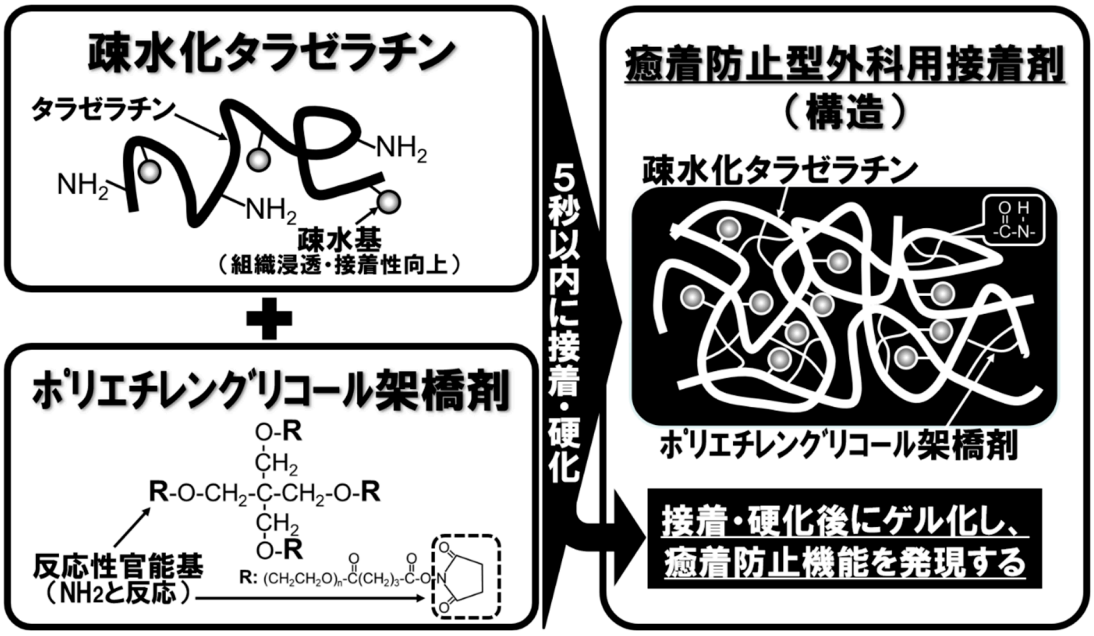
86　硬化後に癒着防止機能を有する外科用接着剤の開発	田口　哲志

【目的】腹腔鏡を用いた消化器外科手術においては、縫合だけで創部を閉鎖し、その後に生じる癒着を防止することは困難であり、外科用接着剤や癒着防止剤が必要となる。既存の外科用接着剤や癒着防止剤は、接着能あるいは癒着防止能の単独機能しか有していないため、外科手術における術部の精密な管理には、①創部の閉鎖には外科用接着剤を使用し、②創部と周辺組織との癒着を防止するために癒着防止剤を適用するという 2 種類の生体材料を用いた処置が必要となっている。本課題では、第 1 成分を「疎水化タラゼラチン」、第 2 成分を「ポリエチレングリコール（PEG）架橋剤」とする「癒着防止型外科用接着剤」を開発し、新鮮ブタ大腸組織に対する接着性試験および癒着防止効果の *in vitro* および *in vivo* 評価を行い、単独の生体材料で接着能と癒着防止能を実現が可能かどうかを検証した。

【方法】スケソウダラ由来ゼラチン（ApGltn）中のアミノ基をオクタナールで修飾した疎水化タラゼラチン（C8-ApGltn）を合成した。得られた C8-ApGltn 中のアミノ基を、末端にスクシンイミジル基を有するポリエチレングリコール系架橋剤により *in situ* 架橋することで、接着剤を得た。生体接着能・癒着防止能の *in vivo* 評価モデルとして、ラット盲腸への擦過傷形成および腹膜切除部位形成により、癒着評価モデルを作製した。擦過傷形成部および腹膜切除部位形成部に、癒着防止型外科用接着剤を適用後、1 週および 2 週後に開腹し、癒着レベルのスコア化により癒着形成を定量化した。さらに、癒着面周辺組織を取出し、ヘマトキシリンーエオジン（HE）染色により材料への細胞浸潤、炎症反応を観察した。

