

導入による毒性付与はないものと考えられる。

#### E. 結論

本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。本光硬化性キトサンゲルは、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。

F. 健康危険情報  
なし。

#### G. 研究発表（平成 20 年度）論文発表

Yura H, Kanatani Y, Ishihara M, Takase B, Nambu M, Kishimoto S, Kitagawa M, Tatsuzawa O, Hoshi Y, Suzuki S, Kawakami M, Matsui T: Selection of hematopoietic stem cells with a combination of galactose-bound vinyl polymer and soybean agglutinin, a galactose-specific lectin. *Transfusion* 48:561-6, 2008

Nakamura S, Nambu M, Ishizuka T, Hattori H, Kanatani Y, Kishimoto S, Takase B, Aoki H, Kiyosawa T, Maehara T, Ishihara M: Effect of

controlled release of fibroblast growth factor-2 from chitosan/fucoidan micro complex-hydrogel on in vitro and in vivo vascularization. *J Biomed Mater Res (A)* 85:619-27, 2008

Nakamura S, Watanabe S, Ohtsuka M, Maehara T, Ishihara M, Yokomine T, Sato M: Cre-loxP system as a versatile tool for conferring increased levels of tissue-specific gene expression from a weak promoter. *Mol Reprod Dev* 75:1085-93, 2008

Nogami Y, Kinoshita M, Takase B, Ogata Y, Saitoh D, Kikuchi M, Ishihara M, Maehara T: Liposome-encapsulated hemoglobin transfusion rescues rats undergoing progressive hemodilution from lethal organ hypoxia without scavenging nitric oxide. *Ann Surg* 248:310-319, 2008

Hattori H, Yashiro N, Tanaka T, Amano Y, Fukuda K, Kishimoto S, Kanatani Y, Nakamura S, Takase B, Ishihara M: Expansion and characterization of adipose tissue-derived stromal cells cultured with low serum medium. *J Biomed Mater Res* 87:229-36, 2008

Maemura T, Shin T, Kinoshita M, Majima T, Ishihara M, Saitoh D, Ichikura T: A tissue-engineered

stomach shows presence of proton pump and G-cells in rat model, resulting in improved anemia following total gastrectomy. *Artificial Organs* 32 (3), 234-329, 2008.

7. 青木幸一, 木下学, 庄野聡, 野上弥志郎, 高瀬凡平, 石原雅之, 山田憲彦, 菊地眞, 齋藤大蔵. 人工赤血球の骨髄内投与による致死的出血性ショックに対する救命蘇生効果. *防衛衛生* 55(2): p.29-37, 2008.02.

8. 岸本聡子, 中村伸吾, 服部秀美, 石原雅之. 成長因子とヘパラン硫酸プロテオグリカンの相互作用. *生体の科学* 59(2): p.92-100, 2008.04.

9. 片桐彰男, 橋谷華世\*, 中村伸吾, 服部秀美, 岸本聡子, 前原正明, 石原雅之. FGF-2 含有フラグミンプロタミンマイクロキャリア(F/P MPs)による虚血改善効果の検討. *防衛衛生* 56(1): p.17-24, 2009.01.

Tsuda Y, Ishihara M, Amako M, Arino H, Hattori H, Kanatani Y, Yura H, Nemoto K: Photocrosslinkable chitosan hydrogel can prevent of bone formation in rat skull and fibula bone defects with. *Artif Org* 33:74-7, 2009

Kishimoto S, Nakamura S, Nakamura S, Hattori H, Oomuma F, Kanatani Y, Tanaka Y, Harada Y, Tagawa M,

Maehara T, Ishihara M: Cytokine-immobilized microparticle-coated plates for culturing hematopoietic progenitor cells. *J Controlled Release* 133:185-90, 2009

Ishizuka T, Ishihara M, Aiko S, Nakamura S, Yura H, Kanatani Y, Nogami Y, Kishimoto S, Hattori H, Tanaka Y, Takase B, Maehara T. Improved endoscopic submucosal dissection using photo-crosslinked chitosan hydrogel. *Endoscopy* 41: 25-28, 2009

Nambu M, Kishimoto S, Nakamura S, Mizuno H, Yanagibayashi S, Yamamoto N, Azuma R, Nakamura S, Kiyosawa T, Ishihara M, Kanatani Y: Accelerated Wound Healing in Healing Impaired *db/db* Mice by Autologous Adipose Tissue-Derived Stromal Cells Combined with Atelocollagen Matrix. *Ann Plast Surg* 62:317-21, 2009

Yura H, Ishihara M, Nakamura S, Kishimoto S, Kanatani Y, Horio T, Ishizuka T, Kawakami M, Matsui T: Coatings of LDL and synthetic glycoconjugates as substrata for hepatocytes. *Artif Org* 2009 in press.

Kishimoto S, Nakamura S, Nakamura S, Kanatani Y, Hattori H, Tanaka Y,

Harada Y, Tagawa M, Maehara T, Ishihara M: Fragmin/Protamine Microparticle (F/P MP)-Coated Matrix Immobilized Cytokines to Stimulate Various Cell Proliferations with Low serum Media. *Artif Org* 2009 in press

Shingo Nakamura S, Yasuhiro Kanatani Y, Satoko Kishimoto S, Shin-ichiro Nakamura S, Chizuko Ohno C, Takuya Horio T, Fujita M, Hattori H, Tanaka Y, Kiyosawa T, Maehara T, Ishihara M: Controlled release of FGF-2 using fragmin/protamine microparticles and effect on neovascularization. *J. Biomed. Mater. Res. (A)*, in press.

