 10 kg の製造に必要な白子は約 200 kg と推定される。

未利用資源の有効活用の観点から考えると、今回創製した OCPF500-P の人工骨への利用は、国内で回収されているサケ白子の一部の有効活用にとどまる。しかし、本研究は、プロタミンの抗菌性を従来の食品領域だけでなく、医療領域においても活用できる可能性を示したものであり、サケ白子の有効活用に関する研究の今後の更なる発展に寄与する重要なものである。

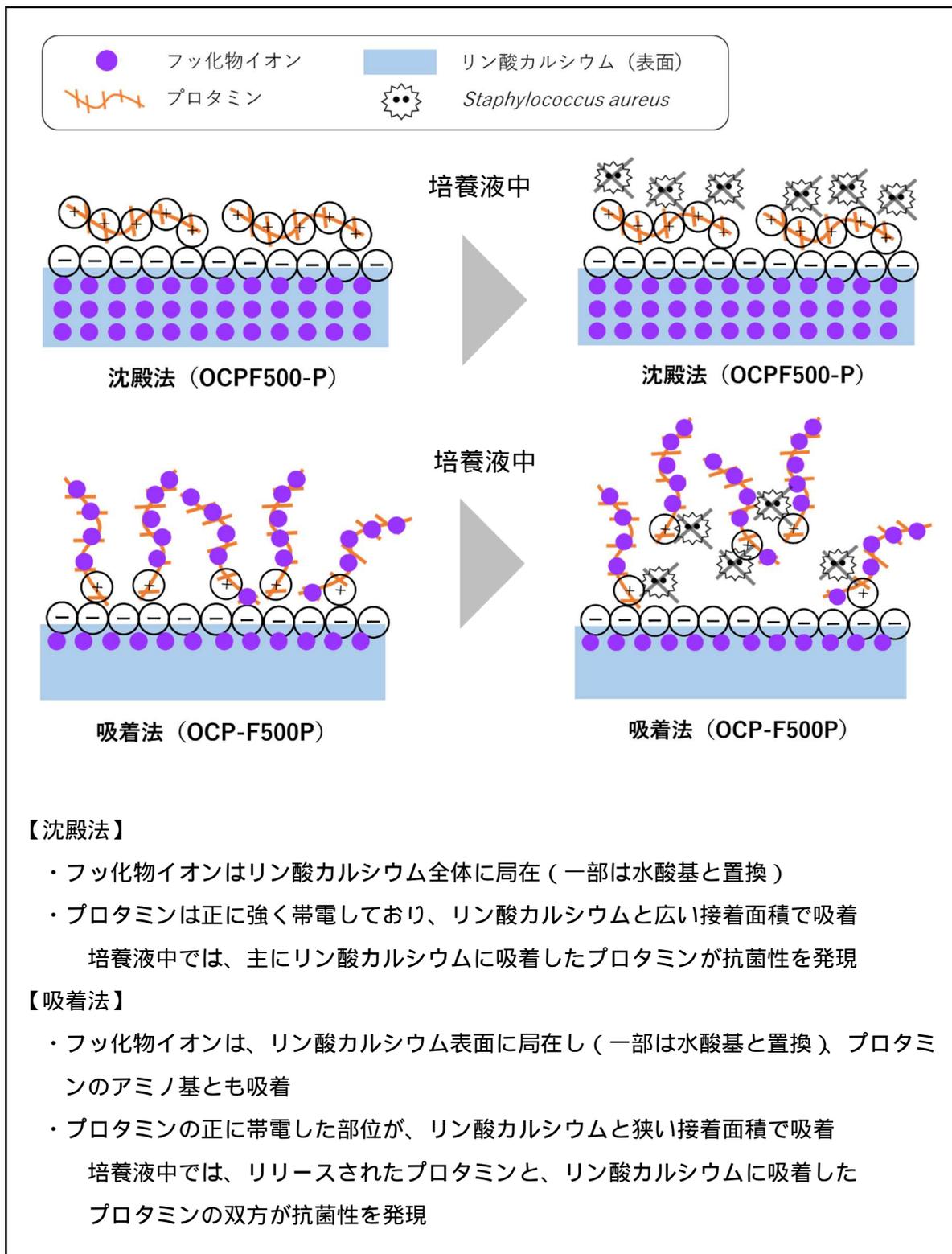


図 3-10 フッ化物イオン含有プロタミン/リン酸カルシウム複合粉体の結合様式と培養液中でのプロタミンの吸着・リリースに関するモデル図

## 引用文献

1. Wekwejt M, Dziaduszevska M, Palubicka A. The problem of infections associated with implants—an overview. *Eur J Med Technol.* 2018;4:19–26.
2. Koizumi D, Suzuki K, Minamisawa H, Togawa R, Yasui K, Iohara K, Honda M, Aizawa M. Preparation of protamine-adsorbed calcium phosphate powders and their antibacterial property. *J Asian Ceram Soc.* 2022;10:230–240. <https://doi.org/10.1080/21870764.2022.2035488>
3. Antoine A, Farah D, Sibelle AH, Jacqueline D. The fluoride debate: the pros and cons of fluoridation. *Prev Nutr Food Sci.* 2018;23:171–180. <https://doi.org/10.3746/pnf.2018.23.3.171>
4. Neti B, Sayana G, Muddala L, Mantena SR, Yarram A, GVD H. Fluoride releasing restorative materials: a review. *Int J Dent Mater.* 2020;2:19–23. <https://doi.org/10.1177/10454411970080020301>
5. Aoba T. The effect of fluoride on apatite structure and growth. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997;8:136–153. <https://doi.org/10.1186/s40824-018-0149-3>
6. Liao Y, Brandt BW, Li J, Crielaard W, Loveren CV, Deng DM. Fluoride resistance in *Streptococcus mutans*: a mini review. *J Oral Microbiol.* 2017;9:1344509. <https://doi.org/10.1080/20002297.2017.1344509>
7. Qiao W, Liu Q, Li Z, Zhang H, Chen Z. Changes in physicochemical and biological properties of porcine bone derived hydroxyapatite induced by the incorporation of fluoride. *Sci Technol Adv Mater.* 2017;18:110–121. <https://doi.org/10.1080/14686996.2016.1263140>
8. Shiwaku Y, Honda Y, Anada T, Morimoto S, Masuda T, Sasaki K, Suzuki O. Analysis of physicochemical properties of octacalcium phosphate prepared by hydrolysis and co-precipitation with fluoride ions. *J Ceram Soc Japan.* 2010;118:402–405. <https://doi.org/10.2109/jcersj2.118.402>
9. Ban S, Hasegawa J, Maruno S. Synthesis of octacalcium phosphate and its transformation to apatite. *JSDMD.* 1996;15:210–217. [https://doi.org/10.18939/jjdm.15.3\\_210](https://doi.org/10.18939/jjdm.15.3_210)
10. Shiwaku Y, Anada T, Yamazaki H, Honda Y, Morimoto S, Sasaki K, Suzuki O. Structural, morphological and surface characteristics of two types of octacalcium phosphate-derived fluoride-containing apatitic calcium phosphates. *Acta Biomater.* 2012;8:4417–4425. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.07.041>
11. Bianco A, Cacciotti I, Lombardi M, Montanaro L, Bemporad E, Sebastiani M. F-substituted hydroxyapatite nanopowders: thermal stability, sintering behaviour and mechanical properties. *Ceramics International.* 2010;36:313–322.

12. Rodríguez-Lorenzo ML, Hart NJ, Gross AK. Structural and chemical analysis of well-crystallized hydroxyfluorapatites. *J Phys Chem B*. 2003;107:8316–8320.
13. Wang K, Zhou C, Hong Y, Zhang X. A review of protein adsorption on bioceramics. *Interface Focus*. 2012;2(3):259–277.
14. Zhuang Z, Aizawa M. Protein adsorption on single-crystal hydroxyapatite particles with preferred orientation to *a(b)*- and *c*-axes. *J Mater Sci Mater Med*. 2013;24:1211-1216.
15. 研究開発本部 第二部門 編集. 2019 年メディカル・ライフサイエンスケミカルの現状と将来展望. 富士キメラ総研. 2019 年 5 月 22 日.

