

# Physical and Biological Properties of a Novel Anti-Adhesive Material Made of Thermally Cross-Linked Gelatin Film -Preliminary Study for the Mechanism of the Anti-Adhesive Effect and Influence on Intestinal Anastomosis-

Ayumi TANZAWA<sup>\*</sup>, Hiroyuki TSUJIMOTO<sup>\*\*</sup>, Mari MATOBA<sup>\*</sup>, Ayumi HASHIMOTO<sup>\*\*</sup>,  
Syuko SUZUKI<sup>\*\*\*\*</sup>, Shinichiro MORITA<sup>\*\*\*</sup>, Yoshito IKADA<sup>\*\*\*\*</sup> and Akeo HAGIWARA<sup>\*\*</sup>

(Received April 20, 2011)

To prevent postoperative abdominal adhesion, we have developed a novel anti-adhesive material made of thermally cross-linked gelatin film. Previously, we reported that it had an excellent anti-adhesive effect and that it could be used safely for intestinal anastomosis in a canine model. This study analyzed the physical and biological properties of the thermally cross-linked gelatin film preliminarily, and investigated the handling and the mechanism of anti-adhesive effect and the influence on intestinal anastomotic sites, in comparison to a combination film composed of hyaluronic acid and carboxymethyl cellulose (cellulose film), that is commonly used in clinical situations.

The tensile strength of the thermally cross-linked gelatin film was significantly higher than that of cellulose film when twisted to 90° in both wet and dry conditions. A degradation test in distilled water showed both films dissolved gradually with time and were nearly 70-80% dissolved by seven days. This suggested that these films have similar solubility. Tests of *in vitro* cell growth and viability on each film showed that cultured cells grew well over time on the thermally cross-linked gelatin film. On the other hand, the cell number decreased significantly on cellulose film and most of the cells died within seven days.

These results suggest the thermally cross-linked gelatin film had more physical strength and better handling than cellulose film. Both thermally cross-linked gelatin film and cellulose film were thought to prevent adhesion as physical barrier during seven days after surgery, which is a significant period for adhesion formation. However the results also suggested that the cellulose film acted as anti-adhesive membrane by inhibiting cell growth and wound healing. In contrast, the thermally cross-linked gelatin film did not inhibit cell growth, and resulted in more favorable wound healing as well as anti-adhesive effects. Therefore, it could be used safely for intestinal anastomosis. In conclusion, the thermally cross-linked gelatin film is considered to be an excellent anti-adhesive material that has no negative effects on intestinal anastomosis sites.

**Key words** : anti-adhesion, gelatin, thermally cross-link

**キーワード** : 癒着防止、ゼラチン、熱架橋

---

<sup>\*</sup> Undergraduate Senior, Department of Medical Life Systems, Doshisha University, Kyoto  
Telephone:+81-774-65-6878, E-mail: bmi2075@mail4.doshisha.ac.jp

<sup>\*\*</sup> Department of Medical Life Systems, Doshisha University, Kyoto

<sup>\*\*\*</sup> Bio-Medical Material Research Center, Doshisha University, Kyoto

<sup>\*\*\*\*</sup> Faculty of Medicine, Nara Medical University

Corresponding Author: Akeo HAGIWARA

Telephone:+81-774-65-6878, E-mail: ahagiwar@mail.doshisha.ac.jp

## 新規癒着防止材熱架橋ゼラチンフィルムの物理的・生物学的特性 -癒着防止効果の機序及び腸管吻合部への影響に対する基礎的検討-

丹澤 あゆみ, 辻本 洋行, 的場 麻理, 橋本 歩,  
鈴木 周子, 森田 真一郎, 筏 義人, 萩原 明郎

### 1. はじめに

腹部外科手術においては術後の組織修復の過程に伴う癒着化により、損傷を受けた臓器・組織が周囲の組織や腹膜と癒着し、その結果慢性疼痛や腸閉塞<sup>1)</sup>、不妊症<sup>2)3)</sup>などのいわゆる癒着障害を起こすことがしばしば認められる<sup>4)</sup>。これを防止するため、これまで様々な癒着防止材が研究開発され、その一部は既に臨床において使用されている。

