養生温度がムラサキイガイ付着盤の接着強度におよぼす影響

青木路人¹⁾・小池卓二²⁾・村上小百合²⁾・本間恭二^{2)*}

¹⁾ 電気通信大学大学院電気通信学研究科 〒182-8585 調布市調布ヶ丘1-5-1

²⁾ 電気通信大学電気通信学部 〒182-8585 調布市調布ヶ丘1-5-1

Influence of curing temperature on adhesive strength of byssus plaques in a marine mussel

Michihito Aoki¹⁾, Takuji Koike²⁾, Sayuri Murakami²⁾ and Kyoji Homma^{2)*}

¹⁾ Graduate School of Electro-Communications, The University of Electro-Communications, 1-5-1 Chofugaoka, Chofu-shi, Tokyo 182-8585, Japan

²⁾ Faculty of Electro-Communications, The University of Electro-Communications, 1-5-1 Chofugaoka, Chofu-shi, Tokyo 182-8585, Japan

*Corresponding author: homma@mce.uec.ac.jp

(Received December 17, 2007; Accepted March 28, 2008)

Abstract

Mussel adhesive protein (MAP) shows promise for the future as a new artificial adhesive material for bonding surgical incisions. The adhesive properties of MAP, however, have not been clarified until now. The purpose of this study was to assess the adhesive strength of MAP with respect to various substrates. The effect of curing temperature on the curing time of MAP after bonding to the substrate was also investigated. Adhesive strength was measured, using a newly developed peel test, using byssus preparations exposed to different curing temperatures (20°C, 40°C, 70°C) for 24 hours following an initial 48 hours of curing at 20°C. Adhesive strength depended on the curing temperature, being 19% lower at a curing temperature at 40°C than at 20°C, and 41% lower at 70°C. In terms of its adhesive strength, MAP may thus be suitable as a medical adhesive in surgery.

Key words: biomaterials, adhesive protein, adhesive strength, peel test, curing temperature

1. 序論

最近、医療分野からムラサキイガイ (Fig. 1) のタンパク質が持つ、強力な付着力と生体との親和性に期待が寄せられている (Waite, 1991)。これまで湿潤環境で使え、安全かつ強力な接着力を有するものがなかったからである。海洋生物が作る付着機能を持つタンパク質は、これまでに数種類見出されている。その中で特にムラサキイガイの持つタンパク質 (MAP: Mussel Adhesive Protein) について、J. H. Waiteらのグループが中心となり、現在化学的な観点から精力的に研究が行われている。

Fig. 1 Schema of adhesion in a mussel.

Fig. 2 Adhesive morphology of a byssus end. Fp: Foot Protein.

ムラサキイガイは足糸 (byssus) と呼ぶ糸状のタンパク質によって基盤に付着している。この足糸末端部は、基盤との接着界面、付着盤 (plaque) のバルク部、糸 (thread) 部分に大別でき、コラーゲンやFpと呼ばれるタンパク質から構成される (Fig. 2)。これらのタンパク質に関して、主に生化学 (Waite and Tanzer, 1981; Coyne *et al.*, 1997) や接着機構 (Waite, 1992; Lin *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007) などの研究がなされており、現在はDNAの解析 (Miki *et al.*, 1996; Inoue, 1997) や、接着成分の人工合成 (Yamamoto, 2000) などの研究が進められている。

こうした化学的な知見が蓄積されている一方で、糸部や付着盤バルク部の強さ、接着界面の強度などの機械的な性質に関する報告は十分でない。機械的強度においては、糸部の引張強度 (Sun *et al.*, 2001) について述べているものは多いが、接着に関わる付着盤と基盤との界面接着強度 (以下、接着強度と略する) について報告している論文は少ない (Young and Crisp, 1982)。例えば Allen *et al.* (1976) や Crisp *et al.* (1985) は、糸部を基盤に垂直に引っ張り、付着盤がはがれる際の荷重の大きさを測っているが、いずれも引張負荷の最終強度値を測定しているに過ぎず、接着強度評価で問題となる界面のせん断強度およびはく離強度については言及されていない。また、Lee *et al.* (2006) がFpに特徴的に含まれるDopa (3, 4-dihydroxyphenylalanine) 単分子についての接着力を測定したように、最近では原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて接着力を測定している研究が見られる。しかし、この接着力はミクロスケールにおける理想的な接着状態のものであり、マクロな接着面積を持ち多数の欠陥を有する場合の接着強度とは異なる。

