

## 複合低エネルギー生体組織接合に関する研究

## -加圧熱によるコラーゲンフィブリルの幾何学的形状変化の検討-

## Integrated low energy adhesion technique for living tissue

## - The change of collagens' geometric structures with heating and pressing-

○諏訪陽祐(茨城大) 増澤徹(茨城大)

南 広祐(医科歯科大) 木村 剛(医科歯科大) 岸田 晶夫(医科歯科大)

Yosuke SUWA, Ibaraki University, 4-12-1 Nakanarusawa, Hitachi, Ibaraki

Toru MASUZAWA, Ibaraki University

Nawangwoo NAM, Tsuyoshi KIMURA, Akio KISHIDA, Tokyo medical and Dental University

**Abstract:** We have developed a method that allows biological tissues to adhere together with minimal invasion by delivering integrated low-level energies such as heat, pressure, and vibration. The adhesion mechanism was investigated by observing collagen fibril's change under the influence of heat by atomic force microscopy. When collagen fibrils were treated with heat at temperature of 120°C in dehydrated environment, some collagen fibrils with 1000 nm were imaged. The results indicated that application of heat leads to aggregate collagen fibrils in dehydrated environment. When application of pressure of 2.5 MPa was applied on a specimen of a porcine aorta, the mean dewatering ratio was 53.0%. This results indicated that the environment around the collagen fibers got close to dehydrated condition with the application of pressure. So we think that simultaneous application of heat and pressure on biological tissues lead to the collagen fibers' aggregation and to adhere biological tissues together tenaciously.

**Key Words:** Integrated low energy adhesion technique, Collagen fibril

## 1. 緒言

外科手術において、血管の接合や止血は従来、縫合糸、電気メス、超音波メスによって行われてきた。しかし、縫合糸による縫合は習得が難しく、手術時間が外科医の能力に左右される。また、電気メスや超音波メスによる接合は生体組織を炭化させてしまうという問題があった。

そこで我々は電気メスなどエネルギーに比べて、低いエネルギーである熱、圧力、振動を複合して生体組織に与えることでそれらを低損傷で強固に接合できる複合低エネルギー生体組織接合技術の開発を行っている(図1)。本技術は生体組織同士の接合だけでなく、脱血管と心臓の接合のような、金属と生体組織の接合にも応用可能である<sup>1)</sup>。しかし、本接合原理は生体組織の構成タンパク質であるコラーゲンの変性によるものと推定されるだけで、十分に解明されていない。そこで本研究では、接合原理解明のため、熱によるコラーゲンの形態学的変化、加圧前後の生体組織内に含まれる水分の変化を検討したので報告する。

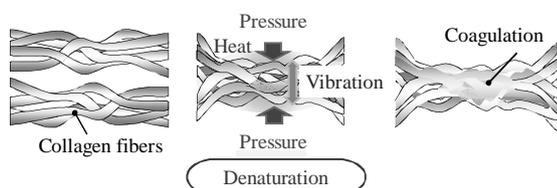


Fig.1 Adhesion mechanism

## 2. 方法

## 2.1 コラーゲンフィブリルの熱変性実験

ネイティブコラーゲンをリン酸緩衝生理食塩水に加え、攪拌し、その溶液をセルデスク上に滴下した。その後環境温度を25°Cに維持し、ネイティブコラーゲンを再線維化させ、セルデスク上にコーティングした。

コラーゲンフィブリルに含まれる水分量の違いが、加熱

後のコラーゲンフィブリルの形状にどのように影響するのか検討するため、生成したコラーゲンフィブリルをオープン内で空気中加熱および、ウォーターバス内で水中加熱し、加熱後の形状を原子間力顕微鏡を用いて観察した。加熱時間は30分、加熱温度は空気中加熱で37°C、45°C、63°C、80°C、120°C、水中加熱で37°C、45°C、63°C、80°C、100°Cとした。

## 2.2 豚の大動脈の加圧実験

一般にコラーゲン線維は含まれる水分量によって変性温度が異なり、水中では65°C付近で変性すると報告されている。生体組織内のコラーゲン線維が変性し、完全にゼラチン化すると、強い結合は望めないと考える。しかし本接合技術をもちいて生体組織同士の接合する場合、接合部分に含まれる水分量は加圧により減少すると考える。そこで加圧による生体組織の脱水を脱水率  $R = (M_1 - M_2) / (M_1 - M_3) \times 100[\%]$  を計算することで評価した。ここで、 $M_1$ は加圧前の生体組織の質量、 $M_2$ は加圧後の生体組織の質量、 $M_3$ は凍結乾燥後の生体組織の質量である。

試験片には、長さ4mm、幅1mm、厚さ0.5mmに切り分けた豚の大動脈の内皮を用いた。試験片の加圧は図2に示す加圧装置を用いて行った。加圧装置はリニアスライダ機構、重り、および試験片と接触する加圧部から構成されており、試験体を垂直に加圧することができる。加圧の大きさは重りで調節し、2.5MPaに設定した。

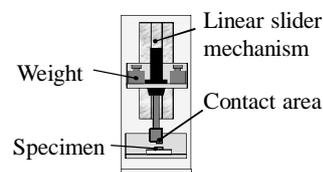


Fig.2 Experimental setup

### 3. 結果

#### 3.1 コラーゲンフィブリルの熱変性実験

図3は熱処理前のコラーゲンフィブリルである。一般にコラーゲンフィブリルには軸方向に幅67nmから69nmの周期的なバンドルが存在し、図2においてもそのバンドルを確認することができた。またコラーゲンフィブリルはその直径が大きいほど機械的強度が高いことが知られているが、計測したコラーゲンフィブリルの平均直径は278nm(N=87)であった。

