

擬似体液浸漬によるグルコン酸修飾キトサンスキャホールドのヒドロキシアパタイトでの被覆

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

福本 晃平 (鹿児島大学 大学院理工学研究科, k9126027@kadai.jp)

檀上 創 (鹿児島大学 大学院理工学研究科, k0632265@kadai.jp)

大角 義浩 (鹿児島大学 大学院理工学研究科, ohzuno@cen.kagoshima-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)

Hydroxyapatite coating on chitosan-gluconic acid conjugate scaffolds

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

Kohei Fukumoto (Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, Japan)

So Danjo (Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, Japan)

Yoshihiro Ohzuno (Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University, Japan)

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

要約

硬骨は、姿勢の維持や内臓の保護、血球の生産など、ヒトが生命活動を行っていく上で重要な役割を担っている。生体組織工学技術を利用して、損傷した硬骨を人工的に再建する場合には、骨芽細胞の移動ならびに増殖のための足場となる高分子多孔体（スキャホールドと呼ばれる）が必要である。われわれはこれまでに、グルコン酸を修飾したキトサン（GC）の水溶液を凍結後、それを融解するだけで、キトサンスキャホールドを作製できることを見出している。本研究では、擬似体液への浸漬により、GCスキャホールド表面を骨伝導性の高いヒドロキシアパタイト（HAp）で被覆できるか調査した。GCスキャホールドをそのまま擬似体液に浸漬しただけでは、スキャホールド表面にHApはほとんど生成しなかった。一方、擬似液中でのHApの不均一核生成を誘発するシリカ（SiO₂）ナノ粒子をGCスキャホールドに組み込むことで、スキャホールドをHApで被覆することができた。また、そのHAp/GCスキャホールド内で骨芽細胞としての特性を有するMG63細胞は増殖できた。以上より、本研究のHAp/GCスキャホールドは硬骨再建用スキャホールドとして有用であることが示唆された。

キーワード

キトサン, ヒドロキシアパタイト, 擬似体液, 不均一核生成, 硬骨再生

1. はじめに

硬骨は、姿勢の維持や内臓の保護、血球の生産など、ヒトが生命活動を行っていく上で重要な役割を担っている。したがって、病気や事故などにより硬骨が欠損した場合、その補填が必要になる。近年、その補填に生体組織工学が応用されている。生体組織工学とは、人工的に生体組織を生体内または生体外で作り出し、それを様々な疾患の治療に利用しようとするものである。この方法で組織を作り出す場合、まず、目的の組織の形状に整形したスキャホールドと呼ばれる生体吸収性の多孔体内に、その組織の細胞を播種する。続いて、細胞を増殖させながらスキャホールドが徐々に分解されることで人工物を含まない生体組織を作り出す（Langer and Vacanti, 1993）。この方法においては、スキャホールド材料が細胞の増殖速度や最終的に作り出した組織の機能にも影響する。硬骨再建用スキャホールド材料として有望であるのがヒドロキシアパタイト（HAp）である。これは、HApが硬骨の主要な無機成分であり、高い骨伝導性を有しているためである（Wei et al., 2011）。しかしながら、無機物であるHApのみからなるスキャホールドは脆く、使用に耐えられない。そこで、柔軟性に優れた有機高分子からなる多孔体表面をHApで被覆

する手法が広く採用されている（Sowjanya et al., 2013）。その有機高分子は、前述のように、生体吸収性ならびに高い生体適合性が求められる。また、スキャホールドを体内に埋め込むことを考えると、抗菌性も有することが好ましい。

キトサンはカニやエビの甲羅から抽出される天然のアミノ多糖である。この高分子は生体吸収性ならびに高い生体適合性、さらには優れた抗菌性を有している。このような特徴から、スキャホールド材料として使用されているが、その整形の際にキトサン分子の架橋が必要であり、それにグルタルアルデヒドなどの毒性の高い化学架橋剤が使用されている（Nikonorov et al., 2010）。そのような化学架橋剤を含むスキャホールドを医療用途に使用することは好ましくない。一方、これまでにわれわれは、化学架橋剤を使用することなく、グルコン酸を修飾したキトサン（GC）の水溶液を凍結後、融解するだけで、キトサンスキャホールドを作製できることを見出し、それが創傷被覆材や軟骨再生用スキャホールド材料として有用であることを見出している（Takei et al., 2012; 2013; 2016; 2016; 武井他, 2013）。

