

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592138

研究課題名(和文) 脳神経外科手術用止血剤の開発に向けた組織接着性ハイドロゲルの安全性評価研究

研究課題名(英文) Evaluation of safety and effectiveness of tissue-adhesive hydrogel for the development of hemostatic agent in neurosurgery

研究代表者

大畑 建治 (Kenji, Ohata)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70194264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：外科手術において止血や接着の目的で特定生物由来製品であるフィブリン製剤が使用されている。しかし、ヒトもしくは動物由来材料には感染症に対する懸念がある。我々は、生分解性・生体適合性を有する食品添加物や医薬品として使用実績のある天然高分子を用いて、安全でゲル強度の高い組織接着効果を開発した。すなわち、 α -1,3-グルカン(黒酵母産生物)由来のポリアルデヒドと α -PLL(放線菌産生物)を架橋剤により高分子量化したポリアミンから Schiff 塩基結合形成による架橋反応によって形成するハイドロゲルを用い、高い安全性と機能性を有する手術用止血剤を開発し、有効性と安全性を確立した。

研究成果の概要(英文)：Combination of fibrinogen and trombone has been used for the purpose of hemostats and tissue-adhesions. In this work, novel cell adhesive hydrogels were developed by using naturally occurring polymers, α -poly-L-lysine and α -1,3-glucan (Aqua). Storage elastic modulus (G') with nEG-PLL and CHO-Aqua showed a higher value than that of a conventional hemostatic agent. Since our hydrogels are consisting of naturally occurring polymers, they have little risk of infectious contaminations. When the hydrogels and their starting materials were administrated by a single oral gavage, no obvious acute toxicity was observed not only on blood chemistry, but also in inflammatory parameters. The results showed that hydrogels obtained by the schiff base formation between nEG-PLL and CHO-Aqua provides a great potential for safer and effective hemostatic agent.

研究分野：脳神経外科

キーワード：フィブリンノーゲン 特定生物由来製品 ポリアルデヒド ポリアミン ハイドロゲル 架橋反応 安全性 有効性

1. 研究開始当初の背景

脳神経外科の手術においては、硬膜内出血部位の止血、硬膜欠損部位の補填、神経の接着剤として市販のフィブリン製剤が大量に使用されている。しかし、ヒトもしくは動物由来材料には感染症に対する懸念から医療現場では他の材料への置換えが切望されている。

これまでにフィブリン製剤を代替する止血用接着剤、創傷被覆材料等として医療用組成物(コラーゲンなどの架橋構造体、合成高分子等)が種々検討されてきたが、これらの材料は局所的な炎症や細胞毒性を示し、また、生物適合性に乏しいものであった。

一方、食品添加物を原料とするデキストランと γ -ポリ-L-リジン(以下、単に γ -PLLとも称する)を原料とする、架橋型シッフ塩基形成に基づく接着剤が研究されているが、ゲル強度は市販止血剤であるフィブリン糊よりも劣り、止血剤としての強度不足が懸念される。さらに、強い接着剤を有するクエン酸を活性エステル化した誘導体とコラーゲン等のタンパクを接着成分とする組織接着剤も研究されているが、活性エステル化合物は化学的に不安定であり水溶液での長期保存が不可能である。従って臨床応用には適さない。

2. 研究の目的

そこで我々は、これらの問題を解決するために、生分解性・生体適合性を有する食品添加物や医薬品として使用実績のある天然高分子を使用することで安全性を確保し、さらに、ゲル強度の高いハイドロゲルを作成することによりハイドロゲル形成による組織接着効果を高める方法を確立した。

本研究では、 α -1,3-グルカン(ダイソー社製、黒酵母 *Aureobasidium pullulans* 産生物、化合物 I)由来のポリアルデヒド(I')と γ -PLL(チッソ社製、放線菌 *Streptomyces albulus* 産生物、化合物 II)を架橋剤により高分子量化したポリアミン(II')からシッフ塩基結合形成による架橋反応によって形成するハイドロゲルを用い、高い安全性と機能性を有する脳神経外科手術用止血剤の開発を目指し、さらに有効性を確立して臨床治験を始める。

