

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月25日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22550155

研究課題名（和文） 生物由来多糖によるフィルム材料の作製およびアパタイトとの複合化

研究課題名（英文） Preparation of film materials made of biological polysaccharides and their composite formation with apatite

研究代表者

橋詰 峰雄（HASHIZUME MINEO）

東京理科大学・工学部・准教授

研究者番号：40333330

研究成果の概要（和文）：グリコサミノグリカン類とキトサンとから生成されるポリイオンコンプレックスを熱プレスすることで、架橋剤などを用いることなく水不溶性のフィルムを得る手法を確立し、その最適条件を見出した。また多糖の構造や分子量などがフィルムの物性に与える影響を評価した。さらに体液類似環境下でフィルム表面へのアパタイトの複合化にも成功し、大スケールで迅速にフィルムを得るためフィルム作製法の改良にも取り組んだ。

研究成果の概要（英文）： The preparation process to obtain water-insoluble films of biological polysaccharides was established by hot pressing of polyion complexes made of glycosaminoglycans and chitosan. The optimal condition for each polysaccharide combination was clarified. Effects of structure and molecular weight of polysaccharides on physical properties of the resulting films were evaluated. Hydroxyapatite deposition on these films under body fluid conditions was achieved. To obtain larger sizes of the films rapidly, improvement of the film preparation process was also examined.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：生体材料、フィルム、多糖、熱プレス、細胞、ドラッグデリバリーシステム、ファイバー

1. 研究開始当初の背景

生物由来の多糖は医薬品や機能性食品として近年注目されているほか、従来からゲルなど種々の形態で医用材料として利用されてきた。多糖の構造材料としての利用に注目すると、三次元的な細胞培養足場などが挙げられる。しかしながら、多糖類のみからなるフィルム材料については、最近早稲田大学の

武岡らの精力的な研究（Takeoka ら、Adv. Funct. Mater. 2009 など）などにより nm 厚みの超薄膜についてはその有用性が示されているが、世界的に見れば研究例は少ない。その一番の原因は多糖をフィルムへと成型加工するのが技術的に困難なためである。フィルムを含水環境で利用する場合、多糖の多くは水溶性が高く、それら単独で安定な形状

を保つのは困難である。そのため通常は架橋剤の利用や糖鎖の化学修飾が行われている。しかしながら、より安全な材料を得るためにはそのような修飾は避けるべきである。

研究代表者はそのような現状を受け、多糖のみから十分な強度を持ったフィルム材料を作製できないか模索していた。多糖としては医用材料の原料として期待されるグリコサミノグリカン類に注目した。しかしながらグリコサミノグリカン類によるフィルム材料の検討例は少なく、特に架橋剤を用いずに非多孔質の自立性フィルムを作製したという例は調べた限り存在しなかった。

そこでこの課題に対して精意検討を行った結果、酸性多糖のグリコサミノグリカン類と塩基性の生物由来多糖であるキトサンとのポリオンコンプレックスを形成させ、それを熱プレス法により成型加工することで、架橋剤や糖鎖の化学修飾を用いることなく、水に不溶なフィルムを得ることに成功した。またこれらフィルムは体液類似環境下で表層にアパタイトの析出を誘起することがわかり、骨修復フィルムとしての可能性も見出された。この系について詳細を系統的に評価し、また新たなフィルム作製法にも取り組むことで研究をより一層発展させる必要があると強く感じ、本研究課題を立案した。

2. 研究の目的

上記の基礎的な知見を基に、本研究では酸性多糖としてグリコサミノグリカン類を用い、均質なフィルムを再現性よく得るための最適条件について種々の検討を行った。多糖の構造や分子量など原料に由来する因子、熱プレス条件などプロセスに由来する因子、などが得られるフィルムの成膜性や機械的強度などの物性に与える影響を系統的に評価し、グリコサミノグリカン類を中心に生物由来多糖から良質な水不溶性の自立フィルムを作製するための必要条件を明らかにすることを目的とした。また得られたフィルムの体液類似環境下でのアパタイトとの複合化について検討し、フィルムの骨修復材料としての可能性を評価した。それと並行して、本研究で提案する概念の拡張性を示すため、またフィルムの種々の物性評価を実現するために、大スケールで迅速にフィルムを得る手法の確立も目指した。

3. 研究の方法

(1) 種々の条件における多糖フィルムの作製およびアパタイトとの複合化

本研究の手法は、①酸性多糖と塩基性多糖とのポリオンコンプレックス形成により固体物を得る、②それら固体物を熱プレス法によりフィルムへと成型加工する、という2段階からなり、一部については③得られたフ

