

# 若手研究者助成金 実績報告書

令和 5年 5月 2日

日本大学学長 殿

氏 名： 星 徹

所属・資格： 理工学部・准教授

実施研究所：

下記のとおり報告いたします。

## 1 研究課題

和文表記 (40 字以内)

中空球状ナタデココによる陽イオン交換樹脂のカプセル化とカリウムイオン吸着能評価

英文表記

Encapsulation of cation exchange resins in hollow-type spherical Nata de coco and its evaluation of K<sup>+</sup> adsorption

## 2 研究期間

令和 4 年度

※令和 年度 ～ 令和 年度 (※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること)

## 3 研究目的

本研究では高カリウム血症を対象とした飲みこみやすく、消化管内壁に吸着しない新規経口吸着剤の開発を目指す。申請者が開発した『セルロースゲル膜によるカプセル化技術』により、血清カリウム抑制剤に用いられる陽イオン交換樹脂 (CER) をカプセル化した CER 内包中空球状ナタデココの調製を行う。さらに、CER 内包中空球状ナタデココの消化管環境における *in vitro* での安定性やカリウムイオンの吸着特性の評価を行う。

採択された科研費の研究課題では、尿毒症用の経口吸着剤を目標として、中空球状ナタデココに内包した吸着炭にインドキシル硫酸などの尿毒症毒素の吸着を評価している。尿毒症毒素は紫外可視分光計を用いた UV 吸収により定量が可能である。本研究では、イオンクロマトグラフィーを用いて、UV 吸収では定量が難しいイオン成分の吸着挙動を評価する。測定対象により最適な測定装置を選ぶことで、様々な症状に対応した経口吸着剤の評価が可能であり、本研究は新しい経口吸着剤の開発に大きく寄与するものと考えられる。

本研究と科研費課題を通して、様々な症状に対応する吸着剤内包中空球状ナタデココの調製と吸着特性の評価法を確立することで、新たな複合型経口吸着剤を提案することを目的とする。

#### 4 研究概要

慢性腎臓病 (CKD) の患者は、腎機能の低下に伴い、体内の老廃物の十分な排泄が行われないため、高カリウム血症や尿毒症などの合併症が発現することで、心血管疾患、入院、死亡の危険性が高いことが知られている。高カリウム血症では、カリメート®、パチロマー®、ロケルマ®などのカリウム吸着剤が、尿毒症では AST120 (クレメジン®) に代表される球形吸着炭が経口吸着剤として、CKD 患者の腎機能低下を抑制するために広く用いられている。これらの経口吸着炭は消化管内で対象物質を吸着し便と共に体外に排出することで、合併症症状の改善による透析導入の遅延効果が認められている。CKD 患者は水分の摂取量が制限されることが多く、少量の水で経口吸着薬を嚥下するため、口内への残留感、飲みこみにくさが課題である。また、経口吸着薬の消化管内壁への吸着は、便秘症状などの軽度の副作用から腸閉塞、腸穿孔といった重度の副作用による死亡例が報告されている。

経口吸着剤を服薬補助ゼリーと一緒に飲みこむなど、口内、喉、食道での不快感を抑えて飲みこみやすい嚥下法が推奨されている。その一方で、副作用の原因となる経口吸着剤と消化管内壁との接触による吸着の抑制については、アガロースゲルやアルギン酸ゲルなどの含水ゲルに経口吸着薬を内包させる方法が検討されているが、報告例が非常に少ないのが現状である。水で膨潤した高分子ゲルに経口吸着剤を内包させることで、飲みこみやすさの向上と消化管内壁への吸着の抑制が期待される。

高分子ゲルに必要とされる機能は、第1に毒性がないことである。第2に、内包した活性炭が漏出しないように、消化管内環境で安定した素材で吸着炭を内包することである。消化管内は部位により pH が大きく変化するため、用いる高分子ゲルには広い pH 領域で安定であり、水に溶解しないことが必要である。また、様々な消化酵素に分解されないことも必要とされる。第3に、消化管のぜん動運動によって破損しない程度の強度を有することが求められる。これらの機能を持つ高分子ゲルとして、無毒かつ酸、塩基で分解しにくいナタデココに着目した。ナタデココは酢酸菌が産生するセルロースナノファイバーから成る無毒かつ消化管内環境では分解しない保水性に優れた高強度のヒドロゲルである。経口吸着剤を中空かつ球状のナタデココでカプセル化することで、飲みこみやすく、消化管内壁と経口吸着薬を接触させない複合型経口吸着剤の開発が期待される。

