

論文の内容の要旨

論文題目 アルギン酸ゲル皮膜マイクロカプセルの作製とそのバイオプロセスへの応用に関する研究

氏名 古山 桂太郎

(本文)

本論文は、ポリエチレングリコールを用いたアルギン酸カルシウムゲル皮膜液芯マイクロカプセルの作製方法とそのバイオプロセスへの応用に関する研究について述べたものであり、酵素や生薬などの生理活性物質の生産や合成を行うバイオプロセスにおいて重要な要素をなす生体触媒の固定化技術の新たな展開を目指したものである。以下に内容を要約する。

1. 研究の背景

生体触媒を固定化することにより、生体触媒の再利用化、安定化、触媒反応の連続化が可能となり、分離プロセスの簡略化にもつながるため、長年にわたり固定化技術の研究が続けられてきた。各種の固定化担体の中でも、カルシウムなどの多価カチオンを介して **cross-link** することで形成するアルギン酸ゲルは、温和な条件下の容易な手法で固定化が可能であり、それ自体が生体に対して無毒であるために、生体触媒、特に細胞の固定化において幅広く用いられてきた。近年、このアルギン酸などを皮膜ポリマーとして利用した親水的環境下におけるカプセルの作製法の開発が進められ、主に二つの方法が考案された。一つは、生体触媒を包括したゲルビーズの周りをポリマーで皮膜し、その後、芯のゲルを溶解させる二段階法であり、もう一つは、生体触媒を含む高粘性液滴を攪拌ポリマー溶液に直接滴下し、ゲル皮膜を形成させる一段階法である。いずれの方法も、カプセルの芯は液体となり、包括された生体触媒は液中に浮かぶ形で存在することになるので、ゲル格子の中に包括する格子型にはない利点が得られる。しかし、両者共に核液中に、溶解させたゲルや増粘剤が残存するため、核液が高粘性となり、物質移動が抑制されていることが問題であった。

本論文は、このカプセル作製の際の増粘剤としてポリエチレングリコール(PEG)を新たに利用したことが特徴である。比較的低分子のPEGを含んだCaCl₂溶液をアルギン酸ナトリウム溶液に滴下し、その後、PEGを漏出させることによって、アルギン酸ゲルを皮膜とする液芯マイクロカプセルを作成する方法を開発した。次に、このPEGを利用したアルギン酸ゲル皮膜液芯マイクロカプセル(Alg(PEG)カプセル)について、作製時の諸条件がゲル皮膜形成へ及ぼす影響、Alg(PEG)カプセル内の物質移動特性の評価、Alg(PEG)カプセルによる増殖細胞の固定化および培養、静電アトマイザーを利用したAlg(PEG)カプセル縮小化の検討を行い、実際のバイオプロセス設計への指針を提示した。

2. PEGを利用したアルギン酸ゲル皮膜液芯マイクロカプセルの作製とPEG漏出挙動

アルギン酸ナトリウム溶液をCaCl₂溶液に滴下する通常のアルギン酸ゲルビーズの作成法とは逆に、攪拌しているアルギン酸ナトリウム溶液にCaCl₂溶液を滴下し、液滴の周囲にアルギン酸ゲルの皮膜を形成させ、続いて外側からもCaCl₂でアルギン酸ゲル皮膜を強化することで、アルギン酸ゲル皮膜液芯マイクロカプセルを作製した。その際に、攪拌によってCaCl₂液滴が変形あるいは分裂しないための増粘剤として、本論文ではPEGを加えることを考案した。他の増粘剤としては、PEGよりも高分子であるデキストランやカルボキシメチルセルロースを利用した報告例があるが、このような増粘剤は極めて高分子であるため形成されたアルギン酸ゲル皮膜を透過することが

出来ず、核液が高粘性の状態となり、物質移動の抑制をもたらすと考えられる。また、増粘剤の残存に関する研究もなかった。そこで、本論文において提案したように、比較的分子量が低い PEG を増粘剤として用いると、形成後に PEG がアルギン酸ゲル皮膜を透過してカプセル外に漏出していき、従来の方法に比べて核液の粘性を低く抑えられることが期待される。核液に粘度が低下することにより、液芯自体の流動が可能になり、物質移動性能が向上するものと考えられる。

図1 アルギン酸ゲル皮膜液芯マイクロカプセルの作製法のスキーム図

次に、平均分子量が異なった PEG を用いて作製した Alg(PEG)カプセルにおける、カプセル内部からの PEG の漏出挙動を測定した。その結果、平均分子量 2000 の PEG は短時間で漏出し終わるが、分子量が増加するに従ってゲル皮膜による物質移動抑制が顕著になり、平均分子量 20000 の PEG では漏出が極端に抑制された。一方、カプセル作製の際に増粘剤として広く用いられている xanthan gum(平均分子量 240 万程度)を用いたアルギン酸皮膜カプセルからは、xanthan gum の漏出はほとんど観測されなかった。以上より、比較的分子量が小さい PEG を用いることで、核液が低粘度であるアルギン酸皮膜カプセルの調製が可能であることが示された。