【結果】下図左には、ラット盲腸ー腹膜癒着モデルに、開発した接着剤、市販接着剤（Fibrin）および市販癒着防止膜（HA/CMC）を適用し 1、2 週後の外観を示す。未処理および Fibrin において癒着の形成が認められ、HE 染色においても盲腸ー腹膜間に明らかに癒着組織（POA）層が認められた。一方、癒着の程度をスコア化した結果から、未処理および Fibrin においてのみ、癒着スコアが高いことが明らかとなった。一方、C8-ApGltn 接着剤、未処理タラゼラチン（Org）接着剤および HA/CMC においては、外観および組織写真において癒着が認められなかった。摘出大腸組織に対する *in vitro* 耐圧（シーリング）強度の評価結果および *in vitro*、*in vivo* 癒着防止効果の評価結果から、C8-ApGltn 接着剤は、強固に組織欠損部に接着することでシーリング・接着効果を示し、硬化後の接着剤は癒着防止効果を発現することが明らかとなった。

本研究の概念図



86. 硬化後に癒着防止機能を有する外科用接着剤の開発

田口　哲志

物質・材料研究機構 機能性材料研究拠点 バイオ機能分野 バイオポリマーグループ

Key words : 外科用接着剤，癒着防止，ゼラチン，疎水化，ポリエチレングリコール

緒　言

外科手術の件数は高齢者人口の増加とともに増加し、手技の低侵襲化に伴い難易度が高度化している。腹腔鏡を用いた消化器外科手術においては、縫合だけで創部を閉鎖し、その後に生じる癒着を防止することは困難であり、外科用接着剤や癒着防止剤が必要となる。消化器外科手術後には、創部と周辺組織・臓器との間で癒着が高頻度に生じるため、創部に適用する生体材料には「単独」で、①硬化時において接着して創部を閉鎖する「生体接着能」を有し、②硬化後には周辺組織・臓器と接着しない「癒着防止能」を有するという相反する機能が求められる。

表 1 には臨床で使用されている外科用接着剤および癒着防止剤の主な特徴を示す。シアノアクリレート系および生体高分子－アルデヒド系接着剤は、生体接着能に優れているものの、生体親和性が低いため、炎症が生じ癒着が促進される。そのため、消化器外科手術には、フィブリン系接着剤が使用される場合が多いが、この接着剤は生体接着能が十分ではなく、接着剤硬化物が細胞の足場となるため癒着が促進されるという課題もある。一方、臨床で使用されている癒着防止剤は、デキストリン系（スプレータイプ）およびセルロース系（シート状）に大別される。これらの癒着防止剤は効果的に癒着を防止するものの、生体組織に対する接着性を有していないため、目的部位への固定が困難であるという課題がある。このように、外科手術における術部の精密な管理には、①創部の閉鎖には外科用接着剤を使用し、②創部と周辺組織との癒着を防止するために癒着防止剤を適用するという 2 種類の生体材料を用いた処置が必要となっている。

本課題では、第 1 成分を「疎水化タラゼラチン」、第 2 成分を「ポリエチレングリコール（PEG）架橋剤」とする「癒着防止型外科用接着剤」（図 1）を開発し、新鮮ブタ大腸組織に対する接着性試験および癒着防止効果の *in vitro* および *in vivo* 評価を行った［1，2］。

表 1. 既存の外科用接着剤および癒着防止剤の種類と主な特徴

外科用接着剤／癒着防止剤の種類		生体接着能（硬化時）	癒着防止能（接着・硬化後）	生体親和性	分類
接着剤	シアノアクリレート系	○高い	癒着促進	×低い	医療機器
	生体高分子－アルデヒド系	○高い	癒着促進	×低い	医療機器
	フィブリン系	×低い	癒着促進	○高い	医薬品
癒着防止剤	セルロース系	なし	○高い（接着しない）	○高い	医療機器
	デキストリン系	なし	○高い（接着しない）	○高い	医療機器
本課題の癒着防止型外科用接着剤		**○高い**	**○高い**	**○高い**	**医療機器**

