

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：82406

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18452

研究課題名（和文）新しい光硬化性止血剤の開発と血管吻合部への適用

研究課題名（英文）Development of new photocurable haemostatic agents and their application to vascular anastomoses.

研究代表者

土屋 壮登 (Tsuchiya, Masato)

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、共同利用研究施設、病院並びに防衛・病院 形成外科・助教

研究者番号：20866735

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は光硬化性ゲルを用いた効果的な血管吻合を実現するための研究である。第一段階は血管吻合に用いるために適切な光硬化性ゲルの開発、第二段階は、動物血管吻合モデルへの使用、第三段階はゲルに成長因子などの生理学的物質を添加することによって血管吻合部の安定の促進を目的に研究を行った。

第一段階ではゲルの構成物質の割合を変化させることにより光照射から硬化までの時間、硬化したゲルの粘性を自由に变化させることを可能とした。第二段階では動脈吻合の微小出血の止血が可能であった一方、静脈吻合では明らかに吻合部閉塞が多く生じる結果となった。第三段階では成長因子の添加による有意な結果を得ることができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光硬化性ゲルを出血のコントロールに用いる研究は既に多く報告されているが、微小血管吻合における有用性の報告は今までなかった。本研究の結果は今後の安全で効率のよい微小血管吻合術の発展に寄与すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This research is aimed at realizing effective vascular anastomosis using light-curing gels. The first step was to develop an appropriate light-curing gel for use in the vascular anastomosis, the second step was to use the gel in an animal model of vascular anastomosis, and the third step was to add physiological substances such as growth factors to the gel to promote stability of the vascular anastomosis site.

In the first stage, the time from light irradiation to hardening and the viscosity of the hardened gel could be changed freely by changing the ratio of the constituent substances of the gel. In the second step, hemostasis of micro bleeding in arterial anastomosis was possible, whereas in the venous anastomosis, many occlusions at the anastomosis site were observed. In the third step, the addition of growth factors did not produce significant results.

研究分野：微小血管吻合

キーワード：光硬化性ゲル 止血剤 血管吻合

1. 研究開始当初の背景

マイクロサージャリーの発展により、血管吻合を伴った遊離皮弁の移植を行うことで多くの組織欠損に対する再建術の施行が可能となっている。この場合、皮弁への血流を常に配慮し、血流を阻害することなく移植床へ移動することが重要である。このため、多くの外科医が血管吻合術のトレーニングを行っているが、吻合中に出血などのトラブルが発生した場合、シアノアクリレートを主成分とする医療用接着剤などを用いて止血することがある。医療用接着剤による止血効果は高いが、これまでの我々の報告では、シアノアクリレート単独の血管吻合部への使用は、血管内膜の微妙なズレと過剰な肉芽組織が原因で血管の狭窄を惹起するため、ステント留置を要することを報告した¹。医療用接着剤は、当然のことながら、従来の工業用粘着・接着剤とは基本的に異なる性能が要求されることになる。すなわち、医療用粘着剤は患者の組織に直接接触するため生体適合性が要求されるだけでなく、生体内分解吸収性の素材が要求される。さらに接着の反応過程が体液や血液など水分が豊富な場において行われるため、接着反応が穏やかな条件下で瞬間的に終わること、術者による操作が容易であること、生体組織を強固に接合し生体の自己修復を妨害しないこと、などが医療用接着剤の性能として要求される。しかし、これらを満足する医療用接着剤は臨床応用されていない。フィブリン糊やゼラチンを主成分とする軟組織用接着剤・止血剤が用いられているが、接着反応に時間を要するため、血管吻合部からの出血に耐えることができず、止血できないこともある。これらのことから、吻合部に滴下後に瞬時に接着し、接着後は強固に接合して止血するとともに、組織の自己修復を妨害することのない医療用接着剤の開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、投与前は水溶液状態であるが、出血吻合部位に滴下後に光を照射することによって強く固化して止血し、また、組織の自己修復のための細胞の足場材料（スキヤホールド）にもなり得る材料の開発を行い、実験動物を用いて血管吻合部への適用を行う。具体的には、ゼラチン水溶液に予め極少量の光応答架橋剤（アリルアジド、ジアジリンやルテニウム）を混合し、患部に滴下後に光照射（波長 405 nm の LED 光源）することでハイドロゲルが形成され、強固な止血作用と組織修復に最適な湿潤環境の維持が期待できる新規止血材料を開発する（図 1）。この光硬化性ハイドロゲルを用いる利点は、光照射という生体に非侵襲的な方法により、吻合部の状態に合わせた形状や厚みの止血剤としてのハイドロゲルを形成できることである。また、京都大学の田畑泰彦教授らが数多く報告している通り、ゼラチンハイドロゲルからは basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) などの成長因子を長期間徐放化することができ、患部の組織修復を促進させることが可能であり、これが血管吻合部の安定化への効果をもたらすか検討する。

