

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：82108

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25289254

研究課題名(和文) 湿潤環境で生体組織に接着する医療用フィルムの創製

研究課題名(英文) Development of biomedical films adhering onto tissues under wet condition

研究代表者

田口 哲志 (Taguchi, Tetsushi)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・MANA研究者

研究者番号：70354264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：ブタ皮膚由来アルカリ処理ゼラチン(AIGln)を用いてヘキサノイル化AIGln(HxAIGln)を合成し、多孔フィルムを調製した。ポロゲンと溶媒の固液比を制御することにより、1-63%の気孔率を有する多孔フィルムが得られた。多孔フィルムの大腸組織表面に対する接着強度は、同一の気孔率においてHx基を導入したものがしていないものよりも約3倍高かった。ラット皮下に多孔膜埋入後の組織切片を血管新生マーカーの発現量を評価した結果、Hx基が効果的に血管新生因子を吸着・徐放促進することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The bonding behavior of hexanoyl (Hx: C6) group-modified alkaline-treated gelatin (HxAIGln) porous films ((P)HxAIGln) on the porcine intestine was evaluated. (P)HxAIGltns with various porosities were prepared by the salt-leaching method for various solid-liquid ratios. (P)HxAIGltns bonded more strongly to porcine intestine surfaces than did porous AIGln films ((P)AIGltns). L929 cells cultured on (P)HxAIGltns showed adhesivity than cells cultured on (P)AIGltns. Faster tissue infiltration and a shorter degradation time of highly porous (P)HxAIGltns were observed after implantation in rat subcutaneous tissues. The angiogenic markers CD34 and α -SMA were highly expressed around (P)HxAIGltns that had high porosity. These results indicated that highly porous (P)HxAIGltns have advantages with respect to not only bonding strength on wet soft tissues, but also angiogenesis.

研究分野：生体材料

キーワード：接着剤

1. 研究開始当初の背景

外科手術における創傷部の閉鎖には一般に縫合糸が用いられるが、手術時間の短縮と患者負担を軽減させることを目的として、数種類の外科用接着剤が臨床で用いられている。外科用接着剤は、シアノアクリレート系、生体高分子 アルデヒド系およびフィブリン系に大別されるが、強度と生体親和性に一長一短があり、両者を併せ持つものが望まれている。外科用接着剤は、対象となる被着体が水分を含む生体組織であるため、血液やリンパ液等の生じる湿潤環境で生体組織を如何に接着させるかが課題となる。これまで、アルデヒド基導入ポリエチレングリコールナノ粒子を用いた接着剤、カテコール基導入架橋剤を用いた接着剤、光反応性官能基を導入した接着剤の研究が行われているが、湿潤生体組織において十分な接着性を示す生体材料の分子設計は行われていない。

我々は、これまでに生体高分子とクエン酸等の有機酸から合成した架橋剤の二成分から構成される外科用接着剤の研究を進め、強度と生体親和性が両立できることを明らかにしてきた。また、ポリエチレングリコールのような親水性高分子に脂溶性分子（疎水基）を導入した両親媒性高分子を培養液中（水環境下）において細胞に作用させると、疎水基が細胞の脂質二分子フィルムにアンカリングすることで細胞間を架橋して細胞凝集塊形成を促進し、細胞機能を著しく向上させることを見出した。さらに、このような研究を通じて疎水基を導入した生体高分子（ゼラチン）と有機酸架橋剤からなる液状の外科用接着剤を考案し、接着剤の成分として、疎水基導入ゼラチンを用いることにより、湿潤生体組織に対して高い界面接着強度と生体親和性を併せ持つことが可能であることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究では、湿潤環境において生体組織に接着性を示す医療用フィルムの創出を行った。生体組織への浸透と架橋反応を可能にするため、脂溶性分子で修飾した疎水化ゼラチンと有機酸架橋剤を合成し、材料物性の基礎的な検討を行った後に、湿潤生体組織に対する接着性、体内分解性及び生体親和性評価を行った。

