

鮭皮コラーゲンのバイオマテリアル化 技術の開発と商品化

井原 慶児^{1*}・永井 展裕²
柚木 俊二²・森 一生¹



Development and Commercialization of Biomaterials Using Salmon Collagen

Keiji Ihara^{1*}, Nobuhiro Nagai², Shunji Yunoki², and Kazuo Mori¹ (*Ihara & Company Ltd., 3-263-23 Zenibako, Otaru, Hokkaido 047-0261¹ and Creative Research Initiative "Sousei" (CRIS), Hokkaido University, N21-W10, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 001-0021²*) *Seibutsu-kogaku* **85**: 126-131, 2007.

1. コラーゲンとの出会い

まずは弊社が鮭皮コラーゲン研究を開始した経緯について述べたい。平成8年に社団法人北海道食品産業協議会（道食産協）の常務理事から、海洋性原料から的人工皮膚の開発について紹介された。鮭皮から抽出したコラーゲンおよびイカの中骨を原料としたキチンからラミネートシートを作製し、それを人工皮膚に応用するという。研究開発を進めていた企業が研究室を解体することになり、道食産協が継続可能な企業を探していた。北海道の開発補助金を利用するため、請負企業は北海道内に限定されていた。当時コラーゲンという言葉も知らなかつた筆者は「コラーゲンは一般に何から作られるのか？」と質問したところ、答えは「牛」であった。それを聞いて筆者は1990年初めのカナダ駐在中に見た狂牛病のニュースを思い出した。米国や日本ではほとんど放送されていなかったが、英連邦のカナダはイギリスのニュースが盛んに流れていた。いつか日本でも狂牛病が発生してコラーゲンが作れなくなり、代替品が必要になるに違いないと確信した筆者は上記研究の推進を決断した。

井原水産は数の子を主体にした水産加工会社である

が、当時としては珍しく研究室をもっていた。昭和50年代からバクテリアによる排水浄化（過酸化水素の除去）を研究していたためである。その研究室をベースにコラーゲンの研究を始めて11年になり、すでに化粧品や食品用のコラーゲンを販売している。

本稿では、栄誉ある日本生物工学会技術賞をいただけたテーマとなった鮭皮コラーゲンのバイオマテリアル研究について紹介する。弊社ではコラーゲンの利用用途として医療材料を化粧品・食品用の次のフェイズと位置づけ、大学などと共同で研究を推進している。しかし、鮭皮コラーゲンによって牛・豚コラーゲンを容易に代替できるとは考えていない。生体内安定性・安全性などクリアしなければならない問題は多々ある。その中で「生体内安定性の制御」を鮭皮コラーゲンの医療応用における最初の課題と認識し、研究を進めてきた。その結果生まれた技術が本受賞研究である。

2. 背 景

コラーゲンは生体内の細胞外マトリックスとして細胞の増殖・分化の調節を行っており、その高い生体親和性から再生医療・組織工学用バイオマテリアル、主に細胞の足場材料（スキャフォールド；scaffold）として利用さ

*著者紹介（代表）¹井原水産株式会社（代表取締役社長） E-mail: ihara@yamani.com
²北海道大学

写真 上左より井原、永井；下左より柚木、森。

れている。コラーゲンは牛、豚、鳥、魚などの真皮や骨を原料にして得ることができる。中でも魚は人獣共通感染症の例がほとんどないため、安全なコラーゲン原料として使用可能と考えた。

3. コラーゲンとは

コラーゲン（コラーゲンには20種類以上の型が存在するが、本稿のコラーゲンという呼称はすべてI型を示す）は3本のポリペプチド鎖（ α 鎖）が螺旋を巻いた特徴的な構造（コラーゲンヘリックス）を有している（図1A）¹⁾。コラーゲン分子の両端にはヘリックス構造を持たないテロペプチドを持つ。テロペプチドは抗原性を示すためバイオマテリアルへ応用する際にはペプシン処理によってテロペプチドを除去した抗原性の低いアテロコラーゲンが利用される。

