

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592653

研究課題名(和文) ヒアルロン酸とコラーゲン及び上皮細胞成長因子を組み合わせた新規癒着防止膜の開発

研究課題名(英文) Development of prevention adhesion sheet composed of hyaluronic acid and collagen sponge containing epidermal growth factor

研究代表者

根本 充 (NEMOTO, Mitsuru)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：20276083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はヒト手指屈筋腱構造と類似するニワトリの第3趾の屈筋腱を用いて癒着防止膜の腱縫合部への癒着防止効果を明らかにすることを目的とした。腱鞘損傷モデルでのヒアルロン酸/コラーゲン癒着防止膜の癒着防止効果を第55回日本手外科学会学術集会、腱縫合モデルにおける肉眼的、組織学的な癒着防止効果を第56回日本手外科学会学術集会で発表した。しかし、健常なニワトリに比べ関節可動域制限が生じており、対策として術後早期運動療法に対応できる癒着防止膜を検討中である。これまでの研究成果は第10回アジア太平洋手外科会議で発表予定である。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study has revealed effects of prevention adhesion sheet composed of hyaluronic acid and collagen sponge in chicken model. We presented effects of prevention adhesion sheet applied for tendon sheath injury in the 56th annual meeting of the Japanese society for surgery of the hand at Yokohama, and applied for tendon injury in the 57th annual meeting of the Japanese society for surgery of the hand at Kobe. However, prevention adhesion sheet applied tendon injury model of chicken occurred limitation of range of motion. Then, we have improved prevention adhesion sheet composed of hyaluronic acid and collagen sponge for postoperative early exercise. We will present these results of prevention adhesion sheet in 10th congress of Asian pacific federation of societies for surgery of the hand at Malaysia.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：癒着防止膜 ヒアルロン酸 コラーゲン 腱損傷 手外科

1. 研究開始当初の背景

生体内の損傷組織の治癒の基本的な機序は、損傷部位にフィブリン網が形成され周囲組織から遊走してきた線維芽細胞がフィブリン網を足場として集積し、コラーゲンを産生することにより周囲組織と癒着しながら創傷治癒が進行する。この創傷治癒の過程で産生された過剰なコラーゲンは、配列も正常組織とは異なり癒着を形成する。この癒着形成を伴う癒着が機能障害の原因であるが、癒着と創傷治癒は切り離すことのできない事象である。腱の癒着防止膜開発の歴史は古く、当初は非吸収性材料であるセロファンやポリエチレン、シリコンシートが用いられてきた。しかし、これらの非吸収性材料には創傷治癒に関連する物質の透過性や素材の操作性(伸展性や柔軟性)に問題があり、実用化までは至らなかった。理想的な癒着防止膜の基材は組織反応が軽微な生体内吸収性で、操作に耐える伸展性や柔軟性などの強度を有していることが必要である。そして確実な癒着防止効果が得られ、腱の治癒に密接に関連している滑液の透過性を阻害しない基材が理想的である。近年、これらの条件を満たし生体内での分解吸収速度が調整可能な基材として研究されているのがヒアルロン酸やコラーゲン膜を応用した癒着防止膜である。これらの癒着防止膜は損傷組織の間に物理的な膜を介在させ、組織が修復された後に分解吸収される設計である。これに対して、本研究では損傷組織の間に物理的な膜を介在させながら早期に治癒を完了し、なおかつ癒着形成を抑制する癒着防止膜の開発に焦点をおいている。創傷治癒促進効果を有するヒアルロン酸とコラーゲンを基材とし、さらに上皮細胞成長因子(EGF)による治癒促進効果を合せもった癒着防止膜は、すべての外科領域において有効性が期待できる。

2. 研究の目的

手外科領域では腱縫合術や腱剥離術を行った後の重大な合併症の1つとして腱癒着があげられる。過去には腱癒着を防ぐために様々な癒着防止膜が考案されたが、非吸収性材料であったことや腱の創傷治癒の遅延、操作性などの問題からいずれの癒着防止膜も実用化されなかった。実用化されるためには生体内吸収性で腱の創傷治癒を促進し、かつ確実な癒着防止効果が得られる材料の開発が必要である。我々はこれらの条件を満たす基材としてヒアルロン酸とコラーゲンから構成される癒着防止膜を作成し、腱縫合部に適用した癒着防止膜の癒着防止効果を評価し、さらに上皮細胞成長因子(EGF)含有ヒアルロン酸水溶液(癒着防止補助材)による腱縫合部への治癒促進効果について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

