

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：24201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23550231

研究課題名(和文) バイオミネラリゼーションに倣った炭酸カルシウム/キトサン複合コアシェル粒子の開発

研究課題名(英文) Biomimetic fabrication of chitosan/calcium carbonate core-shell type composite microparticles

研究代表者

谷本 智史 (Tanimoto, Satoshi)

滋賀県立大学・工学部・准教授

研究者番号：50303350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：生物が体内で無機鉱物を形成する作用「バイオミネラリゼーション」に倣った手法でキトサン微粒子の表面に炭酸カルシウムを析出させ、キトサンをコア、炭酸カルシウムをシェルとする有機無機ハイブリッドコアシェル型複合粒子を作製した。モデル薬物として蛍光色素を導入したキトサン粒子をコアとした複合粒子からの色素放出を種々のpH環境で評価した。その結果、炭酸カルシウムシェルによって薬物放出を制御できることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Chitosan microparticle having calcium carbonate shell was fabricated through a biomimetic process. A hydrophilic fluorescein derivative "uranine" was introduced into the chitosan core particle before the shell formation. The uranine release behavior from the core-shell particles was observed at various pH conditions. The results suggested that the calcium carbonate shell had controlled uranine release from chitosan core particle.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：材料化学・無機工業材料

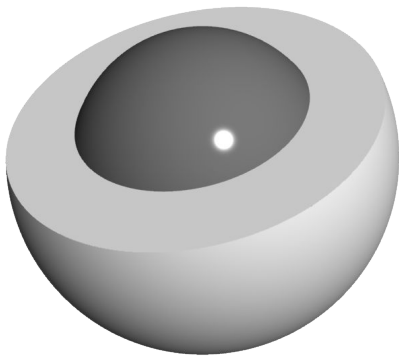
キーワード：ハイブリッド材料 キトサン バイオミネラリゼーション ドラッグデリバリーシステム 微粒子 コアシェル ソフトケミカルプロセス

1. 研究開始当初の背景

微粒子材料は多く実用化され、日常生活には欠かせない材料となってきている。その多くが単一物質を粉体化したものであり、複数の物質を組み合わせた複合微粒子と呼ばれるものにあっては、限られた組み合わせのものしか実用化には至っていない。さらに近年、注目を浴びている有機無機ハイブリッド材料を微粒子化することには大きな可能性が期待されるにも関わらず、実施されている研究は極めて限られたものしかなく、未踏の領域が多く有ると考える。

申請者は平成 15 年度からペプチドを表面に固定化したシリカ微粒子に関して研究を行っており、科研費若手研究に関係テーマが 2 件(課題番号 16750177 及び 21760685)採択されるなど、有機無機ハイブリッド微粒子材料の研究を系統的に行ってきた。その微粒子材料は、コアとなるシリカにペプチドの機能性を付与したものであり、外側が有機物質、内側が無機物質と単なるブレンド材料ではない相分離構造を有した微粒子材料である。

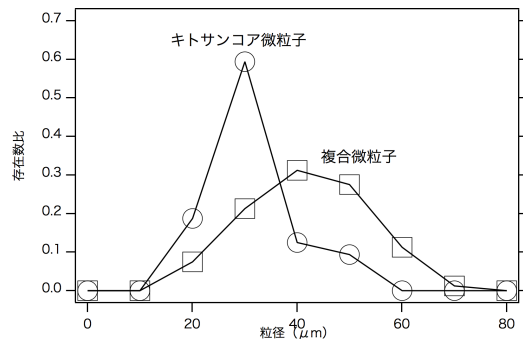
本研究で提案する微粒子材料は、これまでの系とは逆の相分離構造を有している。つまり、内部が有機物質、外側が無機物質の相分離構造となっている。具体的には甲殻類の外骨格から得られる多糖類(キトサン)を球状微粒子化したものをコア粒子として用い、その表面に炭酸カルシウムを析出させた微粒子材料である。



キトサン/炭酸カルシウムコアシェル微粒子

この炭酸カルシウムの析出過程は生物が体内で無機物質を構造材料として用いる方法に倣ったもので、「バイオミネラリゼーション」と呼ばれている。高分子基板表面に対するバイオミネラリゼーションの研究はいくつか為されてきているが、本研究のように制御された構造・形態を有する材料の研究はほとんど見られない。そこで、我々はキトサン微粒子の作製方法から新たに検討することで粒径・構造・形態の制御に取り組んで来た。現時点では、次図のように粒径分布の単峰性を維持したまま、粒子の複合粒子化が進行することを明らかにし、加えて、複合化のメカニズム解析の端緒に辿り着いた段階で

