

天然高分子系成型物の機能化に関する研究

加藤一徳^{*1} 橋本貴史^{*1}

Study on Functionalization of Molding Material Made of Natural Polymer

Kazunori KATOH^{*1} and Takashi HASHIMOTO^{*1}

Owari Textile Research Center, AITEC^{*1}

羊毛から抽出したケラチンを原料にした圧縮成型物を医用材料として利用することを目的として、成型フィルム上で L929 繊維芽細胞を培養したところ、細胞がフィルムに接着し増殖することを確認した。ケラチンと塩化ナトリウム (NaCl) を均一に混合して圧縮成型した後、NaCl を溶出することによってケラチン多孔体を作製した。ケラチン多孔体の気孔率は 90% に達し、また、細胞が増殖する場として適しているとされる細孔径 100 ~ 500 μm を持つ多孔体を作製することができた。

1. はじめに

ケラチンは髪、羊毛、爪などを構成する繊維状タンパク質である。タンパク質のアミノ酸配列から、ケラチンの分子骨格には比較的たくさんのシステイン残基 (5 ~ 10 mol%) が存在し、それらが分子間ジスルフィド架橋結合で結ばれている。羊毛や毛髪の強度やしなやかさはこのような架橋構造によると考えられる。また、細胞接着性タンパク質であるフィブロネクチンと同様に、細胞の接着に関与するアミノ酸配列 (RGD、LDV) が羊毛ケラチンには存在する。したがって、ケラチンは動物細胞の培養担体などの医用材料として利用できると期待される。山内ら^{1),2)}は以前、羊毛から抽出したケラチン水溶液から、溶液キャスト法によりフィルムを作製した。このフィルム上で繊維芽細胞を培養したところ、細胞はフィルム表面に接着し、増殖した。ケラチンフィルムをマウス皮下組織に埋め込んだところ、フィルムの分解を確認した。また、動物細胞を大量培養するための担体や損傷被覆材として利用することを目的として、ケラチンスポンジ³⁾が凍結乾燥法により作製されている。しかしながら、スポンジの細孔径が 100 μm 程度で比較的小さい。

最近注目されているティッシュエンジニアリング (再生医学)⁴⁾に用いられる材料として、コラーゲンやポリ乳酸およびポリグリコール酸などが挙げられ、生体の構成成分または代謝産物であるため安全性において問題がない。これらの材料は、生体内に埋め込まれ、細胞が増殖するための足場となるためスポンジ状で用いられることが多い。コラーゲンスポンジは凍結乾燥法で作られるため、細孔径が比較的小さいが、ポリ乳酸については

種々の方法^{5),6)}でスポンジを作製することができ、その細孔径も制御できる。

我々は平成 12 年度にケラチン粉末を圧縮成型してフィルムを作製した⁷⁾。この成型フィルムを医用材料に利用することを目的として、まずフィルム上で繊維芽細胞の培養を試して、本法で作製したケラチンフィルムが動物細胞に対して有効な培養基質であるか検討した。次に、ポリ乳酸スポンジの作製に多用されている NaCl 溶出法と圧縮成型法を組み合わせ、細胞が増殖する場として適している 100 ~ 数百 μm の細孔径を持つケラチン多孔体の作製を試みた。

2. 実験方法

2.1 試料

ケラチンは羊毛に二亜硫酸ナトリウム、尿素、ドデシル硫酸ナトリウムを作用させ 100、30 分間還元処理することにより抽出した。そして、得られたケラチン水溶液をスプレードライヤーにより 60 で噴霧乾燥してケラチン微粉末を作成した。

2.2 ケラチンフィルム上における繊維芽細胞の培養

まず、ケラチンフィルムを平成 12 年度に検討した圧縮成型法により作製した。ケラチン粉末とエタノール、および蒸留水を混合した後、120 に加熱した 40mm x 40mm の金型に充填した。5MPa で 5 分間、続いて 10MPa で 5 分間加圧して、厚さ 0.3mm のケラチンフィルムを作製した。

ケラチンフィルムを 10mm x 10mm に切断し、生理的リン酸バッファ (PBS、pH 7.5) 中で 60、一週間振盪洗浄、70%エタノール水溶液で一晩滅菌処理後、10%ウシ胎児血

清添加 MEM 培地でリンスした。これらのフィルムの上で、L929 繊維芽細胞を培養した。細胞の接着および増殖を位相差顕微鏡で観察するとともに、フィルム上の細胞数を血球計算板で計数した。

