コラーゲン製止血材の生体顕微鏡による評価： 組織親和性および吸収性

富澤 康子 小森 万希子* 高田 勝美*
西田 博 遠藤 真弘 黒澤 博身

コラーゲン製止血材の組織親和性および吸収性を評価するために創傷治癒モデルにおいて生体顕微鏡下に観察した。3種類の市販のコラーゲン製止血材、綿状 (Integran®)、微細線維性 (Avitene®) とシート状 (TachoComb®) を検討した。家兎の耳介に観察窓を作成し約 0.5 mg の各試料を留置した (Integran $n=8$, Avitene $n=6$, TachoComb $n=6$)。肉眼的および生体顕微鏡学的観察を5週目まで施行した。留置した試料は肉眼的に、Integran 群では2週目まで、Avitene 群および TachoComb 群では4週目まで観察できた。Integran 群では血管新生は速やかに起こり顕微鏡下に綿の繊維上に付着している細胞、および繊維間に侵入している毛細血管が観察され、5週目には6/8匹において観察窓内の脈管構造が完成した。TachoComb 群では2週目には試料周囲の浸出液に向かって新生血管は促進したが、Avitene 群では浸出液に新生血管は向かわなかった。5週目においても Avitene 群と TachoComb 群の両群では浸出液あるいは感染により窓内の脈管構造は完成せず、試料で満たされていた場所は浸出液で満たされているか、空洞が形成されていた。コラーゲン製止血材の形状は宿主の治癒過程に及ぼす影響が大きく、組織親和性、組織治癒および材料の吸収過程には優劣があることが明らかになった。日心外会誌 32 巻 1 号：17-22 (2003)

Keywords：止血材，コラーゲン，組織親和性，綿状，血管新生

In Vivo Evaluation of Collagen Hemostats: Biocompatibility and Resorption

Yasuko Tomizawa, Makiko Komori*, Katsumi Takada*, Hiroshi Nishida, Masahiro Endo and Hiromi Kurosawa (Department of Cardiovascular Surgery, The Heart Institute of Japan and Department of Anesthesiology*, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan)

After bleeding is controlled with hemostats during surgery, the residual material should be resorbed without adverse effects such as inflammation, infection or scar formation. To evaluate the biocompatibility of hemostats, three kinds of commercially available collagen hemostats, cotton type (Integran®), microfibrillar type (Avitene®), and sheet type (TachoComb®), were examined. A rabbit ear chamber (REC), a system for viewing materials *in vivo*, was applied to the auricle of male Japanese white rabbits. The REC was designed to leave a 50- μ m-thick and 6.4 mm-diameter chamber, and 0.5 mg of each specimen (Integran; $n=8$, Avitene; $n=6$, TachoComb; $n=6$) was placed in the chamber. Macroscopic and microscopic observations were performed every week up to 5 weeks without anesthetizing or stressing the animal. In the Integran group, capillaries infiltrated between the collagen fibers, and the vasculature in the REC field was complete in 6 out of 8 animals at 5 weeks. Cotton type collagen fibers of Integran became thinner every week without effusion. In the TachoComb group, capillaries were directed toward the effusion at 2 weeks, while in the Avitene group, a similar phenomenon was not observed. The vasculature was incomplete, with either effusion or infection at 5 weeks in the Avitene and TachoComb groups. Material was recognized up to 4 weeks in the TachoComb group, whereas the space occupied by material remained vacant without vasculature in the Avitene group. Our results suggest that cotton type configuration is excellent as a collagen hemostat, with smooth capillary infiltration, rapid resorption of material and promotion of the healing process. Jpn. J. Cardiovasc. Surg. 32: 17-22 (2003)

現在市販されている止血材の材料には酸化セルロース、ゼラチン、コラーゲンなどがあり、形状としてはガーゼ

状、スポンジ状、微細線維状、綿状、シート状がある。止血材は傷にあわせて形を整えられ、止血効果に優れ、生体内で組織反応が少なく吸収され、抗原性がわずかといった条件を満たすことが重要である。