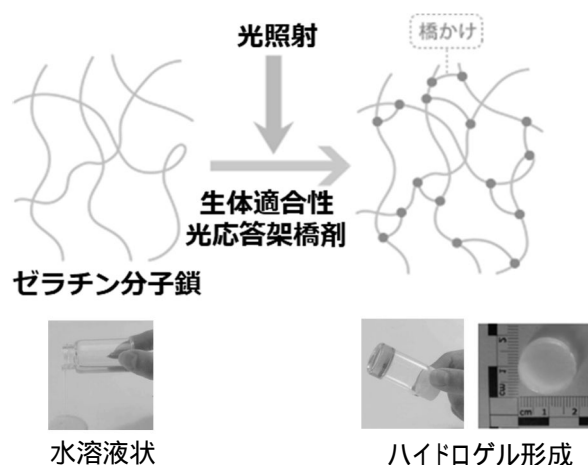


図1. ゼラチンと光応答架橋剤を混合した水溶液に光照射を行うとハイドロゲルを作製することができる。患部の大きさや形状に合わせたハイドロゲルを患部において作製することができる。

3. 研究の方法

本研究では、血管吻合部に適用する新しい止血剤として、光硬化性ゼラチンハイドロゲルを開発することである。さらに、実験動物を用いて、血管吻合部に光硬化性ゼラチンハイドロゲルを適用し、止血作用、生体適合性、生体内分解時間および血管吻合部の組織再生を評価し、その臨床応用に向けた基礎研究を行う。

研究期間1年目

光硬化性ゼラチンハイドロゲルの反応条件（光照射条件や光応答架橋剤濃度）の検証と、物理化学的パラメーター（粘弾性、耐圧性）の測定を行い、血管縫合部に用いる止血剤として有用な材料の作製条件を決定する。

研究期間2年目

血管縫合部にゼラチン水溶液を滴下し、光照射によって止血作用を確認するだけでなく、一定期間後の血管組織の修復についても評価を行う。既存の医療用接着剤（シアノアクリレート系接着剤）やフィブリン糊などを比較対象とし、光硬化性ゼラチンハイドロゲルの有用性について研究を進める。またゼラチン水溶液に bFGF など各種生理活性物質を添加することにより血管組織修復過程に変化があるかの評価を行う。

研究成果

研究1年目では過硫酸ナトリウム、ルテニウムを光応答架橋剤として使い、ゼラチンの濃度と光応答架橋剤の濃度、照射光の強さによってゲル化までの時間と粘性の違いを検討した（表1, 図2）。この結果に関しては当教室の Kushibiki らが発表した²。このなかで#1のハイドロゲルを用いて次に続く微小血管吻合における止血効果の研究に移行した。

Hydrogel #	Gelatin conc. (wt%)	Photoinitiator conc. (mM)	LED power density (mW/cm ²)
1	10	1	30
2	10	0.5	30
3	10	1	10
4	10	0.5	10
5	10	0.25	30
6	5	1	30
7	5	0.5	30

