

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19500409
 研究課題名（和文）卵殻膜の創傷治癒における足場としての役割及び癒着防止膜としての医用材料への可能性
 研究課題名（英文）Study of eggshell membrane: possibility to a scaffold in wound healing and biological material for an anti-adhesive membrane
 研究代表者
 合谷 信行（GOYA Nobuyuki）
 東京女子医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：40142492

研究成果の概要：卵の内側の薄皮を卵殻膜といい、過去において創傷被覆材として用いられていた。卵殻膜の創傷治癒における足場としての役割及び癒着防止膜としての医用材料への可能性を評価したところ、線維芽細胞も新生血管も膜には癒着せず、創部を“分離する”という意味では感染防止に役に立ち、創傷被覆材への応用の可能性が示唆された。卵殻膜の創傷被覆材に応用ならば、固定方法の選択は広がることが示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間工医学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：卵、卵殻膜、創傷治癒、足場、癒着防止、材料

1. 研究開始当初の背景

卵の内側の白色の薄皮を卵殻膜といい、創傷被覆材として過去においては日常的に使用されていた。16世紀に李時珍が本草綱目を書いたが、日本語訳された頭註國訳本草綱目をみると、「ある人がたまたま刀を口に入れたところ、舌が2つに切れ、ほとんど落ちそうになったので、鶏子白皮を袋にして用いた。舌根に止血薬をふって血を手でおさえて止め、蠟化した蜜を鶏子皮の上に塗り、3日間留置してからはずした。」とある。卵殻膜を用い

た理由は「鶏子白皮は柔軟で、薄く、舌を保護し、薬を通らせる点を利用した」とある。卵殻膜は現在もなお、発展途上国では火傷、植皮のdonor siteの創傷被覆材として現在も臨床使用されている。

再生医療で用いる足場は、植え込み直後ばかりではなく遠隔期にも多大な影響をおよぼし、その結果が患者の予後を左右するといっても過言ではない。吉里らは卵殻膜は線維芽細胞の増殖・遊走を促進し、タイプ コラーゲンの産生を促進すると報告した(第64回日本生化学会 1991年)ことに我々は注目した。卵は卵殻、卵殻膜、卵白、卵黄から構成され、

卵殻膜は内外の二層に分けられる。厚さは約70 μm で、繊維状の構造で、裏表の密度が異なり、走査電子顕微鏡で観察した所見はいかにも細胞の遊走・増殖に適している様に想像できる。我々は、過去において細胞親和性の良好でない素材を足場を用いることで血管の先細り現象を観察した。卵殻膜は水に不溶で、主成分はタンパク質で、コラーゲン(I, V & X)を含み、材料としてはシステインに利用価値があるとされている。粉末化した卵殻膜は吸水性、吸油性に優れるため、創傷被覆材、化粧品としての応用が研究されている。さらに卵殻膜をアルカリ又は酵素を用いて、加水分解し、可溶化することにより応用性が広がるのが期待されている。国内のある一社で年間20万トンの卵を使用し、7トンの均一品質の乾燥卵殻膜の供給が可能としている。1950年頃より、卵殻膜の成分や性質に着目し、さらに環境保全の目的で再生利用が考えられ研究が進められている。最近ではさらに、より価値のある材料に生まれ返らせ、高度・高機能の利用法が期待されている。以上のような状況の下、卵殻膜の材料としての利点を生かし、また従来からの欠点を解消することができれば再生医療および臨床医学にとって極めて有効な新しい素材になると考えられる。古典的材料である卵殻膜でも処理方法の工夫により、細胞接着性を改善し足場として用いることの可能性が示唆され、処理法の改良、適応用途を新しい方向に導くことができると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は古くからある生体材料である卵殻膜を構造的あるいは化学的に処理することにより新しい機能を付与し、細胞接着を促進し組織工学用の足場として、あるいは細胞接着しにくくして癒着防止膜、溶解することを利用し代用尿管として応用可能な植込み材料・人工臓器を開発することである。本研究では、特に、適応に応じた至適処理条件を求めることに焦点を絞って研究する。基本的な研究方針は、卵殻膜の構造的特徴を生かし、旧来からの処理方法を用いることに加え、新しい技術である良好な細胞接着を維持させる方法を開発・改良することである。