腹部外科や婦人科領域の手術において吸収性癒着防止材として汎用されているセプラフィルム<sup>®</sup>（以下セルロースフィルム）は、ヒアルロン酸ナトリウムとカルボキシメチルセルロースを成分とするフィルムであり、損傷組織に貼付した場合、周囲の水分を吸収してゲル化し、約7日間程度損傷部にバリアとして存在することで癒着防止効果を発揮するとされている<sup>5)</sup>。

一方、セルロースフィルムは比較的脆弱で些細な力で簡単に破れやすく操作性が悪いなどの欠点がある<sup>6)</sup>。またセルロースフィルムは動物実験において正常な創傷治癒過程に影響を与えないとの報告があるが<sup>7)</sup>、臨床的に吻合部に使用した場合、縫合不全や瘦孔およびそれに伴う腹膜炎や敗血症の発生率が高かったとの報告<sup>8)9)</sup>があり、腸管吻合部への直接貼付することは禁忌とされている<sup>10)</sup>。

我々はこれらの問題を解決するため、より操作性に優れ、また腸管吻合部に対して安全に使用できる新規吸収性癒着防止材を目的として熱架橋ゼラチンフィルムを開発し、これまでに犬を用いた実験<sup>11)</sup>で熱架橋ゼラチンシートが優れた癒着防止効果を有し、また腸管吻合部に直接貼付しても負の影響を与えないことを報告した。

本論文では熱架橋ゼラチンフィルムの物理的お

よび生物学的特性について基礎的に分析し、それぞれ従来のセルロースフィルムと比較することにより、熱架橋ゼラチンフィルムの操作性や癒着防止効果、腸管吻合部への効果との関係について検討を行ったので結果を報告する。

### 2. 材料および実験方法

#### 2.1 癒着防止材作成方法

前述の犬の癒着防止実験及び本実験において使用したゼラチンフィルムは、豚皮由来のアルカリ処理ゼラチン（メディゼラチン、(株)ニッピ）を蒸留水で溶かし4.8%ゼラチン水溶液とした。これをシャーレに流し込み、風乾させたものを140℃の真空オーブンで3時間加熱し、厚さ約30 $\mu$ mの熱架橋ゼラチンフィルムを得た。

セルロースフィルム（商品名セプラフィルム<sup>®</sup>）は厚さ約50 $\mu$ mであり、科研製薬株式会社（東京）より購入したものをを用いた。

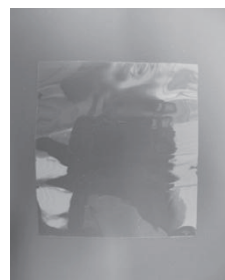


Fig. 1. Thermally cross-linked gelatin film

#### 2.2 引張試験

（実験1）熱架橋ゼラチンフィルムおよびセルロースフィルムを1cm×5cmの短冊状に切り取り、引張試験機（CPUゲージ：MODEL-RX10, TEST STAND: MODEL-1356R, AIKOH ENGINEERING）によりfixed speed 26mm/minで上下に牽引し、フィルムが破断

するまでの力を測定した. (Fig. 2. test1)

(実験2) フィルムを実験1と同様に引張試験機にかけ、フィルムより10cm離れた場所より霧吹きで生理食塩水を1回噴霧した後フィルムが破断するまでの力を測定した. (Fig. 2. test2)

(実験3) 同様にフィルムを1cm×5cmの短冊状に切り取ったものを牽引方向に対し垂直の方向に90度ひねった状態で引張試験機にかけ、フィルムが破断するまでの力を測定した. (Fig. 2. test3)

