

Fibrin 薄膜の製法とその性状について

株式会社 ミドリ十字

(旧：株式会社日本ブラッド・バンク)

佐古英二・高鍋温是・田中秀直・川野武彦

On the preparation and the property of the fibrin film

by

EIJI SAKO, ATUYUKI TAKANABE, HIDENAO TANAKA
and TAKEHIKO KAWANO

The Green Cross Corporation
(former: The Blood Plasma Corporation of Japan)

The fibrin films were prepared from human plasma according to the J. D. Ferry and P. R. MORISON's method by clotting the solution of human fibrinogen with thrombin. The sterilized fibrin films by autoclaving at 15 p. s. i. for 20 minutes in the glass tubes had the properties of fibrin content: 46~68%, tensile strength: 110~325g/mm², elongation at the breaking point; 135~260%, thickness: 0.09~0.20mm, and degree of swelling in 1M. acetic acid: 1.2~4.2g/g., when the films were equilibrated with water.

These films seemed to be enough available for the clinical use.

1944年 Ferry¹⁾²⁾ Bailey³⁾ 等は人血漿 Fibrinogen と Thrombin によつて Fibrin 薄膜 (Fibrin film) を製し Tarlov⁴⁾⁵⁾⁶⁾ 及び Singer⁷⁾ 等は、これを用いて諸種の神経縫合を試みている。

本邦にあつては柏木、西⁸⁾ 等のプラスマ膜が著名である。

われわれは Fibrin 薄膜の臨床使用開発の一助として、Fibrin 薄膜を製することを試み、薄膜の製法及びその性状について若干の検討を加えたので報告する。

実験方法及び材料

Fibrinogen: Cohn の冷エタノール分画法による人血漿分画 I⁹⁾¹⁰⁾ より製した分画 I—0 の凍結乾燥品である。(日本ブラッド・バンク製)

その電気泳動の純度は Fibrinogen 80%, β -Globulin 20%であつた(図-1)。

これを、0.15%の濃度でリン酸緩衝液(1/20M, pH 7.3)に溶解し、最終1単位/mlになるよう Thrombin を加えたとき凝固に要する時間は 28°C で21秒であつた。

薄膜の製造に当つては、あらかじめ蒸留水を用いて

図1 実験に用いた Fibrinogen泳動像



泳動条件

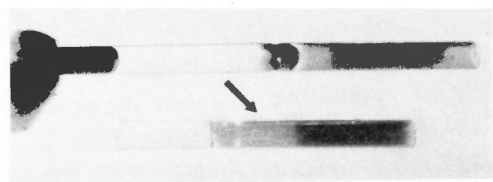
蛋白濃度: 1.0%
緩衝液: Veronal Buffer (pH 8.6 $\mu=0.1$)
電流: 20mA
泳動時間: 150分
温度: +1°C

溶解した。

Thrombin: 人血漿より分離精製¹¹⁾¹²⁾ したもので凍結乾燥されている。(日本ブラッド・バンク製)。その力価¹⁴⁾は8.6単位/mgである。使用に当つては生理食塩液を用いて溶解及び稀釈を行なつた。

Fibrin 凝固血: Fibrinogen に Thrombin を作用させ、Fibrinに転化¹¹⁾¹³⁾するときに用いる。30×10×1.5cm

図2 ガラス・アンフル内の Fibrin 薄膜



蒸気滅菌後、綿栓をほどきそのまま塩化カルシウム上で含湿度を調整（上段），その後アンフルを熔閉する。（下段）

のステンレス製皿であり、底の隅1ヵ所に径約5mmの小孔があり、皿中の水分を除去出来る。

Fibrin 薄膜の製法：Fibrin 薄膜は Ferry-Morrison の方法¹⁾²⁾に準拠して作成した。Fibrinogen 溶液に、Thrombin を加えて混和後、Fibrin に転化するまでに Fibrin 凝固皿に移す。1夜室温に放置し、Fibrin 転化を完結させると同時に、過剰水分の除去を行なう。放置後、凝塊をモスリン布に移しガラス板を介して加圧脱水を行なう。柔軟性を失わない程度に風乾後、薄膜をモスリン布より取り出し、ナイロン布と共に必要な大きさに截断しガラス・アンフルに入れ、綿栓を施し121℃-20分間の蒸気滅菌を行なう。滅菌後、塩化カルシウム上に放置し膜の含湿度を $11 \pm 3\%$ ¹²⁾に調整しガラス・アンフルを熔閉する。（図-2）

