

原 著

感染創に使用したヘパリン湿潤コラーゲン型 創傷被覆材の臨床経験

東京女子医科大学 形成外科学教室 (主任: 平山 峻教授)

ヒガシヤマ タクジ ネギシ ナオキ ヒガシヤマ レイコ コン セイキ
東 山 卓 嗣 ・ 根 岸 直 樹 ・ 東 山 玲 子 ・ 権 成 基
シモダ カツミ ヒグチ リョウヘイ ノザキ モトヒロ ヒラヤマ タケシ
下 田 勝 己 ・ 樋 口 良 平 ・ 野 崎 幹 弘 ・ 平 山 峻

(受付 平成3年11月25日)

Clinical Applications of Collagen Skin Template with Heparin Solution to Infectious Wounds

Takuji HIGASHIYAMA, Naoki NEGISHI, Reiko HIGASHIYAMA, Seiki KONG,
Katsumi SHIMODA, Ryohei HIGUCHI, Motohiro NOZAKI
and Takeshi HIRAYAMA

Department of Plastic and Reconstructive Surgery (Director: Prof. Takeshi HIRAYAMA)
Tokyo Women's Medical College

The bacterial infected wounds (MRSA or *Pseudomonas aeruginosa*) were covered with artificial templates composed of silastic membranes and porous atelo-collagens immersed with heparin solution (200 U/ml). Two weeks after coverage, thin split-thickness skin (11/1000 inches) was grafted on the template after removing silastic membrane. Although infection was present, the skin graft took in wound perfectly. Three months after coverage, the contraction and pigmentation of the graft were observed in the minimum grade.

Histological examination was performed at 1, 2, 3 and 4 weeks after coverage. The capillary vessels extending to the middle layer of the artificial dermis was observed and the initial process of vascularization was recognized in the superficial layer 1 week after coverage. Pseudo-dermation were also observed in good condition, 2, 3, and 4 weeks after the coverage.

From those clinical result, confirmation was definitely made that heparin at its clinical usage accelerated vascularization in the dermis and then formed an immunosurfaced ground. It was surmised that heparin has an activity of strengthening, physiologically, the cross-linking among the molecules to atelo-collagen.

緒 言

形成外科領域において、外傷、熱傷等による皮膚欠損創を早期に被覆し、感染を防止する目的で、現在までに様々な創傷被覆材が開発されてきた^{1)~4)}。アテロコラーゲンを材料としたヤナス型人工皮膚^{5)~10)}は生体の治癒能力を引き出す目的で使用されたテンプレートであるが、コラーゲンに過度の架橋を施しているために、コラーゲンの持

つ組織親和性を低下させ、易感染であることが欠点と言えよう¹¹⁾。我々は、その欠点を補うべく、より組織親和性の高いアテロコラーゲン型人工真皮を開発してきた。また、人工真皮にて被覆後、早期に人工真皮内に血管新生を促すことが感染防止の一手段であるという考えのもとに、血管新生促進作用をもつヘパリンで人工真皮を湿潤させることにより、早期に人工真皮内に血管新生が起こる

ことを基本的な動物実験を用いて確認してきた¹²⁾。

今回、我々は感染創面にヘパリンで湿潤させたアテロコラーゲン型人工真皮を適応し、その血管新生効果、組織親和性、安定性を検討し、感染創にも適応できる新規の創面被覆法を確立したのでここに報告する。

材料および方法

1. 対象

平成3年1月1日から平成3年9月30日まで東京都立府中病院に入院した9歳から67歳までの患者4名、10部位を治療対象とした。感染創の内訳は熱傷潰瘍3名、蜂窩織炎による開放創1名であり、これらは全例皮膚全層欠損創であった。

2. 使用材料

二層構造人工真皮模式図および実物を図1に示す。主な原料であるアテロコラーゲン(高研(株)製:AC)を酸性溶液として溶解させ、これを37℃で中和させ、繊維化アテロコラーゲン(FAC)を作製し得た。また、熱変性アテロコラーゲン(HAC)はAC溶液を60℃、30分間熱処理したものをを用いた。次に、FAC溶液とHAC溶液とをコラーゲン濃度で9:1の割合で混合させ攪拌した後に、これらを金属性容器の中に流し込み、凍結乾燥してFAC-HACスポンジを得た。このFAC-HACスポンジを、あらかじめ製膜しておいたシリコン層の上に静置して風乾し、シリコン/FAC-HACスポンジ二層性膜を作製した。この二層膜を110℃で4時間熱架橋処理を行い、二層構造人工真皮として臨床に用いた(以上の工程はすべて無菌的操作で行った)。最終的なFAC-HAC層のコラーゲン量は20mg/cm²であり、また、シリコン層の厚さは50~80μmとなるように調節した。

