

### 3 医療工学研究部門

教 授 石原 雅之  
講 師 中村 伸吾  
助 教 服部 秀美



# 平成 27 年度研究報告書

## 研究部門：医療工学研究部門

### ○研究の目的

災害時に多発する傷病患者に対する迅速な診断、応急処置、治療に関する医療工学的研究を行い、災害医療、そして自衛隊衛生に貢献することを目的とする。また、感染症対策や生物剤の除染と防護、そして、人に必須である水の安全性の担保を目指した防菌防黴研究を実施する。加えて、平時の隊員の健康管理に関する検討を実施する。

### ○研究報告の概要

#### 1 研究課題：「大災害時に発生する重症患者に対する応急医療用材料、医薬、研究機器の開発」

(統一研究テーマ：有事・災害時、平時（国際貢献時を含む）ともに有用な研究)

#### 研究担当者

石原雅之、中村伸吾、服部秀美、清澤智晴（形成外科）、高林勇氣（形成外科）

#### 概 要

##### (1) 高分子を用いた生体材料の作製とその医療応用

##### ア) 創傷治癒促進材の開発

近年、熱傷、褥瘡、関節炎、腱鞘炎、アキレス腱鞘炎などに対して自己多血小板血漿療法（PRP 療法）が用いられているが、PRP 療法の治療効果は損傷の程度や患者の体質によって大きく異なる。高分子多糖類であるキトサンは、創傷治癒促進効果や止血効果などを有することから医療機器の原材料として使用されている。キトサンは血小板活性化効果も有するため、我々は、キトサンが PRP 療法の治療効果を向上させる良好な促進剤になりえるのではないかと考えた。しかしキトサンは脱アセチル化度と分子量が変わるとその性質も変わるため、キトサンという名前であっても条件によって生体に及ぼす作用は異なる。そこで、より効果的な PRP 療法にするため、分子量と

---

脱アセチル化度が違うキトサンを 13 種類用いて、多血小板血漿に含まれる増殖因子分泌促進効果と細胞増殖促進効果について検討した。

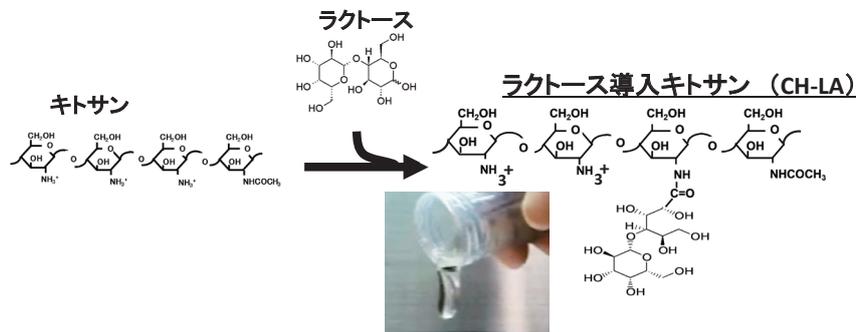
脱アセチル化度が 75% 以上かつ分子量が 8,000 以上のキトサンは、platelet factor、platelet-derived growth factor (PDGF)-AB、PDGF-BB、hepatocyte growth factor、insulin-like growth factor -1 の高い分泌を促した。さらに全てのキトサンは、アルブミンやフィブリノーゲンなどの他の血漿タンパク質成分には影響を与えなかった。また、キトサンによって増殖因子の分泌が促進された PRP を線維芽細胞培地に添加し培養すると良好な細胞増殖が確認された。これらの結果から将来的に PRP 療法の促進剤として、脱アセチル化度が 75% 以上かつ分子量が 8,000 以上のキトサンが適用し得るのではないかと示唆された。

