

# 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

松永	政司	[ 日生バイオ / 代表取締役 ]
杉	正人	[ 日生バイオ 北海道研究所 / 所長 ]
長谷川	英司	[ 日生バイオ 北海道研究所 / 副所長 ]
劉	向東	[ 日生バイオ 北海道研究所 / 主任研究員 ]
武島	嗣英	[ 日生バイオ 北海道研究所 / 副主任研究員 ]
西村	太輔	[ 日生バイオ 北海道研究所 / 副主任研究員 ]
許	善花	[ 日生バイオ 北海道研究所 / 副主任研究員 ]
池野	博貴	[ 日生バイオ 北海道研究所 / 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 / 准教授 ]
西川	武志	[ 北海道教育大学札幌校 / 教授 ]
岡安	多香子	[ 北海道教育大学札幌校 / 教授 ]
森	一生	[ 井原水産 ]
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 / 代表取締役社長 ]

## 背景・目的

鮭の加工時に廃棄処分されている大量の白子及び皮からDNAとコラーゲンを抽出精製し、複合化することにより、今までになかった安全性の高い創傷被覆材を開発する。現在、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あるが、当該製品は、BSE(いわゆる狂牛病)をはじめとした人畜共通感染症の危険性がある。本研究開発は安全性が高いDNA - コラーゲン複合体による創傷被覆材の有効性を確認すること。自然治癒が早く、傷跡が綺麗な創傷被覆材を試作し、開発することを目的としている。

## 内容・方法

DNA - 鮭コラーゲン創傷被覆材の作製：

鮭白子DNAと鮭コラーゲンをを用いて以下のような5種類の創傷被覆材を作製した。 DNA - 鮭コラーゲンスポンジ (1.2:1w/w) DNA - 鮭コラーゲンスポンジ (1:5w/w) DNA - 鮭コラーゲンスポンジ (1:10w/w) 2重層DNA - 鮭コラーゲンスポンジ (1:10w/w) オリゴデオキシリボヌクレオチド - 鮭コラーゲンスポンジ (1:10w/w)。他に、DNA添加しない鮭コラーゲンスポンジをコントロールとして用いた。

DNA - 鮭コラーゲン素材を用いた細胞の接着と増殖能の評価：

正常ヒト皮膚繊維芽細胞(NHDF)と正常ヒト皮膚表皮細胞(NHEK)を用いて、DNA - 鮭皮コラーゲンフィルム及びスポンジ上に培養し、細胞の接着性と増殖能を調べた。

ラットを用いたDNA - 鮭コラーゲン創傷被覆材の性能評価：

ウィスター系ラット(雄性、5週齢)の背部皮膚に生検用レバ(直径8mm)を用いて左右1か所ずつ皮膚全層欠損を形成させた。実験群として、5種類DNA - 鮭コラーゲンスポンジ、豚腱由来アテロコラーゲンスポンジ、キチン膜、キチンスポンジを用い、対照群として、皮膚欠損状態のもの(自然治癒)を設定した。手術3, 5, 7, 10日後に屠殺し、肉眼的・組織学的に評価した。組織学的には創傷皮膚組織の切片作製(厚さ4μm)後、H-E染色と免疫染色を行い肉芽組織形成と新生血管形成を評価した。又、創傷皮膚組織の新生血管関連の遺伝子の発現量を比較した。

## 結果・成果

DNA - 鮭コラーゲン創傷被覆材の作製

鮭コラーゲンは変性温度が低いいため、創傷被覆材として利用する場合化学架橋を行い、変性温度を高める事が必要である。そこで、まずはEDC(カルボジイミド)を用いて鮭コラーゲンに化学架橋を導入し、鮭コラーゲンスポンジの変性温度を高めた。その後、濃度が異なるDNA溶液とオリゴデオキシリボヌクレオチド溶液に浸漬し、凍結乾燥を行う事でDNA含量が異なる創傷被覆材を作製した。その他に、DNAが創傷被覆材からコラーゲンの分解に伴い放出する事を目的に、EDCを用いてDNAと鮭コラーゲンの間に架橋結合を導入した。DNAと鮭コラーゲンのイオン結合による沈殿防止は溶液中のイオン強度を調節(塩化ナトリウムを用いた)することで解決する事が出来た。しかし、鮭コラーゲンスポンジにDNAの結合が導入された場合、スポンジの収縮が起こる事が分かった。そこで、スポンジの収縮を防止するために、鮭コラーゲンスポンジを下層にし、上にDNA - 鮭コラーゲン架橋溶液を注ぎ凍結乾燥を行うことで、収縮を抑制した2重層スポンジを作製することが出来た。

DNA - 鮭コラーゲン素材を用いた細胞の接着と増殖能の評価

正常ヒト皮膚繊維芽細胞(NHDF)と正常ヒト皮膚表皮細胞(NHEK)を用いてDNA - 鮭コラーゲンフィルムとスポンジ上で培養し、細胞の接着性と増殖能を調べた。結果、NHDFではDNA量の添加による影響は殆どなく、プラスチック、及び鮭コラーゲンと同じ程度の接着性と増殖能を示した。NHEKでは増殖能がDNA量の増加によってわずかに低下する事が確認された。接着性ではプラスチックに比べて遥かに高く、鮭コラーゲンフィルムに比べてわずかに低い事が確認された。

ラットを用いたDNA - 鮭コラーゲン創傷被覆材の性能評価

ラットを用いた動物創傷モデル実験では、DNA - 鮭コラーゲンスポンジにより、全層欠損部に大きな痂皮を認めずに肉芽組織の形成が促進され、周囲皮膚との線維性組織による移行が滑らかで、豚由来コラーゲンスポンジ、ペルナツ

ク®、ゲンゼ製 )とほぼ同等の効果が得られた。キチン膜と自然治癒群では創の陥没がみられ、線維形成が不全であった。自作した5種類DNA - 鮭コラーゲンスポンジを比較した場合、DNAの添加量が過剰になると、創傷表面に無構造ゲル状DNA層が形成される一方、炎症細胞の侵入も多く、表皮の形成も抑制される事が分かった。そこで、鮭コラーゲンスポンジに適当な量のDNAを担持させることが重要である事がわかった。他に、サケ白子DNA / サケコラーゲンスポンジはサケコラーゲンスポンジより肉芽組織と新生血管形成が早い事が確認された。以上より、サケ白子DNA / サケコラーゲンスポンジは皮膚欠損創の治癒を促進し、皮膚再生のための吸収性・海洋性バイオマテリアルとして有効であることが示唆された。

### 今後の展望

本事業により出来上がった製品の販売は、医薬部外品または特定保険医療材料として認可を受け、市場参入を行うにあたって認可が下りれば比較的容易である。この製品は患者の治療における肉体的負担の軽減、素材の安全性から安心して使用できるため、新規材料を使用した医療用素材としての需要が高まると予想される。また、未利用天然資源が高付加価値商品とすることができ、北海道に新しい産業が生まれることが期待できる。