慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	吸水性ゲルを応用した開胸手術後癒着防止基材の開発
Sub Title	Application of hydrogels for adhesion prevention after thoracotomy
Author	泉, 陽太郎(Izumi, Yotaro) 朝倉, 啓介(Asakura, Keisuke) 川村, 雅文(Kawamura, Masafumi)
Publisher	
Publication year	2010
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2009.)
JaLC DOI	
Abstract	背景：ポリ(ガンマ-グルタミン酸)(PGA)は納豆菌が産生する生分解性ポリマーであり、いわゆる納豆の粘りの成分である。これを放射線照射により架橋したポリ(ガンマ-グルタミン酸)架橋体(PGAXL)は吸水しながら粘張なハイドロゲルを形成する。本実験では後側方開胸手術を想定したマウス創部癒着モデルを作成し、PGAXLの癒着防止効果について検討した。閉胸肋間と臓側肺胸膜間、閉胸肋間とその直上の筋層縫合部との間には中等度以上の癒着が見られたが、いずれの癒着もPGAXL撒布により軽減される傾向が見られた。
Notes	研究種目：基盤研究(C) 研究期間：2007～2009 課題番号：19591645 研究分野：胸部外科学 科研費の分科・細目：呼吸器外科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_19591645seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式 C -19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2009
課題番号：１９５９１６４５
研究課題名（和文）　吸水性ゲルを応用した開胸手術後癒着防止基材の開発

研究課題名（英文）　Application of hydrogels for adhesion prevention after thoracotomy

研究代表者
泉　陽太郎（IZUMI YOTARO）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：90245506

研究成果の概要（和文）：背景：ポリ（ガンマ-グルタミン酸）（PGA）は納豆菌が産生する生分解性ポリマーであり、いわゆる納豆の粘りの成分である。これを放射線照射により架橋したポリ（ガンマ-グルタミン酸）架橋体（PGAXL）は吸水しながら粘張なハイドロゲルを形成する。本実験では後側方開胸手術を想定したマウス創部癒着モデルを作成し、PGAXL の癒着防止効果について検討した。閉胸肋間と臓側肺胸膜間、閉胸肋間とその直上の筋層縫合部との間には中等度以上の癒着が見られたが、いずれの癒着も PGAXL 撒布により軽減される傾向が見られた。

研究成果の概要（英文）：Cross-linked poly (gamma-glutamic acid) (PGAXL) is a biodegradable polymer capable of forming a hydrogel. In the present study, using a mouse model of thoracotomy, we investigated whether local application of PGAXL could attenuate adhesion formation at the thoracotomy site. We found that local application of PGAXL attenuated adhesion formation at the site of thoracotomy between the lung and the parietal pleura as well as between the chest wall and the chest muscles..

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2007 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総　計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：胸部外科学
科研費の分科・細目：呼吸器外科学
キーワード：癒着、吸水性ハイドロゲル、ポリグルタミン酸架橋体

１．研究開始当初の背景

損傷を受けた組織の創傷面からは出血も含め滲出液が発生する。これらは凝固因子の作用により速やかに凝固し、創面局所に留まる。

さらにこの中に含まれる様々な因子が創傷治癒に向かうカスケードを惹起する。本来この創傷治癒カスケードは外傷を受けた場合、早期に創部局所を隔離し、感染などから個体を守るための防御メカニズムが主体となっていると考えられる。しかし、清潔な環境で行われ、創傷の程度や範囲も制御されている外科手術においては、この創傷治癒カスケードが過剰防衛になり得るという考え方が最近展開されている。術後の癒着や瘢痕形成などがこの例である。従って、清潔な外科手術においては、このカスケードに関与する因子を抑制することにより、癒着や瘢痕形成などが無い、より良好な創傷治癒が得られる可能性が指摘されている（Szpaderska AM et al, Surgery 2005）。創傷治癒に関わるサイトカインに対する抗体、ステロイド製剤、抗血管新生薬などが現在この目的で検討されている（Saba AA et al, Am Surg 1996）。これらの検討はまだ基礎実験の域を出ず、また全身投与による検討が多いため副作用に関する問題点が多い。今回申請者は局所的に創傷治癒を制御する方法として吸水性ゲルに着目した。

