

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K12046

研究課題名(和文) エラスチン成分に着目した項韧带および黄色韧带の力学的評価と韧带骨化症の治療法探索

研究課題名(英文) Biomechanical evaluation of the nuchal and yellow ligaments considering elastin components and development of a new treatment for the ossification of vertebral ligaments

研究代表者

山本 衛 (Yamamoto, Ei)

近畿大学・生物理工学部・准教授

研究者番号：00309270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：エラスチンは高純度で精製することが難しく、このことに起因してエラスチンを対象とした研究は非常に遅れており、バイオメディカル分野への応用も今後の課題であると認識されている。本研究では、エラスチン材料を用いた腱や韧带の再建方法の開発を最終目的として、脊柱に存在する黄色韧带組織の力学的特性やエラスチンの力学的寄与を定量的に検討するとともに、その特性を模倣したエラスチン含有材料の作製を試みた。実験の結果、現時点では韧带組織の特性を完全には模倣できていないものの、オーダーが異なるということはなかった。今後は、他の材料との複合化などによって、強度や伸展性の向上を図っていくことが重要であると推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エラスチンは、生体軟組織に伸展性や柔軟性を付与する重要な役割を担っているにもかかわらず、バイオメカニクス分野での詳細な検討は国内外ともに行われていない。従って、エラスチン含有量の高い生体軟組織におけるエラスチン成分の力学的寄与を、生体力学的観点から検討している点が本課題の学術的な価値である。また、黄色韧带骨化症などの組織伸展性が低下する疾患では、エラスチンの性状変化が病状を左右する重要な因子であると考えられ、エラスチン含有のバイオマテリアルを用いた治療法やアンチエイジング手法を新たに提案することは、健康寿命の延伸など、高齢化社会における諸問題の解決に繋がることが十分に考えられる。

研究成果の概要(英文)：Pure molecular solution of elastin is hardly extracted due to its insolubility. From this reason, many basic characteristics of elastin have not been fully elucidated not only in the area of biochemistry and molecular biology but also in that of biomechanics and biomaterial. Our overall goal was to determine whether the external medication using biomimetic materials which include elastin ingredients is effective for the maintenance and improvement of the extensibility of biological soft tissues such as tendons, ligaments, and skins during healing process. Specifically, in the present study, we developed elastin-based materials having the same elastic moduli as those of soft tissues. The tensile strength and failure strain of the elastin materials were approximately 58% and 50% of those of yellow ligaments, indicative of the incomplete mimicking of biological soft tissues. Further studies should be conducted to improve the strength and extensibility of the elastin materials.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：バイオメカニクス エラスチン 生体軟組織 腱 韧带 力学的特性

## 1. 研究開始当初の背景

腱や靭帯などの生体軟組織は、コラーゲン（膠原線維）、エラスチン（弾性線維）、線維芽細胞、糖タンパクであるプロテオグリカンなどで構成される組織であり、線維成分が規則性を持って配列している。エラスチンはゴムに喩えられ、伸展性に富み、変形にも自在に対応する弾性を有する。生体軟組織の力学的特性では、コラーゲンが付与する剛性とエラスチンによる弾性が複合的に影響することで、非常に複雑な粘弾性挙動が現れている。加齢や損傷などによって、エラスチンが変性や減少すると、組織の伸展性が失われることになる。腱や靭帯では、エラスチンの性状変化によって、本来の組織が有する伸展性や柔軟性が失われ、その結果として関節の不安定化や可動制限などが生じ、身体運動の機能低下が引き起こされる。エラスチンは、腱、靭帯、皮膚、血管のみならず、肺や腎臓など全身の臓器の機能や病態に深く関わっているが、エラスチンの新生や代謝に関しては、未だに不明な点が数多く残されている。エラスチンは不溶性タンパク質であるため、分子溶液を容易に取り出すことができないという理由から、エラスチンを対象とした研究はコラーゲンを対象とする研究と比較すると著しく遅れている。

## 2. 研究の目的

腱や靭帯の力学的特性はコラーゲンとエラスチンの双方の組成や構造に依存すると考えられる。しかしながら、エラスチンとコラーゲンの力学的相互作用などの基本的知見は不足しており、腱や靭帯の力学的特性におけるエラスチン成分の力学的寄与についても不明な点が多い。本研究では、酵素処理を行った黄色靭帯を対象とした力学試験を実施することで、エラスチンが靭帯において果たしている力学的機能についての知見を得ることを試みた。さらに、エラスチンを利用したバイオマテリアルの開発を最終目標とし、靭帯組織の力学的特性の模倣を目指したエラスチン含有材料を作製し、その力学的特性を定量化した。