ヒトの手指屈筋腱構造と類似するニワト

リの第3趾の屈筋腱を用いて実験モデルを作成し、ヒアルロン酸とコラーゲンから構成される癒着防止膜(図1)の腱鞘損傷部や腱縫合部への癒着防止効果を明らかにする(図2、3)。具体的にはニワトリ(レグホン2ヶ月齢)を動物モデルとし吸入麻酔薬で麻酔した後、体幹と下肢を手術台に固定し、第3趾のPIP関節部からDIP関節の皮膚をNo15メスで切開して腱鞘および屈筋腱を露出させる。ここまです癒着防止膜を適用する前の基本処置とし、腱鞘や屈筋腱の各種損傷モデルを作成した。特に臨床応用するためには、腱縫合を行ったモデルで足趾切断後に組織学的評価のほかに関節可動域(滑走距離)評価、縫合した屈筋腱の力学的評価を引張試験機で行い(図4)、臨床応用可能な癒着防止効果と腱縫合部で力学的耐性が得られているかを検討した。



図1. ヒアルロン酸/コラーゲン癒着防止膜

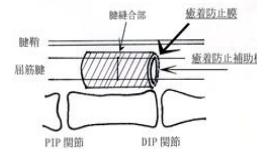


図2. 癒着防止膜適用シエマ(矢状断)

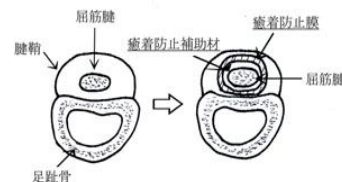


図3. 癒着防止膜適用シエマ(水平断)

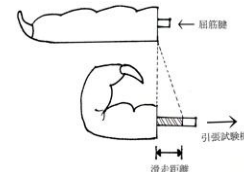


図4. 関節可動域測定

4. 研究成果

(1) 腱鞘損傷モデルでの癒着防止効果

癒着防止膜適用3週後の肉眼的所見は腱鞘を圧挫させ癒着防止膜を適用した部位では皮膚や皮下組織との癒着は認められなかった。対照として癒着防止膜を適用しなかった腱鞘損傷モデルでは皮膚や皮下組織との癒着を認めた。組織学的な所見でも癒着防止膜の挿入された部位では皮膚や周囲組織と癒着していなかったが、癒着防止膜のない部位では皮膚や皮下組織と癒着していた。

(2) 腱鞘欠損モデルでも癒着防止効果
 腱鞘を切除し、腱鞘欠損部に癒着防止膜を適用した部位の肉眼的評価を癒着防止膜適用 3 週間後に行った。癒着防止膜を適用した腱鞘欠損部位では皮膚や周囲組織との癒着は認められなかった。対照として癒着防止膜を適用しなかった腱鞘欠損モデルでは皮膚や周囲組織との癒着が高度であった。組織学的な所見でも腱鞘欠損部に癒着防止膜のない部位では皮膚や皮下組織と癒着していた(図 5)が、癒着防止膜を適用した部位では皮膚や皮下組織と癒着は見られなかった(図 6)。

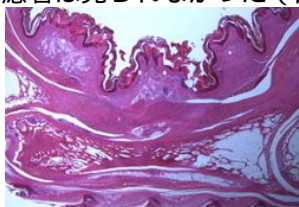


図 5. 腱鞘欠損モデル(癒着防止膜なし)
 (HE × 0.73)



図 6. 腱鞘欠損モデル(癒着防止膜あり)
 (HE × 0.73)

(3) 腱縫合モデルでの癒着防止効果
 腱縫合モデルでも癒着防止膜を適用していない部位では腱縫合部と周囲組織の癒着が見られ、癒着防止膜を適用した部位では腱縫合部と周囲組織の癒着が軽微であることが肉眼的に確認できた。組織学的には癒着防止膜を適用していない腱縫合部位で皮膚、皮下組織との癒着が認められた(図 7)。癒着防止膜を適用した腱縫合部では癒着防止膜が周囲組織との間に介在しており、癒着防止効果が確認できた(図 8)。

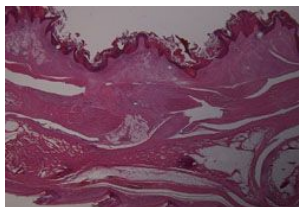


図 7. 腱縫合モデル(癒着防止膜なし)
 (HE × 0.73)

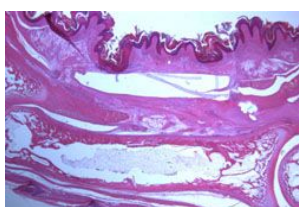


図 8. 腱縫合モデル(癒着防止膜あり)

(HE × 0.73)

