

新規なセルロース誘導体を用いた医療用ゲル材料の開発

覚知 豊次 [北海道大学大学院工学研究科／教授]
佐藤 敏文 [北海道大学大学院工学研究科／助手]
加我 晴生 [独立行政法人産業技術総合研究所／グループリーダー]
金子 憲明 [マクロテック株式会社／代表取締役]

1 事業の背景・研究目的

近年、牛海綿状脳症（BSE）やC型肝炎の蔓延により、医療、医薬用途に用いられている動物由来のゼラチン（コラーゲン）やフィブリノゲンなどのゲル化剤（止血、接着など）の使用制限が厳しくなっている。例えば、ゼラチン（コラーゲン）は牛骨および牛皮、豚皮を原料にしており、発熱性物質やBSE等の問題がある。また、フィブリノゲンの原料は人の血漿蛋白質であり、C型肝炎などのウィルスの感染源としてのリスクがある。さらに、米国でのBSE発生などによって動物由来の医薬品等の原料の確保にとって危機的な状況が起こっている。以上のことから、厚生労働省は生体由来ゲル化剤を他の材料に置き換えるように指導している。しかしながら、現状において、これらに変わる合成材料はほとんどなく、シアノアクリレート（アロンアルファA）が代用されているがごく小さな範囲での使用に限定されている。それゆえに、これらに変わる新規なハイドロゲル材料の開発が急務になっている。

この状況に対応すべく、本事業では北海道大学の覚知らが発明した新規セルロース誘導体を原料として、反応してゲルを生成する医療合成高分子の開発を行ない、原料としてヒト・動物由来材料を使用しない安全性の高い医療用ゲル材料の製品開発を行った。最終的に医療用具として十分な有効性・安全性があることを、動物実験や生物学的安全性試験によって確認すること、さらに採算性のあるコストで製造できる見通しを立てること目的とした。本事業で提案した人・動物関係医療品の代替品の開発に関しては、医療の安全性向上という社会的ニーズもあることから、ここ数年間での重点的な検討が必要である。

2 セルロース誘導体による合成研究と机上評価

2-① 目的

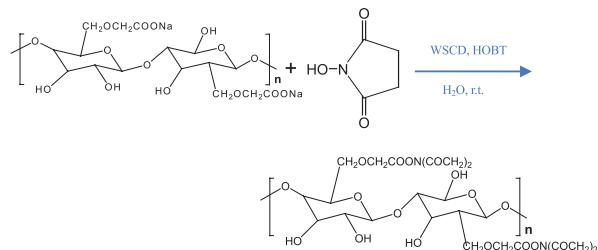
ウイルス感染などの危険性のない医療ゲル材料の開発を目的として、汎用の化学原料を出発物質として多用されているカルボキシメチルセルロース（CMC）より、カルボキシメチルセルローススクシンイミドエステル（CMC-Su）を合成し、これを用いた生体適合性ゲル材料の合成について検討した。また、セルロースと類似しているものであるアミロースのカルボキシ化によるカルボキシメチルアミロース（CMA）の合成を行い、

カルボキシメチルアミローススクシンイミドエステル（CMA-Su）から生体適合性ゲル材料の合成についても検討した。

2-② 実験

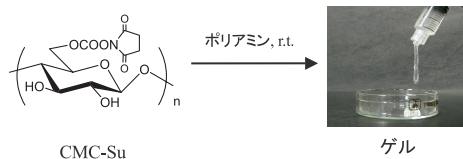
スキーム1に従い、CMC（Aldrich産、Mw=250,000、置換度1.2）をそれぞれ1, 0.5, 0.25当量のN-ヒドロキシスクシンイミド（Su-OH）と6時間反応させた後、透析分子量14,000の透析膜で二日間水中透析を行った。その後、凍結乾燥を行い、收率を測った。得られた生成物については元素分析、赤外分光（IR）測定を行い、エステル化が進行したことを確認した。また、得られた生成物を用いて溶解性実験とゲル化実験を行った。

