

< 研究課題名 >

筒状金型によるコラーゲン線維束の整列技術

北海道大学 / 柚木俊二

1. はじめに

膝前十字靭帯 (ACL) は主にスポーツ活動で損傷し、断裂により著しい膝不安定性を呈する。ACL は自然治癒能力が低いために、膝屈筋腱等から採取された自家腱組織の移植による再建術が標準的治療法となっているが患者への侵襲性など種々の問題があり、“自家腱と同様の機能および力学的特性”を有する人工腱が待望されている。

生体腱は直径約 20 μm のコラーゲンファイバーが階層的に束となった構造体であるため (図1)、コラーゲン線維が一軸配向したファイバーを最小構造単位とした強靱な束が、コラーゲン人工腱として最も有望と考えられている。その構造要素となる配向コラーゲンマイクロファイバー (MF) を連続成型する技術としては、長年にわたり湿式紡糸技術が研究されてきたが [1]、線維配向は MF 表層のみに生じ、微細化と製造速度の観点からも十分でなかった [2]。このため、1980 年代に開始されたコラーゲン人工腱の開発は停滞している。

我々は先行研究で、円筒金型内でコラーゲンを線維化させながら紐状ゲルを連続成型する技術を開発した [3]。得られる MF の微細化と紡糸速度が不十分であったが、糸が形成される過程で中性コラーゲン水溶液ゲル化させるコンセプトは有望であり、コラーゲン水溶液の線維化 (ゲル化) をさらに速め、円筒金型を適切に設計することが課題であった。

2. 目的

そこで本研究では、まずコラーゲン水溶液の線維化を最大限に加速する条件を見出す。次に、精密設計したノズル状金型を試作し、微細な線維配向コラーゲン MF の連続成型技術を開発する。

3. 実用的な価値、実用化の見込など

(1) コラーゲン濃度と緩衝液のイオン強度を変数とした中性コラーゲン水溶液の線維化速度の相図を完成させた。この相図をもとに、線維化を最大限に速めることも、線維化しない条件を見出すことも可能であり、コラーゲン分子の線維化を活用するあらゆるバイオマテリアルデザインの指標となる。学会活動を通し、バイオマテリアル分野へと本知見を周知する。

(2) 本技術によりコラーゲン MF の工業化が可能になると考えられ、令和6年度から企業とのマッチング活動を進める。延伸紡糸技術の製造速度 (線速度) は 171 m/h に達し、得られるコラーゲン MF の直径は 20 μm に近似し、乾燥状態のヤング率は従来研究のチャンピオンデータと同等であった。

(3) 本技術により得られたコラーゲン MF を束化することにより、ヒト ACL に近似した力学特性の実現が可能になった。人工腱の開発を共同で進める企業とのマッチング活動を令和6年度から進める。

-----【達成目標と達成状況】-----

研究計画書で掲げた達成目標 (1) ~ (4) と達成度をまとめた。

(1) 高濃度コラーゲンゾルの特性評価

達成目標: 中性の緩衝液を溶媒としたコラーゲンゾルの諸特性を明らかにする。具体的には、①分子状態を保てる限界濃度の決定、②紡糸時温度における分子分散状態の保持時間の決定、および③コレステリック液晶を形成する濃度閾値の決定。

達成度: 100%

補足: コレステリック液晶は形成されていないと考えられた。

(2) コラーゲン MF 成型条件の決定

達成目標: 回転型レオメーターのズリ流動を用いて、ノズル内で線維化させるための流動条件 (ギャップ、せん断速度、温度) を決定する。その条件をノズル金型の円筒内流動へと換算し、金型設計へと展開する。

達成度: 100%

補足: コラーゲン濃度を限界まで高くしたことにより、高せん断速度域でダイスウェル効果が顕在化するという制限が生じることが判明した。

(3) ノズル金型の試作

達成目標: 研究項目 (2) で明らかにしたコラーゲンゾルの最適流動条件を踏まえ、ペルチェ加熱プレート、アルミブロック、およびステンレスノズルを複合化したマイクロノズル金型 (図2) を試作する。

