

皮膚組織再生のための薬剤徐放型シルクナノファイバーシートの開発

産学官連携推進担当 寺田堂彦*1 生活工学研究所生産システム課 金丸亮二*2 信州大学 玉田 靖

1. 緒言

皮膚組織の深層欠損を治療するためには、代替表皮層を作るだけではなく、壊死した厚い皮膚組織を再生しなければならない。しかしながら、深くえぐられた組織を再生するためには、細胞の足場となる材料で欠損空間を満たし、組織が再構築されるまでの間、湿潤状態で強度を維持し、かつ、組織再生に伴って消失する材料が必要となる。本研究では、これらの要件を満たす薬剤徐放型創傷被覆剤の開発を目的として、シルクナノファイバーの開発およびその機能制御技術の開発に取り組んだ。

2. 実験方法

2.1 使用材料

シルク精練糸は、独立行政法人農業生物資源研究所(岡谷)高林氏から提供を受けたものを使用した。臭化リチウムは和光純薬工業株式会社から、ポリエチレンオキサイド(PEO, $M_w=900000$ g/mol)、ウシ血清アルブミン(BSA)、ウマ心臓ミオグロビン(Mygb)は、シグマアルドリッチ合同会社より購入した。タンパク質定量キット(BCA protein assay kit, Thermo Scientific)を用いて定量を行った。

2.2 試料作製

精練糸を 9M 臭化リチウム水溶液に溶解した後、透析してシルク水溶液を作製した。8%に濃度調整したシルク水溶液と、5%PEO 水溶液とを体積比で 4 対 1 となるよう混合したものをエレクトロスピンニングの紡糸溶液として用いた¹⁾。エレクトロスピンニングは自作の装置を用いて行った。12 kV の電圧を印加したシリンジニードル(22G)から紡糸溶液を 18.2 ml/min で吐出し、ニードル先端から 150 mm の位置に設置した接地コレクター上に繊維を捕集した。1%に濃度調整したシルク水溶液を用いてガラス基板上にスピコートフィルム(1st step, 1500 rpm for 5 s; 2nd step, 3000 rpm for 30 s)を作製し、表面分析に供した。紡糸溶液とほぼ同じ組成の溶液中に、20 mg/ml となるように BSA、Mygb をそれぞれ溶解してキャストフィルムを作製し、タンパク質徐放性試験に供した。いずれの試料も作製後はデシケータに保管した。

2.2 試験および測定方法

作製した試料に対して、種々の濃度(70, 80, 90v%)の

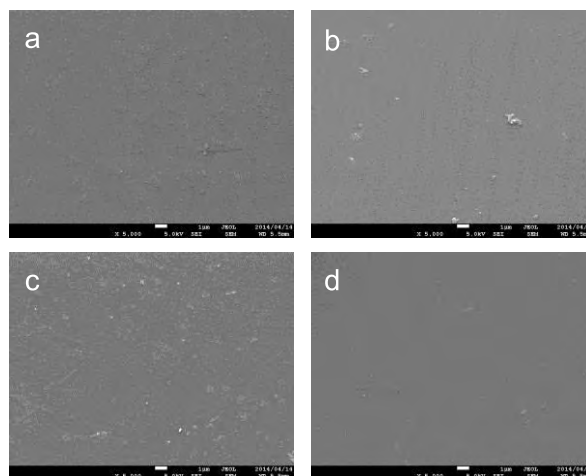


Fig.1 FE-SEM images of spin-coated silk films. a, non-treated; b, treated with 70% EtOH; c, 80%; d, 90%. scale bar = 1 μ m.

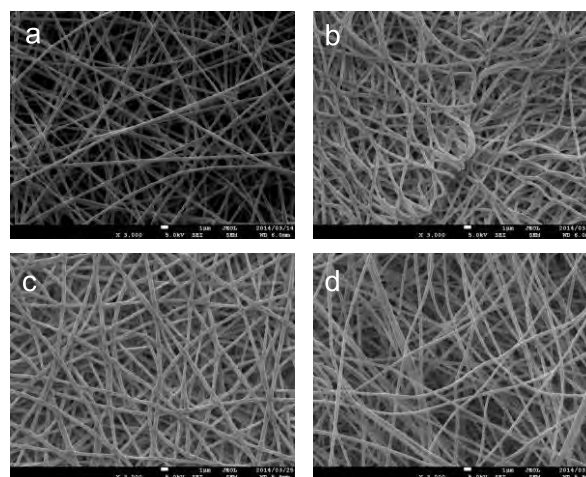


Fig.2 FE-SEM images of electrospun silk fibers. a, as-spun; b, treated with 70% EtOH; c, 80%; d, 90%. scale bar = 1 μ m.

