

山本耕平論文内容の要旨

主 論 文

Biological Safety of Fish (Tilapia) Collagen

魚（テラピア）コラーゲンの生物学的安全性

山本 耕平、井川 一成、杉本 浩司、吉澤 祐、柳口 嘉治郎、池田 毅
山田 志津香、林 善彦

BioMed Research International

Vol. 2014, Article ID 630757, 9 pages

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻

(主任指導教員：林 善彦教授)

緒 言

世界中で発生している哺乳類、鳥類の口蹄疫、インフルエンザ、BSE など人獣共通感染症の可能性のない足場材を開発するため、魚由来の素材の活用に注目した。即ち、魚の皮膚、骨由来の海洋性コラーゲンの生体適合性、抗原性、細胞増殖能等に関して検討した。魚コラーゲン (FC) は一般に変性温度が低く臨床において使用 (医療用と) が難しいとされている。一般に FC の安定性の低いのは、牛コラーゲンと比較してそのヒドロキシプロリン含有量が低いことによると考えられている。最近の研究において、熱帯魚のテラピアの皮膚から抽出したコラーゲンは変性温度が 35-36°C を示したと報告されている。したがって、テラピア由来のコラーゲンは、足場材として牛コラーゲンの代替となる可能性がある。本研究において、臨床応用へ向けたアテロ化タイプ I 型テラピアコラーゲン (FC) の安全性を確かめるため、ISO 規格に準拠して各種試験を実施した。

材料と方法

好気性、嫌気性菌否定試験、真菌否定試験：0.1%FC はゲル化後、PBS(-)を加え 3 日間 37°C で培養する。PBS(-)は専用培地へ加え、さらに 5 日培養後、臨床検査に準じて自動血液培養テスト装置にて分析した。

エンドトキシン残量試験：0.1%FC はゲル化後、PBS(-)を加え 3 日間 37°C で培養する。PBS(-)はリムルス試薬と混和し、比濁時間分析法でエンドトキシン量を計測した。

マイコプラズマとウイルス否定試験：0.1%FC 3mL をゲル化し NOS-1 細胞は 5 日間培養し PCR 法で解析した。

細胞毒性試験：V79 細胞を用い、直接接触法でコロニー形成の抑制を観察した。細胞は 7 日間培養し、100%メタノールで 5 分間固定後、4%のギムザ染色溶液で染色した。

感作性試験：0.1%FC の感作性に関しては、モルモット (5 週齢、10 匹) 最大化試験を使って検討した。炎症誘導後に皮膚反応 (紅斑と膨張) を観察した。

染色体異常試験：CHL/TU 細を用いる染色体異常試験を代謝活性化系の存在下及び非存在下での短時間法、代謝活性化系の非存在下での 24 時間連続処理法の各処理条件で実施した。異常を示している染色体構造と細胞数を調べた。

皮内反応試験：FC ゲルから 37°C で 72 時間生理食塩水あるいは胡麻油を用いて抽出した抽出液の背中皮内 (うさぎ 5 匹) における刺激性について調べた。

急性毒性試験：抽出方法は、皮内試験と同様である。各々の抽出物は、尾部静脈 (生理食塩水)、腹腔 (胡麻油) へ 5 匹のマウスに注射した。

発熱性物質試験：FC の生理食塩水抽出液 (10mL/kg) を、3 匹のうさぎの耳介静脈に単回投与し、直腸体温を投与後 3 時間までの間 6 回測定し、体温上昇度を求めた。

溶血毒性試験：生理食塩水抽出液を使って、溶血の程度をヘモグロビンの吸光度によって調べた。

3次元細胞培養：NOS-1 細胞を FC ゲル内で 3次元培養した。500 μ L の石灰化用培地は、FD-細胞混和ゲル上に加えた。培養 14 日間後に 100%メタノールで固定し 1%のアリザリン レッド S で染色した。

結 果

無菌性試験

0.1% FC は、細菌、真菌、マイコプラズマ、ウイルス試験にて陰性結果を得た。

エンドトキシン残量試験

エンドトキシンの計測結果は、1.0pg/mL 以下で陰性結果を得た。

細胞毒性試験

FC は、コロニー形成率が 30%以上でありコロニー形成抑制はなかった。

感作性試験

0.1% FC の皮内感及び塗布感作し、0.1% FC 及び注射用水で惹起した部位ではいずれの観察時点においても、前 10 ひきの惹起部位に皮膚反応は観察されなかった。

染色体異常試験

陰性対照群と比較して染色体の構造あるいは数的以上を有する細胞の出現数に有意な増加は見られなかった。また、いずれの処理条件においても、集団倍化から求めた細胞増殖率の減少はなかった。

皮内反応試験:

FC の胡麻油を用いた抽出液注入した場合においても、紅斑/かさぶたと浮腫のスコアは、注射後 24~72 時間 3.60 であった (平均: 1.20)。胡麻油の抽出液の注入後の紅斑/かさぶたと浮腫のスコアは、注射後の 24~72 時間で 4.33 (平均: 1.44) であった。差値 (1.20-1.44= -0.24) は 1.0 以下であった。

急性毒性試験

一般状態、体重及び冒険において以上は見られなかった。

発熱性物質試験

生理食塩水中の FC 抽出物の注入で全体の増加温度は 1.3°C 以下であったので、陰性と判断した。

溶血毒性試験

溶血率は 2% 以下であったので、FC は溶血性を示さないことが分かった。

3次元細胞培養

FC ゲル上で NOS-1 細胞は球形を維持して増殖した。アリザリン レッド S 染色によって石灰化培地で培養された群において細胞外マトリックスは赤色に染色された。

考 察

コラーゲンを使う主要な理由は、高い細胞接着並びに生物分解性と生体適合性に優れ、またアテロ化によって抗原性も低いためである。今回、ISO 規格に従った細胞毒性、増感、染色体異常、皮内反応、全身毒性、発熱性反応及び溶血性試験に対してすべて陰性の結果を得たので、FC の安全性を確認することができた。3次元培養は、プラスチック培養皿に細胞を播種する2次元培養に比べてより生理的な環境を提供する。結果として、3次元培養は、2次元培養ではできない分化、形態形成を含めた生理学的過程の検討を可能とする。今回の3次元培養から、FCゲル内における細胞の動態から足場材として石灰化へ向け骨芽細胞の分化への有効性を示している。今後、FCの臨床適合性を評価するため、特に大きな動物を使った実験は必須であるが、再生医療で足場として強く有望な生体適合物質であることが確認できた。