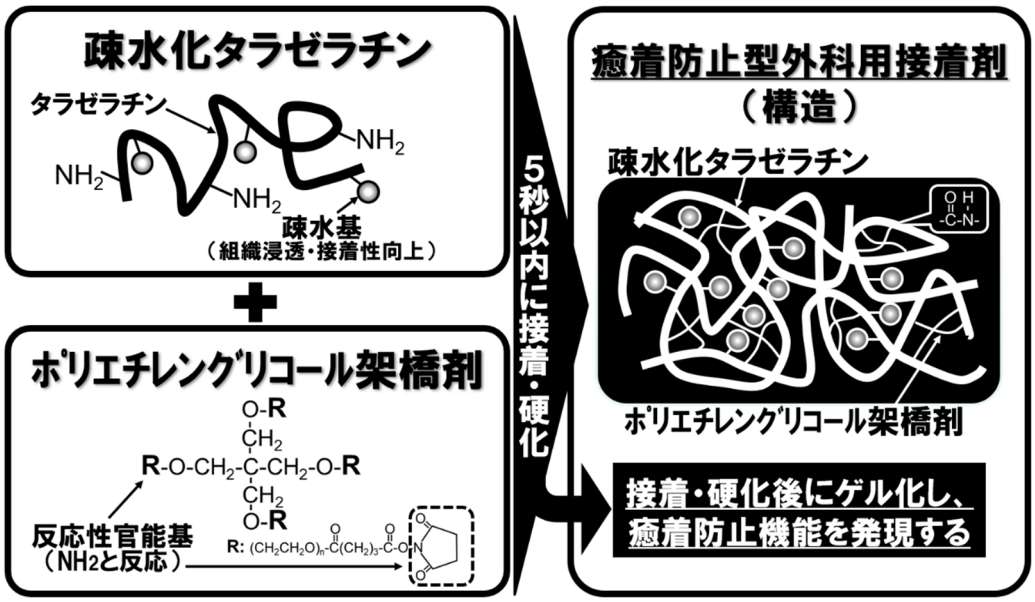


図 1. 本研究の概念図

疎水化タラゼラチンとポリエチレングリコール架橋剤から構成される 2 成分系外科用接着剤を癒着モデルに適用すると対象部位に接着・硬化後、癒着防止機能を発現した。

方　法

1. 疎水化タラゼラチンの合成とキャラクタリゼーション

スケソウダラ由来ゼラチン（ApGltn）中のアミノ基をオクタナールで修飾した疎水化タラゼラチン（C8-ApGltn）を合成した［3］。水 - エタノール混合溶媒中でオクタナールを ApGltn 中のアミノ基と反応させた後、得られるシッフ塩を還元して合成した。オクタナールの仕込み濃度を ApGltn のアミノ基に対し 10 mol%として C8-ApGltn を合成した。得られた C8-ApGltn の核磁気共鳴装置（^{1}H-NMR、^{13}C-NMR）、フーリエ変換赤外吸収スペクトル（FT-IR）および残存アミノ基の定量によりキャラクタリゼーションを行った［4，5］。

2. 癒着防止型外科用接着剤の調製と物理化学的評価

オクチル基を導入した C8-ApGltn 中のアミノ基を、末端にスクシンイミジル基を有するポリエチレングリコール系架橋剤により *in situ* 架橋することで、C8-ApGltn ゲルを得た。得られたゲルの 37℃生理食塩水中における膨潤挙動を追跡し、疎水基導入の有無と膨潤度との関係を検討した。

3. 癒着防止型外科用接着剤の細胞接着性評価

ディスク状に成型した C8-ApGltn ゲル上に細胞を播種することにより、細胞接着性について評価した。細胞には、臓器・組織の癒着に関与する L929 マウス繊維芽細胞を使用した。

4. 癒着防止型外科用接着剤の *in vitro* 生体接着能・癒着防止能評価

癒着防止型外科用接着剤を新鮮ブタ摘出大腸組織表面に塗布し、ASTM の規格に則った評価法により生体接着能（シーリング強度）、接着剤適用後の癒着防止能を評価した。具体的には、φ3 mm の欠損部を作製したφ30 mm の新鮮ブタ大腸表面に接着剤を厚さ 1 mm、φ15 mm で塗布して試料台に設置し、その後生理食塩水を装置下部から導入して破裂した圧力を耐圧強度とした。耐圧強度試験後、大腸組織と癒着防止型外科用接着剤との剥離界面をヘマトキシリンーエオジン（HE）等により組織染色し、剥離界面の観察を行った。

