

魚類由来コラーゲン・エラスチンを用いた医療用材料の開発と応用

¹(株)マルハニチロホールディングス中央研究所, ²弘前大・理工学部, ³札幌医科大・形成外科
山谷祥史¹, 星野躍介¹, 古賀倫子¹, 江成宏之¹, 須藤新一², 松本佳隆³, 四ツ柳高敏³

Application of cross-linked collagen/elastin from salmon for medical materials

Yoshifumi Yamaya¹, Yosuke Hoshino¹, Tomoko Koga¹, Hiroyuki Enari¹,
Shinichi Suto², Yoshitaka Matsumoto³ and Takatoshi Yotsuyanagi³

¹Central Research Institute, Maruha Nichiro Holdings, Inc.

²Faculty of Science and Technology, Hirosaki University

³Division of Plastic Reconstructive Surgery, Sapporo Medical University of Medicine

1. はじめに

近年, iPS細胞の応用研究, 新規な細胞培養技術, 生体親和性の高い医療器具の開発など再生医療の進歩は目覚ましい。細胞を培養するための足場材(スキャフォールド)や, 生体組織に置き換わる医療器具の基材として, 生体親和性の高い素材であるウシやブタなどの哺乳類由来のコラーゲンが広く使われてきた。しかし, 近年, 牛海綿状脳症(BSE)等の問題から, 哺乳類由来医療用素材の使用によりヒトへ病原体が感染する危険性が懸念されており, 代替素材の開発が求められている。

一方, (株)マルハニチロホールディングスは, 1913年よりサケ缶詰の大量生産を行っており, 1973年には銀ザケの養殖技術を開発するなど, サケとの関わりが深い。そこで強みとしてきたサケを原料として, 人畜共通感染症発症報告のない医療用素材の開発を検討した。具体的にはサケ皮からコラーゲン, 心臓からエラスチンを精製する技術を確認すること, さらにこれらを用いた成形物の調製方法を検討し, 医療用材料としての可能性を評価することを目的とした。

2. コラーゲンおよびエラスチン

アテロコラーゲンはサケ皮から常法により調製した(図1)。コラーゲン分子の両端に存在し, 抗原性を有するテロペプチドを酵素処理により除いたものをアテロコラーゲンといい, 通常のコラーゲンよりも抗原性が低い¹⁾。得られたアテロコラーゲンの構成アミノ酸を確認したところ, コラーゲンに特徴的に含まれるヒドロキシプロリン(Hyp)が含まれていた(表1)。コラーゲンのHyp含量は, 種により異なることが知られており, 一

般的に魚類は哺乳動物に比べて低い。また, 調製したアテロコラーゲンの変性温度は粘度を指標に求めた。通常, コラーゲンは加熱することで, 三重螺旋構造が解けてゼラチンとなる。この構造が解ける温度, すなわち変性温度以上になると, コラーゲン溶液の粘度は急激に下がる。粘度測定の結果, サケ皮由来のアテロコラーゲンの変性温度は15~20℃とみられ, ウシ由来と比較すると低かった(図2)。通常, 水産物由来のコラーゲンの変性温度は哺乳類由来のものと比較して低いことが知られている。また, 同一温度で比較した場合, 魚類由来の方

表1. サケ皮由来アテロコラーゲンとウシ由来コラーゲンのアミノ酸組成

アミノ酸	サケ由来	ウシ由来
Asp	5.1	4.5
Thr	2.1	1.8
Ser	4.2	4.0
Glu	7.6	7.4
Gly	38.7	34.4
Ala	11.1	11.6
Val	1.6	1.9
Cys	0.1	-
Met	1.4	0.5
Ile	1.0	1.0
Leu	1.9	2.4
Tyr	0.0	0.3
Phe	1.1	1.2
His	0.8	0.2
Lys	2.3	2.4
Arg	5.2	4.7
Hyp	5.4	10.3
Pro	10.1	11.2
合計	100.0	100.0

