

論文

温度応答性の収縮 - 膨張サイクルにより得られる 高弾力性コラーゲングル

柚木 俊二*¹⁾

Highly elastic collagen gels prepared from thermo-responsive shrinkage and swelling

Shunji Yunoki*¹⁾

Highly elastic collagen gels were prepared from cross-linked collagen fibrillar gels by the use of their thermo-responsive shrinkage and swelling. The collagen gels prepared by simultaneous processing of fibril formation and chemically-induced cross-linking dramatically shrunk in hot water (80°C). The shrunken gels had a rubber-like elasticity as reported previously. Interestingly, the shrunken gels gradually swelled in cold water (4°C), and partially recovered the appearance and mechanical properties of the cross-linked collagen fibrillar gels. The thermo-responsive shrinkage and swelling was reversible. The swelled gel showed highly elastic properties; its stress-strain behavior changed little through 10 repetitions of penetration to a strain of 0.5. The strain at the breaking point was above 0.8. The high elasticity of the swelled collagen gel is expected to be useful for tissue engineering applications in which elastic properties are required. The swelling of the collagen gel in cold water seemed to be due to the renaturation of denatured collagen. This speculation is supported by the similarity in thermo-responsibility between the gel swelling and renaturation of denatured collagen.

キーワード : コラーゲン, ゲル, 線維, 変性, らせん回復, 温度応答性

Keywords : collagen, gel, fibril, denaturation, renaturation, thermo-responsive

1. 緒言

幹細胞を用いて組織・器官を再生させる「再生医療」の実現に期待が寄せられている。幹細胞生物学は近年急速な進歩を示し、1998年にヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) 株が樹立され⁽¹⁾、2006年には体細胞から多能性幹細胞 (iPS 細胞) が作製された⁽²⁾。しかし、幹細胞があれば再生医療がすぐに実現するわけではない。再生医療の実現は多くの場合、ティッシュエンジニアリング (tissue engineering) との融合が必要とされる。ティッシュエンジニアリングは生体が持つ治癒力を最大限に引き出すための環境作りであり、‘細胞の足場材料 (scaffold)’ に ‘細胞’ と ‘薬剤’ を組み合わせて生体組織の再生誘導を行うための学問である⁽³⁾。

Scaffold にはセラミックス, 合成高分子, および生体高分子など多種多様な材料が利用されているが、生体高分子コラーゲンは最も広く利用されている材料の1つである⁽⁴⁾。コラーゲンは生体内でいわば細胞の住処として機能し、体内に最も多量に存在するタンパク質として知られる。Scaffold としてのみならず、止血剤, ドラッグデリバリーキャリア⁽⁴⁾, 人工皮膚⁽⁵⁾, 人工骨⁽⁶⁾などがコラーゲンから開発され、既に多数が臨床応用されている。

ここで、scaffold を含めた医療用具へのコラーゲンの利用方法に対し1つの課題を指摘する。コラーゲン医療用具の開発はほとんどの場合、その生体適合性と生体吸収性にのみ着目して行われてきた。一方、コラーゲンの生体内での

主たる役割は力学的支持体である。骨の強さ、腱・靭帯の強さと特異な伸縮性、あるいは皮膚 (真皮), 筋膜, および軟骨の弾性にはいずれもコラーゲン線維が重要な役割を果たしている。しかし、既存のコラーゲン材料は特に湿潤状態で力学的に脆弱であり⁽⁷⁾、伸縮性もほとんど無い⁽⁸⁾。すなわち、コラーゲンのもつポテンシャルは医療用具において未だ十分に発揮されていない。

筆者らは上記の課題を鑑み、架橋技術と熱処理を組み合わせさせて伸縮性コラーゲンを開発した⁽⁹⁾。本研究では、伸縮性コラーゲンに関する新たな知見として、温度応答性の収縮 - 膨張サイクルを明らかにする。膨張によって生じる力学的な変化を解析するとともに、その構造変化について考察する。

