

2008/7014A

厚生労働科学研究費補助金  
医療技術実用化総合研究事業

「創傷治療に被覆材、組織接着剤、止血剤としての  
新規医療薬品の開発研究」

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 橋 本 公 二

平成 21 (2009) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金  
医療技術実用化総合研究事業

「創傷治療に被覆材、組織接着剤、止血剤としての  
新規医療薬品の開発研究」

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 橋本 公二

平成 21 (2009) 年 3 月

## 目 次

|   |    |
|---|----|
| I. 班員構成 .....                                   | 3  |
| II. 総括研究報告 .....                                | 7  |
| 「創傷治療に被覆材、組織接着剤、止血剤としての<br>新規医療薬品の開発研究」<br>橋本公二 |    |
| III. 分担研究報告                                     |    |
| 「光硬化性キトサンゲルを用いた培養皮膚生着性に関する研究」 .....             | 15 |
| 橋本公二  |    |
| 「組織接着剤・止血剤として光硬化性キトサンゲルの適用に関する研究」 .....         | 19 |
| 石原雅之  |    |
| 「内視鏡を併用した消化器粘膜切除術への充填材としての .....                | 29 |
| 光硬化性キトサンゲルの適用」<br>前原正明                          |    |
| 「創傷被覆剤として光硬化性キトサンゲルの適用」 .....                   | 36 |
| 清澤智晴  |    |
| IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....                        | 45 |
| V. 別刷 .....                                     | 51 |

[I]

班員構成

## 班 員 構 成

| 研究者名      |       | 研究実施場所                            | 職名  | 主な研究分担                         |
|-----------|-------|-----------------------------------|-----|--------------------------------|
| 研究<br>代表者 | 橋本 公二 | 愛媛大学<br>大学院医学系研究科<br>感覚皮膚医学       | 教授  | 研究の総括<br>培養皮膚接着<br>剤としての応<br>用 |
| 研究<br>分担者 | 石原 雅之 | 防衛医科大学校研究センター<br>医療工学研究部門<br>生体材料 | 教授  | 光硬化性キト<br>サンゲルの医<br>療応用        |
| 研究<br>分担者 | 前原 正明 | 防衛医科大学校<br>外科学                    | 教授  | 内視鏡治療へ<br>の応用                  |
| 研究<br>分担者 | 清澤 智晴 | 防衛医科大学校<br>形成外科学                  | 准教授 | 皮膚接着剤と<br>しての応用                |

[II]

総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）  
総括研究報告書

創傷治療に被覆材、組織接着剤、止血剤としての  
新規医療薬品の開発研究

研究代表者 橋本公二  
愛媛大学大学院医学系研究科 感覚皮膚医学 教授

研究要旨 培養皮膚移植は、創傷部位に皮膚組織を即座に導入することが可能で、皮膚全層欠損においてその有効性は臨床的に明らかになっている。特に難治性皮膚潰瘍に対する培養表皮シートならびに三次元培養皮膚移植の有用性・安全性については多くの症例で証明されている。これら培養皮膚移植は生着性が低いことが難点であり、創傷治癒や上皮化を得るためには繰り返しの移植が必要であった。培養皮膚移植に際し、移植用皮膚片の固定ならびに接着を向上させることが、生着率および治療効果の向上につながると推察される。キチン・キトサンスポンジ製剤は、強い抗菌活性とともに創傷治癒促進効果を有することが知られており、創傷被覆材として医療用具としての承認が得られているが、瞬時の止血・生体接着効果を保持させることは難しく、組織適合性を高めることが求められてきた。そこで、キトサンを化学的に修飾することで可溶性を高め、紫外線照射数秒で軟ゴム状にゲル化する光硬化性キトサンゲルを開発した。本材は動脈からの出血に対する止血効果、肺及び気管支からの空気漏出を完全に防ぐことが動物実験で確認されている。本研究は培養皮膚の組織接着剤としての適応、内視鏡を併用した消化器粘膜切除術への充填材・出血抑制剤としての適用、肝臓等内臓出血における止血剤としての適用、創傷被覆剤としての適用について検討し、光硬化性キトサンゲルの新規医療薬品としての可能性について検討した。