試薬としては、ヘパリンナトリウム水溶液(200 U/ml)(扶桑、ミドリ十字)を用いた。

3. 使用方法

創部をイソジンを用いて十分に消毒した後に、デブリードマンを行い、生理食塩水にて洗浄、および電気メスを用いて十分な止血を行った。二層構造人工真皮は創部に適合する大きさにカットし、18Gピンク針にて1cm²あたり1個の割合で穴

を開け、ヘパリン水溶液にて人工真皮面1cm²あたり約0.1mlの割合で湿潤させ被覆した。その後軽いtie-over dressingを施行し手術を終了した。ヘパリン水溶液による湿潤は術中、術後4日目に計2回行った。

術後約2週目に創面、人工真皮上に分層植皮術(11/1,000inch)を施行した。

組織学的生検法による検索は、術後1, 2, 3, 4週目に行った。

4. 被覆効果の判定

人工真皮被覆後は肉芽形成の程度、被覆材の密着度、鎮痛効果、滲出液の度合等に分けて4段階にて評価した。また、分層植皮術後は植皮片の生着の程度を評価し、創収縮の程度は創面の長軸と短軸との長さの変化に注目して評価を行った。

創感染の検索は被覆前、被覆後1, 2, 3, 4週目に行った。

また、被覆後1, 2, 3, 4週目に組織学的検索を行った。

結 果

1. 被覆効果

1) 肉芽形成の程度

被覆後7日目には10部位中8部位は良好であり、被覆後14日目には10部位中8部位に極めて良好な肉芽形成を認めた。特に、頭部など血流の良い部位では、被覆後早期に良好な肉芽が形成される傾向がみられた。

2) 密着度

肉芽形成が進行するとともに、良好となった。被覆後14日目には10部位中8部位に極めて良好な密着が得られた。

3) 鎮痛効果

4症例ともに被覆後疼痛はほとんど訴えがなかった。

4) 滲出液の程度

被覆後早期では滲出液が多くみられた。被覆後14日目には10部位すべてが極めて少ない状態となった。経過観察中滲出液によりコラーゲンが創外に流れ出すようなことはなかった(表1)。

5) 分層植皮片の生着の程度

分層植皮片はすべて完全生着した。

表1 人工真皮被覆後の創部評価

病 日		4 日	7 日	14 日
肉 芽 形 成	極めて良好	0	0	8
	良 好	0	8	2
	やや良好	2	2	0
	不 良	8	0	0
密 着 度	極めて良好	0	3	8
	良 好	8	7	2
	やや良好	2	0	0
	不 良	0	0	0
鎮 痛 効 果	極めて良好	6	7	8
	良 好	4	3	2
	やや良好	0	0	0
	不 良	0	0	0
浸出液の度合	極めて少ない	0	3	10
	少 ない	3	7	0
	やや少ない	5	0	0
	多 い	2	0	0

注) 数字は創部の数を表わす

6) 創収縮の程度

人工真皮被覆時を100%とした創部の長軸×短軸の面積の変化は、被覆後14日までは変化なく100%であったが、被覆後21日目には99.0%となり、被覆後28日目には93.3%と減少した。症例1, 2, 3の被覆後3カ月の面積変化は89.6%で僅か

な減少に留まった(表2)。

2. 創感染

創面からの分離菌の結果を表3に示す。被覆後14日目までは、症例1, 3, 4ではMRSA(methicillin resistant *Staphylococcus aureus*)、症例2では *Pseudomonas aeruginosa* が全経過を通して認められた。しかし、被覆後28日目になると10部位中8部位が陰性となった。

