

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 1 日現在

機関番号：17104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24760549

研究課題名(和文)有機-無機複合体マイクロカプセルを用いた微小空間における生理活性物質の合成

研究課題名(英文)Synthesis of biomolecule using organic-inorganic hybrid capsules

研究代表者

城崎 由紀 (Shirosaki, Yuki)

九州工業大学・若手研究者フロンティア研究アカデミー・准教授

研究者番号：40533956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：キトサンにケイ酸化学種を分子レベルで修飾し皮膜の物質透過性を制御したマイクロカプセルを創製し、カプセル内部の微小空間において生理活性物質を合成することが目的である。皮膜あるいはカプセル内にカルシウムイオンを導入し、それらのアパタイト形成能を確認した。またカプセル作成時に細胞や生理活性物質を内包すると、その後の洗浄過程等で死滅したり失活する為、カプセル作成後にインジェクションによって内部に生理活性物質を導入することを試み、通常吸着法では担持できない量の薬剤を包括可能であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Chitosan is a polycation and can form the polymerized membranes by the reaction with polyanions. We prepared the chitosan-silicate hybrid membranes via the sol-gel process. Their wettability, mechanical properties, and degradability were controllable by the density of cross-linking between the amino groups of the chitosan chains and the epoxy groups of GPTMS. Moreover, the hybrid membranes had excellent cytocompatibility for various cells, such as osteoblastic cells, fibroblast cells, and human gingival cells. In this study, the capsules were prepared from the chitosan-GPTMS hybrids precursor sol for the controllable releasing by the crosslinking of the chitosan matrix. And then, the capsules were modified by hydroxyapatite to improve their mechanical properties. The drug model was injected by micro manipulation methods.

研究分野：生体材料化学

キーワード：有機 - 無機複合体 カプセル 薬物徐放

1. 研究開始当初の背景

再生医療の発展により、細胞が有する種々の機能を利用した次世代医療システム“細胞療法”が注目されている。細胞を安定に機能させる為には、免疫系に影響を与えず、生体内で非自己の機能性細胞を長時間生存させる必要がある。これまでにアルギン酸等の高分子材料を用いて細胞を包括固定化し、生理活性物質を生体内で分泌するカプセルの作製が試みられている。カプセル皮膜が包括細胞を免疫系から保護し、その皮膜の物質透過性によって細胞が分泌した生理活性物質を恒常的に徐放可能である。またマイクロサイズのカプセルは注射器等で使用可能なことから注入型材料としての応用が期待できる。一方、近年 Hench らは Bioglass® と呼ばれるガラスから溶出したケイ酸成分が骨芽細胞の遺伝子を活性化させると指摘した。しかし数多くの重合状態を呈示するケイ酸塩イオンのうち、どれが効果的なのかは全く解明されていない。さらに、コロイダルシリカは結合組織の発達を促進しアモルファスシリカはラット創傷部の再生を促す等の報告はされているが、骨以外の組織に対するケイ酸化学種の影響は詳細には分かっていない。ケンキュ代表者らはキトサンとシランカップリング剤から高い骨芽細胞適合性を有する有機-無機ハイブリッド複合体を開発した。このハイブリッド複合体は膜や多孔質体を作製することができ、合成条件を調整すればその分解性を制御することも可能で、ヒト大腿骨由来骨髄細胞において良好な接着・増殖を示し高い石灰化能を示した。また神経組織再生の足場材料としても本ハイブリッド複合体は良好な結果を示している。さらに前駆的研究(若手スタートアップ 2009 年度, 研究活動スタート支援 2010 年度)において、本複合

体と同組成のゾル溶液からマイクロカプセルを作製し、その内部に骨芽細胞を包括することが可能であることが分かった。そこで、本カプセルの微細構造をケイ酸種の加水分解・縮合反応により制御し、各種細胞をカプセル内部に包括させ集積し 3 次元体組織を構築する。カプセル内部で骨髄由来間葉系幹細胞の骨分化活性を誘発させ、リン酸カルシウム系生理活性物質を産生させる。カプセル内外のイオン拡散を制御し、リン酸カルシウム系化合物をカプセル内部で合成する。の 3 点を可能とする新規カプセル皮膜を創製し、カプセルの特性とケイ酸化学種の微細構造との関連を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

カプセル皮膜の組成および合成条件を検討し、下記の二点に着目して、マイクロカプセルの微細構造(カプセル膜の構造, 物質透過性, 分解性, 機械的特性), 修飾したケイ酸化学種の徐放挙動(加水分解・重縮合反応制御), および高生体機能性発現(細胞増殖性, 細胞分化活性, 細胞からの生理活性徐放挙動, タンパク質吸着挙動)の相関を学術的に追求する。

細胞包括マイクロカプセルの集積による 3 次元体組織の構築: 骨芽細胞を初めとする各種細胞を内部に包括させたマイクロカプセルを目的の形に集積させ, 3 次元体組織を構築する。マイクロカプセルの特性と細胞挙動との関係から組織再生の機構を明らかにする。またケイ酸化学種(濃度, 構造)による各細胞挙動の詳細を明らかにする。