3. 研究の方法

(1) アクア ポリアルデヒド/高分子量化ポリリジンハイドロゲルの単回経口投与毒性試験

上記の組織接着性ハイドロゲル外科用止血材料を C57BL6J マウス 11 週齢・雌雄に単回経口投与し、投与後 4 日後までの観察結果および血中炎症サイトカイン及び肝機能パラメータ測定からハイドロゲル材料およびそ

の原料成分の急性毒性を検討した。以下の実験を行った。

実験 1 各ポリマーの重量濃度測定

実験 2 Aqua -CHO のヒドラジン化によるアルデヒド導入率の算出

実験 3 経口投与によるハイドロゲル及びポリマー溶液の安全性試験

実験 4 経口投与によるハイドロゲル及びポリマー溶液の炎症性サイトカイン測定

実験 4-1 TNF 測定

実験 4-2 IFN 測定

実験 4-3 IL-6 測定

実験 4-4 IL-1 測定

実験 5 経口投与によるハイドロゲル及びポリマー溶液の肝障害試験

実験 5-1 GGT 測定

(2) 市販製品との止血効果の比較

このハイドロゲル止血剤とすでに市販されているフィブリンノーゲンとの止血効果の比較を可視的にするために、ラットの腹部大動脈に切開を加え、ハイドロゲル単独、フィブリンノーゲン単独、ハイドロゲルとコラーゲンシートの併用、フィブリンノーゲンとコラーゲンシートとの併用の 4 群に分け、止血状況をマイクロスコープを用いてビデオ撮影した。それぞれの 2 液の混合は、市販されている混合器を用いた。

4. 研究成果

(1) アクア ポリアルデヒド/高分子量化ポリリジンハイドロゲルの単回経口投与毒性試験

実験 1 :

合成を依頼した企業(サンヨーファイン)からの報告の結果と一致した。

実験 2 :

CN 比から、アルデヒド導入率を計算すると、90%であることが示された。

実験 3 :

Aqua -CHO 投与群の体重に若干の減少が見られたものの、どの群においても死亡するマウスは確認されなかった。そのため、ハイドロゲル及び各ポリマー単独で経口投与した際にも、生体に対して安全に使用することが可能であることが示された。これに併せて、投与直後に投与によるストレス等の理由から毛並みの悪くなるマウスも観察されなかった(Fig.1)。

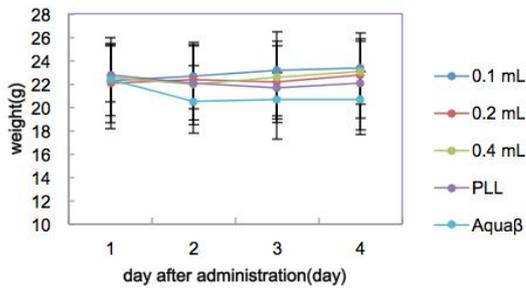


Figure.1 経口投与後のマウスの体重変化

実験 4-1 :

TNF はネガティブコントロールとして用いた、生理食塩水と同程度しか発現しておらず、ゲルおよび、ポリマーの投与による炎症が起こっていないことが示された(Fig.2,3,4)。

