

## 論文

架橋剤ゲニピンの添加によって力学特性を高めたインジェクタブル  
コラーゲンゲルの温度応答特性柚木 俊二<sup>\*1)</sup> 畑山 博哉<sup>\*2)</sup> 大藪 淑美<sup>\*1)</sup>Temperature-responsive characteristics of injectable collagen gel with improved mechanical  
properties by the addition of genipin as a crosslinkerShunji Yunoki<sup>\*1)</sup>, Hirosuke Hatayama<sup>\*1)</sup>, Yoshimi Ohyabu<sup>\*1)</sup>

We investigated the temperature-responsive gelation of pepsin-solubilized collagen (PSC)/genipin solutions. Acid-solubilized collagen (ASC), which had been used in a pioneer study for injectable collagen/genipin solution, was also employed as a collagen substrate. The PSC/genipin solutions exhibited fluidity at room temperature for at least 30 min, whereas the ASC/genipin solutions rapidly reached gel points. Gelation occurred in the PSC/genipin solutions at genipin concentrations 0–2 mM under moderate change in temperature from 25 to 37°C. PSC would be preferred over ASC as an injectable gel system. The temperature-responsive gelation of PSC/genipin solutions was due to both genipin-induced crosslinking and collagen fibril formation which respond to the rise in temperature. The elastic modulus of the 0.5% PSC/genipin gel system could be adjusted in a range of 2.5 to 50 kPa by the genipin concentrations. No inflammatory response was observed at any of the implanted sites, suggesting that a PSC/genipin solution is a potential injectable gel system for drug delivery or tissue augmentation.

キーワード：注入用ゲル, 温度応答性, 生体吸収性, 架橋, コラーゲン

Keywords: Injectable gel, Temperature-responsiveness, Bioabsorbability, Crosslink, Collagen

## 1. はじめに

‘インジェクタブルゲル’は、液体状態で体内に注入され体内環境で自発的にゲル化する材料のことで、生体吸収性の細胞足場を生体組織内に低侵襲に構築できる。薬剤と混合すれば薬剤の徐放も可能であるため、組織工学 (tissue engineering) において有望な材料と考えられている<sup>(1)</sup>。温度もしくは pH などの体内環境 (37°C, pH≒7) に応答して物理ゲルを形成する刺激応答性ポリマーがインジェクタブルゲルとして盛んに研究されている<sup>(2)</sup>。

物理ゲルを形成する生体適合性インジェクタブルゲルとしては、生体内の結合組織を構成する主要なタンパク質であるコラーゲンが古くから利用されている。コラーゲン分子は低温かつ酸性条件で安定であるが、体温及び中性 pH に応答してナノ線維を自己組織化し、線維の絡み合いによる物理ゲルを形成する<sup>(3)</sup>。このような物理化学的性質はインジェクタブルゲルに適している。更にコラーゲンは生体適合性、生体吸収性、及び細胞接着性であり、生物学的にもインジェクタブルゲルとして適している。

しかし、得られるゲルは力学的に脆弱で、インジェクタブルコラーゲンゲルの応用範囲は軟組織の補てんやドラッ

グデリバリーの担体等に限定されているのが実情である。コラーゲンの利点を損なわずに力学特性を向上する手段としては、架橋剤を添加する以外にない。伝統的に利用されているコラーゲン架橋剤をインジェクタブルゲルに用いると、架橋剤が直接生体組織の細胞を攻撃してしまう。また、注入前にコラーゲン架橋が生じ、線維能が喪失する場合がある。すなわち、インジェクタブルコラーゲンゲルの利点を損なわずに力学的脆弱性という課題を解決する技術は、これまで開発されていない。

近年、伝統的な架橋剤に比べ細胞毒性が著しく低い植物由来の架橋剤‘ゲニピン’が発見され<sup>(4)</sup>、コラーゲンに対する架橋特性が研究されてきた<sup>(5)</sup>。2011年には、線維化能 (ゲル化能) が高い酸可溶性コラーゲン (ASC) の水溶液にゲニピンを添加し、ゲルを硬化することが実証された<sup>(6)</sup>。しかし、ASC/ゲニピン水溶液の室温での流動性やゲル化の体温応答性については評価が十分でなかった。また、ゲニピンによる組織障害も評価されていないため、医療応用に向けたエビデンスが不足していた。

