

ナノファイバー技術を活用したコラーゲンシートの医療応用

Application of Collagen Nanofiber Sheets in Advanced Medicine

徳野 陽子 TOKUNO Yoko 内田 健哉 UCHIDA Kenya

再生医療や個別化医療（精密医療）などの先進医療に向け、コラーゲン材料の研究開発が進んでいる。

東芝は、エレクトロスピンニング(ES)法を用いた製造技術で、2種類のコラーゲンナノファイバーシート(以下、コラーゲンシートと略記)を開発し、実用化を進めている。一つ目は、体内移植のため、生体組織を模倣した3次元(3D)配向のものである。独自のファイバー密着プロセスでハンドリング性と生体適合性を両立し、更に今回のマウス皮膚フラップ下移植で、壊死(えし)抑制効果を確認できた。二つ目は、早期がん診断のため、生きたがん細胞を培養・観察できるものである。イメージセンサー表面に薄く形成し、高い生着率で乳がん細胞を観察できた。

The trend toward application of collagen materials in areas of advanced medicine, including regenerative medicine and precision medicine, has accelerated recently with the goal of practical application.

Toshiba Corporation has developed the following two types of collagen nanofiber sheets fabricated using an electrospinning (ES) technique: (1) a transplantation sheet that replicates three-dimensionally oriented structure of living tissues while achieving excellent handleability and biocompatibility through proprietary fiber adhesion treatment, and (2) a sheet for early-stage cancer diagnosis, which cultures cancer cells and visualizes the gene activities in living cells. Experiments on prototype samples have verified that the former type of sheet transplanted into mice is effective in suppressing skin flap necrosis and the latter type of sheet thinly formed on the surface of an image sensor can observe living breast cancer cells with high engraftment rate. We are now actively promoting the practical application of these collagen nanofiber sheets.

1. まえがき

再生医療や個別化医療（精密医療）などの先進医療に向けて、活発な研究開発が進んでいる。再生医療とは、失われた組織や器官を再生する医療である。主に細胞の増殖・分化能力を高め、自然治癒力を介して生体組織の再生修復を目指す⁽¹⁾。一方、個別化医療とは、患者一人一人の特性に合わせて診断や治療を行う医療である。

これらの医療において、細胞が本来持つ機能を発現して組織を構築するための重要な要素として、“足場”がある。足場とは、細胞が機能を発現するために接着する材料を指す。体内で用いる場合は足場材料(スキャフォールド)、体外で細胞培養に用いる場合は細胞培養足場と呼ばれる。図1(a)に示すように、生体組織には、細胞外マトリックス(ECM: Extracellular Matrix)と呼ばれるコラーゲンを主成分とした線維状構造体が細胞の周囲に存在する。このような足場材料には、細胞接着性、細胞や養分などの物質透過性、形状保持性、生体吸収性、機械的強度などの特性が求められる⁽²⁾。生体内と同じように細胞を3Dに配置するための足場として、ECMを模倣した構造体を用いられる⁽²⁾⁻⁽⁴⁾。

このような微小構造を形成する手段として、インプリント

法、3Dプリンティングなどが挙げられるが、ES法や、ソリューションブロー法などによるナノファイバー形成法も検討されている^{(2), (3), (5)}。図1(b)にES法の概要を示す。高電圧を印加した原料溶液を電界中に引き出してナノファイバーを形成し、コレクター表面で不織布状のナノファイバーシートを得る。用いる溶媒の沸点や溶液の濃度、コレクターの回転速度などにより、ファイバーの太さや配向の度合いがコントロールされたナノファイバーシートが得られる。

東芝は、2020年にES法を活用して2種類のコラーゲンシートを開発し、実用化を進めている⁽⁶⁾⁻⁽⁸⁾。一つ目は、生体組織構造を模倣し、良好なハンドリング性と生体適合性を併せ持つ3D配向コラーゲンシート(マトリックス)である。二つ目は、生きたがん細胞を培養し、観察するためのコラーゲンシートである。

細胞や組織を、体内に移植する、又はイメージングデバイスなどの人工物と接する環境で培養して観察する、という状況で、それらの生着率を高め、所望の機能を得る足場材料へのニーズは、今後も医療の高度化に伴い拡大すると考えられる。いかに生体に近い周辺環境を再現できるか、体内での炎症反応や吸収のされやすさをデザインできるか、生体の複雑な機能が解明されていく中、それらに合わせた微細構造を

