

特別賞

新規医療材料シルクエラスチンを用いた 創傷治癒材の開発

1：三洋化成工業株式会社、
2：京都大学

川端 慎吾^{1,2} 柚本 聡¹
河合 勝也² 鈴木 茂彦²

1. 緒言

1.1 背景

我が国の糖尿病総患者数(継続的な治療を受けていると推測される患者数)は、316万6,000人(2014年)で年々増加傾向にある⁽¹⁾。糖尿病患者の中でも、特に神経障害や末梢血流障害を有し、下肢に生じる感染、潰瘍、破壊性病変を伴う糖尿病足潰瘍が世界的にも増加している⁽²⁾。糖尿病足潰瘍は末梢血流障害のため難治性潰瘍が生じやすく、治療に難渋している。また、糖尿病足潰瘍は再発しやすく、かつ下肢切断となるケースが7~20%程度生じている⁽³⁾。さらに、下肢切断の際の死亡率は周術期で約10%、術後1年で約30%、3年で約50%、5年で約70%と報告されている⁽²⁾。

上述のように、糖尿病足潰瘍をはじめとする難治性皮膚潰瘍は、血流障害により感染を惹起するため治癒遷延や数カ月にわたる保存的治療でも創傷治癒が得られないことが多い。しかし、現在市販の創傷治療材料は感染に弱く、感染を起こしやすい難治性潰瘍には不適である。そのため、感染に対する抵抗性を有し、かつ創傷治癒を促進する材料の開発が臨床現場では望まれている。

<現状>

日本の糖尿病患者数 : 316万6,000人
糖尿病下腿潰瘍の有病率 : 1.5~10%(発生率 : 2.2~5.9%)

重症化(足切断)患者 : 1万人/年

(日本糖尿病学会ガイドライン2013)

- ✓高齢化による糖尿病患者が増加
- ✓重症下肢虚血(CLI)も増加予測
- ✓世界の糖尿病患者も増加、4億1,500万人 (国際糖尿病連合2015)

糖尿病性足潰瘍の治療:

- ✓血流障害により感染を惹起するため治癒遷延
- ✓数カ月にわたる保存的治療でも創傷治癒が得られないことが多い。
- ✓従来の創傷治癒を促進するだけの材料では対応が困難



糖尿病性足潰瘍

<臨床ニーズ>

感染に対する抵抗性を持った創傷治癒材料の開発

図1 臨床的背景

1.2 従来の治療方法と課題

現在、創傷治療として人工真皮移植や陰圧閉鎖療法(NPWT)などがあり、創傷治療材料としては各種創傷被覆材、軟膏類など多数存在する。しかし、共通する問題点は感染に対する脆弱性である。近年、糖尿病足潰瘍や褥瘡(床ずれ)といった難治性の慢性潰瘍が増加しており、これらは感染を惹起しやすく敗血症に陥る危険性を含んでいる。そのため、一旦感染傾向が出現すれば治療の中止、洗浄および抗菌剤入りの治療材料への変更等を余儀なくさせ

られる。その間、創傷治癒は中断され、治癒遷延につながる。現在臨床で使用されている既存のゲル製剤(イントラサイトゲル、グラニユゲル)や人工真皮(コラーゲンスポンジ)では感染に対する抵抗力が備わっておらず、使用されないケースが多い⁽⁴⁾。医療現場では、感染に対する抵抗性があり、なおかつ創傷治癒促進を可能とする材料が求められている。そこで、我々はこれらの条件を満たす基材として三洋化成工業保有の機能性タンパク質シルクエラスチンに着目し、創傷治癒材としての開発に着手した。

