「キチン・キトサン」特集

キトサンのカプセル化への応用

塩谷 敏明

1. はじめに

キトサンは、海老や蟹などの甲羅等に含まれているキチンを脱アセチル化することによって得られる多糖類で、弱酸性溶液に溶解すると、アミノ基がアンモニウム化して陽イオン性高分子(ポリカチオン)となる。多糖類でポリカチオンとなるものはキトサン以外になく、ほかの多糖類にはない特徴や性質を示すようになる。このポリカチオンという性質を利用して、天然高分子凝集剤として水処理に利用され始めた。

ポリカチオンであるキトサン溶液と陰イオン性高分子(ポリアニオン)溶液とを接触させると、両者の界面に高分子電解質複合体から成るゲル膜を形成させることができる。この電荷の異なる高分子どうしのゲル化反応は、温度やpH、イオン強度などが生物的に温和な条件下で行うことができるので、酵素や微生物に限らず動物細胞などのカプセル化に応用することができる。また、カプセル膜の透過性は、高分子どうしの反応を利用するため、高分子溶液の性質を変えることにより制御できることがわかってきている。

ここでは、キトサンとポリアニオン多糖類との反応を利用したカプセルの調製方法およびその性質と、キトサンカプセルを動物細胞の培養に応用した例について紹介する。

2. カプセル化法

カプセル化法は包み込む物質や使用目的により種々の方法がある。表1に示したように、製法原理から化学的方法および物理化学的方法、機械的・物理的方法に分類される¹⁾。動物細胞をカプセル化して培養するという目的から、カプセル化法は自ずと限定される。物理化学的

表1 カプセル化法

化学的方法	1. 界面重合法 2. in situ 重合法 3. 液中硬化被覆法 (1)硬化剤を用いる方法 (2)熱凝固を利用する方法 (3)反対電荷高分子どうしの結合を利用する方法
物理化学的方法	1. 相分離法 (1)水溶液系 (2)有機溶媒系 2. 液中乾燥法 3. 溶解分散冷却法
機械的・物理的方法	1. 気中懸濁被覆法 2. スプレードライイング法 3. 真空蒸着被覆法 4. 静電的合体法

方法や機械的・物理的方法では、カプセルを調製する過程で高温になったり、pHが大きく変化したり、あるいは有機溶媒を使用することから、細胞などの生物学的物質のカプセル化には使えない。化学的方法には、界面重合法と in situ 重合法、液中硬化被覆法がある。界面重合法と in situ 重合法は高分子の合成反応を利用する方法であり、液中硬化被覆法は完成された高分子の性質変化を活用する方法である。これら化学的方法のうち、より温和な条件でカプセルをつくることができるのは、液中硬化被覆法である。液中硬化被覆法には、アルギン酸ナトリウムや低メトキシルペクチンをカルシウムなどの多価金属イオンを硬化剤として用いカプセル化する方法や、寒天やゼラチンなど、温度によるゾル・ゲル転移を利用してカプセル化を行う方法、キトサンとポリアニオ

Encapsulation with Chitosan

筆者紹介 TOSHIAKI SHIOYA

Technical Research Institute, Snow Brand Milk Products Co., Ltd

雪印乳業株式会社技術研究所 研究員

筆者は、「キチン、キトサンの応用」技報堂出版1990(共著)を出筆されている様に、食品物性の研究を行なっておられる。趣味は囲碁、テニス。

本稿では、キトサンの細胞培養への応用を豊富な実例をもとに紹介していただいた。

ンなど反対電荷高分子どうしの結合を利用する方法などがある。

酵素や微生物の固定化には、操作が容易なため、アルギン酸カルシウムゲルが広く用いられている。酵素や微生物をアルギン酸ナトリウム水溶液に分解させ芯液として、それを塩化カルシウム等の水溶液中へ滴下してゲル化させ固定化する方法である。この方法では、内部まで均質なゲル粒子をつくることができる。一方、カルシウム等の多価金属イオン水溶液を芯液として、アルギン酸ナトリウム水溶液中へ滴下すると、アルギン酸カルシウムゲル被膜から成るカプセル体をつくることもできる²⁾。つまり、カルシウムイオンの拡散方向により、均質なゲル粒子あるいは内側が液状でゲル被膜を持ったカプセルのいずれかを調製することができる。

アルギン酸カルシウムゲルの欠点は、微生物を固定化して長期培養したときに、細胞密度が高まるとゲルの崩壊が起こることや、塩化ナトリウムや磷酸塩、キレート剤などが共存すると、ゲル中のカルシウムがナトリウムと置換されるイオン交換反応が起こりゲルが崩壊することなどである。また、ゲルの網目構造が粗いため、カプセルにしたときなどに、透過性制御が困難である。