## 第4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

### 4.1 はじめに

これまでに我々は、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、信頼できる情報の提供のために、加工食品に含まれる甲殻類タンパク質を検出可能な定量的酵素結合免疫吸着測定 (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) 法を構築した[1]。また、「アレルギーを含む食品の検査方法を評価するガイドライン」に準じて十分に検証を行い、信頼性の高い検査法であることを確認した[2]。しかし、ELISA 法は比較的時間がかかり、高価な機器と十分に訓練された技術者を必要とする。

これに対し、ラテラルフローアッセイ法は簡便かつ迅速であり、加工食品のモニタリングに適用できる[3]。これまでに食物アレルギー測定のためのラテラルフローアッセイ法は報告されており[3, 4]、また、アフラトキシンに対するラテラルフローアッセイ法は十分に検証されているが[5]、甲殻類タンパク質を検出するためのラテラルフローアッセイ法として、十分に検証された科学的な報告はない。本章では、食品のモニタリングに有用なツールとして、市販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、検証した。

### 4.2 実験方法

#### 4.2.1 食品サンプル

食品原材料および市販加工食品は、茨城県つくば市の食料品店で購入した。甲殻類の原材料表示がある食品とない食品を購入した。

#### 4.2.2 エビタンパク質抽出液とモデル加工食品の調製

エビタンパク質抽出液を、既報[1]を参考にして、ブラックタイガー (*Penaeus monodon*) から調製した。測定溶液は、エビタンパク質濃度が 0.0, 12.5, 25.0, 50.0, 125.0, 250.0  $\mu\text{g/L}$  になるように、PBS( 8.1 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.47 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.68 mmol/L  $\text{KCl}$ , 137 mmol/L  $\text{NaCl}$  ), 1% TritonX-100, 0.009%  $\text{NaN}_3$  を含む抽出試薬で希釈して調製した。

エビタンパク質を含むモデル加工食品として、トマトジュース、魚肉ソーセージ、凍結乾燥卵スープの3種類を調製した。市販トマトジュースに終濃度 0, 2.0, 5.0, 10.0  $\mu\text{g/g}$  の凍結乾燥したブラックタイガー筋肉粉末を加え、60 分間十分に混合することで、トマトジュースを調製した。魚肉ソーセージと凍結乾燥卵スープは既報[1]に準じて、それぞれ終濃度 5.0  $\mu\text{g/g}$  および、6.0  $\mu\text{g/g}$  のブラックタイガー筋肉粉末を含むように調製した。

#### 4.2.3 測定溶液の調製

試料をホモジナイザー( エース AM-4, 日本精機製作所製 )で 30 秒間、3 回粉碎した。1 g の粉碎された試料に、抽出試薬 39 mL を加えた後、ホモジナイザーまたはボルテックス( VORTEX-GENIE2, Scientific Industries 製 )を用いて、30 秒間、3 回抽出した。抽出液を  $3,000 \times g$  にて  $4^\circ\text{C}$  で 20 分間遠心分離した後、上清を濾紙 ( 5AB paper, アドバンテック製 ) で濾過した。

#### 4.2.4 テストストリップの作製

テストストリップは、公開情報 ( Millipore 社 WEB サイト ) を参考にして作製した。ブラックタイガータンパク質に対するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体は、過去に我々が ELISA 法に用いたものを使用した[1]。ニトロ

セルロース膜に、PBS で希釈したモノクローナル抗体 (0.5 g/L) を塗布してテストラインとし、PBS で希釈した抗ウサギ IgG 抗体 (2.5 g/L) を塗布してコントロールラインとした。メンブレンを 5 g/L カゼインを含むブロッキング液に浸漬した後、乾燥させた。金コロイド溶液 (10 mL) を pH 8.15 に調整し、0.1 g/L ポリクローナル抗体 0.8 mL を添加した。室温で 30 分間静置した後、1.2 mL の 100 g/L BSA 溶液を加えた。混合物を遠心分離し、その沈殿物は 0.5 mL の蒸留水に再懸濁した。次に、10  $\mu$ L のポリクローナル抗体-金コンジュゲートと 800  $\mu$ L の希釈溶液に 190  $\mu$ L の蒸留水を加え、ガラス繊維フィルターをその混合液に浸漬した後、乾燥させた。ラテラルフローアッセイ法のテストストリップは、台、ニトロセルロース膜、ガラス繊維フィルター、ろ紙、不織布、カバーで構成されている (図 4-1)。

#### 4.2.5 ラテラルフローアッセイ法の評価

プラスチックチューブに測定溶液 2 mL を入れ、テストストリップを 3 秒間浸漬した後、テストストリップを取り出し、テストラインを上に向けてアルミシートの上に 20 分間静置した。テストラインの発色の有無を目視で判定し、3 人の観測者のうち 1 人以上が発色を認めた場合、陽性と判断し、イムノクロマトリーダー (C10066, 浜松ホトニクス製) を用いて発色強度を測定した。発色強度を比較するため、ブラックタイガー、タラバガニ、カメノテ、ワレカラ、アミ、オキアミの抽出液を抽出試薬で 1:10,000 に希釈し、再試験を行った。ブラックタイガーはタンパク質含量が約 18.4%[6]であることから、希釈したブラックタイガー抽出液に含まれるタンパク質の濃度は、食品換算で約 20  $\mu$ g/g に相当する。ELISA 法は既報[1]に準じて実施した。



図 4-1 構築したラテラルフローアッセイ法

コントロールラインとテストラインが発色した場合は陽性、テストラインが発色しない場合は陰性と判定した。

#### 4.2.6 再現性の評価

日内および日間再現性は既報[5]を参考にして、ブラックタイガー筋肉粉末含有モデル加工食品 0, 2.0, 5.0, 6.0, 10.0  $\mu\text{g/g}$  を使用して評価した。日内変動を評価するために、同日に実施した 5 回の反復測定から変動係数 (coefficient of variation: CV) を算出した。日間変動を評価するために、異なる日に実施した 5 回の測定結果から CV を算出した。

### 4.3 結果

#### 4.3.1 ラテラルフローアッセイ法の最適化

最初のアプローチとして、エビタンパク質に対して高い免疫反応性を示す抗体の組み合わせを選択した。100  $\mu\text{g/L}$  のエビタンパク質抽出液を用いて検証したところ、金結合モノクローナル抗体とポリクローナル抗体の組み合わせでは検出できなかったが、金結合ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の組み合わせでは、テストラインの十分な発色を認めた。

次に、反応時間が発色強度に及ぼす影響について検討した。反応時間が 15 分未満の場合、25  $\mu\text{g/L}$  のエビタンパク質抽出液に対する発色強度は非常に弱かった。しかし、20 分以上の反応時間では、25  $\mu\text{g/L}$  のエビタンパク質抽出液で十分な発色強度が得られ、目視による検出が可能であった。

ラテラルフローアッセイ法では、サンプル溶液中に目的タンパク質が過剰に含まれる場合、プロゾン現象と呼ばれる偽陰性反応がしばしば起こる[7]。本研究では、カニエキスを測定した際に、コントロールラインでプロゾン現象を認めた。この問題を解決するために、コントロールラインの抗体量を最適化したところ、抗体濃度が 2.5  $\text{g/L}$  以上であれば、カニエキスを測定してもプロゾン現象が生じないことが明らかとなった。

#### 4.3.2 エビタンパク質抽出液に対する検出限界

エビタンパク質抽出液を用いて検出限界（limit of detection: LOD）を確認した。表 4-1 に示すように、12.5, 25.0, 50.0, 125.0, 250.0  $\mu\text{g/L}$  のサンプルで反応性を認め、0.0  $\mu\text{g/L}$  の陰性コントロールでは非特異反応は検出しなかった。5 回測定して 5 回全て陽性であった濃度は 25.0  $\mu\text{g/L}$  以上であったことから、目視の検出限界は 25.0  $\mu\text{g/L}$ （食品換算で 1  $\mu\text{g}$  エビタンパク質/g 食品相当）であった。

#### 4.3.3 反応性及び特異性

本検査法の反応性と特異性は、甲殻類、軟体動物、その他食品原材料を用いて検証した。本検査法は、10 品目の十脚目とフジツボを除く 4 品目のその他甲殻類に反応性を示した（表 4-2）。これらの反応性を示した検体の mABS 値は 50.0 以上であった。また、ブラックタイガーとタラバガニの希釈液（1:10,000）には反応性を示したが、4 種のその他甲殻類の希釈液（1:10,000）には反応性を示さなかった。20 種類の軟体動物と 59 種類のその他食品原材料に対しては、交差反応性を示さなかった（表 4-3, 4-4）。

以上の結果から、本検査法は加工食品中の甲殻類タンパク質の検出に関して、十分な特異性を有していることが明らかとなった。

#### 4.3.4 モデル加工食品に対する検出限界と再現性

開発した検査法の加工食品への適用性を評価するために、ブラックタイガー筋肉粉末を含む各種モデル加工食品を測定した。トマトジュースの目視による LOD は、1.0  $\mu\text{g/g}$  であった。また、トマトジュース（2.0, 5.0, 10.0  $\mu\text{g/g}$ ）、魚肉ソーセージ（5.0  $\mu\text{g/g}$ ）、凍結乾燥卵スープ（6.0  $\mu\text{g/g}$ ）を用いて、日内および日間再現性を確認したところ、表 4-5 に示すように、本検査法は十分な感度と再現

表 4-1 エビタンパク質抽出液の測定結果

Sample	Assay solution (µg/L)	Equivalent concentration in food sample (µg/g)	Result (positive/total)	mABS (average)	%CV
Shrimp protein extract	250.0	10.0	5/5	50.3	6.8
	125.0	5.0	5/5	30.8	6.4
	50.0	2.0	5/5	15.0	5.2
	25.0	1.0	5/5	11.1	7.6
	12.5	0.5	4/5	6.5	12.5
	0.0	0.0	0/5	0.5	-

表 4-2 各種甲殻類に対する反応性

Sample	Result
<i>Decapoda group</i>	
Black tiger prawn	+
Red spotted shrimp	+
Northern shrimp	+
Spotted shrimp	+
Freshwater prawn	+
Fan lobster	+
Caribbean spiny lobster	+
Red king crab	+
Swimming crab	+
Snow crab	+
<i>Other species of Crustacea</i>	
Acorn barnacle	-
<i>Pollicipes mitella</i>	+
Skeleton shrimp	+
Opossum shrimp	+
Euphausia	+

表 4-3 各種軟体動物に対する反応性

Sample	Result
<i>Cephalopoda group</i>	
Common octopus	-
Ocellated octopus (with internal organs removed)	-
Giant octopus	-
Japanese common squid	-
Spear squid	-
Cuttlefish	-
Firefly squid (with internal organs removed)	-
<i>Bivalvia group</i>	
Common freshwater clam	-
Short-necked clam	-
Bloody clam	-
Common scallop	-
Japanese oyster	-
Blue mussel	-
Japanese hard clam	-
Sakhalin surf clam	-
<i>Gastropoda group</i>	
Horned turban	-
Japanese abalone	-
Ivory shell	-
Whelk	-
Pond snail	-