3. 組織学的検索

典型的症例の組織を提示する。症例1の頭部では、被覆後7日目には、H-E染色において真皮様構造が形成され、血管系の侵入が認められ、リンパ球主体の細胞浸潤が観察された。その水平断のABC- α VIII染色¹³⁾では、人工真皮上層部に血管らしきものの周囲が淡染され、血管新生の初期状態を呈していた。真皮中層部では血管周囲が濃染され、血管侵入が観察された。被覆後14日目には真皮様組織は定形的な形を示し、人工真皮内の血管は適当量存在していた。ABC-A4A染色¹⁴⁾においては人工真皮部分のコラーゲンが濃染され明らかに人工真皮が生着していることを示していた(図2)。

被覆後21日目、分層植皮術後7日目、真皮様組織に分層植皮片は生着し、両者に血管疎通が観察

表2 創面(長軸×短軸)の経時的変化(cm²)

症 例	部 位	被 覆 時	14 日 後	21 日 後	28 日 後	3 カ月 後
1	頭 部 (1)	10.0×8.0 (100%)	10.0×8.0 (100%)	9.5×8.0 (95%)	9.3×8.0 (93%)	9.5×8.4 (100%)
	頭 部 (2)	8.0×2.5 (100%)	8.0×2.5 (100%)	8.3×2.7 (112%)	8.5×2.5 (106%)	9.0×2.5 (113%)
	頭 部 (3)	8.0×2.5 (100%)	8.0×2.7 (108%)	7.9×3.0 (119%)	7.5×2.7 (94%)	7.5×2.5 (94%)
	頸 部	7.0±3.0 (100%)	7.0×3.0 (100%)	7.0×2.5 (83%)	7.0×2.5 (83%)	6.5×2.0 (62%)
	左 膝 部	3.5×2.5 (100%)	3.0×2.5 (100%)	3.0×2.5 (110%)	3.0×2.5 (100%)	2.9×2.7 (89%)
2	左 大 腿 部	5.0×5.0 (100%)	5.0×5.0 (100%)	5.0×4.7 (94%)	4.9×4.7 (92%)	4.7×4.5 (85%)
3	右 大 腿 部	10.0×3.0 (100%)	10.0×3.0 (100%)	9.7×2.9 (94%)	9.7×2.8 (91%)	9.5×2.7 (85%)
4	右足関節部	3.0×2.5 (100%)	3.0×2.5 (100%)	3.0×2.7 (108%)	3.0×3.0 (120%)	
	右 足 背 部	4.5±1.5 (100%)	4.5×1.4 (93%)	4.3×1.4 (89%)	4.0×1.2 (71%)	
	右 踵 部	6.0×2.0 (100%)	5.9×2.0 (98%)	5.5×2.1 (96%)	5.0×2.0 (83%)	

表3 創面からの分離菌

症 例	部 位	被 覆 前	7 日 後	14 日 後	21 日 後	28 日 後
1	頭 部 (1)	MRSA	MRSA	MRSA	MRSA	—
	頭 部 (2)	MRSA	MRSA	MRSA	MRSA	—
	頭 部 (3)	MRSA	MRSA	MRSA	MRSA	—
	頸 部	MRSA	MRSA	MRSA	MRSA	—
	左 膝 部	MRSA	MRSA	MRSA	—	—
2	左 大 腿 部	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3	右 大 腿 部	MRSA	MRSA	MRSA	MRSA	MRSA
4	右足関節部	MRSA	MRSA	MRSA	MRSA	—
	右 足 背 部	MRSA	MRSA	MRSA	MRSA	—
	右 踵 部	MRSA	MRSA	MRSA	MRSA	—

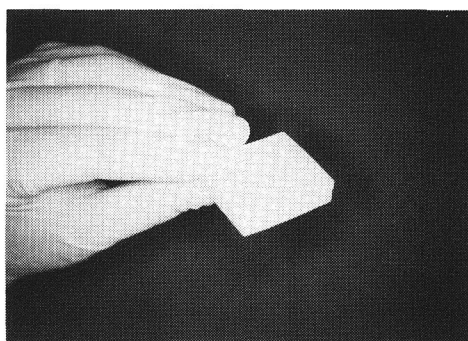
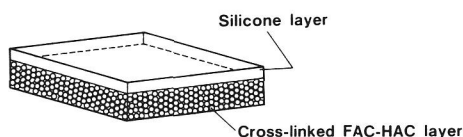