3. キトサンカプセルの性質³⁾

3.1 キトサンカプセル化法

キトサンとポリアニオンとの反応を利用するカプセル製法は、ワンステップでカプセル化できることが特徴である。ポリアニオン水溶液を芯液としてノズルからキトサン溶液中へ滴下する。この時、キトサン溶液は、大きな渦ができる程度に強く攪拌しておくことが必要である。滴下したポリアニオン水溶液の液滴は、キトサン溶液の渦中に引き込まれ、直ちにキトサンとポリアニオンとから成る高分子電解質複合体が形成され、芯液がカプセル化される。この高分子電解質複合体形成は瞬時に行われる。滴下した芯液を長時間キトサン溶液中に置いてもカプセル被膜は厚くならない。これは、両者が高分子であるため、一旦できたゲル被膜をお互いに透過できなくなるため被膜は厚くならないものと考えられる。走査形電子顕微鏡で調べたカプセル被膜の厚さは、3～4 μm と非常に薄いものである。

3.2 キトサン溶媒の影響

キトサンは水には溶けないが、pHが約6.2以下の弱酸性溶液に溶ける。酸性側で溶解したキトサン溶液にアルカリを添加していくと、pHが6前後からキトサンが徐々に析出してくるようになる。

キトサンを溶かす溶媒として、いろいろな無機および有機酸が知られている。通常、希塩酸や酢酸などが使わ

表2 各種酸を溶媒として調製した0.5%キトサン溶液のpHと粘度

溶 媒	pH	粘度(mPa.s)
酢 酸	3.66	222.6
乳 酸	2.71	214.0
プロピオン酸	3.86	222.4
アクリル酸	3.24	209.8
グルコン酸	3.42	209.8
グルタミン酸	3.78	209.8
コハク酸	3.42	201.4
リンゴ酸	2.58	184.6
マレイン酸	1.62	151.1
クエン酸	2.70	125.9
トルエンスルホン酸	1.65	125.9
アスコルビン酸	3.71	151.1
酒石酸	溶解できず	—
シュウ酸	溶解できず	—

れている。カプセル化という見地から、最適なキトサンの溶媒を探索するため、14種類の酸について粘度測定を行った結果を表2に示した。溶媒のpHが低いと粘度が低く、pHの上昇につれて粘度が高くなる傾向が見られた。モノカルボン酸を使用すると、ジカルボン酸やトリカルボン酸よりキトサン溶液の粘度が高くなる傾向がみられた。強酸だとキトサンを溶解することができなかった。キトサンの良溶媒、つまりキトサン溶液の粘度が高くなる溶媒としては、グルタミン酸、酢酸、プロピオン酸、アクリル酸、グルコン酸などがあげられる。これは、酸の強さ、解離の程度と関係しているものと考えられる。

酸の濃度を上げていくとキトサン溶液の粘度は低下していく。酢酸濃度を変えて調製したキトサン溶液の極限粘度測定から、酢酸濃度が高い程、つまりpHが低い程、極限粘度が低くなるという報告⁴⁾もある。これは、pHが低い状態、つまり酸が過剰にある状態では、この酸のためアミノ基の電荷が封鎖され、解離基どうしの静電的反発力が小さくなり分子鎖の広がりが制限され糸球状になり粘度が低くなったものと推定している。キトサンなどのような高分子電解質の粘度は、高分子の濃度ならびに添加塩の濃度によって極めて複雑な変化をするとともに、溶媒との相互作用にも影響される。

3.3 キトサンとポリアニオンとの反応

キトサンとポリアニオンとの反応は、高分子電解質複合体のモデル系としての研究が行われている。つまり、キトサンとポリアニオンとを混合し、水不溶性のゲル状物を形成し、その物性を調べるという研究である。キト

サンとポリアクリル酸⁵⁾やNa-カルボキシメチルセルロース⁶⁾、デキストラン硫酸ナトリウム⁷⁾、ヘパリン⁸⁾、ポリリン酸ナトリウム⁹⁾などが報告されている。反応性やゲルの強度は、使用する多糖類の電荷量、高分子鎖上の反応基の分布、高分子鎖の形状などの影響を受けるものと考えられる。キトサンはアニオン性高分子のみならず、低分子のアニオンとも反応して、水不溶性のゲルを形成する。例えば、トリポリリン酸ナトリウム、ピロリン酸ナトリウム、フェリシアン化カリウムなどである。これらは低分子であるため、キトサン溶液をこれら溶液中へ滴下すると、液滴の内部まで浸透するため、カプセルとはならずゲル粒子となる。このようにして調製したゲル粒子は、アルギン酸カルシウムゲル粒子より機械的強度が高いとの報告もある¹⁰⁾。

