

博士論文審査報告書

論文題目

Development of Polymer Nanosheet
for Wound Dressing Materials

創傷被覆材としての
高分子ナノシートの開発

申請者

Akihiro	SAITO
齋藤	晃広

生命医科学専攻 生体分子集合科学研究

2013年 7月

近年、医療分野において理工学の知見と技術の利用が益々重要になっている。"創傷被覆材"の開発においても、臨床適用における医学的なニーズとスキルからのアプローチは勿論のこと、材料の選定や効果を最も効率よく発揮できる剤形の設計、ナノ・マイクロレベルで精密に制御された確実な調製法、得られた製材の物理化学的、生物学的な評価法など理工学的な知識と技術が必要である。現状の創傷被覆材は、接着方法が煩雑であり生体親和性が低く、透明性が低いため創部の観察が困難などの課題が指摘されている。また体内に適用する場合は組織間の癒着が起り、場合によっては再手術の必要があるため、これらの諸問題を解決できる材料の開発は患者の治療や Quality of life (QOL)の向上に大きく貢献できる。

このような背景の下、申請者はフリースタANDING可能な高分子薄膜"ナノシート"に着目した。まず、汎用性の医用高分子を素材として利用することで医用材料として必要な条件をクリアし、ナノシート自体の物理的密着性により粘着剤を用いずに創部に直接貼付でき、その高い透明性により創部の常時観察が可能となる。本学位論文では、ナノシートの特性を体系的に整理し、その特性を最大限に発揮できる創傷被覆材としての適用の可能性について、*in vitro* および *in vivo* 試験から評価した。また、単なるナノシートの貼付のみでは満たされない適用に対しては、必要な機能を付与した製材を設計し、*in vitro* および *in vivo* 試験にて評価することでその有用性を実証することを目的としている。

本論文は、6章から構成されている。各章の概要は以下の通りである。

第1章では、有機分子の自己集合および自己組織化を利用した高分子材料のこれまでの研究展開について概説し、ナノテクノロジー分野における高分子材料の基礎と応用についてまとめた。また、本論文に関連する、薄膜分野における先駆的な研究例について特筆している。次に、医療分野への薄膜の応用として創傷被覆材について、現状の整理と課題の抽出からナノシートによる解決の可能性を述べることで本論文の位置づけが明確されている。

第2章では、まず生体高分子からなる自己支持性ナノシートの調製方法と、水溶性支持膜および水溶性犠牲膜を利用した任意の界面へ貼付するための操作性を向上させる方法について併せて記述してある。ナノシートの調製方法として、スピニング法を利用した、医用高分子であるポリ乳酸(Poly(lactic acid); PLA)からなる単層型、およびカチオン性・アニオン性高分子電解質であるキトサン・アルギン酸ナトリウムからなる交互積層型(Layer-by-Layer; LbL)ナノシートの調製方法が記述されている。次に、ナノシートの物理的性質についてその評価方法とナノ厚に起因する物性の変化が詳述されている。特に、申請者はバルジ試験により膜厚100nm以下での弾性率の低下と柔軟性の向上が認められ、マイクロスクラッチ試験から膜厚100nm以下での密着力が向上し、柔軟性との相関性が得られていることを示した。これらの知見はナノシートならではの物性であり、第3章以降の医用

応用においてナノシートを用いる重要な意義となる。

第3章では、静脈からの大量出血モデルに対するナノシートの止血能を、*in vitro* および *in vivo* 試験にて評価した結果をまとめている。申請者は、多くの医用高分子や生分解性高分子からなる異なる膜厚のナノシートを検討した結果、バルジ試験における最大抗張力・最大伸び率から膜厚 75nm の LbL ナノシートを選択した。*in vitro* 試験として、シリコン製モデル血管に 7 mm の切開を加え、1cm 角のナノシート耐水圧性を評価した。耐水圧性は約 20 mmHg であり、複数枚貼り合わせることで枚数に対して比例的に耐水圧性は向上した。申請者は、術中で必要に応じてナノシートの追加的に貼付して確実に止血を行う術法を考案し、ウサギ下大静脈を血流平行方向に 7 mm 切開をした、出血モデル(*in vivo* 試験)にて止血能の評価を行った。ナノシートは透明であるため少量の出血でも確認できた。単数ナノシートでの止血の成功率は 33% であり (n=6)、残りはウー징様出血が見られた。出血が認められた場合は完全に止血が完了するまでナノシートを貼り足したところ、2例は1枚、1例は2枚、1例は3枚の追加貼付にて止血できた。術後1ヶ月時の組織像およびCT造影像から、血管の狭窄もなくスムーズな血流が確認された。以上より、ナノシートは血管のような高曲率表面に貼付し、必要に応じて貼り足す補強を施しながら確実に止血できる新しい止血材としての可能性が提示できた。本成果は、縫合困難な静脈を短時間で修復できる新しい手術法の提案となり価値ある成果である。そして、重ね貼りは手術現場での措置を考えると現実的であるものの、手術現場でのより多様な出血現場を想定したナノシートの適用に関して現状での限界を明らかにすると共に治具や形状も含めた開発が期待され、更に動脈出血に対する止血にも挑戦されたい。