スキーム1



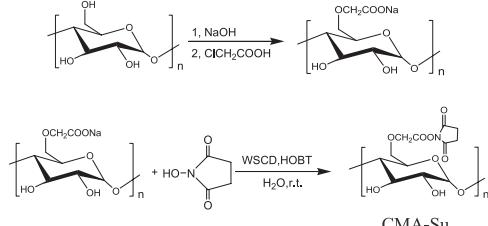
ゲル化実験はスキーム2に示すように、各当量のCMC-Suと2種類のポリアミン（PA-1, PA-3H）を用いてモル比を変えながら行った。生成ゲルについては製膜実験、IR測定などを行った。得られたゲルの膜は大量の蒸留水で洗浄してから凍結乾燥を行い、再び水中に入れ一定時間後、含水率を測った。

スキーム2

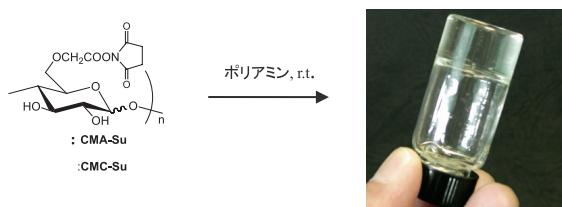


また、スキーム3にしたがって澱粉由來のアミロースを用いたゲル化材料の合成を行った。まず、アミロースを40%NaOH水溶液に溶解させ、モノクロロ酢酸を加え、カルボキシ化させ、カルボキシメチルアミロース（CMA）を合成した。その後、CMCと同様な方法でスクシンイミド化カルボキシメチルアミロース（CMA-Su）を合成した。得られたCMA-SuもCMC-Suと同様な方法を用いてポリアミンと反応させることでゲル化実験を行った（スキーム4）。

スキーム3



スキーム4



ゲルの生分解性についてはpH7.4の生理食塩水溶液の中37℃で数日間攪拌することにより行った。サンプルを水で洗浄後、凍結乾燥を行い、重量減少を測定した。また、含水率は得られたゲル膜を大量の蒸留水で洗浄してから凍結乾燥を行い、再び水に浸して測定した。

2-③ 実験結果

CMCとSu-OHの反応はいずれも収率が80%前後であった。テーブル1にCMC-Suの溶解性実験結果(室温)を示す。

テーブル1 CMC-Suの各溶媒に対する溶解性

H ₂ O	MeOH	EtOH	アセトン	CH ₂ Cl ₂	CHCl ₃	DMSO
○	△	×	×	×	×	×

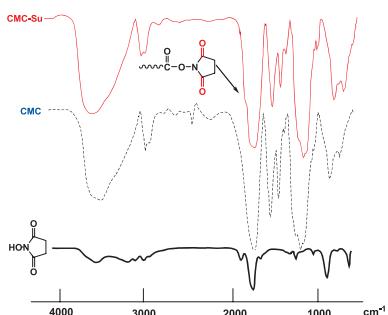
○: 溶解、△: 難溶性、×: 不溶性

得られたCMC-Suについて赤外線吸収スペクトルの測定を行った結果、スクシンイミド由来のピークが1700cm⁻¹付近で観測されたことからエステル化反応は予想通り進行したことが分かった(図1)。このことは元素分析の結果からも確認された。元素分析の結果を次に示す(テーブル2)。

テーブル2 CMC-Suの元素分析結果

SuOHの添加当量数 [SuOH]/ [Carboxy Unit]	C (%)	H (%)	N (%)	置換度 (DS)
1当量	40.62	6.07	4.75	1.2
0.5当量	37.81	5.34	2.07	0.5
0.25当量	36.78	5.29	1.45	0.2

図1. CMC-SuのIR測定結果



この分析結果からエステル化反応の進行が確認でき、スクシンイミド(SuOH)の添加量の変化により、カルボキシ基に対する置換度は0.2~1.2の範囲で制御可能になった。

