

体液中グルコースがトリガーとなり創傷部位を被覆・修復する新規モイストヒーリング剤の開発

大阪大学基礎工学研究科

境 慎 司

Moist wound healing is an approach to wound care under moistened condition given by dressings. The approach is effective for rapid healing with reduced scarring. The motivation of our project is to develop a novel wound dressing for moist wound healing. Our strategies to use the molecules contained in exudate as a trigger of in situ hydrogelation for covering wounds for giving moistened condition. In this report we investigated the feasibility of a horseradish peroxidase (HRP)-catalyzed hydrogelation system for aqueous solutions of polymers using an alginate derivative bearing phenolic hydroxyl moieties (Alg-Ph). We tried to supply the H_2O_2 necessary for the HRP-catalyzed reaction through glucose oxidase (GOx)-catalyzed oxidation of glucose contained in serum. The possibility of the system was demonstrated by the hydrogelation of the mixture solution of Alg-Ph, HRP, GOx on the nonwoven mats containing human serum. The time required for gelation of the Alg-Ph solution containing HRP and GOx was variable within 1 min by changing the contents of enzymes at 4.6 mM glucose. In addition, the resultant hydrogel had an antimicrobial property. These results indicate the great potential of the glucose-triggered hydrogelation system for moist wound healing.

1. 緒 言

けがやヤケドにより生じる創傷部位が傷跡として残ると、部位によっては常に他人の視線を気にする必要があるなど、社会生活において患者は精神的負担を背負うこととなる。そのような患者を減らすために、創傷部位の傷跡を残りにくくするさまざまな治療法の開発が進められている。

近年、創傷部位の修復を促進し傷跡をより残りにくくする治療法として、モイストヒーリングの有効性が広く認知されるようになってきている¹⁾。モイストヒーリングとは、傷口に滲出してくる体液を乾かさずに保持して組織の再生を早める方法であり、傷跡が残りにくかったり、患部の乾燥に起因する痛みが少なかったりといった利点も有している。そのための創傷被覆材としてはニチバン(株)のビューゲルや東洋化学(株)のハイドロヘルプなどがフィルム状の製品としてすでに市販されている。また、医療現場ではハイドロジェル・ドレッシング材として数種が使用されている。これらは創傷部位の修復に有効であることが実証されている一方で、使用時にはすでに整形されているため、広範囲の傷には適用が難しいことや、複雑な形状の創傷部位では傷の深い部分と接触できない部分が生じるなどの欠点がある。例えば、褥瘡(床ずれ)や糖尿病に由来する皮膚潰瘍のような比較的広範囲かつ3次元的にも複雑な形状をしている

創傷部位を良好に被覆することは難しい。

このように使用時に既に成形されているドレッシング材に対して、溶液状態で創傷部位に塗布し、その後患部でゲルを形成させるハイドロジェル・ドレッシング材の検討・開発も行われている。このタイプのドレッシング材は複雑な形状の創傷部位にもフィットさせることが可能であり、さらに広い面積の創傷部位にも容易に適用可能であるといった利点を有している。これまでに、光架橋性の官能基を導入したキトサン水溶液を患部に塗布した後に紫外光を照射してゲルを形成させる方法²⁾や、酸化アルギン酸水溶液とゼラチン水溶液を患部に塗布する直前に混合し、患部でゲルを形成させる方法³⁾などが報告されている。

本研究課題では、生体適合性の高いアルギン酸やヒアルロン酸、ゼラチン、ポリビニルアルコールなどの誘導体溶液を患部に塗布し、体液から供給されるグルコースをトリガーとしてゲル化を進行させることで創傷部位を被覆するハイドロジェル・ドレッシング材の開発を試みた。この反応に必要な多糖誘導体は、フェノール性水酸基(Ph基)を導入したものであり、過酸化水素を消費して進行する西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ(HRP)の酵素反応により架橋される。グルコースをトリガーとする仕組みとして、グルコースオキシダーゼ(GOx)をHRPならびに多糖誘導体と同一系内に仕込むことで、グルコースから過酸化水素を発生させることを試みた(図1)。

本稿では、GOxとHRPの酵素反応を経て得られるゲルのゲル化所用時間の制御ならびにGOxの酵素反応を介さない過酸化水素を直接反応系に添加して得られるゲルとのゲル化特性の比較、得られるゲルの有する抗菌性に関する検討結果を報告する。



