



|                  |                                                                                   |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Title            | 海洋性コラーゲンの真皮マトリックスへの応用                                                             |
| Author(s)        | 柚木, 俊二; 恵良田, 知樹; 高井, 光男 他                                                         |
| Citation         | 学術講演会講演論文集, 52, 404-405                                                           |
| Issue Date       | 2003-05-16                                                                        |
| Doc URL          | <a href="https://hdl.handle.net/2115/71446">https://hdl.handle.net/2115/71446</a> |
| Type             | journal article                                                                   |
| File Information | ART0002512580.pdf                                                                 |



北海道大学

井原水産(株)

○柚木俊二、 恵良田知樹、 高井光男

鈴木 健

## 1 緒 言

コラーゲンはその優れた生体適合性や低抗原性からバイオマテリアルとして広く用いられてきた。特に、人工皮膚マトリックスのような細胞接着性と適度な生体内分解性が同時に求められる用途に適している。コラーゲンの供給源としては牛や豚などの家畜の真皮が一般的であるが、病原体等の混入の恐れから代替品が求められている。魚類由来等の海洋性コラーゲンは安全性に優れているが変性温度が低く安定性に乏しいとされ、バイオマテリアルとしてはほとんど用いられてこなかった。本研究では、水産系廃棄物として多量に産出される鮭の皮から得られるコラーゲンに着目した。鮭皮コラーゲンは家畜由来コラーゲンに比べ極めて不安定であるが、適当な架橋処理を施すことで適度な安定性を付与でき、細胞外マトリックスとして十分に応用可能であることがわかってきた。鮭皮コラーゲンの安定性に及ぼす物理的架橋法の処理条件の影響、および動物皮下埋め込み試験の結果を報告する。

## 2 実験

**2.1 コラーゲンの調製** 鮭皮を脱脂した後、0.5M 酢酸中で酸可溶性コラーゲンを抽出した。ペプシン消化によりテロペプチドを除去した後、5%NaCl による塩析を繰り返して精製した。

**2.2 フィルムおよびスポンジの調製** 0.5%コラーゲン希 HCl 水溶液を 4℃で風乾し、厚み約 10  $\mu$ m の透明なフィルムを得た。プラスチックディッシュに同水溶液を流し込み、ドライエタノールで凍結後、凍結乾燥してスポンジを得た。

**2.3 紫外線架橋** スポンジあるいはフィルムに 254nm 単波長紫外線を照射した。

**2.4 脱水熱架橋** 90~160℃、真空中にスポンジあるいはフィルムを静置した。

**2.5 溶解性** コラーゲン試料を 37℃PBS 中に 3~5 浸漬後残渣をろ過し、ろ液のタンパク質濃度を定量した。

**2.6 酵素耐性** コラーゲン試料をコラゲナーゼあるいはトリプシン水溶液中に浸漬後残渣をろ過し、ろ液の Hypo 濃度を定量した。

**2.7 FT-IR** コラーゲンフィルムを透過法により測定した。コラーゲン変性を A1235/A1450 により評価した。

**2.8 マウス皮下埋め込み試験** 紫外線照射鮭皮コラーゲンスポンジをマウスの皮下に埋め込み、10 日後に取り出して組織観察に供した。対照として、人工皮膚テルダーミス (牛皮コラーゲン由来; テルモ社製) を用いた。

## 3 結果と考察

**3.1 鮭皮アテロコラーゲンの性質** 0.25%コラーゲン希酸水溶液の旋光度変化から変性温度を求めたところ、牛皮アテロ

コラーゲン (以下 BC) の 38℃に対し、鮭皮アテロコラーゲン (以下 SC) は 19℃であった。スポンジを 37℃PBS に浸漬したところ、BS スポンジは形状を保持したのに対し、AC スポンジは急速に溶解した。AC スポンジは安定化処理を施さなければ真皮マトリックスとして全く使用できない。

**3.2 紫外線架橋** コラーゲン乾燥品に紫外線を照射すると架橋が生じてコラーゲンが安定化することが知られている。照射は加温を避けるために 4℃低温室内で行った。乾燥剤で湿度を 0%に保った場合と湿度を 70%に保った場合で AC スポンジ安定化 (溶解性抑制) の照射エネルギー依存性を比較したところ、湿度 70%の方がよく安定化した。紫外線架橋にはヒドロキシラジカルが関与しているとの報告があり<sup>1)</sup>、これを支持する結果となった。また、紫外線架橋は試料の高の影響を受け、スポンジ状試料はフィルム状試料よりも安定化しにくかったが、両面照射により更に安定性を向上することができた。これらの結果を受け、4℃、湿度 60~80%において両面照射を行ったところ、AC スポンジの安定性を BC スポンジと同等にすることができた。

**3.3 脱水熱架橋** コラーゲン乾燥品を 100℃以上、真空中に静置すると架橋が生じてコラーゲンが安定化することが知られている。ラット尾コラーゲン線維による研究結果<sup>2)</sup>と同様、110℃で安定化 (溶解性抑制) し、溶解性は処理期間 3 日間で level off した。紫外線で見られたような試料高の影響は確認されず、脱水熱架橋は試料に対し均一に起こっていることが示された。紫外線と同様、AC スポンジの安定性を BC スポンジと同等にすることができた。

