バイオマテリアルとしてのコラーゲン膜

宮 田 暉 夫

日本医用高分子材料研究所 〒152 東京都目黒区中根 2-11-21

Collagen Membrane as a Biomaterial

Teruo MIYATA

Japan Biomedical Material Research Center,
11-21, Nakane-2chome, Meguro-ku, Tokyo 152

Collagen is a principal protein of connective tissue and recently interested as a biomaterial. Most of connective tissues exist as a membrane like structure in living body such as skin, blood vessel, cornea, basement membrane and so on. Collagen has two functions in vivo, that is, physical one supporting body and biological one controlling interaction with cells. Understanding biological property of collagen as well as its biochemistry becomes very important when applying it as a biomaterial.

Major antigenic determinant of collagen locates in telopeptides of the molecule though collagen is a poor antigen. Pepsin removes telopeptides and produces Atelocollagen which is much less antigenic than normal collagen.

Higher order structure (fibril structure) of collagen relates to expression of its biological activity in collagen-cell interaction. Platelet and fibroblast recognize collagen fibril structure. Chemical modification of collagen is useful to control collagen-cell interaction. Collagen isotypes must be considered in applying collagen to biomaterial. Collagen would be a important substratum of hybrid organs in which cells are incorporated. Biological property of collagen as a biomaterial is unique, which cannot be seen in synthetic polymers.

Key words: Biomaterial, Biological function of collagen, Atelocollagen,
Fibril structure, Collagen-cell interaction, Hybrid organs

1. はじめに
2. コラーゲンの分子と線維
3. アテロコラーゲン
4. コラーゲンの多様性
5. コラーゲンと細胞の相互作用
 - 5-1 コラーゲン構造と血小板反応
 - 5-2 コラーゲンの化学修飾による細胞応答の制御
 - 5-3 細胞形質発現に及ぼすコラーゲン因子
6. コラーゲンをを用いたハイブリッドオーガン
7. おわりに

1. はじめに

他の先端的学問や技術の領域と同様に、バイオマテリアルも過去10年程の間に驚異的な発展を遂げた領域である。かつてはそこにある材料を手当たり次第 trial and error 式に評価をしていた時代もあったが、このような時代はとくに過ぎ去り、生体との界面現象を解析するいくたの分析手段も確立され、目的とするバイオマテリアルを設計合成するという時代にすでに突入している。金属、セラミックス、高分子からなる優れたバイオマテリアルがここ10年程の間に数多く世に送り出されつつある。

コラーゲンは動物結合組織の主要タンパク質として古くから皮革やゼラチンとして利用されてきたものであるが、バイオマテリアルの研究の発展と平行して、バイオマテリアルとしてのコラーゲンも大いに注目されてきて、生体由来の材料としては中心的な位置を占めるようになった。コラーゲンが生物系材料としてこのような位置を占めるようになったのにはいくつかの理由がある。まずコラーゲンを主成分とする多くの結合組織、たとえば皮膚や血管などが置換外科の対象とされ、組織と同じ材料で補修する妥当性が主張された。たとえば一時的に用いる創傷カバー材として凍結乾燥した豚皮や、人工血管として牛の頸動脈などが市販されもした。このようなコラーゲン製材料はそれなりに実績を残した。一方コラーゲンの生化学的研究が大いに進展し、その分子構造、生合成の機構、分子の多様性、免疫化学などに関する基本的研究成果が蓄積されて¹⁾、よく生化学的特質がわかったタンパク質になった。更に近年コラーゲンの各種細胞に及ぼす生物学的効果についても多くの研究がなされ、細胞間マトリックスとしての重要性が認識されるようになってきた²⁾。コラーゲンがもつこのような細胞との相互作用の特徴はこれまでの合成高分子バイオマテリアルには見られないものであり、新しいバイオマテリアルを設計合成する場合1つの指標になるものであるとして多くの研究者の興味を惹くようになったと思われる。コラーゲンは生体中の多くの組織で膜状もしくはシート状構造を形成している。たとえば皮膚は表皮と真皮からなる膜状構造であるし、眼の角膜も上皮細胞を表面にもった膜状組織である。血管も内皮細胞を内面にもった内膜、中膜、外膜よりなる組織である。また内皮細胞や上皮細胞のすぐ下にはタイプIVコラーゲンとグリコプロテインからなる基底膜が存在しており、細胞の機能保持や物質透過に関与している。したがってコラーゲンをバイオマテリアルとして考える場合、膜としてのコラーゲンを考慮することは重要である。このような観点からバイオマテリアルとしてのコラーゲンについて述べてみたい。

