

アニオン性の多糖で被覆したキトサン微粒子への タンパク質のカプセル化と機能評価

慶應義塾大学理工学部

佐藤 智典

In this study, chitosan particles were employed as a protein carrier. Glucose oxidase (GOD) was encapsulated in chitosan particle coated with anionic polysaccharides such as hyaluronic acid and pectin. Encapsulation efficiency of GOD, size of the particles, and controlled release of GOD from the particles were investigated. Water-soluble chitosan was employed to encapsulate proteins (BSA and GOD) at neutral pH condition. Protein-encapsulated chitosan particles were prepared by using cross-linker such as citric acid triacetate. Compared to other cross-linkers, citric acid was showed the higher encapsulation efficiency for BSA (30-40%). However, the stability of ionic cross-linked chitosan particle was significantly decreased by the addition of salt. Therefore, the chitosan particle was covalently cross-linked. Encapsulation efficiency was significantly increased (>80%), and the release of GOD from the covalently cross-linked chitosan particles was significantly suppressed at neutral pH. Next, coating of the chitosan particles with anionic polysaccharides were carried out. Hyaluronic acid-coated chitosan particles showed the aggregation. Pectin-coated chitosan particles showed high encapsulation efficiency for GOD (60-90%), the particle size was submicron order. The aggregation of the particle coated with pectin was also suppressed. The release of GOD from the pectin-coated chitosan particles was significantly suppressed in the absence of NaCl, and increased depending on the concentration of NaCl. The controlled release of proteins from chitosan particle was achieved by using cross-linker and coating with anionic polysaccharide.

1 緒 言

近年遺伝子組み換えタンパク質に代表されるバイオ医薬品の開発が進み、有効な治療法が存在しなかった各種疾病の治療薬として大きな期待が寄せられている。しかし、臨床応用にはまだまだ多くの課題が残されている。タンパク質の医薬品化に際しての主な問題点は、熱や酸、有機溶媒などに不安定で、容易に変性・失活する、消化管や粘膜組織中のプロテアーゼによる分解・失活する、分子量が大きく生体への吸収効率が低い等である。例えば、タンパク質をカプセル化した粒子でも、塩存在下や酵素により速やかに放出や分解が起きる。体内への吸収効率が低く、期待通りの治療効果が得られない。従来の低分子化合物ならば誘導体化によって、化合物の安定性・吸収性などを解決できる事も多いが、タンパク質の誘導体化は容易ではない。そのため、タンパク質の臨床応用には DDS による吸収や体内動態の制御が不可欠であり、「プロテインデリバリーシステム」の重要性が高まっている。

本研究では、キトサン微粒子をタンパク質のキャリアーとして用いることにした。キトサンは、甲殻類や昆虫、微生物などの細胞壁など天然に豊富に存在するキチン (β -1,4-ポリ-N-アセチル-D-グルコサミン) を脱アセチル化

することによって得られるカチオン性の多糖である。キトサンは生体毒性が低く (マウスの経口LD₅₀ = 16 g/kg)、生体適合性および生分解性に優れており、タンパク質キャリアーの開発に適した長所を有している^[1]。また、粘膜吸着性、抗菌・制菌性、免疫賦活作用など多様な生物活性を有する事から、タブレットやビーズ、マイクロスフェア、ナノパーティクルなど様々な剤形で、工業、農業、医薬など様々な分野に応用されている。本研究者らはキトサンを遺伝子のデリバリーとして利用してきた^[2-7]。キトサンは遺伝子と安定な複合体を形成し、遺伝子の分解酵素からの保護能力、細胞内において遺伝子発現活性に優れていることを見出している。

本研究の目的は、タンパク質製剤の設計・開発を行い、タンパク質の安定性や特異性を改善し、その治療効果を高める事である。キトサンを用いてプロテインキャリアーを設計するに当たって、以下の点に留意した。

- ①生体適合性・生分解性のあるマテリアルのみで微粒子を調製する。
- ②タンパク質が変性・失活しない緩和な条件でタンパク質をカプセル化する。
- ③タンパク質の保持能の高い微粒子を作製する。