**3.4 架橋による変性** 架橋コラーゲンフィルムの FT-IR スペクトルを測定した。変性に由来する A1235 バンドの減少は AC および BC ともに認められず、両架橋はコラーゲンらせんの崩壊をほとんど起こさないことが確認された。

**3.5 コラゲナーゼ耐性** 未処理スポンジ、および紫外線架橋と脱水熱架橋により溶解性をほぼ同等に抑制した AC スポンジと BC スポンジについて、コラゲナーゼ耐性を評価した。架橋の有無による酵素耐性の相違は確認されなかった。AC スポンジは BC スポンジよりも約 2 倍消化を受けやすかった。

**3.6 トリプシン耐性** コラゲナーゼ耐性と同様の試料についてトリプシン耐性を評価した。トリプシンはコラーゲンらせんには作用しないとされる。コラーゲンらせんが崩壊していなければ、架橋によって生じた分解フラグメントを除きコラーゲンスポンジはトリプシンの消化をほとんど受けないはずである。しかし、両架橋 BC スポンジは未処理よりもトリプシン耐性が大幅に悪化した。一方で未処理 AC スポンジの耐性は未処理 BC スポンジの約半分 (消化性が 2 倍) であり、

架橋による変化が見られなかった。このことから、以下の仮説を立てることができる。

①架橋により BC スポンジに FT-IR では確認されない程度の小さな崩壊ドメインが生じ、未処理に比べトリプシン消化を受けやすくなった。

②トリプシン耐性試験における 37°C 膨潤状態で AC スポンジのコラーゲンらせんは既に崩壊している。従って、BC スポンジで見られたような未処理と架橋スポンジのトリプシン耐性の相違は無い。

**3.7 マウス皮下埋め込み試験** 紫外線架橋を施した AC スポンジをマウス皮下埋め込み試験に供した。組織観察の結果、牛コラーゲン由来対照品に比べ AC スポンジは細胞の侵入が活発に起こっており、血管の新生も見られ、肉芽組織を形成していた (Fig. 1)。生体内温度で膨潤した AC スポンジが変性しているのなら、架橋ゼラチンと構造的に変わらないということになる。牛コラーゲンを用いた過去の研究では、コラゲナーゼ耐性試験により架橋ゼラチンは不安定すぎて真皮マトリックスとしての使用に耐えないとされた<sup>3)</sup>。このコラゲナーゼ耐性試験は生体内安定性評価として過酷すぎる可能性がある。

#### 4 結論と今後の予定

紫外線架橋、脱水熱架橋などの物理的架橋方法により、AC スポンジの溶解性を BC スポンジと同等にまで抑制することができる。37°C 膨潤状態において、AC スポンジのコラーゲンらせんは変性している可能性が示唆された。このことが BC スポンジに比べ酵素による消化を受けやすい理由と考えられる。しかし、マウス皮下埋め込み試験の結果は真皮マトリックスとして十分に使用可能であり、むしろ BC スポンジよりも優れていることを示した。架橋 AC スポンジが 37°C 膨潤状態でどのような構造を有しているのか、また、架橋ゼラチンスポンジとの相違を解明することが今後の課題である。

#### 参考文献

- 1) Ykano, Y. Sakano and D. Fujimoto, J. Biochem., 102, 839 (1987).
- 2) MC.Wang, G.D.Pins and F.H.Silver, Biomaterials, 15, 507 (1994).
- 3) K.Koide, K.Osaki, J. Konishi, K.Oyamada, T. Katakura, A.Takahashi and K.Yoshizato, J. Biomed. Mat. Res, 27, 79 (1993).

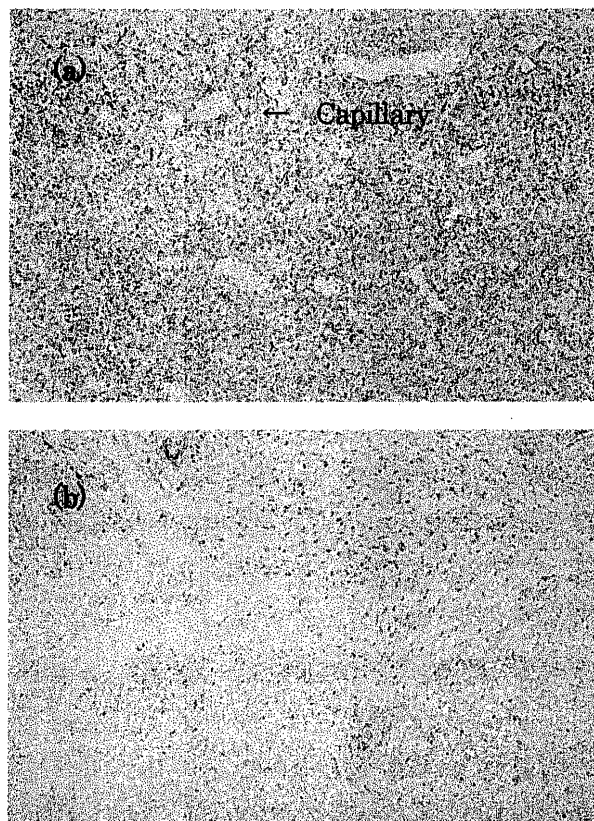


Fig.1 Implantation of collagen sponge into the rat back skin (a)UV crosslinked AC sponge, (b)A commercial artificial skin (Teldarmis).