研究分担者

石原雅之  
防衛医科大学校  
防衛医学研究センター  
医療工学研究部門  
教授

清澤智晴  
防衛医科大学校 形成外科学  
准教授

前原正明  
防衛医科大学校 外科学  
教授

A. 研究目的

培養皮膚移植は、創傷部位に皮膚組織を即座に導入することが可能で、皮膚全層欠損においてその有効性は臨床

的に明らかになっている。特に難治性皮膚潰瘍に対する培養表皮シートならびに三次元培養皮膚移植の有用性・安全性については多くの症例で証明されている。これら培養皮膚移植は生着性が低いことが難点であり、創傷治癒や上皮化を得るためには繰り返しの移植が必要であった。培養皮膚移植に際し、移植用皮膚片の固定ならびに接着を向上させることが、生着率および治療効果の向上につながることは容易に推察される。

キチン・キトサンスポンジ製剤は、強い抗菌活性とともに創傷治癒促進効果を有することが知られており、創傷被覆材として医療用具としての承認が得られているが、瞬時の止血・生体接着効果を保持させることは難しく、組織適合性を高めることが求められてきた。そこで、キトサンを化学的に修飾することで可溶性を高め、紫外線照射数秒で軟ゴム状にゲル化する光硬化性キトサンゲルを開発した。

培養皮膚移植時の接着剤として光硬化性キトサンゲルの有効性を検討することを目的にしている。治療初期の創傷を培養皮膚がカバーし、接着剤としてのキトサンゲルが培養皮膚の機能を維持しながら、強力に接着させるという合理的な培養皮膚移植治療が期待できる。同様な接着剤として、フィブリン糊、化学架橋コラーゲン・ゼラチン、シアノアクリレートなどがあるが、キトサンゲルが有する機能を具備しているものはない。

また、従来行われてきている分層皮膚移植、全層皮膚移植、皮膚縫合創にも応用可能であり、その強力な組織接着が治療効果の向上へつながることが予想される。

また、皮膚科領域に限らず、内視鏡を

併用した消化器粘膜切除術への充填材・出血抑制剤としての適用、肝臓等内臓出血における止血剤としての適用について検討し、その安全性と有効性を検証することを目的とする。

## B. 研究方法

光硬化性キトサンゲルを用いた培養皮膚生着性に関する研究：手術時の余剰正常ヒト皮膚から角化細胞ならびに線維芽細胞を分離培養した。線維芽細胞を含んだ中和コラーゲン溶液を調整し、レインキュベーター内でゲル化させ、5日後に収縮陥凹したゲル上に角化細胞を播種した。2日後空気に暴露することにより（気相下培養）重層化させ、移植には重層化開始後7日目の培養皮膚を使用した。ヌードマウスを麻酔し、背部に1 x 1 cmの全層皮膚欠損を作成し、キトサンゲルを添加後、同じサイズの培養皮膚を密着させ、紫外線を照射した。移植後7、14日目に組織を採取した。

組織接着剤・止血剤としての光硬化性キトサンゲルの適用に関する研究：うさぎの頸動脈を麻酔下に露出させ、針（18G）を刺すことで出血をさせた。出血箇所の両側をクリップを用いて一時クランプすることで止血し、光硬化性キトサン溶液の一滴を出血部に加え、紫外線照射（30秒）によりゲル化させ、クリップを取り除いて血流を再開させ止血を確認した。また、肺の前葉に長さ約5 mm、深さ約5 mmの切傷をつけ、約100  $\mu$ lの光硬化性キトサン溶液を傷口に加え、60秒の紫外線照射で硬化させた。光硬化性キト

サンハイドロゲルとその凍結乾燥して得られたスポンジからなる新規止血材 (PCM-S) を調製し、ラットの肝損傷モデルで市販の止血剤である TachoComb (TC) による止血効果を比較・評価した。ヘパリン投与 (500 IU/kg)、非投与のラットの肝左葉を径 3 mm のダーマパンチで貫通創を作成し、PCM-S と TC で止血を行なった。止血については、肉眼的所見、出血量の測定、経時的な ALT 値の測定及び創部の病理観察を行なった。

