

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462844

研究課題名(和文) ナノシートとマイクロスキンを用いた重症熱傷救命のための治療開発研究

研究課題名(英文) A novel therapeutic approach to severe burns by microskin grafts combined with ultra-thin nanosheets

研究代表者

齋藤 大蔵 (SAITOH, Diazoh)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・防衛医学研究センター・教授)

研究者番号：90531632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：採取面積の10倍以上に拡げられるマイクロスキン技術と組織密着性の高いナノシートを用いた熱傷治療について、マウス熱傷モデルを用いて検討した。マイクロスキングラフティングは創閉鎖を促進させるのみならず、線維芽細胞の増殖が観察され、真皮層の良好な構築が得られた。この作用機序について検討したところ、マイクロスキングラフティングによって、線維芽細胞の増殖に關与する血小板由来増殖因子の発現が増強していた。さらに、早期から創部の血管総面積、枝別れ本数も増大し、血管網の成長促進効果を示した。したがって、マイクロスキングラフティングとナノシートは、重症熱傷における有効な治療法として期待される。

研究成果の概要(英文)：Microskin grafting can be expanded more than 10-fold by mincing the skin grafts, and is an effective method for the treatment of extensive burn injury. We recently fabricated biodegradable ultra-thin nanosheets, which have advantageous properties for their application as a wound dressing, such as transparency, tight adherence, and moisture permeability. This study aimed to investigate the efficacy of a microskin grafts (MSG) combined with nanosheets (NS) in the wound healing using burn wound models in mice. Treatment of the burn wounds with MSG/NS significantly accelerated the wound healing compared with non-treatment, characterized by an increased rate of re-epithelialization and remodeling. In addition, MSG/NS also enhanced platelet-derived growth factor expression and vascular networks of the wound bed in the early stages of repair. In conclusion, microskin grafting and nanosheets might be a possible new and effective procedure for repairing extensive burn wounds.

研究分野：救急医学

キーワード：熱傷 マイクロスキン ナノシート 感染制御

1. 研究開始当初の背景

1960年代から米国を中心に、熱傷急性期の輸液療法の進歩、局所療法剤の開発、同種皮膚移植や早期手術の普及によって、重症熱傷の救命率は飛躍的に向上したが、1990年以降は患者予後の顕著な改善はなく、この領域における医学・医療の進歩は停滞していると言わざるを得ない。重症熱傷患者の主な死因は重症感染症による多臓器不全であり、重症感染症は熱傷創部の局所感染から生じるため、創部局所の感染制御は重症熱傷の治療戦略として最重要といえる。近年、ハイドロファイバー技術の革新により、滲出液を吸収する被覆材が開発されたが、製品が不透明なために創部の状況が外から観察できず、ガーゼ交換等で被覆材を創部から剥がす際に脆弱な新生上皮を物理的に除去する危険がある。また、感染巣を被うことによる創部感染助長の問題点を克服できていない。また、広範囲重症熱傷では創部の被覆に要する代用皮膚が大量に必要なため、患者自身に残存する正常皮膚組織が少ないことから、非感染期である受傷早期に十分な領域を被覆する植皮を行うことは困難である。近年、人工真皮や培養上皮の製品化と臨床応用も進んでいるが、感染に対する脆弱性から重症熱傷患者の救命には寄与できていない。したがって、広範囲の熱傷部位を被覆しかつ感染に強く、安定的に供給可能な新しい皮膚移植技術を開発することは、熱傷治療領域において極めて重要な課題といえる。

2. 研究の目的

マイクロスキンは上皮と真皮成分を有する皮膚を細断した組織であり、毛包等に存在する幹細胞等を含むため皮膚再生能力を有し、広範囲に拡張し得る潜在力を有する。さらに、マイクロスキンから分泌される成長因子や生理活性物質が血管新生を促進させることから、細菌感染にも強い移植法となり得る可能性がある。また、これまで我々が開発してきた創部被覆材ナノシートは、細胞膜ほどの薄さであるにもかかわらず、細菌侵入防御性と滲出液透過性等を併せ持ち、創部の感染を制御して創傷治癒に有用であることを示してきた。

