

外因性液状フィブリングルー製剤の事前調整の可能性に関する実験的検討

東北大学大学院消化器外科学分野

鈴木 正徳 小野川 徹 海野 倫明
遠藤 公人 片寄 友 竹内 丙午
及川 昌也 近藤 典子 松野 正紀

目的: 用時調整が原則である液状フィブリングルー製剤において, 使用前に予め溶解して使用する事前調整が可能か否かについて検討した。**方法:** アベンティス・ファーマ社製 Beriplast[®] で A 液および B 液を作製し, A 液, B 液の経時的粘度測定, ブタ皮膚切片法を用いた抗張力測定, 調剤後のフィブリノゲン活性, トロンビン活性と第 XIII 因子の力価試験, および A 液, B 液の経時的細菌繁殖試験を, 室温時 (20 ~ 25 °C), 冷所保管時 (6 °C) および 37 °C の 3 条件下において実施した。**結果:** (1) 抗張力: 10 日間, いずれもの条件下においても抗張力の低下は認められなかった (2) 粘度: 各種温度下での A 液の粘度は溶解後 3 日まで著変なし。B 液は溶解直後から 10 日後まで不変 (3) 各種成分の力価: フィブリノゲン活性および第 XIII 因子活性の経時変化は僅かであったが, トロンビン活性はすべての試料で 3 日までに 48.9 ~ 63% に減少し, その後も次第に活性は低下した (4) 無菌試験: A 液, B 液の調整直後, および 10 日後に検討では無菌であった。**結論:** 生体接着剤としての効果の面から Beriplast[®] の事前調整は十分可能である。

はじめに

創傷治癒機転において, 生体内 fibrin matrix の一時的代替物となる外因性液状フィブリングルーは, 今や閉鎖生体接着剤としてさまざまな分野の外科手術で使用され, 臨床における重要な役割を担っている^{1)~3)}。一方, 乾燥型のフィブリン系接着剤ともいふべき TachoComb[®] (鳥居薬品) が, 1999 年発売され一般臨床での使用が可能となった。後者はフィブリングルーとコラーゲンシートの合剤であり, 既成のフィブリングルーとは異なり用時調整がいらぬ圧迫可能なシート状製剤として普及してきた⁴⁾。

フィブリングルーは創傷治癒機転を応用した理想的な生体接着剤であるが, 定められた用法・用量からは事前調整が許容されていなかったため, セットアップの点における煩雑さが問題であった⁵⁾。本研究では従来, 用時調整が原則である液状フィブリングルー製剤においても, 事前調整が可能か否かに関して抗張力, 粘度, 構成成分の力価測定および保管時の細菌培養所

見の面から検討した。

1. 対象および方法

今回の液状フィブリングルー製剤の事前調整の検討には, Beriplast[®] (アベンティスファーマ社製) を用いた。添付文書に従ってフィブリノゲン 血液凝固第 XIII 因子混合末, トロンビン末をそれぞれ, アプロチニン液, 塩化カルシウム液で溶解後, シリンジに採取し, A 液および B 液とした。Beriplast[®] の使用前溶解およびドライバス内保存時の安定性試験として, 以下の 6 項目について試験を実施した。

1. 保存時間における抗張力の変化: 抗張力試験はブタ皮膚切片法⁶⁾を用いて行った。屠殺直後に剥ぎ取って -20 °C で冷凍保存したブタの皮膚を 2 × 3 cm の大きさに裁断し, この皮膚片の皮下組織部分を取り除き真皮層を露出させ接着面とした。2 枚の皮膚切片に A 液, B 液をそれぞれ 25 μL ずつ塗布し両者の接着面を重ね合わせ, 30 分間室温で静置したのち力価測定装置で接着部位が離れるまでの力を, 接着力としてグラム単位で測定した。測定は室温時, 冷所保管時および 37 °C の 3 条件下で経時的に 10 日間まで行った。

2. A 液および B 液のドライバス内保存における粘

< 2001 年 9 月 19 日受理 > 別刷請求先: 鈴木 正徳
〒980 8574 仙台市青葉区星陵町 1 1 東北大学大
学院医学系研究科外科病態学講座消化器外科学分野