表 4-4 その他食品原材料に対する反応性

Sample	Result	Sample	Result	Sample	Result
Beef	-	Peanut	-	Agar weed	-
Pork	-	Walnut	-	Sea lettuce	-
Liver of pig	-	Almond	-	Hiziki	-
Chicken	-	Cashew nuts	-	<i>Porphyra</i> <i>yezoensis</i>	-
Liver of chicken	-	Sesame	-	Salmon roe	-
Milk	-	Pepper	-	Cod roe	-
Gelatin	-	Wasabi	-	Mackerel	-
Egg	-	Eggplant	-	Salmon	-
Quail egg	-	Pumpkin	-	Golden threadfin bream	-
Rice	-	Onion	-	White croaker	-
Wheat	-	Bamboo shoot	-	Walleye pollock	-
Buck wheat	-	Ginger	-	Pacific cod	-
Soybean	-	Garlic	-	Cutlassfish	-
Adzuki bean	-	Shiitake mushroom	-	Lizardfish	-
Coffee bean	-	Matsutake mushroom	-	Alfonsino	-
Banana	-	Potato	-	Pacific whiting	-
Apple	-	Sweet potato	-	Horse mackerel	-
Kiwi fruit	-	Japanese yam	-	Sardine	-
Orange	-	Kombu	-	Flying fish	-
Peach	-	Wakame	-		

性を有していた。

#### 4.3.5 市販加工食品への応用

本検査法で 104 品目の市販加工食品を測定した。甲殻類の原材料表示がある製品については、春巻きを除いて全て陽性であった。甲殻類の原材料表示がない製品は全て陰性であった。これらの食品は検証済みの ELISA 法[1]でも測定した。本 ELISA 法の定量下限 (limit of quantification: LOQ) は 2.25  $\mu\text{g/L}$  (0.9  $\mu\text{g}$  甲殻類タンパク質/g 食品相当) であることから、1.0  $\mu\text{g/g}$  以上の甲殻類タンパク質を含むものを暫定的に陽性と判定した。表 4-6 に示すように、1.0  $\mu\text{g/g}$  未満, 1.0-10.0  $\mu\text{g/g}$ , 10.0  $\mu\text{g/g}$  を超える甲殻類タンパク質を含む製品に対する ELISA 法とラテラルフローアッセイ法との一致率はそれぞれ、100%, 88%, 100% であり、全検体の一致率は 97% であった。ELISA 法では、春巻き、蒲鉾、さつま揚げでそれぞれ、5.1, 1.5, 6.4  $\mu\text{g/g}$  の甲殻類タンパク質を検出したが、ラテラルフローアッセイ法は、これらの食品に反応性を示さなかった。

#### 4.4 考察

市販加工食品に含まれる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た。また、加工食品に対する感度、特異性、再現性、適用性を十分に評価し、本検査法は加工食品中の甲殻類タンパク質を検出するための、簡便で信頼性の高い方法であることを示した。

甲殻類のメジャーアレルゲンはトロポミオシンであるため[8]、甲殻類を特異的に検出するためのターゲットタンパク質をトロポミオシンとした。食物アレルゲンの検査法は、高い特異性が要求される。しかし、軟体動物のアレルゲンもトロポミオシンであり、甲殻類トロポミオシンと抗原交差性が見られる[9]。過

表 4-5 モデル加工食品の測定における日内変動と日間変動

Sample	Equivalent concentration in a food sample (µg/g)	Intra-assay		Interassay	
		mABS	%CV	mABS	%CV
Tomato juice	10.0	42.4	8.1	46.4	10.4
	5.0	26.0	9.4	28.5	10.8
	2.0	13.2	8.3	12.7	10.0
	0.0	0.7	-	0.9	-
Fish-meat sausage	5.0	15.8	8.8	16.3	12.6
Freeze-dried egg soup	6.0	21.6	6.9	22.0	13.5

日内変動は同日に実施した 5 回の測定結果から算出した。日間変動は異なる日に実施した 5 回の測定結果から算出した。

表 4-6 加工食品の測定におけるラテラルフローアッセイ法と  
ELISA 法との一致率

ELISA Result	Result of lateral flow assay		Concordant results/total	Concordance (%)
	-	+		
<1.0 µg/g	48	0	48/48	100
1.0 – 10.0 µg/g	3	23	23/26	88
>10.0 µg/g	0	30	30/30	100
Total	51	53	101/104	97

去に我々は、軟体動物タンパク質とは反応性を示さず、甲殻類タンパク質に高い特異性を有するモノクローナル抗体とポリクローナル抗体を作製し、両抗体を用いた加工食品中の甲殻類タンパク質を検出するための十分に検証された ELISA 法を開発した[1, 2]。本研究では、ELISA 法で使用した抗体と同じ抗体を使用した新規ラテラルフローアッセイ法を構築し、検証を行った。本ラテラルフローアッセイ法は、軟体動物や、魚、肉、穀物など他の主要な食品タンパク質と反応性を示さず、甲殻類タンパク質に対して高い特異性を有していた。また、日本の食物アレルギー表示制度では、甲殻類の中で、十脚目に属するエビとカニは表示が義務付けられているが、甲殻類の他のグループ、例えばアミ目やオキアミ目などの表示義務はない[10]。新規検査法は ELISA 法[1]と同様に十脚目のタンパク質に対して高い特異性を有することから、加工食品の検査において、十脚目以外のグループのタンパク質に由来する偽陽性反応は生じないと考えられる。すなわち、新規検査法は、日本の食物アレルギー表示制度に適した検査法である。

目視による判定結果は、mABS の数値と相関が高かったことから（表 4-1）、3 人の観測者による判定は、目視での検出限界の推定に十分だと考えられる。エビタンパク質抽出液の目視での検出限界は 25  $\mu\text{g/L}$ （1  $\mu\text{g}$  エビタンパク質/g 食品相当）であった。食物アレルギーの検査法は低濃度（ $\mu\text{g}$  タンパク質/g 食品程度）の食物アレルギーを検出できる必要があるが[11]、新規検査法は、加工食品中の食物アレルギーの検出に十分な感度を有すると考えられる。

新規検査法の性能を評価するため、モデル加工食品としてトマトジュースを調製した。トマトは魚介類（スープやケチャップなど）と一緒に調理されることが多く、また、免疫学的検査法において食品タンパク質と抗体の反応を阻害するポリフェノールを含んでいるためである[12, 13]。新規検査法は、1  $\mu\text{g}$  エビタンパク質/g 食品に相当する十分な感度と、トマトジュースに含まれるエビタンパ

ク質の検出について、十分な再現性を有していた。

食品検査の分野では、質量分析 (mass spectrometry: MS) を用いた検査法が利用され、MS を用いた食物アレルギーの検出もいくつか報告されている [14-16]。これらの方法は信頼性と高い特異性が得られるが、複雑で高価な機器を必要とし、高度な技術を有するオペレータも必要である。そのため、MS を用いた方法は日常の使用にはあまり適さない。これに対して、ラテラルフローアッセイ法は簡便であり、高度な手順や高価な機器を必要としない。そのため、特に食品加工施設での日常の測定に適している。

新規ラテラルフローアッセイ法と、検証済みの ELISA 法との一致率は 97% であった。ELISA 法は、甲殻類の原材料表示が無かった蒲鉾やさつま揚げの抽出液に含まれるタンパク質に反応性を示したが、ラテラルフローアッセイ法では反応性を示さなかった。魚のすり身を含む食品には甲殻類タンパク質がしばしば含まれることから [17]、これらの加工食品には甲殻類タンパク質が含まれていたと判断できる。蒲鉾やさつま揚げは加工度が高く、ラテラルフローアッセイ法での抽出時間 (90 秒) は ELISA 法の抽出時間 (12 時間) よりも短時間であることから、これら食品の甲殻類タンパク質の検出には、ラテラルフローアッセイ法の抽出時間は短かったと考えられる。また、エビやカニの原材料表示があり、ELISA 法で甲殻類タンパク質が検出されたにも関わらず、ラテラルフローアッセイ法では、春巻きの甲殻類タンパク質を検出できなかった。加工食品の調味料として使用されている甲殻類エキスは、一般的にプロテアーゼ処理されている。そのため、甲殻類タンパク質の構造変化や、両検査法の抗体構成の違いにより、反応性に違いが生じたと考えられる。高度な加工や酵素消化された甲殻類タンパク質は、ラテラルフローアッセイ法では検出できないケースもあり、これらの加工食品に関しては、今後更なる検証が必要である。

#### 4.5 まとめ

加工食品中に含まれる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、検証した。本法は、複雑で高価な機器や、高度な技術を要するオペレータを必要とせずに測定可能である。また、迅速（20分）かつ簡便であり、信頼性が高く、検証済みのELISA法との相関も高いことから、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。