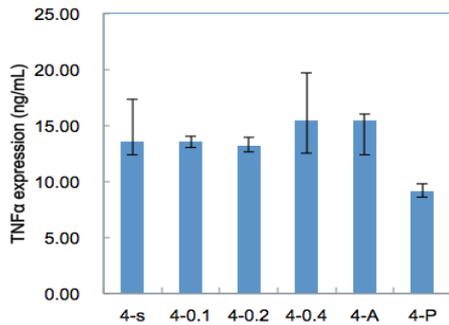


Figure.3 投与 4 時間後の TNFα 発現量

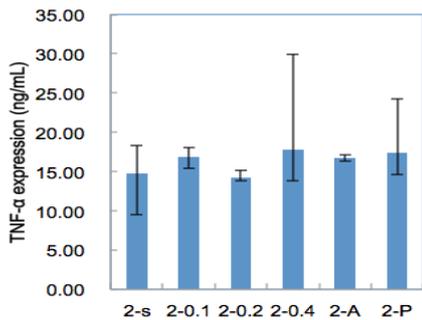


Figure.2 投与 2 時間後の TNFα 発現量

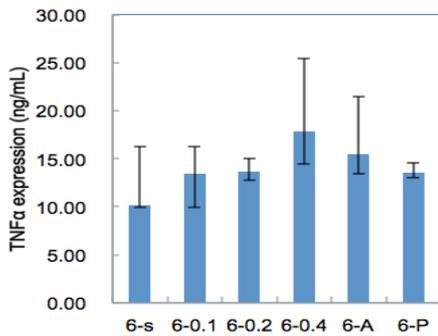


Figure.4 投与 6 時間後の TNFα 発現量

実験 4-2 :

IFN はネガティブコントロールとして用いた、生理食塩水と同程度しか発現しておらず、ゲル及びポリマー単独の投与によって、炎症

が起こっていないことが示された(Fig. 5,6,7)。

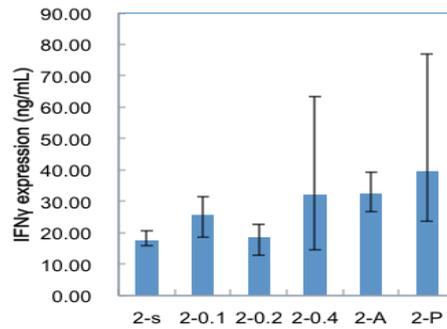


Figure.5 投与 2 時間後の IFNγ 発現量

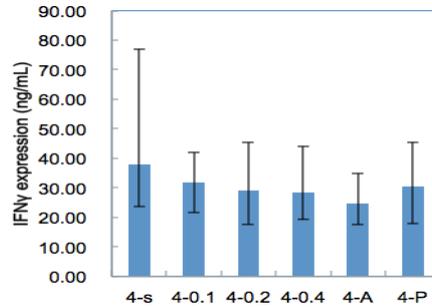


Figure.6 投与 4 時間後の IFNγ 発現量

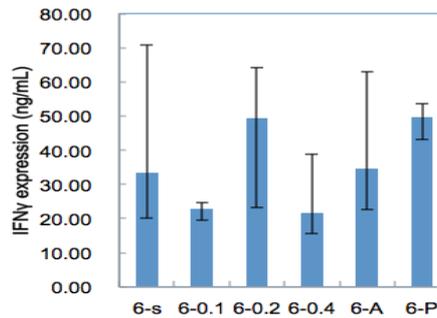


Figure.7 投与 6 時間後の IFNγ 発現量

実験 4-3 :