本研究は広範囲熱傷救命の最重要項目である皮膚全層熱傷の植皮に関して、画期的な被覆材ナノシートとマイクロスキン技術を併用した治療が創部の感染を制御し、有用な治療法となり得るか検証し、重症熱傷患者の救命率向上に向けた革新的な治療技術を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス熱傷モデルを用いたマイクロスキンとナノシートの併用療法

血管新生促進効果の検討

C57BL/6 マウス背部に直径 15mm の II 度熱傷創を作製した後、別個体の背部から採取した

正常皮膚を用いて調製した同種マイクロスキンを創部面積の十分の一量塗布し、ナノシートで保持・固定するモデルを作製した。術後 3 日目に創部を採取し、組織学的・生化学的解析を行った。また、創部の皮下血管密度を評価した。

創傷治癒効果の検証

C57BL/6 マウス背部に直径 15mm の III 度熱傷創を作製した後、創部壊死組織を筋膜上まで切除した。作製した全層皮膚欠損創にマイクロスキンを創部面積の十分の一量塗布し、ナノシートで保持・固定した。術後 7 日目に移植床を含めた全層を採取し、組織学的・生化学的解析を行った。

(2) 熱傷感染創に対する機能性ナノシートを用いた治療効果

ナノシート自体に抗菌能はなく、完全には菌の透過を阻止できないため、耐性菌の出現がなく感染制御に有効とされる銀の抗菌効果に着目し、スルファジアジン銀を担持させたナノシートを作製し、以下の検討を行った。

銀ナノシートの性能評価 (*in vitro* 実験) 経時的な銀イオンの徐放能を測定した。また、熱傷創感染の代表的な起炎菌であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) を播種した BHI 寒天培地に銀ナノシートを貼付し阻止縁を計測することで抗菌能を評価した。

熱傷感染創における治療効果の検討

マウス背部に I 度熱傷創を作製し、1 日後に MRSA を播種し創感染モデルとした。創部を銀ナノシートで被覆し、感染 6 日後に創部を採取し感染の制御性について評価した。

4. 研究成果

(1) マウス熱傷モデルを用いたマイクロスキンとナノシートの併用療法

非常に薄く、且つ組織密着性の高いナノシートで創部に塗布したマイクロスキンを被覆することによって、移植片を創部に密着固定させることができ、創の観察も容易であった (図 1)。



図1. 全層皮膚欠損創に対するマイクロスキンとナノシートの併用療法

II 度熱傷創にマイクロスキンとナノシートの併用療法を施したところ、術後 3 日目には血管内皮細胞増殖因子 VEGF を発現した細胞

が多数確認された。また、創部の皮下血管網について解析したところ、併用療法により微小血管の面積と血管の総全長が有意に増大し、早期から皮下血管網の再構築がなされ、ナノシートとマイクロスキンを用いた治療法が創部の血管新生を促進させる可能性が

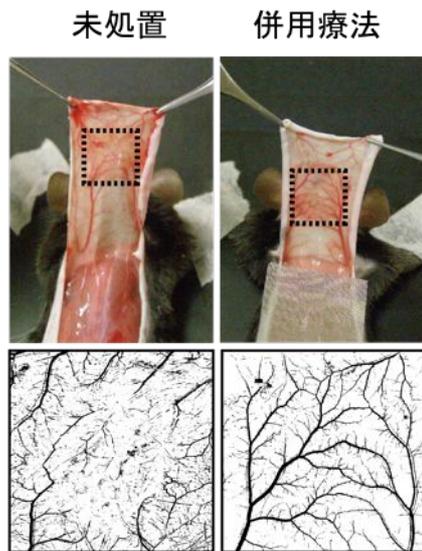


図2. II度熱傷創の皮下血管網

示された(図2)。

さらに、III度熱傷創の壊死組織を除去した後、欠損創に対しマイクロスキンとナノシートによる併用療法を行ったところ、創閉鎖を促進させるのみならず、線維芽細胞の成長・増殖が観察され、真皮層の良好な再構築が示された(図3)。