達成度: 100%

(4) コラーゲン MF の連続成型と構造・物性評価

達成目標: 線維整列性および力学特性の両方において生体腱に比肩するコラーゲン MF を創製する。再水和後の屈折率差 7.0×10^{-4} 以上、乾燥状態でのヤング率 4 GPa 以上を目標とする。

達成度: 100%

補足: 大気中の紡糸は実現できなかったが、エタノール凝固浴を用いた新規紡糸技術を実現した。

4. 研究内容の詳細

4-1. 高濃度コラーゲンゾルの特性評価

【方法】

①分子状態を保てる限界濃度

エバポレーターで濃縮した酸性コラーゲンに対し、濃縮リン酸緩衝液 ($n \times \text{NPB}$; $1 \times \text{NPB}$ は食塩を 140mM 含有した pH 7 の 50 mM リン酸 Na 緩衝液を示す)を加えて均一化し、遠心分離機にて脱泡した。濃度を 1.0~7.0%の範囲で変化させた中性コラーゲン水溶液を得た。この操作は 10°Cを超えないように行った。透明性(可視光透過性)と電子顕微鏡によるモルフォロジー観察により、中性下で分子状態を保てる限界コラーゲン濃度を明らかにするとともに、レオメーターで線維化速度を定量した。線維化開始温度を T_{ini} [°C]、線維化開始時間を $Time-g$ [min]と定義した。コラーゲンの走査型顕微鏡(SEM)観察は、グルタルアルデヒドでコラーゲンを固定化した後、エタノールによる段階的脱水と t-ブタノール凍結乾燥を経た乾燥試料に対して行った。観察には SU8230 顕微鏡(日立ハイテクノロジー製)を用い、加速電圧は 2~3 kV とした。

②紡糸時温度での安定性の評価

レオメーターを用いた動的粘弾性測定を一定温度(10°C、15°C、20°C)で行い、粘弾性に変化を生じない時間を確定した。

【結果】

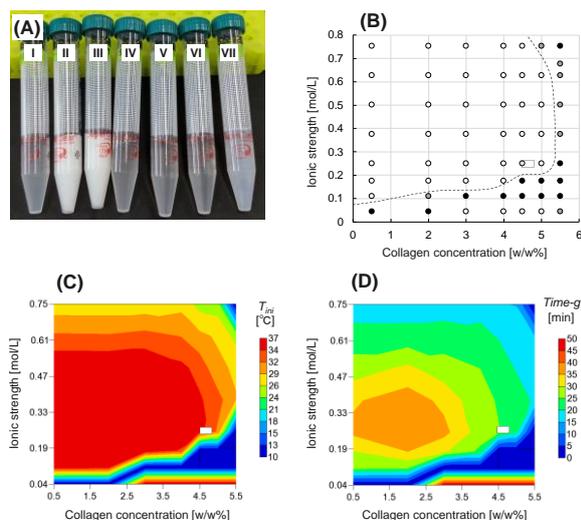


図1. 臨界線維形成濃度(CFC)の評価.

(A) 5.0w/w%中性コラーゲン水溶液の外観. イオン強度 0.0444 M (I)、0.111 M (II)、0.176 M (III)、0.251 M (IV)、0.377 M (V)、0.502 M (VI)、および 0.753 M (VII).

(B) 中和されたコラーゲン水溶液および懸濁液の外観から得られた定性的な CFC マップ. 白円: 無色でほぼ透明; 黒円: 白濁; 灰色円: 半透明. 図中の破線は予想される CFC を示す. CFC 近傍の白抜き長方形は、紡糸実験で使用された水溶液を示す. (C および D) コラーゲン濃度およびイオン強度の関数としての T_{ini} (C)および $Time-g$ (D)の 2D マップ(D).

