

## 論文

# 抗菌剤の溶出性が低い創傷被覆材をポリビニルアルコールの静電的性質を利用して簡易に作製する技術の開発

柚木 俊二<sup>\*1)</sup>      光田 益士<sup>\*2)</sup>      大藪 淑美<sup>\*1)</sup>      関口 正之<sup>\*1)</sup>  
久保 貴史<sup>\*2)</sup>      岩寄 徹治<sup>\*2)</sup>

## A simple fabrication of wound dressings with suppressed release of antibacterial agents using electrostatic properties of poly(vinyl alcohol)

Shunji Yunoki<sup>\*1)</sup>, Masushi Kohta<sup>\*2)</sup>, Yoshimi Ohyabu<sup>\*1)</sup>, Masayuki Sekiguchi<sup>\*1)</sup>,  
Takabumi Kubo<sup>\*2)</sup>, Tetsuji Iwasaki<sup>\*2)</sup>

Hydrogel wound dressings with suppressed release of antibacterial agents are fabricated by chemical reactions or syntheses for attaching or incorporating antibacterial moieties into polymer backbones. However, such polymeric systems often fail to satisfy one of the basic requirements for wound dressings, such as easy and inexpensive synthesis. It is speculated that a positively charged organic antibacterial agent is attracted to polar groups of polyvinyl alcohol (PVA) hydrogels and shows suppressed release. PVA hydrogels containing cetylpyridinium chloride (CPC) are prepared by gamma irradiation. CPC is barely released from the hydrogels, probably due to electrostatic interactions, and is stable upon gamma irradiation. The suppressed release of CPC confers antibacterial activity against *Escherichia coli* on the surface of hydrogels, while no inhibition zone is observed around the hydrogels. CPC-containing PVA hydrogels are easy to prepare and contain known and safe materials. The simplicity and safety of the procedure for achieving suppressed release of antibacterial agents are advantages of CPC-containing PVA hydrogels.

キーワード：吸着, 医療応用, ハイドロゲル, 創傷被覆材, ガンマ線架橋

Keywords : Adsorption, Biomedical applications, Hydrogel, Wound dressing, Gamma crosslinking

### 1. はじめに

皮膚の再生にとって湿潤環境が有効であることは既に常識となり<sup>(1)</sup>, 創傷部に湿潤環境を付与するために創傷被覆材 (wound dressing) が利用されている<sup>(2)</sup>。種々の形態の創傷被覆材が開発され臨床応用されているが, 中でも架橋ポリマーから得られるハイドロゲルは, 創傷郭清 (デブリードマン) 機能, 滲出液の吸収能, 及び感染予防などの特性を有するため<sup>(3)</sup>, 特に注目されている。

外科的創傷と慢性創傷の両方において菌の感染はほぼ不可避免であるため<sup>(4)</sup>, 抗菌剤を含有させてハイドロゲルの感染予防機能を更に高めた創傷被覆材の開発が進められている。しかし, 単にハイドロゲルに抗菌剤を混合すると, 物理的な拡散効果<sup>(5)</sup>によって抗菌剤は早期に溶出する<sup>(6)</sup>。その結果, 菌に対してのみならず, 生体組織の細胞に対しても抗菌剤が許容量を超えて作用し, 組織障害を惹起する恐れがある。適度かつ持続的な抗菌活性と生体安全性を両立す

るためには, 抗菌剤の溶出を抑制する技術が必須である。

抗菌剤の溶出を抑制するための有望な方法として, ハイドロゲルのポリマー主鎖に抗菌剤を側鎖として導入する方法が研究されてきた<sup>(7)</sup>。例えば, 抗菌性を持つビグアニド化合物あるいは四級アンモニウム化合物 (QAC) をペンダント構造として導入したポリメタクリレートが, 黄色ブドウ球菌や大腸菌に対して抗菌活性を持つことが実証された<sup>(8)(9)</sup>。しかし, ポリマー主鎖への抗菌剤の導入には複雑な化学処理が必要であり, 製造コストが高くなる<sup>(10)</sup>。更に反応残留物が安全性を損なわないことを立証しなければならない。創傷被覆材は頻繁に交換・廃棄される安価な医療機器であり, 作製技術が安価でなければ市場競争力が無い。

