

# 剪断応力を用いた配向コラーゲン 線維ゲル製造のための要件

畑山 博哉<sup>\*1)</sup> 柚木 俊二<sup>\*1)</sup> 海老澤 瑞枝<sup>\*2)</sup>  
大藪 淑美<sup>\*1)</sup> 近藤 英司<sup>\*3)</sup> 安田 和則<sup>\*3)</sup>

## Required conditions for the fabrication of collagen gels comprising aligned collagen fibrils using shear stress

Hirosuke Hatayama<sup>\*1)</sup>, Shunji Yunoki<sup>\*1)</sup>, Mizue Ebisawa<sup>\*2)</sup>, Yoshimi Ohyabu<sup>\*1)</sup>,  
Eiji Kondo<sup>\*3)</sup>, Kazunori Yasuda<sup>\*3)</sup>

Shear stress to collagen sols is useful for fabricating aligned collagen fibrils, but the fibrils are thinly deposited on hard substrates and do not form three-dimensional constructs. In this paper, we report required conditions for undestructive production of thick collagen gel constructs comprising uniaxially aligned fibrils. The fabrication method using a rheometer involved application of rotary shearing to dense collagen sols and warming the sols from 23°C to 37°C to trigger gelation upon rotation. When the collagen fibril formation slowly occurred in a neutral phosphate buffer (1×NPB) of which the ionic strength was similar to that of PBS, the shearing during collagen fibril formation resulted in slurry of fibrils (i.e. destructed collagen gel). The acceleration of collagen fibril formation by increased concentrations of NPB allowed for undestructive fabrication of collagen gels between the parallel sensors of the rheometer. The fibril alignment was determined only in 20 s at the early stage of the rapid gelation, producing undestructed collagen gels comprising uniaxially aligned fibrils. In contrast, rotary shearing to dense collagen sols before gelation had little effect on collagen fibril alignment. We have revealed the shearing conditions for creating collagen gels of uniaxially aligned fibrils undestructively: rapid fibril formation during shearing.

**キーワード** : 配向コラーゲン線維, 線維形成, 剪断応力, 細胞足場

**Keywords** : Aligned collagen fibrils, Fibril formation, Shear stress, Cell scaffold

### 1. はじめに

骨や網膜、腱・靭帯等の生体組織を構成するコラーゲン線維は、配向構造を形成することによって特有の生体力学特性を有する<sup>(1),(2)</sup>。例えば、細胞接着の足場となるコラーゲン線維が秩序的に配向して束化した腱・靭帯では、階層構造の空隙に細胞が入り込んで組織を形成することによって、強靱な力学強度を示す。組織工学分野においては、生体構造を模倣した材料を用いることで、組織構造やその力学強度が細胞機能に与える影響を評価することができる。そのため、コラーゲンなどの細胞足場分子を配向させて生体構造を模倣した医療用足場材料の開発が盛んに行われている。

コラーゲンの配向化技術としては、磁場、電場、剪断応力を利用する方法<sup>(3),(4)</sup>が存在する。中でも剪断応力による分子配向技術が、量産性の観点から医療機器の製造方法とし

て最も実用化に近いと考えられる。磁場や電場を用いた方法では、高磁場や高電圧を発生させるため、量産性とスケールアップに制限がある。これまで開発されてきた剪断応力による配向化技術は、コラーゲンの線維化工程において高速剪断を付与し、コラーゲン単線維を基板へ付着させる薄膜作製しかできない<sup>(5),(6)</sup>。

しかし、生体移植マトリクスとして配向コラーゲン線維束を用いる場合、ミリメートルサイズの厚みを有するマトリクスとして製造することが要求される。従来の薄膜作製技術では高速剪断を付与し続けると、基板に付着した以外のコラーゲン線維の立体的構造が破壊される。非破壊的に配向コラーゲン線維束を得るため、従来のコラーゲン線維配向化技術におけるコラーゲン線維化のメカニズムを解明する必要がある。

