

# 天然高分子マイクロカプセルを用いた多孔質集合体の開発

加藤一徳<sup>\*2</sup> 吉村 裕<sup>\*1</sup> 藤田浩文<sup>\*1</sup>

## Preparation of Porous Matrices of Natural Polymer Using Microcapsules

Kazunori KATOH, Hiroshi YOSHIMURA and Hirofumi FUJITA

Owari Textile Research Center, AITEC<sup>\*1</sup> Research and Development Division, AITEC<sup>\*2</sup>

複数のキトサン-アルギン酸カプセルを鋳型に充填し、羊毛由来のケラチンとトリポリリン酸を作用させた。カプセルは接着し、カプセル集合体となった。カプセル間の接着は、カプセル表面のキトサン（カチオン）とケラチン（アニオン）の間のイオンコンプレックス形成能に加え、トリポリリン酸によるキトサン架橋によると考えられた。このカプセル集合体にヘモグロビンを担持し、その放出特性を調べた。集合体からヘモグロビンは徐放され、蒸留水と比較して電解質水溶液中でその放出は促進された。

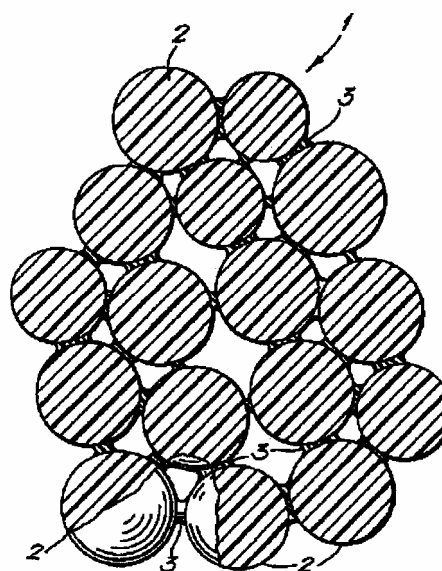
### 1. はじめに

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>。羊毛繊維のしなやかさや強さはこの架橋結合が起因しているものと考えられる。しかしながら、ケラチンをタンパク質として利用する場合、強固な分子間ジスルフィド架橋結合は、羊毛からケラチンを抽出する際の障害となる。羊毛由来のケラチンタンパク質は、そのアミノ酸配列に細胞接着に關与する配列（RGD、LDV）を含んでいるため<sup>2)・4)</sup>、コラーゲンなどの様な医用材料としての利用が期待される。山内ら<sup>5)</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>6)</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。

コラーゲン、キトサン、アルギン酸やポリ乳酸など医用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)材料などに使用するためには、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)・8)</sup>。そこで、筆者らは、ケラチンとキトサンを複合化することにより、マイクロスケールのカプセルを試みている。等電点(pI: 4.8～6.0)<sup>1)</sup>から判断して中性～弱アルカリ性付近でアニオン性のケラチンと、カチオン性天然多糖高分子であるキトサンの間で複合体を形成する。このことより、直径250μm程度の

カプセルを作製した。

本稿では、カプセルを多孔質物に成形するために、複数のカプセルを密に充填した後、カプセル間を接着させることで、**図1**に示すマイクロカプセル多孔質集合体の作製を試みた。また、カプセル集合体の薬物徐放のモデルとして、ヘモグロビンを集合体に担持して、その放出特性も併せて調べた。



- 1 カプセル多孔質集合体
- 2 カプセル
- 3 接着部分

図1 カプセル集合体の概念図

## 2. 実験方法

### 2.1.1 ケラチン

二亜硫酸ナトリウム 150g、尿素 720g、ドデシル硫酸ナトリウム 75g の混合水溶液 1.5L に、羊毛 150g を加えて 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透析用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、ロータリーエボレーター（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 50 でスプレードライ乾燥（Pulvis Mini-Spray GA32、ヤマト科学(株)製）して、粉末状ケラチンを作製した。

### 2.1.2 キトサンおよびアルギン酸

分子量 750,000、脱アセチル化度 85%の粉末状キトサン（共和テクノス(株)製、フローナックN）粉末状のアルギン酸ナトリウム（関東化学(株)製）を使用した。