2. コラーゲンの分子と線維

コラーゲンは、皮膚、眼、血管、軟骨、骨、歯、腱などいわゆる結合組織の主タンパク質として、また他の臓器にも細胞間マトリックスとして存在する。ほ乳動物の場合全タンパク質の約1/3がコラーゲンであるといわれているほど多量に分布している。Fig 1に示したように、

Fig. 1 コラーゲン構造 1構造からfiber bundleまで
繊維学会誌, 39 (11), 427 (1983)

コラーゲン分子は3本の左巻きらせんのポリペプチド鎖 (α 鎖) 3本が寄り集って、右巻きらせん形成している。分子の長さは $3000 \text{ \AA}$ 、直径は $15 \text{ \AA}$ 、棒状で比較的小さく、分子量は30万である。1本の α 鎖中には約1000残基のアミノ酸が含まれ、アミノ酸配列 (一次構造) は $(\text{G-X-Y})_n$ で示されるような繰り返し構造をもっている。Gはグリシン、XとYは他のアミノ酸であり、グリシンが3残基ごとに存在する。生理的条件下ではコラーゲンは線維を形成する性質があるので、生体中では通常コラーゲン線維として存在する。コラーゲン線維は最小単位であるSmithのmicrofibrilが集合したものであり、このSmithのmicrofibril中のコラーゲン分子の配列はFig.1に示したようなものである。同列上の分子間には $0.6 D$ ($400 \text{ \AA}$) の隙間があり、holezoneと呼ばれている。横隣りの分子とは D ($670 \text{ \AA}$) だけ位相がずれている。Smithのmicrofibrilの断面 (Fig.1) を見るとちょうど正五角形の頂点に分子が存在していて、microfibrilは円筒形である。この断面図の@と◎分子の間を切り離して垂直にたれ下った状態を真横から見たときの分子配列が図に示されたものと考えられ

ばよい。この microfibril が集まって fibril を形成する。腱は fibril から出来ているが、皮膚などの組織では fiber が更にかみ合った fiber bundle からなっている。

3. アテロコラーゲン

コラーゲンの分子（トロポコラーゲン）を Fig. 2 に示したが、前節では述べなかったが、分子の両末端には 3 本らせん構造からはみ出した、ひらひらしした部分があり、この部分をテロペプチドと呼ぶ。このテロペプチドは重量にして全分子の 2～3% 程度であり、 $(G-X-Y)_n$ というアミノ酸の繰り返し構造はない。タンパク質加水分解酵素（コラーゲンナーゼを除く）たとえばペプシンは、本体のらせん部分には全く作用せず、テロペプチドだけを選択的に消化し、らせん部分のみからなるコラーゲンすなわちアテロコラーゲンを生成する。コラーゲンの免疫活性の大部分はテロペプチドに存在するので^{2,3)}、アテロコラーゲンはトロポコラーゲンに比べ抗原性が著しく低下する。したがってコラーゲンをバイオマテリアルとくに体内にインプラントするような目的に使用する場合には、アテロコラーゲを用いる方がずっと有利となる⁴⁾。アテロコラーゲンは生理的条件下での線維形成速度がやや低下してくるが、他の性質はトロポコラーゲンと変化はない。

トロポコラーゲンは幼若な動物、たとえば生後間もない仔牛のような場合でも、原料としてよく利用される皮膚真皮中には僅かにしか存在せず、トロポコラーゲンからアテロコラーゲンを得る方法は実用的でない。生体中の大部分のコラーゲンは不溶性線維として存在するが、これらを原料として使用できれば好都合である。

不溶性コラーゲン線維中の分子間架橋の生成位置を Fig. 3 に示す。分子配列の様式は Fig. 1 に示した Smith の microfibril と同じであるが、分子間架橋は分子両末端にあるテロペプチドを介して横隣りの分子との間に生成される。生体内で生合成されたコラーゲン分子は直ちに線維に組み込まれるが、加齢と共にテロペプチド部にアルデヒド基が生じ、これが分子間架橋生成へと進む。ペプシンはテロペプチドを選択消化すると同時に分子間架橋も切断するので、不溶性コラーゲンはペプシンによりアテロコラーゲンとして可溶化される。

アテロコラーゲンの原料ソースとして都合がよい組織は真皮であるが、ペプシンによる不溶性コラーゲンの溶解性は動物の年齢により大きく変わる。幼若な動物ほどアテロコラーゲンの生成は容易である。骨や腱のコラー

Fig. 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
繊維学会誌, 39 (11), 427 (1983)

Fig. 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
繊維学会誌, 39 (11), 427 (1983)