近年高分子の構造解析および設計技術の進歩が飛躍的に進んでいる。これに伴い様々な分野への高分子の応用が開始されている。なかでも高度な水分保持能力を有する吸水性ゲルは多彩な可能性を有している。吸水性ゲルを構成する多量体にはアクリル、アルコール、でんぷん、種々の樹脂などがあり、これらが様々な分子、結合を解して架橋体を形成している。個々の分子の長さや架橋条件などを調節することにより、粘度、吸水性、剤形などを任意に制御することができる。吸水性ゲルは主にその水分保持力により水害時の土嚢、砂漠の緑化、汚水の浄化、おむつ、化粧品などへの応用が展開されている。中でも生分解性を有する吸水性ゲルは環境への負担が少ないとともに生体への応用が期待できる。我々は現在主として砂漠の緑化、汚水の浄化や化粧品に応用されているポリグルタミン酸の架橋体に着目した。

納豆のネバネバの成分であるポリグルタミン酸の架橋体は生分解性吸水性ゲルの一種である。自重量の約 2000 倍の水分を保持できる（Shih IL et al, Bioresour Technol 2001）。凍結乾燥により粉末となり、創面にふりかけることにより容易に塗布することができる。ポリグルタミン酸架橋体を用いて申請者らが行なった予備実験では吸水性ゲルは創傷面において滲出液を随時吸収した。経時的に滲出液を吸水し膨潤したゲルを採取し、遠心後電気泳動を行なったところ様々なタンパクが検出された。吸水性ゲルの水分保持能力の機構に関しては不明な点も多いが、基本的には浸透圧勾配に従って吸水が進み、ある保持能力の臨界点を越えると再び周囲への拡散が起る。吸水性ゲルは創面から出た様々な因子を保持した後再び濃度勾配に応じて随時放出するため、創傷治癒過程を修飾し得ると申請者は考えた。

次に申請者らが行なったラット腹部腸管癒着モデルにおいて、ポリグルタミン酸架橋体は現在臨床応用されている Interceed や Seprafilm よりも有意な癒着抑制効果が見られた。（平均癒着スコア：無処置 3.4±1.1、ポリグルタミン酸架橋体 0.1±0.3＊、Interceed2.4±0.8、Seprafilm1.8±0.6）。また、ポリグルタミン酸架橋体は 48 時間後にはほぼ消失しており、この実験の範囲では明らかな副作用は見られなかった（Izumi Y et al, Surgery, submitted）。なおこのモデルにおいても消失前に膨潤した吸水性ゲルを採取することが可能であった。ゲルを遠心して得られた上清を用いて行なった電気泳動では様々なバンドが見られた。パターンは同時に採取した血漿に類似していたが、幾つか異なるバンドも見られた。開腹のみの場合と癒着を発生させた場合とにおいても、異なったバンドが見られた。ELISA を行なったところ、この中には IL6 などを含む創傷治癒に重要な因子が含まれていた。これらの結果から、創部より生じた複数の因子が一過性（おそらく 24〜48 時間）にゲルに保持されることによって、癒着が抑制された可能性が示唆された。

２．研究の目的

腹部外科領域に比べ、呼吸器外科領域における術後癒着防止に関する検討は少ない。腹部の手術後には腸閉塞という代表的な術後癒着による病態が存在するが、呼吸器外科領域にはこれほど顕著な術後癒着による弊害は存在しない。胸腔内においては、術後の出血や肺漏、細かな気管支断端漏、リンパ漏などが癒着によって防止され、癒着がむしろ有利に働いている可能性がある。しかし、その反面画像診断の進歩により早期肺癌の検出率も高まり、転移性肺腫瘍や二次癌は増加傾向にあり、呼吸器外科領域における複数回手術の可能性は増加している。また、気胸の再発においても癒着による拡張不良や空気漏れの遷延、再手術の難しさなどが問題となる場合がある。術後の癒着が有効に防止できれば胸腔鏡手術の適応も増え、技術的にも容易になると考えられる。さらに、癒着は残存肺機能を少なからず減少させていると考えられる。申請者らは呼吸器外科領域においてフィブリン糊製剤の応用を検討してきたが（Kawamura M et al、Eur J ThoracCardiovasc Surg 2006、Izumi Y et al、

J Trauma 2006 in press、Gika M et al、Int CardiovascThoracic Surg 2006 in press）癒着防止効果についてはいずれも十分とは言えなかった。一方、このような実験により、開胸手術における癒着形成モデルには習熟した。

本研究では前述した予備実験の結果に立脚して、吸水性ゲルの癒着防止効果をラットを用いた開胸肺手術において検討する。開胸肺手術における癒着は切離した胸壁の筋肉間、開胸した肋間と胸壁、開胸した肋間と肺、臓側肺胸膜と壁側胸膜の間に発生する可能性があるので各々について検討する。その癒着防止効果を現在主として腹部領域で臨床使用されている癒着防止基材と比較検討した

