

軟骨組織再生のためのマイクロジェランビーズの開発

Development of micro-gellan beads for cartilage tissue regeneration

○ 小山直紀(三重大) 古蔵史子(三重大)

堀内孝(三重大) 宮本啓一(三重大)

Naoki KOYAMA, Mie University, Fumiko HURUKURA Mie University,
Takashi HORIUTI, Mie, University, Keiichi MIYAMOTO, Mie University

Abstract: It is well known that cartilage tissue has a limited ability for self-repair and regeneration such as articular cartilage and intervertebral disk. Furthermore, there is a problem that current therapy has a high invasiveness. Gellan gum is a polysaccharide secreted by *Sphingomonas elodea* with repeating tetrasaccharide units composed of one glucuronic acid, one rhamnose and two glucoses. It is potential for the application to hydrogel based material. This study aimed to develop injectable micro-gellan beads for repair cartilage tissue. As a result, we got micro-gellan beads which were made by CarboxyMethylGellan and differential degrees of sulfation of GellanSulfate.

Key Words: Gellan gum, Microbeads, Growth factor

1. 緒言

ジェランガムは、微生物 *Sphingomonas elodea* が菌体外に産出する Glucose-Glucuronic acid-Glucose-Rhamnose の4糖の繰り返しから成る天然多糖類である。増粘安定剤としても幅広く利用されており、抗血栓作用や優れた生体適合性を有する。またジェランガムに硫酸基を導入する事で、生体内で最も負電荷の多い多糖であるヘパリン様の基本骨格を持ち、様々な生理活性物質との親和性を有する事が期待できる。

関節軟骨や椎間板などの軟骨組織は、一度損傷すると自然治癒はほぼ見込めない組織である。損傷時の現行治療法として外科手術等があるが、切開に伴う高い侵襲性や術後に生じる組織癒着により再手術が極めて困難であるといった問題点が挙げられる。そこで軟骨再生関連薬物を担持させたビーズゲルをシリンジで患部にインジェクトし、薬物を徐放させる事で、より低侵襲な治療法になり得ると考えた。本研究では、薬物担持能を有する硫酸化ジェラン(GS)および高水溶性のカルボキシメチルジェラン(CMG)(Fig.1)を利用したマイクロサイズのビーズゲルの開発を行い、その薬物放出挙動を調査した。

2. 方法

2-1 CMG および GS 調製

脱アシル型ジェラン(DG)を NaOH に溶解させ、モノクロロ酢酸ナトリウムを添加後、氷浴上で攪拌し、脱イオン水に溶解させた。この溶液を透析、凍結乾燥し、CMG を得た。

ネイティブ型ジェランを塩酸処理し、塩を除去したフリー化ネイティブ型ジェランを出発物質として、N,N-ジメチルスルホキシド(DMF)中で硫酸化剤であるクロロスルホン酸と反応させた。この溶液を透析、凍結乾燥し、GS を得た。得られたサンプルは 1H-NMR によりカルボキシメチル化度(CM 化度*)を測定し、元素分析により硫酸化度を測定した。

CM 化度*=[CMG のプロトン積分強度(4.2~3.0ppm)-DG のプロトン積分強度(4.2~3.0ppm)]/2 ... (1)

2-2 マイクロジェランビーズの作製

カルボキシメチルジェランを流動パラフィン中で乳化⁽¹⁾さ

せ、L-LysineMethylEster、WaterSolubleCarbodiimide hydrochloride (WSCD・HCl)を加え架橋させた後、EtOH および脱イオン水で洗浄し、ビーズゲルを得た。

2-3 アフィニティー測定(ELISA)

硫酸化ジェランと NaBH₄をアミノ基 96 穴プレートに添加し、固定化した後に、0~200ng/ml b-FGF を加え、抗体としてビオチン化 anti-b-FGF、HRP 標識ストレプトアビジンを用いて、各 b-FGF 濃度における吸光度(490nm)を測定した。吸光度値から Scatchard 解析を行い、硫酸化ジェランと b-FGF との結合定数を算出した。

2-4 拡散係数の測定(タイムラグ法)

CMG および GS を用いてゲルシートを作製し、数種類のプローブを用いて、プローブ溶液の透過時間を測定した。透過時間からジェランゲル中のプローブ拡散係数を算出した。

