

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

# 博士論文概要

## 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5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こり、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ンディング可能な高分子薄膜”ナノシート”に着目した。まず、医用高分子を素材とすることで医療機器としての応用性が容易となる。また、自身の物理的密着力にて創部に直接貼付でき、その高い透明性により常時創部の観察が可能な創傷被覆材として期待される。本論文では、ナノシートの特性を体系的に整理し、その特性を遺憾なく発揮できる創傷被覆材としての応用を *in vitro* および *in vivo* にて評価した。また、ナノシートのみでは困難である適用に対して、それに応じた機能化を施した材料設計をし、上記と同様に *in vitro* および *in vivo* 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。第1章は序論、第2章はナノシートの基本的な調製方法および各種物理的性質(操作性、柔軟性、密着性)についてまとめた。第3章から第5章は、第2章にて示したナノシートの各種物理的性質を利用した”自身で密着可能かつ創部観察容易な高透明性新規創傷被覆材”としての応用検討について記載した。第3章は致死性静脈裂傷に対する静脈止血材としてのナノシートの有用性を述べた。第4章および第5章ではナノシートの機能化の章であり、第5章ではナノシートの細断化による分散体の構築(細断ナノシート)およびその感染保護材としての機能評価、第5章では抗生物質担持ナノシートの構築と感染創での創傷保護材としての機能評価についてそれぞれ述べた。第6章は終章として、本論文の結論と将来展望を述べた。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、水溶性支持体および水溶性犠牲体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載した。ナノシートの調製方法の一例として、

スピンコーティング法を利用した、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)ナノシートについてそれぞれ記載した。また、ポリビニルアルコールを支持体として用いた、ナノシートのフリースタANDING化を記し、医療応用に向けたハンドリング性の向上について示した。次に、ナノシートの各種物理的性質について詳述した。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示されていることを記した。また、マイクロスクラッチ試験により、特に膜厚 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。以上の知見はナノシートの特性であり、第 3 章以降の医用応用におけるナノシートの有用性を示す上で重要な要素であることを示した。

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。バルジ試験における最大抗張力・最大伸び率から、膜厚 75nm からなる LbL ナノシートを選択した。*in vitro* 試験として、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、複数枚重ねることで比例的に耐水圧性は向上した。術中で必要な時にナノシートの追加貼付による治療効果の向上が示唆された。次に *in vivo* 試験として、ウサギ下大静脈を血流平行方向に 7 mm 切開をした、出血モデルにて止血能評価を行った。単数ナノシートでの止血の成功率は 33% であり (n=6)、残りはウーキング様の出血が見られた。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。出血が見られた場合は完全に止血が完了するまでナノシートを追加貼付したところ、2 例は 1 枚、1 例は 2 枚、1 例は 3 枚の追加貼付にて止血に成功した。更に術後 1 ヶ月での組織像および CT 造影像から、正常な組織および血流形成が確認された。以上より、ナノシートは血管のような高曲率表面に貼付可能な新規止血材として有用であると明らかとなった。

第 4 章では、手指や爪先などの微細な箇所まで被覆可能な、細断した PLA ナノシートの調製、フィルム再構築およびその細菌感染抑制能について記述した。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  $0.24\mu\text{m}^2$  からなる細断ナノシートの調製に成功した。細断ナノシートはキャストにより大面積サイズのフィルムとして各種界面に再構築が可能であった。細断ナノシートと同表面積を有する PLA ナノ粒子では十分な密着力は得られなかったため、シート状分散体およびその再構築体の意義が示された。また、細菌透過抑制能を有することを *in vitro* 試験にて示した。*in vivo* 試験として、マウス背部に II 度熱傷創を形成し、創部に細断シートを再構成させ、細菌感染抑制能評価を行った。感染細菌としては熱傷感染に汎用とされる緑膿菌を使用した。細断ナノシート貼付下においても創部観察が容易であり、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、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、また 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 日に創部を洗浄し、細断ナノシートを追加貼付したところ、感染抑制能の持続が可能であった。以上より、細断ナノシートを調製し、種々の微細な界面に貼付可能な新規創傷被覆材の開発および適用方法を確立した。

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開発し、感染創での抗菌効果を評価した。まず、LbL ナノシートを作製し、TC を表面に滴下・担持した後、疎水性保護膜として最外層に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。疎水性保護膜の形成により薬物の放出を 6 倍延長した。また、*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していた。*in vivo* 試験として、マウス背部に、容易に感染することが問題である 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た。感染創上に TC 担持ナノシートを貼付したところ、高い透明性から創面の観察が容易であり、また、TC の自家蛍光からブラックライト照射下にてナノシートが視認され、術後 7 日までナノシートは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。TC 担持ナノシート群は、術後 3 日における皮膚および肺病理像から創部局所的および全身性の炎症が低減したことが示された。以上より、TC 担持ナノシートは、従来の創傷被覆材では為し得なかった、長期創部観察および感染予防可能な新規傷医療材として有用であると示された。

