

# トレオン酸修飾キトサンおよびキシロン酸修飾キトサンの凍結-融解処理によるゲル化特性ならびに生物学的特性の評価

武井 孝行 (鹿児島大学 大学院理工学研究科, takei@cen.kagoshima-u.ac.jp)

中原 秀樹 (九州大学 大学院工学研究院化学工学部門)

川上 幸衛 (九州大学 大学院工学研究院化学工学部門, kawakami@chem-eng.kyushu-u.ac.jp)

吉田 昌弘 (鹿児島大学 大学院理工学研究科, myoshida@cen.kagoshima-u.ac.jp)

## Preparation of chitosan-threonic acid and chitosan-xylonic acid conjugates gellable by freeze-thawing and evaluation of their biological properties

Takayuki Takei (Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, Japan)

Hideki Nakahara (Graduate School of Engineering, Kyushu University, Japan)

Koei Kawakami (Graduate School of Engineering, Kyushu University, Japan)

Masahiro Yoshida (Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, Japan)

### 要約

キトサンは、ヒト生体に対して極めて毒性が低く、優れた生体適合性ならびに生体吸収性を示す高分子である。従来、キトサンからなるヒドロゲルを調製する際には、グルタルアルデヒドなどの毒性が高い化学架橋剤が使用されてきた。一方、筆者らは前報において、アルドン酸の一種であるグルコン酸 (C6) を修飾したキトサンが、化学架橋剤の非存在下で凍結-融解処理のみによりゲル化することを見出し、そのゲルがバイオマテリアルとして優れた生物学的特性を有していることを実証した。本報では、グルコン酸とは分子量の異なるアルドン酸を修飾したキトサン誘導体が、グルコン酸修飾キトサンと同様のゲル化特性ならびに生物学的特性を有しているか調査した。アルドン酸として、トレオン酸 (C4) とキシロン酸 (C5) を選択した。トレオン酸修飾キトサンおよびキシロン酸修飾キトサンのいずれも、グルコン酸修飾キトサンと同様に、未修飾のキトサンに比べて中性水溶液への溶解性が向上した。また、それらキトサン誘導体の水溶液は、凍結-融解処理によりゲル化した。このように、修飾するアルドン酸の分子量が減少してもキトサン誘導体は凍結-融解処理によりゲル化することが示された。さらに、グルコン酸修飾キトサンと同様に、トレオン酸修飾キトサンは毒性が低く、そのゲルはリゾチームにより分解され、細胞接着性が低いことを示した。

### キーワード

クライオゲル, キトサン, グルコン酸, キシロン酸, トレオン酸

### 1. はじめに

キトサンは、カニやエビの甲羅などから抽出されるキチン ( $\beta$ -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り得られるアミノ多糖である。この天然高分子はヒト生体に対して極めて毒性が低く、優れた生体適合性ならびに生体吸収性を示す (Ono et al., 2000; Ma et al., 2010)。また、高い抗菌性や抗腫瘍活性も有している (Murakami et al., 2010)。このような特徴から、キトサンは医療用材料として広く使用されている。

生体内に埋植するような医療用途にキトサンを応用する場合、固体状で使用するよりもヒドロゲル状にしたものを使用する方が都合が良い場合がある。これは、一般的にヒドロゲルが柔軟性に優れており、生体組織との摩擦や圧迫による炎症反応が起こりにくいためである。キトサンからなるヒドロゲルを調製する場合、グルタルアルデヒドなどの生体に対する毒性が高い化学架橋剤が広く使用されている (Nikonov et al., 2010; Lozinsky et al., 1982; Chen et al., 2005)。また、キトサンは結晶性が極めて高く、水に溶解させるためには分子中のアミノ基のプロトン化が必須であることから、溶解でき

る溶媒は酸性溶媒に限られる。従って、その高分子水溶液から得られるキトサンゲルは酸性を示す (Lozinsky et al., 1982; Berger et al., 2004)。このように化学架橋剤を含み、かつ酸性を示すゲルは医療用途には適さない。

筆者らはこれまでに、アルドン酸の一種であるグルコン酸を修飾したキトサン (CG) が中性水溶液に溶解し、かつ、その高分子水溶液が凍結-融解処理によりゲル化することを見出している。このキトサンクライオゲル (クライオゲルとは、高分子水溶液の凍結-融解処理により得られるゲルの意) は中性を示し、化学架橋剤を含まないため、医療用ゲルとして適している。また、そのキトサンゲルが創傷被覆材として優