本研究では、高カリウム血症の改善のために、消化管内でのカリウムイオン ( $K^+$ ) 吸着を目的とした陽イオン交換樹脂 (CER) 内包中空球状ナタデココを調製し、*in vitro* 環境中での安定性やカリウム吸着能の評価を行った。調製した CER 内包中空球状ナタデココは、消化管内の環境、具体的には模擬胃液および模擬腸液中で CER の漏出がなく、安定した CER のカプセル化を達成した。 $K^+$ の吸着はイオンクロマトグラフィーと Chlorophosphonazo-III を用いた 2 通りの定量法により評価を行ったところ、内包した CER は未内包の CER 粉末と同等の吸着能を示した。

以上より、CER の  $K^+$ の吸着能を有したまま中空球状ナタデココへのカプセル化は、中空球状を形成しているセルロースゲル膜がバリア層として働き、CER と消化管内壁が接触しないため、CER の消化管内壁への吸着が原因とされる重篤な副作用が起こらないことが期待される。

## 5 研究結果

### ① CER 内包中空球状ナタデココの調製

CER 内包中空球状ナタデココは、以下の方法で調製した。CER 内包円柱状寒天ゲル（直径 2.2 mm，高さ 2.5 mm）を，酢酸菌を植菌した培養液に浸漬後，96 ウェルプレートの各ウェルのシリコンオイル中に沈めて 30 °Cで所定日数培養を行い，寒天ゲル表面にナタデココを産生させた。ナタデココが産生した後，得られたゲルを熱水中での攪拌により，内部の寒天を溶解除去することで，CER 内包中空球状ナタデココを得た (Fig.1 (a))。CER の内包量は寒天水溶液に添加する CER 量で制御でき，30 wt% の CER を含む寒天水溶液で調製した寒天ゲルを用いると，中空球状ナタデココ 1 個あたり 4.19 mg の CER を内包させることが可能であった。

しかしながら，円柱状寒天ゲルを用いることで円柱の角部分に薄膜状ナタデココが産生するため，寒天溶解除去やイオン交換などの操作時に強度の低い薄膜部分が裂け，CER の漏出を多数確認した (Fig.1 (b))。そのため，調製方法の見直しを行い，CER 内包円柱状寒天ゲルを球状に成形し，CER 内包球状寒天ゲルを用いることで，薄膜部を生じさせずにナタデココによるカプセル化を試みた。直径 1.37 mm，高さ 1.5 mm の CER 含有円柱状寒天ゲルを PTFE 製 96 ウェルプレートのシリコンオイルを満たした各ウェルに浸漬させた後，120 °Cで加熱することで，CER 内包球状寒天ゲル調製に成功した。

得られた CER 含有球状寒天ゲルを用いて，前述と同様の操作でナタデココによるカプセル化を行ったところ，小径かつ薄膜部がなく CER が漏出しにくい CER 内包中空球状ナタデココの調製に成功した (Fig.1 (c))。また，球状成型時に寒天ゲルに含まれる水が揮発することで，円柱状から球状になる過程での体積収縮により小径化が起こり，1 個あたりの CER 内包量が増加した。得られた小径かつ内包量が多い CER 内包中空球状ナタデココは，より飲みやすく，1 回あたりの投与量の低減が期待される。

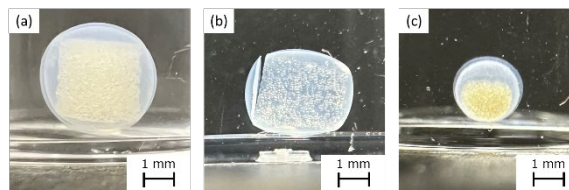


Fig.1 Photographs of CER-encapsulated hollow spherical Nata de coco. (a) prepared using cylindrical agarose gel ( $\phi$  2.2 mm, height 2.5 mm), (b) Nata de coco gel membrane ruptured and CER leaked out, and (c) prepared using spherical agarose gel (diameter 1.85 mm)

Table 1. Comparison of the size and CER content of CER-encapsulated hollow spherical Nata de coco prepared using agarose gels of different shapes.

Shape of agarose gel used for encapsulation	Diameter (mm)	Volume (mm <sup>3</sup> )	Encapsulated CER (mg)	Amount of CER per volume ( $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ )
Cylindrical : $\phi$ 2.2 mm, height 2.5 mm	3.75	27.61	4.19	151
Spherical : diameter 1.85 mm	1.70	2.57	0.61	237

