

貝類殻体からの活性有機分子の分離精製法開発

久保木 芳徳 [北海道大学 / 名誉教授]
巨理 文夫 [北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座 / 教授]
滝田 裕子 [北海道大学大学院歯学研究科研究援助部 / 助教]
北川 善政 [北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座 / 教授]
小砂 憲一 [アミノアップ化学 / 代表取締役社長]
藤井 創 [アミノアップ化学 / 研究開発部門室長]

背景・目的

北海道では貝類とくにホタテ貝の殻が豊富に得られる。殻の大部分を構成する炭酸カルシウムは活用すれば貴重なカルシウム源となるが、そのほかの数%の有機物質には、最近になって様々な生化学的活性物質が報告された。とくに、骨、皮膚などの結合組織の細胞を活性化する蛋白質が含まれているらしい (Nature392:, 861-862, 1998)。そこで、これら貝の有機ならびに無機成分を活用し、皮膚の活性化 (スキンケア) や、細胞の大量培養、骨の局所的な再建に役立てるため、申請者らの技術を活用し、新しい道内産業を創造する。

内容・方法

ホタテ貝、およびアコヤ貝の殻の成分を有機物質と、無機物質に分け、それぞれの成分を無駄なく利用するため次の方法を確立した。

1. 前処理、洗浄(残留する軟組織を除去、外側の不純物を除去)
2. 液体窒素を使った冷凍技術で殻体を粉砕
3. 酸脱灰後の抽出
4. 酸脱灰液を遠心により上澄み残渣に分ける
5. 上清を、トリス緩衝液中で中和しつつ、高濃度の磷酸第2ナトリウムを加えてゆくことによってヒドロキシアパタイトを合成する(これを貝由来の「バイオアパタイト」と呼ぶ)
6. バイオアパタイトを水洗後、液体クロマトグラフィーのカラムに充填し、リン酸カリウムの濃度を段階的に上げて、バイオアパタイトに吸着していたタンパクを溶出させた。
7. 溶出液を、透析、凍結乾燥して0.1M、0.5M、および1.0Mリン酸溶出分画を得る。
8. 各分画を単独または、BMPと共に、ラットの皮下にキャリアーと共に埋植に、骨形成促進効果ならびに組織の反応を測定した。
9. 組織切片を作製して組織像を分析した。
10. 細胞培養と生化学的活性測定(表皮細胞、線維芽細胞、骨芽細胞を培養して、分離精製した貝由来活性物質の細胞増殖・分化促進活性を、生化学的手段によって測定する。

結果・成果

- (1) カルシウムの新しい回収法の確立
貝殻の無機質をヒドロキシアパタイト(バイオアパタイト) として効率よく回収することが出来た。すなわち、ホタテ貝、およびアコヤ貝の粉末を脱灰した液中には、高濃度のカルシウムが残っているが、これをpH6に上昇させて、リン酸を加えることにより、効率よくヒドロキシアパタイトを回収することが出来た。この新しい方法は、貝からカルシウムの回収方法として重要な開発である。出来た新製品は貝由来の「バイオアパタイト」と呼ぶことにした。
- (2) 環境排水からのリン酸イオンの回収方法の確立
一方、粉末の酸脱灰液は、pH6において2-3mM程度の低濃度のリン酸イオンを含む液から、回収が容易な白色沈殿を生ずることが分かったので、排水中からのリン酸の回収(現在、環境問題において大きな課題の一つである) に大いに役立つことを見出した。
- (3) バイオアパタイト・カラムクロマトグラフィー
バイオアパタイトを水洗後、貝殻の有機物質が吸着したまま、液体クロマトグラフィーのカラムに充填し、リン酸カリウムの濃度を段階的に上げて、バイオアパタイトに吸着していた有機物質(主としてタンパク) を溶出させることが出来た。この方法は、アパタイト吸着性の貝の有機性物質、タンパクを効率よく回収する方法として利用価値があった。
- (4) 有機成分の生物学的活性の追求
バイオアパタイトカラムクロマトグラフィーからの溶出液を、透析、凍結乾燥して0.1M、0.5Mおよび1.0Mリン酸溶出分画に分けることが出来た。これらの各分画は、単独または、BMPと共に、ラットの皮下に各種のキャリアーと共に埋植し、骨形成促進効果ならびに組織の反応を測定中である。現在、大量の細胞(炎症性の細胞と推定される) がキャリアー内に集積されることが分かった。このような強力な細胞集積能力の由来は何か? また、この細胞の性質を追求中である。

さらに、骨芽細胞、軟骨細胞、線維芽細胞の培養中に、各リン酸溶出分画を添加した際の、細胞成長と分化に対する影響を分析する予定である。

今後の展望

- 今後、次の2点に絞って研究を進める予定である。
- (1) バイオアパタイトの利用、(2) 排水からのリン酸イオンの回収方法の確立
 - (1) 貝殻の無機質をヒドロキシアパタイト(バイオアパタイト) として効率よく回収することが出来たので、この新しい方法を、貝からカルシウムの回収方法とし大規模化する。今後その中から有用な有機成分を単離同定すると共に、未精製のバイオアパタイト自身もそのまま、スキンケア、実験的骨形成に応用する予定である。肥料としての応用も当然ながら予定している。
 - (2) 貝の酸脱灰液を、環境排水中のリン酸の回収に利用する方法は、現在、北海道大学工学部、船水尚行教授のグループと協同で、その実用化を急いでいる。