ある。この結果は、既に報文として発表している。ただ、この手順で得られる微粒子のサイズに関しては十分に制御出来ているとは言えないのが現状であり、適応できる応用範囲には限界があった。したがって作製時のパラメータと粒子の構造との関係を明らかにすることが必要で有ることは言うまでもない。



キトサンコア粒子と複合粒子の粒径分布

また、このコアシェル型微粒子が生体適合性材料のみからなることより、ドラッグデリバリー材料としてのニーズ及び可能性が有ることがわかってきた。そのための粒径の小型化と試験的研究が今後、実施すべき研究内容である。

2. 研究の目的

本申請の研究では、甲殻類の外骨格や貝類の真珠などの形成の仕組みであるバイオミネラリゼーションという作用に倣った方法で、有機高分子(キトサン)をコア、無機物質(炭酸カルシウム)をシェルとする有機無機ハイブリッドコアシェル型複合粒子を作製することを目的とする。この材料は非常にシンプルな手順で作製することができ、粒径も揃っているため、新規な微粒子材料として環境調和型表面改質剤などの利用が期待できる。また、生体適合材料の組み合わせから成っており、コアシェル型であるため、ドラッグデリバリーを意識した無機系マイクロカプセルとしての可能性も考えられるため、本研究計画においてはこの第二の可能性についても検討する予定である。コア部分にモデル薬物を含浸させたものからの、薬物放出実験を行う。無機シェルが pH によって異なる溶解挙動を示すことを利用し、モデル薬物の徐放制御を目指す。これは言うまでもなく、ドラッグデリバリー材料を意識している。

3. 研究の方法

キトサン/酢酸溶液をトルエン中に混合することで水/油型分散液を作製する。続いてアルカリを添加し、水相の液滴を中和する。キトサンは中性では溶解しないため、液滴のサイズと形状を反映した球状微粒子として析出する。このキトサン微粒子を洗浄・回収

し、そのまわりに炭酸カルシウムを析出させることで、コアシェル型の構造を有する有機無機ハイブリッド粒子を得る。この炭酸カルシウムのキトサン表面での析出は、バイオミネラル化の仕組みに従ったものである。まずは作製手順の各種パラメータを確立することに注力する。作製条件を確立した後は、薬物包含マイクロカプセルとしての応用を検討する。また、シェルの無機成分として金属を用いることも検討する。表面が金属シェルで覆われた粒子材料はマイクロ波による加熱ができるため、マイクロリアクター材料としての可能性も期待できる。

(1) キトサンコア粒子の粒径制御

キトサンコア粒子の作製は、キトサン/酸性水溶液をトルエン等の有機溶媒中に分散した状態で行う。液滴の状態からアルカリによって中和することで、キトサンを析出させ液滴の形状を反映させたキトサン微粒子を得るのである。したがって、分散液滴のサイズ・形状を制御すればキトサンコア粒子の形態制御をすることができるはずである。分散液を安定化させるためには界面活性剤を系内に共存させることを行う。この界面活性剤の種類と濃度が重要なパラメータと考えられるため、詳細な検討を行う。すでに界面活性剤の濃度が粒径に及ぼす影響に関しては検討を始めており、サイズ制御の可能性が見出されている。

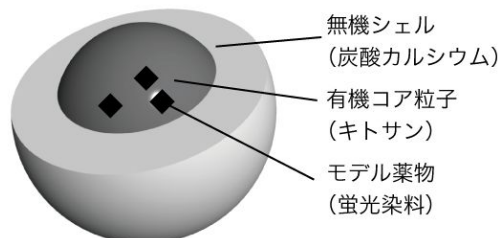
(2) 炭酸カルシウムの析出(バイオミネラル化)の条件確立

バイオミネラル化は炭酸カルシウムの飽和水溶液に洗浄済みのキトサンコア粒子を導入することで行う。その際にキトサン表面とカルシウムイオンとのバインダーとして側鎖に酸性基を有する高分子であるポリアクリル酸を添加している。これまでの研究ではポリアクリル酸の濃度により、析出する炭酸カルシウムの形状が異なることが分かってきている。初年度はポリアクリル酸の濃度に関する検討を行ない、バイオミネラル化条件の確立を目指す。

(3) マイクロカプセルとしての利用

ドラッグデリバリー用マイクロカプセルとしての利用を検討する。モデル薬剤としてはピレン、ローダミン、フルオレセインなど疎水性から親水性までの有機化合物を用いる。モデル薬剤を複合微粒子内に取り込むには、キトサンコア微粒子をモデル薬剤の溶液に浸漬することによる。多くの場合、モデル薬剤は疎水性相互作用によりキトサンコア粒子の内部または表面に吸着すると考えられる。このモデル薬剤含浸コア粒子に対してバイオミネラル化を施し、炭酸カルシウムシェルによって封じ込める。その後、モデル薬剤放出実験を行う。薬剤の放出は分光光度計によって判定する。炭酸カルシウム