さまざまなコラーゲン濃度とイオン強度を持つ一連の中和コラーゲン水溶液の外観を観察して、温度 < 10°C でコラーゲン分子が安定する溶液条件を

決定した。一連の 5.0 w/w% 中性コラーゲン水溶液 (図 1A) の外観からわかる通り、中性コラーゲン水溶液 (コラーゲン濃度: 0.5 w/w%~5.5 w/w%、イオン強度: 0.0444~0.753 M) は無色透明に近いもの、白濁したもの、および中間のもの 3 種類に分類された。白濁した溶液の形態の SEM 観察結果から、白濁はコラーゲン線維であると確認された。一方、無色に近い透明な溶液ではそのようなナノ構造は見られなかった(データは示さない)。従って、本研究では、白濁した水溶液を「コラーゲン(線維)懸濁液」と呼称し、コラーゲン水溶液と区別する。濁度に対するコラーゲン濃度とイオン強度の影響を、2D マッピングを使用して示した(図 1B)。コラーゲン濃度が増加すると、コラーゲン溶液は白濁した懸濁液になる傾向があり、中性コラーゲン水溶液中のコラーゲンが線維化せずに存在できる限界濃度(臨界線維化濃度(CFC)と呼称)がイオン強度に依存していることが明らかになった。予想される CFC を図 1B の破線で示した。

中性コラーゲン溶液の T_{ini} および $Time-g$ をレオロジー測定により決定し、さまざまな条件の水溶液における線維形成を評価するための 2D マッピングに反映させた(図 2C および 2D)。 T_{ini} は、イオン強度が 0.1~0.6 M、コラーゲン濃度が 4.5 w/w%未満の場合に高くなる傾向を示し、低イオン強度範囲では低 T_{ini} ($\leq 10^\circ\text{C}$)の帯状域が横軸方向に沿って伸びていた(図 2C)。 T_{ini} が急激に変化する斜面が帯状域に沿って観察された。同様の果が $Time-g$ についても得られた(図 2D)。

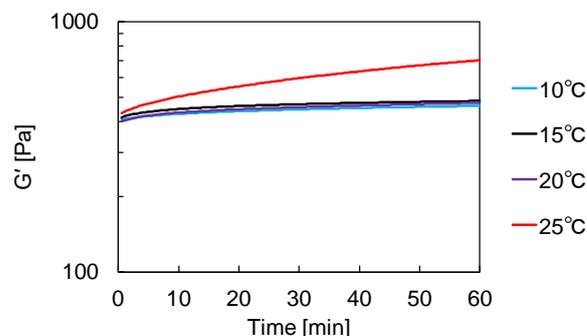


図2. CFC 近傍濃度の中性コラーゲン水溶液の安定性評価結果.

4.5 w/w%中性コラーゲン水溶液の所定温度での動的粘弾性測定を行い、貯蔵弾性率(G')を追跡した. 図中の温度は装置温度を示す.

イオン強度 0.251 M の中性コラーゲン溶液(4.5 w/w%)の動的粘弾性測定結果を図2に示す. 装置温度が 10°C~20°Cの範囲において、中性コラーゲン水溶液の G' は 60 min の計測時間を通してほとんど変化しなかった。一方、装置温度が 25°Cになると時間依存的な増加を示した。

【考察】

中性コラーゲン溶液の濃度とイオン強度を広域に変化させた場合、特徴的な相図が顕在化した(図1)。コラーゲンマテリアル開発で用いられる線維化は、コラーゲン濃度 ≤ 1.0 w/w%, イオン強度は約 0.17 (PBS のイオン強度)で行われることがほとんどあり、その条件は、図1の相図によればコラーゲンの線維化が最も遅い条件となる。細胞を包埋する等、低温で線維化させない用途にとって有効であるが、コラーゲン水溶液の調製時において線維化を抑え、かつ温度上昇による線維化を速める条件が見出された点で、この相図はバイオマテリアル工学的に価値がある。本研究では、図1B~D に白い長方形で示した領域の中性コラーゲン水溶液を紡糸実験に用いることにした。コラーゲン濃度が CFC 近傍であるため、わずかの脱水により濃度が CFC を超え、温度によらず直ちに線維化が生じると推察されたことが、その理由である。ここで、「脱水」とは紡糸時の風乾もしくはエタノール脱水を意味する。

