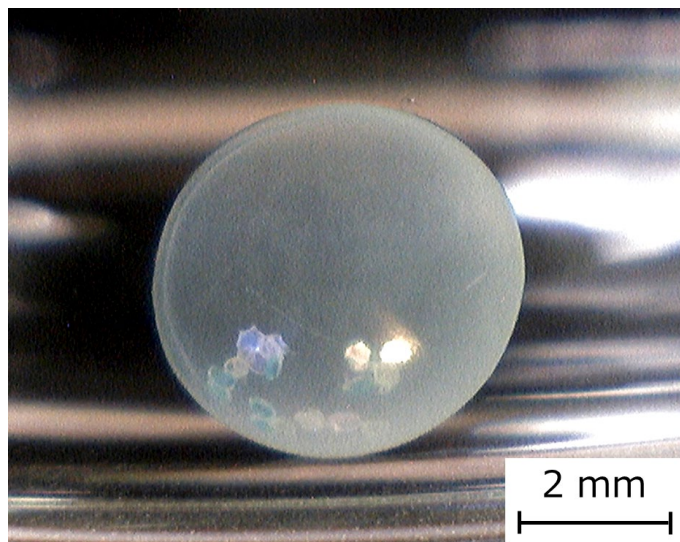


シームレスな薄膜状 セルロースナノファイバーゲルによる 物質内包技術

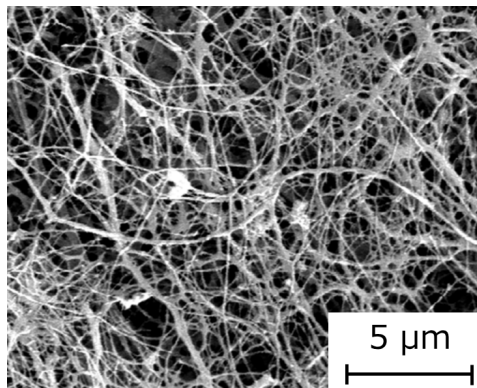
日本大学 理工学部 物質応用化学科
准教授 星 徹

2022年12月20日

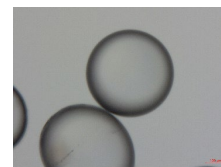
シームレスな薄膜状セルロースナノファイバーゲルによる物質内包技術



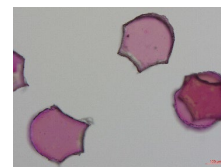
cosmetic glitter内包HSBCゲル



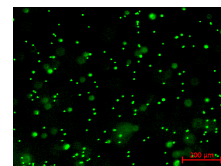
超臨界乾燥後の
セルロースゲル膜のSEM像



Glass bead
0.3 ~ 0.5 mm



Cosmetic glitter
0.3 ~ 0.5 mm



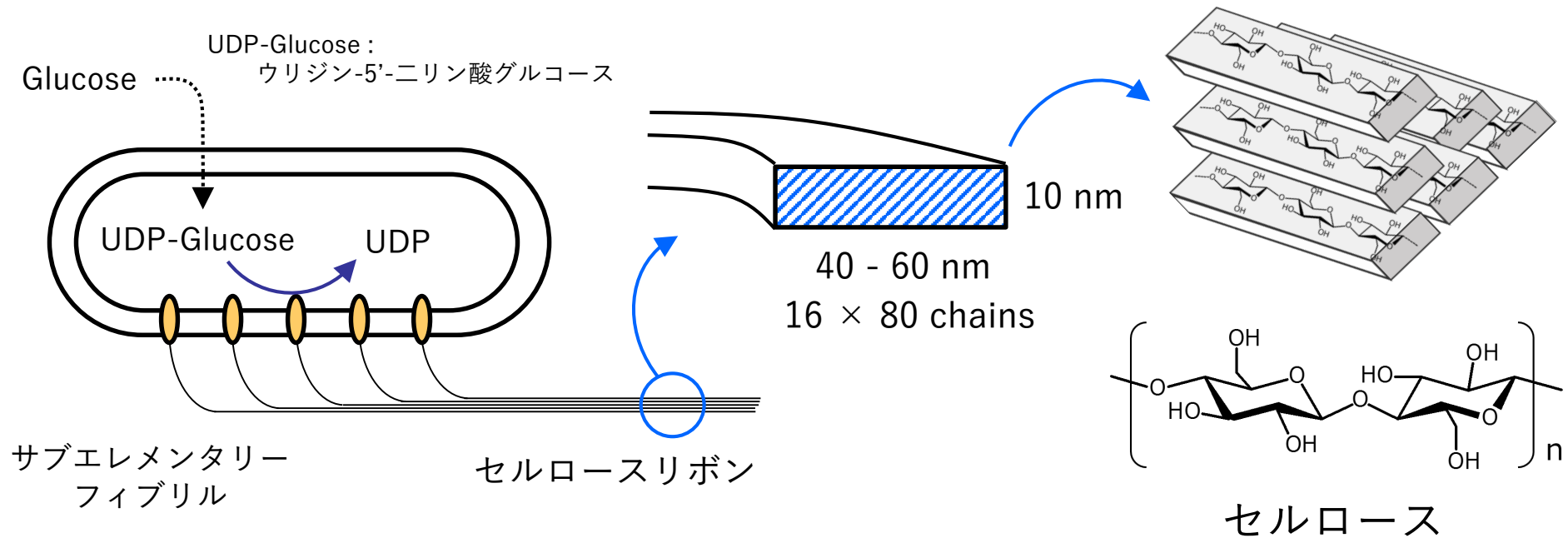
Fluorescent particle
5.0 ~ 5.9 μm

- セルロースナノファイバーから成るヒドロゲルによるカプセル化.
- セルロースゲル膜の膜厚 : 約 150 μm (調整可能)
- セルロースカプセルの大きさ : 1.5 ~ 5 mm (調整可能)

HSBCゲル : Hollow-type Spherical **Bacterial Cellulose** Gel
(中空球状**バクテリアセルロース**ゲル)

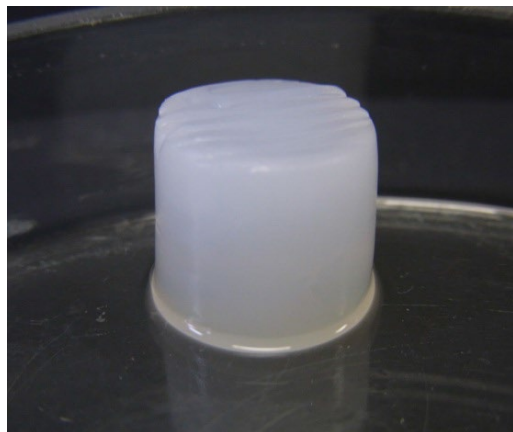
バクテリアセルロース (BC) とは？

酢酸菌(*Gluconacetobacter Xylinus*など)の代謝によって
産生されるセルロースナノファイバー

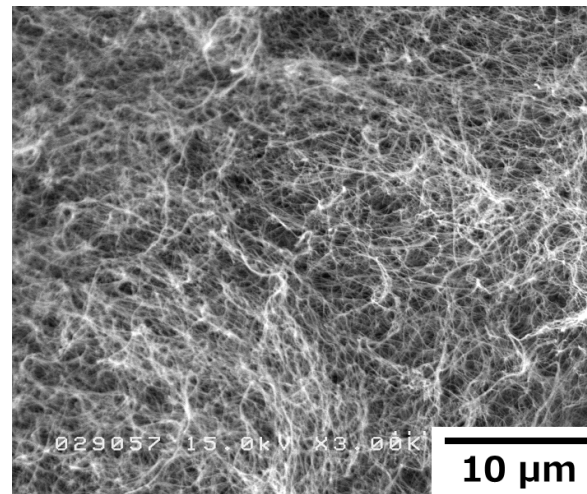


- セルロース分子鎖が配向した直径10 ～ 100 nmの結晶性ナノファイバーを形成する.
- セルロースナノファイバーの強度 (2 ～ 3 GPa) は, ステンレススチールの2 ～ 5 倍も高い.