2. 実験方法

2.1 コラーゲン水溶液の調製 鮭の皮から公知の方法⁽¹⁰⁾でコラーゲンを抽出、精製した。以下に方法を簡単に述べる。鮭の皮をクロロホルム/メタノールで脱脂し、酢酸水溶液に浸漬した。コラーゲンが溶出した外液から不溶残渣を除去し、得られた粗コラーゲン溶液にペプシンを添加してアテロ化 (コラーゲンの非らせん領域の除去) した。その後、食塩による塩析出を繰り返し、ペプシンその他の非コラーゲンたんぱく質を除去し、蒸留水に対して透析して精製コラーゲンを得た。コラーゲンを凍結乾燥し、所定の濃度に溶解して実験に供した。

2.2 伸縮性コラーゲングルの作成 コラーゲンの線維

*1) バイオ応用技術グループ

化と架橋を同時に生じさせる著者らの方法⁽¹¹⁾に従い、コラーゲン水溶液とリン酸緩衝液を混合して架橋コラーゲン線維ゲルを得た。以下に方法を簡単に述べる。pH3 希塩酸を溶媒とした 0.3%コラーゲン水溶液と pH 7, 40 mM リン酸緩衝液 (70 mM 食塩および 100 mM EDC*含有) を 10°C に保ち、等容積混合して内径 85 mm のシャーレに流し込んだ。10°C で一晩静置して十分にゲル化させ、実験に供した。

次に、架橋コラーゲン線維ゲルを 80°C の熱水に浸漬した。得られた収縮ゲルを S-ゲル (Shrunken-ゲル) と定義した。その後、4°C の冷水に浸漬した。膨張がほぼ頭打ちになった 168 h 後のゲルを SS-ゲルと定義した。この熱水浸漬 - 冷水浸漬による収縮 - 膨張サイクルを 2 回経て得られたゲルを SS2-ゲルと定義した。

*EDC: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide

2. 3 ゲルの膨張率の算出 ゲルの直径を互い直行した 2 箇所計測し、その平均値を求めた。作製直後の架橋コラーゲン線維ゲル (図 1 a) の直径との比から、膨張率を直径の回復率 (%) として算出した。

2. 4 コラーゲン線維の電子顕微鏡観察 走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて、ゲル中のコラーゲン線維を観察した。コラーゲンゲルをグルタルアルデヒドで固定し、CO₂ 臨界点乾燥装置を用いて乾燥試料を作製した。乾燥コラーゲンを白金コーティングし、JSM-5600LV (日立製作所製) を用いて、加速電圧 10 kV で観察した。

2. 5 伸縮性コラーゲンゲルの力学試験 強度試験機 (TA XT.2 plus, Stable Microsystems) を用いて、ゲルの貫入試験を行った。ゲルに対し、直径 5 mm の SUS 製プローブを速度 0.5 mm/s で押し込み、応力 - ひずみ曲線を得た。プローブが 1g の応力を検知したときのゼロ点 (底面) からの距離をゲル厚みとして、プローブの移動距離からひずみを算出した。

2. 6 コラーゲンらせんの回復 野村らの方法⁽¹²⁾に従い、水溶液状態での熱変性コラーゲンのらせん回復を測定した。pH 7 のリン酸緩衝液を溶媒として 0.25% コラーゲン水溶液を調製し、60°C に加温して完全に変性させた。水溶液を石英セル (光路長 100 mm) に入れ、旋光度計 (SEPA-300, 堀場製作所) に設置した。セルホルダをあらかじめ 4°C に冷却し旋光度変化を追跡した。らせん回復率は、未変性コラーゲンの旋光度をらせん率 100%、完全変性コラーゲンの旋光度をらせん率 0% とし、得られた旋光度から算出した。

3. 結果

3. 1 温度応答性の収縮 - 膨張サイクル 架橋コラーゲン線維ゲルが熱水への浸漬により収縮し、冷水への浸漬により膨張する様子を図 1 に示す。架橋コラーゲン線維ゲル (図 1 a) を 80°C の熱水に浸漬すると、速やかに収縮を始めた (図 1 b および 1 c)。シャーレ底面側が凸になる湾曲した形状を示し、およそ 5 分後に収縮を停止した (図 1 d)。収縮の過程で、半透明だったゲルは白色に変化して透明性を失った (S-ゲル)。S-ゲルを 4°C の冷水に浸漬したところ、