## 2.2 カプセルの作製

### 2.2.1 ケラチン-キトサン複合カプセル

まず、0.1N 酢酸水溶液にキトサン粉末を溶解し、1.0%キトサン溶液を作製した。一方、蒸留水にケラチン粉末を溶解後、1N 水酸化ナトリウム水溶液で溶液の pH を 8.5～9.0 に調節して 1.0%ケラチン水溶液を作製した。キトサン溶液を、注射器またはスプレーノズル（Pulvis Mini-Spray GA32、ヤマト科学(株)製）からケラチン水溶液中に滴下し、直径約 5mm または約 1mm 以下のケラチン-キトサン複合カプセルを作製した（図 2）。30 分後、カプセルをろ取りし、1%ケラチン水溶液に分散させ、使用するまで 5 で保存した。

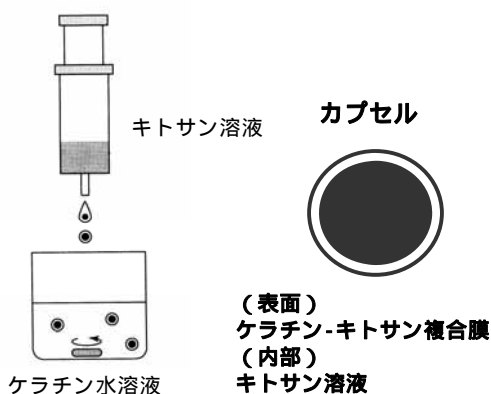


図 2 ケラチン-キトサンカプセルの作製

### 2.2.2 キトサン-アルギン酸複合カプセル<sup>9)・13)</sup>

アルギン酸ナトリウムを蒸留水に溶解した 1.5%アルギン酸ナトリウム水溶液を注射器または、スプレーノズル

から 3.7%CaCl<sub>2</sub>水溶液に滴下、直径約 5mm または 1mm 以下のアルギン酸カルシウムカプセルを一旦作った。そのカプセルを 0.75%キトサン水溶液に移して、キトサンで被覆した。カプセルはキトサン溶液に分散させたまま 5 で保存した。

## 2.3 カプセル間接着方法とカプセル集合体の作製

### 2.3.1 カプセル間接着方法

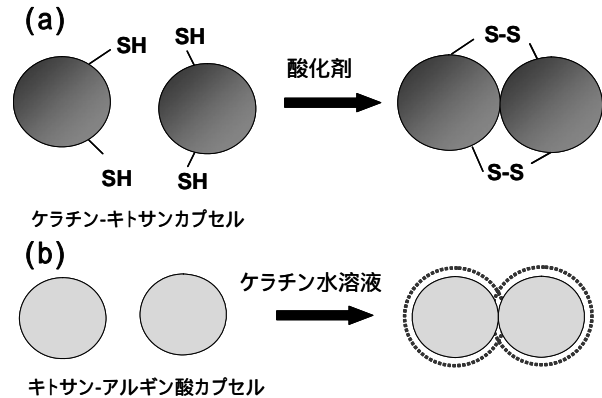


図 3 カプセル間接着の方法

ケラチン-キトサンカプセルには、カプセル表面にケラチンが豊富に存在するため、メルカプト基 (SH) など反応可能な官能基が存在すると考えられる。ケラチン特有の官能基を利用するため、酸化剤（過酸化水素）でジスルフィド結合に架橋させることで、カプセル間接着する方法を検討した（図 3 a）。

代表的なカプセル材料としてキトサン-アルギン酸カプセル<sup>9)・13)</sup>を用いた集合体も検討した。このカプセルの表面を被覆しているキトサンはカチオン性であるので、アニオン性のケラチンを被覆することが可能と考えられる。そこで、複数のキトサン-アルギン酸カプセルをケラチンで被覆することで、カプセルの充填状態を保持する方法を検討した（図 3 b）。

### 2.3.2 カプセル間の接着

カプセル分散液をガラスフィルター付ロートに移し、吸引ろ過して、過剰の溶液を除去した。ロート上に充填された複数のカプセルを接着させるために、ケラチン-キトサン複合カプセルに対して、10%過酸化水素水をロートに流し込み、吸引ろ過した。また、キトサン-アルギン酸複合カプセルに対し、2.0%ケラチン水溶液を流し込んだ。30 分間放置した後、カプセルをロートから取り出し、カプセル間接着の有無を調べた。

2.4 カプセル集合物へヘモグロビンの導入とその放出  
カプセル集合物を 0.4%ヘモグロビン水溶液に 4 日間浸漬した。そして、蒸留水または生理的リン酸緩衝液

(PBS) 40mL にカプセル集合物を移し、カプセル集合物から放出されるヘモグロピンを可視紫外分光分析により検出した。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 カプセル間の接着

図3の2つの方法共に、カプセル間の強固な接着は認められなかった。しかしながら、図3aの方法を修正し、充填した複数のカプセルに2.0%ケラチンと0.1%トリポリリン酸の水溶液を作用させることにより、カプセル間の強固な接着が見られた。トリポリリン酸はキトサンに対する架橋剤として知られている。カプセル表面のキトサンとケラチン間のイオンコンプレックス形成に加え、トリポリリン酸によるキトサンの架橋が、カプセル間を接着したと考えられる。直径約5mmのキトサン-アルギン酸カプセルを接着させたカプセル集合物を図4に示す。



図4 接着後のカプセル

#### 3.2 マイクロカプセル集合体の作製

図5にマイクロカプセル集合体の作製方法を示す。

マイクロスケールのキトサン-アルギン酸カプセルは、1.5%アルギン酸ナトリウム水溶液をスプレーノズルから噴霧することで容易に作製できた。カプセル分散液をフィルター付ロートに注いだ後、過剰のキトサン溶液を除去するために下から吸引した。しかし、カプセルの大きさが小さいと目詰まりを起こす結果、過剰なキトサン溶液を除去できなかった。可能な大きさとして、直径500~800 $\mu$ mのカプセルを使用してロートへのカプセル充填を行った。ケラチン(2.0%)とトリポリリン酸ナトリウム(0.1%)を含む水溶液を注ぎ、15分後ロートから、取り出した。カプセル集合体表面の写真を図6に示す。カプセル間がケラチンで埋められたため、多孔質状とはならず、シート状であった。しかし、表面形態が凹凸で表面積が大きいので、細胞培養基材としては、フ

ィルム材料と比べて多数の細胞を接着および増殖可能と推測された。集合体が高含水率の高い構造物であることから、凍結乾燥など乾燥方法を検討することにより多孔質状に乾燥されると推測される。

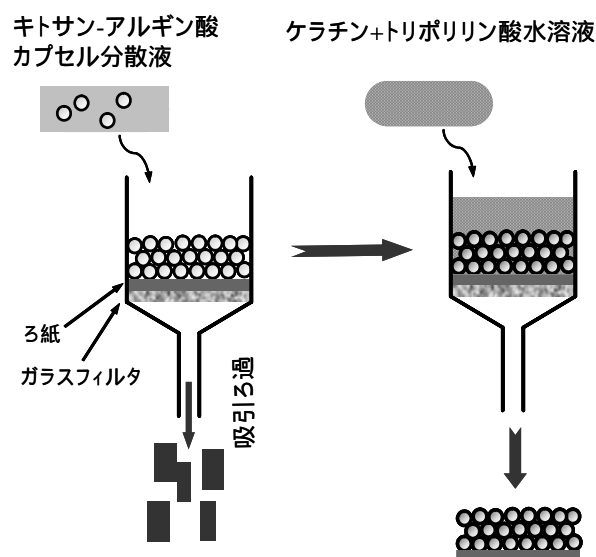
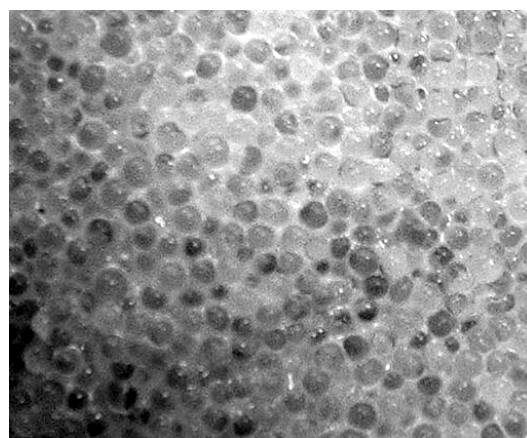


図5 マイクロカプセル集合体の作製



5 mm

図6 マイクロカプセル集合体

#### 3.3 マイクロカプセル集合体へのヘモグロピンの担持と放出挙動

薬物徐放性を調べるためのモデルとして、カプセル集合体にヘモグロピンを担持し、その放出特性を調べた。0.4%ヘモグロピン水溶液にカプセル集合体を浸漬したところ、浸漬1日後にはカプセル部分が赤く染まったので、カプセルがヘモグロピンを担持していることが確認された。浸漬開始から1週間後に浸液に移し、ヘモグロ