性的変化：回転振動型デジタル粘度計 (DIGITAL VISCOMATEVM-100：山一電機社製) を用いて、約 2mL の試料溶液で 20 分まで、および 1, 3, 5, 10 日の短・長期の保存期間における経時的な粘性の変化を室温時 (20~25)、冷所保管時 (6) および 37 の 3 条件下において測定した。

3. フィブリノゲン活性 (A 液)：A 液を調整し、室温および 37 および冷蔵庫内保存時のフィブリノゲンの力価試験を、A 液 0.45ml をディスプレイ試験管にとり、30 秒間 28 に保温し、あらかじめ加温しておいたトロンビン塩化カルシウム液を 0.05ml 加えた後に、1 秒ごとに試験管を傾け、凝固するまでの時間を測定する手法⁶⁾で凝固時間を測定し力価とした。

4. 血液凝固第 XIII 因子活性 (A 液)：ペリクローム法で測定した。第 XIII 因子アクチベータ・NADH 溶液を作製し、基質試薬を混合して混合液を作製した。検体の A 液と、すでに第 XIII 因子含量 (%) が判明している標準ヒト血漿を用いて、試料に混合液を加えた上で、5 分後から 1 分ごとに 5 分間 340nm の吸光度を測定し変化率を算出し、両者の比較から試料の力価すなわち第 XIII 因子含量を求めた。

5. トロンビン活性 (B 液)：トロンビン活性は定量法で測定した。28 のインキュベーター内でトロンビン標準品 (日本薬局方標準品) を 1% BSA 加生理食塩液で希釈し、その希釈液 0.1mL に 0.2% ウシ・フィブリノゲン溶液 0.9mL を加え凝固時間を測定した。4 種の濃度の異なる標準液について、5 回ずつ測定を行い平均値を求め検量線を得た。B 液を調整し、0.1mL に 0.2% ウシフィブリノゲン溶液 0.9mL を加えて凝固時間を測定し、検量線からトロンビンの単位数を求めた。

6. A 液、B 液の経時的細菌繁殖試験：A 液および B 液を調剤後、冷所保存、室温保存および 37 下に保存して、一般細菌および嫌気性菌を対象に経時的に細菌培養を行った。TGC 培地および SCD 培地に A 液、B 液を 1mL 溶解・接種した直後および 1 週間後の細菌繁殖について検討した。

7. 統計学的検討：各測定値は平均 ± 標準偏差 (SD) で表示した。群間の比較は two factor factorial ANOVA (Stat View 4.5) を用いて検定し、post hoc test として Fisher's PLSD を用いた。いずれも危険率 5% 未満の場合を有意差ありとした。

II. 結 果

1) 抗張力試験

溶解後、10 日間とも抗張力は、すべての温度条件で

Fig. 1 The tensile strength of fibrin glue after dissolution (RT : room temperature)

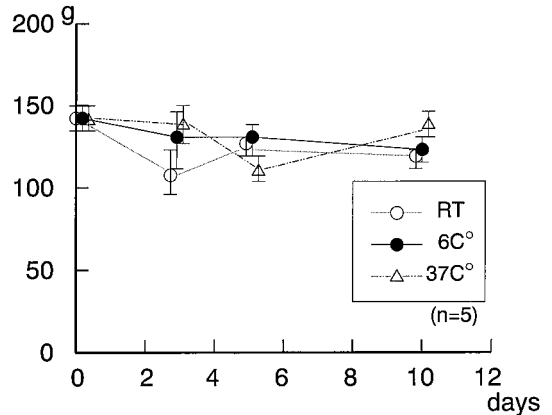
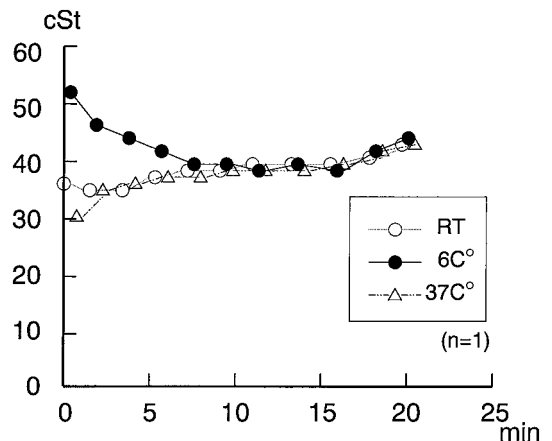


