

キトサン-カラギーナンゲルおよびその微粒子の調製と評価

濱島 安澄・倉成 文絵*・月脚 流風・前田 良輔

Preparation and characterization of chitosan-carrageenan hydrogel and micro particles

Azumi HAMASHIMA, Fumie KURANARI*, and Ruka TSUKIASHI, and Ryosuke MAEDA

Abstract

Chitosan and carrageenan are oppositely charged biopolymers by the positive amino groups and anionic sulfate groups in each molecule. These polymers form the polyelectrolyte complexes by mixing the polymer solution, which are applied to DDS and support of immobilization of biocatalysts. In this research, because enough mechanical strength of the hydrogel was not achieved, D-glucosamine was added to these polymer complexes as a crosslinking agent. To investigate controlled release characteristics of the chemicals from chitosan-carrageenan hydrogel, release test of green dye was carried out. The absorbance was increased linearly for treatment time without induction period until 100 min, the plateau appeared for 300 min, then gel collapsed when it passed for about 600 min. Microparticles of chitosan-carrageenan hydrogel were prepared by W/O type emulsion with surfactant Span-80 and kerosene. Microparticles of 10 μm were observed in the precipitate by microscope images.

Key words : Chitosan, Carrageenan, Hydrogel, Microparticle

1. 諸言

キトサンは甲殻類の外骨格に多く含まれる多糖であるキチンを脱アセチル化して得られる。キチンは N-アセチル-D-グルコサミン(2-acetamido-2-deoxy-D-glucose) 残基が多数 β -(1,4)-結合した多糖であるが、これは典型的な場合であって、キチンは部分的にアセチル基を失っているのが普通である。一方、キトサンは典型的には D-グルコサミン(2-amino-2-deoxy-D-glucose) の β -(1,4)-重合体であるが、キチンと同様、普通、多少のアセチル基を含んでいるものをキトサンと称している。地球上でもっとも豊富なバイオマス資源であるセルロースは D-グルコースが β -(1,4)-結合した、キチンと類似の構造をもつ物質で、年間 10^{11} t が生合成されると推定されている。一方、キチンの年間生合成量はセルロースに匹敵する $10^9 \sim 10^{11}$ t と推定され、キチン・キトサンとして、その有効利用の観点から様々な研究が行われている。特にキトサンはその分子内に一級のアミノ基を有しており、その機能と莫大な生合成量から、これまで盛んに基礎ならびに応用研究がなされてきた。キトサンに関する研究は日本、中国、韓国、インドなどアジア諸国が特に活発である。Fig. 1 はキトサンの構造式である。C2 位のアミノ基は酸性域で NH_3^+ として電荷を帯びる。

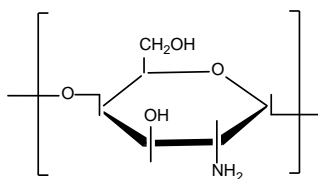


Fig. 1 Chemical structure of chitosan.

またカラギーナンは紅藻類から抽出される天然高分子であり、ガラクトースと 3,6-アンヒドロガラクトースからなる繰り返し単位の中の一部の水酸基が、硫酸エステル Na、K 塩になった形の酸性多糖類である。分子量は 10 万~15 万程度であり、 κ 、 ι 、 λ の 3 種類の構造が知られている。Fig. 2 に 3 種類のカラギーナンの構造式を示した。

本研究では、塩基性高分子であるキトサンを基材として、上記に挙げたカラギーナンのような酸性高分子と複合化することによりゲルを調製し、その微粒子化を行った。

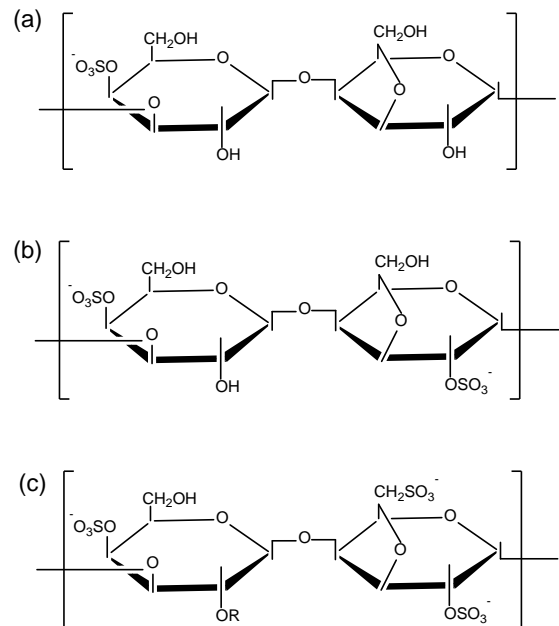


Fig. 2 Chemical structure of three types of carrageenan. (a) κ -type, (b) ι -type, (c) λ -type.