そこで本研究では、これらの不明な点を明らかにし、線維化能の低いペプシン可溶性コラーゲン (PSC) を用いた体温応答性のインジェクタブルゲルシステムを開発した。ゲニピンによるゲル硬化特性を明らかにし、ラットを用いた動物実験により組織障害が起こらないことも実証した。

事業名 平成25年度 科学技術振興機構 A-STEP 探索タイプ  
\*1) バイオ応用技術グループ

## 2. 実験方法

**2.1 材料** ブタ皮膚由来 PSC 水溶液（日本ハム株式会社製，pH 3 希塩酸溶媒，濃度 1%），ブタ腱由来 ASC 水溶液（新田ゼラチン株式会社製，pH 3 希塩酸溶媒，濃度 0.3%），ゲニピン（和光純薬工業株式会社製），及びリン酸緩衝生理食塩水（PBS）調製用タブレット（Sigma-Aldrich Co. 製）を用いた。ゲニピンの構造式を図 1a に示す。

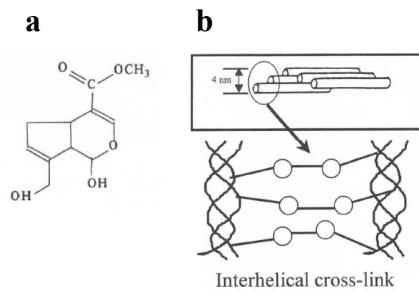


図 1. ゲニピンの構造式(a)及びゲニピンによるコラーゲン分子間架橋の模式図(b)

図 b 中の○はゲニピンを、3 重らせんはコラーゲン分子を示す。

Sung et al. J Biomed Mater Res A. Vol.64, No.3, pp.427-438 (2003)より抜粋。

**2.2 コラーゲン/ゲニピン水溶液の調製** 0.5% PSC/ゲニピン水溶液及び 0.15% ASC/ゲニピン水溶液を以下の手順で調製した。1.0% PSC 水溶液もしくは 0.3% ASC 水溶液 3 g を容量 15 mL の遠沈管に入れ，4°C に保った。2×PBS に溶解した濃度 1–4 mM のゲニピン水溶液（4°C）3 mL を，コラーゲンの入った遠沈管に加え，速やかにボルテックス攪拌した。pH 7 の 0.5% PSC/0.5–2 mM ゲニピン混合水溶液及び 0.15% ASC/0.5–2 mM ゲニピン混合水溶液（共に溶媒は 1×PBS）を得た。コントロールとして，2×PBS を用いてゲニピン不含の pH 7, 0.5% PSC 水溶液及び pH 7, 0.15% ASC 水溶液を調製した。水溶液の調製開始（コラーゲン水溶液に架橋剤水溶液を添加した時点）からレオメータのセンサに置くまでの間を 30 s に設定した。

**2.3 動的粘弾性試験** レオメータ（Thermo Fisher Scientific Inc. 製，HAAKE MARS III）を用いて，コラーゲン/ゲニピン水溶液の室温での流動性変化及び温度応答性のゲル化を計測した。計測にはダブルコーンセンサ DC60/1Ti（直径 60 mm，コーン角度 1 度）及びパラレルプレートセンサ HPP35S（直径 35 mm，センサとゲルのスリップを防止するための溝付きタイプ）を用いた。

架橋剤を含むコラーゲン及びキトサン水溶液に対し，以下に記述する 2 種類の動的粘弾性測定を，線形粘弾性の得られる条件で実行した。水溶液をセンサに載せてから測定開始まで 30 s になるように設定した。

(1) 流動性試験 温度を 25°C に保持した状態で，ダブルコーンセンサ用いて応力制御モード（0.1 Pa の一定せん断応力）で周波数 1 Hz の微小振動を与え，貯蔵弾性率（ $G'$ ）及び損失弾性率（ $G''$ ）の時間変化を追跡した。その時間変化グラフにおいて， $G' < G''$  は水溶液が流動性であることを

