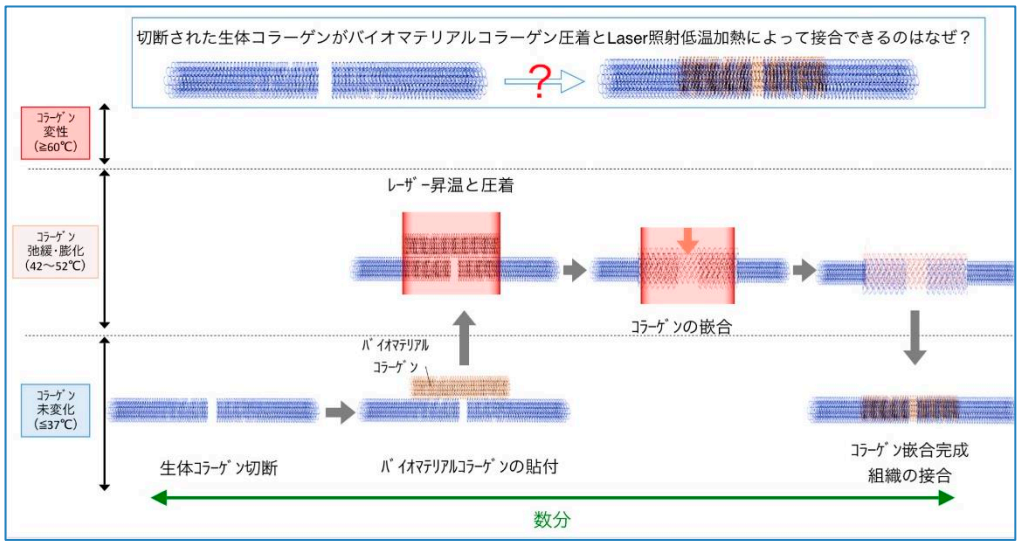
73　Collagen嵌合現象を応用したLaser組織接合機開発-研究	池田　哲夫

【目的】1. 組織コラーゲン嵌合のための至適温度と照射範囲を色の変化で感知するカラーレギュレート方式 Laser 照射装置を開発する。2. *ex vivo* で実証した生体コラーゲン分子の嵌合現象（interdigitation）を応用した動脈接合技術を、*in vivo*（大動物実験）で検証し臨床応用へ繋げる。

【方法】全身麻酔科にビーグル犬の両側大腿動脈を露出させ、横軸方向に 1／3 周の全層切開を加えた。両側大腿動脈の内、片側を 7-0 prolene にて縫合閉鎖、他側をバイオマテリアルコラーゲンを添付しテフロンフィルムで周囲を覆い圧着した。照射する切開部の温度を放射温度計で同時計測し、3 秒間 42～52℃が出来るようにコンピュータ制御された波長 1,940 nm のファイバーレーザーをコラーゲン被覆された切断部に照射した。止血を確認し閉創した。予備実験の 2 頭のみ、翌日大腿動脈の開存の有無などを確認し両側の接合部を病理標本として摘出し、本実験の 5 頭は 14 日後に同様に確認し摘出した。

【結果】7 頭全例でコラーゲン嵌合閉鎖および縫合閉鎖に成功した。予備実験の 2 頭は翌日まで本実験の 5 頭は術後 14 日目まで出血などの併発症を認めず、動脈の開存をドプラー血流計で確認した後に、標本として吻合部を摘出した。

Laser 照射低温加熱によるバイオマテリアルコラーゲンをブリッジとした生体コラーゲン接合技術の原理



73. Collagen 嵌合現象を応用した Laser 組織接合機開発-研究

池田　哲夫

福岡歯科大学 総合医学講座 内視鏡センター

Key words：Collagen 嵌合現象，バイオマテリアル Collagen，組織 viability，組織接合，Laser 照射

緒　言

Collagen 嵌合化 Laser 組織接合技術とは、現在の外科手技のおける組織接合は主に針糸による縫合や Stapler による機械的接合あるいは電気メスや超音波凝固切開装置などの高周波電気手術機器による組織の脱水固定である。しかし、これらの手技は、刺入による組織損傷、過剰な圧迫による血流障害、高温加熱による不可逆的なタンパク変性熱損傷を伴い、それらは創傷治癒の妨げとなっている。昨今の外科手技においては機能温存が重要視されるため、組織を viable な状態のまま接合できる技術の開発が切望されている。