有機高分子からなるスキャホールドをHApで被覆する方法として、擬似液中にスキャホールドを浸漬し、不均一核生成によりHApを生成させる方法がある。本法によりスキャホールド表面をHApで被覆できるか否かは、その表面の特性（電荷等）に大きく依存する。これまでに、本法により、凍結-融解処理によって作製したGCスキャホールドの表面を

HApで被覆可能であるか調査した例はないため、本研究ではその調査を行った。

2. 実験

2.1 GCの作製

われわれの前報にしたがって、グルコン酸の導入率が11%のGCを作製した (Takei et al., 2012)。なお、グルコン酸導入率は、キトサン中の全グルコサミン単位数のうち、グルコン酸が導入されたグルコサミン単位数を表す。

2.2 GC スキャホルドの作製

希塩酸に2% (w/v)濃度でGCを溶解した。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、その溶液を直径15 mmの円筒容器に入れ、 -30°C で6時間凍結した。その後、室温で2時間静置し融解することでGCスキャホルドを作製した。シリカナノ粒子を含むスキャホルドは、pHを7.0に調製したGC水溶液内に1または3% (w/v)の濃度でシリカナノ粒子 (Aldrich社製、10-20 nm)をよく分散させ、以降は同様の手順で作製した。

2.3 GC スキャホルドの擬似体液への浸漬

Oyaneら (2003)の報告にしたがって擬似体液を調製した (142 mM Na^+ , 5.0 mM K^+ , 1.5 mM Mg^{2+} , 2.5 mM Ca^{2+} , 148 mM Cl^- , 4.2 mM HCO_3^- , 1.0 mM HPO_4^{2-} , 0.5 mM SO_4^{2-})。擬似体液中にGCスキャホルドを浸し、 37°C で2週間静置した。

2.4 擬似体液浸漬後のスキャホルドの特性評価

擬似体液浸漬後のスキャホルドを蒸留水で洗浄した後、凍結乾燥し、金蒸着後、走査型電子顕微鏡 (SEM)により観察した。HApの同定にはフーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR)およびX線回折装置 (XRD)を用いた。その測定では、スキャホルドをすり潰し、粉状にしたものを用いた。

2.5 細胞毒性試験

擬似体液中に2週間浸すことで作製したHAp/GCスキャホルドを蒸留水でよく洗浄した。そのスキャホルドを培地に

浸すことでスキャホルド内の蒸留水を培地に置換し、アガロースゲルでコートした24ウェルプレート内に入れた。そのスキャホルド上に、ヒト骨肉腫細胞 (MG63、RIKEN CELL BANK、RBC1890)を懸濁した培地 ($5.8 \times 10^4\text{ cells/ml}$) 0.4 mlを滴下し、6時間後にスキャホルドを、アガロースゲルでコートした別のウェルに移し、培地を加え所定の期間培養した。ウェルから溶液を取り除き、10% (w/v) WST-8 (同仁化学社製) 添加培地を加え、培養3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。

3. 結果と考察

擬似体液に浸したスキャホルド表面でのHApの不均一核生成が起こるか否かは、スキャホルド原料の高分子の官能基に大きく依存する。特にカルボキシル基は、カルシウムイオンと強く相互作用し、それがHApの不均一核生成を引き起こす (Furuzono et al., 2000)。一方、GCはカルボキシル基を有しておらず、カルボキシル基-カルシウムイオン間でのイオン-イオン相互作用は期待できないが、カルシウムイオンとキトサンのヒドロキシル基、およびカルボニル基とのイオン-極性基間相互作用によりHApの不均一核生成が起こる可能性がある。そこでまずは、その確認を行った。凍結-融解処理により作製したGCスキャホルドを図1 (a)に示す。これを2週間、擬似体液中に浸漬したがスキャホルドの表面にHApの結晶はほとんど観察されなかった (図1 (b))。

擬似体液に浸漬することでHApを生成する物質としてシリカ (SiO_2)が広く知られている (Sowjanya et al., 2013)。これは、シリカ表面のSi-OH基がHApの不均一核生成を強力に促進するためである。そこで、本研究では、GCスキャホルドにシリカナノ粒子を組み込むことで、HApの生成が促進されるか調査した。シリカナノ粒子を1または3% (w/v)加えたGCスキャホルドの外観ならびにその表面は、シリカナノ粒子を含まないものと同様であった。そのスキャホルドを擬似体液に2週間浸した後、表面を観察したところ、球状の粒子が観察された (図1 (c, d))。また、その球状粒子の数は、より多くのシリカナノ粒子を添加したものの方が多かった。そこで次にFT-IRおよびXRDを用いて球状粒子の同定を行っ