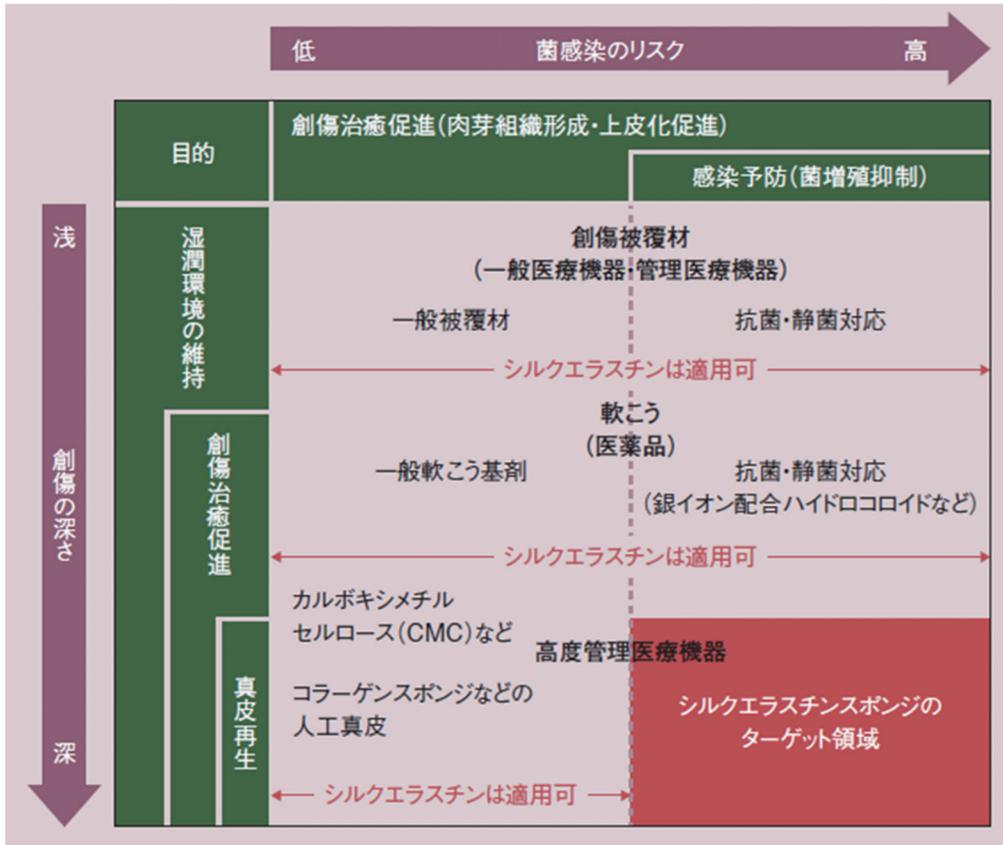


図2 現行創傷治療の位置づけ⁽⁴⁾

1.3 創傷治癒過程

人体の全体を覆う皮膚は、体重の16%を占めており、さまざまな機能を有している。その構造は筋肉や骨の上に皮下組織、真皮、最表面に表皮を形成している。褥瘡や熱傷に代表される創傷は、圧迫や熱によってこれらの皮膚組織が壊死することで生じる。また、擦り傷や切り傷に代表される創傷は、物理的に皮膚組織が破壊され生じる。生じた創傷は深さによって4つに分類されている(表皮に至る創傷、真皮に至る創傷、皮下組織に至る創傷、筋・骨に至る創傷)。さらに、皮膚バリアを失い、糖尿病などにより血流が芳しくない創傷は、菌感染のリスクが高い。

創傷治癒過程は、まず血小板が凝集し、血管収縮によって止血される。その後、体液(滲

出液)が創傷面に浸潤し、滲出液に含まれているサイトカイン(細胞などを引き寄せるタンパク質)によって、炎症細胞(マクロファージなど)が創傷面に引き寄せられ(遊走)、壊死組織の取り込みや菌の除去が起こる(炎症期)。炎症が治まると、同じくサイトカインによって線維芽細胞(肉芽組織の基となるコラーゲンを産生)が創傷面に遊走・増殖して、肉芽組織が形成される(増殖期)。肉芽組織が形成されると表皮となる上皮細胞が伸展して、肉芽組織は瘢痕組織(組織化)へと変化していく(成熟期)。上皮化が完了すると、治癒完了となる。

