[薬学雑誌 YAKUGAKU ZASSHI 110(6) 442—448 (1990)]

キトサン膜のリゾチームによる分解と内包物質の放出[1)]

四方田千佳子,* 小室徹雄, 木村俊夫
国立衛生試験所大阪支所

Studies on the Degradation of Chitosan Films by Lysozyme and Release of Loaded Chemicals

Chikako YOMOTA,* Tetsuo KOMURO, and Toshio KIMURA
National Institute of Hygienic Sciences, Osaka, 1-1-43 Hoensaka, Cyuo-ku, Osaka, 540, Japan

(Received March 13, 1990)

Chitosan films with or without chemicals of interest were prepared and degradation properties of chitosan films of themselves by lysozyme and releases of the loaded chemicals from the films were investigated.

Enzymatic degradation rate of the films was dependent on the degree of deacetylation of chitosan used and decreased with an increase in its deacetylation. The acidic conditions accelerated the degradation compared to the neutral pH.

Most of the water-soluble chemicals used in the present experiments except Coomassie Brilliant Blue with a strong acidic group and pullulan with a high molecular weight (5.8×10^4—38.0×10^4), were rapidly released from the films within 1 h. The two chemicals described above were released only in the presence of lysozyme, and their release rates were controlled by the degradation rate of the films.

Keywords——chitosan; chitosan film; deacetylation degree; lysozyme; film degradation; film dissolution; chemicals release

キチン，キトサンはセルロースに匹敵する豊富なバイオマス資源であり，近年多くの分野でその有効利用が注目されている.[2)] キチンはエビ，カニ等の甲殻類の皮殻や昆虫の甲皮等に含まれる多糖で，*N*-アセチル-D-グルコサミンが β-1,4 結合したものである．キトサンはキチンをアルカリ加水分解することにより部分的に脱アセチル化したもので，キチンが特殊な有機溶媒にしか溶けないのに対し，キトサンは酢酸や塩酸などの希酸に溶解する．

キチン，キトサンは天然物であるという安全性と，生体内分解性を有するという特性のために医用材料，製剤材料としての利用が検討されつつある.[3,4)] すでにキチンの不織布が熱傷用の局所被覆剤として許可，発売されたが,[5)] 薬剤分野ではまだ実用には至っていない．

著者らは，特に生体内分解性を有する高分子としてキトサンに着目し，その薬剤設計用高分子としての可能性を検討するための基礎的な実験を行った．キトサンの水溶液中でのリゾチーム分解に関してはいくつかの報告があり，リゾチームの基質として *N*-アセチル基が必須であること等が示されている.[6,7)] しかし，キトサンで調製した成形物のリゾチーム分解に関しては，キトサン繊維[7)] やキトサンスチックのリゾチーム溶液中での重量変化[8)] を測定した例が見られるだけで詳細に検討した例は見あたらない．また，キトサン膜からの薬物の放出を検討した報告[9)] はあるが，キトサン膜の分解と関連づけた報告はない．

そこで，まず本報ではキトサン成形物のリゾチーム分解について検討し，更にキトサン膜にいくつかの水溶性化合物を内包させた場合の放出挙動と膜分解の関係について検討した．

実　験　の　部

試料　4 種の脱アセチル化度 (DA) の異なるキトサン (DA: 65.8%, 79.8%, 91.5%, 100%) は (株)加ト吉より供与されたエビ甲殻由来のものを用いた．それぞれのキトサンを DA66, DA80, DA92, DA100 と略記する．リゾチームは生化学工業 (株) 製の 6 回再結晶卵白リゾチームを用いた．他の試薬はすべて市販特級品

NII-Electronic Library Service

を使用した.

粘度測定 キトサン水溶液の粘度はキトサンを酢酸緩衝液 (0.1 M 酢酸+0.2 M 酢酸ナトリウム, pH 5.0) に溶解させ 3—4 時間攪はん後, ウベローデ希釈型粘度計を用い 25°C 又は 37°C で測定した.

ゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC) キトサン及びキトサン分解物の分子量は, TSK6000 PW_{xl}+TSK3000PW_{xl} カラム (東ソー (株)) を用い 0.5 M 酢酸+0.5 M 酢酸ナトリウムを溶離液とする GPC により 40°C で測定した. GPC 装置は東ソー (株) 製ポンプ CCPD, 示差屈折検出計 RI-8012, カラムオーブン CO-8010 を用いた. キトサン濃度は 1 mg/ml とし, 100 μl 注入した. 分子量標準品は, 昭和電工 (株) 製 Shodex Standard P-82 (分子量 5800—853000), 及びプルラン (分子量 1600000, 2460000) を用いた. 分子量のデータ解析には島津 (株) 製クロマトパック C-R4A 及び GPC 用プログラムディスクを使用した.

キトサン膜の調製 キトサン 1 g を 1% 酢酸 100 ml に溶かし, グラスフィルターで不溶物を除去後ガラス容器に注入し 60°C で一晩放置した. 得られたキトサン膜は直径 2.5 cm 厚さ 80—100 μm で, 透明なセロファン様の膜であった.

キトサン膜へ水溶性化合物を内包させる場合には, DA66 を用い, 内包物質をキトサン溶液へ溶解させてから同様に成膜した.

キトサン膜のリゾチーム分解 キトサン膜をそれぞれの緩衝液 10 ml に浸し, リゾチームを 10—50 mg 添加後 37°C の恒温槽中で振とうした. キトサン膜の分解速度は, キトサン膜から遊離してくる低分子化キトサンを *N*-アセチル化を伴う Morgan-Elson 反応[10]により定量し, 膜が完全に消失した時の定量値を 100 とした. また, 膜の溶解率は上記と同様に溶出してくる未分解のキトサンを定量し, 完全に溶解させた時の定量値を 100 として表した.

キトサン膜からの内包物質の放出実験 化合物を内包させたキトサン膜を 10 ml の 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4 又は pH 6) に浸し, 37°C の恒温槽中で振とうさせながら緩衝液中に出てくる物質濃度を経時的に測定した. 水溶性色素は吸光度測定により, プルランはアンスロン硫酸法により定量した.[11] アンスロン硫酸法は通常の 10 分の加熱では, キトサン分解物やリゾチームの存在により反応液の色調が褐色を帯びて定量が妨害されたので, 加熱時間を検討し, 発色が充分であり妨害を生じない 3 分へと短縮した.

結果及び考察

キトサンの粘度及び分子量の測定

今回実験で用いた脱アセチル化度の異なる 4 種のキトサンの粘度はウベローデ型粘度計により, 分子量は GPC により測定した. 固有粘度 [η], 重量平均分子量 M_w, 数平均分子量 M_n, M_w/M_n 比及び GPC ピークのトップ位置における分子量の読み M_{top} の値を Table I に示した. キトサンの固有粘度 [η] は 10.6—13.8 dl/g であり, M_w は 90.5 万—221.2 万とかなり大きく, 分子量分布を示す M_w/M_n 比は 9.6—12.3 であった.

キトサンの溶液状態でのリゾチーム分解

キトサンの溶液状態でのリゾチームによる分解を, 水溶液の粘度の減少率を指標として測定した. 4 種のキトサン 0.04 g/dl 溶液 (0.1 M 酢酸+0.2 M 酢酸ナトリウム, pH 4) 10 ml 中にリゾチーム溶液 (10 μg/ml) を 1 ml 添加し, 37°C で経時的に粘度を測定した. リゾチームのオリゴマー分解に対する至適 pH は 5.2 と報告されているが,[12] キトサン溶液は pH を上げると沈澱するため, 本実験では pH を 4 として粘度の測定を行った. 結果を Fig. 1 に示した. 縦軸はリゾチームを加えない場合の還元粘度を 100% としたときの粘度の減少率を表したもので, 脱アセチル化度が低くなると粘度は急激に減少した. DA 100 の場合にはキトサンはリゾチームによりほとんど分解されないと思われるにもかかわらず, リゾチーム添加直後に粘度が 83% 程度に減少したが, これは, キトサン分子がリゾチームの存在でより丸まった形状となる可能性を示唆するものと思われた.

TABLE I. Intrinsic Viscosities and Molecular Weights of Four Kinds of Chitosan

Sample (DA)	[η]	M_w $\times10^{-4}$	M_n $\times10^{-4}$	M_w/M_n	M_{top} $\times10^{-4}$
65.8	13.2	221.2	20.0	11.0	89.5
79.8	13.8	213.5	22.3	9.6	72.6
91.5	10.6	90.5	9.0	10.0	24.9
100	11.8	95.0	7.7	12.3	23.2

Molecular weights were measured by gel permeation chromatography (GPC) using pullulan as standards. Values of M_{top} mean the molecular weights at the retention time of peak top.

