

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：82670

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01321

研究課題名(和文) 生体腱のコラーゲン階層構造を模倣した人工腱マトリックスの創製とその再構築機序の解明

研究課題名(英文) Development of artificial tendon matrices which mimic hierarchical collagen structure of tendon and evaluation of their remodeling properties

研究代表者

柚木 俊二 (Yunoki, Shunji)

地方独立行政法人東京都立産業技術研究センター・開発本部開発第二部バイオ応用技術グループ・主任研究員

研究者番号：20399398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：フィブリルが軸方向に配向した紐状コラーゲングル(CCG)の連続成型技術を開発した。リン酸緩衝液に溶解したコラーゲンを38℃に加熱したステンレス管に導入する工程により、管内で急速なコラーゲンの線維化を生じ、CCGが連続的に吐出された。従来の湿式紡糸法に対する本法の優位性は、ゲル全層に渡りフィブリルを配向させることができ、更にゲルの直径を制御可能なことである。CCGを乾燥させると断面積が0.0123～0.135 mm²のfiberを作製できた。湿潤状態での破断強度は54.5 ± 7.8 MPaに達し、ヒト靭帯に比肩した。このfiberの組紐によって細胞浸潤性を有する人工腱マトリックスを作製した。

研究成果の概要(英文)：We developed a continuous formation method of cord-like collagen gels comprising fibrils preferentially aligned along the geometrical axes (CCGs). Collagen dissolved in a sodium phosphate buffer was introduced into a stainless cylinder warmed at 38 °C. This process caused collagen fibril alignments under acute fibril formation in the cylinder, resulting in continuous formation of CCGs. Outstanding advantages of this method over conventional wet spinning include the capacity of this technique to form aligned fibrils in the entire gels and to control the diameter of cord-like gels over 1 mm. The air-drying of CCGs produced dry collagen fibers with cross-sectional areas of 0.0123-0.135 mm². Upon the rewetting of the fibers, they failed at a stress of 54.5 MPa, which is higher than the mean failure stress of anterior cruciate ligament tissue(13.3-37.8 MPa) Artificial tendons with the capacity of cell infiltration could be fabricated from the fibers by braiding.

研究分野：生体材料

キーワード：人工腱 コラーゲン ファイバー 紡糸

1. 研究開始当初の背景

関節外科領域では自家腱移植が多用されている。移植後の自家腱には生体内再構築機転が作用し、物性が経時的に変化し、患者は運動機能を回復することができる。しかし、採取部に与える害が問題になっており、自家腱移植に代わる人工腱マトリクスの開発が待望されている。

従って、生体内の組織再構築過程を想定に入れた人工腱マトリクスが理想であるが、その開発研究は国内外を問わず全くない。天然の腱マトリクスに起こる再構築現象に関するこれまでの研究は、天然の腱を人為的に改変することで行われてきた。天然の腱マトリクスの構造的特徴を模した人工腱マトリクスを作製し、その構造を制御できれば、in vivo 評価により組織再構築現象の核心に迫ることができる。さらに、再構築現象に寄与する構造因子を反映させた、理想的な生体置換型人工腱の開発へと展開できる。

これまでに研究代表者らは科研費基盤C (H24~26年) の補助を受け、腱のコラーゲン配向構造を模倣した世界初の「不均一径を有する一軸配向コラーゲン線維束」の開発に成功した (特開 2016-077411)。このゲルは配向軸方向に強化された引張強度を有し、また接着した線維芽細胞の配向増殖を促進するなど画期的な性能を示した。しかし in vivo 評価において、天然の腱と比べて被細胞浸潤能および構造特性が劣ることが課題であった。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では、①配向コラーゲン線維束の作製技術をさらに発展させ、配向コラーゲン fibril から構成された紐状コラーゲンゲルの連続成型技術を開発する。この紐状ゲルから作製した fiber を用いて、天然の腱が持つ線維の階層構造 (fibril < fiber < fascicle) を模倣し、天然の腱と比肩し得る被細胞浸潤能および構造特性を有する「高強度3次元ハイブリッド人工腱 (人工腱マトリクス)」を創製する。また②すでに確立した in vivo 実験系に用い、生体内再構築現象によって起こる人工腱マトリクスの構造と物性の変化を生体力学および分子生物学的に評価し、その分子機序を解明する。