ゲンは真皮コラーゲンより溶解されにくい。

4. コラーゲンの多様性

1970 年代に入って、コラーゲンの研究が、皮膚、腱、骨など以外の組織に及んできて、生体中には数種類ものコラーゲン isotype が存在することがわかってきた。Table 1 に各種タイプのコラーゲンの特徴を示した。タイプ I コラーゲンは、皮膚、腱、骨などに分布しており、フィibroblast、osteoblast、平滑筋細胞などにより生合成されている。分子の σ 鎖の組成は $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$ で示され $\alpha 1(I)$ 鎖が 2 本と $\alpha 2(I)$ 鎖 1 本から成っている。コラーゲンは他のタンパク質に含まれていないハイドロキシリジン (hylys) を含んでいるが、タイプ I はこの含量が他タイプコラーゲンより低い。またコラーゲンは側鎖にグルコースやガラクトースを持っており糖タンパク質であるが、タイプ I はこれら糖の含量が他のタイプより低い。タイプ I は動物中に最も多量に分

Table 1 コラーゲンの多様性. 繊維学会誌, 39 (11), 427 (1983)

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, hyllys 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	$[\alpha 1(II)]_3$	$>10\text{hyllys}/\alpha$ 鎖, 糖含量高	軟骨, 角膜, 硝子体	コンドロサイト, 脊索細胞
III	$[\alpha 1(III)]_3$	2cysteine/ α 鎖, hyllys 含有量	胎児皮膚, 血管, 臓器	フィibroプラスト, 筋原細胞
IV		hyllys 含量高, 糖含量高 3-hydro 含量高	基底膜	内皮細胞, 上皮細胞
V	$[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$	hyllys 含量高, ala 含量低, 3-hydro 含	血管, 平滑筋	平滑筋細胞, ある条件下 のコンドロサイト

hyllys: 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

布しており, 最も古くから研究されていたコラーゲンである。

タイプIIコラーゲンは主に軟骨などに局在しコンドロサイトにより生成されるが, hyllysと糖の含量が高い。鎖組成は3本とも $\sigma 1(II)$ 鎖からなっている。

タイプIIIは胎児皮膚などにタイプIと共に存在し, 同一の $\sigma 1(III)$ 鎖3本から成っており, σ 鎖当り1コのI-S-S-結合をもっているのが特徴である。したがって加熱変性しらせん構造をこわしゼラチンにしても, 還元剤で-S-S-結合を切断しない限り単独の σ 鎖は得られない。

基底膜中に局在するタイプIVコラーゲンは細胞との相互作用において最も注目を集めている。基底膜は真皮と表皮の間, 血管壁と内皮細胞との間に存在し, 上皮細胞や内皮細胞の支持の役割を果たしている。また腎臓系球体や胎盤の基底膜は, 栄養や酸素, 老廃物などの物質透過の役目も果たしている。基底膜内ではコラーゲン線維の存在が見られず, タイプIVは線維を形成しないで存在していると考えられている。タイプIVは内皮細胞, 上皮細胞によって作られている。hyllys含量, 糖含量は高く, 複数のタイプIVコラーゲンが存在するらしく鎖組成は確定されていない。

タイプI, II, III, IV, 以外にVもすでに同定され各種細胞の表層に存在することが知られているが, これら以外に更に異なるタイプのコラーゲンが続々と報告されている。このような異なる分子種のコラーゲンがそれぞれ一定の組織に分布するが, どうしてこのような分子の多様性が必要であるのか, また各タイプコラーゲンの機

能をその分子構造の裏付けから理解すると言う問題は今後に残されている。しかしなぜ, どうしてかということは別問題として, 一定のタイプのコラーゲンがある決まった細胞と特異的な相互作用を示し, その細胞の形質発現に関与している例が明らかになってきた。コラーゲンのバイオマテリアルへの応用に際しても, このようなきめの細かいコラーゲンの性質を配慮する時代に突入したと思われる。

コラーゲンの多様性は遺伝子レベルの多様性に起因する。すなわち各タイプコラーゲンの σ 鎖にそれぞれ対応遺伝子が存在することに起因する。軟骨や基底膜にはそれぞれ特有なコラーゲンがほぼ独占的に存在しているが, 他の組織ではタイプIとIIIが混在している。今後タイプ別コラーゲンの機能を探るため, 遺伝子レベル, 細胞レベルでの解明がなされてゆくに違いない。

5. コラーゲンと細胞の相互作用

細胞間マトリックスとしてコラーゲンは細胞の基質として重要な役割を果たしていることは周知であり, これまでも *in vitro* における各種細胞培養の基質としてしばしば用いられてきた。このことはコラーゲンが細胞や組織とよい親和性をもっていることを意味し, バイオマテリアルとしても他の合成材料と異なった特徴をもっていることを示している。細胞が増殖したり生きてゆくためには基質に粘着することが重要であり, 細胞基質としてのコラーゲンの有用性が理解できる。現在までの人工臓器はその大部分が物理的機能をもって生体機能の一時的代行を行わしめるものである。しかしこれからは組織の