3. 研究の方法

アルカリ処理ゼラチン (AlGItn) あるいは疎水基として Hx 基を導入した HxAlGItn を、10%乳酸(LA)-dimethylsulfoxide (DMSO) 混合溶媒に溶解した後、Trisuccinimidyl citrate (TSC) 架橋剤を TSC のスクシンイミド基と(Hx)AlGItnのアミノ基の比が1:1となるよう混合した。さらに NaCl (粒径 250 ~ 500

μm) を(Hx)AlGItn-TSC 溶液に 0, 1, 2, 3, 4, 5 の固液比(w/w)で混合して、1 mm 厚のスペーサーとともにガラス板に挟んで一晩静置し、厚さ 1 mm の NaCl 含有(Hx)AlGItn ゲルを得た。得られた NaCl 含有ゲルを大過剰量の超純水に 3 日間浸漬して、NaCl、DMSO および反応副生成物である N-ヒドロキシスクシンイミドを除去し、(Hx)AlGItn から成る含水多孔質ゲルフィルムを得た。この含水多孔質ゲルフィルムを -80 °C で凍結した後に減圧乾燥し、種々の気孔率を有する多孔フィルム ((P)AlGItn または (P)HxAlGItn) を得た。

得られた (P)AlGItn および (P)HxAlGItn を用いて、固液比と気孔率、機械強度、水濡れ性を評価した。また、L929 細胞を各気孔率の (P)AlGItn と (P)HxAlGItn 上に無血清条件下で 2, 4, 8, 24 時間培養し、細胞数および細胞形状について走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した。さらに、多孔フィルムの疎水基・気孔率がブタ湿潤大腸組織への接着性、組織浸潤性、組織親和性及び分解性に与える影響を検討した。

4. 研究成果

Hx chloride と AlGItn 中のアミノ基との反応 (図 1A) により、AlGItn の全アミノ基に対して、Hx 基が 27% 導入された HxAlGItn が得られたことを、2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid 法により確認した。NaCl と (Hx)AlGItn-LA/DMSO 溶液の固液比を 0/1 から 5/1 まで変化させ、大過剰の水で NaCl を溶解させることにより、種々の気孔率を有する含水多孔質ゲルフィルムを得た。得られた含水多孔質ゲルフィルムはスポンジ状のフィルムであり、圧縮すると内部に含有する水を絞り出すことが可能であった。凍結乾燥後の多孔フィルムを電子顕微鏡により観察すると、NaCl 量が少ない場合には連通孔が少なかったが、NaCl の固液比を増加させることで連通孔が増加した (図 1B)。

多孔フィルム内における含水量の測定より、フィルム中に占める連通孔の量は NaCl 固液比の制御により、最大で 65% まで増加させることができることが明らかとなった (図 1C)。

(P)AlGItn と (P)HxAlGItn の両多孔質フィルムにおいて、気孔率が高いほど機械強度は低くなったが、一方で吸水率は高くなった。フィルム強度の低下はフィルム内壁のゼラチンゲルフラクション量の減少によるものであると考えられる。また、高い気孔率による毛細管現象の促進により空隙内部へ吸水が増加したものと考えられる。