3. 研究の方法

(1) 中性コラーゲンゾルの調製
酸性コラーゲン水溶液 (濃度 1%) をエバポレーターで 3%まで濃縮した。PBS を模倣したリン酸緩衝液 (1×NPB; 140 mM 塩化ナトリウム含有 50 mM リン酸水素ナトリウム緩衝液 (pH 7)) の濃縮液と混合・均一化し、2倍濃度の緩衝液 (2×NPB) を溶媒とした 2.5% コラーゲンゾルを調製した。

得られた中性コラーゲンゾルの線維化速度を回転型レオメーターで定量した。レオメーターにゾルを設置した後、装置温度を 23℃

から 38℃へと急激に上昇させた。ゾルが線維化してセンサーがスリップし、せん断応力が低下し始めるまでの時間を t_{max} (s) と定義した。
(2) 紐状コラーゲンゲルの連続成型 (特願 2017-215184)

線維化速度を高めた中性コラーゲンゾルを加温されたステンレス管へと連続供給し、紐状コラーゲンゲルの連続成型を実施した。2.5%コラーゲンゾル (溶媒は 2×NPB) を 30-mL シリンジに充填し、10G、13G、もしくは 18G のステンレス管とシリンジをシリコーンゴムチューブで接続して、ステンレス管を 38℃の 1×NPB 中に挿入した。ステンレス管内で所定のせん断速度・せん断時間が付与されるように計算された流速でコラーゲンゾルを押し出し、ステンレス管から紐状コラーゲンゲルを吐出させた。

(3) 紐状コラーゲンゲルの評価

・複屈折測定 二次元複屈折装置を用いて紐状コラーゲンゲルのレターデーションを測定し、サンプル全体の面分析を行うとともに、線分析により線維配向性を数値化した。

・内部線維構造 紐状コラーゲンゲルを t-ブタノール凍結乾燥し、長軸方向の断面の走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察を行った。

(4) コラーゲン fiber の作製

紐状コラーゲンゲルを以下の処理に供し、コラーゲン fiber を作製した。サンプル名を表 1 の通り定義した。

①UN 処理 (未架橋) 紐状コラーゲンゲルを 5 mM リン酸緩衝液および 90%エタノールで洗浄し、発泡ポリエチレン棒に巻き取り風乾した。

②DHT 処理 UN 処理コラーゲン fiber に対して 130℃ - 12 h の真空処理を行い、脱水熱架橋を導入した。

③EN 処理 紐状コラーゲンゲルを 50 mM の 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EDC) に浸漬し、37℃ - 12 h の架橋処理を行った。水および 90%エタノールで洗浄し、発泡ポリエチレン棒に巻き取り風乾した。

④EN/DHT 処理 EN 処理を行ったコラーゲン fiber に DHT 処理と同様の脱水熱架橋を行った。

表 1 コラーゲン fiber の名称

名称	使用したステンレス管	線維配向	架橋処理
Sa-fiber	18G	配向	EN/DHT
Ma-fiber	13G	配向	EN/DHT
Mr-fiber	13G	無秩序	EN/DHT
La-fiber	10G	配向	EN/DHT
Ma(UN)-fiber	13G	配向	UN
Ma(DHT)-fiber	13G	配向	DHT
Ma(EN)-fiber	13G	配向	EN

(5) コラーゲン fiber の評価

・形態観察 乾燥および湿潤状態の EN/DHT 処理コラーゲン fiber の外観および断面を光学顕微鏡で観察し、image J を用いて断面積を求めた。

・架橋度 トリニトロベンゼンスルホン酸とコラーゲンのアミノ基との呈色反応により求めたアミノ基消費率を架橋度とした。

・酵素耐性 コラゲナーゼ水溶液にコラーゲン fiber を浸漬し、37°C で 7 h 静置した。その後、ポアサイズ 0.45 μm フィルターを通過した上清中のヒドロキシプロリンを定量し、fiber の分解率を算出した。

・力学特性 テクスチャアナライザーを用いて、乾燥および湿潤状態の EN/DHT 処理コラーゲン fiber の引張試験を行った。引っ張り方向と垂直に配置された一对の平行棒に fiber を巻き付けて固定し、速度 1 mm/s で引っ張った。得られた応力 - 歪曲線からヤング率、引張強度（破断時応力）、および破断歪を算出した。算出には初期の断面積を用いた。

(6) コラーゲン fiber への細胞浸潤性の評価 EN/DHT 処理した Sa-fiber を 54 ループさせた全長 20 mm のインプラントを作製した。これらを家兎の背部皮下に埋植し、3 週後に摘出して HE 染色による組織観察を行い、fiber 間および fiber 内への細胞浸潤性を評価した。

