

機関番号：32613

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21760605

研究課題名（和文） 膜工学に立脚した生体適合性マイクロカプセルの薬物放出制御と自己分解性の概念の創出

研究課題名（英文） Control of drug release from biodegradable microcapsules and development of self-degradable microcapsules based on membrane technology

研究代表者

赤松 憲樹 (AKAMATSU KAZUKI)

工学院大学・工学部・助教

研究者番号：50451795

研究成果の概要（和文）：生体適合性ポリマーであるアルギン酸とキトサンを利用して、膜乳化法を用いてマイクロカプセルを調製した。マイクロカプセル調製法を詳細に検討した結果、粒径と単分散性、さらには中空構造も制御できる手法の開発に成功した。さらにマイクロカプセル内部に、マイクロカプセルを分解可能な酵素を封入することで、自己分解性を有するマイクロカプセルを開発することにも成功した。

研究成果の概要（英文）：Microcapsules were prepared with alginate or chitosan, which are biocompatible polymers, by using the membrane emulsification technique. The detailed study on preparation condition enabled us to control the average diameter, monodispersity and the hollow structure of the microcapsules. Furthermore, a novel type of self-degradable microcapsules were successfully developed and demonstrated by encapsulating the enzymes that can decompose the shell polymers of the microcapsules.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：膜工学

科研費の分科・細目：プロセス工学、化工物性・移動操作・単位操作

キーワード：マイクロカプセル、ミクロスフィア、膜乳化、SPG膜、キトサン、酵素、生分解性、ドラッグデリバリーシステム

1. 研究開始当初の背景

生分解性材料には、使用中は物性・構造を維持しつつも不要になったら直ちに分解するという、相反する特徴をどちらも有することが理想である。このような材料は、バルクで大量生産・大量消費が行われているプラスチックから、組織再生用・インプラント用などの医用機能材料に至るまで、種々の応用用途へ展開する可能性を秘めている。分解性に関して、従来はポリマーの化学構造や結晶

状態、相構造といった観点から検討されてきた。しかし分解挙動を制御するには及んでいない。本研究ではドラッグデリバリーシステムを指向した生体適合性／生分解性マイクロカプセル材料を1つの例にとり、この相反する2つの機能獲得を実現する。この場合、使用中の保持すべき機能は、すべて「膜構造」で決定されると考えられる。カプセル径・カプセルの単分散性・細孔径・カプセル膜厚・中空性がこれに該当する。すなわちカプセル

構造制御手法の確立こそが内包物放出設計となる。また不要になったらすぐに分解を始める自己分解性に関してはほとんど研究例がなく、新しく研究開発すべき分野である。

2. 研究の目的

本研究は、以下の2つの目的を掲げる。

- ・膜工学に立脚したマイクロカプセル構造制御による内包物保持・徐放性設計
- ・不要になったらマイクロカプセル自ら分解を始める自己分解性の設計

第1の目的では、粒径制御性・単分散性・中空構造制御性をすべて兼ね備えたマイクロカプセルの調製法の確立を行い、さらにマイクロカプセルのシェル部の固化方法を詳細に検討することで、内包物保持および薬物徐放性が制御できるマイクロカプセルを調製する。

第2の目的では、分解酵素の活性を失活させずにカプセル中へ封入する手法を開発する。さらにマイクロカプセルに自己分解性という概念を付与することができることを実証する。

3. 研究の方法

(1) SPG 膜乳化法を用いた中空型キトサンマイクロカプセルの調製

粒径制御性と単分散性を有しながら、中空構造の制御も可能とするキトサンマイクロカプセルの調製法として、図1に示す2つの手法を提案し、検討した。

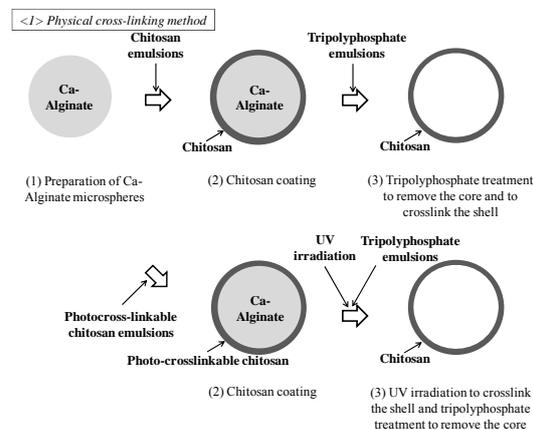


図1. 中空キトサンマイクロカプセルの調製法：<1>物理架橋法、<2>化学架橋法

いずれの調製法も3ステップからなり、各ステップのエマルジョン調製にはSPG膜乳化法を採用することで、粒径制御性と単分散性を担保することができる。物理架橋法では、第1ステップにおいてアルギン酸ナトリウムを内水相に溶解したW/Oエマルジョンと、塩化カルシウムを内水相に溶解したW/Oエマルジョンを混合することで、コアとなるアルギン