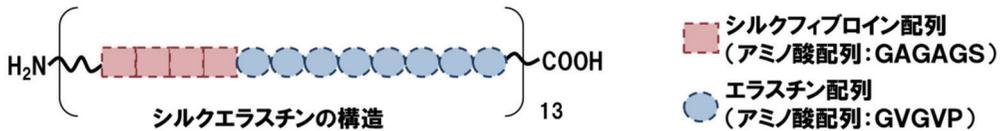
2. 研究開発経緯

2.1 シルクエラスチンとは

シルクエラスチンは、天然由来のタンパク質であるエラスチンとシルクフィブロインを模倣し、遺伝子組み換え技術によって作製された人工タンパク質であり、大腸菌発現系を用いて安定的に生産可能である。分子内にエラスチン由来配列を多く含むため、細胞親和性(炎症を起こさずに皮膚なじむ特性)が高く、かつ弾性(皮膚にハリを与える特性)に富むことから、創傷治療に適していると考えられる。シルクエラスチンを溶解した水溶液は、感温ゲル化性を有する。低温ではシルクフィブロイン由来配列の水素結合により凝集しているが、温度上昇により水素結合が弱まり、親水性の高いエラスチン由来配列が水分を構造内部に抱き込んだまま膨潤することによってゲル化する。一度ゲル化したシルクエラスチン水溶液は、液体に戻ることはない不可逆なゲル化物となる。このゲル化物は、皮膚を含む軟組織に近い弾性を有する。また、三洋化成工業の界面制御技術と組み合わせることで、シルクエラスチンをスポンジ状やフィルム状に加工することができる。

<構造>

シルクエラスチンは、**シルクフィブロイン(丈夫な医療材料素材)**と**エラスチン(皮膚弾性成分)**のハイブリッドタンパク質で、**大腸菌発現系を用いて安定的に生産可能**である。



<感温ゲル化性>

シルクエラスチン水溶液は、**加温することで自己会合を成して不可逆なゲル化物**となる。



37℃、2時間



<材型加工性>

様々な材型に加工可能なタンパク質。

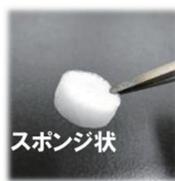


図3 シルクエラスチンとは

2.2 シルクエラスチンの創傷治癒評価

上述のシルクエラスチンをスポンジ状に加工したシルクエラスチンスポンジを用いて創傷治癒に係る有効性を検証した。実験方法は、まず、遺伝的糖尿病性マウスの大腿部に筋・骨に至る創傷を作製する。創傷部にシルクエラスチンを投与してポリウレタンフィルムを貼付、粘着性ガーゼで固定した後、治療14日後に肉眼所見ならびに組織学的評価(HE染色)を実施して、肉芽組織形成を評価した。図4のとおり、従来品投与群やコントロール(ポリウレタンフィルムのみ)群では、組織学的評価において、肉芽組織形成が十分に進んでおらず、創傷面の一部のみに留まっている。一方、シルクエラスチン投与群は肉芽組織形成が十分に進んでおり、一部上皮細胞が伸展して上皮化が認められている。我々はここで示した以外にも健常モルモットやミニブタ等を用いて、創傷治癒評価を実施しており、同様にシルクエラスチンの高い肉芽組織形成促進効果や上皮化形成促進効果を得ている⁽⁵⁻⁶⁾。