接着現象は物理と化学の境界領域に位置し、様々な素過程からなる複雑な問題であることから、化学的手法あるいは物理的手法だけで接着現象を解明することはできない。しかし、実際問題として接着強度といった場合は力学的つまり物理的な側面が強く、マクロスケールで接着がどの程度の外力に耐えられるかを知りたいということである。これには自由表面が現れるまで引張力あるいは、せん断力を負荷する方法でおおよそその値を求めることが一般的である。

このように、マクロスケールにおける接着強度を正確

に測定した例はこれまでになく、10m/sを越えるほどの水流にも耐える (Waite, 1997) といわれるムラサキイガイの岩礁への付着力についても、その接着強度を支配する要因はほとんど明らかになっていない。この接着タンパク質を医療用接着剤として応用するためには、接着強度などの機械的性質を定量化する必要がある、これまでガラス基盤に対する接着強度のうち、はく離強度について、破壊力学的手法を導入することで検討してきた (本間・青木, 2006)。

ムラサキイガイ付着盤はタンパク質からなるため、付着後の時間経過とともに劣化するものと考えられる。この付着盤の接着強度の経時変化については既に報告しているが (青木ほか, 2007)、医療用として体内で利用することを考えた場合、雰囲気温度をパラメータとしたときに、どこまで接着強度を維持できるかを知ることが実用化の重要なポイントとなる。そこで本論文では、温度に注目し、ムラサキイガイの付着盤をガラス基盤に付着させた後の温度変化が、付着盤をはく離するときの接着強度に与える影響について調べた。

2. 実験方法

ムラサキイガイの接着部位である付着盤に対して、後述のようにバルクな接着力を求めるためにははく離試験方法を用いてガラス基盤に対する接着強度を測定した。付着盤が分泌されてから、はく離試験を行うまでの間 (養生期間) において、養生温度である雰囲気温度を変化させ、その後の接着強度に与える影響を調べた。

2. 1 はく離試験方法

試験片となる付着盤は円盤に近い形を持ち、直径は約2mm、厚さも約100 μ mと小さいため、粘着テープなどの試験に用いられる規格化された方法 (JIS K 6854) が適用できない。そこでヘラ状のプロブを用いた独自の

Fig. 3 Schematic drawing of the peel test.

Fig. 4 An example of the load-displacement curves obtained by a peel test. F: peeling force, W: contact width, f: peeling force per width, P_s : adhesive strength (peeling strength).

く離試験方法を考案した。Fig. 3のように、厚さ0.15mmのステンレス板 (SUS304) を加工し、先端にカミソリ刃を取り付け、ひずみゲージを貼付したプローブを45℃となるよう支持台に固定した。モータによりステージを一定速度 (1.0mm/min) で送ることで、プローブのくさび力により付着盤を板ガラス (ソーダライムガラス) からはく離した。この時のプローブのひずみ量から、はく離に要した水平方向の荷重 (はく離荷重F) を求めた。ひずみ量は10Hzのサンプリング周波数で記録した。はく離試験は空气中 (20℃) で行い、付着盤は湿潤状態で測定した。

Fig. 4に刃の動いた距離と、その時の荷重の大きさを測定した一例を示す。付着盤に刃を当てて端からはがすとき、はく離荷重Fは刃と付着盤との接触幅の影響を受ける。そこで、はく離荷重Fを接触幅Wで除した値F/Wを、単位幅あたりのはく離荷重fとした。Fig. 5のように、Wはステージの裏側からマイクロスコープにより計測した。

実際の接着界面では部位により強度にムラが存在し、また付着盤の厚さ形状の影響も受けるため、fの大きさは一定値とはならないが (Fig. 4)、本研究では付着盤の接着強度は部位によらず一様であると仮定する。これ

Fig. 5 Peeling status observation through a microscope.