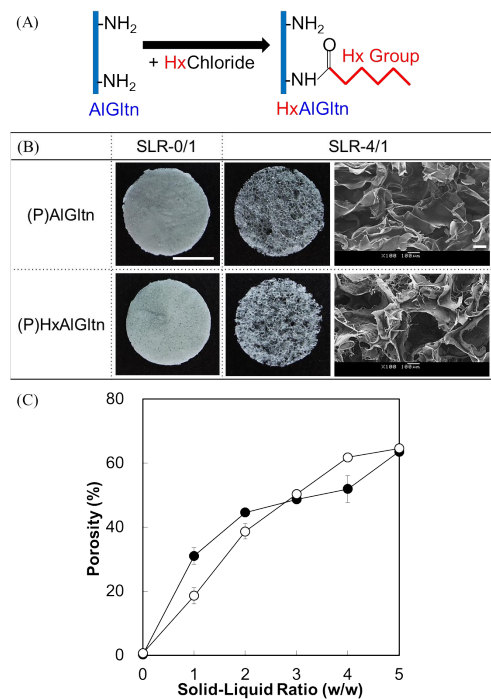


Fig. 1. (A) HxAlGln synthesis after reaction between AlGln and Hx chloride. (B) Macro (a, b, d, e) and microscopic (c, f) images of tissue adhesive porous body fabricated without (a, d) and with (b, c, e, f) NaCl using AlGln (a, b, c) or HxAlGln (d, e, f). (C) Porosity of AlGln or HxAlGln film with various amount of NaCl (●AlGln films, ○HxAlGln films, n=3).

生体組織としてブタの新鮮な大腸組織を用い、得られた多孔フィルムの接着性を評価した。湿潤大腸組織表面に対する多孔フィルムの接着強度は、各気孔率において (P)HxAlGln が (P)AlGln の約 2.5 倍高く、中でも空孔率が 62%の (P)HxAlGln が最も高い値を示した。これは、Hx 基が組織中の疎水性部位と浸透しやすいことと、高气孔率により吸水性が高いことに起因すると考えられる (図 2A)。さらに、多孔フィルムとブタ大腸の剥離界面を観察した結果、(P)AlGln 上には残存組織が観察されないのに対し、(P)HxAlGln においては、厚い残存組織が観察された (図 2B)。このことから、Hx 導入により効果的に界面強度を増加させることができることが明らかとなった。

一方、L929 細胞の増殖性は、(P)HxAlGln 上で培養した場合、(P)AlGln と比較して約 3~5 倍高く、特に気孔率 62%の (P)HxAlGln 上で培養した場合において最も高い値を示した。これは、Hx 基により細胞の親和性が高くなったことに加え、多孔性により液性因子等の通過性が向上したためであると考えられる。また、培養後のそれぞれの多孔質表面における L929 細胞の形状を SEM により観察した結果、(P)HxAlGln 表面に存在する L929 細胞の多くは、(P)AlGln 表面の細胞と比較して伸展している様子が観察され、HxAlGln と L929 細胞表面とで相互作用が起きている可能性が示唆された (図 3)。

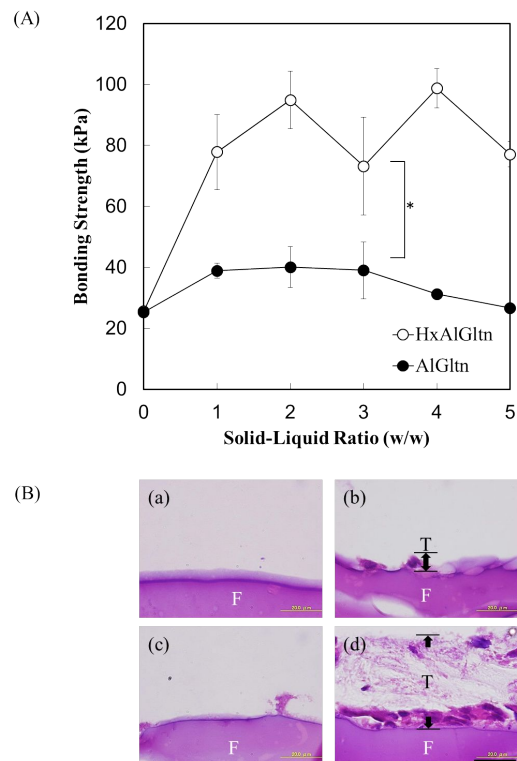


Fig. 2. (A) Bonding strength between porous membrane and porcine intestine (●AlGln, ○HxAlGln, n=3, *p<0.05). (B) Hematoxylin and eosin (H&E) stained cross sections of the interfaces between porcine intestines and (a, b) (P)AlGln or (c, d) (P)HxAlGln membranes after peeling strength measurement. Each solid-liquid ratio of the film is 0/1 (a, c), 4/1 (b, d). F: Film, T: tissue, arrows: the limb of attached tissue.

