

鮭皮コラーゲンの物理化学的性質を利用した バイオマテリアルの開発

学位論文内容の要旨

近年、人体の組織、臓器の再生を目的として、組織工学および再生医療が積極的に研究されている。バイオマテリアルとはこれらの目的に使用される材料全般を意味する。コラーゲンはバイオマテリアルとして極めて重要であるが、その供給源のほとんどが家畜であるために病原体感染の危険性が指摘されている。一方、その代替供給源となり得る魚皮から得られるコラーゲンは、物理化学的性質についての研究が乏しく、変性温度 (T_d) が低いゆえにバイオマテリアルとして不向きであると考えられてきた。そこで本研究は、魚類コラーゲン、特に鮭由来アテロコラーゲン (SC) に注目し、そのバイオマテリアルの開発を目的とした。

第1章は序論であり、本研究の背景および目的を明らかにした。

第2章では、バイオマテリアル開発にとって重要である SC の物理化学的性質についての知見を得た。鮭皮からコラーゲンを調製し、ペプシン処理によるアテロ化が成されていることを確認した。SC の T_d は 18.6°C と低く、 T_d とイミノ酸 (プロリン、ヒドロキシプロリン) 含有量の関係は他の様々なコラーゲンから求められた経験則と一致した。線維ゲルの融点 (T_m) は低い T_d に一致して $23\sim 28^{\circ}\text{C}$ と低く、架橋無しではバイオマテリアルとしての熱安定性が不十分であることがわかった。哺乳類コラーゲンは低温下で線維化能が抑制されるが、SC は 4°C においても活発に線維化した。これは低 T_d コラーゲンの特性であると考えられた。変性 SC は中性バッファー中、低温下で部分的にらせん回復した。そのらせん回復速度は牛アテロコラーゲン (BC) よりも明らかに低かった。これは低い T_d をもたらす低い α 鎖間水素結合エネルギーの結果であると考えられた。

第3章では、コラーゲンバイオマテリアルとして最も広く応用されているコラーゲンスポンジに着目し、架橋剤を用いず、潜在的に細胞毒性を有しない物理的架橋方法による SC スポンジ状マトリックスの安定化を試みた。物理的架橋方法として紫外線 (UV) 照射および脱水熱処理 (DHT) を用いた。安定性を極力高めながらコラーゲンへのダメージを最小化する条件として、UV 照射の場合は 16 J/cm^2 の両面照射、DHT の場合は 110°C 、3 日間の処理が有効であることが明らかとなった。その条件下で作製した架橋 SC マトリックスのコラーゲナーゼ耐性は架橋 BC マトリ

ックスに匹敵した。この結果から架橋 SC マトリックスが架橋 BC マトリックスの代替になり得る可能性がある」と結論した。一方、生理温度である 37℃で含水した架橋 SC マトリックスのコラーゲン分子が部分変性し、その結果マトリックスの収縮が起こることがわかった。この現象は BC では見られなかった。収縮問題を解決し、部分変性コラーゲンマトリックスの埋め込み型マテリアルとしての安定性および生物的效果を *in vivo* で明らかにすることが今後の課題として重要であると考えられた。

第 4 章では、線維化途上に架橋を導入することで SC 線維ゲルの熱安定性を向上させ、細胞培養ゲルとして応用することを目的とした。架橋剤としては、水溶性であり、細胞毒性物質の残留あるいはコラーゲンの分解に伴う放出の危険性の無い 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) を用いた。SC 水溶液と EDC 含有中性リン酸ナトリウムバッファーを混合すると、線維化途上に架橋が導入された。得られた架橋 SC 線維ゲルの機械強度と熱安定性は EDC 濃度 50 mM で最大となった (*f*-50)。*f*-50 の機械強度は、同じ EDC 濃度で線維化の起こらない条件で作製した架橋 SC ゲル (*n*-50) と同等であった。特に、*f*-50 の *T_m* は 47℃であり、*n*-50 (39℃) よりもはるかに高かった。線維化による架橋導入の妨げのためと考えられるが、架橋度は *f*-50 ゲルの方が小さかった。以上のことから、線維化によりゲルの機械強度と熱安定性が増加し、ゲル物性に対し線維化と架橋導入の相乗効果を示すことが推定された。ヒト歯周靱帯細胞の *f*-50 ゲル上での細胞増殖速度は豚アテロコラーゲン線維ゲル上よりも速かった。これらの結果から、線維化と架橋導入の相乗効果によって作製した低 *T_d* 鮭皮コラーゲンゲルはバイオマテリアルとして好適に用いることができると結論した。

本研究の成果は、鮭皮由来のコラーゲンに限らず、*T_d* の低い魚類コラーゲンからのバイオマテリアル開発に広く応用できると期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 棟 方 正 信
副 査 教 授 上 館 民 夫
副 査 教 授 高 木 睦
副 査 教 授 田 口 精 一