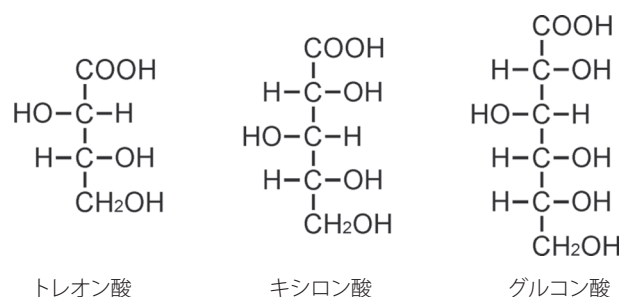


図1: トレオン酸、キシロン酸およびグルコン酸の構造  
注: 全てD体で表記。

ていることも実証している (Takei et al., 2012; 2013)。筆者らの前報ではアルドン酸としてグルコン酸 (図1) のみを使用しており、その他のアルドン酸を修飾したキトサンが同様の特性を有するか不明であった。そこで本報では、アルドン酸としてトレオン酸とキシロン酸 (図1) を選択し、それらを修飾したキトサンが、CGと同様の特性を有するか検証した。

## 2. 実験

### 2.1 アルドン酸修飾キトサンの作製

キトサンLL (脱アセチル化度80%、焼津水産化学工業株式会社) を25 mM MES (2-morpholinoethanesulfonic acid) 緩衝液 (pH4.0) に0.25% (w/v) となるように溶解した。続いて、その溶液にアルドン酸塩 (トレオン酸カルシウムまたはキシロン酸カルシウム)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (EDC) およびN-ヒドロキシコハク酸イミド (NHS) を溶解し、室温で24時間攪拌を続けた。水酸化ナトリウム水溶液を加えることでその混合水溶液のpHを8.0に調整後、10倍量のエタノールを加えてキトサン誘導体を析出させた。析出したキトサン誘導体を回収し、それを透析膜 (分画分子量3000 Da) に入れ、蒸留水中で約1週間透析を行った。透析後の溶液のpHを8.0に調整し、10倍量のエタノールを加え、再度キトサン誘導体を析出させた後、析出物を凍結乾燥した。キトサン誘導体の調製条件ならびに得られた誘導体の略称を表1に示す。トレオン酸およびキシロン酸の導入率は、電導度測定により求めた (de Alvarenga et al., 2010)。

### 2.2 キトサン誘導体の溶解特性評価

50 mM MES 緩衝液50 mlにキトサン誘導体を0.5 g溶解した (pH 4.0)。続いて、水酸化ナトリウム水溶液を少しずつ添加し、水溶液のpHを約0.5きざみで上昇させた。各pHにおける溶液の濁度 (600 nm) を測定した。

### 2.3 キトサン誘導体水溶液の凍結 - 融解処理

キトサン誘導体を希塩酸に1% (w/v) 濃度で溶解した。続いて、水酸化ナトリウム水溶液を徐々に加えることで溶液のpHを7.0に調整した。その溶液を-30℃で24時間凍結した後、室温で2時間静置することで融解した。

### 2.4 キトサン誘導体の細胞毒性評価

マウス線維芽細胞 (L929、理研セルバンク) を懸濁した10% (v/v) ウシ胎児血清 (FBS) 添加ダルベッコ改変イーグル培地

(DMEM、 $1.0 \times 10^4$  cells/ml) を96ウェルプレートの各ウェルに0.1 mlずつ加え、37℃および5% CO<sub>2</sub>条件下で24時間静置した。続いて、キトサン誘導体を溶解した10% (v/v) FBS添加DMEM (pH 7.4) 0.1 mlをウェルに加え、さらに24時間静置培養を行った。ウェルから溶液を取り除き、新鮮培地でウェルを洗浄した後、10%WST-8 (同仁化学) 添加培地を加え、培養4時間後にその培地の450 nmにおける吸光度を測定することで細胞生存率を算出した。なお、キトサン誘導体を含まない培地で処理した細胞の生存率を100%とした。

### 2.5 キトサンクライオゲルの酵素的加水分解特性評価

5 mg/mlウマ心筋由来リゾチームを溶解させた、カルシウムイオンおよびマグネシウムイオンを含まないリン酸緩衝生理食塩水 (PBS (-), pH 7.4) に、キトサンクライオゲル (4 ml) を投入し、37℃および150 rpmで振とうしながら経時的にゲルの状態を観察した。