## 引用文献

1. Seiki, K., Oda, H., Yoshioka, H., Sakai, S., Urisu, A., Akiyama, H., & Ohno, Y. (2007). A reliable and sensitive immunoassay for the determination of crustacean protein in processed foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 9345–9350.
2. Sakai, S., Matsuda, R., Adachi, R., Akiyama, H., Maitani, T., Ohno, Y., Oka, M., Abe, A., Seiki, K., Oda, H., Shiomi, K., & Urisu, A. (2008). Interlaboratory evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assay kits for the determination of crustacean protein in processed foods. *Journal of AOAC International*, 91, 123–129.
3. Röder, M., Vieths, S., & Holzhauser, T. (2009). Commercial lateral flow devices for rapid detection of peanut (*Arachis hypogaea*) and hazelnut (*Corylus avellana*) cross-contamination in the industrial production of cookies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 103–109.
4. Wen, H. W., Borejsza-Wysocki, W., DeCory, T. R., & Durst, R. A. (2005). Development of a competitive liposome-based lateral flow assay for the rapid detection of the allergenic peanut protein Ara h1. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382, 1217–1226.
5. Anfossi, L., D'Arco, G., Calderara, M., Baggiani, C., Giovannoli, C., & Giraudi, G. (2011). Development of a quantitative lateral flow immunoassay for the detection of aflatoxins in maize. *Food Additives and Contaminants*, 28, 226–234.
6. Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Tokyo, Japan. (2010). Standard tables of food composition in JAPAN Tokyo: Official Gazette Co-operation of Japan, (pp.174).
7. Butch, A. W. (2000). Dilution protocols for detection of hook effects/prozone phenomenon. *Clinical Chemistry*, 46, 1719–1721.
8. Shanti, K. N., Martin, B. M., Nagpal, S., Metcalfe, D. D., & Rao, P. V. (1993). Identification of tropomyosin as the major shrimp allergen and characterization of its IgE-binding epitopes. *The Journal of Immunology*, 151, 5354–5363.
9. Shiomi, K. (2009). Mandatory labeling of shrimps and crabs as allergenic substances in processed foods. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 75, 495–499.
10. Akiyama, H., Imai, T., & Ebisawa, M. (2011). Japan food allergen labeling regulation—history and evaluation. *Advances in Food and Nutrition Research*, 62, 139–171.
11. Van Hengel, A. J. (2007). Food allergen detection methods and the challenge to protect food-allergic consumers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 111–118.
12. Aherne, S. A., & O'Brien, N. M. (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 18, 75–81.
13. Bignardi, C., Mattarozzi, M., Penna, A., Sidoli, S., Elviri, L., Careri, M., & Mangia, A. (2012). A rapid size-exclusion solid-phase extraction step for enhanced sensitivity in multi-allergen determination in dark chocolate and biscuits by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Analytical Methods*, DOI 10.1007/s12161-012-9521-4.

14. Abdel Rahman, A. M. A., Lopata, A. L., Randell, E. W., & Helleur, R. J. (2010). Absolute quantification method and validation of airborne snow crab allergen tropomyosin using tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 681, 49–55.
15. Chassaigne, H., Nørgaard, J. V., & Hengel, A. J. (2007). Proteomics-based approach to detect and identify major allergens in processed peanuts by capillary LC-Q-TOF (MS/MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4461–4473.
16. Lutter, P., Parisod, V., & Weymuth, H. (2011). Development and validation of a method for the quantification of milk proteins in food products based on liquid chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of AOAC International*, 94, 1043–1059.
17. Sakai, S., Adachi, R., Shibahara, Y., Oka, M., Abe, A., Seiki, K., Oda, H., Yoshioka, H., Shiomi, K., Urisu, A., Akiyama, H., & Teshima, R. (2008). A survey of crustacean soluble proteins such as “shrimp” and “crab” content in food ingredients. *Japanese Journal of Food Chemistry*, 15, 12–17.

#### 引用 WEB サイト

Millipore 社. Rapid Lateral Flow Test Strips Considerations for Product Development.

URL: file:///e5mnd0h0fsu01/FR01\$/MNC040932/Desktop/tb500en00emm-mk.pdf

Accessed 10.04.2022

## 第5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測定法 の構築と評価

### 5.1 はじめに

第4章では、加工食品に含まれる甲殻類タンパク質を簡便かつ迅速に測定可能なラテラルフローアッセイ法を構築した[1]。また、これまでに我々は、食品に含まれる甲殻類タンパク質を検出するためのELISA法(ELISA-I)を構築し[2]、日本のバリデーションプロトコルにしたがって検証を行い[3]、食物アレルギーの検査法として十分な性能を有することを確認した。ELISA-Iの抽出系では、抽出液中に還元剤として2-メルカプトエタノール(2-ME)を使用したが、2-MEは日本で2008年に毒物指定された。そのためELISA-Iを使用できるのは、毒物の使用が許可された特定の施設のみとなった。

その後、ELISA法を用いたタンパク質検出において、2-MEの代替として亜硫酸ナトリウム( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ )が有用との報告があった[4]。 $\text{Na}_2\text{SO}_3$ は毒物指定されておらず、また食品添加物として一般的に使用されているため、特に食品加工施設での使用において、2-MEよりも適している。

本章では、抽出系に2-MEの代替の還元剤として $\text{Na}_2\text{SO}_3$ を使用した、甲殻類タンパク質検出のためのELISA法(ELISA-II)を構築した。また、ELISA-Iと比較することにより、ELISA-IIの性能を評価した。

### 5.2 実験方法

#### 5.2.1 食品サンプル

ブラックタイガー(*Penaeus monodon*)は、Integrated Aquaculture Specialist

社から購入した。その他の原材料および市販加工食品は茨城県つくば市内のスーパーで購入した。

### 5.2.2 ブラックタイガータンパク質標準液の調製

凍結乾燥したブラックタイガー筋肉粉末を既報[5]の手順を参考にして調製した。すなわち、0.1 g の凍結乾燥したブラックタイガー筋肉粉末を 6 g/L SDS、0.1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>、10 mL/L プロテアーゼインヒビターカクテル ( Halt Inhibitor Cocktail Kit, Thermo Fisher Scientific 製 )、5 mM EDTA ( pH 7.4 ) を含む、20 mL のリン酸緩衝生理食塩水 ( 10 mM リン酸ナトリウム, 154 mM NaCl ) に加えた。次に、この混合物を室温で 15 時間振盪してタンパク質を抽出した。抽出後、試料を 10,000 × *g* で 30 分間遠心分離した。上清を 0.8 μm のマイクロフィルター ( DISMIC-25CS, アドバンテック製 ) で濾過し、抽出液を得た。その後、抽出液を 100 °C で 10 分間加熱した。得られた抽出液中のタンパク質含量を、2-D Quant Kit ( GE Healthcare 製 ) を用いて定量した。

### 5.2.3 モデル加工食品の調製

モデル加工食品は、既報[2]の手順を参考にして調製した。具体的には、数種類の原材料 ( 後述 ) に、凍結乾燥したブラックタイガー筋肉粉末を、終濃度 10-11.9 μg エビタンパク質/g 食品となるように添加し、その後、各食品を調理加工することで、ブラックタイガー筋肉粉末を含むモデル加工食品を調製した。

魚肉ソーセージは以下の手順で調製した。ミンチにした生魚 ( ヒメジ (*Mulloidichthys martinicus*)、ホッケ (*Pleurogrammus monoptyerygius*)、スケトウダラ (*Gadus chalcogrammus* )) をラード、砂糖、塩、冷水、ブラックタイガー筋肉粉末とよく混合した。この混合物を小型カッターで練り、ソーセージ用のケ

ーシングに手作業で入れた。121 °C で 15 分間加熱した後、流水で 5 分間冷却した。その後、5 °C の冷蔵庫で一晩寝かせた。

鶏肉団子は以下の手順で調製した。鶏挽肉をラード、馬鈴薯澱粉、砂糖、ブラックタイガー筋肉粉末とよく混合した。この混合物を小型カッターで練り、手作業で容器に入れた。

トマトジュースは、市販のトマトジュースをブラックタイガー筋肉粉末と室温で 60 分間混合して調製した。

凍結乾燥卵スープは以下の手順で調製した。卵を馬鈴薯澱粉、乳糖、塩、ブラックタイガー筋肉粉末とよく混合し、プラスチック容器に注いだ。−80 °C のディープフリーザーで凍結した後、25 °C で 20 時間凍結乾燥した。

#### 5.2.4 食品抽出液の調製

各検体（甲殻類、軟体動物、その他食品原材料、モデル加工食品、市販加工食品（すり身、ちくわ、さつま揚げ、塩辛、調味料粉末、海鮮キムチ、春巻き、エビ風味トマトソース、天ぷら、コロケ、えびせんべい、カニ風味トマトソース、乾燥スープ、かに玉、ロブスターパテ、ハンバーグ、カニ缶詰、焼売、エビグラタン）をそれぞれ、ホモジナイザー（Ace AM-4, 日本精機製作所）で 30 秒間、3 回粉碎した。6 g/L SDS と 0.1 M Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>[4]を含む検体抽出液（19 mL）を、粉碎した各検体 1 g に添加し、室温で 12 時間振盪して抽出した。抽出後、各サンプルを 3,000 × *g* で 20 分間遠心分離した。上清を定量濾紙（No.5A, アドバンテック製）でろ過し、食品抽出液を得た。

#### 5.2.5 酵素結合免疫吸着測定法（ELISA-II）の構築と測定

本 ELISA 法の希釈直線性を向上させるため、ブタ（*Sus scrofa domestica*）

骨格筋由来トロポミオシン (PTM) を検体希釈液に添加した。PTM は、既報の精製法を用いて調製した[6, 7]。ブラックタイガー筋肉タンパク質に対するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体は、過去に我々が ELISA-I の研究[2] で使用したものを、今回の ELISA-II でも使用した。ポリスチレン製 96 ウェルプレート (Thermo Fisher Scientific 製) の各ウェルに、50 mM 炭酸ナトリウム (pH 9.6) を含む 20 µg/mL モノクローナル抗体溶液を添加し、4 °C で 18 時間静置することで、抗体をコーティングした。トリス緩衝液 (TBS) で 3 回洗浄した後、10 g/L ウシ血清アルブミン (BSA)、30 g/L スクロース、0.5 mL/L ProClin 950 (Supelco 製) を含む TBS を各ウェルに添加し、25 °C で 1.5 時間静置することで、ウェルをブロッキングした。ブロッキング液を吸引した後、プレートをインキュベータに入れ、30 °C で 2.5 時間乾燥した。プレートと乾燥剤 (アイディ製) をアルミコーティングパックに密封して、使用時まで 4 °C で保存した。

