

研究テーマ

難治性創傷治療機器の研究開発

研究代表者

施設名 : 富山大学
システム機能形態学講座

氏 名 : 岡部 素典

研究テーマ：難治性創傷治療機器の研究開発

所属先：国立大学法人 富山大学

氏名：岡部 素典

① 目的と方法

【目的】

HD羊膜を外傷による難治性創傷の治療に利用できるように市場化する。

①HD羊膜が感染を防ぐと同時に皮膚移植のための良質な肉芽(移植床)の形成を促進させる効果を臨床研究で検証する。②医師主導の探索的治験を目指し、独)医薬品医療機器総合機構(PMDA)との対面助言を実施する。③PMDAからの助言をもとに非臨床試験を進め、治験申請に必要なデータを得る。

【背景】

羊膜はコラーゲンと弾性線維で構成される強靱な生体膜で、その抗炎症作用や上皮化促進効果が創傷治療に古くから利用されている(Davis JS., Johns Hopkins Hosp Rep.,1910, Trelford ; J.D.et al.,Am J Obstet Gynecol,1979)。我々は、羊膜の効果を保持したハイパードライヒト乾燥羊膜 (HD羊膜) を開発してきた(Toda A., et al., J Pharmacol Sci ., 2007 ; M.Okabe, et al., J Biot Biomat, 2017 ; 特許4977345号 ; 特許5092119号 ; 特許5224250号)。HD羊膜は、生羊膜と同様の効果 (感染に強く、創傷治癒を促進する効果) を保持し、安全性の面で優れていることが先進医療B (眼科領域：難治性眼表面疾患の治療) で示されつつあり、HD羊膜が口腔粘膜上皮欠損部、中耳骨膜欠損部、脳硬膜欠損部において、上皮再生の足場 (スカフォールド) となることで治療効果を示してきた(Okabe M., et al., J Biomed Mater Res A., 2014 ; Kitagawa K., et al., Am J Ophthalmol., 2009 ; Arai,N., et al., J Oral Maxillofac Surg, 2012 ; Shojaku, et al., Laryngoscope, 121(9): p. 1953-7, 2011 ; Okabe, M., et al., Clinical Ophthalmology, 2013 ; Fujiwara, K., et al., Cleft Palate Craniofac J, 2022 ; Tomita, T., et al., J Neurol Surg B (Skull Base)., 2011)。

その中でも救急領域での外傷で生じる広範囲の皮膚の欠損 (難治性創傷) は治療期間が長期化するだけでなく、創部感染の合併や敗血症による重症化、死亡につながる。難治性創傷の治療には植皮を行うが、その生着は創部の移植床 (質のよい結合組織の再生) により決まる。基礎実験の結果から、HD羊膜は良好な結合組織の再生に効果を発揮できるといえる (図1 ; K Amano, et al., Journal of Surgical Research, 2023)。難治性創傷におけるHD羊膜の開発により、熱傷などの外傷や糖尿病性足潰