Kishimoto S, Nakamura S, Hattori H, Nakamura SI, Oonuma F, Kanatani Y, Tanaka Y, Mori Y, Harada Y, Tagawa M, Ishihara M: Human Stem Cell Factor (SCF) is a Heparin-Binding Cytokine. *J Biochem* 145:275-278, 2009

Kishimoto S, Hattori H, Nakamura S, Amano Y, Kanatani Y, Tanaka Y, Harada Y, Tagawa M, Ishihara M: Expansion and characterization of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells cultured on fragmin/protamine microparticle-coated matrix with FGF-2 in low serum medium. *Tissue Eng.*, in press.

Satoh Y, Saitoh D, Takeuchi A, Ojima K, Kouzu K, Kawakami S, Ito M, Ishihara M, Shunichi Sato S, Takishima K: ERK2 dependent signaling contributes to wound healing after a partial-thickness burn. *BBRC* 2009 in press.

Nakamura S, Kishimoto S, Nakamura S, Nambu M, Fujita M, Tanaka Y, Mori Y, Tagawa M, Maehara T, Ishihara M: Fragmin/protamine microparticles as cell carriers to enhance viability of adipose-derived stromal cells and their subsequent effect on in vivo neovascularization. *J Biomed Mater Res (A)* 2009 in press.

Horio T, Ishihara M, Fujita M, Kishimoto S, Kanatani Y, Ishizuka T, Nogami Y, Nakamura S, Tanaka Y, Maehara T: Hemostatic Effects of Photocrosslinkable Chitosan Hydrogel-Mixed Photocrosslinked Chitosan Sponges (PCM-S) on Hepatic Bleeding in Rats. *Artif. Organs*, in press.

Kishimoto S, Oonuma F, Nakamura S, Hattori H, Nakamura S, Mori Y, Tanaka Y, Harada Y, Tagawa M, Ishihara M: Immobilization, Stabilization, and Activation of Human Stem Cell Factor (SCF) on Fragmin/Protamine Microparticle (F/P

MP)-Coated Plates. J. Biomed. Mater. Res. (B), in press. Ann Plast Surg 2009 in press.

Nakamura S, Ishihara M, Takikawa M, Murakami K, Mishicot S, Nakamura S, Yanagibayashi S, Kubo S, Yamamoto N, Kiyosawa T: Platelet-Rich Plasma (PRP) Promote Survival of Inbred Fat-Graft in Rats.

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

## 光硬化性キトサンゲルは高い生体接着性を有する(止血効果)

光硬化性キトサンゲル (Photocrosslinkable Chitosan : PCH)