得られたCMC-Suについて熱分析を行った結果、278℃から分解し始めることから安定性が高いことが確認できた。

同様に、アミロース、CMA及びCMA-SuのIR測定(図2)と元素分析結果(テーブル3)を次に示す。

テーブル3 CMC-Suの元素分析結果

C(%)	H(%)	N(%)	置換度(DS)
43.86	6.48	1.32	0.3

図2. CMA-SuのIR測定結果

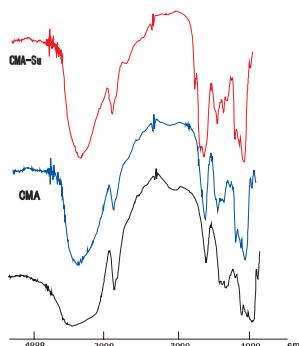


図2からアミロースのカルボキシ化とCMAのスクシンイミド化で新たなカルボキシ由来ピークが1720cm⁻¹付近に観測されたことから、両反応の進行を確認した。ただし、現時点では置換度の値が小さいCMC-Suしか合成できなかった。

次に、CMC-SuまたはCMA-Suとポリアミンを用いたゲル化実験についてテーブル4,5にまとめた。CMC-SuまたはCMA-Suとポリアミン(PA)のゲル化実験を行った結果、いずれの実験でもハイドロゲルが生成した。異なる条件でゲル化実験を行った結果、添加物(CMC-SuまたはCMA-SuとPA)の量と組成の違いにより、ゲル化時間と生成物の硬さの制御が可能になった。得られたゲルは半透明から透明なゲルであった。

テーブル4 CMC-SuとPA-1を用いたゲルの合成結果(1)

Run	CMC-Su (g)	PA-1 (ml)	ゲル	CMC-Su (g)	PA-1 (ml)	ゲル
1	0.2	0.05	△	0.2	1.5	○
2	0.2	0.1	△	0.2	2	◎
3	0.2	0.2	△	0.2	4	◎
4	0.2	0.5	△	0.1	4	○
5	0.2	0.7	△	0.05	4	×
6	0.2	1	○	0.02	4	

○: ゲル化が非常に速い、○: ゲル化が速い、△: ゆっくりゲル化、
×: ゲル化しない

テーブル5 CMC-SuとPA-3Hを用いたゲルの合成結果(2)

Run	CMC-Su(g)	PA-3H(ml)	ゲル	CMC-Su(g)	PA-3H(ml)	ゲル
7	0.2	0.05	◎	0.2	1.5	△
8	0.2	0.1	◎	0.2	2	△
9	0.2	0.2	◎	0.2	4	△
10	0.2	0.5	◎	0.1	4	△
11	0.2	0.7	◎	0.05	4	×
12	0.2	1	△	0.02	4	×

◎:ゲル化が非常に速い、○:ゲル化が速い、△:ゆっくりゲル化、×:ゲル化しない

ゲルの含水率を測った結果、すべてのゲルが130~170%の範囲であった。ゲルの分解性については、pH7.4生理食塩水の中で37°C、1週間攪拌し、重さを測った結果、36.5%の重量減少を示した。

2-④ 研究成果

セルロースおよびアミロースを原料として、ポリアミンと反応してゲルを形成する合成糖鎖誘導体の精密合成に成功した。これにより、ゲルを形成するために適した置換度、反応条件の概要が把握できた。また、セルロース誘導体およびアミロース誘導体とポリアミンのゲル化は瞬時に進行し、それぞれの組成の違い、濃度により、ゲル化時間と生成物の硬さの制御が可能であった。