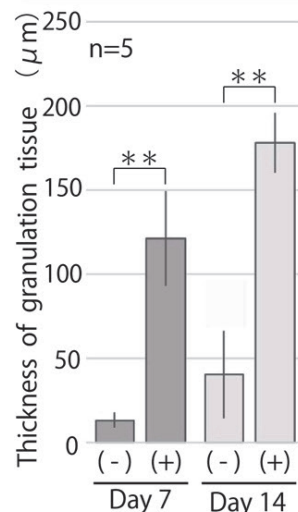


図1 HD羊膜により移植床(肉芽)形成が促進された。

瘍の治療について救命率の改善や入院期間を短縮することが期待できると考えた。

【方法】

1. 臨床研究

- 1) 麻酔後、創部の不良肉芽や壊死組織、感染組織、異物の除去などの十分なデブリードマンを行い、止血を十分に行う。
- 2) 創部の写真を撮影し、皮膚欠損部位の状態を画像として記録する。
- 3) 皮膚欠損部位に医療機器(HD羊膜)を間質面が創部に接するように貼付する。その上をトレックスガーゼ、ソフチュールガーゼ等で被覆する。
- 4) さらに、必要があれば創部陰圧閉鎖療法 [Negative Pressure Wound Therapy(NPWT); 75-125mmHg、連続] を開始する。
- 5) 感染兆候がなければ、創部陰圧閉鎖療法(NPWT)を継続する。包帯とガーゼを交換する際に創部の肉芽増生を評価し、必要があれば、1)-4)を繰り返す。
- 6) 皮膚欠損部位に良好な肉芽の増生を確認した時点で、植皮術あるいは皮弁形成術を施行する。患者の健常皮膚からデルマトームを用いて14—16/1000 inchの厚さで採皮、あるいは皮弁を採皮する。
- 7) メッシューを用いて(3—6)倍にメッシュ化する。
- 8) 採皮した皮膚を植皮部位の肉芽組織の上に置き、3-0もしくは2-0ナイロン縫合糸にて固定する。
- 9) 植皮部はガーゼ被覆を用いたtie overもしくは、局所陰圧閉鎖療法(75-125mmHg、連続)での管理を行う。
- 10) 1週間程度を目安にtie overもしくは陰圧閉鎖療法部位を開けて創部を観察する。
- 11) tie overもしくは陰圧閉鎖療法後の創部は完全な上皮化までゲンタシンやアズノール軟膏で処置を継続する。必要があれば、植皮術あるいは皮弁形成術を追加する。

2. 基礎研究

【羊膜による殺菌の検討】

1. 菌溶液の調整

Bacillus stearothermophilus (ATCC7953, 芽胞菌:オートクレーブ滅菌の指標菌で一般細菌)、S.aureus (ATCC25923, 黄色ブドウ球菌:病原菌)、E.coli (ATCC2592, 大腸菌:病原菌)をTryptone Soya Agar (Casein Soybean Digest Agar:CSD培地,関東化学(株), 711131-5;40g/l)に展開し、55℃でOver Night(O.N.)培養した。コロニーを生理的食塩水に懸濁し、マックファーランド 0.5に調整したものを菌原液とした。

2. 抗菌効果試験(定性試験:ハロー法)

滅菌綿棒に菌原液を浸し、CSD培地のdishに播種後、その上に羊膜を静置し、菌の増殖適正温度(ATCC7953:55℃, ATCC25923/ATCC2592:37℃)、でO.N.培養した。効果の認められるものを定性試験へ進めた。

3. 羊膜の抽出液による抗菌効果試験(定量試験)

i) 滅菌綿棒に菌原液を浸し、播種したdish上にVancomycinVA (VCM; SYSMEX bioMérieux Co.,Ltd., 412488, Tokyo) のストリップを静置・55℃・O.N.培養後、Minimum Inhibitory Concentration(MIC)を測定した。

ii) 菌原液をx100希釈したものをWorking Solutionとし、Working Solutionをさらにx10、x100、x1000希釈し、50 μ l/dish播種・55℃・O.N.培養したものをそれぞれコントロールとした。細切した羊膜(2X2 cm)を950 μ lの生理的食塩水に入れ、ボルテックスで攪拌後30 min静置して抽出液を得た。900 μ lの抽出液に100 μ lの菌原液を加えて調整液とした。調整液をさらにx100、x1,000、x10,000希釈し、50 μ lをCSD培地のdishに播種し、55℃、O.N.培養した。

iii) Vancomycin Hydrichloride(VCM:Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 226-0131, Osaka) の最終濃度が0.125、0.25、0.50、1.00 μ g/mlになるように調整された培地に菌液のWorking Solutionをさらにx100、x1,000希釈し、50 μ l播種、55℃、O.N.培養した。得られたデータから検量線を作製し、各羊膜の抗菌効果をVCMの濃度に換算した。

② 結果

1. 臨床研究

【症例1】

74歳女性、既往歴:糖尿病(インスリン使用),高血圧、現病歴:バイクで転倒して(交通事故により)左大腿部内側を打撲。受傷から1週間後に皮下血腫感染により大腿部軟部組織感染症に至り、当院紹介受診。