2.3 ケラチン多孔体の作製

圧縮成型法と NaCl 溶出法を組み合わせる以下のようにケラチン多孔体を作製した。ケラチン粉末と尿素粉末を重量比 1:1 で混合し、続いて NaCl 粉末を混合した。この混合粉末を 140 に加熱した 40mm×40mm の金型に充填し、5MPa で 5 分間、さらに 15MPa で 5 分間加圧した。この成型物をエタノールに 24 時間、続いて蒸留水に 24 時間浸漬して、尿素および NaCl を除いた。リン酸バッファ (pH6.8) に浸漬した後、凍結乾燥してケラチン多孔体を得た。多孔体の作製に使用する NaCl 粉末の粒子径を 106 μm 以下、106 ~ 300 μm、300 ~ 500 μm とした。また、NaCl/ケラチン重量比を 5、9、15、20 とし、種々の混合比で多孔体を作製した。

2.4 ケラチン多孔体の性質

ケラチン多孔体のかさ密度 (ρ_c , g/cm³) を重量と体積から算出した。かさ密度と比重びん法により測定したケラチンの密度 (ρ_s , 1.30g/cm³) から、気孔率 ($P=1 - \rho_c / \rho_s$, %) を求めた。ケラチン多孔体を PBS に 24 時間浸漬して吸水率を求めた。走査型電子顕微鏡により、ケラチン多孔体の形態を観察した。

3 . 結果および考察

3.1 ケラチンフィルム上での L929 繊維芽細胞の培養

図 1 に示した位相差顕微鏡写真から、ケラチンフィルムに L929 繊維芽細胞を播いて 2 時間後、細胞がフィルム上に接着し、紡錘状に伸展していることが観察された。その後、細胞はフィルム上で増殖し、96 時間後には、フィルム一面に細胞が増殖していた。図 2 の細胞増殖曲線の傾きから求めた細胞数の倍加時間は 21.8 時間であった。また、市販の培養ディッシュ (ブランク) 上で培養した場合、倍加時間は 20.5 時間であった。溶液キャスト法で作製されたケラチンフィルム上で L929 細胞を培養した山内らの実験より、倍加時間は 23 ~ 25 時間と見積もられている。また、コラーゲンフィルム上においても同等の倍加時間であると報告されている²⁾。以上より、圧縮成型法で作製したケラチンフィルムは、コラーゲンや市販培養ディッシュと同様に良好な培養基質であると考えられる。

3.2 圧縮成型/NaCl 溶出法によるケラチン多孔体の作製

ケラチンフィルムは、ケラチン粉末とエタノールおよび水を混合した後、圧縮成型することによって作製される。水はケラチンに対して可塑剤となるため、加熱しながら圧縮すると透明なフィルムが得られる。しかしなが