2-⑤ 今後の展開

置換度の高いセルロース誘導体およびアミロース誘導体を用いて、たんぱく質とより強固な相互作用をもつ合成糖鎖誘導体を合成する。

3 CMC-Suの定常流粘度測定

3-① 目的

我々が合成した多糖誘導体を新しい医療材料として実用化する際、基本的な物性評価は必要となる。詳しい物性がわかれれば分子モデル、活性化エネルギーや自由体積などを推定でき物質間の相互作用を数値で表現できる。これは材料の寿命や生体内挙動を考える上で重要になってくる。本事業では有用な医療材料開発のため多糖誘導体の粘度物性を検討した。今回はスクシンイミド化したカルボキシメチルセルロース(CMC-Su)の粘性評価を示す。

3-① 実験

コーンプレート型回転粘度計($\phi=24\text{ mm}$, cone angle = 1.565°)を用いてCMC-Su水溶液の定常流粘度測定を行った。測定は恒温槽を用い温度10~40°C、回転速度0.3~100RPM(ずり速度1.2~384s⁻¹)の範囲で行った。サンプルには濃度1,2,3,4,5wt%のCMC-Su水溶液を調整した。

3-① 実験結果と考察

3-1) ずり速度依存性

実験には置換度1.2のCMC-Suを使用した。濃度1,2,3,4,5 wt%のCMC-Su水溶液について10~40°Cの条件下で粘度測定を行った。濃度5wt%の粘度-ずり速度の関係を図3と図4に示す。

図3から、CMC-Su水溶液が非ニュートン粘性流体を示し、さらにずり速度が応力のかかる時間に依存するつまり力が加わると内部応力が弱くなるチキソトロピー流体の性質を持ち合わせていることがわかる。図4からは高分子モデルを考えるためにずり速度に対数を採用した。その結果、CMC-Su水溶液は亜鉛型モデルに近い粘性液体と考えられる。しかし理想的な亜鉛モデルはずり速度が大きくなると粘度が一定になるが図4では粘度が単調に減少している。ここにはさらなる考察が必要である。

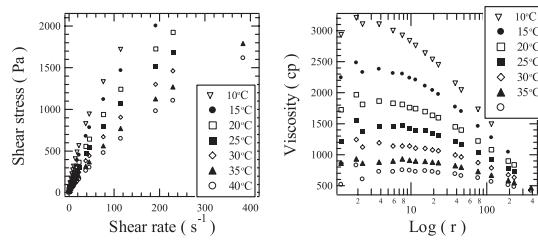


図3 . Shear rate - shear stress plot of 5 wt% CMC - Su solution.

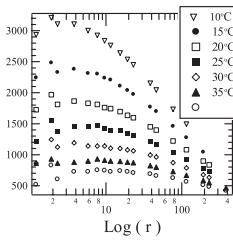


図4 . Viscosity - Log (r) plot of 4 wt% CMC - Su solution.

3-2) 濃度依存性

濃度1,2,3,4,5wt%の溶液に関して温度を10°C~40°C、回転速度30 RPMの条件でCMC-Su水溶液の濃度依存性について検討した(図5)。

濃度の増加とともに粘性が増加している高分子溶液の一般的な性質である。ただ増加の傾向が低温の場合は線形、高温の場合は非線形となっておりまだ考察の余地がある。粘度の対数と濃度の関係が直線の場合には固有粘度が求められ、高分子鎖の性質がわかる。

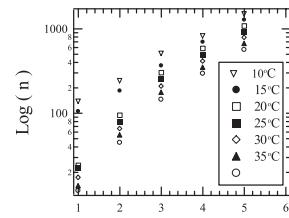


図5 . Concentration dependency of viscosity of CMC - Su solution.

3-3) 温度依存性

回転速度30 RPMの条件のもと温度依存について検討した(図6)。CMC-Su水溶液は高濃度になるほど温度変化の影響を受けやすかった。粘度と温度の関

係からは自由体積、活性化エネルギーが求められ、線形の場合にはアレニウスの式が有効とされている。

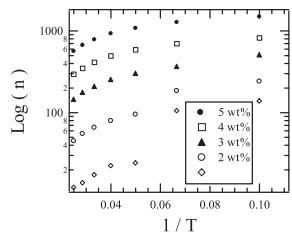


図6 . Temperature dependency of viscosity of CMC-Su solution at respective concentration.