1. 受傷時所見



Fig.1 デブリードマン後(入院時)

皮下組織内に残存した血腫を取り除き、壊死組織をデブリードメント。結果的に、20×20cm程度の皮膚欠損となった(Fig.1:デブリードメント後)。

その後はデブリードメントを繰り返しつつ、NPWT管理を実施した。

2. 受傷13日目

不良肉芽や壊死組織に対し、全身麻酔での創部デブリードマンを施行した (Fig.2:手術後)。



Fig.2 デブリードマン後(来院13日目)

3. 受傷20日目:羊膜の貼付

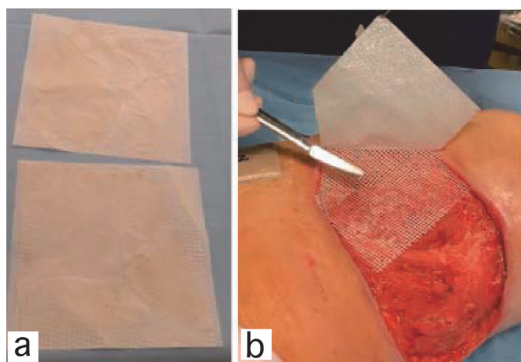


Fig.3 HD羊膜の貼付(来院20日目)

組織の欠損が大きく、

分層植皮を要する創部であったため、肉芽増生の促進と良好なwound bedが整うことを期待して、NPWTの治療に加えて、HD羊膜による治療を実施することの同意を得た。創面と正常皮膚面との段差は約1cmであった。ソフラチュールガーゼに羊膜の間質面を上にして貼布して (Fig.3a)、それを

創部に貼り付けた (Fig.3b)。さらに、その上からNPWTを装着した。

4. 羊膜貼付治療 5日目 / 12日目

HD羊膜は、ほとんどが創部に生着していた。鑷子でつまんでいる部分は羊膜下に滲出液が貯留し生着していなかった (Fig.4a)。生着しなかった羊膜を除去後、ソフラ

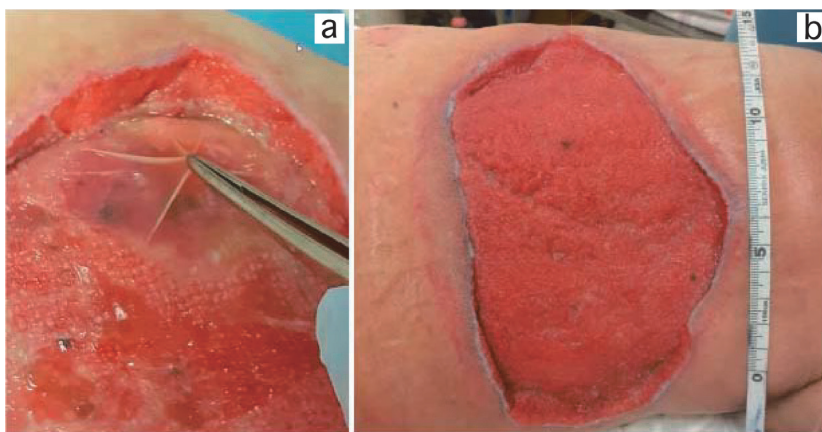


Fig.4 HD羊膜貼付治療後 (a:治療5日目, b:治療後12日目)

をすこし小さめにカットしブロック状に再度貼付すると生着良好となり (Fig.4b)、良好なwound bedが整ったので自家皮膚を用いた分層植皮術を実施した。

5. 治癒後の状態

受傷から約4ヶ月後(羊膜治療を実施して約3ヶ月半後)の創部所見は、衣服による細かな圧迫痕(Fig.5 a)が観察できるほど伸縮性が良好であり、時間が経つにつれ消失(Fig.5 b)が見られた(可塑性があった)。また、触診により、植皮部の皮膚は容易に指でつまみ上げることが可能で、癒痕形成による硬化(癒痕収縮)は比較的少ない印象が得られた。