Fig. 2 The viscosities of solutions A within 20 minutes after dissolution (RT : room temperature)



ほぼ 100g ~ 150g を維持していた。抗張力の低下はなく、接着に必要とされる抗張力 100g 以上の規格値を維持した (Fig. 1)。

2) 粘度 (A 液)

フィブリノーゲンと第 XIII 因子およびアプロチンを含む A 液の粘度を、2 分間隔で 20 分まで測定したところ、8 分ほどですべての温度条件でほぼ同一の 40cSt を維持した (Fig. 2)。ここでは示さないが、A 液の粘度は 5 時間を経過しても 40cSt と同一であった。しかし、粘度は 3 日後からは徐々に上昇し、室温保存のサンプルは 10 日目に凝固した。6 および 37 保存のサンプルは経時的に粘度が増し 40cSt から

Fig. 3 The viscosities of solutions A until 10 days after dissolution (RT : room temperature)

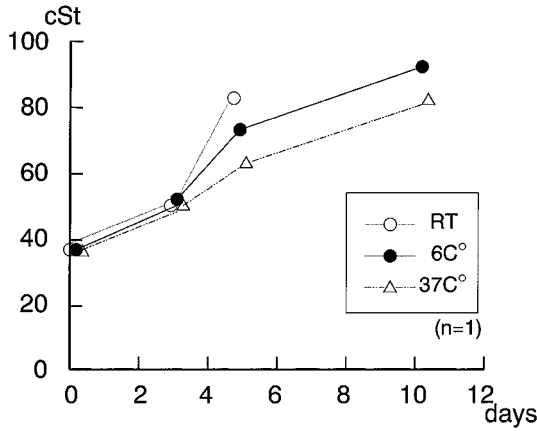
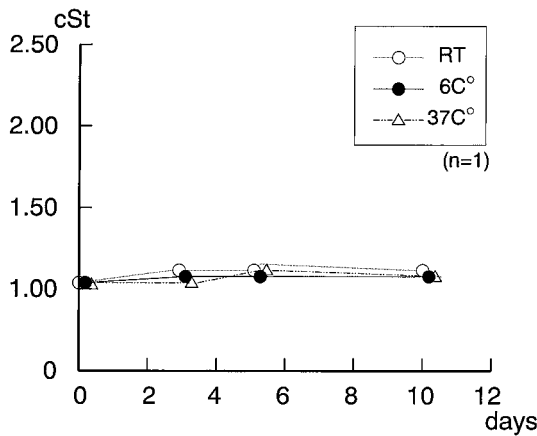


Fig. 4 The viscosities of solutions B after dissolution



80~90cSt まで上昇した (Fig. 3)。

3) 粘度 (B 液)

A 液に比較し, トロンピンと塩化カルシウムを含む B 液の粘度は全経過を通じて 1.0~1.2 とほとんど粘性は生じなかった (Fig. 4)。

4) フィブリノゲン活性 (A 液)

室温および 37 °C では 3 日より前値に比べて有意な活性の低下があり, 6 °C では活性は上昇した。これらの傾向は 3 つの温度条件とも, 10 日間持続したが, すべての試料が 10~20 秒以内の凝固時間を維持したため, フィブリンゲル形成には支障を生じない変動であった (Fig. 5)。

Fig. 5 Time-course changes in the activity of fibrinogen after dissolution in solution A (*P < 0.05 vs pre, RT : room temperature)