Development of dressings for moist wound healing in situ gellable through the reaction triggered by plasma glucose

Shinji Sakai

Department of Materials Science and Engineering, Osaka University

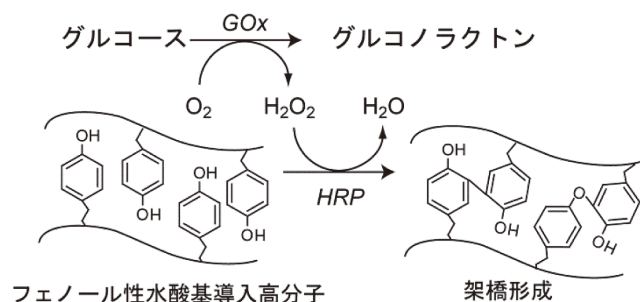


図1 GOxとHRPの酵素反応を経るフェノール性水酸基導入分子間の架橋形成反応模式図。

2. 実験

2.1 Ph基導入アルギン酸の合成

Ph基導入アルギン酸 (Alg-Ph) は、以下に示す既報の方法⁴⁾によりアルギン酸ナトリウムとチラミン塩酸塩をpH6.0の50mM 2-モルホリノエタンスルホン酸緩衝液中で、水溶性カルボジイミドと*N*-ヒドロキシスルホスクシンイミドを用いて縮合させて作製した。なお、本研究で使用したアルギン酸誘導対中のPh基の含有量はアルギン酸中のウロン酸100ユニットあたり2個であった。また同様の方法によりPh基を導入したポリビニルアルコール誘導体 (PVA-Ph) も作製した。

2.2 GOxとHRPの反応を経るゲル形成の確認

図1に示したGOxとHRPの酵素反応を経るフェノール性水酸基の架橋によるゲル形成の可否を確認するために、0.75% (w/v) のAlg-Ph水溶液にグルコースを4.6mMとなるようにガラス瓶に注いだ。この溶液に、GOx (0.8 mL/mL) とHRP (15U/mL) を片方もしくは両方添加し、10分後に瓶の上下を逆さまにすることでゲル化の確認を行った。

2.3 体液との接触によるゲル形成評価

ヒト血清に含まれるグルコースによってゲル化可能であるかを評価するために、折りたたんだ実験用不織布シート (0.28g) に5mLのヒト血清 (Sigma社より入手) を含ませ37℃に保温した。この不織布シート上にAlg-Ph、GOx、HRPをそれぞれ3% (w/v)、100U/mL、100U/mLで含む水溶液に微量のメチレンブルーを添加したものを滴下し、10分後にゲル化確認を行った。

血液と接触することによるゲル化の可否を評価するために、マウス (雄、6週齢) の静脈を傷つけ出血させた。この患部に上記と同様の組成のAlg-Ph溶液を滴下し、ゲル化の確認を行った。なお、本実験は、大阪大学動物実験委員会の承認のもと、動物実験に関わるガイドラインを遵守して実施した。

2.4 ジチラミン結合形成の測定

Ph基間の架橋形成反応の進行度合いを評価するために、Ph基間の結合の形成によって生じるジチラミン結合の蛍光測定を行った (excitation 315nm, emission 410nm)。この測定では、1.5% (w/v) のAlg-Phを溶解するリン酸緩衝液 (pH7.4) を500μLずつプラスチックチューブに入れ、ここに111μLずつのHRPとGOx水溶液を添加した後、56μLのグルコース水溶液を添加して反応を開始した。攪拌後すぐに、96ウェルのブラックウェルプレートに200μL注ぎ、蛍光の経時変化を測定した。

2.5 ゲル化所要時間の測定

Alg-Ph溶液のゲル化所要時間は、以下に示す既報の方法⁵⁾にしたがって測定した。1.1% (w/v) のAlg-Phを溶解するリン酸緩衝液 (pH7.4) を24ウェルプレートに各ウェル450μLずつ分注し、そこに100μLのHRPとGOx混合水溶液100μLを添加するとともに、マグネチックスターラーを用いて攪拌した。次いで攪拌下、50μLのグルコース水溶液を添加し、溶液表面が盛り上がり、明らかに溶液状態と異なる挙動を示した時間までをゲル化に要した時間とした。

