

創傷治癒促進効果に優れた高強度キトサンゲルの開発

武井 孝行、吉田 昌弘

鹿児島大学大学院 理工学研究科 工学専攻 化学工学プログラム

〒890-0065 鹿児島県鹿児島市郡元 1-21-40

TEL : 099-285-3283

要旨

創傷治癒促進効果を有するキトサンからなるヒドロゲルは、創傷被覆材として極めて有望である。しかし、従来のキトサンゲルには毒性の高い化学架橋剤が含まれているため、創傷被覆材としては好ましくない。一方、以前、われわれはキトサンにグルコン酸を修飾したキトサン誘導体を作製し、その水溶液を凍結・融解処理するだけでゲル化することを見出している。しかしながらそのゲルの強度は十分でなく、患部にそのゲルを貼るなどの外科的処置中にそれが崩壊してしまうため、より高強度なキトサンゲルが求められる。本研究では、過ヨウ素酸ナトリウム処理により多糖骨格内に反応性の高いアルデヒド基を付与した酸化アルギン酸ナトリウムによりゲルの強度を向上させることができるか調査した。期待したとおり、凍結・融解処理により作製したキトサンゲルを酸化アルギン酸ナトリウムにより処理することによりゲルの強度が向上することを明らかにした。また、その酸化アルギン酸ナトリウムの細胞毒性が低いことも明らかにした。さらに、その高強度ゲルが創傷治療に有効であることを実証した。

1. 緒言

寝たきりの高齢者によく見られる床ずれなどにより皮膚が損傷した場合、有害細菌による感染を防ぐために、早期に創傷部（皮膚が損傷した部位）を治癒させることが重要である。治癒の促進には、創傷部を湿潤状態に保つことが有効である。ヒドロゲルは創傷部を湿潤状態に保てることから、医療用創傷被覆材（傷を覆って治癒を促進するもの）として広く利用されている。

キトサンは創傷治癒の促進に効果のある天然多糖である。しかし、既存のキトサンヒドロゲルの調製法は、生体毒性の高い化学架橋剤を使用したものがほとんどであり、医療用材料としては不適である。申請者はこれまでに種々のキトサン誘導体（キトサンに別の物質を化学的に修飾したもの）を合成している^{1,2)}。そのなかの一つのキトサン誘導体を水に溶解させ、それを凍結した後、融解させるだけで、生体毒性の高い化学架橋剤を使用することなく、キトサンゲルを作製できることを見出している。さらにそれが高い創傷治癒促進効果を持つことを示した。しかしながらそのゲルの強度は十分でなく、患部にそのゲルを貼るなどの外科的処置中にそれが崩壊してしまうため、より高強度なキトサンゲルが求められる。本研究で

は、過ヨウ素酸ナトリウム処理により多糖骨格内に反応性の高いアルデヒド基を付与した酸化アルギン酸ナトリウムによりゲルの強度を向上させることができるか調査した（図 1）。

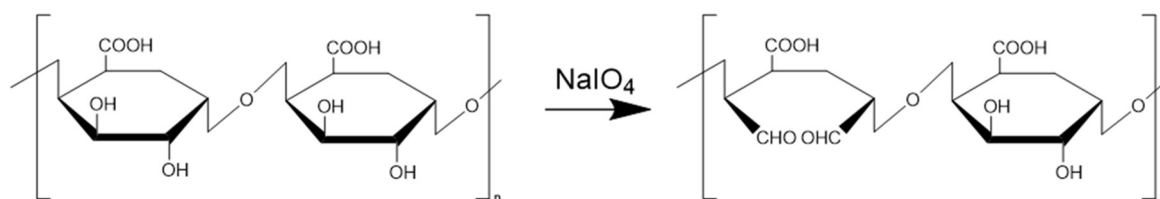


Fig. 1 Schematic for synthesis of the oxidized sodium alginate.

2 実験

2.1 グルコン酸修飾キトサンの合成

2-モルホリノエタンスルホン酸を 23.5 mM の濃度で溶解させた蒸留水 300 mL (pH4.0) にキトサン（商品名「キトサン LL」、脱アセチル化度 80%、焼津水産化学工業株式会社製）を溶解させ、1 M 塩酸水溶液を加えることにより pH を 4.0 に調整した。その水溶液にグルコン酸ナトリウム（以下、GA と省略）、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩（以下、EDC と省略）および N-ヒドロキシコハク酸イミド（以下、NHS と省略）を溶解させ、室温で 24 時間攪拌することで、キトサンのグルコサミン単位 of 2 位のアミノ基にグルコン酸を導入した（図 2）。続いて、1 M 水酸化ナトリウム水溶液を加えることにより反応溶液の pH を 8.0 に調整した後、99.5%エタノールを加えることでグルコン酸修飾キトサンおよび未反応のグルコン酸ナトリウムを沈殿させ、遠心操作により沈殿物を回収した。そ

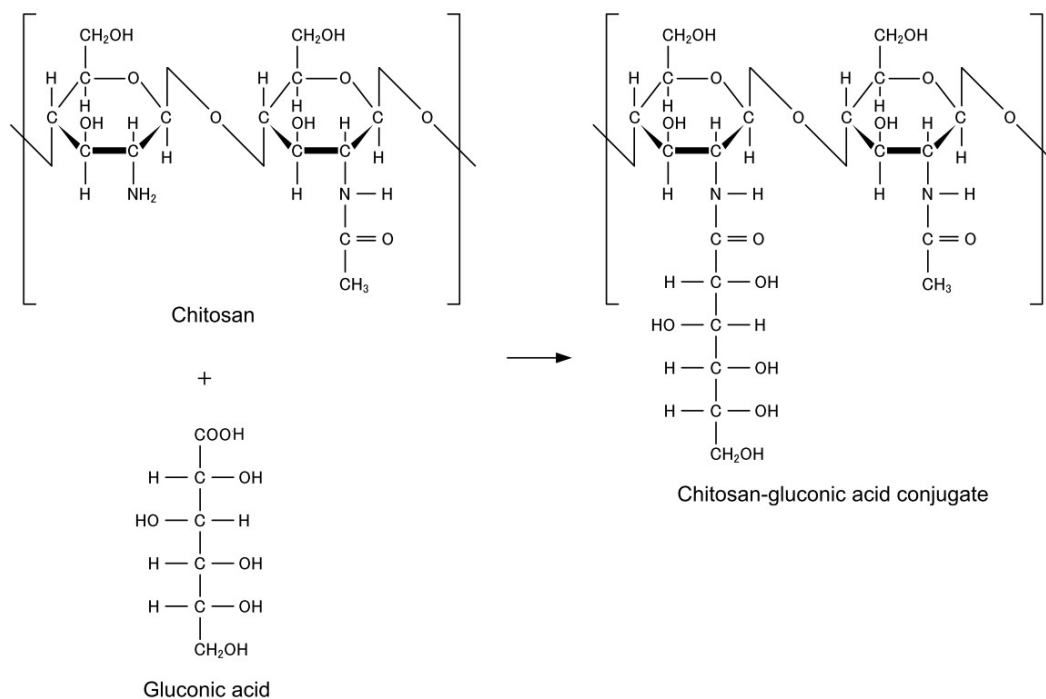


Fig. 2 Schematic for synthesis of the chitosan-gluconic acid conjugate.

の後、沈殿物を透析膜に封入し、1 週間蒸留水に浸すことでグルコン酸ナトリウムを除去した。この際、1 日に 2 回蒸留水を交換した。続いて、透析膜内の沈殿物および水溶液を回収し、99.5%エタノールを加えることでグルコン酸修飾キトサンを沈殿させ、その沈殿物を回収した。その後、凍結・乾燥処理を行うことでグルコン酸修飾キトサンの乾燥粉末を得た。グルコン酸導入率は、0.1 M 塩酸水溶液 40 mL にグルコン酸修飾キトサン乾燥粉末 0.2 g を溶解させ、その水溶液に 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液を加えた際の導電率の変化を測定することで算出した。なお、本研究で使用したグルコン酸修飾キトサンのグルコン酸導入率（＝グルコサミンユニット 100 個あたりのグルコン酸を導入したグルコサミンユニット数）は 18% であった。

2.2 凍結・融解処理によるヒドロゲルの調製

上記のように合成したそれぞれのグルコン酸修飾キトサンの乾燥粉末を蒸留水に加えた（2.0% (w/v)）。次に、0.1 M 塩酸水溶液を加えることにより、粉末を完全に溶解させた。続いて、0.1 M または 1.0 M 水酸化ナトリウム水溶液を加えることで pH を 7.0 に調整した。そのグルコン酸修飾キトサン水溶液を内径 15 mm の円筒形状のガラス容器に入れ、-30℃の冷凍庫で 6 時間静置した後、室温で融解させることでゲルを調製した。

2.3 酸化アルギン酸の合成

アルギン酸ナトリウム粉末 2.0 g をエタノール 10 ml に分散させた。その分散液に 1.08 g の過ヨウ素酸ナトリウムを溶解させた蒸留水 10 ml を加え、室温、遮光下で 6 時間攪拌した。その分散液を透析膜に入れ、蒸留水中で 4 日間透析することにより、酸化アルギン酸以外の不純物を取り除いた。その後、透析膜内の溶液を凍結乾燥することにより酸化アルギン酸ナトリウムの固体粉末を得た。酸化アルギン酸の酸化率（＝ウロン酸 100 個あたりの酸化されたウロン酸数）は、Zhao らの報告にもとに求めた³⁾。本研究で使用した酸化アルギン酸の酸化率は 41% であった。

2.4 酸化アルギン酸ナトリウムの細胞毒性調査

ウシ胎児血清を含まないイーグル最小必須培地に酸化アルギン酸ナトリウムを 8% (w/v) の濃度で溶解させた。その培地中に、細胞培養用シャーレからトリプシン処理により回収したウシ大動脈由来血管内皮細胞を懸濁させ（ 1.0×10^6 cells/ml）、室温で 1～5 時間静置した。細胞の生存率は細胞のトリパンブルー染色により評価した。その際、酸化アルギン酸ナトリウムを含まない培地中での細胞生存率を 100% として算出した。

2.5 酸化アルギン酸によるキトサンゲルの架橋

カルシウムイオンおよびマグネシウムイオンを含まないリン酸緩衝生理食塩水中に酸化アルギン酸を 8% (w/v) の濃度で溶解させた。その水溶液に、凍結・融解処理により作製したキトサンゲルを浸し、1～5 時間室温で静置することでキトサンゲルを酸化アルギン酸ナトリウ

ムで架橋した。

2.6 圧縮試験

上記で得られたキトサンゲルの圧縮強度を測定した。ガラス容器に入った状態の各ゲルに対し、上方から直径 10 mm の圧子を 5 mm/min で下降させる圧縮試験を行った。ひずみが 10% になったときの圧縮強度を測定した。

2.7 酸化アルギン酸ナトリウムで架橋したキトサンゲルの創傷治癒促進効果の検証

酸化アルギン酸ナトリウムで 3 時間架橋したキトサンゲルを 70% (v/v) エタノール水溶液に 10 分間浸すことで消毒し、その後、滅菌した生理食塩水でよく洗浄した。ウイスターラット（雄、8 週齢）の背部の体毛をカミソリで剃り、70% (v/v) エタノール水溶液を用いて皮膚を消毒した後、麻酔下でそのゲルを皮下に埋植した。1 週間後にそのゲルを含む周囲組織を取り出し、その薄切片にヘマトキシリン-エオシン染色を施した。

3 結果と考察

本研究では、酸化アルギン酸により架橋した高強度なキトサンゲルの開発を目指している。一般的に、化学架橋剤は生体毒性が高いために、医療用ヒドロゲル調製のためにそれが使用されることは好ましくない。化学架橋剤の生体毒性は分子量に大きく依存すると考えられる。具体的には、分子量が小さい場合、細胞内に浸透し易く、毒性が顕著に表れると考えられる。その一方で分子量が大きい場合は、細胞内に浸透しにくく、それにより毒性がより低くなると考えられる。このような発想から本研究では、高分子であるアルギン酸ナトリウムを過ヨウ素酸処理にすることによりその骨格内にアルデヒド基を付与した酸化アルギン酸ナトリウムをキトサンゲルの架橋剤として使用することにした。

はじめに、酸化アルギン酸ナトリウムの細胞毒性を調査した（図 3）。期待していたとおり、

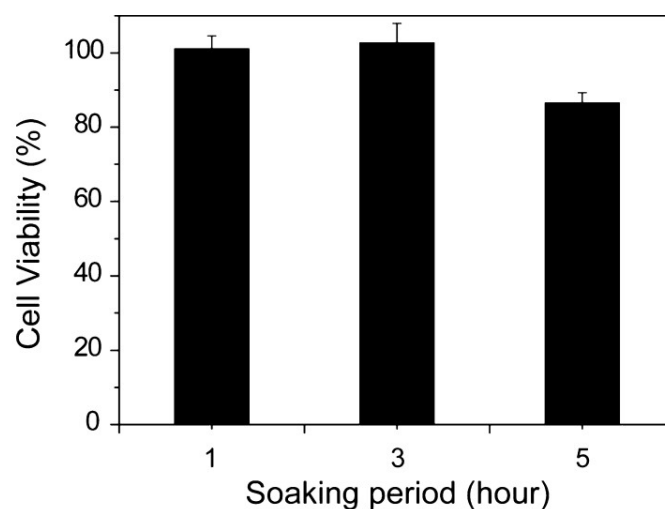


Fig. 3 Viability of bovine carotid artery endothelial cells in a culture medium containing oxidized sodium alginate.

酸化アルギン酸ナトリウムで1時間または3時間処理した細胞の生存率はほぼ100%であり、その細胞毒性の低さを確認することができた。そこで次に、酸化アルギン酸ナトリウム水溶液にキトサンゲルを浸すことでゲルを架橋したところ、ゲルの強度が飛躍的に向上することを確認した(図4)。このように、細胞毒性が極めて低い酸化アルギン酸ナトリウムにより強度が大幅に向上したキトサンゲルは、医療用として極めて有望である。最後に、得られたキトサンゲルをラット皮下に移植し、移植片に対する生体反応を調査した(図5)。ゲルの周囲

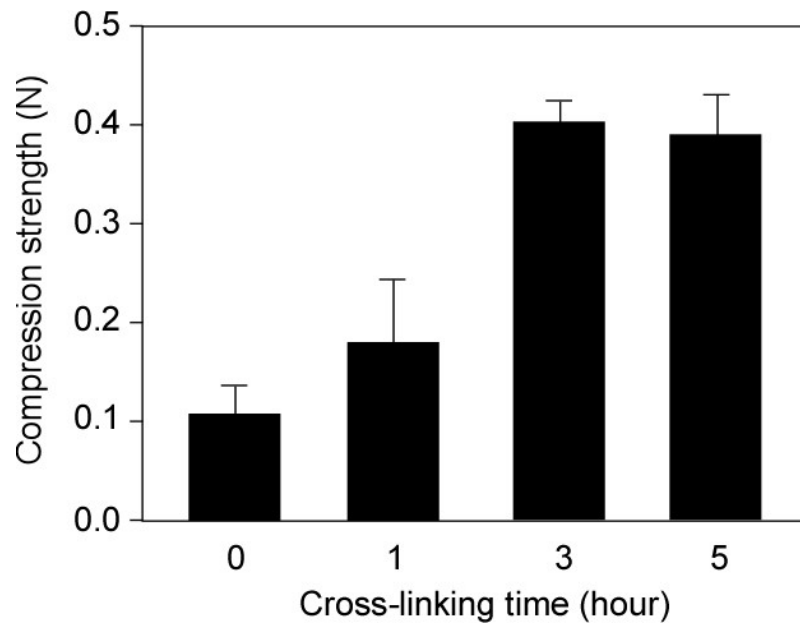


Fig. 4 The compressive strength at 10% strain of chitosan hydrogels incubated in oxidized sodium alginate aqueous solution.