示し， $G'$  と  $G''$  が交差する点をゲル化点と定義した。

(2) 温度応答性ゲル化試験 パラレルプレートセンサを用いて，歪制御モード（0.01 の一定せん断歪）で周波数 1 Hz の微小振動を与え，その間に温度上昇を行った。温度を 25°C に保持した状態で計測を開始し，10–40 min 後に 25°C からターゲット温度（30–37°C）への温度上昇を 30 s かけて行い，その後ターゲット温度で保持した。計測の全期間で  $G'$  と  $G''$  を記録した。

**2.4 ゲル貫入試験** テクスチャーアナライザー（Stable Micro Systems 製，TA.XTplus）を用いて，シャーレ上に作製した PSC/ゲニピンゲルの貫入試験を行った。動的粘弾性試験と同様に調製した PSC/ゲニピン水溶液 4 mL を細胞培養用のポリスチレン製シャーレ（内径 55 mm）に分注し，37°C の水浴の液面に固定して 30 min 加温した。その後シャーレを 37°C のインキュベータに 72 h 静置してゲル化を完了させた。このゲル（ $n=5$ ）の中央部に内径 5 mm のプローブを速度 0.2 mm/s で貫入させて応力-歪曲線を得た。歪 0.005–0.04 の直線領域の傾きから，弾性率を算出した。

**2.5 動物実験による安全性評価** PSC/ゲニピン水溶液をラット背部皮下に注入，ゲル化させ，安全性評価を実施した。ゲニピンを 0, 1, もしくは 2 mM 含有した 0.5% PSC/ゲニピン水溶液を，ゲニピン水溶液をフィルター滅菌したこと以外は動的粘弾性試験と同様に調合し，18 G のシリンジを用いて 0.2 mL をラット背部の皮下 6 箇所（ゲニピン濃度 0 mM, 0.5 mM 及び 1 mM の水溶液を各 2 箇所）に注入した。同様の操作をラット 9 匹に対して実施した。動物の活動状態を観察しながら 3 日後，7 日後及び 21 日後（各 3 匹）に体重測定及び屠殺を実施した。屠殺後，注入部位の外観を所見した後，注入部位の組織のヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を行った。

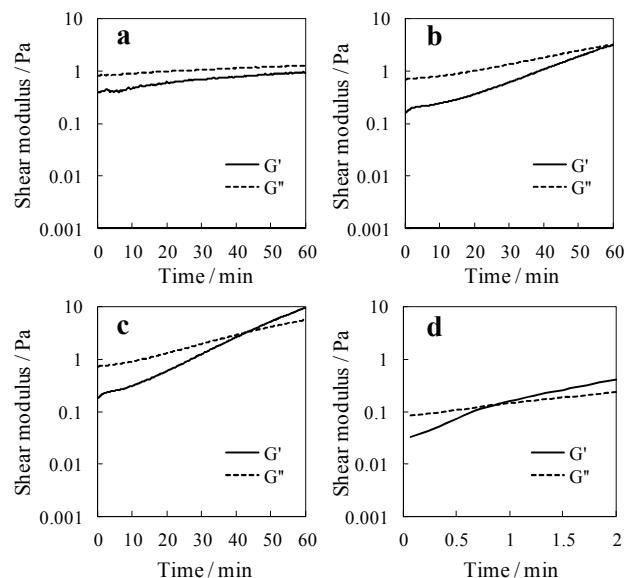


図 2. コラーゲン/ゲニピン水溶液の室温での流動性試験結果<sup>(7)</sup> (a) ゲニピン不含 PSC 水溶液，(b) PSC/1 mM ゲニピン水溶液，(c) PSC/2 mM ゲニピン水溶液，(d) ゲニピン不含 ASC 水溶液。水溶液の溶媒は全て PBS (pH 7)。 $G'$  及び  $G''$  はそれぞれ貯蔵弾性率及び損失弾性率を示す。

### 3. 結果

**3.1 室温でのPSC/ゲニピン水溶液の流動性** PSC/ゲニピン水溶液の室温での流動性試験結果を図2に示す。ゲニピン不含の中性PSC水溶液は、少なくとも60minはゲル化点に達しなかった(図2(a))。ゲル化点に至る時間は、ゲニピンの添加によって濃度依存的に短縮されたが(図2(b)及び(c)), ゲニピン濃度2mMにおいてさえ、ゲル化点に達する時間は30minを超えた(図2(c))。

