繊維と生命科学特集 II

バイオテクノロジーへの繊維材料の応用

宮 田 暉 夫

1. はじめに

ライフサイエンスは先端技術の一つとして近年大いに注目をあびている分野であることは周知の通りである¹⁾。この中でも細胞を利用した遺伝子組み替え技術、細胞融合技術、細胞大量培養技術、また微生物、酵素、抗体などの固定化技術を中心としたバイオリアクター、バイオセンサーなどは、バイオテクノロジーの中心テーマとして活発に研究開発がなされている領域である。ここでは人工臓器を含めたバイオテクノロジーを考えてみたい。生物由来の繊維材料は植物由来のセルロース、動物由来の絹、ケラチン、フィブリン、エラスチン、コラーゲンなど多様であるが、筆者の専門領域の関係でコラーゲンが中心になることを御了承頂きたい。

バイオテクノロジーでの主役は細胞、微生物、また酵素などのバイオアクティブ物質であり、繊維材料は脇役であるが、目的に合った性質をもつ脇役材料を選択することは非常に重要である。たとえば細胞を用いる技術では細胞の培養操作が必ず含まれ、能率よく細胞培養することが非常に重要である。この場合繊維材料は細胞基質として用いられるので、細胞との適合性がよく培養に適した性質をもつことが大切である。人工臓器の領域でも細胞を組みこんだハイブリッドオーガンの研究が盛んに研究されているが、この場合も生体内における同様の生理活性を細胞に保持させたまま人工臓器として機能させることが最も重要であり、従って基質材料の性質はハイブリッドオーガンの成否を分ける程の影響を与える。またバイオリアクターやバイオセンサーでは微生物や酵素を固定化する技術が中心となるので、固定化に有利な、しかも固定化された微生物や酵素が十分に機能するような材料でなければならない。このような観点からバイオテクノロジーと相関するコラーゲンの特徴と、コラー

ゲンがどのように応用されているかを解説してみたい。

2. コラーゲンの構造

結合組織の主タンパク質として存在するコラーゲンは、は乳動物の全タンパク質の約 1/3 を占めるが、生体の中では生体の保護、支持などの物理的機能の外に、細胞の基質として細胞との各種のかかわり合いをもち個体維持のための生物学的機能をもっている。コラーゲンの物理的機能及び生物学的機能にはコラーゲンの構造が大きく反映されるものであり、またバイオテクノロジーへのコラーゲンの応用を考える場合は、この両機能をうまく利用することが最も重要である。

図1にはコラーゲンの一次構造から高次構造までを示したが、コラーゲン分子は3本のポリペプチド鎖(α 鎖)からなり、この α 鎖は分子量約 10 万で約 1000 個のアミノ酸を含む。 α 鎖の一次構造(アミノ酸配列)は周期性が

図1 コラーゲン構造
1 構造から fiber bundle まで

Biotechnological Application of Fiber
TERUO MIYATA
JAPAN BIOMEDICAL MATERIAL RE-
SEARCH CENTER, DIRECTOR
日本医用高分子材料研究所(農博)

あり、G-X-Yで示される。Gはグリシン、XとYは他のアミノ酸であり、従ってグリシンがアミノ酸3残基毎に存在する。このようなアミノ酸配列はコラーゲンが3本らせん構造のコラーゲン分子を形成する上で重要な役割を果たしている²⁾。 α 鎖が図1に示したような左巻きらせんを形成した状態が二次構造に相当し、この左巻き α 鎖が3本寄り集まってゆるやかな右巻きらせんを形成した状態が3次構造、すなわちコラーゲン分子に相当する。コラーゲン分子は長さ3000Å、太さ15Å、分子量約30万である。

生体中ではコラーゲン分子はフィブリルの中に組み込まれて存在する。このフィブリルの基本構造がSmithのmicrofibrilであり、この状態が4次構造に対応する。図に示したように、分子(矢印)は同列上の両隣りの分子との間に402Å(0.6D)の隙間(hole zone)があり、横隣りの分子とは670Å(D)だけ位相がずれた配列をしている。このような配列では横隣り分子に対して268Å(0.4D)の重なり部分(overlap zone)が生ずる。Smithのmicrofibrilの断面を見ると、正五角形の各頂点にコラーゲン分子が位置を占めた状態になっており、a-b、a-e、b-cなど隣り合う各分子間のずれは670Åであることは前述の通りである。Smithのmicrofibrilの太さは約40Åである。