粘稠な PCH水溶液は、短時間の365 nm UV 照射によって接着性のハイドロゲルとなる。

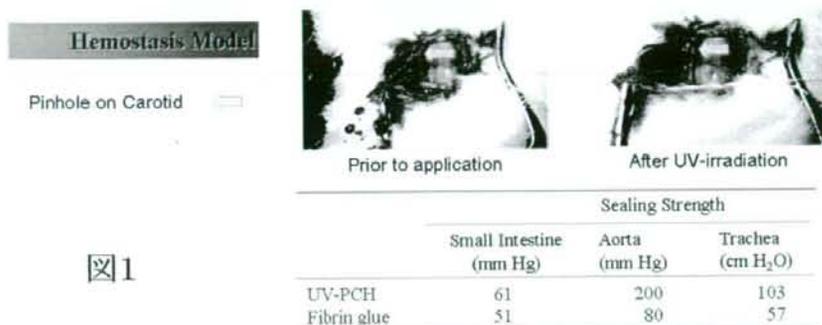


図1

## 肺と頸動脈に投与した光硬化性キトサンゲルの残存

30日後の創傷治癒とキトサンゲル

肺表面



頸動脈



肺表面においてキトサンの多くが残存し、線維組織で覆われている

生分解性の示唆



マクロファージによる貪食



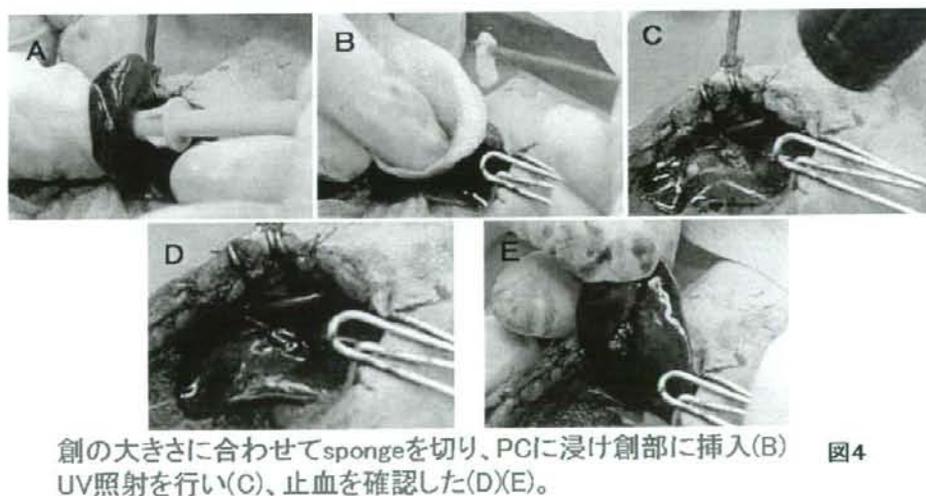
矢印は残存キトサンゲルを示す。

図2

## 光硬化性キトサンゲルとそのスポンジからなる新規止血剤



## ラット肝損傷モデルの止血実験



# 創部の病理組織学的所見

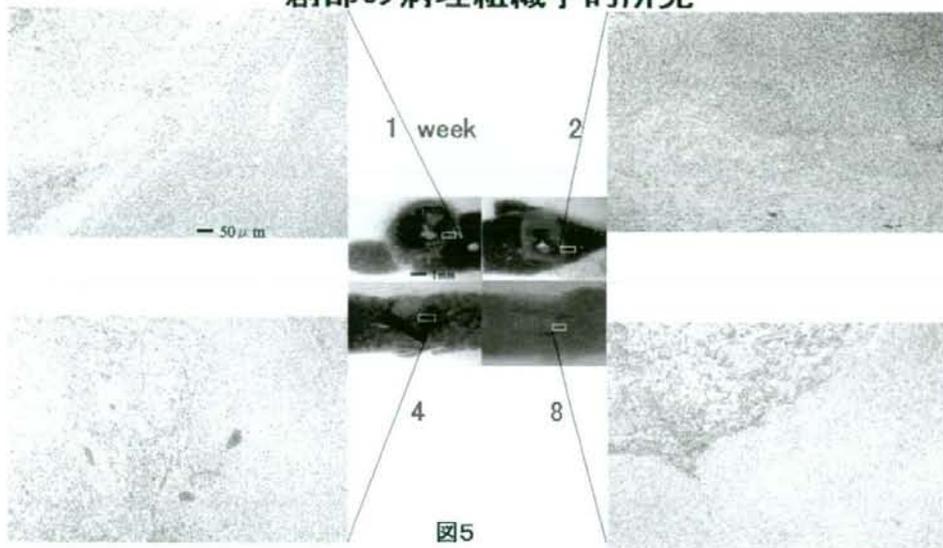


図5

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

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  
光硬化性キトサンゲルの適用

研究分担者 前原正明  
防衛医科大学校・外科学講座 教授

研究要旨 内視鏡的粘膜下層剥離術（ESD：Endoscopic Submucosal Dissection）は、消化管粘膜癌に対して確立された低侵襲かつ根治性の高い治療法で比較的広範囲の粘膜癌切除にも適用されている。しかし、ESDは旧来の内視鏡的粘膜切除術（EMR：Endoscopic Mucosal Resection）と比べると、一括切除率が高いものの、消化管穿孔や切除部位からの出血等の合併症の頻度が増加する。本研究で評価した光硬化性キトサンゲルは紫外線照射により、粘度の高いゲル状から、不溶性に硬化した軟ゴム状に性状が変化する。本研究では、この性質に着目して、特にESDでの、光硬化性キトサンゲルの有用性と安全性を検討した。さらに、臨床応用を目指して、プタを用いて光硬化性キトサンゲルと動物用内視鏡を使用したESDを施行した。

A. 研究目的

内視鏡が臨床に導入されて以来、消化器疾患に対する診断にとどまらず、これを用いた治療法が開発されてきた。多田らのBiopsyに始まり、これを基礎として内視鏡的粘膜切除術（EMR）が開発された。その後、病変部の一括切除の重要性が指摘されるようになり、内視鏡的粘膜下層剥離術（ESD）が開発、臨床応用され、比較的広範囲の粘膜癌切除に適用されている。しかし、ESDは旧来のEMRと比べると、一括切除率が高いものの、消化管穿孔や切除部位からの出血等の合併症の

頻度が増加する。消化管穿孔の原因としては消化管筋層への切り込み及び過通電が指摘されており、これらを防止する粘性物質を正しく注入できれば、合併症の頻度を減少させ、ESDをより安全な手技に改良できると考えられる。

光硬化性キトサンゲルは紫外線照射により、粘度の高いゲル状から、不溶性に硬化した軟ゴム状に性状が変化する。濃度調節をした光硬化性キトサンゲルは23G注射針を容易に通過し、粘膜層の外からの紫外線照射で内部の注入光硬化性キトサンゲルが硬

化することから、良好な粘膜挙上と消化管筋層の保護及び剥離面からの出血予防効果が期待できる。

本研究ではブタを用いて、粘膜下層注入物質としての光硬化性キトサンゲルの有用性、安全性、簡便性を、現在医療現場でESDに使用されている高張生理食塩水と比較した。

## B. 研究方法

畜産ブタ（オス、平均体重20 kg）をケタミンとネンプタールで全身麻酔後、人工呼吸管理下で内視鏡観察及びESDを試行した。本研究では動物用内視鏡（オリンパス社、VQ-8143A）を使用し、粘膜下層注入物質として10%高張生理食塩水と0.75%光硬化性キトサンゲルを使用した。内視鏡下での粘膜下層注入物質注入時には23G食道静脈瘤穿刺針（オリンパス社、NM-200U-0423）を使用した。

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、それぞれ6頭ずつ行った。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（モリテックス社、MUV-250U-L）及び照射用光ファイバー（モリテックス社、AFP01437）を使用し、1 cm<sup>2</sup>の注入部位当り30秒間紫外線照射をした。照射用光ファイバーは内視鏡の鉗子孔を通過し、挙上した消化管粘膜外部からの紫外線照射で、内部の光硬化性キトサンゲルは硬化し、不溶性の軟ゴム状に変化した。