内視鏡を併用した消化器粘膜切除術への充填材としての開発研究：ブタを全身麻酔後、内視鏡的にブタ胃粘膜下層に高張生理食塩水と光硬化性キトサンゲルの注入 (5 ml) を行った。光硬化性キトサンゲルを注入した場合は、紫外線照射装置及び照射用ファイバーを使用し、注入部位当り 30 秒間紫外線照射をした。ESD においては、直径 3 cm の円状に粘膜切除するようにマーキングを行い、光硬化性キトサンゲルの注入及び紫外線照射後、肛門側切除線の粘膜を切除した。続いて同様に口側も光硬化性キトサンゲルの注入及び紫外線照射後、粘膜を切除した。粘膜切除 1, 4 週後、再度内視鏡観察を施行、切除部の創傷治癒過程を観察した。さらに、5 ml の光硬化性キトサンゲルを注入 (粘膜切除はしていない)、紫外線照射 4, 8 週後の注入部の病理組織標本作製し、光硬化性キトサンゲルの生分解性の有無を検討した。

創傷被覆剤として光硬化性キトサンゲルの適用：本研究では糖尿病性皮膚潰瘍モデルを用いた難治性創傷に対する創傷治癒促進剤として FGF-2 含有光硬化性キトサンゲルの使用の可能性を評価した。db/db マウスの背部に約 100 mm<sup>2</sup> の丸い皮膚全層開放性欠損傷をつくり、5µg の FGF-2 を含有させた光硬化性キトサン水溶液を創傷面に投与し、30 秒間の紫外線照射を行ない、ゲル化させた。経時的な創傷治癒過程について組織学的検討を含め、コントロール群と比較検討した。

### C. 研究結果

光硬化性キトサンゲルを用いた培養皮膚生着性に関する研究：光硬化性キトサンゲルは 2%、1.5%、1%、0.75%、0.5%、0.25%、0.1% の濃度で、紫外線の照射は 30-120 秒の間でそれぞれ検討した。0.25% 以下の濃度では紫外線照射を長くしても培養皮膚接着効果はなく、ゲル化しないことが判明した。また、1% 以上であれば移植床と培養皮膚間のゲルが厚くなり培養皮膚が脱落することが明らかとなった。至適条件としては、0.5% のキトサンゲルで紫外線 60 秒程度が明らかとなった。マウスを用いた移植実験では、小さな移植片しか使えず、十分な圧迫が困難なため、キトサンゲルを薄く塗布できないことが判明した。

組織接着剤・止血剤としての光硬化性キトサンゲルの適用に関する研究：頸動脈出血の止血実験において光硬化

性キトサンゲルを投与した場合、1分以内の紫外線照射で完全な止血と血流再開が確認されたのに対して、フィブリングリユーは止血のために $3 \pm 1$ 分の硬化に必要な時間を費やした。なお、紫外線照射のみ、あるいは光硬化性キトサン溶液のみの投与で紫外線照射を行なわない場合、10分以上にわたって止血はできなかった。7例のうち3例に対して上述の光硬化性キトサンハイドロゲルによる止血実験を行ない、すべて1ヶ月以上にわたり再出血なく生存、血管の修復が確認された。止血実験から1ヶ月後の組織学的検討では、血管の傷穴は完全に塞がり、血管の外側は炎症細胞を含んだ繊維状組織で囲まれていた。肺からの空気漏れ抑制実験において、術後1週間、X線透視検査の結果では光硬化性キトサンハイドロゲルおよびフィブリングリユー投与群では肺からの空気漏れはなく、完全に膨らんだ状態で正常に維持され、前例1ヶ月以上にわたって何ら異常なく生存した。光硬化性キトサンとそのスポンジからなる新規止血剤は、TCと比べて有意に高い止血効果を示した。病理観察では両群ともに創部の線維化が観察されたが、形成された線維化組織は経時的に減少し、経時的広がりも観察されなかった。これらの結果はPCM-Sは有効で安全な止血剤となることを示唆する。