３．研究の方法
ラット、マウスを用いた開胸癒着モデル
（モデル作成と手術の実施、術後管理、検体採取：朝倉、泉、癒着のスコア化：川村）

動物種あるいは系統によって癒着の形成程度が異なる可能性がある。本実験では動物種ラットとして雄 Donryu rat、マウスとして C57BL/6 を用いた。

現在までの予備実験ですでに確立された開胸モデルを応用した。全身麻酔下に左半身を剃毛、消毒後経口挿管を行い人工呼吸器管理とした。左側臥位にて固定する。人間における後側方切開に準じ、肩甲骨の尾側に沿って皮膚切開をおく。電気メスを用いて後背筋、前鋸筋を切開し肋骨に至る。第 5 肋間で肋間筋を切開し右開胸を行った。

開胸手術における癒着形成部位として下記を各々検討する。
（１）開胸創における後背筋と前鋸筋間の癒着および前鋸筋と肋間開胸創の癒着。
（２）肋間開胸創と肺の間の癒着。
（３）壁側胸膜損傷＋臓側胸膜損傷モデル。

（１）この群では開胸は行なわない。後背筋と前鋸筋を切開した後縫合する。縫合の際に胸壁と前鋸筋および前鋸筋と後背筋の間に試験基材を留置する。Interceed と Seprafilm は縫合部分同士を隔絶する大きさに切って使用する。フィブリン糊とポリグルタミン酸架橋体粉末は縫合部分を十分覆うように塗布する。無処置群も設定し比較する。

（２）この群では第 5 肋間で開胸する。開胸創直下の肺胸膜面に試験基材を留置し、陽圧換気で肺を膨らませながら肋骨を糸で寄せて閉胸する。Interceed と Seprafilm は開胸肋間を十分に覆う大きさに切って使用する。フィブリン糊とポリグルタミン酸架橋体粉末は開胸部分を十分覆うように塗布する。無処置群も設定し比較する。胸壁の筋肉は１）と同様に閉創する。この群では胸壁部分には試験基材は使用しない。人工呼吸器より序々に離脱させ、抜管し生存させる。

（３）この群では第 5 肋間で開胸する。右肺前葉および後葉を約 5mm四方を電気メスで焼灼する。過度の空気漏れが生じないように低電圧で行なう。またその部位に対応する壁側胸膜も電気メスで焼灼する。臓側と壁側胸膜焼灼創部間に試験基材を留置する。Interceed と Seprafilm は創部を十分に覆う大きさに切って使用する。フィブリン糊とポリグルタミン酸架橋体粉末は創部を十分覆うように塗布する。臓側と壁側胸膜焼灼創部が相対するように肺を膨らませながら閉胸する。この群では胸壁部分には試験基材は使用しない。人工呼吸器より序々に離脱させ、抜管し生存させる。

処置後１、２、３、７、１４、３０日目に癒着の程度をスコア化して評価する（0 点：癒着なし、1 点：鈍的剥離可能、2 点：鋭的剥離 50%以下、3 点：鋭的剥離 50%以上、4 点：胸膜損傷）。また、胸壁、胸膜、肺などを採取し、病理組織学的評価を行なう。炎症性細胞浸潤、中皮細胞の分裂、胸膜の厚さなどを評価し、癒着スコアとの相関を検討する。また、試験基材間で比較検討する。実験（２）と（３）では評価開胸時に胸腔内を PBS5ｍｌで洗浄し、洗浄液を採取する。タンパク解析、ELISA のため遠心後－80℃で保存する。癒着防止効果が不十分であった場合、予備実験で行った腹部腸管癒着モデルとは関与するサイトカインが異なる可能性などを勘案しなければばらない。また病理所見を参考にして架橋形成条件を変えたり、ポリグルタミン酸以外の多量体の使用を検討する。

４．研究成果
本研究は安定した癒着形成モデルの確立が最重要課題である。このため初年度である２００７年度は主にラットを用いた安定した開胸癒着モデルの確立を目指した。
（モデル作成と手術の実施、術後管理、検体採取：朝倉、泉、癒着のスコア化：川村）

動物種あるいは系統によって癒着の形成程度が異なる可能性があるため、本実験では動物種としてラットを用い、2 系統、雄 Wistar rat と雄 Donryu rat を先ず試験した。