Fibrin 薄膜の性状試験法¹²⁾

1. **Fibrin 含量：**薄膜を蒸留水に24時間浸漬する。水に溶出する成分を非 Fibrin と考える。蒸留水より膜を出し、湿重量測定後 $100 \pm 1^\circ\text{C}$ で乾燥恒量とし、湿重量に対する乾燥重量%を Fibrin 含量とする。
2. **抗張力 (Tensile strength)：**薄膜を蒸留水に40分間

浸し、平衡化 (Equilibration) する。このものを図-3の装置で引っぱり、膜の断裂点における膜断面 1mm^2 当りの力 (g) を抗張力とする。

3. **膜厚：**蒸留水中40分間浸して、平衡化し、マイクロメーターで厚さを測定する。
4. **伸張度 (Elongation)：**抗張力測定において膜の断裂点における伸びを求める。もとの長さに対する伸びの割合を%で現わし、それを伸張度とする。原長の2倍の伸びは伸長度200%と示す。
5. **膨潤度 (Degree of Swelling)：**1M-酢酸に膜を24時間浸漬する。その後、湿重量を測定し、更に $100 \pm 1^\circ\text{C}$ で乾燥恒量とする。湿重量 (g) を乾燥重量 (g) で除した値を膨潤度とする。

実験成績

I. Fibrinogen 濃度と伸張度及び抗張力の関係

Fibrinogen 水溶液を1/100M クエン酸-クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.4) で稀釈し、Fibrinogen濃度を1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0%に調整する。

これにThrombin 溶液を加えて、最終的にThrombin 1単位/ml とする。

製された膜を滅菌 (121℃-20分) し、Fibrinogen 濃度と伸張度及び抗張力の関係を調べると同時に、Fibrin 凝塊より脱水する時の加圧影響も調べた。加圧は $20 \sim 25\text{g}/\text{cm}^2$ 24時間とし、対照として加圧しないで自然脱水させる群を設けた。滅菌前の含湿度は $15 \sim 20\%$ である。実験の結果は図-4のようであった。

抗張力は Fibrinogen 濃度が1.5～2%の範囲内でピークを示した。伸張度は殆んど Fibrinogen 濃度の影響を受けない。膜厚は Fibrinogen 濃度の増加につれ