### 2.6 キトサンクライオゲルの細胞接着性評価

キトサン誘導体を希塩酸に1% (w/v) 濃度で溶解した。続いて、水酸化ナトリウム水溶液を徐々に加えることで溶液のpHを7.0に調整した後、48ウェルプレートの各ウェルにその溶液を加え、-30℃で24時間凍結した。その後、室温で融解することでウェルをキトサンクライオゲルで覆った。10% (v/v) FBS添加DMEMでゲルを洗浄した後、L929細胞を $8.0 \times 10^4$  cells/wellの細胞密度で播種した。細胞播種後24時間目に細胞を観察した。

## 3. 結果と考察

アルドン酸の導入率がそれぞれ25%および15%であるCTおよびCXを用いて以下の検討を行った (表1)。なお、前報のCGのアルドン酸 (グルコン酸) 導入率は19%である (Takei et al., 2012)。

### 3.1 キトサン誘導体の溶解特性評価

酸性水溶液中では、キトサン分子中のアミノ基のプロトン化が進み、それにより結晶構造が崩れるため、キトサンは酸性水溶液に溶解する。そこからpHを徐々に上げていくと、アミノ基の脱プロトン化が進み、再度結晶化が起こる。脱アセチル化度や分子量にも大きく依存するが、一般にキトサンはpH 6.5を過ぎたあたりから急激に結晶化が進み析出する (図2)。一方、CGと同様に、CTおよびCXともにその析出が抑え

表1: キトサン誘導体調製時におけるキトサン中のグルコサミン単位に対するアルドン酸塩、EDCおよびNHSの仕込みモル比、ならびにアルドン酸の導入率

略称	グルコサミン単位	トレオン酸カルシウム	キシロン酸カルシウム	グルコン酸ナトリウム	EDC	NHS	アルドン酸導入率 (%) <sup>a</sup>
CT	1	2	-		2	1	25
CX	1	-	2		1	0.5	15
CG	1	-	-	2	2	1	19

注: <sup>a</sup>アルドン酸導入率=アルドン酸が導入されたグルコサミン単位数×100/修飾処理前の全グルコサミン単位数。

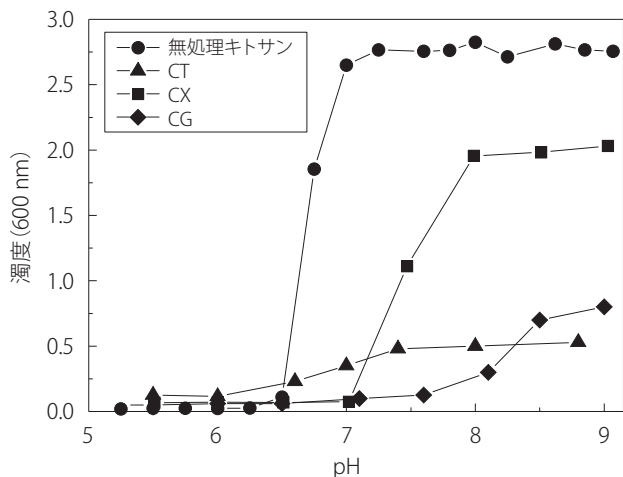


図2：水溶液のpHとキトサン誘導体の溶解性の関係

られた (図2)。これは、キトサン誘導体分子中のアルドン酸部位がキトサンの結晶化を立体的に阻害しているためであると考えられる。

### 3.2 キトサン誘導体水溶液の凍結-融解処理

CGと同様に、凍結-融解処理によりゲル化するポリビニルアルコール (PVA) (Yokoyama et al., 1986; Kawanishi et al., 1987) を参考に、CGのゲル化メカニズムを以下に考察する。PVA水溶液を冷却し、その温度が0℃以下になると、氷結晶が生成しそれが徐々に成長する。氷結晶内部には溶質は組み込まれないため、氷結晶の成長とともにその周囲の液体状態の水中のPVA濃度が上昇し、最終的には飽和溶解度を超え、氷結晶の間隙にPVA固体が析出する。結晶性の高いPVAは、析出とともに容易に結晶化 (高分子の物理的架橋点) するため、凍結物内部に多孔質状の強固な固体高分子骨格が生成する。この凍結物を室温で放置すると、氷結晶は融解し液体の水が生成するが、その水にPVA固体高分子骨格はほとんど溶解しない (固体PVAを水に溶解させるためには、PVAの結晶構造を壊すために水溶液を高温にする必要があり、室温程度ではほとんど水に溶解しない) ことから、融解物はゲル状になる。以上より、凍結-融解処理により高分子ゲルを調製するためには、凍結物の融解の際に生じる水に固体高分子骨格が溶解しないことが必要である。CGの場合、酸性水溶液にCGを溶解し、その溶液を中性にした後に、凍結-融解している (Takei et al., 2012)。その凍結物の融解の際に生じる水も中性である。一方、CG固体は、酸性水溶液には溶解するが、中性水溶液に直接溶解することはない (Takei et al., 2012)。従って、凍結物内に生成したCG固体高分子骨格が融解の際に生じる水に溶解しないことから、CG水溶液の凍結-融解処理によりクライオゲルを調製できると考える。