キトサンを用いてカプセルを調製する目的で、各種のアニオン性多糖類との反応性を調べた。一般に、多糖類はカルボキシル基や硫酸基を含んでいるものが多いので、水溶液にしたとき負に帯電している。例えば、アルギン酸ナトリウム、カラギナン、低メトキシルベクテン、ファーセララン、Na-カルボキシメチルセルロース、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、キサンタンガム、アラビアガム、グアーガム等がある。

上記のポリアニオン多糖類とキトサンとでカプセルをつくったとき、カプセルが形成され、かつ最も強固なゲル被膜を形成したのは、Na-カルボキシメチルセルロース(CMC)およびコンドロイチン硫酸であった。アルギン酸ナトリウムを芯液としたときは、長時間キトサン溶液中においておくと芯部がゲル化した。これはキトサン溶液のpHが低いためと考えられる。

CMCは、重合度とエーテル化度により特徴づけられる。エーテル化度は、原料物質であるセルロースの水酸基がカルボキシメチル基に置換された程度を表し、理論的には3.0まで可能で、通常0.5~1.2前後のものが市販されている。エーテル化度の高いCMCほど解離基が多くカプセル強度が高くなることが予想されるが、明確な関係は認められなかった。

キトサンとポリアニオンとの反応では、ポリアニオンの分子量や電荷量だけでなく、解離基の立体配置も反応性と関係があるものと考えられる。

3.4 カプセル強度

キトサンカプセルの強度は、使用するポリアニオンの種類のみならず、キトサン溶液のpHにも影響されることがわかっている。キトサン溶液のpHとカプセル強度の関係を模式的に図1に示した。キトサン溶液のpHが低いとカプセル強度が低く、またpHが高くてもカプセル強度が低い。カプセル強度はpHが5付近で最も高く

図1 キトサン分子中アミノ基とCMC分子中カルボキシ基の解離割合の変化およびそれらの合成曲線

なった。この関係は、キトサンおよびCMCの官能基の解離の仕方によるものと考えられる。つまり、キトサンの解離基、アミノ基はpHが低いと殆どが解離しているが、pHが高くなるにつれその解離度は減少していく。一方、CMCの解離基、カルボキシル基は、pHが低いと殆ど解離していないが、pHが上がるにつれ、解離度が上がる。つまりキトサンとCMCでは、解離の仕方がpHに対して逆の関係になっているため、このようなpH依存性が現れたものと考えられる。

3.5 カプセル膜の透過性

カプセル化細胞培養では、カプセル膜の透過性を制御することにより、細胞の産生する生理活性物質を、カプセル内に閉じ込めたり、あるいはカプセル外に放出させることができる。そのため、透過性制御因子を見つけることが、応用するうえで必要となってくる。キトサンとCMCとの反応を利用するカプセル製法では、キトサン溶液のpHあるいはイオン強度を調節することにより、カプセル膜の透過性を制御できることがわかってきた^{11), 12)}。

透過性測定結果の一例を図2に示した。分子量既知の物質を指標としてカプセル化し、時間とともにカプセル外に漏出してくる指標物質の濃度を測定することによりカプセル膜の透過性を評価した。各種タンパク質を指標物質として測定した結果、BSAは透過せずミオグロビンが透過したことから、このカプセルの分画分子量は約2万から4万の間にあるものと推定される。また、 γ グロブリンの測定から求めたみかけの膜透過係数は、 $1 \times 10^{-11} \text{cm}^2/\text{s}$ であった。この値は、アルギン酸カルシウムゲルのみかけの膜透過係数： $10^{-4} \sim 10^{-5} \text{cm}^2/\text{s}$ と比較すると非常に小さな値であり、 γ グロブリンはカプセル

図2 キトサンカプセルの膜透過性

膜を殆ど透過しないものと考えられる。 γ グロブリンがカプセル膜を透過しないということは、同程度の分子量をもつ免疫グロブリン(IgG)もカプセル内に保持されることが考えられる。このことは、IgGを産生する細胞の培養をカプセルで行うと、IgGがカプセル内に高濃度に蓄積することを意味する。

4. カプセル化細胞培養への応用

カプセルを用いて細胞培養する利点は、

- 1) 細胞の高密度培養が可能
- 2) 生産物の分離・回収が容易
- 3) 培養中の攪拌などによる機械的損傷から保護する
- 4) 細胞と培養液の分離が容易
- 5) 培養液の再利用が可能
- 6) 微生物汚染から保護する

などがあげられる。

動物細胞をカプセル化して培養しようという試みは、Lim¹³⁾や Nilsson¹⁴⁾によって行われている。Limらの方法では、カプセル化は二段階にわたって行われる。まず動物細胞をアルギン酸ナトリウム水溶液中に分散し、塩化カルシウム水溶液中へ滴下して細胞をアルギン酸カルシウムゲル中に固定する。その後、ポリリジン溶液(ポリカチオン)に入れアルギン酸とポリリジンから成る高分子電解質複合体の膜を形成し、その後ゲルを溶解する方法である。また、Nilssonらの方法は、細胞を寒天溶液に分散し、その溶液をパラフィン油中に乳化する。そ