内視鏡を併用した消化器粘膜切除術への充填材としての開発研究：光硬化性キトサンゲルを粘膜下層に注入・紫

外線照射した場合、明瞭な辺縁をもって粘膜が挙上され、挙上粘膜の形状変化は60分後でも、ほとんど見られなかった。これに対して高張生理食塩水を注入した場合、数分間明瞭な辺縁をもって粘膜が挙上されたものの、5分後より挙上粘膜の高さが低下し、10分後には挙上部位が不明瞭となった。光硬化性キトサンゲルを使用したESDでは、術中の粘膜剥離部位からの出血及び消化管穿孔は認められなかった。粘膜切除後の創傷治癒過程はいずれにおいても、粘膜切除1週間後では創傷面に一部白苔が付着し、周辺粘膜は浮腫状となり漿の形成を認めた。4週間後では両者とも創面が再生上皮で被覆されていた。また、5mlの光硬化性キトサンゲルを注入（粘膜切除はしていない）、紫外線照射4、8週後の注入部の病理組織標本所見では、注入2週間後では挙上粘膜の大きな縮小が観察され、8週間後では粘膜の漿を認めるのみであった。

創傷被覆剤として光硬化性キトサンゲルの適用：光硬化性キトサンゲルを投与したdb/dbマウス（糖尿病発症）群においては、db/+マウスと比べて大きな創傷治癒遅延が起きているが、光硬化性キトサンゲルを投与したdb/dbマウス群も同様にコントロール群と比べて有意に創傷治癒が促進されていた。さらに、光硬化性キトサンゲルへのFGF-2の添加によるdb/dbマウスの有意な創傷治癒促進効果は観察された。

#### D. 考察

培養皮膚移植は、創傷部位に皮膚組織を即座に導入することが可能で、皮膚全層欠損においてその有効性は臨床的に明らかになっている。特に難治性皮膚潰瘍に対する培養表皮シートならびに三次元培養皮膚移植の有用性・安全性については多くの症例で証明されている。これら培養皮膚移植は生着性が低いことが難点であり、創傷治癒や上皮化を得るためには繰り返しの移植が必要であった。培養皮膚移植に際し、移植用皮膚片の固定ならびに接着を向上させることが、生着率および治療効果の向上につながると推察される。キチン・キトサンスポンジ製剤は、強い抗菌活性とともに創傷治癒促進効果を有することが知られており、創傷被覆材として医療用具としての承認が得られているが、瞬時の止血・生体接着効果を保持させることは難しく、組織適合性を高めることが求められてきた。我々が開発した光硬化性キトサンゲルは可溶性であり、紫外線照射数秒で軟ゴム状にゲル化する。動物由来の材料でないため、安全な材料であることは疑う余地はない。本研究において、組織接着剤としての適応、内視鏡を併用した消化器粘膜切除術への充填材・出血抑制剤としての適用、肝臓等内臓出血における止血剤としての適用、創傷被覆剤としての適応について検討したところ、非常に有用であることが明らかとなった。すなわち、光硬化性キトサンゲルは、止血、肺や気管支などからの空気漏れ防止など

外科用補助材料として有用であるとともに、外傷や火傷などの応急止血・被覆剤として応用することができる。また、応急止血剤として災害救急医療へ貢献はもとより、増殖因子や培養皮膚移植等の併用による褥創、糖尿病性皮膚潰瘍あるいは複合創傷等難治性創傷の治療法の確立に応用できるものと期待される。光硬化性キトサンゲルを使用したESDは、粘膜下層注入後の粘膜挙上が良好で、手技は簡便であり、大量出血や消化管穿孔を防止することができた。ESDの目的の一つである病変の一括切除が可能で、根治性判定の妨げにならず、また生体内に残置させても生分解されるため、安全な物質であると言える。以上のごとく、光硬化性キトサンゲルは安全であり適応範囲が広く、有用であることが明らかとなった。

#### E. 結論

本研究により光硬化性キトサンゲルは培養皮膚の組織接着剤、内視鏡を併用した消化器粘膜切除術への充填材・出血抑制剤、肝臓等内臓出血における止血剤、創傷被覆剤として有効かつ安全であり新規医療薬品としての可能性が十分に期待できると思われる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表（平成20年度）

論文発表

巻末研究成果一覧表参照

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし

2. 実用新案登録：なし

3. その他：なし

[III]

