

## K16

(九大工) ○(学)森山 幸祐・(阪大院基工)(正)境 慎司\*・(九大工)(学)廣瀬 圭介・

(九大院工)(正)武井 孝行・(正)井嶋 博之・(正)川上 幸衛

【緒言】ゼラチンとはコラーゲンを加水分解して得られる天然高分子であり、高い生体親和性、生分解性を有することから医用材料として用いられている。ゼラチンの特徴は温度によるゾル-ゲル転移を可逆的に起こすことである。そのため冷却による相転移のみを利用したゼラチンゲルは生体内や細胞培養時の温度においてゲル状態を保つことができない。これらの温度におけるゼラチンゲルの融解を防ぐため、ゼラチンに含まれるチロシンに着目し、分子内に共有結合を形成させることを試みた。チロシンはフェノール性水酸基を有するアミノ酸である。フェノール性水酸基は  $\text{H}_2\text{O}_2$  を消費するペルオキシダーゼ酵素反応により共有結合を形成することから、同様の機構によりゼラチンの分子内架橋が可能であると考えられる。本発表では、ペルオキシダーゼ酵素反応を利用して作製したゼラチンゲルの特性を評価したのでその結果を報告する。

【実験方法】ゼラチンゲルの作製 5 % (w/v) のゼラチン水溶液に、1, 10, 100 units/ml となるように西洋わさび由来ペルオキシダーゼ(HRP)を溶解させ、それぞれ透析膜(直径:1 cm)に入れた。次いで以下に示す2つの条件でゲルを作製した。まず1つ目の条件では、HRP-ゼラチン水溶液を入れた透析膜を濃度 1 mM の  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液 5 L 中に入れ、37°C環境下において12時間静置させ、ゼラチンの分子内架橋を行った。その後、透析膜を5 L の蒸留水中に移し、室温(26°C)で12時間静置させた(without thermally gelation process)。2つ目の条件では、HRP-ゼラチン水溶液を入れた透析膜を5 L の蒸留水中に入れ、4°Cで12時間静置し、相転移によりゼラチンをゲル化させた。その後、透析膜を濃度 1 mM の  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液 5 L 中に浸し、室温(26°C)で12時間静置させることでHRPの酵素反応を利用し分子内架橋を行った(with thermally gelation process)。またコントロールとして、HRP未添加のゼラチン水溶液でも同様の操作を行った。

37°C環境下における安定性 ゲルを透析膜から取り出し、厚さ1 cmに切った。その後、ゲルを37°C環境下で静置させ、1時間後に形態観察を行った。

膨潤率の測定 上記の検討において融解しなかった条件のゲルを厚さ5 mmに切った。その後、ゲルをプラスチック容器に入れ、37°Cの蒸留水に浸し、3時間と6時間後の質量を測定することで膨潤率を算出した。

【結果と考察】HRP未添加のゼラチンゲル(コントロ

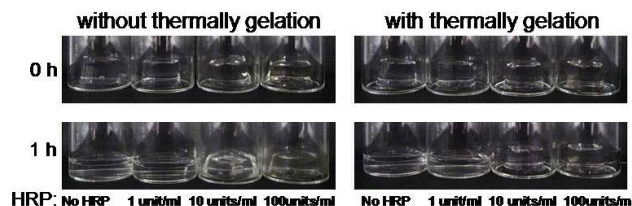


Fig.1 ゼラチンゲルの形態

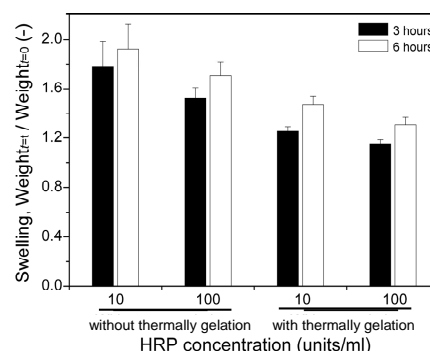


Fig.2 蒸留水中でのゼラチンの膨張率(n=6, Bars:SD)

ール)は37°C環境下において1時間静置後、融解していたのに対し、10及び100 units/mlのHRPを添加したゼラチンゲルは残存していた。これはペルオキシダーゼ酵素反応により、チロシン中のフェノール性水酸基間に共有結合が形成されたためであると考えられる。しかし、HRP濃度が1 unit/mlのゼラチンゲルは37°C環境下において1時間静置後、融解していた。これは、低酵素濃度であったことから架橋密度が不十分であったためである。

37°Cの蒸留水中での膨潤挙動に関しては、HRP濃度が100 units/mlのゲルは10 units/mlのゲルに比べ膨潤率が低下した。これは酵素濃度が高くなったことでHRPとフェノール性水酸基との接触頻度が増え架橋密度が高くなったためであると考えられる。次に作製条件に違いによる比較を行うと、温度によりゲル化させたゼラチンゲルは温度によるゲル化を経てないゼラチンゲルと比べ膨潤率が低下した。これは、温度によるゲル化を経たゲルはゼラチン分子がヘリックス構造を形成することから酵素反応により、ヘリックス構造中に共有結合が形成され、より強固なゼラチンゲルとなったためであると考えられる。

【結言】ゼラチンをペルオキシダーゼ酵素反応させ分子内架橋を行わせることで、冷却による相転移のみを利用して作製したゼラチンゲルと異なる性質を有するゼラチンゲルの作製が可能であった。

\*E-mail: sakai@cheng.es.osaka-u.ac.jp