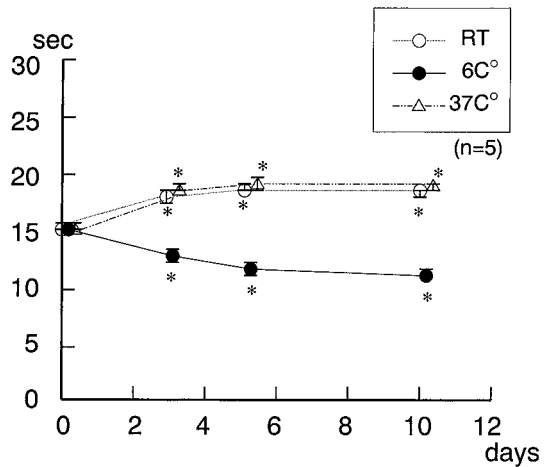
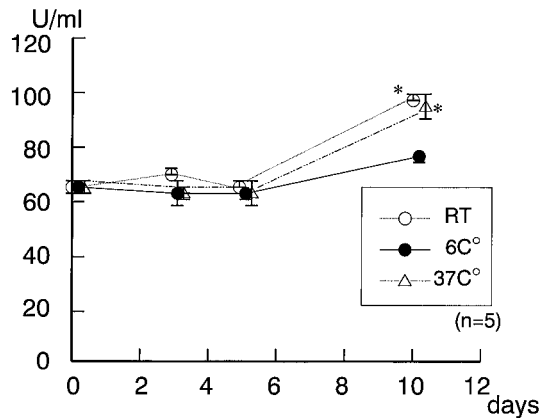


Fig. 6 Time-course changes in the activity of factor XIII after dissolution in solution A (*P < 0.05 vs pre, RT : room temperature)



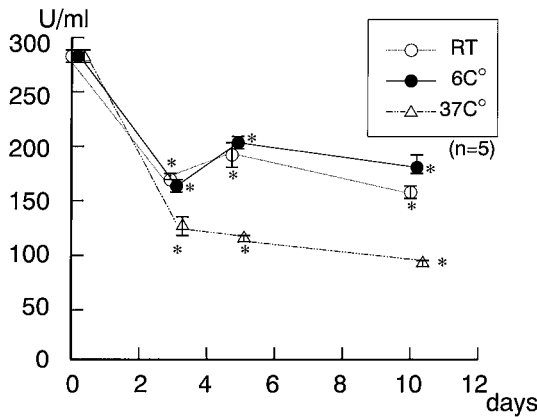
5) 血液凝固第 XIII 因子活性 (A 液)

5 日間, すべての試料が 60~80U/ml で力価の低下は見られなかった。10 日目には 70~100U/ml と活性が上昇し, とくに室温と 37 °C では有意に活性の上昇が認められ, 粘度の変化が測定に影響していると思われた (Fig. 6)。

6) トロンピン活性 (B 液)

すべての試料で 3 日までに溶解直後の 48.9~63% に活性低下し, その後も, 次第に低下した (Fig. 7)。

Fig. 7 Time-course changes in the activity of thrombin after dissolution in solution B (*P < 0.05 vs pre, RT : room temperature)



7) 無菌試験

A液, B液接着直後および1週間後のTGCおよびSCD培地における微生物の繁殖はまったく観察されなかった。

III. 考 察

臨床に用いられる生体接着剤としては, 1960年代に開発されたシアノアクリレートを主とする合成生体接着剤および1970年後半に発売された天然型のフィブリングルーが代表的であるが, 最近では血漿製剤の使用自粛機運ともあいまって, GRF glue® (泉工医科工業) や AdvaSeal® (ジョンソン・エンド・ジョンソン), BioGlue® (CryoLife International, Inc.) などに代表される第2世代の合成接着剤が開発されてきた。

生体接着剤として繁用される薬剤の満たすべき基本条件としては, 接着力が強く, 耐水性がよく, 接着に要する時間が手術手技の施行に対して適当であること, かつ異物性や毒性がないこと, 弾力性・可撓性が良好であり, 固まった後でも生体の動きに適合することなどがあげられる。シアノアクリレート系接着剤は分解副産物の生体刺激性が大きい⁹⁾ことが障害となり, ヒストアクリルブルー® (日本ビー・エス・エス) が血管内塞栓物質として使用されている¹⁰⁾以外, その使用頻度は伸び悩んでいる。