単位: mol%

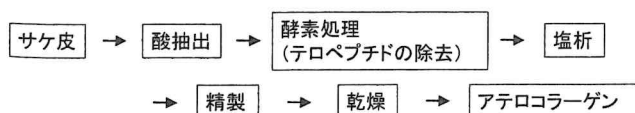


図1. アテロコラーゲンの調製フロー

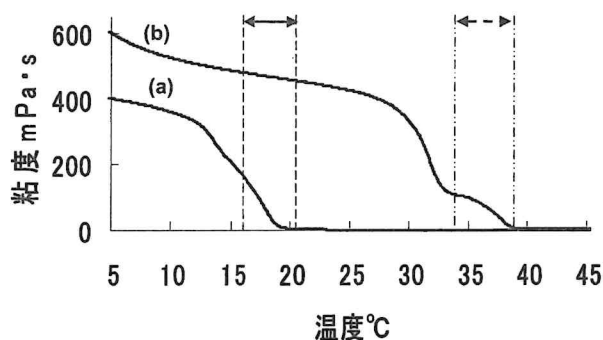


図2. 粘度による変性温度測定の結果

(a) : サケ由来アテロコラーゲン,

(b) : ウシ由来アテロコラーゲン

←→ サケ由来アテロコラーゲンの変性温度帯

←--→ ウシ由来アテロコラーゲンの変性温度帯

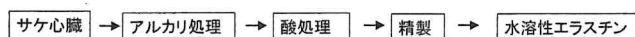


図3. 水溶性エラスチンの調製フロー

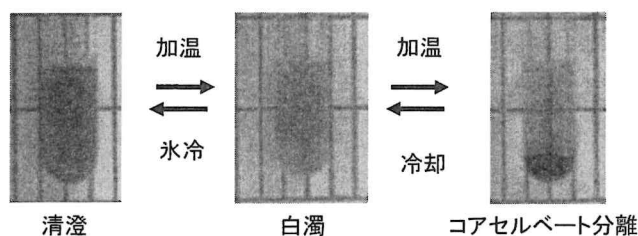


図4. 水溶性エラスチンのコアセルベーション

が哺乳類由来のものより、粘度は低くなった。このように低粘度を特長とする魚類由来のコラーゲンは高濃度のゲルを作りやすく、低温でも再繊維化しやすいことから、ウシ由来のものとは性質の異なる基材の開発に繋がることが期待される。

水溶性エラスチンはサケ心臓の動脈球部分から常法により調製した(図3)。この水溶性エラスチンの溶解性を確認したところ、エラスチンの特徴であるコアセルベーションが確認された(図4)。コアセルベーションとは、温度を上げることで凝集し、下げると溶解する温度可逆的な現象である。また、エラスチンに特徴的に含まれるアミノ酸であるデスマシンおよびイソデスマシンを含むことを確認した(表2)。これらの含量はウシ由来のエラスチンと比較すると低いが、これも先のコラーゲンと同様、種により異なるためである^{2,3)}。

3. アテロコラーゲン/水溶性エラスチン複合体

医療用基材として用いる場合、水等の溶媒に溶けにくい形態が求められる。そこで、アテロコラーゲン、水溶性エラスチンを架橋剤により架橋し、水等の溶媒へ難溶化させる手法を検討した。また、医療用基材として用いる場合、ハンドリングを容易にするため、柔軟性や強度

表2. 水溶性エラスチンのアミノ酸組成 (Des: デスマシン, Ide: イソデスマシン)

アミノ酸	サケ由来 水溶性エラスチン	ウシ由来 αエラスチン
Asp	1.9	0.3
Thr	2.8	0.8
Ser	2.7	0.8
Glu	4.1	1.9
Gly	46.6	31.2
Ala	13.6	28.1
Val	4.2	10.5
Cys	0.3	0.1
Met	0.6	0.0
Ile	0.6	1.8
Leu	4.1	6.0
Tyr	4.8	1.0
Phe	1.1	3.7
Orn	0.1	0.1
His	0.5	0.0
Lys	0.7	0.2
Arg	2.2	0.6
Hyp	0.3	0.7
Pro	8.7	11.9
Ide	0.1	0.2
Des	0.0	0.2
合計	100.0	100.0
Gly,Ala,Val,Pro合計	73.1	81.6
Ide, Des合計	0.10	0.47