4-2. コラーゲン MF 成型条件の決定と金型試作

【方法】

①回転型レオメーターを用いたズリ流動実験

申請者らが先行研究で確立した方法[3]を用いて、回転型レオメーターのズリ流動からノズル金型の円筒内流動条件を求めた。氷冷した中性コラーゲン水溶液(濃度 4.5 w/w%)をレオメーターに設置し、一定のギャップ r [mm]およびせん断速度 $\dot{\gamma}$ [s^{-1}]でズリ流動を与えた。温度を 10°Cから 37°Cへとジャンプさせ、線維化とゲル化が生じることによるセンサーとゲルのスリップ(せん断応力のピークが観察される)を計測した。温度が所定温度に到達してからせん断応力のピークに至るまでの時間を、fibril 形成時間 t_{max} [s]とした。ノズル金型の流路断面の半径を r [mm]、ノズルへ導入するコラーゲンゾルの流速を Q [$mm^3 s^{-1}$]とすると、ノズル内流動のせん断速度をズリせん断速度 $\dot{\gamma}$ と等しくする場合、ノズルへ導入するコラーゲンゾルの流速 Q との関係は式(A)で表すことができる:

$$\dot{\gamma} [s^{-1}] = 4Q / \pi r^3 \quad (A)$$

ノズル金型の流路距離 L とせん断時間 t_a は比例関係にあり、ノズルからコラーゲンが吐出される前に流路内で fibril 形成が十分に完了している必要がある。その安全率を 2 とすると、fibril 形成時間 t_{max} を用いて流路距離 L とせん断時間 t_a を式(B)より設定することができる:

$$t_a [s] = \pi r 2L / Q > 2 \times t_{max} \quad (B)$$

②金型の試作

シリンジポンプに設置したシリンジ先端の円筒金型(針)を加温できる、ペルチェ温調プレートに接合する金型を試作した。

【結果】

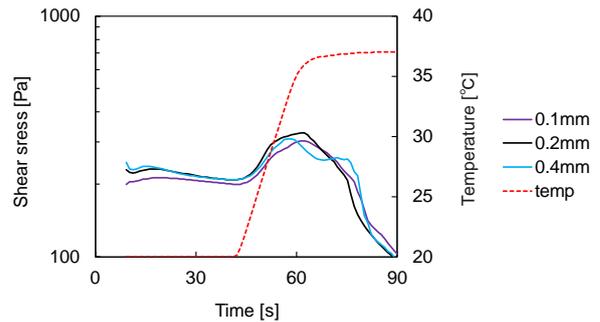


図3. t_{max} を決定するためのレオロジーチャート。図中の赤い破線は装置温度を、曲線はせん断応力を示す。各せん断応力は、センサーギャップ [mm]を変えて測定された。

レオロジー試験により、センサーギャップ(円筒金型の半径に対応)によらず t_{max} は 16~19 s の範囲となった。せん断速度 1000 s^{-1} を与えると仮定すると、式(A)および(B)より適切な円筒金型の長さは 19 mm と算出された。そこで、20 mm の円筒金型(30G: $\phi 184 \mu m$)を試作した。試作した金型の概要を図4に示す。