分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）  
分担研究報告書

光硬化性キトサンゲルを用いた培養皮膚生着性に関する研究

研究分担者 橋本公二

愛媛大学大学院医学系研究科 感覚皮膚医学 教授

研究要旨 難治性皮膚潰瘍に対する培養皮膚移植の有用性が示されているが、生着性が低いことが問題であり、創傷治癒や上皮化を得るためには繰り返しの移植が必要であった。培養皮膚移植の生着率を向上させるために光硬化性キトサンゲルの有用性について検討した。0.5%のキトサンゲルを使用し、60秒間紫外線照射が最適の条件で培養皮膚の生着性を向上させたが、小動物を用いた移植実験では再現性に問題があった。大動物を用いた移植実験が必要と思われる。

A. 研究目的

難治性・再発性皮膚潰瘍に対する培養皮膚の有効性が示されてきている。培養皮膚移植は、創傷部位に皮膚組織を即座に導入することが可能で、皮膚全層欠損においてその有効性は臨床的に明らかになっている。特に難治性皮膚潰瘍に対する培養表皮シートならびに三次元培養皮膚移植の有用性・安全性については多くの症例で証明されている。これら培養皮膚移植は生着性が低いことが難点であり、創傷治癒や上皮化を得るためには繰り返しの移植が必要であった。培養皮膚移植に際し、移植用皮膚片の固定ならびに接着を向上させることが、生着率および治療効果の向上につながると推察される。キチン・キトサンスポンジ製剤は、強い抗菌活性とともに創傷治癒促

進効果を有することが知られており、創傷被覆材として医療用具としての承認が得られているが、瞬時の止血・生体接着効果を保持させることは難しく、組織適合性を高めることが求められてきた。そこで、キトサンを化学的に修飾することで可溶性を高め、紫外線照射数秒で軟ゴム状にゲル化する光硬化性キトサンゲルを開発した。本研究は培養皮膚の組織接着剤としての適応について検討し、光硬化性キトサンゲルの新規医療薬品としての可能性について検討した。

B. 研究方法

手術時の余剰正常ヒト皮膚から線維芽細胞を *outgrowth* 法にて分離培養した。ディスパーゼで剥離した真皮を 1-2 mm 角に細切し、I型コラーゲンコ

ートのシャーレに密着させた後、**10% fetal calf serum (FCS)** 添加ダルベッコ変法 **MEM (DMEM)** 培地を真皮片が少し浸る程度添加した。真皮片の周囲から線維芽細胞が増殖・遊走し、コロニーが大きくなった時点で継代操作を行い、5代継代した細胞を使用した。三次元培養皮膚の作製：I型コラーゲン溶液 6 容量に対して **0.1N NaOH** : 1 容量、**8 倍濃度 DMEM** : 1 容量、**20% FCS/DMEM** : 10 容量の割合で中和コラーゲン液を **4°C** にて作製し、インサートに **1ml** ずつ添加し、室温で **10 分間** 静置しゲル化させた。線維芽細胞を **5x10<sup>5</sup>** 細胞/ml, **10% FCS/DMEM** の濃度に調整し、この細胞懸濁液 : 2 容量に対して中和コラーゲン液 : 8 容量の割合で混和し、細胞を含む中和コラーゲン溶液を調整し、各インサートに **3.5ml** ずつ添加しインキュベーター内でゲル化させた。その後 **10% FCS/DMEM** をゲルが浸る程度加え **5 日間** 静置培養した。**5 日後** に収縮陥凹したゲル上に角化細胞を播種し、表皮細胞増殖用培地を緩やかに添加しさらに **2 日間** 液相下で培養を続けた。**2 日後** 空気に暴露することにより (気相下培養) 重層化させ、移植には重層化開始後 **7 日目** の培養皮膚を使用した。ヌードマウスを麻酔し、背部に **1 x 1 cm** の全層皮膚欠損を作成し、キトサンゲルを添加後、同じサイズの培養皮膚を密着させ、紫外線を照射した。移植後 **7, 14 日目** に組織を採取した。