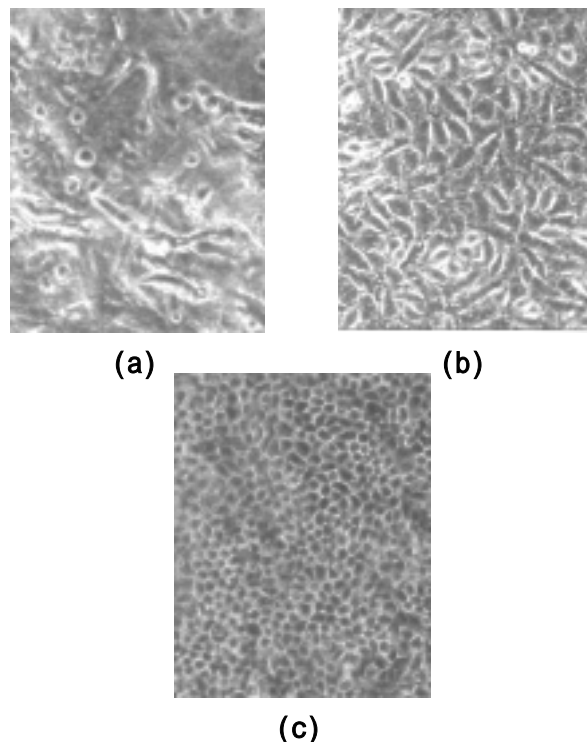


図 1 ケラチンフィルム上の L929 繊維芽細胞。(a)2 時間後、(b)48 時間後、(c)96 時間後

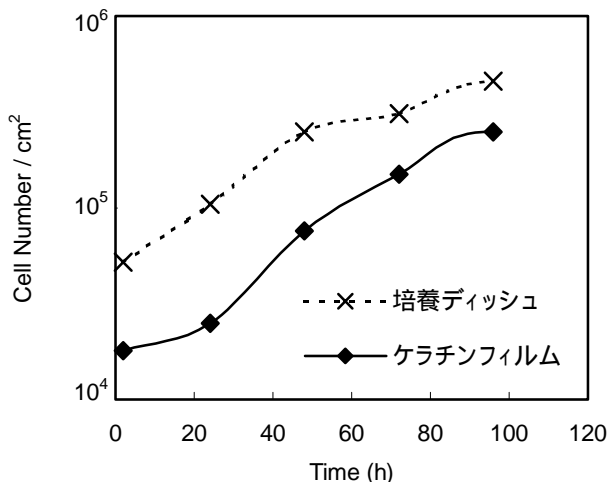


図 2 L929 繊維芽細胞の増殖曲線

ら、ケラチン多孔体を作製する場合、NaCl 粉末を混合するため水を加えることはできない。タンパク質を変性させる尿素をケラチンに加えて、尿素の融点 (136) 以上で圧縮成型したところ、フィルムが形成されることが分かった。そこで、ケラチンと尿素を重量比 1:1 で混合し、そこに NaCl 粉末を加えて 140 で圧縮成型した。得られた成型物は脆くなく、エタノールや水に浸漬して尿素や NaCl を除去しても崩壊することはなかった。凍結乾燥後に得られた多孔体は固いが再度水につけると、非常に柔軟になった。また、水に不溶で膨潤率は約 10% 以下であることから、耐水性に優れていた。

3.3 ケラチン多孔体の性状

圧縮成型/NaCl 溶出法において、NaCl/ケラチン重量比や NaCl の粒子径は、作製後のケラチン多孔体の形態(気孔率、細孔径)に影響すると予想される。NaCl の粒子径が 106 ~ 300 μm である NaCl 粉末を用いて、NaCl/ケラチン重量比を 5、9、15、20 として作製した多孔体の電子顕微鏡写真を図 3 に、気孔率や吸水率を表 1 に示す。NaCl/ケラチン重量比の増加にともなって多数の細孔が観察された。かさ密度が減少し、気孔率が増加した。重量比が 15 の時、気孔率は 90%を超えた。また、多孔体の吸水率が非常に高い値を示した。これは、多数の細孔が互いにつながっていることを示唆し、このような細孔に水が多く充填されたためである。以上より、気孔率が高く、かつ細孔が互いにつながったケラチン多孔体を作製することができた。

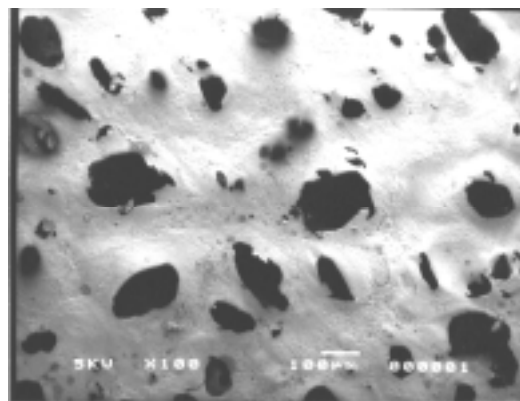
NaCl/ケラチン重量比を 15 に固定し、NaCl の粒子径を 106 μm 以下、300 ~ 500 μm として作製した多孔体の電子顕微鏡写真を図 4 にしめす。図 3 (c)、図 4 より多孔体の細孔径は、使用した NaCl の粒子径と同等程度であった。このことは、ケラチン多孔体の細孔径を NaCl の粒子径で制御できることを意味する。

細胞が増殖する場として適している細孔径は数十 ~ 数百 μm とされている。例えば、骨芽細胞は、100 ~ 400 μm であるといわれている。ケラチンスポンジは凍結乾燥法で作製されるが、細孔径は 100 μm 以下であるため比較的小さい。しかし、圧縮成型/NaCl 溶出法によって、適当な細孔径を持つケラチン多孔体を作製することができた。また、BET 法により比表面積を測定したところ、4 ~ 8 m^2/g であった。多孔体の表面積はフィルムと比較して飛躍的に増加した。

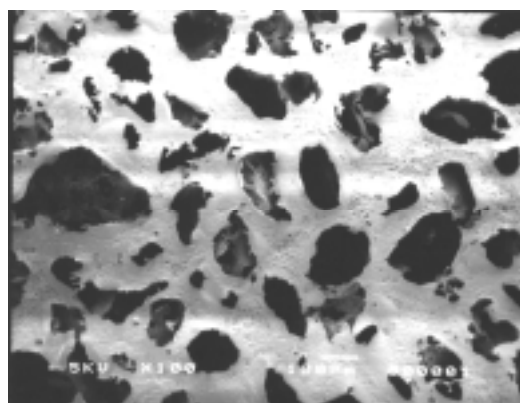
4 . 結び

ケラチンを医用材料として利用することを目的として、圧縮成型法で作製したケラチンフィルム上で L929 繊維芽細胞の培養を試した。フィルム上で細胞は増殖し、ケラチンが良好な培養基質であることを確認した。