#### イ) 粘膜隆起材及び生体接着材の開発

キトサンは前述したように、様々な医療機器の原材料に使用されているものの酢酸や希塩酸などの酸性溶液にしか溶解しないため、誘導体合成や *in vivo* 実験で取扱うことが煩雑である。そこでこの欠点を補うために、キトサンのアミノ基にラクトースを導入することによって、生理食塩水などの中性領域の溶液でも容易に溶解するラクトース導入キトサン (CH-LA) を作製した (次頁図参照)。生体の結合組織には、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸などの硫酸基やカルボキシル基を有する酸性ムコ多糖類が多く存在していることから、もし CH-LA を生体内に注入したならば、これらの酸性ムコ多糖類と接触することになる。そこで、アミノ基を有する CH-LA と硫酸基やカルボキシル基を有する酸性ムコ多糖類の相互作用を修飾基に着目して検討した。

ある一定濃度以上のヘパリンやコンドロイチン硫酸などの硫酸化多糖類の存在下において、3%CH-LA 溶液は懸濁することなく立体構造を保持した状態でゲル化したが、どちらか一方の濃度が低い場合にはマイクロメートル単位の繊維物が形成された。同じ酸性ムコ多糖類であってもヒアルロン酸に対しては、濃度比率の変化を問わず常に微粒子及びマイクロメートル単位の繊維物が形成された。さらに 3%CH-LA 溶液は、固相化されたヘパリンに対して接着することが確認された。また 3%CH-LA 溶液をブタ胃粘膜下に注入した場合 1 時間以上にわたり良好な隆起効果と接着効果が確認された。生体内に CH-LA 溶液を注入すると、生体内のマトリックス環境に依存して組織の

隆起効果や接着効果が見られたことから、有用な粘膜隆起材及び生体接着材になりえるのではないかと示唆された。



キトサンのアミノ基にラクトース(約2~3%)を架橋した。中性領域で可溶性の粘性の高いゲル状物質である。

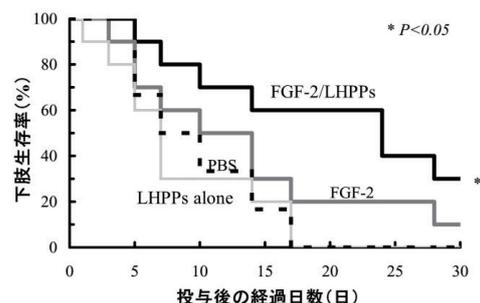
## (2) 生体材料による薬剤・タンパク質・遺伝子デリバリーシステムの開発とその応用

重症下肢虚血モデルマウスの作製手技を確立し、独自の生体材料を用いたドラッグデリバリーシステムの虚血治療への適用の可能性を検討した。具体的には、我々が開発した生体材料 (LHPPs: low-molecular-weight heparin/protamine particles) に対し、血管新生促進因子である増殖因子 (FGF-2: fibroblast growth factor-2) や当該増殖因子を分泌する脂肪組織由来幹細胞 (ADSCs: adipose-derived stem cells) を担持させた複合材料を用意し、これを重症下肢虚血モデルマウス的大腿部へ単回投与する実験を行った。その結果、投与部位では新生血管による血流回復が確認され、対照群と比較して下肢脱落を有意に抑制できた (次頁図参照)。また、クラッシュ症候群モデルラットの傷害部に対して FGF-2 含有 LHPPs を注入したところ、歩行状態の回復など有意な治療効果が確認出来た。現在、その他の血管新生促進因子を用いた検討を実施している。上記のドラッグデリバリーシステムによる検討は、再生医療の根幹にあたる血管新生を誘発させるための検討であり、実際の実験において血管新生とそれに続く改善効果を目論み通りに確認できたことから、今後の各種再生医療への応用が期待できる。引き続き検討を継続すると共に、本ドラッグデリバリーシステムを用いた、細胞内への機能性タンパク質の導入や遺伝子導入によるマウスゲノム編集の可能性など、再生医療用途以外の可能性に関する研究も実施予定である。

## 7日後の外観の様子



## 下肢生存曲線



## 2 研究課題：「防菌防黴に関する研究」

(統一研究テーマ：有事・災害時のための研究)

### 研究担当者

石原雅之、中村伸吾、服部秀美、宮平靖 (国際感染症学講座)、清澤智晴 (形成外科)、横江秀隆 (歯科口腔外科)、小野岳史 (国際感染症学講座)、福田孝一 (共同研究者)、村上馨 (歯科口腔外科)、木之田淳 (歯科口腔外科)、榎原征宏 (形成外科)