さらに、ラット皮下に (P)AlGln および (P)HxAlGln を埋入し、経時的に組織反応および吸収性を評価した結果、(P)AlGln と比較して、(P)HxAlGln 内部に早い組織浸潤が認められ、早く、特に固液比 4/1 で調製した気孔率 62%の高い (P)HxAlGln については 4 週以内に生分解された。また、多孔フィルム埋入後の組織切片を CD34 および α -SMA の免疫染色後 Image J による発現量の定量を行った結果、Hx の導入が効果的に血管新生を促進することが認められた。そこで、SPR 法により AlGln および HxAlGln と FN、bFGF、VEGF との結合定数を比較した。その結果、Hx 基導入により、FN、bFGF、VEGF に対する結合定数はそれぞれ約 3.5 倍、2 倍、10 倍となった。この結果から、HxAlGln 多孔フィルム埋入による血管新生の促進は、HxAlGln による VEGF の捕捉とそれらの分解に起因していると考えられる。

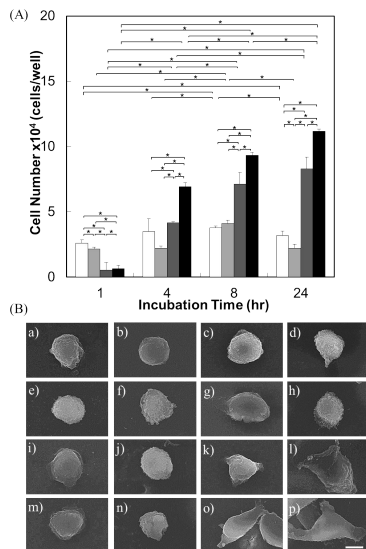


Fig. 3. (A) 1, 4, 8 and 24hr-cultured L929 cell viability on the porous films fabricated with various solid-liquid ratio. White column: (P)AIGln-SLR0/1, light gray column: (P)AIGln-SLR4/1, dark gray column: (P)HxAIGln-SLR0/1, black column: (P)HxAIGln-SLR4/1. n=3, * p < 0.05. (B) L929 cell morphology of 1hr (a, b, c, d), 4hrs (e, f, g, h), 8hrs (i, j, k, l) or 24hrs (m, n, o, p) culturing on (P)AIGln-SLR0/1 (a, e, i, m), (P)AIGln-SLR4/1 (b, f, j, n), (P)HxAIGln-SLR0/1 (c, g, k, o) or (P)HxAIGln-SLR4/1 (d, h, l, p) surfaces. scale bar is 5 mm.

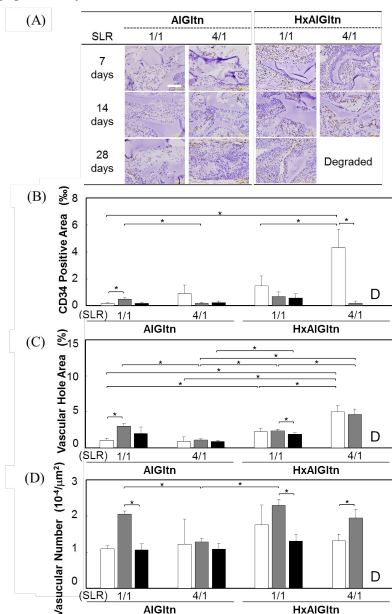


Fig. 4. (A) Microscopic image of CD34-stained tissues and (P)AIGlns or (P)HxAIGlns fabricated with various solid-liquid ratios after implantation under rat subcutaneous for 7, 14 and 28 days. (B) Evaluation of angiogenesis by (a) number CD34 abundant area, (b) CD34-encircled vascular area and (c) CD34-encircled vascular. White column: 7 days, gray column: 14 days, black column: 28 days. D: completely degraded. n=3, * p < 0.05.