## 3. 研究の方法

正常な黄色靭帯組織のデータ取得のために、ウイスターラット（雄、5匹、12週間齢、442±15g）と日本白色家兎（雌、5匹、6ヶ月齢、3.6±0.2kg）を用いた。採取した黄色靭帯を測定用に成型し、何も手を加えない control 群、エラスターゼ溶液（0.2unit/ml）に2時間浸漬したエラスターゼ群、コラゲナーゼ溶液（0.2unit/ml）に2時間浸漬したコラゲナーゼ群に分類した。ラットの黄色靭帯（胸椎 T12-腰椎 L1 間、L2-L3 間、L4-L5 間）を室温大気中で変形量 0.5 mm、引張速度 10 mm/sec を 10 回繰り返すプリロードを行った後、10mm/sec で引張荷重試験を行い、変形量と力を測定した。また、家兎の黄色靭帯（胸椎 T12-腰椎 L1 間）（図 1）では、37℃に加温した生理食塩水中でラット黄色靭帯と同様に引張試験を行った。

また、エラスチン含有材料を作製するために、 $\beta$ -エラスチン（分子量約 7,000）を精製し、ジメチルスルホキシド（DMSO）に 100, 150 mg/ml の濃度で溶解した。その溶液を直径 60 mm シャーレに注ぎ、架橋剤としてヘキサメチレンジイソシアネート（HMDI）を体積比 15%になるように加え、溶液と架橋剤が均一になるように攪拌を行った。その後、25℃に設定したオーブンに 24 時間静置した（図 1）。作製したエラスチン含有材料をダンベル状（図 2）に切り取り、試験片の厚みを 10  $\mu$ m 間隔でレーザ変位計を用いて測定した。試験片の長軸方向の異なる 3 ヶ所の平均から試験片の断面積を求めた。ニグロシンで試験片にマーカーを付け、生体時の状態に近づけるために、37℃に加温した生理食塩水中で変形量 0.5 mm、引張速度 10 mm/min の繰り返し負荷を 10 回作用させるプリコンディショニングを行ったのちに引張速度 10 mm/min で引張破断試験を行い、応力およびひずみを測定した。加えて、作製したエラスチン材料の力学的特性を押し込み試験でも評価した。小型材料試験機を用いて、押し込み速度 1 mm/min でステンレス鋼製球状圧子（半径 2.25 mm）を材料表面から 0.5mm の位置まで押し込んだ。その後、この押し込み変位を 300 秒間維持し、その間の荷重緩和（Load relaxation）を計測した。得られた荷重時の押し込み荷重-変位関係から、ヘルツの接触理論で導かれる式を用いて、エラスチン材料の弾性率を計測した。

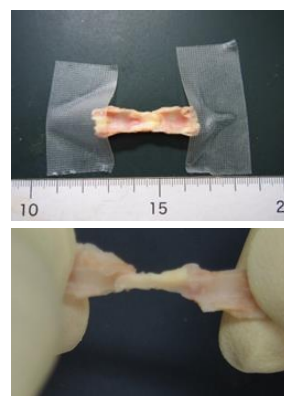


図 1 家兎黄色靭帯の力学試験用試料



図 2 シャーレ上に作製したエラスチン材料

#### 4. 研究成果

ラットでの control 群, エラスターゼ群に分類した黄色靭帯の破断荷重の平均値を図 4 に示す. エラスターゼ群の破断荷重は, control 群と比較して有意に低値であった. また, 家兎黄色靭帯での control 群, エラスターゼ群, コラゲナーゼ群に分類した黄色靭帯の引張強度, 破断ひずみの平均値をそれぞれ図 5, 6 に示す. 引張強度では, エラスターゼ群での強度低下が顕著であり, control 群とコラゲナーゼ群の引張強度の同等であった. 破断ひずみには, 3 つの実験群間に有意な相違は認められなかった.

ラット黄色靭帯のエラスターゼ群の破断荷重は control 群の 35%にまで低下した. 黄色靭帯は, その乾燥重量の 70~80%がエラスチンで構成されており, エラスチンを非常に多く含む組織である. よって, エラスターゼを用いた酵素処理によって破断荷重が著しく低下したものと推察される. この傾向は, 家兎の黄色靭帯でも同様であった. 今後は, エラスチン含有量の少ない腱や靭帯を対象とした実験を行う必要があると考えられる.