5. 癒着防止型外科用接着剤の *in vivo* 生体接着能・癒着防止能評価

生体接着能・癒着防止能の評価モデルとして、既報［6］を参考にし、ラット盲腸への擦過傷形成および腹膜切除部位形成により、癒着評価モデルを作製した。擦過傷形成部および腹膜切除部位形成部に、癒着防止型外科用接着剤を

適用後、1 週および 2 週後に開腹し、癒着レベルのスコア化により癒着形成を定量化した。さらに、癒着面周辺組織を取出し、HE 染色により材料への細胞浸潤、炎症反応を観察した。

結果および考察

1. 疎水化タラゼラチンの合成とキャラクタリゼーション

一般にゼラチンは水溶液を低温で放置するとゲル状となるが、ApGltn は、低イミノ酸含量のために低温でも液状である。そのため、緊急時に加温せずに使用できるという長所がある。そこで、ApGltn 中のアミノ基をデカナール（C8）で修飾した C8-ApGltn を合成した。デカナールの仕込み濃度をタラゼラチンのアミノ基に対して 10 mol%とすることにより、導入率が 7.2 mol%の C8-ApGltn を合成した。得られた C8-ApGltn の核磁気共鳴装置（^{1}H-NMR、^{13}C-NMR）、FT-IR 等によりキャラクタリゼーションを行い、デカナールにより置換された ApGltn に特徴的なピークがあることを確認した。

2. 癒着防止型外科用接着剤の調製と物理化学的評価

C8-ApGltn をポリエチレングリコール系架橋剤により架橋することで癒着防止型接着剤硬化物（ゲル）を得た。得られたゲルの 37℃生理食塩水中における膨潤挙動を評価した結果、疎水基導入の有無にかかわらず、どの条件においても経時的に膨潤度が増加した。また、定量的な膨潤度測定の結果、膨潤度は、24 時間でほぼ平衡に達することが明らかとなった。

3. 癒着防止型外科用接着剤の細胞接着性評価

癒着防止型外科用接着剤硬化物表面に L929 繊維芽細胞を播種後 24 時間培養して細胞数を比較した。比較サンプルとして接着剤のフィブリン（Fibrin）および癒着防止剤のセプラフィルム（HA/CMC）を用いた。癒着防止型外科用接着剤硬化物上への細胞接着性は Fibrin および HA/CMC と比較してやや低い傾向があった。疎水基の有無に対する細胞接着性の差は認められなかった。一方、癒着防止型外科用接着剤硬化物上での細胞数は、播種後の細胞数と比較して増加した。このことから、疎水化の有無にかかわらず、細胞に対する適合性を有していることが明らかとなった。

4. 癒着防止型外科用接着剤の *in vitro* 生体接着能・癒着防止能評価

図 2a には、ASTM の規格に則り大腸に対する直径 3 mm の欠損部に対する耐圧（シーリング）効果を評価した結果を示す。C8-ApGltn を用いた接着剤は、未処理タラゼラチン（Org）接着剤あるいは Fibrin, HA/CMC と比較し、有意に高い耐圧強度を示した。これは、タラゼラチンに導入した疎水基（C8）が大腸の細胞外マトリックスあるいは細胞成分と強く相互作用することによるものと考えられた。一方、図 2b には、C8-ApGltn 接着剤を大腸に塗布後、一定時間後に別の大腸組織を貼付した際の接着強度変化を ASTM の規格に則り評価した結果を示す。接着強度は、C8-ApGltn 接着剤適用後、急激に減少し、60 秒後においてはほとんど接着しなくなった。この結果は、C8-ApGltn 接着剤は対象部位に接着した後、60 秒以降においては接着しない（すなわち、癒着防止機能を有する）ことを示唆していると考えられた。