単位: mol%

が求められる。そこで、難溶化させたアテロコラーゲン/水溶性エラスチン複合体の湿潤状態での力学特性を評価した。

3-1. 成形物

先に調製したアテロコラーゲン、水溶性エラスチンの5%水溶液をそれぞれ調製した。これらをアテロコラーゲン:水溶性エラスチン=100:0, 80:20, 60:40となるように、三種類の混合溶液を調製し、凍結乾燥して成形した。これを、架橋剤で処理することで、水等の溶媒に難溶な三種類のコラーゲン/エラスチン多孔質複合体(Collagen / Elastin Sponge: CES)を得た。CESの構造を走査型電子顕微鏡(SEM)により確認したところ、100μm前後の細孔を有する多孔体であることが確認された(図5)。

本手法によれば、成形の型を変えることでCESを任意の形状にすることができる。さらに、アテロコラーゲンと水溶性エラスチンの混合比を変えることで、生体の組成に合わせてエラスチン含量を制御した製品のデザイン

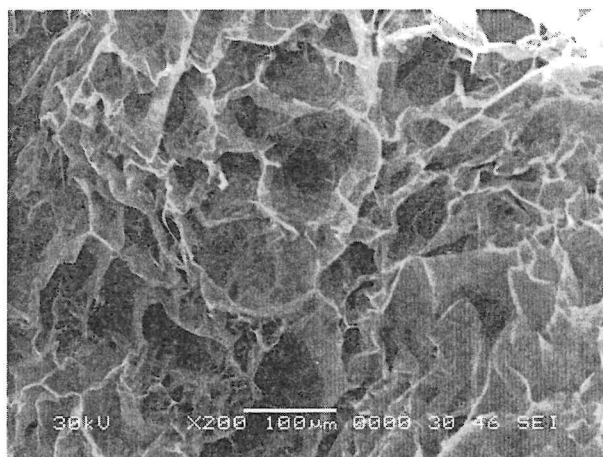


図5. CESのSEM像 (×200)

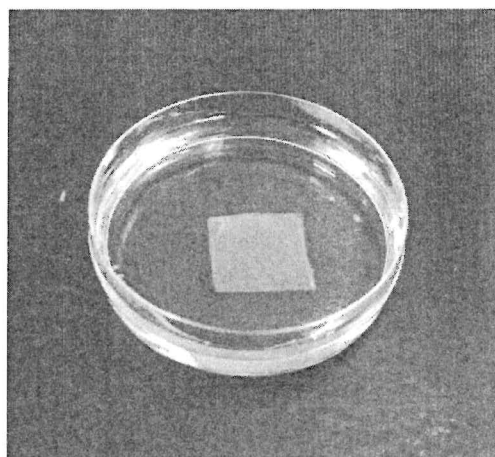


図6. 水に浸漬させたアテロコラーゲン/水溶性エラスチン複合膜

が可能となる。また、多孔体のみならず、成形方法によっては、膜状にすることも可能であり、水に難溶なアテロコラーゲン/水溶性エラスチン複合膜の調製にも成功している (図6)。

3.2. 力学特性

先に調製した三種類のCESの湿潤状態での圧縮試験を、レオメーター (サン科学社製) を用いて行った。試験片のサイズを全て等しくし、圧縮試験の解析項目を破

断力 (CESを破断する際に負荷した力) と破断距離 (CESが破断するまでにプランジャーが押し込んだ距離) として評価した。その結果、CES中のアテロコラーゲン：水溶性エラスチンが8：2の場合、破断力、破断距離がともに最大となった (図7)。すなわち、この配合比率のCESは、コラーゲン単体の成形物より弾性に富み、破断強度が高いという結果が得られた。これは、エラスチンの弾性と構造が関与していると考えられた。

また、比較として市販の人工真皮も同様に評価した。その結果、破断力は検出限界以下 (1×10^{-3} N以下) であり、CESと比較して強度が低いと判断された。そのため、本実験で検討した三種類のCESはいずれも市販品よりも優れた力学特性を有し、その強度は実用レベル以上であると判断された。

5. スキャホールドおよび人工真皮としてのCES

サケ由来のアテロコラーゲンと水溶性エラスチンの製法開発に成功した。これらの素材は人畜共通感染症の報告がなく、安全性の高いものと考えられる。CESのラット皮下への埋入試験では有害な炎症反応は確認されなかった。さらに、哺乳動物由来のこれらとアミノ酸組成や諸性質が異なることから、医療材料としての新たな機能性も期待される。

