

博士学位論文審査要旨

2017年2月14日

論文題目： Anti-adhesive Effects of the Newly Developed Two-Layered Gelatin Sheet
in Dogs

大動物実験における新規ゼラチン2層シートの癒着防止効果の検討

学位申請者： 鳥井 裕子

審査委員：

主査： 生命医科学研究科 教授 萩原 明於

副査： 生命医科学研究科 教授 米井 嘉一

副査： 草津総合病院 副院長 卜部 諭

要 旨：

婦人科手術において妊孕性の低下を招きかねない術後骨盤内癒着の防止は、産婦人科医療のみならず保健行政上も深刻な問題である。この術後癒着に対して用いられる従来製材にはいくつかの課題があり、それらを解決すべく筆者はゼラチンを使用した新規癒着防止材を開発した。本研究ではゼラチン製材を状況に合わせて様々に加工し、Study1、Study2、Study3を通じ、様々な臨床状況に対応が可能な癒着防止材としての有用性を従来製材との比較のもとに検討している。

Study 1では、従来製材の課題の一つの創傷治癒阻害を生じない癒着防止材として熱架橋ゼラチンフィルムを開発している。物性試験、細胞増殖実験、ラットと犬の動物実験を経て、ゼラチンフィルムが創傷治癒阻害を起こさないこと、熱架橋至適時間、優れた癒着防止効果を確認し、従来製材の一つでは禁忌である腸管吻合部への使用の際の安全性を確認するなど、従来製材と比較して何れの点でも優れた結果を得ている。

Study 2では上記成果を発展させ、従来製材の課題の出血部位でも使用可能な癒着防止材として、ゼラチンスポンジ2層構造のシートを開発し、止血効果、癒着防止効果を従来製材と比較検討した。その結果、ゼラチン2層シートは従来の止血材や従来の癒着防止材より優れた止血効果を示して出血部位にも使用可能で、かつ従来製材と比して十分な癒着防止効果を持つと結論した。

Study 3では、Study 2の成果をさらに発展させ、近年増加傾向の胸・腹腔鏡下手術に対応すべく粉末状癒着防止材の開発を行った。胸・腹腔鏡手術で使用可能で、かつ有効な形状を選択するため様々な形状のゼラチン製材を試作し、物性試験、癒着防止効果の検討を行い、その結果フレーク状の形態が最も有望と判断した。それを受けて、フレーク状の形態に加工したゼラチン製材（以下ゼラチンフレーク）の架橋度・粒子径・用量を変化させ、物性試験、癒着防止効果実験を行い、胸・腹腔鏡下での使用の最適条件を検討した。その結果、架橋時間の変更で分解速度が調節可能であること、ゼラチンフレークは急速に周囲の組織の水分や血液を吸収しゲル状に変化するので局所の粘着・滞留性に優れること、ゼラチンフレーク群は無治療対照群に対して有意に癒着防止効果が優れ、その効果は用量に依存することが示された。

以上の総合結論として、ゼラチン製材は熱架橋により、水分保持性、生体内分解速度などの性

質が制御可能で、様々な形状に容易に加工できる。創傷治癒を阻害することなく十分な癒着防止効果を持ち、腸管吻合部・出血部位など従来製材では禁忌の環境でも使用可能である。また胸・腹腔鏡手術で使用可能な材型にも加工できる事が示された。これらの結果から、ゼラチン製材は非常に有用な癒着防止材であると考えられた。

以上のように、本論文は、現実の未解決の臨床的問題を解決する具体的方法を提示した研究である。よって、本論文は、博士（理学）（同志社大学）の学位を授与するにふさわしいものであると認められる。

総合試験結果の要旨

2017年2月14日

論文題目： Anti-adhesive Effects of the Newly Developed Two-Layered Gelatin Sheet
in Dogs

