

博士(医学) 南本俊之

学位論文題名

人工真皮内の血管内皮細胞と筋線維芽細胞が
創傷治癒に及ぼす影響に関する実験的研究

学位論文内容の要旨

緒 言

人工真皮は様々な創面に対し、良好な遊離植皮の移植床を得るために開発された。これはコラーゲンを主成分としたスponジであり、侵入する線維芽細胞や炎症細胞、血管内皮細胞による分解と自己の細胞外マトリックス産生により肉芽様組織へと変化する。

人工真皮の生着には血管新生が必要であり、あらかじめ血管成分を播種しておくことで、血管新生が促進されるものと推測される。また、血管内皮細胞や筋線維芽細胞はIL-1, bFGF, TGF- β を産生しており、これらの作用で良好な肉芽組織を形成するものと推測される。

本研究では、血管内皮細胞および筋線維芽細胞の人工真皮中での増殖動態を検討し、これらの細胞が産生する増殖因子やサイトカインの定量測定を行った。更に細胞を組み込んだ人工真皮の創傷治癒に及ぼす影響を病理組織学的に検討し解析を加えた。

材料と方法

1. 実験動物：実験には体重300～450gのWistar系STDの雄性ラットを使用した。
2. 細胞採取と培養：血管内皮細胞と筋線維芽細胞はラットの精巣上脂肪体より採取した。
3. 細胞の同定：採取した細胞をアセチル化低比重リポ蛋白(DiI-Ac-LDL)と抗ヒト α アクチノクローナル抗体を用いて同定した。
4. 人工真皮：人工真皮は、内層のコラーゲンスponジと外層のシリコンシートの2層構造であり、内層は0.3%のアテロ化豚臍由来I型コラーゲンに熱架橋と化学架橋を加え、再凍結乾燥処理を施している。外層は水蒸気透過性が正常皮膚のそれとほぼ等しくなっている。
5. 血管内皮細胞と筋線維芽細胞の人工真皮内での培養：血管内皮細胞と筋線維芽細胞の合計 1×10^6 個を人工真皮に播種し、播種後1, 2, 4, 7日目に、人工真皮を溶解して細胞の総数を計測した。人工真皮にH.E.染色を行い、人工真皮内の細胞を組織学的に観察した。
6. 人工真皮内の血管内皮細胞と筋線維芽細胞が産生する細胞増殖因子とサイトカインの測定：細胞の合計 1×10^6 個を人工真皮に播種し、播種後4日目に人工真皮に浸透している培地を回収し、この培地中に含まれるIL-1 α , IL-1 β , bFGF, TGF- β をELISAで測定した。細胞を播種した群（細胞播種群）と対照群を作成し比較、検討した。
7. 肉芽様組織に侵入する毛細血管の形状と面積比の検討：細胞を播種した人工真皮を、播種後4日目に、ラットの背部に作成した皮膚全層欠損創に移植した。移植後14日目に肉芽様組織に変化した人工真皮を採取し、肉様膜から表面に至るまでの組織学的検索と、同一平面上を通過する毛細血管の形状と面積比を検討した。細胞を播種した群（細胞播種群）と対照群を作成し比較、検討した。

結 果

1. 細胞の培養と同定：細胞の混合成分中に、培養5日目ごろから管腔形成を始める細胞を認めた。DiI-Ac-LDL染色で赤色に蛍光を発する細胞を、また、抗ヒト α アクチノクローナル抗体を用いて同定した。

ナル抗体染色では緑色に蛍光を発する線維を胞体内に含む細胞を認めた。前者により血管内皮細胞が、後者により筋線維芽細胞の存在が確認された。

2. 血管内皮細胞と筋線維芽細胞の人工真皮内での培養：人工真皮に播種した細胞の総数は、1日目： 6.04×10^5 個、2日目： 6.21×10^5 個、4日目： 9.02×10^5 個、7日目： 1.45×10^6 個であった。組織標本では、人工真皮の線維に付着した細胞を確認し、これらの細胞が人工真皮内で増殖可能であることが示された。

