

Development of Novel Infectious Agent Free-Locally Administered Hemostatic Material Made from Chitosan

Ayumi HASHIMOTO* and Yoshinori HIRASAKI** and Hiroyuki TSUJIMOTO*** and Akeo HAGIWARA****

(Received May 9, 2009)

Hemostatic materials made from collagen of animal origin or from blood components of human being have been commonly administered locally in the bleeding sites during surgery at the present day. These collagen and blood components are principal proteins consisting the body-tissues and they are biocompatible. It is clinically, however, a serious problem that the above-mentioned materials may contain the infectious agents, such as virus and prion which can infect to human. To reduce the risks of the infectious agents, we have developed “chitosan sponge”, a novel hemostatic material from chitosan, which has much lower risks of the infectious agents because chitosan is originated not from animals and human but from crabs. Chitosan sponge was made with a freeze-drying method, and was evaluated in two kinds of basic properties as a hemostatic material in comparison with fibrin glue, one of the clinically most common hemostatic materials. The first property of tissue-adhesive effect was evaluated with shear stress, and the second property of hemostatic performance was compared using a model of bleeding from the kidney in rats. These two properties were almost equal between the two materials. These results suggest that chitosan sponge can be developed as a novel and “infectious agents-free” hemostatic material with a comparable hemostatic effect to fibrin glue.

Key words : Infectious agent-free, hemostatic material, chitosan

キーワード : 非感染性, 止血材料, キトサン

キトサンを主成分とする非感染性の新規局所止血材料の開発

橋本 歩, 平崎 憲範, 辻本 洋行, 萩原 明郎

1. はじめに

現在の外科領域において、手術野で使用する局所止血材料として、①動物由来のコラーゲンを使用したもの¹⁻²⁾や②ヒト由来の血液成分を用いた製材³⁻⁴⁾が使用されている。①の主成分であるコラーゲンは、ヒト以外の哺乳類の体成分から採られ精製されたもので、生体を構成する主要なタンパク質であり、且つ生体適合性に適している。また

コラーゲンを用いた止血材は、コラーゲン自体に止血効果があるという利点がある。一方②はヒト血液凝固因子を主成分とするため、止血効果が高いこと、また使用後に自己体組織と同様に生体に吸収され、消失するなどの優れた性能を持つ。しかし、両者とも動物由来であることに起因するウイルスやプリオンなどのヒトへの感染性因子が含まれる危険性が臨床使用上の問題点として指摘されている⁵⁻⁶⁾。

*Department of Environmental Systems Science, Doshisha University, Kyoto

Telephone: +81-774-65-6878, *E-mail: dmi0302@mail4.doshisha.ac.jp, *** E-mail: htsujimobb@yahoo.co.jp

**** E-mail: ahariwar@mail.doshisha.ac.jp

** Department of Surgical Endoscopy Institute for Juntendo Urayasu Hospital, University of Juntendo

Telephone: + 81-3-3813-3111, E-mail: yoshinorihirasaki84@gmail.com

この感染性因子という問題点を克服する新規の材料を開発することは大きな臨床的意義を持ち、事実従来からこのような目的で化学合成素材⁷⁻⁸⁾や天然素材⁹⁻¹⁰⁾を用いた新規局所止血材料の開発研究が多くなされてきた。以上のようにコラーゲン製材やヒト血液凝固因子製剤に取ってかわる局所止血材料の新規開発は困難であるのが現状である。以上の様な局所止血材料の臨床使用上の問題点と新規開発の現状に鑑み著者らは、節足動物である蟹に由来し、既に他の目的で安全性が証明され、臨床使用が許可されているキトサンを用いて、感染性因子という問題点を克服する新規止血材料を開発することを目的として研究を行った。本論文では、その第1報として *in vitro* の組織接着性と動物の出血モデルにおける止血効果をヒト血液由来製材と比較し、同等あるいはそれ以上の優れた結果を得たので報告する。

2. 試料および実験手順

2.1 試料

キトサンは、脱アセチル化度 75-85%で、株式会社キミカ（東京）より供与されたものを用いた。99.7%酢酸はナカライテスク（京都）より購入したものを用いた。ベリプラスト P コンビセット[®]は、CSL Behring 株式会社（東京）より供与されたものを用いた。豚皮（white pig）は、食肉センター（京都）にて購入したものを用いた。

2.2 新規止血材料の作製

キトサンを用いて、シート状の新規止血材料を作製した。100ml の水に 1g のキトサンを加え、その後 0.5ml の 99.7%酢酸を加え、よく混和し完全に溶けたことを確認した。この溶液をシャーレの底から 3mm の位置まで注ぎ込み、 -80°C で 24 時間凍結させ、凍結乾燥機（FREEZE DRYER FDU-810, EYELA 東京理化工機株式会社、東京）を用いて 3 日間凍結乾燥させ、キトサンスポンジを得た。(Fig. 1.)