生体内のコラーゲン分子は自己組織化して線維を形成している。このコラーゲン線維はコラーゲン分子が4分の1ずつ（約67 nm）ずれながら規則的に会合した構造を有している（図1B）²⁾。生体内のコラーゲン線維は3次元的なネットワーク構造を形成しており、細胞はこのコラーゲンマトリックスに接着して増殖や分化機能を維持している（図1C）。またこのコラーゲンマトリックスは生体組織に耐熱性と力学的強度を与えている。

コラーゲンは古くから皮革、ゼラチン、食品などに利用されてきた。近年は人工臓器や人工皮膚などのバイオマテリアルとしての利用が多くなった³⁾。バイオマテリアルとは生体に触れて使用される材料を示し、生体に毒性を示さないことが必須条件である。もともと細胞外マ

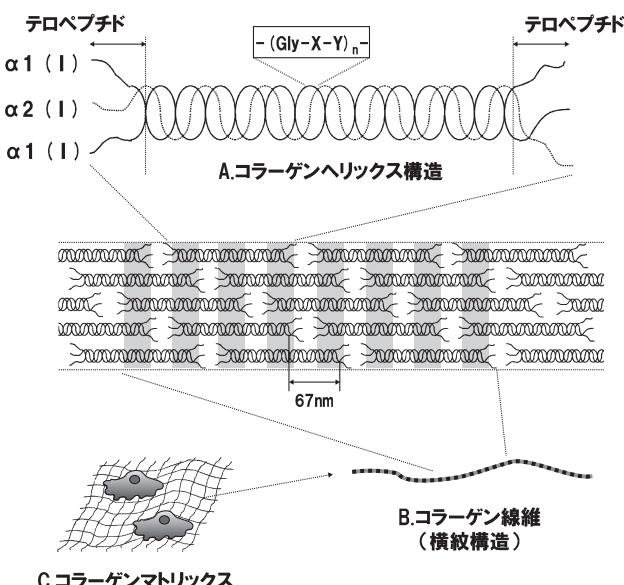


図1. コラーゲンおよびコラーゲン線維の構造

トリックスとして機能しているコラーゲンは生体適合性や生分解性が高いためにバイオマテリアルとして好適な材料である。

4. 鮭皮コラーゲンの利用と問題点

我々は安全・安心なバイオマテリアルの開発と水産資源の有効利用を目的に、水産加工後に廃棄処分されている天然鮭（シロサケ、chum salmon）の皮から抽出したコラーゲンのバイオマテリアル化に取り組んできた。しかし、水生動物由来のコラーゲンは変性温度が低い（変性温度：5～30°C）ために、ヒトの生体内温度では変性・溶解する（図2）。そのためバイオマテリアルへの応用は困難とされてきた。変性とはコラーゲンを加熱したときに3重螺旋（コラーゲンヘリックス）構造がほどけてランダムコイル状のゼラチンへと変化する現象のことを言う（図2右下）。変性したコラーゲンは水に溶けやすく強度が弱いため、生体内のタンパク質分解酵素によって速やかに分解・吸収される。そのため、鮭皮コラーゲンをバイオマテリアルとして利用するためにはコラーゲンの耐熱性を改善しなければならなかった。

そこで我々はコラーゲンの線維化と化学架橋を利用した耐熱性改善の検討を行った。生体から抽出したコラーゲン溶液は、生体に類似した温度やpHに保つと自己組織化して線維ゲルを形成する性質を持つ。このコラーゲンの線維化はコラーゲンマテリアルの耐熱性向上に寄与するだけでなく、生体と類似した線維構造を形成するためバイオマテリアルとして利用したときには細胞親和性の点で都合が良い。本研究はコラーゲンの線維化途上に化学架橋をコラーゲン分子間に導入することによって、鮭皮コラーゲン線維ゲルの耐熱性改善を試みた。

