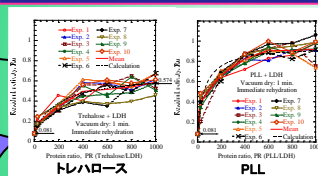


乾燥・再水後のLDH活性に及ぼすLDHと保護物質質量(プロテイン比)の影響

保護物質(トレハロース、PLL)の質量とタンパク質質量の混合割合により、乾燥・再水後の活性がどのように変化するかを測定した。

<プロテイン比の定義> 保護物質の質量/LDHの質量

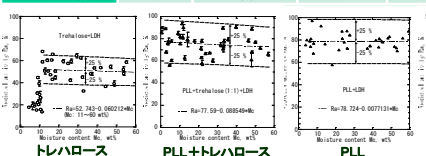


<まとめ>
 * 添加物なしのLDHの活性は0.081
 * トレハロース、PLL共にプロテイン比800~1000で活性は飽和する。
 * プロテイン比1000での活性は、トレハロース:0.874, PLL:0.805であった。
 * Langmuir吸着モデル式で最小二乗近似すると、平衡定数Kは、トレハロース:0.12, PLL:5.3で、PLLが44倍高い。
 * 高野・白根,日本伝染病学会誌(2020)

LDH乾燥試料の水分率と再水後の残存活性

種々の保護物質+LDH試料について、真空乾燥後の含水率を測定し、直ちに給水(再水)した場合のLDH活性(残存活性)との関係が明らかになった。

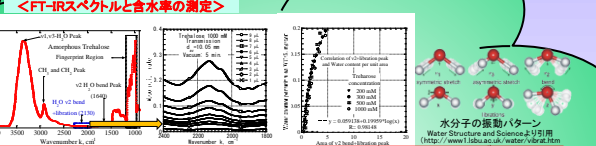
Protective agent	Mixing ratio	Concentration wt%	Dilution ratio of LDH	Protective agent/LDH protein
Trehalose		31.8		1000
Boron-trehalose	R=1.2	30.0	50-fold	1086
PLL		25.0		828
PLL-trehalose	1:1	25.0		884



K. Takano, R. Shirakashi, Trans. JASRAE, Vol.35, No.4(2019) pp.325-330.

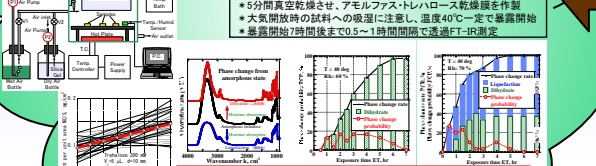
<まとめ>
 * トレハロースは含水率10wt%で活性低下
 * PLL, PLL+トレハロース(1:1)は80%程度の残存活性があることが明らかになった。

トレハロース乾燥膜の赤外吸収スペクトルと含水率・吸湿特性の測定



<まとめ> アモルファストレハロースが容易に作製でき、吸収スペクトルと含水率の相関式を作成した。

<FT-IRスペクトル、含水率と吸湿特性の測定> <実験方法>



<まとめ>
 * アモルファストレハロースの温度・湿度と相変化特性が解明された。
 R. Shirakashi and K. Takano, Pharm Res (2019) 36: 139.

<凍結・乾燥保存の知見に関する基礎知識>

凍結や乾燥をさせると、なぜ保存できるのか？(2種類の効果)

1. 変性(構造変化)を遅延
分子運動(生化学反応)を低下させ、劣化の速度を遅らせる。
* 温度を下げる。
* 余分な水分を除去する。
* 溶液をガラス化させる。(結晶化させない)
* タンパク質の凝集を遅らせる。
2. タンパク質の高次構造を維持
保護物質でタンパク質を保護したり、水分と置換することで高次構造を維持する。

<常温乾燥保存における重要事項>

- * タンパク質の活性を維持したまま余剰の水分を除去する。
- * 常温以上でガラス化する保護物質を測定し、使用する。
- * 試料の含水率、プロテイン比と再水後の活性の関係の解明する。