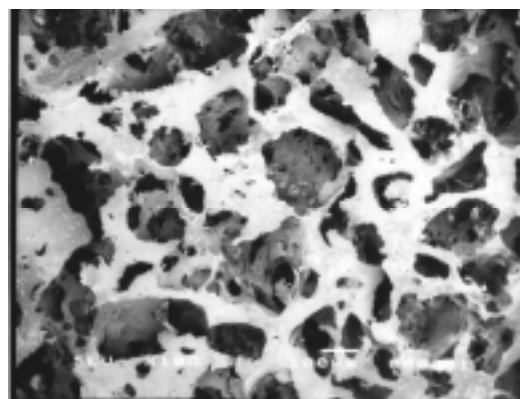
圧縮成型/NaCl 溶出法によりケラチン多孔体を作製した。本法では、多孔体の細孔径を制御できるため、細胞



(a)



(b)



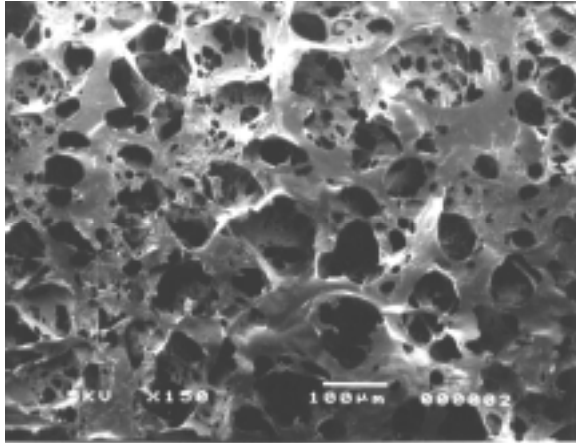
(c)

図 3 種々の NaCl/ケラチン重量比で作製したケラチン多孔体の走査型電子顕微鏡写真。NaCl の粒子径：106 ~ 300 μm 。NaCl/ケラチン重量比：(a)5、(b)9、(c)15

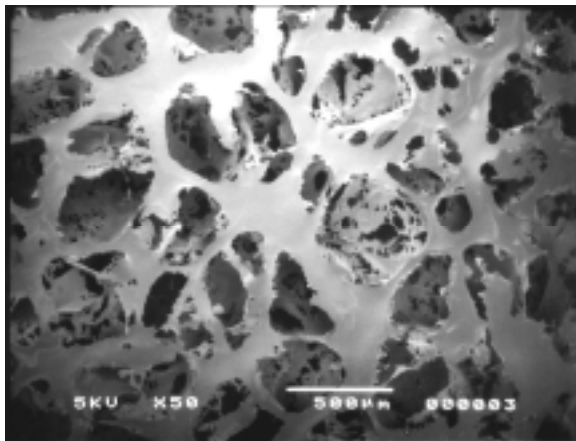
表 1 種々の NaCl/ケラチン重量比で作製したケラチン多孔体の性状

NaCl /Keratin	かさ密度 (g/cm^3)	気孔率 (%)	吸水率 (%)
5	0.204 \pm 0.002	84.3 \pm 0.2	441 \pm 13
9	0.147 \pm 0.008	88.6 \pm 0.6	757 \pm 43
15	0.118 \pm 0.005	90.9 \pm 0.4	1038 \pm 53
20	0.141 \pm 0.003	89.2 \pm 0.3	1170 \pm 51

用いた NaCl の粒度は 106 ~ 300 μm



(a)



(b)

図4 種々の粒子径のNaClで作製したケラチン多孔体の走査型電子顕微鏡写真。NaCl/ケラチン重量比：15。NaClの粒子径：(a)106 μm 以下、(b)300~500 μm 。

が増殖する場として適している細孔径を持つ多孔体を容易に作製することができる。再生医工学が注目され、脂肪族ポリエステルやコラーゲンの多孔体を用いた医療法が開発されている。このような多孔体は、生体内に埋め込まれるため生体適合性が要求される。ケラチンの生体適合性について、定量的に検討された例はないが、インキュベータ内での培養実験で順調な結果が得られている。今後の課題として、本法で作製したケラチン多孔体内における細胞培養、マウスやラットなどを使った動物実験によるケラチンの生体適合性評価があげられるが、今後注目される材料となることは、間違いない。

文献

- 1) Kiyoshi Yamauchi et al.: J. Biomed. Mater. Res., **31**,439 (1996)
- 2) Kiyoshi Yamauchi et al.: J. Biomater. Sci. Polym. Edn., **9**,259 (1998)
- 3) Akira Tachibana et al.: J. Biotech., **93**,165 (2002)
- 4) 筏 義人編：化学フロンティア 「再生医工学」, 化学同人 (2001)
- 5) Mikos A.G. et al.: Polymer, **35**,1068 (1994)
- 6) Wake M.C. et al.: Cell Transplantation, **5**,465 (1996)
- 7) 柴山, 加藤：テキスタイル&ファッション, **18**,10,504 (2000)