(4) 関節可動域及び力学的強度の評価
 癒着防止膜を適用したニワトリの関節可動域は癒着防止膜を適用していないニワトリに比差異が認められた(図 9)。しかし、健常なニワトリの関節可動域に比べれば大きな隔たりがあるため、関節可動域制限の原因検索を行った。経時的に関節可動域が制限されてくるため、癒着防止膜適用モデルにおいても早期可動域訓練の必要性(固定期間短縮)が示唆された。健常ニワトリの屈筋腱滑走に必要な力学的強度を牽引強度測定装置(図 10)から解析し、必要最小限の強度を 1N と仮定し、早期可動域訓練の観点から固定期間を短縮した癒着防止膜適用モデルを作成した。経時的に縫合部に力学的負荷(1N)をかけ、縫合直後から術後 4 週まで期間において力学的強度に問題を生じないことを確認した。

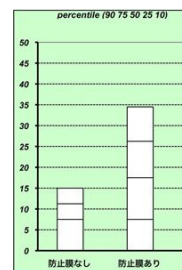


図9.DIP関節可動域



図10.牽引強度測定装置

(5) 今後の推進方策について
 腱鞘損傷モデル、腱鞘欠損モデル、腱縫合モデルにおける肉眼的、組織学的評価について第55回日本手外科学会学術集会(横浜市)で発表し、腱縫合モデルの関節可動域測定や力学的強度を測定した機能的評価について第56回日本手外科学会学術集会(神戸市)で発表してきた。ヒアルロン酸とコラーゲンから構成される癒着防止膜を適用すれば、組織学的、機能的に癒着防止効果が明らかになったが、経時的に癒着防止効果が弱まってくることも明らかになった。これまでの研究成果は平成26年10月に開催される第10回アジア太平洋手外科会議で発表予定である。今後は腱縫合後早期可動域訓練を前提とした耐久性と持続性を兼ね備えた癒着防止効果を持つ癒着防止膜の開発を目指していきたい。

5. 主な発表論文等
 [雑誌論文](計 10 件)

Niiyama H, Kuroyanagi Y. Development of novel wound dressing composed of hyaluronic acid and collagen sponge containing epidermal growth factor and vitamin C derivative. J Artif Organs. 査読あり 17,2014,81-87

DOI:10.1007/s10047-013-0727-x.

Yamamoto A, Shimizu N, Kuriyanagi Y. Potential of wound dressing composed of hyaluronic acid containing epidermal growth factor to enhance cytokine production by fibroblasts. J Artif Organs. 査読あり 16,2013,489-494

DOI:10.1007/s10047-013-0726-0.

Mineo A,Kuroyanagi Y.Development of an artificial dermis composed of hyaluronic acid and collagen.J Biomater Sci Polym Ed. 査読あり 24,2013,726-740

DOI:10.1080/09205063.2012708190.

Suzuki R, Kuroyanagi Y. Safety and utility of a PMMA-based tissue adhesive for closure of surgical incision wounds. J Biomater Sci Polym Ed. 査読あり 24,2013, 287-300

DOI:10.1080/09205063.2012.708190

Sawa M,Kuroyanagi Y.Potential of a cryopreserved cultured dermal substitute composed of hyaluronic acid and collagen to release angiogenic cytokine. J Biomater Sci Polym Ed. 査読あり 24,2013, 224-238

DOI:10.1163/156856212X631888.

黒柳能光 アドバンスド・ウンド・マネジメント THE テクニック 生体材料・細胞成長因子・細胞を応用した新しい創傷治療. 日本創傷・オストミー・失禁管理学会誌. 査読なし 15, 2012, 270-272

黒柳能光 再生医療のいま 基礎研究から臨床への展開に向けて 細胞・細胞成長因子・生体材料を応用した皮膚再生医療. 治療. 査読なし 93,2011, 1946-1952

黒柳能光 細胞・細胞成長因子・生体材料を応用した皮膚再生医療. 日本創傷・オストミー・失禁管理学会誌. 査読なし 15, 2011, 16-24

〔学会発表〕(計 21 件)

根本 充、熊澤憲一、内沼栄樹、ヒアルロン酸とコラーゲンを組み合わせた癒着防止膜の開発 第2報 -機能的評価- 第56回日本手外科学会学術集会 2013.04.19 神戸市

根本 充、熊澤憲一、内沼栄樹、ヒアルロン酸とコラーゲンを組み合わせた新規癒着防止膜の開発 第1報 -組織学的評価- 第55回日本手外科学会学術集会 2012.04.19 横浜市

6. 研究組織

(1)研究代表者

根本 充 (NEMOTO Mitsuru)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：20276083

(2)研究分担者

黒柳 能光 (KUROYANAGI Yoshimitsu)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：80170140

熊澤 憲一 (KUMAZAWA Kenichi)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：60383618