

# 安全性に優れた化学合成コラーゲンによる ドラッグデリバリー用球状微粒子の創成

九州工業大学大学院生命体工学研究科

宮崎 敏樹

Polymer microspheres are expected as novel drug delivery carrier for medical treatment. In addition, if hydrophilic/hydrophobic control is appropriately achieved on the microspheres, the incorporated drug can slowly release into body. Among the component of the microspheres, chemically synthesized collagen with amino acid sequence of proline-hydroxyproline-glycine is promising material because they have no risk of contamination with external pathogens. In the present study, microspheres of chemically synthesized collagen were prepared by cross-linking in water-in-oil emulsion. Water-in-oil emulsion was prepared from synthetic collagen solution as water phase and paraffin solution of surfactant Span 80 as oil phase by ultrasonic emulsification. Microparticles were prepared by addition of cross-linking agents into the emulsion. Surface structural changes were characterized by Fourier-transform infrared spectroscopy, scanning electron microscope and contact angle measurement. Microspheres with 5 to 10  $\mu\text{m}$  in size were obtained, although some particles were peanut-like shape. It was found from model experiment on surface modification on natural collagen films that treatment with biphenyl-4-carboxylic acid was effective for fabrication of hydrophobic surface, suggesting that control in drug delivery properties is possible by this type of surface modification. Drug delivery from the microspheres should be examined in future study.

## 1. 緒言

### 1.1. ドラッグデリバリーについて

薬剤を必要な部位に必要な量だけ到達させるドラッグデリバリーシステム（DDS）の構築や高機能化は、薬効を最大限に発揮させる上できわめて重要である。特に抗がん剤などの副作用の高い薬剤においては、患者に対する負担を低減する意味でもこれらの技術確立が求められている。

DDSに向けた材料設計としては生体吸収性高分子などから微小球を作製しておき、これらに薬剤を担持させ徐放させる方法が一般的である<sup>1)</sup>。一般に薬剤放出初期においては、急激に薬剤放出を起こすバーストと呼ばれる現象が現れ、薬剤の過剰投与につながりかねない。このバーストをいかに抑制するかが、高機能のDDS用材料を得る上で鍵となる。そこで、薬剤分子を微小球表面に予め化学結合させておいたり、バリアー層となる物質を微小球表面にコーティングしておけば、薬剤徐放速度を制御することもできる。生体吸収性高分子をDDS担体として適用するにあたっては、薬効の持続性能や望ましい薬剤放出タイミングに合わせた生体吸収性制御が必須である。しかし、薬剤と高分子マトリックスとの親水性の相違による制御の難しさなどの課題が残されている。最近では酵素や温度、pH変化、電場、磁場など外部刺激に応答しながら薬剤徐放能

を発揮できるインテリジェントな生体吸収性高分子の開発も進んでいる<sup>2)</sup>。

### 1.2. 化学合成コラーゲンについて

コラーゲンは動物の皮膚や結合組織を構成する主要なタンパク質であり、生物学的親和性に優れることから、ハイブリッド型人工骨の構成成分や人工皮膚、歯の抜歯部分の回復を助けるための充填材などさまざまな生体材料として用いられている<sup>3)</sup>。但し、コラーゲンは主にブタなどの動物由来製品が用いられており、最近では海洋生物などから抽出した製品も見られるものの、病因物質の混入を完全に排除することが困難である。また、抗原作用を回避するために分子鎖の末端改質などの前処理が必要である。これらの点を解決するため、コラーゲンの基本アミノ酸配列であるプロリン-ヒドロキシプロリン-グリシン（PHG）に倣った三重らせんモデルペプチドの合成が国内外で行われてきた<sup>4)</sup>。但し、このペプチドは分子量が小さいため溶解性が高く、生体内で一定期間留まり骨格を維持することが求められる医用材料や再生医療スキャフォールドとしての応用には難があった。

これに対して、岸本らは脱水重縮合条件を精密に制御することで、分子量を1万程度にまで高めた化学合成コラーゲンを開発した<sup>5)</sup>。これらは、化粧品の保湿成分として国内企業で量産化に成功し実用化されるとともに、生体材料への応用が期待されている。化学合成コラーゲンは安全性に優れており生体吸収性を示すとともに、反応性に優れたヒドロキシル基を持つので、適当な化学修飾をすることで薬剤を適度な相互作用により固定化して生体内での徐放を達成できると期待される。このように化学合成コラーゲンはドラッグデリバリー担体としても有用と考えられる。これ



Preparation of spherical microparticles for drug delivery from chemically synthesized collagen with high biosafety

Toshiki Miyazaki

Graduate School of Life Science and Systems Engineering, Kyushu Institute of Technology

までに天然コラーゲンの微小球化については種々報告がなされているが<sup>6, 7)</sup>、このような適用例や最適化は未だ例を見ない。

### 1. 3. 本研究の目的

本研究では、安全性の高いDDS用担体を得るための基礎的指針の解明を目的とした。具体的には、化学合成コラーゲンを基材とした微小球微粒子をエマルションなどを用いた方法により合成するとともに、疎水性/親水性制御により薬剤徐放制御を実現するための表面化学修飾の有効性についてモデル系により検討する。エマルションを用いた方法であれば、有機高分子にとどまらずセラミックスや複合材料などさまざまな微小球を望みの粒径で簡便に合成できることが明らかになっている。

## 2. 実験方法

### 2. 1. 化学合成コラーゲン微小球の作製

以下の記述において、特記なき場合は和光純薬工業製の試薬を用いた。本研究では、油中水型エマルション中での架橋反応を利用して微小球を合成した。水相は0.5%化学合成コラーゲン(株式会社PHG製)水溶液2mLとした。油相として界面活性剤Span80の1.3%流動パラフィン溶液3mLとした。これらを混合した後超音波ホモジナイザを用いて出力188Wにて30秒間乳化した。こうして得られたエマルションに、0.2%のN-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)と0.05%の1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(EDC, 東京化成製)を含む水溶液2mLを添加し、1時間攪拌した。生成した微粒子を定量濾紙(アドバンテック東洋, No.5C)を用いて分離した。

### 2. 2. 表面の疎水化

DDS担体としての表面修飾の可能性を探るべく、コラーゲン系材料の親水/疎水性の制御を試みた。濡れ性評価などに際して大きな試料を要するため、本研究では、基礎的アプローチとしてブタ由来コラーゲン(新田ゼラチン製)を用いた。1%コラーゲン溶液をポリスチレン基板上に塗

布し、15W殺菌用紫外線ランプ(東芝製)を用いて紫外線を1時間照射し架橋反応させた。その後、未架橋のコラーゲンを水洗除去した後、4-フェニル安息香酸とEDCを含む水/アセトン混合溶液に1時間浸漬した。

### 2. 3. 試料の分析

試料の化学状態をフーリエ変換赤外分光分析(FT-IR, 日本分光FT/IR-6100)により調べた。同測定では全反射(ATR)法を用いた。試料の形態を走査型電子顕微鏡(SEM, 日立製作所S-3500N)にて観察した。観察に際し、試料表面にはイオンスパッタ装置(日立製作所E-101)により予め金-パラジウム合金薄膜をコーティングした。また水に対する基板の接触角を接触角計(協和界面科学DMe-200)により測定した。

## 3. 結果

図1に得られた化学合成コラーゲン粒子の走査電子顕微鏡写真を示す。5~20ミクロンの球状粒子が形成されている様子が観察された。その多くは真球状であったものの、一部球同士が結合したピーナツ状の形態を取っていた。これは水相と油相界面の界面張力が低く、エマルション中に分散している水相が変形しやすくなり、変形したままの状態であらうためと考えられる。今後は界面活性剤濃度を低減させることにより、界面でのすべり変形を抑制し、真球度の高い微小球が得られると考えられる。

図2に試料のFT-IRスペクトルを示す。未処理のポリスチレン基板では、700 $\text{cm}^{-1}$ 付近にベンゼン環CH面外変角振動、1400及び1500 $\text{cm}^{-1}$ 付近にベンゼン環由来のC=C結合、2800及び2900 $\text{cm}^{-1}$ 付近にベンゼン環由来のCH<sub>2</sub>基、3000 $\text{cm}^{-1}$ 付近にベンゼン環のCH伸縮振動に帰属されるピークが認められた。コラーゲン水溶液処理した試料では、基板のポリスチレン由来のピークに加えて1700 $\text{cm}^{-1}$ 付近にアミドI、1600 $\text{cm}^{-1}$ 付近にアミドII、3400 $\text{cm}^{-1}$ 付近に水酸基に由来するピークが認められた。これらはコラーゲンのペプチド結合特有のピークであり、上記処理によりコラーゲンが表面に固定化されていることが分かる。しかし、

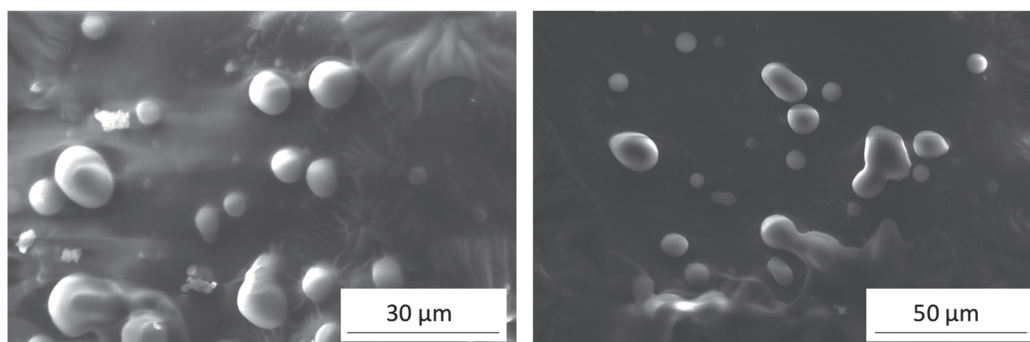


図1 化学合成コラーゲン粒子の走査電子顕微鏡写真

引き続き 4-フェニル安息香酸溶液処理後もスペクトルに大きな変化は見られなかった。

水に対する接触角を測定した結果、コラーゲン固定化基板では  $50.0^\circ$ 、4-フェニル安息香酸溶液処理後は  $66.1^\circ$  であった ( $n=3$ )。これは 4-フェニル安息香酸溶液処理により、表面が疎水化していることを示している。

#### 4. 考 察

エマルションを用いたプロセスにより化学合成コラーゲ

ンからなる微小球が作製できた。化学合成コラーゲンの側鎖にある水酸基が脱水重縮合により架橋して微小球を形成したと考えられる。サイズは 5 から 10 ミクロンであり、生分解性高分子から得られている DDS 用微小球と同程度のサイズであるので、本研究の目的に適ったサイズになっている。

また、天然コラーゲンをを用いたモデル実験により、4-フェニル安息香酸溶液処理することで表面の疎水化ができることが明らかになった。FT-IR では大きな変化は認めら

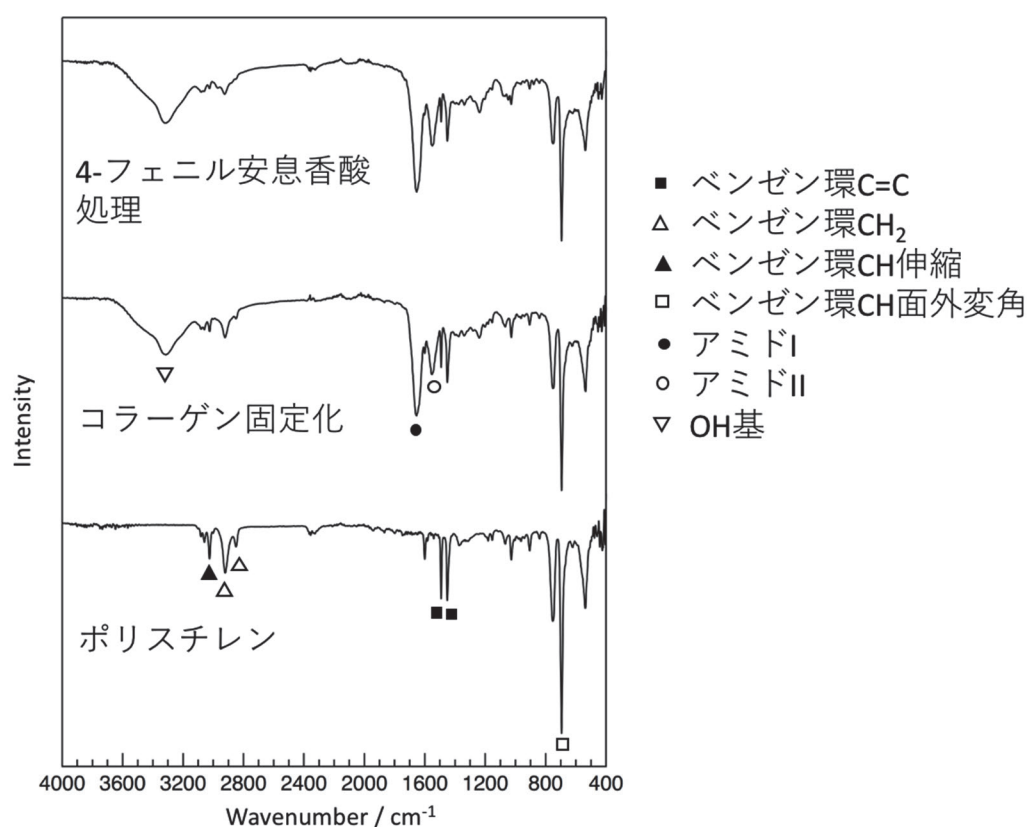


図2 試料のFT-IR ATR スペクトル

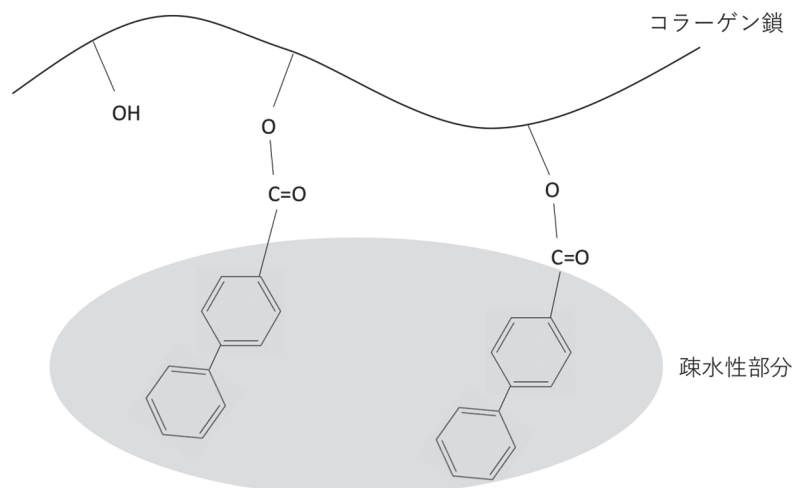


図3 4-フェニル安息香酸によるコラーゲンの疎水化メカニズム

れなかったものの、親水性の観点では変化が認められた。これは4-フェニル安息香酸溶液処理による表面改質が表面のごく近傍のみで生じたためと考えられる。具体的には、図3に模式的に示すように、4-フェニル安息香酸がコラーゲン中の水酸基と結合して表面に疎水性のベンゼン環が固定化され、疎水化に寄与していると考えられる。この結果は、担持させる薬剤の親水性にあわせて化学合成コラーゲン微小球の表面を改質すれば、薬剤徐放性能を制御しうることを示している。

今回は、得られた微小球がきわめて少量であったため、微小球そのものへの表面改質は行えなかったが、今後微小球の量産方法の確立も含めて、この点を明らかにしていく必要がある。

#### (引用文献)

- 1) 竹本喜一, 砂本順三, 明石満編, 高分子と医療, 三田出版会(1989).
- 2) 石原一彦, 塙 隆夫, 前田瑞夫編, バイオマテリアルの基礎, 日本医学館(2010).
- 3) 谷原正夫監修, コラーゲンの製造と応用展開, シーエムシー出版(2009).
- 4) R. Berisio, L. Vitagliano, L. Mazzarella and A. Zagari, Crystal structure of the collagen triple helix model [(ProProGly)<sub>10</sub>]<sub>3</sub>, *Protein Science*, **11**, 262-270 (2002).
- 5) T. Kishimoto, Y. Morihara, M. Osanai, S. Ogata, M. Kamitakahara, C. Ohtsuki, M. Tanihara, Synthesis of poly(pro-hyp-gly)<sub>n</sub> by direct polycondensation of (pro-hyp-gly)<sub>n</sub>, where n = 1, 5, and 10, and stability of the triple-helical structure, *Biopolymers*, **79**, 163-172 (2005).
- 6) N. Nagai, N. Kumasaka, T. Kawashima, H. Kaji, M. Nishizawa, T. Abe, Preparation and characterization of collagen microspheres for sustained release of VEGF, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **21**, 1891-1898 (2010).
- 7) L. Yao, F. Phan, Y. Li, Collagen microsphere serving as a cell carrier supports oligodendrocyte progenitor cell growth and differentiation for neurite myelination in vitro, *Stem Cell Res. Ther.*, **4**, 109 (2013).