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、フック型ナイフ（オリンパス社、KD-620 LR）で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、フック型ナイフで口側切除線の粘膜を切除した。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を作製し、光硬化性キトサンゲルの生分解性の有無を検討した。

## C. 研究結果

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（図1）。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。これに対して高張生理食塩水を注入した場合は明らかな出血増大と2例（合計12例中）の消化管穿孔が観察された（図2）。

粘膜切除後の創傷治癒過程の内視鏡所見を図3に示す。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皸の形成を認めた。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、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週間後では粘膜の皸を認めるのみであった（図4）。注入後4週目ではわずかではあるが、ヘマトキシリンを吸着し染色された光硬化性キトサンゲルの残存を認めるものの、8週目ではヘマトキシリンで染色された部位を認めず、また注入部位は繊維性組織を主体とした肉芽組織に置換されており、光硬化性キトサンゲルは胃粘膜下層で完全に分解されていた。

#### D. 考察

EMR による一括切除は大きな表在型病変に対しては難しい。分割切除になった場合は病理組織学的評価が困難となり、局所の遺残再発率が高くなることが報告されている。そこで ESD が開発され、大きな病変に対する一括切除が可能となった。しかし、ESD の粘膜下層剥離術には高度な技術を必要とし、ESD による大出血や消化管穿孔の発生頻度は、EMR より高いのが現状である。この観点から、確実な粘膜挙上による筋層の保護、止血効果を期待できる光硬化性キトサンゲルの適用は有用である。

皮膚欠損部位の創傷治癒に対して、光硬化性キトサンゲルは創傷治癒を

促進させるとの報告がある。また、難治性創傷に対しても光硬化性キトサンゲルの創傷治癒促進効果が認められている。しかし、本研究で粘膜切除創部の創傷治癒に関しては、有意な促進効果は認められなかった。これは粘膜切除後、光硬化性キトサンゲルは創部に残存を認められなかったためと考察した。少なくとも光硬化性キトサンゲルの適用により、創傷治癒を遅延させることはないと考えられる。

生体に対して使用する場合、組織に対する安全性が問題となってくる。光硬化性キトサンゲルをヒト皮膚線維芽細胞、ヒト血管内皮細胞、及びヒト平滑筋細胞と共培養したが、細胞毒性は全く示さない。残置実験において投与後4週目の病理所見では（図3）、ゲル自体はほとんど残存せず、多数の好中球及び線維芽細胞からなる肉芽組織に置き換わっており、8週目では光硬化性キトサンゲルの残存は全く認められなかった。このように光硬化性キトサンゲルは生分解性があり、生体に対して安全に使用できる物質であると言える。

また、光硬化性キトサンゲルと癌細胞を遺残した場合、癌細胞増殖を助長する懸念があった。しかし今回我々の予備的検討では、光硬化性キトサンゲルの投与は強い抗癌活性を認めることができた。これは光硬化性キトサンゲルの創傷治癒促進活性と相反する結果となるので、さらなる検討は必要と思われる。さらに、紫外線は皮膚や角膜に対する障害性があり、間欠の大

量紫外線曝露が発癌危険因子の一つと考えられる。しかし、本 ESD で使用される紫外線は波長が 350 nm と比較的 safety の光であり、局所では 30 秒程度の照射で、照射した組織周辺での炎症も認められず、組織障害や発癌の危険性はないものと考えられる。

#### E. 結論

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ない。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。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表（平成 20 年度）論文発表

Nakamura S, Nambu M, Ishizuka T, Hattori H, Kanatani Y, Kishimoto S, Takase B, Aoki H, Kiyosawa T, Maehara T, Ishihara M: Effect of controlled release of fibroblast growth factor-2 from chitosan/fucoidan micro complex-hydrogel on in vitro and in vivo vascularization. *J Biomed Mater Res (A)* 85:619-27, 2008

Nakamura S, Watanabe S, Ohtsuka M, Maehara T, Ishihara M, Yokomine T, Sato M: Cre-loxP system as a

versatile tool for conferring increased levels of tissue-specific gene expression from a weak promoter. *Mol Reprod Dev* 75:1085-93, 2008

Nogami Y, Kinoshita M, Takase B, Ogata Y, Saitoh D, Kikuchi M, Ishihara M, Maehara T: Liposome-encapsulated hemoglobin transfusion rescues rats undergoing progressive hemodilution from lethal organ hypoxia without scavenging nitric oxide. *Ann Surg* 248:310-319, 2008

片桐彰男, 橋谷華世, 中村伸吾, 服部秀美, 岸本聡子, 前原正明, 石原雅之. FGF-2 含有フラグミンプロタミンマイクロキャリア(F/P MPs)による虚血改善効果の検討. *防衛衛生* 56(1): p.17-24, 2009.01.