我々が卵殻膜に期待したこととしては、卵殻膜を加水分解などの処理を施し、材料の利点を引き出し、Biological dressing、創傷被覆材として用いることにより不感蒸泄抑制、体液漏出防止、鎮痛、感染防止、表皮化の促進を行うことが可能で、化学的合成製品におとらない物性が安価に期待できる。70%エタノール処理および、無処理の乾燥卵殻膜にお

いて組織がanchoringしなかったことから癒着防止膜(人工臓器、1988)として代用心膜、代用硬膜、代用腹膜として使用可能であることが示唆される。熱処理した卵殻膜上で中皮細胞が培養可能であったことから、代用腹膜として応用の可能性が示唆される。術後4,5週間で無処理の乾燥卵殻膜が溶解したことより、尿管内ステント留置時に内層として用いることにより尿管における重層上皮が完成するまで感染を防止し、尿管における乳頭腫を防ぐことが考えられ、さらには代用尿管としての可能性が示唆される。可溶化することにより形態が変わり、応用範囲が広がる。

今まで経験した種々のモデル(血管新生・組織親和性観察のためのRECモデル、癒着防止膜検討、代用尿管モデル、他)を駆使することにより応用の可能性を評価可能である。

マヨネーズ工場では大量の鶏卵が用いられ、殻および卵殻膜は質が保たれているが"ゴミ"として廃棄処分され、その廃棄に莫大な資金が必要になっている。リサイクルは重要な意味を持つ。卵殻膜を粉砕することにより吸水性および吸油性をある程度調節することができる。ニワトリのLIF遺伝子が発見されたことにより、遺伝子組み換えを行わなくとも、抗ガン剤を始めとした様々な有用成分を含む卵を産むニワトリを低コストで作ることが将来可能となり、その卵殻膜にも機能を付与することが夢見られている。

我々は従来より生体親和性を持った生体材料の開発及び観察に必要な手法を用いて研究を行ってきたので、手技的には十分対応でき、興味ある材料が開発可能であると考えている。本研究は高額な薬剤や材料の減少、治癒の促進により入院期間の短縮し、国家予算の多大な割合を占める医療費の軽減に大きく貢献でき、社会的意義は大きいと考える。本研究課題を克服することは、これまでの研究成果から考えて、困難ではない。以上の諸点と、生体親和性の良好な材料の開発を行ってきた当グループの経験と研究体制から考えて、本研究は必ずや実用化されると考える。

卵殻膜を創傷被覆材として利用したという記載は16世紀の中国の書物にある(本草綱目 by 李時珍)。日本では、Maeda Kらが植皮のdonor siteおよび熱傷に応用し、効果があったと報告した(Burns, 1982)。処理法の応用として、オートクレーブでの熱架橋により *in vitro* で細胞親和性が改善したとの報告がある(Biomaterials, 2004)。開発途上国では未だに創傷被覆材として、用いられており、臨床使用において合成された製品より良好な経過をたどったと報告された(Chang Gung Med J,

2003)。狂牛病のためにウシ由来の生体材料の利用が困難になったときに avian の卵殻膜が代用硬膜として注目されたが、ラットの頭蓋への植え込みでは ePTFE の方が骨形成が良好であった(J Oral Maxillofac Surg, 2001)。薬剤と違い耐性菌を作らないところに注目し、医療費の限られている老人施設において卵殻膜と調理用ラップを用い褥創に処置した報告がある(看護婦の研究会、年不明)。肌荒れに卵殻膜中のケラチンを配合して掻痒感が低下した(新薬と臨床、1993) また透析患者でも同様の効果が報告されている(日透医学誌、2004)。しかし、卵殻膜の持つ創傷被覆材として、また癒着防止膜としての可能性については共同研究者の富澤が人工臓器学会(2006年11月、横浜)で報告したが、癒着防止膜としてについてはこれまでいかなる研究も見られず、全く新しい知見が得られるものと期待される。