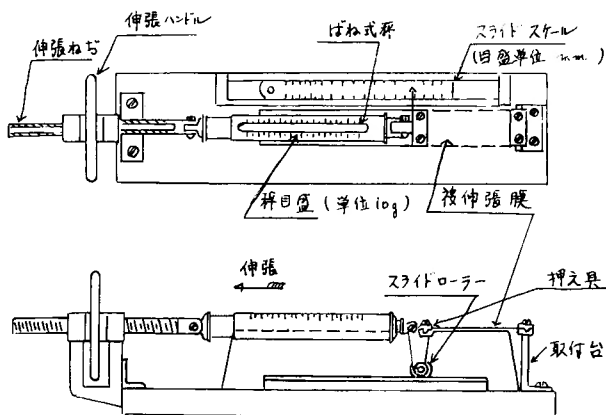


図3 抗張力・伸張度測定装置

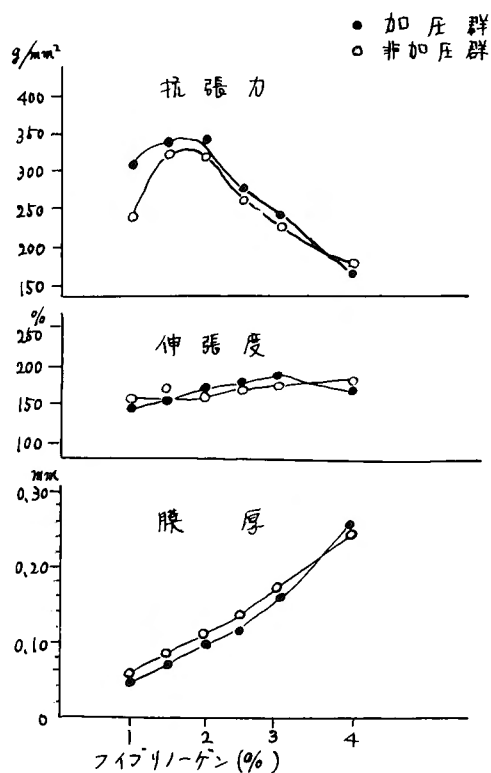


図4 Fibrinogen 濃度及び加圧の影響

て大となつた。加圧は伸張度、抗張力及び膜厚に著しい影響を与えないが、加圧しない群は外観上膜の仕上りが良好でなかつた。以後 Fibrinogen 濃度は 2%、加圧は上の条件で毎行なうこととした。

II. Thrombin の作用pHと作用単位の影響

1/100 M-クエン酸-クエン酸ナトリウム緩衝液を用いて、2% Fibrinogen 溶液の pH を 6.7 及び 8.5 とし、これに Thrombin を加えて最終作用単位を 0.5, 1.0, 2.0 単位/ml とした。製された滅菌ずみの膜について抗張力、伸張度、膜厚及び膨潤度を調べた。(滅菌前の膜の含湿度は 15~20% である)。pH を 6~8.5 に限つたのは、pH 6 以下では Fibrinogen の溶解性が低下するし、(等電点: 5.4) pH 9 以上では、Fibrin 凝塊をモスリン布から剝離するのに困難を感じることに由る。結果は図-5 のようであつた。Thrombin 作用単位は殆んど影響を及ぼさないが¹⁾、作用 pH の影響は明らかであり、特に抗張力及び膜厚に対して著しい。作用 pH が大となるに従い、抗張力は減少し膜厚は増加するようである。作用 pH が 8.5 にあつては、Thrombin 作用 pH と作用単位の影響が Fibrin 含量及び膨潤度に見られる。

III. 高圧蒸気滅菌の影響

Fibrin 薄膜の細菌汚染並びに肝炎ウイルス汚染¹⁵⁾を防ぐために、オートクレーブによる高圧蒸気滅菌を行なつた。滅菌条件は 121°C-20 分間であるが、この滅菌操