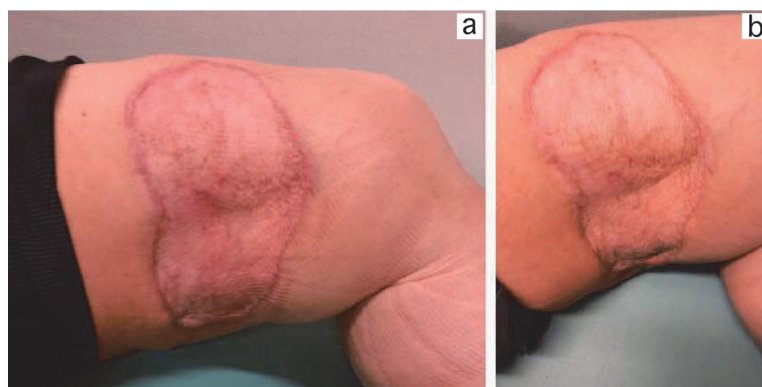


Fig.5 HD羊膜貼付+自家皮膚を用いた植皮術
(a:服をめくった直後, b:時間が経過した後)

【症例2】

68歳女性、既往歴：高血圧、糖尿病、現病歴：熱湯による上肢・下肢熱傷にて当院受診。

1. 来院時所見

左の上肢および下肢に熱湯による、2-3度の熱傷を認め(Fig.1b, c)、どちらも同じ受傷機転による同程度の熱傷であった(Fig.1a, b, c)。

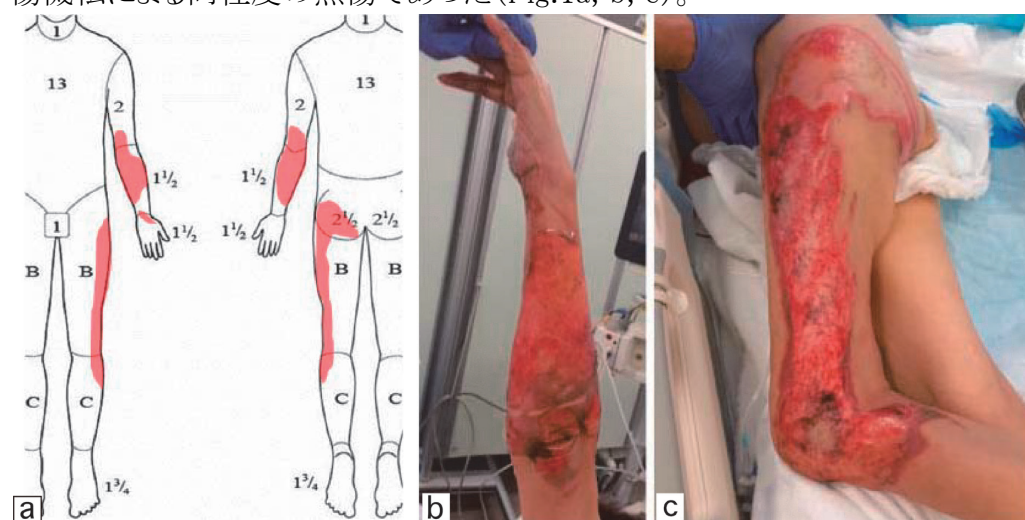


Fig.1 熱傷の受傷部位(a:シェーマー, b:上肢受傷部, c:下肢受傷部)

2. 受傷8日目

3度熱傷の部分は壊死を起こし、白色となりデブリードマン後 NPWT治療を継続した(Fig.2b)。

3. 受傷20日目:羊膜の貼付(HD羊膜貼付治療開始)

3度熱傷の範囲が大きく、分層植皮を要する創部であったため、良好な wound bedが整うことを期待して、HD羊膜による治療を実施することの同意を得た。なお、HD羊膜の使用



