

学位論文題名

*In Vivo* Biological Responses and Bioresorption of Tilapia Scale Collagen as a Potential Biomaterial

(テラピア鱗由来コラーゲンの埋植試験による生物学的安全性評価と生体吸収性評価によるバイオマテリアルとしての可能性の検証)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

コラーゲンは生体支持組織のマトリクスの主なる構成成分であり、人工代替組織開発のカギとなる生体材料であると同時に組織工学や再生医療における重要なマトリクス材料の一つである。しかし、これまで臨床において使用されてきた哺乳動物由来のコラーゲンは、現在の医学で知り得る限界を超えた病原体の存在や未知の生体反応を否定できないため、その臨床応用に関して厚生労働省は極めて厳しい条件を課している。そのような背景の中、人獣共通感染症を持たない魚類から抽出されるコラーゲンは安全性の高い素材として大いなる興味を持たれている先端生体材料である。しかし、その生体反応に関しては不明な点が多く、臨床応用の可能性に関しては早急な検討が求められている。本研究の目的は、変成温度が哺乳動物由来のコラーゲンに匹敵し、なおかつ淡水での養殖が可能なテラピアの鱗由来コラーゲンを組織再生用人工マトリクスへ応用するための基礎データを得ることにある。コラーゲンの初期異物反応および生体内吸収動態を厚生労働省が定めるISOガイドライン(10993-6)に則って成熟した日本白色家兔を用いたペレット筋内埋植試験により評価した。

【対象と方法】

体重 3.0~4.0kg、生後 18~20 週齢の成熟した健康な日本白色家兔 60 羽を用いて、初期異物反応および生体内吸収を評価するためのペレット筋内埋植試験を実施した。テラピア鱗由来コラーゲン線維懸濁液から、凍結乾燥によりスポンジ状コラーゲンを作製した。全てのコラーゲンを脱水熱架橋し、一部のコラーゲンをさらに水溶性カルボジイミド(WSC)で架橋した。得られた 2 種類のコラーゲンスポンジをメスで棒状(2×2×8 mm)に成形し、インプラントとした。豚由来コラーゲンも同様に凍結乾燥によりスポンジ状コラーゲンを作製し、脱水熱架橋とさらに一部を水溶性カルボジイミド(WSC)で架橋した。作製した 2 種類のコラーゲンをテラピア鱗由来コラーゲンと同じ棒状に成形し、インプラントとした。Negative Control として高密度ポリエチレン、Positive Control としてジメチルジチオカルバミン酸亜鉛含有ポリウレタンを用いた。上記 6 種類のインプラントを日本白色家兔(60羽)の傍脊柱筋内に、左右対称 6 ヶ所にそれぞれ刺入した。各インプラントの埋植間隔は正中から左右約 3.5cm、前後

のインプラント間隔は約 2.5cm に埋植し、互いのインプラントに影響を及ぼさない間隔で埋植をおこなった。インプラントの傍脊柱筋内への埋植は特殊な注射器を用いておこない、傍脊柱筋に対して 60 度の角度で各インプラントを傍脊柱筋内に埋植した。各インプラントの埋植部位に出血が無い事を確認し皮膚縫合をおこなった。埋植後 1 週および 4 週において、それぞれ 5 羽から埋植物周囲の組織を摘出した。組織を中性緩衝ホルマリン液で固定後、HE 染色した。光学顕微鏡で細胞浸潤を観察し、炎症部の幅を ISO ガイドラインに則って計測し異物反応を定量した。また、コラーゲンインプラントが 1 週および 4 週において傍脊柱筋内に残存している部分を画像処理によって面積測定をおこない生体吸収性を評価した。

## 【結果】

### 1. 異物反応

埋植後 1 週において、熱架橋と WSC 架橋の種類によらずテラピア鱗由来コラーゲンと豚由来コラーゲンに Negative Control との炎症程度の差は認められなかった。埋植後 4 週でも 1 週同様、4 種類のコラーゲンインプラントと Negative Control との炎症程度の差は認めなかった。また、いずれの時期においても Positive Control に比べ有意に炎症性が低かった。