によりfの平均値を用いることで、付着盤の厚さ形状に依存せず、簡易的に界面接着強度を求めることができる (青木ほか、2006)。しかし平均値は外乱の影響を受けやすいため、次式のように、中央値と平均値の中間値を用いることで、付着盤ごとの接着強度 P_s を代表させた。

$$P_s = \frac{1}{2} \{ \text{mean}(f) + \text{median}(f) \}$$

2. 2 供試試験片

ムラサキガイが板ガラス上に分泌した付着盤を試験片として用いた。ムラサキガイ (*Mytilus galloprovincialis*) は三重県生浦湾のカキ養殖筏に生息する天然の個体を用いた。実験に用いたAからGの7個体の殻長および実験期間をTable 1にまとめる。個体A～Cは2006年10月6日、個体D～Gは2007年4月21日にそれぞれ採集した。

Table 1. Samples and periods of testing.

ID	Shell length [mm]	Period of experiment
A	78	2007-01-13 ~ 2007-02-05
B	70	
C	70	
D	75	2007-05-28 ~ 2007-06-27
E	75	
F	70	
G	87	

採集したムラサキガイは30Lの人工海水を入れた水槽 (容量57L、pH 8.2) で実験時まで予備飼育を行った。予備飼育後の実験手順をTable 2に示す。ムラサキガイが板ガラス上で付着盤を分泌する時間を24時間に限定し、この間に作られた付着盤のすべてを実験に用いた (1日目)。付着盤は人工海水を入れた恒温槽内で養生させた。養生時間は全72時間とし、始めの48時間はすべて20℃に保持し (2～3日目)、最後の24時間において温度を変化させた (4日目)。養生後、はく離試験を行い、接着強度 P_s を測定した (5日目)。4日目における養生温度としては、20℃ (室温)、40℃ (ヒトの体温を想定)、

Table 2. Timetable of specimen preparation.

Day 1	Production of plaque	24 hrs.	72 hrs.
Day 2	Curing at 20°C	48 hrs.	
Day 3			
Day 4	Curing at each experimental temperature	24 hrs.	
Day 5	Peel test		

70°C（一般的なタンパク質変性温度）の3水準について調べた。

ムラサキイガイが付着盤を分泌する際、タンパク質と同時に酸化酵素であるチロシナーゼも分泌される。タンパク質中のチロシンが、このチロシナーゼの酸化作用を受けてDopaとなり、さらにDopaキノンに酸化される。Dopaキノンは2分子のキノン側鎖間で架橋構造を形成し、タンパク質は不溶化するとともに強固な接着界面が作られる。また、リシンが関与する架橋不溶化反応は反応速度が遅く、付着後の養生中に徐々に架橋が進行することでFpが基盤表面に集積し接着界面をより強化すると考えられている（付着盤の成熟；山本、1996；山本、2006）。本論文では付着盤が成熟し、接着強度が高まっている4日目を基準として、その後の養生温度の影響を比較することとした。

接着強度は個体差が大きいため、実験因子である養生温度の影響が明確に現れるよう、個体別にデータを収集した。また、付着盤分泌量は個体などにより大きく異なるため、本実験では各個体、各温度水準で3～21個の付着盤（合計264個）の測定を行った。

はく離試験により得られた接着強度 P_s を被説明変数、ムラサキイガイ個体および養生温度の2因子を説明変数と考え、それぞれの主効果および交互作用を調べるために有意水準5%での二元配置分散分析を行った。

3. 実験結果と考察

各個体の接着強度の中央値をまとめたものをFig. 6に示す。これより養生温度が20～70°Cの範囲では温度に対してほぼ直線的に強度が低下していくことが分かる。20°C養生時（ $P_s = 102 \text{ N/m}$ ）と比べた接着強度の低下量は、70°C養生時で約41%（ $P_s = 60.4 \text{ N/m}$ ）、40°C時では約19%（ $P_s = 82.5 \text{ N/m}$ ）であった。また、養生温度が高くなるにつれて、個体間のバラツキが大きくなっていくことが分かる。

Fig. 7に測定結果のうち、C～Eの3個体についての例を示す。いずれの個体においても養生温度が高くなる

Fig. 6 Dependence of median value P_s on curing temperature. A-G: experimental mussels (see Table 1).

Fig. 7 Dependence of P_s on curing temperature. (a) mussel C, (b) mussel D, and (c) mussel E.