バクテリアセルロース (BC) ゲル = ナタデココの特徴



BC ヒドロゲル
(ナタデココ)



超臨界乾燥後のBCエアロ
ゲルの走査型電子顕微鏡像

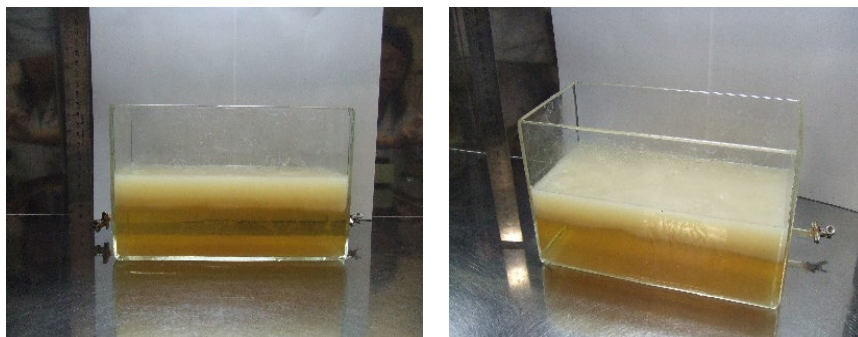
- 99 wt%は水分であり、優れた保水性を示すヒドロゲル (ナタデココ) として産生される。
- 植物由来よりも細い直径10 ～ 100 nmのセルロースナノファイバーが緻密に絡み合うネットワーク構造を形成。
- 無毒，耐酸性，耐塩基性，生体適合性に優れる。

バクテリアセルロース（BC）ゲル産生の特徴

培養日数



- 培養液－空気界面で
ナタデココが産生
- 培養日数の増加と
ともに膜厚の増加



容器形状によって、
様々な形になる。



容器形状でBCゲルの
形が決定

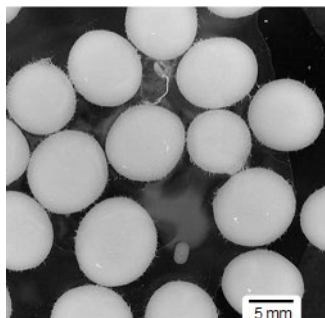
形状の自由度が低い

バクテリアセルロース（BC）ゲルの特徴と問題点

- 形状の自由度が低い
 - BCゲルの形状は培養容器に依存
- 精密な切削加工が難しい
 - 緻密な網目構造を有した 99 wt% が水分
- 一般的なプラスチックの成型法が適用できない
 - セルロースは不融，一般的な有機溶剤に不溶

BCの高度利用にはゲルの形状制御が必要

バクテリアセルロース（BC）ゲルの形状制御の例

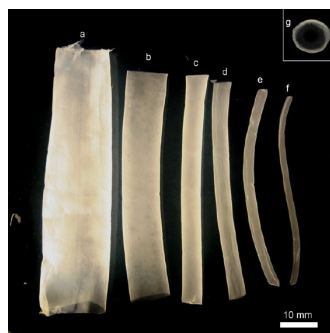


球状BCゲル

- 攪拌培養により調製
- 細胞培養の足場材料，食品

Y.Hu *et al.*, *Biomacromolecules*, 11, 1727-1734 (2010)

W. Czaja *et al.*, *Cellulose*, 11, 403-411 (2004)



チューブ状BCゲル

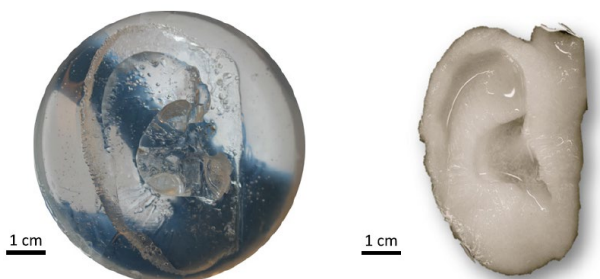
- 培養液を充填したシリコンチューブ内で酢酸菌の培養により調製
- 人工血管

A. Bodin *et al.*, *Biotech. Bioeng.*, 97, 425-434 (2007)

A.Putra *et al.*, *Polymer*, 49, 1885-1891 (2008)

特殊な形状のBCゲル

- シリコンモールドを用いた酢酸菌の培養により調製
- 耳軟骨形状のスキャホールド

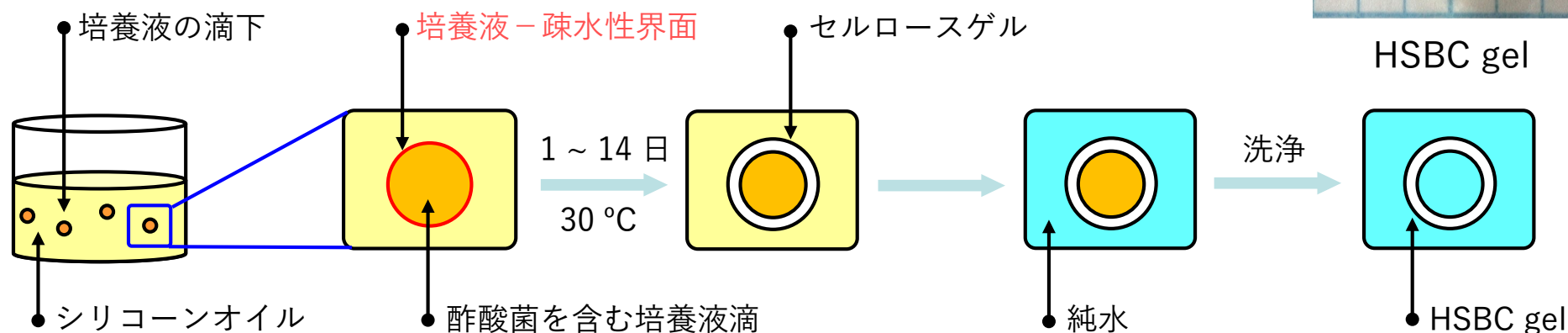


L. Nimeskern *et al.*, *J. Mech. Behav. Biomed.*, 22, 12-21 (2013)

中空球状バクテリアセルロース（HSBC）ゲルの作成

BCゲルの形状制御のポイント

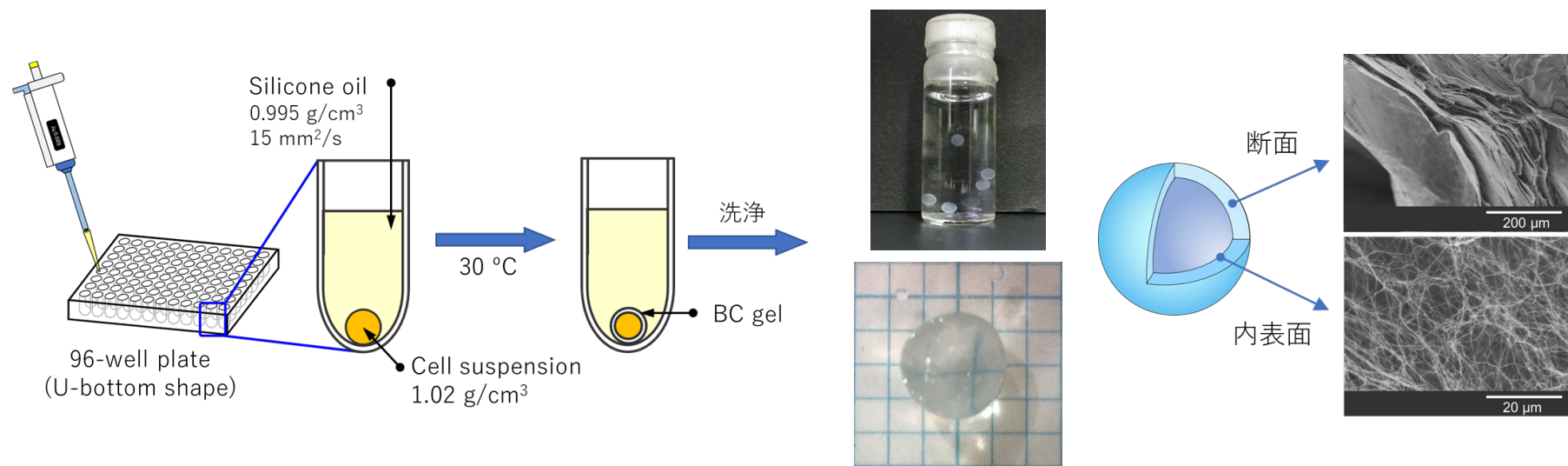
- 培養液－シリコン（疎水性）界面でBCゲルが産生.
- 培養容器の工夫による培養液の形状制御.