5. 耐熱性鮭皮コラーゲン線維ゲルの開発

コラーゲンは生体内で線維を形成して不溶化している

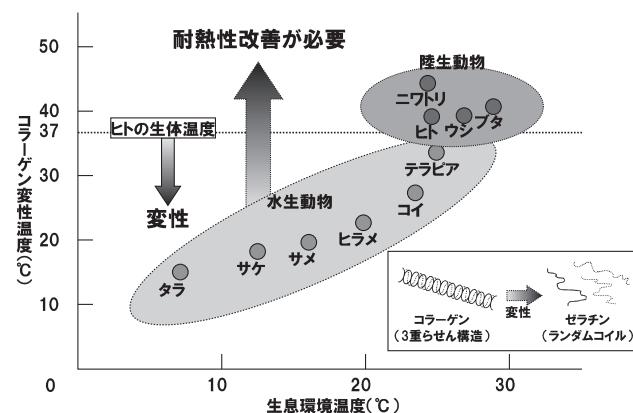


図2. コラーゲン変性温度と生息環境温度との関係

ため一度線維構造を壊してコラーゲン分子を分散させなければ可溶化しない。一般的にコラーゲンは原料（真皮や骨）を酸性条件で可溶化させて分離・抽出される。実際に鮭皮コラーゲンは鮭皮を4°Cで0.5 M酢酸に膨潤させて酸性コラーゲン溶液（pH 3）として分離・抽出されている⁴⁾。分離中の精製過程においてペプシンによるアテロ化が行われ、コラーゲンの抗原性は低下している。この抽出した酸性鮭皮アテロコラーゲン水溶液はリン酸ナトリウムバッファーを加えて中性条件の生体内に類似した温度におくと、コラーゲン分子が自己組織化してナノ線維構造を回復する（図3）。線維化したコラーゲンゲルは、コラーゲン分子の規則正しいパッキング効果によって変性温度は約10度上昇する。

我々はこの鮭皮アテロコラーゲン（以下SAC）が低温（15°C以下）で活発に線維化することに着目した。架橋剤である水溶性カルボジイミド；1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide, hydrochloride（以下、EDC）の存在下、4°Cでコラーゲン線維を再形成させた結果、線維化（fibril formation）と架橋（cross-linking）を同

時に引き起こし、変性温度を28°Cから55°Cまで高めたコラーゲンナノ線維ゲルの作製に成功した⁵⁾。架橋剤にEDCを選んだ理由は他の架橋剤に比べて生体親和性が高いためである。EDCはアミノ基とカルボキシル基を脱水縮合してコラーゲン分子間にアミド結合を形成させる（図4）。このときEDC自体は架橋結合中に残らないため、コラーゲンが生体内で分解したときに架橋剤が遊離して毒性を示すことがない。一方、グルタルアルデヒド、ポリエポキシ化合物の場合は架橋結合中に架橋剤が残るため、分解後に架橋剤が遊離して細胞毒性を示すことがある。図5はさまざまなEDC濃度で作製したSAC線維ゲルの写真である。結果としてEDC濃度が60 mMのときに変性温度が最大となった（図5D）。一方でEDC濃度が70 mM以上では線維化が阻害されて変性温度は低下した（図5E-G）。

これは図6に示したように今回の反応は架橋反応と線維化の競合反応であったことを示している。すなわち、EDC濃度が高い場合（図6C）は架橋反応が優先して線維化が阻害された一方で、EDC濃度が低い場合（図6A）