につれ、接着強度が低下する傾向が見られた。この傾向はほかの4個体についても同様であった。特に70°Cにおける接着強度が20°C時に比べて大きく低下していることが分かる。一方で40°Cでは20°C時に比べて、低下するものとほとんど変化しないものに分かれた。

Table 3に分散分析表を示す。ムラサキイガイ個体および養生温度の主効果はともに有意であった。また、これらの交互作用についても有意となったことから、個体ごとに養生温度の影響が異なるといえる。しかし、養生温度のF値は個体差や交互作用よりもかなり大きく、養生温度の主効果は、有意な交互作用により限定されるが、

Table 3. ANOVA table for adhesive strength.

	df	SS	MS	F	P
Curing temp	2	64953	32476	47.09	< 0.0001
Mussel	6	19149	3191	4.63	0.0002
Temp * Mussel	12	20743	1729	2.51	0.0040
Residuals	243	167583	690		

df: Degrees of freedom, SS: Sum of squares, MS: Mean square, F: Variance ratio, P: Significance probability, Temp: Temperature

接着強度に対して支配的な因子であると考えられる。

70℃での接着強度は20℃時に比べ、大きく低下したことから、70℃の環境下では界面における接着タンパク質が本来持つ接着強度を保てないものと考えられる。一方で、40℃養生時における強度低下は小さく、個体により強度が低下しないものもある。これは、界面のタンパク質の接着能として40℃の環境であれば接着強度を十分維持できると考えられ、このタンパク質が体内の体温環境下においても、接着剤の材料として利用可能であるということを示唆している。

実験時の付着盤の色変化は、時間の経過とともに白から黄色、さらには褐色へと変化していく傾向にあり、酸化によるタンパク質の変性が起きているものと思われる。この変色は、主にDopaが他のアミノ酸残基と架橋するためと考えられているが、板ガラスに付いた付着盤の表面および裏面の両方で同様の変色が見られたことから、付着盤表面だけでなく、バルク部および接着界面のタンパク質まで酸化が進行しているものと思われる。また、養生温度が高いものほど変色の度合いが大きく、酸化がより進んでいると考えられる。一方で、酵素チロシナーゼの酸化作用は約22℃をピークとする温度依存性を持つことが報告されており (Yamamoto and Tatehara, 1995)、養生温度が40℃や70℃の環境では20℃時に比べ、チロシナーゼの活性が大きく低下する。従って、本実験における接着強度低下はチロシナーゼによる酸化ではなく、自然酸化により引き起こされたものであると考えられる。

また、付着盤バルク部のタンパク質の酸化により架橋度が高まることで、バルク部のヤング率は増加することが考えられるが、有限要素法による離シミュレーション (青木ほか、2006) によれば、このヤング率上昇は付着盤はく離時のはく離荷重を低下させるものの、その影響は非常に小さい。そのため、バルク部の物性変化が本試験方法で得られる接着強度 P_s に与える影響は小さく、 P_s の変化は界面のタンパク質による接着強度を反映しているはずである。

以上のように、本実験結果における接着強度低下の主要因は、自然酸化による接着界面のタンパク質の変性であり、養生温度が高くなり酸化反応速度が上がることで、劣化による接着強度の低下量が大きくなったと考えられる。しかし、この劣化による化学構造の変化については不明であり、構造解析などの化学的アプローチにより、化学構造と機械的性質との関係を明らかにし、劣化 (酸化による変性) の進行をコントロールする効果的方法について考える必要がある。

4. 結論

ソーダライムガラスに付着させたムラサキイガイ付着盤において、養生時の温度の界面接着強度に対する影響を調べるため、養生温度を20~70℃の範囲で変化させはく離試験を行った結果、はく離に対する界面接着強度が、養生温度に依存することが分かった。20℃養生時に比べ、70℃養生時では約41%の強度低下が見られた一方、40℃養生時では約19%の低下にとどまった。このことから、

温度に限って考えた場合に接着界面に存在するタンパク質が医療用接着剤として有効であるといえる。

謝 辞

山安水産 (三重県鳥羽市) の間宮昌昭氏には本研究の実験に用いたムラサキイガイを提供して頂いた。記して深謝の意を申し上げる。また実験の協力を頂いた電気通信大学本間・小池研究室の石丸雅規、島崎賢一両氏に感謝する。