3-④ 研究成果

これらをまとめるとCMC-Su水溶液は非ニュートン粘性を示し、さらに温度や濃度依存する偽塑性流体の挙動を持つことがわかった。

3-⑤ 今後の展開

セルロース誘導体を用いたゲル化時の粘弾性と生成したゲルの粘弾性測定をし、材料としての物性評価を行う必要がある。

4 併用装置の検討

4-① 目的

二液混合硬化性の医療用組成物を、施術使用時に、即時に使用、再使用が可能な、小型軽量かつ使用利便性の高い、塗布器具を開発することを目的とする。製品仕様に対応した形態や使用方法に対応した成分を均一に混合して止血や臓器損傷部の閉塞に適用するために必要な用具・装置(アプリケータ)の基礎検討を行なった。2液を混合するための方式を考案して試作品を製作して評価した。粘性の高い場合、粘度差の大きな2種類の溶液を均一に迅速にかつ定量的に混合させるための装置の検討を行うことを目的とした。さらに2本の注射器から幅広い条件で定量的に混合してゲルを形成させて、物性などの評価試料を作製するための実験装置を設計試作することを課題とした。

4-② 方法の検討

溶液は粘性を有するため、水やエタノールのように簡単には混合できない。一般的にこのような溶液には以下のよいうな混合方法を用いる必要がある。

①機械的混合…搔き混ぜる混合でスペース、動力等を考慮すると採用はできない。

②衝突混合…比較的高圧で2液を高速で衝突させ、乱流混合させる。

高压発生部、混合部等の小型軽量化が難しいため、採用はできない。

ア)ラインミキサー…スタティックミキサーのように液吐出ライン途中に混合部を設けることが可能で、スペース、装置の簡略化等でメリットが大きい。

イ)霧化混合…液を霧化し気体に近い極低粘度化し、2液を一定角度で衝突させることで、均一に混合させる。気体に近い性質であるので、比較的簡単に短時間に混合する。飛散等に注意を要するが、器具の取り扱いも簡便である。液の粘度が高くなると霧化し難く、高い圧力を要し飛散、施術部への刺激等の問題もある。

2)混合液の吐出方法

端末器具の操作性との関連が有るが、以下の形態が可能である。

ア)ノズル先端よりの単純吐出…混合部は交換、洗浄のような等硬化前の処置が必要。

イ)刷毛、ブラシへの吐出塗布…混合先端部は上記同様の処置が必要。

ウ)ローラーでの塗布……刷毛ブラシも同様であるが、先端を曲げたりすることで、施術裏面等にも届くように形状を作ることも可能。

エ)スプレーによる吹き付け…完全外部混合とする事が可能で、混合部の洗浄、交換は不要で、時間をおいての再使用にも基本的に問題は無い。

3)端末洗浄ライン…溶剤を加圧送り洗浄、気体を送り吹き払い等。

4)操作方法……前述の混合吐出方法により異なる部分はあるが、確実簡便な器具の操作方法の開発を目指す。

4-③ ラインミキサー法によるプロトタイプの試作とゲル化の試行

ラインミキサーを応用して混合することによって、一方もしくは双方が高粘性の溶液に対して適用した場合にあっても、均質なゲルの形成が可能であった。この装置は、ミキサーユニットを簡単に術中に交換することが可能なので、繰り返し使用が可能であるという特徴を有する。この方式では従来フィブリノゲンのアプリケータの欠点とされていた、一度使用を中断するとノズルが閉塞して以後の使用ができないなくなるという問題点を解決することができた。

図7.ラインミキサー



4-④ 成果概要

本研究において開発されたゲル形成用の溶液は、セルロース誘導体を原料とする反応性合成糖鎖誘導体が、

高粘性であってかつ架橋剤のポリアミンが相対的に著しく低粘性であること、さらには混合適正容量比が大きいことが特徴である。このような、制約条件のもとで、均質なゲルを獲得するための混合装置が公知の技術の組み合わせから低成本で製造できることが明らかとなった

