

膜乳化法による均一キトサン微粒子の調製と薬物運搬体への応用

清水 正高^{*1}・藤本 幹治^{*2}・馬場 由成^{*3}

Preparation of Monodispersed Chitosan Microspheres Using SPG Membrane Emulsification
and Its Application as Drug Carriers

Masataka SHIMIZU, Kanji FUJIMOTO and Yoshinari BABA

酪酸は潰瘍性大腸炎治療に極めて有効な成分であることが知られているが、そのまま経口投与しても胃や小腸で前吸収され、大腸に到達しない可能性が高い。筆者らは生体に安全で難分解性のキトサンに注目し、この微粒子を大腸までの酪酸運搬体として利用する経口製剤の開発を目指した。まず、キトサンの有機酸水溶液を分散水滴とする単分散W/Oエマルジョンを膜乳化法で調製し、浸透圧差を利用して水滴のキトサンを濃縮析出させ、最後にアルカリ中和によって単分散キトサン微粒子を合成する方法を開発した。次に、アニオン性の酪酸とカチオン性キトサンの静電的な結合を利用して酪酸をキトサン微粒子に内包させた酪酸運搬体、すなわち潰瘍性大腸炎治療用経口製剤を試作して酪酸徐放実験を行った。

キーワード：膜乳化，キトサン，多孔粒子，薬物運搬体，多孔質ガラス

1 はじめに

キトサンpoly (N-acetyl-D-glucosamine) は、エビやカニのような甲殻類に含まれるキチンから得られる地球上で最も豊富に存在する多糖類の一つであり、これを利用した多くの食品形態がある。キトサンは、セルロース2位のOH基がNH₂基に置き換わったピラノース環が連結しているカチオン性の生体高分子であり、その生体適合性を利用した医薬品も多い^{1) -6)}。キトサンの化学構造を図1に示す。

最近では薬物運搬体の合成も盛んに研究されているなど、キトサン微粒子は工業的、医薬的に広く応用が期待されている。もし、均一な粒径分布、例えば、10 μm付近に平均粒径を有するキトサン微粒子が生成できるならば、分離分析化学、生物学、製剤、電子機器の分野で最も汎用な機能性材料の一つとなる可能性もある。

しかし、実際にこれら微粒子を合成することは容易でない。特に、均一な粒径を有し、かつ薬物を一定速度で徐放する微粒子の作成は非常に難しい。これに対して本報で論じる新技術は、基本的に1段調製法であるにもかかわらず、単分散性を確保しながら多様な機能性を発現する微粒子を生成する可能性を秘めている^{7) -8)}。

本研究では2つの目標を掲げた。1つ目は、①粒径がコントロールされたキトサン微粒子の製造技術を確立することであり、2つ目は、②同微粒子を酪酸の薬物運搬体として利用し、潰瘍性大腸炎の治療製剤を開発することである。酪酸は潰瘍性大腸炎に薬効があることが知られている。しかし、大腸到達前の胃や小腸などで消化管吸収され

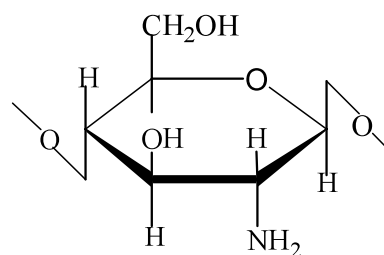


図1 キトサンの化学構造

* 本報は、Journal of Ion Exchangeの18巻4号p.220～225 (2007) に掲載済み。

* 1 材料開発部

* 2 JSTイノベーションサテライト宮崎

* 3 宮崎大学工学部資源環境化学科

やすい性質があるため、酪酸を大腸内でのみ放出する何らかの仕組みが求められる。そこで本研究では、生体に安全なキトサンを壁材にした酪酸運搬体の開発を目指した。キトサンは有機酸に易溶であるが、水や強酸には難溶であり、胃や小腸では溶解性を示さない高分子材料である。

まず、①のキトサン微粒子生成実験では、有機酸水溶液に溶解したキトサンの水滴からなる単分散W/Oエマルジョンを膜乳化法で調製した。その後、高浸透圧の塩化ナトリウムNaCl水滴からなるW/Oエマルジョンと混合させることにより、キトサン水滴を濃縮し、キトサンが球状に析出した状態を形成した。これにアルカリ水溶液（水酸化ナトリウムNaOH水溶液あるいは炭酸アンモニウム(NH₄)₂CO₃水溶液)を必要量加えてキトサンを不溶化し、単分散キトサン微粒子を得た。ここで、NaCl濃度、キトサン濃度、SPG膜細孔径および有機酸の種類を変えることで、生成するキトサン微粒子の物理化学的特性がどのように変化するかを調べた。

