

アルギン酸カルシウムを用いた非生体由来創傷治療用ハイドロゲルの開発 —ゲル化時間の制御と銀イオン放出特性—

手島 涼太 (東京理科大学 理学部第一部, r-teshima@p07.itscom.net)

水野 和浩 (成城中学高等学校理科, kmizuno@seijogakko.ed.jp)

Development of a non-biological hydrogel with calcium alginate for wound healing: Control of gelation time and release of silver ion

Ryota Teshima (Faculty of Science, Tokyo University of Science, Japan)

Kazuhiro Mizuno (Department of Science, Seijo Junior and Senior High School, Japan)

要約

本研究では、植物由来の高分子化合物であるアルギン酸カルシウムを基剤とした抗菌性創傷治療用ハイドロゲルを提案する。ハイドロゲルとは、ゲル中の三次元網目構造内に水分を含有する高分子ゲルであり、従来の高分子材料よりも生体適合性の高い素材である。そのため、医療現場においては手術中などにおける患部の止血、及び癒着防止を促す素材としてハイドロゲルの利用が進んでいる。しかしながら、それらハイドロゲルの多くは生体由来の高分子化合物や合成材料を用いており、生体内において感染症を引き起こす危険性や生体適合性に問題があることが指摘されている。そこで本研究では、植物由来高分子化合物であるアルギン酸を元にアルギン酸カルシウムハイドロゲルを調製し、安全性が高くかつ積極的な止血効果が期待される新たな創傷治療用ハイドロゲルの開発を試みた。アルギン酸カルシウムはイオン化コントロール法によりゲル化反応を制御できるが、この手法ではハイドロゲル内が酸性となり、創部での使用に適さない。そこで我々は、炭酸カルシウムと炭酸水を用いることでハイドロゲル内のpH変化を小さく、キレート剤などの添加化合物も少ない、新たな調製法を考案した。本研究において、調製したハイドロゲルが99%の高い水分含有率を有することや、ゲル化時間が35秒～383秒の範囲で調整可能であること、内部の親水性分子を放出することなどを見出した。また、ゲル内部に医療用抗菌物質である銀イオンを添加した際に、水中放置2時間において30%以上放出したことから、抗菌性を有するハイドロゲルであることが示唆された。これらの結果から、本研究にて開発したハイドロゲルは、止血や癒着防止を促す創傷治療用ハイドロゲルに適用可能であると考えられ、今後、ハイドロゲルとしての硬度の強化やin vivo評価を行うことにより、医療現場で利用されることが期待される。

キーワード

創傷治療用ハイドロゲル, アルギン酸カルシウム, 非生体由来, 銀イオン, 抗菌性付与

1. はじめに

創傷治療用ハイドロゲルとは、手術中などにおける患部の止血及び癒着防止を促すハイドロゲルのことである(村上, 2008)。現在、利用されている創傷治療用ハイドロゲルとして、シアノアクリレート系組織接着材がある。これは水を開始剤としてシアノアクリレートが重合することによって調製され、接着強度が高いことなどが利点として挙げられる。しかし、分解物として毒性の強いホルムアルデヒドが生成される他、血管閉塞などの後遺障害が生じる可能性が指摘されている。その他、創傷治療用ハイドロゲルにはフィブリン系止血材やゼラチン/アルデヒド系止血材など様々な種類があるが、その多くは生体由来高分子化合物や合成材料を用いている。生体由来高分子化合物は、体内で予期しない感染症を引き起こす危険性があることが近年報告されており(Komatsu et al., 2014)、合成材料においても、性質の制御はしやすいが、生体適合性に問題があることが指摘されている(小沢, 2014)。

このような問題を解決するために、筆者らはアルギン酸カルシウムを用いた新たな創傷治療用ハイドロゲルを開発した。アルギン酸は、藻類から抽出される植物由来の高分子化合物で、2種類のウロン酸(D-マンヌロン酸(M)とL-グルコ