外科手術にて使用された止血材は出血が制御されたのち、体内に残存した部分は炎症、感染または瘢痕形成などを起こさずに吸収、器質化されなければならない。止血材

2001 年 12 月 11 日受付, 2002 年 7 月 12 日採用
東京女子医科大学日本心臓血管研究所心臓血管外科, *麻酔科
本論文の要旨の一部は, 第 39 回日本人工臓器学会 (2001 年 11 月, 大阪) において発表した。

の評価が非侵襲的経時的に生体顕微鏡下に観察されたことは少ないが、形状、あるいは製品の違いにより止血材への宿主組織の侵入が異なることが予測された。

本実験ではコラーゲン製止血材の組織親和性および吸収性を評価するために創傷治癒モデルを用いて生体顕微鏡下に観察した。

材料および方法

1. 材 料

市販のコラーゲン製止血材、綿状 (Integran[®], 日本臓器製薬, 東京), 微細線維性 (Avitene[®], ゼリア新薬工業, 東京) とシート状 (TachoComb[®], 鳥居薬品, 東京) の 3 種類を用いた。

2. 実験方法

白色家兎の耳介に直径 6.4 mm, 厚さ 50 μ m の空間を作るように設計された観察窓 (rabbit ear chamber, REC) を装着するモデル¹⁾を使用した。約 0.5 mg の各試料を窓内に留置した (Integran $n=8$, Avitene $n=6$, TachoComb $n=6$)。

3. 観察方法

肉眼的および生体顕微鏡的な観察を術後 4 日目, および毎週 1 回, 5 日目まで施行した。なお, 肉眼的観察時にはマクロ写真撮影を行ったが, 撮影には撮影架台 (Nikon 社, Multi Photo), カメラ (Nikon 社, Nikon F4s, Medical Nikkor の鏡塔, 純正レンズ 1 倍, 2 倍) と作成した照明箱 (Nikon 社, Nikon Macro SpeedLight SB-21 内蔵) を用いた²⁾。経時的直視下の観察には生体顕微鏡を使用し, 結果はビデオテープに収めた。観察は実験動物をケージに入れて行った。なお, 動物実験は東京女子医科大学倫理委員会の許可を受け, 「動物実験に関する指針」³⁾ に従った。

結 果

1. REC の治癒

Integran 群では 6/8 匹において観察窓内の脈管構造が完成したが, 2 匹では完成しなかった。Avitene 群と TachoComb 群の両群では浸出液あるいは感染により窓内の脈管構造は 1 匹も完成せず, 試料で満たされていた場所は浸出液で満たされているか, 血管・組織などの侵入の認められない空間が形成された。

2. 肉眼的観察およびマクロ写真評価

(1) 材 料

Integran: 留置直後には, 観察窓内で綿状であり, 1 週目においても留置した材料は観察された (図 1 a)。感染しなかったものでは肉眼的には 2 週目まで綿状に認められたが, 侵入血管と形成された組織のために 4 週目以降は観

察が困難であった。

Avitene: 留置直後には塊状であり, 1 週目でも認められた (図 1 f)。4 週目まで試料の形が確認できた (図 1 i) が, 5 週目に材料が崩れて空洞となった (図 1 j)。

TachoComb: 留置直後および 1 週間後にも塊状およびゼリー状の試料が認められ (図 1 k), 4 週目まで鮮明ではなかったが浸出液のなかに試料の形が確認できた (図 1 n)。5 週目には材料は認められず浸出液が残った (図 1 o)。

(2) 血管新生

Integran: 周囲からの血管新生が起こったが, 先端に出血を伴っていなかった (図 1 b, c)。

Avitene: 材料内への血管侵入は観察できなかった。

TachoComb: 2 週目には周囲の浸出液に向かって血管が伸展し, 出血していた (図 1 l) が, 3 週目以降はその現象は観察されなかった。

3. 生体顕微鏡下の観察

Integran: 4 日目には繊維状の止血材が疎に存在し, 周囲に円形の細胞が認められた (図 2 a)。新生血管は止血材に阻止されることもなく周囲から侵入した (図 2 b)。4 週目の観察窓の表面にはほぼ同じ大きさの細胞が増殖しており (図 2 c), 動静脈が認められた (図 2 d)。止血材は辺縁が不整で細くなり, 血管が乗り越えているところが多数あった (図 2 e)。5 週目には繊維が断片化され, 血管が収縮したときに, 止血材の断片が残存した (図 2 f)。

