

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25年 6月 11日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390268

研究課題名（和文）胸部領域用癒着防止膜に関する基礎的研究

研究課題名（英文）Fundamental study of an anti-adhesive membrane for thoracic surgeries

研究代表者

野一色 泰晴 (NOISHIKI YASUHARU)

横浜市立大学・医学研究科・特任教授

研究者番号：60033263

研究成果の概要（和文）：胸部外科領域、特に胸腔内領域内における癒着防止膜に関する基礎的研究を行った。ゼラチンまたはヒアルロン酸を用いた生体内吸収性膜を作成し、一定量のグリセリンを含有させた。作成した膜では In vivo と in vitro の実験結果より良好な抗癒着効果が明らかとなった。癒着阻止の機序は次の通りであった。膜に含まれるグリセリンが大量の水を集め、そして創傷部で産生される過剰の細胞成長因子を拡散させていた。

研究成果の概要（英文）：A pilot study for an anti-adhesive membrane for thoracic surgeries especially for the pleural cavity surgery was performed. A biodegradable membrane made of gelatin or hyaluronic-acid containing a certain amount of glycerin was developed. In vivo and in vitro studies showed that the tested membranes were effective to prevent adhesion in the pleural cavity. The mechanism of these desirable results was as follows. The membranes contained glycerin, which gathered and dispersed abundant water. Together with this, growth factors are also dispersed, resulting in dilution of excessive growth factors at the wound sites.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	10,000,000	3,000,000	13,000,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：癒着防止膜、外科、細胞・組織、臨床

1. 研究開始当初の背景

(1) 世界の現状

予期せぬ癒着で苦しむ患者にとっては、癒着現象は悪魔の仕業の如く響く。しかし

癒着は自然現象の一つである。傷害を受けた組織の修復過程に於ける最終状態の一つである。癒着現象がなければ、外科手術も創傷の治療も出来ない。癒着が自然現象であるが故に、それを阻止することは、ある意味では自然に逆らうこととなる。医療行為では自然現象に逆らった治療法は、一時的に成果を収めたにしても、長期的な観点

から見ると、決して安定した最終状態ではあり得ない。問題は癒着現象の生じる場所や状態であって、癒着が生じてほしい箇所に癒着を誘導し、癒着が生じてほしくない部位には癒着現象を誘導しない、という誘導技術の不備が問題である。癒着現象は自然現象の一つであるので、私共は癒着をしてほしい部位に癒着を促し、癒着が好ましくない部位には及ばないように自然現象を誘導することが人類の知恵であると考え、決して自然に逆らうのではない。自然と共に生きていく知恵を出すことを試みた。本研究を開始する段階において、世界の情勢は以下の通りであった。

(2) 癒着阻止の手法としては、物理的、スペース的に癒着しそうな臓器、組織、器官を隔離させる方法は古くから行われていた。これらに用いられているのは、シリコン膜 (silastic membrane)、EPTFE 膜、ポリウレタン膜、大腿筋膜、グルタールアルデヒド処理のウシもしくはブタ心臓、シリコン加工ダクロン、脳硬膜、gelfilm、Gelfoam perts、羊膜、腹膜などである。最近では柔軟性に富む吸収性ポリペプチドが用いられている。しかしこれらは周囲の癒着を促進させるとの報告もある。

(3) 異常反応の少ない膜としては Johnson & Johnson から発売されている酸化セルロース膜や Poloxamer 407 などこれに相当する。この Poloxamer 407 は温度の変化によりゾル状態になったりゲル状態になったりすることから、内視鏡的に観察しつつ、抗癒着を希望する部位に注入して、ゲル状の膜形成を生じさせる特徴をもつ。次に可逆的状態のうちにこれをブロックする方法としては、古くからヘパリンやコンドロイチン硫酸などの薬剤が使用されていた。また最近では漿膜細胞表面の主成分の一つであるレシチンを膜腔内に注入すると癒着が軽減するという報告がある。例えばヘパリンはフィブリン析出を阻止するため、フィブリン網は形成されず、線維芽細胞は侵入の足場を失って結果的には癒着組織は形成されない。このような薬剤は比較的吸収が早いため、前述のように日単位で進行する変化を阻止し続けることはできない。

(4) 薬剤除放システムを用いて阻止に成功したのは 1985 年になってからである。そしてこのように人工的にそれを阻止している間に、天然の抗癒着作用をもつ宿主の漿膜細胞がその部を覆って永久的抗癒着性をもたらすよう、表面のみの細胞接着を促進させるべく、コラーゲン膜などが使用され、さらに吸収性をもたせる工夫も行われ