図1 二層構造人工真皮（左；模式図，右；実物）

された。被覆後28日目、植皮術後14日目、真皮様構造は安定し、血管構築も良好で、植皮片は完全生着した（図3）。

症 例

代表的症例を提示する。

症例1：39歳，男性。平成3年2月19日自宅の火災にてⅡ～Ⅲ度50%の全身熱傷，および気道熱傷を受傷した。受傷後66日までに計3回のデブリードマン，分層植皮術を施行し，熱傷潰瘍は頭部，頸部，右膝部に2.5%を残すのみとなった。

平成3年4月25日，頭部8×10cm²の熱傷潰瘍に対しデブリードマンを行った後，二層構造人工真皮を200U/mlのヘパリン水溶液8mlで湿潤させて創部を被覆し，軽いtie-over dressingを施行した。術後4日目にtie-over dressingを除去し，人工真皮を200U/mlのヘパリン水溶液8mlで湿潤させた。1週間後にシリコン膜を除去した。人工

真皮の密着は極めて良好であった。被覆2週間後，左側腹部より11/1,000inchの採皮を行い，人工真皮上に分層植皮術を施行した。同様にさらに頭部2カ所(8.0×2.5, 7.5×3.0cm²)，頸部(7.0×3.0cm²)，右膝部(3.5×2.5cm²)の難治性潰瘍に対しても人工真皮移植，分層植皮術を行った。植皮片は完全生着し，植皮後3カ月を経過しているが，薄い分層植皮片移植にもかかわらず拘縮はほとんどみられず，色素沈着も認められなかった(図4)。

症例2：67歳，男性。平成3年1月より糖尿病治療の目的で内科に入院中，平成3年3月より左大腿部に蜂窩織炎を生じた。3月20日形成外科初診。4月7日デブリードマンを行った。術後，洗浄，軟膏療法を行い，4月25日，5×5cm²の潰瘍部をヘパリン湿潤人工真皮にて被覆した。術後2週間目に分層植皮術(11/1,000inch)を施行した。植皮片は完全生着し，分層植皮術3カ月後も拘縮は

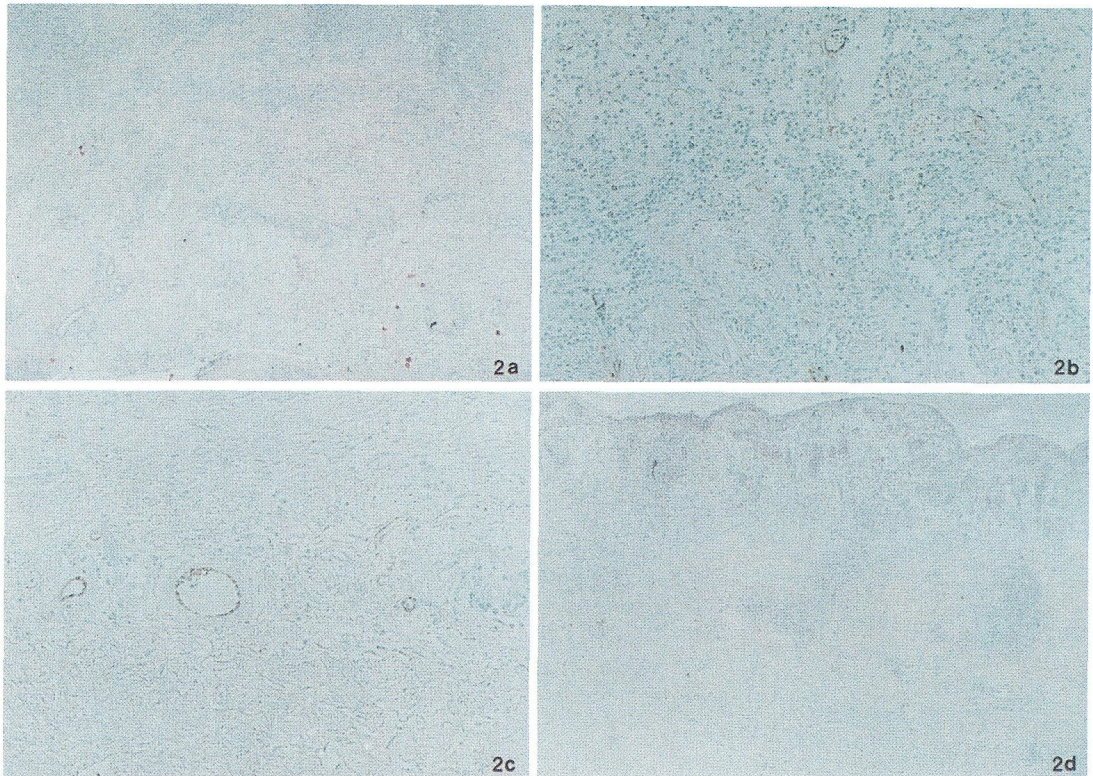
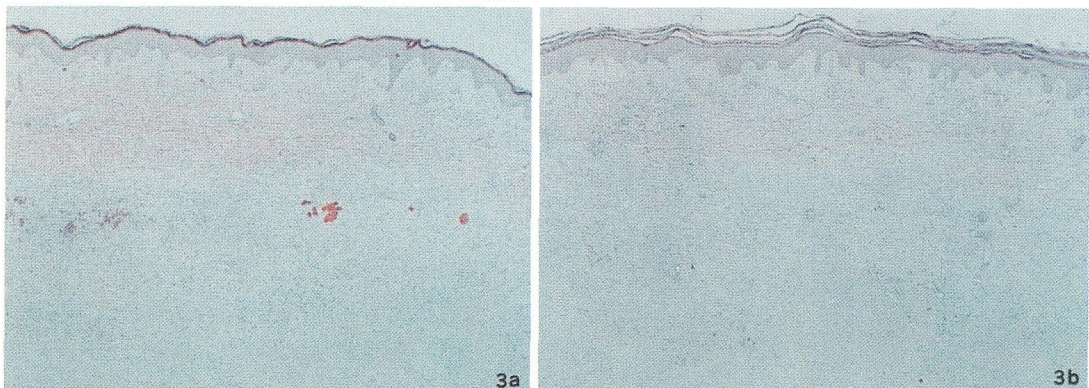