4-⑤ 今後の展開

混合装置の小型化とスプレー式混合装置の開発の必要がある。

5 安全性評価

5-① 目的

厚生労働省の「生物学的安全性評価のガイドライン(平成15年3月)」に準拠して試作品の生物学的安全性を予備評価した。指定機関である(財)食品薬品安全センター秦野研究所にて、スクリーニングのために数項目の試験を選択して実施した。培地抽出による細胞毒性、復帰突然変異試験による遺伝毒性評価、血小板凝集試験、補体活性試験を実施して材料の持つ生物学的安全性試験を把握することを目的とした。分解生成物の影響、周囲組織の変化については(財)食品農医薬安全性評価センターの指導と協力を得て進める。本年度はラットによる1ヶ月の皮下埋植によって、分解吸収の様子、周囲組織の変化の概要を把握することを目的とした。形成したゲルに加えて、合成糖鎖の誘導体の細胞毒性を評価して、開発の指針とする。物理的・化学的試験を適切に実施する。

5-② 培地抽出法による細胞毒性試験

合成糖鎖誘導体の10wt%水溶液を80°Cにて2時間加熱して水溶液を作製してこれを試料としてV79細胞を用いて細胞毒性を評価した。結果は、IC₅₀すなわちコロニー形成を50%阻害する濃度は6.6mg/mlであった。この毒性は、弱い陽性物質(0.25%ZDBC含有ポリウレタン・フィルム)の2000分の1以下であって実質的に毒性は無い。5mg/ml以下ではコロニー形成を阻害しなかった。

合成糖鎖誘導体10wt%溶液とポリアミンを定量的に混合してゲルを4種類作製した。ポリアミンを2種類、洗浄方法の違いによって合計4種類の試料を作製して試験に供した。洗浄方法としてはシーラントを想定して、生理食塩水と緩衝溶液の混合液でフラッシュした。これら4種類の結果に差異はなく、いずれもコロニーの形成をまったく阻害しなかった。

5-③ 復帰突然変異

本試験は培地抽出液を用いて、突然変異や発ガンをもたらす可能性のある物質を微生物を用いて検出する試験である。本合成糖鎖ゲルを用いた試験で変異コロニー数が陰性対照値の2倍を超えてかつそれが用量依存性

と再現性がある場合を陽性とする。

本ゲルの抽出物を用いた試験結果は陰性であった。

5-④ 血小板凝集試験

均質に調製したゲルを試験に供した。血液凝固性を評価することを目的とする。

ウサギの多血小板血漿とゲルの抽出液との接触で、誘発される血小板の凝集を評価することによって血液凝固性の有無を判定する。

ADPまたはコラーゲン誘発血小板凝集率を100%としたとき、本ゲルの生理食塩水抽出液のウサギ血小板凝集率は81.2%、74.2%を示したことから、血小板凝集を弱く抑制することが確認された。

本試験とは別に血液凝固性の評価のために、リーホワイト氏全血凝固時間を東京大学井街教授のご好意によってヤギの血液を用いて実施した。試験には、ゲルを薄く平滑に塗布したガラス試験管を用いた。凝固時間は明らかにガラスに比べて延長しており、本ゲルは血栓形成性を呈しないことが示唆された。

5-⑤ 補体活性試験

人工血管の最大移植面積を300cm²と仮定して、0.63cm²に対してヒト血清1mlを37°Cで120分接触させて補体活性を測定した。ポリアミン2種類、混合時の溶媒、ゲル形成後の後処理の有無によって5種類の試料を作製して試験に供した。試験結果からいずれの試料においても補体活性は存在しなかった。

