

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：44413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05638

研究課題名(和文)動物繊維から作成するナノファイバー再生繊維の評価と生体材料への応用

研究課題名(英文)Fabrication and evaluation of animal fiber originated nanofibers

研究代表者

澤田 和也 (SAWADA, KAZUYA)

大阪成蹊短期大学・生活デザイン学科・教授

研究者番号：50393210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、動物毛(羊毛および人毛)から構成成分であるケラチンたんぱく質を抽出し、それらをバイオマテリアルとして応用することを目的として実施した。ケラチンは、酸化的手段または還元的手段により抽出し、得られたケラチンはフィルム、ナノファイバー、およびそれらの複合体に加工した。ケラチンは抽出方法に関係なく、分子量低下を引き起こさずに抽出することが可能であった。また、抽出したケラチンより作成したフィルムおよびナノファイバーは細胞との親和性も高いことが判明した。さらに、作成したフィルムやナノファイバーは力学強度として既存材料と同等以上の特性を持ち合わせていた。

研究成果の概要(英文)：Keratin protein contained in wool fiber and human hair was extracted by both reductive and oxidative methods. Keratin could be extracted without causing reduction of molecular weight. Cytotoxicity of keratin was evaluated by cell culture using mixture of culture medium and keratin solution. When the culture medium which contained higher amount of human hair keratin was used for cell culture, cell viability was somewhat lower than that on the control. In contrast, wool and gray hair derived keratin were found to have no negative effect for cell viability. Extracted keratin was processed into film, nanofiber and their complexes. Keratin film and nanofibers were found to have excellent affinity to cells. The rate of cell growth on them was equivalent or higher than that on the collagen coated culture dishes. The mechanical strength of keratin film and nanofibers was evaluated by tensile test. Elastic behaviors of them were similar to those of existing biomaterials.

研究分野：材料科学

キーワード：ナノファイバー ケラチン バイオマテリアル 再生繊維

## 1. 研究開始当初の背景

### **動物(タンパク質)再生繊維に関する現状**

天然繊維を再生繊維化した実用例として、植物由来のセルロースが挙げられる。近年は再生セルロースをナノファイバー化することでその応用分野が飛躍的に拡大している。一方、動物由来タンパク質の再生繊維化は、一部研究例があるものの、実用的な汎用には至っていない。特に、最も身近な羊毛についても、再生すること自体が困難とされ、金山ら[1]が実施した一部の検討例を除き再生繊維化は達成されていない。再生繊維は、天然の物理構造が変化しているため、その構造由来の特徴を得ることは困難であるが、成分由来の特徴を活かし、かつさまざまな付加価値を付与することが可能である。その意味で、天然繊維以上に再生繊維の応用価値は高い。実際、羊毛を原料とした場合、以下の2点でセルロース系再生繊維と比較して優れている。

(1) 生産過程で生じる“廃棄羊毛屑”を原料とすることができ、それを再生繊維化することから、廃棄処分されてきた資源の有効活用(リサイクル)に繋がる。

(2) 生分解性や生体適合性に優れていることから、単に繊維製品としての応用化だけでなく、特にバイオ・メディカル分野への応用が期待できる。

このような背景をもとに、本研究代表者および研究分担者らは、動物由来繊維の再生繊維化に着手した。H26年度は学術研究振興基金の助成を受け、“羊毛繊維の再生ナノファイバー化”に挑戦している。そして、ケラチンナノファイバーの形成が可能なことや、操作パラメーターにより表面特性を制御することが可能である等、良好な結果が得られている。

### **ケラチンタンパク質のバイオマテリアル応用に関する現状**

1990年代後半になり、羊毛のような動物毛を細胞の培養担体として利用する研究が活発に行われるようになった。それは、ケラチンが分子内に細胞接着に関与するアミノ酸配列(RGD、LDV等)を含んでおり細胞培養基材に有利なことや、反芻動物の血管性由来の材料(例えばコラーゲン)にBSEの危険性が危惧されることと関連している。山内ら[2]が行ったケラチンに関する先駆的な研究では、同物質が生体材料として最も応用されているコラーゲンに匹敵し得る優れた特性を有することを示している。そして近年では、実験動物を対象とする疾患モデルで、末梢神経再生、止血剤応用、骨結合促進、皮膚再生応用、血管拡張作用、心筋梗塞後の心臓機能

