

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）  
総括研究報告書

主任研究者 鈴木 義久 京都大学大学院 講師

研究要旨 ポリビニルアルコールのカルボキシル基の導入にアセタール結合が有効であることが明らかとなった。

分担研究者 西村 善彦  
京都大学大学院  
教授

分担研究者 谷原 正夫  
奈良先端科学技術大学院大学  
教授

#### A. 研究目的

ポリビニルアルコール（PVA）に酵素切断性ペプチドを介して抗菌剤（ゲンタマイシン）を結合し、細菌と接触すると細菌が放出した酵素により抗菌剤が放出される創傷被覆材を研究している。PVA にペプチドを結合させるには、高分子鎖中にカルボキシル基が必要であるが、従来その導入方法として無水酢酸を用いたエステル化を検討してきた。しかし、結合させたペプチド中に含まれるグアニジド基により分子内求核置換反応を受け、エステル結合が切断されることが解った。本研究の目的はペプチド結合後も安定で、オートクレーブ滅菌にも耐え得る上記デバイスを提供することである。

#### B. 研究方法

エステル結合に変わるカルボキシル基導入の方法として、p-ホルミル安息香酸を用いたアセタール結合の導入の可能性を検討した。さらに、同方法により作成したカルボキシル基含有 PVA に対して、ペプチドリンカー、

およびゲンタマイシンを結合させ、オートクレーブ滅菌前後のゲンタマイシン放出量を測定した。

#### C. 研究結果

PVA に対する p-ホルミル安息香酸の量を変化させ、DMSO 中、90℃、1 時間、p-トルエンスルホン酸を触媒として用いて、加熱攪拌することで PVA 鎖中に任意量のカルボキシル基を導入することが可能であった。1.2mol%（対 PVA 中水酸基）カルボキシル基導入 PVA を用いて、ペプチドおよびゲンタマイシンを結合させた本デバイスの酵素による放出量は 282.1 μg/g ゲルであり、PBS による非特異放出量は 9.9 μg/g ゲルであった。また、オートクレーブ滅菌終了後の放出量は 204.1 μg/g ゲルであり、PBS による非特異放出量は 2.0 μg/g ゲルであった。

#### D. 考察

アセタール結合によりカルボキシル基を導入した原料を用い、ペプチドおよびゲンタマイシンを結合させた本デバイスは、ペプチド結合後も切断されることなく安定であった。オートクレーブ滅菌後も同様に安定であり、実用に近いデバイスを得たものと思われる。従来の抗菌剤含有型創傷被覆材は、創傷部に貼付すると同時に抗菌剤が放出されるため、耐性菌を発生させる危険性が高かったが、本

デバイスは細菌が増殖を始めた場合にのみ抗菌剤が放出されるため、耐性菌発現の危険性は低いものと期待される。

#### E. 結論

酵素によりペプチド部分が分解され抗菌剤が放出される機構を確認できた。放出量は実用に際して十分であり、非常に有用なデバイスである。また、非特異放出量は極めて少なく、細菌が増殖を始めた場合にのみ抗菌剤が放出されることが解った。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Suzuki, Y., Tanihara, M., Nishimura, Y., Suzuki, K., Shimizu, Y., Kakimaru, Y. A new drug delivery system with controlled release of antibiotic only in the presence of infection. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1998; 42, 112-116.

(2) Suzuki, Y., Tanihara, M., Nishimura, Y., Suzuki, K., Kakimaru, Y., Shimizu, Y. Antibiotic delivery system stimulated by microbial infection. In: Haris, P. I., Chapman, D., editor. *New Biomedical Materials, Basic and Applied*. Amsterdam: IOS Press, 1998, pp130-134.