本報告では、生体内のコラーゲン線維配向構造を模倣したゲル状配向コラーゲン線維束 (CGAF) の作製を目的として、剪断応力の付与によるコラーゲン線維化メカニズムを解明したので報告する。

平成 25 年度 基盤研究

剪断応力によるコラーゲン線維配向技術の開発

\*1) バイオ応用技術グループ

\*2) 先端材料開発セクター

\*3) 北海道大学大学院医学研究科

## 2. 実験方法

**2.1 中性コラーゲン水溶液の調製** ブタ皮膚製コラーゲン溶液（日本ハム製）を原料とし、エバポレーターを用いた減圧濃縮によって2.4%まで濃縮した濃縮コラーゲン溶液を調製した。中性（pH7）のリン酸緩衝液には、塩化ナトリウム 140 mM を含有した 50 mM リン酸水素ナトリウム緩衝液（1×NPB）およびその濃度を高めた  $n \times \text{NPB}$  ( $n \leq 10$ ) を使用した。温度応答性架橋剤であるゲニピン（和光純薬製）を  $n \times \text{NPB}$  に溶解し、濃縮コラーゲン溶液と混合することで  $n \times \text{NPB}$  ( $1 \leq n \leq 3$ ) を溶媒とし、2.5 mM のゲニピンを含む濃度 0.5%~1.8% 中性コラーゲン水溶液を調製した。

**2.2 線維形成反応によるコラーゲンゲルの作製** 動的粘弾性測定装置 HAAKE MARS III（サーモフィッシャーサイエンティフィック製）の平板センサー（ $\phi 60$  mm）に中性コラーゲン水溶液を充填し、温度を 23°C から 37°C まで上昇させたときの動的粘弾性測定（微小振動測定）もしくは回転測定を実施し、センサー間にコラーゲンゲルを作製した。動的粘弾性測定は、剪断応力によるコラーゲン配向化のコントロールとなるゲルの作製手段として行ったほか、コラーゲンの線維化によるゲル化を追跡するために行った。図 1 は動的粘弾性測定から得られる典型的なゲル化曲線を示している。ゲル化曲線は 3 つの状態に分かれる：流動性期、ゲル形成期、およびゲル熟成期。センサー温度が 23°C においては流動性期であるが、23°C から 37°C へと 30 s かけて上昇させると、温度に応答したコラーゲンの線維化が生じてゲル形成期へと移行し、貯蔵弾性率 ( $G'$ ) が上昇する。その後、ゲル化がプラトーに達して  $G'$  が変化しなくなる。

一方、回転測定は、センサー間に充填した中性コラーゲン水溶液に対して回転剪断を付与しながら線維化させ、円盤状のコラーゲン線維ゲルを作製するために行った。このとき、作製工程での剪断応力変化もモニターした。図 1 のようなゲル化曲線を描く中性コラーゲン水溶液に対して、23°C から継続した回転測定を 37°C に到達してからも所定時間継続させ（その時間を  $t_{37}$  と定義する）、その後回転測定を停止して動的粘弾性測定へと移行した。20 min 経過後にセンサーをリフトし、センサー間のサンプルの状態を観察した。円盤状のゲルが形成されていた場合、回収して各種試験に供した。回転測定においては以下の条件を制御した：剪断速度、 $t_{37}$ 、およびセンサーギャップ。

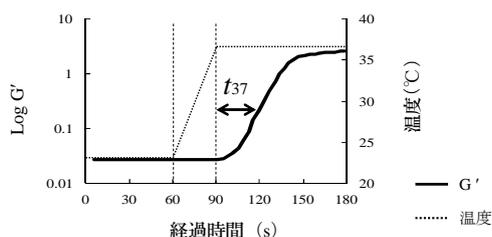


図 1. 温度に応答して生じるコラーゲン線維化の動的粘弾性測定によって得られる典型的なゲル化曲線およびそれをリファレンスとした回転測定での  $t_{37}$

**2.3 コラーゲンゲルの複屈折位相差測定** レーザー光を用いた複屈折位相差測定<sup>7)</sup>により、ゲル中のコラーゲンの線維配向度を評価した。作製した円盤状コラーゲンゲルの外縁部から、長軸方向が剪断ひずみの方向と平行になるように  $7 \times 12$  mm の大きさに切り出したゲルを試験片として二枚のガラス板で挟み込み、偏光子と 1/4 波長板の間に固定した。He-Ne レーザー（633 nm）を照射することで透過光の複屈折位相差を計測した。