図2 組織所見

- a: 人工真皮断面 (被覆後7日, H.E. 染色, $\times 36$)
 b: 人工真皮水平断 (被覆後7日目, ABC- α VIII 染色, $\times 180$) FAC-HAC 層上層部の状態.
 c: 人工真皮水平断 (被覆後7日目, ABC- α VIII 染色, $\times 180$) FAC-HAC 層中層部の状態.
 d: 人工真皮断面 (被覆後14日目, H.E. 染色, $\times 36$)
 e: 人工真皮水平断 (被覆後14日目, ABC-A4A 染色, $\times 90$)

図3 a: 被覆後21日, 分層植皮術後7日目の組織断面 (H.E. 染色, $\times 36$), b: 被覆後28日, 分層植皮術後14日目の組織断面 (H.E. 染色, $\times 36$)



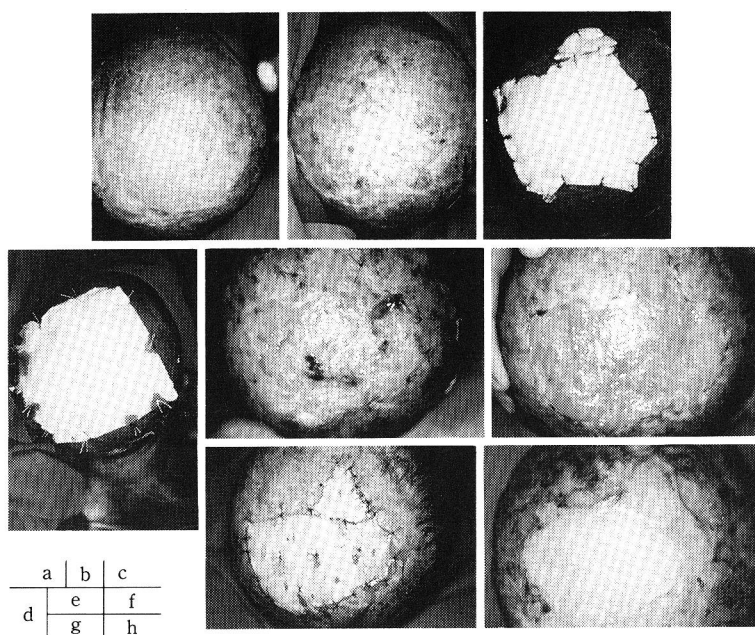


図4 症例1. 頭部

a: 術前, b: デブリードマン直後, c: 人工真皮被覆直後, d: 軽い tie-over dressing 施行, e: 人工真皮被覆後7日目, f: 人工真皮被覆後14日目, g: 人工真皮上分層植皮術直後, h: 分層植皮術後3ヵ月目。