ン酸(G))を構成糖とする直鎖的な高分子多糖である。そのカルシウム塩であるアルギン酸カルシウムは、ウロン酸のカルボキシ基と2価のカルシウムイオンが架橋構造を形成することによって生じるゲル状物質である。アルギン酸カルシウムは、滲出液や血液中のナトリウムイオンによって、カルシウムイオンが交換されることにより血液凝固を活性化するため(宮本他, 2003)、本研究で開発した創傷治療用ハイドロゲル(Calcium Alginate Hydrogels, 以下CAHs)は患部を覆うハイドロゲルとしての役割に加え、それらによる積極的な止血効果も期待される。また、植物由来の高分子化合物であるアルギン酸カルシウムは、従来の生体由来高分子化合物よりも安全性の高い高分子化合物であることが知られている(加藤, 2007)。

通常、アルギン酸カルシウムは、アルギン酸ナトリウム溶液と塩化カルシウム溶液などのカルシウムイオンを含む溶液を反応させることによって生成する(小沢, 2014)。しかし、この架橋反応は極めて瞬間的であり(宮島, 2009)、ゲル化時間を制御することが困難であった。これに対して金属イオンのアルギン酸への接触を調整し選択的にゲル化反応を制御するイオン化コントロール法が報告されている(脇坂, 2015)。この場合、イオン化していないカルシウムとアルギン酸ナトリウムは、ゲル化することなく混ぜ合わせることが可能である。これを目的の形状に整えた後、徐々にカルシウムイオンを放出させれば系全体で均一に反応が進行し、形状の操作が可能

となる(西成, 2007)。カルシウムをイオン化させないためには、リン酸塩やEDTAなどでキレートしてしまう方法がある。逆にカルシウムのイオン化の促進には、酸を加えてカルシウム塩の溶解度をあげてやればよく、クエン酸を用いることで素早いゲル化が促せることが確認されており、これらのゲル化システムは主に食品分野で応用されている(西成, 2007)。

しかし、医療現場で使用することを目的とすると、医療用ハイドロゲル内のpH条件が酸性であることは、好ましいことではない(Komatsu et al., 2014)。そこで、我々は炭酸カルシウムを電解質とし、それを電離させる溶液として炭酸水を用いる新たなゲルの調製方法を考案した。クエン酸の酸解離定数pKaは2.87であり、炭酸の酸解離定数pKaは6.35である。そのためクエン酸を用いた従来の手法よりも、炭酸を用いる手法の方がハイドロゲル内を酸性にしなくてすむ。医療現場で用いることを考えた場合、キレート剤などの添加化合物が少なく、pH変化も小さい本手法が適していると言える。また、本研究ではハイドロゲル内に医療用抗菌物質である銀イオンの添加を実施した。CAHs内への銀イオンの添加に関しては、酢酸銀水溶液にハイドロゲルを浸す手法で、Ronan, John M.らによって1998年に国際特許が取得されている。しかしながら、本研究で用いた手法は、金属銀を水を酸化剤として酸化させ銀イオンとし、その溶液をハイドロゲル調製時の溶媒に含ませる手法であり、患部で直接ゲル化を促す際、調製したハイドロゲルを酢酸銀溶液に浸す必要がないため、実際の医療に適した手法であると言える。本研究で開発を試みたCAHsの概念図が図1である。本研究では、アルギン酸カルシウムを用いた安全かつ積極的な止血効果が期待される非生体由来創傷治療用ハイドロゲルを開発することを目的とし、検討した。

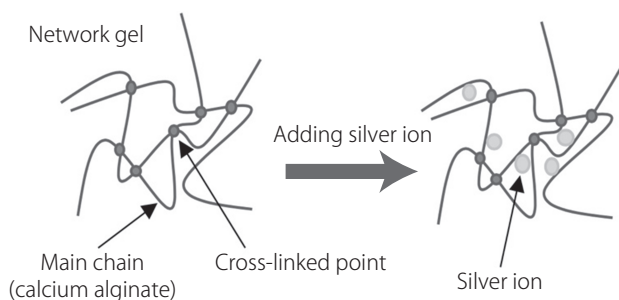


図1：銀イオン含有CAHsの概念図

2. 実験

2.1 試薬と器具

アルギン酸カリウム(株式会社キミカ、キミカルギンK-3)、炭酸カルシウム(沈降 国産化学株式会社)、炭酸水(アサヒ飲料株式会社、WILKINSON)、精製水(サンエイ化学株式会社、純水100%)、食用色素 赤(共立食品株式会社、4901325-001245)、銀イオン電解水 シルビオンP(日本イオン株式会社)、リン酸(特級 林純薬工業株式会社)、硫酸マンガ(II)五水和物(特級 純正化学株式会社)、ペルオキシ二硫酸カリウム(特級 関東化学株式会社)、塩化ナトリウム(1級