持つ足場材料の製造技術も革新していく必要がある。

今回、3D配向コラーゲンシートのマウス皮膚フラップ下移植試験で、皮膚の壊死抑制効果と、ハンドリング性を確認したので、その内容・結果について述べる。

2. 生体組織を模倣した3D配向コラーゲンシート

2.1 作製方法と特長

生体組織内のECMを模倣するためにコラーゲン線維が3D配向した構造体を作り出す手法として、多数のコラーゲンナノファイバーを一方方向に配列させ、それを交互に積層させて3D構造に立体化する方法がある。部分的に絡み合ったり、接したりするだけのナノファイバー集合体では十分な機械的強度を得られず、水を含んだり、引っ張られたりすることで形状が崩れてしまい、使用が困難となるケースがある。また、熱や化学架橋剤を用いた架橋（硬化）処理を行う場合、毒性が懸念される。

そこで当社は、熱や化学架橋剤を用いずに強度を付与する手法として、液体と固体の界面で発生する“毛管力”を利用してナノファイバー同士を密着させる技術を開発した。ここで毛管力とは、狭い隙間に存在する液体によって、物体同

士を引き寄せる方向に作用する力のことである。図2に密着プロセスの概要と、後で述べる生医学的評価2種（ラット皮下埋植、マウス皮膚フラップ下移植）への適用の流れを示す。

密着プロセスは、まず、ファイバーを一方方向に配列させたナノファイバーシート（以下、配向シートと略記）を、交互に配列の向きを変えながら積層した後、アルコールなどの揮発性を持つ液体に浸漬（しんせき）して乾燥させる。すると、シート内に含浸した液体が揮発する過程でファイバー間に発生する毛管力によって、ファイバー同士が強く引き寄せられる。このような現象は、半導体の洗浄プロセスにおける液体洗浄・乾燥時に微細な回路パターンが変形して密着する現象としても知られている。

このような密着処理を行った3D配向コラーゲンシート（乾燥状態）の応力-ひずみ曲線を図3に示す。従来の配向シートは、ナノファイバーを配列させた方向に引っ張ると容易に裂ける。このとき、破断に至るまでの最大応力（引っ張り破断強度）は0.6 MPa程度と低かった。これに対し、配向シートを積層して上記の密着処理を施した3D配向コラーゲンシートでは、引っ張り破断強度が79 MPaに大きく向上した。同様に、層間剝離強度についても密着処理後に300

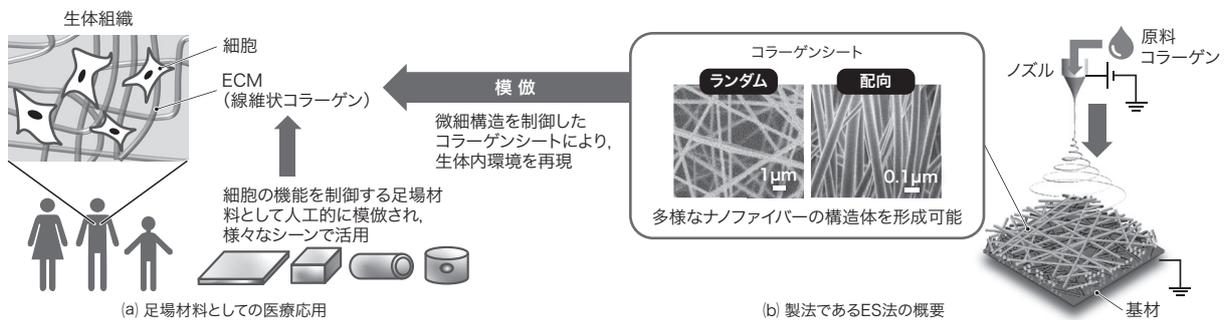


図1. 微細構造を持つコラーゲンシートの医療応用

ES法で微細構造を制御したコラーゲンシートで生体組織のECMを模倣したスキャフォールドを作り、医療に応用する。

Applications of collagen nanofiber sheets fabricated using ES technique in medicine