表1

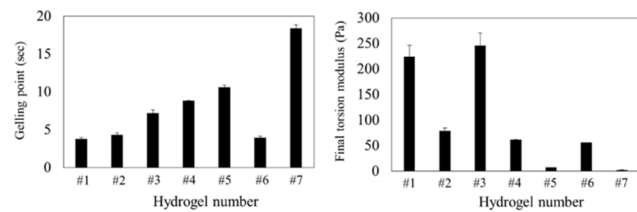


図1

次にラット遊離皮弁モデルに対し、光硬化性ゲルの適応を行った。動脈吻合への適応に関しては生着率を妨げることなく、血管吻合部の出血を止める止血剤としての用いることが確認できた。しかしながら、静脈吻合に関しては、一部に吻合部の閉塞を認め、その結果は安定しなかった。この原因として硬化性ゲルの自重によって吻合部が圧迫され、物理的閉塞が起こることが病理学的に判明した。そのため、ゲルの物性を変えて複数回適応を試みたが本研究期間中には上記問題点が解決しなかった。さらに光硬化性ゲルのは各種の生理学的物質を徐放性に添加できることが可能であり、当教室ですでに作成していた、線維芽細胞増殖因子とインスリン関連成長因子を添加した光硬化性ゲルを血管吻合部に適応することで、血管内皮細胞を含めた吻合部のリモデリングが促進されるかを検討した。上記に示したように静脈吻合に関しては、閉塞のため適応できなかったため動脈吻合にのみ検討を行った。しかし、現時点ではコントロール群との有意な差は認めなかった。今後静脈吻合における問題点を解決するとともに、血管吻合部のリモデリングの促進に寄与する生理学的物質の検討を行っていく。

1) Aizawa, T., Kuwabara, M., Kubo, S., Domoto, T., Aoki, S., Azuma, R., & Kiyosawa, T. (2018). Sutureless microvascular anastomosis using intravascular stenting and cyanoacrylate adhesive. *Journal of Reconstructive Microsurgery*, 34(01), 008-012.

2) Kushibiki, T., Mayumi, Y., Nakayama, E., Azuma, R., Ojima, K., Horiguchi, A., & Ishihara, M. (2021). Photocrosslinked gelatin hydrogel improves wound healing and skin flap survival by the sustained release of basic fibroblast growth factor. *Scientific reports*, 11(1), 1-12.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 佐々木 矢恵, 長野 寿人, 土屋 壮登, 久保 諭, 中村 和人, 會沢 哲士, 東 隆一, 清澤 智晴	4. 巻 40
2. 論文標題 診断と治療に苦慮した軽症血友病Aの1例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本形成外科学会誌	6. 最初と最後の頁 547-553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakayama Eiko, Kushibiki Toshihiro, Mayumi Yoshine, Tsuchiya Masato, Azuma Ryuichi, Kiyosawa Tomoharu, Ishihara Miya	4. 巻 41
2. 論文標題 Photobiomodulation Therapy in Plastic Surgery and Dermatology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nippon Laser Igakkaishi	6. 最初と最後の頁 370~384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2530/jslsm.jslsm-41_0035	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Azuma Ryuichi, Horiguchi Akio, Ojima Kenichiro, Shinchi Masayuki, Aizawa Tetsushi, Tsuchiya Masato, Nakayama Eiko, Nagano Hisato, Ito Keiichi, Asano Tomohiko, Kiyosawa Tomoharu	4. 巻 28
2. 論文標題 Triangular extension of hinge flaps: A novel technique to resolve stomal stenosis and prevent restenosis in staged buccal mucosal urethroplasty	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 806~811
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.14582	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 得能香菜、土屋壮登、長野寿人、久保諭、中村和人、 會沢哲士、東隆一、清澤智晴
2. 発表標題 真性浅側頭動脈瘤の一例
3. 学会等名 第63回日本形成外科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 円城寺夏季、土屋壮登、竹内一博、長野寿人、久保諭、中村和人、 會沢哲士、東隆一、清澤智晴
2. 発表標題 Morel-Lavallee Lesionにドレーンアクセサリーを用いた陰圧閉鎖療 法が著効した 1 例
3. 学会等名 第12回日本創傷外科学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土屋壮登、佐々木矢恵、久保諭、中村和人、 會沢哲士、東隆一、清澤智晴
2. 発表標題 原発性リンパ浮腫患者における陰部リンパ浮腫に対する精索周囲リンパ管静脈吻合術の有効性
3. 学会等名 第64 回日本形成外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内一博、土屋壮登、佐々木矢恵、中村和人、久保諭、 會沢哲士、東隆一、清澤智晴
2. 発表標題 ガンマプローブを用いた鼠径部輸出リンパ管の同定方法
3. 学会等名 第64 回日本形成外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土屋壮登、阿部圭那子、川上沙織、久保諭、 會沢哲士、東隆一、清澤智晴
2. 発表標題 二次性下肢リンパ浮腫における lymphoscintigraphy と ICG lymphography の相関関係の検討
3. 学会等名 第 65 回日本形成外科学会総会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------