そこで我々は, 抗菌剤の溶出が抑制されたハイドロゲルを安全性の高い材料から簡便に作製する技術を開発するため, 優れた生体適合性が実証されているポリビニルアルコール (PVA) の二つの性質に着目した。その性質とは, 放射線で容易に架橋してハイドロゲルを形成する性質<sup>(11)</sup>及びタンパク質などの化合物を静電的に吸着する性質<sup>(12)</sup>である。QAC の一種である塩化セチルピリジニウム (CPC) を PVA

事業名 平成 24 年度 共同研究 A

\* 1) バイオ応用技術グループ

\* 2) アルケア株式会社 医工学研究所

水溶液に混合して放射線を照射すると、CPC が PVA 主鎖に静電的に吸着した PVA ハイドロゲルが得られ、CPC が低溶出性を示すと予測した。この予測の検証ならびに抗菌剤の溶出が抑制されたハイドロゲルを簡便に作製する技術の開発を本研究の目的とした。

## 2. 実験方法

**2.1 材料** PVA (けん化度=87-89%, 4%水溶液の 20°C での粘度=23-27 mPa·s) 及びポリビニルピロリドン (PVP ; PVP K90, 5%水溶液の 20°C での粘度=50-90 mPa·s) は和光純薬工業株式会社製を、CPC 及び重水 (D<sub>2</sub>O) はシグマアルドリッチ株式会社製を用いた。

**2.2 CPC の吸着試験** 水溶液の状態では CPC を PVA に吸着させ、限外ろ過膜を通過した PVA 非吸着 CPC の量をろ液の UV 吸収 (吸収波長 260 nm) から求め、吸着率を見積もった。

**2.3 CPC のガンマ線照射試験** CPC 水溶液 (濃度 20 mg/mL) 及び CPC/PVA 混合水溶液 (濃度各 10 mg/mL) を調製し、脱酸素剤の共存下で <sup>137</sup>Cs ガンマ線照射装置 (PS-3000SB, ポニー株式会社製) を用いて 50 kGy のガンマ線を照射した。線量率は 705 Gy/h であった。

照射前後の構造変化を、NMR 及び分光光度計を用いて解析した。照射した水溶液 800 μL を 200 μL の D<sub>2</sub>O と混合し、JNM-ECA600 (日本電子株式会社製) を用いてプロトンデカップリングモードで <sup>13</sup>C NMR 測定を行った。分光光度計については、照射した水溶液を水で希釈して測定した。

表 1. CPC 含有 PVA ハイドロゲルの組成

Composition of the hydrogel			CPC/PVA-OH <sup>1</sup> molar ratio
PVA (%)	PVP (%)	CPC (%)	
18	2	0	0
18	2	0.08	0.58×10 <sup>-3</sup>
18	2	0.16	1.2×10 <sup>-3</sup>
18	2	0.24	1.7×10 <sup>-3</sup>

<sup>1</sup> PVA-OH は PVA 分子の水酸基を表す。

**2.4 CPC 含有 PVA ハイドロゲルの作製** CPC 含有量の異なる PVA ハイドロゲルを 4 種類作製した (表 1)。生理食塩水を溶媒とした 18% PVA 水溶液に対し、吸水性を向上させる目的で 2% の PVP を、抗菌剤として 0.08-0.24% の CPC を添加した。CPC 含有 PVA/PVP 混合水溶液をポリエチレンテレフタレートのパックに入れ、寸法が 2×60×90 mm のシート状になるように成形した。<sup>60</sup>Co ガンマ線照射施設 (コーガイソトープ株式会社) にて 50 kGy のガンマ線を照射してシート状のハイドロゲルを得た。同様の操作で CPC 不含のゲルをコントロールサンプルとして作製した。

**2.5 PVA ハイドロゲルの力学特性** パラレルプレート型のレオメータを用いて、PVA ハイドロゲルの力学特性を評価した。ハイドロゲルシートから内径 22 mm の円盤状試験片を切り出し、内径 20 mm のパラレルプレートセンサー

で挟み込んだ。応力制御モードにより、周波数 1 Hz、せん断応力 50 Pa における貯蔵弾性率 (G') を測定した。

**2.6 CPC の溶出試験** 生理食塩水を溶出液として、PVA ハイドロゲルからの CPC の溶出特性を評価した。ハイドロゲルシートから切り出した試験片 (約 2×15×15 mm) の重量を測定し、20 mL の溶出液に浸漬して 37°C のインキュベータに静置した。試験片 (n = 3) を浸漬後 6, 24, 及び 72 h 後に取り出した。溶出液に含まれる微粒子をシリンジフィルターで除去し、CPC に特徴的な波長 260 nm の UV 吸収から CPC 濃度を求めた。

