

# オートクレーブ滅菌が可能な新規創傷被覆材の開発

武井 孝行、吉田 昌弘

鹿児島大学大学院 理工学研究科 化学生命・化学工学専攻

〒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、モイストヒーリング用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（以下、CGと略記する）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（以下、このゲルをCG クライオゲルと記載する）。本研究では、そのCG クライオゲルがオートクレーブ滅菌可能であるか調査した。オートクレーブにより CG クライオゲルは収縮したが、融解することはなかった。また、オートクレーブ処理によりゲルの架橋度が高まった。さらに、オートクレーブ処理後のゲルは、そのような高温処理を行っていないゲルと同等の高い創傷治癒効果を保持していた。このようにオートクレーブ滅菌が可能な CG クライオゲルは医療用創傷被覆材として有望である。

## 1. 緒言

外科手術や事故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、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（モイストヒーリング）。ヒドロゲルで創傷部を覆うことで湿潤状態に保てることから、ヒドロゲルは医療用創傷被覆材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、そのような物質を含むヒドロゲルは医療用材料としては不適である<sup>1)</sup>。

申請者は、これまでにキトサンにグルコン酸を修飾した新たなキトサン誘導体を合成している（Fig. 1 A）<sup>2)</sup>。驚くべきことに、CG を溶かした水溶液は、化学架橋剤を使用することなく、凍結－融解処理のみによりゲル化することを見出した（Fig. 1 B）。また、このゲルは生体の免疫細胞を活性化させる効果を保持していることを確認しており、新たな創傷被覆材として有望である<sup>2,3)</sup>。

CG クライオゲルを実際の創傷治療に利用する場合、その滅菌方法を確立しておかなければならない。医療用材料の滅菌法として、放射線滅菌や酸化エチレンガス滅菌など数種あるが、それらの中でも、各病院に必ずあるオートクレーブを使用した滅菌（高温・高圧滅菌）は操

作が簡便かつ確実な滅菌法である<sup>4)</sup>。しかし、一般的に高分子は高温であるほど水への溶解度が増す場合が多く、その高分子から得られるヒドロゲルも高温で溶けてしまうためオートクレーブ滅菌は適用できない。一方、CG の水への溶解度は pH に大きく依存するものの、温度にはほとんど依存しないことを見出している<sup>2)</sup>。つまり、CG から作られるクライオゲルは、オートクレーブ滅菌を適用できる可能性が大きいにある。本申請課題では、そのオートクレーブ滅菌の可能性について調査したので報告する。

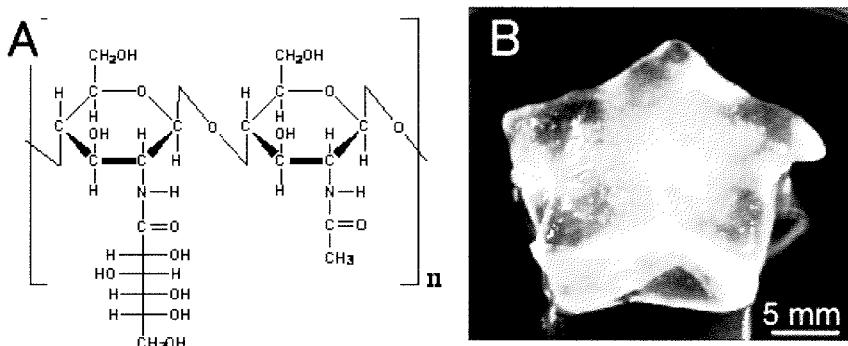


Fig. 1 (A) CG molecule. (B) CG cryogel.

## 2 実験

### 2.1 CG クライオゲルの作製とオートクレーブ処理

本研究では、キトサンのグルコサミン単位 100 個あたりのグルコン酸の修飾量が 11 の CG を用いた。酸性の生理食塩水 (pH 4 程度) に CG を溶解し、それに徐々に 0.1–1.0 M 水酸化ナトリウム水溶液加えることで pH を 7.0 にした (最終 CG 濃度 : 2.0% (w/v))。その水溶液を -30°C で 12 時間凍結した後、室温で融解させることで CG クライオゲルを作製した。ガラス密封瓶内でそのゲルを大過剰の生理食塩水中に浸し、オートクレーブ処理 (121°C、15 分を行った。