最後に、第 6 章では、本論文の総括と将来展望について述べた。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要件に対する提言を将来展望として纏めた。

本論文では、ナノシートの各種界面に対する高い密着性に基づき、創傷被覆材として応用展開した。平面から高曲率面まで柔軟に追従でき、高い透明性から術中および術後の創部管理が容易な新規創傷被覆材としての位置づけを確立した。ナノシートは従来の創傷被覆材では為し得なかった治療効果を発揮し、新規医療材料としての応用展開への道筋を示した。

## 早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

氏名 齋藤 晃広 印

(2013 年 7月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
1. 論文	
①	Hagisawa K*, Saito A*, Kinoshita M, Fujie T, Otani N, Shono S, Park, S YK, Takeoka S (*equority contributed) “Effective control of massive venous bleeding by “multi-overlapping therapy” using polysaccharide nanosheets in a rabbit inferior vena cava injury model” <i>J. Vasc. Surg.: Venous Lym. Dis.</i> , <b>1</b> , 289, (2013)
2.	Fujie, T, Kawamoto, Y, Haniuda, H, Saito, A, Kabata, K, Honda, Y, Ohmori, E, Asahi, T, Takeoka, S “Selective Molecular Permeability Induced by Glass Transition Dynamics of Semicrystalline Polymer Ultrathin Films” <i>Macromolecules</i> , 2013, 46, 395-402.
3.	Aoki S, Kinoshita M, Miyazaki H, Saito A, Fujie T, Iwaya K, Takeoka S, Saitoh D. “Application of poly-L-lactic Acid nanosheet as a material for wound dressing” <i>Plast. Reconstr. Surg.</i> , 2013, 131, 236-240.
4.	Otani N, Kinoshita M, Fujie T, Saito A, Takeoka S, Saitoh D, Hagisawa K, Nawashiro H, Shima K “Novel therapeutic use of polysaccharide nanosheets for arachnoid plasty and enhancement of venous tensile strength in rat microneurosurgery” <i>J. Clin. Neurosci.</i> , 2013, 20, 301-305.
⑤	Okamura Y, Kabata K, Kinoshita M, Miyazaki H, Saito A, Fujie T, Ohtsubo S, Saitoh D, Takeoka S “Fragmentation of Poly(lactic acid) Nanosheets and Patchwork Treatment for Burn Wounds” <i>Adv. Mater.</i> , 2013, 25, 545-551.
6.	Miyazaki H, Kinoshita M, Saito A, Fujie T, Kabata K, Hara E, Ono S, Takeoka S, Saitoh D “An ultrathin poly(L-lactic acid) nanosheet as a burn wound dressing for protection against bacterial infection.” <i>Wound Repair Regen.</i> , 2012 20, 573-579.
⑦	Saito A, Miyazaki H, Fujie T, Kinoshita M, Ohtsubo S, Saitoh D, Takeoka S, “Therapeutic efficacy of an antibiotic-loaded nanosheet in a murine burn-wound infection model.” <i>Acta Biomater.</i> , 2012, 8, 2932-2940.
8.	Fujino K, Kinoshita M, Saito A, Yano H, Nishikawa K, Fujie T, Iwaya K, Kakihara M, Takeoka S, Saitoh D, Tanaka Y “Novel technique of overlaying a poly-l-lactic acid nanosheet for adhesion prophylaxis and fixation of intraperitoneal onlay polypropylene mesh in a rabbit model.” <i>Surg. Endosc.</i> , 2011, 25, 3428-3436.
9.	Taccola S, Desii A, Pensabene V, Fujie T, Saito A, Takeoka S, Dario P, Menciacchi A, Mattoli V, Free-Standing Poly(l-lactic acid) Nanofilms Loaded with Superparamagnetic Nanoparticles.” <i>Langmuir</i> , 2011, 27, 5589-5595
2. 総説	
1.	齋藤晃広, 武岡真司 “高分子ナノシートの物性と医療展開” <i>未来材料</i> , 2011, 11, 24-28.
2.	藤枝俊宣, 齋藤晃広, 武岡真司 “医療応用に向けた高分子超薄膜の新展開” <i>表面</i> , 2010, 48, 211-219.