5-⑥ ラット皮下埋植試験

合成糖鎖誘導体と3種類のポリアミンを反応させたシート状のゲルを調製した。これらを湿潤状態で一辺約10mmの正方形で厚さが1mmになるように、柔軟性を持たせるためにグリセリンで可塑化後乾燥した状態で一辺約8.5mmの正方形に切り出したものを試料とした。エチレンオキサイドガスにて滅菌して試験に供した。

各群5試料を埋植して、試料を移植しないで同一手術操作を施したプラセボを5例実施して30日後の、材料の残存の有無と周囲組織の変化を観察した。

その結果、いずれの群も試料は残存していたが、ポリアミンの種類によってやや違いが認められた。周囲には被包が形成されつつあるが、異常な変化は認められなかった。

5-⑦ 研究成果

現時点で本ゲルとその原料についての生物学的安全性の評価結果から、大きな問題点は認められないことが判明した。

ポリアミン原料の安全性については、製造元のデータによって主なものは確認されている。

5-⑧ 今後の展開

安全性評価のスクリーニングの結果と性能評価に基づいて決定された最終候補に関して、日本の医療用具の生物学的安全性試験のガイドラインに基づいて全項目について、GLPに基づいた最終的な試験を実施する必要がある。

6 製造条件検討

最終的には、滅菌方法・条件検討を含む生産方法/条件の検討を行って治験品の製造が再現性良く実施できるようにすることが目的である。それぞれの原料、中間体、基材の汚染度の把握、除菌等の方法、試験検査方法、貯蔵条件の影響等の品質に影響を及ぼす重要な項目について検討する。さらに加工時の組成のばらつきを低く抑えることができる製造方法を作る。本事業では化学的安定性、汚染度等を評価した。

6-① 研究成果

本年度は、合成糖鎖ゲルの合成方法を改良して試作を反復した。得られた合成物の元素分析をおこなって再現性を評価して、単位操作の問題点を改良して本格的な動物実験や生物学的安全性試験に使用するためのスケールアップを実施した。

6-② 今後の展開

さらにスケールアップした反応装置を製作して、再現性良く清潔に合成物を調整することを課題とする。原料の保存条件と安定性との関係、原料中の菌数、試作品の滅菌前汚染菌数の把握と滅菌条件の設定、基材の選定等々の製品化のための課題を逐一解決する必要がある。

7 まとめ

- ・セルロース誘導体を原料とした合成糖鎖ゲルの形成法を確立した。混合することで迅速に架橋反応が進み、流動しないゲル化層を形成することが可能であった。止血剤として、現行のフィブリノゲンとトロンビンを混合して使用する製品を代替しうる可能性があると考えられた。
- ・生物学的安全性評価を、厚生労働省の指定機関にて実施した。これのスクリーニングの結果から現在検討中の材料はかなり広範囲な領域で生物学的安全性に影響の少ない組み合わせが選択できることが判明した。今後さらに実用化する製品ごとにGLPに準拠した試験を実施する必要がある。
- ・ラットの皮下埋植にて3種類のゲルの生分解性を評価した。30日では少なくとも相当部分が残存しており、正常な被包が形成されつつあることが確認された。
- ・反応性の2液を混合してゲルを形成するアプリケータを考案して試作した。試行の結果、優れた性能を示した。高粘性の高分子溶液をと少量の低粘度の架橋剤とで均一な混合ゲルを形成することができた。先端を軽くふき取っておくことで、繰り返し使用することができる点で優れている。

本研究の成果により、セルロース誘導体が工業的規模で再現性良く生産できるようになり、セルロース誘導体を基盤物質とした新しい医療ゲル材料の開発が期待される。また、感染の危険性をはらむ人・動物由来の材料を使用せずに既存の汎用医療材料、用具を製造する選択肢ができることにより、医療の安全性を向上することに貢献する。今後は、安価で感染の心配がないというセルロース誘導体の特性を活かし、二液混合型の医療用接着剤、止血剤などの実用化が期待される。また、セルロース誘導体を用いたゲル材料の応用として、創傷被覆材、医療用臓器模型材料などの開発が期待される。