Avitene: 4 日目には線維は束状の塊になっていた (図 2 g)。2 週目には止血材の塊の周囲には浸出液が存在し, 周囲からの侵入血管と止血材には境界があった (図 2 h)。2 週目に図 2 g と同じ部位の止血材に血管が到達した (図 2 i)。束状だと到達した血管は止血材の上に乗るあげにくい (図 2 j) が, ほぐれている部位では血管が乗り越えることもあった (図 2 k)。4 週目に顕微鏡下では止血材の構造はなくなっていたが, 血管はそれ以上には侵入しなかった (図 2 l)。

TachoComb: 4 日目には膜状の止血材および付着していたゼリー状の物質 (図 2 m) が認められ, ゼリー状の物質は浸出液との境界が明らかであった (図 2 n)。7 日目には止血材の膜状の部分へは細胞付着が少ない (図 2 o) が, ゼリー状のものが存在したところには円形の細胞が認められていた (図 2 p)。2 週目, 膜状のところに円形の細胞が認められ (図 2 q), 大小の円形の細胞が認められるところもあった (図 2 r)。

考 案

止血操作性以外では, 綿状, ガーゼ状, 微細線維状, スポンジ状, シート状などの止血材の形状の違いはそれほど

図1 観察窓のマクロ観察所見

Integran(a~e)は1~3週目に綿状の試料が観察でき、5週目にはほぼ観察窓全体が浸出液もなく血管網が完成して治癒している。Avitene(f~j)では1週目に詳細に観察された試料(f: ↓)は4週目(i)には崩れかけており、5週目(j)には空洞の部分以外は治癒している。TachoComb(k~o)では1週目に試料(k: ↓)は鮮明に観察された。2週目(l)では中央の浸出液の辺縁が濃い赤色であり、ほかの試料に比べて浸出液の色が赤い。5週目(o)には試料は認められないものの、浸出液は残留している。*家兎の耳介の軟骨。

図2 生体顕微鏡下観察所見

Integran: 4日目には繊維状の止血材が疎に存在し、周囲に円形の細胞が認められた(a), 新生血管は止血材の繊維間に侵入した(b). 4週目の観察窓の表面にはほぼ同じ大きさの細胞が増殖しており(c), 動脈, 静脈が認められ(d), 止血材は細くなってきており辺縁が不整で、血管が乗り越えているところが多数あった(e: ↓). 5週目には線維が断片化され、血管が収縮したときに、止血材の断片が残存しているのが認められた(f). Avitene: 4日目には線維は束状の塊であった(g). 2週目には止血材の塊の周囲には浸出液が存在し、周囲からの侵入血管と止血材には境界があった(h). 2週目に止血材に血管は到達した(i)が、束状の部分では血管は止血材の上に乗りにくい(j)が、ほぐれている部位(k: ↓)では血管が乗り越えるのが認められた. 4週目には止血材の構造は壊れていたが、血管は先細りして侵入していなかった(l). TachoComb: 4日目には膜状およびゼリー状の物質(m)が認められ、ゼリー状の物質は浸出液との境界が明らかであった(n). 7日目には膜状の部分へは細胞付着が少なく(o)が、ゼリー状のものが存在したところには円形の細胞が多数認められ(p). 2週目、膜状の上に円形の細胞が認められ(q), 大小の円形の細胞が認められるところもあった(r). Integranの4日目(a), 3週目(b), 4週目(c~e), 5週目(f). Aviteneの4日目(g), 2週目(h~k), 4週目(l). TachoCombの4日目(m, n), 7日目(o, p), 2週目(q, r). Original magnification: h, l, m, n: ×10, b, f, i, o, q: ×25, a, c, d, e, k, r: ×50.