一方、②では、有機酸の一つである酪酸水溶液にキトサンを溶解し、①と同様の手順でキトサン微粒子を調製した。ただし、アルカリ水溶液でキトサンを不溶化するプロセスを省略し、酪酸を包含したキトサンが球状に析出したままの微粒子を回収して潰瘍性大腸炎の治療製剤とした。また、その製剤の309Kにおける酪酸放出挙動を調べた。

2 方法

2-1 キトサン溶液の調製

キトサンはフルカ株式会社より入手した。分子量は80,000~100,000, コロイド滴定により求めた脱アセチル化度は約95%であった。酢酸、クエン酸、酪酸などの有機酸が2 wt%含有する有機酸水溶液にキトサンを2 wt%になるように溶解（以下、キトサン水溶液）した。その後、キトサン水溶液に残る不溶物を3 G1ガラスフィルターで除去して清澄にした。

2-2 キトサン微粒子の調製方法

キトサン微粒子の調製フローを図2に示す。有機酸水溶液に溶解したキトサンの水滴からなる単分散W/Oエマルジョン（以下、キトサンW/Oエマルジョン）は、多孔質ガラス膜（SPGテクノ株式会社）とそれらを装着する装置モジュール（清本鐵工株式会社）を使用し、直接乳化により調製した。多孔質ガラス膜は外径10mm、全長150mmの円筒状であり、平均細孔径はそれぞれ19.3, 8.82, 5.5, 2.0 μmであった。

最初に、それぞれの膜に最適な透過圧で分散水相となるキトサン水溶液を直接乳化し、連続油相に分散して単分散のキトサン水滴を生成した。連続油相は、油性界面活性剤のソルビタンモノオレートSpan80（和光純薬工業株式会社）を含んだヘキサンであった。

次に、高速かくはん式ホモミキサーを用い、NaCl水溶液を上記と同じ油相に分散乳化したW/Oエマルジョン（以下、NaCl W/Oエマルジョン）を調製し、これをキトサンW/Oエマルジョンと混合した。両水滴間の浸透圧差を駆動力にキトサン水滴からNaCl水滴に水が移動するため、キトサン水滴は濃縮されてキトサンが球状に析出した。

その後、1 mol・dm⁻³のアルカリ水溶液を添加した。アルカリによって水滴中に析出したキトサンは不溶化され、キトサン微粒子が生成した。ろ過、エタノールと蒸留水による洗浄によりヘキサ

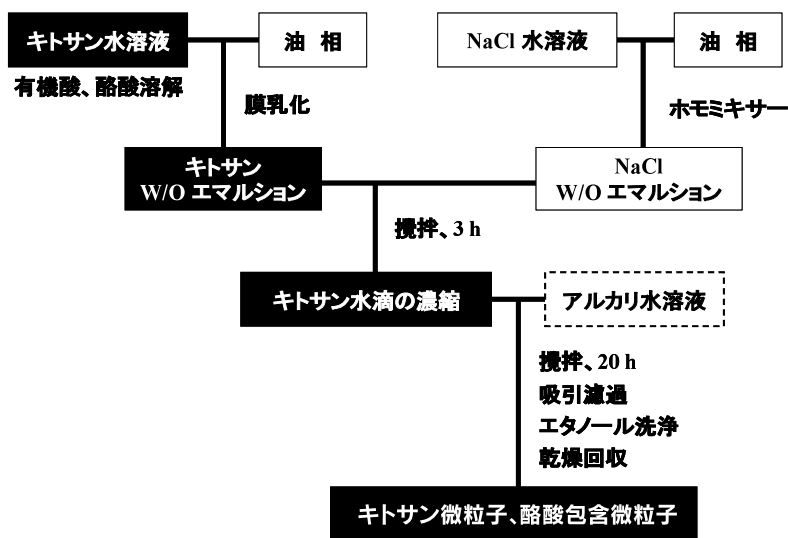


図2 キトサン微粒子あるいは酪酸包含微粒子の調製フロー

ン, Span80およびNaClなどを除去し, キトサン微粒子を回収した。

2-3 酪酸包含微粒子の調製方法

図2に示すように, 酪酸水溶液にキトサンを溶解し, 直接乳化により単分散のキトサンW/Oエマルションを調製した。その後, ①と同様の手順でキトサン微粒子を調製した。ただし, アルカリ水溶液でキトサンを不溶化するプロセスを省略し, 酪酸を包含したキトサンが球状に析出したままの微粒子を回収して潰瘍性大腸炎の治療製剤とした。

