

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K20732

研究課題名(和文)新規止血材材料の開発に向けた動物モデルの確立及びその止血機能評価

研究課題名(英文) Establishment of animal hemorrhage model and assesment of efficiency of novel hemostat

研究代表者

有馬 大紀(Arima, Hironori)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：10817729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)： 架橋コラーゲンを止血材として用いることにより、安価かつ臨床的に高機能な止血材を作成すべく本研究を実施した。動物実験モデルでは、新規止血材がコントロール群と比較して出血時間を短縮できることを確認し、皮下埋没後も炎症反応はほとんどなく吸収も良好であり生体適合性も問題なかった。また電子顕微鏡や粘弾性測定器を用いた物理特性の確認試験でも、止血材として良好な機能を確認できた。

本研究における止血材の機能評価・物理特性の評価は、将来の外科手術領域における確実な止血の実施に寄与し、結果的に安全な手術の実施に貢献できる。また、状況によっては医療費削減にも貢献しうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物を用いた多くの出血実験では、動物種・出血部位・測定方法は様々でかつ血圧管理がされておらず客観性に乏しい。一方で、本研究で作成した動物実験モデルは客観的かつ再現性のある方法での出血モデルであり、小動物を用いた出血実験の際には標準的に使用できる方法であると考えられる。また現行の止血材は高価なものがほとんどで臨床で使う際には量が不十分となることが多いが、本止血剤は安価に調整が可能である。その機能についても止血・生体適合性・物理特性いずれも臨床的に使用する上で有用な機能を確認でき、外科領域において安全・安価な止血材を提供するための多くのデータを取得できた。

研究成果の概要(英文)： This study was conducted to create an clinically highly functional and inexpensive hemostatic material by using crosslinked collagen as a hemostatic material. In the animal experimental model, it was confirmed that the new hemostatic material could shorten the bleeding time as compared with the control group. After subcutaneous implantation, there was almost no inflammatory reaction and its smooth absorption showed its good biocompatibility. In addition, a good function as a hemostatic material was confirmed in a test of physical examination using an electron microscope and a viscoelasticity measuring instrument.

The functional evaluation and evaluation of physical characteristics of the hemostatic material in this study will contribute to the reliable implementation of hemostasis in the field of surgery, and as a result, will contribute to the implementation of safe surgery. It can also contribute to reducing medical costs depending on the situation.

研究分野：脳神経外科 外科一般

キーワード：止血材 ゼラチン 架橋

1. 研究開始当初の背景

外科手術において、手術野の止血は術中の視野の確保や術後の合併症の回避のための重要な要素となり、様々な止血材料が利用されている。しかしながら、既存の止血材料は材形・安全性・価格などの面で、その使用場面や用途には制約があり、満足のいく状況ではない。我々は、従来の概念とは異なる止血材料を見出した。すなわち、高分子、低分子及び架橋剤成分組成比を調整することで形態を自在に変えることができ、様々な場面・用途に応用可能と予想されるものである。この材料の効果判定のためには良好な動物出血モデルの作成が必要と考えられるが、研究開始時点では統一された動物モデルが存在しなかった。そのため、再現性がよく簡便な動物出血モデルの作成が必要と考えられた。

2. 研究の目的

上記の状況を鑑みて、(1)従来にないこの新規材料の止血材の物理的な効果を確認し、臨床応用に向けた基礎事項を検討することを目的とする。具体的には、止血材の物理特性の検証をおこなう。また、(2)簡便かつ再現性のある動物出血モデルを作成することを目的とする。それを用いた出血・生体適合性試験を実施する。そのモデルを用いて、止血材の効果・生体適合性を確認する。

3. 研究の方法

(1) 止血材の物理特性確認

粘弾性試験

粘弾性の確認には sonocrot®を用いた。37℃に加熱された液状ゼラチン 150 μ l を検査装置にセットし、ゼラチン全体の粘弾性が一定化するまで3分程度静置した。その後、架橋剤を 50 μ l 添加し直ちに測定を開始し、架橋剤添加後の粘弾性変化について観察した。

電子顕微鏡

液状ゼラチン 200 μ l および、液状ゼラチン 150 μ l と架橋剤 50 μ l の混合物 (CLG) を 24 時間凍結乾燥した。凍結乾燥した液状ゼラチンおよび CLG を 3 mm 厚に切りだし、SEM で観察した。

(2) 動物実験モデル作成

すべての動物実験は学内委員会の承認を得て、「研究機関等における動物実験棟の実施に関する基本指針」(guideline for animal experiment which formulated by national ministry of education) を遵守し実施した。侵襲を伴う手技の場合はセボフルランの持続吸引による全身麻

酔を実施し、適切な鎮痛・鎮静下に行い手技を実施した。

生体適合性

8週齢ラットの腹部もしくは胸部皮下組織に、直径約8mm、厚さ1mmのCLGを埋没させた。埋没後は3-0ナイロンにて皮膚を縫合した。同一ラットに対して、埋没期間が1週・2週・4週となるように計3回の埋没手技を行なった。4週目に、皮膚の外観・膨隆の径を測定し、皮下組織を切除して病理学的検討を行った。