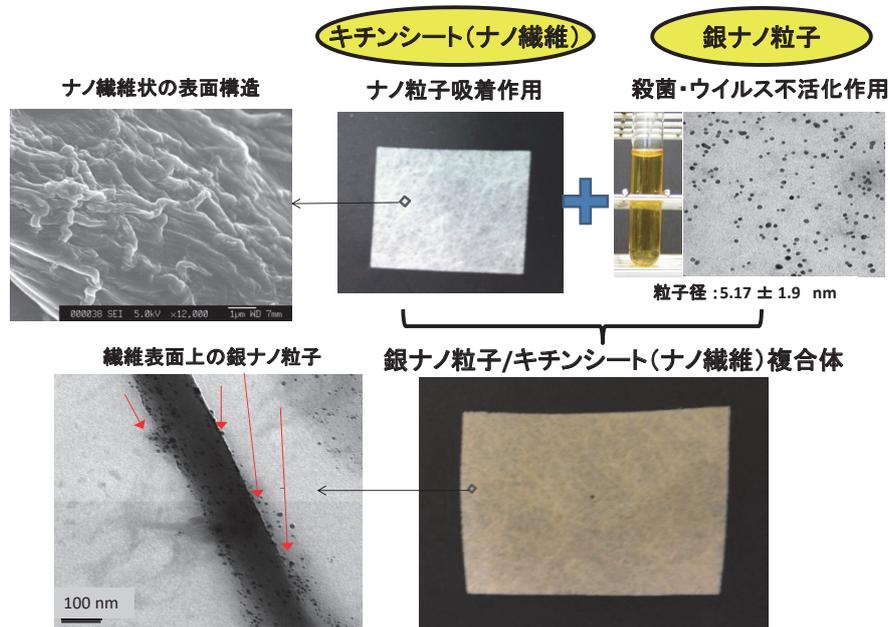
### 概要

#### (1) 銀微粒子を用いた衛生材料の創製

近年の Middle East Respiratory Syndrome (MERS)、各種インフルエンザ、エボラ出血熱、ジカ熱等の流行により、ウイルス等の微生物防護材料が注目されている。抗菌・抗ウイルス効果を謳う様々な製品が市販されているが、それらの多くは細菌やウイルスを吸着させて捕獲する効果は認められるものの、殺菌・ウイルス不活性化効果を持つものは少ない。銀は古代より抗ウイルス活性や殺菌活性を有することが知られ、比較的安全性が高く、抗生物質のような薬剤耐性の現象はないといわれている。一方、近年様々なナノ材料が開発されており、金属をナノ粒子化して使用した場合、人体や環境などに悪影響を及ぼすと指摘されている。そこで銀ナノ粒子が環境中に流出しないように、創傷被覆材であるキチンシート (ナノ繊維様表面加工済) に吸着させた銀ナノ粒子/キチンシート (ナノ繊維) 複合体を作製した (次頁図参照)。

まず、銀ナノ粒子/キチンシート複合体の抗菌・抗ウイルス作用を調べたところ、銀ナノ粒子含有量が多いキチンシートほど強力な、抗大腸菌、抗緑膿菌、抗ウイルス [A型インフルエンザ (A(H1N1))] 活性が確認された。

次に安全性について *in vitro* で検討したところ、銀ナノ粒子／キチンシート複合体は線維芽細胞に対して細胞障害性をもたらすことが確認された。糖尿病マウスの背中に皮膚欠損を作成し、欠損部に銀ナノ粒子／キチンシート複合体を適用したところ、明らかな創傷治癒遅延が誘発され、その原因は活性酸素によるものであることが確認された。しかし、この治癒遅延は銀ナノ粒子が触れた組織を生理食塩水で洗浄することによって防止することができたことから、適切な処置によって治癒遅延を制御することが可能であった。活性酸素は殺菌・ウイルス不活化作用を有するが、一方で組織障害性をもたらす。このバランスをコントロールすることによって、安心・安全な抗菌・抗微生物材料としての使用の可能性が示唆された。我々は、キチンを主原料とした素材だけでなく、ナノ繊維様表面構造を有する綿・レーヨン繊維や紙パルプなどに対しても、銀ナノ粒子が良好に吸着することを見出している。今後、銀ナノ粒子を様々なナノ繊維様表面構造を有する繊維素材に吸着させることによって、殺菌・ウイルス不活化作用を有し、かつ安心・安全な医療用防護繊維材料や装備品の開発に着手する予定である。