(実験4) 実験3と同様にフィルムを牽引方向に対し垂直の方向に90度ひねった状態で、フィルムから10cm離れた場所より霧吹きで生理食塩水を1回噴霧した後、フィルムが破断するまでの力を測定した. (Fig. 2. test4)

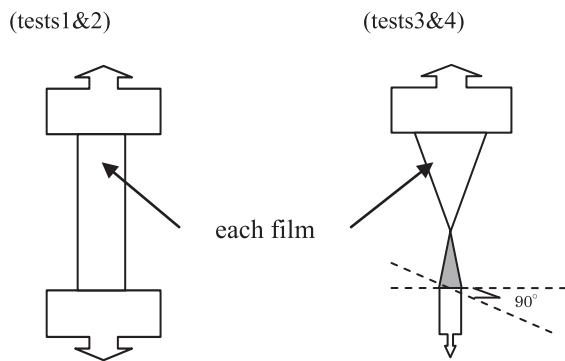


Fig. 2. Schematic illustration of the tensile strength test

### 2.3 フィルム溶解試験

熱架橋ゼラチンフィルムおよびセルロースフィルムを1cm×1cmの大きさに切り取り、重量を測定した後37℃の蒸留水の中に入れ恒温振盪水槽(NTS-4000A, (株)メトラー・トレド, 東京)により60rpm/minの早さで振盪させた。1日後(24時間後), 3日後, 5日後, 7日後にそれぞれ取り出し, 80℃に設定した送風恒温乾燥器(WF0-500, (株)東京理化器械)にて2時間乾燥させた後, 乾燥重量を測定した。コントロールとして未架橋ゼラチンフィルムを使用して同様に測定した。

### 2.4 フィルム上での細胞増殖試験

培養用24ウェルプレートのウェルの大きさに熱

架橋ゼラチンシート, セルロースフィルムを切り抜いたものをそれぞれウェルの底に敷き, その上からラット線維芽細胞を培養液中に $1.33 \times 10^3$  cells/ $\mu$ lに調整した細胞浮遊液を1ウェルあたり750 $\mu$ l, すなわち1ウェル $10^3$ 個のラット線維芽細胞を入れ, 1日後(24時間後), 3日後, 5日後, 7日後にATP Liteアッセイキット(PerkinElmer, Inc. USA)を用いて1ウェルあたりの生細胞数を計測した。

### 2.5 フィルム上での細胞生死判定試験

培養用24ウェルプレートのウェルの大きさに熱架橋ゼラチンシート, セルロースフィルムを切り抜いたものをそれぞれウェルの底に敷き, その上からラット線維芽細胞を培養液中に $1.33 \times 10^3$  cells/ $\mu$ lに調整した細胞浮遊液を1ウェルあたり750 $\mu$ l, すなわち1ウェル $10^3$ 個のラット線維芽細胞を入れ, 1日後(24時間後), 3日後, 5日後, 7日後に0.5%トリパンブルーを1ウェルあたり1/20量(37.5 $\mu$ l)入れ, 軽く振盪させた後, 細胞の染色性により細胞の生死を計測した。

## 3. 統計処理

測定値はすべて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 引張試験

実験1においてセルロースフィルムが破断するのに必要な力は $23.2 \pm 2.5$ N (mean±SD)であり, 熱架橋ゼラチンフィルムの $29.0 \pm 5.9$ N (mean±SD)と比較し有意差は認められなかった。(Fig. 3.-a)同様にフィルムを湿潤状態にしたものでも有意差は認められなかった。(Fig. 3.-b)一方, フィルム方向に90°捻りを加えたものはセルロースフィルムと熱架橋ゼラチンフィルムの間で有意差( $P < 0.01$ )が認められ(Fig. 3.-c), 湿潤状態においても有意差( $P < 0.05$ )が認められた。(Fig. 3.-d)