このmicrofibrilが束になった状態がfibrilであり、太さは $a \times 10^3$ Åのオーダーで電子顕微鏡で観察すると670Åの周期構造が見られる。更にfibrilが寄り集まってfiberを形成するが、生体の腱のような組織はこのfiberからできており、縦にさくことができる。fiberがからまってfiber bundleを更に形成するが、皮膚のような組織はこのfiber bundleがからみ合った構造をとっているので引き裂き強さは非常に強くなる。このようにコラーゲンは一次構造から高次構造まで多くのレベルの構

造が存在する。なお生体内ではコラーゲンは加齢変化をうけて不溶性コラーゲンに変化してゆくが、これはmicrofibril内で分子間架橋が生成するためで、架橋に關与するのは分子の末端部分である。

これまでコラーゲンは5種類の異なったタイプが見出されており、これら各タイプのコラーゲンの α 鎖組成、組織分布、合成細胞について示したのが表1である。各タイプのコラーゲンは夫々の遺伝子に基づいて合成されるもので、合成後に修飾を受け他のタイプに変換すると言うものではない。最も多量に生物界に存在し、最も古くからよく研究されてきたのがタイプIである。なぜこのようなコラーゲンの多様性が存在するのかは明らかではないが、各タイプのコラーゲンが決まった組織に局在し、決まった細胞と相關していることは、コラーゲンを材料としてバイオテクノロジー領域に応用するとき大いに留意すべき点であろう。

3. バイオテクノロジーに関連した コラーゲンの物理化学的性質

若い動物の組織からは少量のコラーゲン分子が希酸による抽出法により得られる。しかし若い動物でも大部分は不溶性コラーゲンであり、大量に可溶性コラーゲンを得るためには、不溶性コラーゲンをペプシンなどで処理する方法がおこなわれる。図2にはコラーゲン分子に対するペプシンの作用を示したが、ペプシンはコラーゲン分子の両末端に存在する、ひらひらしたテロペプチドのみを切断消化し、テロペプチドのとれたアテロコラーゲンを生成する。一方不溶性コラーゲンは前述したようにテロペプチドを介して分子間架橋が生成されているので、不溶性コラーゲンをペプシンで作用するとテロペプチドの切断と同時に分子間架橋も切断するのでアテロコラーゲンが生成される(図3)。

表1 コラーゲンの多様性

タイプ	鎖組成	アミノ酸組成の特徴	分 布	合成する細胞
I	$[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$	糖含量低、hylys含量低	皮膚、骨、角膜、腱	フィibroプラスト、オステオブラスト、平滑筋細胞、上皮細胞
II	$[\alpha 1(II)]_3$	> 10 hylys/ α 鎖	軟骨、角膜、硝子体	コンドロサイト、背索細胞
III	$[\alpha 1(III)]_3$	2 cysteine/ α 鎖、hylys含量低	胎児皮膚、血管、臓器	フィibroプラスト、筋原細胞
IV	$[\alpha 1(IV)]_3$ $\alpha 2(IV)]_3$	hylys含量高、糖含量高、3-hydro含量高	基底膜	内皮細胞、上皮細胞
V	$[\alpha 1(V)]_2 \alpha 2(V)$	hylys含量高、ala含量低、3-hydro含	血管、平滑筋	平滑筋細胞、或る条件下のコンドロサイト

hylys : ハイドロキシリジン

3-hydro : 3-ハイドロキシプロリン

ala : アラニン

酸可溶性コラーゲンやアテロコラーゲンは pH 4.5 以下の希酸に溶解し分子状分散溶液となる。この溶液を加温するとコラーゲンは 37°C で変性し、らせん構造がほどけてランダムコイルのゼラチンに変化する (図 4)。この変

化はコラーゲンらせんの安定に関与している水素結合の切断によるもので、ペプチド結合の開裂はなくコラーゲンの二次、三次構造が失われただけのものであるので、工業生産されたゼラチンと区別するため親ゼラチンと呼ぶことがある。