酸カルシウムミクロスフィアを調製する。ここにキトサンを溶解したW/Oエマルジョンを混合することで、シェル部にキトサンがコーティングされた粒子を得る。第3ステップにおいて、トリポリリン酸ナトリウムを内水相に溶解したW/Oエマルジョンを混合し、キトサンを静電相互作用で物理的に架橋すると同時に、アルギン酸カルシウムのカルシウムを捕捉し、アルギン酸ポリマーを再溶解することでコアを除去し、中空性を得る。化学架橋法では、第1ステップは物理架橋法と同様であるが、第2ステップでは光架橋性を有するキトサンを用いてコーティングを行う。この後にUV照射によりシェルのキトサンを架橋し、同じくトリポリリン酸ナトリウムを内水相に溶解したW/Oエマルジョンを混合し、コアを除去する。

調製したマイクロカプセルはFE-SEM、TEM、XPSで評価した。

(2) 加水分解したアルギン酸をテンプレートとして用いて調製する中空型ナノカプセルと、ナノカプセル形成メカニズムの解明

(1)で検討を重ねた結果、物理架橋法の際、第1ステップで加水分解したアルギン酸ポリマーを用いた場合のみ、得られる中空マイクロカプセルの粒径が、他の条件で調製した場合の10分の1以下に収縮し、中空ナノカプセルとなることが明らかとなった。そのメカニズムを解明するため、アルギン酸を加水分解することで、どのステップにおいて大きな変化が生じているのかを検討した。分析にはFE-SEM、BET吸着法、XPSを用いた。

(3) 分解酵素を封入したマイクロカプセルの調製と、自己分解性の実証

膜乳化法を用いて酵素封入マイクロカプセルを調製する手法を確立するため、調製条件の検討を行った。また分解酵素としてリゾチームを用い、封入酵素量の調節が可能であるかを検討し、XPSにより評価した。さらに封入酵素の活性評価をエチレングリコールキチンの粘度低下法により実施し、マイクロカプセルが経時的に分解する挙動もFE-SEMを用いて追跡した。

4. 研究成果

(1) SPG 膜乳化法を用いた中空型キトサンマイクロカプセルの調製

物理架橋法の第1ステップで調製したアルギン酸カルシウムミクロスフィアと、第2ステップで調製したキトサンをコーティングしたアルギン酸カルシウムミクロスフィアのFE-SEM画像を図2に示す。第1ステップ、第2ステップともに単分散な粒子が得られた。第1ステップのアルギン酸粒子の粒径は、アルギン酸ナトリウム水溶液を乳化する際に

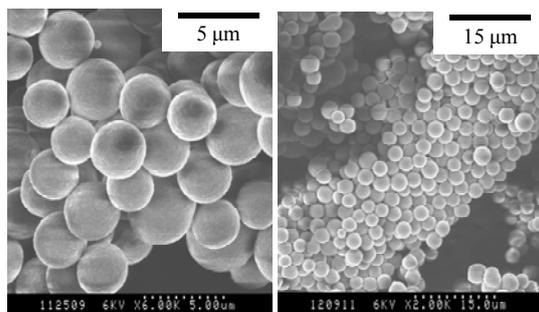


図2. 物理架橋法の<左>第1ステップ、<右>第2ステップ後の粒子のFE-SEM

用いるSPG膜細孔径で制御できることが明らかとなり、第2ステップで得られる粒子の粒径は、第1ステップで得られたコア粒子の粒径とほとんど変わらないことも明らかとなった。またXPS測定により第2ステップでキトサンがコーティングされていることも確認された。