本研究ではキトサンとタンパク質の複合体を作製し、さらにキトサン微粒子の安定性を向上させるために、ヒアルロン酸やペクチンのようなアニオン性多糖での被覆を行った。

2 実験方法

水溶性キトサンは焼津水産化学(株)より入手した。ヒアルロン酸ナトリウムとペクチンは Wako から購入した。カ



Encapsulation of proteins in chitosan particles coated with anionic polysaccharides and analyses of their functions

Toshinori Sato

Department of Biosciences and Informatics,
Keio University

ブセル化するタンパク質であるグルコースオキシダーゼ (GOD、Aspergillus niger) は ICN から購入した。

タンパク質をカプセル化したキトサン粒子の作製プロセスは図1に示した。まず、BSA や GOD をカプセル化したキトサン粒子を作製した。キトサン溶液は 20 mM MES buffer (pH6.0) に溶解した。架橋化剤として用いたトリポリリン酸 (TTP) やデキストラン硫酸 (DS) およびクエン酸三ナトリウム (TC) は Milli-Q 水に溶解した。BSA、グルコースオキシダーゼ (GOD) は Milli-Q 水に溶解した。共有結合架橋を形成するには、縮合剤である EDC を 20 mM MES Buffer (pH 5.8) に溶解して用いた。

カプセル化効率は次のようにして求めた。GOD をカプセル化した被覆化キトサン微粒子懸濁液を、遠心分離機を用いて 10000 rpm, 20 min, 4 °C の条件で遠心処理を行い、微粒子を沈殿させた。遠心後上清を回収し、上清中のタンパク質濃度をプロテインアッセイにより決定した。

$$\text{カプセル化効率 (\%)} = (\text{タンパク質仕込み濃度} - \text{上清のタンパク質濃度}) / (\text{タンパク質仕込み濃度}) \times 100$$

この微粒子懸濁液の NaCl 溶液、異なる pH 中での安定性を評価した。被覆化キトサン粒子を塩溶液と混合した。一定時間後、微粒子懸濁液を上記と同様の条件で遠心処理を行い、微粒子を沈殿させた。遠心後上清を回収し、上清をプロテインアッセイした。

3 実験結果

キトサン微粒子の作製における、架橋化剤の違いによる影響を検討した。トリポリリン酸を用いた場合、カプセル化効率が高いナノサイズの粒子を調製できる条件は見つからなかった。カプセル化効率は、10%前後であったが、粒子径とゼータ電位はキトサン/トリポリリン酸比に依存した変化が見られた。キトサンを増やすと粒子径は小さくなり、ゼータ電位は増加した。

デキストラン硫酸をクロスリンカーとした場合にはキトサン/デキストラン硫酸比が大きくなるにつれて粒子径およびカプセル化効率ともに大きくなり、ナノサイズの粒子径と高いカプセル化効率を持つ微粒子が調製される条件は見つからなかった。

クエン酸を用いて調製したキトサン微粒子では、キトサン/クエン酸の組成により、ナノサイズの粒径を有し、30

– 40% 程度のカプセル化効率を持つ微粒子が調製された。フマル酸やマレイン酸を架橋剤として用いた場合には、微粒子の形成は確認できなかった。よってクエン酸がキトサン粒子の作製には有効であることが示された。またカプセル化効率は、本研究では BSA や GOD を用いているが、タンパク質の種類により影響されることが示された。

次に、調製したキトサン微粒子懸濁液の塩強度を変化させた際の、懸濁液の濁度の変化を測定した。低分子であるクエン酸は高分子であるデキストラン硫酸ナトリウムと比較して、塩強度の変化に非常に脆弱であった。塩強度に依存して濁度が経時的に減少し、30mM NaCl でもわずか1分程で粒子が崩壊してしまう事が示された。一方、デキストラン硫酸の場合では、塩強度を変化させても濁度に大きな変化は見られず、NaCl の濃度が 150mM でも微粒子が崩壊しなかった。高分子–高分子間のコンプレックスは、ある位置で高分子同士の官能基が結合すると、近傍に存在する官能基間で次々と結合が進行するため、安定性が高いと考えられる。