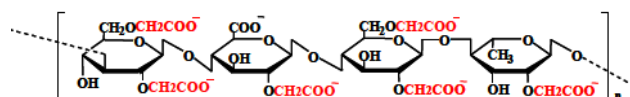
2-5 徐放実験

b-FGF を吸着させたマイクロジェランビーズを PBS 中に入れ、各時間での溶液を採取し、ELISA から放出量を測定した。

3. 結果

3-1 CMG および GS 調製

A) CarboxyMethylGellan (CMG)



B) Gellan Sulfate (GS)

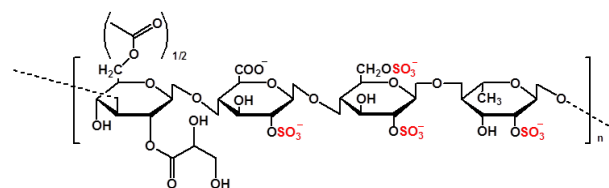


Fig.1 structural formula

脱アシル型ジェランとカルボキシメチルジェランを比較するとプロトンの積分強度が増加した事からヒドロキシ基からカルボキシメチル基への置換を確認した(Fig.2)。

式(1)から算出したサンプルのカルボキシメチル基化度は最大で 6.1 であった。

A) Methyl group of Rhamnose

B) other functional group of CMG

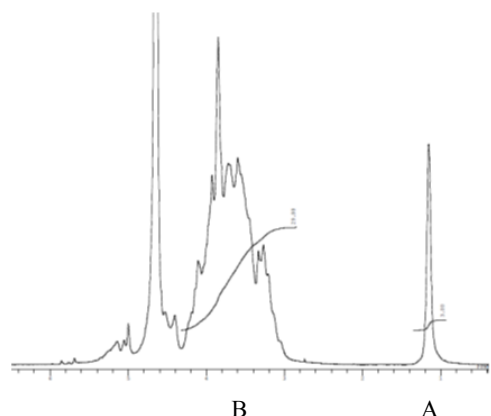


Fig.2 hydrogen NMR spectrum of CMG

次に硫酸化ジェランは硫酸化反応条件によって硫酸化度が増加し、得られた硫酸化ジェランの硫酸基含有量から算出した硫酸化度は、0~40%であった。

3-2 マイクロジェランビーズの作製

乳化法により作製する事で、半径 10 μ m~250 μ m のマイクロジェランビーズを得ることが出来た。

3-3 アフィニティー測定(ELISA)

カルボキシメチルジェランおよび異なる硫酸化度の硫酸化ジェランと b-FGF との親和力に違いが確認された。吸光度値から算出した硫酸化ジェランと b-FGF の結合定数は、 $3.3E+08$ ~ $2.1E+09(M^{-1})$ であった。

4. 考察

ELISA 法による親和力測定において、硫酸化ジェランの硫酸化度が高くなるに従って b-FGF との親和力が増加する傾向にある事が確認された。b-FGF はリシンやアルギニン、ヒスチジンといった多くの塩基性アミノ酸から構成されており、硫酸化ジェランは負電荷を帯びた硫酸基を有する多価電解質であると考えられる。そのため硫酸化ジェランと b-FGF は電荷的に結合しており、硫酸化度が高い硫酸化ジェランの場合、硫酸基がより多く導入されることで親和力が増加すると考えられる。またカルボキシメチルジェランが持つカルボキシ基は硫酸基より比較的弱い負電荷を帯びていると考えられるため、b-FGF と親和力を有するが、カルボキシメチルジェランのカルボキシ基はゲル化反応に伴って消費される事が予測される為、硫酸化ジェランの硫酸化度の違いが b-FGF との結合に大きく関与すると考えられる。

5. 結論

本研究により、カルボキシメチルジェランおよび、異なる硫酸化度の硫酸化ジェランを用いたマイクロジェランビーズを得る事ができた。得られた硫酸化ジェランの b-FGF に対する結合定数や拡散係数の測定から本マイクロジェランビーズは特徴的な放出挙動を示す事が分かった。

6. 参考文献

- (1) Sun Y, Gao F, Preparation and characterization of 5-Fluorouracil loaded chitosan microspheres by a two-step solidification method, Chem. Pharm. Bull, vol.58, no.7, pp.891-895, 2010.