2.6 ゲルの力学的特性測定

1.5% (w/v) のAlg-Ph水溶液を24ウェルプレートの各ウェルに1.5mLずつ分注した。0.32mLのGOxとHRPの混合溶液を添加した後、0.16mLのグルコース溶液を添加して10秒間攪拌した。ゲル化する前に攪拌子を取り出し、37℃の条件下で1時間もしくは24時間静置した。ゲルの圧縮-反発力の測定は卓上型材料試験装置 (EZ-test, 島津製) を用いて行った。

2.7 ゲルの抗菌性測定

GOxの作用によりグルコースより過酸化水素が発生する。このため、発生する過酸化水素の作用により形成したゲルが抗菌性を有することが期待される。これを確かめるために、7% (w/w) PVA-Ph、HRP0.5U/mL HRP、25U/mL GOxを含む水溶液に4.6mMとなるようにグルコースを添加してゲルを作製した。このゲルを雑木林から採取した腐葉土に水を加えて得られた上澄み液を塗布したポリペプトン、イーストエキストラクト、グルコースを含むPYG寒天培地上に置き、25℃に保温することで抗菌性の評価を行った。コントロールとしてGOxを用いずに過酸化水素の添加によって得られるゲルを用いた。

3. 結果

3.1 GOxとHRPの反応を経るゲル形成

グルコースを溶解させたAlg-Ph水溶液にGOxとHRPの

いずれか一方を溶解させただけでは、溶液はゲル化することにはなかった(図2)。一方で、GOxとHRPを両方添加した場合にはゲルが形成した。この結果は、GOxの反応により生成した H_2O_2 を消費するHRPの反応によりフェノール性水酸基同士の架橋とそれによるゲル化が可能であることを示している。

ヒトの体液と接触することでゲルを形成可能であるかどうかを評価するために、ヒトの血清(血糖値6.1mM)を含ませた不織布にAlg-Ph、GOx、HRPの混合溶液を塗布した。塗布後、約30秒で図3に示すようにピンセットで持ち上げられる強度を有するゲルが形成した。さらに、血液と接触することでゲル化が可能かどうかを確認するために、マウスの出血部位に溶液を塗布したところ、Alg-Ph溶液単独ではゲルが形成しなかったが、GOxとHRPを混合した溶液ではゲルが形成した(図4)。

3.2 ジチラミン結合の形成評価とゲル化所要時間の測定

図5にヒトの正常血糖値とほぼ同じとなるようにグルコース濃度を4.6mM一定としてGOxとHRPの濃度を変化



図2 グルコース含有 Alg-Ph 水溶液が HRP と GOx の存在下でのみ形成したゲル(右端)。

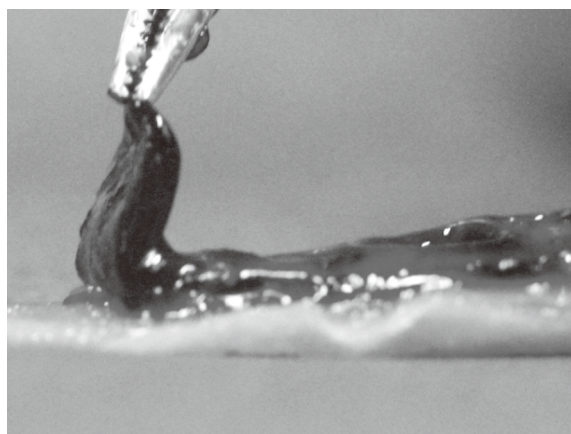


図3 ヒト血清を染みこませた不織布上で GOx と HRP の酵素反応を経て形成したゲル。

させた場合の、3成分混合直後から2分間のジチラミン形成に起因する蛍光の強度増加速度変化を示した。GOxの濃度が0.8U/mLの条件では、HRPの濃度を1から15U/mLまで増加させてもジチラミン形成初速度に変化はなかった。一方で、GOxの濃度を0.8から8.3U/mLへ増加させるとジチラミンの結合形成速度も約10倍向上した。

図6にゲル化所要時間に与える各成分濃度の影響を示した。グルコース濃度が4.6mMよりも高い範囲では、ゲル化所要時間に対するHRP濃度の明確な影響は確認されなかった。しかし、1.4mMにおいては1U/mLでゲル化に約400秒要したのに対し、15U/mLでは約150秒に短縮された(a)。また、ジチラミン結合形成評価の結果と同じく、GOxの濃度の増加と共にゲル化所要時間は減少し、8.3U/mLでは14秒でゲル化した(b)。