食品抽出液を、検体希釈液 (2 g/L BSA, 30 g/L スクロース, 40 mg/L PTM, 0.5 mL/L Tween 20, 0.5 mL/L ProClin 950 を含む TBS) で 1:20 に希釈した。希釈した食品抽出液または標準液 (100 µL) をそれぞれ 3 ウェルずつに添加し、25 °C で 90 分間静置した。プレートを 0.5 mL/L Tween 20 を含む TBS (TBS-T) で 5 回洗浄した後、西洋わさびペルオキシダーゼ標識ポリクローナル抗体 100 µL を各ウェルに添加し、プレートを 25 °C で 30 分間静置した。TBS-T でさらに 5 回洗浄した後、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン溶液 (SureBlue Reserve TMB Microwell Peroxidase Substrate, KPL 製) を基質として各ウェルに 100 µL ずつ添加し、プレートを 25 °C で 20 分間静置した。反応は 1 M 硫酸の添加により停止させた (100 µL/ウェル)。その後、各ウェルの吸光度を、マイクロプレートリーダー (SpectraMax 340PC, Molecular Devices 製) 主波長 450 nm、副波長 650 nm で測定した。標準曲線は、標準液濃度 (50 ng/mL から段階希釈)

の対数に対して吸光度をプロットすることにより得た。また、比較のため、検証済みの ELISA-I (2-ME を抽出系で使用する) [2]を用いて測定した。

#### 5.2.6 甲殻類タンパク質に対する反応性

甲殻類タンパク質に対する 2 種類の ELISA 法の反応性を調べるため、「5.2.4 食品抽出液の調製」に記載した方法で、11 種類の甲殻類について、食品抽出液を調製した。食品抽出液を 1 から 100 万倍に検体希釈液を用いて段階希釈した後、ELISA-I および ELISA-II で測定した。濃度-反応曲線は、サンプル濃度の対数に対して吸光度をプロットし、4 パラメータロジスティック方程式  $y = \{(A - D)/[1 + (x/C)^B]\} + D$  (A は無限濃度での最大吸光度、B は変曲点における傾き、C は 50% 応答濃度 (RC<sub>50</sub>)、D は検体を含まない最小吸光度) から得た。反応性は以下のように計算した : (ブラックタイガータンパク質の RC<sub>50</sub>/対象甲殻類タンパク質の RC<sub>50</sub>) × 100。

#### 5.2.7 検査法の再現性、検出限界、定量限界の評価

日内再現性を評価するために、同日に測定した 5 回の測定結果の変動係数 (coefficient of variation: CV) を算出した。日間再現性を評価するために、異なる日に測定した 5 回の測定結果の CV を算出した。いずれも、モデル加工食品 (10-11.9 µg エビタンパク質/g 食品) を用いて測定した。検出限界 (limit of detection: LOD) はブランクを 25 回測定した結果の標準偏差 (standard deviation: SD) の 3 倍、定量限界 (limit of quantitation: LOQ) はブランクを 25 回測定した結果の SD の 10 倍として算出した。

## 5.3 結果と考察

### 5.3.1 ELISA-II の最適化

過去の ELISA-I の研究では、PTM を含まない検体希釈液では、モデル加工食品の測定において、吸光度-濃度曲線に十分な直線性が得られなかった。また、様々な検体希釈液の組成を検討した結果、甲殻類に属さないブタ (*Sus scrofa domestica*) 由来のトロポミオシンである PTM を検体希釈液に添加すると、ELISA-I の直線性が劇的に改善されることを見出した。ELISA-I で正確な結果を得るためには、検体希釈液に PTM を加えることが必要であった[2]。

なぜ PTM が直線性を向上させるのかは不明だが、検体の抽出及び希釈に 2-ME ではなく  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  を還元剤として使用する ELISA-II についても、PTM の必要性を検証した。その結果、ELISA-II についても、十分な直線性を得るためには PTM が必要であった。これらの結果から、使用する還元剤の種類に関わらず、検体希釈液には PTM を添加することが必要なことが明らかとなった。

### 5.3.2 標準曲線

図 5-1 に ELISA-I と ELISA-II で作成した標準曲線を示す。両 ELISA 法は、甲殻類タンパク質濃度 0.78-50 ng/mL の範囲において、類似した標準曲線のプロファイルを示した。また、日本の食物アレルギー表示制度では、表示の基準値は、10  $\mu\text{g}$  甲殻類タンパク質/g 食品[8]であるが、ELISA-II は 25 ng/mL (10  $\mu\text{g}$  甲殻類タンパク質/g 食品相当) において、十分に高い吸光度を示した。

### 5.3.3 検出限界と定量限界

両 ELISA 法の LOD と LOQ を確認し、比較した。表 5-1 に示すように、ELISA-II は LOD が 0.36 ng/mL (0.14  $\mu\text{g}$  甲殻類タンパク質/g 食品相当) LOQ

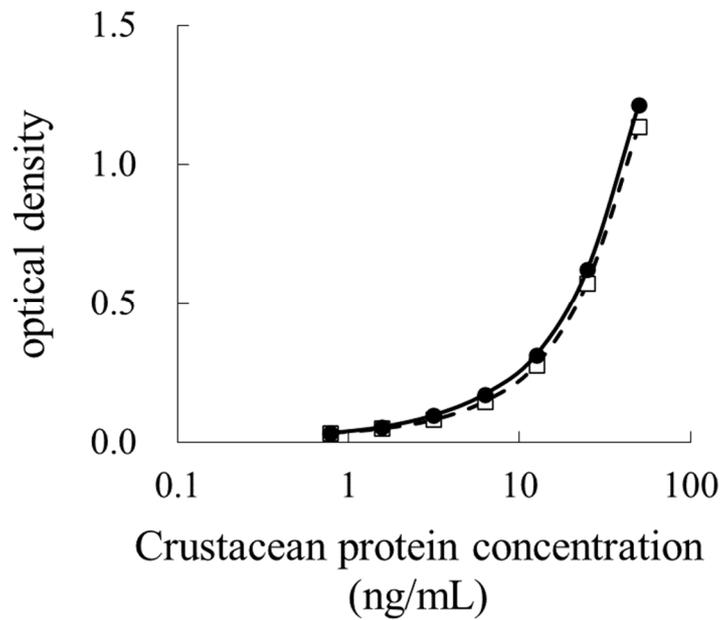


図 5-1 ELISA-I ( ) と ELISA-II ( ) の標準曲線

ELISA-I は抽出工程で還元剤として 2-メルカプトエタノールを使用するが、ELISA-II は  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  を使用する。

は 1.64 ng/mL (0.66 µg 甲殻類タンパク質/g 食品相当) であり、これらの値は ELISA-I よりも優れていた。食物アレルギー検査法は、数 mg タンパク質/kg 食品を検出できる感度が求められる[9]が、上記結果から、ELISA-II は、食物アレルギー検査法として十分な感度を有すると考えられる。

ELISA-II の LOQ は 1.64 ng/mL (0.66 µg 甲殻類タンパク質/g 食品相当) であることから、実用的な LOQ を、2.5 ng/mL (1.0 µg 甲殻類タンパク質/g 食品相当) に設定し、実際の食品を用いて ELISA-II の反応性と適用性を評価した。日本の食物アレルギー表示の基準値は、アレルギーの分析に使用される分析法の実用的な定量限界に基づき、すべてのアレルギーに対して 10 µg タンパク質/g 食品に設定されている[8]。そのため、我々が実用的な LOQ として設定した 1 µg 甲殻類タンパク質/g 食品は、日本の食物アレルギー表示制度に対して十分かつ適切だと考えられる。安全性の観点において、アレルギーの原因となる食品の最小誘発量はその種類によって異なり、エビアレルギーに対する閾値は、アレルギーを有する個々の消費者によって異なる[10]。アレルギー表示専門家委員会の試算によると、エビアレルギーの最小誘発量は 10 mg タンパク質である[10]。もし消費者が 1 µg のエビタンパク質を含む食品を 1 kg 食べた場合、エビタンパク質の摂取量は 1 mg となる。我々が設定した ELISA-II の実用的な LOQ (1.0 µg 甲殻類タンパク質/g 食品相当) は、アレルギーを有する消費者の大半にとって十分な安全マージンがある。

#### 5.3.4 反応性と特異性

ELISA-I の反応性と特異性について、甲殻類、軟体動物、その他食品原材料を用いて評価した。表 5-2 に示すように、十脚目に対する反応性は、エビとロブスターで 65.2%以上、カニで 47.0-50.5%であった。一方、その他甲殻類の反応

表 5-1 ELISA-I と ELISA-II の検出限界 (LOD) 及び定量限界 (LOQ)

Parameter	ELISA-I		ELISA-II	
	ng/mL <sup>a</sup>	μg/g <sup>b</sup>	ng/mL <sup>a</sup>	μg/g <sup>b</sup>
LOD	0.71	0.29	0.36	0.14
LOQ	2.25	0.90	1.64	0.66

