

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592984

研究課題名(和文) 口腔組織欠損に対する修復促進作用を有する創保護材の開発に関する基礎的研究

研究課題名(英文) A development of wound protection materials having healing acceleration for an oral mucosal tissue defect.

研究代表者

藤村 和磨 (Fujimura, Kazuma)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：30252399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：処置群(n=8)では、直径5mmの粘膜欠損は、周囲粘膜から中心に向かって上皮が進展していくパターンがみられた。約2週間後、上皮形成面積は平均12.56mm²、瘢痕拘縮率は約36%であった。一方、無処置群(n=7)は、上皮形成面積は平均7.46 mm²、瘢痕拘縮率は約62%であった。LYDEXでは、無処置群に比べて粘膜増生が速く、粘膜欠損部位を早く覆うため、瘢痕拘縮率が低くなることが示唆された。同様の実験方法で、LYDEXにFGF-2を添加した(n=4)。処置後2週間で、上皮形成面積は平均15.11mm²、瘢痕拘縮率は23%であった。FGF-2は口腔粘膜修復を加速させ、瘢痕拘縮を抑制する。

研究成果の概要(英文)：In the treated group (n=8), a tendency for the epithelium in a mucosal defect with a diameter of 5 mm to extend towards the center from the peripheral mucosa was observed. Approximately 2 weeks thereafter, the epithelial formation area was 12.56mm² on average, and the scar contraction rate was approximately 36%. In the non-treated group (n=7), the epithelial formation area was on average 7.46 mm², and the scar contraction rate was approximately 62%. With LYDEX, mucosal proliferation was faster, and mucosal defect sites were covered more quickly compared to those in the non-treated group; therefore, this suggested that this reduces the scar contraction rate. FGF-2 was added to LYDEX in a similar experimental method (n=4). Two weeks following treatment, the epithelial formation area was 15.11mm² on average, and the scar contraction rate was 23%.

研究分野：口腔外科学

キーワード：生体材料 粘膜保護材

1. 研究開始当初の背景

口腔領域では、特に悪性腫瘍や前癌病変は広範囲に亘って発症することがある。これらの病変を切除した場合、広範囲の粘膜欠損および粘膜下組織欠損が残り、創閉鎖に苦慮することが多い。

現在、この広範囲な口腔組織欠損に対しては、人工真皮グラフト(テルダーミス®)などの人工材料を使用するか、中間層皮膚移植あるいは自家遊離複合組織移植などでなんとか治療を行ってきたが、前者は、タイオーバーなどで圧迫固定が必要であるが、口腔は狭小で複雑な形態であるため、組織が運動機能を有する動きやすい部位では、圧迫固定が困難で苦慮することが多い。また後者は、前腕および下腿や腹部などから健全な部位の皮膚や深部組織を採取する必要があり問題がある。また、最近では、自己の口腔粘膜細胞や iPS 細胞を培養し、欠損部位へ貼り付ける再生粘膜移植法の研究が進められおり、将来有力な治療法になると思われるが、移植細胞を作製するには時間を要し、また、非常に高価であるため、更なる準備が必要で、現在の一般臨床で即座に使用出来ない。最近、上述の皮膚移植や人工真皮グラフトの代わりに、フィブリン糊(ポルフィール®)とポリグルコール酸を材料とした吸収性縫合補強材(ネオベール®)を併用し、口腔粘膜欠損の創部保護を行い治療が試みられている。この生体材料は、ポリグルコール酸メッシュを補強材として粘膜欠損創部に置き、その上からフィブリン糊を噴霧して固定するため、操作が非常に簡単で操作時間も短い。また、創部表面を緻密に覆うため感染しにくく疼痛が少ない。さらに、自己含嗽ができ、早期に食事摂取が可能で入院期間が大幅に短期化できるなどの利点がある。申請者らは、この生体材料を悪性腫瘍や前癌病変の切除術後の粘膜および粘膜下組織欠損症例に使用

