

学 位 論 文 題 名

Studies on DNA-chitosan bilayer membrane
as a bi-functional biomedical adhesive

(二官能性医療用組織接着剤としてのDNA-キトサン二層式膜に関する研究)

学位論文内容の要旨

医療用接着剤は、従来の縫合糸による組織接合法よりも迅速かつ簡単に接合できることから外科手術の向上に大きく貢献できることが期待される。現在用いられている医療用接着剤としては、大きく分けて2種類あり、瞬間接着剤として汎用されている α -シアノアクリレート系接着剤と生体の凝血機構を利用したフィブリン糊がある。シアノアクリレート系接着剤は、組織表面に水分が存在しても瞬時に固まり組織と強く接着するが、接着剤が硬い塊であることから創傷治癒の妨げになることや生体内で分解されるとき有毒なホルムアルデヒドを生じるといった欠点がある。一方、フィブリン糊は生体内の凝血機構を利用しているため創傷組織の接着が迅速に行われ患部の治癒に有効的であるが、ヒトやウシの血液由来のためヒト免疫不全症候群(HIV)やウシ伝達性海綿状脳症(BSE)等の感染症の危険性がある。

現在、医療用材料として様々な材料の利用が検討されており、中でも天然高分子は天然物由来のため人体に用いても毒性が低いことが考えられる。天然ポリマーであるキトサンはD-グルコサミンが β 1 $\rightarrow$ 4で結合したアミノ多糖で創傷治癒促進・止血・鎮痛・抗菌性などの機能が報告されており、付加価値の高い医療用材料として期待されている。一方、同じく天然ポリマーであるDNAは生物の遺伝子本体で遺伝子工学などの分野を中心に研究が行われているが、材料として見たときDNAは核酸塩基、糖、リン酸からなり二重らせん構造を有する非常に興味深い生体材料である。

本研究では、機能的で生体にやさしい医療用接着材の開発を目的に、DNAとキトサンの二層からなり両方の機能を有する二層式膜を調製し、DNA-キトサン二層式膜の種々の物性評価とうさぎ腹膜を用いた組織接着強度試験を行い、医療用接着材としての有用性について検討した。さらに、この二層式膜をより機能的な材料として用いるために、DNA面に抗菌性ペプチドや殺菌剤を担持しドラッグキャリアとしての有用性についても検討した。

DNA-キトサン二層式膜の調製は、DNA(二本鎖、 $M_w \geq \sim 5\,000\,000$)水溶液をガラス板上にキャストし、風乾後、254 nmの紫外線を6 hr照射した。この不溶化DNA膜上にキトサン酢酸水溶液を重ねてキャストし風乾した。得られた膜を0.5 M NaOH・80%メタノール水溶液に5 min浸漬させ、さらにメタノールで2回洗浄し、真空乾燥し実験に用いた。

はじめに医療用接着材としての強度の知見を得るためにキトサン膜の、キトサン量の異なる膜をそれぞれ調製した。膜の引っ張り強度は、膜を幅 1.0 cm の短冊状に切断し、引っ張り強度試験機を用いて、標準間距離 30 mm、引っ張り速度 1.0 mm/sec で測定した。キトサン膜は、キトサン量の増加とともに引っ張り強度は上昇し、キトサン量が 2 mg/cm² 以上で引っ張り強度が 4 N/cm 以上となり医療用接着材として用いるのに十分な強度を有することがわかった。次に、キトサン量を 2 mg/cm² にし、DNA 量を変化させた二層式膜を作成し、引っ張り強度を測定した結果、DNA 量を変化させてもキトサン単層膜と同程度であり、引っ張り強度はキトサン量に依存することがわかった。次に走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて二層式膜の表面構造を観察した。二層式膜の構造確認は、膜を水中に 24 hr 浸漬させた後、フリーズドライし、SEM を用いて二層式膜の DNA 面、キトサン面をそれぞれ観察した。二層式膜の DNA 面は 0.3 mg/cm² 以上で DNA 特有の繊維状の構造が観察された。一方、キトサン面はすべて平滑なキトサン単層膜と同様な表面構造が観察された。このことから DNA・キトサン二層式膜は DNA 量が 0.3 mg/cm² 以上で DNA、キトサンそれぞれの表面構造からなる二層構造であることがわかった。