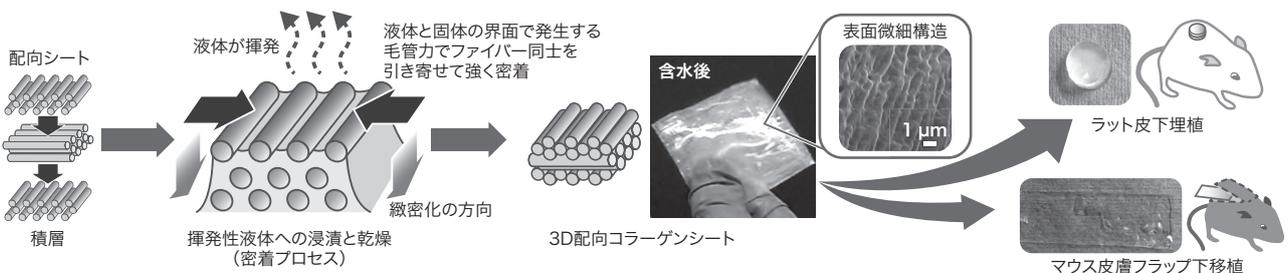


図2. 3D配向コラーゲンシートの作製と生医学的評価2種への適用の流れ

液体の毛管力を利用した密着プロセスにより、含水状態でも形状を保持でき、移植も可能なシートが得られた。

Flow of processes for fabrication of three-dimensionally oriented collagen nanofiber sheets applied to biomedical evaluations

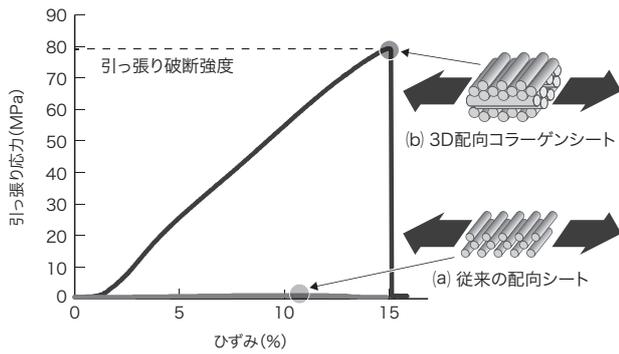


図3. 3D配向コラーゲンシート(乾燥状態)の引っ張り試験での応力-ひずみ曲線

従来の配向シートではナノファイバーの配列方向における破断強度は非常に低いが、3D配向コラーゲンシートでは積層と密着処理の効果で破断強度は大きく向上した。

Comparison of stress-strain curves of oriented and three-dimensionally oriented collagen nanofiber sheets in dry state obtained from tensile tests

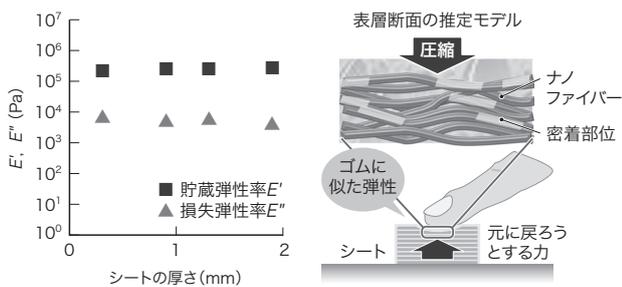


図4. 3D配向コラーゲンシート(含水状態)の動的粘弾性

“貯蔵弾性率 E' >損失弾性率 E'' ”の関係を満たし、弾性体としての性質が強い。ナノファイバー間の密着状態は維持されていると考えられる。

Results of dynamic viscoelasticity measurements of three-dimensionally oriented collagen nanofiber sheet in hydrous state

倍以上に向上した。

2.2 動的粘弾性

生理食塩水を含ませた3D配向コラーゲンシート(含水状態)について、圧縮による動的粘弾性測定を行った。室温、 N_2 (窒素)雰囲気、一定の周波数下(1 Hz)における測定結果を図4に示す。シートの厚さによらず、貯蔵弾性率 E' が損失弾性率 E'' を上回り、弾性体としての性質が強いことを示した。含水状態でも、ナノファイバーの密着部位は維持されていると考えられた。これらの結果から、密着処理により、含水状態でもゴムに似た強い弾性を示す、良好なハンドリング性を持つ3D配向コラーゲンシートが得られたと確認できた。