**2.7 抗菌性試験** PVA ハイドロゲルの抗菌性を JIS L1902 法に記載の寒天拡散法、及びその改変法により評価した。試験菌として、感染創に良くみられるグラム陰性菌である大腸菌 (ATCC 33456) を用い、LB 寒天培地上でコロニー形成単位 (CFU) が 10<sup>7</sup> CFU/cm<sup>2</sup> になるように培養した。寒天培地の中央にハイドロゲル試験片 (内径 20 mm, 厚さ 1 mm) を置き、37°C で 18 h 培養し、試験片周囲の阻止帯 (菌が死滅する領域) の有無を観察した (n=3)。その後、試験片に接触していた寒天培地を切り出し、接触面の菌数を顕微鏡で計数して抗菌性の指標とした。抗 CPC 含有 PVA ハイドロゲルとコントロールゲルの抗菌性の違いをダネット法で検定し、p 値が 0.05 未満の場合を有意差とした。

## 3. 結果

**3.1 PVA への CPC の吸着** 水溶液中で CPC は PVA に吸着された。図 1 は、PVA 水酸基 (PVA-OH) と CPC のモル比に対し、CPC 吸着率をプロットしたものである。CPC/PVA-OH のモル比が  $< 4.1 \times 10^{-2}$  (18% の CPC ハイドロゲルにおいて  $< 5.8\%$  の CPC に相当) では、ほぼ全ての CPC が PVA に吸着された。CPC/PVA-OH のモル比が  $8.3 \times 10^{-2}$  (18% の CPC ハイドロゲルにおいて 12% の CPC に相当) に達すると、CPC 吸着率は 98% から 95% へとわずかに減少した。

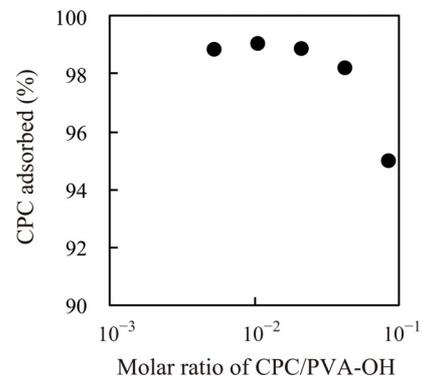


図 1. 水溶液中での CPC の PVA への吸着<sup>(13)</sup>  
PVA-OH は PVA 分子の水酸基を表す。

**3.2 ガンマ線照射に対する CPC の安定性** ガンマ線照射による CPC の構造変化を <sup>13</sup>C NMR 及び UV 分光分析により評価した。50 kGy のガンマ線を照射した CPC 水溶液の <sup>13</sup>C NMR スペクトルは非照射のものと同じであり、ケミカ

ルシフトの移動はみられなかった (スペクトルは示さない)。PVA を共存させても, ガンマ線を照射した CPC の  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルは同一であった。同様に, UV 吸収スペクトルからも構造変化の痕跡は観察されなかった。

**3.3 PVA ハイドロゲルの力学特性** PVA ハイドロゲルの  $G'$  と CPC 濃度の関係を図 2 に示す。CPC 濃度の増加に伴い  $G'$  は減少し, CPC 濃度が 0.24% に達した時の  $G'$  は  $10.5 \pm 0.7 \text{ kPa}$  であった。

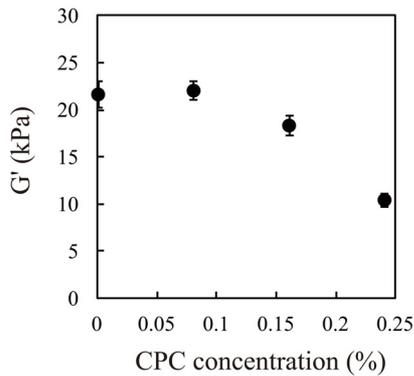


図 2. CPC の添加が PVA ハイドロゲルの硬さに及ぼす影響<sup>(13)</sup>  
CPC 濃度はゲル中の濃度を示す。データは平均値±標準偏差 (n=3)。

