

# 天然高分子系複合膜の成膜

加藤一徳<sup>\*1</sup> 金山賢治<sup>\*1</sup>

## Preparation of Hybrid Membranes Made of Natural Polymers

Kazunori KATOH, Kenji KANAYAMA

Owari Textile Research Center, AITEC<sup>\*1</sup>

羊毛から抽出したケラチンを溶解した水溶液にキトサン水溶液を滴下することによって、カプセルを作製することができた。アニオン性のケラチンとカチオン性のキトサンが双方の溶液の接触面（球面）上で会合して成膜されたためと考えられた。この膜を赤外分光分析で調べた結果、ケラチンとキトサンに起因する吸収バンドが観察された。また、カプセル内にヘモグロビンを導入し、その放出挙動を調べた。ヘモグロビンの放出速度は、カプセル作製時のケラチン水溶液とキトサン水溶液の濃度に依存して変化した。

### 1. はじめに

ケラチンは髪、羊毛、爪などを構成する繊維状タンパク質である。タンパク質のアミノ酸配列から、ケラチンの分子骨格には比較的たくさんのシステイン残基（5~10 mol%）が存在し、それらが分子間ジスルフィド架橋結合で結ばれている<sup>1)</sup>。また、細胞接着性タンパク質であるフィブロネクチンと同様に、細胞の接着に関与するアミノ酸配列（RGD、LDV）が羊毛ケラチンには存在する<sup>2), 3)</sup>。したがって、ケラチンを動物細胞の培養担体などの医用材料として利用できると期待される。

山内ら<sup>4)</sup>は還元剤と界面活性剤を併用して羊毛からケラチンを高収率で抽出する方法を開発した。筆者ら<sup>5)</sup>は、羊毛から抽出したケラチン水溶液をスプレードライ乾燥して、粉末とし、その粉末を圧縮成型して緻密なフィルムを作製した。このフィルム上で動物細胞を培養したところ、細胞はフィルム表面に接着し、活発に増殖した。

現在、医用に使用される高分子素材として、コラーゲン、キトサンやポリ乳酸などが挙げられる<sup>6)</sup>。このような高分子は、元々体内に多く存在している、または、その加水分解物が代謝中間体である。外科手術用縫合糸として商品化されているほか、再生医療における細胞の足場材料として検討されている。コラーゲンはウシ由来のものが多いので、BSE 問題などでその使用が危惧されている。また、こうした状況の中で、コラーゲンやポリ乳酸以外の天然および合成高分子、例えば、キチン、キトサンやアルギン酸もまた医用高分子素材として活発に研究されている。

上記の高分子を損傷被覆材、Scaffold（細胞足場材料）

や DDS（ドラッグデリバリーシステム）材料、など医用材料として使用するためには、スポンジやマイクロカプセルなどに成形されなければならない<sup>7)</sup>。そこで、筆者ら<sup>8)</sup>は、NaCl を細孔の鋳型とした新規な成型方法により、気孔率 90%以上、細孔径 100~500 μm のケラチンスポンジを作製した。フィルム上における細胞培養と同様に、スポンジ上においても細胞は多数増殖することが認められた。

本稿では、ケラチンから成るカプセルを作製する方法を検討した。アニオン性高分子とカチオン性高分子との間でポリイオンコンプレックス（PIC）を形成させるカプセル化方法は以前から知られ、現在においてもカプセル作製方法の主流である<sup>9)・14)</sup>。ケラチン単独でのカプセル化は知られていないが、ケラチンはアニオン性であるため、代表的なカチオン性高分子のキトサンと複合化してカプセルを作製することを試みた。また、モデル薬物としてヘモグロビンをカプセル内に導入してその徐放性を検討した。

### 2. 実験方法

#### 2.1 試料

羊毛を二亜硫酸ナトリウム、尿素、ドデシル硫酸ナトリウムの混合水溶液に加えて 100、30 分間還元処理することにより、羊毛からケラチンを抽出した。そして、得られたケラチン水溶液をセルロースチューブ（分画分子量：12,000~14,000）に充填し 3 日間透析した後、ロータリーエバポレーター（N-11、東京理科器械(株)製）で濃縮した。そして、精製ケラチン水溶液を 60 でスプレードライ乾燥（Pulvis Mini-Spray GA32、ヤマト科学(株)製）して、微粉末を作製した。