し、良好な結果が得られたため、日本口腔科学会近畿地方部会で報告した^{1,2)}。現在、多施設で多くの患者に使用され始めているが、このフィブリン糊は血液製剤であり、何らかの感染の危険性を回避できないこと、また、口腔での使用は保険適応がなく高価であることなどの欠点がある。そのため、このフィブリン糊に代わるもの、すなわち、生体に安全で安価な人工材料を是非とも開発する必要がある。

申請者らは、2006年に京都大学再生医学研究所で「自己分解性を有する食品添加物を用いた医療用接着材」として開発された LYDEX³⁾に着目した。これは、増粘剤や保湿剤や血漿増量剤として広く知られている多糖類であるデキストランをある条件下に酸化させてアルデヒド基を導入させたものと、食品添加物(保存剤)として広く一般的に使用されているγ-ポリリジン⁴⁾を混合しながら創面上に塗布して硬化させる材料である。操作は非常に簡単であり、狭小な口腔領域での応用には適していると思われる。さらに、その結合体中にシッフ基が形成され、これにより、周囲のデキストランまたはポリリジンの分子が徐々に切断される自己分解能が備わること予備実験で確認された。また、他の特徴としてアルデヒド基の導入量によって硬化時間が自由に調節でき、さらに、ポリリジンに加える無水酢酸の濃度を変えることで、自由に自己分解時間が調整できることが解っている³⁾。また、フィブリン糊(ポルフィール®)に比べ、接着強度は約4倍、弾性は、1.5~2.0倍であり、さらに、生物検定で生体安全性が確立されており³⁾、元来の食品保存剤であるγ-ポリリジンの抗菌作用も立証されている⁴⁾。また、申請者が予備実験で作製した場合の値段は、非常に安価(1回使用分は約98円)である。現在、肺瘻閉鎖材あるいは臓器切除後の止血剤、臓器

の癒着阻止剤や眼強膜置換剤としても研究されている⁵⁻⁷⁾。

申請者らは、これまでに予備実験にて、このLYDEXをフィブリン糊の代用材として、硬化時間、自己分解時間、柔軟性などを口腔領域の粘膜および粘膜下組織を含めた組織欠損創の保護材として調整し、それを動物実験にて組織学的に検討してきた²⁾。その結果、臨床的に適応できる生体材料であることが確認され、今回、本研究の申請を行うに至った。

2. 研究の目的

本研究は、この3年間に、多糖類であるデキストランと食品添加物（保存剤）であるγ-ポリリジンから構成される新しい医療用組織接着材（以下LYDEX）の口腔粘膜欠損および粘膜下組織欠損での創保護・治癒促進材としての開発を行うことであった。とくに、粘膜欠損に対する創保護作用と線維芽細胞増殖因子(FGF-2)を含有させることで粘膜欠損治癒促進作用の確認、さらに、骨形成因子(BMP-2)を加えることで、抜歯窩や歯肉欠損創などの骨露出部の保護と早期に骨増生を促す創保護・治癒促進材として検討する予定とした。

- 1) 日口外誌. 56: Suppl.193, 2010.
- 2) 日口外誌. 56: Suppl.311, 2010.
- 3) Key Engineering Materials . 342: 713-716, 2007.
- 4) 防菌防微誌. 23(6): 349-354, 1995.
- 5) Japanese Journal of Endourology and ESWL. 21: 142, 2008.
- 6) 日本泌尿器科学会雑誌.101: 216, 2010.
- 7) Invest Ophthalmol Vis Sci. 50: 2679-85, 2009.