Fig.2 治療経過

量が制限されるために、左上肢のみにHD羊膜の治療を施した。上肢の創面は壊死を起こした組織に覆われ(Fig.2c-1)、デブリードマン後(Fig.2c-2)にソフラチュールガーゼで固定した羊膜を創部に貼り付けた。さらに、その上からNPWTを装着した。なお、左下肢に関しては洗浄と軟膏処置などの通常の熱傷創管理を行った。

4. HD羊膜による治療および患者の健常部皮膚による植皮

左上肢の熱傷部位にHD羊膜の貼付治療を開始してから4日目(受傷18日目)に良好な移植床が観察できた(Fig.2d)。同日に14/1000inchで採皮した自家皮膚をソフラチュールガーゼに

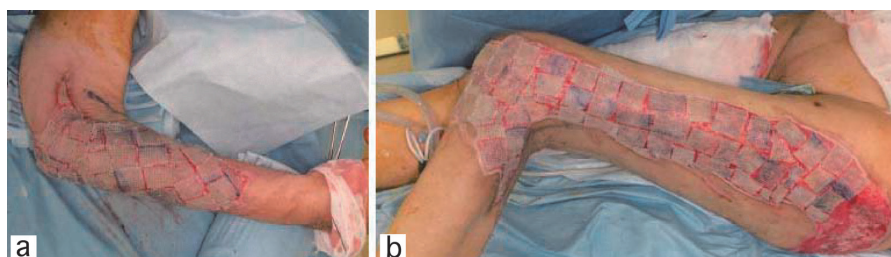


Fig.3 自家皮膚の植皮

左上肢, b:左下肢)。分層植皮後ソフラチュールガーゼを除去し、エスアイメッシュを置きガーゼと包帯で圧迫固定した。

ユールガーゼに置いた後にパッチ状にして上肢および下肢の創面に分層植皮した(Fig.3a:左上

5. 生検(バイオプシー)による移植床の病理学的検討

左上肢の熱傷部位にHD羊膜の貼付治療を開始してから4日目(受傷18日目)の創部を生検(バイオプシー)し、移植床の病理学的検討を実施した。上肢組織(羊膜あり)では表皮・真皮は欠損し、移植床(肉芽)組織の層は約

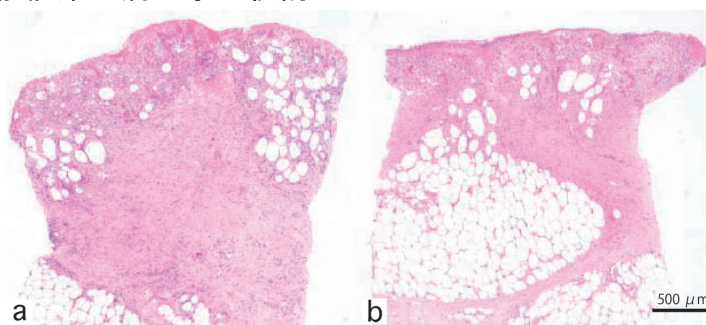


Fig.4 移植床の病理像

2200 μ mの厚さであった(Fig.4a)。下肢組織(羊膜なし)でも表皮・真皮は欠損し、移

植床(肉芽組織)の層は約800-900 μm の厚さであった(Fig.4b)。上肢組織(羊膜あり)の表層には毛細血管が観察できた。

6. 植皮4ヶ月後の患部所見

植皮4ヶ月後の患部所見は良好で、肘関節に拘縮はなく、上肢の可動域に制限を認めなかった(Fig.5a、5b)。植皮部の皮膚は寄せると皺ができ、柔らかかった。瘢痕は下肢と比べて少ない印象であった(Fig.5c、5d)。