今回調製したCTおよびCXのいずれとも、その高分子水溶液は凍結-融解処理によりゲル化した (図3)。CGと同様の機構によりゲル化したと考える。これより、修飾するアルドン酸の炭素原子数が減少 (分子量が減少) しても、キトサンクライオゲルの調製が可能であることが明らかとなった。以降の検討では、CTのみを使用した。

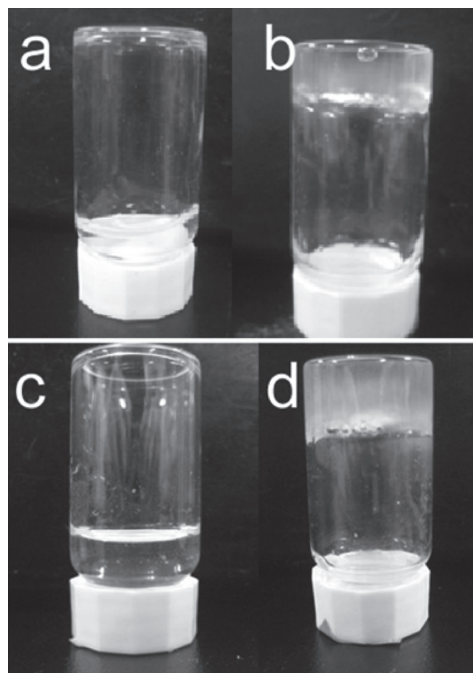


図3：凍結-融解処理前 (a, c) および処理後 (b, d) のCT水溶液 (a, b) およびCX水溶液 (c, d)

### 3.3 CTの生物学的特性評価

CTの細胞毒性を調査したところ、0.25% (w/v) 濃度においてもほとんど毒性がなかった (図4)。また、CTのクライオゲルはヒト生体内にも存在するリゾチームにより分解された。つまり、このゲルは生体吸収性を有していた (図5)。さらに、そのゲルの細胞接着性は非常に低かった (図6)。これらの特性は、CGとほぼ同じであり、キトサンに修飾するアルドン酸の分子量による影響は見られなかった。従って、CTもCGと同様に、創傷被覆材などのバイオメディカル分野での利用が可能であると考えられる。