3. 研究の方法

この材料（以下LYDEXと表す）は、デキストラン（Dextrin：増粘剤/食物添加物）とポリリジン（抗菌剤/食物添加物）から構

成されている。in vivoでの安全試験は、予備実験にて既に終了しているため、本研究では、実際の臨床応用を目指して、生物検定で、硬化時間、柔軟性、自己分解時間を設定し、組織適合性を確認する。さらに、FGF-2の上皮形成を促進するサイトカインを混入して生体内での各組織の反応を検討した。

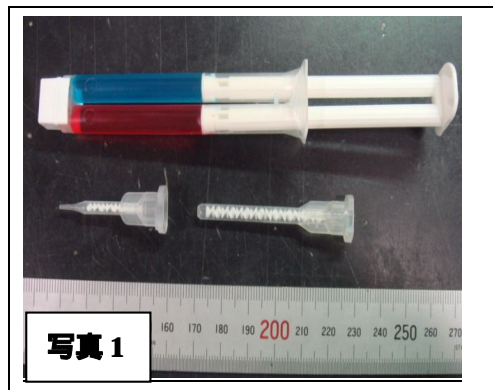
I. LYDEXの精製および硬化時間、柔軟性、自己分解時間の調整

1) aldehyded α-glucanのアルデヒド基(R-CHO)の導入量を変化させることで硬化時間を任意に設定できるため1)、口腔内操作での至適時間を60-120秒(R-CHOを0.2-0.25)に調整する。

2) γ-ポリリジン2)に添加する無水酢酸の濃度を1.0-3.0%の範囲で変えることで、自己分解速度は5時間から5週間に調節が可能であり1)、本研究では、先ず2週間に設定する予定である。これらの結果は、既に予備実験にてデータがあるため、本研究では、動物実験にて再度確認を行う。

II. 生物検定 実験1. LYDEXの口腔粘膜欠損への創保護材としての有用性の検討。処置群(各々：n=10)は、ウイスター系ラット10-11週齢300-330gを使用。ペントバルビタール(5mg/100g)を腹腔内に投与した後、舌下面粘膜にバイオブシーパンチにて直径5mm^{3,4)}の粘膜欠損を作成し、ポリグルコール酸メッシュ⁵⁾を同様の大きさに切って欠損部に置き、その上からLYDEXを1mlのシリンジに各々A液(デキストラン)とB液(ポリリジン)を混和・充填して創面を固定する[写真1]。手術直後、3日、1週、2週、3週、6週の各グループの組織を取り出して、4%パラフォルムアルデヒドにて48時間固定を行い、パラフィン包埋後5μmの切片にしてHE染色後、組織学的評価をする。また、粘膜および粘

膜下組織の修復過程の確認のために、インテグリン 3 染色、フィブロネクチン染色、ラミニン染色など⁶⁾の特殊染色を行う予定である。



一方、対照群（各々：n=5）は、舌下粘膜に直径 5mm の粘膜欠損を形成するのみで放置する。そして同様の期間で摘出し、同様に標本作成後、組織学的評価を行い、処置群と比較検討する。

実験 2. LYDEX の線維芽細胞誘導因子 FGF-2 のドラッグデリバリーシステムとしての有用性と粘膜欠損修復過程の促進の検討（口腔粘膜保護剤として使用した場合、FGF-2 を使用することにより、皮膚におけるフィブラスト⁷⁻⁸⁾と同様の効果で修復能力を向上できることを確認する。）

処置群（各々：n=5）は、ウイスター系ラット 10-11 週齢 300-320 g、雄を使用する。実験 1 処置群と同様の方法で、LYDEX に FGF-2 を混合（100 μ g/ml LYDEX）させて使用する）ただし、FGF-2 は、これまでの申請者らの研究で、2-3 日以内に組織の未分化細胞へ情報伝達が行われることが解っているため、LYDEX の自己分解開始を 3 日に調整して約 7 日で分解するものを使用する。対照群は、実験 1 処置群および対照群のデータを使用する。