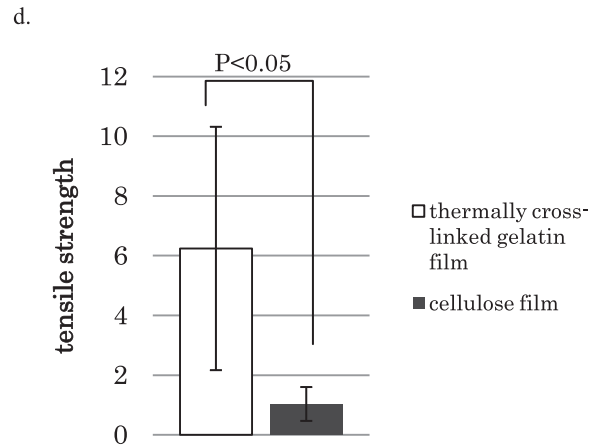
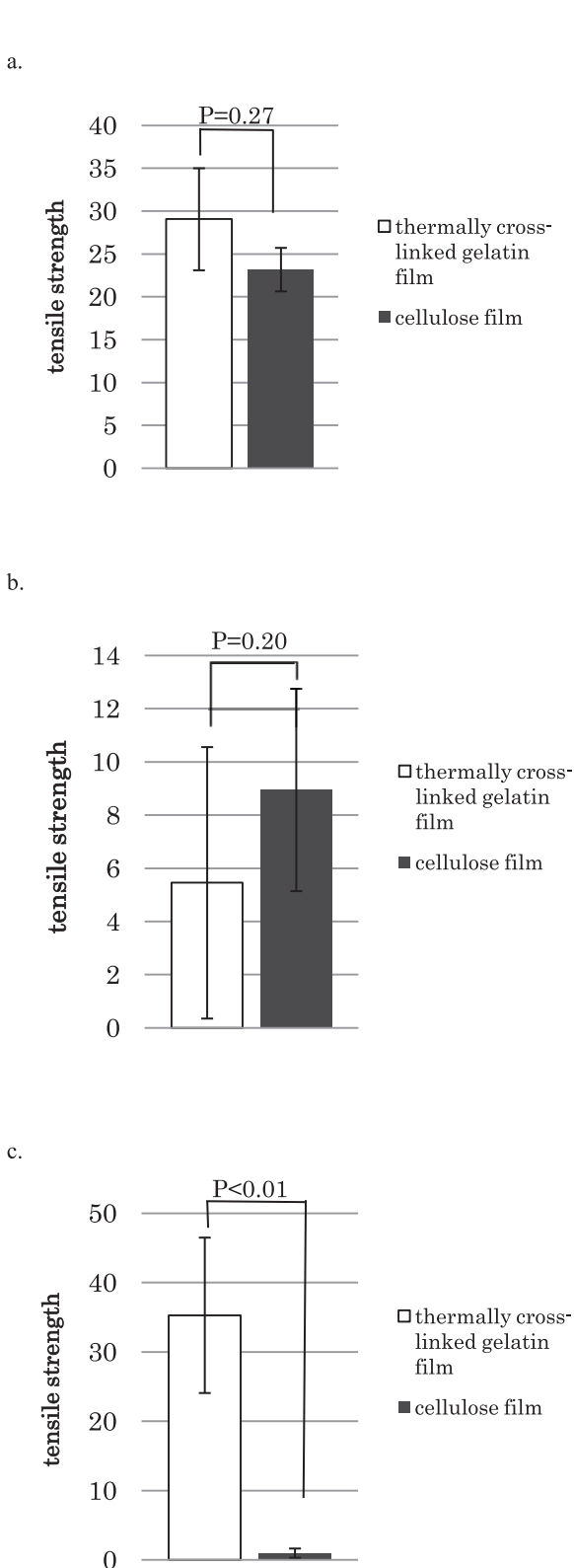


Fig. 3. Tensile strength test of thermally cross-linked gelatin film and cellulose film