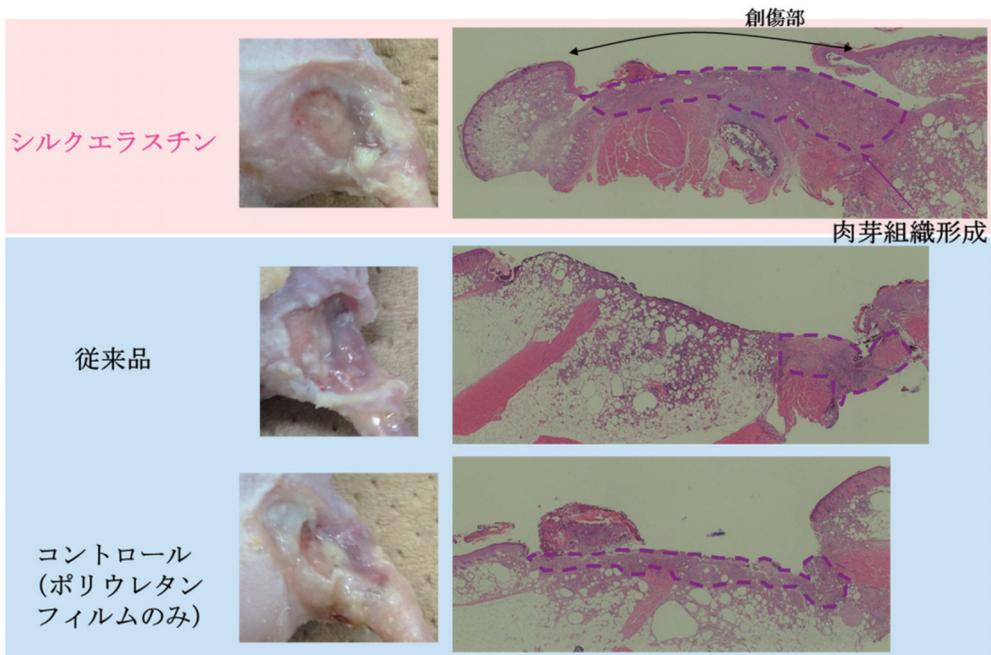


図4 シルクエラスチン肉芽組織形成評価

2.3 シルクエラスチンの菌増殖抑制評価

シルクエラスチンの菌に対する抵抗性についても動物実験にて検証した。健常モルモットの背部に皮下組織に至る創傷(全層欠損創)を作製する。その後、緑膿菌を 10^6 cfu/1創傷となるように創傷面に播種し、シルクエラスチンもしくは従来品を投与して、ポリウレタンフィルムを貼付した。治療3日目に創傷面を摘出し、細菌コロニー法を用いて創傷面の存在する菌数を測定した。その結果、従来品(CMCゲル品)では菌増殖を抑制することはできなかったが、シルクエラスチンでは菌増殖を抑制することができた⁽⁷⁾。図5は、図4と同様の動物実験モデルにて、創傷面に緑膿菌を播種した後、シルクエラスチンを投与し、治療3日目に創傷面を摘出し、細菌コロニー法を用いて創傷面に存在する菌数を測定した結果である。そ

の結果、従来品では菌増殖を抑制することはできなかったが、シルクエラスチンでは抑制できた。

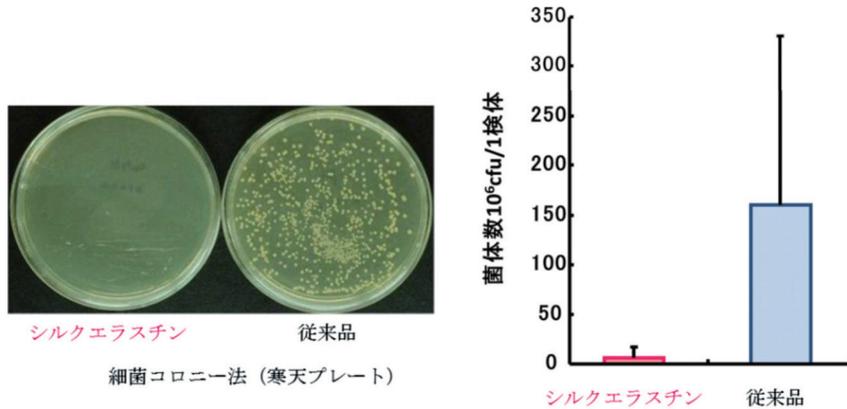


図5 シルクエラスチンの菌増殖抑制評価

2.4 作用機序について

シルクエラスチンの創傷治癒や菌増殖抑制に関する作用機序は以下のように考察している。シルクエラスチンスポンジを創傷部に投与することで、創傷面からの滲出液をスポンジが吸収し、シルクエラスチンが溶解する。高濃度の滲出液を含む溶液が、創傷面全体に広がりゲル化する。創傷面で形成された滲出液を含んだゲルは創傷面への密着性が非常に高いため、創傷被覆材として必要な「創傷の保護」や「湿润環境の維持」機能をもたらす。加えて、ゲルに内包されている滲出液由来のサイトカインや、細胞親和性の高いシルクエラスチンの効果により、創傷面全体で炎症期に必要なマクロファージの遊走や皮膚再生をつかさどる線維芽細胞の遊走・増殖が促進される。これらの作用によって、創傷面の「菌増殖抑制」や「創傷治癒促進」につながると考えている。