3. 人工真皮内の血管内皮細胞と筋線維芽細胞が産生する細胞増殖因子とサイトカインの測定：IL-1 α とIL-1 β は両群ともキットの検出感度以下であった。bFGFは細胞播種群で 10.3 pg/ml 、対照群は検出感度以下であり、両者間には有意差が認められた。TGF- β_1 は細胞播種群で 1115.7 pg/ml 、対照群は 680.2 pg/ml であり、両者間には有意差が認められた。

4. 肉芽様組織の組織像と侵入した毛細血管の形状と面積比の検討：細胞播種群の上層では、強い炎症所見がみられ、小型円形の毛細血管を多数認めた。下層でも炎症所見は強いが、炎症細胞は減少し、線維芽細胞の侵入が多数認められた。毛細血管は上層より太く、同一の毛細血管が横走している所見を随所に認めた。対照群では上層と下層の両者とも細胞播種群よりも炎症細胞の浸潤は少なく、緩やかな炎症所見を示していた。肉芽様組織に置換された人工真皮の上層と下層の毛細血管の占める割合は、細胞播種群上層： 5.81% 、下層： 10.39% 、対照群上層： 4.52% 、下層： 5.12% であり、両群間の上層では有意差は認められなかつたが、下層では有意差を認めた。

考 察

1. 細胞を播種した人工臓器としての人工真皮：人工真皮の生着には線維芽細胞や血管内皮細胞の侵入が重要であり、あらかじめ血管成分を播種しておくことにより早期の血管新生が期待できると考えられる。また、人工真皮に血管内皮細胞と筋線維芽細胞を播種することにより、これらの細胞から産生される細胞増殖因子やサイトカインが直接、間接に創面に作用し、より生理的に近い経過で創傷治癒を促すことができると推測される。

2. 創傷治癒におけるサイトカイン・細胞増殖因子の役割：熱傷創面や採皮創の滲出液中にPDGF、IL-6、TGF α などの細胞増殖因子やサイトカインが多く含まれている。糖尿病マウスや圧挫創にbFGFを局所投与することで肉芽組織が増加し、上皮化により創面の縮小がはかれたとされる。また、糖尿病ラットの創面にPDGFを塗布し、良好な肉芽が形成される。TGF- β_1 投与により創傷治癒は促進される。

3. 細胞が産生しているサイトカイン・細胞増殖因子と病理組織学所見の解析：本研究において、細胞を播種した人工真皮は、対照群より強い炎症所見を示し、より多くの毛細血管を誘導している所見が得られた。血管内皮細胞や筋線維芽細胞が産生するbFGFやTGF- β_1 などの増殖因子が一次的に作用するとともに、TGF- β_1 により誘導されたマクロファージが炎症を増強し、二次的に毛細血管を誘導したものと推測された。

4. 血管内皮細胞と筋線維芽細胞を播種した人工真皮の応用：細胞播種型人工真皮は炎症所見が強かったが、毛細血管の侵入が著しく遊離植皮の移植床として良好な状態が得られたと考えた。今後、細胞増殖因子やサイトカインに対する抗体を組み合わせることにより、より生理的に近い人工真皮の開発が可能になると思われた。

結 語

血管内皮細胞と筋線維芽細胞は人工真皮内で増殖可能であり、bFGFとTGF- β_1 を産生していることが確認された。これらの増殖因子により、この細胞播種型人工真皮は強い炎症反応を示したが、より多くの毛細血管を誘導していることが確認された。

学位論文審査の要旨

主　查　教　授　杉　原　平　樹

副　查　教　授　吉　木　敬

副　查　教　授　加　藤　絢　之

学　位　論　文　題　名

人工真皮内の血管内皮細胞と筋線維芽細胞が 創傷治癒に及ぼす影響に関する実験的研究

人工真皮は様々な創面に対し、良好な遊離植皮の移植床を得るために開発された。人工真皮の生着には血管新生が必要であり、あらかじめ血管成分を播種しておくことで、血管新生が促進されるものと推測される。また、血管内皮細胞や筋線維芽細胞はIL-1、bFGF、TGF- β を産生しており、これらの作用で良好な肉芽組織を形成するものと推測される。