3. 研究の方法

平成19年度には(1)~(3)を、平成20年度には引き続き(1)~(3)を、さらに(4)~(5)を行う予定であった。

(1)材料の選択および評価：鶉、鶏卵、鶯鳥、駝鳥等、鳥類の卵殻膜(Eggshell membrane; ESM)を得、厚さおよび構造などの形状、引っ張り強度、引き裂き強度等の物理的性質を評価する。また、採取できる大きさを検討する。鶏卵は厚さ70 μ mで、裏表の構造が異なる。走査電子顕微鏡(SEM)を用いる。卵殻膜は1個の鶏卵から約40~50cm²の面積が採取できるとされている。乾燥鶏卵殻膜はflake状と30 μ mの大きさのpowder状の2種類がある。マヨネーズ企業から提供を受けるが、water jetで分離・採取するため品質は整っている。flake状ESMは試料の湾曲から裏表(内側外側)が判断可能である。powder状ESMは微粉化技術により粒が整っている。

(2)処理方法の検討：無処理、架橋剤として70%エタノール、ホルムアルデヒド、エポキシ化合物を、また処理方法として、熱処理、アルカリ処理または酵素処理を検討する。特に架橋は架橋剤の選択、架橋程度などの条件を良く検討する。

(3)細胞親和性の検討：試料の上で細胞培養し、また培養した細胞の上に試料を留置し、細胞接着および生育状態を観察する。用いる細胞は線維芽細胞NIH3T3および中皮細胞である。線維芽細胞は組織治癒をまた、中皮細胞は癒着防止膜としての可能性をみる。

(4)動物実験

Rabbit ear chamberモデル：ウサギ耳介にアクリル製のmodifiedチェンバーを作成し、試料を観察窓内に少量留置する。観察は5週間後まで毎週1回、マクロ撮影および生体顕微鏡下に観察する(Tomizawa Y et al. J Invest Surg, 2002)。採取した標本はチェンバーの蓋をあけ、4%パラホルムアルデヒドで固定し、ガラス標本作製し顕微鏡下に評価する。心膜モデル：雑種成犬を開胸し、心膜を切除し、試料を留置する。植え込み期間は富澤らの検討(人工臓器、1988)を参考に2ヶ月を予定する。この植え込み期間では試料は植え込み時の構造を保っていないことが予想される。先の論文では中皮細胞の繊毛上皮が観察されている。腹膜モデル：雑種成犬にて、Noishiki Yらが報告した腹膜を剥離する癒着モデル(ASAIO J, 1988)を用いる。繊毛上皮の再生の有無が鍵となる(J Thoracic Cardiovasc Surg, 1994)

硬膜モデル：以前、代用硬膜の植え込みを雑種成犬で行ったが、頭蓋骨が硬く、本格的な器具を持たないと植え込めなかったため、今回はDupouirieux Lら(J Oral Maxillofac Surg, 2001)で用いたラットモデルを採用する。このモデルでは対照を反対側に植え込み、比較可能である。尿管モデル：研究協力者のNishino Sと尿管にステントを留置する実験を行った時は、用いたステントにカバーをつけなかった。今回、処理卵殻膜をステントに内層して用いる。尿管にステントが表面に露出していて感染、乳頭腫を形成したため、重層上皮が完成するまでの間、内面をESMにて被覆し、高張の尿に接触することを避ける。また、時間の経過とともに卵殻膜は脱落し、ステント以外は残らないため、感染及び結石形成を防ぐことが可能と考える。