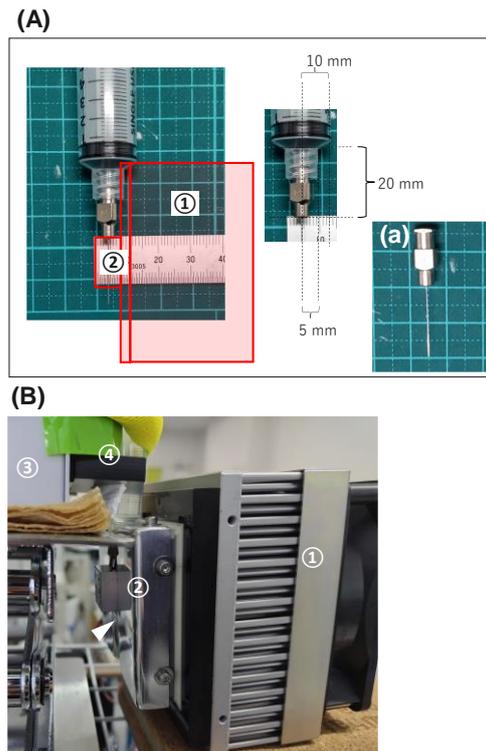


図4. ノズル金型の概要。

(A) ノズル金型の簡易図面。①、ペルチェ温調プレート；②、温調プレートに接合させる金型。金型を構成する円筒金型(針)をサブ写真 a に示す。

(B) ノズル金型を用いた大気中コラーゲン紡糸時の構成：①、同上；②、同上；③、シリンジポンプ；④、コラーゲン充填シリンジ。

【考察】

CFC 近傍濃度の中性コラーゲン水溶液は、10°C

から 37°C への温度上昇の過程ですでに線維化を開始した(図3)。センサーギャップ値は t_{max} へほとんど影響を与えなかったことから、直径が 1 mm 未満の円筒金型を用いる場合、金型のサイズによる熱伝導の遅れに配慮する必要性は低く、コラーゲン水溶液が持つ線維化能を高めることが重要であることが示唆された。決定された t_{max} をもとに、長さ 20 mm の円筒金型をデザインし、それを加温するための加温システムを設計・作製することができた(図4)。

4-3. 大気中でのコラーゲン MF の連続成型と構造・物性

【方法】

図4Bの構成にて、4.5 w/w% の中性コラーゲン水溶液をせん断速度 100~1,000 s^{-1} の範囲で待機中へ押し出した。金型温度は 37°C に設定した。

【結果と考察】

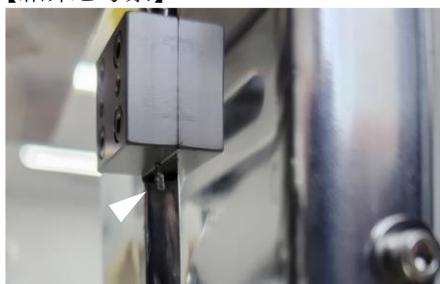


図5. 円筒金型を用いたコラーゲンの大気中紡糸の様子。

図中の矢印は張力により丸まったコラーゲンゲル。

金型設計および線維化条件から予想された通り、円筒金型の先端からは線維化して白濁したコラーゲンが吐出された。しかし、コラーゲン濃度の上限が 4.5 w/w% (水が 95.5 w/w%) であったため、風乾する前に自重により断裂した。あるいは、張力により塊状となった。大気中の紡糸を実現するには、大幅に高いコラーゲン濃度が必要と考えられた。そこで、コラーゲン水溶液に対する脱水効果が期待でき、コラーゲンを変性させない溶媒としてエタノールを選択し、エタノール浴中での紡糸を行うこととした。

4-4. エタノール浴中でのコラーゲン MF の連続成型と構造・物性

【方法】

図6の紡糸装置を作製した。円筒金型および中性コラーゲン水溶液は前項実験と同じものを用いた。エタノール浴に吐出されたコラーゲン水溶液が脱水・凝固(線維化)する過程で延伸されることを特徴としている。押し出し時の線速度を V_e 、巻き取り線速度を V_w とし、 V_w/V_e を変化させた。MF の断面を SEM で観察し、ImageJ で求めた断面積から延伸倍率を求めるとともに、MF の断面形状が真円と仮定したときの直径(計算ファイバー径: d_{cal})を算出し

た。内部の線維配向は透過型電子顕微鏡(TEM)で観察した。

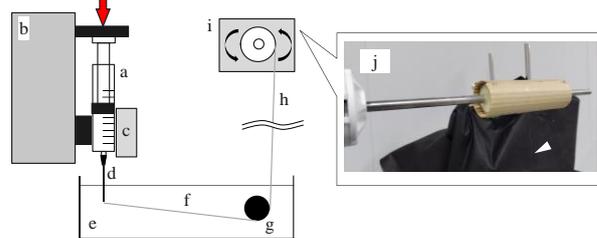


図5. エタノール浴中でのコラーゲン MF 連続成型装置の模式図。

10cc シリンジに充填された 4.5 w/w% コラーゲン水溶液(a)を高トルクシリンジポンプ(b)で赤矢印方向へ押し出した。コラーゲン水溶液の温度を 13°C 未満に保つため、シリンジにはペルチェクーラー(c)を常時接触させた。サイズ 30G の円筒金型(d)を經由して吐出されたコラーゲン水溶液は 90% エタノール浴(e)に吐出された。凝固により形成された細い紐状コラーゲンゲル(f)はテフロン製ロッド(g)を介して鉛直方向へ方向転換され(h)、自動巻き取り機(i)でスプールへと巻き取った。(j)はスプールの写真で、白矢印は乾燥して巻き取られる過程のコラーゲン MF を示す。