本研究は、血管内皮細胞と筋線維芽細胞の人工真皮内での増殖動態を検討し、これらの細胞が産生する細胞増殖因子やサイトカインの定量解析を行い、更に細胞を組み込んだ人工真皮が創傷治癒に及ぼす影響を病理組織学的に解析を加えたものである。

人工真皮は、2層構造をなしており、内層が0.3%のアテロ化豚臍由来I型コラーゲンスポンジ、外層が150 μm のシリコーンシートとなっている。

血管内皮細胞と筋線維芽細胞はWistar系SDの雄性ラットの精巣上脂肪体より採取し、アセチル化低比重リポ蛋白と抗ヒト α アクチンモノクローナル抗体を用いて同定した。

血管内皮細胞と筋線維芽細胞の合計 1×10^6 個を人工真皮に播種し、播種後1・2・4・7日目に人工真皮を溶解し、細胞総数の計測を行うとともに、人工真皮にH.E.染色を施し、その中の細胞を組織学的に観察した。

また、細胞の合計 1×10^6 個を人工真皮に播種し、播種後4日目に人工真皮に浸透している培地に含まれるIL-1 α ・IL-1 β ・bFGF・TGF- β_1 をELISAで測定した。細胞を含まない培地を用いて対照群とした。

さらに、細胞を播種した人工真皮を、播種後4日目にラットの皮膚全層欠損創に移植し、移植後14日目に組織学的検索・毛細血管の形状と面積比に関する解析を行った。細胞を含

まない培地のみを浸透させた人工真皮を用いて対照群とした。

人工真皮から回収した細胞の総数は1日目： 6.04×10^5 個、2日目： 6.21×10^5 個、4日目： 9.02×10^5 個、7日目： 1.45×10^6 個であり、組織標本において、人工真皮に付着した細胞を確認した。これらの細胞が人工真皮内で増殖可能であることが示された。

IL-1 α ・IL-1 β は細胞播種群・対照群ともに検出感度以下であった。bFGFは細胞播種群で 10.3 pg/ml 、対照群は検出感度以下であり両群間には有意差が認められた。TGF- β_1 は細胞播種群で 1115.7 pg/ml 、対照群で 680.2 pg/ml であり、両群間には有意差が認められた。細胞播種群の上層では、炎症細胞の浸潤と小円形の毛細血管を多数認め、下層では線維芽細胞の浸潤と太い毛細血管新生を隨所に認めた。対照群では、上層・下層のいずれも細胞播種群より細胞浸潤が少なく、血管新生も少なかった。人工真皮に新生している毛細血管の面積比は、細胞播種群上層：5.81%、下層：10.39%、対照群上層：4.52%、下層：5.12%であり、両群間の上層では有意差は認められなかつたが、下層では有意差を認めた。公開発表に際し、副査の吉木教授より、1)細胞外基質と血管内皮細胞に関する知見、2)播種細胞の濃度設定に関する知見、3)in vivoにおける播種細胞の詳細、4)同種移植系の応用に関する知見について質問があり、次いで、副査の加藤教授より、1)良好な移植床としての肉芽様組織に関する詳細、2)IL-1 α ・IL-1 β の産生に関する知見、3)肉芽様組織の上層・下層の差異ならびに経時変化に関する知見の詳細、4)動物種の差異による創傷治癒に関する知見について質問があった。安田（慶）教授より、1)細胞外基質の差異と創傷治癒の関連、2)実験に用いた細胞に関する詳細、3)細胞増殖因子の創傷治癒に及ぼす影響に関する知見について質問があった。また、主査の杉原より、人工真皮内の細胞の同定に関する詳細について質問があった。申請者は最新の情報をまじえ概ね適切な解答をなし得た。以上の研究は、細胞播種型人工真皮の作成とそれが創傷治癒に及ぼす影響を解明した貴重な研究であり、審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位などと併せ、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。