*本校卒業生

2. 実験方法

2.1 試薬

キトサンは大日精化工業(株)製脱アセチル化度 100%のものを使用した。 κ -および ι -カラギーナンは伊那食品工業(株)製を使用した。D-グルコサミン塩酸塩、酢酸, Span-80, ケロシン, 流動パラフィン, はナカライテスク(株)から入手し、いずれの試薬もさらなる精製は行わずに使用した。

2.2 キトサン-カラギーナンの調製

純水を溶媒に 45°C に加温しながら 2 wt% κ -カラギーナン溶液及び 3 wt% ι -カラギーナン溶液を調製した。また、2 vol% 酢酸水溶液を溶媒として 2.5 wt% キトサン溶液を調製した。次に、事前に最適な濃度、混合比を決定した結果に基づき 30 wt% D-グルコサミン溶液と 2.5 wt% キトサン溶液を体積比で 2:3 となるように混合した(以下、混合溶液と呼ぶ)。この混合溶液をスターラーで攪拌しながら 45°C に保持したところに、3 wt% ι -カラギーナンを滴下した。

2.3 キトサン-カラギーナンの色素の徐放性

ι -カラギーナンが 3.0wt%、緑色素を 0.38wt% となるように純水に溶解し、 ι -カラギーナン溶液を調製した。調製した ι -カラギーナン溶液と 2.2 で述べた混合溶液を 45°C に調整した。 ι -カラギーナン溶液を混合溶液に滴下し 45°C で 30 分反応させ、キトサン-カラギーナゲルを調製した。反応後キトサン-カラギーナゲルを別のビーカーに移し、純水、0.1M-HEPES 緩衝溶液の順でゲルの表面を洗浄した。蓋付き石英セルに緩衝溶液を 3mL、調製したキトサン-カラギーナゲルを 5 粒入れた。セルを 3 回転倒混和させ、紫外可視分光光度計 (Shimadzu UV-1240) にセットした。転倒混和の 30 秒後をブランクとして、予め測定した緑色素の吸収スペクトルのピークの 1 つである波長 628.0nm における吸光度を測定した。その後、測定の前 30 秒前に 3 回転倒混和を行い、所定時間ごとに吸光度を測定した。

2.4 キトサン-カラギーナゲル微粒子の調製^{2),3)}

油相 50 ml (ケロシンと流動パラフィンを 1:1 で混合したもの) 中へ、界面活性剤 (Span-80) と調製したキトサン溶液 5 ml、35 g/L の ι -カラギーナン 5 ml、30 wt% キトサンモノマーを 30 ml を加え、30 分間、50°C の恒温槽の中でホモジナイザー (IKA 社製 ULTRA-TURRAX® T18 basic) を用いて 3500 rpm で攪拌し、乳化させた。乳化液は遠心分離機 (KOKUSAN 社製 H-19F) を用いて 3500rpm×20 分で遠心分離を行うと透明な層と乳白色の層の 2 層に分離し、そのうち乳白色の層を回収しケロシン約 100 ml 中に入れ攪拌して界面活性剤を除去した。続いてケロシンと水を交換して、固体層の分離および洗浄をし、1M-NaCl 水溶液中で保存した。遠心分離前に回収した沈殿物は、回収した後にケロシンと水で洗浄を行い、同様に NaCl 水溶液中で保存した。Fig. 3 は使用した界面活性剤 Span-80 の化学構造である。

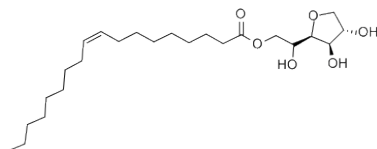


Fig. 3 Chemical structure of Span-80.