大動物実験における新規ゼラチン2層シートの癒着防止効果の検討

学位申請者： 鳥井 裕子

審査委員：

主査： 生命医科学研究科 教授 萩原 明於

副査： 生命医科学研究科 教授 米井 嘉一

副査： 草津総合病院 副院長 卜部 諭

要 旨：

上記審査員は、申請者の鳥井裕子氏に対する総合試験を、2017年1月18日17時から、口頭発表60分、質疑応答30分、口頭試問30分の構成で行った。総合試験において学位申請者は、提出した学位論文の内容、意義、研究の発展などに関する質問に対して的確に応答した。妊孕性を低下させる術後骨盤内癒着の防止は、産婦人科医療や保健行政上の重要問題であり、この術後癒着に対する従来製材はいくつかの課題があるが、本論文ではそれらを解決すべく筆者はゼラチンを使用した新規癒着防止材を開発した。その結果、ゼラチン製材の様々な性質を熱架橋により制御し、また形状を加工して、創傷治癒を阻害することなく十分な癒着防止効果を持ち、腸管吻合部・出血部位など従来製材では禁忌の環境や、また腹腔鏡手術で使用可能な材型にも加工することで、上記の課題を解決できる事を示した。なおこの研究を基に、本邦企業がゼラチンの新規癒着防止材を開発し、世界市場に提供の予定である。

申請者は、本研究科修了に必要な所定の単位を修得しており、また語学試験「英語」は入学時に合格している。研究を行うに必要な語学力については、本論文は300ページを超える英語論文であり、更に国際学会でも複数回の学術発表を行っているなど、申請者の語学力は合格水準と考えられる。よって、総合試験の結果は合格と認める。

博士學位論文要旨

論文題目： Anti-adhesive Effects of the Newly Developed Two-Layered Gelatin Sheet
in Dogs

大動物実験における新規ゼラチン2層シートの癒着防止効果の検討

氏名： 鳥井裕子

要旨：

研究の背景

比較的若年の女性を対象とした婦人科領域の手術において妊孕性の低下を招きかねない術後骨盤内癒着の防止は、特に少子高齢化を迎えた本邦では、産婦人科医療のみならず保健行政上も重要な課題となっている。例えば、子宮筋腫、子宮内膜症などの手術では晩婚化を迎えた現在では、以前の子宮を全摘する治療から変化し、子宮・妊孕性の温存、つまりは妊娠をするための手術という意味合いが強くなってきている。そのため、手術を原因とした新たな癒着が形成されることは避けねばならない事態である。現在、術後癒着の防止材として数種類の製材が使用されている。これらの現用の製材にはいくつかの問題が存在しており、それらを解決すべく筆者はゼラチンを使用した新規癒着防止材を開発した。本研究ではゼラチン製材を状況・課題に合わせ様々な形状に加工し、Study1、Study2、Study3を通じ、様々な臨床状況に対応が可能な癒着防止材としての有用性を従来製材との比較のもとに検討した。

Study 1: 熱架橋ゼラチンフィルム

目的：創傷治癒を阻害することなく、癒着を防止することのできる製材を目指し、ゼラチンフィルムを開発した。物性試験、細胞増殖実験、ラットと犬の動物実験を経て、熱架橋至適時間、ゼラチンフィルムの癒着防止効果の確認、従来製材である Seprafilm®では禁忌とされている腸管吻合部への使用の際の安全性を検討した。

材料および方法：①物性試験: 熱架橋時間が0、1、3、8あるいは14時間の異なる熱架橋を施したゼラチンフィルムにおいて含水率、溶解度、コラゲナーゼによる被分解性を評価した。②0、1、3、8あるいは14時間の熱架橋を施したゼラチンフィルムの表面で、ラット線維芽細胞の細胞増殖を評価した。③ラットの腹腔内癒着モデルで、0、1、3、8あるいは14時間の熱架橋を施したゼラチンフィルムを使用し、癒着防止効果を評価した。④犬の腸管癒着モデルで3時間架橋を施したゼラチンフィルム、Seprafilm®（従来製材）を使用し、癒着防止効果と局所生体反応を肉眼的、組織学的に評価した。⑤犬の腸管吻合モデルで3時間架橋を施したゼラチンフィルム、Seprafilm®（従来製材）を使用し、腸管吻合部耐圧能実験を行った。