2.3 生医学的評価

このコラーゲンシートについて、国立大学法人 東京医科

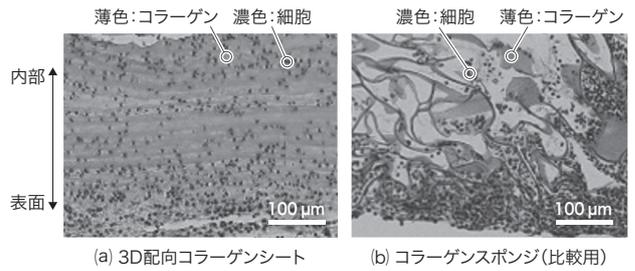


図5. ラット皮下埋植1日後に採取した組織切片のH-E染色した観察像

シートの内部まで速やかに細胞が浸潤していた。
Hematoxylin and eosin (H-E) stained images of tissue sections of rats collected one day after subcutaneous implantation of prototype samples

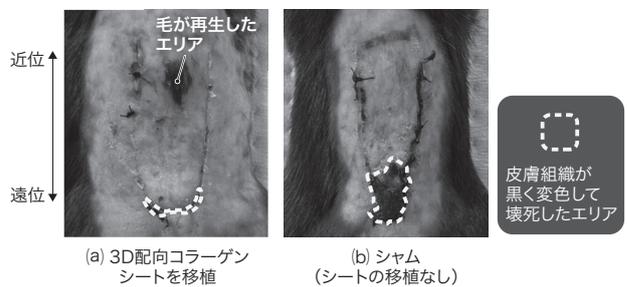


図6. マウス皮膚フラップ下移植7日後のフラップ外観

フラップ遠位における皮膚組織の壊死が抑制される傾向が見られた。

Images of skin flaps of mice with and without subcutaneous transplantation of prototype samples observed seven days after

歯科大学と共同で、生医学的な評価を行った。ラットの皮下に埋植して生体内反応を調べる試験をした結果、市販のコラーゲングルやスポンジに比べ、強い炎症を示さず、早期にコラーゲンシートが消失する特性を確認した。図5(a)に、埋植1日後に採取した組織切片をヘマトキシリン・エオジン(H-E)で染色して観察した結果を示す。H-E染色では、コラーゲンは薄赤色、細胞は濃紫色に染まる。市販のコラーゲンスポンジ(図5(b))に比べ、コラーゲンシートは内部まで細胞が浸潤して消失したことが確認できた(図5(a))。

これらの特性を生かす用途の一つとして、今回、皮膚再建(生着)の医療応用に向け、マウスを用いた皮膚フラップ下移植試験により、皮膚生着性への影響を評価した。図6に、移植7日後のフラップ外観の代表的な写真を示す。3D配向コラーゲンシートを移植した場合と移植しない場合で比較した結果、移植をしない場合は、フラップの遠位において皮膚が黒く変色した壊死したエリアがあるのに対し、移植した場合は、皮膚の壊死が抑制される効果を確認できた。また、手術で縫い付ける動作に対してもハンドリング性は良好であった。

今後、損傷した組織の再建を助ける移植材料としての応

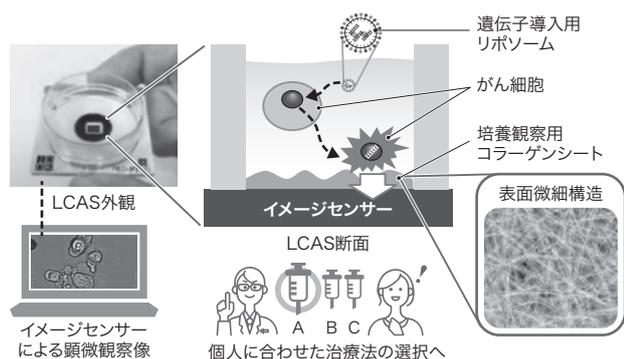


図7. 生きたがん細胞を観察するためのLCASとその培養シート

イメージセンサー表面に薄くて透明なコラーゲンシートを形成することで、がん細胞をシートの凹凸面に接着させて、生きたまま観察できる。

Outline of live cell analyzing system (LCAS) and its culture sheet to observe living cancer cells