(7) 人工腱の作製と評価

・作製 架橋処理および直径の異なる 3 種類のコラーゲン fiber (Sa-、Ma-、および Ma(DHT)-fiber) を用いて、総断面積が同じになるように組紐を施した。Ma- および Ma(DHT) fiber においては組紐作製ディスクを用いて 6 本の組紐を作製した。一方、直径の小さい Sa-fiber においては、まず 6 本の撚り紐を作製し、その後撚り紐 5 本の組紐を作製した。両端を玉結びで固定し、長さ約 50 mm の人工腱を作製した。

・形態観察 前出の方法で SEM 観察を行った。

・力学特性 前出の方法で引張試験を行った。

4. 研究成果

(1) 本研究の価値

・高度に線維配向した紐状コラーゲンゲルの連続成型技術が開発され、生体置換型人工腱の構成要素となり得る優れた強度の線維配向コラーゲン fiber が量産可能になった。従来の湿式紡糸技術はコラーゲン線維が配向しないという課題があった。

・本連続成型技術は金型のサイズを変えることで紐状ゲルの直径が可変であるため、コラーゲン fiber の直径を制御でき、直径の異なる fiber から構成された人工 fascicle の開発が可能になった。従来の湿式紡糸技術では、凝固液中に吐出されたコラーゲンゾルの周囲から徐々にゲル化するため、直径の制御が困難であった。

・本連続成型技術で作製される紐状コラーゲンゲルは強度が高く、未架橋の状態乾燥し

て種々の架橋が導入できた。このため、架橋度により酵素耐性を制御したコラーゲン fiber を作製でき、生体吸収性が異なる fiber から構成された人工 fascicle の開発が可能になった。

(2) 中性コラーゲンゾルの線維化速度

1 \times NPB、1.5 \times NPB、および 2 \times NPB を溶媒とした 2.5% コラーゲンゾルの t_{max} は、レオメーターのセンサーギャップを 13G ステンレス管の内半径と等しく 1 mm とした場合に、それぞれ 120 s、60 s、および 21 s と求められた。NPB 濃度を高めることで線維化速度が高くなった。

(3) 紐状コラーゲンゲルの連続成型と線維配向性

2 \times NPB を溶媒とした 2.5% コラーゲンゾルに対して 13G のステンレス管内でせん断速度 $\gamma_a = 5 \text{ s}^{-1}$ およびせん断時間 21 s (t_{max} と等価) を与えられるようにポンプの流速とステンレス管長 (26 mm) を設定し、38°C に加温したステンレス管からの紐状ゲルの連続成型に成功した (図 1 a)。紐状ゲルは切れることなく同一の直径で成型され (図 2 a)、平滑な表面を有していた (図 2 b)。

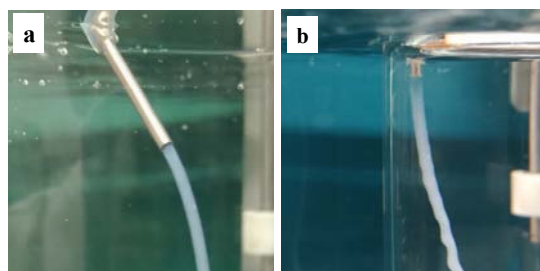


図 1 13G ステンレス管から紐状コラーゲンゲルが吐出される様子

(a)せん断時間 = 1 $\times t_{max}$ 、せん断速度 = 5 s^{-1}

(b)せん断時間 = 0.2 $\times t_{max}$ 、せん断速度 = 5 s^{-1}

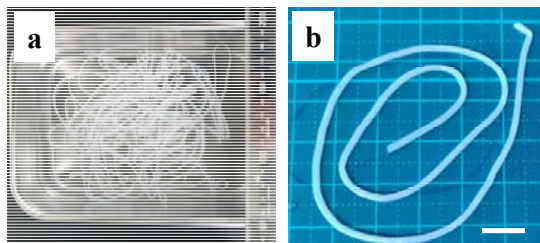


図 2 13G ステンレス管から吐出された紐状コラーゲンゲルの外観

(a)全体像、(b)拡大像 (図中のスケールは 10 mm)

得られた紐状コラーゲンゲルの複屈折面分析像を図 3 a に示す。サンプル全体にわたってレターデーションの高い領域 (黄~赤) を有し、長軸方向にコラーゲン線維が配向していることが明らかになった。図 3 c は長軸と垂直方向の線分析結果である。中心部の配向性がやや弱かったが、均一度の高い配向性