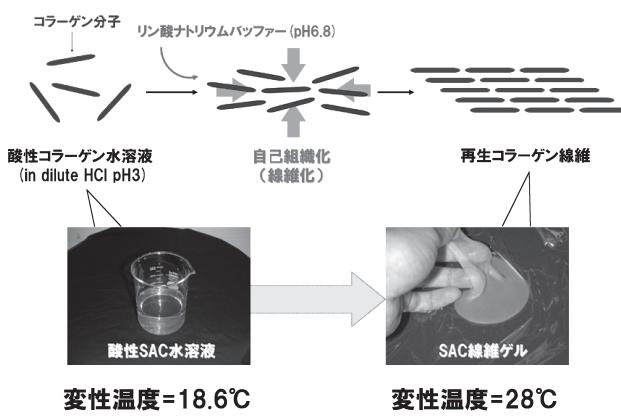


図3. 鮭皮コラーゲンの線維化と線維ゲルの写真

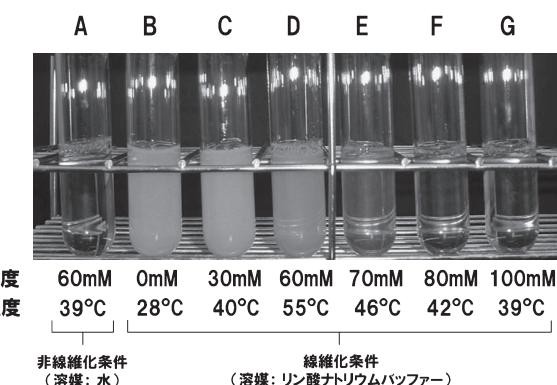


図5. 架橋したSAC線維ゲルの写真
(架橋剤濃度と変性温度の関係)

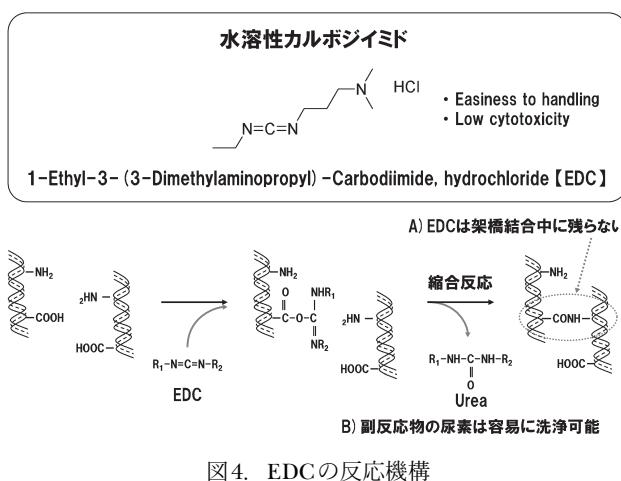


図4. EDCの反応機構

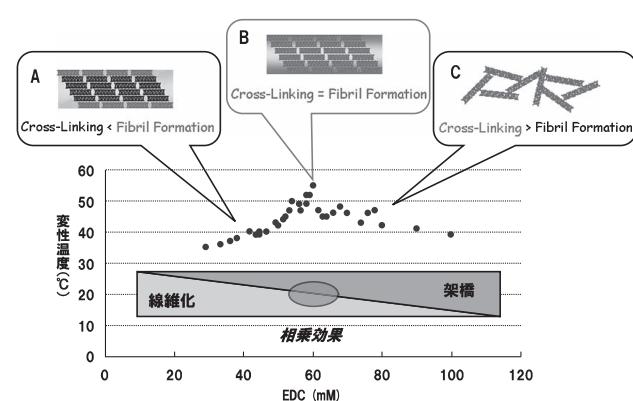


図6. 架橋剤濃度と変性温度の関係および架橋コラーゲン線維の推定構造図

は線維化が優先して線維内部の架橋が不十分であったと考えられる。最適条件(図6B)では架橋が線維間だけでなくコラーゲン分子間にも導入された均一な架橋構造であったと考えられる。

SAC線維ゲルを走査型電子顕微鏡(SEM)で観察した結果、約70 nmのナノ線維からなる線維構造を有していた(図7)。豚コラーゲンと比較して線維が細く、線維の太さが均一であることを特徴としている。さらに線維1本の構造を原子間力顕微鏡(AFM)で観察した結果、線維には規則的な横紋構造を有していることがわかった(図7D)。横紋構造は生体のコラーゲン線維に見られるコラーゲンに特徴的な構造である(図1B)。この横紋構造の周期は生体のコラーゲン線維と同じであった。これは生体内と同様の正常な線維化が起こっていたことを示している。すなわち生体擬似線維を有するコラーゲンバイオマテリアルとして利用することが可能となった。