第4章は、手指などの高曲率で微細な箇所まで被覆可能な、細断 PLA ナノシートの調製、再構築フィルムの物性およびその細菌感染抑制能について記述である。疎水性 PLA ナノシートを水溶性犠牲膜と交互に積層させた後、PLA ナノシートのみを水中にて剥離、10分間ホモジナイズすることで平均サイズ 0.24mm^2 からなる細断ナノシートの調製に成功した。細断ナノシートは、液状からのキャストにより、様々な界面に大面積のフィルムとして再構築できる能力を有していることを示した。同表面積の PLA マイクロ粒子のキャストでは十分な密着力は得られず、ナノシートの形状が密着性には重要であることが示された。また、トランスウエルを用いた緑膿菌の透過性試験(*in vitro* 試験)で再構成フィルムの高いバリアー能を確認した上で、II度熱傷創を形成したマウス背部に再構成フィルムを形成させ、緑膿菌を播種して感染抑制能を評価した (*in vivo* 試験)。術後3日において病理像から感染は確認されなかったものの、術後6日においては感染由来の炎症細胞浸潤が確認され、SEM観察によりナノシート生分解由来の孔形成が確認された。そこで、術後3日に一旦創部を洗浄してから細断ナノシートを追加貼付したところ、感染抑制能が術後6日でも持続していた。細断ナノシートの分散液を塗布するだけで、

従来型ナノシートでは貼付困難な複雑な面に細菌が透過できない緻密なフィルムが再構成できることを示したことは、ナノシート使用の利便性を格段に向上する道を拓くものとして高く評価できる。

第5章では、抗生物質テトラサイクリン(TC)を担持したナノシートを構築し、感染創での抗菌効果を評価した。まず、基板上に調製したLbLナノシートの表面にTC溶液を表面に滴下・乾燥させた後、更に疎水性保護膜としてポリ酢酸ビニルを製膜し、3層構造からなるTC担持ナノシートを構築した。疎水性保護膜により薬物の放出期間を6倍延長できた。*in vitro*試験より、TC担持ナノシートは緑膿菌に対して十分な抗菌能を有することを確認した上、マウス背部にIII度熱傷を形成し緑膿菌を播種したIII度熱傷感染モデルを用い、感染創上にTC担持ナノシートを貼付した。TCの自家蛍光からナノシートが視認でき、術後7日までナノシートは形状を保持した状態で創部に貼付されていた。ナノシート未処置群は術後4日で約40%の生存率であったのに対し、TC担持ナノシート群は術後1週間でも生存率100%であった。このTC担持ナノシートの研究は薬物徐放性ナノシートの初めての報告であり、患部に必要な量の薬剤を長期間に亘って確実に放出できる、貼付性のフィルム製剤の概念を実証できたことは、高く評価できる成果である。TC以外の薬剤に対しても、その溶解性、ナノシートを構成する高分子の溶解性や薬剤と高分子の親和性などを考慮して適切な製造方法の選択によって、担持量、放出特性の制御が可能となれば、製剤化が期待できる。

第6章では、本論文の総括と将来展望についてまとめたものである。更なる機能化による今後の研究展開に関する予測を素材や物性および機能用件に対する提言をしている。

本学位論文には、医用高分子から構成されるナノシートの生体組織表面への高い密着性、ナノシートの平面から高曲率面までの柔軟な追従性や、術中および術後の創部管理が容易な高い透明性から、ナノシートの新規創傷被覆材としての可能性が示されている。更に、ナノシートを細断化して液状とすることにより従来のナノシートでは為し得なかった部位への適用、ナノシートに薬物を担持させて保護膜を用いて徐放性を制御するなど、ナノシート工学をより高レベルに発展させ、イノベーティブな医療材料としての応用展開を示すことができている。以上より、本学位論文は博士(工学)としての価値があると判断できる。

2013年7月

- (主査) 早稲田大学教授 工学博士(早稲田大学) 武岡真司
早稲田大学教授 博士(医学)(慶應義塾大学) 合田亘人
早稲田大学教授 医学博士(慶應義塾大学) 池田康夫