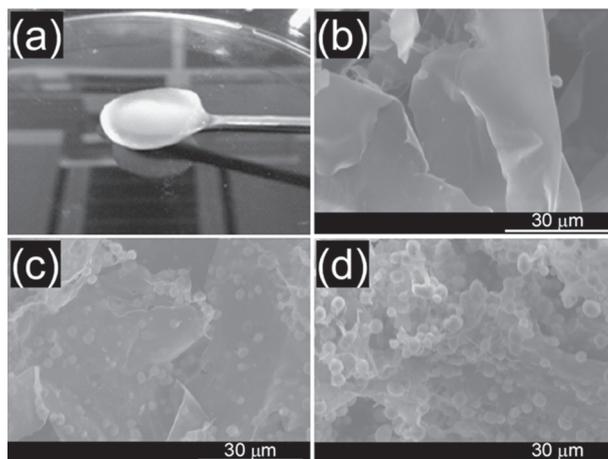


図1：(a) GCスキャホルド、(b-d) 擬似体液に2週間浸した0% (b)、1% (c) および3% (d) シリカナノ粒子含有GCスキャホルドのSEM像

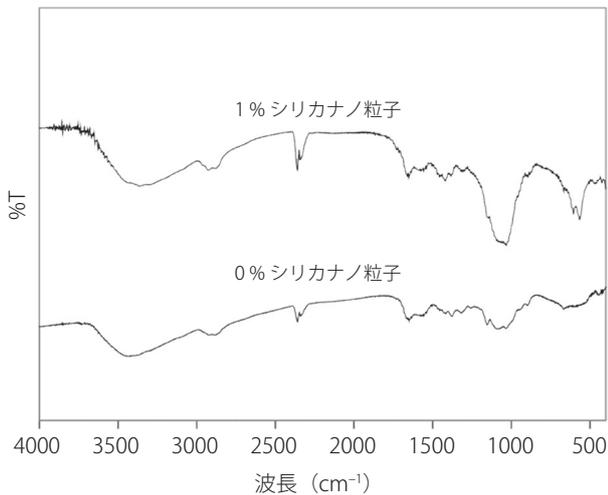


図2：擬似体液に2週間浸した0%および1%シリカナノ粒子含有GCスキャホールドのFT-IRスペクトル

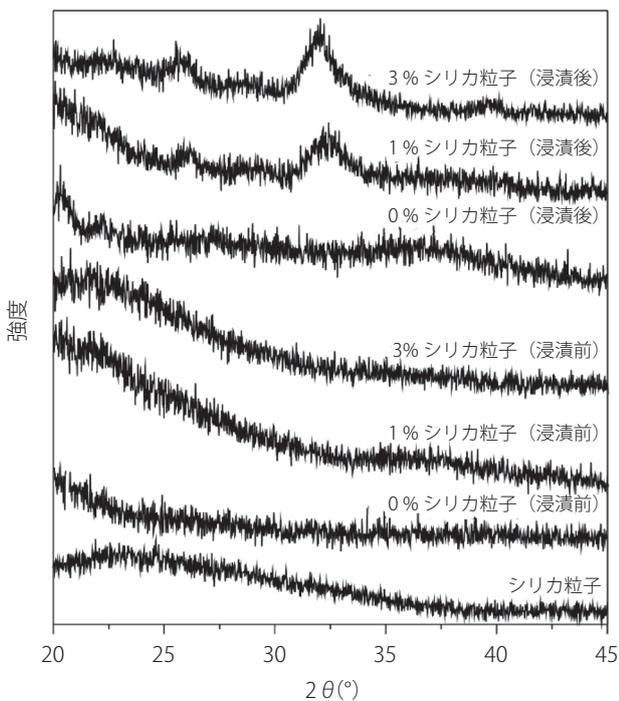


図3：シリカナノ粒子、0-3%シリカナノ粒子含有GCスキャホールド、および擬似体液に2週間浸した0-3%シリカナノ粒子含有GCスキャホールドのX線回折スペクトル

た。FT-IRスペクトルを図2に示す。シリカナノ粒子を含まないスキャホールドの 1651 cm^{-1} および 1552 cm^{-1} におけるピークは、それぞれキトサンのアミドIおよびIIを示している。また、 3420 cm^{-1} 付近でのブロードピークは高分子の-NHおよび-OH基を表している。シリカナノ粒子含有スキャホールドを擬似体液に2週間浸したものでは、 PO_4^{3-} に対応する新しいピークが 600 cm^{-1} 付近に観察された(Wei et al., 2011)。次に、シリカナノ粒子やシリカナノ粒子不含GCスキャホールド、シリカナノ粒子含有GCスキャホールドをXRDで測定したところ、明確なピークは見られなかった(図3)。一方、シリカ

