# 超分子架橋を施した高保水性コラーゲン微粒子の創製

東京医科歯科大学生体材料工学研究所

# 田村篤志

In order to fabricate collagen microparticles with high water content and chemical stability, the collagen microparticles cross-linked with carboxylmethylated  $\alpha$ -cyclodextrin ( $\alpha$ -CD)-threaded polyrotaxanes (CMPRs) were prepared. First, the cross-linking of collagen hydrogels with CMPRs were tested. CMPR-cross-linked collagen hydrogels showed higher mechanical and swelling properties than those of EDC/NHS-cross-linked and carboxymethyl cellulose (CMC)-cross-linked collagen hydrogels. These results suggest that the mobility of cross-linking points in CMPR-cross-linked collagen hydrogels contributed to improving mechanical and swelling properties. Additionally, the chemical compositions of CMPR greatly affected mechanical and swelling properties of CMPR-cross-linked collagen hydrogels, and CMPR comprising high molecular weight axle polymer and high  $\alpha$ -CD threading ratio was suitable for improving the functions of collagen hydrogels. Moreover, CMPR-cross-linked collagen hydrogels showed high adhesiveness of mouse fibroblasts compared with EDC/NHS-cross-linked and CMC-cross-linked collagen hydrogels, presumably due to the high elasticity of CMPR-cross-linked collagen hydrogels. Finally, CMPR-cross-linked collagen microparticles with 3.38  $\pm$  1.42  $\mu$ m in diameter were successfully prepared. These cross-linked collagen microparticles showed excellent chemical stability. Altogether with these results, the cross-linking of collagen with CMPR is an effective method to modulate the mechanical properties and cytocompatibility, and CMPR-cross-linked collagen microparticles would be applied as a cosmetic ingredient.

# 1. 緒言

真皮などの生体組織を構成するコラーゲンは、医療、食 品、美容製品など様々な分野で利用されている生体由来高 分子である。コラーゲンはヒドロゲルなどへの成型加工も 容易であり、組織適合性や保水性(保湿性)に優れることか ら美容製品分野では美肌成分として利用されている<sup>1,2)</sup>。 このような目的で用いるコラーゲンは角質層に留まり、肌 表面の保湿剤として機能すると考えられる<sup>2</sup>。また、コラー ゲンのヒドロゲルは医療分野では再生医療や癒着防止膜な どの外科的な利用まで幅広く研究されている。コラーゲン ゲルは単体で使用される場合も多いが、医療目的では力学 的な強度を増大させる目的で化学架橋が検討されている1)。 これまでに検討されている代表的なコラーゲンの架橋法と して、グルタルアルデヒドや縮合剤によるコラーゲン分子 鎖同士の架橋、ポリエチレングリコールなど親水性ポリマ ーを用いた架橋が挙げられる<sup>1)</sup>。これらの架橋により破断 強度の増大は達成されるが、コラーゲン本来が有している 」字型の応力 - 歪み特性(低歪み時には応力が小さく、」字 のように応力が増加) は喪失し、プラスチックのようなS 字型応力 - 歪み特性(低歪み字に応力が大きく、S字を描 いて応力が増加)を示す。すなわち、生体組織の動きに追



Design of collagen microparticles by introducing supramolecular cross-linkers

# Atsushi Tamura

Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University 従するようなしなやかさは失われ、硬くて脆い構造になる。 また、架橋方法や条件によっては細胞毒性が生じるといっ た問題も指摘されている<sup>3)</sup>。