- a. Tensile strength of each film in dry condition
  - b. Tensile strength of each film in wet condition
  - c. Tensile strength of each film twisted 90° in dry condition
  - d. Tensile strength of each film twisted 90° in wet condition
- thermally cross-linked gelatin film: n=5, cellulose film: n=5

#### 4.2 フィルム溶解試験

結果を Fig. 4. に示す. 熱架橋を施したゼラチンフィルムおよびセルロースフィルムは時間とともにゆっくり溶解している. 特に, 7日目においてセルロースフィルムが約 70%溶解しているのに対して, 今回我々が用いた架橋度のゼラチンフィルムは約 85%が溶解していた.

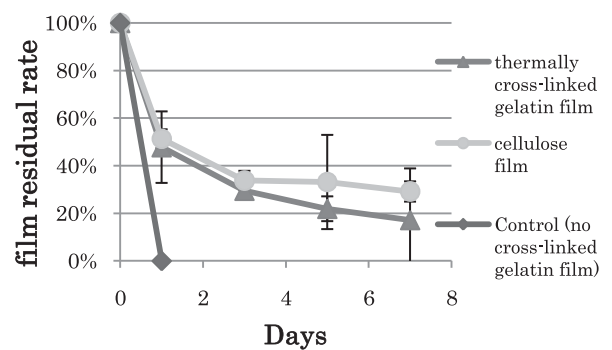


Fig. 4. *In vitro* degradation of thermally cross-linked gelatin film and cellulose film

### 4.3 フィルム上での細胞増殖試験

結果を Fig. 5. に示す. 熱架橋ゼラチンフィルム上では経過日数に従って細胞数が増えているのに対し, セルロースフィルム上では細胞がほとんど増えていない.

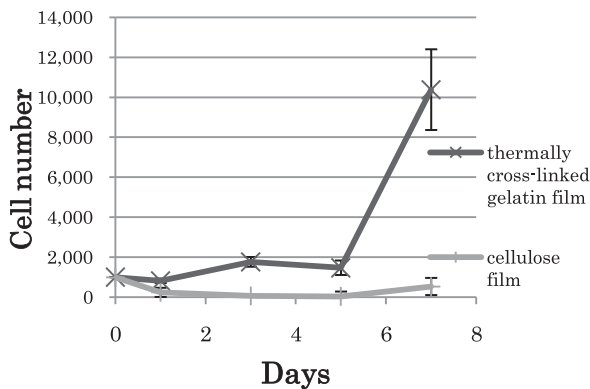


Fig. 5. Cell growth test on thermally cross-linked gelatin film and cellulose film

### 4.4 フィルム上での細胞生死判定試験

結果を Fig. 6. に示す. 熱架橋ゼラチンフィルム上では徐々に細胞生存率が回復するのに対し, セルロースフィルム上では著明に細胞生存率が低下し, 7日目においては生存率が0%であった.

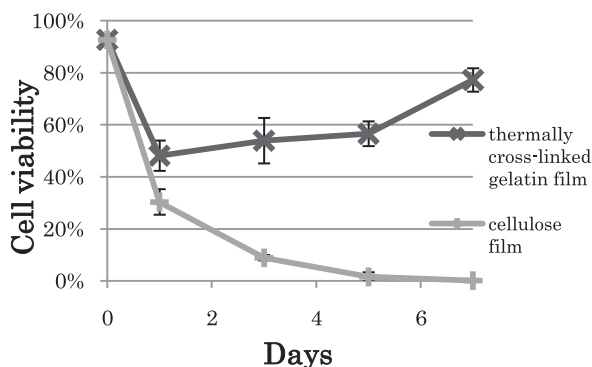


Fig. 6. Cell viability test on thermally cross-linked gelatin film and cellulose film

## 5. 考察

癒着防止材に求められる性質の一つに, 十分な強さ・弾力性を持ち, 乾燥した局面でも湿潤した局面でも外科医が容易に操作可能で, かつ手術器具や外科医の手袋に張り付かない等の良好な操作性が挙げられる<sup>12)</sup>.