<ガラス化とは？>

液体が結晶構造をとらず(非晶質)、分子がランダムな状態で動かない状態になること。一般的に凍結はガラス転移温度T_gが高く、一部は常温以上でガラス化する。

<安全性は？>トレハロース、PLLは食品添加物として使用されている。

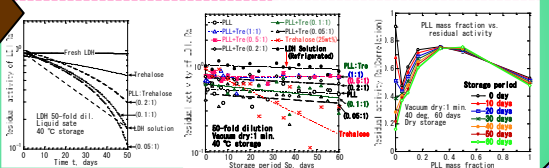
Continue to the future

保護物質+LDHの液体・乾燥状態での長期保存

<実験方法> トレハロースとPLLの混合割合を変え、40℃環境で80日間保存

<実験結果> <液体状態> <乾燥状態>

- (1)LDHのみ(保護物質なし)の活性低下は顕著
- (2)トレハロース単成分は、活性低下が小さい
- (3)PLLの混合割合が低いほど活性は低下する
- (1)トレハロースの活性低下が顕著⇒水中和?
- (2)トレハロース以外は80日後の活性低下が小さい
- (3)PLL質量分率に最適値が存在する可能性

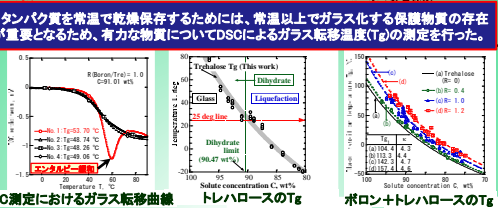


液体状態での保存結果 乾燥状態での保存結果 PLLの質量分率と活性(乾燥試料)

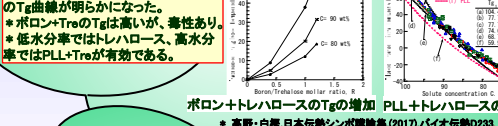
* 高野・白根,日本伝染病学会誌(2019),バイオ伝染3131.

保護物質のガラス転移温度の測定

<示差走査熱量測定(DSC)とは？> 標準物質と試料の温度を比較しながらプログラムされた温度変化をさせ、試料の相変化などに伴う発熱・吸熱量を測定する方法



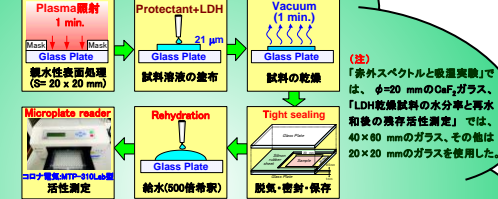
<まとめ>
 * トレハロース、ポロソ+Tre, PLL+TreのT_g曲線が明らかになった。
 * ポロソ+TreのT_gは高いが、毒性あり。
 * 低水分率ではトレハロース、高水分率ではPLL+Treが有効である。



ポロソ+トレハロースのT_gの増加 PLL+トレハロースのT_g

* 高野・白根,日本伝染病学会誌(2017),バイオ伝染D233.

乾燥試料の作製・保存・給水・活性測定



<試料溶液の作製と活性測定>
 * LDH原液を純水で5倍希釈
 * LDH 5倍希釈水溶液を保護物質で10倍に希釈(LDH50倍希釈)
 * 乾燥後LDH500倍希釈になるように再水

* 試料タンパク質: βタ由来乳酸脱水酵素 L-Lactate dehydrogenase from Pig heart (LDH) Act. 5000 U/ml
 Protein= 14.4 mg/mL, 分子量: 約135,000 g/mol
 * 比較的乾燥に弱い
 * 血液検体の測定指標として用いられている酵素分析法(340nmの吸光度測定)

保護物質	分子量(g/mol)
トレハロース	342.296
PLL (ε-Poly-L-Leine)	約4700
トレハロース+PLL混合物	
四水ウランナトリウム+トレハロース	

(注) *トレハロース、PLLは食品添加物にも使用されている。
 *四水ウランナトリウム(ポロソ)は、若干の毒性を示す。

研究テーマ: 医療検体・タンパク質などの高品位・常温乾燥保存

<研究の背景>

血液やタンパク質などの医療検体のある成分は、常温では短時間で劣化するため、通常、低温や凍結・凍結乾燥状態で保存する。しかしながら、低温の維持・管理には多大な手間やコストが必要となる。

常温・乾燥状態で長期間保存し、必要時に給水して使用することが可能になれば手間やコストが大幅に削減され、医療・製薬・食品など、応用分野は非常に広い。

<広範な温度・乾燥状態で生息できる自然界の生物>