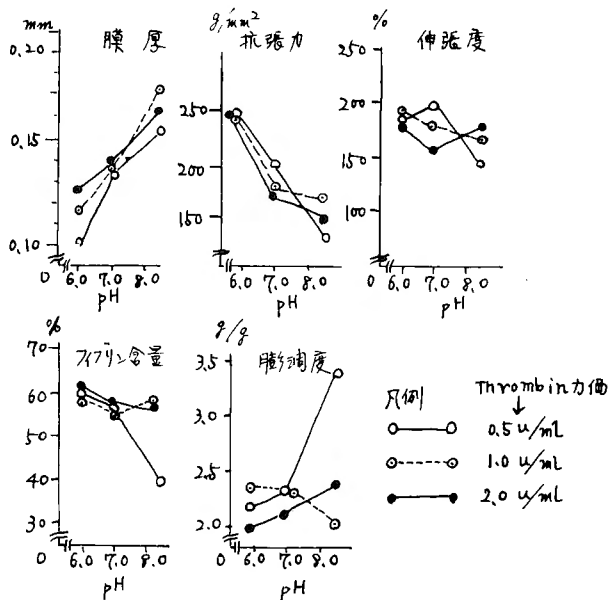


図5 Thrombin 作用pH及び作用単位の影響

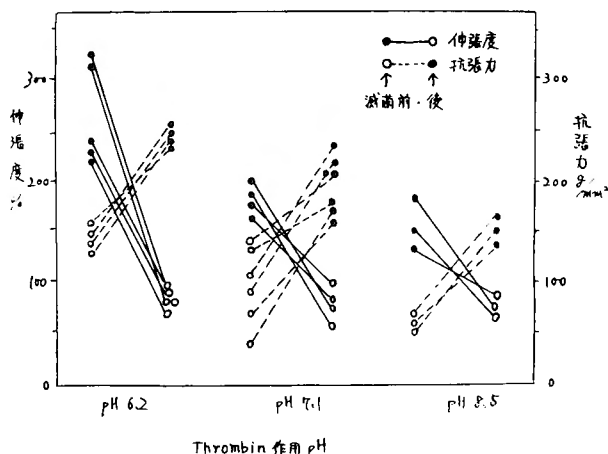


図 6 高圧蒸気滅菌 (121°C~20分) の抗張力, 伸張度に及ぼす影響

含湿度 (滅菌前) と伸張度の関係

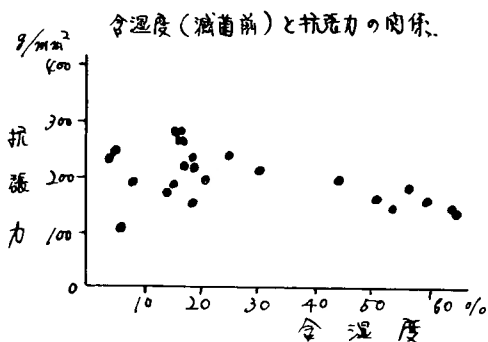
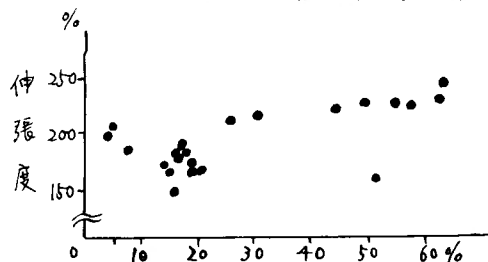


図 7 滅菌前の薄膜の含湿度の影響

作が薄膜の抗張力, 伸張度には影響を調べた。用いた薄膜は Fibrinogen 濃度 2%, Thrombin 作用単位 1 単位/ml, Thrombin 作用 pH 6.7, 8.5 の条件で製されたものである。結果は図-6 のようであつた。滅菌操作によつて抗張力は増すが伸張度は減ずる。Thrombin 作用 pH が小なる程, この変動は著しい。

IV 高圧蒸気滅菌前の膜含湿度の影響

Fibrinogen 溶液 (2%, pH 6.4) に Thrombin (1 単位/ml) を作用させて得た滅菌前の薄膜を, デシケーター内で水蒸気中又は塩化カルシウム上にさらして含湿度を種々変え, この含湿度と滅菌後の膜の抗張力, 伸張度の関係を調べたところ図-7 のようであつた。後に詳述するが, 望ましい条件で製された薄膜は水で平衡化すると透明になるが, 滅菌前の含湿度が 30~35% 以上では, 滅菌によつて膜は平衡化しても灰白色で不透明となつた。滅菌前の含湿度が増すにつれて, 微弱ではあるが, 抗張力は減じ, 伸張度は増加するようである。滅菌効果のための最低必要含湿度は膜とアンブル容量によつて左右されるが, われわれの場合 (アンブル容量 15ml, 内蔵 Fibrin 膜 0.5g) にあつては少なくとも 10% の含湿度が必要と思われる。以後膜の滅菌含湿度は 15~20%¹²⁾ とした。

V Fibrin 薄膜の性状について

2% Fibrinogen 溶液 (pH 6.4) に最終 1 単位/ml となるよう Thrombin を加え, 滅菌前の含湿度を 15~20% として製した滅菌済み膜の性状を調べた。アンブルより取り出した膜は淡黄褐色不透明で乾燥しており, 硬くもろい。(薄膜の最終含湿度は $11 \pm 3\%$ に調整してある。)

このものを蒸留水中に浸漬し平衡化すると膜は柔軟性を帯び, 無色で透明又は透明に近くなり良く伸びる。(図-8)