2-4 キトサンW/Oエマルションとキトサン微粒子の特性解析

薬物運搬体の最適な製造条件を見つけるために得られたキトサン微粒子の特性を調べた。W/Oエマルションは光学顕微鏡, 微粒子は走査型電子顕微鏡SEM (日本電子株式会社, JSM-35CF II) により観察した。水滴径分布と微粒子径分布はレーザー回折散乱式粒度分布計 (株式会社島津製作所, SALD-2000) を用いて測定し, 必要に応じて顕微鏡写真から直接計測して分布を算出した。微粒子の乾燥状態における比表面積と空隙率はガス吸着測定装置ソーフトマチック (ファイソンス社, 1800), キトサンの真密度はヘリウム比重計 (株式会社島津製作所, 1330) により求めた。

3 結果

3-1 キトサンW/Oエマルションの水滴径分布とキトサン微粒子の粒径分布

細孔径 $8.82\ \mu\text{m}$ のSPG膜を用い, 直接乳化法により調製したキトサンW/Oエマルションの光学顕微鏡写真とキトサン微粒子のSEM写真を図3に示す。さらにキトサンW/Oエマルションの水滴径累積分布とキトサン微粒子の粒径累積分布を比較して図4に示す。単分散状のキトサンW/Oエマルションと単分散状キトサン微粒子が生成されたことを確認した。また, W/Oエマルションの水滴径分布が小さい方へシフトした結果がキトサン微粒子の粒径分布であることから, キトサン水滴が濃縮されてキトサン微粒子になったことが明らかとなった。

キトサン水滴の濃縮に及ぼすNaCl濃度の影響,

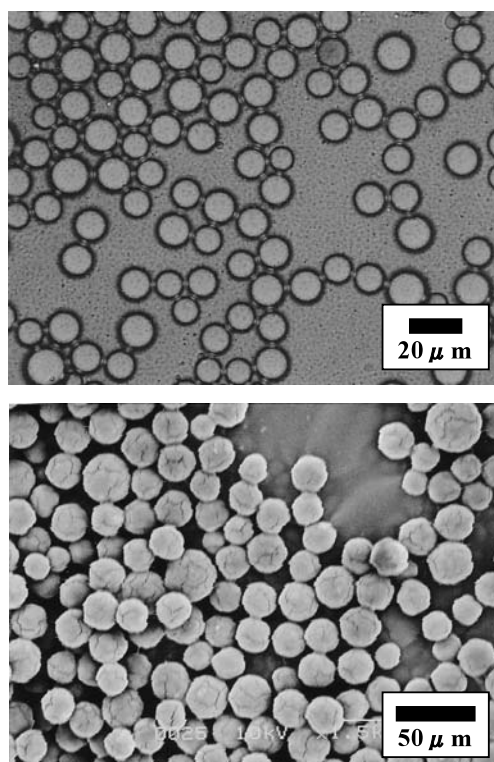


図3 キトサンW/Oエマルションの光学顕微鏡写真 (上) とキトサン微粒子のSEM写真 (下)

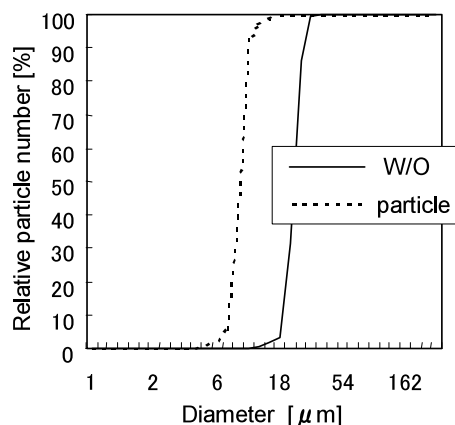


図4 キトサンW/Oエマルションの水滴径累積分布 (W/O) とキトサン微粒子の粒径累積分布 (particle)