は酸性条件下で溶解することが考えられるため、pH 応答性のマイクロカプセルとして振舞うことが期待できる。



有機無機コアシェル粒子のカットモデル

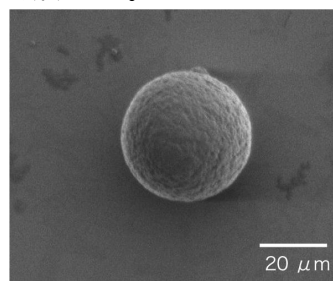
(4) 表面の金属によるコーティング

コア粒子としてはキトサンを利用するが、シェル部分の無機物質として金属が利用できないかを検討する。金属のバイオミネラル化は実施例も少なく、報告例も非常に限られた金属群のみであるため、極めてチャレンジングなテーマではあるが、成功すれば、マイクロ波を利用した無接触加熱が可能でマイクロカプセルを開発することができる。これを生体内利用するなら「ドラッグターゲティング」材料と考えられる。また体外での利用であるなら、加熱のできるマイクロリアクターなどという新規な領域に踏み込んだ材料となるはずである。

4. 研究成果

(1) 初年度

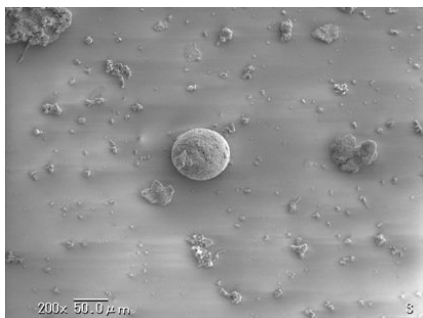
甲殻類の外骨格や貝類の真珠などの形成の仕組みであるバイオミネラル化という作用に倣った方法で、天然多糖であるキトサンをコア、炭酸カルシウムをシェルとする有機無機ハイブリッドコアシェル型複合粒子を作製した。初年度は、キトサンコア粒子の粒径制御に関わるパラメータの検討を主に行った。キトサンコア粒子の作製は、キトサン酸性水溶液/トルエン分散液を中和することで行う。分散液中の液滴のサイズ・形状を制御することで、キトサンコア粒子の形態制御をできると考えた。キトサンの濃度、作製時の温度、分散液を安定化させるための界面活性剤の濃度などのパラメータを検討し、概ね安定して真球度の高い粒子を作製することのできる条件を得ることに成功した。



キトサンコア粒子のSEM画像

また、キトサンの分子量を変化させると調製パラメータが大幅に変わることがわかってきたため、それらの関係性についても調査を継続している。さらに小粒径のコア粒子を得るため作製時に超音波照射を行った。その結果、粒径を小さくすることに成功した。

炭酸カルシウムのバイオミネラリゼーションの条件に関しては概ね確立することに成功した。バイオミネラリゼーションの際に補助剤として添加するポリアクリル酸が炭酸カルシウムの析出に影響を及ぼすことが明らかになったものの、そのメカニズムに関しては検討の継続が必要である。



バイオミネラリゼーションによって炭酸カルシウムシェルを付与した微粒子

この研究で作製する複合粒子はコアに天然多糖高分子を用い、シェルに炭酸カルシウムを用いており、環境調和型材料としての意義が大きい。本研究で目的の1つとしている粒径の制御が確立できたならば、体内使用を含む様々な領域への応用が期待できる。また、コア部分に用いているキトサンは抗菌作用なども有しており、新たな薬物担持基材としての期待も大きい。

(2) 第二年度

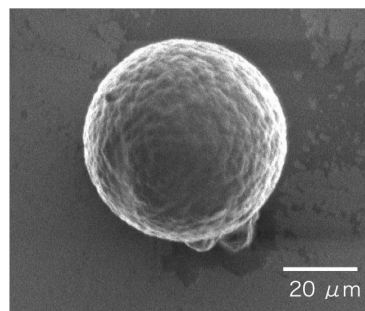
二年度目である24年度は、研究実施計画に掲げていた「マイクロカプセルとしての利用」に関する研究、中でもキトサンコア粒子へのモデル薬物導入の試みに注力した。

モデル薬物としては、ウラニン（親水性官能基を導入した蛍光色素フルオレセイン誘導体）を選択した。ウラニンはフルオレセインと同様の蛍光挙動を示す親水性の色素である。モデル薬物をキトサンマイクロ粒子に取り込むには、次のような手順を試みた。キトサンの酢酸水溶液にモデル薬物を添加しておき、界面活性剤を含むトルエン溶液と攪拌混合した状態で水酸化ナトリウムによって酢酸を中和した。キトサンは中性域で析出するため、微粒子として得られる。析出・微粒子化の際にモデル薬物は粒子中に取り込まれた状態となると考えられる。

