

学 位 論 文 題 名

Cyclosporin A の創傷治癒に与える影響に関する基礎的検討

学位論文内容の要旨

I はじめに

各種の外科手術における創傷治癒は重要な課題であるが、とくに移植手術では移植組織片の生着不全を防止することが最優先である。移植手術では免疫抑制剤が投与されるが、免疫抑制が創傷治癒に与える影響については十分に検討されていない。本研究では carrageenan, 抗-asialo GM 1 抗体, Cyclosporin A（以下 CSA）を投与し創傷治癒過程に与える影響について検討した。

II 材料と方法

1. 実験動物

使用動物は体重20から22 g の C57 BL/6 マウス, 6 週齢から10週齢の雌を用い創傷を作製（作創）した。創傷治癒の評価は, 創抗張力と創局所に折出する hydroxyproline（以下 OHP）の定量および組織像を用いた。

2. 免疫抑制の方法

1) carrageenan の投与

macrophage（以下 Mφ）を抑制する目的で, carrageenan を投与した。A 群（8 匹）には carrageenan 10mg/kg を作創の 4 日前, 1 日前, 1 日後, 4 日後に腹腔内投与し, B 群（8 匹）はコントロール群として生理食塩水 0.2ml/body を同様に投与した。

2) 抗-asialo GM 1 抗体の投与

natural killer cell（以下 NK 細胞）を抑制する目的で, 抗-asialo GM 1 抗体を投与した。A 群（8 匹）は抗-asialo GM 1 抗体 10mg/kg を作創の 4 日前, 1 日前, 1 日後, 4 日後に腹腔内投与し, B 群（8 匹）はコントロール群として生理食塩水 0.2ml/body を同様に投与した。

3) CSA の投与

a) CSA 投与量の検討: T helper lymphocyte (以下 helper T 細胞) 機能を抑制する目的で CSA を投与した。CSA は原末を98%エタノールで溶解後 Intralipos で希釈した。以下の4群に分け、A群(8匹)は CSA1.0mg/kg を作創の4日前、1日前、1日後、4日後に腹腔内投与した。B群(8匹)は CSA10.0mg/kg, C群(8匹)は CSA100.0mg/kg を同様に投与した。D群(8匹)はコントロール群として Intralipos0.2ml/body を同様に投与した。

b) CSA 連日投与の検討: 以下の4群に分けた。A群(10匹), B群(10匹)は CSA40.0mg/kg を作創の7日前から14日後まで連日腹腔内投与し、C群(10匹), D群(10匹)は Intralipos0.2ml/body を同様に投与した。2週目にA群, C群では新鮮皮膚引っ張り試験を、B群, D群では10%formalin に72時間固定後に引っ張り試験を行った。

c) TGF- β 投与の影響: 以下の4群に分け、A群(10匹), B群(10匹)は CSA40.0mg/kg を作創の7日前から14日後まで連日腹腔内投与した。C群(10匹), D群(10匹)は Intralipos0.2ml/body を同様に投与した。更に作創3日後に、A群, C群には TGF- β 2.5 μ g/kg, B群, D群には生理食塩水0.2ml/kg を創局所に投与した。

3. 作創

作創はエーテル麻酔下に背部皮膚を剃毛した後、皮膚組織に達する約4cmの縦切開をおいた。創上端に皮下ポケットを作成し、OHP を測定する目的で20mgの polyvinyl alcohol sponge を挿入後、ミハエル針にて縫合閉鎖した。抜糸は作創後1週目に行った。

4. 創抗張力の測定

2週目あるいは3週目に犠牲死させ、創を中心に皮膚を巾2cm長さ4cm採取し、両端を4×2cmのサンドペーパーとアロンアルファで固定しダンベル型とした。その後、島津 autograph SD 形にて皮膚引っ張り試験を行い創抗張力を測定した。

5. OHP の定料

20mg sponge 中に含まれる OHP 量を Woessner 法を用いて測定した。

6. 組織学的検討

2週目、3週目において hematoxyline -eosine 染色(以下 H. E. 染色)および masson trichrome 染色によって組織学的検討を加えた。

7. 統計学的処理

統計学的処理は Student t - test を用い危険率5%以下を有意とした。

Ⅲ 結 果

1. carrageenan 投与群

創抗張力は、A群では2週目 634 ± 89 g (mean $\pm$ S. E.), 3週目 748 ± 82 g, B群では、2週目 976 ± 46 g, 3週目 1225 ± 104 gであり、A群はB群に比較して2週目、3週目ともに有意に創抗張力が低下していた ($P < 0.05$)。OHP量はA群では2週目 $188 \pm 33 \mu$ g, 3週目 $221 \pm 34 \mu$ g, B群では2週目 $166 \pm 34 \mu$ g, 3週目 $272 \pm 34 \mu$ gであり、A群、B群間に差はなかった。