一方希酸のコラーゲンもしくはアテロコラーゲン溶液を図 5 に示す各種の条件下にさらすと、それぞれ分子の集合様式の異なる集合体 (沈殿物) を生ずる。たとえばコラーゲン酸性溶液を生理条件すなわち 0.9% NaCl に透析したり、phosphate buffered saline (pH 7.0) を加えて 37°C に加温すると 670 Å の周期構造をもつ天然型のコラーゲン線維を形成する。phosphate buffered saline による 37°C 加温では形成されたコラーゲン線維の網目の中に溶媒が immobilize されてゲルとなって固まる。このコラーゲン溶液が線維 (フィブリル) を形成して固まる性質は、各維の細胞や微生物をゲル中に包含するのに都合のよいものであり、またこのゲルの表面及び内部は細胞培養の基質として都合のよいものであり、バイオテクノ

図 2 コラーゲン分子に対するペプシンの作用によるアテロコラーゲンの生成

図 3 不溶性コラーゲンに対するペプシンの作用によるアテロコラーゲンの生成
矢印はコラーゲン分子を示す。

図 4 コラーゲン分子の熱変性

図 5 各種コラーゲン集合体の生成

FLS: Fibrous long spacing
SLS: Segment long spacing
ATP: アデノシン 3 燐酸

ローへの応用においても非常に役立つものである。

またコラーゲン溶液を5%もしくはそれ以上の濃度のNaClにさらすと、規則配列のないアモルファス集合体となって沈殿する。このような性質は大量の紡糸コラーゲン繊維³⁾、ホローファイバー⁴⁾、コラーゲン膜⁵⁾などを製造するのに利用される。細い穴から飽和食塩水中にコラーゲン溶液を押しだすと直ちに凝固してコラーゲン繊維が得られるし、またスリットから押し出すとコラーゲン膜が得られる。コラーゲン液に微生物や酵素などを混合しておくと、これらがコラーゲン糸や膜内に包含されたバイオセンサーやバイオリクター用の材料も作成可能である⁶⁾。コラーゲン溶液の代りに不溶性コラーゲン線維を希酸に分散した線維分散液でも同様な方法は応用できる。

コラーゲン溶液をガンマー線や紫外線照射すると分子間架橋が生成されハイドロゲルが生成される。コラーゲン溶液のコラーゲン濃度は通常10%以下であるので、90%以上の含水率のハイドロゲルが得られ、酸素透過性や溶質透過性も非常にすぐれている。コラーゲンをよく精製して透明な溶液とすればソフトコンタクトレンズにも応用できる⁷⁾。このようなハイドロゲルもバイオテクノロジー領域に応用できるかも知れない。

タイプIコラーゲン1分子中に含まれる各アミノ酸の残基数を表2に示した。アスパラギン酸、グルタミン酸の側鎖の-COOH基は約1/3が-CONH₂で存在するので、塩基性アミノ酸であるリジン、ヒドロキシリジン、アルギニン、ヒスチジンの合計よりCOOH基の数は少ないのでコラーゲンの等電点(pI)は8付近にあり塩

基性タンパクである。-COOH基、ε-NH₂基、アルギニン、ヒスチジンは化学修飾にしばしば用いられる。その1例として図6にメチル化とサクシニル化を示したが、メチル化コラーゲンはpIが10.5、サクシニル化コラーゲンはpI=4.5となり、図7に示したようにそれぞれの等電点で沈殿を生成するようになる。未修飾のコラーゲンはpH5以上になると線維生成して沈殿を生ずるが、両者の修飾コラーゲンは中性pH領域で可溶となる。メチル化およびサクシニル化コラーゲンは未修飾コラーゲンと較べて血液との相互作用⁸⁾、細胞の粘着挙動⁹⁾などに特徴ある性質を示すようになり、コラーゲンのバイオテクノロジーへの応用においても利用されるべき技術の一つである。

図6 コラーゲンのメチル化とサクシニル化

表2 タイプIコラーゲン1分子中に含まれるアミノ酸残基数

ヒドロキシプロリン	291
アスパラギン酸	132
スレオニン	53
セリン	114
グルタミン酸	217
プロリン	401
グリシン	1054
アラニン	355
バリン	76
メチオニン	19
イソロイシン	29
ロイシン	75
チロジン	8
フェニルアラニン	38
ヒドロキシリジン	19
リジン	85
ヒスチジン	15
アルギニン	155
合 計	3136