3 結果と考察

3.1 キトサン-カラギーナゲルの調製

3.1.1 調製温度・時間の影響

Table 1 にキトサンと ι -カラギーナンのゲルを調製する際の調製温度と調製時間の関係を示した。 κ -カラギーナンとのゲル化についても同様の実験を行ったが (データは示さない) 透明なカプセル状までしか形成しなかった。一方で、キトサンと ι -カラギーナンのゲルはカプセル状ではあるものの、被膜の強度は比較的強く、 κ -カラギーナンを用いたゲルより良好であった。いずれの場合も、内部まで一様なゲルを形成することが難しいことがわかった。これは、キトサン溶液中にカラギーナン溶液を滴下することでゲル化を試みた方法に起因していると考えられる。反対の電荷を帯びた高分子電解質同士が滴下後直ちに被膜を形成しカプセル状となるが、内部を凝固させるには、高分子同士の接触が困難であったと考えられる。Shumilina and Shchipunov⁴⁾ は比較的低濃度の多糖溶液を用いて、十分な攪拌下でゲル化している。さらに、 κ -および ι -カラギーナンはヘリックス-コイル転移のため、温度に敏感であると述べている。従って、温度の調整も非常に重要であると考えられる。

Table 1 Effects of preparation temperature and time on giving to a state of chitosan- ι -carrageenan hydrogel.

Temp. [°C] \ Time [min]	45	50	55	60
0.5	○	○	○	○
5	○	○	○	○
10	○	○	○	○
30	◎	○	○	○
60	◎	△	△	△
120	◎	△	△	×

◎: 強度が高いカプセル状, ○: 透明のカプセル状
△: 表面にしわを有し白濁したカプセル状, ×: 崩壊

3.1.2 カラギーナンとキトサンモノマーの反応性

キトサンとカラギーナンの高分子同士のゲル化は、現在の滴下による調製方法では困難であったため、架橋剤としてキトサンモノマー (D-グルコサミン) の添加を試みた。Table 2 から明らかなように、D-グルコサミンの濃度に依らず κ -カラギーナンはゲル化せず、 ι -カラギーナンに対して高濃度の D-グルコサミンを用いた時にゲル化した。これは、カラギーナン分子内の硫酸エステル基の数に依存したと考えられる。

Table 2 Influences of D-glucosamine concentration on gelation of κ - or ι -carrageenan.

D-Glu [wt%]	2.5	5.0	25	30
κ -carrageenan	×	×	×	×
ι -carrageenan	×	×	○	○

○: 反応した, ×: 反応せず,

3.1.3 キトサン溶液とキトサンモノマー溶液の混合比

l-カラギーナンを D-グルコサミンのみでゲル化するには高濃度の D-グルコサミン溶液が必要であった。これをもとに、2.5 wt%キトサン溶液と 30 wt%キトサンモノマー溶液の体積混合比を変化させた場合の *l*-カラギーナンとのゲル化の様子を Table 3 にまとめた。キトサン溶液と D-グルコサミン溶液の体積比が 9:1 から 3:2 までは球状のゲルは形成されず、1:1 の場合以降 (実質的な D-グルコサミン濃度 15 wt%以上) でキトサンとの相補的なゲル形成が進行したと考えられる。特に、接触直後からゲル形成が進行した 2:3 (D-グルコサミン濃度 18wt%) を最適な調製条件と決定した。

Table 3 Relationship between the volume ratio of chitosan solution and D-glucosamine solution and reaction time.

Reaction time[min]	0	10	30	60	120
Chitosan:D-Glu					
9:1	×	×	×	×	×
3:1	×	×	×	×	×
3:2	△	△	△	△	△
1:1	○	◎	◎	◎	◎
2:3	◎	◎	◎	◎	◎
1:3	○	◎	◎	◎	◎
1:9	○	◎	◎	◎	◎

◎ : 球状均一ゲル, ○ : 球カプセル状,
△ : 不定形ゲル, × : スライム上ゲル

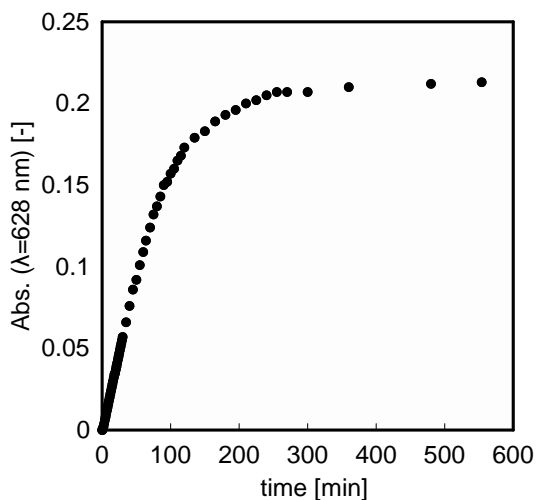


Fig. 4 Time course of release behavior of green dye from chitosan-*l*-carrageenan hydrogels in HEPES buffer pH 7.4.