引用文献

- Allen, J. A., M. Cook, D. J. Jackson, S. Preston, and E. M. Worth (1976). Observations on the rate of production and mechanical properties of the byssus threads of *Mytilus edulis* L.. *J. Moll. Stud.*, 42, 279-289.
- 青木路人・本間恭二・小池卓二・村上小百合 (2006). ムラサキイガイの持つ接着タンパク質の簡易接着強度測定について. 日本機械学会論文集A編, 72(716), 487-492.
- 青木路人・本間恭二・小池卓二・村上小百合 (2007). ムラサキイガイ付着盤のガラス基盤への接着強度について. 日本機械学会論文集A編, 73(726), 307-312.
- Coyne, K. J., X. Qin, and J. H. Waite (1997). Extensible collagen in mussel byssus: A natural block copolymer. *Science*, 277, 1830-1832.
- Crisp, D. J., G. Walker, G. A. Young, and A. B. Yule (1984). Adhesion and substrate choice in mussels and barnacles. *J. Colloid Interface Sci.*, 104(1), 40-50.
- 本間恭二・青木路人 (2006). ムラサキイガイの足糸の付着力をはかる. 接着の技術, 26(3), 11-17.
- Inoue, K., S. Odo, T. Noda, S. Nakao, S. Takeyama, E. Yamaha, F. Yamazaki, and S. Harayama (1997). A possible hybrid zone in the *Mytilus edulis* complex in Japan revealed by PCR markers. *Mar. Biol.*, 128, 91-95.
- Lee, H., N. F. Scherer, and P. B. Messersmith (2006). Single-molecule mechanics of mussel adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(35), 12999-13003.
- Lin, Q., D. Gourdon, C. Sun, N. Holten-Andersen, T. H. Anderson, J. H. Waite, and J. N. Israelachvili (2007). Adhesion mechanisms of the mussel foot proteins mfp-1 and mfp-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(10), 3782-3786.
- Miki, D., Y. Takeuchi, K. Inoue, and S. Odo (1996). Expression site of two byssal protein genes of *Mytilus galloprovincialis*. *Biol. Bull.*, 190, 213-217.
- Sun, C., E. Vaccaro, and J. H. Waite (2001). Oxidative stress and the mechanical properties of naturally occurring chimeric collagen-containing fibers. *Biophys. J.*, 81, 3590-3595.
- Waite, H. (1997). Marine bioadhesion: Unravelling the chemistry. 日本接着学会誌, 33(5), 186-193.
- Waite, J. H. (1991). Mussel beards: A coming of age. *Chemistry & Industry*, September, 607-611.
- Waite, J. H. (1992). The formation of mussel byssus: Anatomy of a natural manufacturing process. In: *Biopolymers, Results and Problems in Cell Differentiation*, ed. S. T. Case, vol. 19, Springer-Verlag, Berlin, pp. 27-54.
- Waite, J. H. and M. L. Tanzer (1981). Polyphenolic substance of *Mytilus edulis*: Novel adhesive containing L-dopa and hydroxyproline. *Science*, 212, 1038-1040.
- Wang, J., C. Liu, X. Lu, and M. Yin (2007). Co-polypeptides of 3,4-

- dihydroxyphenylalanine and L-lysine to mimic marine adhesive protein. *Biomaterials*, 28, 3456-3468.
- 山本浩之 (1996). 海洋付着生物の接着物質の化学. *Sessile Organisms*, 13(1), 21-28.
- 山本浩之 (2006). ムラサキイガイの接着タンパク質化学. 接着の技術, 26(3), 6-10.
- Yamamoto, H. and H. Tatehara (1995). Oxidation of synthetic precursors of adhesive proteins from mytilid bivalves using tyrosinase. *J. Mar. Biotechnol.*, 2, 95-100.
- Yamamoto, H., Y. Sakai, and K. Ohkawa (2000). Synthesis and wettability characteristics of model adhesive protein sequences inspired by a marine mussel. *Biomacromolecules*, 1, 543-551.
- Young, G. A. and D. J. Crisp (1982). Marine animals and adhesion. In: *Adhesion* 6, ed. K. W. Allen, Applied Science Publishers, London, pp. 19-39.