昭和化学株式会社)、可視分光光度計(PASCO PS-2600)、分析用電子天秤(AND HT-120)、プラスチックセル(No.749004)

2.2 CAHsの調製

20 g/Lアルギン酸カリウム水溶液20 mLと10 g/L炭酸カルシウム白濁液15 mLをスターラーを用いて充分に混合させた後、炭酸水15 mLを添加し、素早く攪拌後、放置し、CAHsを調製した。この操作は全て室温(23 ~ 27°C)で行った。

2.3 親水性分子のゲル内外における自由拡散

親水性分子の拡散を視覚的に捉えるため、本実験では親水性分子として食用色素 赤の色素成分であるNew Coccineを用いた。20 g/Lアルギン酸カリウム水溶液20 mLと10 g/L炭酸カルシウム白濁液15 mLをスターラーで充分に混合させた後、食用色素 赤0.05 gおよび炭酸水15 mLを添加し、素早く攪拌してセル(12.5 × 12.5 × 45 mm)に流し込んでゲルを調製した。このゲルを精製水で表面洗浄を行った上で、生理食塩水(0.9 w/v塩化ナトリウム水溶液)を含ませたろ紙の上に30分間放置し、ろ紙の状態を観察した。また、上記の方法で作成し表面洗浄したゲルを生理食塩水10 mLに浸し、30分間放置した。

2.4 水分含有率

シート型に流し込んで作成したCAHsの総重量を測定し、45°Cのインキュベーター内に放置して、重量の変化を記録した。その重量の変化から水分含有率を算出した。

2.5 ゲル化時間の測定

3.3、6.7、10、20 g/L炭酸カルシウム白濁液15 mLと20 g/Lアルギン酸カリウム水溶液20 mLをそれぞれスターラーで充分に混合させた後、炭酸水15 mLを添加し、素早く攪拌して、そのうち5 mLをサンプル管(内径25 mm、高さ57 mm)にとり、ゲル化時間を測定した。ゲル化の判定は、サンプル管を180°転倒させることで判定する試験管倒立法(長田・梶原, 2003)に基づき判定した。この操作は全て常温(23 ~ 27°C)で行なった。

2.6 銀イオンを含有したCAHsからの銀イオン放出量

銀イオン放出量の測定は、山田ら(2000)が報告している方法を用いた。20 g/Lアルギン酸カリウム水溶液と10 g/L炭酸カルシウム白濁液の溶媒を精製水から銀イオン電解水に変更し、銀イオン含有量3,200 ngのCAHsを3つ調製した。調製したゲルを精製水10 mLが入った試験管の中に入れ、10分、20分、30分、60分の間隔でゲルを取り出し、再度新たな精製水10 mLが入った試験管に移すことを繰り返した。その後、新たな試験管に 6×10^{-3} Mの硫酸第一マンガン溶液とリン酸の1:1混合溶液(v/v)を2 mLずつ入れた後、先にゲルを取り出した試料溶液を8 mL加えた。その後、この試験管にペルオキシ二硫酸カリウム0.5 gを添加し、ゴム栓をして10回ふり混ぜ、100°Cで3分間加熱した。加熱後、流水にて10分間冷却して、1分後に525.2 nmにおける吸光度を計測した。検量線は、山田ら(2000)の報告に基づいて筆者らが実験的に作成