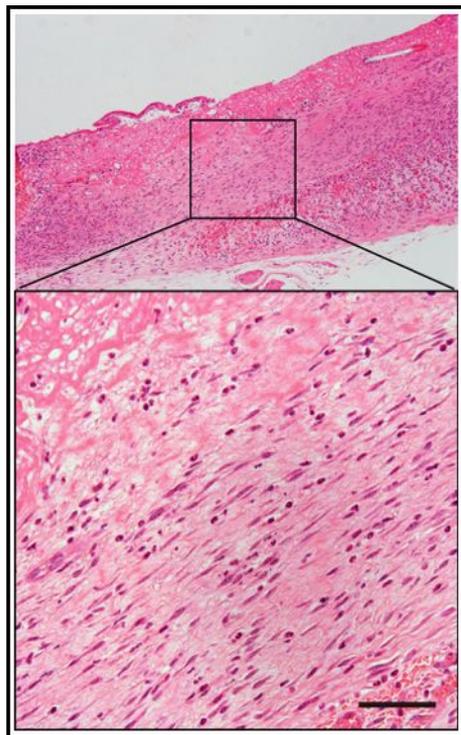


図3. 併用療法7日後の創部HE染色像 (Bar=50μm)

併用療法によって良好な治癒が得られた機序を明らかにするため、線維芽細胞の増殖に関与する生理活性物質の発現量を検討したところ、血小板由来成長因子 PDGF の発現量が増強していることが明らかとなり(図4)、被覆材として密着性の高いナノシートを用いることによって、マイクロスキンから分泌される生理活性物質が移植床に対し効果的に作用する可能性が示唆された。

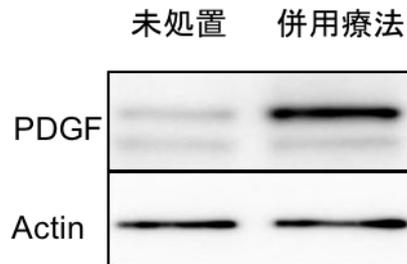


図4. 移植床における血小板由来成長因子のタンパク発現

以上のことから、マイクロスキンをナノシートで被覆する新たな治療法は、創部の観察が容易であるばかりでなく、マイクロスキンの皮膚再生能力が最大限に活かされ、早期から良好な治癒効果を示し、広範囲重症熱傷に対する極めて有用な治療として期待できる。

(2)熱傷感染創に対する機能性ナノシートを用いた治療効果

*invitro*実験により、銀ナノシートは膜厚に依存して銀イオンの放出速度を制御し得ることが明らかとなった。また、MRSA に対し持続性のある抗菌効果を発揮し、作製した銀ナノシートが機能性を有していることが示された。マウス熱傷感染創を銀ナノシートで被覆したところ、速やかに抗菌作用を発揮することで感染創の菌数を劇的に減少し創部の炎症を軽減することが示された(図5)。

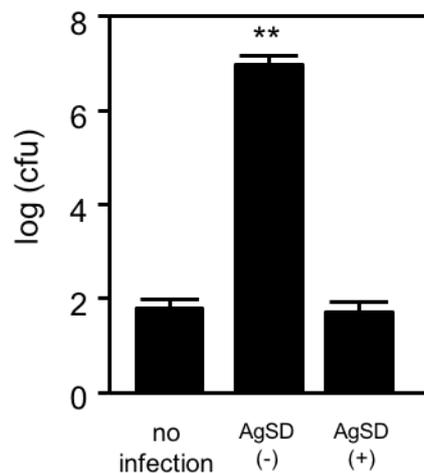


図5. MRSA感染創の細菌数.

AgSD: 銀ナノシート. mean ± SE. (n=5 per each) ** p<0.01

ナノ厚という特徴を活かし、創傷被覆材に求められる種々の特性・機能を持たせた機能性ナノシートは、熱傷の局所療法において画期的な創傷被覆材として期待される。今後さらなる改良を加え、ナノシートの日も早い臨床応用が望まれる。

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11件)

Okamura Y, Kabata K, Kinoshita M, Miyazaki H, Saito A, Fujie T, Ohtsubo S, Saitoh D, Takeoka S. Fragmentation of Poly(lactic acid) Nanosheets and Patchwork Treatment for Burn Wounds. *Adv Mater.* 25:545-551, 2013. DOI: 10.1002/adma.201202851. 査読有.