が観察された。

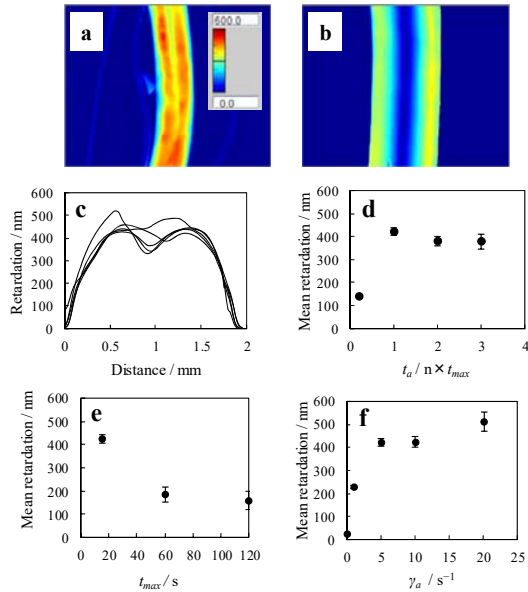


図3 紐状コラーゲンゲルの複屈折測定結果

(a) 図1aのゲルの面分析像、(b) 図1bのゲルの面分析像、(c) 図1aのゲルの線分析結果、(d) 配向性に及ぼすせん断時間の影響、(e) 線維配向性に及ぼす線維化速度の影響、(f) 線維配向性に及ぼすせん断速度の影響

一方、ステンレス管長を短くしてせん断時間を $0.2 \times t_{max}$ まで短縮すると、ステンレス管から線維化前の透明なゾルが吐出され、その後ゲル化した (図1b)。複屈折面分析は弱い配向性を示した (図3b)。線維化が完了してから吐出されることが線維配向性を高めるために重要であることが明らかになった。

線分析から得られた平均レターデーションを配向性の指標とし、連続成型の条件 (せん断時間 t_a ($n \times t_{max}$), 線維化速度 t_{max} , せん断速度 γ_a) の配向性に及ぼす影響を調べる成型実験を行った。配向性は $t_a = 1 \times t_{max}$ をピークに、 t_a が長くても短くても低下した。 t_{max} が短いほど配向性が向上した。 γ_a が 5 s^{-1} まで配向性は向上し、それ以上の γ_a の増加は配向性にほとんど寄与しなかったばかりか、 γ_a が 20 s^{-1} 以上でゲル表面の荒れが生じた。以上の結果から、線維配向性に優れた紐状コラーゲンゲルの連続成型条件として、 $2 \times \text{NPB}$ を溶媒とした短い t_{max} 、 $t_a = 1 \times t_{max}$ 、および $\gamma_a = 5 \sim 10 \text{ s}^{-1}$ が明らかになった。

図1aの紐状コラーゲンゲルの線維構造のSEM観察結果を図4aに示す。完全ではないが、ゲルの長軸方向と平行な線維配向構造が観察された。比較として、同じゾルから静置条件で作製したゲルの無秩序な線維構造を図4bに示す。

(4) 紐状コラーゲンゲルの直径制御性

ステンレス管のサイズを13Gから10Gおよび18Gへと変更し、同じく最適条件で連続成型した紐状コラーゲンゲルの外観を図5aに示す。ステンレス管の内径とほぼ同一の直径