<sup>a</sup> 試験溶液の濃度 (ng 甲殻類タンパク質/mL 試験溶液)

<sup>b</sup> 食品に換算した濃度 (μg 甲殻類タンパク質/g 食品)

性は1.8%以下であった。十脚目の中では、ELISA-IIはELISA-Iと同様に、エビと比較してカニへの反応性が低かった。過去の研究において[2]、ガザミの精製トロポミオシンに対して高い反応性(154%)を示したことから、反応性の差異は、エビとカニに含まれるトロポミオシン含量の違いによるものと考えられる。表5-2に示すように、ELISA-IIはELISA-Iと比較して、十脚目への反応性が高かったが、イセエビは例外であった。この理由は明らかとなっていないが、イセエビに含まれるタンパク質の可溶化については、他の十脚目のタンパク質の可溶化に比べ、 $\text{Na}_2\text{SO}_3$ の効果が低い可能性がある。表5-3および表5-4に示すように、19種類の軟体動物、56種類のその他食品原材料について、交差反応は認めなかった。エビアレルギー患者血清の免疫グロブリンEは、甲殻類と軟体動物の両方のトロポミオシンに反応することが知られている[11]。一方で、ELISA-IIは軟体動物には反応しなかった。日本の食物アレルギー表示制度では、軟体動物ではなく甲殻類を食品ラベルに表示する義務がある。そのため甲殻類への特性が高いELISA-IIは、食品のモニタリングやラベルに対して有望な検査法である。

また、今回の結果は、ELISA-IIがエビ、ロブスター、カニを含む十脚目に対して高い特異性を有することを示す。日本の食物アレルギー表示制度において、甲殻類の中の十脚目に属するエビ・カニに対しては表示義務があるが、十脚目以外については表示義務はない[8]。ELISA-IIは日本の食物アレルギー表示制度に適した高い特異性を有する。

#### 5.3.5 モデル加工食品の回収率と再現性

ELISA-IIの加工食品への適用性を評価するため、ブラックタイガー筋肉タンパク質を含む4種類のモデル加工食品を測定した。表5-5に示すように、4種類

表 5-2 各種甲殻類に対する ELISA-I と ELISA-II の反応性

Sample	Reactivity (%)	
	ELISA-I	ELISA-II
Decapoda group		
Black tiger prawn	100.0	100.0
Northern shrimp	65.8	87.7
Japanese spiny lobster	114.3	65.2
Caribbean spiny lobster	105.6	109.9
Red king crab	38.5	50.5
Swimming crab	28.5	47.0
Other species of Crustacea		
Japanese mantis shrimp	7.6	1.8
<i>Euphausia</i>	1.2	< 0.1
Opossum shrimp	0.1	< 0.1
Acorn barnacle	11.3	< 0.1
Goose barnacle	5.7	< 0.1

表 5-3 各種軟体動物に対する ELISA-II の交差反応性

Sample	µg/g <sup>a</sup>
<b>Cephalopoda class</b>	
Common octopus	< 1.0
Giant octopus	< 1.0
Ocellated octopus (with organs removed)	< 1.0
Japanese common squid	< 1.0
Spear squid	< 1.0
Cuttlefish	< 1.0
Firefly squid	< 1.0
<b>Bivalvia class</b>	
Common scallop	< 1.0
Japanese oyster	< 1.0
Bloody clam	< 1.0
Blue mussel	< 1.0
Short-necked clam	< 1.0
Common freshwater clam	< 1.0
Japanese hard clam	< 1.0
Sakhalin surf clam	< 1.0
<b>Gastropoda class</b>	
Horned turban	< 1.0
Japanese abalone	< 1.0
Whelk	< 1.0
Pond snail	< 1.0

<sup>a</sup> 食品に換算した濃度 (µg 甲殻類タンパク質/g 食品)

表 5-4 その他食品原材料と ELISA-II との反応性

Sample	µg/g <sup>a</sup>	Sample	µg/g <sup>a</sup>	Sample	µg/g <sup>a</sup>
Beef	< 1.0	Peanut	< 1.0	Salmon roe	< 1.0
Pork	< 1.0	Walnut	< 1.0	Cod roe	< 1.0
Pig liver	< 1.0	Almond	< 1.0	Mackerel	< 1.0
Chicken	< 1.0	Cashew nuts	< 1.0	Salmon	< 1.0
Chicken liver	< 1.0	Sesame	< 1.0	Golden threadfin bream	< 1.0
Gelatin	< 1.0	Eggplant	< 1.0	White croaker	< 1.0
Milk	< 1.0	Pumpkin	< 1.0	Walleye pollock	< 1.0
Egg	< 1.0	Onion	< 1.0	Pacific cod	< 1.0
Quail egg	< 1.0	Bamboo shoot	< 1.0	Cutlassfish	< 1.0
Rice	< 1.0	Ginger	< 1.0	Lizardfish	< 1.0
Wheat	< 1.0	Garlic	< 1.0	Alfonsino	< 1.0
Buck wheat	< 1.0	Shiitake mushroom	< 1.0	Pacific whiting	< 1.0
Soybean	< 1.0	Matsutake mushroom	< 1.0	Horse mackerel	< 1.0
Adzuki bean	< 1.0	Potato	< 1.0	Sardine	< 1.0
Coffee bean	< 1.0	Sweet potato	< 1.0	Flying fish	< 1.0
Banana	< 1.0	Japanese yam	< 1.0	Atka mackerel	< 1.0
Apple	< 1.0	Kombu	< 1.0		
Kiwi fruit	< 1.0	Sea lettuce	< 1.0		
Orange	< 1.0	Hiziki	< 1.0		
Peach	< 1.0	<i>Porphyra</i> <i>yezoensis</i>	< 1.0		

<sup>a</sup> 食品に換算した濃度 (µg 甲殻類タンパク質/g 食品)

表 5-5 4 種類のモデル加工食品における甲殻類タンパク質の回収率

Sample	µg/g <sup>a</sup>	Recovery (%)	
		ELISA-I	ELISA-II
Fish meat sausage	10.0	86.7	83.8
Freeze-dried egg soup	11.9	94.3	91.9
Tomato juice	10.0	93.6	91.6
Chicken meatball	10.0	87.8	100.8

<sup>a</sup> 各モデル加工食品に含まれる甲殻類タンパク質濃度( µg 甲殻類タンパク質/g モデル加工食品 )

のモデル加工食品の回収率は 83.8-100.8%の範囲であった。4 種類のモデル加工食品の再現性に関する結果を表 5-6 に示す。日内変動の CV は 2.4-3.1%であり、日間変動の CV は 4.6-8.2%であった。F-検定 ( $F$ 値  $< 3.7$ ) において、ELISA-I と ELISA-II で有意な差はなく、ELISA-II は十分な再現性を示した。

### 5.3.6 加工食品への応用

図 5-2 に示すように、ELISA-I と ELISA-II を使用して 34 種類の加工食品を検査したところ、相関係数は 0.996 であり、近似直線は  $y = 1.06x + 40.8$  であった。日本の食物アレルギー表示制度の基準値は、 $10 \mu\text{g}$  タンパク質/g 食品であることから、低濃度域においても ELISA-II は ELISA-I と十分な相関を示すことが重要である。 $40 \mu\text{g/g}$  未満の低濃度域における、16 種類の加工食品に対する相関係数は 0.988 であり、近似直線は  $y = 0.97x + 1.6$  であった(図 5-3)。ELISA-II は、既に検証済みの ELISA-I [2]と高い相関を示したことから、市販加工食品に含まれる甲殻類タンパク質の定量にも適している。

34 品目の加工食品を測定したところ、甲殻類の原材料表示があった 26 品目について、 $1.0 \mu\text{g/g}$  以上の甲殻類タンパク質を検出した。さらに、他の 8 品目では、甲殻類の原材料表示が無かったが、ELISA-I と ELISA-II の両方で  $1.0 \mu\text{g/g}$  を超える甲殻類タンパク質(ただし  $10 \mu\text{g/g}$  未満)が検出された。この反応性は ELISA 法の偽陽性反応によるものではなく、甲殻類の混入によるものと考えられる。なぜならば、8 品目のうち 6 品目(すり身 3 品目、ちくわ、さつま揚げ 2 品目)は、魚のすり身から作られ、すり身にはしばしば甲殻類タンパク質が含まれていることが、PCR 法で確認されているためである[12]。さらに、8 品目のうち 2 品目(塩辛、海鮮キムチ)はタコを含む。タコのタンパク質は ELISA 法と交差反応を示さないが(表 5-3)、タコは甲殻類を食べることが多いため、胃の

表 5-6 モデル加工食品の測定における日内変動と日間変動

Sample	μg/g <sup>a</sup>	ELISA-I		ELISA-II	
		Intra-assay CV(%) <sup>b</sup>	Interassay CV(%) <sup>c</sup>	Intra-assay CV(%) <sup>b</sup>	Interassay CV(%) <sup>c</sup>
Fish meat sausage	10.0	3.4	6.8	2.7	8.2
Freeze-dried egg soup	11.9	2.8	5.2	2.4	6.3
Tomato juice	10.0	4.3	6.4	2.6	4.6
Chicken meatball	10.0	3.0	8.2	3.1	7.0

<sup>a</sup> 各モデル加工食品に含まれる甲殻類タンパク質濃度( μg 甲殻類タンパク質/g モデル加工食品 )