障害の改善等々、その報告例が急増しており、それらをまとめた総説も書かれている。本研究代表者らも、数年前より先行研究として、羊毛からのケラチン抽出とそれを用いたバイオマテリアル応用を目指した検討を実

施している。この結果、羊毛由来ケラチンから作成したフィルムや多孔質スポンジ上での細胞接着・増殖性が既存の培養ディッシュと同程度であることを示してきた。

<引用文献>

[1] 金山賢治、中西裕紀、ウールケラチンの再繊維化技術、愛知県産業技術研究所研究報告、126-129(2009)

[2] 山内清、ケラチンの化学と利用、高分子、50(4) 240-243(2001)

## 2. 研究の目的

上記の研究背景(経過)をもとに、本研究では従来から用いてきた動物毛である“羊毛”を“ヒト毛髪”へと応用し、ナノファイバーとして再生繊維化する。そして、それらに適切な加工を施し、最終的に“癒着防止シート”としての応用化について検討ことを目的として検討を行った。組織間の癒着防止効果を得る材料の検討は多くなされているが、上市されている製品は未だに僅かである。癒着防止シートに望まれる特性として、組織間での細胞吸着を阻止しながらシート自体は組織に密着すること、埋植部位に応じて任意に生分解速度を制御すること、任意の力学強度を有すること、細胞の浸潤を防ぎ栄養や老廃物の透過のみを可能にすること、等が挙げられる。本研究代表者らは現在までの先行研究で、羊毛から抽出したケラチンは、フィルム化やナノファイバー化が可能であることを示した。特に、ナノファイバーは操作パラメーターを制御することで、その特性(強度、親水性度、細胞親和性、ハンドリング等)をコントロールすることが可能であり、上記癒着防止シートに望まれる特性を得ることの出来る可能性を有していた。本研究は、これらの基礎的知見を基に着想したものであり、動物毛として最も生体親和性の高い毛髪由来ケラチンの特性と、ナノファイバーの特性を融合して癒着防止シートへの応用化の可能性を評価する。

このように、本研究は、未利用のまま大量に廃棄されている動物由来繊維をナノファイバーとして再生繊維化した上で、種々の加工処理を施し、最終目標としてバイオマテリアルへの応用を図るものであるが、特筆すべき点として、以下の2つの特徴を有している。第1点目は動物繊維(タンパク質繊維)であるヒト毛髪をナノファイバーとして再生繊維化することである。未だ達成されていないこの課題を実現すれば、その応用分野は広い。第2点目は、ヒト毛髪由来ケラチンをバイオマテリアルとして応用化することである。現在、バイオマテリアルとして実用化されているコラーゲンは、BSE問題を除けば優れた材料である。近年、羊毛から還元的に抽出したケラチンのバイオマテリアル化研究が進む一方、ヒト毛髪についてはその例が圧倒的に少ない。ヒト由来であるということは、自己由来物が利用可能であることにつながる。従

って、バイオマテリアルとして理想的な材料であり、それが実現すれば組織移植による再生医療の発展につながる。

### 3. 研究の方法

本研究は、毛髪からのケラチン抽出、成型加工および物性評価、in vitro における細胞培養、そして最終段階の動物実験という多分野にわたる内容であることから、研究分担者を含む3名体制で検討を実施した。具体的には研究実施期間において以下の4つの項目について検討を行い、現在も継続している。

