

平成23年 5月 10日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21800035

研究課題名（和文）骨形成を誘導するキトサンマイクロ粒子の創製と医用工学的応用

研究課題名（英文）Preparation of chitosan microspheres for the medical application

研究代表者

城崎 由紀（SHIROSAKI YUKI）

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号：40533956

研究成果の概要（和文）：本研究では、損傷した生体組織を修復するための材料として、カニ等の甲羅から精製されるキトサンにケイ酸化学種を分子レベルで修飾し、多孔質粒子および生理活性物質を包括したカプセルを作成した。多孔質粒子は細胞1個の大きさとほぼ同程度の孔を有し、生体内に多く存在するタンパク質であるアルブミンに対して高い吸着能を示した。一方、生理化成分物質を包括したカプセルでは、ケイ酸化学種の修飾率によってその徐放率を制御することが可能であった。

研究成果の概要（英文）：In this study, Porous particles and capsules were prepared to recover of the damaged human tissues. Chitosan and γ -glycidoxypropyltrimethoxysilane (GPTMS) were used as the starting materials. Porous particles were prepared by dropping precursor sol with CaCl_2 or without into liquid nitrogen. Obtained porous particles had about 2 mm in diameter and 10-30 μm in pore size. HAp particles of about 1 μm in diameter deposited on the pore surface by soaking thus obtained hybrid parties in 0.01 M Na_2HPO_4 solution at 80°C for 7 days. Bovine serum albumin (BSA) adsorbed much on the chitosan-GPTMS particles. Capsules were prepared by dropping carboxymethylcellulose into chitosan-GPTMS sols. The releasing of bioactive molecules included into the capsules was controlled by the cross-linking degree. Moreover the capsules did not show the cytotoxicity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,080,000	324,000	1,404,000
2010年度	980,000	294,000	1,274,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,060,000	618,000	2,678,000

研究分野：生体材料化学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学，生体材料学

キーワード：キトサン，マイクロ粒子，マイクロカプセル，薬物徐放，細胞適合性，有機-無機複合体

1. 研究開始当初の背景

組織工学的技術を用いて臓器の機能を復元させる為に、高気孔率で種々の孔径を有する多孔質足場材料が開発されているが、欠損部位が大きく多孔質体材料も大きくなると、その内部まで細胞を早期に遊走させ、目的とする機能を持った細胞に分化させることは困難である。一方、注入型インプラント材料は、取り扱いが簡便で低侵襲治療の為に、患者にかかる負担が軽減されることから注目されている。つまり、細胞が材料内部まで遊走するのが容易で、さらに適切な部位に生理活性分子を送達し適切な期間それらを徐放可能な薬物徐放能を有し、組織再生と共に分解・吸収される注入型材料であればさらに有用である。

申請者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あった。さらにこのハイブリッド複合体膜上でヒト由来骨芽細胞様細胞 (MG63) が良好な接着・増殖を示しただけではなく、ヒト患者大骸骨由来骨髄細胞においても良好な接着・増殖を示し、高い石灰化能を示した。以上のことをふまえ、さらなる高機能を持った骨再生足場材料を開発するために、ケイ酸化学種を生体活性物質ととらえ、これらの生体内徐放を制御した注入可能な新規キトサンマイクロ粒子あるいはマイクロカプセルを創製し、この粒子を3次元構築させた多孔質体構造を創製することを試みる。

2. 研究の目的

各種有機鎖を持つシランカップリング剤をキトサンに修飾し、各種アルカリ溶液中にキトサンを添加・ゲル化させ、ケイ酸化学種を修飾したキトサンマイクロ粒子あるいはマイクロカプセルを創製する。シランカップリング剤の添加量、反応溶液のpH、粒子を作製する際のアルカリの種類を調節し、マイクロ粒子の微細構造とケイ酸化学種の徐放挙動、および高生体機能性発現の相関を学術的に追求する。

3. 研究の方法

(1) ケイ酸分子修飾多孔質キトサンマイクロ粒子の作成

キトサンを所定濃度となるように、希塩酸に溶解させた。得られたキトサン溶液に所定量の 3-グリシドキシプロピルトリメトキシシラン (GPTMS) を添加し、均一なゾル溶液を得た。種々の径のシリンジを取り付けたマイクロポンプを用いて、ゾル溶液を液体窒素中に滴下した。得られた凍結粒子を -20°C で1日間保持した後、凍結乾燥した。得られた粒子を水酸化ナトリウム水溶液および蒸留水で洗浄し、残留した塩酸を取り除いた。再び凍結、凍結乾燥を行い、目的とする粒子を得た。得られた粒子の分子構造をフーリエ変換赤外分光法で調べ、表面および断面形状を走査型電子顕微鏡で調べた。

(2) キトサンマイクロ粒子へのアパタイトコーティング

ゾル溶液に所定量の塩化カルシウムを添加し、(1)と同様に粒子を得た。得られた粒子をリン酸塩水溶液に 80°C で7日間浸漬

した。浸漬後、蒸留水で洗浄し、凍結、凍結乾燥して目的とする粒子を得た。粒子の表面結晶構造を X 線回折計で調べた。

(3) 粒子表面へのタンパク質吸着能評価

モデルタンパク質として、牛血清アルブミンを用いた。所定濃度のタンパク質溶液と粒子を所定時間 36.5°C で接触させた後、上清中に残留したタンパク質量をマイクロ BCA キットを用いて定量した。

(4) ケイ酸分子修飾キトサンマイクロ粒子の作成

所定濃度の希酢酸溶液に所定量のキトサン溶液を滴下し、キトサン溶液を得た。酢酸ナトリウム水溶液を加え、攪拌した後、121°C で 20 分間オートクレーブ滅菌した。その後、所定量の GPTMS を添加しさらに攪拌しゾル溶液を得た。得られたゾル溶液中にカルボキシメチルセルロース溶液をデンドリマンピペットで滴下し、カプセルを得た。GPTMS の代わりにテトラエトキシシラン (TEOS) を添加したゾル溶液も作成し、同様にカプセルを得た。

得られたカプセルの外観は光学顕微鏡を用いて観察した。

(5) キトサンマイクロカプセルの機械的強度

得られたカプセルをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に浸漬し、37°C, 200rpm で所定期間振盪し、形状観察により、カプセルの損傷率を求めた。

(6) キトサンマイクロカプセルの物質透過性

物質透過性のモデル物質として、チトクローム C および BSA を用いた。CMC 溶液と所定量のモデル物質溶液を混合した。この溶液を (4) と同様に、ゾル溶液中へ滴下しカプセルを得た。得られたカプセルを PBS 中に移し、カプセル内から外部へのモデル物質溶液の徐放率を調べた。

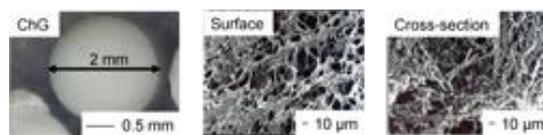


図 1 キトサン-GPTMS 粒子の外観写真と表面および断面の走査型電子顕微鏡画像。

4. 研究成果

(1) キトサンマイクロ粒子

滴下したゾル溶液は、液体窒素界面で瞬時に真球粒子を形成し、粒子表面が凍結された後、窒素中に沈降し、内部まで凍結される。液体窒素へ滴下するゾル溶液の量に依存して、粒子の直径を容易に制御可能であった。例えば、ゾル溶液 5μl を滴下した際に得られた粒子直径は約 2mm であった (図 1)。

得られた凍結粒子を -20°C で保持した後、凍結乾燥すると平均孔径 10~20μm の多孔を有するスポンジ状粒子が得られた。粒子直径は凍結乾燥後もほとんど変化しなかった。

フーリエ変換赤外分光計により得られたスペクトルから、粒子の主構造はキトサンからなり、GPTMS によって 10~20% のアミノ基が架橋されていることが分かった。また GPTMS のメトキシ基は加水分解・縮重合し、シロキサン結合を形成していることも確認された。粒子からのケイ酸化学種の溶出は出発原料の GPTMS 量に依存して増加した。