マイクロカプセルを用いた微小空間でのアパタイト合成およびタンパク吸着挙動: ミクロカプセル内で化学的な反応あるいは細胞の分化活性を用いてアパタイトを合成す

る。得られたアパタイトの微細構造・化学的性質と細胞接着/タンパク質吸着挙動との関係を明らかにする。

3. 研究の方法

キトサン0.03 gを0.1 M 酢酸 3.00 gに加えて室温で1時間攪拌し、さらに0.1 M 酢酸カルシウム水溶液を6.5 g加え室温で1時間攪拌した。キトサン：GPTMSのモル比が1：2となるようGPTMSを加えて室温で1時間攪拌し、キトサン-GPTMS溶液を調製した。蒸留水に0.5 w/v%となるようCMCを溶解させCMC溶液を調製した。キトサン-GPTMS溶液をスターラーで攪拌しながら、そこにディストリマンピペットを用いてCMC溶液を1 μ Lずつ滴下し、5分間攪拌してキトサン-シロキサン複合カプセル (ChG) を得た。

ChG 50個を、37°Cで30分間、5 mLの200 mM CaCl_2 水溶液と5 mLの120 mM Na_2HPO_4 水溶液に交互に3回浸漬し、アパタイト被覆型キトサン-シロキサン複合カプセル (ChG+HAp) を得た。得られた試料の結晶構造を、粉末X線回折法を用いて調べた。試料形態を走査電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察し、エネルギー分散型X線分光装置 (EDX) にて元素分析を行った。SEM観察に用いる試料には、事前にPt-Pdを蒸着した。

マイクロカプセル内での細胞培養

ChGカプセル作製時に骨芽細胞懸濁液をCMC溶液に混合し、細胞包括カプセルを作製した。酢酸溶媒をアスコルビン酸、グルタミン酸に変えたものも同様に作製した。作製後のChGカプセル内にマイクロキャピラリーを用いて細胞培養懸濁液を後から注入することも試みた。

アパタイト修飾マイクロ粒子を用いた薬物徐放挙動試験

骨形成タンパク質のモデル物質としてシトクロムC (Cyt. C) を用いた。含浸法を用いた際、各試料の最大担持量は、試料1個当た

り、ChGで約30 μ g、ChG+HApで約9.3 μ gであった。各最大薬剂量担持試料10個をpH3生理食塩水200 μ Lに浸漬し、37°C、静置環境下で保持した。浸漬後10、20、30、40、50分、1、2、3、4、5、6時間後の上清を採取し、マイクロプレートリーダーを用いて波長528 nmの吸光度を測定し、各試料のCyt. C徐放率を算出した。

次に、ChG+HApを薬剤担体とし、マイクロインジェクション法にて含浸法よりも多くの薬剤が導入可能かの検討を行った (図1)。9.3 μ gおよび27.9 μ g/0.3 μ LのCyt. C溶液を調製して試料1個当たり約0.3 μ Lをマイクロキャピラリーを用いてインジェクションし、試料1個当たりそれぞれ9.3 μ gおよび27.9 μ gのCyt. Cを導入した。試料各10個をpH3生理食塩水200 μ Lに浸漬し、37°C、静置環境下で保持した。浸漬後10、20、30、40、50分、1、2、3、4、5、6時間後の上清を採取し、マイクロプレートリーダーを用いて波長528 nmの吸光度を測定し、各試料のCyt. C徐放量 (μ g) を算出した。

4. 研究成果

マイクロカプセル内での細胞培養

酢酸溶媒をアスコルビン酸、グルタミン酸に変更し、カプセル作製時に細胞を包括することを試みたが、カプセル作製後の洗浄操作時に細胞が死滅することを防ぐことはできなかった。一方、作製後のカプセルにマイクロインジェクション法を用いて細胞懸濁液を注入することはできたが、注入時キャピラリーによって形成した穴が塞がらないため、細胞が孔から漏れたり、皮膜特性 (強度、粘弾性) がインジェクション作動に適さず、キャピラリーを引き抜く際に、カプセルが崩壊した。よって、ChGカプセル皮膜をヒドロキシアパタイトで修飾しカプセル皮膜強度を向上させた (ChG+HAp)。

マイクロカプセルを用いたアパタイト合成

XRD 回折図より ChG+HAp において $2\theta = 26^\circ$ および 32° 付近に HAp (ICDD PDF #09-0432) に帰属されるピークが検出された。EM 像より, ChG 表面は平滑である一方, ChG+HAp 表面には析出物が観察された。また, EDX スペクトルより, ChG においては観察されなかった Ca および P のピークが ChG+HAp においては検出された。これらより, ChG+HAp 表面に観察された析出物は HAp であると考えられる。

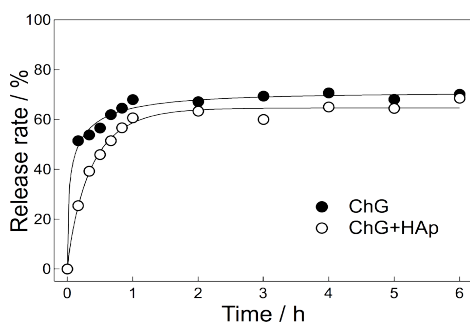


Fig. 2 Release rate of Cyt. C from ChG and ChG+HAp as a function of time.