図 7 に作製したエラスチン含有材料の応力-ひずみ線図を示す. エラスチン濃度が 100 mg/ml の試料では, 破断応力と破断ひずみはそれぞれ 0.67 MPa と 10.2%であった. これに対して, 濃度が 150 mg/ml の試料で, 破断応力と破断ひずみはそれぞれ 0.78 MPa と 39.3%であった. 濃度が 150 mg/ml の試料のほうが 100 mg/ml の試料と比較して, 破断応力, 破断ひずみともに高値であった. 黄色靭帯の破断応力と破断ひずみは, それぞれ約 1.3 MPa と約 90%であり, 今回の実験で作製したエラスチン含有材料よりも破断応力, 破断ひずみともに高い値となっている. 黄色靭帯のエラスチン含有量は約 70~80%であり, エラスチン以外にもコラーゲンやプロテオグリカンなどのタンパク質が含まれている. 今後は, コラーゲンとの複合化などを行うことで, エラスチン含有材料の強度や伸展性の向上を試みる必要があるものと考えられる. 架橋剤濃度 20%, 30%で作製したエラスチン材料に対して押し込み試験を実施して得られた弾性率を図 8 に, 荷重緩和率を図 9 に示す. 架橋剤濃度 20%で弾性率は約 107 kPa, 荷重緩和率は約 49%であり, 架橋剤濃度 30%で弾性率は約 1625 kPa, 荷重緩和率は約 21%であった. 架橋剤濃度が上がると弾性率は高くなり荷重緩和率は低くなった. 先行研究のデータでは, ヒト皮膚の弾性率は約 100 kPa, ヒト脊椎靭帯の弾性率は約 56 MPa であることが示されている. 本研究では, 架橋剤濃度 20%で作製したエラスチン材料の弾性率が約 107 kPa となっており, 皮膚組織と同程度の値であった. 一方, 架橋剤濃度 30%で作製した場合でも, 材料の弾性率は約 1.6 MPa であり, 靭帯組織よりも低値であった. 今後, 架橋剤濃度を幅広く設定した条件での作製を行うことで, 種々の生体軟組織の弾性率に近い特性を有するエラスチン材料が作製できるかを検討する必要があると考えられた.

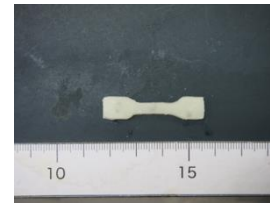


図 3 エラスチン材料のダンベル型試験片

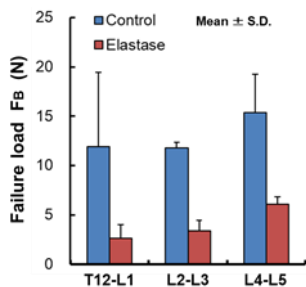


図 4 ラット黄色靭帯の破断荷重

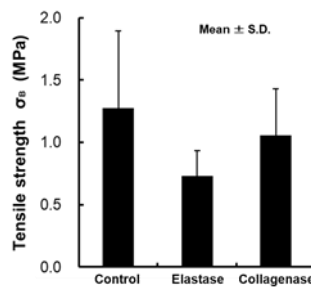


図 5 家兎黄色靭帯の引張強度

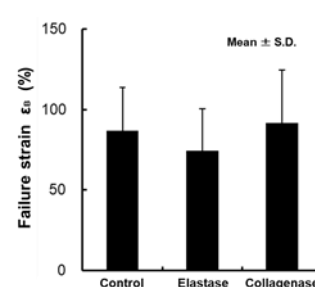


図 6 家兎黄色靭帯の破断ひずみ

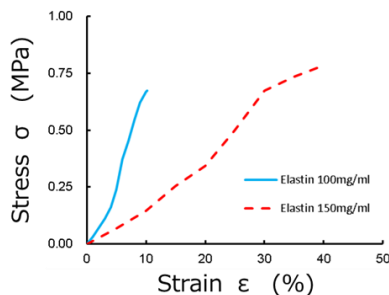


図 7 エラスチン材料の応力-ひずみ線図

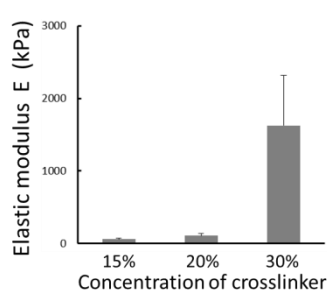


図 8 エラスチン材料の弾性係数

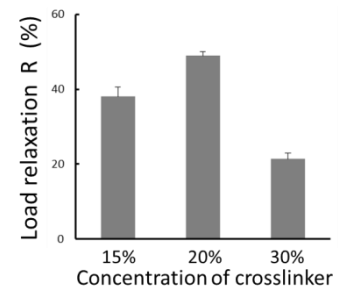


図 9 エラスチン材料の荷重緩和

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamamoto, E., Kawamura, Y.	4. 巻 33
2. 論文標題 Biomimetic materials for the regeneration of extracellular matrix in biological soft tissues	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Photopolymer Science and Technology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本衛, 竹森久美子, 伊藤浩行
2. 発表標題 腱・靭帯におけるエラスチン成分の力学的寄与
3. 学会等名 第46回日本臨床バイオメカニクス学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本衛, 竹森久美子, 伊藤浩行
2. 発表標題 腱や靭帯の力学的特性におけるエラスチン成分の役割
3. 学会等名 日本実験力学会分科会合同ワークショップ
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------