### ② CER 内包中空球状ナタデココの *in vitro* 環境中での安定性

球状寒天ゲルを用いて調製した CER 内包中空球状ナタデココの消化管内 pH での安定性評価を次のように行った。経口投与し消化管を通過し排泄するまでにかかるおおよその時間を 48 時間とし，崩壊試験液第 1 液（模擬胃液，pH 1.2）または崩壊試験液第 2 液（模擬腸液，pH 6.8）に CER 内包中空球状ナタデココを浸漬し，内部の CER の漏出の有無を調査した。比較として，純水および強塩基条件（pH 12.6）での安定性も評価した。どの条件においても内部 CER の漏出は確認されなかった。CER を内包した場合と同様に，漏出の有無がわかりやすい活性炭を内包した中空球状ナタデココにおいても漏出は認められなかった。ナタデココを形成しているバクテリアセルロースナノファイバーは，優れた酸および塩基耐性を有し，広い pH 領域で加水分解

などされないため、様々な吸着剤を漏出させずにカプセル化することに成功した。

### ③ CER 内包中空球状ナタデココの K<sup>+</sup>吸着能の評価

市販のカリウム吸着剤であるカリメート®を参考に、内包 CER を Ca<sup>2+</sup>型に置換した試料を用いて K<sup>+</sup>の吸着実験を行った。Ca<sup>2+</sup>型 CER は K<sup>+</sup>が存在すると、CER のスルホン酸に配位している Ca<sup>2+</sup>と K<sup>+</sup>がイオン交換することで、K<sup>+</sup>を吸着し Ca<sup>2+</sup>を放出する。放出された Ca<sup>2+</sup>は Chlorophosphonazo-III とのキレート錯体を形成後、690 nm の吸光度を用いて定量を行った。Ca<sup>2+</sup>の放出量は K<sup>+</sup>濃度に依存するため、濃度依存性が消失する最小の濃度 100 mg/mL KCl 水溶液を用いた。100 mg/mL KCl 水溶液 (K<sup>+</sup>濃度 52.4 mg/mL) 中での Ca<sup>2+</sup>の放出は、CER の内包量に依存せず、約 50 分程度で平衡に達した。CER 粉末では、KCl 水溶液に添加後 1 分ほどで Ca<sup>2+</sup>濃度は平衡に達した。これは CER をカプセル化したことで、中空球状ナタデココの内部への K<sup>+</sup>の拡散がイオン交換の律速となるためと考えられる。CER 内包量 1.40 mg × 5 個 (Fig.3 (c)) の平衡に達した時の Ca<sup>2+</sup>濃度は 1.35 μmol/mL、同量の CER 粉末は 1.32 μmol/mL と同程度になったことから、カプセル化による吸着能の低下は確認されなかった。

KCl 濃度 100 mg/mL は、生体内環境中の濃度と比較して非常に濃く、現実的ではない。また、Ca<sup>2+</sup>の定量のため、K<sup>+</sup>の濃度変化を追跡することが出来ていないため、イオンクロマトグラフィーを用いて、K<sup>+</sup>濃度 5.0 mg/mL (5000 ppm)、溶剂量 2.0 mL 中での CER 内包中空球状ナタデココ (CER 内包量 4.19 mg × 5 個) の吸着能の評価を行った。この吸着条件の K<sup>+</sup>の総量は、高カリウム血症改善剤 (ロケルマ®) の評価で使用されている量とほぼ等しい値である。室温下 24 時間吸着後の水溶液のクロマトグラムでは、良好に Ca<sup>2+</sup>と K<sup>+</sup>のピークが分離されており、検量線の R<sup>2</sup> 値はどちらも 0.9997 以上であり、精度よく定量することが可能であった。また、Chlorophosphonazo-III を用いて定量した Ca<sup>2+</sup>放出量とイオンクロマトグラフィーで定量した値は、ほぼ同等の値であった。

CER 粉末との比較において、CER 1.0 g あたりの K<sup>+</sup>の吸着量はほぼ等しい値であり、低濃度の K<sup>+</sup>の吸着においても、カプセル化工程による吸着能の低下は確認されなかった。また、1 個の Ca<sup>2+</sup>は 2 個の K<sup>+</sup>とイオン交換するため、吸着した K<sup>+</sup>と放出した Ca<sup>2+</sup>の mol 比 (K<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>) の理論値は 2.0 であり、実測値も理論値に近い値であった。このことは、K<sup>+</sup>とのイオン交換によって、Ca<sup>2+</sup>は放出されていることを支持している。

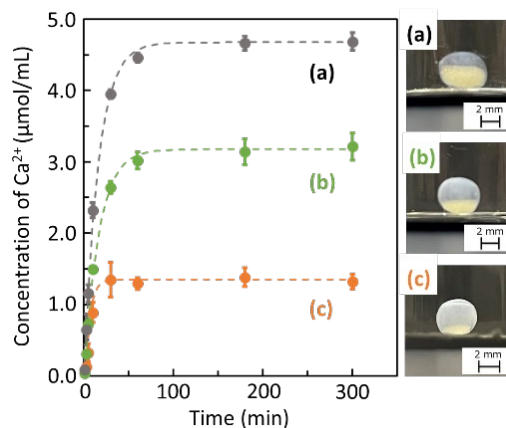


Fig.2 Calcium release behavior of CER-encapsulated HSBC gels (5 pieces) upon potassium adsorption (n=3). Encapsulated amount of CER : (a) 4.19 mg, (b) 2.79 mg, (c) 1.40 mg