すなわち, キトサン水滴とNaCl水滴間の浸透圧差の影響をSEM写真で図5に示す。NaClが低濃度で浸透圧差が小さい場合, キトサン水滴からNaCl水滴へ移動する水分量が少ないためにキトサンの濃縮率は小さくなる。例えば, NaClが $0\ \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ではキトサンの析出が不十分で微粒子が全て凝固し, $0.17\ \text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ では非球形粒子と

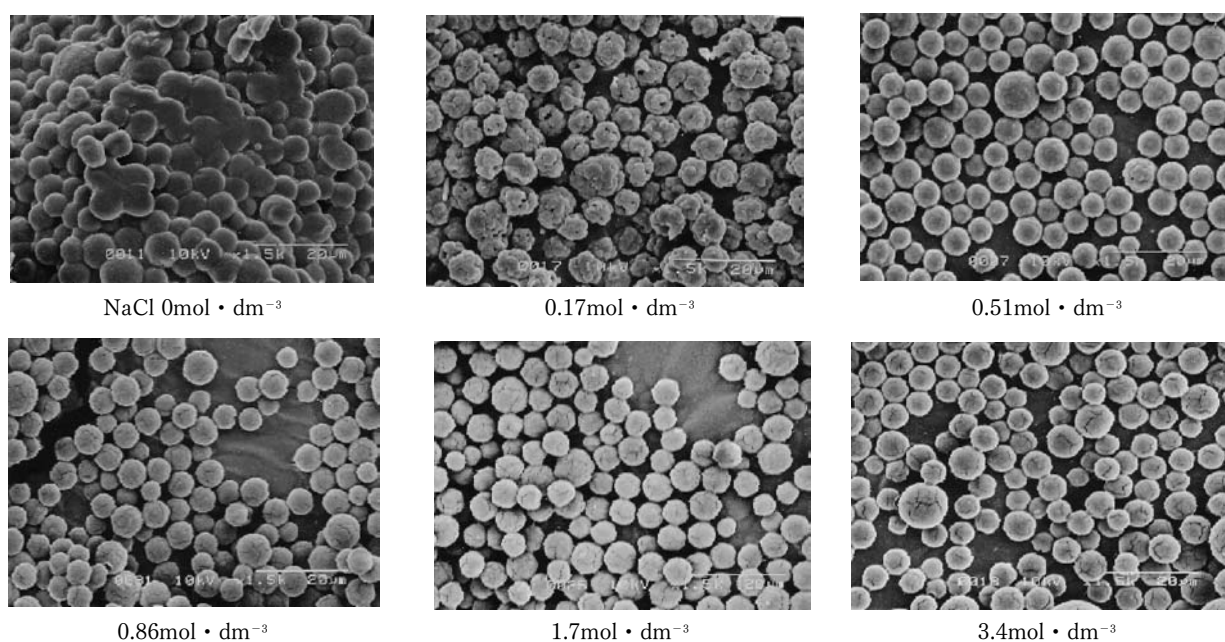


図5 異なるNaCl濃度条件で生成したキトサン微粒子のSEM写真

なった。一方、NaCl濃度が $3.4\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ と非常に大きい場合には、脱水が著しく微粒子に亀裂が生じたと推測される。球形と分散性を保持した微粒子を調製する最適なNaCl濃度は $0.5\sim 1.7\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ であった。そこで、これ以降の実験では $1.5\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ のNaCl濃度を採用した。

3-2 キトサン濃度の影響

図6は、キトサンW/Oエマルション水滴径とキトサン微粒子径に及ぼす有機酸水溶液中キトサン濃度の影響を示している。直接乳化法で単分散

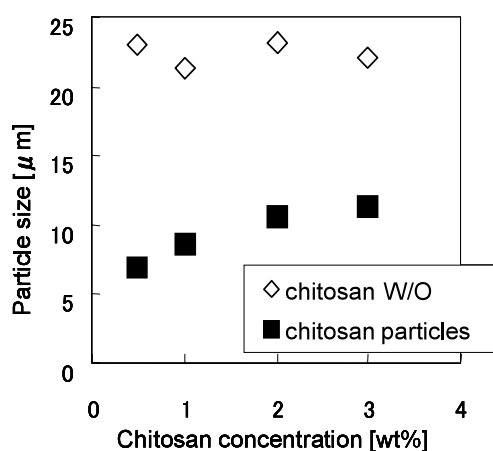


図6 キトサンW/Oエマルション水滴径(◇)とキトサン微粒子径(■)に及ぼす有機酸水溶液中キトサン濃度の影響

エマルションを生成した場合、分散水相の溶質濃度や粘度によって水滴径が変化することは基本的にほとんどないことが知られている。このことを反映してW/Oエマルションの水滴径はキトサン濃度に依存しなかったと考えられる。