**3.4 CPC の溶出特性** CPC は PVA ハイドロゲルからほとんど溶出しなことが溶出試験から明らかになった。CPC 水溶液に特徴的な波長 260 nm の UV 吸収ピーク (図 3) は, 全ての溶出液において不明瞭であった。CPC を 0.08%, 0.16%, 及び 0.24% 含むハイドロゲルから得られた溶出液の波長 260 nm における正味の吸光度 ( $\text{OD}_{260}$ ) はそれぞれ  $0.011 \pm 0.005$ ,  $0.022 \pm 0.004$ , 及び  $0.023 \pm 0.006$  [平均値±標準偏差,  $n=9$  (3 水準のサンプリング期間ごとに  $n=3$ )] であった。溶出液の  $\text{OD}_{260}$  から算出した CPC 溶出率を図 4 に示す。CPC 濃度は  $\text{OD}_{260}$  と比例関係にあるため検量線を作製したが, その直線性は  $< 0.8 \mu\text{g/mL}$  ( $\text{OD}_{260} < 0.01$ ) で失われ, 溶出液の  $\text{OD}_{260}$  はどれも検出限界付近であった。溶出試験後の PVA ハイドロゲルに残存した CPC を観察するため, UV 吸収スペクトルを測定した (図 3)。CPC を 0.08% 含有したハイドロゲルは, 溶出試験後も波長 240–280 nm の範囲にブロードな吸収を示し, CPC がゲル内に残存していることが示唆された。

**3.5 抗菌性試験** CPC 含有 PVA ハイドロゲルは, CPC を含まないコントロールゲルと同様に, 大腸菌に対して阻止帯を形成しなかった。抗菌性物質が寒天培地中に拡散しなかったことが示唆された。

一方, ハイドロゲルが接触した部位の大腸菌数は CPC 濃度の増加と共に減少した (図 5)。CPC 濃度が 0.16% に達した時, コントロールゲルとの大腸菌数に有意差 ( $p < 0.05$ ) が確認された。コントロールゲルの大腸菌数は試験片を載せる前の初期値と同等であり, ゲル試験片を載せた後に剥がすという本試験の操作が大腸菌数に影響しないことを確認した。

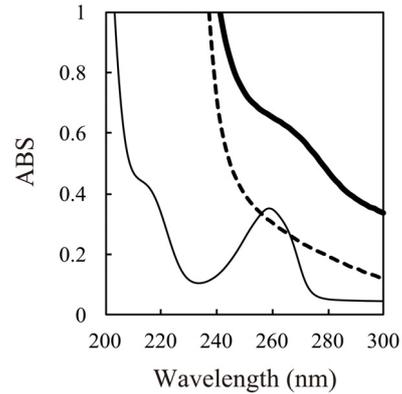


図 3. 各サンプルの典型的な UV 吸収スペクトル<sup>(13)</sup>  
(実線) 濃度 25  $\mu\text{g/mL}$  の CPC 水溶液, (破線) CPC を含まない PVA ハイドロゲル, (太線) 72 h 溶出試験後の 0.08% CPC 含有 PVA ハイドロゲル。

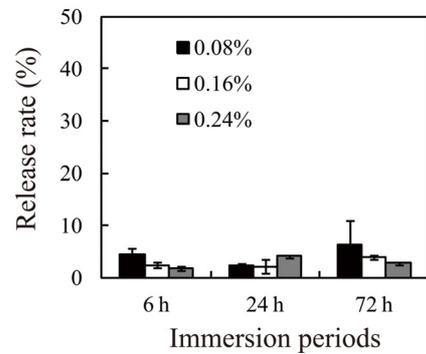


図 4. PVA ハイドロゲルからの CPC の溶出率<sup>(13)</sup>  
図中の濃度は PVA ハイドロゲル中の CPC 濃度を示す。データは平均値±標準偏差 (n=3)。

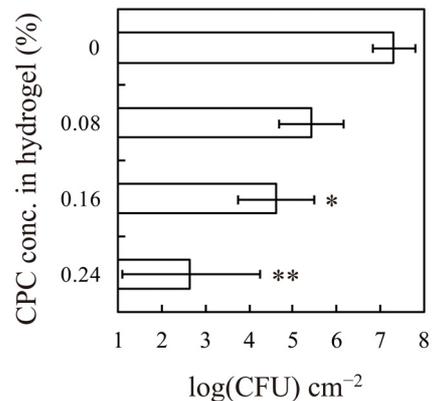


図 5. CPC 含有 PVA ハイドロゲルの大腸菌に対する抗菌性<sup>(13)</sup>  
ゲルと接触した部位の菌数 (コロニー形成率; CFU) を計測した。初菌数は  $\log(\text{CFU})\text{cm}^{-2}=7$  に設定した。データは平均値±標準偏差 (n=3)。

#### 4. 考察

PVA/PVP/CPC 混合溶液にガンマ線を照射するだけの簡易かつ安全性の高い方法で, 抗菌剤の溶出が抑制された抗菌性ハイドロゲル創傷被覆材の作製に成功した。医療機器の分野では, 化学反応を利用した場合はその反応残留物の有無や安全性を確認しなければならず, 本方法の簡易性と安全性は実用化にとって利点となる。医療機器としての実績

のある PVA のような高分子主鎖を用いた場合であっても、その主鎖に新規な側鎖を化学結合させると、薬事承認においては新規材料とみなされる。Kenawy らは<sup>(10)</sup>、抗菌性高分子の開発において、簡易かつ安価な合成手法が使われるべきであると指摘した。我々は創傷被覆材の組成として PVA, PVP, 及び CPC を用い、ハイドロゲルを作製する手段としてガンマ線架橋を用いた。PVA と PVP は創傷被覆材として既に使用実績がある。CPC の創傷被覆材への応用例はまだ無いが、口腔ケア用の抗菌剤として認可されている。ガンマ線は医療機器の滅菌手段として広く利用されている。本研究の PVA ハイドロゲルの架橋線量は 50 kGy であり、一般的な滅菌線量 (25 kGy) を超えるため、架橋工程は滅菌を兼ねることができる。本研究で開発したハイドロゲル創傷被覆材及びその製造方法は、簡易性と安全性に優れ、早期の臨床応用が期待できる。

抗菌剤 CPC の溶出が抑制されたことは、PVA に対する CPC の吸着能によって説明できる。PVA の CPC 吸着能は、CPC/PVA-OH のモル比として  $4.1 \times 10^{-2}$  を超えていたことから、本実験で作製した PVA ハイドロゲル中 (CPC/PVA-OH モル比は高くても  $1.7 \times 10^{-3}$ ) で CPC はほぼ完全に PVA 鎖に吸着していたと推定された。CPC はガンマ線に対して安定であったことは、CPC が吸着した状態で PVA 鎖及び PVP 鎖をガンマ線が架橋したことを示唆した。我々が見出したこの CPC-PVA 吸着系は、抗菌性創傷被覆材の開発において、高分子主鎖への抗菌性化合物の化学結合に代わり得る。

CPC の溶出が抑制されたことにより、抗菌性はゲル周囲に及ばず、ゲル表面で発揮された。CPC は QAC の一種であり、界面活性効果と細胞膜への高いアフィニティによってグラム陰性菌に対する抗菌性を発揮することが知られている。CPC の持つ四級アンモニウムイオンが PVA-OH との吸着サイトになったと我々は推定した。この場合、CPC の持つ長いアルキル鎖は溶媒に対して露出され、CPC の界面活性効果は保持される。CPC 含有 PVA ハイドロゲルの抗菌性はグラム陰性の緑膿菌のみならずグラム陽性の黄色ブドウ球菌でも認められた<sup>(14)</sup>。CPC 含有 PVA ハイドロゲルの抗菌性メカニズムの詳細は本研究の目的を超えるが、他の QAC の PVA との吸着能と抗菌性を調べることで、メカニズムの一部を明らかにする研究を進めている。

以上、PVA ハイドロゲルの製造方法及び抗菌性について議論してきたが、ハイドロゲル創傷被覆材にとっては機械的な強度も重要な性質である。我々の経験では、PVA ハイドロゲルの G' が 7 kPa 未満だと、ゲルが強い粘着性を示すと共に軟質性が顕著になり、取り扱いが困難になる。また、強度の低下は架橋密度の低下を意味し、吸水による膨潤度が極めて高くなる。CPC の添加量につれて粘着性と軟質性が顕在化したことは、CPC の持つガンマ線架橋の阻害効果で説明できる。その解決策としてはガンマ線量の増加が候補となる。ガンマ線量を 50 kGy よりも高くすると架橋度が更に高くなることが報告されており<sup>(11)</sup>、CPC の架橋阻害効果は高線量のガンマ線照射により相殺することが可能と考