代表的な生体接着剤の操作性と効果について比較すると, セットアップにかかる労力の面では薬剤を注射筒に詰める必要のある液状フィブリン糊製剤と AdvaSeal® が劣っており, 対して TachoComb® と Bio-

Glue® は, そのままの使用が可能である。接着強度と硬化時間は GRF glue® や AdvaSeal®, BioGlue® など新しいゲル状接着剤に利点があり, 対して液状フィブリン糊製剤は接着時間および硬化時間の面で他の接着剤よりも劣っている⁵⁾

血漿製剤であり, 調整の面や接着強度, 硬化時間の点で他の生体接着剤に比較して問題のあるフィブリングルーであるが, 異物性や接着面への適合性については他の製剤より, はるかに優れている。これはフィブリングルーの硬化に, 血液凝固や創傷治癒の生理的な原理が応用されていることに関係する。

その作用機序は, フィブリノーゲンがトロンビンの作用で可溶性のフィブリンポリマーとなり, Caイオンの存在下でトロンビンで活性化された XIII 因子により, フィブリノーゲンの α 鎖間および γ 鎖間に架橋形成が行われ物理的強度をもった不溶性で安定なフィブリン塊となる。さらに, 第 XIII 因子の作用によりフィブロネクチンを介して組織コラーゲンと強固に結合し, 組織との接着がはかれる。蛋白分解酵素阻害剤であるアプロチンは, 不要性のフィブリン塊がプラスミンなどの線溶物質により分解されるのを防止する。生じた外来性のフィブリン塊には線維芽細胞が侵入・増殖し, コラーゲン前駆体および蛋白多糖体が分泌され, 真の collagen matrix に置換され呼吸・消失する。これらの生成・吸収過程においてフィブリングルーは異物反応や拒絶反応をおこさない点が特徴であり, 1か月後にはほぼ器質化され3か月後には癒痕組織になる¹¹⁾²⁾。

乾燥型フィブリン系接着剤である TachoComb® はスポンジ状の馬コラーゲンシートを支持体として片面にヒトフィブリノーゲン, 牛トロンビン, 牛アプロチンの各成分を粉末状にして固着させている。組織の接着力はフィブリノーゲンやトロンビンの濃度に依存する。液剤であるフィブリングルーに含まれるフィブリノーゲンは一定の濃度であるのに対して, TachoComb® は乾燥状態のフィブリノーゲンを少量の血液や組織液で溶解させることから, 適用部位には液状のフィブリングルーに含まれる約7倍の高濃度のフィブリノーゲンが存在することになる¹³⁾。イヌの肝切実験における止血効果は液状のフィブリングルーの約4倍と算出されている¹⁴⁾が, TachoComb® と Beriplast® の接着速度や強度の差には, 両者のフィブリノーゲン濃度の差が関与していることが考えられる。

TachoComb® と従来の液体フィブリングルーとの違

いはその吸収過程に現れる。TachoComb[®]では異物となるコラーゲンシートを含んでおり、構成成分もフィブリノーゲン以外異種蛋白であることなどが関与し、貼付1日目から炎症性細胞が浸潤し急性炎症の像を呈する。その後、周囲には異物性肉芽組織が形成され、貪食系細胞や組織芽細胞による器質化が生じる。TachoComb[®]は炎症変化の経過中に線維化・瘢痕組織化が生じることが、フィブリングルーとは大きく異なっている点であり¹⁵⁾、その使用が実質臓器の止血補強に限定されるゆえんで、腸管吻合局所に使用すれば異物反応から瘢痕化を誘導することになる。