タイプIコラーゲンは[α1(I)]₂α2の鎖組成である。

図7 未修飾、化学修飾コラーゲンの沈殿とpHの関係

pI：等イオン点。O.D. がベースラインに近い部分は溶解していることを示す。

4. バイオテクノロジーに関連した コラーゲンの生物学的性質

ハイブリッドオーガンの基質材料としてコラーゲンが用いられる場合は、体内にインプラントされることもあるので、コラーゲンの免疫活性についても触れておく必要がある。コラーゲンの免疫活性は他のタンパクに比べ非常に弱く、言いかえれば他のタンパク程動物種間の差異がないと言うことである。従ってこれまでも牛や豚を起原とするコラーゲンが医療にも応用されてきたが、これまで免疫原性に基づく重大な副作用については報告がない。しかし免疫学が発展してきた今日、今まで以上に注意深くコラーゲンの免疫原性に留意して応用を考えることは大切である¹⁰⁾。コラーゲンの抗原決定基は分子内に3ヶ所存在している。第1は分子の両末端にあるテロペプチドを決定基とするもの、第2はらせん部分の立体構造を決定基とするもの、第3は変性した α 鎖の中のアミノ酸配列に基づく決定基である。この中第1のものが主要な決定基であり第2、第3のものはマイナーである。第1の決定基はコラーゲンをペプシン処理することにより失われるので、ペプシン処理により得られるアテロコラーゲンはこの決定基が除かれているので、インプラント材として有利である。このテロペプチドに基づく抗体はタイプⅢコラーゲンでも産生すると考えられているが、タイプⅡとⅣコラーゲンは通常ペプシン処理により得られており、従ってこれらのコラーゲンで得られた抗体はらせん構造およびらせん内部に基づくものと考えられる。コラーゲンの細胞性免疫反応は皮膚テストやマクロファージの遊走阻止反応によって測定されるが、未変性コラーゲン、未変性アテロコラーゲン、熱変性アテロコラーゲンでも遅延型皮膚反応を起こすことが報告されている。この細胞性免疫反応はコラーゲンタイプ間で非常に異なり、Ⅱ、Ⅳ>Ⅲ>Ⅰの順で反応の強さに差が見られる。

コラーゲンをグルタルアルデヒドなどでなめし処理を施すと、体内での吸収速度が大幅に遅延するので免疫活性が減少することが知られている¹¹⁾。

バイオテクノロジー領域へのコラーゲンの応用を考えると、最も重要な性質は細胞との相互作用に関するものである。生体内でコラーゲンはムコ多糖などと共に細胞間に存在し、細胞のマトリックスとしての重要な働きをしている。これまでもコラーゲンは細胞培養の基質としてしばしば用いられてきており、細胞との親和性がよいことが認められている。肝細胞、角膜内皮細胞、上皮細胞、表皮細胞、線維芽細胞などはプラスチック上よりコラーゲン基質上で長期間生存することが報告されている¹²⁾。また当然のことながら細胞とコラーゲン基質との

接着性は非常に良好で、正常な線維芽細胞はプラスチック培養皿から細胞をはがすのに用いられるトリプシン処理では、コラーゲン基質からはがすことができない程である。

最近ある種の細胞が決まったタイプのコラーゲンをより良い基質とすることが報告されるようになってきた¹²⁾。表1に示したように、各タイプのコラーゲンは決まった細胞により合成される。細胞が自身で合成したコラーゲンをより良い基質として選択することは当然うなずけることである。たとえば内皮、上皮、表皮細胞などがタイプⅣコラーゲンをより良い基質とすること¹³⁾、また肝細胞は生体内と同様の活性を保たせたまま培養するのが非常に難しい細胞であるが、タイプⅠコラーゲンをを用いた浮遊培養では20日程活性を保持したまま培養できたが、肝組織から取り出したコラーゲンを基質として用いると5ヶ月以上も活性を保持したまま培養ができたと言う報告¹⁴⁾もある。