重要とは考えられてこなかった。過去において植え込み後の止血材は組織学的に評価されることがほとんどであった。本研究で選択した方法により止血材に新生血管が境界を作らずに侵入する、あるいは侵入せず取り囲むだけであるといった所見を観察したことは細胞・組織親和性の評価の面から貴重であった。コラーゲン製止血材は組織親和性が優れているとされてきたが、細胞親和性および血管新生を生体顕微鏡で経時的に評価できたことにより、止血材の形状と性質により治癒過程が異なる、すなわち材料の形状、性質により吸収される過程、必要時間、吸収後の治癒などに差があることが明らかになった。

REC モデルでは、長期間にわたって同じ試料を生体顕微鏡を用い非侵襲的、直視下に、何度でも観察可能であり、材料表面への細胞接着、新生血管の侵入過程、材料の吸収および器質化が、再現性をもって評価できる。さらに、新生血管の侵入の遅延・不全の理由が、組織親和性の不良、周囲の炎症、浸出液貯留などが観察できる利点がある。しかし、欠点としては観察窓が薄い2次元の chamber であるため、局所的な影響を受ける可能性は否定できない。窓内の円形の細胞が拍動しており、窓内の組織液の循環が十分行われていても、本研究においては試料への周辺の宿主組織からの距離は同一ではなかった。また、試料の形状も影響し、同じ重量でも綿状の試料は薄く広げることができたが、Avitene および TachoComb は、試料が密であり、とくに Avitene は微細線維性としていたが、注射針の先端でほぐしたにもかかわらず、線維をばらすことはできなかった。

コラーゲンを紡糸し、繊維化させると、綿状の繊維構造が止血時に膨潤してもその基本的構造が保たれ、創面に付着するのに適しており、血小板凝集能を十分発揮させ、安定な血栓を誘導し、さらに、血管新生の足場として役に立つ⁴⁾。実験的には繊維径 20~50 μm が最も止血効果が高く、細すぎても効果が落ちることが報告されている⁵⁾。また、適切な高次構造をもった架橋コラーゲンを供給することにより新生血管や線維芽細胞の侵入を助長し創傷治癒過程が促進されることも優れている⁶⁾。

過去に、REC モデルの観察窓内に足場となるものを入れないで治癒を評価したところ出血しやすかった²⁾ ことを経験した。窓内の組織液の循環を妨げず、境界をもたずに綿の繊維間への新生血管の侵入が速やかで、出血せず、治癒が速やかで、しかも材料への細胞接着が良好で、試料が徐々に、細く、また断片化されていくのが観察されたことから今回用いた Integran は良好な足場になりえ、この形状および性質が創傷治癒に適していることが示唆された。

微細線維性の Avitene は粉末状であり、操作性に劣ることは以前から指摘されていた。本研究では試料が 4, 5

週目に速やかに崩壊したが、その空洞に宿主の組織が侵入せず、血管が先細りしていたのは新しい知見であった。材料を血管が乗り越えず、血管が材料を回避するというのは組織学的には観察できなかった所見であり、この REC モデルにおいては、天然のコラーゲンの螺旋構造を重んじた微細線維性止血材の組織親和性は綿状に比べて劣ると評価された。

TachoComb は人フィブリノゲン、ウマコラーゲン、ウシトロンビン、ウシアプロチニンを使用しているため医薬品であるが、ほかのコラーゲン製止血材料は医療用具に分類されている。心臓血管外科領域ではフィブリン糊の欠点を補う接着剤として期待されて登場した⁷⁾。臨床で止血材の吸収を直視下に観察することは希であり、15 日目の再開胸時に用いた TachoComb が胸膜面に強固に張り付いていたのが観察されている⁸⁾ が、本実験でも 2 週目には TachoComb のコラーゲンの部分が鮮明に観察されている。

TachoComb において図 11 に見られたように、2 週目に浸出液に向かって輪状に出血が観察されたのは興味深い所見であった。血管の芽 (sprout) の出現から血管新生は顕微鏡下で観察することが可能である⁹⁾。Sprout は壁が薄く、足場のないところでは壊れやすい。今回観察した出血は TachoComb に含まれている成分による血管新生促進効果と考えられ sprout ができたものの、足場がないために壊れ出血したものと考えた。そのため、ゼリー状の物質が吸収された 3 週目以降には、コラーゲンのみが残留し、血管新生を能動的には誘導しなかった。

このたび用いた Integran は、米国産の子牛 (6 か月未満) から採取した真皮を酵素を用いて可溶化精製した、アテロコラーゲンを原料としている¹⁰⁾。アテロコラーゲンはコラーゲンの主要抗原決定部位が除去されており、可溶化のさいの酵素処理により不純物のアルブミンも消去除去されることになっている。Avitene に不純物としてアルブミンが検出される¹¹⁾ が、ウシアアルブミンはヒトでは抗原性がある。発熱をきたした症例にて細菌が検出されず、血中 IgE 値と好酸球数が高値であったため、発熱の原因がアレルギー性機序によるものと考えられた症例¹²⁾、全身性アレルギー反応をきたした症例¹³⁾ などが報告されている。

現在、コラーゲンは医薬品、医薬部外品、化粧品、医療用具などに多用されている。コラーゲンは止血に優れているばかりでなく、再生医学・組織工学においては良好な足場になることが知られている。また欠損部での肉芽組織の形成を促進し、骨の形成促進を期待しうる材料と報告されている⁶⁾。

止血に問題のある、あるいは問題となる症例の対処には工夫が必要である。循環器外科領域手術の特殊性として

1) 患者が抗血小板剤, 抗凝血剤を使用していることが多い, 2) 心臓, 大血管系の手術, 3) 人工心肺使用による影響 (ヘパリンの使用, 血液希釈, 血小板数の減少, 血液凝固因子の物理的損傷, 線溶系の活性化) が大きいことがあげられる^{14,15)}。

抗凝固療法中の患者の抜歯についてはワーファリンおよび抗血小板のいずれも維持量のままでは止血に難渋することが多い。International Normalized Ratio (INR) が4以下であれば薬を減量することなく維持量のまま抜歯は可能であると報告¹⁶⁾されている。経口抗凝血薬の維持量投与下の23症例において56歯を延べ46回にわたり抜歯した報告では, 当日のトロンプテスト8.7~44.8% (24.7±8.5%) で, 止血時間は平均5.9時間かかったが, もし局所止血材を使用したならば止血時間の短縮改善が得られたに違いないと考察されている¹⁷⁾。また, 維持量のまま, 通常どおり抜歯した症例にて, 抜歯窩への局所止血処置に綿状アテロコラーゲンを填入し, 圧迫した¹⁸⁾ところ, 止血材は補助的な止血方法として有用であった。また血液凝固障害患者 (Von Willebrand 病) の出血にも局所的止血の使用により対応可能であった¹⁹⁾との報告がある。

止血材は吸収, 器質化が良好で, 宿主の治癒を遅延させないことが望ましい。そして, 止血材は術後に体内に留置された場合, 速やかに吸収されることになっていても, 使用後に余剰分は可能な限り除去することが好ましい。外科医のなかには吸収性材料を非吸収性材料のように扱い, 「小さく正方形に切断し, 縫合時, 一緒に針を通し, 針穴の表面につきあてるような形で適用し…」といった使用方法を勧めている¹⁵⁾が, コラーゲン製止血材の吸収後には, 縫合糸の緊張にゆるみが生じ, 術後出血の可能性がある。そのため, 吸収性材料の使用は, 吻合後の縫合線上にのみとどめるべきと考える。