ィルムを擬似体液に浸漬することで骨類似アパタイトと複合化する、という3つ目の操作を行うものである。酸性多糖としてグリコサミノグリカン類のコンドロイチン硫酸、ヘパリン、ヒアルロン酸を、塩基性多糖としてキトサンをそれぞれ用いて検討を行った。

段階①において、ポリオンコンプレックス生成は溶液中の高分子鎖同士の反応であるため、必ずしも電荷比が1:1のときに最大量の複合体が得られるとは限らない。そこで糖鎖の構造や分子量による影響を評価した。

段階②の操作は、①で得られたゲル状の析出物を凍結乾燥して得られる固体物を、フィルム面積に相当する穴の空いた、膜厚に相当する厚みをもったスペーサーを挿入したうえで熱プレス処理を施し、フィルムとして成型加工するものである。用いる多糖の組み合わせに応じて最適な成膜条件を見出した。

段階③については、上記のようにして得られたフィルムを擬似体液 (Kokubo ら、J. Biomed. Mater. Res. 1990, Biomaterials 2006 など) に浸漬することで、その表層に骨類似アパタイトの微結晶を析出させ、複合フィルムを得ることとした。用いる糖鎖の組み合わせによりフィルム表面に提示される酸性官能基の密度が異なると予想されたため、その影響を評価した。また高塩強度の擬似体液中でフィルムの安定性も確認した。

以上のようにして得られた種々の (複合) フィルムのキャラクターゼーションは巨視的形態観察による均質性の確認のほか、研究室所有の FT-IR、大学共通設備の走査型電子顕微鏡、エネルギー分散 X 線分光装置などの装置を用いて行った。またフィルムの物性評価としては水溶液中での膨潤性や接触角 (本科研費で購入した接触角計で測定) を基にした湿潤性を評価した。さらにフィルム材料としての重要な特性の一つである引張強度などの機械的強度の測定を研究室所有の材料試験機を用いて行った。種々の場合について得られた結果を総合的に評価することで、最終的に本手法の適用可能範囲や、多糖の種類や分子量がフィルムの特性に及ぼす影響の一般則を明らかにすることを目指した。

(2) 新たな成膜法の開発

上記項目と並行して、新たな成膜法の開発について検討を行った。上記手法はポリオンコンプレックスの単離に凍結乾燥を用いるが、その作業時間が全体のフィルム作製時間の大部分を占めていた。そこで凍結乾燥に代わる手法を探索した。また引張強度測定のような物性測定の実現のためにもフィルムの大面積化に取り組んだ。それら改良した手法で得られたフィルムの均質性や物性を従来法によって得られたものと比較した。

(3) 多糖複合フィルムの機能評価

当初の研究計画にはなかったが、期間中にフィルムの大面積化が可能となったことで多糖複合フィルムの機能材料としての評価も可能となった。細胞足場材料や薬物徐放担体としての予備的な評価を行った。

4. 研究成果

(1) 種々の条件における多糖フィルムの作製およびアパタイトとの複合化

段階①において、検討した酸性多糖3種とキトサンとを水溶液中で混合することでいずれの場合もポリイオンコンプレックスが生成した。糖鎖の組み合わせによりゲルの収量や乾燥状態での形態が若干異なった。

段階②では、これら乾燥ゲルを熱プレスすることで架橋剤や糖鎖の化学修飾を用いることなく、厚さ数十〜100マイクロメートルの種々の多糖複合フィルムを得ることに成功した。その際熱プレス時における水の添加やプレス操作を複数回行うことが均質なフィルムを再現性良く得るために重要であることを見出した。用いる糖鎖の種類により成膜性が異なることがわかり、ポリイオンコンプレックス生成および熱プレス操作における至適条件をそれぞれ明らかにした。

フィルムの形態は微視的にも糖鎖の種類による影響は見られず、均質で緻密なフィルムが得られることが確認された。フィルムは十分な自立性をもち、取り扱いが容易であった(図左)。一方でフィルムの膨潤性や機械的強度は、材料として利用するにあたっては十分な範囲において、用いる糖鎖の組み合わせにより異なった。これは各糖鎖の分子量や単位構造あたりの官能基密度などの因子を反映した結果であると考えられた。

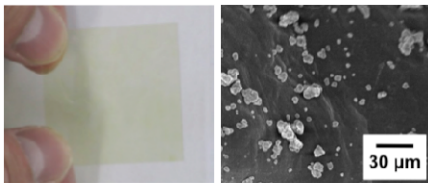


図. 作製したフィルム(3cm角)(左)とフィルム表面へのアパタイトの複合化(右)