我々は 2014 年からウシの動脈を用いた実験に取り組み、collagen の fibril が結束した血管外膜の collagen fiber は 46℃の加熱によりで結束が弛緩し膨化することを明らかにした。この結果を元に、バイオマテリアル Collagen シートをブリッジとして Laser を用いて非接触に組織として viability を維持できる低温加熱実験を行った。この結果、光学顕微鏡および電子顕微鏡で血管外膜の Collagen fibril とバイオマテリアル Collagen の fibril が密に嵌め合った嵌合現象を観察することに初めて成功し、更にウシ頸動脈摘出血管を用いた *ex vivo* 実験にて Collagen 嵌合による接合実験を行い、生体の血圧を超える 300 mmHg に耐える接合に成功しその成果を、Scientific Reports 誌に発表した［1］。また、臨床応用可能な技術として、カラーレギュレート方式 Laser 照射による組織嵌合システムを考案し、原理となる特許を九州大学より出願した（特願 2018-037082、2018 年 3 月 2 日、池田哲夫）。開発目標：バイオマテリアル Collagen を Bridge とした組織接合の原理がヒトへの応用可能性を見極めるため、対象に分けて、今回のシステムの要素となる 1. バイオマテリアル Collagen シート、2. カラーレギュレート方式 Laser 照射装置、3. 対象臓器、組織に適応した圧着器具、大動物で *in vivo* 実験を行い短期的、長期的な成績を検討することによって原理を検証し臨床応用可能な製品仕様を決定する。

方　法

イヌ、ビーグル、マーシャル雄 5 匹を試験動物とし、左大腿動脈／コラーゲンによる接合、右大腿動脈／縫合糸による接合を行った。

観察項目は対象の 5 匹／群に対して 2 ポイント（24 時間、14 日目）において吻合部の状態を、測定方法としてエコー、組織学的検査において血流、血管壁厚、癒着の観察、組織学的検査（大腿動脈／HE 染色）をおこなった。剖検日は塩酸メデトミジン（ドミトール、1.0 mg/mL、Orion Corporation、0.04 mL/kg）、ミダゾラム（ドルミカム注射液 10 mg、丸石製薬株式会社、0.04 mL/kg）及び酒石酸ブトルファノール（ベトルファール 5 mg、5 mg/mL、Meiji Seika ファルマ株式会社、0.02 mL/kg）の混合液剤を筋肉内投与し動物を鎮静化させ、動物を解剖台に乗せ、速やかに気管内挿管し、人工呼吸器付き全身麻酔装置を用いて窒素と酸素（2：1）と 0.5～5.0%のセボフルランの混合ガスによる調節呼吸を行った後、塩酸アチパメゾール（アンチセダン、5.0 mg/mL、Orion Corporation、0.04 mL/kg）を筋肉内投与し、動物用モニタ（BSM-2391 あるいは BSM-3592、日本光電株式会社）を用いて非観血圧、心拍数、心電図、SpO_2をモニタし、超音波診断装置（SONOS7500、株式会社フィリップス エレクトロニクス ジャパン）を用いて、適応部位の血流（開存の有無）を検査した。電気手術器を用いて大腿部を切開し、適応部位を露出させ血流状態及び残存被験物質等を肉眼的に観察した後、縫合大腿動脈を夫々摘出し電顕および光学顕微鏡標本として保存液に浸透した。

結　果

7 頭全例でコラーゲン嵌合閉鎖および縫合閉鎖に成功した。予備実験の 2 頭は翌日まで本実験の 5 頭は術後 14 日目まで出血などの併発症を認めず、動脈の開存がドプラー血流計で確認した後に、標本として吻合部を摘出した。

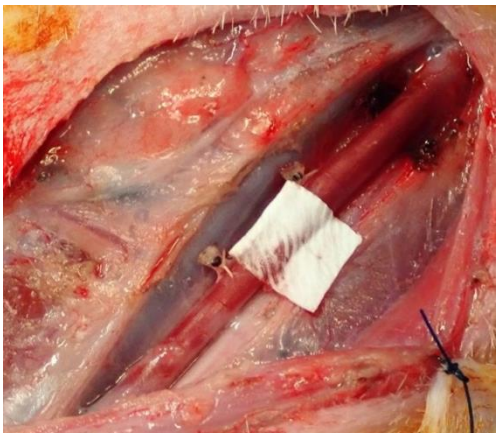


図 1. 外径 3 mm の左大腿動脈にφ1 mm の切開を加え、コラーゲンシートを圧着させ Laser 照射直後の状態
シート中央部が穿刺部、シーは乾燥した状態で動脈血流は再開されており出血を認められなかった。



図 2. 外径 3 mm の左大腿動脈にφ1 mm の切開を加え、コラーゲンシートを圧着させ Laser 照射後 60 分の状態
シート中央部が穿刺部、シーは水分を吸収しているが動脈血流は保たれており、出血を認められなかった。