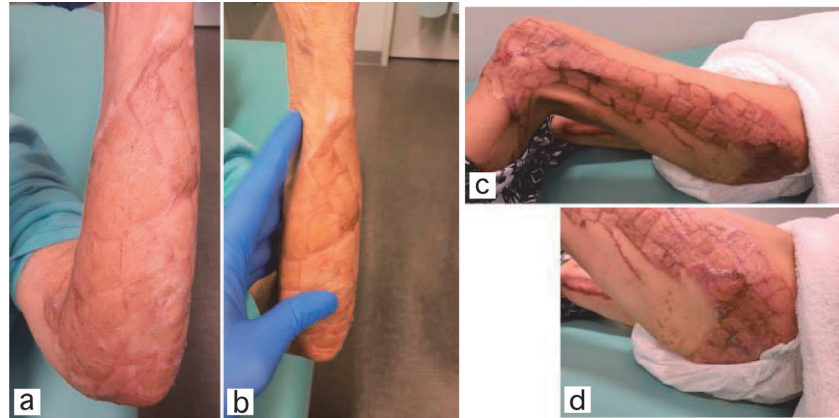


Fig.5 植皮4ヶ月後の所見

2. 基礎研究

1. 抗菌効果試験(定性試験:ハロー法)

生羊膜およびHD羊膜の双方でオートクレーブ滅菌の指標菌であるBacillus stearothermophilus:芽胞菌に対して阻止円を認めた(Fig.1A)。S.aureus:黄色ブドウ球菌およびE.coli:大腸菌では阻止円は認められなかった(Fig.1B)。

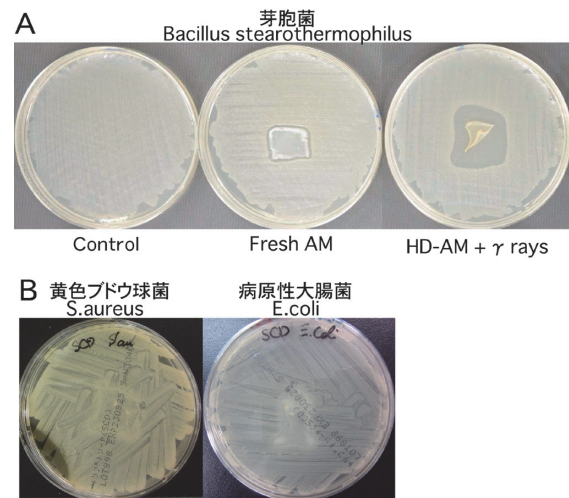


Fig.1

2. 羊膜の抽出液による抗菌効果試験(定量試験)

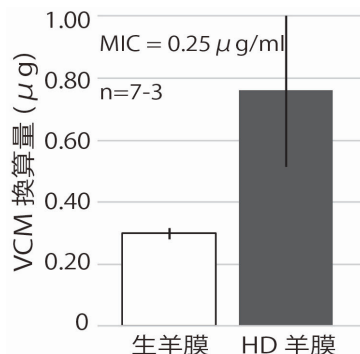


Fig.2
ことが分かった(Fig.2)。

ハロー法による試験で阻止円が見られたBacillus stearothermophilus:芽胞菌に対してHD羊膜の抽出液を作用させて抑制効果を検討した。芽胞菌に対するバンコマイシン(VCM)のMinimum Inhibitory Concentration(MIC:最小発育濃度)は0.25 $\mu\text{g/ml}$ であった。VCMの検量線を引き、羊膜の抽出液の抑制効果をVCMに換算したところ、生羊膜(Fresh AM)では0.30 $\mu\text{g/ml}$ 、HD羊膜では0.76 $\mu\text{g/ml}$ に相当する

③ 考察

臨床研究

羊膜以外の創面の被覆材としては、1) 人工真皮 (OASIS:ブタ小腸粘膜下組織;クックメディカル合同会社、テルダーミス:仔牛の真皮アテロコラーゲン;アルケア株式会社)、2) バンクからのヒト皮膚 (アログラフト)、3) 自家培養表皮 (自家培養表皮ジェイス;株式会社 J-TEC, 帝人グループ) などがある。

人工真皮は、異物として感染引き起こす原因になることがあり使用を控えることが少なくない。また、バンクからの供給は施設要件 (実施医師の条件を含む) を満たすことおよび契約などがあり、広く一般的とはいえない。そして自家培養表皮は良好な移植床がなければ生着しないことが知られている。