<sup>b</sup> 同日に実施した 5 回の測定結果から算出した

<sup>c</sup> 異なる日に実施した 5 回の測定結果から算出した

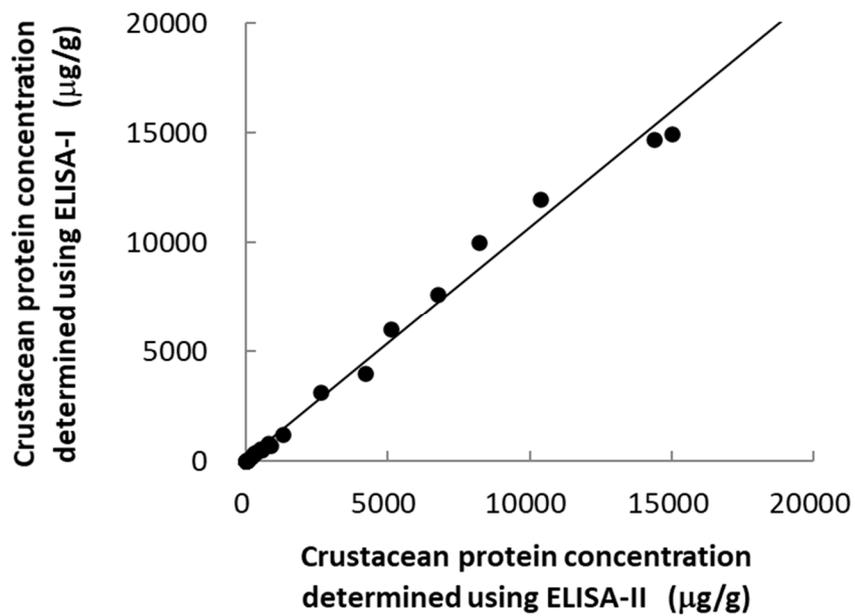


図 5-2 各種モデル加工食品と市販加工食品の測定における  
 ELISA-I と ELISA-II の相関 (<15,000 μg/g の濃度域)  
 (  $n = 34$ ; 相関係数, 0.996 )

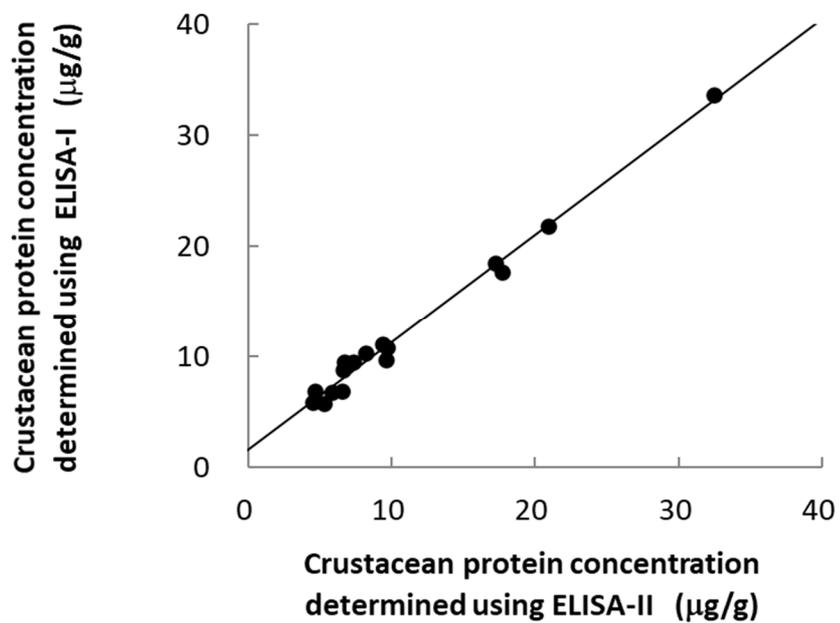
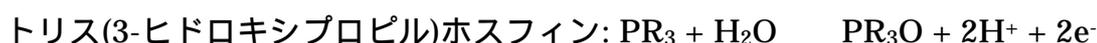


図 5-3 各種モデル加工食品と市販加工食品の測定における  
 ELISA-I と ELISA-II の相関 (<40 μg/g の濃度域)  
 (  $n = 16$ ; 相関係数, 0.988 )

中にしばしば甲殻類が含まれているためである[13]。

本研究では、抽出系に 2-ME と Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> の 2 種類の還元剤を用いて ELISA 法の検討を行ったが、いずれの還元剤を使用しても同等の結果を得ることができた。Ito らは、還元メカニズムが異なる下記 3 種類の還元剤を用いて ELISA 法の比較を行った。その結果、2-ME と同様に SH 基による還元作用を示す 2-メルカプトエチルアミン塩酸塩は、他の 2 種類の還元剤および 2-ME と比較して抽出効率が悪いことおよび、2-ME と Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> で同等の結果が得られることを確認し、抽出効率は必ずしも還元メカニズムと相関するわけではないことを報告している[4]。



ELISA 法の抽出液や検体希釈液中には、還元剤以外にも、緩衝液や界面活性剤などの各種成分が含まれている。そのため、ELISA 法の性能に関しては、還元剤の還元メカニズムよりも、溶液中に含まれる各種成分によってもたらされる溶液全体としての特性（pH、電荷、還元力など）の方がより重要だと推察している。

#### 5.4 まとめ

還元剤として 2-ME の代わりに Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> を用いた抽出系を使用して、加工食品中の甲殻類タンパク質の検出が可能な ELISA 法 (ELISA-II) を構築し、評価した。抽出系の変更が必要となった理由は、過去に我々が開発した ELISA 法 (ELISA-I) で使用していた 2-ME が、2008 年に日本で毒物指定されたためである。還元剤が異なるにも関わらず、ELISA-II は、高感度、高い特異性、十分

な回収率、高い再現性を有し、甲殻類タンパク質を含む市販加工食品の測定において、過去に検証済みの ELISA-I と高い相関を認めた。今回新たに構築した ELISA-II は毒物を使用する必要がなく、十分な精度を有することから、加工食品の日常的なモニタリングに有用である。

本研究では、加工食品中の甲殻類アレルゲンを検出するための、ラテラルフローアッセイ法（第 3 章）および、ELISA 法（第 4 章）を構築した。アレルゲンの表示ミスに起因する食品リコールは年間 627 トン程度と推定される（第 1 章）。また、食品表示ミスによるアレルギー発症の全品目に占める甲殻類の割合は約 2%との報告[14]がある。仮に、アレルゲンの表示ミスに起因する食品リコールのうち、甲殻類の割合が 2%とすると、甲殻類の表示ミスに起因する食品リコールは年間 13 トン程度と推定される。表示ミスの原因としては、甲殻類の使用を把握していながら表示漏れがあるケースや、原材料や製造工程中に甲殻類が混入したことが原因である可能性がある。両原因の比率は明らかではないが、前者が半数以上を占めていると思われる。また、前者は製造管理体制を強化することで、後者は甲殻類アレルゲン検査法で十分に検査することで防止可能なことを考慮すると、甲殻類アレルゲン検査法を有効活用することで、年間 6 トン程度の食品廃棄の削減に貢献できると推定される。

また、本研究で構築したアレルゲン検査法は、数字には表れない形でも、食品廃棄の削減に寄与できる。すなわち、食品会社では、受入原料、製造ライン、最終製品などに対して、アレルゲン検査法で日常的にアレルゲン混入の有無を確認しているが[15]、本研究で構築した甲殻類アレルゲン検査法を用いることで、製造ラインの洗浄不足などに起因する甲殻類アレルゲンの混入を製品の製造前に未然に防ぐことが可能となる。

即時型食物アレルギーによる健康被害に関する全国実態調査では、即時型食

物アレルギーの原因食物は、鶏卵が最も多く 33.4%、牛乳が 18.6%、木の実類が 13.5%であり、甲殻類は 3.3%であった[14]。食物アレルギーの患者数は未だあきらかとなっていないが、240 万人程度と推定(第 1 章)すると、甲殻類アレルギー患者は 8 万人程度と推定される。本研究で構築した甲殻類アレルゲン検査法は、加工食品への適切な甲殻類アレルゲン表示に寄与するものであり、甲殻類アレルギー患者(推定 8 万人程度)の QOL 向上に貢献できる。