IL-6 はネガティブコントロールとして用いた、生理食塩水と同程度しか発現しておらず、炎症を引き起こしていないことが確認された(Fig.8,9,10)。

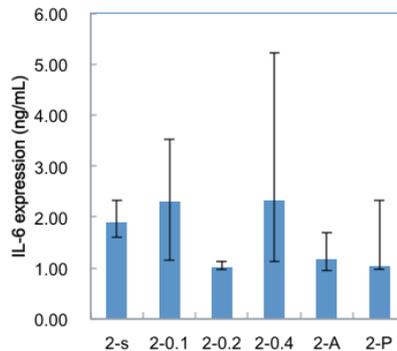


Figure.8 投与 2 時間後の IL-6 発現量

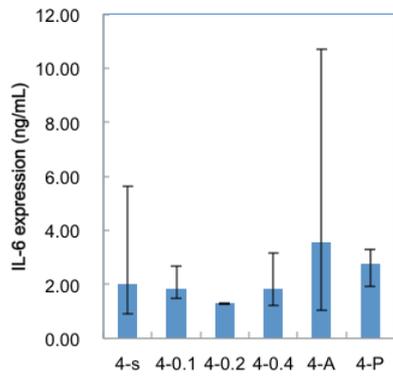


Figure.9 投与4時間後のIL-6発現量

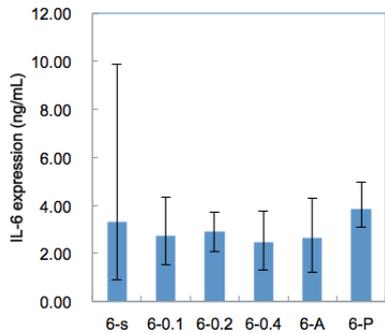


Figure.10 投与6時間後のIL-6発現量

実験 4-4 :

IL-1 はネガティブコントロールとして用いた、生理食塩水と同程度しか発現しておらず、炎症を引き起こしていないことが確認された(11,12,13)。

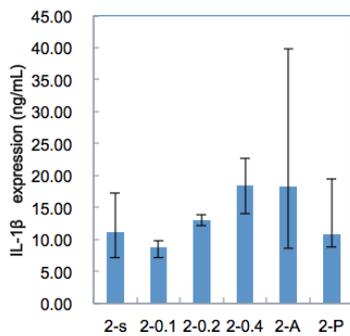


Figure.11 投与2時間後のIL-1β発現量

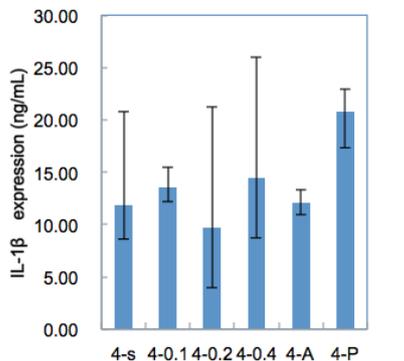


Figure.12 投与4時間後のIL-1β発現量

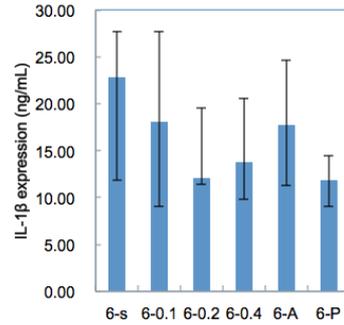


Figure.13 投与6時間後のIL-1β発現量

実験 4-5 :

NO_x 発生量はネガティブコントロールとして用いた Saline と同程度であったことから、炎症を引き起こしていないことが確認された(Fig.15,16)。

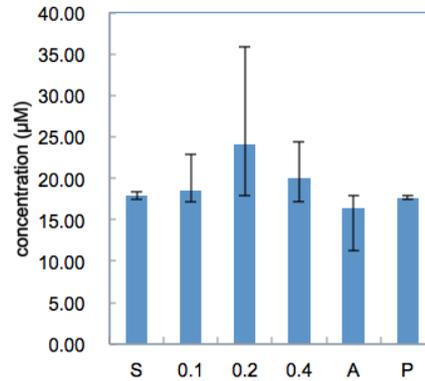


Figure.14 NO₂発生量

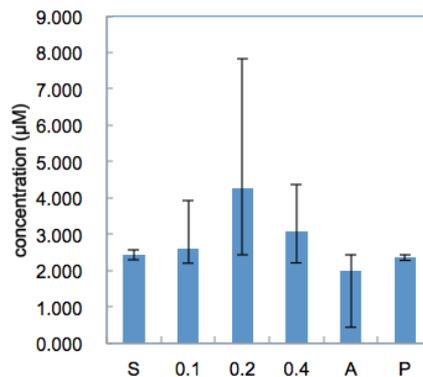


Figure.15 NO₃発生量

実験 5-1 :

