

鮭白子DNA-鮭皮コラーゲン複合素材を用いた創傷被覆材の開発(生体材料)

松永	政司	〔日生バイオ株式会社／代表取締役〕
杉	正人	〔日生バイオ株式会社／北海道研究所長〕
長谷川	英司	〔日生バイオ株式会社／北海道研究所副所長〕
劉	向東	〔日生バイオ株式会社／主任研究員〕
武島	嗣英	〔日生バイオ株式会社／副主任研究員〕
西村	太輔	〔日生バイオ株式会社／副主任研究員〕
許	善花	〔日生バイオ株式会社／副主任研究員〕
棟方	正信	〔北海道大学大学院工学研究科／教授〕
西	則雄	〔北海道大学大学院工学研究科／客員教授〕
村田	勝	〔北海道医療大学／講師〕
森	一夫	〔井原水産株式会社／商品部〕
高木	睦	〔北海道大学大学院工学研究科／教授〕
湊	孝康	〔恵庭リサーチ・ビジネスパーク株式会社／代表取締役社長〕
西川	武志	〔北海道教育大学／助教授〕

背景・目的

鮭白子と鮭皮の大部分は利用されず有料で廃棄されている未利用天然資源である。これまで日生バイオ(株)と井原水産(株)は、それぞれ北海道大学西教授、棟方教授と鮭白子DNAの精製・利用法と鮭皮コラーゲンを常温で安定化させる技術を共同で開発した。西教授らは、鮭白子DNA・牛皮コラーゲン複合材料は、傷跡を綺麗に直すことを報告した。牛皮や豚皮を原料にしたコラーゲンを使用した創傷被覆材は既に実用化されているが、当該製品は、BSE(狂牛病)をはじめとした人畜共通感染症の危険性がある。本事業では鮭白子DNA・鮭皮コラーゲン複合材料を作り牛皮コラーゲンに代わる安全性の高い創傷被覆材を開発する。

内容・方法

＜複合素材作製＞

様々なゲル化・繊維化方法によりサケコラーゲン溶液をゲル化・繊維化し、DNAを安定的に複合化する方法を検討した。また、試作したDNA-鮭皮コラーゲン複合素材について、DNA溶出量(ABS260nmから算出)、変性温度(適当な湯浴を用いて温度をかけた)を測定し、最も安定した素材を作製した。

＜動物実験＞

Wistar系ラット(雄性・6週齢)を使用し、皮膚欠損部へのサンプル移植を以下の手順で行った。全身麻酔下で側腹部を剃毛し、手術部位の消毒を行った。その後、背部皮膚左右に皮膚生検用トレパンを用いて皮膚欠損(直径8mm)を

作製した。皮膚欠損部に直径8mmにカットした7種のサンプル①DNA(1%)浸漬サケコラーゲンスポンジ②DNA(1%)浸漬サケコラーゲンゲル③二重層サンプル(コラーゲン:DNA=10:1・EDC 60mM)④二重層サンプル(コラーゲン:DNA=10:1・EDC 30mM)⑤サケコラーゲンスポンジ(DNAなし)⑥アテロコラーゲン(ペルナック®、ゲンゼ製)⑦キチン(ベスキチン®, ユニチカ製)を移植するとともに皮膚欠損のみ(自然治癒群)も設定した。なお、移植後のサンプルと皮膚欠損部に生理食塩水を50μl 添加した。組織学的観察は以下の方法で行った。5、7、10、14、21日後に屠殺し、実験相当部皮膚組織を切除、切除試料は、10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬固定後、パラフィン包埋し、切片を作製(厚さ4 μm)した。ヘマトキシリン・エオジン染色により組織学的に観察した。

＜培養細胞実験＞

動物実験に用いたサンプルと同様の素材を用い、ヒト正常線維芽細胞、ヒト表皮角化細胞の増殖性、接着性を生化学的手法を用いて観察した。

結果・成果

＜サケコラーゲン-DNA複合素材の作製＞

①ポリイオンコンプレックスにしてDNAコラーゲンを作る方法を検討した。その結果、サケコラーゲンではDNAとポリイオンコンプレックスの形成が弱くDNAが大量に溶出してしまうため複合素材として不相当であった。②サケコラーゲンを組織化する際にDNAを添加し、サケコラーゲン組織(ゲル)中にDNAを取り込む方法について検討した結果、以下の事がわかった。

1. DNA濃度を高くするとゲル形成が阻害される。
2. DNA濃度は0.005%以下にしなければ、十分な強度を持ったゲルを得られない。
3. UV架橋ではゲル形成を促進できない。
4. 架橋剤としてEDCだけではなく、グルタルアルデヒドを20mM加えることでゲル形成でき、DNA濃度は0.008%まで上げることが出来た。
5. DNAを加えるとゲル形成しないことの原因を検討した結果、透過型電子顕微鏡写真から、DNAを添加するとコラーゲン繊維の発達が阻害されゲルの強度が落ちるためと分かった。
6. NaClで塩濃度を調整することでDNAを含むサケコラーゲンゲルが安定して形成できることを突き止めた。この技術により複合素材のDNA濃度を飛躍的に高めることが出来た。
7. ゲル凍結乾燥後、水等の液体に浸すと、凍結乾燥スポンジが収縮してしまうことが分かった。そこで、液体に浸しても収縮しない修飾したコラーゲンの

スポンジとDNA入りのスポンジを二つ重ねる事で収縮を抑えたスポンジを作製した。

簡易的な方法として、③サケコラーゲンゲル凍結乾燥スポンジをDNA溶液に浸したまま再び凍結乾燥し、サケコラーゲンDNA複合素材を作成する事ができた。

<動物実験>

DNA (1%) 浸漬サケコラーゲンスポンジの吸水性は迅速で極めて良好であった。一方、アテロコラーゲン(ペルナック®、ゲンゼ製)の吸水速度は最も遅く約30秒かかった。

すべてのサンプルに術後感染は起こらなかった。

移植7日後、DNA (1%) 浸漬サケコラーゲンスポンジ、二重層サンプル(コラーゲン:DNA=10:1・EDC 30mM)、サケコラーゲンスポンジ(DNAなし)群に肉芽の形成と局所的石灰化がみられた。一方、アテロコラーゲン(ペルナック®・ゲンゼ製)群に石灰化は認められなかった。

14日後、アテロコラーゲン群の肉芽・線維形成は良好だが、キチン群の肉芽形成は少量で組織が陥没傾向にあった。

<動物細胞実験>

二重層サンプルと同様の方法で作製したDNA-鮭皮コラーゲン複合フィルムを用いて、細胞増殖試験、細胞接着試験を行った。その結果、用いた複合素材は、ヒト正常線維芽細胞及びヒト正常表皮角化細胞の増殖をわずかながら促進し、ヒト正常表皮角化細胞の接着性も向上している事がわかった。

今後の展望

動物実験を再度行い、DNA-鮭皮コラーゲン複合素材の性能評価を継続する。また、複合素材の*in vitro*試験を細胞種を変えて行うことで、創傷治癒のメカニズムについて解明する。未実施である、安全性試験二種類(急性毒性試験及び変異原性試験)を行い、開発したDNA-鮭皮コラーゲン複合素材の安全性を確認する。また、動物を用いた安全性試験(アレルギーの有無等を皮膚刺激試験にて測定)とヒトを用いたパッチテストを行うことで最終的な安全性について確認する。