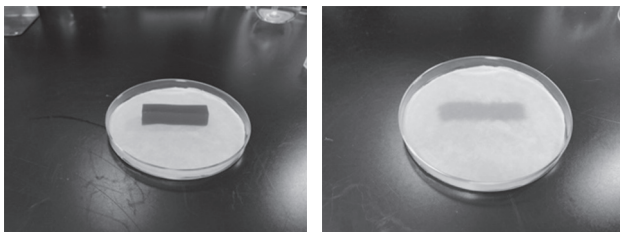
したものを用いた。

3. 結果

3.1 CAHsの物性評価

先で述べたようにアルギン酸カルシウムの鋭敏な架橋反応をどのように時間コントロールするかは、一つの大きな課題であった。そこで、我々は反応条件を検討し、難溶性のカルシウム塩である炭酸カルシウムを電解質とし、炭酸カルシウムを電離させる溶液として炭酸水を用いる新たな手法を考案し、CAHsを調製する事に成功した。

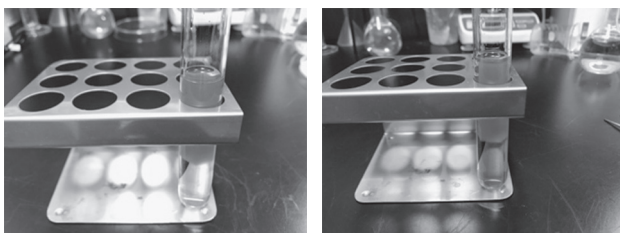
その物性評価として、まずCAHsに含有した親水性分子の挙動を観察するため、赤色素New Coccineを含有させたCAHsを調製した。このゲルを生理食塩水を含ませたろ紙上に置き、30分間放置した。その後CAHsを取り除くと、ろ紙上にNew Coccineの着色が確認でき、New Coccineのゲルからろ紙への移動が認められた(図2)。また、色素を含有させたCAHsを生理食塩水中で30分間放置すると、New Coccineの生理食塩水中への放出が認められた(図3)。さらに、45℃インキュベーター中でのCAHsの水分含有量の経時変化の測



(a)ゲルを置いた直後

(b)ゲルを取り除いた後

図2：生理食塩水を含ませたろ紙上におけるゲル中の赤色素の移動の様子



(a)ゲルを添加した直後

(b)添加してから30分後

図3：生理食塩水への赤色素の自由拡散の様子

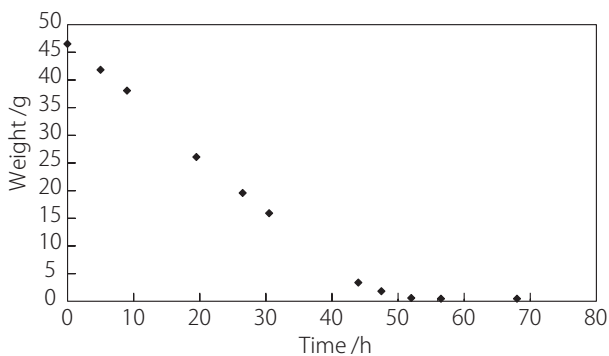


図4：CAHsの重量変化



(a) 精製水に浸漬する前のゲル

(b) 精製水中に1週間浸漬したゲル



(c) 生理食塩水に浸漬する前のゲル

(d) 生理食塩水中に1週間浸漬したゲル

図5：ゲルの精製水中及び生理食塩水中における安定性評価

定を行った。加熱開始前のハイドロゲルの重量は46.5gであった。総重量は時間経過とともに徐々に低下し、52.5時間で0.45gとなり、それ以降はほぼ一定となった(図4)。このことから、CAHsの水分含有率は99.0%であると算出された。また、CAHsの安定性について、CAHsを精製水及び生理食塩水中に1週間放置し形状の観察を行なったところ、重量の変化は認められたが、崩壊等の変化は認められなかった(図5)。

3.2 CAHsのゲル時間の制御

CAHsのゲル化時間制御の試みとして、炭酸カルシウムの仕込み濃度を变化させてゲル化時間の測定を行った。まず、炭酸カルシウム濃度が3.3 g/Lの場合は、ゲル化に到達するまでの時間が383秒であった。その後、炭酸カルシウム濃度を増加させていくと、CAHsのゲル化時間が減少し、20 g/Lでは35秒であった(図6)。このように、炭酸カルシウムの仕込み濃度を調整することによって、ゲル化時間を制御することに成功した。

3.3 CAHsからの銀イオンの放出

ここで、CAHsに含有された銀イオンの放出量を経時的に測定した。山田ら(2000)の手法で筆者らが作成した検量線に基づいて、各放出時間において検出された銀イオン量を算出した。結果を図7に示す。