次に、溶液の pH におけるキトサン微粒子懸濁液の濁度を測定した。酸性の pH ではクエン酸の荷電率の低下、pH6.5 以上ではキトサンの荷電率の低下に対応して濁度が低下し、粒子が崩壊していた。つまり、官能基の荷電率の低下に対応して濁度が減少し、荷電率が濁度の変化 (粒子の膨張や崩壊) に密接に関わっている事が示唆された。この結果は、官能基の荷電率の低下に伴い、微粒子形成の駆動力である粒子内のイオン架橋点が減少するため微粒子が徐々に膨張し、イオン架橋点がある一定以下の数になると微粒子は完全に崩壊すると考察される。

そこで、より安定なキトサン粒子を得るために EDC による共有結合架橋の形成を行ったところ、塩存在下での微粒子の安定性が改善された。またタンパク質のカプセル化効率は 80% かそれ以上となり、大幅に改善されることがわかった。キトサンの架橋化によりタンパク質の放出が抑制されていることが示された。粒子サイズとしては、動的光散乱法および走査型電子顕微鏡での観察により 4 – 5 μm 程度であることが示された。

共有結合されたキトサン粒子からの内包された GOD の放出挙動を測定した。イオン架橋化キトサン微粒子では、pH 7.4 の緩衝液中において GOD が 10 分で 80% 以上放出

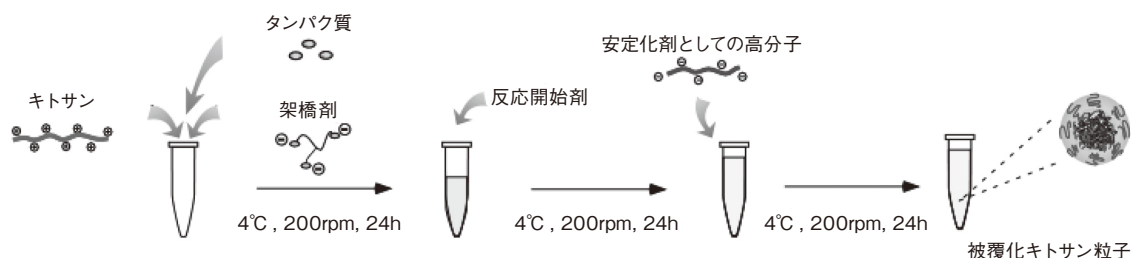


図1 タンパク質をカプセル化した微粒子の作製方法の概略図

されてしまった。一方、共有結合架橋化キトサン微粒子では、GOD の放出が大幅に抑制され、数時間後でも 10% 程度であった (図 2)。共有結合架橋により微粒子が膨張・崩壊しなくなった事でタンパク質を粒子内に安定に保持できるようになり、放出が抑制されたと考えられる。

次に、キトサン粒子をアニオン性の高分子により被覆を行った。このような 3 元複合体の作製では、キトサンのアミノ基とアニオン性高分子のカルボキシル基の比率 (N/C 比) によって調製される粒子の粒子径やカプセル化効率などの物性が変化すると考えられる。そこで複数の N/C 比でキトサン粒子を被覆し、そのキャラクタリゼーションを行なった。ヒアルロン酸で被覆した粒子では凝集の度合いが高く正確な測定が出来なかったため、ペクチンでの測定を行なった。

ペクチン被覆化キトサン粒子のカプセル化効率と粒子径の測定を行なった。カプセル化効率に関しては全体的に 60 ~ 90% の高い値を示していた。粒子径に関しては、N/C 比の増加によりミクロンオーダーからナノオーダーへの粒子サイズの減少が観察された。N/C 比が増加するにつれて粒子の凝集が抑制された。次に、ペクチン被覆キトサン粒子からの GOD の放出挙動における塩濃度の影響について検討した。その結果、塩濃度が高くなると GOD の放出がみられた (図 3)。

3 結言

キトサン粒子中にタンパク質 GOD をカプセル化することができた。水溶性のキトサンを用いることで、タンパク質の変性のない中性の pH でのカプセル化が可能であった。しかしながら、タンパク質とキトサンを混合するだけでは、溶液中でタンパク質を保持する事はできなかった。そこで、クエン酸を用いてキトサンをイオン架橋さらには共有結合架橋する事でタンパク質の保持効率を向上することができた。さらに、その表面をアニオン性の多糖で被覆すること