平衡化した薄膜について, その断裂点に至るまでの伸びと膜断面積 1 mm² 当りの引っぱり力との関係を調べたところ, 伸びと引っぱり力は Sigmoid 曲線を描く²⁾。

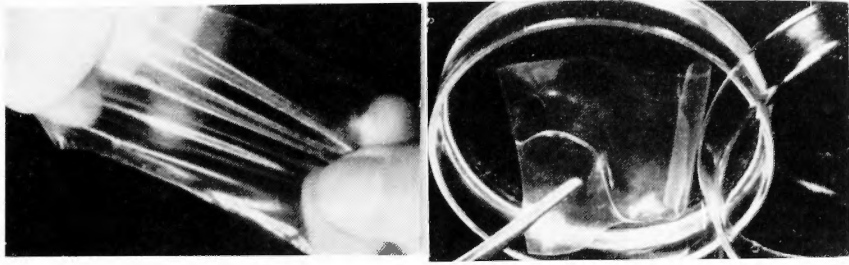


図 8 平衡化した Fibrin 薄膜

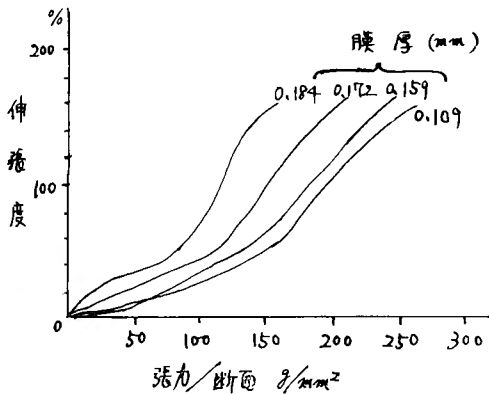


図9 平衡化膜の stress-strain 曲線

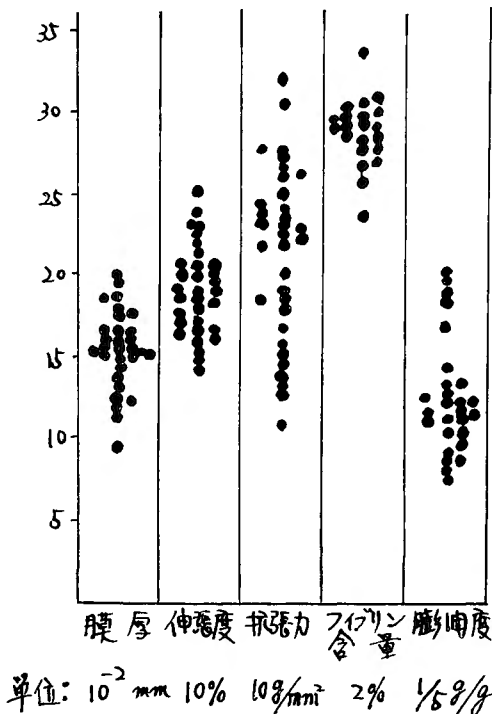


図10 Fibrin 薄膜の性状

この曲線は膜厚と関係があるらしく、膜厚が小となれば横軸(引っぱり力)の方に傾くようである。(図-9)

上述の方法で、われわれが反復試験製造した約20ロットの薄膜について、その性状を調べたところ図-10の成績を得た。フィブリン含量は46~68%、抗張力は110~325g/mm²、膜厚は0.09~0.20mm、伸張度は135~260