出血実験

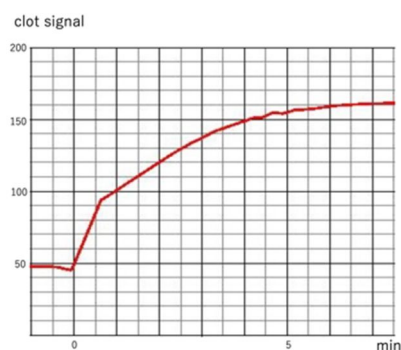
上記のラットの皮膚標本摘出し創部が治癒した2週間経過後に出血実験を実施した。術中は頸動脈から血圧モニタリングを実施して継続的に血圧を測定し、安定した血圧下で実験が行われていることを確認した。浅大腿静脈、総腸骨静脈、下大静脈の順に出血実験を実施し、それぞれ22G針、22G針、18G針で穿刺し穿刺開始から止血までを撮影した。コントロール群では生理食塩水に浸したネオパールを出血開始後直ちに穿刺部に貼付した。CLG群では液状ゼラチンを浸したネオパールを出血開始後直ちに貼付し、速やかに同部位に架橋剤を塗布した。2名の測定者が実験後に映像を確認、それぞれが止血と判断した時間の中間値を止血時間とした。また、収縮期血圧が80以下かつ止血までの時間が120秒以上となった場合は、動物の苦痛に配慮して直ちに実験を中止した。実験終了後はそれぞれのラットにはソムノペンチルを経静脈的に投与し安楽死させた。

4. 研究成果

(1) 止血材の物理特性確認

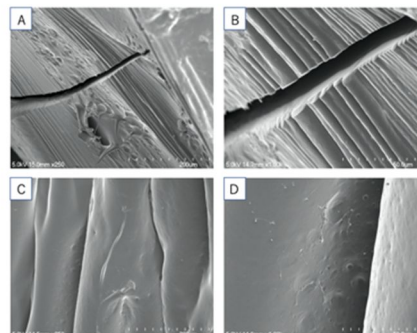
粘弾性試験

粘弾性試験の結果について表に示す。温度による粘性が安定後、架橋剤を添加すると直ちに粘弾性が上昇し、数十秒以内に固化を得た。その後も粘弾性は継続的に上昇し続け、およそ5-10分程度で一定の粘弾性に達した。



電子顕微鏡

液状ゼラチンのみで凍結乾燥を行った場合、表面は粗雑で細かい繊維が線状に走行するような構造が観察できた(A.B)。架橋剤を混合して凍結乾燥させた場合、全体的にゴムのような滑らかな構造となり、線状に配列していた繊維も均一化して平坦化していた(C.D)。架橋剤を添加することにより、液状コラーゲンの配列が

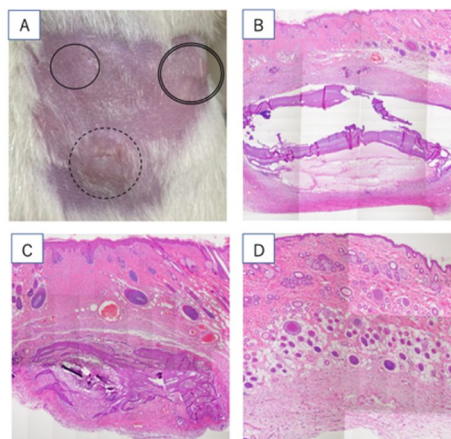


ランダムに並んだ状態のまま架橋が行われていることが示唆された。

(2) 動物実験モデル作成

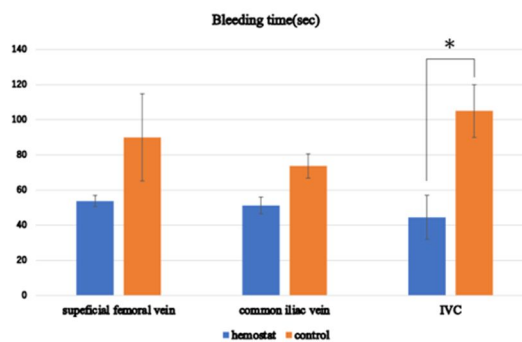
生体適合性

いずれのラットにおいても、埋没部に潰瘍形成や創離開などは認めず、埋没させた CLG は脱落することなく実験期間を経過した。埋没から 1 週後 (A 破線)、2 週後 (A 二重線)、4 週後 (A 一重線) の皮膚はそれぞれ、CLG 埋没による膨隆が 8 mm、4 mm、0 mm であり表面からも吸収の経過が見て取れた (A)。それぞれ、病理検査 (HE 染色) を実施したところ、埋没一週間後では、大きな CLG が皮下に存在していたが (B)、2 週間後にはやや縮小し (C)、4 週間の経過で確認できない程度まで吸収されていた (D)。



出血実験

穿刺から止血までに要した時間は、浅大腿静脈では、コントロール群が平均 90 秒、CLG 群が平均 53.8 秒であった。総腸骨静脈では、コントロール群が平均 73.8 秒、CLG 群が平均 51.3 秒であった。下大静脈では、コントロール群が平均 105 秒、CLG 群が平均 44.5 秒であった。下大静脈の穿刺に置いて、コントロール群では出血が多量でショック状態となるラットが 2 匹存在したが、CLG 群ではショックに陥るラットは認めなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 有馬 大紀
2. 発表標題 コラーゲンペプチドを用いた新規止血剤の開発
3. 学会等名 Biomedical Forum
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 液状医療材料	発明者 有馬 大紀、城戸 浩胤	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-011397	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 液状医療材料	発明者 有馬 大紀、城戸 浩胤	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-11398	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 液状組成物および液状医療材料	発明者 有馬 大紀、城戸 浩胤	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-011399	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------