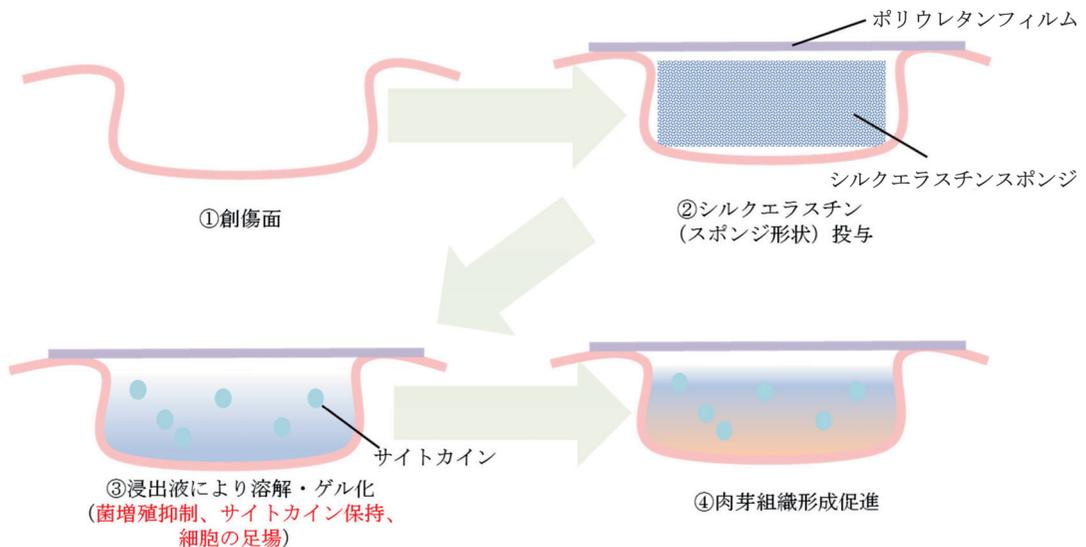


図6 シルクエラスチンスポンジの作用機序

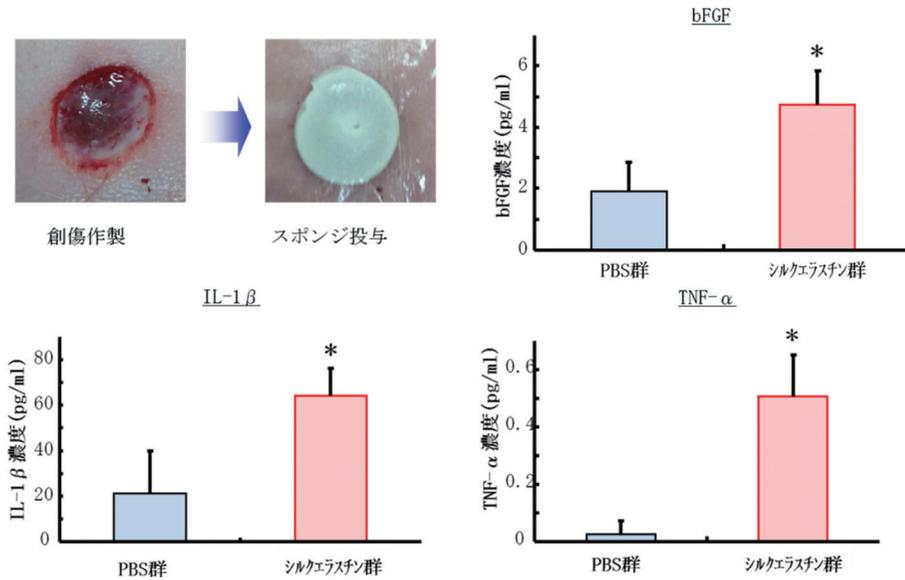


図7 シルクエラスチンのサイトカイン保持 * : P < 0.05

図7はシルクエラスチンゲルに滲出液由来のサイトカインがどの程度含まれているかを測定した結果である。実験方法は、健常モルモットの背部に皮膚欠損(全層欠損創)を作製する。その後、シルクエラスチンスポンジを創傷面に投与し、ポリウレタンフィルムを貼付する。投与12時間後に、創傷面でゲル化したシルクエラスチンゲルを摘出し、含まれるサイトカインのうち、線維芽細胞の増殖に寄与する bFGF や抗炎症に関与する IL-1β や TNF-α について定量した。その結果、創傷面を PBS(リン酸緩衝液)で洗浄・回収した液に含まれているサイトカインと比較して、シルクエラスチン群は2~10倍程度多く含まれていた⁽⁸⁾。