た。松田らのグループにより、コンドロイチン硫酸を含んだ含水性ゲルをその場で膜形成させる方法が開発された。これらは *in vitro* でも細胞接着が阻止されるのを確認している。この現象は、細胞接着阻止というより、その前の段階のフィブリン粘着阻止、そして細胞接着のアンカリングサイトの接着阻止からスタートしていると考えられる。そして、この膜は癒着を阻止した後は徐々に吸収されるように設計されている。ところが吸収性が大切という考え方を受けてか、最近、吸収性の膜であれば癒着を阻止できると主張する考え方で紹介され、心外膜における癒着防止に使用されてその成果も示されている。しかし実際に追試してみると期待通りには癒着防止が得られないのが実情である。吸収性膜は、吸収過程においてそれなりの細胞反応があって各種細胞が侵入するため、このことが膜の吸収時点において癒着促進を引き起こすことも指摘されている。単に吸収性だから癒着阻止が図れることはない。

(5) 移動現象の活用、すなわち不可逆的のうち、癒着部位が移動を受ける、剥がされるという状態により、近接する組織間際に癒着のブリッジが形成されないことによるのではない。このような状況下では、生体反応の少ない材料であればいかなるものでも癒着を阻止しうると思われる。しかしながら、実際に癒着阻止を必要とする場、例えば悪性腫瘍切除後の広範囲な漿膜欠損部などでは、現時点では癒着阻止には成功していない。また一方、胸部領域では、例えば胸腔内や心膜腔内の手術操作後では癒着が必ず生じており、問題解決には程遠い。臨床現場では腹部領域で「セプラフィルム」の名で癒着防止膜が販売されているが、効果が不確実であり、胸部領域では全く効果を示していない。

(6) 癒着防止膜への期待 このようなことから、現状より優れた癒着防止膜、特に胸部領域でも使用可能な癒着防止膜の出現が切望されていた。

2. 研究の目的

(1) 癒着現象の原点に立ちもどって癒着機序を解明した結果、癒着は創傷治癒の一つのプロセスとして進行することが判明したことから、そのプロセスを論理的に断ち切ることで癒着阻止が可能とする癒着防止膜を作成することを第一の目的とした。

(2) 第二の目的としては、作成した癒着防

止膜が、まだ世界中で誰一人成功していない胸部領域での癒着阻止に、動物実験レベルであるが、成功させ、我々の掲げる理論の正しさを証明することである。以上の2つの課題を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 癒着機序の解明 癒着阻止を図るため、癒着がどのようなステップを踏んで進むのかを解明する。そしてそのステップの個々の段階での阻止のうち、どの段階での阻止であれば、創傷治癒を阻止することなく意図せぬ癒着を阻止可能かの解明を行う。

(2) 世界の情勢の解析 本研究領域は、この数年間にわかに激しい競争の世界に突入した。そこでその情勢を理解し、それから学んで新たな手法を考案した。

(3) 具体的方法は、理論にしたがった膜の作成と動物を用いた地道な実験の繰り返しであるが、それを確実に実施する。

4. 研究成果

(1) 癒着現象の機序の解明 癒着機序を創傷治癒研究の一部としてとらえる考え方をしして詳細に観察した結果、癒着は以下に示す5つの段階を踏んで進むことを明らかにした。文献的検討では、このような癒着現象の解析を行った後に、論理的に癒着阻止を考える手法を採択した研究は見られないが、本研究では、癒着の本質を捉えた後に阻止を考える手法を採択した。その結果を以下に示す。

第1段階として、障害を受けた部位では漏出液内のフィブリノーゲンからフィブリンが転換され、フィブリン・モノマーが集合してポリマーとなり、血小板も加わり、それらが立体的に絡み合ってフィブリン網を作り、周囲組織との間に橋渡しをする。この過程は分単位で進む。

第2段階として、創傷部で障害を受けた細胞やマクロファージ、白血球などが細胞成長因子を産生し、フィブリン網にトラップされる。これと同時に線維素溶解現象もスタートする。従ってフィブリン網は溶解される可能性があり、癒着は可逆的である。この過程は時間単位で進行する。

第3段階として、細胞成長因子に誘導され線維芽細胞が侵入し、周囲にコラーゲン線維網を形成し、フィブリン線維とコラーゲン線維が混在する状況となる。コラーゲン線維は線維素溶解現象では溶解されないので、コラ

ーゲン線維が増えると不可逆的となる。この過程は日単位で進む。

第4段階として、増殖した線維芽細胞が栄養を要求することから毛細血管が侵入し、肉眼的に見てもピンク色の肉芽組織形成へと進む。この過程は週単位で進む。

第5段階として、炎症も創傷も収まると、線維芽細胞が退出し、毛細血管も消え、組織も縮み、肉眼的にも白い癒着組織となり、癒着組織が完成する。この過程は月単位で進む。

(2) **世界の情勢の解析**から、新たな癒着阻止技術を以下の通り創出した。

成果1 癒着阻止のために、前述の第一段階で癒着を阻止するため、周囲組織との間にフィブリン網を防ぐことである。臨床では腹部のセプタフィルム以外はシリコンやテフロン等の疎水性膜が使用されている。しかし我々は細胞成長因子が疎水性物質に吸着され癒着を促進すること、及び含水性の高いハイドロゲル内では線維芽細胞が活動を停止しコラーゲン線維を産生させない事、を見出したことから、本研究では疎水性とは逆に高含水性のハイドロゲルを用いて細胞成長因子の吸着と細胞侵入を阻止する手法を開発した。

背景の努力として、この成果の裏には、我々の日頃の細胞培養技術における観察が役立った。具体的に言えば、ゼラチンやコラーゲンなどの細胞の足場としてベストな物質を細胞外マトリックスとして使用し、細胞培養を行っていたところ、含水率がある程度以上になると細胞が分裂や遊走を中止し、静かにとどまってしまう現象を発見したことである。細胞が死滅したのではないが、細胞が静かな状態に陥る。そこで癒着阻止には、活発に動き回る線維芽細胞を静かにさせるために、こう含水状態を癒着阻止部分に作ることで得策であることを明らかにした。

成果2 もう一つの成果は細胞成長因子を拡散させることであった。創傷部では治癒促進のために細胞成長因子が持続的に放出されるが、その量が過剰で周囲ににじみ出ると癒着が生じる。癒着組織はコラーゲン線維が主体であり、コラーゲン線維は線維芽細胞から産生される。そこで線維芽細胞の侵入を阻止するため、にじみ出た過剰な細胞成長因子を拡散希釈させることで癒着阻止に効果的であることを明らかにした。

(3) **in vitro 実験** 本研究では、水の層を作り、細胞成長因子を希釈するために

は、グリセリン濃度が重要な意味を持っていることを明らかにしてきたが、どの濃度が適正であるかに関して、in vitro の細胞培養を用いた結果を下图に示す。

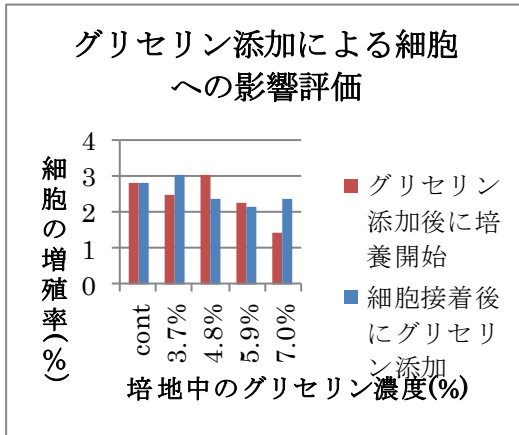


図1 グリセリン濃度と細胞増殖の関係

新しいコンセプトの誕生として、前述の実験結果から我々は、(誘導水層膜技術)という概念を考え付くに至った。

具体的手法としては、グリセリンなどの多価アルコールをハイドロゲル膜に含ませ、膜表面にグリセリンが徐放されるに連れてグリセリンに吸収される水の層を形成させ、水の流れによって創部で産生される過剰な細胞増殖因子を拡散させる、という、これまで世界でも提唱されていなかったアイデアを生み出した。

(4) 動物実験結果 動物を用いた実験結果を以下に示す。

【in vivo 評価】

今回の検討では、癒着防止の第一のターゲット部位として胸腔を選択した。実際の手術後に確実に癒着の発生がみられること、生じた癒着の剥離に多大な時間とリスクを伴い、更に動物実験において市販の癒着防止材料では胸腔の癒着防止ができないことから、第一のターゲット部位として胸腔を選択した。

胸腔を選択した理由は、腹腔の場合、手術後数日経過後には臓器自体が蠕動運動を始めるために癒着が生じ難いに対し、胸腔では肺と胸壁の切開部とが常に密着した状態になっているため、確実に癒着が生じると思われる。この確実に癒着が生じる胸腔において、癒着を防止出来る材料であれば全身で癒着が生じる可能性のある如何なる部位においても癒着を予防することが出来ると考え、胸腔を癒着防止のターゲットとして選択した。