## (2) 微生物汚染除去に関する研究

ハイターやミルトンなどの商標名で知られている“次亜塩素酸”と呼ばれる殺菌剤は、医療現場や家庭で使われている。しかし、正確に言えばこれらの薬液は次亜塩素酸ナトリウム水溶液であり、次亜塩素酸水溶液ではない。我々は次亜塩素酸ナトリウム水溶液とは全く異なる性質を持つ次亜塩素

酸水溶液のうち、pH がほぼ中性である微酸性次亜塩素酸水を用いた殺菌等を目的とする種々の検討を実施している（下図左参照）。例えば、生命維持に極めて重要な飲用水の微生物等による汚染は、我々の健康を確実に害する。そこで、微酸性次亜塩素酸水の水中における微生物殺菌効果を検討し、非常時の飲用水確保のための簡易浄水技術について検討を行った。具体的には、風呂水や貯水槽、井戸水やため池水等の比較的綺麗であるが微生物の混入や繁殖が疑われる水を飲用水化するための検討である。微酸性次亜塩素酸水の基である次亜塩素酸分子を発生させて吸着する陽イオン交換樹脂を利用した簡易浄水装置（下図右参照）を作製し、本装置を用いて井戸水の浄水を行ったところ、1回の簡易浄水によって微生物を皆無にすることができ飲用可能な水にすることができた。今後も浄水技術の検討を継続すると共に、微酸性次亜塩素酸水の微生物殺菌効果やウイルス不活化効果を利用した感染防護、公衆衛生対策の検討を実施する予定である。

	次亜塩素酸Na水溶液	微酸性次亜塩素酸水
主な構成因子	次亜塩素酸イオン(OCl <sup>-</sup> )	次亜塩素酸分子(HOCl)
pH	アルカリ性(pH8-12付近)	中性(pH5-6付近)
毒性	皮膚刺激等	なし
安定性	塩を形成し安定	悪い (強い酸化力故に反応性高い)
製法	水酸化ナトリウム水溶液に塩素ガスを混合する等で工業的に大量生産可	電気分解法、二液法、緩衝法などによる用事調製
残留性	高い	低い (有機物と反応後、水となる)
殺菌効果	一部芽胞菌、ウイルスに弱い	芽胞菌、ウイルスに効果有り
有効濃度	高濃度が必要 200-10,000ppm (0.02-1%)	低濃度でOK 50-200ppm (0.005-0.02%)



### 3 研究課題：「隊員の健康管理に関する研究」

(統一研究テーマ：平時（国際貢献時を含む）のための研究)

#### 研究担当者

石原雅之、中村伸吾、服部秀美

#### 概要

##### (1) 肥満と疾患の相関性の検討

肥満と炎症性疾患の関連についてマウスを用いて検討を行っている。マウスから脂肪組織由来間質細胞を採取し、脂肪細胞分化誘導培地にて脂肪細胞に分化させた後で培地中の添加物を変えて培養し、サイトカインやケモカインの分泌能の変化について検討している。