得られた結果よりハイドロゲルの銀イオン放出量(平均値)

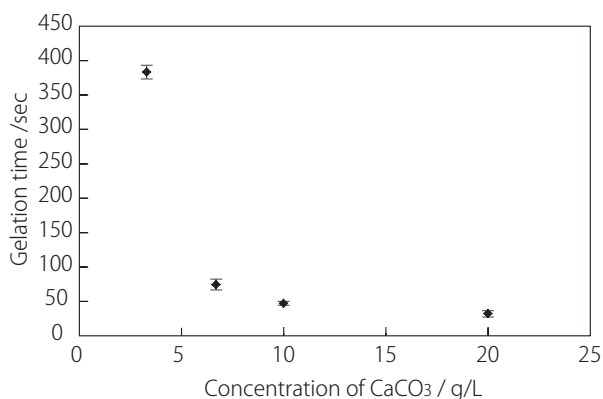


図6：炭酸カルシウム量とゲル化時間の関係

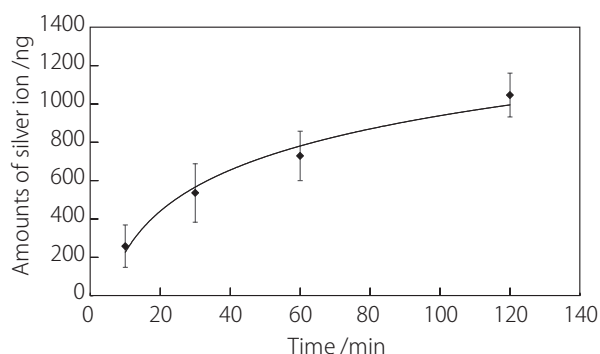


図7：CAHsの銀イオンの放出量と放置時間の関係

は時間に応じて増加することがわかる。銀イオンの含有量は3,200 ngであり、放置2時間後の銀イオンの放出量は1,046 ngであることから、放出割合は30%以上であるとわかった。

4. 考察

本研究において、我々はアルギン酸カルシウムのゲル化時間の制御に成功し、CAHsを開発することができた。そして、CAHsが内部の親水性分子を放出すること、水分含有率が99%であること、また、ゲル化時間は炭酸カルシウム濃度の調節により制御可能であることを見出した。

親水性分子の放出について、CAHsを生体内で利用することを考慮した場合、それらが自由拡散に任せて放出されることは極めて重要な性質である。本実験において、New Cocaineが生理食塩水を含んだろ紙及び生理食塩水中に放出されたことは、CAHsが親水性分子を放出する性質を有することを意味している。今後、放出速度をより緻密に制御する手法を開発することができれば、ゲルを構成する分子鎖間に薬物を保持させることも可能であり、手術後に継続して治療を行う術後療法や体内留置型の薬物放出デバイスなどへの利用も期待される(村上, 2007)。

また、生体組織における水分率は70~80%である(秋山, 2007)ことから、CAHsの99%という水分含有率は、ゲルの中でもかなり高い水分含有率と言える。水分含有率が低いと、生体適合性に問題が生じてしまう可能性があるが、CAHsにおいてはそのような可能性は低いことが推察できる。

ゲル化時間の制御については、炭酸カルシウム濃度を変化させることによって、35秒~383秒の範囲で制御できることが明らかとなった。一般的な創傷治療用ハイドロゲルのゲル化時間は数十秒~数十分とされるため(村上, 2007)、CAHsは創傷治療用ハイドロゲルに必要とされるゲル化時間内で調製することが可能である。

安定性については、市販のハイドロゲル型創傷被覆材の連続使用期間が、1週間であったことから(小林他, 2014)、安定性評価時間を1週間とし評価した。図5より崩壊等の形状変化はないことから、本実験系で調製したハイドロゲルは安定性に優れていることが明らかとなった。本実験結果からCAHsの安定基準は創傷治療用ハイドロゲルへの適用基準を満たしている。