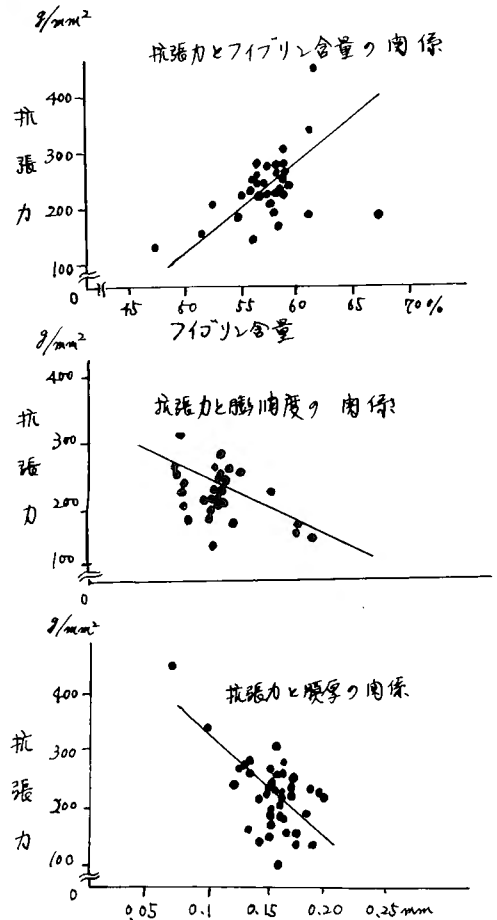


図11 薄膜の抗張力と他の性状との関係

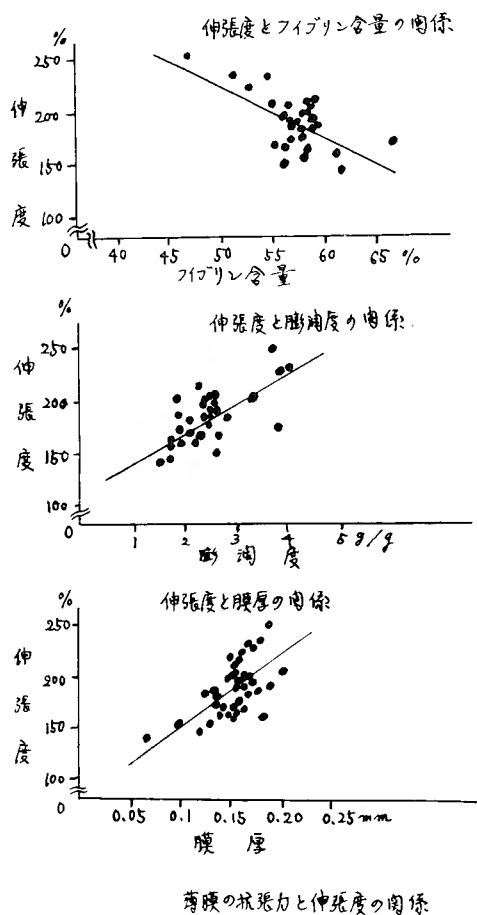


図12 薄膜の伸張度と他の性状との關係

%, 膨潤度は1.0~1.2g/gであつた。アメリカ公衆衛生局の定める基準との対比は後に考察する。

VI. 抗張力及び伸張度と他の膜性状との關係

「膜の強さ」は一般に抗張力、伸張度を指標とすることが出来る。従つて抗張力、伸張度は特に重要な性状であろう。そこで、われわれは抗張力、伸張度と他の膜性状との關係を、上の反復製造膜について調べたところ図-11及び図-12の成績を得た。図中の直線は各点の分布から求めた回帰直線である。抗張力とFibrin含量とはほぼ比例的な關係にあり、膨潤度と膜厚に關しては反比例的關係にある。一方伸張度と比例的關係にあるのは膜厚と膨潤度であり、反比例的關係にあるのはFibrin含量である。次に抗張力と伸張度の關係を調べたところ図-13の結果を得た。即ち抗張力と伸張度は互に交叉する直線上に分布するようである。これ

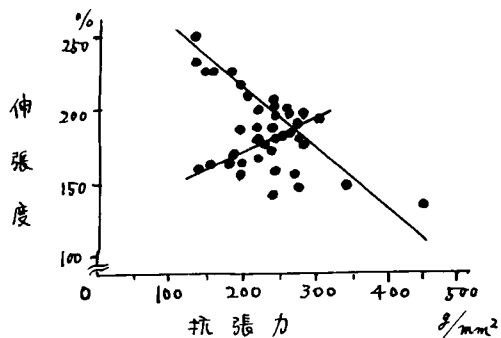


図13 薄膜の抗張力と伸張度の關係

らの成績は抗張力と伸張度は互に相殺する性状の要因によつて成り立つらしいことを示している。

考 察

Ferry-Morrison 法について検討した主な点は、用いる Fibrinogen 溶液の Fibrinogen 濃度、Thrombin の作用pH及び作用量についてであつた。その結果 Fibrinogen 濃度には使用至適量があつて、その値は1~2%であると判つたが、その他の点については殆んど Ferry-Morrison 法を肯定した。

即ち、Ferry-Morrison法では Fibrinogen 濃度が0.5%が良く、Thrombin の作用 pHは6.2~6.3、作用量は殆んど影響なく0.3単位/mlで充分であるとしている。われわれの結論は、Thrombin 作用pHは可能な限り6.0に近い方が良く作用量は殆んど影響がないと云うことであつた。われわれが日常作業として反復製造した薄膜をアメリカ公衆衛生局 (N. I. H.) の Minimum Requirements の方法で検査したとき、Fibrin 含量 (N. I. H. 規格: 50~60%), 膨潤度 (N. I. H. 規格: 5g/g以下)は殆んど N. I. H. 規格を満足したが伸張度 (N. I. H. 規格: 2倍以上の伸び)、抗張力 (N. I. H. 規格: 300g/mm²以上)についてはこれを満足しなかつた。伸張度、抗張力が臨床上的使用にどの程度の影響を持つか明らかなない。われわれが用いた伸張度、抗張力測定器にも問題があると考えられる。

Ferry 等はその論文¹²⁾に彼等の製した膜の性状を記載しているが、極めて良好な成績を得ている (表)。

又、Bailey 等が臨床的に使用した薄膜³⁾は Ferry-Morrison 法によつて製したものであり、その伸張度は200%以上であると報告している。この様な理由から、Ferry-Morrison 法に欠陥があるとは考えられない。

(表) Ferry 等の製した Fibrin 薄膜の性状

Table 1 Properties of Fibrin Film
Equilibrated with Water

Film	Fibrin Content	Capacity	Permeability	Stress-Strain Curve	Tensile Strength, g/mm ²	Elongation at break, %	Swelling Index ^{a)} , in 1M AcOH	Trypsin Digestion Times, ^{b)} Hr.
Untreated	30	Opaque	Permeable to hemoglobin	Almost linear	160-220	210-260	Dissolves	0.5
Glycerol-	43	Trans-parent	Impermeable to hemoglobin	slight curvature	150-180	330-350	24	24
steam-sterilized	57	Trans-parent	Impermeable to hemoglobin permeable to diglycime	S-shaped	500	230	3.9	26

a) Weight of swollen gel divided by weight of fibrin

b) Films with 14 mg. per sq. cm. of fibrin is a 1% solution of commercial trypsin (Cenco) at 37°C

われわれが、Fibrin 薄膜の製造に使用した Fibrinogen は20%の β -Globulin を含んでいる。この非 Fibrinogen 成分が、どの程度抗張力、伸張度に影響を及ぼすか不明である。

今後検討したい。

結 論

人血漿 Fibrinogen 溶液に Thrombin(ヒト)を作用させ、Fibrin 薄膜を製する方法として Ferry-Morrison 法を選び、これに多少検討を加え、更に製された薄膜の性状を調べたところ次の結果を得た。

1) 用いる Fibrinogen 溶液の Fibrinogen 濃度を 1.5~2% とし Thrombin の作用 pH を可能な限り 6.0 に近づけた場合最も良好な薄膜を得る。Thrombin の作用量は最終的に 1 単位/ml で充分である。

2) 水で平衡化した膜の断裂点に至るまでの伸びと引っぱり力の関係を図示するとき Sigmoid 曲線が得られる。

3) 薄膜の無菌性及び肝炎ウイルス殺滅のために、高圧蒸気滅菌 (121°C-20分間) を行なつたが、滅菌の操作によつて、薄膜の伸張度は約 80% 低下し、抗張力は約 150% 増強する。