一方、キトサン微粒子の粒径はキトサン濃度の影響を受けた。もし、微粒子が緻密体であるならば、当然、キトサン濃度が低かった微粒子は小さく、高かったものは大きくなる。図6もキトサン濃度と粒径が対応しており、キトサン微粒子は緻

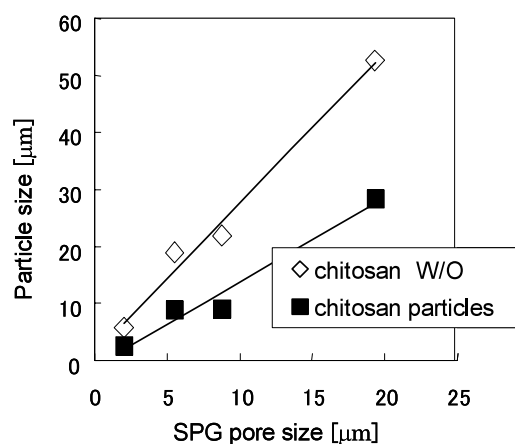


図7 キトサンW/Oエマルション水滴径(◇)とキトサン微粒子径(■)に及ぼす多孔質ガラス膜細孔径の影響
SPG膜細孔径は2.0, 5.5, 8.82, 19.3 μm.

密体であるか、あるいは、粒径に関わりなく同程度の空隙率を有していることを示唆している。

3-3 SPG膜細孔径の影響

図7にW/Oエマルション水滴径およびキトサン微粒子径と使用したSPG膜細孔径の関係をプロットした。W/Oエマルション水滴径 d_w とSPG膜細孔径 D_m の比は、膜乳化(直接乳化)法の普遍的な値である $d_w/D_m=3$ となり、直接乳化が成立していることが明らかである。

それに対して微粒子径 d_p の勾配は低く、

$$d_w = 2.6d_p \quad (1)$$

であった。ここで1個の水滴体積 V_w 、微粒子体積 V_p 、微粒子の空隙 V_e 、キトサンの実体積 V_c およびキトサンの真密度 $1.5\text{g}/\text{cm}^3$ から、

$$V_w = (\pi/6) d_w^3 \quad (2)$$

$$V_p = V_c + V_e = (\pi/6) d_p^3 = 2V_w/150 \quad (3)$$

である。以上の(1)~(3)式より、キトサン微粒子の空隙率 ε は、

$$\varepsilon = V_e/V_p \times 100 = 76.6\text{vol}\% \quad (4)$$

となった。すなわち、図7のキトサン微粒子は、その粒径に関わりなく全ての粒子が77vol%程度の空隙率を有していることが明らかとなった。

3-4 キトサン微粒子の内部構造に及ぼす有機酸種類の影響

乾燥したキトサン微粒子の空隙率と比表面積をソープトマチックにより測定し、表1にまとめた。有機酸以外の調製条件は同一である。空隙率および比表面積ともに値が小さいものの、有機酸の種類によって若干内部構造が異なる微粒子が得られることが明らかになった。

乾燥微粒子の空隙率は3~5 vol%であったが、上記3-3の粒径から推定した値は77vol%であった。微粒子を水に再分散し、レーザー回折散乱式粒度分布計を用いて湿式で粒径測定を行ったため、微粒子が水和して空隙率77vol%まで膨張したと推測される。こうした水和膨張と乾燥収縮は天然多糖類であるキトサン微粒子に特徴的な性質であると考えられる。

3-5 キトサン微粒子からの酪酸放出率

酪酸を内包したキトサン微粒子を生理食塩水に

表1 キトサン微粒子の内部構造に及ぼす有機酸種類の影響

有機酸種類	比表面積 [m^2/g]	空隙率 [vol%]
蟻酸	14.6	3.93
酢酸	10.3	6.39
プロピオン酸	1.47	3.72
酪酸	1.47	3.75
クエン酸	4.66	5.24