一方で今回のSAC線維ゲルの作製は思わぬ結果を生んだ。それは伸縮性コラーゲンである。SAC線維ゲルは変性温度以上(60°C)で加熱処理するとゲルが溶解することなく収縮して約2~3倍伸びる伸縮性コラーゲンに変化した(図8)⁶⁾。この現象はコラーゲン線維内に架橋が均一に導入されていることを裏づけている。収縮するメカニズムは明らかではないが、SAC線維ゲルの架橋率が20%前後であることを考慮すると、コラーゲン分子内には部分的に変性したランダムコイル構造を有していたと推定している(図9B)。このランダムコイル部分がバネのような働きをして伸縮性を与えていていると考えている(図9C)。従来のコラーゲン担体は伸縮性をほとんど持ていなかった。伸縮性を求められる血管、腱、心筋などの再生医工学材料として新しい応用が期待できる。

6. バイオマテリアルへの応用

SAC線維ゲルのバイオマテリアル化として細胞培養基材への応用を検討した。体外で自己の細胞を必要なだけ增幅させることを必要とする再生医工学において細胞培養は基本的な技術である。このとき細胞が本来持つ分化機能を失わずに維持していることが重要である。本研究ではヒト正常細胞をSAC線維ゲル上に播種して静置培養を行い、細胞増殖性と分化機能を評価した。比較のコラーゲンとして、市販の豚コラーゲンを線維化したゲルを用いた。その結果、SAC線維ゲル上で培養した歯根膜細胞の増殖性は豚コラーゲン線維ゲル対比約1.5倍高いことがわかった。また歯根膜細胞の分化機能であるアルカリフォスファターゼ(alkaline phosphatase; ALP)活性は増殖が安定した7日目以降から活性が高くなり分化機能を維持していることがわかった。さらに歯根膜細胞の代

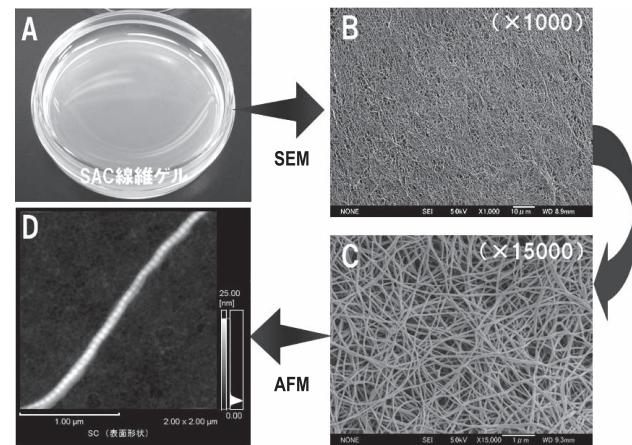


図7. SAC線維ゲルの外観写真(A), 走査型電子顕微鏡(SEM)写真(B, C), および原子間力顕微鏡(AFM)写真(D)

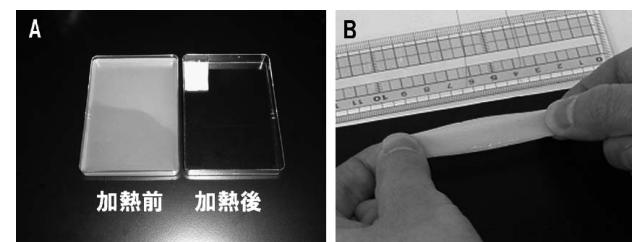


図8. 加熱処理後の伸縮性コラーゲン

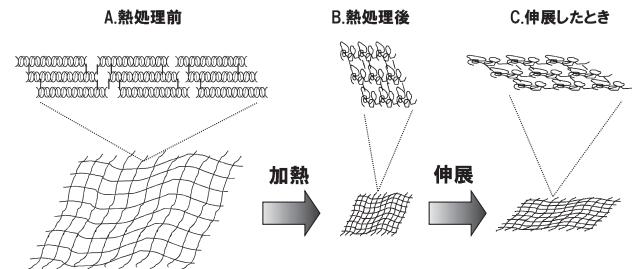


図9. 伸縮性コラーゲンの推定構造

表的な遺伝子も正常に発現していることを確認した⁷⁾。

以上のようにSAC線維ゲルは従来のコラーゲンと同様に細胞培養基材として利用可能であることがわかった。SAC線維ゲルの増殖促進メカニズムについてはまだ明らかになっていないが、鮭と豚ではコラーゲンのアミノ酸組成やコラーゲン線維構造、ゲル機械強度に差があることがわかつており、細胞はこれらの差を認識して増殖・分化シグナルを変化させていると考えている。