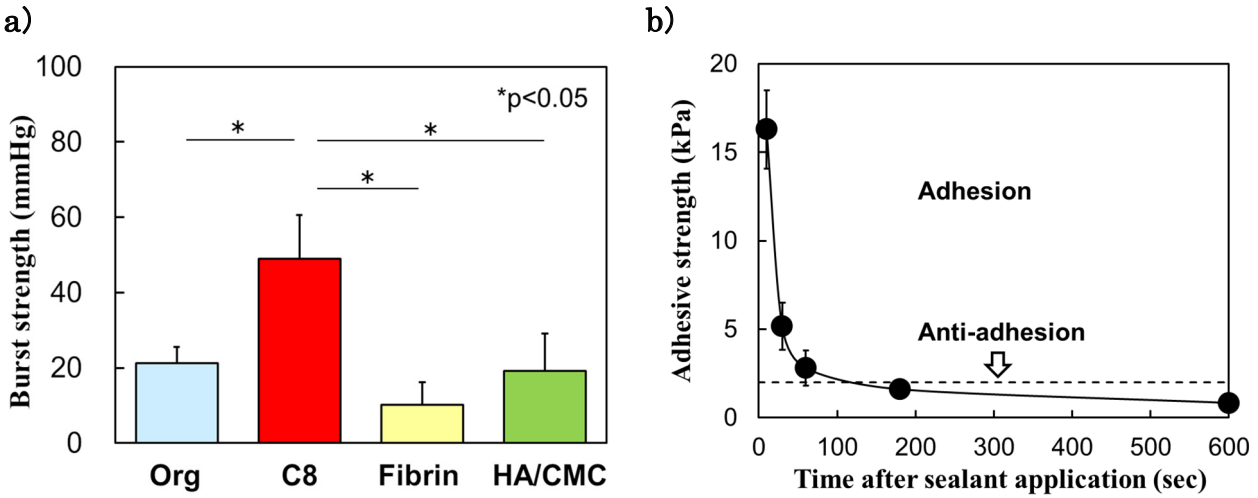


図 2. 癒着防止型外科用接着剤の耐圧（シーリング）強度・接着および非着性

a) ブタ摘出大腸に対するシーリング強度比較：開発した接着剤は市販接着剤（Fibrin）と比較して有意に高い耐圧強度を示した（Welchi's t-test、*p＜0.05）。

b) 大腸に対する接着／非接着の時間依存性：接着強度の時間依存性を評価すると、組織に接着剤を適用して 60 秒後には非接着性を示すことが明らかとなった。

5. 癒着防止型外科用接着剤の *in vivo* 生体接着能・癒着防止能評価

図 3 には、ラット盲腸ー腹膜癒着モデルに開発した接着剤、Fibrin および市販癒着防止膜（HA/CMC）を適用し 1、2 週後の外観および 2 週間後の HE 染色の結果を示す。未処理および Fibrin において癒着の形成が認められ、HE 染色においても盲腸ー腹膜間に明らかに癒着組織（POA）層が認められた。一方、癒着の程度をスコア化した結果（表 2）から、未処理および Fibrin を使用した場合においてのみ、癒着スコアが高いことが明らかとなった。一方、C8-ApGltn 接着剤、未処理タラゼラチン（Org）接着剤および HA/CMC においては、癒着が認められなかった。

大腸に対する耐圧強度（図 2a）および *in vitro*／*in vivo* 癒着防止効果の評価結果（図 2b、図 3、表 2）から、C8-ApGltn 接着剤は、強固に組織欠損部に接着し、硬化後は癒着防止効果を発現することが明らかとなった。