図2 PEG の Alg(PEG)カプセルからの漏出挙動

3. アルギン酸ゲル皮膜形成挙動の検証

作製時の諸条件がゲル皮膜形成へ及ぼす影響について検討した。例えば、濃度 30% (w/w) の PEG (平均分子量 7500) に CaCl_2 を 2% (w/w) 溶解させ、22G (外径 0.7 mm) のノズルを通して、攪拌している 1.92% (w/v) のアルギン酸ナトリウム溶液に滴下すると、直径 4.5 mm 程度の Alg(PEG)カプセルが形成された。ゲル形成時間が 15、30、60 分で、それぞれ皮膜の平均厚さが 99、149、327 μm となり、皮膜の厚さとゲル形成時間はおおよそ正比例していることがわかった。また、10 分程度のゲル形成時間でも十分な強度を備えた、実用に耐えうる極めて膜が薄いアルギン酸皮膜カプセルを得ることが可能であった。

図3 PEG の Alg(PEG)カプセルのアルギン酸ゲル皮膜厚への皮膜形成時間の影響

続いて、様々な条件下でのゲル皮膜形成挙動を、含有 Ca イオン 1 mg あたりから形成されたゲル皮膜の体積を指標として測定した。その結果、アルギン酸ナトリウム濃度、PEG の分子量や濃度、 CaCl_2 濃度、攪拌速度などが皮膜形成に関与することが明らかとなり、皮膜の厚さに影響を与える操作条件を提示することが出来た。種々のバイオプロセスにおいて、Alg(PEG)カプセルへの基質の流入あるいはカプセルからの生産物の放出は、ゲル皮膜中の透過速度が律速となる可能性が高く、皮膜厚を制御する知見が得られたことは、極めて有益であると考えられる。

4. Alg(PEG)カプセルの物質移動特性の評価

カプセルの核液が低粘性である Alg(PEG)カプセルの物質移動特性を調べるために、カプセル内へのグルコースの移動挙動を見かけ上の有効拡散係数 D_e を指標として評価した。

その結果、Alg(PEG)カプセル内へ移動するグルコースの有効拡散係数の値は、水中での拡散係数値と比較して、見かけ上 20%程度上昇した。この理由としては、PEG の漏出により低粘性となった核液の流動による影響が考えられる。また細胞を含有させた場合においても、Alg(PEG)カプセルにおいては有効拡散係数の値が上昇する傾向が観察された。以上の結果から、他の固定化技術と比較して、Alg(PEG)カプセルを生体触媒の反応の場として利用することは極めて有益であり、特に whole cell enzyme の固定化においては、物質移動が損なわれない点において非常に優れていると考えられる。

5. Alg(PEG)カプセルによる増殖細胞の固定化および培養

Alg(PEG)カプセルを用いて、yeast 細胞の固定化および培養を行い、アルギン酸ゲルビーズを用いて固定した場合と比較を行った。その結果、アルギン酸ゲルビーズにおいては、細胞がビーズの周縁部で増殖し、培養の進行とともにビーズ自体の直径が増大していった。最終的には、ビーズの周縁部は細胞を大量に含み、脆くなった結果、ゲルが細胞ごと剥がれ落ち、保持細胞量が減少し、細胞の培地中への漏出量も甚大であった。一方、Alg(PEG)カプセルを用いた場合には、芯が液体であることにより、内側にも自由に細胞を蓄積していくことが出来たために、担体の膨張を抑えて、細胞の漏出なしに培養を続けることが可能となり、高密度培養が可能となった。この長所も、whole cell enzyme の固定化における反応速度向上に大きく貢献できると考えられる。

6. 静電アトマイザーを利用した Alg(PEG)カプセル縮小化の検討

固定化担体の物質移動の向上には、担体自体の大きさを小さくすることが、非常に有効である。そこで、高電圧を利用した静電アトマイザー法で、Alg(PEG)カプセルの縮小化を試みた。その結果、アルギン酸溶液と太さ 27G (外径 0.4 mm) のノズルの間に、5000 V の電圧を印加することで、直径 680 μ m、皮膜の厚さ 110 μ m の Alg(PEG)カプセルを作成することに成功した。

7. まとめ

本研究において、PEG を利用して作製したアルギン酸皮膜液芯マイクロカプセルの開発に関する検討を行い、1)核液の低粘性化、2)皮膜形成挙動の解明、3) 他の固定化担体より優れた物質移動の達成、4)マイクロカプセルへの細胞の高密度保持、5)静電アトマイザーを利用したアルギン酸皮膜液芯マイクロカプセルの縮小化などの結果を得た。これらの成果は、マイクロカプセル固定化生体触媒における物質移動特性を理解する上で、極めて有用な知見を与えるばかりでなく、本法を利用したバイオプロセスの実現に資するものと考えられる。