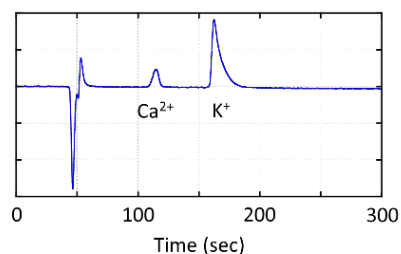


Fig.3 Chromatogram of aqueous solution after potassium adsorption.

Table 2. Comparison K<sup>+</sup> adsorption ability of CER-encapsulated hollow spherical Nata de coco and CER powder.

Sample	Amount of adsorbed K <sup>+</sup> (mmol/g-CER)	K <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> ratio
CER-encapsulated hollow spherical Nata de coco	1.93	2.25
CER powder	1.88	2.18

- 6 将来獲得を目指す学内外の競争的資金の種類 (※研究計画書に記載したものを記入すること)  
 文部科学省 科学研究費助成事業 基盤研究 (A), 基盤研究 (B),  
 厚生労働省 厚生労働科学研究費補助金 腎疾患政策研究事業など

7 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況

氏名	申請年度	研究種目	研究課題	採・否
なし				

8 学会発表等

要旨集の抜き刷り、発表原稿のコピー等及び発表したことがわかるものを添付してください。

発表者名	学会、発表会名等	発表テーマ	発表年月
平井あや 丸山高史 阿部雅紀 青柳隆夫 星 徹	第 65 回 日本腎臓学会 学術総会	尿毒症改善を目的としたセルロースナノファイバーシームレスカプセルによる活性炭の封入と吸着能評価	2022 年 6 月 10 日
高野弦貴 星 徹 青柳隆夫	第 71 回 高分子討論会	陽イオン交換樹脂内包中空球状バクテリアセルロースゲルの調製とカリウム吸着能評価	2022 年 9 月 7 日
佐藤海斗 星 徹 青柳隆夫	第 71 回 高分子討論会	尿毒症の症状改善を目的とした小径の中空球状バクテリアセルロースゲルによる活性炭粒子のカプセル化	2022 年 9 月 7 日
高野弦貴 星 徹 青柳隆夫	第 66 回 日本大学理工学部 学術講演会	陽イオン交換樹脂内包中空球状バクテリアセルロースゲルの調製とカリウム吸着能評価	2022 年 12 月 1 日
佐藤海斗 星 徹 青柳隆夫	第 66 回 日本大学理工学部 学術講演会	尿毒症の症状改善を目的とした小径の中空球状バクテリアセルロースゲルによる活性炭粒子のカプセル化	2022 年 12 月 1 日
星 徹	新技術説明会	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	2022 年 12 月 20 日

9 著書・雑誌論文

著書、雑誌、抜き刷り等を添付してください。コピーの場合は掲載されたことが客観的にわかるものを添付してください。

著者・執筆者	著書名・雑誌名／論文名	巻・号	年月	出版社・発行所
なし				

10 本研究課題に関するその他の発表 (新聞, 一般雑誌掲載等)

なし

### 1 1 他の研究への発展

本研究で確立した小径かつ薄膜部がない CER 内包中空球状ナタデココの調製法は、CER 以外の吸着剤（活性炭、ゼオライトなど）にも適用することが可能であり、活性炭、ゼオライトのカプセル化に成功している。活性炭は尿毒症原因物質の除去、ゼオライトは高カリウム血症、高血糖、高脂血症の原因物質の除去に用いられており、本研究成果と合わせることで、様々な症例に適した経口吸着剤への応用を検討中である。

また、本手法は寒天ゲルの表面にナタデココを産生させることでカプセル化を行っている。寒天ゲルの代わりに機能性高分子ゲルをカプセル化することに成功している。機能性高分子ゲルには、温度応答性や pH 応答性ゲルを用いることで、任意の刺激に対して薬剤の放出制御が可能なドラッグリザーバーとしての応用も検討を進めている。

### 1 2 その他の成果

### 1 3 本研究課題による発明届の提出及び知的財産権の出願・取得状況

名 称	知的財産の種類	発 明 者 (考案者・創作者)	権 利 者	出願・登録番号	出願年月日	取得年月日
な し						

※ホームページ等での公開（可・否）いずれかをチェックしてください。  
否の場合は、理由書を別途添付のこと。