実験 3. LYDEX の骨形成因子 BMP-2 のドラッグデリバリーシステムとしての有用性と抜歯窩の骨修復過程の促進の検討（抜歯

窩の止血と創保護剤として使用した場合、BMP-2 を使用することにより、顎骨における BMP-2¹¹⁾と同様の効果で骨修復能力を向上できることを確認する。）

処置群（各々：n=5）：ウイスター系ラット 9-11 週齢 300-320 g、雄を使用する。

実験 1 処置群と同様の方法で、LYDEX に BMP-2 を混合（100 μ g/ml LYDEX）させて使用する。^{9,10)}これも実験 2 と同様に BMP-2 は、2-3 日以内に組織の未分化細胞へ情報伝達が行われることが解っているため、LYDEX の自己分解開始を 3 日に調整して約 7 日で分解するものを使用する。対照群は、実験 1 処置群および対照群のデータを使用する。

実験 4. LYDEX の癒痕拘縮抑制作用の検討 研究期間に余裕があれば下記実験を行う予定である。皮膚や粘膜が欠損した場合、癒痕拘縮を起こして創部を縮小させながら、周囲組織から上皮細胞が増殖して閉創するため、癒痕形成による機能障害が観られる（拘縮率は最大約 80% に達すると推測される）。そのため、拘縮率を評価する必要がある。理想的には皮膚中間層移植時の拘縮率とほぼ同様が望ましいと考えられる。実験 1 において、それぞれの組織を摘出した後、組織固定の前に創部の面積を測り、収縮率を調べ、無処置群と比較検討する。さらに、現在臨床応用されているテルダーミスとの比較を行う。もし、口腔粘膜で拘縮の測定が不可能な場合、塩沢ら⁸⁾の方法を用いて、ラット背部皮膚を用いて検討する予定である。

参考文献

- 1) Key Engineering Materials Vols. 342: 713-716, 2007.
- 2) 防菌防微誌 23(6): 349-354, 1995.
- 3) 日薬理誌 128: 315-320, 2006.
- 4) J Oral & Maxillofac Surg 62:7 3-80, 2004.
- 5) Ann Thorac Surg. 84(6): 1858-61, 2007

- 6) 日形会誌 30: 277-288, 2010.
- 7) 褥創会誌 11(2): 92-100, 2009.
- 8) 熱傷 35(2): 71-79, 2009.
- 9) Skin Surgery. 18(3): 2009.
- 10) トラフェルミン製剤説明書, 科研製薬, 2009.
- 11) Int J Oral Maxillofac Surg. 36(10): 934-7, 2007.

4. 研究成果

LYDEX の aldehyded α -glucan のアルデヒド基 (R-CHO) の導入量を調節し、最終的に硬化時間を約 2 分とした (R-CHO を 0.25 に調整設定した)。硬化時間は、 α -ポリリジンに無水酢酸を加えて、約 2 週間に設定した。処置群 (n=8) では、直径 5mm の粘膜欠損は、周囲粘膜から中心に向かって進展していくパターンがみられた。約 2 週間後時点で、上皮形成面積は平均 12.56mm²、癒痕拘縮率は約 36% であった。一方、無処置群 (n=7) は、上皮形成面積は平均 7.46 mm²、癒痕拘縮率は約 62% であった。LYDEX は、粘膜欠損の修復では、無処置群に比べて粘膜増生が速く、修復が早期に終了するため、癒痕拘縮率が低くなることが示唆された。この実験方法で、LYDEX に FGF-2 を添加すると (n=4)、処置後 2 週間で、平均 15.11mm²、癒痕拘縮率は 23% であった。FGF-2 は口腔粘膜修復を加速させる結果、癒痕拘縮が有る程度抑制されることが分った。このことは、LYDEX がドラッグデリバリーシステムとしての担体になれることが示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤村 和磨 (FUJIMURA KAZUMA)

京都大学・医学研究科・非常勤講師

研究者番号：30252399

(2) 研究分担者

園部 純也 (SONOBE JUNYA)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：50464219

(3) 研究分担者

別所 和久 (BESSHO KAZUHISA)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90229138