えている。

抗菌剤の溶出が抑制されたハイドロゲル創傷被覆材を、化学合成を用いずに簡易に作製する技術を開発した。ハイドロゲルは安全性の実証された材料からのみ構成され、ゲル化させるための架橋は医療機器の滅菌に頻用されるガンマ線である。この安全性と簡便性が本製造技術の利点であり、抗菌性創傷被覆材としての早期の実用化が期待できる。なお、本論文の図は引用文献<sup>(13)</sup>から転載されたものであり、本研究の詳細も記述されている。

#### 謝辞

高度分析開発セクターの渡邊禎之主任研究員から NMR 測定について助言を受けた。ここに感謝の意を表する。

(平成 26 年 7 月 7 日受付, 平成 26 年 8 月 18 日再受付)

#### 文 献

- (1) Jones V, Grey JE, Harding KG : "Wound dressings", *BMJ*, Vol.332, No.7544, pp.777-780 (2006)
- (2) Boateng JS, Matthews KH, Stevens HN, Eccleston GM : "Wound healing dressings and drug delivery systems: a review", *J Pharm Sci*, Vol.97, No.8, pp.2892-2923 (2008)
- (3) Morgan, DA : "Wound management products in the drug tariff", *Vol.263, No.7072*, pp.820-825 (1999)
- (4) Kingsley A : "A proactive approach to wound infection", *Vol.15, No.30*, pp.50-58 (2001)
- (5) Kormsmeier RW, Gurny R, Doelker E, Buri P, Peppas NA : "Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers", *Inter J Pharma*, Vol.15, No.1, pp.25-35 (1983)
- (6) Kim JO, Choi JY, Park JK, Kim JH, Jin SG, Chang SW, Li DX, Hwang MR, Woo JS, Kim JA, Lyoo WS, Yong CS, Choi HG : "Development of clindamycin-loaded wound dressing with polyvinyl alcohol and sodium alginate", *Biol Pharm Bull*, Vol.31, No.12, pp.2277-2282 (2008)
- (7) Timofeeva L, Kleshcheva N : "Antimicrobial polymers: mechanism of action factors of activity, and applications", *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol.89, No.3, pp.475-492 (2011)
- (8) Ikeda T, Ledwith A, Bamford CH, Hann RA : "Interaction of a polymeric biguanide biocide with phospholipid membranes", *Biochim Biophys Acta*, Vol.769, No.1, pp.57-66 (1984)
- (9) Ikeda T, Yamaguchi H, Tazuke S : "New polymeric biocides: synthesis and antibacterial activities of polycations with pendant biguanide groups", *Antimicrob Agents Chemother*, Vol.26, No.2, pp.139-144 (1984)
- (10) Kenawy ER, Worley SD, Broughton R : "The chemistry and applications of antimicrobial polymers: a state-of-the-art review", *Biomacromolecules*, Vol.8, No.5, pp.1359-1384 (2007)
- (11) Park KR, Nho YC : "Synthesis of PVA/PVP hydrogels having two-layer by radiation and their physical properties", *Radiat Phys Chem*, Vol.67, No.3-4, pp.361-365 (2003)
- (12) Bajpai AK : "Adsorption of bovine serum albumin onto glass powder surfaces coated with polyvinyl alcohol", *J Appl Polym Sci* Vol.78, No.5, pp.933-940 (2000)
- (13) Yunoki S, Kohta M, Ohyabu Y, Sekiguchi M, Kubo T, Iwasaki T : "Electrostatic immobilization of cetylpyridinium chloride to poly(vinyl alcohol) hydrogels for the simple fabrication of wound dressings with the suppressed release of antibacterial agents", *J Appl Polym Sci*, Vol.131, No.13, p.40456 (2014)
- (14) Kohta M, Yunoki S, Ohyabu Y, Kubo T, Iwasaki T : "The antimicrobial activity and biological safety of a novel cross-linked hydrogel-based wound dressing containing cetylpyridinium chloride or polyhexamethylenebiguanide", *Jpn J PU*, Vol.15, No.4, pp.493-501 (2013)