エタノール(EtOH)水溶液を用いて処理を施した(25°C, 24h)。EtOH 処理後、純水で十分に洗浄し、後の操作あるいは測定に用いるまでの間、水中に保存した。電界放出型走査型電子顕微鏡(FE-SEM, JSM7001FTTSL, JEOL)観察には、液体窒素で凍結した後、凍結乾燥器で乾燥した試料を用いた。スピコート試料に対して、走査型プローブ顕微鏡(SPM, Dimension Icon, Bruker AXS)による水中観察を行った。キャストフィルムからディスク状試料($\phi 5$ mm)を切り出し、EtOH 処理(70v%, 90v%)を施した後、純水洗浄し、37°C の PBS 中に浸漬して徐放タンパク質の測定を行った。

*1 現 材料技術課

3. 実験結果および考察

図 1、2 にそれぞれ EtOH 処理後のスピコートフィルムとナノファイバーの FE-SEM 観察の結果を示す。スピコートフィルムでは EtOH 処理による影響がほとんど見受けられなかった。一方、ナノファイバーでは EtOH 濃度によって繊維外観に若干の変化が認められた。このときの繊維径の変化を表 1 に示す。EtOH 濃度の低下に伴って繊維径は増加する傾向を示した。

Table 1 Change in average diameters of electrospun silk fibers by ethanol solution treatment.

EtOH conc., v%	ave. dia., nm	max. dia., nm	min. dia., nm	std. div., nm
as-spun	388	488	310	40
70	448	530	390	36
80	471	640	320	66
90	381	440	320	34

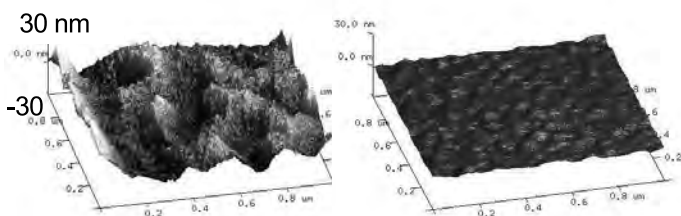


Fig.3 Underwater SPM images of the spin-coated silk film. left, 70% EtOH treated; right, 90% EtOH treated.

図 3 に、EtOH (70v%, 90v%) 処理を施したスピコート試料の水中 SPM 観察の結果を示す。70v%処理試料は、90v%処理試料よりも大きな表面凹凸を有していることが確認された。

図 4 に、タンパク質徐放試験の結果を示す。Day 1 の時点においては、Mygb の放出量は BSA のそれよりも多かった。Mygb (Mw=17800) の分子量は BSA (Mw=66000) よりも小さく、従って、慣性半径が小さい ($R_g^{Mygb}=2 \text{ nm}$, $R_g^{BSA}=5 \text{ nm}$) ために、シルク内か

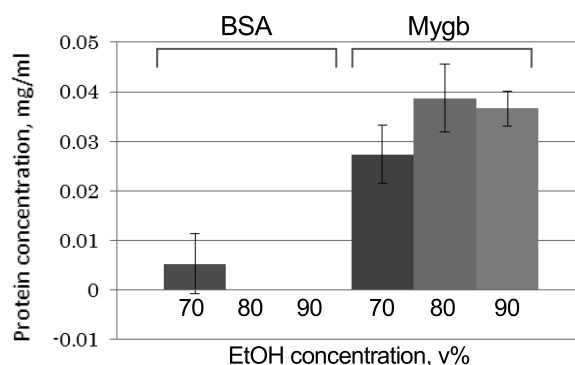


Fig. 4 Protein concentration of the media (PBS) at day 1 of the protein releasing test.

らの初期放出速度が高かったと推察される。80v%、90v%EtOH 処理試料からは、Day 1 における BSA 放出はほとんど認められず、70v%処理試料からはわずかに認められた。

EtOH 水溶液の濃度は、シルク試料の表面性状に影響を及ぼすことがわかった。EtOH 濃度の低下に伴い、繊維径は増大 (FE-SEM) し、また、最表面は膨潤 (SPM) した。これらは、非晶性シルクが EtOH 処理によって結晶化する際、非晶領域に含浸する水分子の数が非晶状態のシルク分子鎖の運動性に影響したためと考えられる。

4. 結 言

エレクトロスピンニング法によって紡糸したシルクナノファイバーの表面性状が、EtOH 処理条件によって変化することを見出した。今後、含有薬剤の放出プロファイルの制御や、シルクナノファイバー自体の分解速度への影響について検討を進める予定である。

参考文献

1)DL Kaplan:Biomacromolecules, 3(2002)1233-9

キーワード：シルク、ナノファイバー、エレクトロスピンニング

Development of silk nanofiber sheets for regenerative medicine of dermal tissues

Planning & Information Section; Dohiko TERADA*¹, Product Technology Section; Ryoji KANAMARU, and Shinsyu University; Yasushi TAMADA

Toward a material used for regenerative medicine, we studied electrospun silk nanofibers capable of releasing drugs. The results demonstrated that properties of electrospun silk nanofibers were affected by the post-treatment with ethanol solutions.