【結果】

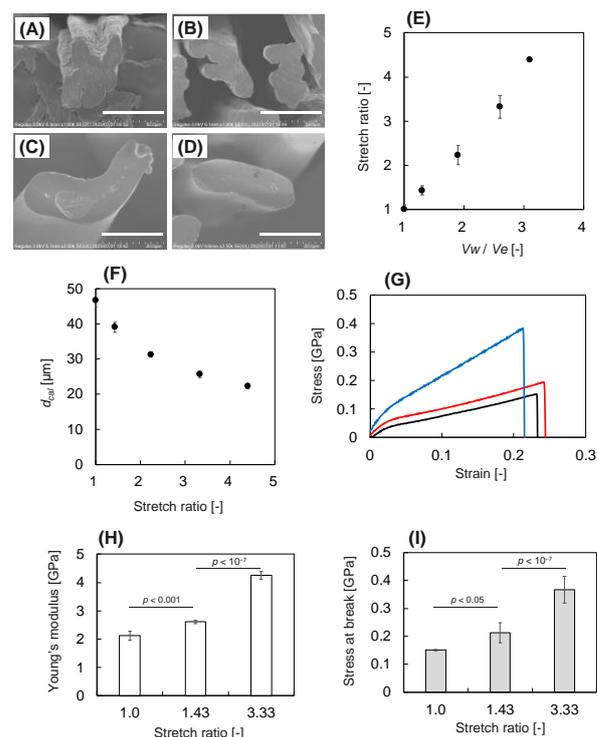


図6. 延伸紡糸により得られたコラーゲン MF の構造と力学特性。

(A-D) $V_w/V_e = 0.9$ (A)、1.3 (B)、2.6 (C)、および 3.1 (D) で製造されたマイクロファイバー断面の SEM 像。図 A および B のスケールバーは 50 μm 、図 C および D のスケールバーは 20 μm を示す。(E) 延伸倍率と V_w/V_e の関係。延伸倍率は MF 断面積から求めた。(F) 計算 MF 直径(d_{cal})と延伸倍率の関係。(G) 延伸倍率 1.0(黒線)、1.43(赤線)、および 3.33(青線)で紡糸された乾燥コラーゲン MF の代表的な応力-ひずみ曲

線。(H および I) 乾燥コラーゲン MF の引張特性に対する延伸倍率の影響: ヤング率(H)および破断応力(I)。データは平均値±標準偏差(n = 5)として示す。

・コラーゲンMFの形態と力学特性

押し出された紐状コラーゲングルの延伸性を評価するために、巻き取り速度を段階的に上げながら延伸紡糸実験を行った。固定した押出条件(30G円筒金型、せん断速度 $1,000 \text{ s}^{-1}$)における紐状コラーゲンの形成速度は、円柱状スプール(直径 35 mm)を 10 rpm で巻き取る速度と一致したため、実際の V_e は 18 mm s^{-1} と見積もられた。そこで、巻き取り回転速度 9 rpm で未延伸コラーゲン MF(延伸倍率 1.0)を製造した。図5J は、 $V_w/V_e=2.6$ で自動的に巻き取られる乾燥 MF の様子を撮影した写真である。ほとんど目視できないほど細い MF が巻き取られ、未延伸 MF には見られない光沢を示した。MF の横断面 SEM 像から、 V_w/V_e が 1.0 から 3.1 に増加するにつれてファイバー径が細くなり、断面形状が歪んだ状態から楕円形へと変化することがわかった(図6A~6D)。断面積から求められた延伸倍率は V_w/V_e に比例した(図6E)。 $V_w/V_e=3.1$ まで増加すると延伸倍率は 4.39 ± 0.25 に達した。この範囲の延伸倍率での d_{cal} は、 $46.7 \pm 1.9 \text{ }\mu\text{m}$ から $22.3 \pm 0.7 \text{ }\mu\text{m}$ に減少した(図6F)。延伸紡糸では V_w/V_e が 3.1 に達すると、紡糸中の MF が頻繁に断裂した。従って、以降の実験では高延伸条件として $V_w/V_e=2.6$ (延伸倍率 3.33)で紡糸を実施した。この条件で MF 製造の線速度は 171 m h^{-1} となった。