**3.2 室温でのASC/ゲニピン水溶液の流動性** ASC/ゲニピン水溶液は、ゲニピンを添加しない場合でも1min以内にゲル化点に達し、 $G'$ と $G''$ は時間と共に増加し続けた(図2(d))。ASCは中性で速やかに流動性を失うことが分かったため、以降の実験は全てPSC/ゲニピン水溶液を用いて実施した。

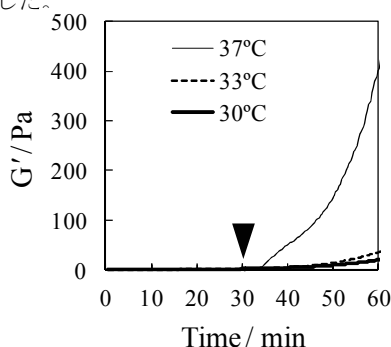


図3. 種々のターゲット温度により得られたPSC/ゲニピン水溶液の温度応答性ゲル化曲線  
ゲニピン濃度は1mM。図中の温度はターゲット温度を、矢印は室温からターゲット温度へと増加させた時点(30min)を示す。

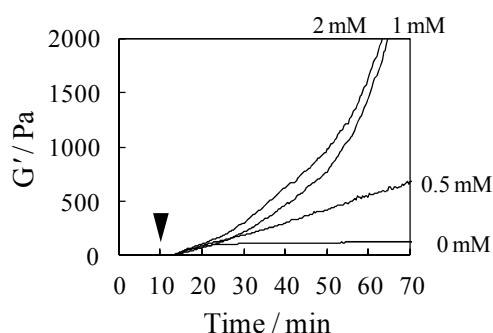


図4. 種々のゲニピン濃度により得られたPSC/ゲニピン水溶液の温度応答性ゲル化曲線  
ターゲット温度37°Cで実施した。図中の数値はゲニピン濃度を示し、矢印は室温からターゲット温度へと増加させた時点(10min)を示す。

**3.3 PSC/ゲニピン水溶液の温度応答性ゲル化** ターゲット温度を変えた温度応答性ゲル化試験を、PSC/1mMゲニピン水溶液に対して実施した結果を図3に示す。室温で流動性を保ったPSC/ゲニピン水溶液の $G'$ (図2(b))は、計測開始から30min後に与えた37°Cへの温度上昇をトリガーとして鋭い上昇を示した(図3)。温度上昇後2minでゲル化点を通過し、30min後に $G'$ は400Paを超えた。一方、

ターゲット温度30°C及び33°Cの場合、 $G'$ の増加は37°Cと比べて著しく小さく、温度上昇後30minの $G'$ は40Paを下まわった。

**3.4 PSC/ゲニピン水溶液の温度応答性ゲル化に及ぼすゲニピン濃度の影響** ターゲット温度37°Cで行った温度応答性ゲル化試験を、ゲニピン濃度を変化させたPSC/ゲニピン水溶液に対して行った結果を図4に示す。PSC/ゲニピン水溶液の $G'$ は、計測開始から10min後に与えた37°Cへの温度上昇をトリガーとしておよそ2minでゲル化点を通過した。 $G'$ はその後も持続的に増加し、その増加速度はゲニピン濃度に依存して高くなった。特に、ゲニピン濃度が1mM以上では、 $G'$ は対数的な増加を示した。一方、ゲニピンを含まないPSC水溶液の $G'$ は、温度上昇後14minで100Paに達した後に増加がほぼ頭打ちになった。形成されたゲルはゲニピン濃度によらず全て白濁し、内部にはゲニピン不含PSCゲルと同様のコラーゲン線維が観察された<sup>(7)</sup>。

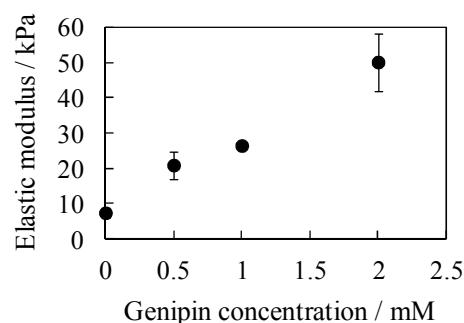


図5. PSC/ゲニピンゲルの弾性率とゲニピン濃度の関係  
作製後37°Cで3日経過したPSC/ゲニピンゲルを貫入試験に供した。

**3.5 PSC/ゲニピンゲルの最終的な硬さ** ゲニピンによるコラーゲンの架橋は3日後に収束することが知られている<sup>(6)</sup>。シャーレ上で十分に成熟させたPSC/ゲニピンゲルの貫入試験結果を図5に示す。ゲルの弾性率はゲニピン濃度の増加と共に高くなり、ゲニピン濃度が2mMの時、弾性率は $50.2 \pm 8.2$  kPaに達した。