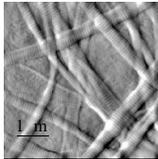
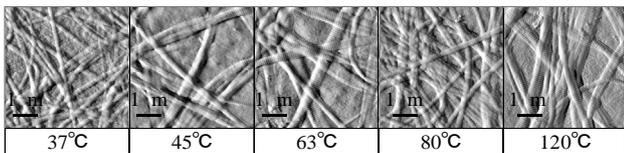
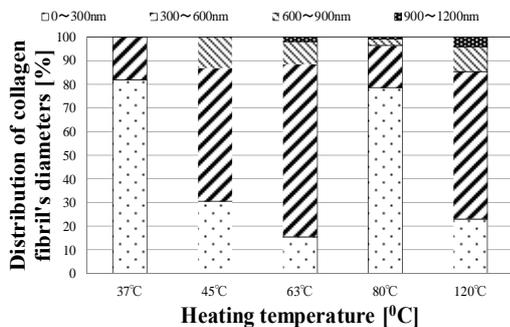


Fig.3 Untreated collagen fibril



(a) Collagen fibril after heating for 30min



(b) The distribution of collagen fibril's diameters and the number of collagen fibril at heating temperatures  
Fig. 4 Collagen fibril heated in dehydrated environment

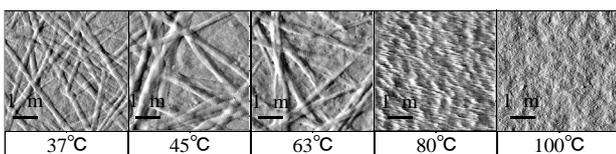


Fig.5 Collagen fibril heated after heating for 30 min in hydrated environment

図4(a)にオープン中で30分間空気中加熱した後のコラーゲンフィブリルを示す。加熱温度が80°C以上の時、コラーゲンフィブリル同士の凝集を確認した。特に120°Cの時には直径が1000nmを超えるコラーゲンフィブリルも存在した。また、凝集後のコラーゲンフィブリルにもバンドル構造は存在した。

図4(b)に加熱温度ごとのコラーゲンフィブリルの直径の分布を示す。コラーゲンフィブリルの直径は、加熱温度が120°Cの場合、300nm以上が約75%を占めていたのに対し、80°Cの場合には約20%であった。また、加熱温度が45°Cと水中での変性温度より低い場合でも、コラーゲンフィブリルの直径は300nm以上が約70%を占めていた。

図5にウォータバス中で30分間水中加熱した後のコラーゲンフィブリルを示す。加熱温度が63°C以下ではコラーゲ

ンフィブリルの線維構造を確認することができたが、80°C以上になるとその構造を確認することができなかった。

#### 3.2 豚の大動脈の加圧実験

図6に、ブタ大動脈内皮の加圧による脱水率を示す。脱水率の最大、最小、平均、標準偏差はそれぞれ、89%、31%、53%、16%であった。

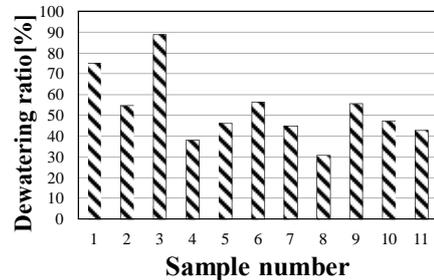


Fig.6 Dewatering ratio of the specimens caused by application of pressure

### 4. 考察

#### 4.1 コラーゲンフィブリルの熱変性実験

80°C以上の空気加熱でバンドル構造有したコラーゲンフィブリルの凝集体を確認した。よって本接合技術において、加熱は生体組織間のコラーゲン線維を凝集させ、それらの接合に関与している可能性が示唆された。一方で、80°Cのサンプルには凝集した個所が存在したにもかかわらず、45°Cのサンプルよりも細かいコラーゲンフィブリルの割合が高かった。これは生成時のサンプルのばらつきが影響していると考えられる。今後このばらつきを考慮した新しい評価方法を考案する。

80°C以上の水中加熱でコラーゲンフィブリルは消失した。この現象はコラーゲンフィブリルが完全にゼラチン化し、原子間力顕微鏡で画像化できないほど軟らかくなったため生じたと考える。以上から本接合技術では、生体組織内の水分量を減らすことで、加熱によるコラーゲン線維の凝集が促進され強固に接合できると考える。

#### 4.2 豚の大動脈の加圧実験

2.5MPaの加圧で生体組織内の水分のおよそ53%が脱水された。よって本技術を用いて接合する場合、コラーゲン線維は空気中加熱と水中加熱の両方の状態を有していると考えられる。その中でも空気中加熱時に見られたコラーゲン線維の凝集が本接合原理に寄与している可能性が高い。今後、コラーゲン線維の加圧熱に対する形状変化を評価していく。

### 5. 結言

本接合技術の接合原理解明のため、生体組織の構成タンパク質であるコラーゲンの熱に対する形態学的変化の観察、および加圧による生体組織の脱水率を評価した。本接合原理には、加熱によるコラーゲン線維の凝集、および加圧による生体組織内の水分の脱水が関与している可能性があることが分かった。今後は実際の接合時間に近い1分間で、コラーゲンフィブリルの加熱、加圧熱実験を行っていく。

### References

- [1] A Katho, T Masuzawa, K Oseki, A Kishida, T Kimura, and THigami; "Development of tissue adhesion method using integrated low-level energies", Medical Engineering & Physics, Vol.32, Issue.4 pp.304-311(2010)