次に、DNA・キトサン二層式膜とウサギ腹膜の接着強度試験を行った。二層式膜の組織接着強度は、うさぎの腹膜をよく生理食塩液に湿らせ、表面の水分を軽く拭き取った後、二層式膜と腹膜の結合面積が 1×1 cm² になるように接着させ、引っ張り強度試験機を用いて引っ張り速度 1.0 mm/sec で測定した。二層式膜のキトサン面は、脱アセチル化度の増加に伴い接着強度が増加し、脱アセチル化度 80% の膜がもっともよく組織に接着した。また、DNA・キトサン二層式膜(脱アセチル化度 80%)のキトサン面ではフィブリン糊とほぼ同程度の接着強度であった。一方、二層式膜の DNA 面はいずれも腹膜と接着しなかった。このことから、二層式膜はキトサン面では組織と接着し、DNA 面では接着しない性質の異なる両面構造を有することがわかった。

次に、DNA・キトサン二層式膜の DNA 面にアクリフラビンを担持させ、DNA・キトサン二層式膜のドラッグキャリアとしての有用性について行った。アクリフラビンは DNA にインターカレーションする物質として報告されており、局所殺菌剤としても用いられている。実験には UV 照射 2 hr と 6 hr の 2 種類の UV 照射時間の異なる DNA 膜を用いた。DNA 膜はアクリフラビン溶液に浸漬させると 90% 以上吸着し、24 hr で平衡になった。この溶液の中に DNA 分解酵素である DNaseI(ウシの膵臓由来)を加えると、2hrUV を照射した DNA 膜は 24 hr で 40% アクリフラビンを放出した。一方、6 hrUV を照射した DNA 膜はアクリフラビンを徐放しなかった。このことから、DNA 膜への UV の照射時間を変化させることによりドラッグの放出量がコントロールできることが示唆された。

以上の結果から、DNA・キトサン二層式膜を体内絆創膏として用いた場合、キトサン面では組織と接着し、DNA 面では癒着防止することが考えられ、さらに二層式膜の DNA 面に薬物を担持することによってドラッグデリバリーシステムも兼ね備えたマルチファンクショナルな医療用材料として幅広い応用が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 則 雄

副 査 教 授 坂 入 信 夫

副 査 助 教 授 野 水 基 義

副 査 教 授 覚 知 豊 次 (北海道大学大学院工学研究科)

学 位 論 文 題 名

Studies on DNA-chitosan bilayer membrane as a bi-functional biomedical adhesive

(二官能性医療用組織接着剤としてのDNA-キトサン二層式膜に関する研究)

医療用接着剤は、従来の縫合糸による組織接合法よりも迅速かつ簡単に接合できることから外科手術の向上に大きく貢献できることが期待される。現在用いられている医療用接着剤としては、大きく分けて2種類あり、瞬間接着剤として汎用されている α -シアノアクリレート系接着剤と生体の凝血機構を利用したフィブリン糊がある。シアノアクリレート系接着剤は、組織表面に水分が存在しても瞬時に固まり組織と強く接着するが、接着剤が硬い塊であることから創傷治癒の妨げになることや生体内で分解されるとき有毒なホルムアルデヒドを生じるといった欠点がある。一方、フィブリン糊は生体内の凝血機構を利用しているため創傷組織の接着が迅速に行われ患部の治癒に有効的であるが、ヒトやウシの血液由来のためヒト免疫不全症候群(HIV)やウシ伝達性海綿状脳症(BSE)等の感染症の危険性がある。