TachoComb[®]と比較して液剤のフィブリングルーは用時調整が不可欠とされているが、欧州においては、フランス製・Tissucol[®]には専用のFibrinotherm[®]と呼ばれるドライバスが附属しており、手術が始まった段階で、A液とB液をドライバスの中に用意し、常時使える状態にstand byすることが推奨されている。すなわち、Tissucol[®](本邦ではTisseel[®]帝国臓器)では事前調整が可能とされ、Beriplast[®]やBolheal[®](化血研)では用事調整が不可欠とされている。そこで、なぜ同様の製剤が一つは用事調整とされ、一方は事前調整が可能とされているのかの疑問が生じた。これは製品開発時の用法の取り決めが関与したと考えた方がよい。すなわち、調整時の細菌の混入と増殖をきらったのが一点。時間経過でフィブリノーゲンを含んだA液の粘度が上昇すると考えられた点などがあげられる。しかし、時代の要請で再評価が必要と考え、用法とは異なり最初から溶解しておいて使用した際の粘度と抗張力に関して実験を実施した。

今回の実験結果としては、室温、6、37のどのような温度設定でも抗張力の面で、溶解後10日間にわたって有意差を認めず、生体接着剤として必要な100~150gの抗張力を維持したことは注目すべきことと思われる。各種構成成分の力価は、トロンビン活性が経日的に低下したが前値の48.9~63%を維持し、第XIII因子活性は5日までは不変で、フィブリノーゲン活性に関しては若干の変動にとどまった。抗張力の面からは、これら構成成分の力価の変動がグルー形成には大きな影響を与えていないことがわかる。粘性に関してはB液は長期間にわたって変化は認められず、A液も3日以内で上昇は軽度であった。また、無菌操作により細菌の繁殖はなかった。以上の結果より、従来のコンセプトとは異なり、フィブリングルーは用時調整でなくとも使用可能であることが明らかになった。

とくに事前調整とはいえ、1回の手術に用いるフィブリングルーを溶解後、24時間以上に作製・放置することは実際には考えにくい。ため、粘度の面や抗張力および各種構成成分の力価の面からも、事前調整という行為自体は臨床上、生体接着剤の効果を著しく損なうものではないことが明らかになった。

一方、溶解後、数日して使用する状況を考慮した場合の適性な保管方法に関しては、温度設定は冷蔵庫保管、6および37でも形成されたフィブリン塊の抗張力は同様であるが、トロンビン活性やフィブリノーゲン活性の維持の面から、冷所保存が最善と考えられた。ただし、冷所保存の場合はA液の粘性が上昇することから使用前に37に復温することが必要である。

最後に、われわれが推奨する通常のフィブリングルーの用法について言及する。調整後24時間以内に使用する場合には、37に保管した方が、フィブリノーゲンが含まれるA液の溶解性と粘性は、調整後すぐに使用するのに比較して良好となる。汎用のドライバスを手術室に常備し、フィブリングルーを使用する予定のある手術症例では、手術開始直後に用法・用量に従って無菌的にA液およびB液を調整し、37に加温したドライバス内に保管しておく。この操作により、セットアップ時間は短縮され操作性の向上が期待できる。

本論文の内容の一部は、第101回日本外科学会総会(平成13年4月・仙台)で発表した。

文 献

- 1) 尾形佳郎, 菱沼正一, 尾澤 巖ほか: 臍頭十二指腸切除後の消化管再建術式と成績。手術 43: 1079-1088, 1989
- 2) 横井佳博, 中村 達, 鈴木昌八ほか: 肝切離断面における止血剤の検討。外科 52: 916-918, 1990
- 3) 吉谷克雄, 大和 靖, 江口昭治ほか: 肺外科領域における生体接着剤。Biomed Perspect 6: 33-40, 1997
- 4) 内野純一, 中島保明, 河野信博ほか: 肝切離面の出血および胆汁漏出に対するTO-193の有効性~フィブリン接着剤を対照とした臨床第III相比較試験~。外科診療 37: 235-244, 1995
- 5) 西田 博, 青見茂之, 遠藤真弘ほか: 組織接着剤: フィブリン糊・TachoComb等~特に循環器外科領域について~。医薬の門 39: 341-348, 1999
- 6) 井上 勉, 北谷照雄, 小林孝好ほか: Fibrin接着剤(Beriplast)の接着効果と創の自然治癒過程の及ぼす影響。応用薬理 31: 641-648, 1986
- 7) 鈴木正徳, 内山哲之, 及川昌也ほか: Gelatin Re-