NII-Electronic Library Service

キトサン膜の溶液中での安定性

キトサン膜が溶液中で溶けだすことなく安定に存在するかどうかを pH 4 の酢酸緩衝液及び pH 5.0, pH 6.0, pH 7.4 のリン酸緩衝液中で溶解率を測定することにより検討した．以後，酵素分解を伴わないで膜状態が解消されることを溶解，酵素分解により膜が消失する場合を分解と記す．Fig. 2 に示すように pH 4 では，いずれの膜も 1—2 時間以内に完全に溶解するが，DA 92, DA 100 のキトサン膜では DA 66, DA 80 のキトサン膜よりも速く溶ける傾向が認められた．pH 5 では DA 80 の膜で最も溶解が速く 5 時間後には約 50% が溶解し，ついで DA 66 の膜で約 20%，DA 92 の膜で約 5% が溶解するにとどまった．DA 100 の膜は全く溶解しなかった．pH 6 では DA 66 の膜は 5 時間後に 10% 溶解したが，DA が大きくなるにつれ溶解しにくくなった．pH 7.4 における結果は図に示さなかったが，いずれの膜も全く溶解せず安定に存在した．これらの結果より，生理的 pH である pH 7.4 では DA に無関係に膜状態が保たれること，また，DA 92, DA 100 と DA が大きいキトサン膜は pH 5.0—pH 7.4 程度の弱酸性下では安定に存在するが，pH が 4.0 と低くなると速やかに溶解すること，DA 66, DA 80 の膜は pH 5.0—6.0 でも一部が溶解することが明らかとなった．

脱アセチル化度の異なるキトサン膜のリゾチーム分解

DA の異なるキトサンにより調製した 4 種の膜を用い pH 6.0 のリン酸緩衝液中における，リゾチーム添加により分解を検討した．分解率と時間の関係を Fig. 3 に示した．DA 66 の膜では 2 時間で，DA 80 の膜では 3 時間でほぼ 100% 分解したが，一方 DA 92 の膜では 4.5 時間後で 5.7% 分解したにとどまり，20 時間後でも分解率は 12.2% にすぎなかった．但し DA 100 の膜では分解は全く認められなかった．Fig. 3 のリゾチーム存在下での分解率と Fig. 2 の pH 6 における溶解率を比較すると，DA 92 の膜では分解率の約半分はリゾチームが存在しない場合にも溶解率として表れていることから考え，DA 92 のキトサン膜のリゾチーム分解は極くわずかであると言える．キトサン膜のリゾチーム分解では Fig. 1 に示した溶解状態での場合と同様に

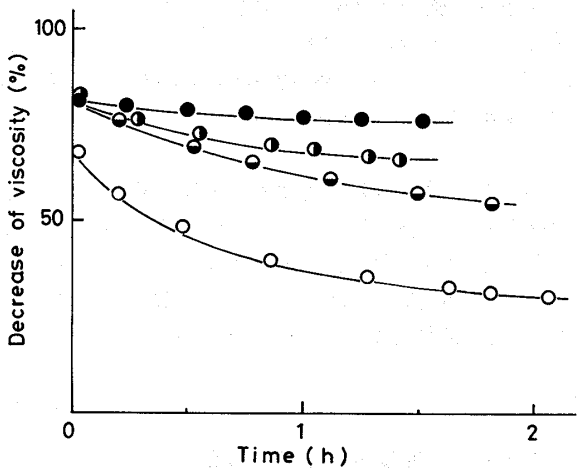

Fig. 1. Decrease of Viscosity of Chitosan Solution in the Presence of Lysozyme

The concentration of chitosan was constant at 0.04 g/dl and the amount of lysozyme was 10 μg/ml. ○, DA66; ◒, DA80; ◑, DA92; ●, DA100.