CESのスキャホールドまたは医療用基材としての応用を期待し、力学特性が最も優れていると判断したアテロコラーゲン：水溶性エラスチンが8：2のCESをサンプルとし、線維芽細胞に対する細胞毒性試験および増殖挙動を調べた。また、医療用基材への応用研究の一例として、ラット皮膚欠損創に対してCESを移植した際の効果を検証することで、人工真皮としての有効性を評価した (札幌医科大学で実施)。CESはスキャホールド、人工真皮のいずれにも応用が期待できるデータが得られた (現在投稿中)。

我々は肌機能改善効果のあるDNA⁴⁾ や抗菌性を示すプロタミン^{5,6)} を用いた複合体を開発しており、この複合体の歯科領域や骨再生分野への応用を検討している^{7,8)}。コラーゲンとエラスチン複合体は、DNAやプロタミンといった素材を組み合わせることも可能であり、さらな

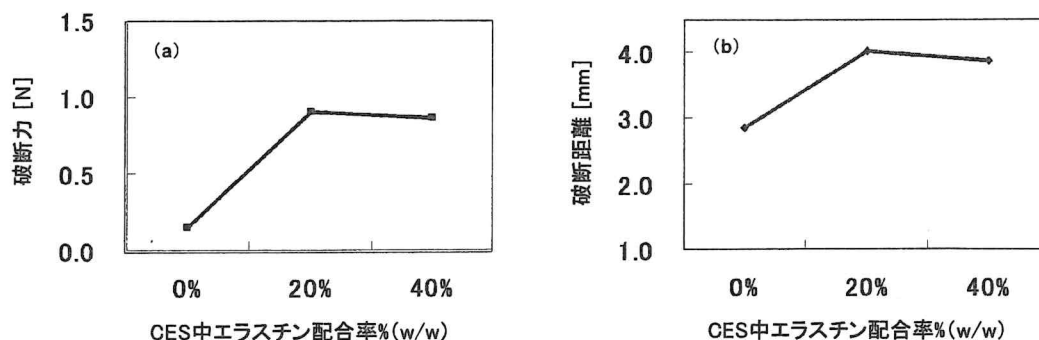


図7. CESの圧縮試験結果 ((a)：破断力, (b) 破断距離)

る機能性を付与することも期待できる。

6. まとめ

サケの皮と心臓の動脈球からアテロコラーゲンと水溶性エラスチンをそれぞれ調製した。医療用素材への展開を図るため、それらを成形し、架橋剤にて難溶化させた。これらは人畜共通感染症発症の報告がない素材であり、かつ成形加工することで、従来の医療用基材よりも優れた力学特性を示した。このCESは現在上市されている市販品の代替となる可能性が大いに期待できる。

文献

- 1) Knapp TR, Kaplan EN, Daniels JR (1977) Injectable collagen for soft tissue augmentation. *Plast Reconstr Surg*, **60** : 398-405.
- 2) Anwar RA (1966) Comparison of elastins from various sources. *Can J Biochem*, **44** : 725-734.
- 3) Spina M, Garbisa S, Field JM, Serafini-Francassini A (1979) The salmonid elastic fibril An investigation of some chemical and physical parameters. *Arch Biochem Biophys*, **192** : 430-437.
- 4) 許慈芳, 王銘富, 関戸治知, 平原弘志, 星野躍介, 本村亜矢子, 秋田涼子, 山本茂, 江成宏之 (2009) サケ白子由来DNAのヒト肌質改善効果, *日本化粧品技術者会誌*, **43(2)** : 107-112.
- 5) 庵原啓司, 根本えりか (2006) しらこたん白 (プロタミン) の食品への利用, *月刊フードケミカル* **22(4)** : 24-32.
- 6) 庵原啓司, 河原崎正貴, 古賀倫子, 関戸治知, 杉本正裕, 江成宏之 (2009) アルギニンリッチな配列を有する新規抗カンジダ活性ペプチド, *防菌防黴誌*, **37(6)** : 413-420.
- 7) 御手洗誠, 福島忠男, 川口稔, 早川徹, 岡畑恵雄 (2009) 賦形性に優れた生体材料; サケ白子由来DNAの加工性とその応用, *第31回日本バイオマテリアル学会大会予稿集* : 324.
- 8) 福島忠男, 大野純, 井上勇介, 川口稔, 早川徹, 御手洗誠, 岡畑恵雄 (2009) DNA/プロタミン複合体の合成と組織親和性, *第31回日本バイオマテリアル学会大会予稿集* : 366.