そこでまず著者らは実際に外科医が本材を使用する際の操作性を念頭に置き, その物理的強度についてセルロースフィルムとの比較をおこなった. その結果, フィルム引張試験においてフィルム方向に平行な状態で牽引を行った場合は乾燥した状態でも湿潤した状態でもセルロースフィルムとの間に有意差が認められなかった. しかしながらフィルム垂直方向に 90° ひねった状態で牽引した場合においてはフィルムが破断するのに必要な力は乾燥状態及び湿潤状態において熱架橋ゼラチンフィルムとセルロースフィルムで有意差が認められた. この事からセルロースフィルムは乾燥した局面でも湿潤した局面においても僅かなひねり等の動作で破損することが予想されるのに対し, 今回我々が作成した熱架橋ゼラチンフィルムは, 乾燥・湿潤いずれの局面でもある程度の操作に耐え得ると考えられた.

次に各々のフィルムの吸収性を検討するため, フィルム溶解性試験を行ったところ, 熱架橋ゼラチンフィルムとセルロースフィルムの溶解度は3日目まではほぼ同等であり, 7日目でセルロースフィルムが約70%溶解し, 熱架橋ゼラチンフィルムは約85%が溶解していた. 一般的に癒着の形成機序は, 組織損傷後に炎症反応が惹起され血管透過性が増し, 浸出液と共に多核白血球が出現する. 3日目にはフィブリンの過剰析出に伴う線維素性癒着が始まり, 7日目には癒着性基質化が強固となり, 癒着が完成すると言われている<sup>13)</sup>. これらの事からセルロースフィルム及び熱架橋ゼラチンフィルムはこの癒着形成に重要な約7日間に腹膜損傷部の表面において物理的なバリアとして存在することで損傷組織が周囲の組織に直接接触するのを妨げ, 癒着を防止する事が考えられる.

一方我々は前回犬を用いて、小腸の吻合部に新規癒着防止材料及びセルロースフィルムを貼付し、3日後に開腹し吻合部の破裂圧を測定する実験を行い、セルロースフィルムが何も貼付しないControl群に比べ腸管吻合部の耐圧能を有意に低下させるのに対し、熱架橋ゼラチンフィルムは耐圧能を低下させず、腸管吻合部にも安全に使用ができる事を確認している。この事はセルロースフィルムと熱架橋ゼラチンフィルムとでは、損傷部における物理的バリアとして機能する上で創治癒に対する影響が異なっている可能性が考えられる。そこで我々はセルロースフィルム及び本材の癒着形成時における貼付部位の組織及び細胞に与え得る影響について、*in vitro*での細胞増殖および細胞生死判定試験により検討を行った。

結果、細胞増殖実験において、熱架橋ゼラチンフィルム上では細胞の経時的な増殖を認めたのに対し、セルロースフィルムにおいては顕著に細胞数の減少がみられ、さらに細胞生死判定試験においては7日目にはほぼすべての細胞が死滅することが確認された。以上のことからセルロースフィルムは物理的バリアとして癒着防止効果を有する一方、組織損傷部位の細胞増殖を阻害することで創治癒にも抑制的に作用する事が考えられ、この事が腸管吻合部における耐圧能の低下や縫合不全の増加をもたらしている可能性が考えられる。これに対して熱架橋ゼラチンフィルムは細胞増殖を抑制しない為、結果としてより良好な創傷治癒効果があり、吻合部においても耐圧能を低下させず、より安全に使用できると考えられた。