Fig. 1. chitosan sponge on the kidney

2.3 せん断応力試験

A 群（キトサンスポンジ群：n=5）、B 群（ベリプラスト群：n=7）の 2 群についてせん断応力を測定した。対照として用いたベリプラスト群は、従来品であるベリプラスト P コンビセット[®]を用いて測定したものである。豚皮は、よく水洗いをした後きれいに剃毛し、2cm×2cm の大きさの試験片に切り分けた。切り分けた試験片の毛が生えていた表皮側を固定板にシアノアクリレートでしっかりと固定して用いた。

A：キトサンスポンジ群

豚皮と豚皮の間にキトサンスポンジを挟み、200g で 2 分圧迫した。その後引張試験機（CPU ゲージ：MODEL-9500, TEST STAND：MODEL-1356, AIKOH ENGINEERING 株式会社、大阪）により fixed speed 80mm/min で上下に牽引して、2 枚の豚側間のせん断応力を測定した。(Fig. 2.)

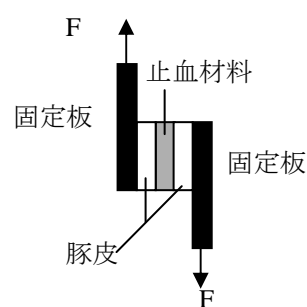


Fig. 2. shear strength

B：ベリプラスト 群

通常の生体接着・止血操作と同様にベリプラスト P コンビセット[®]を用いた。2 枚の豚皮のうち 1 枚に A 液を塗布し、もう一方の豚皮に B 液を塗布した。両者を貼り合わせ 200g で 2 分圧迫した。その後、引張試験機により、A 群と

同様の方法でせん断応力を測定した。

2.4 止血効果の検討

体重量 200g~300g の雌性ラット (Wistar ST) ラットを無作為に 3 群、すなわちキトサンスポンジ群 (n=8)、ベリプラスト群 (n=7)、無処置群 (n=7) に分けて止血効果を検討した。

ラットを全身麻酔下 (pentobarbital 80mg/kg を腹腔内投与) に開腹し、腎臓を脱転させた。脱転させた腎臓の下にパラフィルムを敷き、パラフィルムと腎臓の間にろ紙を挟んだ。ラットを固定した固定板を傾け、腎下極より約 5mm 頭側の位置に、23G の注射針で臓器に対し垂直に 3mm 刺すことで傷をつけ出血させた。出血した血液をろ紙に染み込ませ、ろ紙で回収しきれなかった血液はガーゼでふきとり、出血した全血液を回収した。回収した全出血量の総重量を測定し、その重量を出血量とした。すなわち速やかに血液を含んだろ紙とガーゼの重量を測定し、実験に使用したろ紙とガーゼの重量を引いてその重さを出血量とした。

A: 無処置群

注射針を刺し、1 分間止血処置を加えずに流血させた後、血液を含んだろ紙とガーゼを回収し重量を測定した。

B: キトサンスポンジ群

注射針を刺した後、抜き取ると同時にキトサンスポンジを穿孔部に貼り付け、止血処理を行ない、その 1 分後に血液を含んだろ紙、ガーゼ、加えて貼り付けたキトサンスポンジも回収し重量を測定した。

C: ベリプラスト群

注射針を刺した後、抜き取ると同時に A 液を穿孔部に滴下し、その直後に B 液を滴下する止血処置を行い、その 1 分後に同様の方法で出血量を測定した。

3. 統計処理

測定値は全て mean±standard deviation (SD) で表した。統計処理には student-t 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意の差とした。

4. 結果

4.1 せん断応力試験

キトサンスポンジ群のせん断応力は $5.48 \pm 0.48\text{N}$ (mean±SD) で、ベリプラスト群のそれの $5.85 \pm 1.57\text{N}$ (mean±SD) とおよそ同等であった (Table. 1) (Fig. 3)。

Table. 1. Shear strength, Beriplast vs Chitosan sponge

Experimental number	Experimental groups	
	Beriplast group	Chitosan sponge group
1	6.19	5.67
2	4.34	5.18
3	3.79	5.15
4	5.92	6.24
5	8.68	5.15
6	5.90	
7	6.13	
mean	5.85	5.48
SD	1.57	0.48

Unit:N

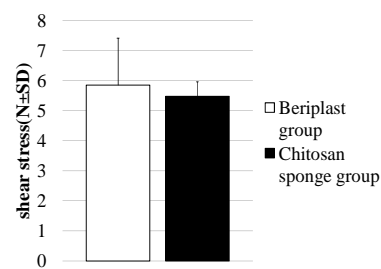


Fig. 3. Shear strength of Beriplast group or chitosan spongegroup

Data were expressed as mean and standard deviation(SD), Chitosan sponge: n=7, Beriplast P(conventional product): n=5

4.2 止血効果の検討

キトサンスポンジ群の出血量は $0.045 \pm 0.050\text{g}$ (mean±SD) で、コントロール群のそれと比較して $0.299 \pm 0.219\text{g}$ (mean±SD) と有意 ($P < 0.01$)

に少なかった (Table. 2) (Fig. 2)。

Table. 2. Hemorrhage volume

Number of rat	Experimental groups		
	control group	Berioplast group	Chitosan sponge group
1	0.12	0.23	0.01
2	0.04	<0.01	<0.01
3	0.68	0.02	0.08
4	0.30	0.06	0.01
5	0.48	<0.01	<0.01
6	0.26	0.36	0.14
7	0.21	<0.01	0.09
8			0.01
mean	0.30	0.10	0.05
SD	0.22	0.14	0.05

Unit: g

These data were evaluated by the use of rat bleeding from kidney model.

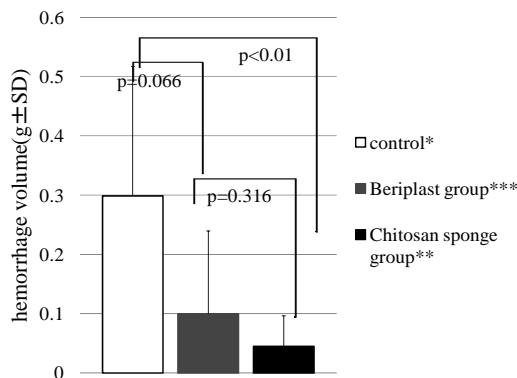


Fig. 5. Hemorrhage volume

Control group*: Control group composed of rat treated with no hemostatic materials., Berioplast group*: Berioplast group composed of rat treated with hemostatic materials as Berioplast^R, Chitosan sponge group**: Chitosan sponge group composed of rat treated with hemostatic materials as Chitosan sponge, Data were expressed as mean and standard deviation(SD), control: n=7, Berioplast: n=7, Chitosan sponge: n=8

5. 考察と結論

局所止血材料に求められる重要な性質として、

組織接着性が挙げられる⁸⁾。本研究では、従来臨床で最も広く用いられている局所止血材料の1つで、ヒト血液由来製剤であるフィブリングルー(ベリプラスト[®])との対比において、キトサンを主成分とする新規止血材料のせん断応力を測定することにより組織接着性を比較した。その結果、キトサンスポンジ群のせん断応力は従来品であるベリプラスト群のそれとほぼ同等であり、ほぼ同等の組織接着性能を示した (Fig. 3)。

止血効果については、ラットの腎臓に注射針で穿孔させて出血させるモデル (Fig. 4.) を用いて、止血効果を検討した (Table. 2) (Fig. 5)。止血困難な出血は大別して太い血管壁を直接損傷したために出血する血管壁からの出血と、腎臓・肝臓・脾臓などの実質臓器を損傷して出血する実質臓器出血がある。前者は結紮や縫合による止血処理が施される場合が多く、局所止血材料が使用されるのは、後者である。著者らは実質臓器出血に対する止血操作において使用される局所止血材料の開発を念頭に置き、腎臓を穿刺することによる出血モデルを作製し、これに対する止血効果を比較・検討した。その結果、キトサンを主成分とする新規止血材料使用群の出血量は、止血操作を施さない無処置群と比較して有意 (p<0.01) に少なかった (Fig. 5)。また、本実験では、有意差は認められなかったが、従来品であるベリプラスト群の平均出血量と比較してキトサンスポンジ群の平均量は半分であった。この事は、キトサンスポンジの止血効果は少なくとも従来品のベリプラストと同等またはそれ以上である事を示していると考えられる。本出血モデルは、無処置群においてもSDがmeanの70%以上と大きかった。この事実は本出血モデルでは出血量のばらつきが大きく、止血効果の統計的有意差の検定が困難であることを意味している。今後ばらつきの少ない出血モデルを作製し、ベリプラストとキトサンスポンジの止血効果に有意差があるか否かを再検討する必要があると考えられる。