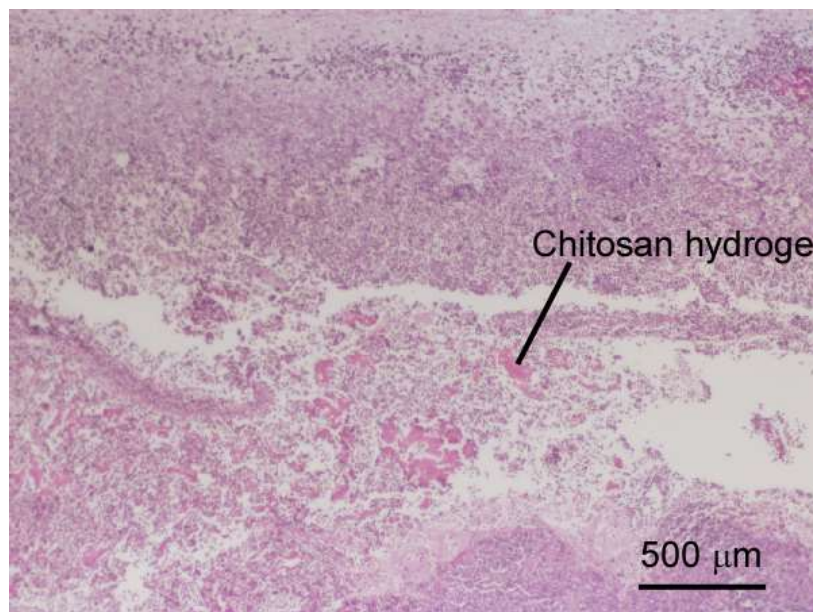


Fig. 5 Hematoxylin- and eosin-stained sections of host tissue containing a chitosan cryogel cross-linked with oxidized sodium alginate after 1 week of implantation.

には好中球の集積が見られた。キトサンの生体内での加水分解物は、好中球を活性化させ、その細胞が産出する液性因子により創傷治癒が促進されることが報告されている⁴⁾。酸化アルギン酸ナトリウムで架橋したキトサンゲルにおいても、架橋していないキトサンゲルと同様の好中球の集積が見られたことから、本キトサンゲルは創傷治療に有効な創傷被覆材として期待できる。

4 結論

本研究では、凍結・融解処理によって作製したキトサンゲルを、細胞毒性の低い酸化アルギン酸ナトリウムで架橋することにより、そのゲルの強度を大幅に上げることができることを示した。さらに、架橋後のキトサンゲルが創傷治癒促進効果を有していることを示唆する結果を得た。

5 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を頂いたサンケイ科学振興財団に厚く感謝申し上げます。

6 引用文献

1. Takei T., Nakahara H., Ijima H., and Kawakami K.: Synthesis of a chitosan derivative soluble at neutral pH and gellable by freeze-thawing, and its application in wound care, *Acta Biomater*, 8, 686-693 (2012).
2. 武井 孝行、中原 秀樹、川上 幸衛、吉田 昌弘: トレオン酸修飾キトサンおよびキシロン酸修飾キトサンの凍結-融解処理によるゲル化特性ならびに生物学的特性の評価, *科学・技術研究*, 2, 123-126 (2013).
3. Zhao H., Heindel N. D.: Determination of degree of substitution of formyl groups in polyaldehyde dextran by the hydroxylamine hydrochloride method, *Pharm. Res.*, 8, 400-402 (1991).
4. Ueno H., Mori T., Fujinaga T.: Topical formulations and wound healing applications of chitosan, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 52, 105-115 (2001).

Development of chitosan hydrogel with high mechanical strength as wound dressings

Takayuki Takei and Masahiro Yoshida

Department of Chemical Engineering, Graduate school of Science and Engineering, Kagoshima University, 1-21-40 Korimoto, Kagoshima 890-0065, Japan

TEL: +81-99-285-3283

Abstract

Hydrogel wound dressings are suitable for the moist wound healing because of their hyperhydrous structure. Chitosan is a strong candidate for base materials of hydrogel wound dressings because the polymer has excellent biological properties to promote wound healing. We previously developed physically-crosslinked chitosan cryogels, which was prepared only by freeze-thawing of a chitosan-gluconic acid conjugate aqueous solution without toxic additives, for wound treatment. In this study, we used oxidized sodium alginate to improve the strength of the chitosan cryogels. The oxidized sodium alginate was synthesized by treating sodium alginate with sodium periodate. The oxidized sodium alginate exhibited quite low cytotoxicity. Cross-linking of chitosan cryogels with the oxidized sodium alginate resulted in improved mechanical strength of the gels. It should be highlighted that numerous inflammatory cells such as polymorphonuclear leukocytes accumulated around the cryogels implanted into rats, which suggests that the cross-linked cryogels have an ability to promote wound healing.