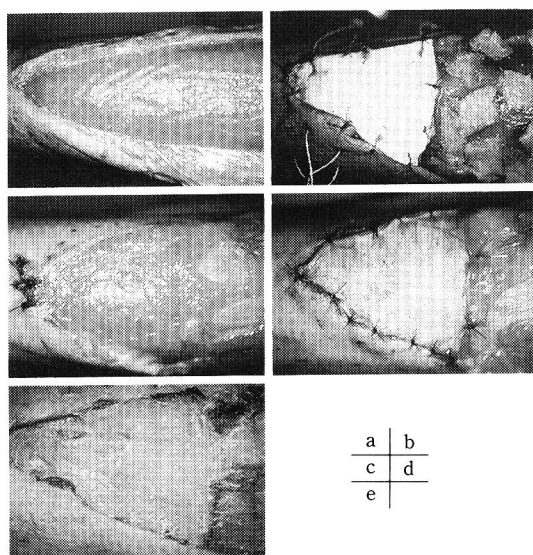


図5 症例2. 左大腿部

a: 術前, b: 人工真皮被覆直後, c: 人工真皮被覆後14日目, d: 人工真皮上分層植皮術直後, e: 分層植皮術後3ヵ月目。

ほとんどみられなかった(図5)。

症例3: 45歳, 男性。平成3年3月28日, 自宅の火災にて四肢, 顔面にII~III度30%, および気道熱傷を受傷した。直ちに, 全身管理を行い, 受傷後2回の分層植皮術を行った結果, 熱傷潰瘍は2%を残すのみとなった。5月14日右大腿後面の $10 \times 3 \text{ cm}^2$ の熱傷潰瘍に対し, デブリードマン施行後, ヘパリン湿潤人工真皮にて被覆した。被覆2週間後, 分層植皮術(11/1,000inch)を施行した。植皮片は完全生着し, 分層植皮術後3ヵ月, 拘縮はほとんどなく柔らかかった(図6)。

症例4: 9歳, 男児。平成3年7月10日, 焚き火にて両下腿にII~III度, 7%の熱傷を受傷した。平成3年8月13日, 右足関節, 右足背, 右踵部の熱傷後難治性潰瘍(それぞれ 3.0×2.5 , 4.5×1.5 , $6.0 \times 2.0 \text{ cm}^2$)に対し人工真皮移植術を行った。この症例では術後3週目に分層植皮術の代わりに自家培養表皮移植術を施行した。培養表皮移植2週間後の生着は良好であった(図7)。

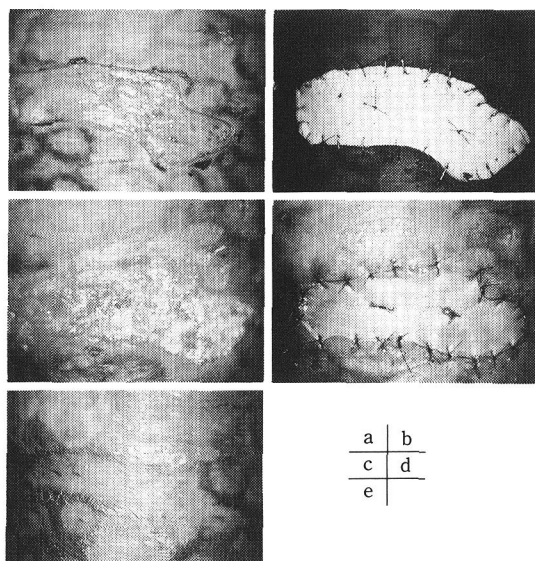


図6 症例3, 右大腿後面

a: デブリードマン直後, b: 人工真皮被覆直後, c: 人工真皮被覆後14日目, d: 人工真皮上分層植皮術直後, e: 分層植皮術後3ヵ月目。

考 察

Yannas, Burke ら^{5)~7)}の Stage I 膜の報告以来, コラーゲンを材料とする人工真皮的の開発, 研

究が盛んに行われ, 臨床使用経験報告も散見されるようになってきた。しかし, それらの報告例のほとんどは非感染皮膚全層欠損創に適応されており, 感染創に適応することには躊躇されてきた。しかし, 臨床においては, 熱傷等, 感染創をとり扱うことが多いのが現状である。今回我々は, ヘパリンの血管新生効果に着目し, 組織親和性の高い人工真皮を感染創に適応し, 良好な結果を得ることができたので報告した。