**3.6 PSC/ゲニピンゲルの組織障害性** PSC/ゲニピン水溶液を背部皮下に注入したラット計9匹を、3日後、7日後、もしくは21日後まで経過観察したところ(各3匹)、死亡、異常な所見、及び異常な体重変化はいずれも生じなかった。皮下のゲル化部位は周囲の組織に比べて白いため目視で観察でき、ゲル周囲には目視で確認できる炎症反応は認められなかった。ゲル化部位の組織切片のHE染色像を、注入後3日のPSC/2mMゲニピンゲルを代表例として図6に示す。炎症反応が生じた組織はHE染色によって紫に染色されるが、全期間において、ゲル周囲の組織に炎症反応の痕跡はどのゲルについても認められなかった。

### 4. 考察

本研究により、ゲニピン濃度が2mM以下のPSC/ゲニピン水溶液が室温で少なくとも30minは流動性を保ち、室温から体温への温度変化にตอบสนองして鋭いゲル化を示すことが

明らかにされた。ラットを用いた動物実験により、安全性が高いことも実証された。これまでは、コラーゲンに架橋剤を添加すると、室温で固まりやすく操作性が悪いうえ、細胞毒性（組織障害の原因）を惹起すると考えられていた。そのため、コラーゲン/架橋剤の混合水溶液をインジェクタブルゲルに応用する試みはほとんど行われてこなかった。この認識に反して、PSC/ゲニピン水溶液が体温に反応して硬いゲルを形成するインジェクタブルゲルであることを我々は示した。

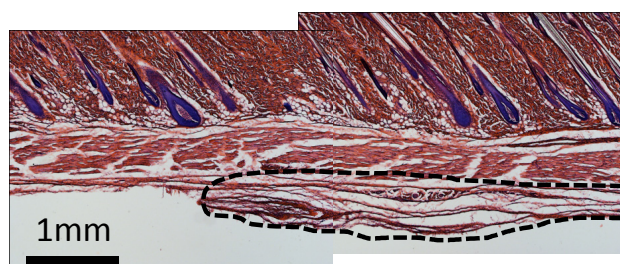


図6. ラット背部皮下に注入して3日後のPSC/ゲニピンゲル及びその周囲の組織切片のHE染色像  
ゲニピン濃度は1 mM。図中の点線の範囲がPSC/ゲニピンゲル。

臨床でPSC/ゲニピン水溶液を用いる場合、室温での流動性がある程度の時間保たれることが望ましい。PSC水溶液とゲニピン水溶液は使用前に調合されるため、粘度の高いPSC水溶液に混入した気泡はその場で除去しなければならない。気泡の除去は遠心分離機を用い、操作には数分間を要する。また、薬物の溶解、シリンジへの充填、長いチューブを用いた送達などに要する時間を考慮すると、体温に反応したゲル化に至るまでに、長く見積もって30 minは流動性が保持されることが望ましい。PSC/ゲニピン水溶液の室温での流動性は、この要求を十分に満足する。

流動性を持ったPSC/ゲニピン水溶液が生体組織に接触した後は、体温に反応した鋭いゲル化を示し、最終的に硬いゲルを形成することが望ましい。ゲル化が遅い場合、注入部位でのゲルのディメンションが保たれない。PSC/ゲニピン水溶液は体温に達した後2 minでゲル化点に達する性質を持ち、注入部位でコラーゲン溶液が拡散する前に固化するものと考えられる。ゲルの硬化は、生体組織の動作や圧力などによってゲルが崩壊することを防いでくれる。