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計13件)

1. Taguchi, T.; Mizuta, R.; Ito, T.; Yoshizawa, K.; Kajiyama, M., Robust sealing of blood vessels with cholesteryl group-modified, Alaska pollock-derived gelatin-based biodegradable sealant under wet conditions. *J Biomed Nanotechnol* 2016, 12, 128-134. (査読有)
2. Yoshizawa, K.; Ryo, M.; Taguchi, T., Enhanced angiogenesis of growth factor-free porous biodegradable adhesive made with hexanoyl group-modified gelatin. *Biomaterials* 2015, 63, 14-23. (査読有)
3. Ito, T.; Sasaki, M.; Taguchi, T., Enhanced ALP activity of MG63 cells cultured on hydroxyapatite-poly(ethylene glycol) hydrogel composites prepared using EDTA-OH. *Biomed Mater* 2015, 10, 015025. (査読有)
4. Ushiyama, A.; Ono, M.; Kataoka-Hamai, C.; Taguchi, T.; Kaizuka, Y., Induction of intermembrane adhesion by incorporation of synthetic adhesive molecules into cell membranes. *Langmuir*, 2015, 31, 1988-1998. (査読有)
5. Taguchi, T.; Endo, Y., Crosslinking liposomes/cells using cholesteryl group-modified tilapia gelatin. *Int J Mol Sci* 2014, 15, 13123-34. (査読有)
6. Yoshizawa, K.; Taguchi, T., Bonding behavior of hydrophobically modified gelatin films on the intestinal surface. *J Bioact Compat Polym* 2014, 29, 560-571. (査読有)
7. Yoshizawa, K.; Taguchi, T., Enhanced Bonding Strength of Hydrophobically Modified Gelatin Films on Wet Blood Vessels. *Int J Mol Sci* 2014, 15, 2142-2156. (査読有)
8. Taguchi, T.; Okada, M.; Kogai, Y.; Masuda, M.; Shimomura, Y.; Inoue, M.; Ito, T.; Hamahata, T.; Funatogawa, K.; Kirikae, T.; Furuzono, T., Prevention of catheter infection using a biodegradable tissue adhesive composed of human serum albumin and disuccinimidyl tartrate. *J Bioact Compat Polym* 2014, 29, 284-297. (査読有)
9. Taguchi, T.; Endo, Y., Crosslinking liposomes/cells using cholesteryl group-modified tilapia gelatin. *Int J Mol Sci* 2014, 15, 13123-34. (査読有)
10. Inoue, M.; Sasaki, M.; Katada, Y.; Taguchi, T., Effects of ultraviolet irradiation on bonding strength between Co-Cr alloy and citric acid-crosslinked gelatin matrix. *J Biomater Appl* 2014, 28, 880-6. (査読有)
11. Inoue, M.; Sasaki, M.; Katada, Y.; Taguchi, T., Quantitative biocompatibility evaluation

of nickel-free high-nitrogen stainless steel in vitro/in vivo. J Biomed Mater Res Part B, Appl Biomater 2014, 102B, 68-72. (査読有)

12. Hikiji, H.; Tomizuka, K.; Taguchi, T.; Koyama, H.; Chikazu, D.; Mori, Y.; Takato, T., An in vivo murine model for screening cranial bone regenerative materials: testing of a novel synthetic collagen gel. J Mater Sci Mater Med 2014, 25, 1531-1538. (査読有)
13. Inoue, M.; Sasaki, M.; Katada, Y.; Fujiu, K.; Manabe, I.; Nagai, R.; Taguchi, T., Poly-(L-lactic acid) and citric acid-crosslinked gelatin composite matrices as a drug-eluting stent coating material with endothelialization, antithrombogenic, and drug release properties. J Biomed Mater Res A 2013, 101A, 2049-2057. (査読有)

[学会発表] (計 18 件)

田口哲志、吉澤恵子、水田亮、血管新生能を有する細胞増殖因子フリー組織接着能多孔膜の創製、東京、第 53 回日本人工臓器学会、2015/11/19 - 2015/11/21

水田亮、伊藤典明、吉澤恵子、田口哲志、耐圧強度と生体親和性に優れた疎水化タラゼラチンシーラントの設計と機能、京都、第 37 回日本バイオマテリアル学会大会、2015/11/09 - 2015/11/10