ゆっくりと膨張を始めた。冷水に浸漬してから 12 h で明確な膨張が見られた (図 1 e)。24 h 以上では膨張がほぼ頭打ちになったので、168 h で浸漬を終了した (SS-ゲル) (図 1 f)。SS-ゲルをふたたび熱水に浸漬すると、図 1 d と同様の収縮ゲルが得られた。ふたたび冷水に浸漬すると、ほぼ同等の速度で図 1 f のゲルが得られた (SS2-ゲル)。

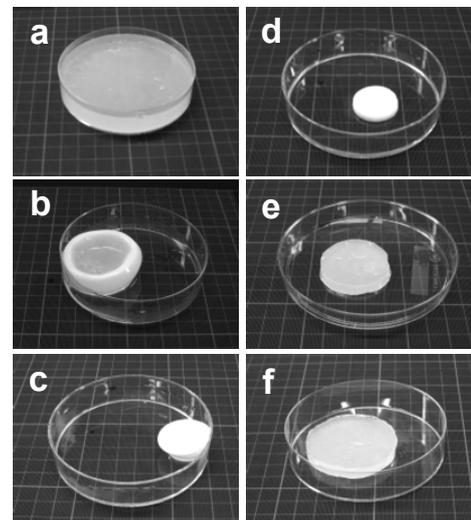


図 1. 熱水への浸漬により収縮し、冷水への浸漬により膨張する架橋コラーゲン線維ゲルの外観

(a) 作製後の架橋コラーゲン線維ゲル, (b) および (c) 熱水への浸漬により収縮する過程, (d) 完全に収縮した状態 (S-ゲル), (e) 冷水へ浸漬してから 12 h 後, (f) 冷水へ浸漬してから 168 h 後 (SS-ゲル)

図 2 にゲルの膨張の時間変化を示した。2 回目の膨張は 1 回目と同様の時間依存性を示した。冷水浸漬してから 168 h 後のゲルのサイズは 2 回目の方が大きかったが、熱水浸漬後のゲルに対する膨張率で表すと、1 回目 (1.53 倍) と 2 回目 (1.63 倍) の膨張率はほぼ同じであった。

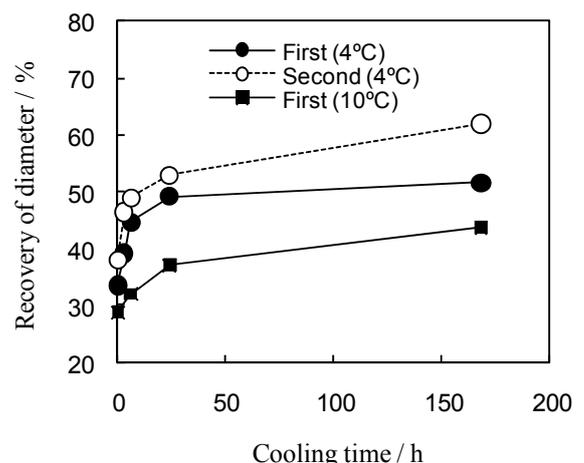


図 2. 熱水への浸漬により収縮した架橋コラーゲン線維ゲルの冷水中での膨張

図 1 a のゲルの内径を 100% として、ゲルの内径の増加により膨張を評価した。First, 1 回目の熱水冷水 - 冷水浸漬; Second, 2 回目の熱水冷水 - 冷水浸漬

冷水の温度を 4℃から 10℃に高めた場合の膨張も評価した。熱水による収縮後の冷水中の膨張は, 明らかに 10℃の方が小さかった (図2)。水の温度が 30℃に達すると, もはや膨張は起こらなかった。

3.2 ゲルの力学試験 図3にコラーゲンゲルの貫入試験から得られた典型的な応力 - ひずみ曲線を示す。架橋コラーゲン線維ゲルはひずみ 0.35~0.40 の間に降伏値を示した (n=5)。これに対し, S-ゲルはほぼ完全に圧縮され (ひずみ>0.9), 装置の計測限界値である 5 kgf の荷重がかかるまで降伏を示さなかった。SS-ゲルはひずみ 0.89~0.92 の間に降伏値を示し (n=5), 架橋コラーゲン線維ゲルと S-ゲルの中間の性質を示した。SS2-ゲルの応力 - ひずみ挙動は SS-ゲルとほぼ同じだった。S-ゲルに対してひずみ 0.5 までの繰り返し貫入試験を実施した。得られた応力 - ひずみ曲線を図4に示す。応力 - ひずみ曲線はヒステリシスを示した。1回目から2回目の貫入においてわずかな応力の減少が見られたが, 2回目以降 (~10回) はほぼ同じ曲線となった。