治癒をうながし自己と同等の組織構造にまで回復できるようなもの、また細胞を組みこんで生理機能を付与したハイブリッド人工臓器へと発展する時代となるものと思われる。このような観点からバイオマテリアルとしてのコラーゲンの位置は更に高まると考えられる。

5.1 コラーゲン構造と血小板反応⁶⁾

血管壁の内皮細胞が剥離しコラーゲン線維が露出すると血流中の血小板がコラーゲンに粘着し、血小板因子を放出して更に血小板凝集反応へと進む。次いでフィブリン線維が形成され血栓が形成される (Fig. 4)。一方試験管においても、多血小板血漿 (platelet rich plasma, PRP) にコラーゲンを添加すると血小板凝集反応が起こることが知られており、コラーゲンが血小板粘着、凝集に端を発する血栓形成に関与していることは広く認められている。

血小板反応を誘起するコラーゲンの構造因子がどのようなものであるのかを調べてみた^{7,8)}。Fig. 5 に示したように、分子分散の酸性コラーゲンを溶液を各種条件にさらすと、分子配列の異なったコラーゲン集合体を得られる。PRP を用いて血小板凝集反応を追跡してみると、コラーゲンが 1 個 1 個ばらばらの分子分散の場合には血小板反応は起こさず、コラーゲン分子が規則配列した集合体の場合にのみ反応が起こった。Fig. 5 のコラー

Fig. 4 内皮細胞はく離による血管内での血栓生成過程
現代化学, 1979 (6), 34

Fig. 5 コラーゲン溶液から各種コラーゲン集合体の生成

FLS: Fibrous Long Spacing, コラーゲン溶液に血清糖タンパクを加え、水に対し透析すると生ずる

SLS: Segment Long Spacing, コラーゲン溶液に ATP を加えると生ずる

短周期集合体: コラーゲン溶液に NaCl を 2% になるよう加えると生ずる

各集合体は希酸で溶解し、再びどのタイプの集合体にも転換できる

化学と工業, 36 (8), 539 (1983)

ゲン線維, FLS, 短周期集合体は反応を透導したが, SLSは規則配列しているが長さが短いため, またアモルファス集合体は規則配列がないため, とともに反応を起こさなかった. 血小板はコラーゲン分子の規則配列(4次構造)を認識することがわかった. 更に血小板反応に必要なコラーゲン4次構造のcritical sizeを調べてみると, 長さが9000Å, 直径が45Åであり, これより小さな4次構造体では反応を起こさないことがわかった. このcritical sizeの9000Åという長さは血小板(直径約2μ)の大きさの約半分である. 血小板反応にはコラーゲンの4次構造とその大きさが重要であることがわかったが, 一方コラーゲンの官能基が血小板膜のレセプターと相互作用し反応の引き金になっていると考えられる. コラーゲン4次構造体を化学修飾により各アミノ酸の側鎖をブロックし反応性を調べてみると, アルギニン側鎖をブロックしたときのみ反応は全く不活性になった. このことからアルギニン側鎖が血小板膜との反応に関与している官能基であることが推定された. 血小板反応にはコラーゲン側鎖に結合している糖が重要であるという説もあるが, 現在はコラーゲンの4次構造の方がより中心的な役割を果たしているという考えの方が有力である⁶⁾.

Table 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
繊維学会誌, 39 (11), 427 (1983)

ハイドロキシプロリン	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
フェニールアラニン	38
ハイドロキシリジン	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 $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2$ の鎖組成である.

5.2 コラーゲンの化学修飾による細胞応答の制御

タイプIコラーゲン1分子中には3136残基のアミノ酸を含む. このうち酸性アミノ酸であるグルタミン酸とアスパラギン酸は合計で349残基含まれているが, このうち約1/3は側鎖のCOOH基が $-\text{CONH}_2$ で存在するので $-\text{COOH}$ 基としては約231個が存在する. 一方塩基性アミノ酸であるリジンとヒドロキシリジンが合計で104残基, アルギニン155残基, 塩基性アミノ酸の総合計として274残基存在する (Table 2). したがってコラーゲンは等電点が8附近にある塩基性タンパクである. コラーゲン側鎖の $-\text{COOH}$, $\epsilon\text{-NH}_2$, アルギニン残基は化学修飾に用いられ, コラーゲンの性質の改良に応用される. たとえばFig. 6に示したように $-\text{COOH}$ のメチル化および $\epsilon\text{-NH}_2$ のサクシニール化がなされ, 抗血栓性や細胞応答についての研究がなされている. メチル化によりpIは10.55になり生理条件下で正電荷が大きくリッチになり, サクシニール化によりpIは4.57になり負電荷リッチとなる.