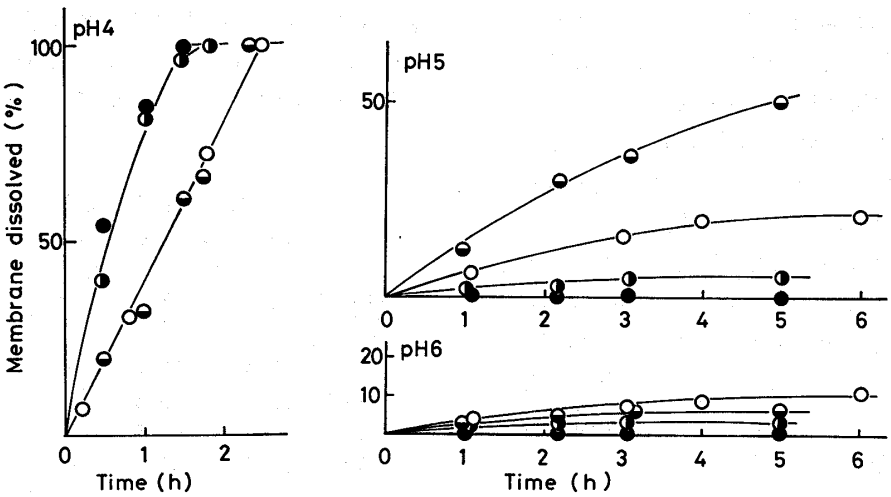

Fig. 2. The Dissolution of Chitosan Films at Various pHs

The films were prepared with DA66.
○, DA66; ◒, DA80; ◑, DA92; ●, DA100.

NII-Electronic Library Service

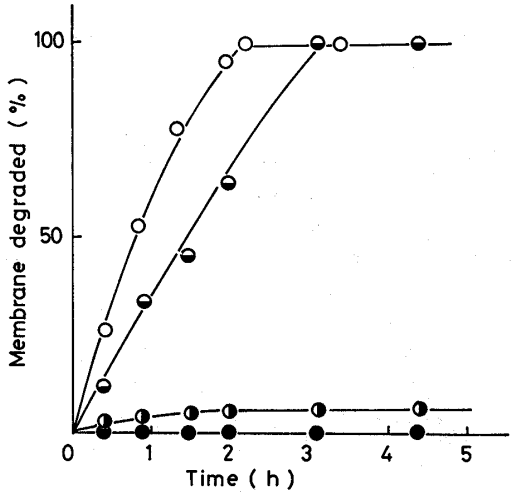

Fig. 3. Effect of Degree of Deacetylation on the Degradation of Chitosan Films in the Presence of Lysozyme

○, DA66; ◒, DA80; ◑, DA92; ●, DA100.

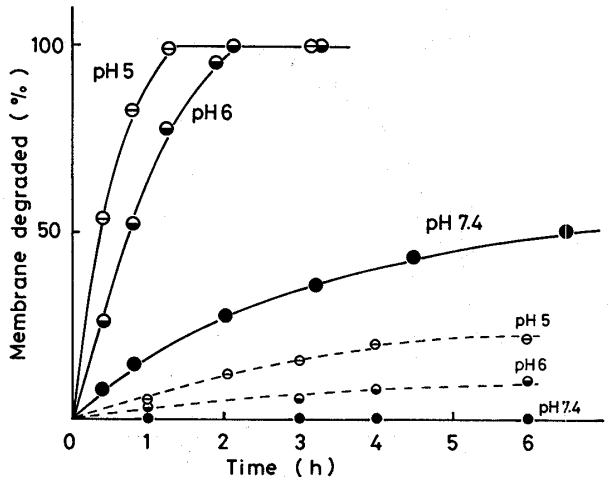

Fig. 4. Effect of pH on the Degradation of Chitosan Films in the Presence of Lysozyme

The films were prepared with DA66. The broken lines indicate the dissolution curves shown in Fig. 2.

膜を構成するキトサンの DA が低くアセチル基が多い場合には分解速度は速く，Fig. 3 の場合のように多量のリゾチーム存在下ではごく短時間で分解することが明らかとなった．

次に，DA 66 のキトサン膜においてリゾチーム分解の pH 依存性を検討した．pH 5.0，pH 6.0 及び pH 7.4 における膜の分解率を測定した結果を Fig. 4 に示した．Fig. 4 中には Fig. 2 における DA 66 のキトサン膜の各 pH での溶解率を再度点線で示した．膜の分解は pH が低い程速く，pH 5 及び pH 6 では膜は 1 枚の膜状態を保ったまま速やかに分解された．生理的 pH である 7.4 においては小さく鱗片状になりながら徐々に分解され，6 時間後には 50% 程度にまで分解された．Davies ら[12]は，アセチルグルコサミンテトラマーに対するリゾチームの活性は pH 7.4 では pH 5.0—6.0 の場合の約 1/3—1/4 であると報告しているが，キトサン膜においても分解速度は pH に依存するといえた．