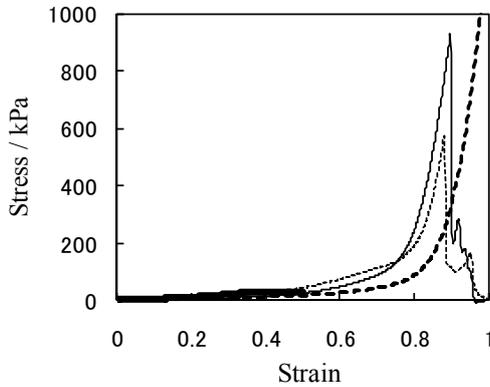


図3. コラーゲンゲルの貫入試験により得られた典型的な応力 - ひずみ曲線

太い実線、架橋コラーゲン線維ゲル； 太い破線、S-ゲル； 細かい実線、SS-ゲル； 細かい破線、SS2-ゲル

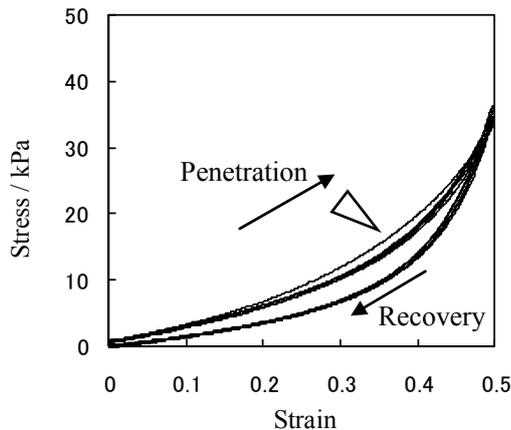


図4. SS-ゲルの繰り返し貫入試験から得られた応力 - ひずみ曲線

図中の白抜き矢印は1回目の圧縮により得られた曲線を示す。

3.3 コラーゲンゲルのナノ線維構造 架橋コラーゲン線維ゲルおよび SS-ゲルの SEM 観察を行った (図5)。架橋

コラーゲン線維ゲルは典型的な type I コラーゲンのナノ線維ネットワークを有していた。収縮 - 膨張を1回行ったゲルにおいてもナノ線維ネットワークは保持されていたが, 切断された線維が見られ, ネットワークが疎になっていた。

3.4 コラーゲンのらせん回復 水溶液状態での熱変性状態からのコラーゲンらせん回復を図6に示した。図6aは旋光度の実測値であり, 図6bは旋光度から求めたコラーゲンらせん率である。4℃において, 変性コラーゲンは3h後に32%のらせん回復率を示し, 24h後には60%に達した。一方, 冷水温度を10℃に高めると, コラーゲンらせん回復が抑制された。24h後らせん回復率は30%まで低下した。

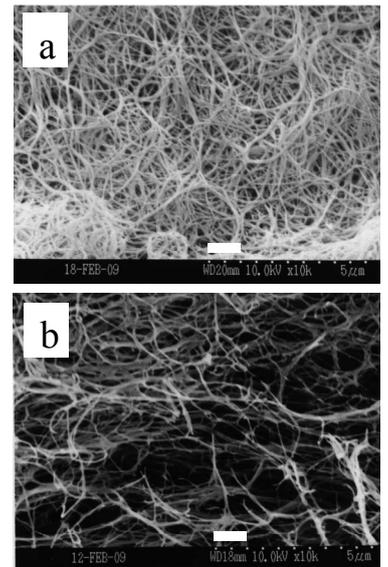


図5. コラーゲンゲルの SEM 像
(a) 架橋コラーゲン線維ゲル, (b) SS-ゲル
図中のスケールバーは 1μm を示す。

4. 考察

架橋コラーゲン線維ゲルを熱水処理すると著しく収縮した。原因はコラーゲンの3重らせんのランダムコイルへの変性である。コラーゲンの変性温度は水溶液状態で最も低く, 乾燥状態で最も高くなる。乾燥状態でのコラーゲンの変性温度は 100℃を超えるが⁽¹³⁾, 乾燥コラーゲンに水を吸収させると 70℃以下に低下する⁽¹⁴⁾。80℃の熱水中ではゲル中のコラーゲンが棒状の3重らせんから糸まり状の球状タンパク質に変性する。その結果, ゲルの著しい収縮が生じる。

伸縮性コラーゲンを冷水に浸漬すると徐々に膨張し, 外観 (図1) および力学特性 (図3) が熱処理前に近づくことを新たに発見した。サイズの小さかった SS-ゲルの方がむしろ架橋コラーゲン線維ゲルよりも線維ネットワークが疎だった (図5)。この事実は, ゲルの膨張と収縮は線維ネットワークの疎密に起因するのではなく, 分子レベルの構造変化が膨張の原因であることを示唆している。熱変性したコラーゲンを変性温度以下に冷却すると, コラーゲンらせんを徐々に回復する (renaturation) ことが知られている⁽¹⁵⁾。らせん回復は温度が低いほど活発であり, S-ゲルから SS-ゲルへの膨張と温度依存性が一致した (図6)。SS-ゲルの力学特性が架橋コラーゲン線維ゲルと S-ゲルの中間の性質を示した。以上の事実は, S-ゲルから SS-ゲルへの膨張が熱変性コラーゲンのらせん回復によることを示唆している。

コラーゲンのらせん回復は水溶液中のコラーゲンについてのみ研究されてきた。ゲルやスポンジ, シートなど成形体の中でコラーゲンらせん回復が起こったことを示した報

告は無い。コラーゲン成形体の中のらせん回復を直接測定する方法は、示差走査型熱量計 (DSC) 以外に無い。しかし、DSC による変性温度やエンタルピーの測定値はゲル中の水分含量により敏感に変化するため、ゲル試料間のらせん回復率を定量するには至っていない。

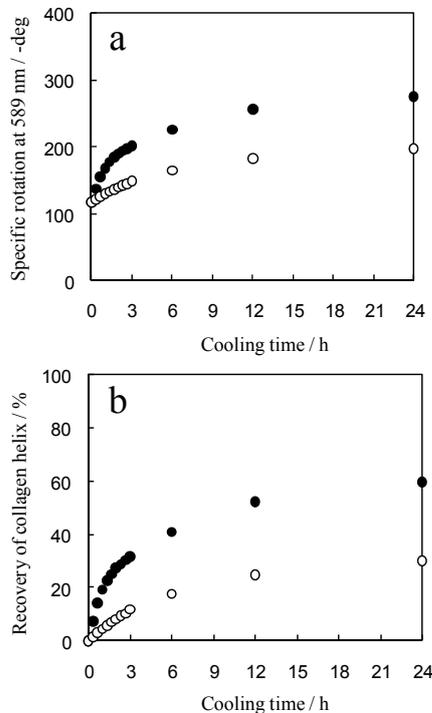


図6. 水溶液状態での熱変性コラーゲンのらせん回復
(a) 比旋光度, (b) 比旋光度から求めたコラーゲンらせん回復率
(●) 4°Cの冷水中, (○) 10°Cの冷水中

次に、SS-ゲルの弾力性について述べる。SS-ゲルはひずみ0.5を超える大変形に対し優れた復元力を持っていた(図4)。再生医療に用いられている公知のコラーゲン線維ゲルは中性でのコラーゲンの自己組織化を利用した物理ゲルであり⁽¹⁶⁾、圧縮するとゲルネットワークから漏水して明確な降伏を示さない⁽¹¹⁾。このため、ティッシュエンジニアリングの足場材料としてはゲル状態で用いられることが少なく、多くはスポンジやフィルム・シートとして用いられている⁽⁴⁾。SS-ゲルは従来のコラーゲンゲルでは実現できなかった変形・荷重のかかるティッシュエンジニアリングに応用できると期待される。

通常のコラーゲン線維ゲルと異なるSS-ゲルの優れた弾力性については、筆者らが開発した架橋コラーゲン線維ゲルに特有の‘ダブルネットワーク’構造⁽¹¹⁾に起因すると推定される。通常のコラーゲン線維ゲルの架橋点はコラーゲン線維の接点のみに存在し、架橋点が疎になっている。このため、圧縮などの変形に対し復元力に乏しい。一方、架橋コラーゲン線維ゲルは原子間力顕微鏡観察により実証した通り、コラーゲン線維間をオリゴメリックなコラーゲンが架橋した緻密な架橋点を持つ。熱処理によりコラーゲン線維とオリゴメリックなコラーゲンが変性、収縮して架橋