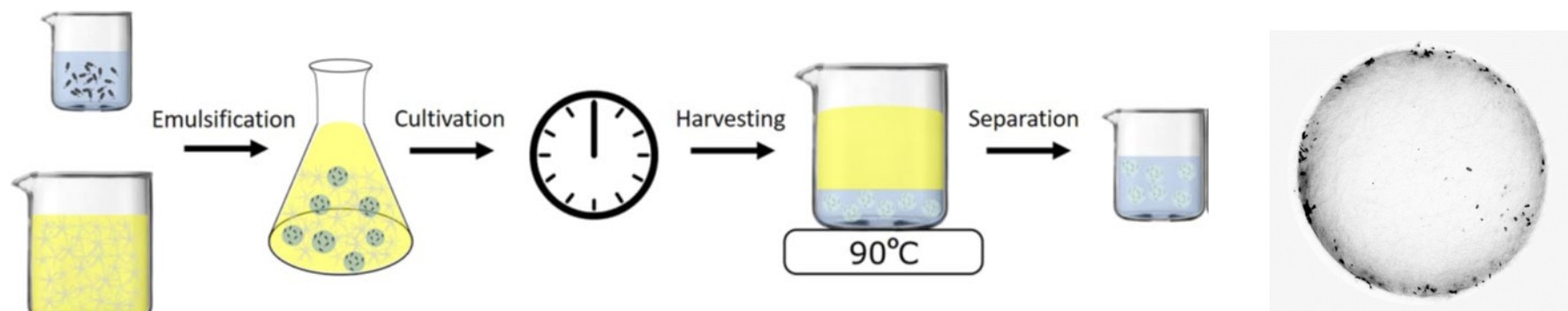
- シリコンオイル中で作成した**球状培養液滴**中で酢酸菌を培養.
- 培養液－疎水性界面でBCゲルが産生し、**中空球状**のBCゲルを形成.
- Water-in-Oilによる液滴作成のため、モールドが不必要.
- 滴下する培養液量で**サイズを制御**

サイズが揃ったHSBCゲルの高効率調製法

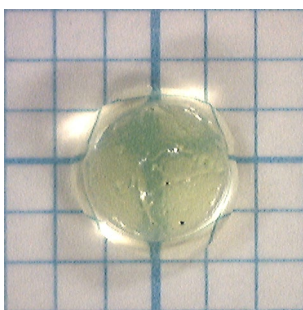
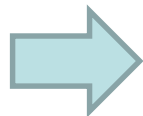
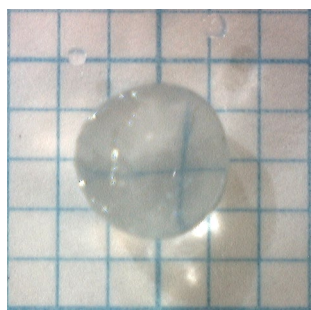
- U-shape 96-well plateを用いた培養



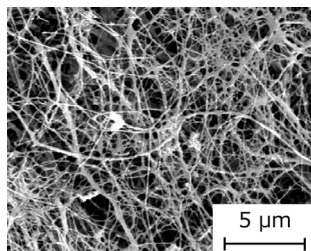
- ゲル化させたオイル中での培養 J. Song, et al., *Biomacromolecules*, 20, 4437-4446 (2019)



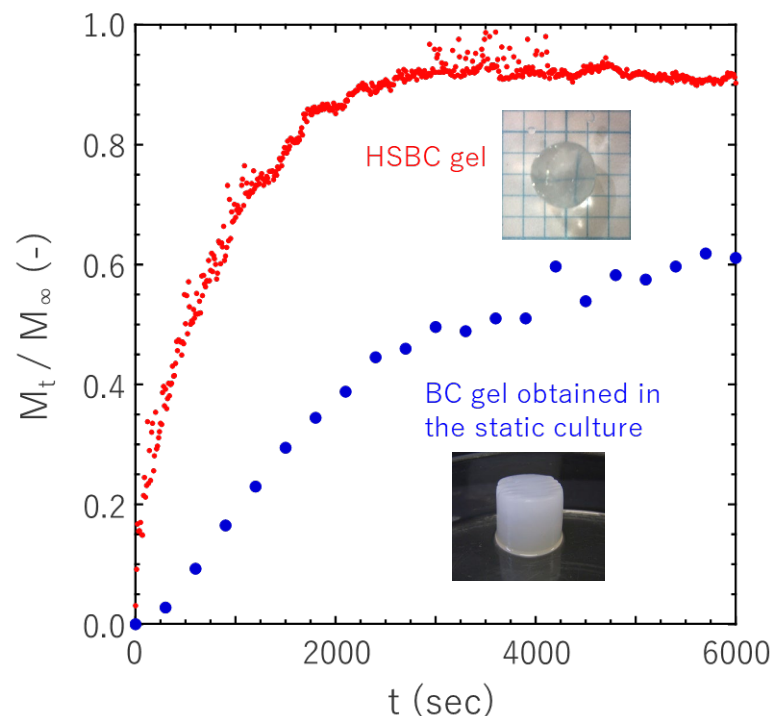
中空球状バクテリアセルロース (HSBC) ゲルからの薬物放出



1.0 mg/mL FITC-Dextran
(Mw:10,000) 水溶液に浸漬前後



FITC-Dextran (Mw:10,000)
流体力学半径 : 2.9 nm

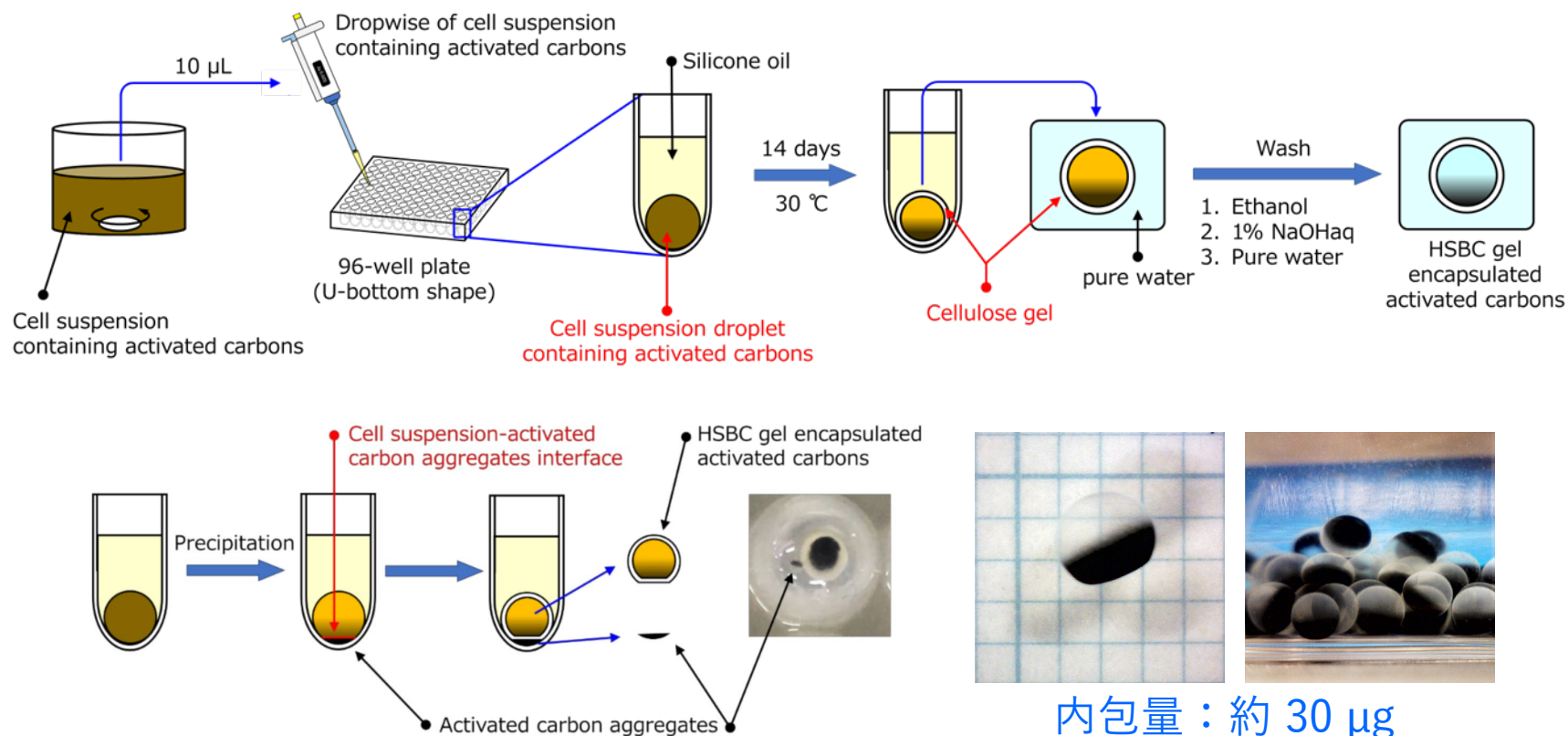


- 網目の細孔より小さいサイズの分子は、BCゲル膜を透過可能
- HSBCゲルへの薬物充填が可能
- BCゲル膜が薄いため、迅速な薬物の浸透、放出が可能
- アルブミンも透過可能 (Mw : 66,000, 4.0 nm × 4.0 nm × 14.0 nm*)

* R. J. Rapola, T. A. Horbett, *J. Colloid Interface Sci.*, 136, 480-492 (1990)