ピンの放出を開始した。

図7にカプセル集合体とアルギン酸カプセル単体と比較した結果を示す。ここで、浸液はリン酸緩衝生理食塩水液 (PBS) とした。アルギン酸カプセルからヘモグロビンは短時間で放出された。24 時間後には、ほとんどのヘモグロビンが放出された。一方、集合体からの放出は非常に遅く、ヘモグロビンが徐放されていることがわかった。集合体の場合、カプセル表面にキトサンやケラチンが被覆されており、このことが放出速度を適度に低下させ、長時間にわたるヘモグロビンの放出を可能にしていると思われる。

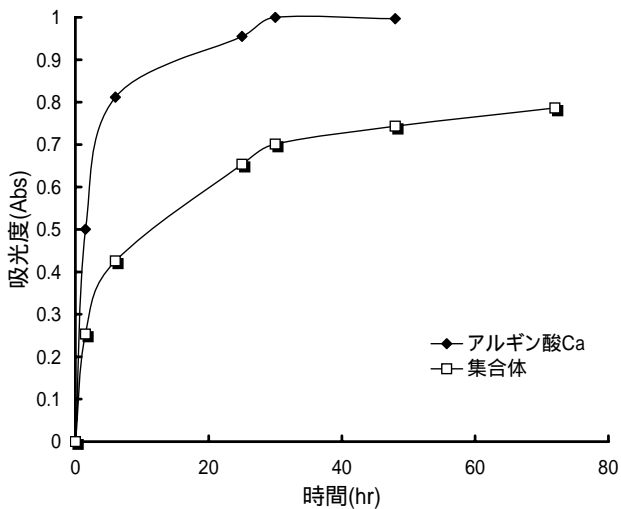


図7 カプセル集合体からヘモグロビンの放出

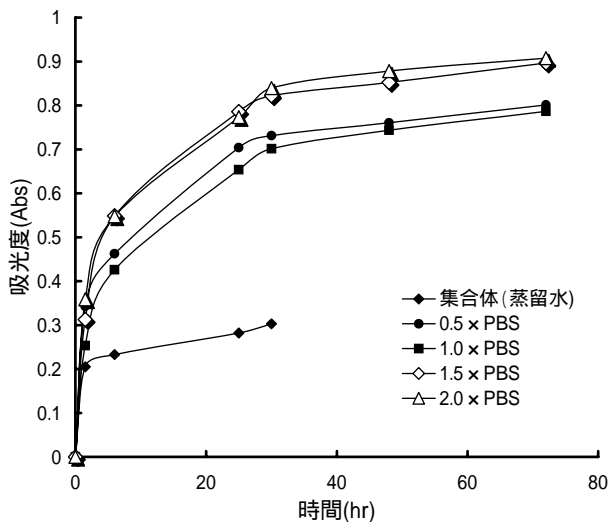


図8 カプセル集合体から種々の浸液への放出

図8に浸液を蒸留水または種々の濃度のリン酸緩衝生理食塩水液 (PBS) とした場合の放出挙動を示す。

蒸留水への放出はほとんど認められなかった。一方、PBS に対してヘモグロビンが放出された。PBS の濃度を変化させたところ、高濃度になるとヘモグロビンの放出が促進される傾向が認められた。浸液の pH は PBS の濃度変化に依らず、7.4 で一定なため、pH の影響とは考えられず、イオン濃度が高い電解質水溶液に対してヘモグロビンの放出が促進されていると推測された。

#### 4. 結び

キトサン-アルギン酸カプセルを、ケラチンを用いて接着させ、カプセル集合体を作製した。カプセル間に空隙は認められず、多孔質状には成形されなかった。

カプセル集合体からのヘモグロビンの放出速度は、カプセル単体と比較して遅く、長時間の放出が認められた。また、イオンの溶解した電解質水溶液においてその放出は促進された。こうした放出挙動は、医用を指向した用途の場合都合が良い傾向と考えられた。

#### 文献

- 1) Feughelmann M. *et al.*: *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, **8**, 566 (1985)
- 2) Dowling L.M. *et al.*: *Biochem. J.*, **236**, 705 (1986)
- 3) Hynes R.O.: *Scientific American*, **254**, 32 (1986)
- 4) Dowling L.M. *et al.*: *Biochem. J.*, **236**, 695 (1986)
- 5) Kiyoshi Yamauchi *et al.*: *J. Biomed. Mater. Res.*, **31**, 439 (1996)
- 6) Kazunori Katoh *et al.*: *Biomaterials*, **25**, 2265 (2004)
- 7) 筏 義人編: 化学フロンティア 「再生医工学」, 化学同人 (2001)
- 8) Jeffery R.M. *et al.*: *Tissue Engineering Methods and Protocols*, Humana Press (1999)
- 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)