も可能であった。アニオン性の多糖としてヒアルロン酸は粘性が高く安定な粒子を得ることができなかったが、ペクチンを用いることで安定な粒子を得ることができた。このようなタンパク質をカプセル化した微粒子の作製を達成したが、用途によっては、溶液中での凝集の抑制や、塩溶液中での安定性を高める工夫を更に行なう必要性が示された。キトサン微粒子の安定性を向上と、タンパク質の徐放性が示されたことで、今後は細胞特異性を高めるための工夫、および細胞を活性化するタンパク質などをカプセル化して、その機能を解析する予定である。

(引用文献)

- 1) M. Morimoto et al, *Trends. Glycosci. Glycotechnol.*, 14, 205-222, (2002)
- 2) T. Sato, T. Ishii, and Y. Okahata, *Biomaterials*, 22, 2075-2080 (2001)
- 3) T. Ishii, Y. Okahata, T. Sato, *Biochim. Biophys. Acta*, 1514, 51-64 (2001)
- 4) M. Hashimoto, Z. Yang, Y. Koya, *Non-viral Gene Therapy: Gene Design and Delivery*, Springer, 63-74 (2005)
- 5) M. Hashimoto, M. Morimoto, H. Saimoto, Y. Shigemasa, T. Sato, *Bioconjugate Chemistry*, 17, 309-316 (2006)
- 6) M. Hashimoto, M. Morimoto, H. Saimoto, Y. Shigemasa, H. Yanagie, M. Eriguchi and T. Sato, *Biotechnology Letters*, 28, 815-821 (2006)
- 7) M. Hashimoto, Y. Koyama, and T. Sato, *Chem Lett.* 37266-267 (2008)

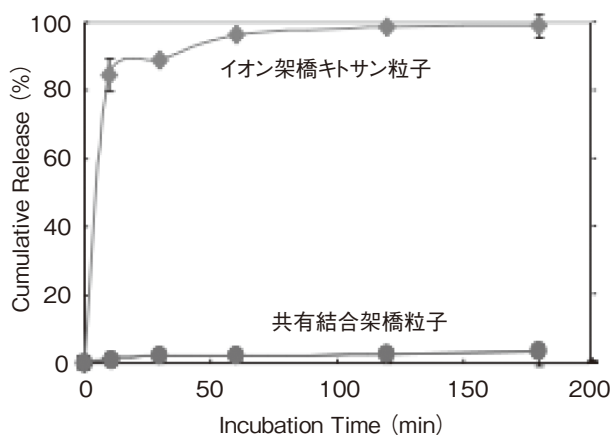


図2 イオン架橋および共有結合架橋したキトサン粒子からの GOD の放出

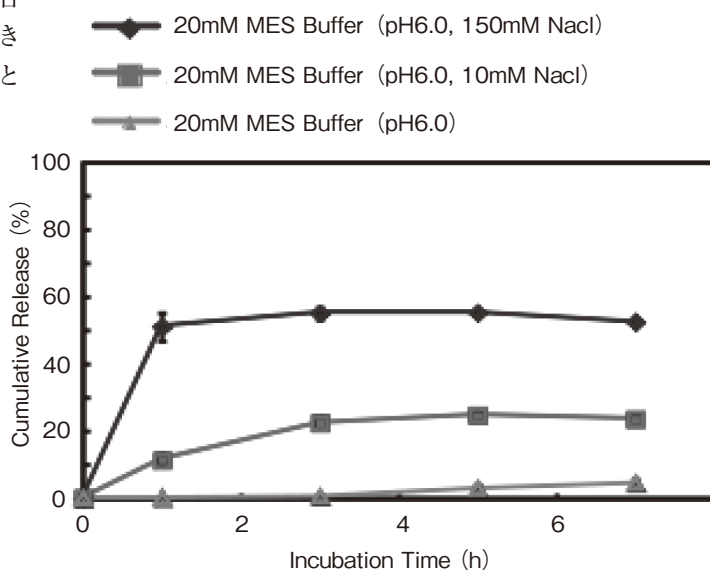


図3 ペクチン被覆化キトサン微粒子からの GOD の放出の塩濃度依存性