段階③では、それぞれのフィルムを擬似体液中に浸漬することで、それらフィルムの表面にアパタイトを複合化することに成功した(図右)。これはフィルム表面に存在する糖鎖が提示するイオン性官能基が擬似体液中からのアパタイトの不均一核形成を誘起した結果と考えられた。またこの実験により塩強度の高い溶液においてもフィルム構造の破壊は見られないことも確認された。

(2) 新たな成膜法の開発

本科研費により原料を大量に購入できる

ようになったことから、はじめにポリイオンコンプレックス作製においてスケールアップを行い、得られた多量のゲルを用いて大面積のフィルム作製を試みた。その結果当初は1cm角の大きさで作製していたフィルムサイズを5cm角にまで拡大することに成功した。これにより水に対するフィルムの膨潤性や機械的強度など、フィルム材料としての物性評価を再現性の確認も含めて定量的に行うことが可能となった。

またフィルム作製法の改良に取り組んだ。従来法では水中で形成させたポリイオンコンプレックスを凍結乾燥した後、熱プレス法による成膜に用いていたが、遠心分離条件の変更により、余分な水分が大部分除去された、含水ゲル状のポリイオンコンプレックスを得る事に成功した。その結果、それら含水ポリイオンコンプレックスをそのまま熱プレスすることで、従来法のものと同様のフィルムを作製することに成功した。これはポリイオンコンプレックス作製からフィルムを得るまでの所要時間は30分程度であり、従来の凍結乾燥(通常一晩)を経る手法に比べて飛躍的な時間短縮を実現した。フィルムの物性を比較したところ、膨潤性には差はなく、一方で機械的強度は凍結乾燥を経ないフィルムの方が若干低い値を示した。これは凍結乾燥処理の方が水中で形成させたポリイオンコンプレックスの緻密なネットワーク構造を良く保持したためと考えられた。

さらに多糖ポリイオンコンプレックスのフィルム以外の構造材料化についても検討し、二液界面に生成した多糖ポリイオンコンプレックス薄膜の一部を引き上げて巻き取ることで多糖複合ファイバーが作製可能であることを見出した。

(3) 多糖複合フィルムの機能評価

多糖複合フィルムの生体材料としての可能性を評価するため、フィルム上での細胞培養について検討した。その結果、フィルムはマウス線維芽細胞に対して毒性を示さず細胞はフィルム表面に接着するものの、増殖は抑制されるという興味深い結果が得られ、細胞機能制御能をもつ培養担体としてのフィルムの利用可能性が期待された。

また多糖複合フィルムが薬物モデルとしてのカチオン性色素を担持および放出する性質をもつことがわかり、薬物徐放担体としての可能性も新たに見出された。

以上の成果は後述のように論文や学会で発表し、また現在論文原稿を作成中である。

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) Mineo Hashizume,* Hironobu Kobayashi, and Masafumi Ohashi
Preparation of Free-Standing Films of Natural Polysaccharides using Hot Press Technique and Their Surface Functionalization with Biomimetic Apatite
Colloids Surf., B **2011**, *88(1)*, 534-538.
DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.07.031
査読有
- 2) 橋詰 峰雄*
生体システムを応用したハイブリッド材料の開発
Fragrance Journal **2010**, *38(7)*, 35-39.
査読無

〔学会発表〕 (計 30 件)

- 1) 村田 悠
多糖複合フィルムからの徐放挙動における内包分子の化学構造の効果
第 42 回医用高分子シンポジウム, 産総研臨海副都心センター, 2013 年 7 月 29 日発表予定
- 2) 朝稲 香太郎
多糖複合ファイバーの作製条件の改良
第 62 回高分子学会年次大会, 京都国際会館, 2013 年 5 月 30 日発表予定
- 3) 木村 孝行
多糖複合フィルムの分子透過性評価
第 62 回高分子学会年次大会, 京都国際会館, 2013 年 5 月 29 日発表予定
- 4) 川口 啓介
多糖複合フィルムの酵素分解性評価
第 62 回高分子学会年次大会, 京都国際会館, 2013 年 5 月 29 日発表予定
- 5) 橋詰 峰雄
自立型多糖複合薄膜からの薬物モデル分子放出挙動の評価
日本膜学会第 35 年次大会, 早稲田大学, 2013 年 5 月 20 日
- 6) Atsushi KAKIMOTO
Biomaterial Properties of Free-Standing Polysaccharide Composite Films
The 9th SPSJ International Polymer Conference (IPC2012), Kobe, Japan, December 13, 2012.
- 7) Yu MURATA
Free-Standing Polysaccharide Composite Films as Sustained Drug