### C. 研究結果

光硬化性キトサンゲルは **2%, 1.5%, 1%, 0.75%, 0.5%, 0.25%, 0.1%** の濃度で、紫外線の照射は **30-120 秒** の間でそれぞれ検討した。組織学的検索では **0.25%** 以下の濃度では紫外線照射を長くしても培養皮膚接着効果はなく、ゲル化しないことが判明した。また、**1%** 以上であれば移植床と培養皮膚間のゲルが厚くなり培養皮膚が脱落することが明らかとなった。至適条件としては、**0.5%** のキトサンゲルで紫外線 **60 秒** 程度が明らかとなった。マウスを用いた移植実験では、小さな移植片しか使えず、十分な圧迫が困難なため、キトサンゲルを薄く塗布できないことが判明した。

### D. 考察

表皮角化細胞の培養法が **1975 年** に Rheinwald と Green により確立されて以降、は、角化細胞培養は急速に展開し、**1980 年代** には表皮角化細胞の無血清培養法が開発され、再生医療の先陣を切るかたちで **1981 年** には O'Connor らにより初の培養表皮シート移植の臨床応用が実施された。本邦においては **1985 年** 頃より培養表皮シート移植が行われ、主に新鮮熱傷、熱傷癍痕、刺青、母斑や、下腿潰瘍、表皮水疱症などの難治性再発性潰瘍の治療に応用されている。一方、培養皮膚の改善も精力的に行われ、**1983 年** には三次元培養皮膚の作製法が開発された。

培養皮膚は **1980 年代** から臨床応用さ

れているが、再生医療の一環として当初期待されたほど普及していない。この原因は、培養皮膚の密着不全により生着性が低いこと、ならびに細菌等感染による脱落などがあげられる。生着性の向上のためにフィブリンゲルを用いる場合があるが、生体材料であるため、原料の確保の困難性と常に感染症の疑念がつきまとう。より安全な培養皮膚移植を推進するためには、生体材料を用いない組織接着剤の開発が急務である。今回我々は培養皮膚の生着性を向上させることを目的として、キトサンゲルについて検討した。キトサンは、甲殻類に含まれるキチンから精製された多糖類であり、感染リスクが無く組織適合性に優れた物質である。我々は、このキトサンを化学修飾することで紫外線照射により不溶性のゲル体となる光硬化性キトサンゲルの開発を手掛け、創傷治癒の促進、止血効果及び感染予防効果を有することを明らかにしてきた。本研究では、培養皮膚移植における接着剤としての光硬化性キトサンゲルの有効性について検討を行った。今回の検討により、ある特定の濃度と紫外線照射によりゲル化し、培養皮膚接着剤としての可能性が示唆された。マウスを用いた実験では鯉原生に問題があり、大動物での検討ならびに臨床研究が必要であると思われる。

#### E. 結論

培養皮膚接着剤としてのキトサンゲルの可能性が示唆された。今後さらな

る検討が必要であると思われる。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表（平成 20 年度）

##### 1. 論文発表

Nanba D, Inoue H, Shigemi Y, Shirakata Y, Hashimoto K, Higashiyama S: An intermediary role of proHB-EGF shedding in growth factor-induced c-Myc gene expression. *J Cell Physiol.* 214:465-73, 2008

Dai X, Sayama K, Shirakata Y, Tokumaru S, Yang L, Tohyama M, Hirakawa S, Hanakawa Y, Hashimoto K: PPARgamma is an important transcription factor in 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3-induced involucrin expression. *J Dermatol Sci* 50:53-60, 2008

Dai X, Sayama K, Tohyama M, Shirakata Y, Yang L, Hirakawa S, Tokumaru S, Hashimoto K.: The NF-kB, p38 MAPK and STAT1 pathways differentially regulate the dsRNA-mediated innate immune responses of epidermal keratinocytes. *Int Immunol.* 20:901-9, 2008

##### 2. 学会発表

Yang L, Shirakata Y, Hirakawa S, Dai

X, Hanakawa Y, Tokumaru S, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K: Myofibroblasts differentiation is modulated by epithelialmesenchymal in human living skin equivalent. International Investigative Dermatology, May 14-17, Kyoto, 2008.

Shirakata Y, Yang L, Hashimoto K: Successful treatment of giant congenital melanocytic nevus with new skin equivalent using amnion membrane. The 17<sup>th</sup> congress of the European Academy of Dermatology Venereology, Sep 17-20, Paris, 2008.