3.2 キトサン-カラギーナングルの徐放性

Fig. 4 にはキトサン-*l*-カラギーナングル中に内包した緑色色素の pH 7.4 の HEPES 緩衝液中への溶出挙動を示した。図から明らかなように、誘導期はほとんどなく、100 min まではほぼ線形に吸光度が増加した。その後溶出量は減少し、300 min

付近でプラトーを迎えた。また、このゲルは D-グルコサミンの溶出も同時に起こっていると考えられ、600 min 以降では球状を維持することが出来ず崩壊するゲルが現れた。ここでの徐放性の検討では緑色色素を使用し、簡便に可視光を測定することで基礎的な情報を得た。徐放性はこのゲルを固定化酵素担体として用いた場合、基質や生成物のゲル内の輸送に関する重要な情報となる。今後、徐放性について pH、温度、イオン強度等の影響を検討する。

3.3 キトサン-カラギーナングル微粒子の調製

Fig. 5 はエマルジョン法で調製したキトサン-*l*-カラギーナングル微粒子である。使用した界面活性剤 Span-80 は今回用いた W/O 型エマルジョンに適したものであり、ケロシン中で逆ミセルを形成する。Fig. 5(a) は遠心分離後の沈殿物を回収後に水で洗浄する前に観察したものであり、10 μm 前後の粒子を確認することができた。Fig. 5(b) は同じく沈殿物を回収後に水で洗浄したものであるが、こちらはゲルは存在するものの粒子としての形状を保持できていない。これは、架橋剤として添加した D-グルコサミンが、水溶液中に溶出したためであると考えられる。そのため洗浄方法の工夫も必要であり、アルコール等でリンスすることも考えられる。

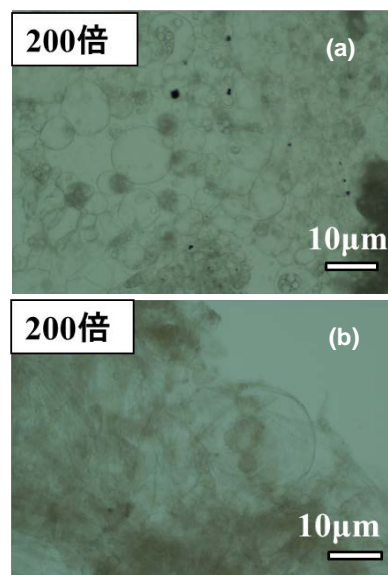


Fig. 5 Microscope images of chitosan-*l*-carrageenan microparticles with emulsion by Span-80 in kerosene as a solvent. (a) precipitate before decantation, (b) precipitate after decantation

4. 結言

キトサンとカラギーナンは反対の電荷を持つ天然高分子電解質であり、この二つを静電的相互作用によって複合化させることにより、ドラッグデリバリーシステム(DDS)や固定化酵素担体などへの応用を目的としたゲルの調製を試みた。ゲルの調製は、キトサン、*l*-カラギーナン、架橋剤としてキトサンモノマー (D-グルコサミン) を用いた。実質的に D-グルコサミンの濃度が 15wt%以上のとき内部まで一様なゲル化に成功した。次に、キトサン-カラギーナングルの徐放性を見るためにゲル内部に緑色色素を内包し、pH7.4 の HEPES 緩衝

溶液中への溶出挙動を見た。溶出挙動を見ると誘導期はほとんどなく、100 min まではほぼ線形に吸光度が増加した。その後溶出量は減少し、300 min 付近でプラトーを迎えた。また、このときゲル内部の D-グルコサミンも同時に溶出が起きているため 600 min 付近でゲルの崩壊が見られた。加えて、界面活性剤を用いた乳化法による微粒子の調製では、10 μm 程度の微粒子を確認できたが、水での洗浄時に崩壊すると考えられる。今後の課題としては、より長時間ゲル状態を安定に保てる調製条件（高分子濃度、塩類の添加、調製時 pH 等）の検討、溶出挙動における pH、温度、イオン強度等の影響を検討することが挙げられる。

謝辞

キトサンを提供していただいた大日精化工業㈱に御礼申し上げます。

引用文献

- 1) キチン、キトサン研究会編, 最後のバイオマス キチン、キトサン, 技報堂出版(東京)(1988)
- 2) Y. Sun, L. Gu, Y. Gao, and F. Gao, *Chem. Pharm. Bull.* **58** (7) 891-895 (2010)
- 3) 前田他, 北九州工業高等専門学校研究報告, **48**, 71-74(2015)
- 4) E. V. Shumilina and Yu. A. Shchipunov, *Colloid Journal*, **64**(3), 413-420(2002)

(2015 年 11 月 9 日 受理)