結 語

コラーゲン製止血材の組織親和性および吸収性を評価するために創傷治癒モデルを用いて生体顕微鏡下に観察したところ, 材料の形状および性質により, 細胞親和性, 材料の吸収過程, 新生血管の侵入, および組織治癒には優劣があった。綿状では新生血管の侵入および治癒が妨げられず, 良好に治癒することが明らかになった。止血材の使用にさいしては製品の選択, 適応, 外科医の使用方法などが適切であることが望ましいことが示唆された。

文 献

- 1) 浅野牧茂, 吉田敬一, 田多井吉之介: Rabbit ear chamber による微細循環動態の研究法について. 生体の科学 **13**: 285-294, 1962.
- 2) 鈴木 豊, 美山 晃, 冨澤康子: Rabbit ear chamber の簡易撮影方法. 呼と循 **48**: 93-96, 2000.
- 3) (社)日本実験動物学会: 動物実験に関する指針. Exp. Anim. **36**: 285-288, 1987.
- 4) 夏目 徹, 田村康一, 河原崎茂孝ほか: コラーゲン止血材一形状の改良と止血効果. 人工臓器 **19**: 1235-1238, 1990.
- 5) 夏目 徹, 奥村典仁, 清水慶彦: コラーゲン止血材一線維径と溶解性の検討. 人工臓器 **22**: 348-352, 1993.
- 6) 上田 実, 大久保肇, 藤本雄大ほか: スポンジ状アテロコラーゲンの骨欠損治療に及ぼす影響. 口科誌 **43**: 363-368, 1994.
- 7) 西田 博, 青見茂之, 遠藤真弘ほか: 組織接着剤; フィブリン糊・タココンプ等一特に循環器外科領域について. 医薬の門 **39**: 341-347, 1999.
- 8) 佐藤寿彦, 古川幸穂, 岡崎 強ほか: 貼付後15日のタココンプ再開胸時所見. 医薬の門 **41**: 100, 2001.
- 9) Arnold, J.: Experimentelle untersuchungen über die Entwicklung der Blutcapillaren. Virchows Arch. **53**: 70-92, 1871.
- 10) 跡見 祐, 木内立男, 野内 亘ほか: アテロコラーゲンを原料とした綿状止血剤 (KB-921) の外科領域における臨床的検討. 臨床成人病 **25**: 117-121, 1995.
- 11) 冨澤康子, 野一色泰晴, 遠藤真弘ほか: 綿状コラーゲン製止血材の吸血性, 止血性及び純度の評価. 胸部外科 **49**: 126-129, 1996.
- 12) 白石隆祐, 蔡 元奎, 安近健太郎ほか: ZA-552 (アピテン) 残留が原因と思われる高熱をきたした外傷性肝・腎損傷の一例. 日臨外会誌 **55** (増刊): 388, 1994.
- 13) Kitamura, K., Yasuoka, R., Ohara, M. et al.: How safe are the xenogeneic hemostats?—Report of a case of severe systemic allergic reaction. Surg. Today **25**: 433-435, 1995.
- 14) 鎌田振吉: 小児外科手術における吸収性止血パッド INSTAT の止血効果の検討. 基礎と臨床 **25**: 249-256, 1991.
- 15) 川副浩平: 心臓外科領域における吸収性止血パッド INSTAT の止血効果の検討. 基礎と臨床 **26**: 375-386, 1992.
- 16) Beirne, O. R. and Koehler, J. R.: Surgical management of patients on warfarin sodium. J. Oral Maxillofac. Surg. **54**: 1115-1118, 1996.
- 17) 式守道夫: 経口抗凝血薬療法患者の口腔観血処置に関する臨床的並びに凝血学的研究, 特に維持量投与下での抜歯について. 口科誌 **28**: 1629-1642, 1982.
- 18) 新美直哉, 各務秀明, 熊谷康司ほか: 抗凝固療法施行患者の抜歯における出血管理について—綿状アテロコラーゲンの使用経験—. 口科誌 **46**: 445-447, 2000.
- 19) 大野正光, 黒住良隆, 西村敏治ほか: 局所的止血処置が奏功した歯肉出血を有した血液凝固障害患者 (Von Willebrand 病) の1例. Prog. Med. **11**: 2605-2610, 1991.