## 早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
3. 講演	<p>A. 国際会議での講演発表</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <u>Saito A</u>, Miyazaki H, Fujie T, Ohtsubo S, Kinoshita M, Saitoh D, Takeoka S “Evaluation of Therapeutic Efficiency of Antibiotic-Loaded Nanosheet in a Murine Burn-Wound Infection Model” 2nd International Conference on Biomaterials Science in Tsukuba, Tsukuba, 2013.3</li> <li>2. <u>Saito A</u>, Miyazaki H, Fujie T, Ohtsubo S, Kinoshita M, Saitoh D, Takeoka S “Therapeutic effects of tetracycline-loaded nanosheet for a deep burn-wound infection model” 243rd ACS National Meeting, San Diego, USA, 2012.3</li> <li>3. <u>Saito A</u>, Takeoka S “Antibacterial efficiency of silver nanoparticle-loaded nanosheet” Japan-India Joint Workshop on “Biomedical Research”, Tokyo, 2012.2</li> <li>4. <u>Saito A</u>, Takeoka S “Antibacterial efficiency of silver nanoparticle loaded nanosheet” German-Japanese Joint Symposium for Diamond Researchers on Sustainable Life Science Innovation and Biomedical Research, Bonn, German, 2011.12</li> <li>5. <u>Saito A</u>, Fujie T, Miyazaki H, Kinoshita M, Saitoh D, Takeoka S “Fabrication and evaluation of silver-nanoparticle loaded nanosheet” The 6th Global COE international Symposium, Tokyo, 2011.12</li> <li>6. <u>Saito A</u>, Fujie T, Miyazaki H, Kinoshita M, Saitoh D, Takeoka S “Fabrication and evaluation of silver-nanoparticle loaded nanosheet” The 3rd NIMS-Waseda International Symposium, Tokyo, 2011.11</li> <li>7. <u>Saito A</u>, Miyazaki H, Fujie T, Kinoshita M, Saitoh D, Takeoka S “Antimicrobial Effects of Tetracycline Loaded Nanosheets for Deep Burn Infectious Model Mice” 5th GCOE International Symposium, Tokyo, 2011.1</li> <li>8. <u>Saito A</u>, Miyazaki H, Fujie T, Kinoshita M, Saitoh D, Takeoka S “Antimicrobial Effects of Tetracycline Loaded Nanosheets for Deep Burn Infectious Model Mice” 2nd NIMS(MANA)-Waseda International Symposium, Tsukuba, 2010.12</li> </ol> <p>その他連名で7件 計15件</p> <p>B. 国内会議での講演発表</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 齋藤 晃広, 武岡 真司 “高分子ナノシートによる下大静脈止血” 新宿バイオマテリアルの会, 新宿, 2013.1</li> <li>2. 齋藤 晃広, 萩沢 康介, 小川 大輔, 木下 学, 朴 栄光, 梅津 光生, 武岡 真司 “高分子ナノシートを用いた静脈止血材としての応用” 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2013, 仙台, 2012.11</li> <li>3. <u>Saito A</u>, Ito K, Fujie T, Takeoka S “Antimicrobial efficiency of silver nanoparticle-loaded nanosheet”第61回高分子討論会, 名古屋, 2012.9</li> </ol>

## 早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
4.	齋藤 晃広, 木下 学, 宮崎 裕美, 藤枝 俊宣, 齋藤 大蔵, 武岡 真司 “抗生物質担持ナノシートを用いた III 度熱傷治療への有用性” 第 112 回日本外科学会定期学術集会, 幕張, 2012.4
5.	齋藤晃広, 宮崎裕美, 藤枝俊宣, 木下学, 齋藤大蔵, 武岡真司 “抗生物質担持ナノシートの III 度熱傷・感染に対する創傷保護材としての有用性” 第 60 回高分子学会年次大会, 大阪, 2011.5
6.	齋藤晃広, 宮崎裕美, 藤枝俊宣, 木下学, 齋藤大蔵, 武岡真司 “薬剤担持ナノシートの III 度熱傷・感染に対する創傷保護能評価” 第 32 回日本バイオマテリアル学会大会, 広島, 2010.11
	その他連名で 10 件 計 16 件
4. その他 特許	
1.	阿部公司, 八巻悟史, 武岡永里子, 武岡真司, 藤枝俊宣, 下野浩貴, 齋藤晃広 (株式会社資生堂、ナノシータ株式会社), 粉末担持薄膜, 国内, 特許公開 2013-1661, 2013.1.7
2.	宮地計二, 小林義典, 甘利昌彦, 武岡真司, 藤枝俊宣, 齋藤晃広, 張宏, 大坪真也 (甘利昌彦、学校法人早稲田大学), 高分子超薄膜の製造方法及び高分子超薄膜の製造装置, 国内, 特許公開 2012-236125, 2012.12.6
3.	武岡真司, 柏木賢治, 藤枝俊宣, 齋藤晃広 (武岡真司、国立大学法人山梨大学), 医薬製剤, 国際, PCT/JP2012/057519, 2012.3.23
報道	
1.	萩沢 康介, 齋藤 晃広, 木下 学, 藤枝 俊宣, 大谷 直樹, 庄野 聡, 朴 栄光, 武岡 真司 “静脈止血材としてのナノ絆創膏の開発” 日本経済新聞, 日経産業新聞, 科学新聞, 毎日新聞, 日刊工業新聞, 化学工業日報 2013 年 5 月