TABLE II. Molecular Weights of Soluble Degradation Product Liberated from Chitosan Film by Lysozyme

Time (h)	0	0.5	1.22	2.0	2.68
Molecular weight ($\times 10^{-4}$)	86.0	6.8	4.3	4.3	3.0

キトサン膜分解物の分子量

キトサン膜のリゾチーム分解により遊離してくる可溶性分解物がどの程度の分子量を有するかを GPC により検討した．DA 66 のキトサンにより調製した膜を pH 7.4 の緩衝液中で分解させた．緩衝液を経時的に GPC に注入し，ピークトップの分子量をプルランによる分子量更正曲線より読み取って結果を Table II に示した．この場合には，膜は 20 時間後には完全に消失した．キトサン分解物の分子量は 3—7 万であり，緩衝液中でも更に分解が進んでいることを考慮すると，キトサン膜のリゾチーム分解では，数万程度のかなり大きな分子が膜から遊離してくることが示唆された．

キトサン膜からの水溶性化合物の放出

キトサン膜 (DA 66) からの内包物質の放出挙動がキトサン膜の分解によりどのような影響を受けるかを，数種の水溶性化合物を用い，pH 7.4 のリン酸緩衝液中で検討した．

まず，水溶性色素としてトルイジンブルー，メチルオレンジ，クーマシーブリリアントブルー (CBB) をキトサン 100 mg に対して 1 mg 内包させ，放出を調べた．Fig. 5 に示すようにトルイジンブルーやメチルオレンジの場合には，20 分程度で 100% 放出するのに対し，CBB は全く放出しなかった．これは，CBB は一分子中に 2 つの硫酸基を有し，キトサンのアミノ基との強い相互作用を起こしているためと思われる．

次に，キトサン膜からの水溶性色素の放出を，リゾチームの存在下でキトサン膜を分解しながら検討した．キ

NII-Electronic Library Service

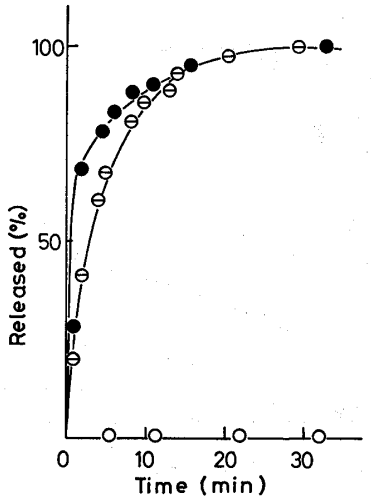

Fig. 5. Release of Loaded Pigments from Chitosan Films

●, Toluidine Blue; ⊖, Methyl Orange; ○, Coomasie Brilliant Blue
The films were prepared with DA66 and the loading of color reagents was 1%. Release was measured at 37°C in 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4).

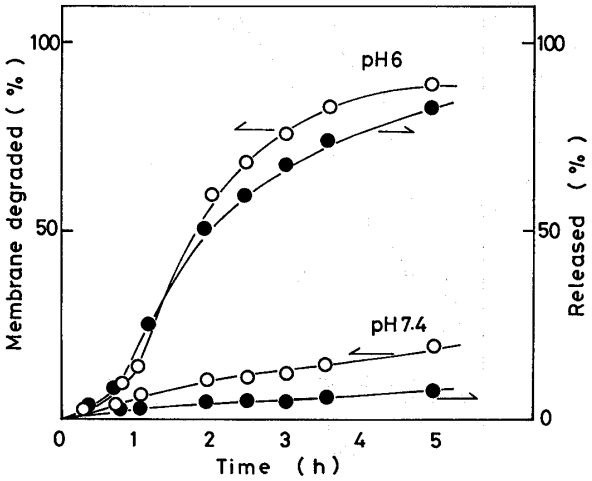

Fig. 6. Release of Coomasie Brilliant Blue from Chitosan Films in the Presence of Lysozyme

○, membrane degraded (%); ●, released (%).
The films were prepared with DA66 and the loading of coomasie brilliant blue was 1%.
Release was measured at 37°C in 0.01 M phosphate buffer (pH 6.0 or pH 7.4).