予備実験によりすでに確立された開胸モデルを応用した。全身麻酔下に左半身を剃毛、消毒後経口挿管を行い人工呼吸器管理とす

る。左側臥位にて固定する。人間における後側方切開に準じ、肩甲骨の尾側に沿って皮膚切開をおく。電気メスを用いて後背筋、前鋸筋を切開し肋骨に至る。第 5 肋間で肋間筋を切開し右開胸を行なう。

開胸手術における癒着形成部位として下記を各々予備的に検討した。
（１）開胸創における後背筋と前鋸筋間の癒着および前鋸筋と肋間開胸創の癒着。
（２）肋間開胸創と肺の間の癒着。
（３）壁側胸膜損傷＋臓側胸膜損傷モデル。
損傷方法についても予備的検討を行った。
ラットは経口挿管、開胸操作などが容易であり、手技的習熟には適していたが、胸壁の厚み、肺胸膜の脆弱性などのために必ずしも再現性のあるモデル構築が容易ではなかった。

2008 年度ではラットに比べ分子生物学的解析なども将来的により容易であると想定されるマウスを用いた実験を主体に行った。気管内挿管など一部の手技がラットより困難であったが、安定した開胸手技が確立された。全身麻酔下に左半身を剃毛、消毒後経口挿管を行い人工呼吸器管理とする。左側臥位にて固定する。人間における後側方切開に準じ、肩甲骨の尾側に沿って皮膚切開をおく。電気メスを用いて後背筋、前鋸筋を切開し肋骨に至る。第 5 肋間で肋間筋を切開し右開胸を行った。ラットにおける検討と同様に開胸手術における胸膜損傷癒着形方法として下記を各々検討した。（１）壁側胸膜損傷＋臓側胸膜損傷モデル、（２）綿棒、メス刃による擦過。（３）電気メス焼灼。しかし、ラットに比べ呼吸回数が多い影響か、胸腔内癒着の形成率は低い印象であった。肋骨に沿って開胸した部位と肺との間にも軽度の癒着のみ見られる場合もあった。電気メスによる壁側胸膜の焼灼のみでは、軽度の癒着形成しか見られなかった。臓側胸膜の焼灼を追加すると焼灼部位どうしの癒着が見られた。また臓側および壁側胸膜の綿棒による擦過では高率に癒着形成が見られた。ポリグルタミン酸架橋体により形成されるハイドロゲルはこれらの癒着を高率よく抑制した。これに対し予備実験ではあるが、臨床応用されているヒアルロン酸シートは、シート自体との間に癒着が形成される確率が高いと考えられた。しかし、電気メス焼灼、綿棒擦過ともに臓側胸膜処置時に出血を来たす場合が多く、モデルが安定しなっかた。

2009 年度は追加損傷は与えずに肋骨に沿って開胸した部位と肺臓側胸膜との間および開胸部位と胸壁の筋肉との間に比較的安定し、スコア化可能な癒着がみられた。このため肋間閉胸方法と筋肉縫合方を一定にして検討を行った。開胸肋間を１つ頭側にして第 4 肋間とすることにより、さらにモデルは安定化した。

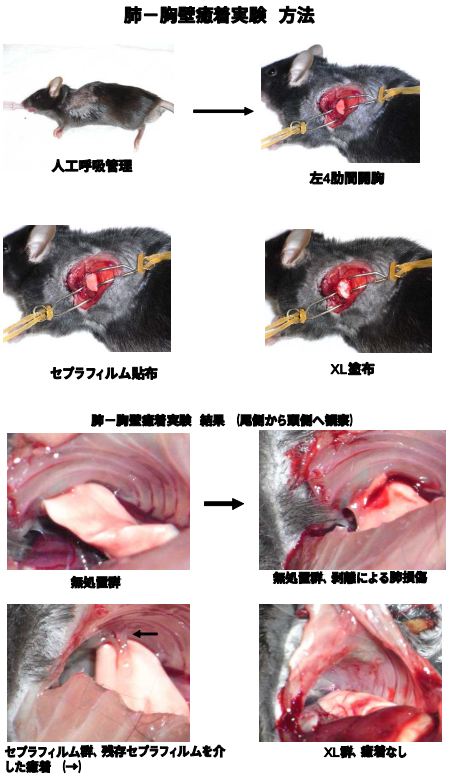
引き続き本モデルを用いて肺と胸壁間および胸壁と筋層間の癒着評価を行った。
肺－胸壁癒着実験
第 4 肋間開胸→肺表面に比較群の処置→閉胸→閉創。１週間後に癒着評価。