・コラーゲンMFの力学特性

延伸倍率 1.0、1.43、および 3.33 で紡糸された乾燥コラーゲンMFの代表的な応力-ひずみ曲線を図6G に示す。延伸倍率が増加するにつれて降伏点は不明瞭になる傾向が見られたが、延伸倍率 3.33 で紡糸されたMFは依然として弾性領域と可塑性領域を示した。図6H および6I は、延伸コラーゲンMFの引っ張り特性を延伸比の関数として示した図である。延伸された MF のヤング率は伸長率とともに増加した(図6H)。延伸倍率 3.33 で得られたヤング率($4.26 \pm 0.13 \text{ GPa}$)は未延伸条件で得られた値($2.12 \pm 0.16 \text{ GPa}$)の約 2 倍となった。破断応力についても同様の結果が得られ、延伸倍率 3.33 の場合は $0.367 \pm 0.048 \text{ GPa}$ 、未延伸の場合は $0.150 \pm 0.003 \text{ GPa}$ となった。

・延伸MFの内部線維配向

延伸コラーゲンMF(延伸倍率 3.33)の縦断面を TEM で観察し、内部フィブリルの整列を評価した(図7)。ファイバー軸方向に整列した線維がMFの表面から内部まで均一かつ明確に観察された。

【考察】

延伸紡糸は、従来の湿式紡糸の課題であった低

い線維整列性と太いファイバー径を解決するとともに、紡糸速度も飛躍的に高くなる効果を示した。ノズルからエタノール浴に押し出され、流動状態から紐状ゲルへと移行するコラーゲンは、 V_w/V_e 比が 1 を超えるとエタノール浴中で伸長される。このプロセスは、熔融した熱可塑性樹脂が熔融紡糸中に固化する熔融紡糸に近似している。延伸倍率を変えることでMFの直径をコントロールでき(図6Eおよび6F)、さらに生産性も向上し(V_w/V_e 比 2.6 で最大 171 m/h)、乾燥 MF の力学特性も向上した。ヤング率は 4 GPa を超え、湿式紡糸法のチャンピオンデータ[4]に比肩した。CFC 溶液が示す即時線維形成能と高粘性が延伸紡糸の実現に寄与したと考えられた。私の知る限り、連続的紡糸技術によって生成されたコラーゲン MF が表面だけでなく中心部にも一軸に整列した線維を有することを初めて実証した研究成果である(図7)。従来の湿式紡糸 MF は、フィブリルの整列性を高めるためにバッチ式で張力下で乾燥またはアニールする必要があった[5]。

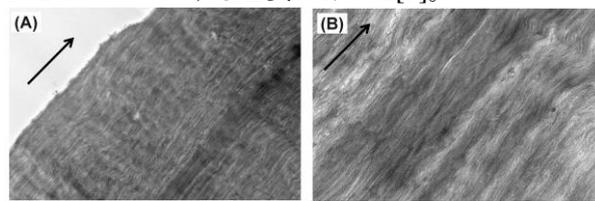


図7. 延伸倍率 3.33 で延伸紡糸されたコラーゲンMFの軸方向断面の TEM 画像。

図 A および B のスケールバーはそれぞれ $2 \text{ }\mu\text{m}$ および 400 nm を示す。矢印は MF の軸方向を示す。

5. まとめ(結言)

CFC 近傍濃度の中性コラーゲン溶液を延伸紡糸することにより、乾燥時のヤング率が 4 GPa を超える高弾性率 MF を連続紡糸することに成功した。延伸紡糸法は生体腱のファイバー径に近い微細化が可能であり、かつ 170 m/h を超える高速紡糸も達成した。延伸コラーゲン MF を束化して適切な化学架橋を付与することで、臨床応用可能な合成コラーゲン人工腱を創製できると期待された。

<引用文献>

- [1] Kew S et al. *Acta biomaterialia*. 7: 3237-47 (2011)
- [2] Pins GD et al. *Biophysical journal*. 73: 2164-72 (1997)
- [3] Yunoki S et al. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 107: 1011-23 (2019)
- [4] Haynl C et al. *Nano letters*. 16: 5917-22 (2016)
- [5] Caves JM et al. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 93: 24-38 (2010)

以上