まず癒着モデルの検討を行った。実験の際には気管への挿管を行い、人工呼吸器につないだ後に開胸するが、人間あるいはイヌでは開胸した後に閉胸するだけで確実に癒着が発生することがすでに基礎研究で明らかにしたので、ラット、ウサギ、モルモットを用い検討を行った後に、犬を用いた本格的実験を行った。

犬を用いた実験の具体手順は、開胸し肺を露出させることで、肺と胸壁縫合部の間で確実に癒着を生じることが確認できていたため、イヌを使い癒着防止の評価を行った。具体的な手順は次の通りである。

1. 成犬(ビーグル犬、雌、1.5才)を全身麻酔下、手術台に仰向けに固定し挿管チューブを経由して人工呼吸器につなぐ。
2. 第5、第6肋骨の間より開胸し肺を露出後、試作した膜を肺の表面に広げて置いた後に(図4)、胸を閉じる。閉じた後に、留置したチューブより空気を抜き肺をふくらませた後にチューブを抜く。
3. 2週間以上経過後に全身麻酔下、後脚鼠蹊部より脱血しイヌを安楽死の後に、第7、第8肋骨の間より開胸し癒着の有無、程度、範囲を観察する。

倫理面の配慮として、横浜市立大学動物実験センターにおいて実施した動物実験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(環境省告示)」および「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省告示)を元に作成された「公立大学法人横浜市立大学福浦キャンパス動物実験指針」に則り、審査を受けた後に実施された。

具体的実験結果 代表的な例を下記の図に示す。

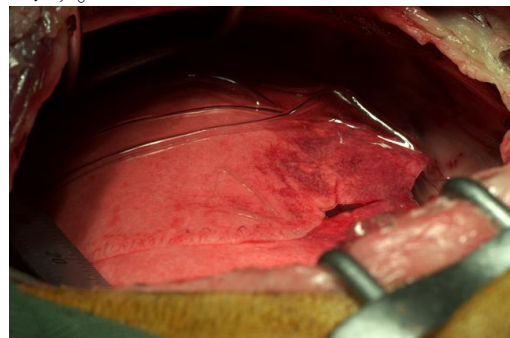


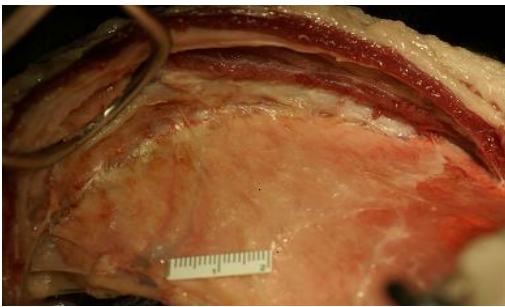
図2. 試作膜を肺上面に適用した様子

この図2の所見は犬の胸腔を開き、肺のうえに作成した癒着防止膜を置いた状況を示している。膜が透明であるため認めにくい、皺の入ったところでは膜の存在が判別

できる。膜の位置は、置いたのちでも自由に置きなおすことが可能であり、市販のセプラフィルムとの取扱い性の違いは明らかである。



図3. 本研究で作成した癒着防止膜を肺組織表面に置くことによって開胸手術の影響を受けることなく、癒着が防止された状態。手術一か月後の再開胸時の胸腔内所見である。肺組織の一部に充血した箇所が見られるが、胸壁との癒着は全く見られず、癒着を無理なく阻止している。肺組織の癒着阻止は世界で初めてである。

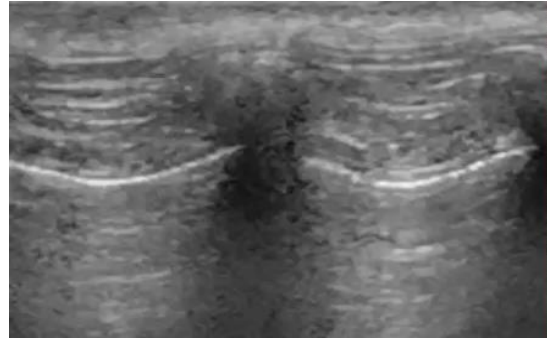


「図4. 市販のセプラフィルムを用いた対象例を示す。手術創に沿って肺組織がべったりと胸内壁に癒着し、胸腔内を先まで見渡すことができない。セプラフィルムを使用しなければ、なおのさら癒着は生じる。胸腔内の癒着阻止は誰も成功していない。