7. 細胞シート化技術の開発

最近の新しい再生医工学として細胞シート工学(cell sheet engineering)がある。細胞シートは細胞間の結合

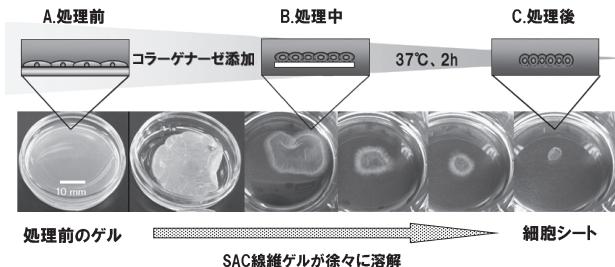


図10. SAC 線維ゲルのコラーゲナーゼ消化によって細胞シートが形成するまでの様子

が維持された、人工のスキャフォールド成分を含まないシート状の細胞凝集塊を示す。細胞シート工学はこの細胞シートを重層することによって3次元的に組織化された人工組織を構築することを目的とする。この手法は従来のスキャフォールド埋め込み型移植医療にあったスキャフォールド分解物由來の炎症反応や低い細胞密度といった問題⁸⁾を解決できる方法として期待されている。細胞シート化は温度応答性高分子をコーティングしたプラスチック上での剥離法が有名である⁹⁾。

我々はコラーゲナーゼ (collagenase) と呼ばれるコラーゲンを特異的に分解する酵素を用いてSAC線維ゲルを消化・分解することによって、SAC線維ゲル上で培養した細胞をシート状に剥離できることを見いだした¹⁰⁾。SAC線維ゲルはコラーゲナーゼによる分解速度が早くゲルの分解が均一に起こるため細胞シート化に適している。本方法で細胞がシート状に剥離するメカニズムは次の通りである(図10)。細胞はコラーゲンに伸展した(伸びた)状態で接着している。このとき細胞内にはストレスファイバーと呼ばれる細胞内骨格タンパク質が発達し、細胞内に張力がかかっている(図10A)。コラーゲナーゼによって細胞の足場となるコラーゲンゲルが徐々に解け始めると、細胞内の張力が優先して(細胞がゲルを引っ張り始めて)徐々にコラーゲンゲルが収縮し始める(図10B)。このとき細胞間結合に関与する β カテニンというタンパク質はコラーゲナーゼによる分解を受けないため、細胞間結合は維持されている。最終的にコラーゲンゲルが完全に分解すると細胞だけが収縮した細胞シートとして残る(図10C)。このコラーゲナーゼ処理は *in vitro* (試験管内) の実験で細胞の機能(増殖性、分化機能)にほとんど影響しないことがわかっている。また、合成高分子を利用した従来方法と比較して、コラーゲンを細胞シート化基材として利用している本方法は細胞との親和性や増殖性の点で有利と考えている。

今まで歯根膜細胞シートの作製とその重層化に成功し、歯周病再生治療用のミニ人工歯根膜組織の作製を検討している。また、線維芽細胞シートと角化細胞シート

を組み合わせた人工皮膚の作製にも取り組んでいる。

8. 商品化

SAC 線維ゲルは平成16年10月より「FIBRIGEL」の商品名で細胞培養キットとして発売が開始された。北海道の大学研究室や研究機関を中心としたサンプル提供によるモニタリングによりデータを蓄積し、それをもとに平成17年度以降は展示会を中心とした販促活動を開始した。これまでの蓄積データから、FIBRIGELへの癌細胞の浸潤性が高いことがわかり、癌細胞浸潤アッセイ用のゲルとして利用可能であることがわかった。また、培養が難しいとされる腱由來の細胞がFIBRIGEL上でよく成長することもわかつてき。さらにヌードマウス皮下への埋め込み試験では分解性や炎症性は従来のコラーゲンと同等であることもわかつた。

