

## 論文

# 抗菌性創傷被覆材の開発に向けたPVAハイドロゲルからの 抗菌剤の溶出性制御

柚木 俊二<sup>\*1)</sup> 光田 益士<sup>\*2)</sup> 大藪 淑美<sup>\*1)</sup> 久保 貴史<sup>\*2)</sup>  
関口 正之<sup>\*1)</sup> 岩寄 徹治<sup>\*2)</sup>

## Controlled release of antibacterial agents from PVA hydrogel as a wound dressing

Shunji Yunoki<sup>\*1)</sup>, Masushi Kohta<sup>\*2)</sup>, Yoshimi Ohyabu<sup>\*1)</sup>, Takabumi Kubo<sup>\*2)</sup>  
Masayuki Sekiguchi<sup>\*1)</sup>, Tetsuji Iwasaki<sup>\*2)</sup>

Recently, antibacterial wound dressings have been developed and clinically used on the basis of the fact that moist, warm and nutritious environments of wound beds provides ideal conditions for microbial growth. Controlled release of antibacterial agents is a critical issue for wound dressing. We prepared polyvinyl alcohol (PVA) hydrogels containing cetylpyridinium chloride (CPC) or polyhexamethylene biguanide (PHMB) by gamma irradiation, and evaluated the release of the antibacterial agents and antibacterial properties. A half of PHMB released from the hydrogel soaked in saline for 6 h, whereas CPC showed little or no release during 72 h. The difference in the release characteristics was reflected in the antibacterial activity around the hydrogels: only the PHMB-containing hydrogels created an inhibition zone against *Staphylococcus aureus* cultured on agar plates. On the surface of the hydrogels CPC also showed concentration-dependent antibacterial activity. We demonstrated that antibacterial hydrogels could be created by gamma irradiation on PVA solutions. The hydrogels are expected to be useful as a wound dressing having immediate and long-term antibacterial activities.

キーワード: 創傷被覆材, 褥瘡, 抗菌性, ポリビニルアルコール, 塩化セチルピリジニウム, ポリヘキサメチレンビグアニド

Keywords: Wound dressing, Pressure ulcer, Antibacterial property, Polyvinyl alcohol, Cetylpyridinium chloride, Polyhexamethylene biguanide

### 1. はじめに

潰瘍の治療に用いられる創傷被覆材としてハイドロゲルやハイドロコロイドが盛んに利用されるようになった<sup>(1)</sup>。創傷被覆材は創傷部を物理的に保護するのみならず、湿潤環境を保ち治癒を促進する効果がある。潰瘍の中でも褥瘡(床擦れ)は寝たきりの患者に頻発する。免疫力が低下している場合は菌に感染し易く、ひとたび感染すると難治化する場合があるため、抗菌剤を含んだ“抗菌性創傷被覆材”が治療に用いられる。

抗菌剤は潜在的に細胞毒性を有するため、基材からの溶出性制御 (controlled release) が重要になる。有機系抗菌剤をハイドロゲル創傷被覆材に混合すると、良く知られた溶液の拡散現象<sup>(2)(3)</sup>によって速やかに溶出してしまう。一方、創傷被覆材の基材に用いられるポリマー鎖に抗菌剤をグラフトし、抗菌剤の溶出を抑える方法が多数開示されている。しかし、化学合成の利用は製造コストの増加を招くうえ、

ポリマー鎖自体が既存のものでも新規物質として扱われるため安全性の立証に時間と労力がかかる。そこで、安全性が立証された材料を組み合わせ、化学合成を経ずに有機系抗菌剤の溶出性を制御する技術が望まれている。

本研究では、基材としてのポリビニルアルコール (PVA) の二つの特性に着目した。

(1) 水酸基が分極して静電的な吸着特性を示す<sup>(4)</sup>

(2) 放射線照射で架橋してハイドロゲルを形成する<sup>(5)</sup>

我々は、有機系抗菌剤を含んだPVA水溶液に放射線を照射すると、PVAハイドロゲルに包含された有機系抗菌剤はPVAと静電的に結合して溶出性が抑えられると予測した。

本研究の目的はこの予測を実証する事である。医療機器として利用された実績のある材料のみを用いて、簡易な工程で、抗菌剤の溶出性が制御された創傷被覆材が作製可能である事を示す。有機系抗菌剤として塩化セチルピリジニウム (CPC) 及びポリヘキサメチレンビグアニド (PHMB) を用い、これらを含有了したPVA水溶液にガンマ線を照射してハイドロゲルを作製した。抗菌剤の溶出特性、抗菌性、及び細胞毒性を *in vitro* で評価し、抗菌性創傷被覆材としてのポテンシャルを評価した。

事業名 平成23年度 共同研究A

\*1) バイオ応用技術グループ

\*2) アルケア株式会社

## 2. 実験方法

**2.1 PVA水溶液の作製** PVA水溶液にガンマ線を照射し、水溶液を凍結乾燥し、1gを切り出してポリスチレン容器に入れた。濃度40 µg/mLのCPC標準液もしくは濃度8 µg/mLのPHMB標準液10 mLを加え、37°Cで72 h静置した。その後、吸水して膨潤したコントロールゲルを除去した。メンブランフィルタで液中の微粒子を除去し、波長220~280 nmのUVスペクトルを測定した。CPCとPHMBそれぞれに特異的な波長260 nm及び235 nmのUV吸収から各抗菌剤濃度を定量した。

**2.2 抗菌剤のガンマ線耐性** 濃度40 µg/mLのCPC標準液もしくは濃度8 µg/mLのPHMB標準液をマイクロチューブに入れ、脱酸素剤A-500-50S（アズワン社製）とともにガスバリア性バッグに封入した。50 kGyのガンマ線を照射したのち、得られた水溶液のUVスペクトルを測定した。CPCとPHMBそれぞれに特異的な波長260 nm及び235 nmのUV吸収から各抗菌剤濃度を定量した。各水溶液に少量の重水を加え、<sup>13</sup>C NMR測定（JEOL）も行った。

**2.3 ハイドロゲルの動的粘弾性** PVA水溶液にガンマ線を照射し、水溶液を凍結乾燥し、1gを切り出してポリスチレン容器に入れた。濃度40 µg/mLのCPC標準液もしくは濃度8 µg/mLのPHMB標準液10 mLを加え、37°Cで72 h静置した。その後、吸水して膨潤したコントロールゲルを除去した。メンブランフィルタで液中の微粒子を除去し、波長220~280 nmのUVスペクトルを測定した。CPCとPHMBそれぞれに特異的な波長260 nm及び235 nmのUV吸収から各抗菌剤濃度を定量した。

**2.4 抗菌剤の吸着試験** 抗菌剤を含有しないPVA水溶液を凍結乾燥し、1gを切り出してポリスチレン容器に入れた。濃度40 µg/mLのCPC標準液もしくは濃度8 µg/mLのPHMB標準液10 mLを加え、37°Cで72 h静置した。その後、吸水して膨潤したコントロールゲルを除去した。メンブランフィルタで液中の微粒子を除去し、波長220~280 nmのUVスペクトルを測定した。CPCとPHMBそれぞれに特異的な波長260 nm及び235 nmのUV吸収から各抗菌剤濃度を定量した。

**2.5 抗菌剤の溶出試験** PVA水溶液にガンマ線を照射し、水溶液を凍結乾燥し、1gを切り出してポリスチレン容器に入れた。濃度40 µg/mLのCPC標準液もしくは濃度8 µg/mLのPHMB標準液10 mLを加え、37°Cで72 h静置した。その後、吸水して膨潤したコントロールゲルを除去した。メンブランフィルタで液中の微粒子を除去し、波長220~280 nmのUVスペクトルを測定した。CPCとPHMBそれぞれに特異的な波長260 nm及び235 nmのUV吸収から各抗菌剤濃度を定量した。

**2.6 抗菌性試験** ハイドロゲルの抗菌性を2つの方法で評価した。

(1) ディスク拡散法 JIS L 1902を参考に、水溶液を凍結乾燥し、1gを切り出してポリスチレン容器に入れた。濃度40 µg/mLのCPC標準液もしくは濃度8 µg/mLのPHMB標準液10 mLを加え、37°Cで72 h静置した。その後、吸水して膨潤したコントロールゲルを除去した。メンブランフィルタで液中の微粒子を除去し、波長220~280 nmのUVスペクトルを測定した。CPCとPHMBそれぞれに特異的な波長260 nm及び235 nmのUV吸収から各抗菌剤濃度を定量した。

(2) ディスク接触法 ディスク拡散法を行った後、下記の試験に移行して水溶液を凍結乾燥し、1gを切り出してポリスチレン容器に入れた。濃度40 µg/mLのCPC標準液もしくは濃度8 µg/mLのPHMB標準液10 mLを加え、37°Cで72 h静置した。その後、吸水して膨潤したコントロールゲルを除去した。メンブランフィルタで液中の微粒子を除去し、波長220~280 nmのUVスペクトルを測定した。CPCとPHMBそれぞれに特異的な波長260 nm及び235 nmのUV吸収から各抗菌剤濃度を定量した。

表1. PVA水溶液の抗菌剤含有量

抗菌剤含有量 (%)	
CPC	PHMB
0.08	0
0.16	0
0.2	0
0.24	0
0	0.1
0	0.2
0	0

**2.2 抗菌剤のガンマ線耐性** 濃度40 µg/mLのCPC標準液もしくは濃度8 µg/mLのPHMB標準液をマイクロチューブに入れ、脱酸素剤A-500-50S（アズワン社製）とともにガスバリア性バッグに封入した。50 kGyのガンマ線を照射したのち、得られた水溶液のUVスペクトルを測定した。CPCとPHMBそれぞれに特異的な波長260 nm及び235 nmのUV吸収から各抗菌剤濃度を定量した。各水溶液に少量の重水を加え、<sup>13</sup>C NMR測定（JEOL）も行った。

**2.3 ハイドロゲルの動的粘弾性** PVA水溶液にガンマ線を照射し、水溶液を凍結乾燥し、1gを切り出してポリスチレン容器に入れた。濃度40 µg/mLのCPC標準液もしくは濃度8 µg/mLのPHMB標準液10 mLを加え、37°Cで72 h静置した。その後、吸水して膨潤したコントロールゲルを除去した。メンブランフィルタで液中の微粒子を除去し、波長220~280 nmのUVスペクトルを測定した。CPCとPHMBそれぞれに特異的な波長260 nm及び235 nmのUV吸収から各抗菌剤濃度を定量した。

**2.4 抗菌剤の吸着試験** 抗菌剤を含有しないPVA水溶液を凍結乾燥し、1gを切り出してポリスチレン容器に入れた。濃度40 µg/mLのCPC標準液もしくは濃度8 µg/mLのPHMB標準液10 mLを加え、37°Cで72 h静置した。その後、吸水して膨潤したコントロールゲルを除去した。メンブランフィルタで液中の微粒子を除去し、波長220~280 nmのUVスペクトルを測定した。CPCとPHMBそれぞれに特異的な波長260 nm及び235 nmのUV吸収から各抗菌剤濃度を定量した。

加え、37°Cで72 h静置した。その後、吸水して膨潤したコントロールゲルを除去した。メンブランフィルタで液中の微粒子を除去し、波長220~280 nmのUVスペクトルを測定した。CPCとPHMBそれぞれに特異的な波長260 nm及び235 nmのUV吸収から各抗菌剤濃度を定量した。

**2.5 抗菌剤の溶出試験** PVA水溶液にガンマ線を照射し、水溶液を凍結乾燥し、1gを切り出してポリスチレン容器に入れた。濃度40 µg/mLのCPC標準液もしくは濃度8 µg/mLのPHMB標準液10 mLを加え、37°Cで72 h静置した。その後、吸水して膨潤したコントロールゲルを除去した。メンブランフィルタで液中の微粒子を除去し、波長220~280 nmのUVスペクトルを測定した。CPCとPHMBそれぞれに特異的な波長260 nm及び235 nmのUV吸収から各抗菌剤濃度を定量した。

**2.6 抗菌性試験** ハイドロゲルの抗菌性を2つの方法で評価した。

(1) ディスク拡散法 JIS L 1902を参考に、水溶液を凍結乾燥し、1gを切り出してポリスチレン容器に入れた。濃度40 µg/mLのCPC標準液もしくは濃度8 µg/mLのPHMB標準液10 mLを加え、37°Cで72 h静置した。その後、吸水して膨潤したコントロールゲルを除去した。メンブランフィルタで液中の微粒子を除去し、波長220~280 nmのUVスペクトルを測定した。CPCとPHMBそれぞれに特異的な波長260 nm及び235 nmのUV吸収から各抗菌剤濃度を定量した。

(2) ディスク接触法 ディスク拡散法を行った後、下記の試験に移行して水溶液を凍結乾燥し、1gを切り出してポリスチレン容器に入れた。濃度40 µg/mLのCPC標準液もしくは濃度8 µg/mLのPHMB標準液10 mLを加え、37°Cで72 h静置した。その後、吸水して膨潤したコントロールゲルを除去した。メンブランフィルタで液中の微粒子を除去し、波長220~280 nmのUVスペクトルを測定した。CPCとPHMBそれぞれに特異的な波長260 nm及び235 nmのUV吸収から各抗菌剤濃度を定量した。

阻止帯を観察した寒天培地から水溶液を凍結乾燥し、1gを切り出してポリスチレン容器に入れた。濃度40 µg/mLのCPC標準液もしくは濃度8 µg/mLのPHMB標準液10 mLを加え、37°Cで72 h静置した。その後、吸水して膨潤したコントロールゲルを除去した。メンブランフィルタで液中の微粒子を除去し、波長220~280 nmのUVスペクトルを測定した。CPCとPHMBそれぞれに特異的な波長260 nm及び235 nmのUV吸収から各抗菌剤濃度を定量した。

## 3. 結果

**3.1 抗菌剤のガンマ線耐性** CPC標準液及びPHMB標準液に50 kGyのガンマ線を照射し、波長260 nm及び235 nmのUV吸収から濃度を求めたところ、各抗菌剤の濃度減少は5%未満であった。<sup>13</sup>C NMRスペクトルは照射前後で変化していなかった（スペクトルは示さない）。以上の結果から、CPCとPHMBは50 kGyのガンマ線によって分解や構造変化をほとんど生じない事が示された。

### 3.2 抗菌剤がPVA水溶液の硬さに及ぼす影響

抗菌剤濃度とPVA水溶液の弾性率との関係を図1に示す。CPCとPHMBのどちらも含有量が増加するにつれてゲルの弾性率が低下した。弾性率の実用下限は7 kPaと推定されたが、CPCとPHMBの上限濃度0.24%及び0.2%においてPVA水溶液の弾性率は7 kPaよりも高かった。

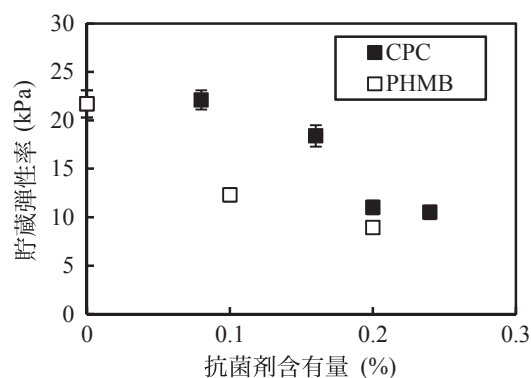


図1. PVA水溶液の硬さに及ぼす抗菌剤含有量の影響

**3. 3 PVAヒドロゲルへの抗菌剤の吸着** CPC標準液及びPHMB標準液に乾燥PVAを浸漬し，浸漬前後のUVスペクトルを比較した（図2）。吸着試験後の標準液にはCPC及びPHMBに特異的なUV吸収が見られなかった。

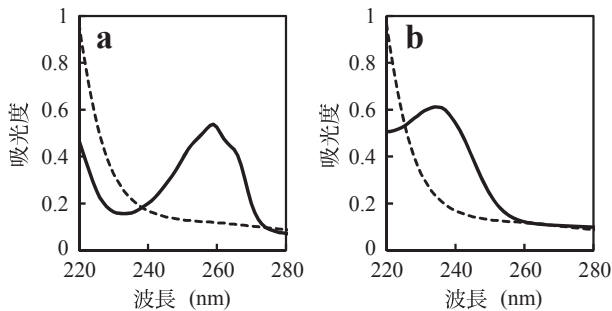


図2. PVAの浸漬によるCPC標準液(a)及びPHMB標準液(b)のUVスペクトルの変化  
実線，PVA浸漬前；破線，PVA浸漬後

**3. 4 PVAヒドロゲルからの抗菌剤の溶出** 抗菌剤含有PVAヒドロゲルを生理食塩水に所定時間浸漬した場合の抗菌剤の溶出率を図3に示す。CPCとPHMBは全く異なる溶出挙動を示した。CPCの溶出はどの濃度においても浸漬時間72hまでほとんど見られなかった。対照的に，PHMBは浸漬後6hで含有量のおよそ半量が溶出し，その後72hまで溶出率はほとんど増加しなかった。

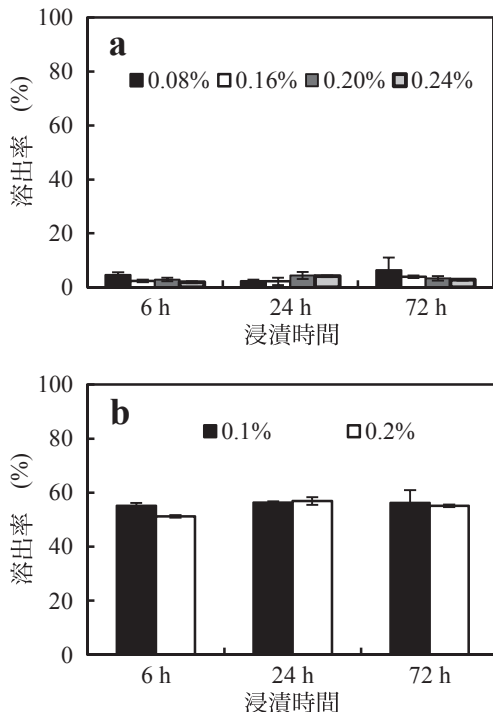


図3. PVAヒドロゲルからのCPC(a)及びPHMB(b)の溶出  
図中の濃度(%)はヒドロゲル中の抗菌剤含有量

**3. 5 黄色ブドウ球菌に対する阻止帯形成** 抗菌剤の溶出によるゲル周囲の抗菌性を評価するため，ディスク拡散法を実施した（図4）。CPC含有ゲルはどの濃度においても

コントロールゲルと同様に阻止帯を生じなかった（図4a～d）。PHMB含有ゲルは明確な阻止帯を形成し，阻止帯の幅はPHMB濃度が高いほうが大きかった（図4e及びf）。

**3. 6 ゲル表面における黄色ブドウ球菌に対する抗菌性**

ゲル表面での抗菌性を評価するため，ディスク接触法を実施した（図5）。PHMB含有ゲルとの接触部位におけるコロニー数は，PHMB濃度0.1%及び0.2%のどちらも定量下限値まで減少していた。CPC含有ゲルとの接触部位におけるコロニー数はCPC濃度が高くなるにつれて減少し，CPC濃度が0.2%に達するとPHMB含有ゲルに匹敵する抗菌性を示した。コントロールゲルの値が初期値（ $10^7$  CFU/cm<sup>2</sup>）とほぼ同じだった事から本試験の妥当性が示された。

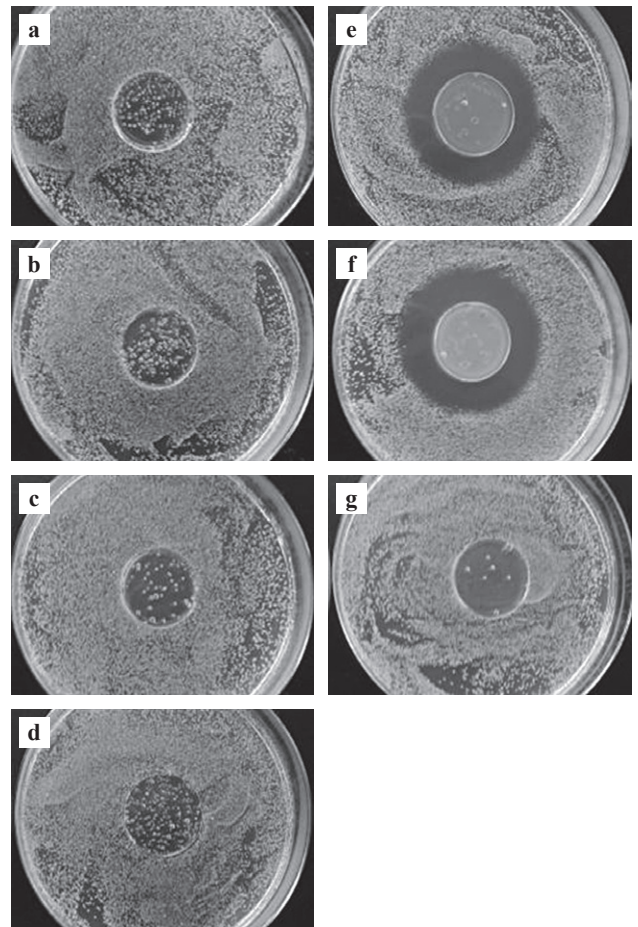


図4. ディスク拡散法による抗菌剤含有PVAヒドロゲルの抗菌性評価結果  
(a) CPC 0.08%，(b) CPC 0.16%，(c) CPC 0.2%，(d) CPC 0.24%，  
(e) PHMB 0.1%，(f) PHMB 0.2%，(g) 抗菌剤不含

**4. 考察**

我々の研究の焦点は，有機系抗菌剤の溶出性が制御されたヒドロゲルを，医療機器として実績のある材料のみを用いて，できるだけ簡単な工程で作製する方法を開発する事である。薬剤の溶出性を制御する技術は，ポリマー鎖へのグラフト，ミセルへの包埋，あるいは架橋ゲルによる包埋など多種多様である。しかし，新しい材料や化学合成の



利用は機能性を向上させる一方で、製造コストや安全性を立証するためのコストが増加する。更に、薬事承認に要する時間が長くなる事で海外の製品にシェアを奪われる場合があり、“ドラッグラグ・デバイスラグ”<sup>(6)</sup>として問題視されている。本研究の特長は、PVAという安全なポリマーを基材とし、医療機器の滅菌で使用されるガンマ線照射のみでハイドロゲルを製造し、医療機器として実績のある有機系抗菌剤の溶出性を制御する事にある。

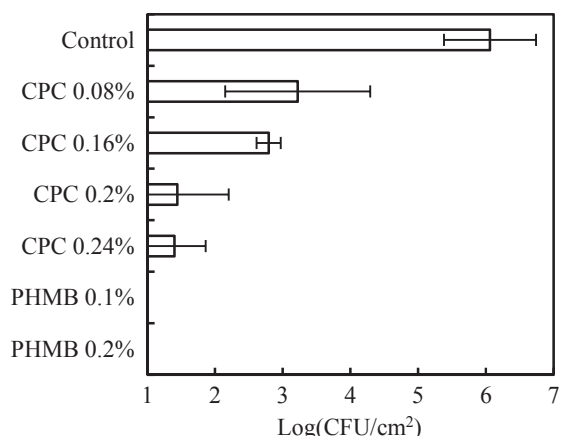


図5. ディスク接触法による抗菌剤含有PVAハイドロゲルの抗菌性評価

図中の濃度はハイドロゲル中の抗菌剤濃度  
Control: 抗菌剤不含

はじめにガンマ線照射に対するCPCとPHMBの安定性を確認した。CPC及びPHMB水溶液に50 kGyのガンマ線を照射しても構造変化や分解の痕跡がほとんど見られなかった事から、抗菌剤含有PVA水溶液にガンマ線を照射してハイドロゲルを作製するという簡易な工程が可能である事が示された。