第3ステップで調製した中空キトサンマイクロカプセルのFE-SEMおよびTEM画像を図3に示す。

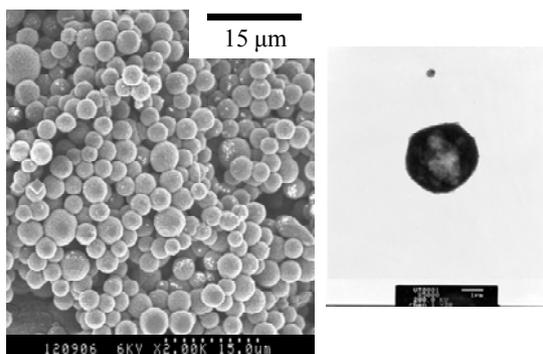


図3. 物理架橋法第3ステップ後の粒子の<左>FE-SEM、<右>TEM

粒径は第2ステップとほとんど変わらないが、TEMより中空であることが分かる。

化学架橋法でも同様に第3ステップまで実施して中空カプセルを得た。第1ステップは物理架橋法と共通であり、第2ステップでも

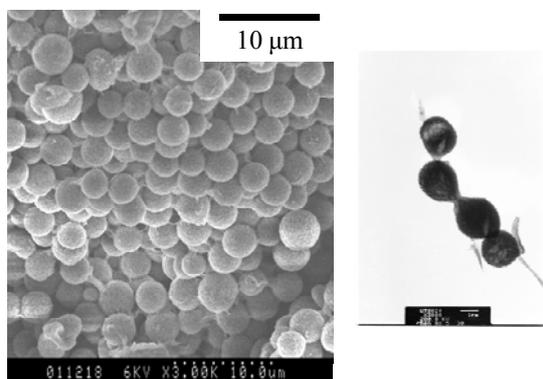


図4. 化学架橋法第3ステップ後の粒子の<左>FE-SEM、<右>TEM

同様に光架橋キトサンをコーティングしたマイクロファイアの調製に成功した。第3ステップ後の中空キトサンマイクロカプセルのFE-SEMおよびTEM画像を図4に示す。粒径は第2ステップとほとんど変わらず、中空性も物理架橋法と比較してほとんど発達していないことが分かった。これは化学架橋法の方がキトサンシェルが強固に架橋され、トリポリリン酸により再溶解したアルギン酸が外部へ拡散しにくいと考えられる。

また物理架橋法による調製の際、第1ステップで加水分解したアルギン酸ポリマーを用いた場合のみ、得られる中空マイクロカプセルの粒径が、他の条件で調製した場合の10分の1以下に収縮し、図5に示すような中空ナノカプセルとなることが明らかとなった。

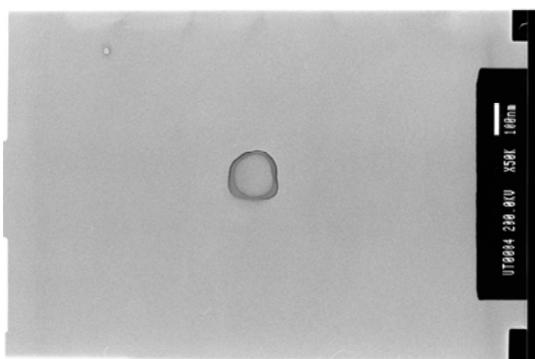


図5. 中空ナノカプセルのTEM
(スケールバー：100nm)

(2) 加水分解したアルギン酸をテンプレートとして用いて調製する中空型ナノカプセルと、ナノカプセル形成メカニズムの解明

上述のような中空ナノカプセルは様々な応用面において魅力的であり、この中空ナノカプセル形成メカニズムの解明を行った。アルギン酸ナトリウムを溶解し室温で静置しておくだけでも、加水分解により分子量は徐々に低下し、82日後には約15分の1程度になることが明らかとなった。

またfreshな(=加水分解していない)アルギン酸ナトリウムを用いて第1ステップのアルギン酸カルシウム粒子を調製したものと、82日間加水分解処理を行ったアルギン酸ナトリウムを用いて調製したアルギン酸カルシウム粒子を調製したものを比較した。得られた粒子のFE-SEMを図6に示す。調製において、膜乳化に用いたSPG膜の細孔径、他の実験条件などはすべて同じとし、アルギン酸以外の要素をすべて排している。図6より明らかであるが、freshなアルギン酸を用いた場合は粒子が無孔であるのに対し、82日間加水分解したアルギン酸を用いた場合は粒子が多孔であることが明らかとなった。粒径はSPG膜細孔径やアルギン酸濃度の影響を受けることが分かっており、本試験における比較