を持った紐状コラーゲンゲルが成型された。このため、ステンレス管の内径に対してゲルの断面積の対数をプロットした片対数プロットは直線関係となった (図5b)。

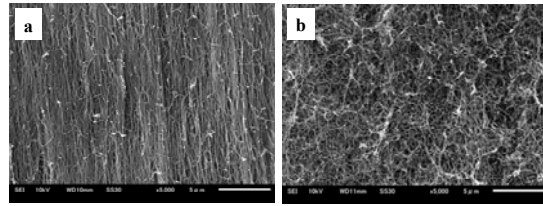


図4 紐状コラーゲンゲルの内部のSEM像 (a) 図1aで作製したゲル、(b) 静置条件で作製したゲル。 図中のスケールは5 μm 。

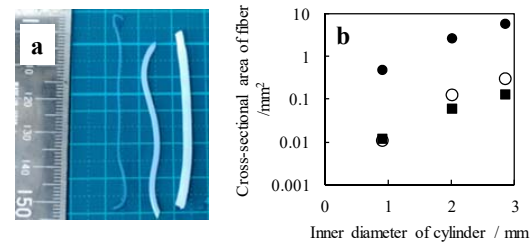


図5 ステンレス管のサイズを変えることによる紐状コラーゲンゲルおよびコラーゲン fiber の直径制御性

(a) 紐状コラーゲンゲルの外観、(b) ステンレス管の内径に対する紐状コラーゲンゲルおよびコラーゲン fiber の直径のプロット図

(5) コラーゲン fiber の酵素耐性

13G ステンレス管で作製した紐状コラーゲンゲルから得られたコラーゲン fiber の架橋度と酵素耐性を表2に示す。架橋を施さない Ma(UN)-fiber はほぼ全てコラーゲナーゼで分解された。一方、EN処理とDHT処理を経たコラーゲン fiber はほとんど分解されなかった。EN処理とDHT処理はそれらの中間の酵素耐性を示し、DHT処理のみでは架橋度がわずかに7.9%であったため、その低い架橋度に応じて高い酵素分解性を示した。

表2 コラーゲン fiber の架橋度と酵素耐性

Fibers	架橋度 (%)	コラーゲナーゼ分解性 (%)
Ma(UN)-fiber	-0.2 ± 0.4	94 ± 5
Ma(DHT)-fiber	7.9 ± 2.7	81 ± 3
Ma(EN)-fiber	37 ± 2	25 ± 5
Ma-fiber	43 ± 3	0 ± 0

(6) コラーゲン fiber の形態

最も高い架橋度を与えるEN/DHT処理を経て作製したコラーゲン fiber の形態観察結果を図6に示す。図6aは、10G ステンレス管から作製したLa-fiberが2kgの分銅を釣り上げている様子である。10G、13G、および18G ステンレス管から作製した紐状コラーゲンゲルから得られたLa-、Ma-、およびSa-fiber

は半透明の釣り糸状であり (図 6 b~6 d)、表面形状は均一かつ平滑であった (図 6 e~6 g)。乾燥工程の影響により、fiber が太いほど断面は扁平化していた (図 6 h~6 j)。

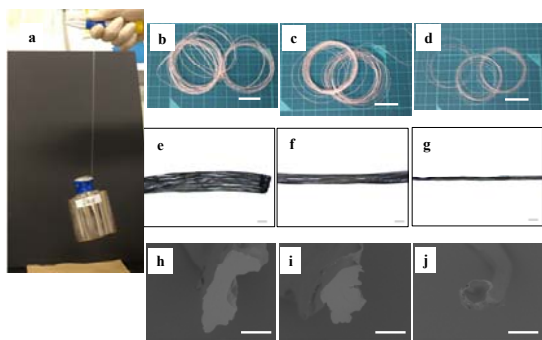


図 6 コラーゲン fiber の外観、表面形状、および断面形状

(a) La-fiber が 2 kg の分銅を釣り上げている様子、(b, e, h) La-fiber の外観、表面形状、および断面形状、(c, f, i) Ma-fiber の外観、表面形状、および断面形状、(d, g, j) Sa-fiber の外観、表面形状、および断面形状。外観写真 (b~d) のスケールは 20 mm、表面形状写真 (e~g) のスケールは 250 μm 、断面形状写真 (h~j) のスケールは 200 μm を示す。

(7) コラーゲン fiber の力学特性

最も高い架橋度を与える EN/DHT 処理を経て作製したコラーゲン fiber の乾燥状態および湿潤状態での引張試験結果を図 7 に示す (Sa-fiber は大気中での乾燥が速すぎて試験できなかった)。Ma-fiber のヤング率と破断応力は Mr-fiber よりも有意に高く、線維配向による物性向上が示された。このヤング率はヒト靱帯のヤング率に比肩するものであった。

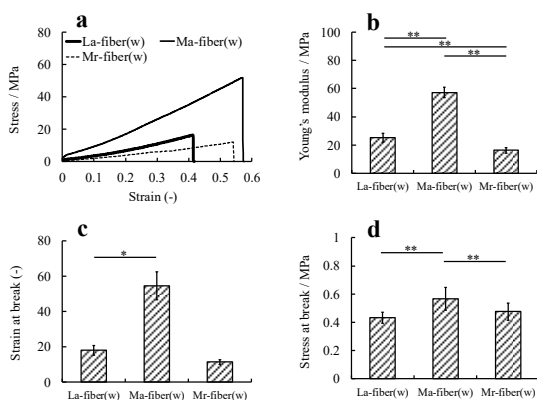


図 7 各種コラーゲン fiber の湿潤状態での引張試験結果

(a) 代表的な応力 - 歪曲線、(b) ヤング率、(c) 破断歪、(d) 破断応力 データは平均値±標準偏差 (n=5)。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ 。Fiber 名の(w)は湿潤状態を示す。