(5)評価方法

組織親和性の評価：宿主の線維芽細胞が増殖・遊走しなければ良好な組織親和性を有するとはいえない。preliminary studyでは70%エタノール処理のmembrane状ESM上では新生血管は2週間で2mmくらいは伸展したが、anchoringしない/しにくいことをRECモデルで観察した。熱処理したものでは線維芽細胞の接着が良好であったとの報告がある。

新生血管の評価：新生血管の証明は存在しないところに出現する、血管芽か

ら成熟血管まで、経過をおって観察できる、血管が伸展する、以上の3点が確認できなければならない。RECモデルは経過を経時的に観察可能である。

新生血管の周皮細胞：蛍光標識トマトレクチンは血管内皮の糖皮を認識し、実験動物に静脈内投与し、血管壁を内腔側から血流とともに染色する。血管内皮細胞を抗CD31抗体(緑)で、周皮細胞を抗αSMA抗体(赤)で、森川らの方法(Am J Pathol, 2002)で描出する。Preliminary studyでは切片で染色性を評価したが、還流方法を工夫し、whole-mountで染色してデータを取りたい。血管新生部は内腔が未形成で、血流の無い内皮細胞策であるとされているが確認する。

材料の変化：無処理のESMは4週間後には大部分の形態は保たれているが、溶解しているところもある。処理法によるdegenerationの違いを観察する。エポキシ化合物での架橋処理、ホルマリンでの架橋処理ではdegenerationにかかる時間が延長する可能性がある。

抗感染性の評価：ESMは抗感染性といわれているが、科学的に証明されたわけではない。過去においてDineen Pらがオキシセル綿の抗菌作用を主張した時は、対照のない実験だった(Surg Gynecol Obstet, 1976)。現代の標準化された手法を採用し評価する。

4. 研究成果

- (1) 材料の選択および評価：本研究では鶏、駝鳥の卵殻膜を入手しやすさから使用した。鶏の卵殻膜は薄く、駝鳥のは厚く腰があった。
- (2) 処理方法の検討：状態はflesh、乾燥、アルコール架橋の3種類であった。形状は平面、フレーク様、粒状の3種類とした。
- (3) 細胞親和性の検討：Rabbit ear chamber (REC)モデル(Ref. 17)のチェンバーに留置した。
- (4) 動物実験では、生体顕微鏡下に観察可能で、繰り返し、同じ試料を観察することができた。
- (5) 評価方法：材料の変化では生、70%アルコール固定では5週間でオリジナルの形状をとどめなかった。新生血管の観察では血管の伸展は見られたが、組織接着は起こらなかった。組織親和性では、良好ではなく、線維芽細胞の遊走は少なかった。形成された結合組織は周囲に接着せず、摘出して組織評価を行うときに脆く、

壊れやすかった。抗感染性では、膜としてセパレーションすることはできなかったが、これ自体に抗感染性があると判断出来なかった。創傷被覆材として用いたれていたのは、創傷保護作用によるもので、抗感染性とは考えにくかった。

- (6) 創傷治癒を促進したのではなく、保護作用があったためである可能性が示唆された。
- (7) その他の成果：本研究では卵殻膜の研究をしている過程で他の研究成果が得られた。主研究者の専門の泌尿器科の基礎研究(Ref. 7, 12 & Ab-1)および臨床研究(Ref. 1, 6)人工臓器と材料(Ref. 3, 15, 17)末梢血管の反応性(Ref. 2, 13)人工心肺の安全教育(Ref. 4, 8, 9, 11, 14, 16)男女共同参画(Ref. 10)文献管理(Ref. 5 & 図書1)であり、どれもこの研究を行わなければ成果がでなかったと思われた。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計17件)