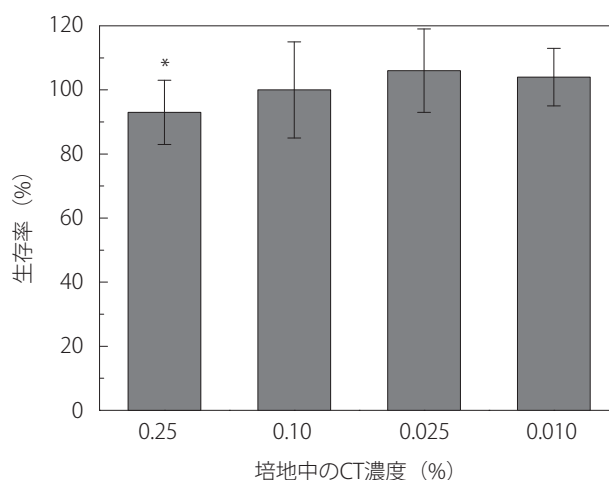


図4：CTの細胞毒性

注：\* $p = 0.19$  vs CT濃度0.01%

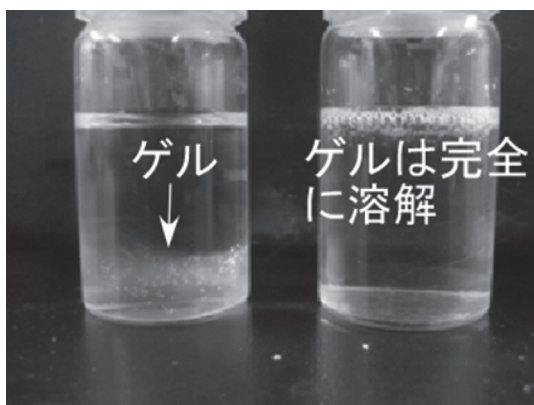


図5：リゾチーム不含PBS (-) および含有PBS (-) 内で5時間振盪した後のCTクライオゲルの様子

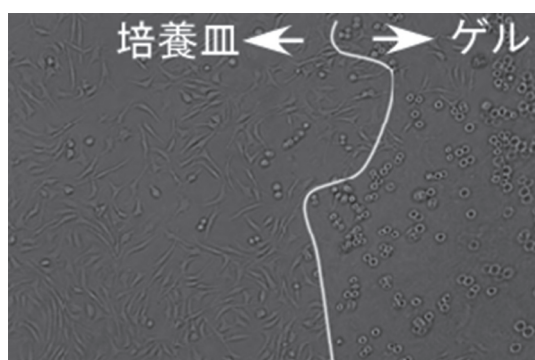


図6：CTクライオゲルで底面の一部を覆った培養皿にL929細胞を播種し、24時間後の細胞の形態（ゲル上には細胞はほとんど接着していない。）

#### 4. まとめ

トレオン酸またはキシロン酸を修飾したキトサンは、未処理のキトサンに比べ、中性水溶液への溶解性が向上した。また、トレオン酸修飾キトサンは細胞毒性が極めて低く、そのクライオゲルはリゾチームにより分解することができ、細胞接着性は低かった。

#### 引用文献

- Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A. and Gurny, R. (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Vol. 57, 19-34.
- Chen, H. M., Wei, O. Y., Bisi, L. Y., Martoni, C. and Prakash, S. (2005). Reaction of chitosan with genipin and its fluorogenic attributes for potential microcapsule membrane characterization. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 75, 917-927.
- de Alvarenga, E. S., de Oliveira, C. P. and Bellato, C. R. (2010). An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 80, 1155-1160.

- Kawanishi, K., Komatsu, M. and Inoue, T. (1987). Thermodynamic consideration of the sol-gel transition in polymer-solutions. *Polymer*, Vol. 28, 980-984.
- Lozinsky, V. I., Vainerman, E. S. and Rogozhin, S.V. (1982). Study of cryostructurization of polymer systems .2. the influence of freezing of a reacting mass on the properties of products in the preparation of covalently cross-linked gels. *Colloid and Polymer Science*, Vol. 260, 776-780.
- Ma, G., Qian, B., Yang, J., Hu, C. and Nie, J. (2010). Synthesis and properties of photosensitive chitosan derivatives. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 46, 558-561.
- Murakami, K., Aoki, H., Nakamura, S., Nakamura, S., Takikawa, M., Hanzawa, M., Kishimoto, S., Hattori, H., Tanaka, Y., Kiyosawa, T., Sato, Y. and Ishihara, M. (2010). Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings. *Biomaterials*, Vol. 31, 83-90.
- Nikonorov, V. V., Ivanov, R. V., Kil'deeva, N. R., Bulatnikova, L. N. and Lozinskii, V. I. (2010). Synthesis and characteristics of cryogels of chitosan crosslinked by glutaric aldehyde. *Polymer Science Series A*, Vol. 52, 828-834.
- Ono, K., Saito, Y., Yura, H., Ishikawa, K., Kurita, A., Akaike, T. and Ishihara, M. (2000). Photocrosslinkable chitosan as a biological adhesive. *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 49, 289-295.
- Takei, T., Nakahara, H., Tanaka, S., Nishimata H., Yoshida, M., Kawakami, K. (2013). Effect of chitosan-gluconic acid conjugate/poly(vinyl alcohol) cryogels as wound dressing on partial-thickness wounds in diabetic rats. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Vol. 24, 2479-2487.
- Takei, T., Nakahara, H., Ijima, H. and Kawakami, K. (2012). Synthesis of a chitosan derivative soluble at neutral pH and gellable by freeze-thawing, and its application in wound care. *Acta Biomaterialia*, Vol. 8, 686-693.
- Yokoyama, F., Masada, I., Shimamura, K., Ikawa, T. and Monobe, K. (1986). Morphology and structure of highly elastic polyvinyl-alcohol hydrogel prepared by repeated freezing-and-melting. *Colloid and Polymer Science*, Vol. 264, 595-601.

(受稿：2013年11月5日 受理：2013年11月13日)