**2.4 コラーゲン線維の走査電子顕微鏡観察** 走査電子顕微鏡 Miniscope TM3000（SEM, 日立ハイテクノロジーズ製）を用いて、コラーゲンゲル中のコラーゲン線維の形状を観察した。複屈折位相差と同様に採取したコラーゲンゲル試験片をエタノールで脱水し、その後 t-ブチルアルコール凍結乾燥を行い、金コーティングを施して観察に供した。

**2.5 熱電対によるセンサー実温度の測定** 動的粘弾性測定装置の平板センサーに、熱電対をテープで固定して、センサー間にコラーゲン水溶液が充填されている状態で、装置温度を 23°C から 37°C まで上昇した際のセンサー実温度上昇の時間変化を追跡した。センサーギャップを変えることで 1 mm ならびに 3 mm 厚のコラーゲンゲルを作製した。

## 3. 結果

**3.1 配向したコラーゲン線維ゲルの作製** 動的粘弾性装置を用いた回転測定により、中性コラーゲン水溶液の条件に依存してコラーゲン線維のスラリーもしくはゲルが得られた。過去の湿式紡糸研究ではリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を溶媒とした 0.3%~0.5% コラーゲン水溶液が絮用されていたので、それと類似の条件として 1×NPB を溶媒とした 0.5% コラーゲン水溶液を用いた。コラーゲン水溶液に対して回転剪断 ( $40 \text{ s}^{-1}$ ) を付与し、温度上昇によってコラーゲンの線維化を生じさせたところ、センサー間には円盤状ゲルが形成されずスラリー状のコラーゲンが得られた（図 2a）。コラーゲン濃度を 1.8% まで高めてもゲルは形成されなかった。連続的に付与される剪断ひずみによってゲルの破壊が生じていることが目視で確認できた。回転剪断によって破壊されたスラリー中には、0.5% コラーゲン水溶液では観察されなかったマクロな繊維状凝集体が観察され（図 2b）、凝集体中には一部配向したコラーゲン線維が観察された（図 2c）。そこで、以後の実験では 1.8% の中性コラーゲン水溶液を用いた。

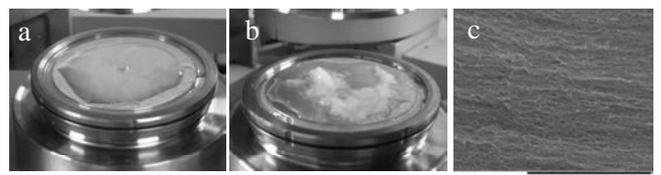


図 2. コラーゲン線維の配向

(a) スラリー状の 0.5% コラーゲン, (b) マクロな線維凝集体 (1.8% コラーゲン), (c) 局所的に配向した線維構造

短時間で線維化を完了させてゲルの破壊を防ぐため、溶媒の NPB 濃度を増加させ、温度応答性のコラーゲン線維化を加速させた。濃度を増加した NPB を溶媒とした中性コ

ラーゲン水溶液の動的粘弾性測定により得られたゲル化曲線を図 3 に示す。コラーゲン線維化の温度応答性が NPB 濃度に依存して高められた。溶媒が 2.25×NPB の時, 37°C 到達後に急速なゲル化を示し,  $t_{37}$  が 90 s に達する前に  $G'$  が  $10^3$  Pa を超えた。そこで, 2.25×NPB を溶媒とした 1.8% コラーゲン水溶液に対して回転測定を行ったところ, センサー間にはセンサーと同型の円盤状コラーゲングルが非破壊的に作製され (図 4a), ゲルの外縁部から矩形状の試験片を採取することができた (図 4b)。これ以降の実験では, コラーゲングルを作製するための中性コラーゲン水溶液として, 溶媒が 2.25×NPB で 2.5 mM のゲニピンを含有した 1.8% コラーゲン水溶液を用いた。

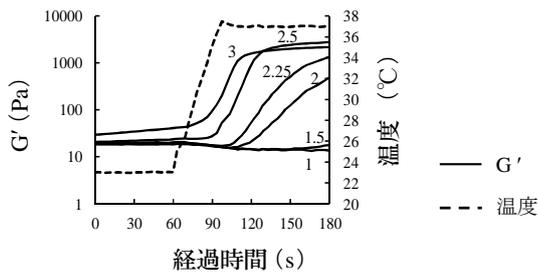


図 3. 動的粘弾性測定によって得られた, 溶媒の NPB 濃度を変えたコラーゲン水溶液の温度応答性ゲル化曲線

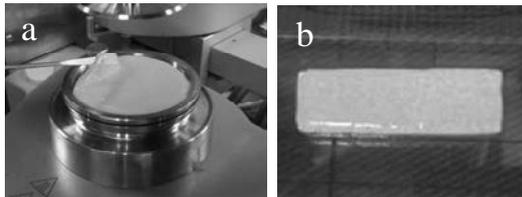


図 4. コラーゲングルの概観  
(a) 回転測定によって得られた円盤状コラーゲングル, (b) その外縁部から採取した矩形状の試験片

**3.2 配向コラーゲン線維ゲルの配向度及ぼす剪断条件の影響** 配向したコラーゲングル作製用として選定された中性コラーゲン水溶液を用いて, センサーギャップを 1 mm に固定し, 剪断速度と  $t_{37}$  を変えた回転測定によりコラーゲングルを作製した。線維化開始の直前に回転剪断が停止するように  $t_{37}$  を 0 s に設定し, 剪断速度を変えて得られたゲルの複屈折位相差を図 5a に示す。剪断速度 2~100  $s^{-1}$  の範囲で変化させても, 対象サンプルの複屈折位相差 ( $2^\circ$ ) より高い値が得られたものの  $30^\circ$  前後に留まった。一方,  $t_{37}$  を 20 s に設定して剪断速度を変化させたところ, 剪断速度とゲル内部の線維配向度を表す複屈折位相差のプロットは 2~5  $s^{-1}$  を極大域とする凸型となった (図 5b)。以後, コラーゲン線維の配向度を高めるための適切な剪断速度を 2  $s^{-1}$  とした。

剪断速度を 2  $s^{-1}$  とした回転測定において配向化がどの時点で生じているかを明らかにするため,  $t_{37}$  を変えてゲルを作製した場合の複屈折位相差を求めた (図 6)。  $t_{37}$  の増加につれて複屈折位相差が増加し,  $t_{37} = 20$  s で複屈折位相差はほぼプラトーに達した (図 6a)。図 6b は回転時間を  $t_{37} = 50$  s

まで継続した場合の応力をモニターした結果を示している。複屈折位相差がほぼプラトーに達した  $t_{37} = 20$  s で剪断応力が極大値を示し, その後は経時的に減少を続けた。センサーがゲル表面でスリップを起こしていることが目視で確認できた。

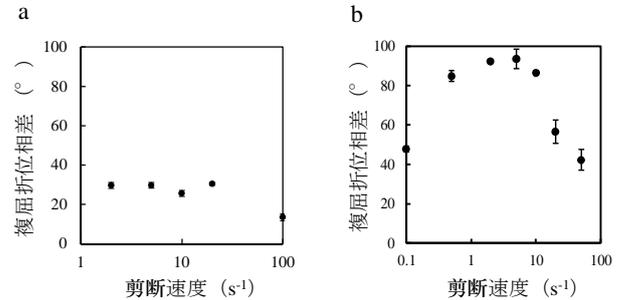


図 5. コラーゲン線維配向に及ぼす回転剪断速度の影響  
(a)  $t_{37} = 0$  s (流動性期), (b)  $t_{37} = 20$  s (ゲル形成期)

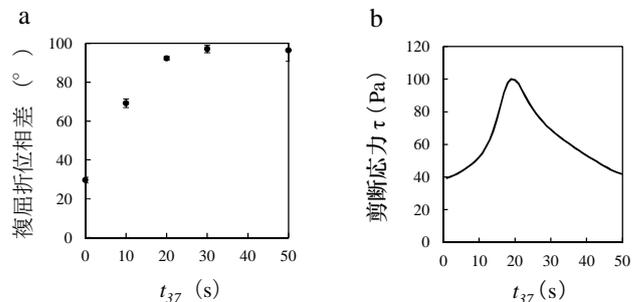


図 6.  $t_{37}$  がコラーゲン線維配向に及ぼす影響  
(a)  $t_{37}$  の増加に伴う複屈折位相差の変化,  
(b)  $t_{37}$  の増加に伴う剪断応力の変化 (剪断速度 2  $s^{-1}$ )

**3.3 配向コラーゲン線維ゲルの配向メカニズム** 回転剪断下でのコラーゲン線維配向過程を明らかにするため,  $t_{37}$  を変えた 2 mm 厚の配向コラーゲングルを作製し, ゲルの横断面の下部, 中部, および上部の SEM 観察を行った (図 7)。全層にわたり無秩序な線維構造を示すコントロール試料と比べ,  $t_{37} = 0$  s において下部にわずかな配向が認められた。  $t_{37}$  が増加するに従って内部の線維配向が促進されるとともに下部側から上部側へと移行した,  $t_{37} = 40$  s でゲル内部の線維は全層配向した。ここに CGAF (collagen gels comprising unialigned fibrils) が作製された。

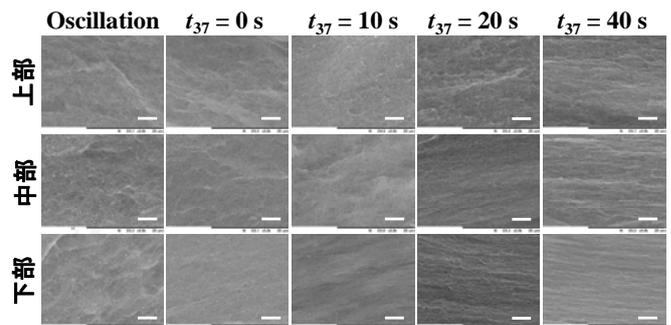


図 7. ゲル内部の線維配向構造の様子

**3.4 センサー間の実温度差が線維化に与える影響** 動的粘弾性測定時の上下センサーの温度上昇の時間変化を図8に示す。センサー間距離を1 mm から3 mm に拡大してゲルをスケールアップする場合、ゲルの下部から上部にかけて温度上昇速度に遅延が生じた(図8a)。図8bは、温度センサーが37°Cに到達した時の上下プレート表面の実温度の温度差を、上下センサー間距離に対してプロットした図である。センサー間距離が1 mm の時には2°Cであった温度差が、3 mm 厚のゲルでは約9°Cまで増大した。

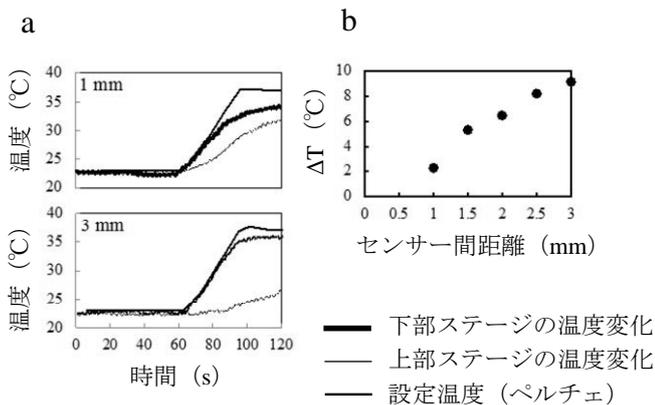


図8. 動的粘弾性装置でコラーゲン水溶液を加温してゲル化させた場合の上下センサーの温度プロファイル

(a) センサーギャップ1 mm、または3 mm に固定して作製したゲルの線維化時の温度プロファイル、(b) ゲルの厚みに対する上下センサー間の温度差

#### 4. 考察

我々は、剪断付与下におけるコラーゲン線維配向化のメカニズムを解明し、生体内コラーゲン線維配向を模倣した立体的なCGAFの作製に成功した。CGAFの厚さを2 mmまで増大させた時の線維配向を確認し、硬質基板へ薄膜サンプルを付着させるに留まっていた従来の剪断配向化技術にブレークスルーをもたらした。

配向化メカニズムの検証のためには非破壊的にCGAFを作製する条件が必要であり、その条件とは“高濃度なコラーゲン”と“加速された線維化”の二条件であることを明らかにした。特に重要な条件は線維化の加速であり<sup>(8)</sup>、数十秒という短時間で線維化によるゲル化が完了するため、連続的に剪断を付与しても、破壊を生じずにゲル化を完了させることができた。この場合、ゲル化の完了に伴いセンサーがスリップを開始し、回転剪断が破壊的に作用することはなかった。これに対し、コラーゲン研究で繁用されるPBSに近似した溶媒を用いた場合、生じるコラーゲンの線維化は遅く、連続的に付与される剪断応力がコラーゲン線維ネットワークの形成を許さずに破壊的に作用することがわかった。

回転剪断によるCGAFの作製において、コラーゲン線維の配向化はどの時点で生じていたのであろうか。 $t_{37}$ を制御した実験により、線維化が開始した直後(動的粘弾性装置の温度が37°Cに達してからわずか20秒)に配向化が決定付けられることがわかった。この事実は、従来の研究で示唆されていた“高速剪断によって配向したコラーゲン分子がそのまま配向線維化へと移行する”というモデル<sup>(5)</sup>と合致しない。事実、動的粘弾性装置の温度が37°Cに達する前に回

転剪断を停止すると、コラーゲン線維の配向は促進されなかった。線維化した、あるいはしつつあるコラーゲンに対する作用の結果としてコラーゲンの配向化が生じていた。

作用させる適切な剪断速度に関しても、過去の研究から推定された値とかけ離れていた。マイクロ流路やスピノコーターを用いたコラーゲン線維の剪断配向化は、数100~数1000  $s^{-1}$ の剪断速度で行われた<sup>(6,9)</sup>。一方、本研究の最適な剪断速度はわずか2~5  $s^{-1}$ であり、異なるメカニズムで線維配向が生じていると考えられる。また、このように低い剪断速度で線維が配向したという結果は、シリンジポンプ等の汎用の押し出し装置を用いた円筒形状の連続紡糸へと応用できる可能性を示唆している。配向度と剪断速度のプロットが凸型となった理由としては、低剪断速度域では線維化完了までの変位の不足が、高剪断速度域では乱流の発生が推察された。

ここで、回転は上部プレート、加温は下部プレートに担わせる回転測定を用いた配向化が均一に生じるのか、あるいは不均一に生じるのかの疑問が生じる。この疑問を解消するため、我々はセンサーギャップを2 mmまで拡大し、得られるゲルの断面の線維構造を経時的に追跡する実験を行った。加温される下部プレートに近いほど線維の配向化が早い時期に生じる様子が確認されたことから、線維形成中のコラーゲンが剪断応力を受け、配向化が温度の伝導に沿って厚み方向へと逐次的に促進されることが分かった。従来技術では、コラーゲンモノマーが高速剪断によって一軸に並び、やがて長時間かけて線維化することでコラーゲン線維ゲルが形成すると考えられてきたが、本研究におけるコラーゲン線維の配向化メカニズムは、これまでの配向化技術とは異なるメカニズムで進行することがわかった。