新しいコンセプトである（誘導水層膜技術）すなわち細胞増殖因子の拡散に関して試作膜について評価結果は、不溶化したグリセリン含有ゼラチン膜を使うことで、これまで癒着防止が出来なかった胸腔での癒着防止が可能であることが確認された。

低侵襲的癒着評価方法の開発 このたびの研究である膜開発の先には臨床応用が待ち構えているが、その時に問題となるのは、臨床治験で癒着の有無をいかにして低侵襲で実施するかである。世界の情勢を見る限りでは、手術後に腹腔鏡を用いた検査を行っているが、これは患者負担が大きすぎる。そこで本研究では動物における肉眼的観察に先立ち低侵襲的な癒着状態観察方法の検

討を行った。MRI, CT Echo、等を駆使した結果、動きのある画面から癒着を判断するためには超音波 Echo が肥料可能であることを見出した。その成果の一部を示す。



胸腔での癒着の有無について、低侵襲的な評価方法により確認が可能となった。図5. 犬の胸腔内に作成した癒着防止膜を置き、3週間後に手術創部を超音波エコーで検査した画像を示す。観察中では呼吸性移動をする肺組織の画像の解析から、肺が癒着していないことが明らかとなった。コントロールで癒着した肺組織は動きが見られなかった。

低侵襲で癒着防止膜の効果を臨床的に明らかにするには、製品開発における最大の課題である。市販のセプラフィルムは腹部手術後に内視鏡的検査を行って癒着の有無を調べた記載があるが、今日的には患者のメリット・デメリットを考えると患者負担が大きすぎて実施不可能である。文献的には cine-MRI によって癒着の有無が 90%以上の確率で判断可能との報告があるが、特殊装置を用いる手法は一般的ではない。本研究ではそのことも考慮し、新たな手法を開発中であり、近々報告予定である。

【まとめ】

新規コンセプトである誘導水層膜技術による胸腔での癒着防止の検討を行った。

1. これまで癒着防止が不可能であった胸腔において、癒着防止が可能となった。
2. 胸腔における癒着防止では、本コンセプトである誘導水層膜技術並びにある期間の物理的障壁性が必要であった。
3. 本コンセプトは、腹腔、心嚢膜内部の癒着防止にも有効であった。
4. 癒着防止は、胸腔と腹腔で必要な要件が異なっていた。

5. ヒアルロン酸 Na 並びにゼラチンについて、化学架橋剤を使うことなく不溶化させることが可能となった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

1. H. Arai, K Okudera, H. Oshiro, N. Komitsu, H. Mitsui, T. Nishi, M. Tsuboi, A. Nozawa, Y. Noishiki, K. Ohhashi, K. Inui, M. Masuda: Elevated microsatellite alterations at selected tetra-nucleotide (EMAST) in non-small cell lung cancers - a potential determinant of susceptibility to multiple malignancies. Int. J. Clin. Exp Pathol; 査読有, 6(3)2013, 359-410.
2. K. Yoshida, M Ono, H Bito, T. Mikami, H. Sawada: Plasmodium induced by SU6656, an Sre family kinase inhibitor, in accompanied by a contractile ring defect. Cell Biochem. Func. 査読有 30(1)2012, 33-40.
3. Y. Noishiki, N. Shintani: Anti-adhesive membrane for pleural cavity. Arti Organs, 査読有, 34:2010, 224-229.
4. Oshinari Mine, Hideya Mitsui, Yu Oshima, Yasuharu Noishiki, Mikizo Nakai, and Shunji Sano : Suture Retention Strength of Expanded Polytetrafluoroethylene (ePTFE) Graft : Acta Med. Okayama, 査読有, 64(2)2010 121-128.

[学会発表] (計2件)

1. 野一色泰晴、伊藤博: 細胞の動きを止め、細胞成長因子を拡散させる機能を組み込んだ癒着防止膜。第3回生体由来材料研究会、2012年12月10日、大日精化工業(株)研修センター(東京)
2. 野一色泰晴、伊藤博: 癒着防止膜の現状。水の動きと細胞の動き。第2回バイオマテリアル基材研究会、2012年7月26日、(株)ハイレックスコーポレーション会議室(兵庫県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野一色 泰晴 (NOISHIKI YASUHARU)
横浜市立大学・医学研究科・特任教授
研究者番号：60033263

(2) 研究分担者

澤田 元 (SAWADA HAJIME)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：90101112
(H23 退職)

(3) 連携研究者

伊藤 博 (ITO HIROSHI)
横浜市立大学・医学研究科・客員教授
研究者番号：80124303
(H22～H23)