2. 抗-asialo GM1 抗体投与群

創抗張力は、A群では2週目 928 ± 87 g, 3週目 1017 ± 81 g, B群では2週目 976 ± 46 g, 3週目 1225 ± 104 gであり、A群とB群の間に有意差は認められなかった。OHP量は、A群では2週目平均 $182 \pm 47 \mu$ g, 3週目 $278 \pm 17 \mu$ g, B群では2週目平均 $166 \pm 34 \mu$ g, 3週目 $272 \pm 34 \mu$ gであり、A群B群間に差はなかった。

3. CSA 投与群

1) CSA 投与量の検討

創抗張力は、A群では2週目 911 ± 59 g, 3週目 815 ± 74 g, B群では2週目 594 ± 74 g, 3週目 808 ± 47 g, C群では2週目平均 682 ± 69 g, 3週目 799 ± 63 g, D群では2週目平均 829 ± 56 g, 3週目 826 ± 89 gであった。2週目においてB群とD群、C群とD群の間には統計学的有意差を認めた ($P < 0.05$)。しかし2週目ではA群とD群、B群とC群との間、また3週目には各群間に有意差はなかった。OHP量は、A群では2週目 $233 \pm 21 \mu$ g, 3週目 $313 \pm 23 \mu$ g, B群では2週目 $269 \pm 37 \mu$ g, 3週目 $313 \pm 34 \mu$ g, C群では2週目 $253 \pm 43 \mu$ g, 3週目 $334 \pm 34 \mu$ g, D群では2週目 $200 \pm 16 \mu$ g, 3週目 $331 \pm 35 \mu$ gであった。A群、B群、C群、D群間に有意差はなかった。CSA投与群はコントロール群と比較して、2週目ではH. E. 染色, masson trichrome 染色ともに、上皮化の程度、皮下組織の厚さの差を認めなかった。3週目では両群ともに皮下組織が薄くなっていたが、H. E. 染色, masson trichrome 染色でも差を認めなかった。

2) CSA 連日投与の検討

創抗張力はA群 658 ± 40 g, B群 1969 ± 177 g, C群 853 ± 72 g, D群 1930 ± 57 gであり、A群は、C群に比較して有意に創抗張力が減弱していた ($P < 0.05$)。B群はD群との間に差がなかった。

3) TGF- β 投与による創傷治癒の回復効果

A群 732 ± 44 g, B群 578 ± 31 g, C群 773 ± 76 g, D群 759 ± 57 gであり, B群はA群に比較して創抗張力が有意に減弱していた。(P<0.05)。A群はD群に比較して, C群はD群に比較して差はなかった。

IV 考 察

移植手術における創傷治癒の評価には, 創抗張力の比較が総合的評価として最適と考え, 最も単純で, 正確な定量化の可能な組織片の引っ張り試験を採用した。創傷治癒の過程で産生された膠原線維が再形成をへて完成に向かい, 創抗張力が増すと考えられ, その生化学的指標としてOHPを定量した。創抗張力の測定, OHPの定量は, 膠原線維の量的質的变化の最も著しい2週目および3週目に行なった。本研究からMφは膠原線維量に影響を与えずに, 創抗張力を増加させている可能性が示された。またNK細胞は, 創傷治癒過程において創抗張力には影響を与えていないことが示された。10.0mg/kg以上のCSA投与により創抗張力は減弱すること, 減弱の程度はCSAの投与量には依存しないことが示された。また組織学的に差がなく, OHP量にも差がないことから, 創抗張力の減弱には膠原線維の総量は関与しないことが示された。新鮮皮膚抗張力はCSA投与群で有意に減弱したが, formalin固定後の抗張力測定では差がなく, 膠原線維の架橋結合の変化が関与していると推測された。またTGF- β は正常の創傷治癒は促進させないが, CSA投与により減弱した創抗張力を回復させることが示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 邊 達 三

副 査 教 授 小 柳 知 彦

副 査 教 授 大 浦 武 彦

移植手術において各種の免疫抑制剤が投与されるが, 免疫抑制が臓器生着など創傷治癒に与える影響については十分に検討されていない。本研究では免疫抑制の創傷治癒過程に与える影響について基礎的検討を行った。

実験方法はC57BL/6マウス(6~10週齢)雌を用い創傷を作製(作創)した。創傷治癒の評価は, 2週目3週目に創抗張力とhydroxyproline(以下OHP)の測定および組織像(H. E.