## 6. 結論

熱架橋ゼラチンフィルムはセルロースフィルムに比べ、その物理的特性からより操作性に優れていた。熱架橋ゼラチンフィルム及びセルロースフィルムは腹膜損傷部に対し約7日間程度物理的バリアとして存在する事で癒着防止効果を示すが、セルロースフィルムは細胞増殖や創治癒に対し抑制的に働く一方、熱架橋ゼラチンフィルムはそれらを阻害せず、結果より良好な創治癒を伴った癒

着防止を行うと共に吻合部に対して負の影響を与えない優れた癒着防止材であることが推察された。

本研究の一部は「理工学研究所2010年度同志社大学理工学研究所研究助成金」の支援を受けた。ここに記し、謝意を表す。

## 参考文献

- 1) 高崎秀明, 恩田昌彦, 長嶋裕司, 佐々部一, 横山滋彦, 美濃部かおり, 源河敦史, 会田邦彦, 鈴木英之, 吉村和泰, 古川清憲, 田中宜威, 森山雄吉, “イレウス全国集計21,899例の概要.” 日腹部救急医学会誌, 21, 629-636, (2000).
- 2) 辻勲, 向林学, 星合昊, “術後癒着の原因と予防法-妊孕能温存の視点から-,” 産科と婦人科, 8, 985-990(2001)
- 3) 田中政信, 平川舜, “術後癒着の問題点と防止法-帝王切開を中心として-,” 産科と婦人科, 4, 553-556(2000)
- 4) Menzies D, Ellis H. “Intestinal obstruction from adhesions - how big is the problem?” Ann R Coll Surg Engl 72, 60-63(1990)
- 5) 楠正人, 三木誓雄, 登内仁, 柳秀憲, 池内浩基, 野田雅史, 荘司康嗣, 山村武平, “開腹術後の癒着防止材「セプラフィルム」について,” Progress in Medicine, 21, 731-735(2001)
- 6) Greenawalt K, Masi L, Muir C, Burns J, “THE PHYSICAL PROPERTIES OF A HYALURONIC ACID BASED BIORESORBABLE MEMBRANE FOR THE PREVENTION OF POST SURGICAL ADHESIONS,” Master Res Soc Symp Proc, 292, 265-269(1993)
- 7) Medina M, Paddock HN, Connolly RJ, Schwaartzberg SD, “Novel antiadhesion barrier does not prevent anastomotic healing in a rabbit model,” J Inv Surg, 8, 179-186(1995)
- 8) Beck DE, Fleshman JW, Kaufman HS, van Goor H, Wolff BG, “A prospective, randomized, multicenter, controlled study of the safety of Seprafilm<sup>®</sup> adhesion barrier in abdominopelvic surgery of the intestine.” Dis Colon Rectum, 46, 1310-1319.(2003)
- 9) Fazio VW, Cohen Z, Fleshman JW, van Goor H, Bauer JJ, Wolff BG, Cormann M, Beart RW, Wexner SD, Becker JM, Monson JRT, Kaufman HS, Beck DE, Bailey HR, Ludwig KA, Stamos MJ, Darzi A, Bleday R, Dorazio R, Madoff RD, Smith LE, Gearhart S, Lillemoe K, Gohl J, “Reduction in Adhesive Small-Bowel Obstruction by Seprafilm<sup>®</sup> Adhesion Barrier After Intestinal Resection.” Dis Colon Rectum, 49, 1-11(2006)

- 10) 商品添付文書
- 11) 萩原明郎, 辻本洋行, 戸川剛, 橋本歩, 平崎憲範, 筏義人 “損傷腹膜の再生の足場提供による腹腔内臓器癒着防止材の開発” 第 65 回日本消化器外科学科総会, WS-9-2
- 12) 福島恒男, 杉田昭, 木村英昭, 小金井一隆, “癒着防止材による癒着性イレウスの防止,” 外科治療, 94, 919-924(2006)
- 13) 藤井正一, “癒着防止対策～癒着防止フィルムの使用方法とその成績～,” MEDICAMENT NEWS, 2020, 4-5(2010)