9. まとめ

コラーゲンの線維化と化学的架橋を組み合わせることによって、変性温度が低い鮭皮コラーゲンのバイオマテリアル化に成功した。生体が持つ性質(コラーゲンの線維化)を人為的に応用することによって(これはバイオインスパイア技術と呼ばれる)、鮭皮コラーゲンの耐熱性を大幅に改善するとともに、従来のコラーゲンにはなかった伸縮性担体の作成が可能となった。現在は再生医療への応用を目指し、人工歯根膜、人工皮膚、人工血管の開発を進めているが、この先の展開として付加価値(高い細胞増殖性、細胞シート化、伸縮性)を持った新規コラーゲンバイオマテリアルとして再生医工学分野へ利用されることを期待している。

10. 最後に

骨再生を筆頭に、再生医工学を用いた組織再生術が実用化されつつある。世界的に脚光を浴びる万能細胞研究に比べ、組織再生の足場材料に関する研究は比較的地味な印象がある。しかし、現時点で実用化に貢献しているのは言うまでもなく「材料」である。再生医工学の黎明期から現在に至るまで、コラーゲンは最もすぐれた組織再生の足場材料として利用されている。その重要性は今後も変わらないと考えられる。

弊社は鮭皮コラーゲンの製造・構造制御・安定化などの基盤技術の整備をほぼ終えた。今後は医療材料研究を加速し、一日でも早く実用化に結びつけ、医療の高度化に貢献したい。そのために用途を絞り込み、医療機関と連携しながらの材料設計に研究の軸足を移していく予定である。用途としては人工血管、人工硬膜、および人工歯根膜などを想定している。特に人工血管については、

弊社の独自技術である伸縮性コラーゲンの有効性が実証されつつある。

本研究を手掛けるにあたり、北海道大学工学研究科の棟方正信先生、科学技術振興機構の清水條資先生、他多くの方のご指導、ご協力を頂いた。この度、名譽ある日本生物工学会技術賞を受賞し、ゴールまでの道のりが長い医療材料研究を継続・加速するための大きな励みになった。これからも北海道の地域資源を生かし、産学官という取り組みの中で、新たな成果を上げる所存である。

文 献

- 1) Hulmes, D. J., Miller, A., Parry, D. A., Piez, K. A., and Woodhead-Galloway, J.: *J. Mol. Biol.*, **79**, 137–148 (1973).
- 2) Kadler, K. E., Holmes, D. F., Trotter, J. A., and Chapman, J. A.: *Biochem. J.*, **316**, 1–11 (1996).
- 3) Lee, C. H., Singla, A., and Lee, Y.: *Int. J. Pharm.*, **221**, 1–22 (2001).
- 4) Nagai, N., Yunoki, S., Suzuki, T., Sakata, M., Tajima, K., and Munekata, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **97**, 389–394 (2004).
- 5) Yunoki, S., Nagai, N., Suzuki, T., and Munekata, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **98**, 40–47 (2004).
- 6) Yunoki, S., Mori, K., Suzuki, T., Nagai, N., and Munekata, M.: *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, in press.
- 7) Nagai, N., Mori, K., Satoh, Y., Takahashi, N., Yunoki, S., Tajima, K., and Munekata, M.: *J. Biomed. Mater. Res. A.*, in press.
- 8) Saldanha, V. and Grande, D. A.: *Biomaterials*, **21**, 2427–2431 (2000).
- 9) Shimizu, T., Yamato, M., Kikuchi, A., and Okano, T.: *Biomaterials*, **24**, 2309–2316 (2003).
- 10) Nagai, N., Yunoki, S., Satoh, Y., Tajima, K., and Munekata, M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **98**, 493–496 (2004).