

●ポリアクリル酸/ポリビニルピロリドン複合体による創傷治癒促進

Promotion of wound healing by polyacrylic acid/polyvinylpyrrolidone complex

大内 彩歌
Ayaka Oouchi

Key Word : Bioadhesive Polymers、Medical Device、Hemostatic Material、Wound healing

1 緒言

近年、創傷被覆材の目的として、感染性微生物の侵入防止、外部刺激からの保護、止血に加え、創傷治癒の促進に目が向けられるようになった。

治癒を促進させる方法として代表的なものに、モイスチャーヒーリングが挙げられる。モイスチャーヒーリングとは、傷からの浸出液を管理することで、創傷治癒に適した環境を提供する方法のことである¹⁾。Winter らは、豚を用いた研究により、湿潤した傷が乾燥した傷よりも早期に上皮化されることを報告した²⁾。また、湿潤環境では、炎症や痴皮の形成を伴わずに皮膚を再生できることも報告されている³⁾。

傷口の湿潤環境を保つため、現在多様なハイドロコロイド膜が治癒を促進する創傷被覆保護材として上市されている。しかし、これらには生体組織への十分な接着性がないため、その効果が不十分であったり、別途粘着カバー剤による固定化が必要となったりするなどの問題点がある。

そのような背景の中、小山らは、安全性の高い合成高分子であるポリアクリル酸(PAA)とポリビニルピロリドン(PVP)を原料とした新規な材料を開発した⁴⁾。その基本構造を Fig. 1 に示す。

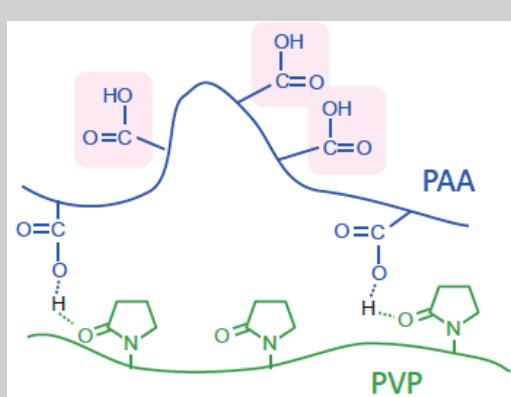


Fig. 1 PAA/PVP複合体の構造

本材料は、PAAをあらかじめ乾燥させた状態でPVP水溶液と反応させるという特殊な製法により、PAAとPVP間の架橋点が制限され、PAAのカルボキシ基とPVPのピロリドン基が一部未反応のまま残されている。これにより、本材料は血液等の体液を吸収して瞬時にハイドロゲル化し、生体組織に高い接着性を示す。

Fig. 2に示す通り、実際に濡れた豚肉に本材料を乗せると、数秒で吸水し、膨潤して組織に強く接着する様子が確認できる。

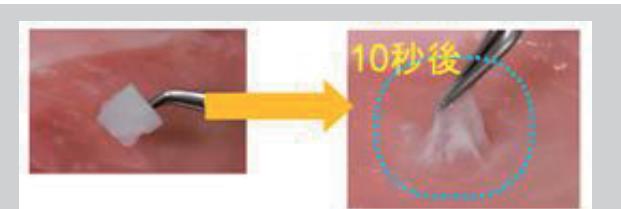


Fig. 2 PAA/PVP複合体の性能

このような優れた吸水・膨潤性と接着性により、本材料は傷口に密着し、高い止血効果を発揮する。その際、本材料が吸収した血液や体液中に含まれるサイトカインや増殖因子などの成分がゲル内に保持され、創傷面に徐放されることで、治癒が促進されることが期待される。

そこで本研究では、糖尿病マウス皮膚損傷モデルを用いて、本材料の治癒促進効果を評価した。

2 実験

(1) PAA/PVP複合体の作製

厚さ5mm、直径20mmのポリプロピレン製の型にPAA水溶液(1.2%、1.57mL)を加え、室温で24時間乾燥させてPAAフィルムを作製した。次に、PVPとヒアルロン酸ナトリウム(HA)の混合水溶液(PVP: 1.85%、HA: 0.24%、1.57mL)をPAAフィルム上に加え、室温で20分間放置し