結果と結論：①ゼラチンフィルムの熱架橋時間と含水率、溶解度、コラゲナーゼによる分解性には相関関係が認められ、架橋時間に応じてゼラチンの性質が制御可能であることが示唆された。②細胞増殖実験ではゼラチンフィルム上では細胞増殖用シャーレを用いた対照群のような増殖は認められなかったものの明確な細胞増殖が認められ、ゼラチンフィルムは細胞増殖阻止による創傷治癒阻害作用を生じにくいと考えられた。③無治療対照群に対し、3時間、8時間、14時間

架橋のゼラチンフィルムは有意に癒着スコアが低下した。ゼラチンフィルムは癒着防止効果を持つが、効果は架橋時間に依存することが示唆された。④癒着の肉眼的評価において、ゼラチンフィルム群は無治療対照群に比して有意に癒着スコアが低かった。組織学的評価では、ゼラチンフィルム群は無治療対照群、Seprafilm®群に比べ、炎症が軽微であり有意差を持って優位な腹膜再生が認められた。⑤術後 3 日目では、無治療対照群・ゼラチンフィルム群に対し、Seprafilm®群では有意に耐圧能が低下した。無治療対照群、ゼラチンフィルム群間では有意差は認めず、ゼラチンフィルムは腸管吻合部にも安全に使用可能と考えられた。

Study 2：熱架橋ゼラチン 2 層シート

目的：study 1 の成果を発展させる研究として、出血コントロールが困難な婦人科手術の際にも使用可能な（すなわち局所止血作用を併せ持つ）癒着防止材として、前出のゼラチンフィルムとゼラチンスポンジから成る 2 層構造のシートを開発した。ヒトに近いとされる犬の実験モデルを使用し、止血効果、癒着防止効果を従来製材と比較検討した。

材料と方法：①犬の脾臓を用いた出血モデルを作成し、ゼラチン 2 層シート、ゼラチンスポンジ、従来から血材として使用されている Tachosil®を比較し、血効効果と操作性を比較検討した。②犬の子宮を用いた癒着実験モデルを作成し、癒着防止効果を肉眼的、組織学的に既存の癒着防止材（Seprafilm®、INTERCEED®）と比較検討した。③ゼラチン 2 層シート、Seprafilm®、INTERCEED®（従来製材）上で、ヒトの繊維芽細胞、中皮細胞、子宮平滑筋細胞の細胞増殖性を比較検討した。

結果と結論：①ゼラチン 2 層シート、ゼラチンスポンジは Tachosil®に比較して有意に優れた止血効果を示した。また操作性も 2 層シートは他の 2 者に比較して優れていた。②無処置対照群に比較してゼラチン 2 層シートは有意に癒着防止効果が優れていたが、Seprafilm®や、INTERCEED®との比較では有意差を認めなかった。③Seprafilm®、INTERCEED®上では 3 種類の細胞はほとんど増殖しなかったが、ゼラチン 2 層シート上では明確な細胞増殖を認めた。以上よりゼラチン 2 層シートは出血のコントロールが困難な部位にも使用でき、かつ従来製材と比しても十分な癒着防止効果を持つと考えられた。

Study 3：熱架橋ゼラチンフレーク

目的：study 2 の成果を受けてこれをさらに発展させ、近年増加傾向にある胸腔鏡・腹腔鏡下手術に適応するべく粉末状の癒着防止材の開発を行った。開腹手術に比べ腹腔鏡下手術では癒着が少ないとされているが、前述のように妊孕性の温存を第一に考慮した場合、術後の癒着は腹腔鏡においても対策がとられるべき課題である。腹腔鏡手術で使用可能で、かつ効果のある形状を選択するために、様々な形状のゼラチン製材を試作し、物性試験、癒着防止効果の検討を行い、その結果フレーク状の形態に着目した。さらに、フレーク状の形態に加工したゼラチン製材（以下ゼラチンフレーク）の架橋度・粒子径・用量を変化させ、物性試験、癒着防止効果実験を行い、胸腔鏡・腹腔鏡下での使用の最適条件を検討した。