生体内では細胞は単独に独立して存在しているのではなく、他の細胞やマトリックスに接着し相互に作用し合ったオーガナイズされた状態で存在し生命体を構成している。細胞間、細胞と基質間に存在し細胞の接着に関与している細胞接着因子が次々と明らかにされている¹²⁾。フィブロネクチン、コンドロネクチン、ラミニンなどが報告されているが、このうちフィブロネクチンが最も良く研究されており、血清中にも200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度存在し、コラーゲン、ヘパリン、ゼラチン、フィブリンなどに特異的に結合するサイトをもっており、コラーゲンに対してはタイプⅠからⅣまで結合する。フィブロネクチンは線維芽細胞、肝細胞、筋原細胞、平滑筋細胞のコラーゲン基質への接着に関与し、これら細胞が悪性転換を起こすと細胞表面のフィブロネクチンは減少すると言われている。コンドロネクチンは軟骨細胞のタイプⅡコラーゲンへの粘着に、ラミニンは上皮、内皮細胞のタイプⅣコラーゲンへの粘着に関与している。これらの接着因子はそれぞれの細胞が合成する訳だが、コラーゲンと特異的結合をすることを考えると、コラーゲンが各細胞のすぐれた基質となり得ることが容易に理解できる。

合成高分子材料とコラーゲンを複合化してより良い細胞の基質を得ることも今後の新しい材料の開発には必要なことである。poly HEMAのゲル上では人胎児の肺線維芽細胞は増殖しないが、poly HEMAにコラーゲンを混合すると良い増殖を示すことが報告されている¹⁰⁾。

コラーゲンの細胞に及ぼす効果で、もう一つ述べておくべきことは細胞分化に及ぼす効果である。コラーゲンは多くの細胞分化に深く関係しており、たとえば筋原細胞は線維芽細胞やコラーゲン非存在下では筋線維に分化

しないが、コラーゲン存在下では細胞融合を起こし筋線維になる¹⁶⁾。また骨や歯から抽出精製したコラーゲンを皮下など軟骨細胞や骨細胞の存在しない組織にインプラントすると、間葉細胞が軟骨細胞に分化し更に骨細胞で置換され骨組織が生成される¹⁷⁾。この骨誘導活性はアルカリ処理、トリプシン処理、過ヨウ素酸処理により消失もしくは減少するので、コラーゲンに強固に結合している活性物質によるものと考えられている。この他角膜上皮細胞の角膜 stroma の生成や表皮細胞の多層構造の生成などにおける細胞分化にもコラーゲンは関与している¹²⁾。またコラーゲンマトリックスが細胞の形質発現に関与している例として、軟骨細胞をコラーゲンゲル内で培養するとタイプII コラーゲンを産生し軟骨細胞の性質を保つのに反し、コラーゲンゲル上で培養すると脱分化を起こし線維芽細胞様となりタイプI コラーゲンを生成するようになるということもある¹⁸⁾。生体内の生理活性を保たせたまま細胞を培養するためには、生体内に近い物理的環境を作り出すことが重要であると言う一つの例である。

5. 細胞に及ぼすコラーゲン高次構造の作用

血管の内皮細胞が剥がれると血管壁のコラーゲンが露出し、血小板を粘着、凝集し更に血栓形成に至ることはよく知られている。コラーゲンと血小板との反応がどのようなコラーゲン側の因子により支配されているかを調べてみると⁹⁾、まずコラーゲンによる血小板凝集反応は、コラーゲンが分子状分散の状態では起こらず天然のコラーゲン線維のような規則性集合体でないと反応しないことが分った。図5に示したようにコラーゲンは各種の集合体を形成する。血小板凝集反応活性を示す集合体は、天然コラーゲン線維、FLS、短周期集合体であり、いずれもコラーゲン分子が一定の規則性をもって配列しているものである。SLSは分子の横方向のみに正しく配列しているが長さが充分でなく不活性である。アモルファス集合体の中には分子配列の規則性がないので不活性である。このように血小板膜のレセプターにコラーゲン側の反応基がうまくかみ合うような場合に血小板が活性化されるが、活性をもつコラーゲン集合体のクリティカルサイズがどの位の大きさを調べてみると、図1に示したSmithのmicrofibrilの構造をもち、3分子の長さすなわち9000Åのものが血小板反応に活性を示すクリティカルサイズで、これ以下のサイズの集合体は全く活性を示さない。9000Åは血小板の半径にほぼ匹敵し、これ以上の大きさを持ち、しかも規則性コラーゲン集合体はすべて活性である。このようにコラーゲンの4次構造が血小板反応に重要な役割を果たしているが、他の細胞