0.4 mL 投与、Aqua -CHO および、23EG-PLL 投与群では他の群と比較して高い値を示していることがわかった。また、ゲルで投与した場合は正常値である 50 IU/L 以下に収まっているため、安全に使用することが可能であることが示された。これに併せて、ポリマー単独での投与では正常値を越えるマウスが見られたのに対して、ゲル化させることにより、ポリマーの肝臓への毒性を低減可能であ

ることが示された(Fig. 16)。

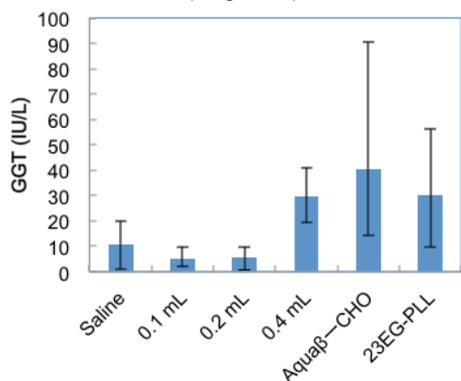


Figure.16 血中 GGT 量

実験 5-2 :

0.4 mL 投与、Aquaβ-CHO および、23EG-PLL 投与群では他の群と比較して高い値を示していることがわかった。また、ゲルで投与した場合は正常値である 40 IU/L 以下に収まっているため、安全に使用することが可能であることが示された。これに併せて、ポリマー単独での投与では正常値を越えるマウスが見られたのに対して、ゲル化させることにより、ポリマーの肝臓への毒性を低減可能であることが示された(Fig. 17)。

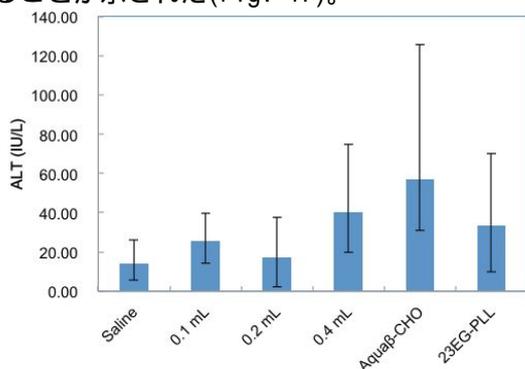


Figure.17 血中 ALT 量

(2) 市販製品との止血効果の比較

ハイドロゲルおよびフィブリノーゲン・トロンビンでは大動脈からの出血を止めることはできなかった。コラーゲンシート併用では、両者の間に差はなかった。

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)

〔学会発表〕(計 2 件)

大畑建治、長崎健：組織接着性ハイドロゲル外科用止血材料、第 7 回次世代医療システム産業化フォーラム、2015 年 2 月 26 日、シティプラザ大阪(大阪商工会議所主催)

森迫拓貴、長崎健、大畑建治：組織接着性ハイドロゲル外科用止血材料、ACT japan meets 未来医療交流会(実用化志向の研究者とオー

プイノベーション企業の出会い)、2015 年 1 月 30 日、大阪大学

〔図書〕(計 1 件)

長崎健、石橋謙一、大畑建治、技術情報協会、ゲルの安定化と機能性付与・次世代への応用開発、2013、51-456
〔産業財産権〕

取得状況(計 1 件)

名称：-1,3-グルカン由来ポリアルデヒド / ポリアミンハイドロゲル

発明者：長崎健、林達郎、大畑建治、石橋謙二、鈴木利雄、古川喜朗

権利者：公立大学法人大阪市立大学

種類：特許 PCT 指定国

番号：第 5660781 号

出願年月日：2008 年 11 月 4 日

取得年月日：2014 年 12 月 12 日

国内外の別：国内、国外(アメリカ)

〔その他〕

製品化が一社において進行中である。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大畑建治 (OHATA, Kenji)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70194264

(2) 研究分担者

長崎健 (NAGASAKI, Takeshi)

大阪市立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：30237507

石橋謙一 (ISHIBASHI, Kenichi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：50438230