- sorcinol Formaldehyde (GRF) glue の肝切離面局所応用のための基礎的検討 . 日消外会誌 33 : 18-24, 2000
- 8) Macchiarini P, Wain J, Almy S et al : Experimental and clinical evaluation of a new synthetic, absorbable sealant to reduce air leaks in thoracic operations. J Thorac Cardiovasc Surg 117 : 751-8, 1999
- 9) 玄 丞休, 中島直喜, 山田圭介ほか : 新しい生体組織接着剤 ~ 改良型 α -シアノアクリレートの軟組織接着剤 . 日接着学会誌 34 : 162-166, 1998
- 10) 豊田秀徳, 中野 哲, 熊田 卓ほか : 消化管大量出血に対する生体接着剤注入による経カテーテル的動脈塞栓術 . 日腹部救急医学会誌 15 : 491-497, 1995
- 11) 大久保千代次, 山田重行, 柏崎利昌ほか : 生体顕微鏡的に観察した創傷治癒過程とこれに及ぼす組織接着剤の影響 . 基礎と臨床 28 : 2215-2225, 1994
- 12) Tabata S, Echert HG, Kellner H-M, et al : Pharmacokinetic study of a fibrin adhesive agent, Beriplast in rats. Oyo Yakuri-Pharmacometrics 31 : 1123-1127, 1986
- 13) 前川祐理子, 越山良子, 柏原早苗ほか : シート状 Fibrin 接着剤の最適用量およびウサギ頸動脈における止血効果の検討 . 応用薬理 56 : 191-196, 1998
- 14) 中島保明, 木村 純, 田村 元ほか : シート状フィブリン接着剤 (TO-193) を用いた肝切離面の止血効果に関する実験的検討 . 外科診療 38 : 115-120, 1996
- 15) 木村 純, 中島保明, 嶋村 剛ほか : シート状フィブリン接着剤 (TO-193) を用いた肝切離面の止血効果に関する実験的検討 (第2報) . 外科診療 38 : 749-754, 1996

Possibility of Pre-adjusting Exogenous Liquid Fibrin Glue Prior to the Surgical Operation

Masanori Suzuki, Tohru Onogawa, Michiaki Unno, Kojin Endo, Yu Katayose,
Heigo Takeuchi, Masaya Oikawa, Noriko Kondo and Seiki Matsuno
Department of Surgery, Division of Gastroenterological Surgery,
Tohoku University Graduate School of Medicine

Background : Liquid type fibrin glue should, in principle, be prepared immediately before use. We studied the feasibility of dissolving fibrin glue in advance of surgery. **Materials and Methods :** Solutions A and B were prepared using Beriplast® (Aventis Pharma Co. Ltd., Tokyo, Japan). The viscosity of solutions A and B was measured throughout the time course; tensile strength was measured using the swine skin section method, and the potency of fibrinogen, thrombin, and factor XIII after preparation were also examined; and bacteria reproduction in both solutions was studied under the following 3 conditions: at room temperature (20 to 25 °C), preserved in a cold place (6 °C), and at 37 °C. **Results :** (1) The tensile strength was maintained for 10 days under all of the above conditions, without reduction. (2) The viscosity of solution A did not change markedly immediately after dissolution to 3 days after dissolution at any temperature. The viscosity of solution B did not change immediately after dissolution and even 10 days after dissolution. (3) Time-course changes in fibrinogen and factor XIII activity were mild, whereas thrombin activity decreased to 48.9~63% at 3 days in all samples, and activity continued to decrease gradually. (4) Tests conducted immediately and 10 days after preparation demonstrated the sterility of both solutions. **Conclusion :** It is feasible to prepare fibrin glue in advance of use, given its effectiveness as a biological adhesive.

Key words : fibrin glue, biological adhesives

[Jpn J Gastroenterol Surg 35 : 18-23, 2002]

Reprint requests : Masanori Suzuki Department of Surgery, Division of Gastroenterological Surgery
Tohoku University Graduate School of Medicine
1-1 Seiryomachi, Aobaku, Sendai 980-8574 JAPAN