新規の局所止血材料としては、合成材料を原材料とした外科用接着材・止血材としてシアノアク

リレート（アロンアルファ[®]など）が実用化に至っているが、分解過程で有害物質を産生し^{8,10)}局所的副作用が強いという短所に加えて、材料の硬さから生体適合性に劣るなどの問題点が指摘されている。ゼラチン製材（スポンゼル[®]など）も実用化に至っているが、ゼラチン自体には固有の止血効果はなく、また組織への接着力が弱いため容易にはがれやすいなどの問題点があり、止血効果が低いので臨床的に使用する頻度が小となってきた。この様な短所に対して、ゼラチンの接着力を上げるために、ゼラチンに化学的な処理を加えて反応させる製品も実用化されているが（GRF グルー[®]など）、これについても架橋剤による副作用が問題となっている^{11,12)}。以上の様に、感染性因子の問題点を克服するべく開発されてきた新規の局所止血材料は、局所への副作用等の問題点が多く、臨床的に広く使用されるには至っていない。

本研究で着目したキトサンは、分子内にアミノ基を有しており、正に帯電しているため負に帯電した血小板の細胞膜を引き寄せ、血小板凝集作用を促進することで止血効果を発揮するという長所がある一方、正に帯電していることで炎症反応を起こしやすいという問題点も指摘される。しかし、キトサンは既に他の目的で臨床使用が許可されており、仮に局所的副作用が発現したとしても臨床的に許容範囲内と考えられるので、上記の新規製材における局所的副作用のように決定的短所になる可能性は低いと考えられる。

今回の検討で、キトサンスポンジの組織接着性と止血効果は従来から最も臨床的に頻用されているフィブリングルーと少なくとも同等あるいはそれ以上であると考えられるので、今後は臨床応用に向けて、本止血材料の更なる改善を試みていきたいと考える。

京都大学再生医科学研究所の中村達雄准教授および所属される先生方には、試料採取・試料測定等においてご協力、ご指導をいただいた。また、せん断応力測定は京都大学再生医科学研究所にて行った。ここに記して謝意を表す。

参考文献

- 1) 土屋邦喜, “脊椎手術における局所止血材(微繊維性コラーゲン:アビテン(R))の新しい使用法“, *Pharma Medica*, 24(10), 126-128 (2006)
- 2) 佐藤直樹, 内野純一, 松下通明, “新しい医療材料・用具 止血材料・接着剤”, *外科診療 特集・手術室材料・用具マニュアル*, 5号(15), 531-538 (1996)
- 3) 池田泰治, 杉町圭史, 岡史郎, 富川盛雅, 塚本修一, 川崎勝己, 山村晋史, 是永大輔, 竹中賢治, “肝切離面の出血防止に対する液状フィブリン糊製剤とポリグリコール酸フェルト併用の有用性に関する基礎的研究”, *臨床と研究*, 84(1), 148-152 (2007)
- 4) 森本泰介, “フィブリン接着剤の導入と進歩”, *Surgery Frontier* 7(2), 115-119 (2000)
- 5) 鈴木正徳, 海野倫明, 片寄友, 竹内丙午, 小野川徹, 大塚英郎, 及川昌也, 松野正紀, “組織接着閉鎖剤の種類と特徴”, *Surgery Frontier* 8(4), 100-104 (2001)
- 6) 岡田義昭, 奥山堅司, 水沢左衛子, 福島誉子, 種市麻衣子, 斎賀菊江, 小室勝利, “フィブリン接着剤の役割と安全性”, *Surgery Frontier* 7(4), 95-100 (2000)
- 7) Masato Araki, Hiroyuki Tao, Naoki Nakajima, Hajime Sugai, Toshihiko Sato, Suong-Hyu Hyon, Takeshi Nagayasu and Tatsuo Nakamura, “Development of new biodegradable hydrogel glue for preventing alveolar air leakage”, *evolving Technology, The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* Volume 134, Number 5, 1241-1248 (2007)
- 8) 村上義彦, “架橋性の生体高分子や自己組織化体が形成する新規バイオマテリアルの医療応用”, *高分子論文集 (Kobunshi Ronbunshu)* 64(8), 486-477 (2007)
- 9) Ronit Bitton, Havazelet Bianco-Peled, “Novel Biomimetic Adhesive Based on Algae Glue”, *Macromolecular Bioscience*, 393-400 (2008)
- 10) Natalie Artzi, Tarek Shazly, Cristina Crespo, Adriana Bon Ramos, H. Keith Chenault, Elazer R. Edelman, “Characterization of Star Adhesive Sealants Based On PEG/Dextran Hydrogels”, *Macromolecular Bioscience*, 1-12 (2009)
- 11) 郷一知, 久保良彦, 笹嶋唯博, “外科治療接着剤の進歩・現状 Development and practice of surgical glue”, *総合臨床 診断の指針・治療の指針*, 46(3): 603-604 (1997)

- 12) Singh RP, Maheshwari V, Verma AK , “Evaluation of gelatin/resorcinol/aldehyde as a hemostatic agent and tissue adhesive: an experimental study in rat.”, Int Surg, 93(1):25-31 (2008)