Kishimoto S, Nakamura S, Nakamura S, Hattori H, Oomuma F, Kanatani Y, Tanaka Y, Harada Y, Tagawa M, Maehara T, Ishihara M: Cytokine-immobilized microparticle-coated plates for culturing hematopoietic progenitor cells. *J Controlled Release* 133:185-90, 2009

Ishizuka T, Ishihara M, Aiko S, Nogami Y, Nakamura S, Kanatani Y, Kishimoto S, Hattori H, Horio T, Tanaka Y, Maehara T: Experimental

evaluation of photocrosslinkable chitosan hydrogel as injection solution for endoscopic resection. *Endoscopy* 41:25-8, 2009

Kishimoto S, Nakamura S, Nakamura S, Kanatani Y, Hattori H, Tanaka Y, Harada Y, Tagawa M, Maehara T, Ishihara M: Fragmin/Protamine Microparticle (F/P MP)-Coated Matrix Immobilized Cytokines to Stimulate Various Cell Proliferations with Low serum Media. *Artif Org* 2009 in press

Nakamura S, Kanatani Y, Kishimoto S, Nakamura S, Ohno C, Horio T, M, Hattori H, Tanaka Y, Kiyosawa T, Maehara T, Ishihara M: Controlled release of FGF-2 using fragmin/protamine microparticles and effect on neovascularization. *J Biomed Mater Res (A)* 2009 in press

Nakamura S, Kishimoto S, Nakamura

S, Nambu M, Fujita M, Tanaka Y, Mori Y, Tagawa M, Maehara T, Ishihara M: Fragmin/protamine microparticles as cell carriers to enhance viability of adipose-derived stromal cells and their subsequent effect on in vivo neovascularization. *J Biomed Mater Res (A)* 2009 in press

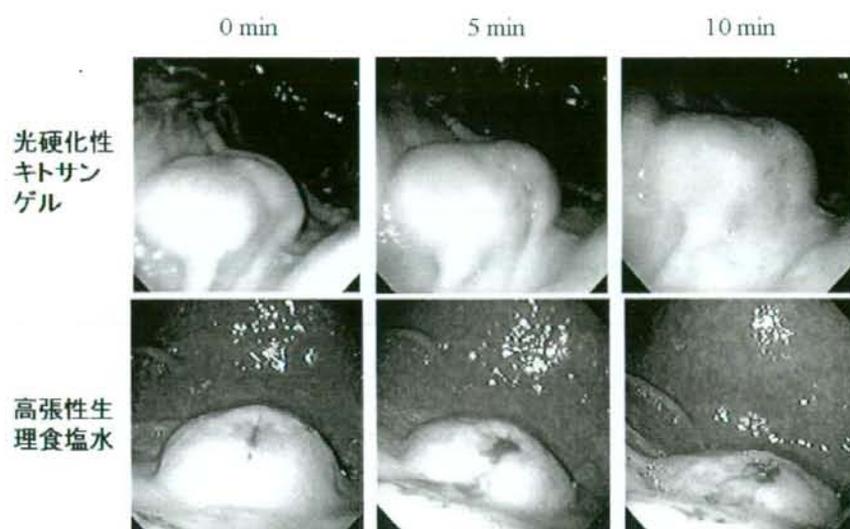
Horio T, Ishihara M, Fujita M, Kishimoto S, Kanatani Y, Ishizuka T, Nogami Y, Nakamura S, Tanaka Y, Maehara T: Hemostatic Effects of Photocrosslinkable Chitosan Hydrogel-Mixed Photocrosslinked Chitosan Sponges (PCM-S) on Hepatic Bleeding in Rats. *Artif Org* 2009 in press