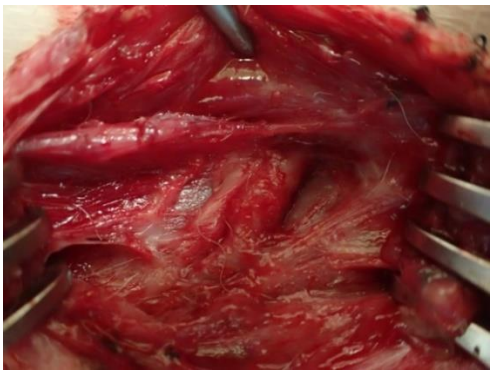


図 3. 外径 3mm の左大腿動脈にφ1mm の切開を加え、コラーゲンシートを圧着させ Laser 照射後閉創し麻酔覚醒後飼育室に移して 14 日間飼育後、全麻下に再開創し吻合部を観察した状態
シートは周囲組織と癒着しているが、動脈血流は保たれており、出血を認められなかった。

表1. 吻合実験前後の血液生化学Data

No.	WBC			NEUT			Hb			CK		
	pre	1POD	14POD	pre	1POD	14POD	pre	1POD	14POD	pre	1POD	14POD
1	10170	12370	10870	51	62.1	57.2	15.2	15.6	16	122	255	116
2	13990	19580	15770	55.9	65.9	64.5	16.8	15.7	16.3	115	2386	84
3	10800	16660	18130	60.1	73	69.6	16.4	15.4	16.9	93	2410	97
4	11640	20870	11400	55.6	75.2	57.7	17.2	15.7	16.1	192	22483	103
5	10380	19640	11370	57.1	81.5	62.6	15.1	17.1	15.2	111	4602	514

術後1日目（1POD）では炎症所見とCKの値の上昇を認めるが、14日後（14POD）では術前値に戻っている。

考　察

バイオマテリアルコラーゲンとレーザー接合技術を応用することによって、組織損傷によって発生する出血、硬化、脱水、炭化を伴わない。また、損傷した組織の創傷治癒過程で発生する、止血、増殖（肉芽形成）を促進させるだけでなく、1. 現在困難な末梢および、現在不可能な脊髄等の中枢神経の再生を可能とし、神経移植の道を開く、2. 骨融合を短時間で完成させ、プレートやスクリュー不要な骨接合を可能とする、3. 動脈硬化、炎症、虚血等によって組織癒合が困難な状態での再生を可能とする、4. 現在、低侵襲性から外科手術に広く適応されるようになったが、吻合操作自体が技術的に困難である、内視鏡外科手術あるいは内視鏡治療において止血、再建を容易とし適応を広げる、5. 血流の無い組織(軟骨、コラーゲン嵌合技術は、生体組織の変性を伴うことのない組織接着性の高い革新的技術であり、現在の外科治療に革新をもたらすプラットフォーム技術である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、光産業創成大学院大学光産業創成研究科光産業創成専攻光加工・プロセス分野の沖原伸一朗先生である。

文　献

1) Shun Sasaki Tetsuo Ikeda , Shin-Ichiro Okihara , Shotaro Nishimura , Ryu Nakadate , Hiroshi Saeki , Eiji Oki , Masaki Mori , Makoto Hashizume , Yoshihiko Maehara· Principles and Development of Collagen-Mediated Tissue Fusion Induced by Laser Irradiation. Sci Rep, 9 (1), 9383 2019 Jun 28 Affiliations expand PMID: 31253820 PMCID: PMC6598983 DOI: 10.1038/s41598-019-45486-4

2) Nakadate R, Omori S, Ikeda T, Akahoshi T, Oguri S, Arata J, Onogi S, Hashizume M: Improving the strength of sutureless laser-assisted vessel repair using preloaded longitudinal compression on tissue edge. Lasers Surg Med,49:533-538,2017. PMID: 28129436, DOI: 10.1002/lsm.22621

3) Schober, R., Ulrich, F., Sander, T., Dürselen, H. & Hessel, S. Laser-induced alteration of collagen substructure allows microsurgical tissue welding. Science **232,** 1421-1422 (1986). PMID: 3715454, DOI: 10.1126/science.3715454

4) Nishimura, S. et al. Immunohistochemical and scanning electron microscopic comparison of the collagen network constructions between pig, goat and chicken livers. Anim. Sci. J. **80,** 451-459 (2009). PMID: 20163607, DOI: 10.1111/j.1740-0929.2009.00660.x