HSBCゲルによる機能性粒子のカプセル化

活性炭（粒径 6 μm ）を分散させた培養液を用いたカプセル化



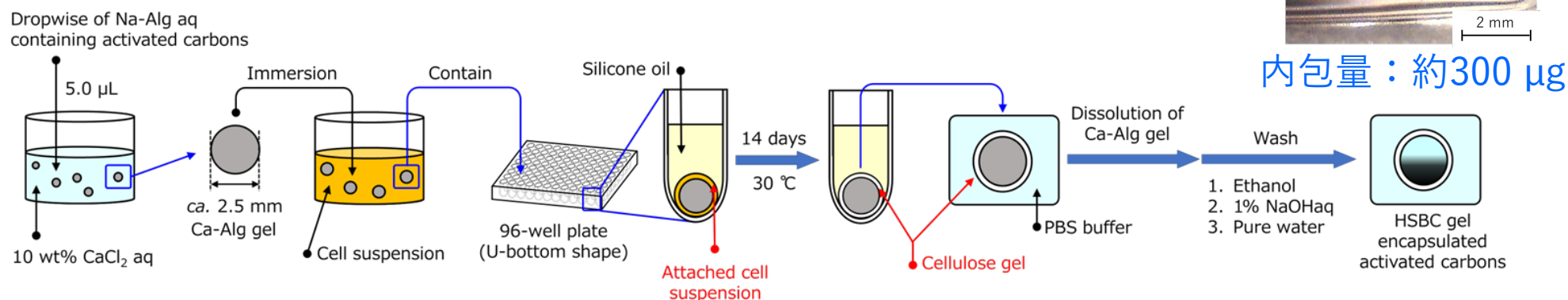
課題：内包量が少ない。

培養中に活性炭が沈降し、全量内包されない。

酢酸菌の生育を阻害しない活性炭量までしか添加できない。

ヒドロゲル表面でのBC産生による内包効率に優れた機能性粒子のカプセル化

例. アルギン酸ゲルを用いた活性炭の内包

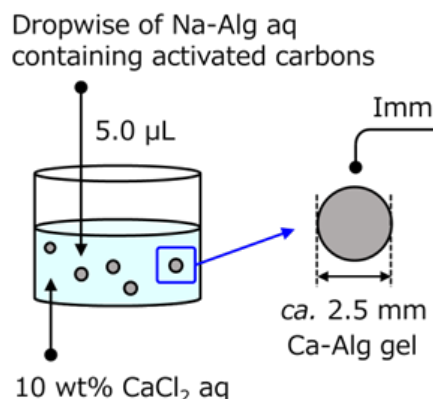


- ① 内包させたい粒子などをヒドロゲルに内包する。
(ヒドロゲル：アルギン酸カルシウムゲル，寒天)
- ② ヒドロゲルの表面に酢酸菌を植菌した培養液を付着させる。
- ③ シリコンオイル中で培養する。 ➡ ヒドロゲル表面でBCゲルが産生
- ④ BCゲル産生後にヒドロゲルを溶解除去する。

BCカプセルの直径は，①のヒドロゲルの大きさに依存

ヒドロゲル表面でのBC産生によるカプセル化の特徴 - ヒドロゲルの選択 -

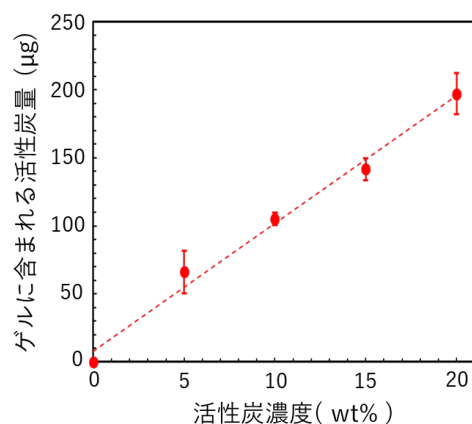
- アルギン酸カルシウムゲル
- PBS Bufferや Na_2CO_3 水溶液中で、**室温で溶解除去**が可能。



→ 熱変性しやすい**酵素**などの内包へ応用

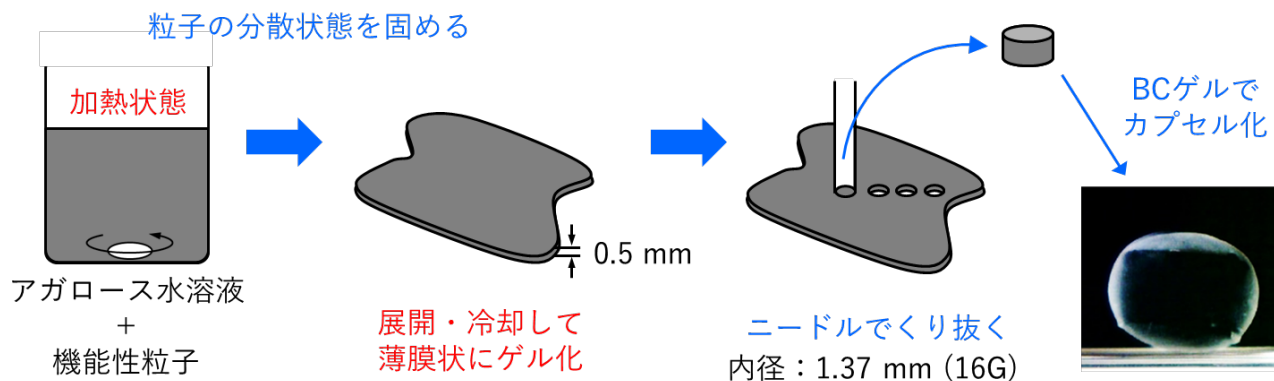
- CaCl_2 水溶液に滴下する必要があるため、内包量が多い場合には不適當。

- 寒天（アガロースゲル）

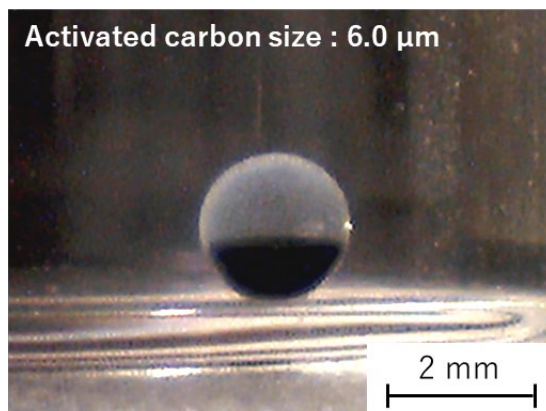
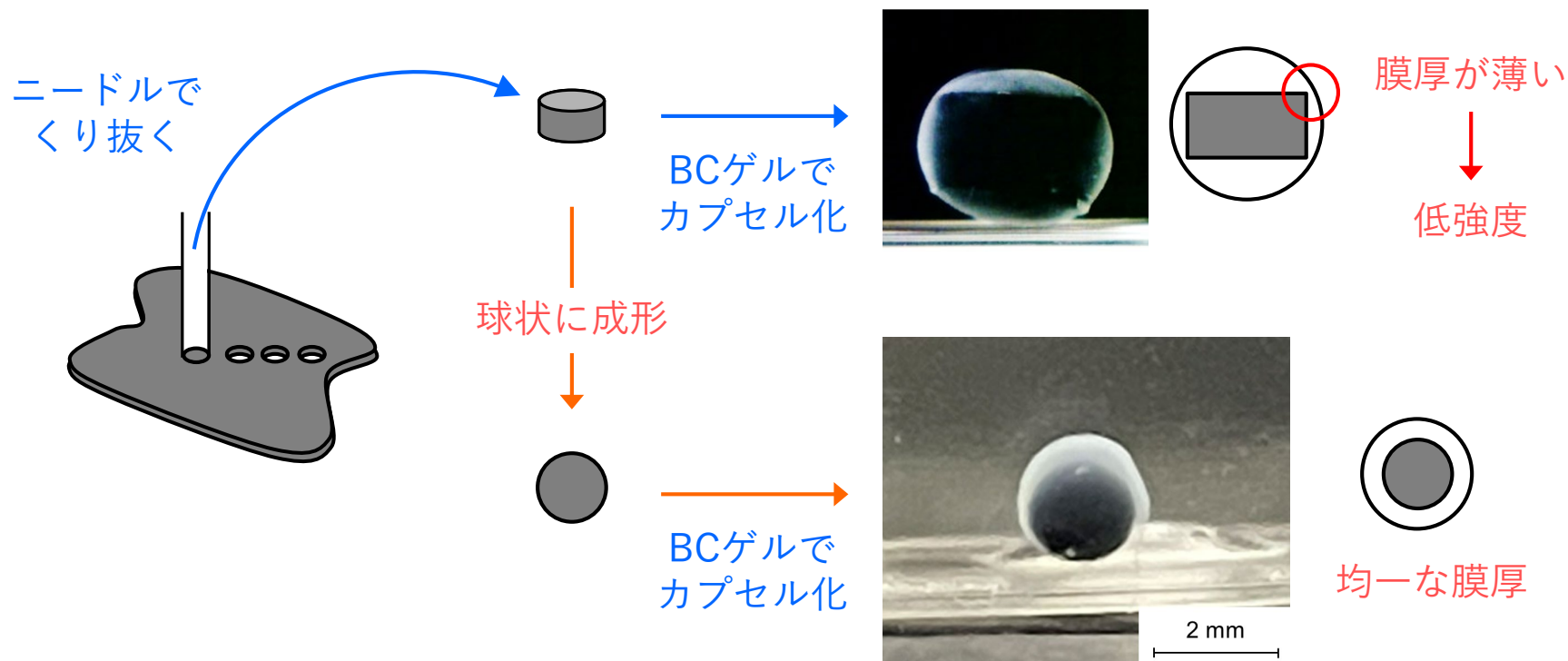