Release Carriers

- The 9th SPSJ International Polymer Conference (IPC2012), Kobe, Japan, December 13, 2012.
- 8) Kazuya YUYAMA
Microfluidics-Based, Controllable Preparation of Polysaccharide Composite Fibers
The 9th SPSJ International Polymer Conference (IPC2012), Kobe, Japan, December 12, 2012.
- 9) Mineo HASHIZUME (Invited)
Polyion Complexes of Natural Polysaccharides as Structural Materials
International Conference on Energy and Environment-Related Nanotechnology (ICEEN 2012), Beijing, China, October 23, 2012.
- 10) 村田 悠
多糖複合フィルムの物質徐放能評価
第 61 回高分子討論会, 名古屋工業大学, 2012 年 9 月 20 日
- 11) 柿本 敦史
細胞培養基材としての利用を目指した多糖複合フィルムの改質
第 61 回高分子討論会, 名古屋工業大学, 2012 年 9 月 21 日
- 12) 湯山 和也
マイクロ流体技術により作製した多糖複合ファイバーの特性評価
第 61 回高分子討論会, 名古屋工業大学, 2012 年 9 月 21 日
- 13) 村田 悠
多糖複合フィルムの物質保持および徐放能
第 41 回医用高分子シンポジウム, 東京大学先端科学技術研究センター, 2012 年 6 月 25 日
- 14) 柿本 敦史
多糖複合フィルム上での細胞培養条件の最適化
第 61 回高分子学会年次大会, パシフィコ横浜, 2012 年 5 月 31 日
- 15) 湯山 和也
マイクロ流体技術を利用した多糖複合ファイバーの作製
第 61 回高分子学会年次大会, パシフィコ横浜, 2012 年 5 月 31 日
- 16) 村田 悠
水溶性多糖による複合フィルムの物質保持能評価
第 61 回高分子学会年次大会, パシフィ

- コ横浜, 2012年5月31日
- 17) 入江 貴太
多糖複合ファイバーの構造特性における分子量と延伸の効果
日本化学会第92春季年会, 慶應大学, 2012年3月25日
 - 18) 大橋 雅史
熱プレス法を利用した自己支持性多糖複合フィルム作製法の高効率化
第21回日本MRS学術シンポジウム, 横浜開港記念会館他, 2011年12月20日
 - 19) Mineo HASHIZUME
Preparation of Free-Standing, Water-Insoluble Thin Films of Natural Polysaccharides by Utilizing Hot Press Technique
12th Australia-Japan Colloid and Interface Science Symposium, Cairns, Australia, November 21, 2011.
 - 20) 大橋 雅史
熱プレス法を用いた多糖複合フィルムの作製および特性評価
第60回高分子討論会, 岡山大学, 2011年9月30日
 - 20) 柿本 敦史
線維芽細胞による多糖複合フィルムの生体材料特性評価
第60回高分子討論会, 岡山大学, 2011年9月29日
 - 21) 湯山 和也
ポリオンコンプレックス形成を利用した多糖複合ファイバーの作製と特性評価
第60回高分子討論会, 岡山大学, 2011年9月29日
 - 22) 大橋 雅史
水不溶性多糖複合フィルムの物性評価および新規成膜法の開発
第40回医用高分子シンポジウム, 関西大学100周年記念ホール1, 2011年7月25日
 - 23) 湯山 和也
水溶性多糖を用いた水に不溶なファイバーの作製と特性評価
日本化学会第91春季年会, 日本化学会第91春季年会(2011)講演予稿集, 2011年3月11日
 - 24) 柿本 敦史
水溶性多糖から作製した複合フィルムと細胞との相互作用
日本化学会第91春季年会, 日本化学会第91春季年会(2011)講演予稿集, 2011年3月11日

- 25) 大橋 雅史
水溶性多糖から作製した水に不溶な複合フィルムの表面特性
日本化学会第91春季年会, 日本化学会第91春季年会(2011)講演予稿集, 2011年3月11日
- 26) Masafumi OHASHI
Preparation and physicochemical properties of water-insoluble glycosaminoglycan composite films
The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2010), Hawaii, USA, December 16, 2010
- 27) Masafumi OHASHI
Development of Fabrication Processes for Water-Insoluble Free-Standing Thin Films from Natural Polysaccharides
International Conference on Nanoscopic Colloid and Surface Science (NCSS2010), Chiba, Japan, September 20, 2010
- 28) 橋詰 峰雄
多糖複合フィルムの医用材料としての可能性
第59回高分子討論会, 北海道大学, 2010年9月16日
- 29) 大橋 雅史
水溶性多糖による複合フィルムの材料特性
第59回高分子学会年次大会, パシフィック横浜, 2010年5月26日

[その他]

ホームページ等

<http://www.ci.kagu.tus.ac.jp/lab/hyb-chem1/Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋詰 峰雄 (HASHIZUME MINEO)
東京理科大学・工学部・准教授
研究者番号: 40333330

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: