

滅菌を兼ねた熱処理により作製可能な創傷被覆材の開発

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。本研究では、上述のような凍結・融解処理を行うことなく、滅菌を兼ねた加熱処理のみによりその水溶液がゲル化するかどうかを調査した。期待したとおり、グルコン酸修飾キトサン水溶液はオートクレーブを利用した高温高圧蒸気滅菌（121°C、2 気圧）により自発的にゲル化した。また、グルコン酸導入率が高くなるに伴って、かつ、高温蒸気滅菌の処理時間が長くなるに伴って、機械的強度の高いゲルが得られた。オートクレーブはほとんどの医療機関に設置されているため、望ましい形状およびサイズのゲルをオンサイトで作製できることから極めて有用である。

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。一方、そのゲルを実際に患者に適用するためには滅菌が必要である。そこで、医療器具の一般的な滅菌法であるオートクレーブ滅菌（高温高圧蒸気滅菌）によりそのキトサンゲルを滅菌でき、さらにその滅菌によりゲルの創傷治癒促進効果が下がらないことを証

明している³⁾。

本研究では、上述の凍結・融解処理を行うことなく、滅菌を兼ねた加熱処理のみによりゲル化するかどうかを調査した。加熱処理のみによりゲル化できれば、キトサンゲルの作製および滅菌を1ステップで達成できるため、操作が簡便になる。また、オートクレーブはほとんどの医療機関に設置されているため、望ましい形状およびサイズのゲルをオンサイトで作製できることから極めて有用である。

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の水酸基にグルコン酸を導入した (図 1 参照)。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

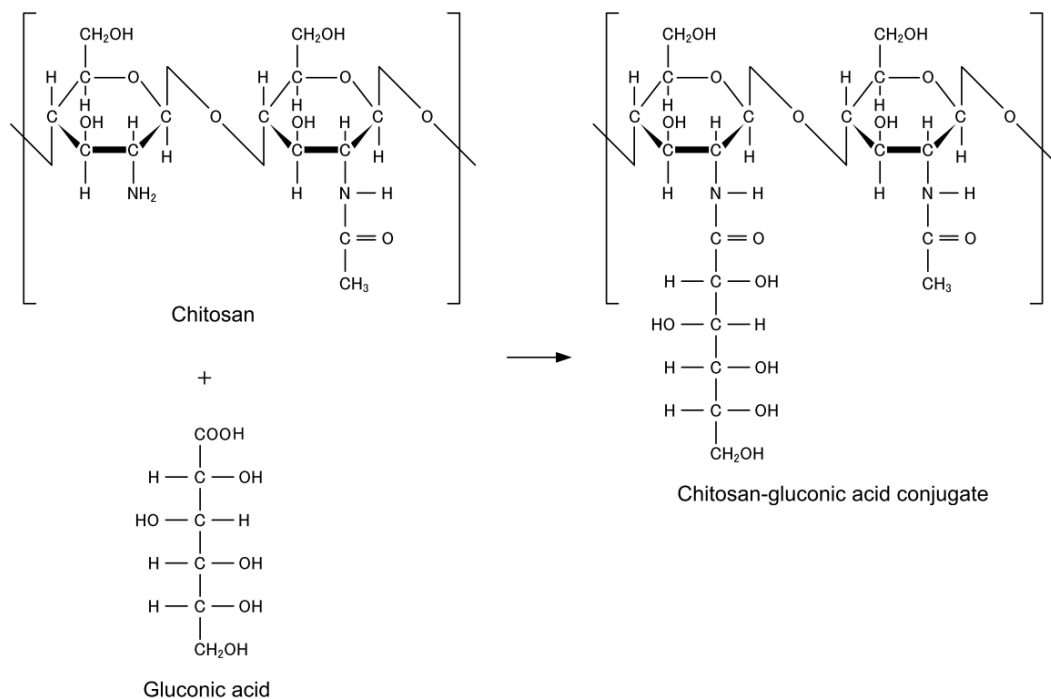


Fig. 1 Schematic for synthesis of the chitosan–gluconic acid conjugate.

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て、保管した。なお、原料比が異なる 3 種のグルコン酸修飾キトサンの乾燥粉末を調製した。これらのグルコン酸修飾キトサンを GC8、GC26、GC54 とそれぞれ記す。そして、GC8、GC26、GC54 について、グルコン酸導入率を算出した。グルコン酸導入率は、既述のように、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。表 1 にそれぞれのグルコン酸修飾キトサンの調製条件、グルコン酸導入率を示す。

Table 1. Feeding weight (gram) of chitosan, sodium gluconate, EDC and NHS for synthesis of chitosan-gluconic acid conjugate.

Name	Chitosan	Sodium gluconate	EDC	NHS	Gluconic acid content (/100 glucosamine units)
GC8	10	2.7	2.4	0.7	8
GC26	10	5.4	4.7	1.4	26
GC54	5	10.8	9.5	2.8	54

2.2 オートクレーブによる滅菌及びヒドロゲルの調製

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、密閉した。それをオートクレーブに入れ、高温高圧蒸気滅菌処理 (121°C、2 気圧) した。処理時間は 20 分、60 分、120 分とした。

2.3 圧縮試験

上記で得られたそれぞれの医療用ヒドロ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医療用ヒドロゲルに対し、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。そして、ひずみが 10%になったときの圧縮強度を測定した。