このような従来の化学架橋ヒドロゲルの力学特性を改善 することを目的に、当研究室ではこれまでに鎖状高分子が 多数の環状糖類 α-シクロデキストリン (α-CD) 空洞部に貫 通した超分子ポリロタキサンによるゼラチンの架橋を検討 した<sup>4,5)</sup>。ポリロタキサン中のα-CDは軸高分子上を自由 に移動するといった特徴があり、α-CD同士を架橋するこ とで、可動性の架橋構造を有するヒドロゲルが得られる<sup>6)</sup>。 本ゲルは架橋点が滑車のように軸高分子を移動するため、 伸張しても滑車様の運動により高分子の切断が回避され、 破壊エネルギーの蓄積を防ぐといった特徴がある 6.7)。実 際に、ポリロタキサンを用いてゼラチンを架橋した結果、 破断強度が増大するとともに低応力高歪な力学特性を示す ことを見出している<sup>1)</sup>。そこで本研究では、ポリロタキサ ンによるコラーゲンの化学架橋を行い力学特性、細胞接着 性を明らかにするとともに、美容分野への応用に向けたポ リロタキサン架橋コラーゲンマイクロ粒子の調製を検討し た。

# 2. 方 法

#### 2.1. カルボキシメチル化ポリロタキサンの合成

環状分子として $\alpha$ -CD (塩水港精糖社製)、軸高分子として平均分子量 10,000、35,000 のカルボキシ末端 PEG (Sigma-Aldrich社製)、封鎖基として1-アダマンチルアミン(富士フイルム和光純薬社製)を用いたポリロタキサンは既報に従い合成した $^{8}$ 。次に、ポリロタキサンを 1.5 M水酸化カリウム水溶液に溶解させ、 $^{2}$ -ブロモ酢酸 (東京化

成社製)を添加し、室温で 24 時間反応させた。反応終了後、分画分子量 35,000 の透析膜を用いて、純水に対して透析を行うことで精製し、凍結乾燥により粉末状のカルボキシメチル化ポリロタキサン (CMPR) を得た。CMPR中の $\alpha$ -CD貫通数、及びカルボキシメチル基修飾数は  $^1$ H NMR (Avance III 400, Bruker Biospin)測定により決定した。

#### 2.2. コラーゲンゲルの化学架橋と力学特性の評価

アテロコラーゲン粉末(高研社製)に1 mM塩酸を加え、 氷冷下で溶解させた。次に、水酸化ナトリウム水溶液でコ ラーゲン溶液を中和し、テフロン性の鋳型に加え、37℃ で24時間静置することでコラーゲンゲルを調製した。次 に、CMPRをエタノール-純水の混合溶媒(エタノール: 純水=3:7)に溶解し、縮合剤として1-エチル-3-(3-ジ メチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩(EDC、東 京化成社製)、及びN-ヒドロキシコハク酸イミド (NHS、 東京化成社製)をCMPR中のカルボキシ基:EDC:NHS= 1: 10: 10 のモル比となるように加え、15 分攪拌した。そ の後、コラーゲンゲルをCMPR溶液に浸漬し、室温で24 時間静置し、化学架橋を行った。反応終了後、コラーゲン ゲルはリン酸緩衝溶液(PBS)に浸漬し、未反応のCMPR、 及び縮合剤を除去した。本操作を計3回繰り返すことで精 製し、架橋コラーゲンゲルを得た。比較対象として、可動 性の架橋構造を有していないカルボキシメチルセルロース (CMC、数平均分子量 139.000、東京化成社製)で架橋し たコラーゲンゲル、及びEDC/NHSのみで化学架橋を行っ たコラーゲンゲルを調製した。

コラーゲンゲルの力学特性は引張強度測定、及び動的粘弾性測定によって評価した。引張強度はダンベル型に成形したゲルを作成し、RE2-33005B(山電社製)により測定した。動的粘弾性はRheosol-G3000(UBM社製)により測定した。

## 2.3. 架橋コラーゲンゲルへの細胞接着性評価

24 ウェルプレート内に上記と同様に架橋コラーゲンゲルを作成し、マウス線維芽細胞株である BALB/3T3 細胞を  $2\times10^3$  cells/cm $^2$  の密度で播種した。所定時間経過後、位相差顕微鏡により細胞を観察し、細胞接着数を計測した。