学 位 論 文 題 名

鮭皮コラーゲンの物理化学的性質を利用した バイオマテリアルの開発

近年、再生医療工学の立場からバイオマテリアルの開発が盛んに行われるようになった。その多くは家畜由来、特に牛由来コラーゲン（BC）が使用されている。最近の牛海綿状脳症（BSE）問題により、BC 由来医薬品および医療用具の自主回収および他種コラーゲンへの切替えが求められており、他の家畜への波及も懸念されている。バイオマテリアルは医薬品あるいは医療用具に含まれる。しかし、家畜の代替供給源になり得る魚類のコラーゲンは変性温度（ T_d ）が低く、バイオマテリアルとして不向きと考えられ、ほとんど研究が行われてこなかった。以上の理由から、家畜コラーゲンバイオマテリアルの代替品を魚類コラーゲンから作製することは極めて重要である。そこで著者は、国内の主要な水産物である鮭に着目し、その皮から得られるコラーゲン（SC）を用いたバイオマテリアル開発を試みた。

コラーゲンはその由来によって異なる物理化学的性質を有するため、バイオマテリアル開発において、用いるコラーゲンの物理化学的性質を知ることは重要である。鮭皮からコラーゲンを調製し、ペプシン処理によるアテロ化が成されていることを確認した。SC の T_d は 18.6°C と低く、これは低いヒドロキシプロリン含量のためと考えられた。線維ゲルの融点（ T_m ）は T_d に対応して $23\sim 28^{\circ}\text{C}$ と低く、架橋を行わないゲルはバイオマテリアルとしての熱安定性が不十分であることがわかった。哺乳類コラーゲンは低温下で線維化能が抑制されるが、SC は 4°C においても活発に線維化した。これは低 T_d コラーゲンの特性であると考えられた。変性 SC は中性バッファー中、低温下で部分的にらせん回復した。そのらせん回復速度は牛アテロコラーゲン（BC）よりも明らかに低かった。これは T_d と同様、低いヒドロキ

シプロリン含量による低い α 鎖間水素結合エネルギーの結果であると考えられた。

つぎに著者は SC バイオマテリアルの作製を行った。コラーゲンバイオマテリアルとして最も広く応用されているコラーゲンスポンジに着目し、架橋剤を用いず、潜在的に細胞毒性を有しない物理的架橋方法による SC スポンジの安定化を試みた。物理的架橋方法として紫外線 (UV) 照射および脱水熱処理 (DHT) を用いた。安定性を極力高めながらコラーゲンへのダメージを最小化する条件として、UV 照射の場合は 16 J/cm^2 の両面照射、DHT の場合は 110°C 、3 日間の処理が有効であることが明らかとなった。その条件下で作製した架橋 SC スポンジの *in vitro* 生体内安定性試験の結果は架橋 BC スポンジに匹敵した。この結果から架橋 SC スポンジが架橋 BC スポンジの代替になり得る可能性を有すると結論した。一方、生理温度である 37°C で含水した架橋 SC スポンジ中のコラーゲン分子が部分変性し、その結果スポンジの収縮が起こることがわかった。この現象は BC では見られなかった。架橋だけでは SC の変性を抑制できないことが明らかになった。

線維化によるコラーゲン分子の凝集は熱安定性向上に寄与することが知られている。そこで著者は線維化途上に架橋を導入することで得られるゲルが上記収縮問題を有さないバイオマテリアルになると考えた。架橋剤としては、水溶性であり、架橋剤分子が架橋結合に残留しない 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide (EDC) を用いた。SC 水溶液と EDC 含有中性リン酸ナトリウムバッファーを混合することで、線維化途上に架橋が導入されることがわかった。この方法で作製した架橋 SC 線維ゲル (*f*-ゲル) 中のコラーゲンの架橋度は、線維化の起こらない条件で作成した SC ゲル (*n*-ゲル) よりも大幅に低かった。しかし、同じ EDC 濃度において両者のゲル強度は同等であり、融点については *f*-ゲルの方が *n*-ゲルよりも高い場合があった。これらの結果は、ゲル強度と融点に対する線維化と架橋の相乗効果が存在することを示している。本実験では、未架橋 SC 線維ゲルの融点が 28°C であったのに対し、架橋 SC 線維ゲルでは EDC 濃度 50 mM で 47°C となった (*f*-50 ゲル)。この融点は細胞培養に適用するに十分なものである。そこで、*f*-50 ゲル上でヒト歯周靱帯細胞の培養を行った。対照として市販の豚アテロコラーゲンから作製した線維ゲル (PC ゲル) を用いた。その結果、*f*-50 ゲル上の細胞増殖速度は PC ゲル上の約 2 倍であり、*f*-50 ゲルが組織工学用細胞 scaffold として利用できることが示された。

これを要するに、著者は変性温度の低い鮭皮コラーゲンのバイオマテリアルとしての開発に新知見を得たものであり、再生医療工学および組織工学に対して貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士 (工学) の学位を授与される資格あるものと認める。