用を期待して、生体内での反応メカニズム解明を進めるとともに、各用途に合わせた足場材料や医療デバイスとしての機能検証を進めていく。

3. 生きたがん細胞を観察するための培養シート

二つ目は、生きたがん細胞を培養し、観察するためのコラーゲンシートである。当社は(株)IDDKと共同で、がん診断向けにイメージング細胞培養デバイス(Live Cell Analyzing System : LCAS)を開発している。図7に、デバイスの概要を示す。乳がんなどの細胞に効果的に遺伝子を導入できる独自のリポソーム⁽⁹⁾試薬と、CMOS(相補型金属酸化膜半導体)イメージセンサーを搭載する。更に、イメージセンサーの近傍に生きたままがん細胞を接着させるため、表面に凹凸構造を持つ透明なコラーゲンシートを形成する技術を開発済みである。ES法では、ファイバーの径や密度、配向度などを制御することで、ターゲットとする細胞の培養に適したコラーゲンシートを形成できる。

乳がん細胞に合わせて、表面の凹凸構造や厚さを適正化したコラーゲンシートを、イメージセンサーの表面に薄く形成した。その結果、80%以上の生存率で人の乳がん細胞株を生きたまま観察できた。従来、体外での培養が困難であった検体細胞に足場を提供し、高い生着率で培養して観察できることで、LCASを活用して乳がん患者個人の特性に基づいた診断精度の向上に貢献する。

4. あとがき

ここでは、ES法を用いたナノファイバー製造技術を活用して開発した2種類のコラーゲンシートについて述べた。再生医療などの体内への移植を想定して生体組織を模倣し

た3D配向マトリックスでは、液体と固体の界面で生じる毛管力を利用した独自のナノファイバー密着処理技術による良好なハンドリング性と、今回のマウス皮膚フラップ下移植での壊死抑制の効果を含めた生体適合性の両立を実現した。個別化医療におけるがん診断向けでは、細胞培養基材として、イメージセンサー表面に薄くて透明なコラーゲンシートを形成したデバイスで、生きた乳がん細胞の可視化を実現済みである。

今後は、体内、体外それぞれにおいて、生体内環境を再現するため、微細構造を制御したコラーゲンシートの実用化に向けた基礎検証を進めていく。

謝辞

この研究成果の一部は、国立大学法人 東京医科歯科大学 岸田晶夫教授、木村 剛准教授(現在、東洋大学教授)との共同研究に基づくものです。ここに深く感謝の意を表します。

文献

- (1) 田畑泰彦, ほか. 再生医療用足場材料の開発と市場. シーエムシー出版, 2016, 267p.
- (2) 岡野光夫, ほか. バイオマテリアル その基礎と先端研究への展開. 東京化学同人, 2016, 368p.
- (3) 青柳隆夫, ほか. 医療用バイオマテリアルの研究開発<普及版>. シーエムシー出版, 2023, 258p.
- (4) Khor, E. et al. Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprotheses. *Biomaterials*. 1997, **18**, 2, p.95-105.
- (5) 山下義裕. エレクトロスピニング最前線 ―ナノファイバー創製への挑戦―. 繊維社企画出版, 2007, 206p.
- (6) 徳野陽子. ナノファイバー技術を活用した精密医療向けコラーゲンシート. *東芝レビュー*. 2021, **76**, 4, p.50-51. <<https://www.global.toshiba/content/dam/toshiba/jp/technology/corporate/review/2021/04/r01.pdf>>. (参照 2024-03-01).
- (7) 徳野陽子, 内田健哉. ナノファイバー技術を活用した医療用コラーゲンシート. *Nanofiber*. 2022, **13**, p.8-11.
- (8) 徳野陽子, 内田健哉. ナノファイバー技術を活用した医療向けコラーゲンシート ～再生医療からがん診断まで適用可能なコラーゲン構造体の開発～. *繊維学会誌*. 2023, **79**, 5, p.153-156.
- (9) Nozaki, E. et al. Lipid Composition Design of Lipid Nanoparticles by Bayesian Optimization for High-Efficiency Gene Delivery to Peripheral Blood Mononuclear Cells. *J. Nanomedicine*. 2021, 237525102.



徳野 陽子 TOKUNO Yoko
生産技術センター
製造プロセス・検査技術領域 材料・デバイスプロセス技術研究部
日本再生医療学会・日本人工臓器学会会員
Material & Device Process Technology Research Dept.



内田 健哉 UCHIDA Kenya, Ph.D.
生産技術センター
製造プロセス・検査技術領域 材料・デバイスプロセス技術研究部
博士(理学) 日本化学会・ケイ素化学協会会員
Material & Device Process Technology Research Dept.