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

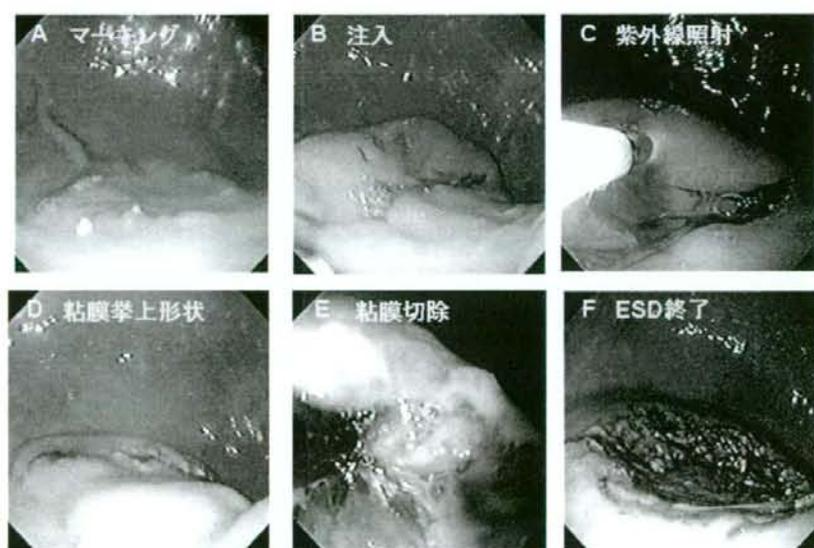
その他：なし



内視鏡下での粘膜挙上

10 mm

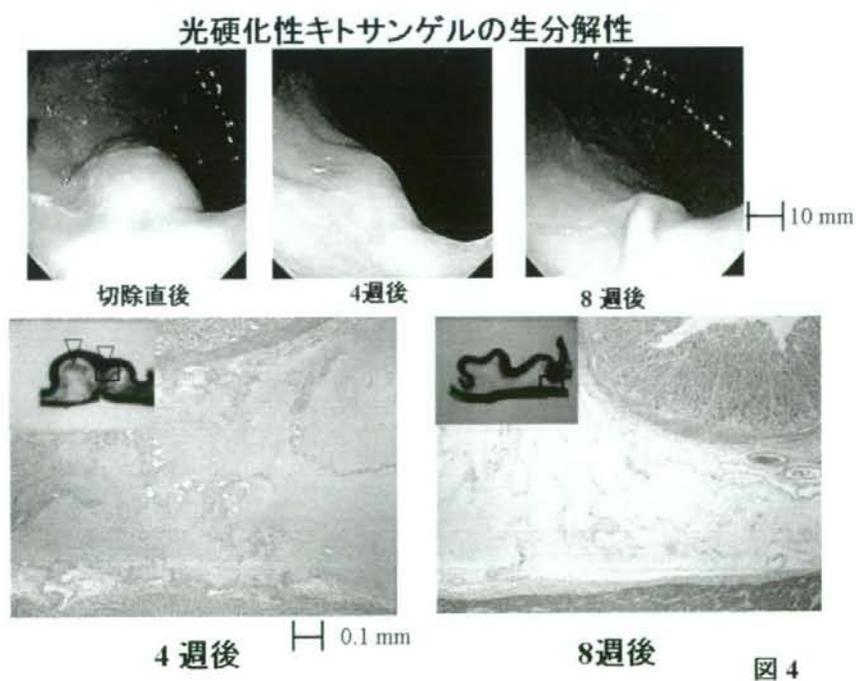
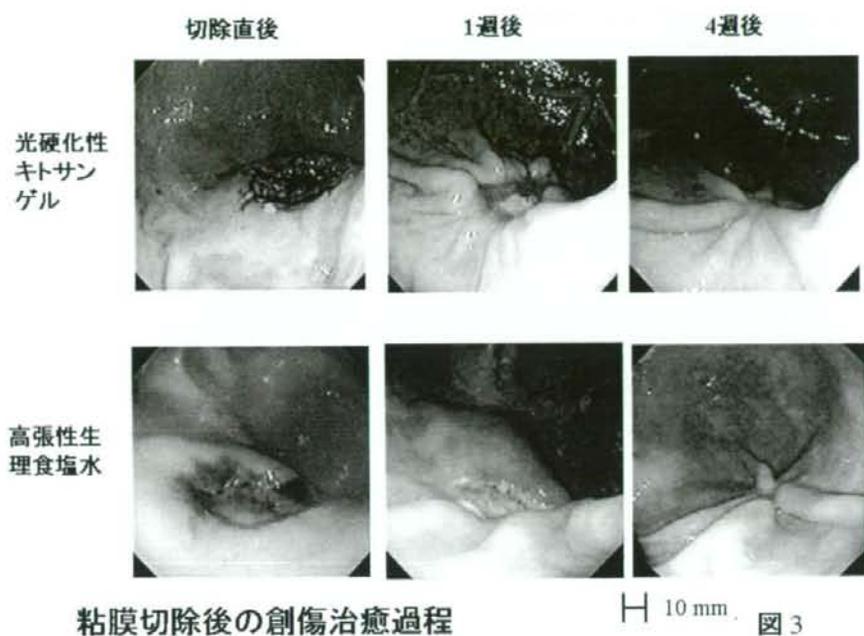
図 1



光硬化性キトサンゲルを適用したESD

10 mm

図 2



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

創傷被覆剤として光硬化性キトサンゲルの適用

研究分担者 清澤智晴  
防衛医科大学校・病院形成外科部部长・准教授

研究要旨 健康な通常マウスの創傷モデルを用いて、創傷治癒促進効果について検討した結果、光硬化性キトサンゲルは外傷・火傷に対する応急処置のための止血・創傷保護剤として最適であるという評価と、顕著な創傷収縮、創傷治癒促進活性が見出されている。またキトサンゲルへの FGF-2 の添加は *db/db* マウスの有意な創傷治癒促進効果が観察され、糖尿病性皮膚潰瘍や難治性創傷において有効な創傷被覆剤として応用できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

1960 年以前の創傷管理は、感染から創傷を守るため乾燥した被覆剤として布、綿、ガーゼ等を用いていた。その後、創傷治癒の最適環境を作り、維持するための閉塞性創傷被覆剤の概念が今日に至っている。この閉塞性創傷被覆剤の備えるべき条件は、生体適合性に優れ、傷を細菌感染等から保護する素材で、創傷治癒を高める湿潤環境を維持できるものと言われている。この湿潤環境は、創傷部の滲出液に含まれる創傷治癒の促進に関わる増殖因子やサイトカイン等の機能分子を保持、活性化させ、創傷治癒を促進させるものと言われている。光硬化性キトサンゲルはまさに理想的な閉塞性創傷被覆剤となる上記の条件を満たすものと考えられる。

キトサンゲルを創傷被覆材として

適用すると創面縮小を強く誘導し、創傷閉塞と治癒を促進することが見出されている。シーリング効果と創傷治癒促進活性をもつ光硬化性キトサンゲルは、有効な閉塞性創傷被覆材と考えられる。医療用創傷被覆材料および生体接着剤としての光硬化性キトサンゲルの有用性、そして線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) を含有させた光硬化性キトサンゲルの創傷治癒促進そして血管新生促進活性の評価を行ってきた。本研究の目的は、FGF-2 含有光硬化性キトサンゲルの調製および糖尿病性皮膚潰瘍のような難治性創傷に対する治癒促進活性や血管新生活性を明らかにするとともに、創傷治癒促進活性のメカニズムについて検討することである。