Otani N, Kinoshita M, Fujie T, Saito A, Takeoka S, Saitoh D, Hagsawa K, Nawashiro H, Shima K. Novel therapeutic use of polysaccharide nanosheets for arachnoid plasty and enhancement of venous tensile strength in rat micro-neurosurgery. *J Clin Neurosci.* 20:301-305, 2013. DOI: 10.1016/j.jocn.2012.05.028. 査読有.

Aoki S, Kinoshita M, Miyazaki H, Saitoh D, Iwaya K, Takeoka S, Fujie T, Saitoh A. Application of poly-L-lactic acid nanosheet as a material for wound dressing. *Plast. Reconstr Surg.* 131:236-240, 2013. DOI: 10.1097/PRS.0b013e3182789c79. 査読有.

Tsunoi Y, Sato S, Kawauchi S, Ashida H, Saitoh D, Terakawa M. *In vivo* Photoacoustic molecular imaging of the distribution of serum albumin in rat burned skin. *Burns.* 39:1403-1408, 2013. DOI: 10.1016/j.burns.2013.03.007. 査読有.

Ida T, Kawaguchi Y, Kawauchi S, Iwaya K, Tsuda H, Saitoh D, Sato S, Iwaie T. Real-time photoacoustic imaging system for burn diagnosis. *J Biomedical Optics.* 19:086013, 2014. DOI: 10.1117/1.JBO.19.8.086013. 査読有.

宮崎裕美, 木下学, 齋藤大蔵. 超薄膜ナノシートを応用した熱傷基礎研究. 防衛医科大学校雑誌 40:1-9, 2015. 査読有.

Ito K, Saito A, Fujie T, Nishiwaki K, Miyazaki H, Kinoshita M, Saitoh D, Ohtsubo S, Takeoka S. Sustainable

antimicrobial effect of silver sulfadiazine-loaded nanosheets on infection in a mouse model of partial thickness burn injury. *Acta Biomater.* 24:87-95, 2015. DOI: 10.1016/j.actbio.2015.05.035. 査読有.

Ito K, Saito A, Fujie T, Miyazaki H, Kinoshita M, Saitoh D, Ohtsubo S, Takeoka S. Development of a ubiquitously transferrable silver-nanoparticle-loaded polymer nanosheet as an antimicrobial coating. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.*, 104:585-593, 2016. DOI: 10.1002/jbm.b.33429. 査読有.

Miyazaki H, Kinoshita M, Ono S, Seki S, Saitoh D. Burn-evoked reactive oxygen species immediately after injury are crucial to restore the neutrophil function against postburn infection in mice. *Shock* 44:252-257, 2015. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000404. 査読有.

Hinoki A, Saito A, Kinoshita M, Yamamoto J, Saitoh D, Takeoka S. Polylactic acid nanosheets in prevention of postoperative intestinal adhesion and their effects on bacterial propagation in an experimental model. *Br J Surg.* 103:692-700, 2016. DOI: 10.1002/bjs.10122. 査読有.

Ida T, Iwazaki H, Kawaguchi Y, Kawauchi S, Ohkura T, Iwaya K, Tsuda H, Saitoh D, Sato S, Iwai T. Burn depth assessments by photoacoustic imaging and laser Doppler imaging. *Wound Repair Regen.* 24:349-355, 2016. DOI: 10.1111/wrr.12374. 査読有.

[学会発表](計13件)

Tsunoi Y, Sato S, Watanabe R, Kawauchi S, Saitoh D, Ashida H, Terakawa M. Acoustic-resolution photoacoustic microscopy of serum albumin in rat burned skin. European Conferences on Biomedical Optics Munich, Germany, 2013年5月.

伊田泰一郎, 保坂智也, 川口康, 塚原直哉, 桜井孝夫, 増田伸, 岩屋啓一, 川内聡子, 齋藤大蔵, 佐藤俊一, 岩井俊昭. 光超音波イメージングによるリアルタイム熱傷深度診断. 第39回日本熱傷学会総会・学術集会, 沖縄, 2013年6月.