直径1.37 mm, 高さ0.5 mmのアガロースゲル中に含まれる活性炭量

- 熱水中で溶解除去が可能。
- 活性炭濃度により内包量の制御が容易。



寒天ゲルを用いた活性炭内包量の増大と小径化



内包量 : 約300 μg

アルギン酸ゲルを用いた場合との比較

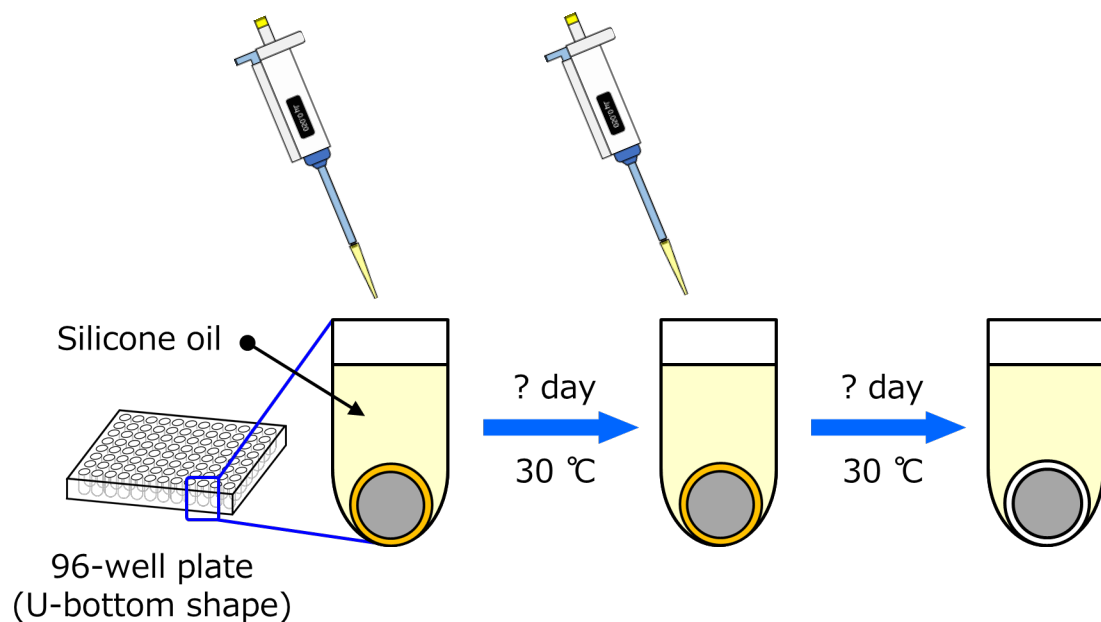
直径 : 約 0.94 倍

体積 : 約 0.83 倍

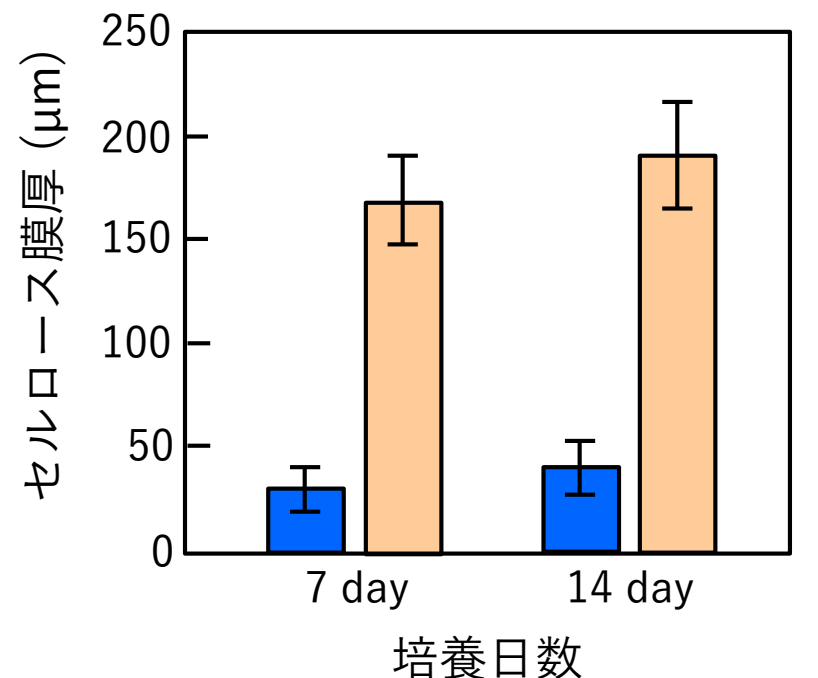
内包量 : 1.5 ~ 3.0 倍

小型化かつ内包量の増大を達成

ヒドロゲル表面でのBC産生によるカプセル化の特徴 - 膜厚の制御 -



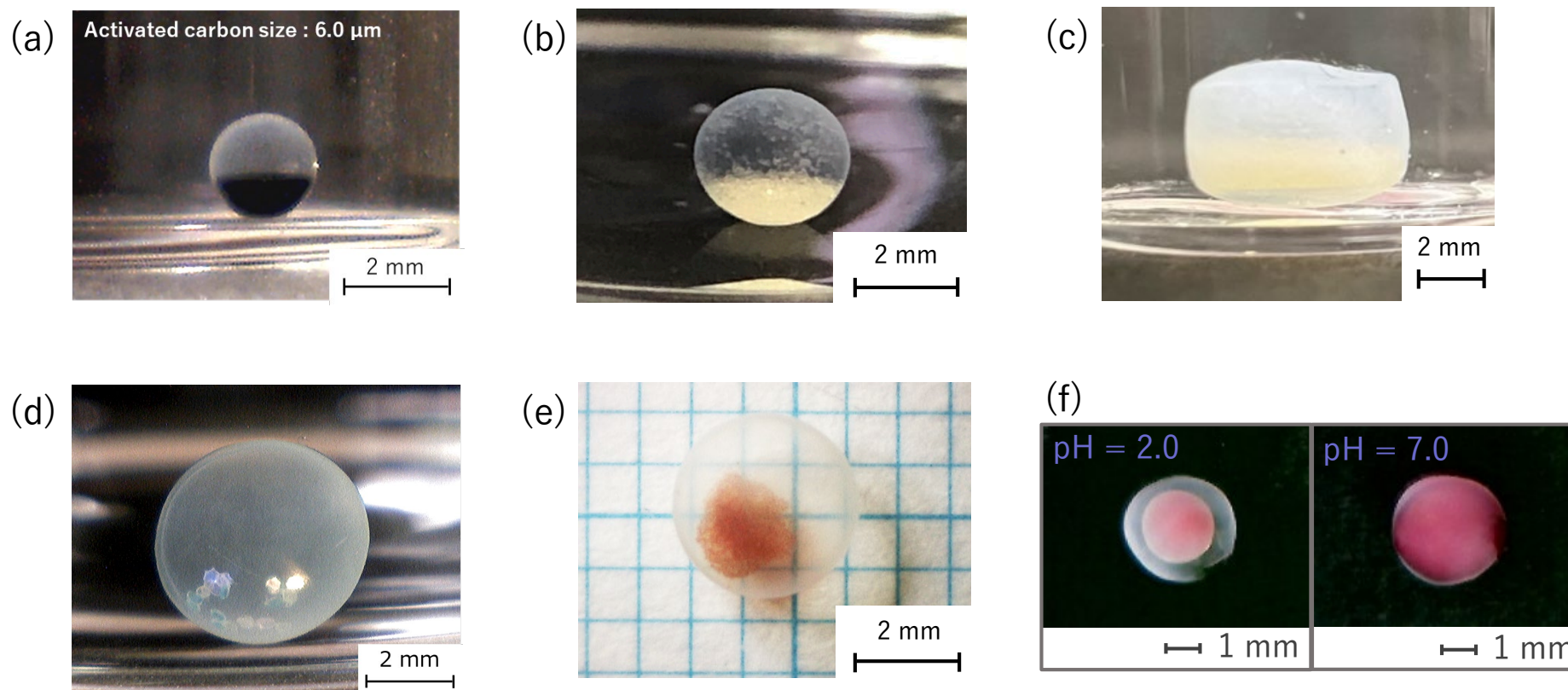
培養開始時や任意の時間で
酢酸菌を含む培養液を滴下



■ : 無添加
■ : 培養開始時および5日目に2 μL添加

- 酢酸菌を含む培養液を滴下することで、セルロースゲルの膜厚を増大させることができる。
- 滴下量と培養日数により、膜厚制御が可能？