- (1) 抽出に関する基礎項目評価
- (2) 抽出物のシートへの加工及び物性評価
- (3) シートの細胞親和性評価
- (4) シートの複合化

各項目についての実施内容の詳細は以下の通りである。

#### (1) 抽出に関する基礎項目評価

一般に動物毛からのケラチン抽出は還元的抽出、および酸化的抽出が可能でありそれぞれ抽出されたケラチンの特性が異なる。概して、還元抽出ケラチンは、ケラチン分子を特徴付けている性質の一つであるSS結合が天然の状態で維持されている。このため、水不溶性である反面、加工性が困難である。一方、酸化抽出ケラチンはその結合が不可逆的に消失し-SO<sub>3</sub>Hの状態であるため水溶性であり加工性に優れているが、親水性環境での使用には架橋が必要となる。結果として、架橋度のコントロールにより生分解性を制御することが可能になる。そこで本研究では、最終目標である癒着防止シートへの応用に向け、特性の異なる両ケラチンを用い、それらを目的に合わせて複合化することを目標とした。羊毛からの抽出手法は、既に本研究代表者らの先行研究にて確立しているが、羊毛ケラチンと毛髪ケラチンには種々の相違が見られる。そこで、従来法を基に操作条件を調整しながら効率的な抽出と、抽出物の同定を含む検討を実施した。

#### (2) 抽出物のシートへの加工及び物性評価

抽出されたケラチンをフィルムおよびナノファイバーへと加工し、その物性(接触角測定・吸湿測定による親水性度評価・引張試験・引裂き試験・破裂試験等の力学強度評価)について評価した。フィルムはキャスト法により調製し、ナノファイバーの作成はエレクトロスピニングにより行った。尚、先行研究により、電解質高分子の場合、高圧電源の電荷がファイバー形成に大きく影響するという知見を得ていたため、正電源および負電源を用いたナノファイバー形成の影響をも評価した。

#### (3) シートの細胞親和性評価

前項までの検討で得られたケラチンシート(フィルムおよびナノファイバー)を用い、細胞の接着性や増殖性等を詳細に評価した。現在までの先行研究では、ケラチンフィルムの細胞との親和性は良好で、特に細胞接着性

はコラーゲン上のそれと比較して極めて高い。本検討では、羊毛と毛髪のケラチン分子の相違の影響を評価すると共に、毛髪特有のメラニン色素の影響を含めて細胞親和性を評価した。この検討では、組織吸着性の高い酸化抽出ケラチンフィルムと、細胞接着性の低い還元抽出ケラチンナノファイバーの調製を図った。フィルムやナノファイバーの特性が予想と異なる場合、改善項目として濃度組成や操作パラメーターの制御により、目的物の形成を図った。

#### (4) シートの複合化

当該項目では、回転型コレクター上で酸化抽出ケラチンによるキャストフィルムを作成し、適切な架橋処理を施した後、その表面を還元抽出ケラチンによりナノファイバーで被覆した。これにより、細胞や組織に対する親和性で表裏特性の異なる複合シートを作成した。作成された複合シートは、その物性(前記手法に準じる)を評価し、癒着防止シートとしての物理的特性が得られるよう、各層の厚みや複合化条件の調整を行った。

### 4. 研究成果

(1) 比較対象としての羊毛、および主目的の毛髪を用いて、酸化法においては過酢酸を用いたSS結合の不可逆的開裂による抽出を、還元法においてはトリスヒドロキシプロピルホスフィンを用いたSS結合のSH化還元抽出を実施した。羊毛においては、酸化・還元の何れの手法においても、ペプチド分解による分子量低下を起こすことなく、ケラチンを抽出することが可能であった。一方、毛髪からのケラチン抽出においては、還元法においてメラニン色素由来と考えられるケラチン-メラニン複合体が存在し、その後の再溶解において、および後述のナノファイバー化において影響を与えることが確認された。現在、抽出時における精製手段の改善に着手しており、概ねその除去を達成することが可能となっている。