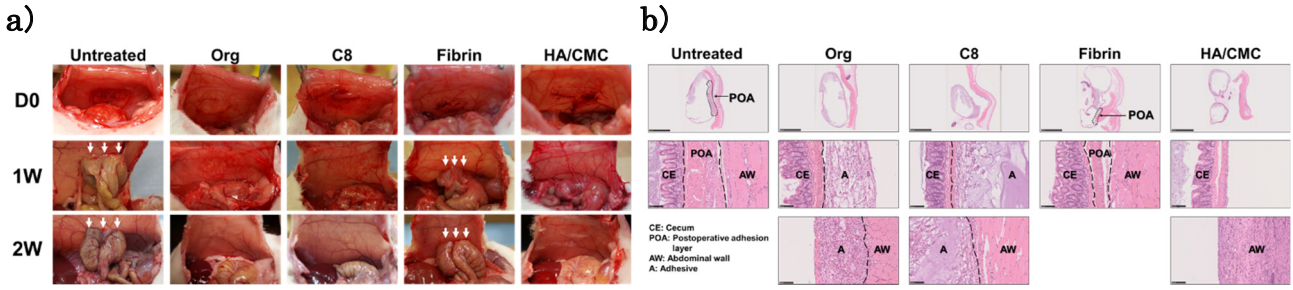


図 3. 盲腸ー腹膜癒着モデルを用いた外科用接着剤の癒着防止効果の検証

a) 外観：ラット癒着モデルを用いた評価において、開発した接着剤（C8）は市販接着剤（Fibrin）と比較して効果的に癒着防止効果を示した。

b) HE 染色（2W）：HE 染色の結果より開発した接着剤（C8）は組織表面に残存した状態（図中 A の箇所）で効果的に癒着を防止していることが明らかとなった（スケールバー：上 10 mm、中・下 100 μm）。

表 2. ラット盲腸ー腹膜癒着モデルを用いた材料の癒着防止効果スコア（1 週および 2 週後）

Adhesion score	1 week (n=3)					2 week (n=3)				
	Untreated	Org	C8	Fibrin	HA/CMC	Untreated	Org	C8	Fibrin	HA/CMC
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	3 (100%)	0	0	0	0	3 (100%)	0	0	0	0
3	0	0	0	2 (66.6%)	0	0	0	0	1 (33.3%)	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (33.3%)	0
1	0	0	0	1 (33.3%)	0	0	0	0	1 (33.3%)	1 (33.3%)
0	0	3 (100%)	3 (100%)	0	3 (100%)	0	3 (100%)	3 (100%)	0	2 (66.6%)

Score: 0 for No Adhesion, 1 for One thin firmly adhesion, 2 for More than one thin adhesions, 3 for Thick adhesion with focal point, 4 for Thick adhesion with plantar attachment or more than one thick adhesion with focal point, 5 for Very thick vascularized adhesion or more than one plantar adhesion

既報［6］に基づく癒着スコア評価の結果から、開発した接着剤（C8）は、1 週および 2 週目において癒着を生じさせないことが定量的に明らかとなった。

文　献

1) Mizuta R, Mizuno Y, Chen X, Kurihara Y, Taguchi T. Evaluation of an octyl group-modified Alaska pollock gelatin-based surgical sealant for prevention of postoperative adhesion. Acta Biomaterialia. 2021;121:328-38. Epub 2020/12/17. doi: 10.1016/j.actbio.2020.12.025. PubMed PMID: 33326886.

2) Mizuno Y, Watanabe S, Taguchi T. Tissue-sealing and anti-adhesion properties of an *in situ* hydrogel of hydrophobically-modified Alaska pollock-derived gelatin. Int J Biol Macromol. 2020;163:2365-73. Epub 2020/09/19. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.084. PubMed PMID: 32946944.

3) Mizuno Y, Mizuta R, Hashizume M, Taguchi T. Enhanced sealing strength of a hydrophobically-modified Alaska pollock gelatin-based sealant. Biomater Sci-Uk. 2017;5(5):982-9. doi: 10.1039/c6bm00829a. PubMed PMID: WOS:000400690700008.

4) Mizuta R, Taguchi T. Enhanced Sealing by Hydrophobic modification of Alaska pollock-derived gelatin-based surgical sealants for the treatment of pulmonary air leaks. Macromol Biosci. 2017;17(4):1600349. PubMed PMID: WOS:000398891200014.

5) Mizuta R, Ito T, Taguchi T. Effect of alkyl chain length on the interfacial strength of surgical sealants composed of hydrophobically-modified Alaska-pollock-derived gelatins and poly(ethylene)glycol-based four-armed crosslinker. Colloids and Surfaces B-Biointerfaces. 2016;146:212-20. PubMed PMID: WOS:000382269600024.

6) Zhang E, Li J, Zhou Y, Che P, Ren B, Qin Z, et al. Biodegradable and injectable thermoreversible xyloglucan based hydrogel for prevention of postoperative adhesion. Acta biomaterialia. 2017;55:420-33. Epub 2017/04/10. doi: 10.1016/j.actbio.2017.04.003. PubMed PMID: 28391053.