1. ヘパリンの血管新生, 組織安定効果

我々は, 臨床例において, 生理食塩水を用いて人工真皮を浸潤させて感染創部を被覆した症例を3例経験している。その中の2例は創感染により人工真皮が創面に密着せず, 除去せざるをえなくなった。また, 1症例は滲出液によりコラーゲンが創外に流出したり, 一カ所に固まってしまった結果となった。これらの現象に対し, ヘパリン湿润人工真皮を使用した本臨床例では, 創部が感染しているにもかかわらず, 肉眼的に, 人工真皮内に膿が観察されることは全く見られなかった。またコラーゲン自体が創外に流れ出すようなこともなく, 人工真皮は確実に創面に密着し, 良好な真皮様構造を形成し, さらにその上部に移植した分

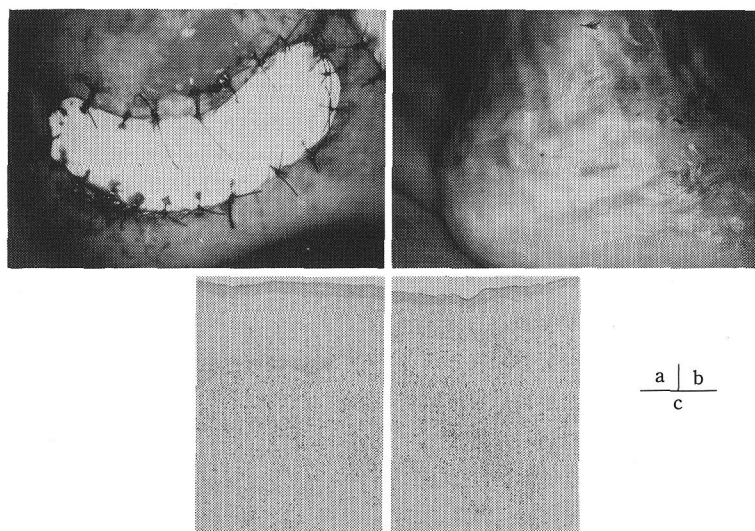


図7 症例4, 右踵部

a: 人工真皮被覆直後, b: 人工真皮上培養表皮移植後14日目, c: 培養表皮移植後2週目の組織所見 (H.E.染色, $\times 36$), 左: 再生表皮部, 右: 培養表皮生着部。

層植皮片は完全生着を示した。これらは、人工真皮被覆後7日目の組織像において確認されたように、ヘパリンの使用により血管新生が人工真皮内に早期に発生し、しかも、2次的に人工真皮内に、細胞性免疫の母床が形成され、感染に抵抗できる状態になったものと推察された。さらに、(1) 滲出液によりコラーゲンが流れ出さなかったこと、(2) コラーゲン免疫染色により被覆後14日目に極めて良好な疑似真皮構造が確認されたこと等により、ヘパリンは人工真皮を構築する材料であるアテロコラーゲンの分子間の架橋を生理的に強化する作用を持つことが強く推察された。

2. 人工真皮の創収縮抑制効果

現在までに、創収縮に関する研究の報告は数多い。Padgett¹⁵⁾は人の頸部の分層植皮において、薄い分層植皮片は60%の、厚い分層植皮片は30%の収縮を来し、全層植皮片はほとんど収縮しなかったと報告している。また、Sawhney ら¹⁶⁾は家兎をモデルに分層植皮片と全層植皮片の収縮を経時的に比較し、分層植皮片では69.9%、全層植皮片では44.9%の収縮率であったと報告している。また、鮫島¹⁷⁾はラットをモデルに Allograft を行い、Al-lodermis が創収縮を制限するものと推察している。

今回、我々が使用した人工真皮の被覆後1カ月、分層植皮術後2週目の平均創収縮率は6.7%であり、症例1, 2, 3の3カ月後の創収縮は10.4%と少なく、勿論、今後症例を重ねて検討する必要があるが、二層構造人工真皮を使用することによって、全層植皮に近い創収縮防止効果が期待された。