た後、膨潤した PAA/PVP 複合体を-35°Cで凍結し、凍結乾燥機（三庄インダストリー社製、KF-4KB）で凍結乾燥させ、Fig. 3 に示すようなスポンジ状の PAA/PVP 複合体を得た。



Fig. 3 PAA/PVP 複合体スポンジ

(2)複合体の接着性評価

得られた PAA/PVP 複合体スポンジの生体組織への接着性を確認するために、疑似皮膚であるプロテインレザー（イデアテックス ジャパン社製、プロテインレザーPBZ13001-BK）に対する複合体スポンジの面接着強度を測定した。

まず、50 mL 遠沈管の蓋に 30 mm 角のプロテインレザーを瞬間接着剤（東亞合成社製、アロンアルファ（登録商標））によって貼り付けたものを 2 本作製した。それぞれのプロテインレザーに綿棒で水を適量塗布し、複合体スポンジを間に挟み込んだ後、300 g の錘を乗せて 1 分間放置し、プロテインレザーとスポンジを接着させた。錘を取り除いてから 1 分後に、引張試験機（インストロンジャパン社製、インストロン）を用いて、25°C、120 mm/min の条件で引っ張りを行い、発生する最大応力を測定した。

(3)スポンジの吸水性評価⁵⁾

得られた PAA/PVP 複合体スポンジの吸水性を確認するために、疑似体液としてリン酸緩衝液（0.1 mol/L、pH7.2、富士フィルム和光純薬社製）を用いた吸水性評価を実施した。

始めに複合体スポンジを 150°Cで 60 分間常圧乾燥させ、質量を測定した。次に、乾燥後のスポンジをリン酸緩衝液中に 1 時間浸漬し、濾過後のサンプルの質量を測定し、下記公式（1）により吸水率を算出した。

$$\text{吸水率} = W_2/W_1 \quad \cdots (1)$$

W_1 = 150°Cで 60 分間乾燥させた後の質量 (g)

W_2 = リン酸緩衝液により 1 時間膨潤させた後の質量 (g)

(4)マウスでの治癒促進効果検証⁶⁾

PAA/PVP 複合体による治癒促進効果を、糖尿病マウス背側皮膚損傷モデルにて評価した。

マウス（BKS.Cg+Leprdb/+Leprdb/Jcl、7 週齢、メス）の背部皮膚を剃毛し、メデトミジン、ブトルファノール、ミダゾラムの併用による全身麻酔下で、8 mm の生検トレパンを使用して左右 2 か所に円形の全層欠損創（直径 8 mm）を作

製した。その上から傷を覆うように、15 mm 角にカットした PAA/PVP 複合体スポンジを両方の創傷部位に貼り付けた。スポンジは貼付 1 日後もしくは 3 日後に取り除き、そのまま傷の観察を行った。また、対照群として、傷に対し何の処置も行わない（未処置）群も用意した。各群のサンプル数は 6 とした。

なお、マウスの糖尿病状態を確認するために、創傷後 7 日目に各グループのマウス 1 匹から血液サンプルを採取し、血糖値を測定した。

創傷後 11 日目まで傷サイズの測定を行った。測定には、ImageJ ソフトウェア（バージョン 1.53s、米国国立衛生研究所製）を使用し、写真から傷のサイズを定量化した。

また、創傷後 11 日目には創傷周囲の組織を採取し、10% ホルマリンで固定化し、ヘマトキシリン・エオシン（HE）染色を行った後、顕微鏡（オリンパス社製、CKX53）にて観察し、上皮再生の程度を評価した。

(5)徐放性評価⁶⁾

血液および体液によって膨潤した PAA/PVP 複合体からのタンパクの放出挙動を *in vitro* にて評価した。

マウス（BALB/c、7 週齢、メス）の背中に、麻酔下で円形の傷（直径 8 mm）を作り、10 mm 角の PAA/PVP 複合体スポンジを創傷部に一晩貼付した。その後、血液または体液によって膨潤したスポンジを剥がし、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で調製した 1% アガロースゲル（1 mL）の表面に置き、静置した。所定時間経過ごとにスポンジを除去し、アガロースゲルを全量回収して粉碎し、2 mL の PBS を加えて激しく攪拌した後冷蔵庫で 30 分以上静置してタンパクを溶出させた。その後、遠心分離（4°C、3000 g × 15 分）を行い、上清を回収した。