La-fiber のヤング率と破断応力は Ma-fiber よりも有意に低く、fiber 径の増大による物性の低下が示された。線維配向性の低下が原因と考えられた。

(7) 細胞浸潤性

In vivo 実験によるコラーゲン fiber への細胞浸潤性評価を実施したが、知財化の可能性があるため、データの公開を 1 年延期する。

(8) 人工腱の作製と評価

コラーゲン fiber を用いた人工腱の作製と評価を行ったが、知財化の可能性があるので、データの公開を 1 年延期する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

Shunji Yunoki, Hirotsuke Hatayama, Mizue Ebisawa, Eiji Kondo, Kazunori Yasuda
Novel fabrication method to create a thick collagen bundle composed of uniaxially aligned fibrils: an essential technology for the development of artificial tendon/ligament matrices. Journal of Biomedical Materials Research partA 103, 3054-3065 (2015)
DOI: 10.1002/jbm.a.35440

Shunji Yunoki, Mizue Ebisawa, Hirotsuke Hatayama, Eiji Kondo, Kazunori Yasuda
A novel method for continuous formation of cord-like collagen gels to fabricate durable fibers in which collagen fibrils are longitudinally aligned. Journal of Biomedical Materials Research partB Applied Biomaterials. accepted (2018)

[学会発表] (計 6 件)

① 柚木俊二、畑山博哉、海老澤瑞枝、近藤英司、安田和則 「一軸配向した線維からなる太いゲル状コラーゲンバンドルの作製技術」第 64 回高分子討論会 2015 年 09 月 15 日~17 日 東北大学川内キャンパス

② 柚木俊二、畑山博哉、海老澤瑞枝、近藤英司、安田和則 「ゲル状配向コラーゲン線維束の作製とその in vitro および in vivo 評価」第 37 回日本バイオマテリアル学会 2015 年 11 月 09 日~10 日 京都テルサ

③ Shunji Yunoki, Hirotsuke Hatayama, Mizue Ebisawa, Eiji Kondo, Kazunori Yasuda
「Gelation of collagen under shearing to create a thick gel composed of uniaxially aligned fibrils」10th World Biomaterials Congress 2016 年 05 月 17 日~22 日 Montreal, Canada

④ 柚木俊二 「医療ニーズに応えるためのコ

ラーゲン工学」
平成 28 年度 高分子学会北陸若手会（招待講演）2016 年 11 月 11 日 センチュリオンホテル福井

⑤柚木俊二、畑山博哉、海老澤瑞枝、近藤英司、安田和則 「コラーゲンのゲル紡糸」
第 39 回日本バイオマテリアル学会 2017 年 11 月 20 日～21 日 タワーホール船堀、東京

⑥柚木俊二、海老澤瑞枝、畑山博哉、近藤英司、安田和則 「Continuous Fabrication of Collagen Fibers Comprised of Uniaxially Aligned Fibrils: The Second Step for Mimicking Hierarchical Collagen Structure of Tendon」
Society for Biomaterials 2018 Annual Meeting & Exposition Atlanta, USA

〔図書〕（計 1 件）

柚木俊二 「体温に急激に応答するコラーゲンゲルの調製」 ゲル化・増粘剤の使い方、選び方 事例集 （株）技術情報協会 350-364 (2017)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：コラーゲンゲルの連続成型体およびその作製方法

発明者：柚木俊二、海老澤瑞枝、近藤英司、安田和則

権利者：東京都立産業技術研究センター及び北海道大学

種類：特許

番号：特願 2017-215184

出願年月日：2017 年 11 月 17 日

国内外の別：国内（PCT 予定）

○取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1)研究代表者

柚木俊二 （YUNOKI Shunji）

東京都立産業技術研究センター・主任研究員
研究者番号：20399398

(2)研究分担者

大藪淑美 （OHYABU Yoshimi）

東京都立産業技術研究センター・主任研究員
研究者番号：80587410

近藤英司 （KONDO Eiji）

北海道大学大学院医学研究科・特任教授
研究者番号：60374724

安田和則 （YASUDA Kazunori）

北海道大学大学院医学研究科・理事／副学長
研究者番号：20166507