Yang L, Shirakata Y, Tokumaru S, Dai X, Hirakawa S, Tohyama M, Sayama K, Hashimoto K: Human amnion improves the development of basement membrane and epidermogenesis in a living skin equivalent. The 10<sup>th</sup> China-Japan Joint Meeting of Dermatology, Hangzhou, China, Oct. 30-Nov. 2, 2008.

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

特許取得：なし

実用新案登録：なし

その他：なし

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）  
分担研究報告書

組織接着剤・止血剤として光硬化性キトサンゲルの適用に関する研究

研究分担者 石原雅之

防衛医科大学校・防衛医学研究センター・医療工学研究部門 教授

研究要旨 災害時の緊急医療の場でも使用できる生体接着剤、応急止血剤、創傷被覆剤の研究・開発に光硬化性キトサンゲルを利用することとした。キトサンをあらゆる創傷に簡便に塗布できるように中性領域で可溶化し、光硬化基を導入することで短時間の紫外線照射で不溶性の軟ゴム状ゲル体を形成し創傷の止血・接着・保護と治癒を有利にする光硬化性キトサンを調製した。この光硬化性キトサンは災害救急医療の場での止血・創傷被覆剤として、そして外科手術での止血剤或いは内視鏡下の粘膜下層剥離術で用いる粘膜下層注入剤としての使用の可能性が認められている。本研究では、現在我々が研究・開発中である生体接着剤及び応急止血剤としての光硬化性キトサンゲルの適用研究を、小動物を用いて、行った。その結果、本材は組織接着剤・応急止血剤として、有効で安全なバイオマテリアルであると認められた。

A. 研究目的

外科手術中における出血は、ほとんどの場合適切な縫合等で処置できるけれども、凝固障害、抗血栓剤、炎症、感染などで止血に難渋することもしばしば発生する。また呼吸器外科においても、特に肺気腫を伴う場合、肺からの空気漏れを止めることが難しい。このような制御しがたい出血や肺からの空気漏れを止めるために、架橋型ゼラチン、シアノアクリレート、フィブリングリユーなどの素材が開発され、使用されてきた。しかし、架橋型ゼラチンやシアノアクリレートは強

い組織接着性を有するが、架橋反応や分解反応時の生じるアルデヒドやイミドなどの細胞毒性や強い組織刺激性により接着後の創傷治癒を遅延させる。現在生体接着剤として、もっとも広く使用されているのが血液凝固システムを応用したフィブリングリユーである。フィブリングリユーの生体接着剤としての有効性は広く認識されているが、ヒトや家畜動物の血液製剤であり、十分な原料の確保が難しく、肝炎ウイルスや HIV などの感染の危険性は否定できない。

本研究目的は、フィブリングリユー

よりも強い接着力、シーリング力を有する光硬化性キトサンゲルの生体接着剤及び止血剤としての適用について検討することである。

## B. 研究方法

うさぎ (New Zealand White rabbit) の頸動脈を麻酔下に露出させ、針 (18G) を刺すことで出血をさせた (図1)。出血箇所の両側をクリップを用いて一時クランプすることで止血し、光硬化性キトサン (Az-CH-LA; 30 mg/ml) 溶液の一滴 (約 30  $\mu$ l) を出血部に加え、紫外線照射 (30 秒) によりゲル化させ、クリップを取り除いて血流を再開させ止血を確認した。また同様にポジティブコントロールとしてフィブリングリユーを用いて止血実験を行なった。

7例のうさぎに対して、肺の前葉に長さ約 5 mm、深さ約 5 mm の切傷をつけ、3~5 滴 (約 100  $\mu$ l) の光硬化性キトサン (Az-CH-LA; 30 mg/ml) 溶液を傷口に加え、60 秒の紫外線照射で硬化させた。爾後、開胸部を閉じ、脱気により肺を膨らませ、X線透視検査等によりその後の経過を観察した。また同様に、フィブリングリユーを用いて肺からの空気漏れを止める実験を行なった。