染色, masson trichrome 染色)を用いた。免疫抑制状態として 1) carrageenan の投与; A 群 (8 匹) は macrophage を抑制する目的で carrageenan 10mg/kg を, B 群 (8 匹) は対象群として生食 10ml/kg を作創の 4 日前, 1 日前, 1 日後, 4 日後に腹腔内投与した。2) 抗-asialo GM 1 抗体の投与; A 群 (8 匹) は natural killer cell (以下 NK 細胞) を抑制する目的で抗-asialo GM 1 抗体 10mg/kg を, B 群 (8 匹) は対象群として生食 10ml/kg を 1) と同様に投与した。3) CSA の投与; a) T helper lymphocyte 機能を抑制する目的で CSA を投与した。A 群 (8 匹) は CSA 1.0mg/kg を, B 群 (8 匹) は CSA 10.0mg/kg, C 群 (8 匹) は CSA 100.0mg/kg を D 群 (8 匹) は対象群として Intralipos 10ml/kg を 1) 2) と同様に投与した。b) CSA 連日投与の検討: A 群 (10 匹), B 群 (10 匹) は CSA 40.0mg/kg を作創の 7 日前から 14 日後まで連日腹腔内投与し, C 群 (10 匹), D 群 (10 匹) は Intralipos 10.0ml/body を同様に投与した。2 週目に A 群, C 群では新鮮皮膚を用いて, B 群, D 群では 10% formalin に 72 時間固定後の皮膚を用いて創抗張力を測定した。c) TGF- β 投与の影響: A 群 (10 匹), B 群 (10 匹) は CSA 40.0mg/kg を, C 群 (10 匹), D 群 (10 匹) は Intralipos 10.0ml/kg を b) と同様に投与した。更に作創 3 日後, A 群 C 群には TGF- β 2.5 μ g/kg, B 群 D 群には生理食塩水 0.2ml/kg を創局所に投与した。作創はエーテル麻酔下に, 皮下組織に達する約 4 cm の縦切開とし, 創上端に皮下ポケットを作成し 20mg の polyvinyl alcohol sponge を挿入後, ミハエル針にて縫合閉鎖し, 1 週間後に抜糸した。創を中心に巾 2 cm 長さ 4 cm の皮膚片を採取し両端をサンドペーパーで固定しダンベル型とし, 島津 autograph SD 型にて皮膚引っ張り試験を行ない創抗張力を測定した。sponge 中に含まれる OHP 量は Woessner 法を用いて測定した。統計学的処理は Student t - test を用い危険率 5 % 未満を有意とした。

結果は, 1) carrageenan 投与での創抗張力は, A 群では 2 週目 634 ± 89 g, 3 週目 748 ± 82 g, B 群では 2 週目 976 ± 46 g, 3 週目 1225 ± 104 g で, A 群は B 群に比較して 2 週目, 3 週目ともに有意に創抗張力が減弱していた ($P < 0.05$)。OHP 量は A 群 B 群間で差はなかった。2) 抗-asialo GM 1 抗体の投与では創抗張力, OHP 量に差はなかった。3) CSA 投与群では, a) 創抗張力が, A 群では 2 週目 911 ± 59 g, 3 週目 815 ± 74 g, B 群では 2 週目 594 ± 74 g, 3 週目 808 ± 47 g, C 群では 2 週目平均 682 ± 69 g, 3 週目 799 ± 63 g, D 群では 2 週目 829 ± 56 g, 3 週目 826 ± 89 g であり, 2 週目の B 群と D 群, C 群と D 群の間に有意差を認めた ($P < 0.05$)。A 群と D 群との間, B 群と C 群との間, 3 週目では各群間に有意差は認めなかった。OHP 量は各群間に差を認めなかった。組織学的には CSA 投与群は対象群と比較して, 2 週目 3 週目ともに上皮化の程度, 皮下組織の厚さに差を認めなかった。b) CSA 連日投与の検討では, 創抗張

力はA群 658 ± 40 g, B群 1969 ± 177 g, C群 853 ± 72 g, D群 1930 ± 57 gであり, A群はC群に比較して有意に創抗張力が減弱していた ($P < 0.05$)。B群はD群との間に差がなかった。c) TGF- β 投与による影響は, A群 732 ± 44 g, B群 578 ± 31 g, C群 773 ± 76 g, D群 759 ± 57 gであり, B群はA群に比較して創抗張力が有意に減弱していた ($P < 0.05$)。

本研究から以下の結論を得た。1. macrophage は膠原線維量に影響を与えずに, 創抗張力を増加させている可能性がある。2. natural killer 細胞は, 創傷治癒過程において果たす役割は小さい。3. 10.0mg/kg以上のCSA投与により創抗張力は減弱するが, 減弱の程度はCSAの投与量には依存しない。また組織所見, OHP量に差がないことから, 創抗張力の減弱には膠原線維の総量は関与しない。新鮮皮膚抗張力はCSA投与群で有意に減弱したが, formalin固定後の抗張力測定では差がなく, 膠原線維の架橋結合の変化が関与していると推測された。またTGF- β はCSA投与により減弱した創抗張力を回復させることが示された。

口頭発表において小柳教授よりCSA投与量, 投与方法, 評価時期, 大浦教授より抗張力の測定方法, TGF- β の投与方法, 皆川教授より実験方法などに就いて質問があったが, 申請者はおおむね妥当な回答を行った。また小柳, 大浦両教授には個別に審査を受け合格と判定された。

肺移植など創傷治癒について臓器生着と免疫抑制に詳細な検討を加えた本研究は, 臨床的意義が少なくなく, 学位授与に値すると考えられる。