B. 研究方法

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。脱毛クリームにより脱毛した後、遺伝的糖尿病発症マウスとその（ヘテロ型）非発症マウス（healing-impaired diabetic (*db/db*) mice and their normal (*db/+*) littermates）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、5 $\mu$ g の FGF-2（フィブラスト；科研製薬）を含有させた約 100  $\mu$ l の光硬化性キトサン水溶液（20 mg/ml）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。爾後、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投与した *db/+* マウス（糖尿病未発症）群は 1 日目から顕著な創傷縮小が観察され、その後もコントロール群と比べて有意に創傷治癒が促進され、10 日目には開放創はほぼ表皮化されていた（図 1）。また投与したキトサンゲルは、4 日目まで完全に創傷部をカバーしていたが、その後創傷部の表皮化に伴い、自然に創傷部から落ちていくことが観察されている（図 1）。ここでキトサンゲル投与群の 1～2 日目での顕著な創傷縮小は、生物学的現象というよりもキトサンゲル自身の物理的な縮小により引き起こされていると考えられている。ここで光硬化性キトサン

ゲルへの FGF-2 の添加による *db/+* マウスの創傷治癒促進効果は観察されていない。他方、*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る。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。さらに免疫組織学的検討では創傷被覆後 4 日目以降、FGF-2 含有光硬化性キトサンゲル投与 *db/db* マウス群においてコラーゲンの産生（図 2）及び CD34 陽性内皮細胞が有意に増加した（図 3）。このように、FGF-2 含有光硬化性キトサンゲルは、特に糖尿病性皮膚潰瘍や難治性創傷において有効な創傷被覆剤として応用できる可能性がある。

### D. 考察

閉塞性創傷被覆剤の備えるべき条件は、生体適合性に優れ、傷を細菌感染等から保護する素材で、創傷治癒を高める湿潤環境を維持できるものと言われている。この湿潤環境は、創傷部の滲出液に含まれる創傷治癒の促進に関わる増殖因子やサイトカイン等の機能分子を保持、安定化させ、創傷治癒を促進させるものであり、光硬化性キトサンゲルはまさに理想的な閉塞性創傷被覆剤となる上記の条件を満たすものと考えられた。健康な通常マウスの創傷モデルを用いて、創傷治

癒促進効果について検討した結果、光硬化性キトサンゲルは外傷・火傷に対する応急処置のための止血・創傷保護剤として最適であるという評価と、顕著な創傷収縮、創傷治癒促進活性が見出されている。またキトサンゲルへのFGF-2の添加はdb/dbマウスの有意な付加的創傷治癒促進効果は観察され、糖尿病性皮膚潰瘍や難治性創傷において有効な創傷被覆剤として応用できる可能性がある。

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行っていないが、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。従って今の所、キトサンの改変や光架橋基の導入による毒性付与はないものと考えられる。

#### E. 結論

本光硬化性キトサンゲルは、応急止血剤或いは応急創傷被覆剤として災害救急医療へ貢献はもとより、増殖因子の併用による褥創、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。

#### F. 健康危険情報

なし。

#### G. 研究発表（平成20年度）

（論文発表）

山本直人, 中村真一郎, 東隆一, 柳林聡, 清澤智晴, 山本直人, 中村真一郎, 東隆一, 柳林聡, 清澤智晴. 脂肪腫摘出術後に生じた Chronic expanding hematoma の1例. 日本形成外科学会誌 28(5):328-335, 2008.

山本直人, 南部正樹, 植田晃史, 千々和剛, 大竹登志江, 小倉奈加, 東隆一, 清澤智晴. 術後予防的抗菌剤の投与期間に関する検討 -外来での皮膚軟部腫瘍摘出において-. Skin Surgery 16(3):137-140, 2008.

加藤摩衣, 泉彰典, 瀧川恵美, 柳林聡, 南部正樹, 東隆一, 山本直人, 清澤智晴. 鼻尖部腫瘍に対する Midline incision の有用性. Skin Surgery 16(3):122-125, 2008.

Nakamura S, Nambu M, Ishizuka T, Hattori H, Kanatani Y, Kishimoto S, Takase B, Aoki H, Kiyosawa T, Maehara T, Ishihara M: Effect of controlled release of fibroblast growth factor-2 from chitosan/fucoidan micro complex-hydrogel on in vitro and in vivo vascularization. J Biomed Mater Res (A) 85:619-27, 2008

Nambu M, Kishimoto S, Nakamura S, Mizuno H, Yanagibayashi S,

Yamamoto N, Azuma R, Nakamura S, Kiyosawa T, Ishihara M, Kanatani Y: Accelerated Wound Healing in Healing Impaired *db/db* Mice by Autologous Adipose Tissue-Derived Stromal Cells Combined with Atelocollagen Matrix. *Ann Plast Surg* 62:317-21, 2009

Nakamura S, Ishihara M, Takikawa M, Murakami K, Mishicot S, Nakamura S, Yanagibayashi S, Kubo S, Yamamoto N, Kiyosawa T: Platelet-Rich Plasma (PRP) Promote Survival of Inbred Fat-Graft in Rats. *Ann Plast Surg* 2009 in press

(学会発表)

山本直人, 清澤智晴, 東隆一, 柳林 聡, 佐々木薫, 中村真一郎. 縫合創の治癒過程の詳細観察 - 形成外科的縫合がもたらす組織学的影響について-. 第1回日本創傷外科学会学術集会, 東京, 2009.01.16-2009.01.17. 第1回日本創傷外科学会学術集会 プログラム・抄録集: p.112-112, 2009.