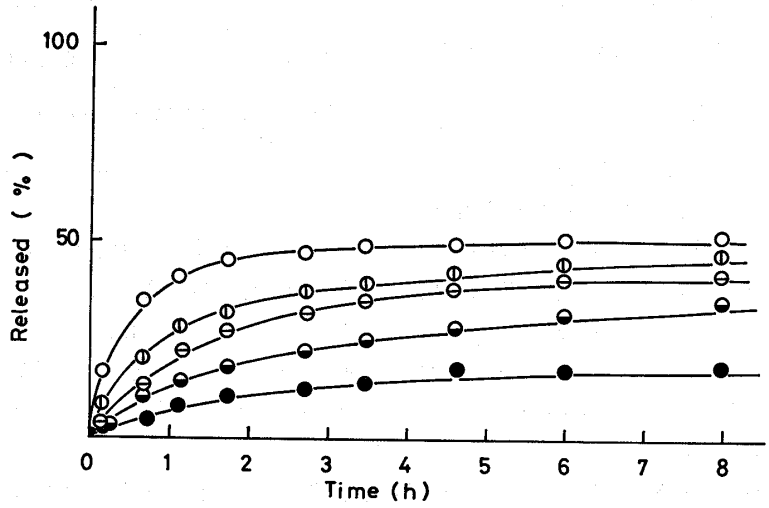

Fig. 7. Release of Pullulan from Chitosan Films

The films were prepared with DA66 and incubated at 37°C in 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4).
Molecular weight (M_w) of pullulan: ●, 38.0×10^4; ◒, 18.6×10^4; ⊖, 10.0×10^4; ◑, 4.8×10^4; ○, 0.58×10^4.

トサン膜をリゾチーム 10 mg を含む緩衝液に浸し，経時的に定量したところ，Fig. 5 で放出の速かったメチルオレンジ，トルイジンブルーではキトサン膜の分解よりも放出の方がはるかに速いために，放出パターンは Fig. 5 とほぼ同様であった．一方，CBB では，Fig. 6 に示すように pH 6，pH 7.4 いずれの条件下でもキトサン膜の分解とほぼ平行して，放出が起こる結果となった．

さらに，分子量の大きなものとして GPC 用の分子量標準物質であるプルランを内包させて同様に放出性を検討した．キトサン 100 mg に 1 mg のプルランを内包させた場合の放出曲線を Fig. 7 に示した．プルランはいずれの分子量でも 3—4 時間以降では放出はみられず，内包量の一部しか放出されなかった．これは，キトサン膜の中心部分へ内包されたプルランは放出しにくいためと考えられた．また，放出量は分子量が大きくなるに従って少なくなり，膜表面の膨潤部分に形成されたキトサンゲルがふるい様の効果を生み出したものと思われる．次に，これらのプルラン内包膜をリゾチームにより分解させた場合の放出性を調べ，結果を Fig. 8 に示した．

NII-Electronic Library Service

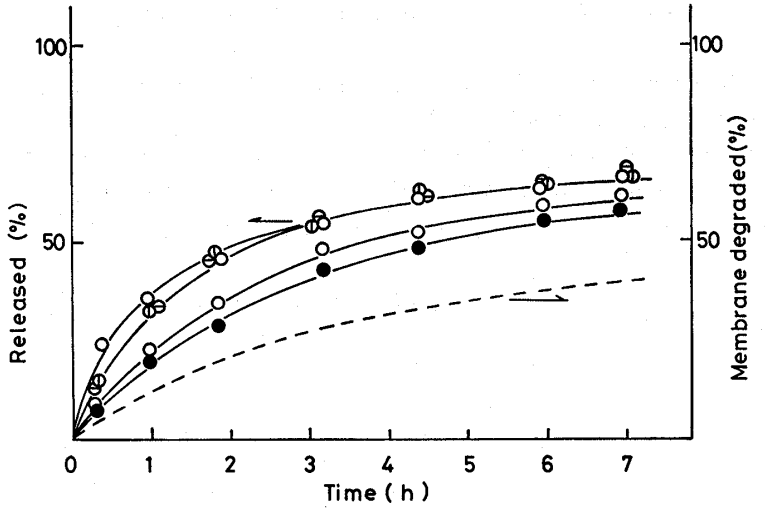

Fig. 8. Release of Pullulan from Chitosan Films in the Presence of Lysozyme

The films were prepared with DA66 and incubated at 37°C in 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4). Symbols are the same as shown in Fig. 7. The broken line indicates the percentage of degradation of the films.