## 引用文献

1. Koizumi, D., Shirota, K., Akita, R., Oda, H., & Akiyama, H. (2014) *Food Chem.* 150, 348–352. doi:10.1016/j.foodchem.2013.10.130
2. Seiki, K., Oda, H., Yoshioka, H., Sakai, S., Urisu, A., Akiyama, H., & Ohno, Y. (2007) *J. Agric. Food Chem.* 55, 9345–9350. doi:10.1021/jf0715471
3. Sakai, S., Matsuda, R., Adachi, R., Akiyama, H., Maitani, T., Ohno, Y., Oka, M., Abe, A., Seiki, K., Oda, H., Shiomi, K., & Urisu, A. (2008) *J. AOAC Int.* 91, 123–129.
4. Ito, K., Yamamoto, T., Oyama, Y., Tsuruma, R., Saito, E., Saito, Y., Ozu, T., Honjoh, T., Adachi, R., Sakai, S., Akiyama, H., & Shoji, M. (2016) *Anal. Bioanal. Chem.* 408, 5973–5984. doi:10.1007/s00216-016-9438-7
5. Seiki, K., Oda, H., Shibahara, Y., Gamo, R., Arima, M., Sakai, S., Nakamura, A., Adachi, R., Shiomi, K., Akiyama, H., & Teshima, R. (2010) *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 51, 133–138. doi:10.3358/shokueishi.51.133
6. Greaser, M.L., & Gergely, J. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 4226–4233.
7. Bailey, K. (1948) *Biochem. J.* 43, 271–279. doi:10.1042/bj0430271
8. Akiyama, H., Imai, T., & Ebisawa, M. (2011) *Adv. Food Nutr. Res.* 62, 139–171. doi:10.1016/B978-0-12-385989-1.00004-1
9. van Hengel, A.J. (2007) *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 111–118. doi:10.1007/s00216-007-1353-5
10. Taylor, S.L., Baumert, J.L., Kruizinga, A.G., Remington, B.C., Crevel, R.W.R., Brooke-Taylor, S., Allen, K.J., & Allergen Bureau of Australia & New Zealand Houben, G. (2014) *Food Chem. Toxicol.* 63, 9–17.
11. Leung, P.S., Chow, W.K., Duffey, S., Kwan, H.S., Gershwin, M.E., & Chu, K.H. (1996) *J. Allergy Clin. Immunol.* 98, 954–961. doi:10.1016/S0091-6749(96)80012-1
12. Nakamura, A., Sakai, S., Kawaura, T., Kobayashi, M., Adachi, R., Akiyama, H., & Teshima, R. (2010) *Jpn. J. Food Chem. Safety* 17, 213–220.
13. Villegas, E.J.A., Ceballos-Vázquez, B.P., Markaida, U., Abitia Cárdenas, A., Medina-López, M.A., & Arellano-Martínez, M. (2014) *J. Shellfish Res.* 33, 305–314. doi:10.2983/035.033.0129
14. 令和3年度 食物アレルギーに関連する食品表示に関する調査研究事業報告書. 消費者庁. 令和4年3月.
15. 羽藤公一. 食品会社のアレルギー対策. 幸書房. 2015年9月20日.

## 第6章 結言

水産資源の有効活用を目指して、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試みた。

プロタミンは未利用資源のサケ白子に含まれる抗菌性のタンパク質である。プロタミンの抗菌性は食品保存料として活用されているが、プロタミンの抗菌性が食品保存料以外で活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ている。一方で、バイオマテリアルの移植では細菌感染が問題となっており、特に歯科や代用骨の移植での感染症例が多いことが報告されている。また、化学合成した抗生物質は、耐性菌に関わる憂慮すべき問題に直面している。プロタミンの抗菌メカニズムは、耐性菌の問題は比較的少ないと考えられている、動的流体である病原体の生体膜への作用に関わるものであることから、医療分野で活用できる可能性がある。そこで本研究では、バイオマテリアルの原料として広く用いられているリン酸カルシウムとプロタミンの複合材料を調製し、抗菌性バイオマテリアルとしての性能を評価した。

トロポミオシンは筋原線維タンパク質の一種で、筋収縮を調節するタンパク質として知られている。エビ・カニのメジャーアレルゲンとして知られ、加工食品への表示が義務化されている。食物アレルギー患者の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、加工食品中に含まれる食物アレルゲンに関する適切で、信頼できる情報の提供が必要であるが、これまでに加工食品中のエビ・カニを迅速かつ簡便にモニタリング可能な、十分に検証されたラテラルフローアッセイ法の科学的な報告はない。また、過去に開発した ELISA 法は十分に

検証された検査法ではあるが、抽出系に毒物を含むため、毒物の取り扱いが可能な特定の施設でのみ使用が可能であった。そこで本研究では、簡便かつ十分に検証されたラテラルフローアッセイ法および、毒物を使用しない ELISA 法の 2 種類の検査法を構築し、加工食品中のエビ・カニを検出するための、食物アレルギー検査法としての性能を評価した。

本論文は上記研究を纏めたものであり、以下に得られた知見を総括する。

## 第 1 章 緒言

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 2 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

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、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て、評価した。具体的には、リン酸カルシウム原料として、HAp とその前駆物質である ACP, 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  $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$  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 *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である。

### 第3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

オーラルケア素材の基礎研究として、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MG-63細胞の増殖試験を行ったところ、いずれの複合粉体も増殖阻害を示さなかった。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である。

### 第4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

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、信頼できる情報の提供のために、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、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/L, 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。

## 第 5 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

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、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-ME を使用したが、ELISA-II では、2-ME の代わりに  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  を使用した。ELISA-II は高感度 (定量限界:  $0.66 \mu\text{g}$  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 CV, 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タンパク質の検査に有用である。

以上、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細菌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、食物アレルギー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。

## 本論文に関連した公表論文および学会発表ほか

### 公表論文

1. 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.*, 33, 35(2022); doi: 10.1007/s10856-022-06656-5
2. 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. Socs.*, 10, 1(2022); doi: 10.1080/21870764.2022.2035488
3. M. Fujiki, K. Abe, T. Hayakawa, T. Yamamoto, M. Torii, K. Iohara, D. Koizumi, R. Togawa, M. Aizawa and M. Honda, “Antimicrobial Activity of Protamine-Loaded Calcium Phosphates against Oral Bacteria”, *Materials*, 12, 2816(2019); doi:10.3390/ma12172816
4. D. Koizumi, K. Shirota, H. Oda, R. Adachi, S. Sakai, H. Akiyama, T. Nishimaki-Mogami, 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.*, 101, 3(2018); doi: 10.5740/jaoacint.17-0324
5. D. Koizumi, K. Shirota, R. Akita, H. Oda, H. Akiyama. “Development and validation of a lateral flow assay for the detection of crustacean protein in processed foods.”, *Food Chem.*, 1, 150(2014); doi:10.1016/j.foodchem.2013.10.130

### 学会発表

1. 豊福航平, 相澤 守, 本田みちよ, 早川 徹, 山本雄嗣, 鳥居麻菜, 廣田正嗣, 小泉大輔, 外川理絵, 安井幸輔, 庵原啓司, “根面う蝕に対するプロタミン分解物担持リン酸カルシウム粉体の抗菌性評価”, 第 24 回生体関連セラミックス討論会, 2021.12.10
2. 豊福航平, 本田みちよ, 相澤 守, 早川 徹, 山本雄嗣, 鳥居麻菜, 廣田正嗣, 庵原啓司, 小泉大輔, 外川理絵, 安井幸輔, “プロタミン分解物担持リン酸カルシウム粉体のオーラルケア素材への応用”, 日本セラミックス協会 第 34 回秋季シンポジウム, 2021.9.2
3. 豊福航平, 藤木政志, 相澤 守, 本田みちよ, 早川 徹, 山本雄嗣, 鳥居麻菜, 廣田正嗣, 小泉大輔, 外川理絵, 住田基樹, 庵原啓司, “プロタミン分解物担持リン酸カルシウムの口腔内細菌に対する抗菌性評価”, 日本セラミックス協会 2020 年年会, 2020.3.2
4. 藤木政志, 早川 徹, 山本雄嗣, 小泉大輔, 外川理絵, 庵原啓司, 相澤 守, 本田みちよ,

“プロタミン担持リン酸カルシウムを用いた新規知覚過敏抑制材の開発”, 第 40 回日本バイオマテリアル学会大会, 2018.11.13

5. 小泉大輔, 清木興介, 織田浩司, 中村健人, 酒井信夫, 穠山浩, 安達玲子, 手島玲子, “加工食品中に混入する甲殻類タンパク質について”, 第 98 回日本食品衛生学会学術講演会, 2009.10.18
6. 秋田涼子, 小泉大輔, 織田浩司, 清木興介, 酒井信夫, 安達玲子, 穠山浩, 手島玲子, “イムノクロマト法による甲殻類原材料検出キットの開発”, 第 98 回日本食品衛生学会学術講演会, 2009.10.18

## その他

1. 小泉大輔, 代田和也, 織田浩司, “アレルギー管理に有用な甲殻類検査キット=甲殻類キット 「マルハニチロ」とえびかにキャッチャー「マルハニチロ」=”, クリーンテクノロジー, 24, 10(2014)
2. 織田浩司, 小泉大輔, “アレルギー管理に有用な甲殻類原材料検出キットの開発”, アレルギーの臨床, 31, 9(2011)

## 謝辞

本論文を纏めるにあたり、非常に多くの方々からご指導及びご助言を賜りました。

本研究を行う機会を頂き、また親身にご指導を頂きました明治大学理工学部応用化学科専任教授 相澤 守 先生に心から御礼申し上げます。

本論文の副査をご担当していただきました明治大学理工学部応用化学科 専任教授 渡邊友亮 先生、明治大学理工学部応用化学科 専任教授 本田みちよ 先生に深く感謝致します。

プロタミン/リン酸カルシウム複合粉体の研究において、多くのご協力を頂きました鶴見大学歯学部 教授 早川 徹 先生、教授 山本雄嗣 先生、助教 鳥居麻菜 先生、助教 廣田正嗣 先生、明治大学 相澤 守 先生、本田みちよ 先生、南澤宏瑚 先生、鈴木 来 先生、阿部航大 氏、藤木政志 氏、豊福航平 氏、マルハニチロ株式会社 芦田慎也 氏、庵原啓司 氏、外川理絵 氏、安井幸輔 氏に深く感謝致します。

甲殻類アレルギー検査法の研究において、多くのご協力を頂きました国立医薬品食品衛生研究所 最上(西牧)知子 先生、手島玲子 先生、安達玲子 先生、穂山 浩 先生、酒井信夫 先生、マルハニチロ株式会社 清木興介 氏、織田浩司 氏、秋田涼子 氏、代田和也 氏に深く感謝致します。

以上に述べました方々および御氏名を上げることがを略させて頂きました多くの方々へ心より厚く御礼申し上げます。

最後に、暖かい励ましとサポートをいただいた家族に心より感謝致します。

2022年6月

小泉 大輔