山本直人, 清澤智晴, 東隆一, 南部正樹, 中村真一郎, 柳林 聡, 佐々木薫. 『表皮・基底膜・乳頭真皮』は生体においてあらゆる状況で一體的に存在する. 第17回日本形成外科学会基礎学術集会, 東京, 2008.10.02-2008.10.03. 第17回日本形成外科学会基礎学術集会 抄録集:

p.91-91, 2008.

中村真一郎, 中村伸吾, 岸本聡子, 石原雅之, 南部正樹, 東隆一, 山本直人, 清澤智晴. フラグミンプロタミン複体の各種サイトカインキャリアとしての有用性. 第17回日本形成外科学会基礎学術集会, 東京, 2008.10.02-2008.10.03. 第17回日本形成外科学会基礎学術集会 抄録集: p.114-114, 2008.

佐々木薫, 山本直人, 中村真一郎, 柳林 聡, 東隆一, 清澤智晴. ラット腱コラーゲン線維網の走査電子顕微鏡による詳細観察～アルカリ・水浸軟法の有用性～. 第17回日本形成外科学会基礎学術集会, 東京, 2008.10.02-2008.10.03. 第17回日本形成外科学会基礎学術集会プログラム・抄録集: p.123-123, 2008.

岸本聡子, 中村伸吾, 南部正樹, 金谷泰宏, 服部秀美, 高瀬凡平, 前原正明, 清澤智晴, 原田恭治, 多川政弘, 石原雅之. フラグミン・プロタミンマイクロ粒子被覆プレートを用いた骨髄細胞由来間葉系幹細胞及び造血系幹細胞の選択的増殖培養に関する基礎的検討. 第47回日本生体医工学会大会, 2008.05.08-2008.05.10. 日本生体医工学会誌 46(1): p.299-299, 2008.

山本直人, 瀧川恵美, 南部正樹, 中村真一郎, 柳林 聡, 佐々木薫, 東隆一,

清澤智晴. 比較的大きな頭皮欠損の保  
存的治療. 第 51 回 日本形成外科学会  
基礎学術集会, 名古屋,  
2008.04.09-2008.04.11. 第 51 回 日  
本形成外科学会総会・学術集会プログ  
ラム・抄録集: p.147-147, 2008.

岸本聡子, 中村伸吾, 南部正樹, 金谷  
泰宏, 服部秀美, 高瀬凡平, 前原正明,  
清澤智晴, 石原雅之. フラグミン・ブ  
ロタミンマイクロ粒子による脂肪組  
織由来間葉系細胞の凝集と血管新生  
効果. 第 53 回防衛衛生学会, 東京,  
2008.02.06. 防衛衛生(別冊) 55:  
p.49-49, 2008.

南部正樹, 石原雅之, 金谷泰宏, 岸本  
聡子, 中村伸吾, 中村真一郎, 山本直  
人, 東隆一, 柳林 聡, 清澤智晴. 脂肪  
組織由来細胞を用いた難治性潰瘍治  
療の検討. 第 53 回防衛衛生学会,  
2008.02.06. 防衛衛生(別冊) 55:  
p.50-50, 2008.

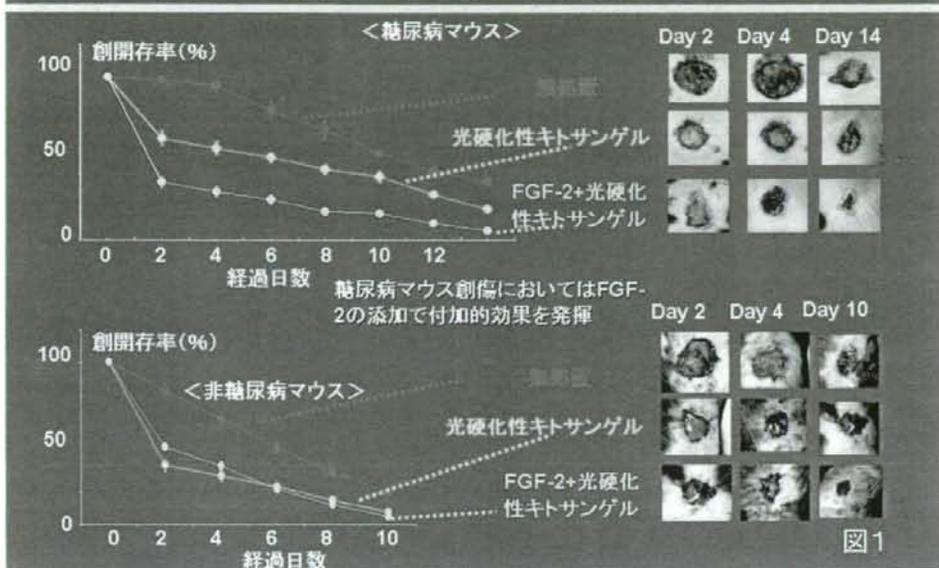
H. 知的所有権の出願・登録状況 (予  
定を含む)

特許取得: なし

実用新案登録: なし

その他: なし

## 創傷のマクロ的推移



## 糖尿病マウス病理所見(マッソントリクローム染色 day4)