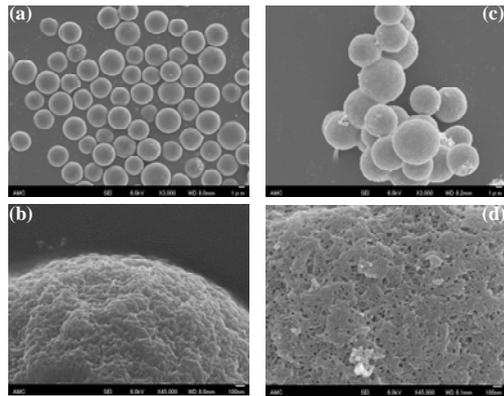


図 6. アルギン酸カルシウム粒子の FE-SEM : (a)-(b) fresh アルギン酸、(c)-(d) 加水分解したアルギン酸、(a)と(c)および(b)と(d)は同倍率の画像

ではこれらの条件を同じとしているため、粒径には差はあまり認められない。BET 吸着法により BET 表面積を求めたところ、fresh なアルギン酸により調製した粒子は $17.5 \text{ m}^2/\text{g}$ であったのに対し、加水分解したアルギン酸により調製した粒子は $113 \text{ m}^2/\text{g}$ と非常に大きい値を示した。さらに架橋剤となるカルシウムが粒子中に含まれている割合を XPS により測定したところ、fresh なアルギン酸、加水分解したアルギン酸のどちらを用いた場合も、大差ないことがわかった。

以上のことから、アルギン酸を加水分解することによって、架橋に与らないマンヌロン酸リッチな低分子成分が、カルシウム架橋の際に開孔剤として働き、多孔構造が形成されることが強く示唆された。さらに、これらにキトサンをコーティングし、トリポリリン酸処理すると、多孔構造を有するアルギン酸カルシウム粒子の場合は、トリポリリン酸との接触面積が大きいため反応速度が速く、キトサン架橋が完了する前にアルギン酸の溶解が進行するため、キトサンが足場を失い、収縮しながら粒子化するというメカニズムで、粒子形成が行われると考えられる。

(3) 分解酵素を封入したマイクロカプセルの調製と、自己分解性の実証

所定濃度のキトサン、リゾチーム水溶液を水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH を 5 に調整し、これを分散相とし、SPG 膜乳化法により W/O エマルションを調製した。さらにこれをグルタルアルデヒド架橋することで、分解酵素を封入したマイクロカプセルを調製した。マイクロカプセルはいずれも CV が 10% 程度の単分散なものが得られ、粒径は SPG 膜の細孔径や分散相の濃度で制御できることが示された。また XPS 測定により、仕込みリゾチーム割合が多いほど、マイクロカプセルに封入されるリゾチーム割合が多くな

ることが明らかとなった。

さらにエチレングリコールキチンの粘度低下法を用いて封入されたリゾチームの見かけの活性を測定したところ、完全な失活は起こっておらず、またグルタルアルデヒド架橋が緩やかなほど高い活性を示すことが分かった。

さらに、分散相としてキトサン、リゾチームをそれぞれ 1.0%、1.5% の濃度で溶解し、pH を 5 に調整した水溶液を用い、グルタルアルデヒド架橋したマイクロカプセルを用いて、 30°C 、pH 5 の環境でしんとし、1 週間後に FE-SEM によりマイクロカプセル形状を確認した。結果を図 7 に示す。