(2) キトサン多孔質粒子の *in vitro* アパタイト形成能

CaCl₂ を添加したキトサン-GPTMS ゾル溶液から作成した粒子も添加しない場合と同

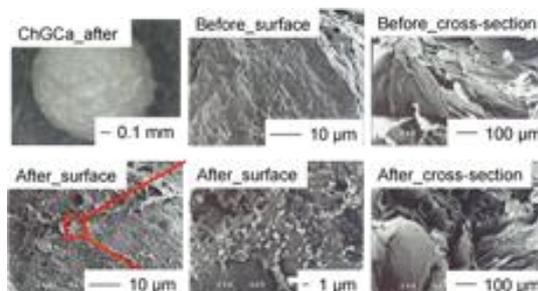


図 2 アパタイト析出後の粒子の外観と表面および断面の走査型電子顕微鏡画像。

様に、真球状の形態で、その直径は液体窒素に滴下した溶液の量に依存した。得られた粒子をリン酸塩水溶液中に 80°C で保持すると、粒子表面にヒドロキシアパタイトの析出が観察された (図 2)。一方、粒子内部にはアパタイトは形成しなかった。

アパタイト析出後、粒子直径は減少したが、多孔質構造は保持されていた。また、圧縮強度試験より、アパタイト形成前の粒子はスポンジ様の強度を示しているが、形成後には強度が増加し、セラミックス様の強度を示すことが分かった。

(3) キトサン多孔質粒子の *in vitro* タンパク質吸着特性

アルブミン溶液とキトサン多孔質粒子を 6 時間接触させた際、キトサン-GPTSM 多孔質粒子表面へのタンパク質吸着量は平衡状態に達した。平衡状態でのタンパク質吸着量は、文献値等で報告されているキトサン多孔質体膜と比較して高い値を示した。

形状の揃った粒子を液体窒素を用いるといった簡便な方法で作成することに成功した。また、得られた粒子は多孔質で、細胞の足場を誘導するタンパク質吸着を引き起こすのに十分な表面積を有していた。アルブミンを用いたタンパク質吸着実験においても、本粒子は高い吸着性を示した。得られた孔の孔径は細胞が 1 個と同程度の大きさを示しており、初期段階で、粒子内にうまく細胞を分散させることができれば、粒子内部全体に細胞が存在し、それらが個々に連結できると考えられる。

以上のことから、本多孔質粒子は細胞の足場材料として応用できると考え、現在細胞培養試験を進めている。さらに、これら粒子を 3 次元に集積し、3 次元培養も平行して行っている。一方、アルブミン吸着特性が高いことから、本粒子を用いた新規吸着剤の開発に

取り組んでいる。

(4) キトサンマイクロカプセル

キトサンマイクロカプセルの直径は溶液の組成に依存せず、滴下した CMC 溶液の量に依存した。添加した GPTMS 量の増加に伴い、キトサンのアミノ基の架橋度は増加した。

溶液に浸漬した環境下での機械的強度試験では、浸漬 21 日以内でカプセルの損傷率は最大で 10%程度であった。また架橋度の増加に伴い、カプセル皮膜の強度は増加した。

(5) キトサン-GPTMS ミクロカプセルの物質透過性

チトクローム C, BSA のどちらを包括した際も、PBS 浸漬 3 時間後にはカプセル皮膜の組成に関わらず 60%以上 PBS 中に放出された。3 時間後は緩やかに放出したが、放出する割合はカプセルの架橋度に依存し、架橋度が高いほど徐放速度は低下した。

キトサン-TEOS から作成したカプセル皮膜は TEOS の添加量を変化させても、徐放挙動に違いは観察されなかった。よって、GPTMS のエポキシ基はアミノ基と架橋して、皮膜の微細構造 (生理活性物質が放出可能なサイズの孔径) を変化させると考えられる。

そこで、キトサン-GPTMS カプセルが細胞毒性を示さないことを骨芽細胞の培養実験により確認した。現在カプセル内部へ細胞を包括する実験を進行している。

5. 主な発表論文等

[その他]

ホームページ

<http://apatite.biotech.okayama-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

城崎 由紀 (SHIROSAKI YUKI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号：40533956