更に、本研究では検証していないが、ゲニピンの添加によってゲルの定着性が向上することが期待できる。皮膚や骨などの結合組織の主成分はコラーゲンであり、その他の組織もタンパク質が主成分である。ゲニピンはコラーゲンのみならずアミノ基を有するタンパク質は全て架橋することができるので、注入後に形成されたゲルと生体組織の間にはタンパク質-タンパク質間の架橋が形成される。ゲルの硬化とゲル-生体組織間の結合により、優れた組織定着性が期待できる。

ゲニピンは1 mMの濃度でコラーゲンゲルの硬化を顕著に高め、その濃度において組織障害を生じなかった。細胞培養液にゲニピンを添加した場合、細胞毒性を生じない上

限濃度は0.5–1.0 mMであるとの報告がある<sup>(8)</sup>。本研究の動物実験ではゲニピン濃度1 mMで組織障害が生じなかったが、その理由として、ゲニピンがゲルからほとんど溶出しなかったことが考えられる。ゲニピンは高分子量化してコラーゲン分子間に導入され、架橋結合を形成することが知られている<sup>(5)</sup> (図1)。PSC/ゲニピンのゲル化は体温に達した後2 minでゲル化点に達するため、ゲニピンが拡散・溶出する前にゲル化が完了したと推定される。

コラーゲン/ゲニピン水溶液がインジェクタブルゲルになり得ることは、Macayaら<sup>(6)</sup>により示されていた。しかし、線維化の活発なASCをコラーゲン基質として用いたため、室温での流動性が急速に失われるゲルシステムであったことが推定される。ゲニピンが直接細胞に作用する系での細胞毒性はこれまで*in vitro*でのみ検証され<sup>(6)(8)</sup>、*in vivo*での検証はなされていなかった。PSCを用いることで室温での流動性と鋭い体温反応性のゲル化を両立したこと、及び*in vivo*での安全性を実証したことが、本研究の進歩性である。

我々は、安全性が高く、従来のコラーゲンゲルよりも硬さが飛躍的に向上した体温反応性のインジェクタブルコラーゲンを開発した。薬剤送達や組織補てん材として有用であり、医工連携による実証試験を進める予定である。なお、本研究の詳細は引用文献<sup>(7)</sup>に記述されている。

#### 謝辞

本研究は、科学技術振興機構 A-STEP 探索タイプ（課題番号：AS242Z01905P）の支援を受けて実施された。

（平成26年7月7日受付，平成26年8月18日再受付）

#### 文 献

- (1) Tan H, Marra KG : "Injectable, biodegradable hydrogels for tissue engineering applications", *Materials*, Vol.3, No.3, pp.1746-1767 (2010)
- (2) Schmaljohann D : "Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery", *Adv Drug Deliv Rev*, Vol.58, No.15, pp.1655-1670 (2006)
- (3) Williams BR, Gelman RA, Poppke DC, Piez KA : "Collagen fibril formation. Optimal *in vitro* conditions and preliminary kinetic results", *J Biol Chem*, Vol.253, No.18, pp.6578-6585 (1978)
- (4) Sung H-W, Huang R-N, Huang LLH, Tsa C-C, Chiu C-T : "Feasibility study of a natural crosslinking reagent for biological tissue fixation", *J Biomed Mater Res*, Vol.42, No.4, pp.560-567 (1998)
- (5) Sung H-W, Chang W-H, Ma C-Y, Lee M-H : "Crosslinking of biological tissues using genipin and/or carbodiimide", *J Biomed Mater Res A*, Vol.64A, No.3, pp.427-438 (2003)
- (6) Macaya D, Ng KK, Spector M : "Injectable Collagen-Genipin Gel for the Treatment of Spinal Cord Injury: *In Vitro* Studies", *Adv Funct Mater*, Vol.21, No.24, pp.4788-4797 (2011)
- (7) Yunoki S, Ohyabu Y, Hatayama H : "Temperature-responsive gelation of type I collagen solutions involving fibril formation and genipin crosslinking as a potential injectable hydrogel", *Int J Biomater*, Vol.2013, article ID. 620765 (2013)
- (8) Sundararaghavan HG, Monteiro GA, Lapin NA, Chabal YJ, Miksan JR, Shreiber DI : "Genipin-induced changes in collagen gels: correlation of mechanical properties to fluorescence", *J Biomed Mater Res A*, Vol.74A, No.2, pp.308-320 (2008)