4) 滅菌前の膜の含湿度は膜の性状、少なくとも伸張度、抗張力に対して影響を及ぼす。含湿度が大であれば、膜の外観が劣るし、平衡化しても灰白色不透明となる。滅菌前の含湿度は、膜が内蔵されるアンプル容量、その他によつて滅菌効果と膜に与える影響を考慮して定めるべきである。

5) われわれが反復試験製造した薄膜は抗張力、伸張度を除く、他の諸性状において充分にアメリカ公衆

衛生局の定める基準を満足する。

6) 抗張力の大きな膜を得るためには、膜厚が薄く、膨潤度の低い高フィブリン含量膜を製し、伸張度の大きな膜を得るには膜厚の大きな膨潤度の高い低フィブリン含量膜を製すれば良いと思われる。

7) 抗張力、伸張度を同時に高めることは、これらが相殺的性状であるため困難と考える。

以上であるが本薄膜が実用に供し得るかどうかは臨床試験の結果を待たねばならない。

終りに本研究に関し東京大学医学部平井秀松助教授の御助言を賜つたことを深謝いたします。

文 献

- 1) Ferry, J. D. and Morrison, P. R. ; Chemical, clinical and immunological studies on the products of human plasma fractionation. XVI. Fibrin clots, fibrin film, and fibrinogen Plastics. J. Clin. Invest. **23** ; 566-72 (1944).
- 2) Ferry, J. D., and Morrison, P. R. ; Fibrin film and other products from human plasma. Ind. Eng. Chem., Ind. ed. **38** ; 1217-21 (1946).
- 3) Bailey, O. T., and Ingraham, F. D. ; Chemical, clinical and immunological studies on the products of human plasma fractionation. XXII. Fibrin films in neurosurgery, with special reference to their use in the repair of dural defects and in the prevention of meningocerebral adhesions. J. Clin. Invest. **23** ; 597-600 (1944).
- 4) Tarlov, I. M. ; Autologous plasma clot suture of nerves, its use in clinical surgery. J. Am. Med. Assoc. **126** ; 741-8 (1944).
- 5) Tarlov, I. M., and Benjamin, B. ; Plasma clot and silk suture of comparative tissue reaction. Surg. Gynecol. Obstet. **76** ; 366-74 (1943).

- 6) Tarlov, I. M., and Boernstein, W. ; Nerve regeneration; Comparative experimental study following suture by clot and thread. *J. Neurosurg.* **5** ; 62~83 (1918).
- 7) Singer, M. ; Combinend use of nerves experimental studies. *J. Neurosurg.* **2** ;102-5 (1945)
- 8) 西 重敬：プラズマ膜に関する研究. *医学研究* **30** ; 1130-51 (1960).
- 9) Cohn, E. J., Strong, L. E., Hughes, Jr., W. L., Melford, D. J., Ashwoth, J. N. Melin, M., and Taylor, H. L. ; Preparation and properties of serum and plasma proteins. IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J. Am. Chem. Soc.* **68** ; 459-75 (1946)
- 10) Blombäck, B., and Blombäck, M. ; Purification of human and bovine fibrinogen. *Arkiv Kemi* **10** ; 415-43 (1956)
- 11) Seegers, W. H., and Smith, H. P. ; Factors which influence the activity of purified thrombin. *Am. J. Physiol.* **137** ; 348-54 (1942).
- 12) U. S. Dept. of Health, Education and Welfare, Public Health Service, National Institutes of Health ; Minimum requirements for fibrin film, human (1945)
- 13) Macfarlane, R. G. ; The blood coagulation system. The plasma proteins, edited by F. W. Putnam, Vol. **2**. New York ; Academic Press, 1960 137pp.
- 14) U. S. Dept. of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, National Institutes of Health ; Minimum requirements for dried thrombin (1946).
- 15) Porter, J. E., Shapiro, M., Maltby, G. L., Darke, M. E., Barondess, J. A., Bashe, Jr., W. J., Stokes, Jr., J., Oliphant, J. W., Diefenbach, W. C. L., Murray, R., and Leone, N. C. ; Human thrombin as vehicle of in homologous serum hepatitis. *J. Am. Med. Assoc.* **153** ; 17-9 (1953).