近年、上記被覆材とNPWTを組み合わせる治療方法およびNPWT単独での治療が一般となるので本研究でもその併用とした。羊膜とNPWTの併用により、NPWT単独よりも血管新生を伴う良好な移植床の増生が見られ (Fig.4)、その結果として植皮後に関節の可動域の制限がなく、瘢痕拘縮の抑制効果が示唆された (Fig.5)。

羊膜には抗炎症作用 (Hao YX, et. al., Cornea, 19, 348-352, 2000)、抗菌活性 (Kjaergaard N, et. al., Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 94, 224-229, 2001; Robson MC, et. al., Ann Surg, 177, 144-149, 1973; Sachs BP, et. al., Br J Obstet Gynaecol, 86, 81-86, 1979)、瘢痕抑制効果 (Trelford JD, et. al., Am J Obstet Gynecol, 134:833-845, 1979)、水分保持効果 (Okabe M, et. al., J Biomed Mater Res A., 102, 862-70, 2014)、低い抗原性 (Li, J., et. al., Cell Transplant, 24, 2065-76, 2015)、増殖因子 (Koizumi N, et. al., Curr Eye Res, 20, 173-177, 2000)、が報告されており、臨床での有用性が示されている。乾燥羊膜 (HD羊膜) でも同様の効果が眼科領域の先進医療B「再発翼状片の治療」で示されつつあり、本研究は探索的臨床研究であるが、乾燥羊膜は十分な創傷治癒効果を発揮する事が確認できた。

基礎研究

近年、羊膜自体に抗菌効果が報告 (M.Gholipourmalekabadi, et al., Burns, 2015) されているが、我々も羊膜が一般細菌の芽胞菌に対しては抗生物質よりも効果を発揮する事を裏付けた (基礎研究 Fig.1, Fig.2)。しかしながら、病原菌のなかで黄色ブドウ球菌および大腸菌については報告にある効果は見られなかった (Fig.1)。これは使用した羊膜の人種による違いも考えられる。

一方で、一般細菌や皮膚の常在菌も時に感染症を招くこともあり、これらに対しても羊膜の効果を検証する必要があると考える。羊膜がどのような一般細菌および病原菌に効果があるか興味深いところである。

④ 結論

HD羊膜は交通事故で起こりうる外傷で広範囲の皮膚欠損等で基礎研究と同様に良質な移植床を形成し、瘢痕拘縮の予防効果を示す良好な治療効果を示した。広範な皮膚欠損部の再建に有効な再生医療材料であることが示され、この開発研究が有用であると考えられた。

学会発表

1. 岡部素典、天野浩司、中村光伸、大場次郎、佐武利彦、門脇未来、安原裕美子、中田康城、林 篤志、伊藤哲史;HD羊膜の創傷治療への適用可能性の検討, 第24回日本再生医療学会総会;一般演題;横浜, 3月20-22日2025年
2. 天野浩司、吉田淑子、岡部素典、大場次郎、門脇未来、安原裕美子、米谷公佑、上月志乃、山際優子、橋本優、茅田洋之、加藤文崇、川本匡規、薬師寺秀明、向井信貴、晋山直樹、臼井章浩、森田正則、中田康城; 重度熱傷に対する羊膜治療の“revival”, 第50回 日本熱傷学会総会・学術集会; シンポジウム 1 LOVE! 熱傷創管理;大阪, 6月13-14日2024年
3. 天野浩司、吉田淑子、岡部素典、大場次郎、茅田洋之、加藤文崇、川本匡規、薬師寺秀明、臼井章浩、安原裕美子、森田正則、中田康城; ハイパードライヒト乾燥羊膜(HD羊膜)の開発による救急領域における羊膜治療発展への期待, 第51回日本救急医学会学術集会; 一般口演26 脳死・臓器組織提供;東京, 11月28-30日2023年

PMDAとの相談

1. 事前面談 2023年12月5日
2. 事前面談 2024年10月3日