3.3 ゲルの力学的特性評価

図7に4.6mMのグルコースからGOxの反応により生成する過酸化水素を消費して得られたゲルおよび、直接4.6mMとなるように過酸化水素を添加して得られたゲルを圧縮した際の反発力を測定した結果を示した。反応開始



図4 マウスの出血部位で GOx と HRP の酵素反応を経て形成したゲル。

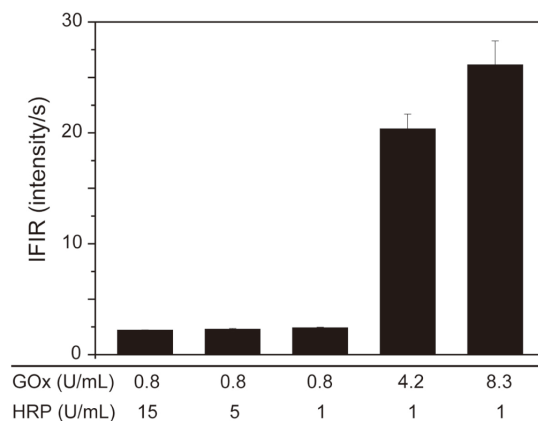


図5 GOx と HRP の濃度とジチラミンの形成初速度 (IFIR) の相関. グルコース濃度: 4.6 mM に固定。

1時間後においては、ゲル間に顕著な差はなかった。24時間後にはGOxの反応により過酸化水素を供給して得られたゲルの2mm圧縮時の応力が1時間後に測定した値の約10倍に達した。これに対して、過酸化水素を直接添加して得られたゲルは24時間後も1時間後とほぼ同じ挙動を示した。

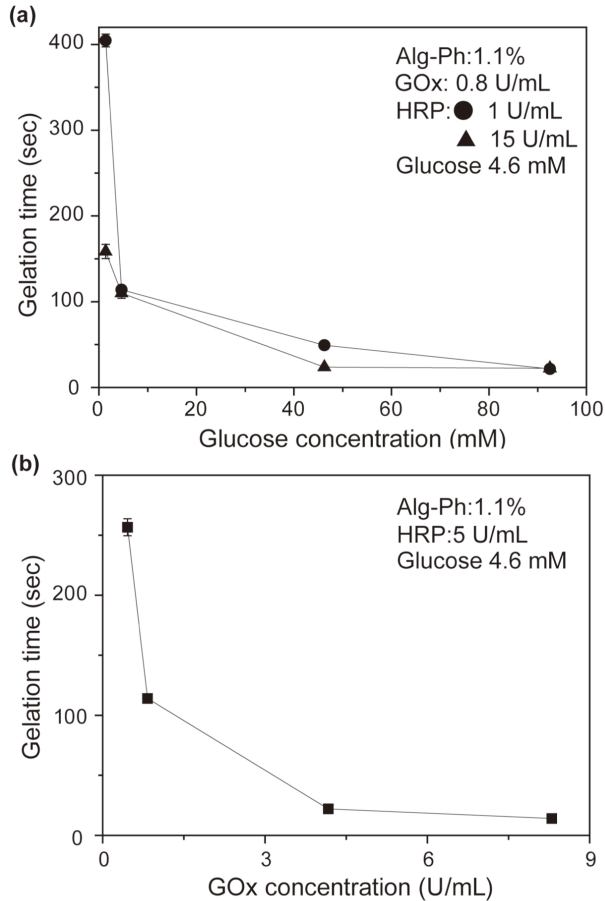


図6 (a)グルコース、(a)HRP と(b)GOx 濃度とゲル化所要時間の相関。

3.4 ゲルの抗菌性評価

図8に腐葉土と混ぜた水の上澄みを塗布した寒天培地の経時変化の様子を示す。PVA-Phゲルを形成させていない寒天培地は菌体・微生物の増殖により全体的に白くなった。一方で、GOxとグルコースから過酸化水素を発生させて得られたゲルの表面には白くならない領域が115時間経過後も存在していた。これに対して、GOxによらず直接過酸化水素を添加してゲルを形成させたものでは、培養開始16時間後まではGOxを含むゲルと同じ程度の白くならない領域が存在したものの、その大きさは時間経過と共に減少し、40時間後にはなくなった。