に対してもコラーゲン高次構造が影響を及ぼしていることは当然考えられる。たとえば人皮膚の線維芽細胞を再生コラーゲン線維上で培養すると組織培養皿やゼラチン上と異なった特異的形態を示し、DNA合成能も低い。細胞のこのような特徴はコラーゲン分子が規則配列をしていないアモルファスコラーゲン膜上では見られず、コラーゲンの4次構造に影響されていることが報告されている¹⁹⁾。なお血小板反応に関与するコラーゲン規則性集合体の官能基はアルギニン残基と考えられ、アルギニン側鎖をマスクすると血小板反応は完全に不活性になる⁸⁾。

6. 化学修飾コラーゲンの利用

図6に示したサクシニール化およびメチル化コラーゲンをを用いてホローファイバーを作成し、人の上腕静脈から血液をこのホローファイバー内に誘導し、一定時間コラーゲン表面と血液を接触させて、表面への血小板とフィブリンの粘着を調べたところ⁸⁾、非修飾コラーゲンに較べてサクシニール化コラーゲン表面には血小板の粘着が非常に少なく抗血栓性であったのに反し、メチル化コラーゲン表面には非常に多くの血小板が粘着、凝集し、次いで多量のフィブリンが沈着して強い血栓性表面であることが分った。メチル化コラーゲンは生理条件下(pH 7.0)で正電荷リッチ(正の実効電荷)であり、サクシニール化コラーゲンは反対に負電荷リッチである。このようにコラーゲンの電荷分布をコントロールすることにより血液に対する反応を制御できる。メチル化コラーゲンは止血用材料に、サクシニール化コラーゲンは人工血管材料に適している。サクシニール化コラーゲンの人工血管は血小板の粘着は起こらず、初期に血管内面に薄いフィブリン層が生成し、ついで速やかに内皮細胞が内面に増殖してくる。内皮細胞の増殖には薄いフィブリン層の形成が必要であり、サクシニール化コラーゲン血管は速やかに偽内膜化する血管として注目される²⁰⁾。サクシニール化コラーゲンが血液凝固因子のハーゲマン因子(第12因子)を活性化することが最近報告されたが²¹⁾、サクシニール化コラーゲン血管が血液に接触すると、血小板の粘着は抑制し、第12因子の活性化に始まる凝固因子の活性化カスケード反応が起こり、速やかに血管内面にフィブリン層を薄く生成する。このフィブリンの生成が血管の治癒を促すものと思われる。

メチル化およびサクシニール化コラーゲン上での細胞粘着や増殖率についての研究もなされている^{9b)}。マウス線維芽細胞(L細胞)やマウス腹腔マクロファージ(Mφ)は牛血清存在下または非存在下で、無修飾コラーゲンよりこれら化学修飾コラーゲン上によく粘着する。L細胞は無血清存在下では無修飾コラーゲン上で増殖は見られ

図8 L細胞の化学修飾コラーゲン上での増殖
FN(+)及びFN(-)はフィブロネクチン存在下
および非存在下を示す。

ないが、メチル化およびサクシニール化コラーゲン上では図8に示したように充分増殖する。フィブロネクチンを添加した系では無修飾コラーゲンでもL細胞の増殖は見られたが、やはり化学修飾コラーゲンの方が増殖性は良好であった。また血清存在下で化学修飾コラーゲンに粘着したMφは、EDTAやEGTA処理により能率よく脱着回収でき、Mφを高純度で分離回収するための基質としてこれら化学修飾コラーゲンは利用可能であることが示されている^{6b)}。このようにコラーゲン分子の側鎖を化学修飾してコラーゲン表面の電荷分布をコントロールすることにより、各種細胞との相互作用を制御する方法はコラーゲン線維をバイオテクノロジーに応用する場合の一つの重要な技術と考えられる。

7. バイセンサー、バイオリアクターへのコラーゲンの応用

3. で述べたようにアテロコラーゲンは酸性で水溶液とすることができ、これを中和することにより線維を再生する。またこの酸性溶液を高濃度の中性塩溶液に接触させると凝固し膜状にも加工できる。さらにコラーゲン酸性液に電極を挿入し直流を通じると、陰極上にコラーゲンが析出し膜状に成形される^{6b)}。コラーゲン溶液を平板容器に入れ風乾しただけでも膜が得られる。このような性質はアテロコラーゲンのみでなく不溶性コラーゲン線維の酸性水分散液でも有している。一旦形成されたこれらの膜は中性のpH領域では溶解することはないが、膜