上清中に放出された血管内皮細胞増殖因子（VEGF）を、VEGF ELISA アッセイキット（Proteintech Group 社製）を用いて定量した。

3 結果と考察

(1)接着性および吸水性

PAA/PVP 複合体スポンジの接着性および吸水性を Table 1 に示す。

Table 1 複合体スポンジの面接着強度と吸水性

性能	評価結果
接着力 (N/cm ²)	5.96
吸水率 (g/g)	8.7

PAA/PVP 複合体スポンジは疑似皮膚に対して強い接着力を示した。また、疑似体液に対して高い吸水性を示した。このことから、本複合体は、血液や体液を速やかに吸収して膨潤し、皮膚への十分な接着性を示すことが示唆された。

前述の通り、本複合体は特殊な製法により、PAA と PVP 間に適度な架橋構造が形成されているため、このような吸水・膨潤性能を示すことができたと考えられる。

また、PAA のカルボキシ基が一部 PVP と未反応のまま残っているため、これが皮膚等の生体組織を構成するアミノ酸残基と水素結合を形成することで、高い接着力が生み出されたと推測される。

(2) マウスでの治癒促進効果検証⁶⁾

次に、PAA/PVP 複合体スポンジを糖尿病マウスの創傷部に貼り付け、治癒促進効果を調べた。

使用したマウスの状態を確認するため、試験 7 日目に各グループのマウス 1 匹から血液サンプルを採取し、血糖値を測定した。その結果、全て 18~32 mmol/L の範囲となり、基準となる 16.7 mmol/L を超えていたため、意図した通り糖尿病状態であることが確認された。

糖尿病マウスの背側皮膚に円型の傷をつけ、その上から傷を覆うように PAA/PVP 複合体スポンジを貼り付けた群と、傷に対し何の処置も行わない（未処置）群を用意し、経過時間ごとの傷の状態を比較した。処置後の経過時間に対する各群の傷の状態の観察結果を Fig. 4 に、各群の傷サイズの測定結果を Fig. 5 に示す。

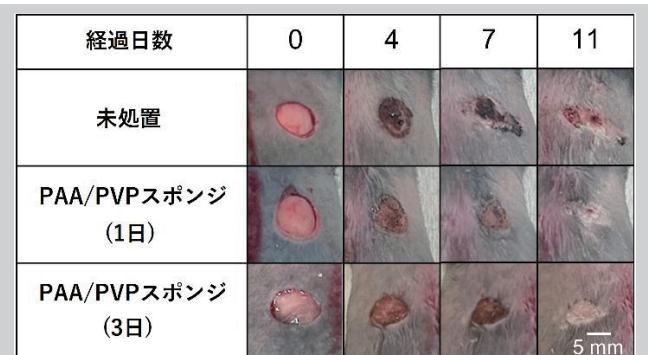


Fig. 4 傷の状態変化

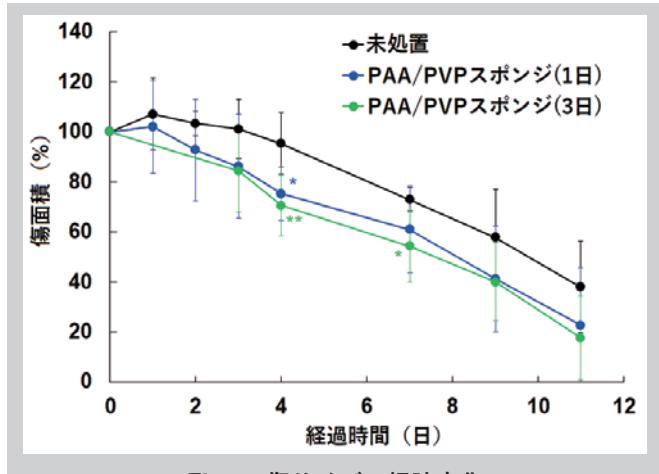


Fig. 5 傷サイズの経時変化

Fig. 5 に示したように、未処置群のマウスでは、創傷面積は 4 日後も元のサイズの 95%以上を維持していた。

対照的に、PAA/PVP 複合体スポンジで覆われていた傷は、剥がすタイミング（1 日目もしくは 3 日目）によらず、著しく早期に縮小しており、4 日目には元の大きさの 70~75%に達していた。さらに、複合体スポンジで覆われていた傷は、観察後期においても治癒が促進されており、11 日目には元の大きさの 17~23%まで縮小していた。