の後冷却して、細胞の寒天ゲル粒子内への包括固定を行う。これらの方法は、カプセル化の手順が煩雑であるばかりでなく、時間もかかるので効率的とはいえない。

キトサンカプセルで動物細胞をカプセル化した例を次に示す。動物細胞としてハイブリドーマを使った。この細胞はリンパ球と骨髄腫細胞を細胞融合させたもので、免疫タンパク質の一種である、モノクローナル抗ウシラクトフェリン IgG を産生する¹⁵⁾。この IgG はラクトフェリンとのみ特異的に結合するので、牛乳中などから、ラクトフェリンをワンパスかつ高純度で回収することができる。

CMC を無血清培地に加え、この溶液に細胞を分散して芯液とした。芯液をキトサン溶液に滴下して細胞をカプセル化した。所定の反応時間後、カプセルをキトサン溶液中から取り出し、水洗後、スピナーフラスコに移し攪拌培養をした。なお、カプセルの体積分率は培養液の10%である。

カプセル化直後

培養6日目

図3 カプセル内細胞増殖

図4 細胞増殖曲線

カプセル内の細胞増殖の様子を図3に示した。培養初期では、細胞はカプセル内に均一に分散している。培養が進むに従い、数個の細胞が塊状を形成する。更に増殖が進むと、カプセル内は、大きな1個の細胞塊で占有される。図4にカプセル化細胞ならびに浮遊培養の増殖の例を示した¹⁶⁾。細胞増殖は、細胞数が急激に増加する対数増殖期とその後細胞数が一定になる定常期とに分けられる。対数増殖期では、カプセル化細胞と浮遊培養の増殖速度は、ほぼ同じであった。定常期において、カプセル内細胞密度は、最高 1.0×10^7 cells/mlに達した。この細胞密度は、浮遊培養系の細胞密度に比べ、約10倍高い値である。ここで注意しなければならないのは、培養系全体での総細胞数はカプセル化培養も浮遊培養でも同じという点である。

カプセル化細胞培養において、酸素透過性を考慮してカプセル粒径を決める必要がある。つまり、粒径が大きくなるとカプセル内部まで酸素が透過しづらくなり細胞増殖に悪影響を及ぼす。また、使用する細胞によっても酸素要求性は異なってくるので、培養方式を含め最適化を図っていくことが必要である。

5. おわりに

キトサンはいろいろな機能性、特に生理活性効果が最近脚光を浴びてきている。また、食物繊維として食品への応用も図られてきている。それら機能の応用の一つが、キトサンを用いたカプセル化法である。本法は、今回紹介した動物細胞のカプセル化に限らず、徐放性のカプセルあるいは、生体適合性が良いことから人工臓器などへの応用などが考えられる。

本稿がキトサンの機能性の一端を理解する一助になれば幸いである。

参考文献

- 1) 近藤・小石, 「新版マイクロカプセル—その製法・性質・応用」, 三共出版 (1987)
- 2) 塩谷, 相良, 木村, 種谷, 日本食品工業学会誌 **36** (8), 631-635 (1989)
- 3) 塩谷, 椎木, 木村, 加固, 林, 特開昭 59-33062
- 4) Kienzie-Sterzer, C., Rodriguez-Sanchez, D. & Rha, C., *Journal of Applied Science* **27**, 4467-70 (1982)
- 5) Chavasit et. al. *Polymer Bulletin* **19**, 223-30 (1988)
- 6) Arguelles-Monal, *Makromol. Chem., Rapid Commun.* **9**, 693-97 (1988)
- 7) 菊地, 福田, 日本化学会誌, **9**, 1505-7 (1976)
- 8) Kikuchi, Y., *Die Makromolekulare Chemie* **175**, 2209-11 (1974)
- 9) Kawashima et al., *Journal of Pharmaceutical Sciences* **74**, 264-68 (1985)
- 10) Knorr, D. & Daly, M., *Process Biochemistry* **4**, 48-501 (1988)
- 11) Shioya, T. & Rha, C., 4th International Conference on Chitin/Chitosan, p. 51 (1988)
- 12) Hwang, C., Rha, C. & Sinskey, A., 3rd International Conference on Chitin/Chitosan (1985)
- 13) Lim, F. & Sun, A., *Science* **21**, 908-10 (1980)
- 14) Nilsson, K. et al., *Nature* **302**, 629-30 (1983)
- 15) Kawakami, H., Shinmoto, H., Dosako, S. & Sogo, Y., *J. Dairy Sci.* **70**, 752-59 (1987)
- 16) Yoshioka, T., Hirano, R., Shioya, T. & Kako, M., *Biotechnology and Bioengineering*, **35**, 66-72 (1989)

(平成2年9月20日受理)