4. 考察

本研究課題では、体液と接触すると患部でヒドロゲルを形成し、さらに創傷治癒を促進する新しいモイストヒーリ

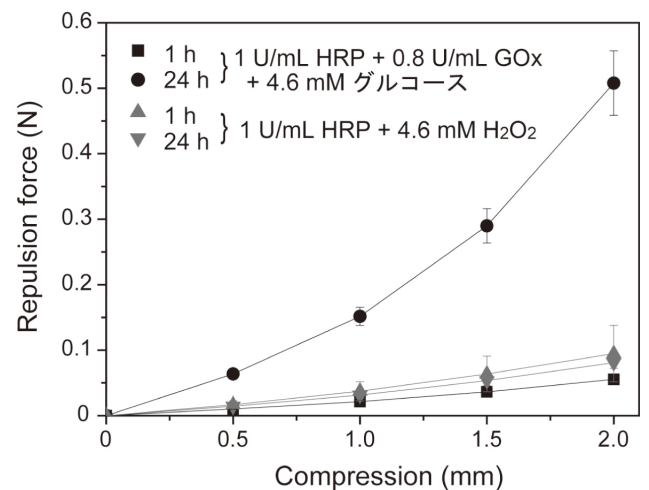


図7 GOx と HRP の酵素反応を経て得られたゲルおよび H₂O₂ を直接添加して得られたゲルの圧縮－反発力特性の経時変化。

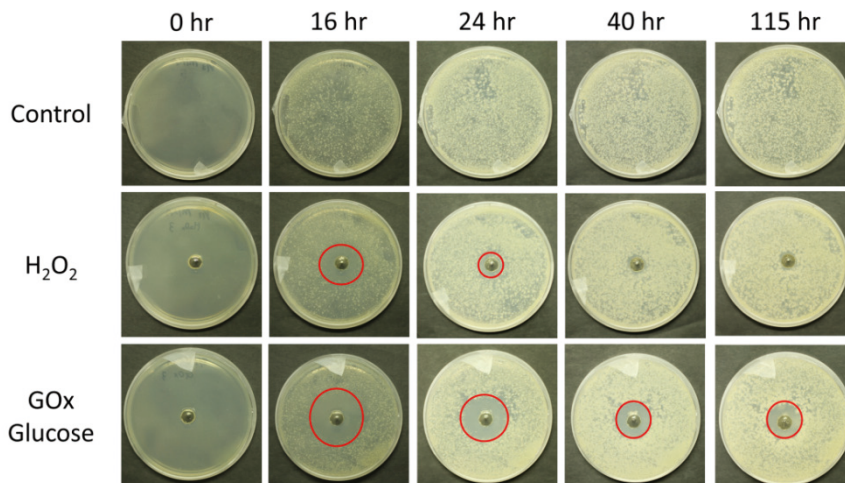


図8 PYG 寒天培地上に腐葉土抽出水溶液を塗布し、過酸化水素の直接添加およびGOxの反応によりグルコースより過酸化水素を生成させて形成させたゲルを留置した後の経時変化。

ング剤の開発を目的としている。これまで著者らが取り組んできたのは、フェノール性水酸基を導入した高分子の水溶液にHRPを溶解させ、そこに過酸化水素を直接添加することでゲルを形成させるものであった。これに対して、本研究においてグルコースから過酸化水素を生成するGOxの酵素反応を用いると、体液中に存在するグルコースをトリガーとしてヒドロゲルを形成させることが可能であることが明らかになった(図3, 4)。また、GOxやHRPの濃度を制御することによってゲル化に要する時間を制御することができ、数十秒でゲル化できるような条件を見出すこともできた。

図5に示したジチラミン結合の形成に関する検討において、グルコース濃度4.6mM、GOx濃度0.8U/mLの場合に、HRP濃度を変化させても結合形成初速度に差が生じなかった結果は、図1に示した反応経路においてGOxの反応が律速段階になっていたことを示している。ゲル化時間を測定した図6に示した結果において、4.6mM以上のグルコース濃度ではHRP濃度が1U/mLと15U/mLの場合においてゲル化時間に差が生じなく一方で、グルコース濃度1.4mMの場合にはHRP濃度15U/mLの条件で明らかにゲル化所要時間が短かった結果も、GOx反応が律速であったことを示している。