このように線維形成が段階的に生じて形成したCGAFは、粘弾性装置の上下プレート間距離を拡大することによって3 mm厚までスケールアップが可能となる。しかし、上下センサー間の温度ギャップが拡大すると、いずれは線維化が完了した部分とまだまだ流動性を保った部分がセンサーギャップ内に生じる。このような状態で流動性部分に剪断応力を加えると、線維化の完了した部分にも応力が加わり破壊的に作用するため、全層配向したCGAFの非破壊的な作製には厚みに限界が存在すると予想される。

本研究のCGAF作製技術は、配向コラーゲン線維を立体的なゲルの状態で作製できるため、多孔質体やフィルムなどの成型体への加工が容易となる利点がある。剪断応力を付与できればどのような形状へも応用できるため、例えば金属管やTダイからの連続押し出しも可能である。

#### 5. まとめ

剪断付与下におけるコラーゲン線維化のメカニズムを解明し、生体内のコラーゲン線維が配向した構造を模倣したCGAFの作製法を確立した。作製したCGAFは、生体腱の一次構造を模倣した構造を有していた。今後は配向構造を階層化させることにより、腱のコラーゲン階層構造を模倣した人工腱マトリクス等の医療材料開発へと展開する。なお、本研究の詳細は引用文献<sup>(10)</sup>に記述されている。

謝辞

本研究の一部は, 科学研究費補助金 (課題番号: 24500534) の支援を受けて実施した。

(平成 28 年 7 月 13 日受付, 平成 28 年 7 月 27 日再受付)

文 献

- (1) 岩指仁, 坂根正孝, 堀田裕司, 他, 配向連通孔を有するハイドロキシアパタイト他抗体の骨伝導能, 日整会誌, 80, S937 (2006)
- (2) Silver F H, Freeman J W, Seehra G P: "Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties", *J Biomech*, 36, pp.1529-53 (2003)
- (3) Guo C, Kaufman L J: "Flow and magnetic field induced collagen Alignment", *Biomaterials*, 28, pp.1105-14 (2007)
- (4) Cheng X, Gurkan U A, Dehen C J, Tate M P, Hillhouse H W, Simpson G J, Akkus O: "An electrochemical fabrication process for the assembly of anisotropically oriented collagen bundles", *Biomaterials*, 29, pp.3278-88 (2008)
- (5) Lanfer B, Freudenberg U, Zimmermann R, Stamov D, Körber V, Werner C: "Aligned fibrillar collagen matrices obtained by shear flow Deposition", *Biomaterials*, 29, pp.3888-3895 (2008)
- (6) Saeidi N, Sander E, Zareian R, Ruberti J W: "Production of highly aligned collagen lamellae by combining shear force and thin film confinement", *Acta Biomater*, 7, pp.2437-2447 (2011)
- (7) 海老澤瑞枝, 結晶性生体吸収材料の光学的特性の計測, 電気学会論文誌 A (基礎・材料・共通部門誌), 132, 6, pp.458-459 (2012)
- (8) S. Yunoki, Y. Ohyabu, H. Hatayama: "Temperature-responsive gelation of type I collagen solutions involving fibril formation and genipin crosslinking as a potential injectable hydrogel", *Int J Biomater.*, article ID. 620765 (2013)
- (9) Saeidi N, Sander E A, Ruberti J W: "Dynamic shear-influenced collagen self-assembly", *Biomaterials*, 30, pp.6581-6592 (2009)
- (10) S. Yunoki, H. Hatayama, M. Ebisawa, E. Kondo, K. Yasuda: "A novel fabrication method to create a thick collagen bundle composed of uniaxially aligned fibrils: An essential technology for the development of artificial tendon/ligament matrices", *J Biomed Mater Res A.*, 103A, 9, pp.3054-3065 (2015)