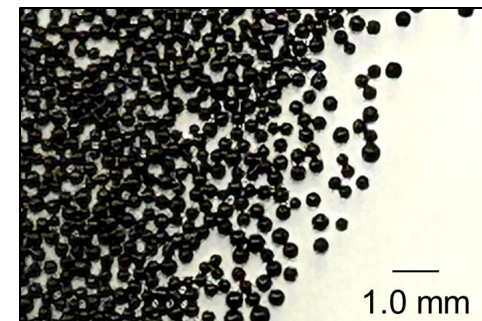
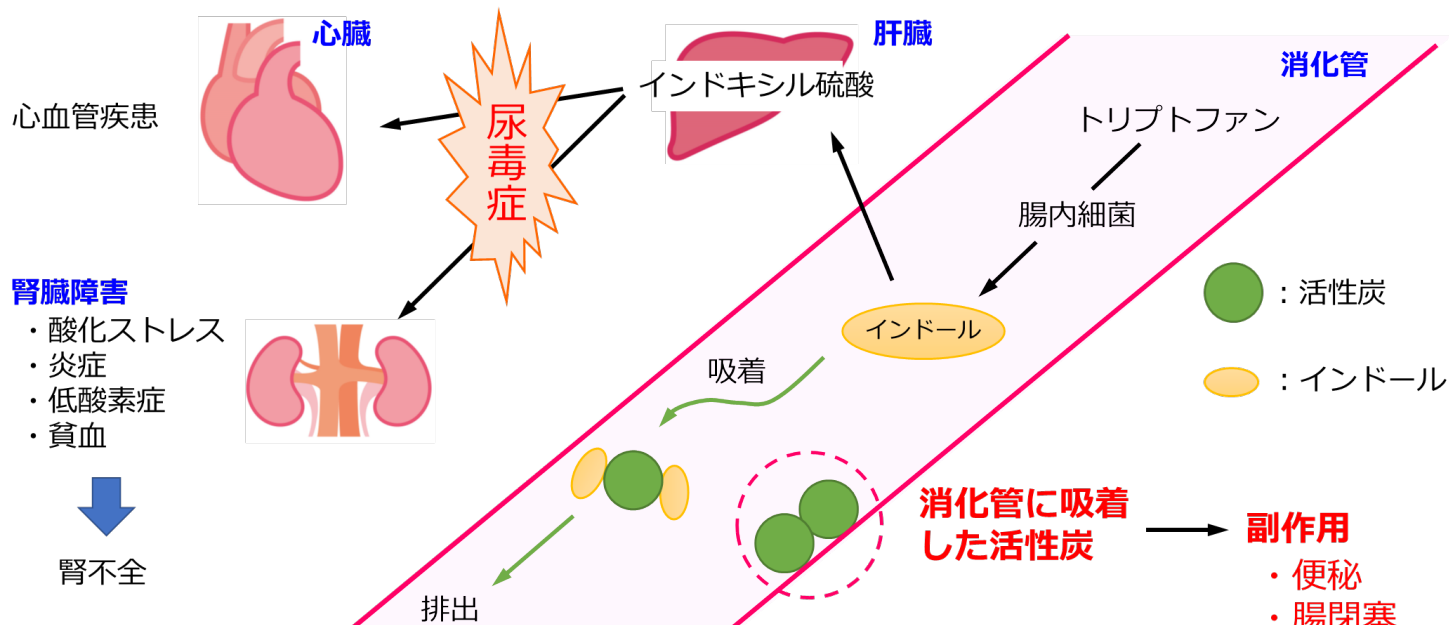
これまでに作成したサンプル



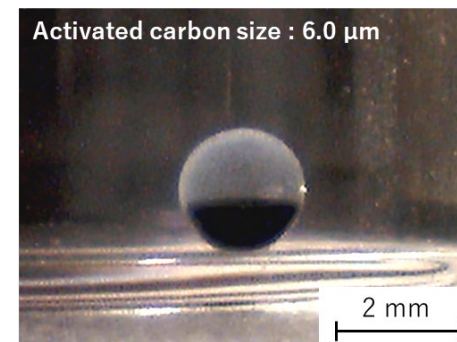
- 1 ~ 500 μm の粒子の内包が可能
- (a) 活性炭, (b, c) イオン交換樹脂, ゼオライトを内包可能
- (c) ヒドロゲルの形状が球形以外でも内包可能
- (e) 酵素固定化粒子や (f) pH応答性高分子ゲルの内包が可能

医療用機能性カプセルへの応用

尿毒症用経口吸着剤への応用



一般的な経口吸着炭

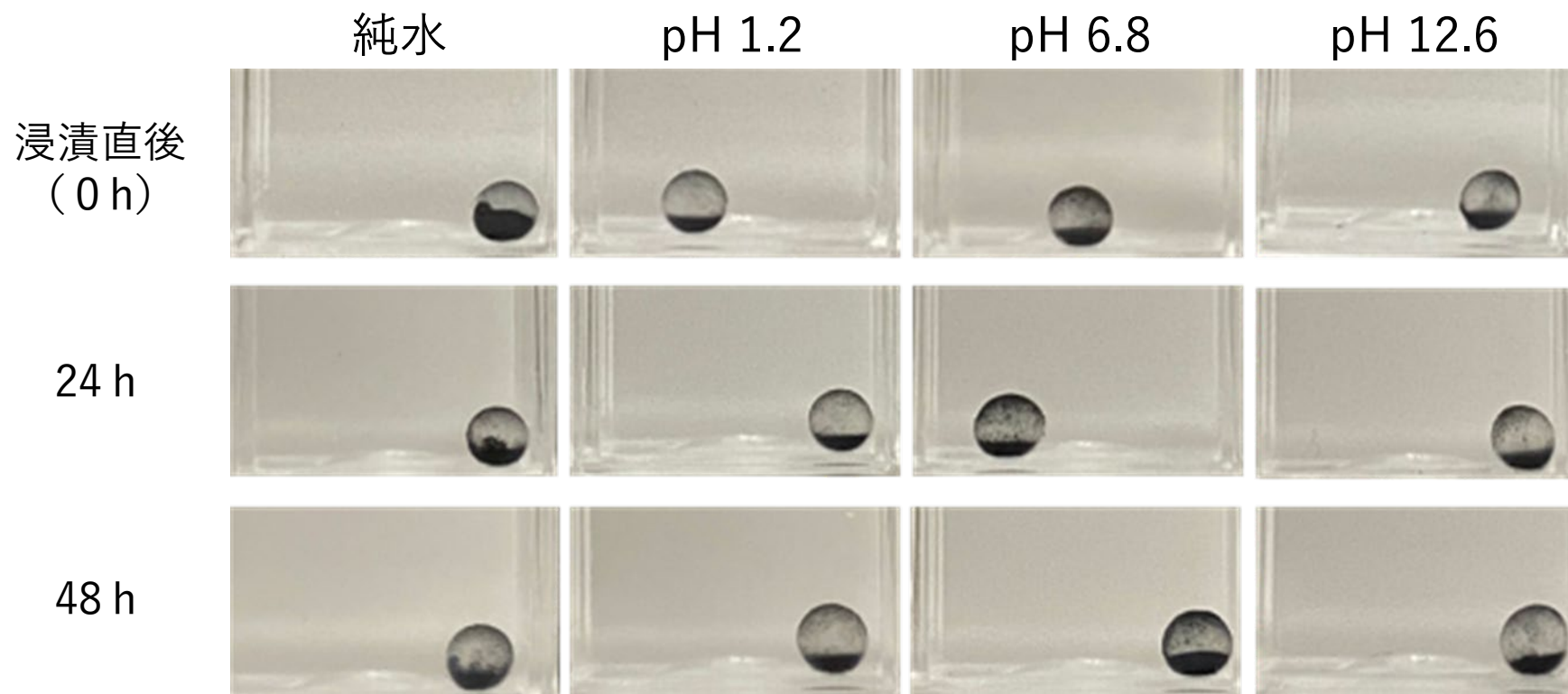


活性炭内包HSBCゲル

HSBCゲルによるカプセル化のメリット

- ・ 消化管の内壁と活性炭（内包した粒子）が接触しない
- ・ 親水性のナタデココにより，消化管に吸着しない
- ・ 高含水率のナタデココでカプセル化するため，飲みこみやすい