##### 2. 学会発表

25 Congress European Society for Artificial Organs, Suzuki, Y., Tanihara, M., Suzuki, K., Hashimoto, T., Nishimura, Y., A new device with antibiotic delivery system stimulated by *Staphylococcus aureus* infection, Bologna, Italy, 1998/11/11-

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）  
分担研究報告書

分担研究者 西村 善彦 京都大学大学院 教授

研究要旨 ラット等、動物の感染創ではトロンピン様活性が上昇することが明かとなった。

A. 研究目的

細菌感染時にのみ抗生物質を放出するデバイスの作成にはまず、細菌感染時と非感染時の違いを見つけたさなければならない。種々の検討を重ねた結果、創滲出液中の酵素に的を絞った。したがって、目的はブドウ球菌感染創と非感染創との滲出液で種々の酵素の活性を調べ、シグナルとして用いることのできる酵素を決定することである。

B. 研究方法

ラット背部にエアープOUCHを作成し、24時間後にPOUCH内にブドウ球菌とモンモリロナイトを注入する。5日後創をあけ、創面よりの滲出液をアガロースの凍結乾燥スポンジにて回収した。回収されたスポンジより滲出液の重量を測定した後、滲出液を抽出し蛍光ペプチド基質をもちいて酵素量を測定した。

C. 研究結果

ブドウ球菌感染創では非感染創にくらべて有意に滲出液量は多かった。また、有意にトロンピン様活性も高かった。

D. 考察

ブドウ球菌感染創で上昇する酵素はいくつかあったが、そのなかでも最も量がおおく、シグナルとして利用可能と考えられる酵素としてトロンピン様活性に注目した。トロンピンに関しては従来研究が進んでおり、トロンピン特異的に切断されるアミノ酸配列がすで

にいくつか報告されている。従って、この配列をリンカーとしてブドウ球菌に有効な抗生物質を担体に結合すれば良いことになる。

E. 結論

トロンピン様活性がブドウ球菌感染創で特異的に上昇することが分かった。次に、トロンピンによって切断されるリンカーを開発することで目的のデバイスを作成することが可能であることが分かった。

F. 研究発表

論文発表 他の共同研究者の報告書参照  
学会発表 他の共同研究者の報告書参照

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）  
分担研究報告書

分担研究者 谷原 正夫 奈良先端科学技術大学院大学 教授

研究要旨 担体として好適な性質有するポリビニルアルコールゲルの作製と刺激応答性リンカーの最適化を行い、動物モデルで細菌感染抑制効果を検証した。

A. 研究目的

閉鎖性創傷被覆材としても有効な担体を作製する。ブドウ球菌感染創で増大する酵素で切断するペプチドリンカーの最適な配列を探索する。得られた抗菌剤放出デバイスの有効性を動物モデルで評価する。

B. 研究方法

1. 担体の作製方法

ピバリン酸ビニルをメタノール中で AIBN を開始剤として重合して、重合度が約 1650 のポリピバリン酸ビニルを得た。得られたポリピバリン酸ビニルを THF 中で KOH により部分加水分解を行い、ケン化度 63%、81%、93% の部分ケン化ポリビニルアルコールを得た。

カルボキシル基の導入は以下の方法で行った。3重量%の部分ケン化ポリビニルアルコールの DMSO 溶液を 70℃に加熱し、攪拌溶解した。その後無水コハク酸とピリジンを加え、70℃に加熱し、3-4 時間攪拌した。反応物を水で良く洗浄して、カルボキシル基が導入された部分ケン化ポリビニルアルコールを得た。電位差滴定によりカルボキシル基導入率を求めた。

得られた部分ケン化ポリビニルアルコールを 3重量%の濃度で DMSO に溶解し、ガラス製トレイに流延した。その後、水中に投入してゲル化させた、十分に水洗して部分ケン化ポリビニルアルコールゲルを得た。

2. ペプチドリンカーの合成と酵素切断性の検討

全自動ペプチド合成装置を用いて合成した。トリフルオロ酢酸で処理してレジンからのペプチドの脱離と脱保護を行った。逆相系の分取用高速液体クロマトグラフで精製した。得られた精製ペプチドの純度を分析用高速液体クロマトグラフと FAB-MS で確認した。

合成されたペプチドとトロンピンを 37℃で反応させた。0~24 時間まで経時的に反応液をサンプリングし、アセトニトリルで除蛋白した後、分析用高速液体クロマトグラフでペプチドのピーク面積の変化を追跡して、トロンピンによるリンカーの切断活性を検討した。

3. 動物モデルにおける細菌感染抑制効果の検証

ラット背部皮下に作製したエアポーチに、黄色ブドウ球菌とモンモリロナイトを移植することにより、細菌感染創を作製した。その後、抗菌剤放出デバイスを細菌感染創に貼付し、細菌数の変化を追跡した。