Fig. 8 中には，膜の分解率を点線で示した．Fig. 7 に比べて分子量による放出の差が減少し，Fig. 7 ではごく一部しか放出されなかった高分子量のプルランもキトサン膜の分解が進むにつれて分子量の小さなプルランと同様に放出された．また，高分子量のプルランにおいては，Fig. 8 の放出曲線は Fig. 7 における放出曲線と Fig. 8 の膜の分解曲線（点線）を加算したものとほぼ一致し，リゾチーム非存在下では放出されなかった部分がリゾチーム分解に伴って放出されたものと考えられた．キトサンのような分解性マトリックスの分解速度と内包物質の放出に関しては，アルブミン小球体におけるプロテアーゼ分解の例[13,14]が見られるが，報告は少ない．以上のように，キトサン膜からの水溶性化合物の放出では，キトサンとの相互作用の強い CBB や，分子量の大きいプルランは放出されにくく，いずれの場合もキトサン膜が分解されると，分解率に応じて放出された．さらに，キトサン膜の分解速度が膜を構成するキトサンの脱アセチル化度に依存することを考慮すると，キトサンの脱アセチル化度によって内包物質の放出制御が可能である．

本実験では，*in vitro* における単一酵素系でのキトサンの分解について検討し，キトサンの生体内分解性マトリックスとしての可能性を示した．しかし，実際の生体内には，キトサンの分解に関与する酵素としてはリゾチームのような *endo* 型のものの他に，*β-N*-アセチルグルコサミニダーゼなどの *exo* 型のも存在する．さらに，生体内には多くのコンドロイチン硫酸等のアニオン性の高分子が存在するために，カチオン性のキトサンは徐々に複合体を形成していくものと考えられる．したがって，キトサンの生体内での分解を予測するには，以上のような基礎的な検討に加え，複合酵素系における検討やキトサンの複合体形成時における分解挙動などについての検討が必要であると考えられる．

謝辞　本研究はヒューマンサイエンス振興財団基礎研究委託研究費の援助の基に行われた．

引　用　文　献

1) 本研究は，日本薬学会第 108 年会，1988 年，4 月並びに第 38 回日本薬学会近畿支部大会，1988 年，11 月において発表した．
2) “キチン/キトサンの科学,” フードケミカル-1，食品科学新聞社，1987.
3) 川島嘉明，笠井明宏，製薬工場，**4**，245 (1984).
4) 宮崎正三，粉体と工業，**11**，41 (1986).
5) 大島良夫，西野健一，米倉義雄，前田基彰，堀江順子，野々村京子，岸本三郎，若林俊治，外松茂太郎，熱傷，**12**，3 (1986).
6) K. Amano, E. Ito, *Eur. J. Biochem.*, **85**, 97 (1978).
7) 工藤慶子，西村紳一郎，西　則男，戸倉清一，日本化学会北海道支部例会講演要旨集，1986，p. 91.

NII-Electronic Library Service

8) J. P. Zikkakis (ed.), "Chitin, Chitosan and Related Enzymes," Academic Press, Inc., 1984, pp. 303—325.
9) M. Kanke, H. Katayama, S. Tsuzuki, H. Kuramoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 523 (1989).
10) G. A. Levy, A. Mcallan, *Biochem. J.*, **73**, 127 (1959).
11) 日本生化学会編，"生化学実験講座第 4 巻，糖質の化学 (下)，" 東京化学同人，東京，1976，p. 370.
12) R. C. Davies, A. Neuberger, B. M. Wilson, *Biochim. Biophys. Acta*, **178**, 294 (1969).
13) Y. Morimoto, M. Akimoto, K. Sugibayashi, T. Nadai, Y. Kato, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 3087 (1980).
14) 瀬崎　仁編，"ドラッグデリバリーシステム，新しい投与剤形を中心とした製剤学，" 南江堂，東京，1986，p. 180.

NII-Electronic Library Service