### 2. 生体吸収性

コラーゲンインプラントの断面積は埋植期間が長くなるにつれ小さくなり、インプラントが生体吸収されることが明らかになった。テラピア鱗由来および豚由来コラーゲンの生体吸収性の違いについては、熱架橋試料において顕著であった。テラピア鱗由来コラーゲンが埋植後 4 週でほぼ完全に吸収されたのに対し、豚由来コラーゲンでは埋植後 1 週のインプラント面積の約半分が残存していた。一方、テラピア鱗由来コラーゲンの高い吸収性は WSC 架橋により抑制された。豚由来コラーゲンとの吸収性の違いが WSC 架橋により認められなくなり、1 週から 4 週にかけての吸収がどちらのコラーゲンについても抑制された。

## 【考察】

本研究における最も重要な発見は、テラピア鱗由来コラーゲンの異物反応が ISO のガイドラインに定める Negative Control と同等レベルに低いことを明らかにしたことにある。魚は人獣共通感染症を持たないため、哺乳類由来コラーゲンに代わる新規コラーゲン材料として期待できる。テラピア鱗由来コラーゲンのアミノ酸組成は豚由来コラーゲンと極めて良く似ていることから、異物反応に差異が無い結果は妥当と言える。生体吸収性については、熱架橋したテラピア鱗由来と豚由来コラーゲンに大きな違いが認められた。熱架橋はコラーゲン分子間にエステル結合を付与する一方で、コラーゲンらせん構造を壊す（熱変成させる）ことが報告されている。また、同じ熱処理温度における熱変成の度合いは、変成温度が低いコラーゲンの方が高いことが報告されている。従って、熱架橋したテラピア鱗由来コラーゲンは豚由来コラーゲンよりも熱変成を強く受け、酵素分解に対する感受性が高まったと推定される。しかし、WSC 架橋による架橋密度の増加により、吸収性の差異は認められなくなった。以上の結果は、テラピア鱗由来コラーゲンの生体吸収性を豚由来コラーゲンよりも広範囲に制御可能であることを示唆している。この特性は、迅速な骨再生を行うための人工骨マトリクスに応用する場合、有効に働くと考えられる。

## 【結語】

SPF 魚類であるテラピアの鱗由来コラーゲンは、初期異物反応に関して架橋の種類に関わらず、既に臨床応用されている豚由来コラーゲンと同様に強い異物反応は示さなかった。また、生体吸収動態においてはテラピア鱗由来コラーゲンが豚由来コラーゲンより早い吸収性を有することから新たな吸収性医用材料を開発するための基礎的材料として期待の持てるコラーゲン材料であると考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 浪 明 男  
副 査 教 授 清 水 宏  
副 査 教 授 安 田 和 則

学 位 論 文 題 名

## *In Vivo* Biological Responses and Bioresorption of Tilapia Scale Collagen as a Potential Biomaterial

(テラピア鱗由来コラーゲンの埋植試験による生物学的安全性評価と生体吸収性評価によるバイオマテリアルとしての可能性の検証)

コラーゲンは人工代替組織や Scaffold 開発のカギとなる生体材料であり、これまでは哺乳動物由来のコラーゲンが使用されてきた。しかし哺乳動物由来コラーゲンには人獣共通感染症病原体の存在を否定できないため、厚生労働省はその臨床応用に関して極めて厳しい条件を課している。一方、魚類には人獣共通感染症の存在は知られていないが、魚類由来コラーゲンはその変性温度が低いため臨床応用は困難であった。しかし近年、テラピアの鱗由来コラーゲンの変性温度は哺乳動物由来のコラーゲンに匹敵することが発見された。テラピアは淡水での SPF 養殖が可能であり、原料の安定供給の見地からも有利なコラーゲンである。しかし魚類由来コラーゲンの臨床応用に関する研究は極めて少なく、生体材料として未だ確立されていない。本研究の目的は、テラピア鱗由来コラーゲンをを用いて高密度多孔質体 (TC) を開発すること、その多孔質体の構造と物性を評価すること、およびその生体内異物特性および吸収特性を評価することである。