3 結果と考察

申請者はこれまでに、未修飾のキトサンを水に溶解させ、その水溶液を加熱処理することで、キトサン分子が凝集し、固体キトサンが析出することを確認している。ヒドロゲルは、固体ほど高分子密度が高くなく、かつ、その分子間に水分子を含んだものであるため、加熱処理中のキトサン分子の凝集をある程度抑制できればヒドロゲルを作製できると考えた。その抑制方法として有効なのが、キトサンに他の物質を化学的に修飾することである。つまり、修飾物質が立体障害になり、キトサン分子の凝集を防止できると考えた。また、立体障害の

程度は、修飾物質の分子量やその修飾率に依存すると考えられる。そこで、高分子としては、われわれがこれまでに報告しているグルコン酸修飾キトサンを採用し、グルコン酸の修飾率がオートクレーブによるゲル化特性に及ぼす影響を調査した。

pH を 7.0 に調整したグルコン酸修飾キトサン水溶液をオートクレーブに入れ、高圧蒸気滅菌処理（121℃、22 気圧）した。処理時間は 20 分、60 分、120 分とした。その結果、いずれの処理時間においても水溶液のゲル化が認められた（図 2）。

次の各ゲルの強度を測定した（図 3）。GC8 を用いて得られたゲルは、処理時間の長さによる圧縮強度の変化はほぼ見られなかった。一方、GC26、GC54 のゲルでは、グルコン酸導入率が高くなるに伴って、かつ、高温高圧蒸気滅菌の処理時間が長くなるに伴って、力より高強度のゲルが得られることがわかった。

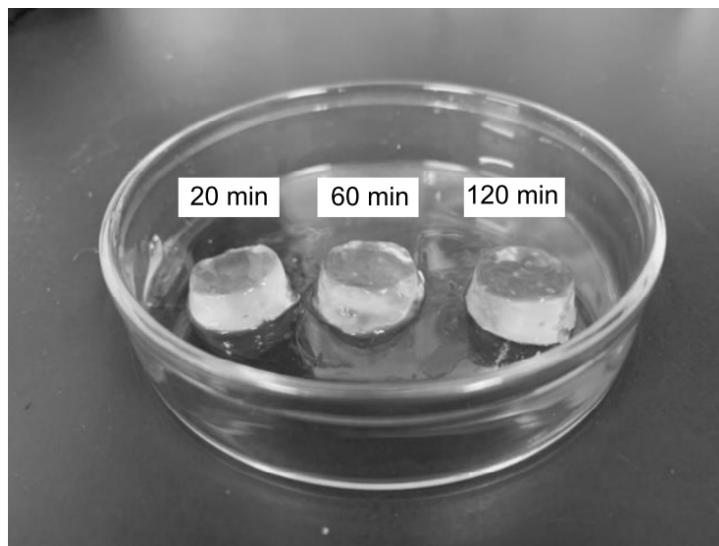


Fig. 2 GC26 hydrogels formed through autoclave sterilization at 121°C for 20, 60 or 120 min.

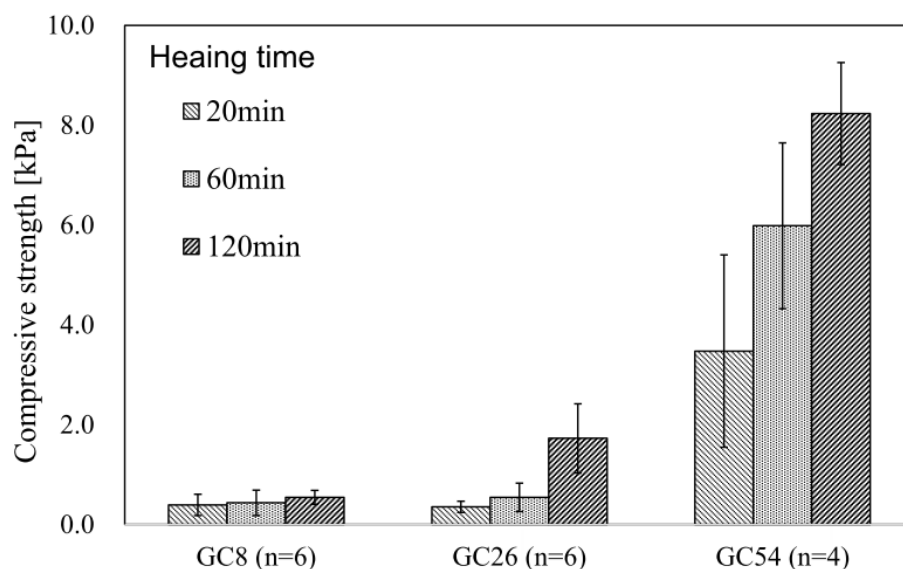


Fig. 3 Compressive strength of chitosan hydrogels formed through autoclave sterilization.

4 結論

本研究では、グルコン酸修飾キトサン水溶液がオートクレーブを利用した高温高压蒸気滅菌処理により自発的にゲル化することを見出した。また、グルコン酸導入率が高くなるに伴って、さらには高压蒸気滅菌の処理時間が長くなるに伴って、より強度の高いキトサンゲルが得られた。

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. Takei T., Danjo S., Sakoguchi S., Tanaka S., Yoshinaga T., Nishimata H., Yohisda M.: Autoclavable physically-crosslinked chitosan cryogel as a wound dressing, *J Biosci Bioeng*, 125, 490-495 (2018).

Development of chitosan hydrogel formed through autoclave sterilization

Takayuki Takei, 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 examined whether the chitosan derivative aqueous solution formed hydrogel through autoclave sterilization (121°C). As expected, the polymer solution spontaneously formed hydrogel. Mechanical strength of the hydrogels increased with increase in gluconic acid content and heating time. Since most medical facilities have autoclaves, the feature of the hydrogel allows on-site hydrogel preparation, which is extremely useful because it allows for the preparation of chitosan hydrogels of the desired shape and size.