活性炭内包HSBCゲルのpH耐性



- 幅広いpH領域で、崩壊せずに活性炭の保持が可能

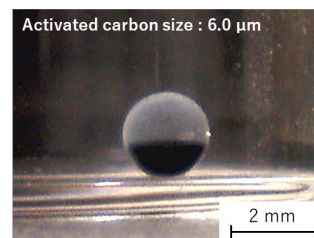
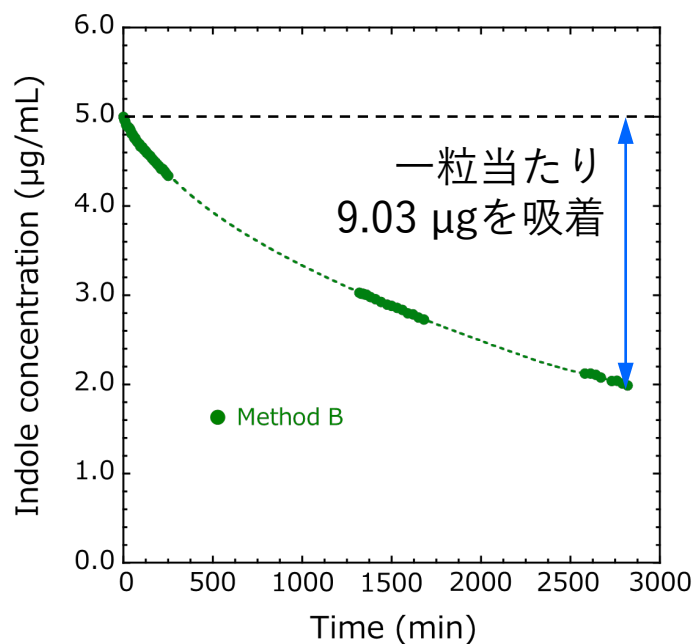
pH 1.2：崩壊試験液第一液（模擬胃液）

pH 6.8：崩壊試験液第二液（模擬腸液）

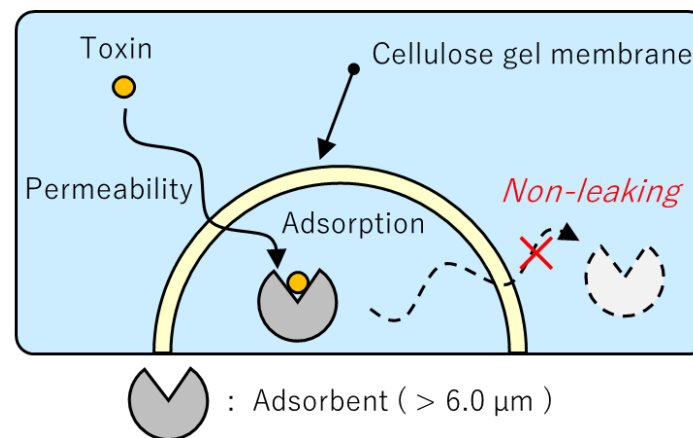
} 消化管中のpHでも安定な
カプセル素材

尿毒症用経口吸着剤への応用

インドールの吸着試験
(37 °C, インドール濃度 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)



約 300 μg の
活性炭を内包

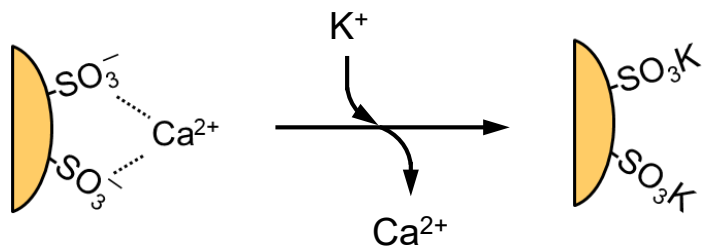


- 内包した活性炭は、BCゲル膜を透過したインドールを吸着可能。
 - 活性炭はHSBCゲルから漏出しない。
 - 消化管内壁への吸着による副作用を起こさずに、毒素のみ吸着除去を示唆。
- 尿毒症
 - 高カリウム血症
 - 高リン血症

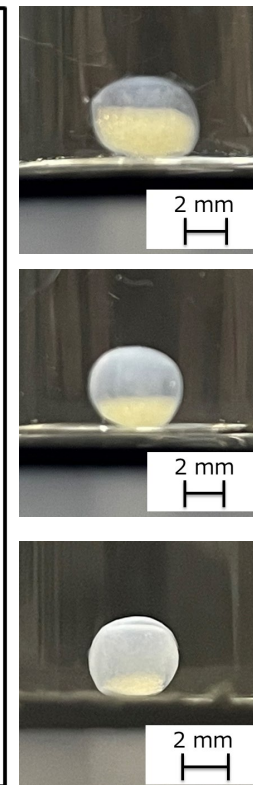
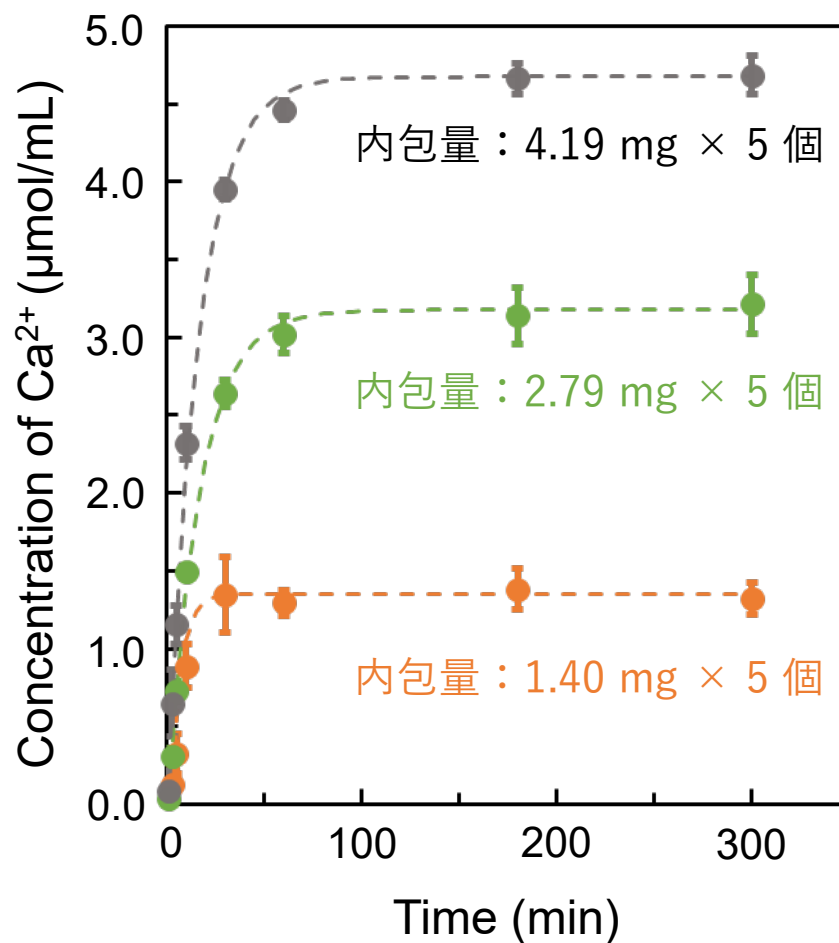
イオン交換樹脂のカプセル化による高カリウム血症用経口吸着剤への応用