角井泰之, 佐藤俊一, 川内聡子, 芦田廣, 齋藤大蔵, 寺川光洋. 光音響イメージン

グ法によるラット熱傷皮膚組織中のアルブミン動態観測. 第 39 回日本熱傷学会総会・学術集会, 沖縄, 2013 年 6 月.

宮崎裕美, 安西一正, 小野聡, 木下学, 齋藤晃広, 武岡真司, 齋藤大蔵. 同種皮膚を用いた新規熱傷治療法 - マイクロスキンとナノシートの併用療法 -. 第 39 回日本熱傷学会・学術集会, 沖縄, 2013 年 6 月.

伊田泰一郎, 保坂智也, 川口康, 岩屋啓一, 川内聡子, 津田均, 齋藤大蔵, 佐藤俊一, 岩井俊昭. 光超音波イメージングによる熱傷深度診断. 第 12 回日本組織移植学会総会・学術集会, 埼玉, 2013 年 8 月.

伊田泰一郎, 保坂智也, 川口康, 川内聡子, 岩屋啓一, 津田均, 齋藤大蔵, 佐藤俊一, 岩井俊昭. 光超音波イメージングによる移植皮膚生着診断. 第 12 回日本組織移植学会総会・学術集会, 埼玉, 2013 年 8 月.

伊田泰一郎, 保坂智也, 川口康, 塚原直哉, 桜井孝夫, 増田伸, 川内聡子, 岩屋啓一, 津田均, 齋藤大蔵, 佐藤俊一, 岩井俊昭. 光超音波イメージングによる移植皮膚生着過程のモニタリング. 第 43 回日本創傷治療学会, 別府, 2013 年 11 月.

齋藤大蔵. (会長講演) 熱傷治療のブレイクスルーを目指して. 第 40 回日本熱傷学会総会・学術集会, 埼玉, 2014 年 6 月.

佐藤俊一, 伊田泰一郎, 川口康, 関根康雅, 川内聡子, 岩屋啓一, 津田均, 阪本敏久, 根本学, 齋藤大蔵. (シンポジウム) 光音響イメージング法による熱傷深度診断: トランスレーショナルリサーチ. 第 40 回日本熱傷学会総会・学術集会, 埼玉, 2014 年 6 月.

宮崎裕美, 木下学, 小野聡, 武岡真司, 齋藤大蔵. (ワークショップ) 超薄膜ナノシートを応用した熱傷治療. 第 40 回日本熱傷学会・学術集会, 埼玉, 2014 年 6 月.

Miyazaki H, Kinoshita M, Ono S, Takeoka S, Saitoh D. Application of a biodegradable nanosheet as a new dressing for burn wounds. The 17th Congress of International Society for Burn Injuries, Sydney, Australia, 2014 年 10 月.

宮崎裕美, 木下学, 藤枝俊宣, 武岡真司, 齋藤大蔵. 抗菌性を有した機能性ナノシートによる熱傷治療. 第 41 回日本熱傷学

会総会・学術集会, 名古屋, 2015 年 6 月.

宮崎裕美, 木下学, 川内聡子, 佐藤俊一, 齋藤大蔵. (シンポジウム) 培養皮膚とアログラフトを用いた重症熱傷ハイブリッド治療「マイクロスキン技術を応用した熱傷治療の有用性」. 第 42 回日本熱傷学会総会・学術集会, 浦安, 2016 年 6 月.

〔図書〕(計 1 件)

齋藤大蔵, 日本熱傷学会学術委員会. 熱傷診療ガイドライン改訂第 2 版. 重症度評価 p.11-15, 春恒社, 2015.

6. 研究組織

齋藤 大蔵 (SAITOH, Daizoh)
防衛医科大学校・防衛医学研究センター・教授
研究者番号: 90531632

(2) 研究分担者

武岡 真司 (TAKEOKA, Shinji)
早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号: 20222094

小野 聡 (ONO, Satoshi)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号: 30531355

木下 学 (KINOSHITA, Manabu)
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・准教授
研究者番号: 70531391

宮崎 裕美 (MIYAZAKI, Hiromi)
防衛医科大学校・防衛医学研究センター・助教
研究者番号: 30531636