無処理, メチル化およびサクシニール化コラーゲンを用いてホローファイバー(H. F.)を作成し, 人の上腕静脈から血液を一定条件でH. F.内に流し, 血小板やフィブリンの沈着状態を観察したところ⁹⁾, メチル化では血液接触直後から血小板が多数粘着し, 数分後には多くのフィブリン線維が生成し, 強い血栓性表面であることがわかった. 一方サクシニール化は血小板粘着がほとんど起こらず, 抗血栓性を示した. 無処理コラーゲンは

Fig. 6 コラーゲンのメチル化とサクシニール化
繊維学会誌, 39 (11), 427 (1983)

この中間であった。この実験からメチル化は止血剤などに適し、サクシニール化は人工血管などへの応用に適していると考えられたので、サクシニール化コラーゲン人工血管の動物実験を行った^{10,11)}。無処理およびサクシニール化コラーゲン人工血管をそれぞれ犬の胸部下行大動脈に植えこみ比較したところ、無処理血管は移植約1時間に植えこみ厚さの血栓を形成したが、サクシニール化では血栓の形成は全くなく厚さ5~20 μ の薄いフィブリン層が形成されていた。無処理では4週目になってもわずかな内皮細胞が認められるのみであったが、サクシニール化では内皮細胞が連続的に血管内面を覆い早期の内皮化、治癒が進行した。このようにサクシニール化は初期の血栓形成を抑制し、内皮化の促進に効果があることがわかった。

一方メチル化、サクシニール化コラーゲン膜上での細胞の粘着や増殖率についての研究もなされている^{12~14)}。マウス線維芽細胞(L細胞)やマウス腹腔マクロファ-

Fig. 7 L細胞の化学修飾コラーゲン上での増殖
FN(+)およびFN(-)はフィブロネクチン存在下および非存在下を示す
繊維学会誌, 39 (11), 427 (1983)
AC: 無修飾アテロコラーゲン
SAC: サクシニール化アテロコラーゲン
MAC: メチル化アテロコラーゲン
control: 市販培養シャーレ

ジ (M_{ϕ}) は、牛血清存在下または非存在下で無処理コラーゲンより、これら化学修飾コラーゲン膜上によく粘着する。L細胞は無血清下では無処理膜上では増殖は見られないが、メチル化およびサクシニール化コラーゲン膜上ではFig.7に示したように充分増殖は見られたが、やはり化学修飾コラーゲン膜上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したコラーゲン膜上に粘着した M_{ϕ} は、EDTAやEGTA処理により能率よく脱着回収ができ、 M_{ϕ} を高純度で分離回収するための基質として化学修飾コラーゲンは利用可能であることが示された。化学修飾による細胞の粘着、増殖に及ぼす効果は細胞により異なり、すべての細胞に共通して見られるものではないらしい。たとえば肝細胞の場合コラーゲン基質への粘着特性はコラーゲン基質の荷電に影響されず、化学修飾の有無にかかわらず、いずれも高い粘着を示した¹⁵⁾。肝細胞の場合コラーゲンのらせん構造が破壊されたゼラチン膜上では粘着率が低く、コラーゲンらせんが重要な因子の1つであることが示されている。

5.3 細胞形質発現に及ぼすコラーゲン因子

繰り返し周期をもつコラーゲン分子の配列が血小板凝集反応にとり必要なこと、コラーゲンの電荷の修飾が血栓形成や細胞の粘着、増殖に関係していることは前に述べたが、この他にコラーゲンの線維構造や特定タイプのコラーゲンが細胞の形質発現に關与している例をあげてみたい。

コラーゲンは生体内や *in vivo* での細胞培養基質として重要な役割を果たしていることは前述してきた通りであるが、また多くの細胞の分化にも関係している⁵⁾。たとえば筋原細胞を線維芽細胞なしに培養しても筋線維に分化さないが、線維芽細胞やコラーゲン存在下では細胞融合を起こして筋線維になる¹⁶⁾。すなわちコラーゲンは筋原細胞の筋線維への分化に重要な役割を果たしている。

コラーゲンフィブリルが一方向に配列したコラーゲン膜 (Fig.8) 上で細胞を培養すると、細胞はフィブリルに沿って成長増殖することが観察されている¹⁷⁾。フィブリルはあたかも列車のレールのような役目をする。このような膜上に筋原細胞を培養すると、フィブリルに沿った細胞融合が起こり単核の筋原細胞が多核細胞の筋線維に分化する (Fig.9)。一方コラーゲンフィブリルを含まない膜上 (Fig.8) では、細胞の配向も起こらないし、多核細胞への融合も見られない (Fig.9)¹⁷⁾。

フィブリルのようなコラーゲン分子が規則配列したコ

Fig. 8 表面にコラーゲンフィブリルの配向がある膜とない膜の走査型電子顕微鏡写真
Develop., Growth and Differ., 23, 175 (1981)¹⁷⁾