銀イオンの放出性については、時間に応じて放出量が増加することが確認され、患部における抗菌性が発揮されることが期待される。医療現場での使用を考慮すると、CAHs内に均一に銀イオンを含有させ、放出量についてさらに誤差を無くす必要があると考えられる。また、ハイドロゲル内への銀イオンの取り込みについて、網目構造内の銀イオンの正電荷をどのように補償しているのか明らかにする必要もあると考える。補償の方法として、銀イオンと同時に、溶液中の負電荷を持つイオンがカウンターアニオンとして取り込まれている可能性やアルギン酸の-OHプロトンが解離する可能性などが挙げられるが、これらの機構の解明については今後検討する必要がある。

5. 結論

本研究において、炭酸カルシウムと炭酸水を用いることでCAHsの開発に成功し、CAHsのゲル化時間の制御が炭酸カルシウム濃度の調節によって可能であることを見出した。また、本研究で調製したCAHsは、高い水分含有率を有することや親水性分子を放出することが明らかとなった。さらに、CAHsの内部に含有した銀イオンが水中放置2時間において含有量の30%以上放出することが明らかとなった。本研究で得られた結果は、CAHsが創傷治療用ハイドロゲルへの応用が期待できることを示している。今後、銀イオンがCAHs内に取り込まれる機構の解明やin vivo評価を実施することにより、患部の形状により形状変化するCAHsとして医療現場での応用が期待される。

謝辞

本論文の執筆において、東京理科大学理学部第一部応用化学科、大橋祐美子助教ならびに、東京理科大学理学部第一部化学科、亀淵萌助教に懇切丁寧なご指導をいただいた。ここに深く感謝いたします。また、有用な助言を頂いた東京理科大学薬学部薬学科、花輪剛久教授ならびに東京理科大学薬学部薬学科、河野弥生講師に厚く御礼申し上げます。

引用文献

秋山庸子(2007). 生体高分子と水の相互作用に関する基礎的研究—陽電子消滅法と熱分析を用いた検討—. 大阪大学大学院工学研究科 博士学位論文.

- 小沢文智 (2014). ハイドロゲル形成の電気化学的制御および3次元ゲル培養による生体組織構築に関する研究. 東北大学大学院環境科学研究科環境化学・生態学コース 博士学位論文.
- 加藤隆史 (2007). バイオミネラゼーションとそれに倣う新機能材料の創製. シーエムシー出版.
- 小林愛雲・太田英佑・大和弘之 (2014). 結晶生成一イオン架橋による複合ハイドロゲルの開発一. 栃木県産業技術センター研究報告, No. 12.
- Komatsu, S., Nagai, Y., Naruse, K., Kimata, Y. (2014). The neutral self-assembling peptide hydrogel SPG-178 as a topical hemostatic agent. *PLOS ONE*, Vol. 9, No. 7, e102778.
- 長田義仁・梶原莞爾 (2003). 普及版 ゲルハンドブック, 第2刷. エヌ・ティー・エス.
- 西成勝好 (2007). 食品ハイドロコロイドの開発と応用. シーエムシー出版.
- 宮島千尋 (2009). アルギン酸類の概要と応用. *SEN'I GAK-KAISHI (繊維と工業)*, Vol. 65, No. 12.
- 宮本武明・赤池敏宏・西成勝好 (2003). 天然・生体高分子材料の新展開, 普及版, 第1刷. シーエムシー出版.
- 村上義彦 (2007). 架橋性の生体高分子や自己組織化体が形成する新規バイオマテリアルの医療応用. *高分子論文集*, Vol. 64, No. 8, 486-497.
- 村上義彦 (2008). 高分子系生体材料. *化学と教育*, Vol. 56, No. 6, 254-257.
- 山田悦・沖田秀之・山田武・平野宗克・成田貞夫 (2000). 殺菌作用を持つ微量銀イオンの接触分析法. *分析化学*, Vol. 49, No. 6, 419-422.
- Ronan, J. M. and Thompson, S. A. (1998). Medical devices containing in-situ generated medical compounds. WO 9802114. A1.
- 脇坂亨 (2015). 泡消火薬剤の耐アルコール性に関する研究. 東京理科大学大学院国際火災研究科火災科学専攻 修士論文.

(受稿：2018年11月27日 受理：2018年12月25日)