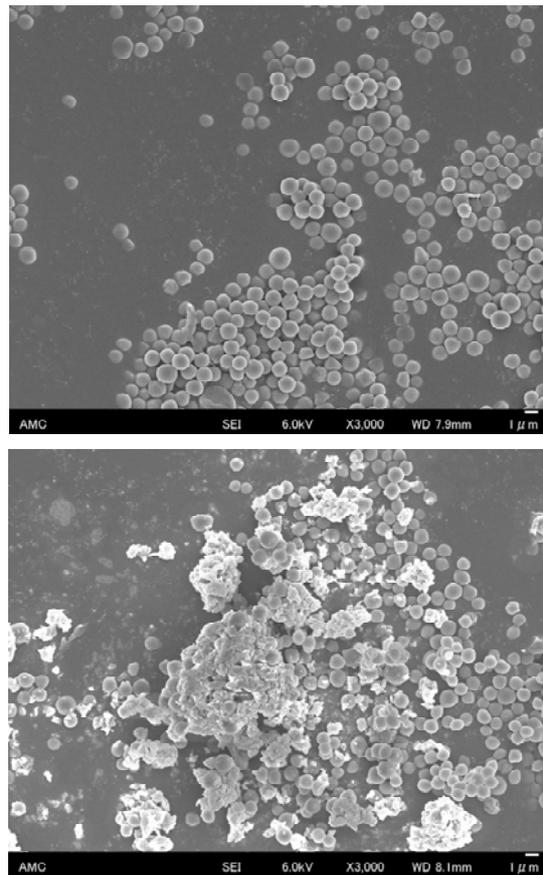


図 7. リゾチーム封入キトサンマイクロカプセルの FE-SEM : <上> 分解実験前、<下> 分解実験 1 週間後

マイクロカプセルは一部球状を維持しておらず、分解が進行していることが示唆される。一方でグルタルアルデヒド架橋が強く、リゾチーム同士も架橋されている可能性が強く残されており、分解速度は決して速いとは言えない。何らかの構造制御を施し、この分解速度を向上させることが求められる。

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)

〔雑誌論文〕(計2件)

- ① K. Akamatsu, W. Chen, Y. Suzuki, T. Ito, A. Nakao, T. Sugawara, R. Kikuchi, S. Nakao, Preparation of monodisperse chitosan microcapsules with hollow structures using the SPG membrane emulsification technique, Langmuir, 査読有, Vol.26, No.18, 2010, pp.14854-14860
- ② K. Akamatsu, D. Kaneko, T. Sugawara, R. Kikuchi, S. Nakao, Three Preparation Methods for Monodispersed Chitosan Microspheres Using the Shirasu Porous Glass Membrane Emulsification Technique and Mechanisms of Microsphere Formation, Ind. Eng. Chem. Res., 査読有, Vol.49, No.7, 2010, pp.3236-3241

〔学会発表〕(計8件)

- ① 池内悠人、赤松憲樹、中尾真一、膜乳化法によるキトサンマイクロカプセルの合成と酵素封入法の開発、第2回海水学会学生発表会、2011年3月6日、秋田県立大学
- ② 池内悠人、赤松憲樹、中尾真一、膜乳化法による酵素封入キトサンマイクロカプセルの開発、第13回化学工学会学生発表会、2011年3月5日、秋田大学
- ③ K. Akamatsu, W. Chen, Y. Suzuki, T. Ito, A. Nakao, T. Sugawara, R. Kikuchi, S. Nakao, Preparation of monodispersed chitosan microcapsules with hollow structures using SPG membrane emulsification technique, The 6th conference of the Aseanian Membrane Society in conjunction with the 7th International Membrane Science and Technology Conference (AMS6-IMSTEC10), November 23, 2010, Sydney, Australia
- ④ 赤松憲樹、陳為、鈴木幸光、伊藤大知、菅原孝、菊地隆司、中尾真一、膜乳化法を用いたキトサン中空マイクロカプセルの合成と架橋法が中空構造に与える影響、化学工学会第42回秋季大会、2010年9月6日、同志社大学
- ⑤ 赤松憲樹、陳為、菅原孝、菊地隆司、中尾真一、SPG膜乳化法を用いた単分散中空キトサンマイクロカプセルの調製、日本膜学会第32年会、2010年5月13日、産業技術総合研究所臨海副都心センター
- ⑥ 陳為、赤松憲樹、菅原孝、菊地隆司、中尾真一、膜乳化法を用いた中空型生分解性マイクロカプセルの合成、化学工学会第75年会、2010年3月20日、鹿児島大学

- ⑦ K. Akamatsu, D. Kaneko, T. Sugawara, R. Kikuchi, S. Nakao, Preparation of mono-dispersed chitosan microcapsules using SPG membrane emulsification technique, Euromembrane 2009 Conference, September 9, 2009, Montpellier, France
- ⑧ 兼子大作、赤松憲樹、菅原孝、菊地隆司、中尾真一、SPG膜乳化法による単分散キトサンマイクロカプセルの合成と粒径制御、日本膜学会第31年会、2009年5月21日、東京理科大学

〔その他〕

ホームページ等

<http://er-web.sc.kogakuin.ac.jp/Profiles/9/0000826/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤松 憲樹 (AKAMATSU KAZUKI)
工学院大学・工学部・助教
研究者番号：50451795

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：