キトサン粒子を粉砕したものの蛍光測定の結果、得られたキトサン微粒子の内部にはウラニンが導入されていることがわかった。また、ウラニン導入キトサン微粒子からは酸性域でウラニンが徐放されることも明らかとなった。キトサンはこれまで廃棄に回され

ていた天然物であり、薬物の徐放担体への利用を検討することは非常に意義がある。今後、当初の計画にそって炭酸カルシウムによるコアシェル複合化が成功すれば、薬剤放出の制御がより容易になると期待できる。

また、当初の計画では25年度に予定していた金属とキトサンのコアシェル複合化にも既に着手しており、複合微粒子の調製手順・条件に関する知見も得られ始めている。



金属シェルを付与したキトサン微粒子

(3) 第三年度

最終年度である25年度は、研究実施計画に掲げていた「マイクロカプセルとしての利用」に関する研究に注力した。まず、キトサンマイクロコア粒子へモデル薬物を導入した。モデル薬物としてはウラニン（親水性官能基を導入した蛍光色素フルオレセイン誘導体）を選択した。また、ウラニン導入キトサン微粒子からは酸性域でのみウラニンが放出されることが第二年度に明らかにされていることから、次に、炭酸カルシウムによる無機シェルの付与を行い、ウラニン放出の制御を評価・比較した。その結果、コア微粒子の状態ではウラニンの放出が観察された酸性域で、ウラニンの放出が抑制されることが観察された。この結果に関しては、再現性の確認を実施しているところである。キトサンはこれまで廃棄に回されていた天然物であり、本研究で薬物担体としての可能性が示されたことには非常に意義があると言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 10 件)

Satoshi Tanimoto, Shohei Ida, Yoshitsugu Hirokawa, Preparation of chitosan microparticles having calcium carbonate shell via soft chemical process, ACS National Meeting, 2014/08/12, San Francisco
Satoshi Tanimoto, Ayaka Satoh, Shohei Ida and Yoshitsugu Hirokawa, Preparation of chitosan microparticles having inorganic shell via soft chemical process, the

10th International Conference of the Asian Pacific Chitin Chitosan Symposium, 2013/10/05, Yonago Convention Center

谷本智史、佐藤彩香、井上隆太、フィンピンホア、伊田翔平、廣川能嗣、無機シェルを有するキトサン微粒子のソフトケミカル調製、第 62 回高分子討論会、2013/09/16、金沢大学

谷本智史、佐藤彩香、伊田翔平、廣川能嗣、金属金のシェルを有するキトサン微粒子のバイオミメティック調製、第 62 回高分子学会年次大会、2013/05/30、京都国際会館

佐藤彩香、伊田翔平、廣川能嗣、谷本智史、キトサンを用いた有機 / 無機コアシェル微粒子のバイオミメティック調製、第 61 回高分子討論会、2012/09/19、名古屋工業大学

佐藤彩香、伊田翔平、廣川能嗣、谷本智史、金属金のシェルを有するキトサン微粒子のバイオミメティック調製、第 58 回高分子研究発表会(神戸)、兵庫県民会館、2012/07/13

谷本智史、佐藤彩香、伊田翔平、廣川能嗣、無機殻 / キトサンコア型複合微粒子材料のバイオミネラリゼーションによる作製、第 26 回キチン・キトサンシンポジウム、北海道大学、2012/07/12

佐藤彩香、伊田翔平、廣川能嗣、谷本智史、金属/キトサン複合微粒子のバイオミメティック調製、第 61 回高分子学会年次大会、パシフィコ横浜、2012/05/31

佐藤彩香、伊田翔平、廣川能嗣、谷本智史、金属/キトサン複合微粒子のバイオミネラリゼーションに倣った調製、第 60 回高分子討論会、岡山大学、2011/09/28

佐藤彩香、伊田翔平、廣川能嗣、谷本智史、金属/キトサン複合微粒子のバイオミネラリゼーションに倣った調製、第 25 回キチン・キトサンシンポジウム、奈良県新公会堂、2011/08/31

〔図書〕(計 1 件)

谷本智史、他、技術情報協会、生体模倣技術と新材料・新製品開発への応用、2014 夏出版予定

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.mat.usp.ac.jp/polymer-chemistry/index_j.html

http://db.spins.usp.ac.jp/html/166_ja.html

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

谷本 智史 (TANIMOTO, Satoshi)

滋賀県立大学・工学部・准教授

研究者番号：50303350

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし