

平成 2 8 年 6 月 2 2 日現在

機関番号：3 2 6 7 6

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：2 6 8 6 0 1 1 4

研究課題名（和文）キシログルカンハイドロゲルを用いた新規被覆材・製剤の開発

研究課題名（英文）Development of new wound dressing materials and formulations with xyloglucan hydrogel

研究代表者

笹津 備尚（Sasatsu, Masanaho）

星薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：6 0 4 2 1 2 1 0

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000 円

研究成果の概要（和文）：褥瘡治療用新規ゲル製剤・被覆材を開発するために、ゲル化やゲル化のコントロールできる添加剤をスクリーニングし、ゲルの物性や生態への影響などについて検討をした。その結果、エピガロカテキンガレートにおいてかなり低い添加量でゲル化や物性をコントロールできることが明らかとなった。さらに、重度創傷モデルの結果より今回検討したゲルは、壊死組織が除去できるまでの期間で適用することが重度創傷治療に効果的であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In order to develop a novel gel formulation for treatment to pressure ulcer, it was performed to screen about additive agent which could control gelation and gelation time. Furthermore, the physical properties of the gel and its effect on wound were evaluated. As a result, epigallocatechin gallate (EGCG) could control the physical properties such as gelation speed at a much lower amount. In addition, the results of the severe wound model shows that the EGCG gel was found to be useful to apply until the stage of necrotic tissue removal.

研究分野：医療薬剤学

キーワード：ハイドロゲル キシログルカン 褥瘡治療 被覆材

1. 研究開始当初の背景

褥瘡は、床と接する身体部位が自重により床に対して持続的に圧迫されることによって生じる虚血性皮膚壊死のことである。高齢化社会が進むにつれ長期臥床者等の増加に伴い、褥瘡患者が増加傾向にあることが知られている。また、在宅で褥瘡を治療する機会も増えており、規模に関係なく褥瘡のケアや治療は QOL の観点からも社会的に大きな課題となっている。しかしながら、現在の使用されている被覆材や製剤には欠点が多く挙げられ、更に使用するものを選択する際に知識と経験を要する点やベッドサイドでケアや治療を行うのに、より簡便なものの開発が急務となっている。そこで研究代表者は、形状を創傷面に合わせて自由に変更でき、使用方法も簡便な被覆材や製剤の開発が必須であると考えた。

天然多糖類であるキシログルカンは、白糖など水酸基を有する化合物を添加することでゲル化しハイドロゲルを形成することが知られている。これまでの研究で、キシログルカン-白糖ゲルからシート状の被覆材を調製し、その物理化学的特性と創傷治療効果について検討を重ねてきた。その結果、調製したシートは十分な引張強度と伸展性を有していることが明らかとなった。また、市販製品（ビューゲル）と比べ高い吸水性や皮膚付着性を有していることが示された。さらに、シートを創傷モデルラットに適用して治療効果を検討した。その結果、コントロール群と比較して、シート適用群では高い治療効果が得られたことを学会で報告している。また得られた結果より、早期に滲出液の浸潤が抑制され、肉芽増殖を促進していることを明らかとした。しかしながら、形状はあくまでもシート状であり、強度や弾力性の問題、貼付時の破損、さらに重度の褥瘡のようにポケットができていような創傷面への適用を考えると十分な形状ではないと考えられた。

従って本研究では、キシログルカンを主とした溶液をゲル化させ、そのゲル強度やゲル化時間をコントロールすることで、溶液状態で創傷面に流し込んだものが即時にゲル化し被覆できる被覆材や製剤の開発の着想に至った。これまでの検討により、キシログルカン-白糖溶液のゲル化の有無に関しては、白糖濃度が関係していることが明らかとなっ

ている。しかしながら、キシログルカン-白糖溶液に新たな化合物を添加することによるゲル化時間の変化やゲル強度への影響についての詳細は明らかとなっていない。研究代表者は既に、キシログルカン-白糖溶液にポリエチレングリコール (PEG) やポリフェノールを加えることで、ゲルの物理化学的性質が変化することまでは見出している(特開 2012 - 254940)。この両物質は水酸基を 2 つ以上有する化合物である。つまり、前述の化合物のように、水酸基を 2 つ以上有する化合物を添加することで、ゲル化時間やゲル強度がコントロールできる可能性を秘めている。

2. 研究の目的

キシログルカンを主とした水溶液のゲル化に影響を与える化合物を PEG およびポリフェノールを含めたスクリーニングを実施し、ゲルの物理化学的变化や創傷面に与える影響を明らかにすること目的とした。

3. 研究の方法

(1) キシログルカン溶液をゲル化しうる化合物のスクリーニング

キシログルカン-白糖溶液に水酸基を有する種々の化合物を添加し、ゲル化時間を測定することで、ゲル化促進効果の有無を明らかにした。ゲル化時間は転倒法にて行った。試料の液面が流動しなくなった状態をゲル化した状態と定義した。対象とする化合物は水酸基を有するアルコール類、ポリマー類、ポリフェノール類から選択した。選択にあたり、皮膚への安全性も考慮した。なお、ゲル化時間が 2 時間以上かかるものは、対象化合物から除外した。

(2) スクリーニングした化合物による、ゲルの作成と物性評価

(1) より得られた結果から添加剤を選択し、調製したゲルの融点、ゲル強度、離水性、吸水性などのゲル物性を測定し比較した。
融点：ゲル落下法と小球落下法を参考にした方法にて測定した。試験法は、水浴の温度を昇温させ、ゲル内のステンレス球が落下した時の温度を融点とした。
ゲル強度：レオメーター(RTC-2005D・D, レオテック社製)を用いて測定し、得られた荷重から破断強度、歪、弾性率を算出した。

離水率：調製したゲルを静置し、重量の変化を測定することでゲルからの離水を測定した。

吸水性：吸水試験を用いて、経時的に水の量を測定し、ゲルの吸水性を評価した。

(3) 重度創傷モデルラットの作成および製剤の創傷治療効果に対する影響の解明

ラットによる重度創傷モデルを作成し、その創面を用いて製剤の治療効果、安全性について評価した。ゲルはモデル作成翌日より適用し毎日交換した。評価項目： 大きさ、深さ、 滲出液、 炎症/感染、 壊死組織の割合と深さ、 肉芽組織の割合、 ポケットの有無。

4. 研究成果

(1) キシログルカン溶液をゲル化しうる化合物のスクリーニング結果

転倒法の結果より、アルコール類として3価のアルコールであるグリセリン、ポリマー類は、PEG(MW:400)、ポリプロピレングリコール(PPG, MW:400, Diol 型)。ポリフェノール類は、エピガロカテキンガレート(EGCG)が、キシログルカン-白糖水溶液をゲル化およびゲル化時間のコントロール可能であることを見出した。各添加剤のゲル化可能な添加量とゲル化時間を以下に示す(Fig. 1)。

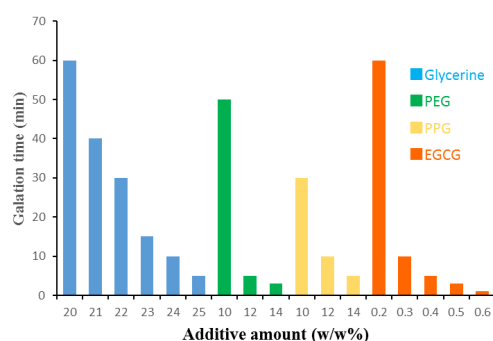


Fig 1. Gelation behavior of the sample by addition of materials with different amount.

どの添加剤も低い添加量においてゲル化は遅く、添加量依存的にゲル化する時間が短縮される。しかしながら特定の添加量を超えると均一なゲルを形成しなかった。今回スクリーニングを行った添加剤の中で、EGCGは0.2-0.6%と非常に低い添加量でゲル化し、ゲ

ル化時間のコントロールが可能であることが認められた。以上のスクリーニングの結果より、最も低い添加量でゲル化時間がコントロールできる EGCG を用いゲルを調製し、物性評価とモデル動物への影響を検討した。

(2) スクリーニングした化合物による、ゲルの作成と物性評価

EGCG ゲルの融点：融点は 37.1-44.8 (EGCG 0.2-0.6%) を示し、添加量依存的に高くなることが認められた。EGCG の添加量を増加させることにより、ゲルの三次元構造を構築する水素結合から成る架橋点が増えた結果、熱に対してより安定なゲルが形成されたと考えられる。

EGCG ゲルの強度：破断応力は添加量依存的に、また時間依存的に高値を示した。歪はEGCG の添加量依存的に低下し、弾性率は添加量にほぼ比例して高くなった(Fig. 2)。EGCG ゲルにおいて、EGCG の添加量に対して破断応力が高くなり、歪が低下することから、弾性率が高くなったと考えられる。融点の結果からも EGCG の添加量を増やすことによってゲルの三次元構造を構築するための架橋点が増えたことが考えられた。従って、EGCG の添加量依存的に、より安定で硬いゲルを形成することが示された。

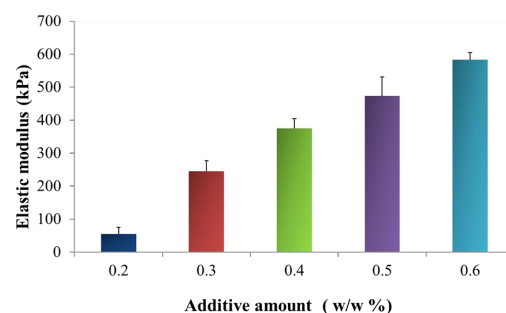


Fig. 2. Elastic modulus of the gel at 24h by addition of EGCG with different amount. The data were expressed as the mean \pm S.D. (n=3).

EGCG ゲルの離漿性：EGCG の添加量が0.5%以上のゲルにおいて、離漿率が著しく高くなることが示された(Fig. 3)。ハイドロゲル内での水分子は主に、自由水、束縛水、不凍水の三種類に分類されている。EGCG0.2%-0.4%添加したゲルは、離漿率に差がなかった。これは、水分子を介した水素結合の割合にあまり差はなく、ゲル内に存

在する自由水の割合に大きく影響を及ぼさなかったと考えられる。しかしながら、0.5%以上のゲルにおいては、EGCG が水分子を介さず、直接キシログルカンなどと架橋したことが考えられ、それによりゲル内の自由水が増え、離漿率が上昇したと考えられる。

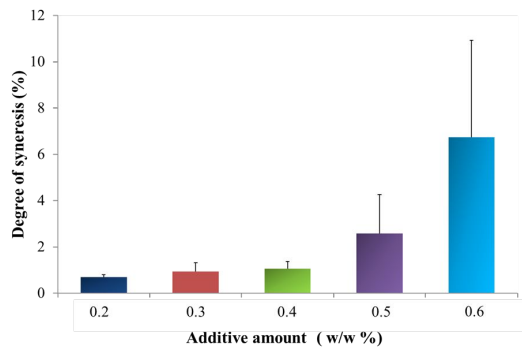


Fig. 3. Degree of syneresis of the gel by addition of EGCG with different amount. The data were expressed as the mean \pm S.D. (n=3).

EGCG ゲルの吸水性: 5 時間における EGCG ゲルの吸水量は、0.25 mL から 0.4 mL を示した。EGCG0.2%から 0.4%のゲルに関しては添加量が増加すると吸水性は低下したが、0.5%と 0.6%に関しては吸水性が高くなることが認められた。キシログルカンを基剤としたハイドロゲルにおける吸水性と弾性率には負の相関があることが示されている。これはゲルの弾性率が高くなることで、膨潤性が低くなったものと考えられる。このことから、EGCG ゲルの添加量 0.2-0.4%では、同様に吸水性と弾性率に負の相関がある可能性が考えられた。しかしながら、0.5%と 0.6%に関しては、吸水性が高くなった。これは、離漿性の試験結果より 0.5%および 0.6%は自由水の増加により離漿が高いことが示され、その自由水が離漿してできた空間に水分子を取り込み吸水性が高まったと考えられる。

(3) 重度創傷モデルラットの作成および製剤の創傷治療効果に対する影響の解明

凍傷モデルラットの創傷面は、処置直後にはピンク色を呈し、凍傷作製 1 日後には創面の一部が壊死し、創面から滲出液が生じていた。凍傷モデルラットを作製してから 1 日経過した後の創傷面積を 100%とし、毎日製剤交換時に測定した創傷面の残存率（創傷残存率）を Fig. 4 に示した。また、製剤交換時に

創面の状態を評価した(data not shown)。コントロール群においては、時間経過によって黄色の壊死組織が観察された。およそ 11 日後にこれらの壊死組織が除去された後、赤色の肉芽組織の形成が始まり、ある程度の盛り上がり認められてから創面周辺から上皮組織の形成が始まった。EGCG ゲルを適用した群では、4 日目に創傷残存率の上昇が認められた。観察記録によると、5 日目にほぼすべての凍傷モデルラットにおいて壊死組織が除去された。このことから、早期に壊死組織が除去されたことにより肉芽形成が促進し、肉芽が盛り上がったことにより、創傷残存率の上昇につながったものと考えられる。次に壊死組織の除去に伴い赤色の肉芽組織の形成が始まったが、それと同時に毎日痂皮形成が認められた。痂皮の形成は上皮化を妨げることから、ゲル交換時に痂皮を除去したものの、痂皮の形成はくり返された。その結果、創傷面の上皮化ができず創傷残存率の減少がコントロールに比べ遅延する結果となった。ただし、壊死組織の除去や肉芽形成の時期の早さに関しては、EGCG は良好であることから、痂皮の形成がくり返されたことに問題がある可能性が考えられた。

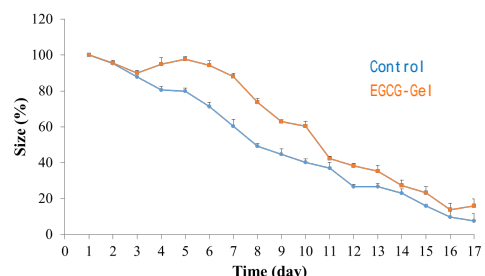


Fig. 4. Change in wound surface area after application of each preparation. The data were expressed as the mean \pm S.E. (n=4).

そこで EGCG ゲルを適用する際には、痂皮の形成を回避することが重要であると考え、適用期間を適切に設定することで改善できるのではないかと推測された。臨床現場においても、製剤は創傷及び患者の全身状態などに基いて選択され、初期と後期の治療方針は大きく異なる。よって、EGCG ゲルの最適な適用期間を特定するために、EGCG ゲルの適用時期を変更した群について検討した。すなわち、壊死組織が消失し肉芽組織が形成される 5 日目を境として、EGCG ゲルの適用期間を 4 日間とした群（EGCG-Gel）あ

る程度肉芽形成が促進したと考えられるまでの6日間ゲルを適用した群(EGCG-Gel)について検討した。その結果をFig. 5に示す。EGCG-Gel 群の完治に要する日数は平均11.75日、EGCG-Gel 群は平均13.25日であり、コントロール群に比べ早く完治した。また、両群とも5日目にほぼすべての凍傷モデルラットにおいて、壊死組織が認められなかった。更に、EGCG-Gel 群においては痂皮の形成はみられなかったが、EGCG-Gel 群では6日目から痂皮の形成がみられ、EGCG-Gel 群に比べ治癒が遅延した。しかしながら、EGCG ゲルの適用中止後には痂皮形成が抑えられ、急激に上皮化が進行した。このことより壊死組織が除去され、肉芽の盛り上がりが見られた期間まで EGCG ゲルを適用することが重要であり、その後 EGCG ゲルの適用を中止することで、痂皮形成を抑えられることが示された。

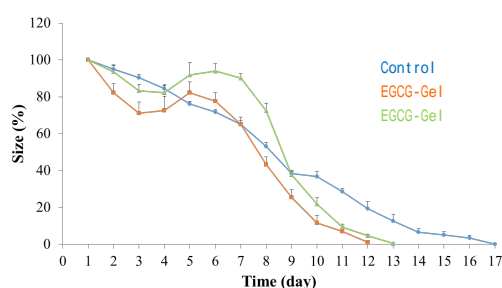


Fig. 5. Change in wound surface area after application of each preparation. The data were expressed as the mean \pm S.E. (n=4).

以上より、今回の結果から得られた知見は、キシログルカン主とした水溶液に特定の添加剤を新たに加えることで、ゲル化時間や物理化学的性質を制御でき、新しい褥瘡治療被覆材・製剤の開発につながるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計 2 件)

笹津 備尚, 沢幡 聖治, 増田 篤之, 池内 由里, 虎石 竜典, 廣瀬 香織, 大西 啓, 輪千 浩史: キシログルカンハイドロゲルを用いた新規被覆材・製剤の開発 -ポリフェノール添加によるゲル

化に及ぼす影響-, 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 28 日, 横浜

沢幡 聖治, 笹津 備尚, 増田 篤之, 池内 由里, 大西 啓: ポリフェノール添加キシログルカンハイドロゲルの調製と評価, 第 59 回日本薬学会関東支部大会, 2015 年 9 月 12 日, 千葉

6. 研究組織

(1)研究代表者

笹津 備尚 (MASANAHO SASATSU)

星薬科大学・薬学部・助教

研究者番号: 60421210