(2) 羊毛由来・毛髪由来を問わず、また酸化抽出由来・還元抽出由来の何れにおいても抽出されたケラチンの再溶解のための溶媒にギ酸を使用した。酸化抽出ケラチンは、塩基性環境下であれば、幅広い溶媒に溶解可能であることが判明しているのに対し、還元抽出ケラチンはその良溶媒が極めて限られている。さらに、後述のエレクトロスピニングを考慮した場合、溶媒の揮発性や溶解状態の粘性も重要なファクターとなる。そこで本研究では、それらを総合的に勘案してスクリーニングを行った結果、ギ酸を最適溶媒と結論付けた。尚、強酸であるギ酸に溶解させることによる分子量低下の懸念も生じるため、抽出のためのギ酸処理継続時間に対する分子量低下を評価したところ、少なくとも48時間の処理範囲内では分子量低下を生じさせないことが明らかとなった。

(3) ケラチンフィルム、およびナノファイバ

ーシート上で、L929 細胞を用いた細胞培養を実施したところ、フィルム上、ナノファイバー上の何れにおいても細胞は良好に増殖することが確認された。図 1 は、細胞培養結果の一例を示しており、細胞の増殖様態を細胞の生死状態から染色により判別できる、Live-Dead 染色を行った結果である。生細胞は緑色に、死細胞は赤色に染色されている。図から明らかなように、コントロールとして用いた細胞培養ディッシュ上での 1 日目(A)から 5 日目(B)の写真と比較して、ケラチンナノファイバー上での 1 日目(C)から 5 日目(D)を比較しても、遜色なく細胞が増殖していることがわかる。

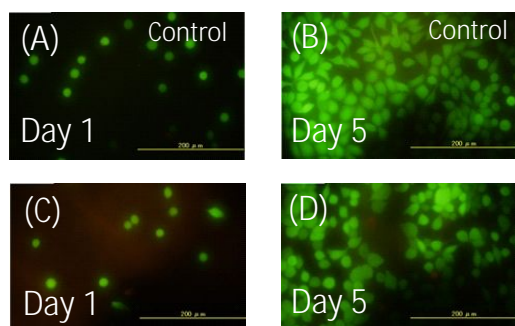


図 1 Live-Dead 染色により評価した培養用ディッシュ(A)(B)上とケラチンナノファイバー上(C)(D)での L929 細胞の培養結果

また、酸化抽出ケラチンについては、培地にケラチンを溶解共存させた状態での細胞毒性についても評価を行った。その結果、羊毛由来ケラチンについては、通常培地と比較して同様の細胞増殖結果が得られたのに対し、毛髪由来ケラチンの場合は、高濃度のケラチンを共存させた場合に、細胞増殖がコントロールと比較してやや低い結果が得られた。この結果について、毛髪に含まれるメラニン色素の影響を検証するため、白髪より抽出したケラチンについても同様に検討を行った結果、増殖への影響は見られなかった。これらの結果から、メラニン色素が細胞との親和性に何等かの影響を与えていることが考えられるが、バイオマテリアルとしての材料としての利用においては、図 1 の結果が示すとおりメラニン色素の影響は見られておらず、今後引き続き色素の影響について詳細な検討を継続する必要がある。

(4) 本項目では、酸化抽出により得られたケラチンをキャスト法によりフィルム化し、グルタルアルデヒドによる不溶化を施した後、さらにその上に還元法により得られたケラチンをナノファイバーとして被覆することを検討した。ケラチンのナノファイバー化については、ケラチンの分子量が数万程度であることから、純ケラチンのみでナノファイバー化を達成するには至らなかった。今回実施した検討では、ナノファイバー化を達成させるため、スピニング時の粘度を目的として、ポリエチレングリコール(PEG, 平均分子量 50

万)を共存させて実施した。本研究代表者の先行研究においては、羊毛由来の酸化抽出ケラチンのナノファイバー化は達成されているが、メラニンを含む毛髪由来のケラチンのナノファイバー化は課題として残されていた。本検討では、増粘のための PEG を共存させると共に、抽出ケラチンの精製をもさらに検討した。その結果、図 2(A)に示す通り、未精製の毛髪由来ケラチンを用い、溶媒をギ酸としてナノファイバーを試みたところ、ビーズが中心の生成物であった。この結果は、ケラチン濃度、PEG 濃度を変化させても同様であった。一方、特殊なフィルターを用いて、ケラチン溶液を精製して PEG と共にギ酸溶解させてエレクトロスピニングを実施したところ、図 2(B)のように、毛髪由来のケラチンナノファイバーを作成することが可能であった。