### 2.2 オートクレーブ処理後の CG クライオゲルの加水分解耐性

オートクレーブ処理前後の CG クライオゲル (0.5 ml) を、リゾチームを溶解したリン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4、リゾチーム濃度 : 0.3 mg/ml) 中に浸し、震盪した。経時的にゲルの湿重量を測定した。

### 2.3 オートクレーブ処理後の CG クライオゲルの創傷治癒促進効果

CG クライオゲル (2.0 ml) をオートクレーブ処理により滅菌した。また、70% (v/v) エタノール水溶液に 10 分間浸することで消毒し、その後、滅菌した生理食塩水でよく洗浄したものを作製した。

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。ペントバルビタールの麻酔下で直径 1 cm の全層皮膚欠損創を 1 匹あたり 2 つ作製した。オートクレーブで滅菌したゲルおよび 70% (v/v) エタノール水溶

液により消毒したゲルで2つの創をそれぞれ覆い、その上を粘着包帯でさらに覆うことで、創上にゲルを固定した。その後、通常の飼育を行い、経時的に創の面積を測定した。

### 3 結果と考察

#### 3.1 CG クライオゲルの作製とオートクレーブ処理

CG と同じように化学架橋剤を使用することなく、凍結-融解処理のみによりゲル化する高分子としてポリビニルアルコール（PVA）が挙げられる。まずははじめに、PVA クライオゲルのオートクレーブ耐性を調査した。その結果、そのゲルは完全に融解した（Fig. 2 A, B）。これは、PVA の水への溶解度が高温になるほど高くなるためである。一方、CG クライオゲルは収縮が見られたが、初期形状を保っていた（Fig. 2 C, D）。これは、CG の水への溶解度が pH には大きく依存するものの、温度にはほとんど依存しないことに起因していると考える。このように CG クライオゲルはオートクレーブ滅菌が可能であった。

オートクレーブにより CG クライオゲルの収縮が見られたことから、ゲル内の高分子の化学架橋や物理架橋が進行した可能性がある。そこでまずはフーリエ変換赤外分光分析（FT-IR）により新規な共有結合（化学架橋点）の形成の可能性を調査したが、オートクレーブ処理前後でスペクトルに違いはなかった（Fig. 3）。そこで次に、CG クライオゲル中の高分子の主要な架橋点である CG 高分子の結晶化部位（物理架橋点）が増加したかを X 線回折分析（XRD）により調査した。しかし、固体に比べて結晶化度が極端に低いヒドロゲルが測定対象であったため、CG に固有の結晶ピークをいずれのゲルにも観察することはできなかった（データ省略）。

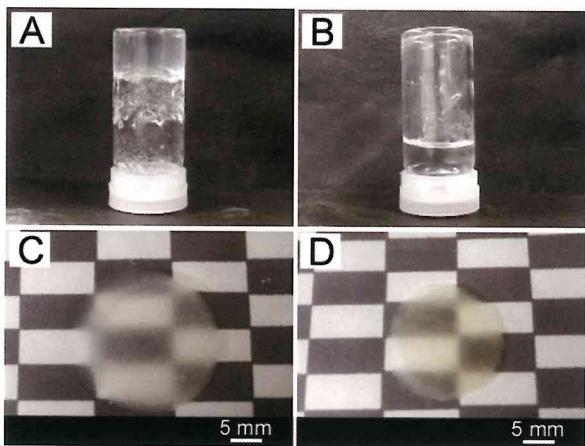


Fig. 2 PVA (A, B) and CG cryogels (C, D) before (A, C) and after autoclaving (B, D). CG cryogels were immersed in saline.

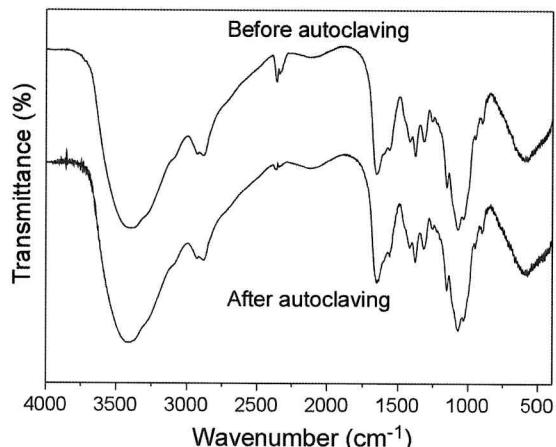


Fig. 3 FT-IR spectra of dried CG cryogels before and after autoclaving.