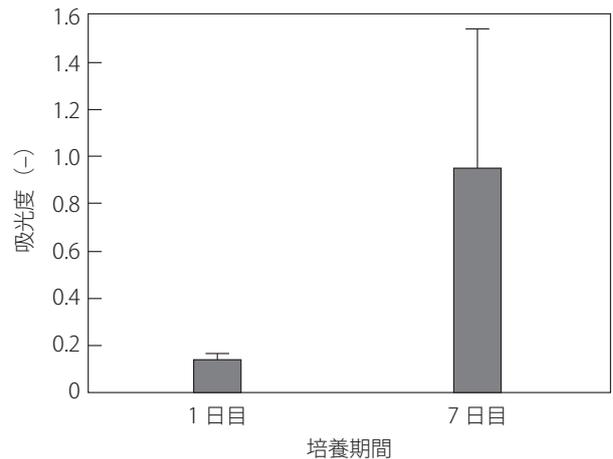


図4：擬似体液に2週間浸すことでHApで被覆した1%シリカナノ粒子含有GCスキャホールド中でのMG63細胞の増殖

ナノ粒子含有GCスキャホールドを擬似体液に2週間浸したのものには 26° および 32° 付近にピークが観察できた。これはHApの(211)、(112)および(300)面に帰属するピークであることから、シリカナノ粒子含有GCスキャホールドを擬似体液に浸漬することで、スキャホールド表面をHApで被覆できることが示された。

最後に骨芽細胞としての特性を有するMG63細胞をそのHAp/GCスキャホールド中で培養し、その細胞毒性を調査した。培養7日目の細胞数は1日目よりも多く、HAp/GCスキャホールド中でMG63が増殖したことが示された。この結果は、HAp/GCスキャホールドが硬骨作製用スキャホールドとして有望であることを示している。

4. まとめ

GCスキャホールドを擬似体液に浸漬してもHApの生成はほとんど認められなかった。一方、GCスキャホールドにシリカナノ粒子を組み込むことで、スキャホールド表面をHApで被覆することができた。また、そのHAp/GCスキャホールド内で骨芽細胞としての特性を有するMG63細胞は増殖できた。

引用文献

- Furuzono, T., Taguchi, T., Kishida, A., Akashi, M., and Tamada, Y. (2000). Preparation and characterization of apatite deposited on silk fabric using an alternate soaking process. *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 50, 344-352.
- Langer, R. and Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science*, Vol. 260, 920-926.
- 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.
- Oyane, A., Kim, H. M., Furuya, T., Kokubo, T., Miyazaki, T., and Nakamura, T. (2003). Preparation and assessment of revised simulated body fluids. *Journal of Biomedical Materials Re-*

-
- search Part A, Vol. 65, 188-195.
- Sowjanya, J. A., Singh, J., Mohita, T., Sarvanan, S., Moorthi, A., Srinivasan, N., and Selvamurugan, N. (2013). Biocomposite scaffolds containing chitosan/alginate/nano-silica for bone tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 109, 294-300.
- Takei, T., Nakahara, H., Ijima, H., and Kawakami, K. (2012). Synthesis of a chitosan derivative soluble at neutral pH and gelable by freeze-thawing, and its application in wound care. *Acta Biomaterialia*, Vol. 8, 686-693.
- 武井孝行・中原秀樹・川上幸衛・吉田昌弘 (2013). 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. *科学・技術研究*, Vol. 2, No. 2, 123-126.
- Takei, T., Nakahara, H., Tanaka, S., Nishimata, H., Yoshida, M., and 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., Yoshitomi, H., Fukumoto, K., Danjo, S., Yoshinaga, T., Nishimata, H., and Yoshida, M. (2016). Toxic chemical crosslinker-free cryosponges made from chitosan-gluconic acid conjugate for chondrocyte culture. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, in press.
- Takei, T., Fukumoto, K., Danjo, S., Yoshinaga, T., Nishimata, H., and Yoshida, M. (2016). In vitro and in vivo characterization of hydroxyapatite/chitosan-gluconic acid conjugate scaffolds. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, in press
- Wei, K., Li, Y., Kim, K., Nakagawa, Y., Kim, B., Abe, K., Chen, G., and Kim, I. (2011). Fabrication of nano-hydroxyapatite on electrospun silk fibroin nanofiber and their effects in osteoblastic behavior. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Vol. 97A, 272-280.

(受稿：2016年11月9日 受理：2016年11月28日)