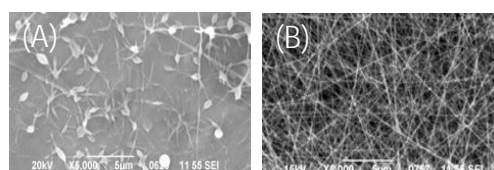


図 2 毛髪由来ケラチン/ポリエチレングリコール(7:3)のエレクトロスピニング (A):未精製 (B):精製

現在、メラニンの影響についての更なる詳細検討を継続している。今後も、前記の細胞培養への影響等、色素の含有について詳細に検討を実施することが必要である。

研究期間の最終段階では、このようにして形成可能となったナノファイバーを、酸化抽出ケラチンから作成されたフィルム上に重ねてナノファイバー化させ、複合化することを試みた。作成されたフィルム/ナノファイバー複合体の力学的特性は、フィルム単独、ナノファイバー単独に比べて、弾性、伸び等の種々の力学評価要素において、それを向上させた結果が得られており、優れた複合体が形成されていることが明らかとなった。

これらの特性は、ケラチン/PEG 比率やスピニングにおける設定パラメータの諸条件によりコントロールできることも判明しており、現在、このようにして形成した複合体の組織への吸着性を評価する検討を継続している。

#### 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)

Kazuya Sawada, Toshiya Fujisato, Animal fiber protein for fabrication of the scaffolds、査読有、Proceedings of 14th Asian Textile Conference (ATC-14)

澤田和也、藤里俊哉、動物繊維由来タンパク質の新たな応用展開、査読有、Journal of

Textile Engineering, 63 卷 6 号、p171-174、  
2017

〔学会発表〕(計 8 件)

Kazuya Sawada、Scaffold for cell culture made by keratin protein、Textile Biotechnology Symposia、2015.12.9-10.

澤田和也、再生医療用材料としての動物毛由来タンパク質、繊維応用技術研究会、2016.7

Hiroki GOTO、Kazuya SAWADA、Toshiya UJISATO、Preparation and evaluation of keratin scaffold derived from wool and human hair for cell culture and tissue engineering、World Biomaterial Congress、2016.5.17-19

Kazuya Sawada、Hiroki Goto、Toshiya Fujisato、Fabrication of the scaffold utilizing animal fiber protein、IFPB2016、2016.9.7-9

Kazuya Sawada、Hiroki Goto、Toshiya Fujisato、Electrospun Nanofibrous Scaffolds made by Animal Fiber Protein、TERMIS AM、2016.12.11-14

澤田和也、藤里俊哉、再生医療用材料としての動物毛由来タンパク質、繊維機械学会、2017.6.2-3

後藤 弘樹、澤田 和也、藤里 俊哉、毛髪由来ケラチンを用いた再生医療用の自家高分子材料、高分子討論会、2017.9.20-22

Kazuya SAWADA、Ryotaro Shimizu、Tomoaki AOYAMA、Hiroki GOTO、Toshiya FUJISATO、Characteristics of Nanofibrous Scaffolds Made By Animal Fiber Protein、TERMIS AM、2017.12.3-6

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

澤田 和也 (SAWADA Kazuya)

大阪成蹊短期大学・生活デザイン学科・教授

研究者番号：50393210

### (2) 研究分担者

藤里 俊哉 (FUJISATO Toshiya)

大阪工業大学・工学部・教授

研究者番号：60270732

吉村 由利香 (YOSHIMURA Yurika)

地方独立行政法人大阪市立工業研究所  
生物・材料研究部・主任研究員

研究者番号：00416314