ゲルの力学的特性評価において、GOxの反応を介して過酸化水素を供給した系で反応開始1時間目から24時間目までに圧縮に対する反発力が大きく向上した理由は、1時間経過時点でもまだ未反応のグルコースが存在し、その後も徐々に過酸化水素が生成した結果、徐々にHRPによるフェノール性水酸基同士の架橋が進行していったためと考えられる。なお、GOxの反応において1分子のグルコースから1分子の過酸化水素が生成するため、系内のグルコースが完全に過酸化水素に変換された場合には、4.6mMの過酸化水素が発生する。これと同量の過酸化水素を同じHRP濃度下で添加したにも関わらずGOxを用いて得られたゲルの反発力が過酸化水素を直接添加して得られたゲルよりも著しく大きな値を示した理由は、ゆっくりと反応が進行したために、ゲル内の分子構造がより均質なものとなったためと考えられる。ゲル化機構は異なるものの、Vielaらは大豆蛋白抽出物とジェランガムの混合溶液をカルシウムイオンでゲル化させたところ、ゲル化が早いほど不均質なゲルが形成したことを報告している⁶⁾。

ゲルの抗菌性評価において、過酸化水素を直接添加して得られたゲルの周囲では作製後しばらくしか周囲での菌体・微生物の増殖が抑制されなかった。一方でGOxを用いてゲル化させたゲルの周囲ではより長期間にわたり増殖が抑制された(図8)。この違いは、ゲル形成後もGOxが活性を有しており寒天培地に含まれるグルコースを消費し

て徐々に過酸化水素を生成しているためだと考えられる。創傷面に適用した場合にも、細菌の感染を防がなくてはならない創面から体液が滲出している状況では、体液中のグルコースを消費しながら持続的に過酸化水素を生成し、抗菌機能を発揮することが期待される。なお、抗菌性のみでなく過酸化水素の細胞毒性により、治癒が遅れるのではないかとの懸念がされるところであるが、これまでにラットを用いて市販のモイストヒーリング材と全層・分層欠損創傷治癒に要する期間を比較したところ、ほぼ同じ期間で治癒することを確認しており(データ未掲載)、その影響はないものと考えられる。おそらく、発生している過酸化水素の量が微量であることと、生体組織側に放出された過酸化水素は、生体に存在するカタラーゼの作用により迅速に分解されているためと考えられる。

本検討で得られた結果は、溶液状態で患部に塗布すると、患部に存在する体液と反応してゲル化し、創面を覆うことで創傷治癒を促進する新しいモイストヒーリング剤ができる可能性を示している。今後、より詳細に実験動物を用いた治癒に関する検討を行い、新しいモイストヒーリング剤としての実用化の可能性を評価していきたい。

(引用文献)

- 1) Sibbald RG, Goodman L, Woo KY, Krasner DL, Smart H, Tariq G, Ayello EA, Burrell RE, Keast DH, Mayer D, Norton L, Salcido RS.: Special considerations in wound bed preparation 2011: an update, *Adv. Skin Wound Care*, 24, 415-436, 2011.
- 2) Lu G, Ling K, Zhao P, Xu Z, Deng C, Zheng H, Huang J, Chen J.: A novel in situ-formed hydrogel wound dressing by the photocross-linking of a chitosan derivative. *Wound Repair Regen.*, 18, 70-79, 2010.
- 3) Balakrishnan B, Mohanty M, Umashankar PR, Jayakrishnan A.: Evaluation of an in situ forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin. *Biomaterials* 26, 6335-6342, 2005.
- 4) Sakai S, Kawakami K.: Synthesis and characterization of both ionically and enzymatically crosslinkable alginate. *Acta Biomater.*, 3, 495-501, 2007.
- 5) Sakai S, Hirose K, Taguchi K, Ogushi Y, Kawakami K.: An injectable, in situ enzymatically gellable, gelatin derivative for drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* 30, 3371-3377, 2009.
- 6) Viela JAP, Cavallieri ÂLF, Cunha RL.: The influence of gelation rate on the physical properties/structure of salt-induced gels of soy protein isolate-gellan gum. *Food. Hydrocolloid*, 25, 1710-1708, 2011.