の安定化を施す意味で適当な架橋処理がなされる。このようにして得られるコラーゲン成形物の内部や表面に微生物や酵素などの生理活性物質を固定すれば、バイオセンサーやバイオリアクターに応用できる。StreptomycesやBacillusなどの菌体をコラーゲン膜内に包埋し、これら菌体の有するグルコース異性化酵素を利用するバイオリアクターへの応用や²²⁾、表3に示したような各種酵素をコラーゲン膜に固定しバイオセンサーに応用する試みもなされている^{6a)}。酵素の支持体への固定化の際にはしばしば活性低下が見られるが、このような不都合な固定化法を改良する研究もなされている。たとえばリゾチームをアテロコラーゲンに静電的に結合させるとリゾチームの立体構造変化が起こり活性が低下するが、コラーゲンにサクシニール側鎖の長い-COOH基を導入してやると、酵素の立体構造変化を抑え活性発現の高い吸着固定が得られる²³⁾。

表3 コラーゲン膜に固定化された各種酵素

Catalase
Glucose oxidase
Lactate oxidase
Choline oxidase
Cholesterol oxidase
Monoamine oxidase
Alcohol dehydrogenase
Lactate dehydrogenase
Asparaginase
Amylase
Urease
Invertase
AMP deaminase
Lipase
Phospholipase

8. 細胞培養用ミクロスフェアへのコラーゲンの応用²⁴⁾

アテロコラーゲンの酸性溶液を水と溶け合わない有機溶媒中に分散し、中和して凝固させると球状微粒子のままコラーゲン線維が再生されて、細胞培養用基質のミクロスフェアが得られる(図9)。これまで主に架橋デキマトランからなる細胞培養用ミクロスフェアが実用化されているが、ここで述べるコラーゲンミクロスフェアは再生コラーゲン線維がからみ合って球になっており、細胞の基質としても生体内と同様にコラーゲン線維であることが特徴と言える。図10と図11にはコラーゲンミクロスフェア上に培養増殖した人皮膚線維芽細胞の走査型電子顕微鏡写真を示す。基質表面を細胞が完全にカバーす

図9 コラーゲンミクロスフェアの
位相差顕微鏡写真
150倍

図10 コラーゲンミクロスフェア上に増殖した
人皮膚線維芽細胞
白線は100 μ

図11 コラーゲンミクロスフェア上に粘着、
増殖した人皮膚線維芽細胞
コラーゲン再生線維によく粘着している。
白線：10 μ

るまで増殖した様子が見られ(図10)、また強拡大の図11では基質のコラーゲン線維が明瞭に観察でき、線維に細胞がよく粘着、伸展している様子が分る。このミクロスフェアはコラーゲン線維の網目から出来ているので、この網目の中に細胞がもぐり込んでいる場合も見られる(図12)。バイオテクノロジーにおける細胞の大量培養に、このコラーゲンミクロスフェアは生体に近似の基質として応用できるものと考えられる。

図12 コラーゲンミクロスフェアのコラーゲン
線維内にもぐりこんだ人皮膚線維芽細胞
白線：10 μ，細胞は丸みをおびている。

9. ハイブリッドオーガンへの コラーゲンの応用

今まで述べてきたコラーゲンの特徴を考えれば、コラーゲンがハイブリッドオーガンの細胞を支える材料に適していることが容易に理解されよう。MITのBell²⁶⁾はコラーゲン溶液をpHやイオン強度を生理条件に合せ37℃に加温するとゲルになる性質を利用して、このゲル中に真皮から採取した線維芽細胞を植え培養し、余分な水分を分離、ゲルを収縮させて真皮に類似した構造体を作った。線維芽細胞を含むこの真皮様構造体の上にトリプシン処理でばらばらにした表皮細胞をまくと、表皮細胞は増殖し多層構造を形成し最上層は角化し、生体の表皮と同様な表皮構造を作った。このようにして作られた細胞組みこみ人工皮膚は生体の皮膚に極めて類似の構造をもち、Skin equivalent graftと呼ばれている。この場合用いられる細胞は移植を受ける個体から採取されるので、Skin equivalent graftがインプラントされても自己の細胞であるので拒絶反応もなく、そのまま生着する。これはコラーゲンをうまく利用したハイブリッドオーガンの例であるが、人工血管やその他の臓器にもコラーゲンの特徴を生かした細胞とのハイブリッド化の研究が今後なされるものと思われる。