今回の臨床例の結果、ヘパリンを湿潤させることにより感染創にも人工真皮を適用できることが明らかになった。今後、さらに症例を重ね検討するとともに、ヘパリンをFAC-HAC層に組みこんだヘパリン徐放性人工真皮を開発したいと考えている。また、今回、症例4の3部位は、人工真皮被覆と同時に採取した患者本人の皮膚を培養し、被覆後4週目に、培養表皮移植術を行った。培養表皮は移植後2週目においては、生着が確認されたが、さらに長期に観察し創収縮の程度、色調、

質感について検討の必要がある。本法の理想的な未来像としては、人工真皮の上に直接培養表皮移植を行う方法を一刻も早く確立したいものである。

結 語

1) 感染創にヘパリン湿潤人工真皮を適応し、感染があるにもかかわらず、人工真皮は良好な疑似真皮構造を形成し、分層植皮片は完全生着した。

2) 人工真皮を使用することによる創収縮防止効果を確認できた。

3) 人工真皮上に自家培養表皮移植を行った症例では、2週間後にその生着を確認した。

文 献

- 1) 黒柳能光, 黄金井康巳, 塩谷信幸: 創傷被覆材の開発I ポリ-L-ロイシン創傷被覆材と他の被覆材との比較一. 日形会誌 7: 515-525, 1987
- 2) 黒柳能光, 黄金井康巳, 塩谷信幸: 創傷被覆材の開発II—抗菌剤含有ポリ-L-ロイシン創傷被覆材の評価一. 日形会誌 7: 526-537, 1987
- 3) 金 栄吉, 塩谷信幸, 黒柳能光: 抗菌剤徐放性創傷被覆材の評価. 日形会誌 9: 676-686, 1989
- 4) 金 栄吉, 塩谷信幸, 黒柳能光: ポリウレタン膜とコラーゲンスポンジから成る抗菌剤含有創傷被覆材の評価. 日形会誌 10: 389-399, 1990
- 5) Yannas IV, Burke JF: Design of an artificial skin. I. Basic design principles. J Biomed Mater Res 14: 65-81, 1980
- 6) Yannas IV, Burke JF, Gordon PL et al: Design of an artificial skin. II. Control of chemical composition. J Biomed Mater Res 14: 107-131, 1980
- 7) Burke JF, Yannas IV, Quinby WC et al: Successful use of a physiological acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. Ann Surg 194: 413-428, 1981
- 8) Dagalakis N, Flink J, Stasikelis P et al: Design of an artificial skin. III. Control of pore structure. J Biomed Mater Res 14: 511-528, 1980
- 9) 鈴木茂彦, 一色信彦, 玉田 靖ほか: GAG添加コラーゲンとシリコンの2層構造をもつ新しい人工皮膚の作製と使用経験. 日形会誌 6: 221-231, 1986
- 10) 鈴木茂彦, 松田和也, 一色信彦ほか: コラーゲンスポンジとシリコンの2層構造をもつ新しい人工皮膚について. 熱傷 13: 42-48, 1987
- 11) 大崎健一, 小西 淳, 後藤彰久ほか: コラーゲンスポンジを用いた新しい人工皮膚. 人工臓器

- 18 : 151-154, 1989
- 12) 東山卓嗣 : コラーゲン型被覆材における生理活性物質の血管新生効果の検討—ヘパリン, プロタミンの血管新生に及ぼす影響—. 日形会誌 8 : 597-608, 1991
 - 13) 森本典雄, 久保良彦, 笹嶋唯博ほか : 吻合部内膜肥厚の基礎研究, PAP 法による吻合部内膜肥厚の検討. 人工臓器 14 : 941-944, 1985
 - 14) McCoy JP, Schade JW, Siegle RJ et al : Characterization of the humoral immune response to bovine collagen implants. Arch Dermatologica 121 : 990-994, 1985
 - 15) Padgett EC : Skin Grafting from a Personal and Experimental Point of View. Charles C Thomas, Springfield (1942)
 - 16) Sawhney CP, Monga HI : Wound contraction in rabbits and the effectiveness of skin grafts in preventing it. Br J Plast Surg 23 : 318-321, 1970
 - 17) 鮫嶋憲治 : Allograft の自家表皮形成促進効果と創収縮抑制効果に関する実験的研究. 長崎医学会誌 63 : 151-163, 1988