胸壁－筋層癒着実験
第 4 肋間開胸→閉胸→閉胸肋間上に比較群の処置→閉創。１週間後に癒着評価。

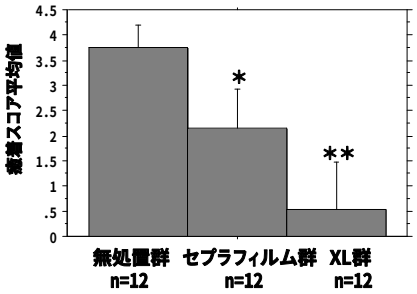
比較群
無処置群：開閉胸のみ
セプラフィルム群：セプラフィルム（シート）約 5x3㎜ を介在。
XL 群：PGAXL（粉末、約 20ｍｇ）を散布。

癒着スコア
0：癒着なし
1：鈍的に剥離可能な軽度の癒着
2：鋭的剥離が 5 割以下
3：鋭的剥離が 5 割以上
4：剥離時に創面に損傷

平均値を群間比較評価。

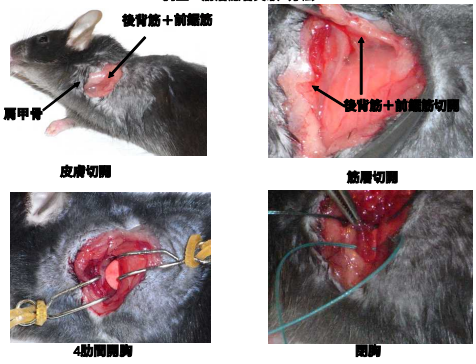


肺－胸壁癒着実験　癒着スコア



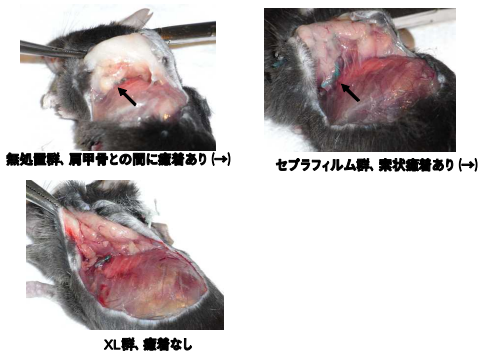
＊p<0.05 vs 無処置群
＊＊p<0.05 vs 無処置群とセプラフィルム群

胸壁－筋層癒着実験　方法

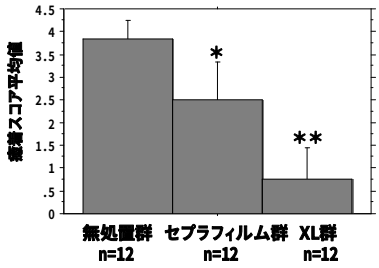


胸壁－筋層癒着実験　方法（続き）

胸壁－筋層癒着実験　結果



胸壁－筋層癒着実験　癒着スコア



＊p<0.05 vs 無処置群（Mann-Whitney U test）
＊＊p<0.05 vs 無処置群とセプラフィルム群（Mann-Whitney U test）

ポリグルタミン酸架橋体により形成されるハイドロゲルはこれらの癒着を効率よく抑制した。これに対しすでに臨床応用されているヒアルロン酸シートは、シート自体との間に癒着が形成される頻度が高い可能性が示唆された。本実験モデルでは XL の開胸創部癒着軽減効果が示唆された。創部周辺からの浸出液を吸水してゲルを形成し創面を覆うことが作用機序の一端と推測されるが今後検討を要する。

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　1 件）
Izumi Y, Kawamura M, Gika M, Nomori H. Granulation tissue formation at the bronchial stump is reduced after stapler closure in comparison to suture closure in dogs. Interact Cardiovasc Thorac Surg 10; 356-359: 2010.査読有り

〔学会発表〕（計　1 件）
泉陽太郎、朝倉啓介、高橋祐介、河野光智、川村雅文、渡辺真純、堀之内宏久、野守裕明。マウス開胸創部癒着モデルにおいてポリ（ガンマ-グルタミン酸）架橋体の局所投与は癒着を軽減する。第 60 回日本胸部外科学会年次大会、東京(2009.10.15)

〔図書〕（計　０件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　０件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計　0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
なし

６．研究組織
(1)研究代表者
泉　陽太郎（IZUMI　YOTARO）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：9024556

(2)研究分担者
朝倉　啓介（ASAKURA KEISUKE）
慶應義塾大学・医学部・研究員（非常勤）
研究者番号：90383786

川村　雅文　（KAWAMURA　MASAFUMI）
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号：70169770

(3)連携研究者
なし