○ 研究業績等

- 1) Hattori H, Ishihara M. Feasibility of improving platelet-rich plasma therapy by using chitosan that exhibits high platelet activation ability. *Experimental and Therapeutic Medicine*, in press, 2016.
- 2) Sato M, Kagoshima A, Saitoh I, Inada E, Miyoshi K, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S. Generation of  $\alpha$ -1,3-galactosyltransferase-deficient porcine embryonic fibroblasts by CRISPR/Cas9-Mediated knock-in of a small mutated sequence and a targeted toxin-based selection system. *Reproduction in Domestic Animals* 50(5), 872-880, 2015.
- 3) Ishihara M, Kumano I, Hattori H, Nakamura S. Application of hydrogels as submucosal fluid cushions for endoscopic mucosal resection and submucosal dissection. *Journal of Artificial Organs* 18(3), 191-198, 2015.
- 4) 中村伸吾, 山中望, 服部秀美, 石原雅之. 安全な水の供給のための微生物汚染への対策. *防衛医科大学校雑誌* 40(3), 173-180, 2015.
- 5) Sato M, Koriyama M, Watanabe S, Ohtsuka M, Sakurai T, Inada E, Saitoh I, Nakamura S, Miyoshi K. Direct injection of CRISPR/Cas9-Related mRNA into cytoplasm of parthenogenetically activated porcine oocytes causes frequent mosaicism for indel mutations. *International Journal of Molecular Sciences* 16(8), 17838-17856, 2015.
- 6) Nakamura S, Sato M, Hattori H, Shimizu M, Fujita M, Maehara T, Ishihara M. Therapeutic angiogenesis for limb ischemia using angiogenic growth factors and carriers. *Current Tissue Engineering* 4(2), 57-63, 2015.
- 7) 石原雅之, 中村伸吾, 服部秀美. 銀ナノ粒子の吸着及び抗微生物活性のためのキチンのナノ繊維様表面構造. *キチン・キトサン研究* 21(2), 38-45, 2015.
- 8) Ishihara M, Nguyen VQ, Mori Y, Nakamura S, Hattori H. Adsorption of silver nanoparticles onto different surface structures of chitin/chitosan and correlations with antimicrobial activities. *International Journal of Molecular Sciences* 16(6), 13973-13988, 2015.
- 9) Takikawa M, Nakamura S, Ishihara M, Takabayashi Y, Fujita M, Hattori H, Kushibiki T, Ishihara M. Improved angiogenesis and healing in crush syndrome by fibroblast growth factor-2-containing low-molecular-weight

- 
- heparin (fragmin)/protamine nanoparticles. *Journal of Surgical Research* 196(2), 247-257, 2015.
- 10) Ishihara M, Kishimoto S, Takikawa M, Hattori H, Nakamura S, Shimizu M. Biomedical application of low molecular weight heparin/protamine nano/micro particles as cell- and growth factor-carriers and coating matrix. *International Journal of Molecular Sciences* 16(5), 11785-11803, 2015.
  - 11) Takikawa M, Ishihara M, Takabayashi Y, Sumi Y, Takikawa M, Yoshida R, Nakamura S, Hattori H, Yanagibayashi S, Yamamoto N, Kiyosawa T. Enhanced healing of mitomycin C-treated healing-impaired wounds in rats with PRP-containing fragmin/protamine microparticles (PRP&F/P MPs). *Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery* 13, 1-7, 2015.
  - 12) Hattori H, Ishihara M. Altered protein secretions during interactions between adipose tissue- or bone marrow-derived stromal cells and inflammatory cells. *Stem Cell Research & Therapy* 6, 70-79, 2015.
  - 13) Hattori H, Ishihara M. Changes in blood aggregation with differences in molecular weight and degree of deacetylation of chitosan. *Biomedical Materials* 10(1), 015014, 2015.
  - 14) Nakamura S, Maehara T, Watanabe S, Ishihara M, Sato M. Liver lobe and strain difference in gene expression after hydrodynamics-based gene delivery in mice. *Animal Biotechnology* 26(1), 51-57, 2015.
  - 15) Takabayashi Y, Ishihara M, Sumi Y, Takikawa M, Nakamura S, Kiyosawa T. Platelet-rich plasma containing fragmin-protamine micro-nanoparticles promote epithelialization and angiogenesis in split-thickness skin graft donor sites. *Journal of Surgical Research* 193(1), 483-491, 2015.
  - 16) Sato M, Inada E, Saitoh I, Matsumoto Y, Ohtsuka M, Miura H, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S. A combination of targeted toxin technology and the piggyBac-mediated gene transfer system enables efficient isolation of stable transfectants in nonhuman mammalian cells. *Biotechnology Journal* 10(1), 143-153, 2015.
-