一方、シルクエラスチンはアミノ酸配列に起因して、肉芽組織形成を司る線維芽細胞や、炎症期を早期に終了させ増殖期に移行させる炎症細胞(特にマクロファージ)を創傷部に引き寄せる細胞遊走性も兼ね備えていることを見出している⁽⁹⁾。図8はシルクエラスチンの線維芽細胞に対する細胞遊走性を示した結果である。実験方法は、細胞培養シャーレ上にマウス線維芽細胞を一面に増殖させた後、マイクロチップを使用して線状に細胞をかき取り、その後シルクエラスチンを加えた培地に置き換えて、細胞の様子を観察した。培養6時間後、シルクエラスチンを加えた培地条件では、加えていない場合と比較して、線状にかき取った部分に再度両端から細胞がより多く遊走している様子が認められた。さらに72時間後には、再び線維芽細胞が一面に増殖している様子を確認できた。

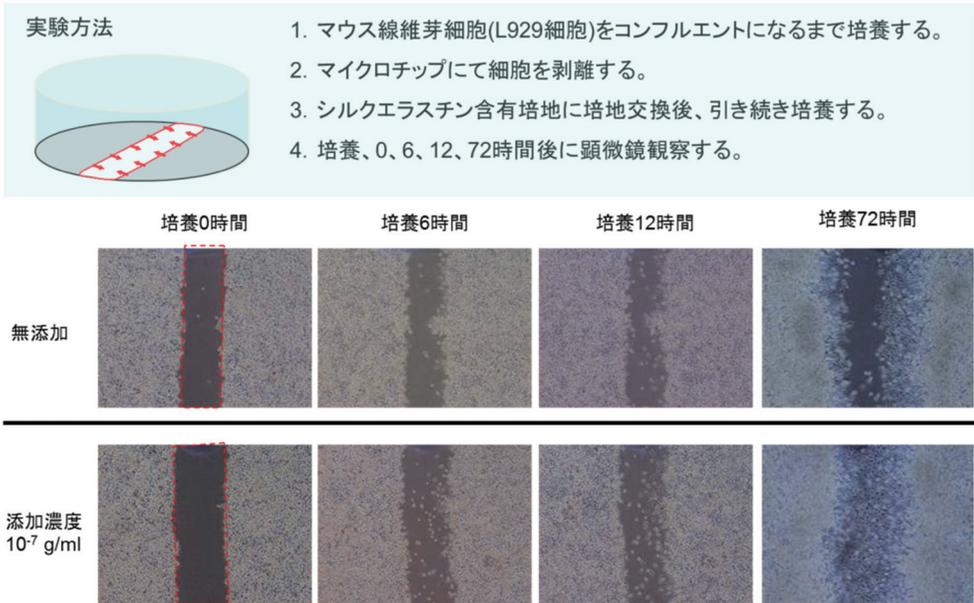


図8 シルクエラスチンの細胞遊走性

図9はシルクエラスチンのマクロファージに対する細胞遊走性を示した結果である。実験方法は、ボイデンチャンパー法という手法にて実施しており、具体的にはマウス腹腔からマクロファージを採取する。その後、底面が半透膜となったボイデンチャンパー内にマクロファージを含んだ培地を加える。半透膜の外側にシルクエラスチン含有培地を加えることで、半透膜を通過してシルクエラスチン含有培地に引き寄せられたマクロファージ数を顕微鏡下でカウントした。その結果、至適濃度(10⁻³~10⁻¹ μg/ml)でマクロファージを有意に遊走する効果を示した。

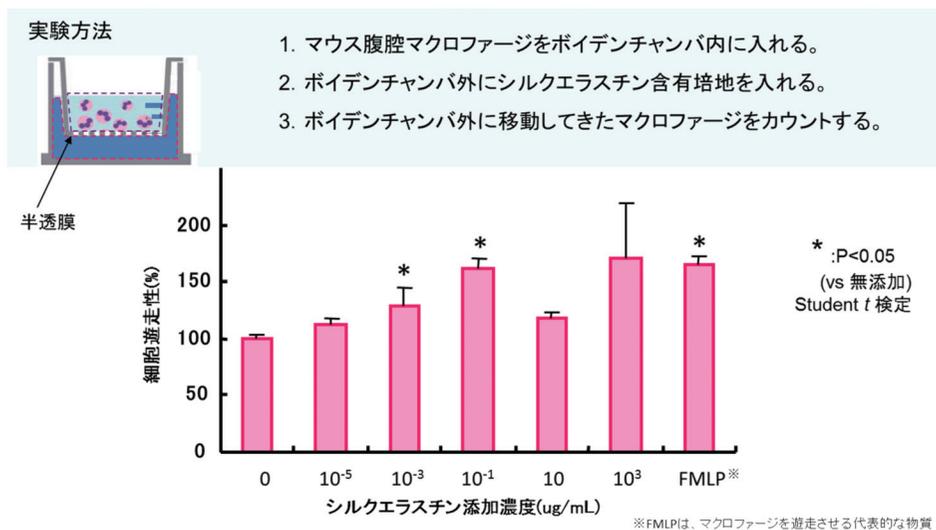


図9 シルクエラスチンの細胞遊走性(マクロファージ)