材料と方法：①ゼラチンフレーク、ゼラチンフレークボール、ゼラチン多面体、Seprafilm®（従来製材）を使用し、ラットの腹腔内癒着モデルで癒着防止効果を評価した。②物性試験としては、ゼラチンフレーク、ゼラチンフレークボール、ゼラチン多面体にビーズ状ゼラチンを加え、膨潤度、ゲル分率、溶解度試験を行った。またゲル化後の外観形態変化を検討した。③物性試験として、ゼラチンフレークの粒子径を、500 未満、500～1000、1000～2000 μm の 3 種類に変化を加えた場合の膨潤度、ゲル分率を測定した。さらに架橋時間（0、3、5、8、14 時間架橋）を変えた場合の、吸水性、コラゲナーゼによる被分解性を評価した。④架橋時間が 0 時間と 14

時間のゼラチンフレーク 20mg を使用し、ラットの腹腔内癒着モデルで癒着防止効果を評価した。⑤架橋時間が 0 時間、5 時間、14 時間のゼラチンフレーク 20mg を使用し、ラットの腹腔内癒着モデルで癒着防止効果を評価した。⑥架橋時間が 0 時間、5 時間、14 時間のゼラチンフレークを 5mg あるは 10mg 投与した場合の癒着防止効果をラットの腹腔内癒着モデルで評価した。⑦5 時間架橋のゼラチンフレークを 10mg、15mg、20mg 使用し、ラットの腹腔内癒着モデルで癒着防止効果を検討した。⑧

結果と結論：①ゼラチンフレーク、ゼラチンフレークボールが Seprafilm® (従来製材) に近い癒着防止効果を示した。②各々の材料でゲル分率、膨潤度に差が認められた。同じ架橋時間でもゲル分率が低いのはゼラチンフレーク、ゼラチン多面体であり、分解されやすいことが示唆された。またゲル化後はフレークボール、フレークは融合し、細かな配列で組織に密着する外観変化が観察された。③物性試験では粒子径による違いは認めなかったが、架橋時間の違いでは差異を認めた。すなわち吸水試験では架橋したゼラチンフレークは未架橋のゼラチンフレークより早く試料を吸収したが、コラゲナーゼ試験では架橋時間が長いほど緩やかに分解される傾向を認めた。このことから、架橋時間を変化させることで、分解速度を調節可能であることが示唆された。④ゼラチンフレーク群は無治療対照群に対して有意に癒着防止効果が優れていた。⑤ゼラチンフレークは急速に周囲の組織の水分や血液を吸収しゲル状に変化した結果、局所に粘着して留まる様子が観察され、局所滞留性に優れることが判った。また、架橋時間の違いでは、20mg の用量では 5 時間架橋のゼラチンフレークが低い癒着スコアを示した。⑥5mg あるいは 10mg の用量では癒着スコアはおしなべて高く、用量・架橋時間に関わらず、有意差は認められなかった。この結果により 10mg 以下の低用量では十分な癒着防止効果は得られないと考えられた。⑦20mg 投与群では無治療対照群と比較して、癒着の範囲および強度の両方において有意に低いスコアを示した。10、15mg 群は強度において有意に低いスコアを示した。このことからゼラチンフレークの癒着防止効果は用量に依存することが示唆された。

総合結論

ゼラチン製材は熱架橋を行うことで、水分保持性、生体内での分解速度などの性質を制御でき、様々な形状にも容易に加工できる。創傷治癒を阻害することなく十分な癒着防止効果を持ち、腸管吻合部・出血部位などの従来製材では禁忌とされていた環境でも使用が可能である。また腹腔鏡手術でも使用可能な材型にも加工が可能である。これらの結果から、ゼラチン製材は非常に有用な癒着防止材であると考えられる。