C. 研究結果

1. 担体の評価

部分ケン化ポリビニルアルコールは、OH 基の濃度が高くなるほど（ケン化度が高いほど）含水率が高く柔軟なゲルとなった。また、ケン化度が 95%を越えると本方法では含水ゲルは得られなかった。さらに、COOH 基を

導入するとその濃度に応じて、さらに含水率が高く透明で柔軟なゲルとなった。OH 基の濃度が低く、かつ COOH 基の濃度が低いゲルは、創部に密着せず被覆材として不適であった。逆に OH 基の濃度と COOH 基の濃度がともに高いゲルは、取扱にくくなり不適であった。

総合的に判断して、ケン化度が 81% で COOH 基導入率が 12micromol/g-hydrogel の部分ケン化ポリビニルアルコールが最適であることが判明した。

## 2. ペプチドリンカーの酵素切断性

種々のペプチドリンカーを合成して、トロンピン切断性を検討した結果、N 端から 2 番目のアミノ酸は D 体の Phe 残基、3 番目は Pro 残基、4 番目は Arg 残基、5 番目は Gly 残基、6 番目は Phe 残基がそれぞれ好適であることが分かった。また、ペプチドの長さは 8 量体以上必要であることも明らかとなった。これらから、Gly-(D)-Phe-Pro-Arg-Gly-Phe-Pro-Ala-Gly-Gly を最適なリンカーとして抗菌剤放出デバイスの作製に用いた。

## 3. 動物モデルにおける細菌感染抑制効果

黄色ブドウ球菌感染症動物モデルにおける細菌数は、抗菌剤放出デバイスを貼付した創で、91 CFU/ml (n = 8) となった。部分ケン化ポリビニルアルコールゲルを貼付した創の細菌数 (550,000 CFU/ml, n = 9) や未貼付の創の細菌数 (5,800 CFU/ml, n = 8) と比較して顕著な減少が認められ、本デバイスの細菌感染抑制効果が検証された。

## D. 考察

本研究の結果から、部分ケン化ポリビニルアルコールから得られるゲルは、OH 基および COOH 基の存在率が高いほど高含水率で、透明、柔軟になることが分かった。OH 基が多いと結晶化が促進され、その結果含水率が

低下することも予測されたが、ケン化度が 93% までの範囲では、OH 基濃度と含水率は相関していた。ケン化度が 95% 以上の部分ケン化ポリビニルアルコールではゲルが得られにくいことを考えあわせると、残存するピバリン酸部分の疎水結合がゲルの性質に大きな影響を与えることが示唆された。また、COOH 基はその負電荷に起因する水和の効果と結晶化阻害効果により透明性と含水率の増大に寄与すると推測される。

最適なペプチドリンカーとして選択した Gly-(D)-Phe-Pro-Arg-Gly-Phe-Pro-Ala-Gly-Gly は、2 U のトロンピン存在下で 15 分以内に 100% 切断された。切断部位は Arg-Gly の間の結合と推定され、切断部位からアミノ末端側のアミノ酸配列については既にいくつかの研究報告があり、それらの結果と本研究の結果は矛盾しなかった。切断部位からカルボキシ末端側については全く研究がなされておらず、本研究で初めてアミノ酸配列の好適性と速やかな切断に必要なアミノ酸残基数とが明らかとなった。

本研究で得られた抗菌剤放出デバイスは、コントロールの部分ケン化ポリビニルアルコールゲルと比較して 1 / 5 0 0 0 に細菌数を減少させ、動物モデルで抗菌活性を示すことが検証された。何も貼付しない感染創の細菌数がコントロールより減少したが、これは創部の乾燥が原因と考えられる。

## E. 結論

1. 抗菌剤放出デバイスの担体として、ケン化度が 81% で COOH 基導入率が 12 micromol/g-hydrogel の部分ケン化ポリビニルアルコールが最適であることが判明した。
2. Gly-(D)-Phe-Pro-Arg-Gly-Phe-Pro-Ala-Gly-Gly が最適なリンカーであることが分かった。
3. 黄色ブドウ球菌感染症動物モデルで本研

究の抗菌剤放出デバイスが顕著な細菌数の減少を示し、本デバイスの細菌感染抑制効果が検証された。

F. 研究発表

1. 論文発表

M. Tanihara, Y. Suzuki, Y. Nishimura, et al.,  
A novel microbial infection-responsive drug release system, J. Pharm. Sci., 1999, in press.