シルクエラスチンの創傷治癒効果や菌増殖抑制効果は、形状特性や感温ゲル化性に起因した物理学的側面に加えて、細胞遊走性やサイトカイン保持に起因した生化学的側面の双方から発揮するものと考えられる。

2.5 臨床治験に向けて

in vivo や *in vitro* の実験からシルクエラスチンの創傷治癒材としての可能性が見出してきたため、次ステップである臨床治験(医師主導治験)の実施に向けて準備を進めている。現在(2017年3月)は薬食機発0301第20号およびISO10993に従い、シルクエラスチンスポンジの生物学的安全性試験を実施しているとともに、治験計画書の作成等を準備している(2017年秋に治験実施予定)。

3. 今後の展望

シルクエラスチンは、スポンジ形状で投与して、滲出液を吸収することで溶解・ゲル化する点で、従来品の創傷治癒材とは大きく異なる。具体的には、スポンジが滲出液によって溶解することで、一旦、溶液状となるため、複雑な創傷(特にポケットのような入り組んだ創傷)に対しても密着する。その後、体温によってゲル化し、創傷面を密閉できる。シルクエラスチンは急性創傷から感染リスクのある慢性創傷に至るあらゆる創傷に対して治癒を促進する材料であり、この一材のみで創傷治癒を完結させることが可能である。創面に基材を縫合する必要がなく、貼付し密閉するだけであるため、その扱いやすさから手術、処置を問わず手軽に使用可能な材料である。そのため入院治療のみならず、外来通院治療でも使用可能である。2025年問題として、来る後期高齢化社会における在宅医療での褥瘡管理においても十分に対応可能であり、病院内外を問わず広く普及され得るものと考えている。またシルクエラスチンは、創面の浸出液に含まれる細胞増殖因子をスポンジ内に吸収・内包してゲル化するため、基材の分解とともに細胞増殖因子を徐放し創傷治癒促進に働くことが *in vitro* および非臨床試験でも確認されている。すなわちシルクエラスチンに細胞増殖因子を組み合わせることが可能であり、今後の医療を担う再生医療における新規医療材料として創傷治癒をもたらすため、国内外をみても今までにない画期的な材料であり、さらに新しい治療法が確立されるものと考えている。計画通り臨床治験を経て、患者のQOL向上に一日でも早く貢献できるよう邁進していく。

4. 謝 辞

シルクエラスチンに関する研究成果を得るために多大なご協力を頂いた京都大学形成外科鈴木教授、河合先生に深く感謝申し上げます。また、三洋化成工業株式会社の関係者の多大なご協力に心より感謝申し上げます。

5. 引用文献

- (1) 厚生労働省「平成26年患者調査の概況」
- (2) International working group on the Diabetic Foot 2011

- (3) Frykberg RG, et al : Diabetic foot disorders : a clinical practice guideline. J Foot Ankle Surg. 45 : S1-S66, 2006
- (4) 三洋化成ニュース 500号「機能性タンパク質シルクエラスチンを用いた新規医療材料の開発」
- (5) Kawai K, Kawabata S, Suzuki S, et al. The effect of silk-elastin in the pressure ulcers Jpn J PU. 2013;15(1); 41-47
- (6) Kawai K, Kawabata S, Suzuki S, et al. The Effect of Silk-elastin as a New Material on the Wound Healing 4th Congress of the World Union of Wound Healing Societies
- (7) 三洋化成ニュース 488号「機能性タンパク質シルクエラスチンを用いた新規医療材料の開発」
- (8) 河合, 川端, 鈴木 他「新規医療材料シルクエラスチンスポンジの創傷治癒効果とその作用機序について」日本形成外科学会基礎学術集会(2015)
- (9) Ozaki C, Kawabata S, Tabata Y, et al. Effect of an artificial silk elastin-like protein on the migration and collagen production of mouse fibroblasts. J Biomater Sci Polym Ed. 2014;25(12): 1266-77