ラーゲン膜と、コラーゲン分子が規則配列をもっていないコラーゲン膜上では、線維芽細胞に及ぼす効果も異なる^{18, 19)}。たとえばランダム配列のコラーゲン上では人皮膚線維芽細胞は紡錘形を示し、DNA合成活性(増殖性)は高いが、コラーゲン分子の規則配列をもった線維膜上では細胞の形態は全く異なり、突起を多数もった星状であり、DNA合成活性も抑制され低い¹⁹⁾。

またコラーゲンフィブリルをもつ基質を用いた場合でも、この基質表面に単層培養したときと、この基質ゲル内で3次元(立体)培養した場合では細胞の形質発現が異なることが知られている。軟骨細胞は軟骨内にあって軟骨特有のタイプIIコラーゲンを合成している。この細胞をコラーゲンフィブリルのゲル内で培養すると、生体内と同様の形態を保ちタイプIIコラーゲンを生産し続ける。しかし同じ基質上で単層培養すると、形態も線維芽細胞様となり、タイプIコラーゲンを生産するようになり高い増殖率を示すようになる²⁰⁾。生体内で3次元状態で存在している細胞に生体内と同様の形質を発現させるためには3次元培養が良いことをうかがわせる。

肝細胞は生体内で保持していた機能を保たせたまま培養保存するのは難しい細胞とされているが、肝組織から

Fig. 9 コラーゲンフィブリル配向膜(B)上とフィブリルのない膜(A)上でのニワトリ胎児筋原細胞の培養
1.8mM EGTAを含む培地で86時間培養したもの
Develop., Growth and Differ., 23 (2), 175 (1981)¹⁷⁾

抽出したコラーゲンを基質にすると、5カ月以上機能が保持でき²¹⁾、細胞が生体内にあったときと近い培養条件が本来の細胞機能の保持に好適であることを示している。

Table 1に示したようにそれぞれのタイプのコラーゲンは決まった細胞により合成されている。したがって細胞は自身が合成するコラーゲンを最も良い基質とすることが考えられる。最近タイプIVコラーゲンが細血管内皮細胞の形質発現に重要な役割を演じているという興味ある報告がなされている²²⁾。細血管内皮細胞を間質コラーゲンであるタイプIやタイプIII上で培養すると、細胞は平面的に増殖して広がり基質表面全体をカバーするのみである。一方基底膜の成分であるタイプIVコラーゲン上で培養すると、細胞は集まってあたかも細血管のような管状構造を形成する。これは培養の初期から起こり、また細胞の増殖はほとんど起こらない。これは内皮細胞が基質を認識し、生体内と同様の形質を保持していることを示すものである。内皮細胞のこのような基質の認識はタイプIVコラーゲンのかわりに基底膜をそのまま用いても同様に見られる。このような事実は結合組織成分が細胞の形質発現にとり重要な役割を果たしており、

生体における組織形成、器官形成にコラーゲンが大きく関与していることを示すものである。コラーゲン線維構造や電荷の問題またコラーゲン基質の物理的状態などの他に、タイプ別コラーゲンをうまく活用することが、コラーゲンをバイオマテリアルとして組織修復、ハイブリッドオーガン、細胞培養などに応用する際とくに重要と思われる。

6. コラーゲンを用いたハイブリッドオーガン

表皮細胞が残っているⅡ度以下の浅い熱傷の治癒にはこれまで凍結乾燥豚皮、紙状コラーゲン膜、その他各種の創傷カバー材が開発されてきた。このような浅い傷の場合は10日～2週間もすると残存表皮細胞が増殖して傷表面をカバーして治癒する。ところが表皮細胞が完全に失なわれたⅢ度以上の深い熱傷や皮膚完全損失傷の場合は、周囲の表皮細胞が増殖して傷を完全にふさぐことができないので、自家植皮をしなければならない。したがって一時的な創傷カバー材でなく、完全皮膚欠損傷にも応用できてそのまま生着して皮膚となるような人工皮膚が望まれていた。

皮膚はFig. 10に示すようにコラーゲンと線維芽細胞からなる真皮と、表皮細胞層からなっている。表皮は基

底細胞が順次分裂し有棘細胞、顆粒細胞層へと変化し最後に角質層となる。このような生体皮膚と同等な構造をもつ人工皮膚、すなわち細胞を組みこんだハイブリッド

実際は真皮の厚さは表皮の20倍ほどある

Fig.10 皮膚の断面の模式図

Fragrance J., 12 (1), 98 (1984)

Fig.11 Bellのskin equivalent graftの作成法。 *Fragrance J.*, 12 (1), 98 (1984)