1. Iida S, Kondo T, Kobayashi H, Hashimoto Y, Goya N, Tanabe K. Clinical outcome of high-grade non-muscle-invasive bladder cancer: a long-term single center experience. Int J Urol 2009;16(3):287-292 査読有
2. Komori M, Takada K, Tomizawa Y, Nishiyama K, Kondo I, Kawamata M, Ozaki M. Microcirculatory responses to acupuncture stimulation and phototherapy. Anesth Analg 2009;108(2):635-640 査読有
3. Tateishi M, Tomizawa Y. Intravascular foreign bodies: danger of unretrieved fragmented medical devices. J Artif Organs 2009;12:in press 査読有
4. Tomizawa Y, Momose N. Certified perfusionists at core institution accredited by the Japanese Board of Cardiovascular Surgery. J Artif Organs 2009 in press 査読有
5. 富澤康子. 国内外胸部心臓血管外科系学術雑誌のh-indexを用いた評価. 日心臓血管外会誌 2009;38(1):11-16 査読有
6. Iida S, Kondo T, Tomita E, Kouchi Y, Goya N, Ito F, Tanabe K. A case of renal cell carcinoma with intrahepatic vena caval tumor thrombus successfully managed by surgery in a long-term chronic hemodialysis patient with liver cirrhosis. Hinyokika Kyo 2008;54(3):229-234 査読有
7. Momose N, Tomizawa Y. Incident-simulating device with wireless

control for extracorporeal circulation crisis management drills. Perfusion 2008;23(1):17-21 査読有

8. Tomizawa Y, Tokumine A, Ninomiya S, Momose N, Matayoshi T. Quantitative evaluation of hand cranking a roller pump in a crisis management drill. J Artif Organs 2008;11(3):117-122 査読有
9. 富澤康子. 医学部における女性研究者の h-index と科学研究補助金連続取得. 東女医大誌 2008;78(8-9):443-447 査読有
10. 富澤康子. 心臓血管領域 人工心肺を用いた体外循環のリスクマネジメント. 胸部外科 2008;61(8):636-639 査読有
11. Goya N, Koga S, Tomizawa Y, Onitsuka S, Yamaguchi Y, Toma H. Effects of direct injection of dehydrated ethanol on PC3 human prostate cancer cells in nude mice: preliminary study. Int J Urol 2007;14(8):760-763 査読有
12. Goya N, Gotanda K, Sasaki T, Okada M, Tomizawa Y, Toma H. Local injection of a sustained-release antiandrogen formulation into a target prostatic site: an experimental study. BJU Int 2007;99(1):202-206 査読有
13. Komori M, Takada K, Tomizawa Y, Nishiyama K, Kawamata M, Ozaki M. Permissive range of hypercapnia for improved peripheral microcirculation and cardiac output in rabbits. Crit Care Med 2007;35(9):2171-5 査読有
14. Ninomiya S, Tokumine A, Yasuda T, Tomizawa Y. Development of an educational simulator system, ECCSIM-Lite, for the acquisition of basic perfusion techniques and evaluation. J Artif Organs 2007;10(4):201-205 査読有
15. Tomizawa Y, Hanawa T. Corrosion of Pure Titanium Sternal Wire. Ann Thorac Surg 2007;84(3):1012-1014 査読有
16. Tomizawa Y, Momose N. Certified perfusionists in Japan. J Artif Organs 2007;10(2):122-123 査読有
17. 佐藤章, 富澤康子, 小森万希子, 高田勝美. 装置と方法 軽量で開閉可能な家兎耳介観察窓の開発. 呼吸と循環 2007;55(3):359-362 査読有

〔学会発表〕(計1件)

1. Goya N, Gotanda K, Sasaki T, Okada M, Tomizawa Y, Toma H. Local injection of sustained-release antiandrogen formulation into a targeted prostatic site: an experimental study. AUA Annual Meeting, 2007.05.22, Los Angeles, CA, USA

〔図書〕(計1件)

1. 富澤康子. EndNote100 の裏ワザ. 東京: 秀潤社, 2009. p239 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

合谷 信行 (GOYA Nobuyuki)
東京女子医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 40142492

(2) 研究分担者

富澤 康子 (TOMIZAWA Yasuko)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号: 00159047