TC の作製方法は、テラピア鱗から抽出したコラーゲンを酸性水溶液で溶化し、中性および生体内温度下で静置して自己組織化させた後、冷却遠心分離器を用いて線維化された濃縮コラーゲンを作製した。これをポリスチレンディッシュで成型した後、凍結乾燥することによって気孔を形成させ TC を作製した。なお架橋には熱架橋処理と化学架橋処理の 2 種類を用いることにより、2 種類の TC を作製した。比較対照として、同様の処理を行った 2 種類の豚由来コラーゲン高密度コラーゲン多孔質体 (PC) を作製した。

TC と PC の架橋度は TNBS 法で計測した。熱架橋においては TC が 15.1%、PC が 9.5% であった。化学架橋においては TC が 52.2%、PC が 57.2% であった。いずれの多孔質体に関しても、架橋度は熱架橋より化学架橋の方が有意に高かった。密度に関しては重量法で計測した。すべての多孔質体間に有意差を認めなかった。TC と PC の物性の評価には万能試験機を用い、圧縮速度 0.2mm/s、圧縮歪み 0.5% の条件で圧縮試験を行った。弾性率は熱架橋において TC が 6.7KPa、PC が 5.9KPa であった。化学架橋においては TC が 34.5KPa、PC が 30.9KPa であった。いずれの多孔質体に関しても、弾性率は熱架橋より化学架橋の方が有意に高値を示した。

熱架橋および化学架橋処理をおこなった TC の異物特性および吸収特性の評価には、日本白色家兎 60 羽を用い、ISO ガイドラインに則ったペレット筋内埋植試験を行った。比較対照には同様の処理を行なった PC、陰性対照の高密度ポリエチレンおよび陽性対照のジメチルジチオカルバミン酸亜鉛含有ポリウレタンを使用した。これら 6 種類のペレット (2×2×8 mm) を家兎の傍脊柱筋内の 6 ヶ所に、特性の Injector を用いて非侵襲的に埋植した。埋植期間は 1 週および 4 週とし、ペレット周囲の炎症およびコラーゲンの吸収を定量的に評価した。炎症の程度に関しては、埋植後 1 および 4 週において、架橋の種類に係わらず、TC と PC は陰性対照との間に有意差は認めなかった。陽性対照はいずれの時期においても炎症が有意に強かった。生体吸収性に関しては、熱架橋 TC が他のどのペレットよりも有意に吸収が速く、4 週でほぼ完全に吸収された。化学架橋 TC は PC と同様の生体吸収を示し、4 週で 1 週目の約半量が残存していた。この結果は、TC の異物反応は架橋の量に関わらず、既に臨床応用されている PC と同等であること、および TC の生体吸収は架橋の量によって制御することができることを示した。

口頭発表の後、副査の清水教授より、TC の副作用、同じ魚類である鮭由来コラーゲンと比較した際のテラピア鱗由来コラーゲンの利点、および獣医学領域における同様の生体材料応用の現状についての質問があった。また主査の三浪教授より、人魚共通感染症の存在、評価したテラピア鱗由来コラーゲンの気孔率と気孔径の作為的変更の可能性、および多孔質の孔内へ細胞を入れる研究の有無について質問があった。また副査の安田教授より、魚および豚コラーゲンゲル上における細胞培養実験の結果、テラピア鱗由来コラーゲンの応用の方向性について質問があった。いずれに対しても申請者は、自己の研究結果と文献的考察に基づいて概ね妥当な回答を行った。

本研究はテラピア鱗由来コラーゲンから高密度多孔質体の開発に初めて成功し、その構造と物性、生体内異物特性および吸収特性を明らかにし、今後の人工骨や再生治療用の生体材料の開発に重要な情報を与えた。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。