CPCとPHMBは50 kGyのガンマ線に安定であったが、PVAの架橋効率を低下させる事がわかった。PVA水溶液中に発生するヒドロキシラジカルが抗菌剤によって消去され、PVAへのラジカルの移行が妨害されたと推定された。本実験におけるCPC及びPHMBの上限濃度ではコントロールゲルに比べて軟質化が進行したが、実用レベルの硬さを保った。抗菌剤濃度を更に高める場合、ガンマ線量を増加させる事が必要であろう。以上の結果から、50 kGyのガンマ線をPVA水溶液に照射して抗菌剤含有PVAハイドロゲルを作製できる事がわかった。

そこで、表1に示した7種類のゲルを作製し、創傷被覆材としての特性評価へと移行した。CPCがゲルからほとんど溶出しなかった事は我々の予想通りであり、架橋PVAへのCPCの静電的吸着によって説明できると考えられた。グラフト結合など化学反応を経ずに低溶出性を付与された抗菌性ハイドロゲルとして、CPC含有PVAハイドロゲルは価値がある。

CPCはゲルから溶出しないために黄色ブドウ球菌に対して阻止帯を形成しなかったが、ゲル表面では抗菌性を示し

た。抗菌剤の過度な溶出は細胞毒性を惹起するのみならず、抗菌性が早期に喪失する原因となる。CPCの低溶出性は“長期的抗菌性”に寄与するものと期待できる。

CPCとは対照的に、PHMBはゲルから短時間に溶出し、ゲル表面のみならずゲルの周囲にも抗菌性を示して阻止帯を形成した。架橋PVAはPHMBに対しても吸着特性を有していたが、溶出試験の結果は吸着特性と矛盾した。現時点では、この矛盾に対する明確な説明をするための証拠がない。もしPHMBにガンマ線が照射された事によりPVAとの静電的相互作用を失ったのであれば、CPCと併用する事で、短期的な抗菌性(高溶出性)と長期的な抗菌性(低溶出性)を付与したハイドロゲルを作製可能と考えられた。

我々は本研究により、簡便なガンマ線照射のみで有機系抗菌剤CPC及びPHMBのハイドロゲルからの溶出性を制御できる事を示した。PVAは生体に接触しても安全であり、医療機器として豊富な実績がある。ガンマ線は医療機器に必須な滅菌工程を兼ねる事ができる。CPC及びPHMBは医療機器として使用実績がある。この抗菌剤含有ハイドロゲルの作製方法は、低コストかつ高機能な抗菌性創傷被覆材の開発につながると期待できる。

#### 謝辞

本研究を進めるにあたり、高度分析開発セクターの林英男研究員から微量金属の分析法について、同セクターの渡邊禎之研究員からNMR測定について助言を受けた。

(平成25年7月26日受付, 平成25年8月23日再受付)

#### 文 献

- (1) Boateng JS, Matthews KH, Stevens HNE, Eccleston GM: "Wound healing dressings and drug delivery systems: A review", J Pharm Sci, Vol.97, No.8, p.2892 (2008)
- (2) Korsmeyer RW, Gurny R, Doelker E, Buri P, Peppas NA: "Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers", Int J Pharm, Vol.15, No.1, p.25 (1983)
- (3) Sujja-areevath J, Munday DL, Cox PJ, Kahn KA. "Relationship between swelling, erosion and drug release in hydrophilic natural gum mini-matrix formulations", Eur J Pharm Sci, Vol.6, No.3, p.207 (1998)
- (4) Bajpai AK: "Adsorption of bovine serum albumin onto glass powder surfaces coated with polyvinyl alcohol", J Appl Polym Sci, Vol.78, No.8, p.933 (2000)
- (5) Park KR, Nho YC: "Synthesis of PVA/PVP hydrogels having two-layer by radiation and their physical properties", Radiat Phys Chem, Vol.67, No.8, p.361 (2003)
- (6) 厚生労働省 "医療イノベーションに関する資料" 第7回社会保障改革に関する集中検討会議資料 平成23年5月19日