# 2.4. 架橋コラーゲンゲル微粒子の調製と評価

Span-20を溶解させた流動パラフィン溶液に、中和したコラーゲン溶液を添加し、ホモジナイザーによって乳化させた。その後、上記と同様に、CMPR、EDC、NHSを溶解した水溶液を滴下し、24時間攪拌した。反応修了後、2-プロパノールを用いて3回洗浄し、精製を行った。位相差顕微鏡により観察し、粒径を計測した。

# 3. 結果

## 3.1. ポリロタキサン架橋コラーゲンゲルの調製

本研究では、軸高分子分子量、及びα-CD貫通数の異な る4種類のCMPRを調製した。<sup>1</sup>H NMR測定より求めた 各CMPRの軸高分子分子量、α-CD貫通数、ならびにカル ボキシメチル基修飾数をTable 1に示す(ポリロタキサン 中のα-CDはエチレングリコール2ユニットを包接するた め、軸高分子の重合度よりα-CD貫通率を計算)。架橋コ ラーゲンゲル微粒子作成の条件検討に先立ち、コラーゲン ゲルを用いてCMPRによる架橋の検討と物性評価を行っ た。コラーゲンは分子中にリシンに由来する一級アミノ基 を有しているため、カルボキシ基を有する化合物と縮合反 応により結合が可能である。そこで、あらかじめ調製した コラーゲンゲルをCMPR溶液に浸漬することで架橋反応 を行った(Fig. 1)。 反応後、各架橋コラーゲンゲル中に残 存するアミノ基を定量した結果、いずれの架橋コラーゲン ゲルにおいても残存アミノ基は20%以下であり、アミノ 基の大部分が架橋されたことを確認した。

次に、各架橋コラーゲンゲルの力学特性を引張強度より評価した(Fig. 2)。NHS/EDCで架橋したコラーゲンゲルやCMC架橋ゲコラーゲンゲルでは、歪みに対して応力がほぼ直線的に増加する傾向が認められた。どちらの架橋コラーゲンゲルも歪みがおよそ10%程度で破断し、破断時において2MPa以下の応力を示した。一方、CMPR架橋ゲルでは、J字型の応力 – 歪み曲線を示した。これは、伸長時に架橋点となるポリロタキサン部位が異動することに起因すると考えられる。また、破断時の歪みも1.5~2倍程度増大するとともに、破断強度も大幅に向上した。特に、軸高分子が短く、α-CD貫通率の低いCMPR (CMPR-17%-10k) ほど低応力高歪みであった。また、軸高分子が長く、

Table 1 CMPR の化学組成

Sample code	$M_{\rm n}$ of PEG axle	Number of threading $\alpha\text{-CDs}$ onto PRX (threading ratio)	Number of CME groups on PRX (per $\alpha$ -CD)	$M_{ m n}$
CMPR-17%-10k	10,000	19.5 (17%)	52.4 (2.68)	32,300
CMPR-37%-10k	10,000	41.9 (37%)	122 (2.92)	58,300
CMPR-20%-35 k $$	35,000	82.3 (20%)	275 (3.34)	132,000
CMPR-37%-35k	35,000	147 (37%)	495 (3.35)	208,000

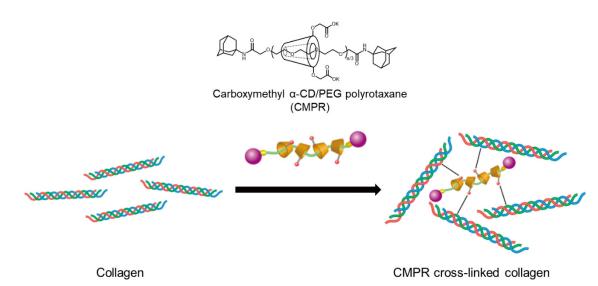
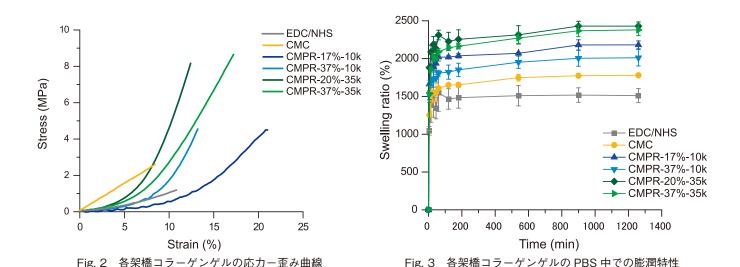