組織の再生度を評価するために、創傷後 11 日目に傷口周囲の組織サンプルを採取して HE 染色し、顕微鏡で観察した。

各群の代表的な画像を Fig. 6 に示す。

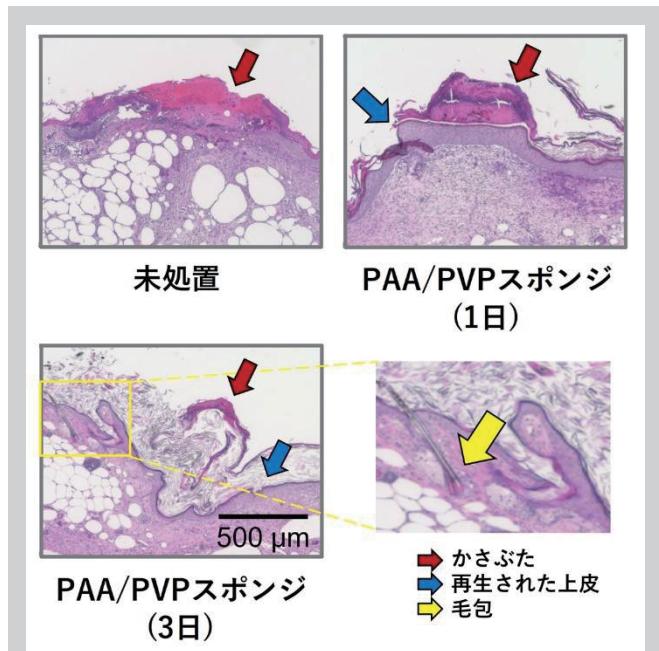


Fig. 6 組織断面の状態観察（11 日目）

未処置群では、ある程度の再上皮化が観察されたが、かさぶたの下に肉芽組織が形成されておらず、組織の再生が不完

全な部分が観察された。また、毛包や皮脂腺は存在せず、真皮と皮下層が乱れた構造となっていた。

一方、PAA/PVP複合体スポンジを貼付したグループでは、**Fig. 6**に青色の矢印で示したように、ほぼ完全な再上皮化が観察された。さらに、複合体スポンジを貼付し、3日後に除去したグループでは、黄色の矢印で示したような、皮脂腺を伴う毛包の構造が複数観察され、傷の治癒が進んでいることが示唆された。

これらの結果により、PAA/PVP複合体による創傷治癒効果が確認された。

本実験にて使用したPAA/PVP複合体スポンジは、防水シートなどで覆われてはいなかったため、貼付している間に水分が蒸発していくことが予想されたが、実際に複合体スポンジを傷口から剥がすと、スポンジは貼付から3日経過後も吸収した浸出液により適度に水分を保持しており、それに覆われていた傷口も湿度を保っていた。膨潤したスポンジによって作り出されたこの湿潤環境が、傷の治癒過程を加速させたと推測される。

湿潤環境が治癒に寄与するとされる一方で、透湿性の低いドレッシング材を使用し続けると、滲出液の過剰分泌により皮膚の軟化が起こり、不快感や痛みが生じるだけでなく、治癒過程が遅れる可能性もあることが最近報告されている⁷⁾。皮膚への過剰な水分投与によって、水分が皮膚の深層にまで浸透し、より広範囲の損傷を引き起こし、治療期間を延長させる可能性があるため、適切な滲出液管理が重要であると考えられている。よって、傷口の治癒のためには滲出液の量に応じた吸収性と水分蒸発性を備えたドレッシング材を選択する必要がある。

PAA/PVP複合体は、吸収した水分によってハイドロゲルを形成し、滲出液を吸収すると同時に適度な速度で水分を蒸発させるため、このような浸軟による悪影響を防ぐことが期待される。よって、本複合体は傷口の治癒に最適な環境を提供できるドレッシング材となり得る。

(3) タンパク徐放性

治癒が促進されたもう1つの理由として、PAA/PVP複合体のハイドロゲルが、創傷から滲出するか複合体に吸収された血小板によって分泌されたVEGFなどのサイトカインをその構造内に保持し、創傷部に強く接着することで、創傷表面に向かってそれらを徐放した可能性が挙げられる。