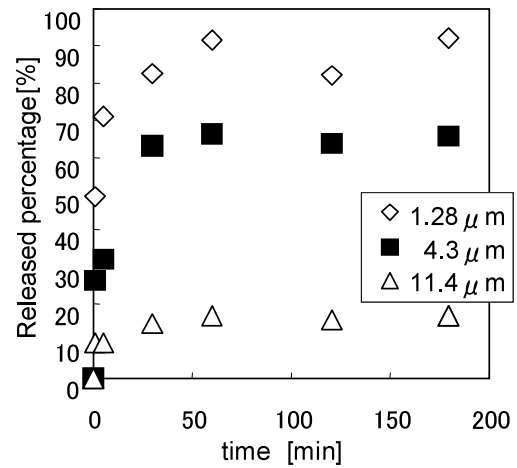


図8 酪酸の放出率に及ぼすキトサン微粒子径の影響
微粒子径; \diamond 1.28, \blacksquare 4.3, \triangle 11.4 μm

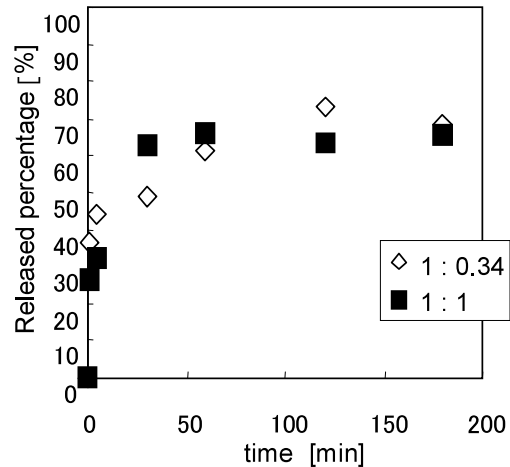


図9 酪酸の放出率に及ぼす酪酸内包量の影響
 \diamond 1:0.34, \blacksquare 1:1.

添加し、309K条件下、微粒子から放出された酪酸の量を中和滴定で測定した。図8に酪酸放出率に及ぼすキトサン微粒子径の影響を示す。放出率は、キトサン微粒子に内包された酪酸量に対する生理食塩水へ溶解した酪酸量の比として表した。

図8に示すようにキトサン微粒子径が大きくなるに従って酪酸放出速度は減少した。微粒子の界面積と酪酸放出速度が対応していることを示している。そこで酪酸放出速度に及ぼす酪酸内包量の影響を調べた。キトサンモノマー分子と内包された酪酸分子数比が1:0.34 (◇) と1:1 (■) の2例を比較して図9に示す。その結果、放出速度は酪酸内包量に依存しないことが明らかになった。

4 まとめ

本報では、W/Oエマルションを経由してキトサン微粒子を製造する基本的な手法を明らかにした。微粒子生成のポイントは浸透圧差を利用した水の油相透過によるキトサン濃縮工程であった。また、直接乳化法を利用することにより粒径コントロールも可能であった。さらに得られたキトサン微粒子は、乾燥状態の空隙率が3~5 vol%, 水和状態の空隙率が77vol%であり、水和膨張が非常に大きかった。一方、酪酸運搬体としての機能は明らかにすることができなかった。潰瘍性大腸炎治療用経口製剤については、さらなる検討が必要であると考えられる。

5 参考文献

- 1) S.Y. Lin and R.I. Perng, *Chem. Pharm. Bull.*, 40 (4) 1058-1060 (1992).
- 2) C.G. Begona and D. Ruth, *Int. J. Pharm.*, 148, 231-240 (1997).
- 3) O. Kwunchit and W. M. Bernd, *Int. J. Pharm.*, 56, 229-237 (1997).
- 4) T. Hino, A. Yanamoto, S. Symabayashi, M. Tanaka and D. Tsuji, *J. Control. Release*, 69, 413-419 (2000).
- 5) C. L. Caren and W. M. Bernd, *Int. J. Pharm.*, 194, 229-237 (2000).
- 6) M. Burjak, M. Bogataj, M. Velnar, I. Grabnar and A. Mrhar, *Int. J. Pharm.*, 224, 123-130 (2001).
- 7) 中島忠夫, 清水正高, 化学工学論文集, 19 (6), 984-990 (1993).
- 8) S. Omi, K. Katami, A. Yamamoto and M. Iso,

J. Appl. Polym. Sci., 51, 1-11 (1994).