#### 3.2 オートクレーブ処理後の CG クライオゲルの加水分解耐性

本検討では、オートクレーブ処理により実際に CG クライオゲルの架橋度が高まったかを、ゲルの酵素による加水分解耐性を調査することにより評価した。酵素としては、ヒトの体内

に存在するキトサンの加水分解酵素であるリゾチームを利用した。その結果を Fig. 4 に示す。オートクレーブ処理後のゲルは処理前のゲルよりも分解速度が遅かった。この結果より、オートクレーブ処理によりゲルの架橋度が高まることが示された。

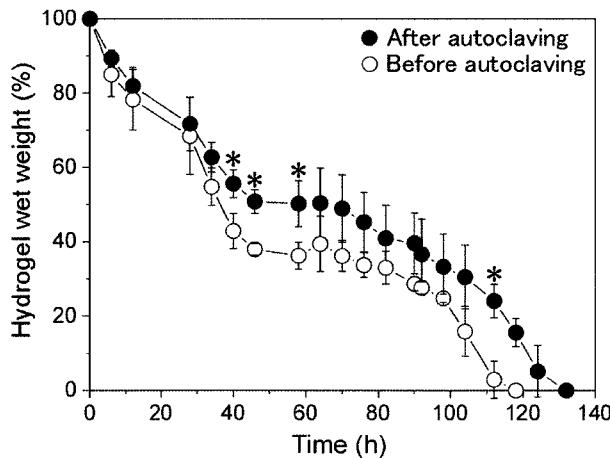


Fig. 4 Degradation rate of CG cryogels before and after autoclaving by lysozyme ( $n = 3$ , \* $p < 0.05$  vs cryogels before autoclaving at identical incubation time).

### 3.3 オートクレーブ処理後の CG クラオゲルの創傷治癒促進効果

最後に、オートクレーブ処理により滅菌したゲルと 70%エタノール水溶液に浸することで消毒したゲルの創傷治癒促進効果を比較したところ、両者の治癒速度に違いはなかった (Fig. 5)。また、治療 10 日目には両条件とも上皮化が完了していた (Fig. 6)。われわれは前報で、70%エタノール水溶液に浸することで消毒した CG クライオゲルが市販の創傷被覆材よりも高い創傷治癒効果を有していることを示した。今回の結果は、オートクレーブ処理後の CG クライオゲルが、70%エタノール水溶液により消毒した CG クライオゲルと同等の創傷治癒促進効果を有しており、さらに感染症のリスクをより低減できることを示している。

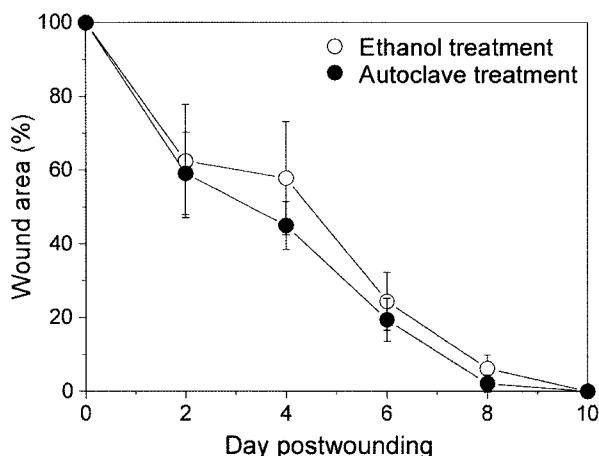


Fig. 5 Healing rate of wounds treated with autoclaved CG cryogels and those treated with 70% ethanol ( $n = 8$  (day 0, 2), 7 (day 4), 6 (day 6), 4 (day 8, 10)).