肝損傷は止血困難な出血を伴うことが多く、その出血は致命傷となりうる。我々は光硬化性キトサンハイドロゲルとその凍結乾燥して得られたスポンジからなる新規止血材 (PCM-S: Photocrosslinkable chitosan

hydrogel-Mixed its Sponges) を調製し、ラットの肝損傷モデルで市販の止血剤である TachoComb (TC) (Torii Pharmaceutical Co., Ltd.) による止血効果をポジコンとして比較・評価した。ヘパリン投与 (500 IU/kg)、非投与のラットの肝左葉を径 3 mm のダーマパンチで貫通創を作成し、光硬化性キトサンハイドロゲルとそのスポンジからなる新規止血剤 (PCM-S) と TC で止血を行なった。止血については、肉眼的所見、出血量の測定、経時的な ALT 値の測定及び創部の病理観察を行なった。

## C. 研究結果

頸動脈出血の止血実験 (図1) において光硬化性キトサンゲルを投与した場合、1分以内の紫外線照射で完全な止血と血流再開が確認されたのに対して、フィブリングリユーは止血のために  $3 \pm 1$  分の硬化に必要な時間を費やした。なお、紫外線照射のみ、あるいは光硬化性キトサン溶液のみの投与で紫外線照射を行わない場合、10分以上にわたって止血はできなかった。7例のうさぎに対して上述の光硬化性キトサンハイドロゲルによる止血実験 (30 秒の紫外線照射) を行ない、すべて1ヶ月以上にわたり再出血なく生存、血管の修復が確認された。止血実験から1ヶ月後の組織学的検討では、血管の傷穴は完全に塞がり、血管の外側は炎症細胞を含んだ繊維状組織で囲まれていた (図2)。投与した光硬化性キトサンハイドロゲル

の大部分は生分解・吸収されており、一部ゲルがマクロファージや好中球により貪食されている様子が観察された。

肺からの空気漏れ抑制実験（図2）において、術後1週間、X線透視検査の結果では光硬化性キトサンハイドロゲルおよびフィブリングリユー投与群では肺からの空気漏れはなく、完全に膨らんだ状態で正常に維持され、前例1ヶ月以上にわたって何ら異常なく生存した。なお、紫外線照射のみ、あるいは光硬化性キトサン溶液のみの投与で紫外線照射を行わない場合、手術当日から、肺の萎縮がX線透視検査で観察され、明らかな肺からの空気漏れが確認された。

光硬化性キトサンとそのスポンジからなる新規止血剤（図3）は、ヘパリン非投与のラットにおいてはTCと比べて有効性及び安全性において有意差は見られなかった（図4）。しかし、ヘパリン投与のラットにおいては、本新規止血剤（PCM-S）は、TCと比べて有意に高い止血効果を示した。両群ともに肝臓炎症の指標となる血液ALT (serum alanine aminotransferase) 値が術後2日間上昇したが、以降は正常値に回復した。病理観察では両群ともに創部の線維化が観察されたが、形成された線維化組織は経時的に減少し、経時的広がりも観察されなかった（図5）。これらの結果はPCM-Sは有効で安全な止血剤となることを示唆する。

#### D. 考察

本報告では、我々が研究・開発している光硬化性キトサンゲルの生体接着剤及び止血剤としての適用について記述した。本剤は、止血、肺や気管支などからの空気漏れ防止など外科用補助材料として有用であるとともに、外傷や火傷などの応急止血・被覆剤として応用することができる。最近の基礎研究から、キトサンによる線維芽細胞の増殖、遊走、浸潤、コラーゲンやサイトカイン産生の誘導が認められており、これらの現象はさらに血管新生や表皮形成の促進を導くものと考えられる。このように本光硬化性キトサンゲルは単なる接着性と生体適合性に物理的に優れた生体接着剤或いは止血剤であるのみでなく、創傷治癒を積極的に促進する生物活性を有する機能性医用材料である。

キチン・キトサンの安全性についてすでに広く研究が進められ、健康食品、医薬品、創傷被覆剤として利用されている。しかしながら、光硬化性キトサンは光架橋剤としてアジド基が導入されており、その安全性は確認されていない。医療用器材として治験使用認可に必要な完全な安全性試験はまだ完了していないが、現在までのところ、ヒト型細胞（皮膚上皮、真皮細胞、血管内皮細胞など）に対する細胞毒性、微生物細胞毒性、微生物突然変異性は全く検知されず、小動物に対する一般毒性も基準値を大きく下回る安全性を示している（データは示さない）。従って、キトサンの改変や光架橋基の