水田亮、伊藤典明、吉澤恵子、田口哲志、優れた生体組織界面強度を示す疎水化ゼラチン接着剤の創製、東京、第 5 回 CSJ 化学フェスタ 2015、2015/10/13 - 2015/10/15

水田亮、伊藤典明、吉澤恵子、田口哲志、湿潤環境で血管組織接着性を示す生体親和性シーラントの創製、仙台、第 64 回高分子討論会、2015/09/15 - 2015/09/17

吉澤恵子、水田亮、田口哲志、血管新生能と組織接着能を有する成長因子フリー吸収性多孔膜の創製、つくば、つくば医工連携フォーラム 2015、2015/01/23 - 2015/01/23

K. Yoshizawa, R. Mizuta, T. Taguchi, Growth factor-free, porous tissue adhesive films with angiogenic activity, Tsukuba, International Polymer Conference 2014, 2014/12/02 - 2014/12/05

吉澤恵子、水田亮、田口哲志、血管新生能と組織接着能を併せ持つ疎水化ゼラチン多孔質フィルム of 創製、第 37 回日本バイオマテリアル学会大会、東京、2014/11/17 - 2014/11/18

水田亮、伊藤典明、吉澤恵子、梶山幹夫、秋山利正、神谷勝弘、田口哲志、湿潤血管組織に接着する生体親和性シーラントの設計と機能、東京、第 37 回日本バ

イオマテリアル学会大会、2014/11/17 - 2014/11/18

田口哲志、伊藤典明、水田亮、吉澤恵子、秋山利正、神谷勝弘、梶山幹夫、湿潤血管接着性を有する外科用シーラントの開発、札幌、第 52 回日本人工臓器学会大会、2014/10/17 - 2014/10/19

T. Taguchi et al., HYDROPHOBICALLY MODIFIED GELATIN BASED ADHESIVES WITH HIGH BONDING STRENGTH AND BIOCOMPATIBILITY, Roma, 41st Annual ESAO congress, 2014/09/17 - 2014/09/20

K. Yoshizawa, T. Ito, R. Mizuta, T. Taguchi, Stimulation of angiogenesis by growth factor-free porous adhesive films made by hexanoyl group modified gelatin, Liverpool, European Society of Biomaterials 2014, 2014/08/31 - 2014/09/03

吉澤恵子、田口哲志、湿潤組織接着性を有する疎水化ゼラチン多孔膜の開発、名古屋、高分子学会年次大会、2014/05/28 - 2014/05/30

吉澤恵子、田口哲志、組織接着性を有する疎水化ゼラチン多孔膜の開発、つくば、つくば医工連携フォーラム 2014、2014/01/28 - 2014/01/28

吉澤恵子、田口哲志、疎水基導入ゼラチンフィルムの湿潤組織に対する接着効果、東京、第 35 回日本バイオマテリアル学会大会、2013/11/25 - 2013/11/26

田口哲志、吉澤恵子、湿潤組織接着性を有する架橋剤フリー分解性フィルムの創製、横浜、第 51 回日本人工臓器学会大会、2013/09/27 - 2013/09/29

T. Taguchi et al., Effect of Hydrophobic Groups on Bonding Strength of Soft Tissue Adhesives, Hong Kong, The 4th Asian Biomaterials Congress, 2013/06/26 - 2013/06/29

吉澤恵子、田口哲志、湿潤生体組織に接着するゼラチンフィルムの疎水基導入効果、東京、日本接着学会年次大会、2013/06/20 - 2013/06/21

吉澤恵子、田口哲志、湿潤組織に接着する架橋剤フリー疎水化ゼラチンフィルムの創製、京都、高分子学会年次大会、2013/05/29 - 2013/05/31

[図書]

なし

[産業財産権]

出願状況

なし

取得状況

なし

[その他]

ホームページ等

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田口 哲志 (TAGUCHI, Tetsushi)
国立研究開発法人物質・材料研究機構 国
際ナノアーキテクトゥクス研究拠点・MANA
研究者
研究者番号：70354264