現在、医療用材料として様々な材料の利用が検討されており、中でも天然高分子は天然物由来のため人体に用いても毒性が低いことが考えられる。天然ポリマーであるキトサンは創傷治癒促進・止血・鎮痛・抗菌性などの機能が報告されており、付加価値の高い医療用材料として期待されている。一方、同じく天然ポリマーであるDNAは生物の遺伝子本体であるが、材料として見たとき二重らせん構造を有する非常に興味深い生体材料である。

本研究では、機能的で生体にやさしい医療用接着材の開発を目的に、DNAとキトサンの二層からなり両方の機能を有する二層式膜を調製し、DNA-キトサン二層式膜の種々の物性評価とうさぎ腹膜を用いた組織接着強度試験を行い、医療用接着材としての有用性について検討した。さらに、この二層式膜をより機能的な材料として用いるために、DNA面に抗菌性ペプチドや殺菌剤を担持しドラッグキャリアとしての有用性についても検討した。

DNA-キトサン二層式膜の調製は、DNA(二本鎖、 $M_w \geq \sim 5\,000\,000$)水溶液をガラス板上にキャストし、風乾後、254 nmの紫外線を6 hr照射した。この不溶化DNA膜上にキトサン酢酸水溶液を重ねてキャストし風乾した。得られた膜を0.5 M NaOH-80%メタノール水溶液に5 min浸漬させ、さらにメタノールで2回洗浄し、真空乾燥し実験に用いた。

はじめに医療用接着材としての強度の知見を得るためにキトサン膜の、キトサン量の異な

る膜をそれぞれ調製した。キトサン膜は、キトサン量の増加とともに引っ張り強度は上昇し、キトサン量が 2 mg/cm^2 以上で医療用接着材として用いるのに十分な強度を有することがわかった。次に、キトサン量を 2 mg/cm^2 にし、DNA 量を変化させた二層式膜を作成し、引っ張り強度を測定した結果、DNA 量を変化させてもキトサン単層膜と同程度であり、引っ張り強度はキトサン量に依存することがわかった。次に走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて二層式膜の表面構造を観察した。二層式膜のDNA面は 0.3 mg/cm^2 以上でDNA特有の繊維状の構造が観察された。一方、キトサン面はすべて平滑なキトサン単層膜と同様な表面構造が観察された。

次に、DNA-キトサン二層式膜とウサギ腹膜の接着強度試験を行った。二層式膜の組織接着強度は、二層式膜と腹膜を接着させ、引っ張り強度試験機を用いて測定した。二層式膜のキトサン面は、脱アセチル化度の増加に伴い接着強度が増加し、脱アセチル化度 80%の膜がもっともよく組織に接着した。また、DNA-キトサン二層式膜(脱アセチル化度 80%)のキトサン面ではフィブリン糊とほぼ同程度の接着強度であった。一方、二層式膜のDNA面はいずれも腹膜と接着しなかった。

次に、DNA-キトサン二層式膜のDNA面に局所殺菌剤のアクリフラビンを担持させ、DNA-キトサン二層式膜のドラッグキャリアとしての有用性について行った。実験にはUV照射 2 hr と 6 hr の 2 種類の UV 照射時間の異なるDNA膜を用いた。DNA膜はアクリフラビン溶液に浸漬させると 90%以上吸着し、24 hr で平衡になった。この溶液の中にDNA分解酵素であるDNaseI(ウシの膵臓由来)を加えると、2hrUVを照射したDNA膜は24 hr で40%アクリフラビンを放出した。一方、6 hrUVを照射したDNA膜はアクリフラビンを徐放しなかった。このことから、DNA膜へのUVの照射時間を変化させることによりドラッグの放出量がコントロールできることが示唆された。

以上の結果から、DNA-キトサン二層式膜を体内絆創膏として用いた場合、キトサン面では組織と接着し、DNA面では癒着防止することが考えられ、さらに二層式膜のDNA面に薬物を担持することによってドラッグデリバリーシステムも兼ね備えたマルチファンクショナルな医療用材料として幅広い応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(地球環境科学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。