イオン交換樹脂：

ポリスチレンスルホン酸カルシウム

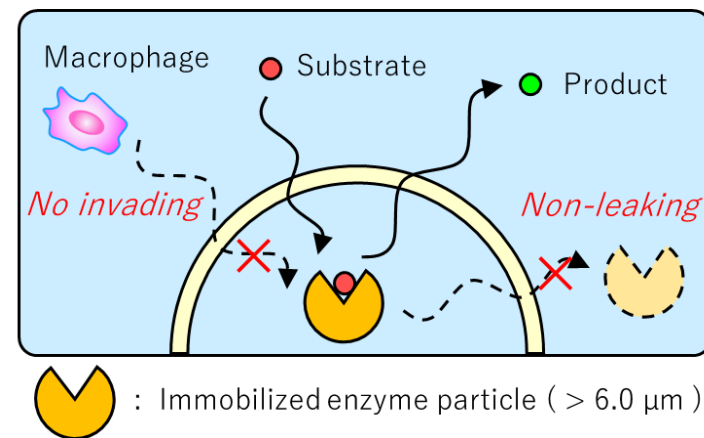
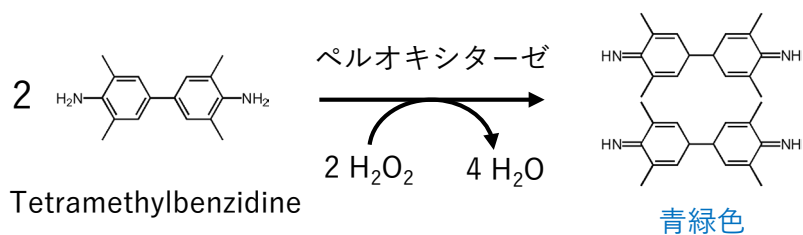
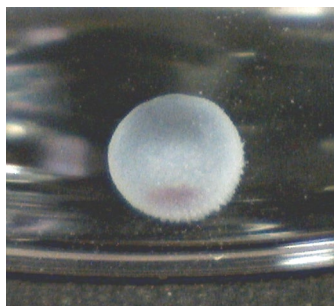


BCゲル膜を透過した K^+ が吸着
放出された Ca^{2+} を定量



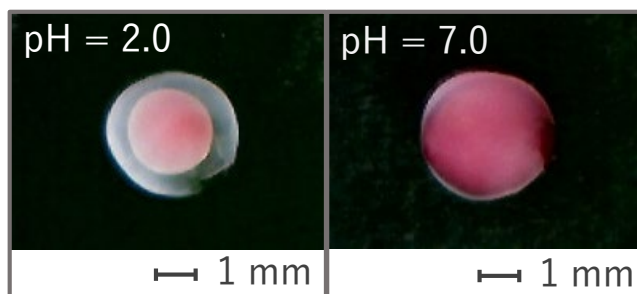
- イオン交換樹脂の内包量に従い、 K^+ の吸着量が増加。
- 内包したイオン交換樹脂はHSBCゲルから漏出しない。
- イオン交換孔樹脂粉末と同等の吸着容量を示す。

アルギン酸ゲルを用いた酵素固定化粒子のカプセル化

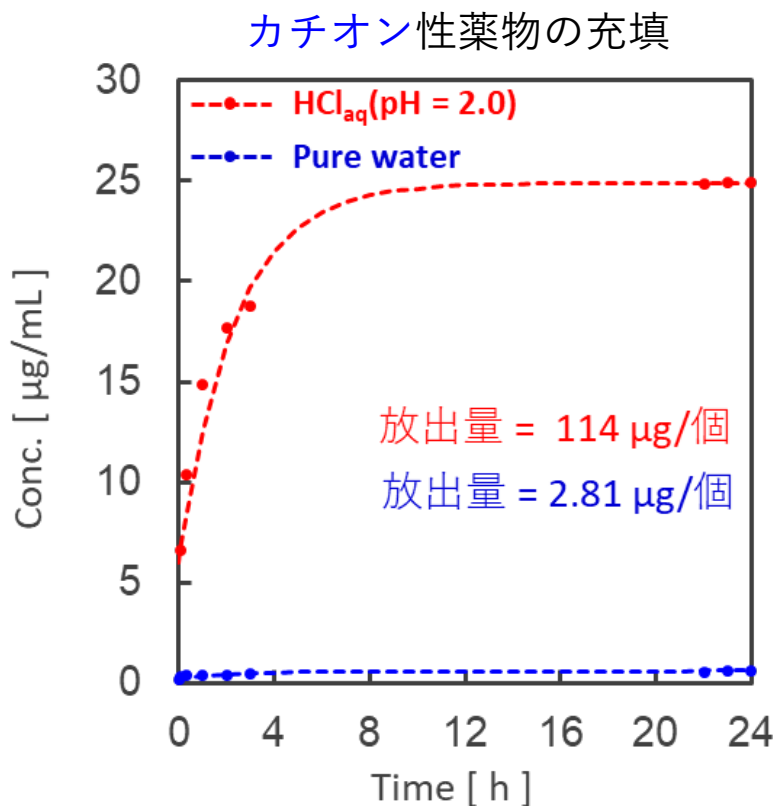
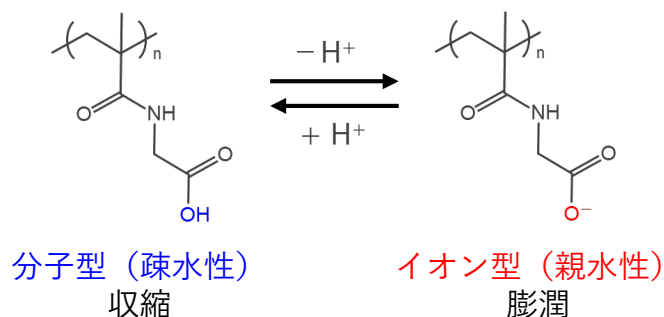


- ペルオキシターゼ（HRP）を固定化した粒子のカプセル化に成功。
- カプセル内を反応場として酵素反応が可能。
- BCゲル膜を透過できる大きさの分子を基質とすることができる。
- 免疫細胞存在下での種々の酵素反応が可能？

pH応答性ゲルの内包による薬物キャリアとしての応用



PMGlyゲル：Rhodamine 6Gで染色

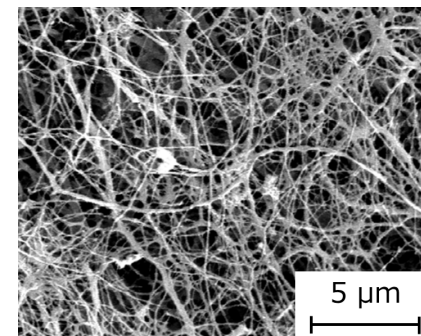
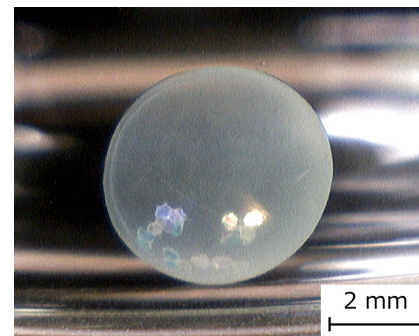


- 内包する高分子ゲルのpKaを境に、薬剤のpHによる放出制御可能
- ドラッグデリバリーシステム (DDS) への応用

胃(pH 1.2)で放出して、腸(pH 6.8)では保持
腸(pH 6.8)で放出して、胃(pH 1.2)では保持 など

シームレスな薄膜状セルロースナノファイバーゲルによる物質内包技術

セルロースナノファイバーで形成された
BCゲルによる物質の内包（カプセル化）



超臨界乾燥後の
セルロースゲル膜のSEM像

本技術で得られるセルロースカプセルの特徴

- カプセルを形成するのゲル膜が酸，塩基耐性を有する。
- セルロースゲル膜の細孔よりも大きい内包物質を漏出しない。
- 内包する物質により様々な機能を発現する。

想定される用途

- 内包する物質により様々な機能を発現する。

吸着剤（活性炭，イオン交換樹脂，ゼオライトなど）

- 経口吸着剤（尿毒症，高カリウム血症，高リン血症）
- 吸着剤を拡散させずに，目的物の吸着を行いたい
- 難溶性薬剤の非晶質化とDDS など

触媒（酵素固定化粒子，担持触媒など）

- セルロースカプセル内での反応
- 触媒を拡散させずに反応を行いたい など

機能性ゲル（pH応答性，温度応答性など）

- DDS（薬剤の保持，刺激に応答した放出） など

実用化に向けた課題，企業への期待

- 吸着剤，触媒，機能性ゲルのセルロースゲルによるカプセル化は可能であるが，内包する物質ごとに調製条件の最適化が必要。

再現性向上のためのオートメーション化

- 触媒や機能性ゲルなどをカプセル化し，新たな機能を有するセルロースカプセルを開発し，多岐にわたる分野への応用を検討する。

カプセル化のニーズのご提供

- *in vitro*試験やモデル薬物を使用した評価のみしか行っていないため，より実使用条件に近い条件での評価が必要。
- 活性炭やイオン交換樹脂を内包したカプセルのターゲット化合物の吸着挙動を明らかにし，経口吸着薬への応用検討を行う。

経口吸着薬の応用，評価方法

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：バクテリアセルロース膜
カプセルの製造方法，
バクテリアセルロース膜
カプセル，及び医薬組成物
- 出願番号：特願2020-137078
- 出願人：日本大学
- 発明者：星 徹，青柳 隆夫

お問い合わせ先

日本大学産官学連携知財センター

T E L 0 3 - 5 2 7 5 - 8 1 3 9

F A X 0 3 - 5 2 7 5 - 8 3 2 8

e-mail nubic@nihon-u.ac.jp