そこで、血液および体液によって膨潤した複合体からのタンパクの放出挙動を *in vitro* にて評価した。

PAA/PVP複合体スポンジを傷口に一晩当て、血液と体液で膨潤したスポンジをアガロースゲル上に置き、アガロース

ゲル内に移行したVEGFの量をELISAで測定した。測定結果を**Fig. 7**に示す。

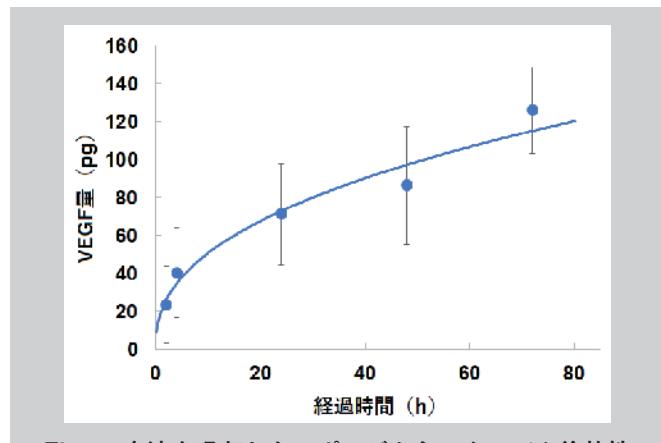


Fig. 7 血液を吸収したスポンジからのタンパク徐放性

このように、72時間以上にわたってVEGFがスポンジからアガロースゲル内に徐々に移行していることが観察された。このことから、血液や体液で膨潤したPAA/PVP複合体のハイドロゲルは、このような成長因子を創傷表面に向けて徐放する機能があることが確認された。

この機能により、PAA/PVP複合体で覆われた傷口は常に一定濃度の成長因子と接触していると考えられ、これが傷口の迅速かつきれいな治癒を引き起こすと予測される。

4 結論

本研究では、血液を吸収して膨潤し、傷口に強く密着する機能を持った、PAAとPVPとの複合体からなる新規素材を開発し、その治癒促進効果について評価した。

乾燥したPAA/PVP複合体を傷口に貼り付けると、血液や体液を急速に吸収し、組織接着性のあるハイドロゲルとなって傷口を保護する。膨潤した複合体ハイドロゲルは、傷の治癒に適した適度な湿潤環境を維持する。また、吸収した血液や体液中に含まれる成長因子がハイドロゲル内に浸潤して留まり、徐々に傷口に向かって放出される。これらの機能により、PAA/PVP複合体は、創傷治癒を促進する効果を示すと考えられる。

実際に、PAA/PVP複合体スポンジは糖尿病マウスの背側皮膚損傷モデルにおいて、創傷治癒を促進する効果があることが確認された。

本材料は、組織接着性があるために使い勝手がよく、創傷治癒促進効果を有する医療材料として、今後も幅広い用途への応用が期待される。

5 謝辞

本研究は、小原病院研究所 小山義之博士、伊藤智子博士との共同研究として実施した。各評価にあたり、多大なるご協力、ご助言を頂いた同氏らに感謝の意を表す。

引用文献

- 1) W. Naylor, D. Laverty, J. Mallett, *Wiley-Blackwell*, Chapter 3 (2001).
- 2) Winter GD. *Nature*. **193**, 293–294 (1962).
- 3) Z. Fan, B. Liu, J. Wang, S. Zhang, Q. Lin, P. Gong, L. Ma, S. Yang, *Adv. Funct. Mater.* **24**, 3933 (2014).
- 4) 小山義之, 伊藤智子, 江里口正純, *BIO INDUSTRY*, **34**, 6, 42-53 (2017).
- 5) T. Ito, N. Otani, K. Fujii, K. Mori, M. Eriguchi, Y. Koyama, *J Biomed Materoc Res.*, 1-10 (2019).
- 6) A. Ouchi, T. Ito, Y. Katahira, H. Hasegawa, K. Nakamura, I. Mizoguchi, T. Yoshimoto, Y. Koyama, *Gels*, **11**, 300 (2025).
- 7) F. Whitehead, S. Giampieri, T. Graham, P. Grocott, *J Wound Care*, **26**, 159-165 (2017).