

## 共同研究中間報告

2008年9月25日

高知大学理学部 北條正司

### 新冷凍技術を利用した凍結乾燥による生物組織の高機能保存法の開発

#### はじめに

電界場による新冷凍技術は、有効性が実証され、実用化が進みつつある。この新冷凍技術を真空乾燥の前段階及び真空乾燥進行中等に適用すると、生体組織の損傷を最小限におさえることができる。

本共同研究において、生物組織の高機能保存法を開発し、ワクチンなどの長期保存を可能にすることが、目的である。また、併用する凍結技術の進歩により動物の精子などの保存状態を飛躍的に向上させることも可能となる。

本研究は、新冷凍技術を併用することにより、冷凍乾燥時等の生物組織の損傷を最小限におさえ、生体試料の高機能保存を実現するものである。既に、新冷凍技術として、 $-20$  程度の冷凍庫内において、高電圧（直流及び交流電流）で誘起される電界をかけ、各種食品の風味や品質を劣化させることなく冷凍できる画期的な手法を開発している。高電圧により誘起された電界を印加しながら、 $-20$  ~ 液体窒素温度において、生体組織を凍結し、真空乾燥させることにより、生体組織の機能を高度に維持できる。

各種の伝染病の予防にはワクチンの接種が効果的であるが、その長期保存法の開発は重要な課題とあっている。ワクチンを長期保存する方法として、BCG ワクチンなどについては古くから冷凍（真空）乾燥の技術が使われている。しかし、ワクチンを凍結乾燥することにより、その機能の一部が損なわれ、歩留りが大幅に低下する（ $20 \sim 30\%$ ）ことが多い。各種ワクチンは特定の期間で大規模に製造されるばかりではなく、各大学病院や研究所等で、試験的に製造されている。製造したワクチンの有効期間を延長させるには、優れた冷凍乾燥技術が必要であるが、本冷凍技術は極めて有用であるといえる。

本研究中では、試料として生体触媒である酵素を用いた。酵素は活性中心がタンパク質によって取り囲まれている生体高分子である。

酵素 HRP（ホースラディッシュペルオキシダーゼ）を液体窒素温度（ $-196$ ）に冷却し、凍結によるタンパク質の損傷の程度を、酵素活性から判定した。液体窒素温度による冷却・凍結によって酵素の活性は低下する。しかし、電界を印加することにより、酵素の活性は未処理の酵素活性を保持した。このように液体窒素温度の冷却をしても電界を印加することにより、酵素のタンパク質が損傷を受けないことが明らかになった。

## 実験

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>によるABTSの酸化反応に、酵素としてHRP（ホースラディッシュペルオキシダーゼ）を用い、その酵素活性を評価した。水溶液系において、クエン酸-クエン酸ナトリウム緩衝液濃度の変化により、酵素活性がどう変化するかを観測した。

酵素の処理方法は三種類であり、(A) 液体窒素で15分間冷却した酵素、(B) NICE-1により電界を印下しながら液体窒素で15分間冷却した酵素、(C) コントロールとして未処理の酵素である。本冷却実験には、「ITO蒸着ナス型フラスコ」を用いた。

## 《試薬》

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Assay 30~33.5%) [和光特級]

ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) Diammonium salt)  
[Fluka]

PEROXIDASE (HRP・ホースラディッシュペルオキシダーゼ) [SIGMA]

クエン酸[和光特級]

クエン酸三リチウム四水和物[Fluka]

クエン酸三ナトリウム二水和物[和光特級]

クエン酸三カリウム一水和物[和光特級]

## 《装置》

島津 UV-2550 可視・紫外分光光度計

pH メーター [堀場, pH Meter F-13]

## 《実験操作》

〈実験 I (緩衝液濃度による活性値の変化およびpH変化)〉

クエン酸 50 mM, クエン酸ナトリウム 100 mM のクエン酸ナトリウム緩衝液 (100 mM) を調製し、それを希釈し 2 倍(50 mM), 5 倍(20 mM), 10 倍(10 mM), 20 倍(5 mM), 50 倍希釈(2 mM) の溶液を作成した (\*カッコ内はクエン酸ナトリウム濃度を示す)。また、また、クエン酸 100 mM, クエン酸ナトリウム 200 mM のクエン酸ナトリウム緩衝液(200mM) とクエン酸 150 mM, クエン酸ナトリウム 300 mM のクエン酸ナトリウム緩衝液(300 mM) も作成した。

その緩衝液をそれぞれ 3 ml ずつ試験管に測り取り、0.012 M ABTS を 10 μL, 0.0262 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を 10 μL 添加した。反応は、その溶液を 1 cm セルに入れた後、30 ppm の HRP (ホースラディッシュペルオキシダーゼ) を 10 μL 添加しふたをし、3 秒間シェイク (上下に 3 回) することで開始した。測定は、開始 10 秒後に行い、ABTS の酸化の反応速度を UV-VIS スペクトルメーター (島津

UV-2550) を用い 414 nm の吸光度を測定することで追跡した。0 ~ 50 秒における時間当たりの吸光度の変化を活性値 (Abs. / 分) とし, 反応速度を示す指標とした。活性値測定はそれぞれ少なくとも 3 回ずつ行いその平均値を取った。

### 実験結果と考察

試料(A)(B)および(C)の酵素活性に関する実験結果を表 1 および図 1 に示す。クエン酸緩衝液濃度は 5 - 100 mM に変化させて酵素活性を測定している。いずれの濃度のクエン酸緩衝液においても, (A)は(B)に比べて低い値となった。一方, (B)は(C)に近い活性を保持した。

液体窒素の低温下で処理することにより, 酵素内タンパク質に含まれる水の氷結等により, タンパク質が損傷を受け, 酵素活性は低下する。しかし, 電界を印加することにより, 水の氷結等が緩和されることにより, 酵素に含まれるタンパク質が損傷を受けることが避けられた。そのため, 液体窒素で冷却処理しても, 未処理の酵素と同等の活性を維持できるものと考えられた。

タンパク質など高分子状の中の水の氷結状態を, 何らかの手段により観測する必要がある。

表 1 クエン酸緩衝液濃度変化による酵素活性値

	5 mM	10 mM	20 mM	50 mM	100 mM
A	0.3198	0.3872	0.4157	0.5001	0.5344
B	0.3855	0.4098	0.4792	0.5360	0.5972
C	0.3752	0.4422	0.4765	0.5242	0.5981

図 1 処理方法の異なる試料の酵素活性値の変化