10. おわりに

バイオテクノロジーの技術のうち遺伝子組み換え法が最も有望と言われている。アミノ酸配列が判明している生理活性物質についてはこの技法は有用であるが、自然界には化学構造の不明な生理活性物質は非常に多い。このような場合には大量培養された細胞からメッセンジャーRNAを採取し遺伝子組み換え操作に入る必要がある。また生理活性物質には糖を側鎖に有する物質が多くあり、このようなグリコペプチドは遺伝子組み換え法では生産できない。このような意味からバイオテクノロジーにおける細胞大量培養技術は必要性の高い価値あるものであることに変わりはない²⁶⁾。

細胞培養技術が近年大いに発展したとは言え、生体内での機能を保持したままの正常細胞の培養技術は未だ確立を見ていない。このためには培養環境条件の研究が必要であるが、生体条件に近い環境で培養することが重要であろう。このような観点からすれば生体内基質としてのコラーゲンは大いに注目を浴びる材料であろう。生体内での機能を保持したままの正常細胞の培養技術が確立されれば、老化現象や難病などの細胞レベルでの研究を通じ新しい医薬品の開発につながる可能性もあるであろうし、ハイブリッドオーガンの発展にも大いに役立つであろう。

文 献

- 1) 野本正雄, 化学の領域, **35**, 950 (1981).
- 2) K. A. Piez, Collagen-platelet Interaction, F. K. Schattauer, Verlag, Stuttgart-New York, ed. H. Gastpar, p.111 (1978).
- 3) 宮田暉夫, 天然高分子の最新利用技術, CMC, (昭和 57 年), 54 頁.
- 4) 宮田暉夫, 人工臓器, **1**, 302 (1972).
- 5) 宮田暉夫, 繊維と工業, **4**, 480 (1971).
- 6) a. 鈴木周一, 軽部征夫, 膜, **6**, 148 (1981).
b. 鈴木周一, 膜, **2**, 49 (1977).
- 7) T. Miyata et al., US Patent 4,223,984, 4,260,228, 4,268,131.
- 8) T. Miyata et al., *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs*, **22**, 268 (1976).
- 9) a. 宮田暉夫, 化学の領域増刊 135 号, バイオマテリアルサイエンス, 第 2 集, 南江堂, 31 頁.
b. 笠井俊二ら, *Polymer Reprints, Japan*, **30**, No. 7, 1632 (1981), 繊維学会昭和 56 年度年次大会講演集, 176 頁, 第 3 回日本バイオマテリアル学会論文集, 5 頁, (1981).
- 10) 許斐博史, コラーゲン代謝と疾患, 永井・藤本編, 講談社, (1982), 135 頁.
- 11) M. Chvapil et al., *Inter. Rev. Conn. Tissue Res.*, ed. by D. A. Hall and D. S. Jackson, Academic Press (1973), **6**, p.1.
- 12) H. K. Kleinman et al., *J. Cell Biology*, **88**, 473 (1981).
- 13) J. C. Murray et al., *J. Cell Biology*, **80**, 197 (1978).
- 14) M. Rojkind et al., *J. Cell Biology*, **87**, 255 (1980).
- 15) L. C. Perez et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2064 (1980).
- 16) S. D. Hanschka et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **55**, 119 (1966).
- 17) A. H. Reddi, *Biochemistry of Collagen*, ed. by G. N. Ramachandran and A. H. Reddi, Plenum Press, New York (1976) p. 449.
- 18) 安井夏生ら, コラーゲン研究会抄録(昭和 57 年度) 65 頁.
- 19) 吉里勝利ら, 第 15 回日本結合組織学会總會抄録, 42 頁.
- 20) 宮田暉夫ら, 第 3 回日本バイオマテリアル学会大会論文集, 85 頁, (1981).
- 21) 松田武久, 多相系生医学材料ニュース, **3**, 11 (1982).
- 22) R. Saini et al., *J. Appl. Chem. Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 565 (1973).
- 23) 赤池敏宏, 化学の領域増刊 134 号, バイオマテリアルサイエンス, 南江堂, 9 頁, (1982).
- 24) 並木哲朗, 繊維学会昭和 58 年度年次大会講演要旨集, 40 頁.
- 25) E. Bell et al., *Science*, **211**, 1052 (1981).
- 26) 山根 績, 応用細胞生物学, **1**, 1 (1983).

(昭和 58 年 7 月 12 日受理)