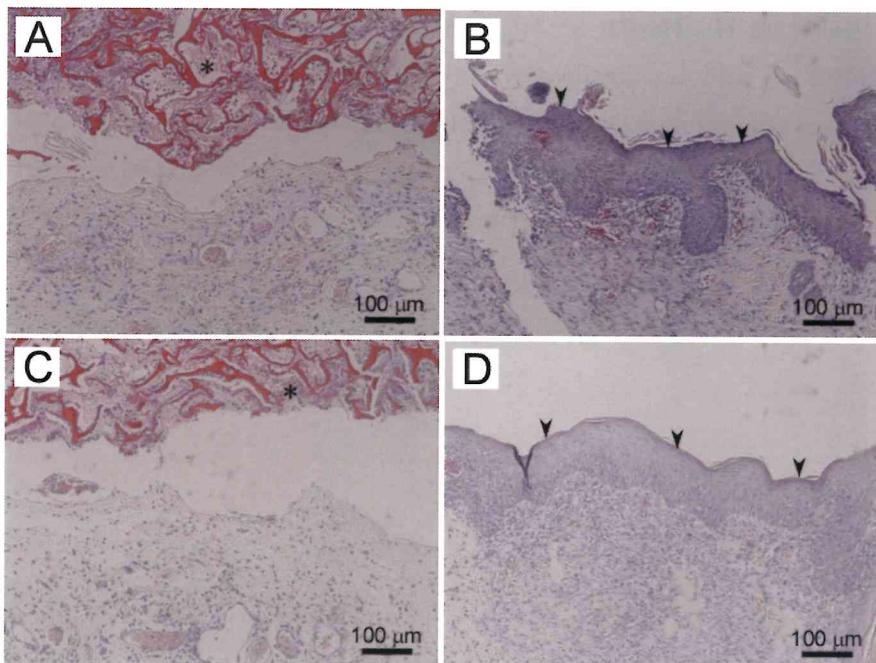


Fig. 6 Hematoxylin- and eosin-stained sections of wound tissues treated with autoclaved CG cryogels (A, B) and those treated with 70% ethanol (C, D) after 2 days (A, C) and 10 days postwounding (B, D). Negatively-charged eosin dyes the positively-charged CG cryogel skeleton in red. Asterisk indicates accumulated polymorphonuclear leukocytes.

#### 4 結論

本研究では、われわれが開発した CG クライオゲルがオートクレーブ滅菌可能であるか調査した。オートクレーブにより CG クライオゲルは収縮したが、融解することもなく、オートクレーブ滅菌が可能であった。また、オートクレーブ処理により架橋度が高まることが示された。さらに、オートクレーブ処理後のゲルは、そのような高温処理を行っていないゲルと同等の高い創傷治癒効果を保持していた。

#### 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. Nikonorov V. V., Ivanov R. V., Kil'deева N. R., Bulatnikova L. N., and Lozinskii V. I.: Synthesis and characteristics of cryogels of chitosan crosslinked by glutaric aldehyde, *Polym. Sci. Ser. A*, 52, 828-834 (2010).
2. 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).

3. Takei T., Nakahara H., Tanaka S., Nishimata H., Yoshida M., and Kawakami K.: Effect of chitosan-gluconic acid conjugate/poly(vinyl alcohol) cryogels as wound dressing on partial-thickness wounds in diabetic rats, *J. Mater. Sci-Mater. Med.*, 24, 2479-2487 (2013).
4. Rediguieri C. F., Sassonia R. C., Dua K., Kikuchi I. S., and Pinto T. D. A.: Impact of sterilization methods on electrospun scaffolds for tissue engineering, *Eur. Polym. J.*, 82, 181-195 (2016).

# Autoclavable physically-crosslinked chitosan cryogel as wound dressing

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

It has been widely known that moist wounds heal faster than dry wounds. Hydrogel wound dressings are suitable for the moist wound healing because of their hyperhydrinous 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 (CG) aqueous solution without toxic additives, for wound treatment. In this study, we examined influence of autoclave sterilization (121°C, 15 min) on characteristics of CG cryogel because complete sterilization is one of the fundamental requirements for medical devices. CG cryogel could withstand autoclaving though conventional physically-crosslinked poly(vinyl alcohol) cryogel completely melted by autoclaving. Increased crosslinking degree of CG cryogel by autoclaving enhanced resistance to enzymatic degradation of the gels. Further, the autoclaved CG cryogels retained favorable biological properties of CG cryogels before autoclaving that they promotes infiltration of inflammatory cells such as polymorphonuclear leukocytes, which have the potential to release chemical mediators effective for wound healing, in wound sites and accelerated the healing of full-thickness skin wounds. These results show great potential of the autoclavable CG cryogels as a practical wound dressing.