\*1 尾張繊維技術センター 加工技術室

表1に示す3種類のキトサン粉末を共和テクノス㈱から提供された。

表1 キトサンの分子量と脱アセチル化度

|            | 分子量     | 脱アセチル化度 (%) |
|------------|---------|-------------|
| フローナック C   | 70,000  | 85          |
| フローナック NSW | 200,000 | 85          |
| フローナック N   | 750,000 | 85          |

## 2.2 ケラチン-キトサン複合フィルムの成膜と IR 分析

まず、3.0%酢酸水溶液にキトサン粉末（フローナック N）を加え、室温で1日間攪拌して、1.0%キトサン水溶液を作製した。また、蒸留水にケラチンを加え、室温で3時間攪拌して1.0%ケラチン水溶液を作製した。

シャーレ上に1.0%キトサン水溶液を2mlキャストし、風乾してキトサンフィルムを作製した。そして、キトサンフィルム上に1.0%ケラチン水溶液をキャストし、1分経過した後、ケラチン水溶液を除去した。0.5N水酸化ナトリウム水溶液を滴下し、中和後、蒸留水で洗浄した。フィルムを風乾した後、シャーレから剥がした。

赤外分光分析（IR）-ATR法により、得られたフィルムの表面（ケラチン側）における赤外吸収を調べた。

## 2.3 ケラチン-キトサンカプセルの作製

まず、3.0%酢酸水溶液にキトサン粉末（フローナック C, NSW, N）を加え、室温で1日間攪拌して、0.5、1.0、1.5%キトサン水溶液を作製した。また、蒸留水にケラチンを加え、室温で3時間攪拌して1.0、3.0%ケラチン水溶液を作製した。そして、1N水酸化ナトリウム水溶液でケラチン水溶液のpHを10~10.5に調整した。

キトサン2.5mlを20mlガラス製注射器に充填し、ケラチン水溶液50mlに滴下して、30分間攪拌後、生成した直径約5mmのカプセルをpH7.4生理的リン酸バッファ（PBS）に移し、5℃で保存した。

## 2.4 カプセルへヘモグロビンの導入とその徐放

直径約5mmのケラチン-キトサンカプセルを0.2%ヘモグロビン水溶液に約1週間浸漬した。そして、PBS15mlにカプセルを移し、カプセルからPBSに放出されるヘモグロビン量を可視紫外分光分析により測定した。

## 2.5 ケラチン-キトサンマイクロカプセルの作製

キトサン水溶液をスプレードライヤー（Pulvis Mini-Spray GA32、ヤマト科学㈱製）のノズル（孔径0.5mm）から200mlケラチン水溶液へ噴射した。ケラチン水溶液を吸引ろ過して、マイクロカプセルをろ別した。単離したマイクロカプセルを光学顕微鏡で観察した。

## 3. 結果および考察

### 3.1 ケラチン-キトサン複合膜の成膜と IR 分析

ケラチンの等電点<sup>15)</sup>は弱酸性（pI: 4.8~6.0）領域にあるため、中性~弱アルカリ性の水溶液中ではケラチンはアニオン性である。一方、キトサンは、図1に示すようにアミノ基を豊富に持つため、酢酸などの酸性水溶液に溶解する代表的なカチオン性高分子である。したがって、両者の間でイオニックに結合した複合体であるポリイオンコンプレックス（PIC）を形成する可能性がある。ケラチンとキトサンとの間でPICが形成されるかどうかを調べるために、キトサンフィルム上にケラチン水溶液を滴下して複合フィルムを作製後、フィルム表面を洗浄した後、IR-ATR法により、フィルム表面の赤外吸収を測定した。

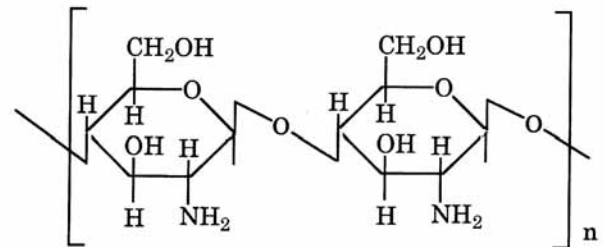


図1 キトサンの分子構造

図2に複合フィルムおよびケラチンとキトサンのIRチャートを示す。複合膜のIRチャートには、ケラチンとキトサンの特性吸収バンドが認められた。したがって、キトサンのキャストフィルム上にケラチンが吸着していることが確認され、キトサンとケラチンとの間でPICが形成されることが示唆された。

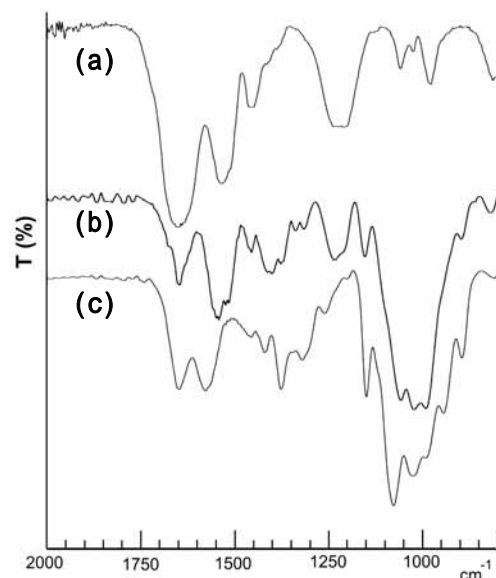


図2 複合フィルム、ケラチン、キトサンのIRチャート、(a);ケラチン,(b);複合フィルム,(c);キトサン

### 3.2 ケラチン-キトサンカプセルの作製

#### 3.2.1 カプセル形成性とキトサンの分子量

分子量の異なる3種類のキトサンを用いて、ケラチン-キトサンカプセルの作製を試みた。1.0%キトサン水溶液を20mlガラス製注射器に充填し1.0%ケラチン水溶液に滴下したところ(図3)、キトサンの分子量が70,000と200,000の場合、カプセルは形成されず沈殿した。一方、分子量750,000では、カプセルが生成した。得られたカプセルの直径は約5mmで、その表面には膜が形成されており、内容物であるキトサン水溶液を封じ込めるに十分な強度を持っていた。ここで、カプセル表面に形成された膜は、アニオン性のケラチンとカチオン性のキトサンとの間で形成されたPIC膜であると考えられる(図3)。

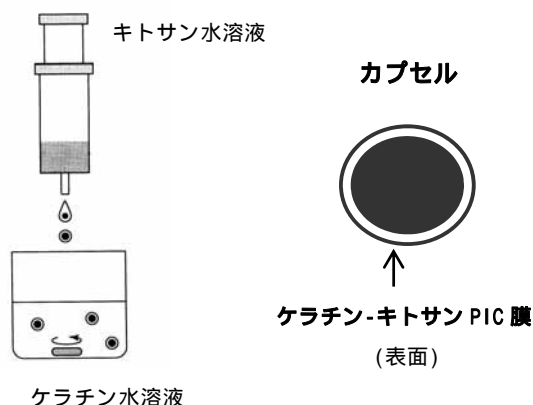


図3 カプセルの作製とカプセルの概念図

#### 3.2.2 カプセル形成性とケラチンおよびキトサンの濃度

種々の濃度のケラチンおよびキトサン水溶液からカプセルの作製を試みた。ここで、使用したキトサンの分子量は750,000である。まず、ケラチンとキトサンの濃度がそれぞれ1.0および0.5%より低いと、カプセルが生成されず、沈殿物が得られた。また、キトサンの濃度が2.0%以上であると、溶液の粘度が高いため、注射器から滴下が困難となり、球形でなく紡錘形のカプセルが得られた。ケラチンの濃度が1.0~3.0%、キトサンは0.5~1.5%において、球形のカプセルが生成した。

#### 3.3 ケラチン-キトサンカプセルへのヘモグロビンの導入

薬物をカプセル内に導入する方法として、溶液(例えば、キトサン水溶液)に予め薬物を溶解した後カプセル化する方法が知られているが、溶液中で薬物に変性して活性を失ったり、カプセル作製中に薬物の殆どが放出されることが問題とされる。したがって、本実験では、カプセルを作製した後、薬物を導入する方法を採用した。

1.0、3.0%ケラチン水溶液および0.5、1.0、1.5%キ

トサン水溶液からカプセルを作製した後0.2%ヘモグロビン水溶液に浸漬してカプセル内にモデル薬物のヘモグロビンを導入した。そして、カプセルをpH7.4生理的リン酸バッファ(PBS)に移した。カプセル内のヘモグロビン量を調べるためにすべてのカプセルを潰して遠心分離後、可視紫外分光分析で上澄み液のヘモグロビン量(吸収ピーク410nm)を測定した。図4に結果を示す。

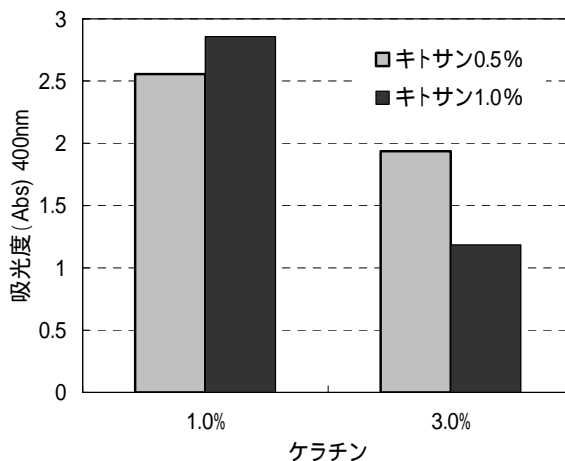


図4 カプセル内へのヘモグロビン導入量

カプセル内にヘモグロビンを導入することは可能であったが、ケラチンの濃度が高いとヘモグロビン導入量が減少した。生成したカプセル表面のPIC膜が緻密で、外部からのヘモグロビンがPIC膜を通過しにくいためと考えられる。

#### 3.4 ケラチン-キトサンカプセルからヘモグロビンの徐放

上記のカプセルからヘモグロビンの徐放性とケラチンおよびキトサンの濃度との関係を検討した。ヘモグロビンの徐放量の経時変化を図5~8に示す。

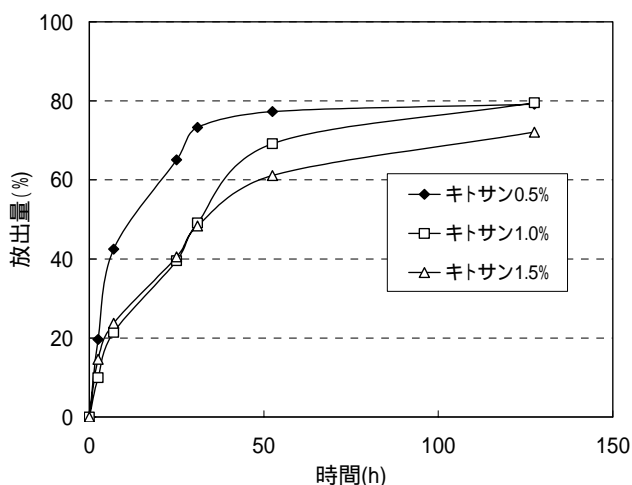


図5 ヘモグロビンの徐放性(ケラチン1.0%一定)

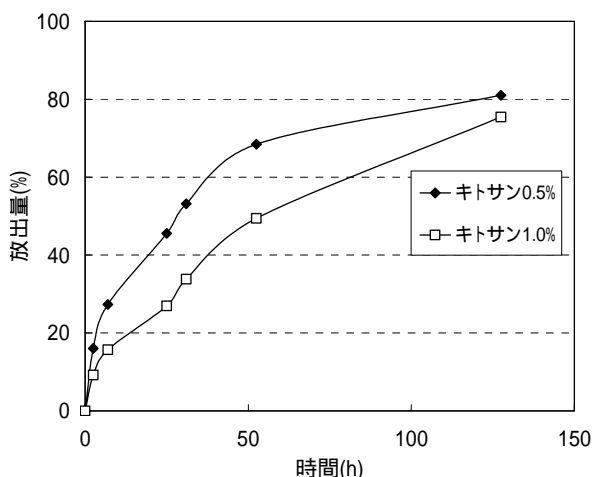


図6 ヘモグロビンの徐放性(ケラチン3.0%一定)

ここで、放出量は、カプセル内のヘモグロビンがすべて放出された場合に100%とした規格化した値である。ケラチン、キトサン水溶液ともに比較的低濃度で作製したカプセルから、ヘモグロビンは20~30時間以内で殆ど放出された(図5)。濃度の増加に伴い、放出速度が低下した(図5、図6)。特に、3.0%ケラチン、1.0%キトサン水溶液から作製したカプセルでは、100時間(約4日間)以上経過してもヘモグロビンの放出が認められた(図6)。

### 3.5 ケラチン-キトサンマイクロカプセルの作製

上記のカプセルを作製する際、キトサン水溶液を注射器で滴下すると直径5mm程度のカプセルが得られた。このカプセル寸法は滴下液の粒径とほぼ一致した。したがって、マイクロスケールのカプセルを作製するためには、滴下液の粒径を小さくする必要がある。そこで、キトサン水溶液をスプレーノズルから噴射した。ここで、キトサン、ケラチン水溶液の濃度はそれぞれ1.0%である。得られたカプセルの光学顕微鏡写真を図7に示す。

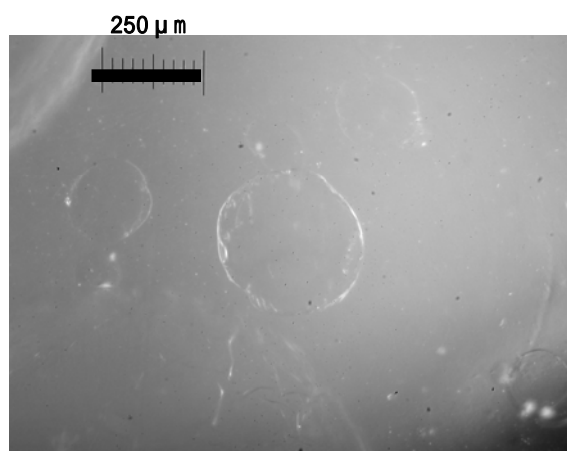


図7 マイクロカプセルの光学顕微鏡写真

スプレーの噴射圧やキトサン水溶液の吐出量などを変更しても、カプセルの直径は大きく変化しなかったが、直径100~500μmのマイクロカプセルを作製することは可能であった。

## 4. 結び

ケラチンを医用材料として利用することを目的として、ケラチンから成るカプセルの作製を目指した。以前からアニオン性高分子とカチオン性高分子との間でポリイオンコンプレックス(PIC)を形成させるカプセル化方法は知られている。ケラチン単独でのカプセル化は知られていないが、等電点が弱酸性域にあるアニオン性のケラチンとカチオン性のキトサンとの間でPICが形成されることがわかった。このことによりケラチン-キトサンカプセルを作製することができた。モデル薬物であるヘモグロビンをカプセルに導入して徐放させることも可能で、また、キトサン水溶液の滴下液の粒径を小さくすることでマイクロスケールのカプセルを作製することができた。

## 文献

- 1) Dowling L.M. et al.: Biochem. J., **236**, 705 (1986)
- 2) Hynes R.O.: Scientific American, **254**, 32 (1986)
- 3) Dowling L.M. et al.: Biochem. J., **236**, 695 (1986)
- 4) Kiyoshi Yamauchi et al.: J. Biomed. Mater. Res., **31**, 439 (1996)
- 5) Kazunori Katoh et al.: Biomaterials, **25**, 2265 (2004)
- 6) 篠 義人編: 化学フロンティア 「再生医工学」, 化学同人 (2001)
- 7) Jeffery R.M. et al.: Tissue Engineering Methods and Protocols, Humana Press (1999)
- 8) Kazunori Katoh et al.: Biomaterials, **25**, 4255 (2004)
- 9) Nilsson K. et al.: Nature, **302**, 629 (1983)
- 10) Lim F. et al.: Science, **210**, 908 (1980)
- 11) Lim F. et al.: J. Pharm. Sci., **70**, 351 (1981)
- 12) Lim F.: Appl. Biochem. Biotechnol., **10**, 81 (1984)
- 13) Kierstan M. et al.: Biotechnol. Bioeng., **19**, 387 (1977)
- 14) Toshimitsu Yoshioka et al.: Biotechnol. Bioeng., **35**, 66 (1990)
- 15) Feughelmann M. et al.: Encyclopedia of Polymer Science and Engineering Vo.8, 566 (1985)