人工皮膚を作るには細胞培養の技術によらなければならない。Bell^{23,24)}らはFig. 11に示した方法でskin equivalent graftを作った。まず真皮に相当する組織を作る。レシピエントの線維芽細胞を中和したコラーゲン溶液に混合し、37°Cで培養すると、線維再生したゲル状マトリックスは収縮して真皮組織と似た構造体となる。この線維芽細胞を含む収縮コラーゲンマトリックス上にレシピエントの表皮細胞を培養すると、Fig. 10に示したような細胞の多層構造からなる表皮が形成される。これはレシピエントの細胞を用いているので拒絶反応もなくそのまま皮膚として生着する。

もう1つはYannas^{25,26)}により開発されたもので、Fig. 12に示した操作で作られた。これはコラーゲンとコンドロイチン硫酸からなるスポンジの上面に薄いシリコン膜を張ったものであり、傷に適用する前にレシピエ

Fig.12 Yannas らの人工皮膚 (skin template) とその作成法

シリコン膜は移植後過剰の水分蒸発を防ぐ。スポンジ層内の基底細胞はシリコン膜との境界面に集まり表皮を形成する。血管や線維芽細胞はスポンジ内に進入する。

Fragrance J., 13 (1), 98 (1984)

ントの表皮基底細胞をスポンジ内に種まきしておく、基底細胞がシリコン膜下に集まり増殖して表皮を形成する。シリコン膜は表皮形成後脱落し、スポンジ内には周囲組織から細血管や細胞が進入し、そのまま生着して皮膚となる。Yannasの人工皮膚は適用された患部でレシピエントの治癒力により皮膚組織を形成するもので、スポンジはそのための template の役割をしているものである。彼は skin template と名付けた。

このようなコラーゲンを基質として用いたハイブリッドオーガンは内皮細胞を組みこんだ人工血管などにも発展してゆくと考えられる。

コラーゲン膜は現在可食性のソーセージケーシングとして実用化されているし、また、かつて血液透析膜としても開発研究されたことがある^{27,28)}。溶質透過性もセルロース膜 (Cuprophane) より良く、ultrafiltration の性質も大変良い。管状膜、hollow fiber など各種形状の膜に加工可能であり、膜の pore size も製法により或る程度調節可能である。最近 hollow fiber の外表面に肝細胞や β 細胞などを粘着培養し、fiber の中空内に血液を流すいわゆるハイブリッド型人工肝臓や人工脾臓の研究も行われている。コラーゲンの生物学的特性から考えてこのような応用も将来可能であろう。

7. おわりに

従来動物の支持物質と考えられていたコラーゲンも、近年細胞との相互作用で新しい知見が蓄積されてきて、バイオマテリアルとしてコラーゲンを応用する場合もコラーゲンの生物学的特質を考慮することが重要であることを述べてきた。コラーゲンは、膜、糸、スポンジ、ゲル、マイクロスフェアなど各種形状に加工できる。生体内埋植材料、ハイブリットオーガン材料のみでなく、有用物質の生産に用いられる人細胞の培養における基質物質として用いられる時が来るようになるかも知れない。今後発展すると考えられるバイオテクノロジーにおいてもコラーゲンの貢献できる領域が大いにあると考えられる。このためにも新しい観点で基礎的特質をふまえたコラーゲンの応用研究が蓄積されねばならない。

文 献

- 1) 永井 裕, 藤本大三郎編: コラーゲン代謝と疾患, 講談社サイエンティフィク (1982)
- 2) P. F. Davison, L. Levine, M. P. Drake, A. L. Rubin, S. Bump: *J. Exp. Med.*, 126, 331(1967)
- 3) B. Ponz, W. Meigel, J. Pauterberg, K. Kuhn:

- Eur. J. Biochem.*, **16**, 50 (1970)
- 4) K.H. Stenzel, T. Miyata, A.L. Rubin: *Ann. Rev. Biophys. Bioengin.*, **3**, 231 (1974)
 - 5) H.K. Kleinman, R.J. Klebe, G.R. Martin: *J. Cell Biol.* **88**, 473 (1981)
 - 6) 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, 31 頁, 南江堂 (1982)
 - 7) C.L. Wang, T. Miyata, B. Weksler, A. L. Rubin, K.H. Stenzel: *Biochim. Biophys. Acta*, **544**, 555 (1978)
 - 8) C.L. Wang, T. Miyata, B. Weksler, A. L. Rubin, K.H. Stenzel: *ibid*, **544**, 568 (1978)
 - 9) T. Miyata, A. Schwartz, C. L. Wang, A. L. Rubin, K.H. Stenzel: *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs*, **22**, 661 (1976)
 - 10) Y. Noishiki, T. Miyata: *Trans. 8th Meeting of the Society for Biomaterials*, **5**, 102 (1982)
 - 11) 宮田暉夫, 野一色泰晴: 第 3 回バイオマテリアル学会大会論文集, 85 頁 (1981)
 - 12) 笠井俊二, 富永直樹, 赤池敏宏, 宮田暉夫: *Polymer Preprints, Japan*, **30** (7), 1632 (1981)
 - 13) S. Kasai, T. Akaike, T. Miyata, T. Kunimoto, K. Nitta: *J. Biomed. Mat. Res.*, **18**, 243 (1984)
 - 14) S. Kasai, T. Miyata, T. Kunimoto, K. Nitta: *Biomed. Research*, **4** (2), 147 (1983)
 - 15) 西沢真治, 小林 明, 石田正夫, 笠井俊二, 赤池敏宏, 宮田暉夫: 第 6 回バイオマテリアル学会抄録集, 15 頁 (1984)
 - 16) I.R. Konigsberg: "Chem. Mol. Biolog. Intercellular Matrix" ed. by Balazs E. A., vol 3, 1799, Academic Press (1970)
 - 17) K. Yoshizato, T. Obinata, H. Huang, R. Matsuda, N. Shioya, T. Miyata: *Develop. Growth and Differ.*, **23** (2), 175 (1981)
 - 18) 平 敏夫, 吉里勝利: 第 15 回日本結合組織学会
 - 19) K. Yoshizato, T. Taira, N. Shioya: *Annals of Plastic Surgery*, **13**, 9 (1984)
 - 20) 安井夏生, 大沢 傑, 木村友厚, 小野啓郎: コラーゲン研究会抄録, 65 頁 (昭和 57 年度)
 - 21) M. Rojkind, Z. Gatmaitan, S. Mackensen, M. Giambrone, P. Ponce, L.M. Reid: *J. Cell Biol.*, **87**, 255 (1980)
 - 22) J. A. Mardi, S.K. Williams: *J. Cell Biol.*, **97**, 153 (1983)
 - 23) E. Bell, P. Ehrlich, D.J. Buttle, T. Nakatsuji: *Science*, **211**, 1052 (1981)
 - 24) E. Bell, P. Ehrlich, S. Sher, C. Merrill, R. Sarber, B. Hull, T. Nakatsuji, D. Church, D. Buttle: *Plast. Reconst. Surgery*, **67**, 386 (1981)
 - 25) I. V. Yannas, J.F. Burke, D.P. Orgill, E. M. Skrabut: *Science*, **215**, 174 (1982)
 - 26) I. V. Yannas, J.F. Burke, M. Warpehoski, P. Stasikelis, E.M. Skrabut, D. Orgill, D. J. Giard: *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, **27**, 19 (1981)
 - 27) 宮田暉夫, 西沢 優: コラーゲン, 野田, 永井, 藤本編, 南江堂, 251 頁 (1975)
 - 28) 宮田暉夫, 西沢 優, 鈴木達夫, 早出 武: 日本臨床, **30**, 2422 (昭和 47 年)

第 8 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム予告 (2)

と き: 昭和 60 年 11 月 11 日 (月), 12 日 (火)
 ところ: 岡山県総合福祉会館 (岡山市石関町 2-1)
 : TEL (0862) 26-3501
 [交通]: 岡山駅より路面電車 東山行「表町入口」下車徒歩 5 分
 ・タクシー 約 12~13 分

主 催: 日本薬学会

協 賛: 日本膜学会・他

講演要旨集原稿締切 9 月 14 日 (土) 必着

参加申込要領:

1. 参加予約締切 10 月 21 日 (月)

シンポジウム参加予約希望の方は, はがき大の用紙に次の各事項を記し, 参加費を添えて, 現金書留にてお申込み下さい。

① 参加者氏名 (フリガナ併記), ② 所属 (勤務先等), ③ 薬学会会員, 非会員の別 (会員の場合は, 一般, 学生の別を記入), ④ 会員の場合は会員番号, ⑤ 連絡先 (住所, TEL), ⑥ 懇親会参加の有無,

⑦ 要旨集送付希望の有無, ⑧ 送金額. 要旨集送付ご希望の方は, 下記金額に送料 300 円を加算の上, 送付宛名用紙 (はがき大の紙に〒, 送付先住所, 氏名を明記したもの) を添えてお送り下さい。

2. 参加費

日本薬学会会員			
	一般会員	学生会員	非 会 員
予約申込	3,500 円	2,500 円	4,000 円
当日申込	4,000 円	3,000 円	4,500 円
懇親会参加費（原則として予約制）			3,500 円
懇親会は11月11日（月）午後6時より岡山県総合福祉会館にて行う予定です。			

申込・連絡先

〒 700 岡山市津島中 1-1-1

岡山大学薬学部

第 8 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム

実行委員長 藤田勇三郎

TEL (0862) 52-1111 内線 989, 990