点が近づき、エントロピー弾性を発現するたわみが架橋点間に生じたと考えている。

本研究は、架橋コラーゲン線維ゲルを熱水処理により収縮させて得られる伸縮性コラーゲンゲルの新たな性質を明らかにした。コラーゲンを主体とする生体組織は、本来、皮膚や腱・靭帯のように優れた伸縮性を持つ。一方で、医療用具として研究開発されているコラーゲン材料には伸縮性がほとんど無く、コラーゲンの用途展開を制限する理由の1つとなっている。筆者が開発した高弾性コラーゲンゲルは弾性足場材料が求められる血管や軟骨のティッシュエンジニアリングに応用される可能性を秘める。

(平成23年5月24日受付, 平成23年6月17日再受付)

文 献

- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, and Jones JM: "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." *Science*, Vol.282, No.5391, p.1145 (1998)
- Takahashi K and Yamanaka S: "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." *Cell*, Vol.126, No.4, p.663 (2006)
- 田畑泰彦: 「再生医療を支えるバイオマテリアルと基盤技術, 再生医療のためのバイオマテリアル」, コロナ社, p.3 (2006)
- Lee CH, Singla A, and Lee Y: "Biomedical applications of collagen." *Int J Pharm*, Vol.221, No.1-2, p.1 (2001)
- Koide M, Osaki K, Konishi J, Oyamada K, Katakura T, Takahashi A, and Yoshizato K: "A new type of biomaterial for artificial skin: dehydrothermally cross-linked composites of fibrillar and denatured collagens." *J Biomed Mat Res*, Vol.27, No.1, p.79 (1993)
- Burg KJL, Porter S, and Kellam JF: "Biomaterial development for bone tissue engineering." *Biomaterials*, Vol.21, No.23, p.2347 (2000)
- Hiraoka Y, Kimura Y, Ueda H, Tabata Y: "Fabrication and biocompatibility of collagen sponge reinforced with poly (glycolic acid) fiber." *Tissue Eng*, Vol.9, No.6, p.1101 (2003)
- Koide T and Daito M: "Effects of various collagen crosslinking techniques on mechanical properties of collagen film." *Dent Mater J*, Vol.16, No.1, p.1 (1997)
- Yunoki S, Mori K, Suzuki T, Nagai N, and Munekata M: "Novel elastic material from collagen for tissue engineering." *J Mater Sci Mater Med*, Vol.18, No.7, p.1369 (2007)
- Yunoki S, Nagai N, and Suzuki T, Munekata M: "Novel biomaterial from reinforced salmon collagen gel prepared by fibril formation and cross-linking." *J Biosci Bioeng*. Vol.98, No.1, p.40 (2004)
- Yunoki S and Matsuda T: "Simultaneous processing of fibril formation and cross-linking improves mechanical properties of collagen." *Biomacromolecules*, Vol.9, No.3, p.879 (2008)
- Nomura Y, Yamano M, and Shirai K: "Renaturation of a1 chains from shark skin collagen type I." *J Food Sci*, Vol.60, No.6, p.1233 (1995)
- Sionkowska A and Kamińska A: "Thermal helix-coil transition in UV irradiated collagen from rat tail tendon." *Int J Biol Macromol*, Vol.24, No.4, p.337 (1999)
- Gorham SD, Light ND, Diamond AM, Willins MJ, Bailey AJ, Wess TJ, and Leslie NJ: "Effect of chemical modifications on the susceptibility of collagen to proteolysis. II. Dehydrothermal crosslinking." *Int J Biol Macromol*, Vol.14, No.3, p.129 (1992)
- Altgelt K, Hodge AJ and Schmitt FO: "Gamma tropocollagen: A reversibly denaturable collagen macromolecules." *Biochemistry*, Vol.47, p.1914 (1961)
- Willits RK and Skornia SL: "Effect of collagen gel stiffness on neurite extension." *J Biomater Sci Polym Ed*, Vol.15, No.12, p.1521 (2004)