Fig. 1 カルボキシメチル化ポリロタキサン (CMPR) によるコラーゲンの化学架橋



α-CD貫通率の低いCMPR (CMPR-37%-35k)では破断強度が最も高い値を示した。また、各架橋コラーゲンゲルの動的粘弾性測定を行った結果、破断強度の値と相関して、貯蔵弾性率が上昇した。以上の結果より、CMPRによる化学架橋によりコラーゲンゲルの力学特性を大きく改善できるとともに、CMPRの化学組成によって力学特性が変化することを明らかにした。

各架橋コラーゲンゲルの膨潤特性を明らかにするために、 乾燥状態のゲルをPBSに浸漬後の重量変化を調べた (Fig. 3)。その結果、NHS/EDCで架橋したコラーゲンゲルや CMC架橋コラーゲンゲルと比較して、CMPR架橋コラー ゲンゲルでは膨潤度が大きく増大する様子が観察された。 特に、軸高分子の分子量が大きいCMPR-20%-35k、及び CMPR-37%-35kで架橋したコラーゲンゲルにおいて大き な膨潤度を示した。

# 3. 2. ポリロタキサン架橋コラーゲンゲルへの細胞接着性

次に、各架橋コラーゲンゲルの生体親和性を明らかにするために細胞接着性を評価した。細胞として、マウス線維芽細胞であるBALB/3T3細胞を使用した。細胞播種直後から24時間後までは徐々に接着、伸展する細胞数が増加する様子がどのゲルでも観察された(Fig. 4)。しかしながら、72時間後にはポリロタキサン架橋コラーゲンゲル上で伸展した細胞数が顕著に増加している様子が観察された。実際に、細胞接着数を計測した結果、分子量35,000のPEGを軸高分子として用いたCMPR架橋コラーゲンゲル上で細胞数が有意に増加していることが確認された(Fig. 5)。また、接着細胞の形態とアスペクト比を計測した結果、2時間後ではCMPR-37%-35kで架橋したコラーゲンゲルにおいて細胞接着面積の増大が確認され、早期に細胞が

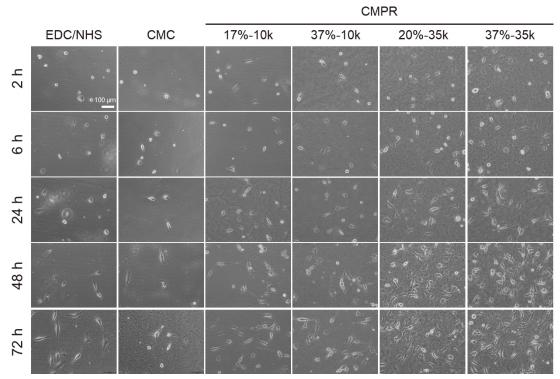


Fig. 4 各架橋コラーゲンゲル上に播種した BALB/3T3 細胞の位相差顕微鏡像

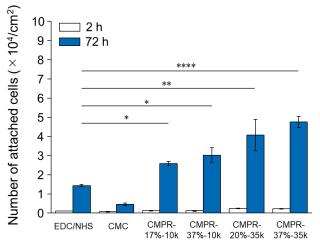


Fig. 5 各架橋コラーゲンゲル上における BALB/3T3 細胞の接着数

伸展していることが示唆された。しかしながら、24~72 時間後の細胞では、各架橋コラーゲンゲル間で接着面積やアスペクト比に有意な差は認められなかった。以上の結果を総合して考えると、力学特性、膨潤度、細胞親和性に優れるコラーゲンゲルを調製するためには軸高分子が長く、α-CD貫通率の高いCMPRが好適であり、微粒子調製の実験ではCMPR-37%-35kを使用することとした。