Table 1 Constants (a, b and k) in Weibull model about Fig. 2.

Sample	a	b	k
ChG	2.33 ± 0.15	0.37 ± 0.03	70.30 ± 0.71
ChG+HAp	2.42 ± 0.12	0.89 ± 0.07	64.61 ± 0.10

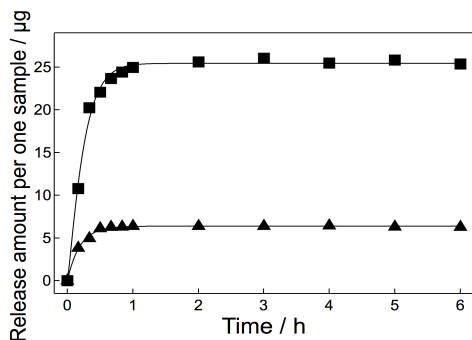


Fig. 3 Release amount of Cyt. C per ChG+HAp as a function of time. Cytochrome C loading amount per sample is about $9.3 \mu\text{g}$ () and $27.9 \mu\text{g}$ ().

Table 2 Constants (a, b and k) in Weibull model about Fig. 3.

Sample	a	b	k
$9.3 \mu\text{g}/\text{sample}$	5.16 ± 0.11	0.98 ± 0.01	6.40 ± 0.02
$27.9 \mu\text{g}/\text{sample}$	4.71 ± 0.55	1.14 ± 0.08	25.50 ± 0.21

図 2 に含浸法により薬剤を担持させた試料の薬剤徐放試験の結果を示す。両試料とも, 6 時間以内に担持薬剤の約 70% が徐放された。徐放曲線を Weibull model $F(t) = k(1 - \exp(-at^b))$

で解析した結果を表 1 に示す。表 1 より, 両試料の a の値がほぼ同じであることから, 初期の徐放速度はほぼ等しいが, ChG では b の値が 1 よりかなり小さいことから徐放速度が減少したことがわかる。これは, ChG からの Cyt. C の初期バーストが原因として考えられる。一方, ChG+HAp の b の値は 1 に近いことから 試料表面に修飾した HAp によりカプセル皮膜の微細孔が塞がれ, Cyt. C の初期バーストが抑制されたと考えられる。これらより, ChG 表面への HAp 層形成による Cyt. C の初期バーストの抑制効果は, 徐放後 1 時間以内において確認された。

図 2 に, マイクロインジェクション法にて 1 試料あたりの薬剤導入量を変化させた ChG+HAp に関する薬剤徐放試験の結果を示す。これより, インジェクションする薬剤溶液の Cyt. C 濃度を変えることで, 含浸法にて担持可能な量 ($9.3 \mu\text{g}/1$ 試料) 以上の Cyt. C の導入が可能であった。徐放曲線を Weibull model で解析した結果を表 2 に示す。試料 1 個当たりの Cyt. C の導入量を変えても, a および b の値がほぼ同じだったことから, ChG+HAp からの Cyt. C の徐放挙動は Cyt. C の導入量には依存しないことがわかった。これより, インジェクションする溶液の薬剤濃度を変化させることで, 含浸法により担持可能な薬剤量よりも多くの薬剤を徐放できると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 3 件)

1. Yuki Shirotsaki, Kohei Okamoto, Satoshi Hayakawa, Akiyoshi Osaka, "Preparation of micro particles derived from chitosan-silicate hybrids for drug delivery system", XVII International Sol-Gel Conference, P-F-14, Poster, p.402, Madrid, Spain, 25-30 August 2013.

2. Yuki Shirosaki, Kohei Okamoto, Satoshi Hayakawa, Akiyoshi Osaka, “In vitro cytocompatibility of microspheres derived from chitosan-silicate hybrids”, 24th MHS2013 & Micro-Nano Excellent Graduate School, pp. 82-83 (2013).
3. Yuki Shirosaki, Yasuyo Tsukatani, Satoshi Hayakawa, Akiyoshi Osaka, “Preparation of chitosan-silicate capsules for cell encapsulation”, International Conference on Processing & Manufacturing of Advanced Materials (Thermec’2013), Invited, Abstract No. 1117 (p.558), Session D2 Biomimetic Materials, Nanostructured Biomaterials & Biological Interactions II, 2-6 December 2013, Las Vegas, USA.

〔その他〕

ホームページ

<http://www.lsse.kyutech.ac.jp/~yukis/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

城崎 由紀 (SHIROSAKI YUKI)

九州工業大学・若手研究者フロンティア研究アカデミー・准教授

研究者番号：40533956