# 3. 3. コラーゲンマイクロ粒子の調製

これまでに報告されているコラーゲン微粒子の作成方法

を踏襲し、CMPR 架橋コラーゲンゲル微粒子の調製を行った。コラーゲン水溶液と流動パラフィンを混合し乳化後、ただちに CMPR 溶液を加えることで架橋反応を行った。最終的には、Fig. 6 に示すような球状の粒子が得られた。粒子の平均直径は  $3.38\pm1.42\,\mu\mathrm{m}$  であった。粒径のヒストグラムは単峰性であったものの、変動係数は 0.42 と大きく、粒系分布は比較的大きいことが明らかになった。本 CMPR 架橋コラーゲンゲル微粒子を PBS中に分散させ、 $37\,\mathrm{C}$ で浸透しても 1 週間以上は同様の粒子形状を保持していた。一方で未架橋コラーゲンゲル微粒子は 1 週間後に

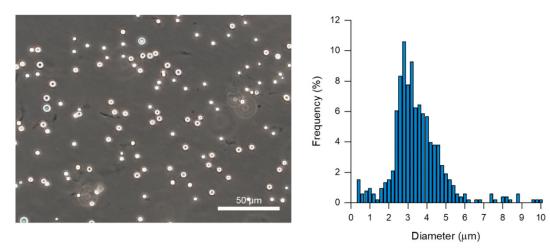


Fig. 6 CMPR 架橋コラーゲンゲル微粒子の位相差顕微鏡像と、粒径のヒストグラム (n=529)

は消失していたことより、CMPRによる架橋が施されていることが確認された。以上の結果より、化学的に安定なCMPR架橋コラーゲンゲル微粒子が調製されたと言える。

# 4. 考察

本研究では、コラーゲンゲルの新たな架橋方法として分 子可動性を有するポリロタキサンによる架橋を検討した。 グルタルアルデヒドなどの従来の化学架橋では、コラーゲ ンゲルの力学特性や化学的安定性が改善されるが、応力-歪み特性が天然のものから大きく変化してしまう点や、細 胞接着性が低下することが課題であった。本研究では、種々 の化学組成のCMPRを用いてあらかじめ調製したコラー ゲンゲルの架橋を行った。予備的な検討としてコラーゲン 溶液中でCMPRと反応後、ゲル化を行ったが、ゲル化し ないサンプルがあったことや、力学特性の改善が見られな かった。これは、CMPRの添加によりコラーゲンの分子 間相互作用によるゲル化が阻害されたと考えられる。一方、 あらかじめ調製したコラーゲンゲルの架橋ではゲル化の条 件は変化しないが、ゲル内部まで均一に架橋できるかが課 題である。実際に得られた架橋コラーゲンゲルではほとん どのアミノ基が反応していたことより、内部まで十分架橋 されていると考えられる。

CMPRで架橋したコラーゲンゲルでは力学的な強度や膨潤度などの物性が、EDC/NHS架橋コラーゲンゲルや分子可動性のないCMC架橋コラーゲンゲルと比較して大幅に向上していた。特に、軸高分子が長く、 $\alpha$ -CD貫通率の高いCMPRでは膨潤度や力学特性に優れることを明らかにした。これは、高分子量の軸高分子を用いることで化学架橋の架橋点間距離が延長されたためであると予想される。また、CMPR-37%-35kで架橋したコラーゲンゲルは細胞の進展や増殖にも優れることが明らかになった。CMPR-37%-35kで架橋したコラーゲンゲルでは、弾性

率の上昇が確認されており、このような力学的特性の違いによって細胞の早期進展や増殖性に変化が表れたと考えられる<sup>9</sup>。

また、CMPR-37%-35kで架橋したコラーゲン微粒子では、同様に調製したコラーゲン微粒子(10~20 µm)よりも粒径が小さいものが得られた<sup>10,11)</sup>。コラーゲン微粒子の粒径は界面活性剤の濃度や攪拌速度によって変化する。架橋剤として添加したCMPRは親水性であり、ただちに水層に分配されると考えられるが、親水性の高分子であるため界面活性剤として機能し、粒径が小さくなったと考えられる。しかしながら、軸高分子の分子量や、あらかじめ油層に溶解した界面活性剤の濃度を詳細に検討することによって、コラーゲン微粒子の粒径は制御できると考えられる。

# 5. 総 括

本研究では、分子可動性を有するポリロタキサンによるコラーゲンゲルの架橋を検討するとともに、架橋コラーゲン微粒子の調製を行った。適切な化学組成のCMPRを用いてコラーゲンゲルを架橋することで、力学特性、膨潤度、ならびに細胞接着性に優れる架橋コラーゲンゲルが得られることを明らかにした。また、本手法を利用してコラーゲン微粒子の調製に成功した。CMPR架橋コラーゲン微粒子は、化学的安定性、細胞親和性、膨潤度に優れることから化粧品成分として有用であると考えられ、今後の応用展開が期待される材料である。

#### 謝辞

本研究の遂行にあたり、多大なるご支援を頂きました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に心より感謝申し上げます。

### (引用文献)

- R. Parenteau-Bareil, R. Gauvin, F. Berthod. Collagenbased biomaterials for tissue engineering applications. *Molecules* 3, 1863–1887 (2010).
- 2) M. I. A. Rodríguez, L. G. R. Barroso, M. L. Sánchez. Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. *J. Cosmet. Dermatol.* 17 (1), 20–26 (2018).
- 3) M. A. Awang, M. A. B. Firdaus, M. B. Busra, S. R. Chowdhury, N. R. Fadilah, W. K. Wan Hamirul, M. Y. Reusmaazran, M. Y. Aminuddin, B. H. I. Ruszymah. Cytotoxic evaluation of biomechanically improved crosslinked ovine collagen on human dermal fibroblasts. *Biomed. Mater. Eng.* 24 (4), 1715–1724 (2014).
- 4) D. H. Lee, A. Tamura, Y. Arisaka, N. Yui. Mechanically reinforced gelatin hydrogels by introducing slidable supramolecular cross-linkers. *Polymers* 11(11), 1787 (2019).
- D. H. Lee, Y. Arisaka, A. Tonegawa, T. W. Kang, A. Tamura, N. Yui. Cellular orientation on repeatedly stretching gelatin hydrogels with supramolecular cross-linkers. *Polymers* 11 (12), 2095 (2019).
- L. F. Hart, J. E. Hertzog, P. M. Rauscher, B. W. Rawe,
   M. M. Tranquilli, S. J. Rowan. Material properties and

- applications of mechanically interlocked polymers. *Nat. Rev. Mater.* in press (2021) DOI: 10.1038/s41578-021-00278-z
- 7) A. B. Imran, K. Esaki, H. Gotoh, T. Seki, K. Ito, Y. Sakai, Y. Takeoka. Extremely stretchable thermosensitive hydrogels by introducing slide-ring polyrotaxane cross-linkers and ionic groups into the polymer network. *Nat. Commun.* 5, 5124 (2014).
- 8) J. Araki, C. Zhao, K. Ito. Efficient production of polyrotaxanes from α-cyclodextrin and poly (ethylene glycol). *Macromolecules* 38, 7524–7527 (2005).
- 9) M. G. Haugh, C. M. Murphy, R. C. McKiernan, C. Altenbuchner, F. J. O'Brien. Significantly influence cell attachment, proliferation, and migration within collagen glycosaminoglycan scaffolds. *Tissue Eng.* Part A 17, 1201–1208 (2011).
- B. Rössler, J. Kreuter, D. Scherer. Collagen microparticles: preparation and properties. J. Microencapsul. 12 (1), 49-57 (1995).
- 11) 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).