

学位論文題名

キチン・キトサンの創傷治癒促進機構の解析に関する研究

学位論文内容の要旨

キチン・キトサンは創傷被覆材として医療および獣医療において製剤化され、その有効性は臨床的に広く認識されている。キチン・キトサンを創傷被覆材として用いた場合の特徴として、血管新生の豊富な肉芽組織の増生および感染抵抗性がまず挙げられる。しかしその作用機序の詳細についてはほとんど解明されていない。そこで本研究では線維芽細胞、血管内皮細胞およびマクロファージなどの創傷治癒において重要な役割を担っている細胞に及ぼす、キチン・キトサンの直接的作用について主に検討した。

まず、キチンおよびその誘導体のL929マウス線維芽細胞に対する増殖活性およびマウスまたはラット正常皮膚線維芽細胞に対するサイトカイン誘導能について検討した。

In vitro における増殖活性の実験に際しては、ウシ胎児血清 (FBS) 中に存在する酵素によって供試物質が分解あるいは修飾を受ける可能性があるため、10%ウシ胎児血清加 Eagle's MEM (E-MEM) 培養液およびASF-301 無血清培養液 (ASF) を用いて実験を行い比較した。その結果グルコサミンの500 $\mu\text{g/ml}$ 添加により10%FBS加E-MEMおよびASFの両方で、またキトサンの500 $\mu\text{g/ml}$ 添加により10%FBS加E-MEMで有意に増殖を抑制したが、有意な増殖の促進はすべての供試物質(キチン、キトサン、37%および80%脱アセチル化キチン、低分子化キトサン、N-アセチルキトヘキソース、キトサンヘキサマー、N-アセチル-D-グルコサミンおよびD-グルコサミン)で観察されなかった。

サイトカイン産生誘導能についてはすべての供試物質にてinterleukin (IL)-1 α 、IL-1 β 、IL-6およびtumor necrosis factor (TNF)- α の産生誘導は認められなかった。IL-8はすべての供試物質の50 $\mu\text{g/ml}$ 添加により対照の約2倍以上の産生誘導能が観察された。

次に、キチンおよびその誘導体のヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) に対する増殖活性およびサイトカイン誘導能について検討した。

増殖活性についてはすべての供試物質(キチン、キトサン、低分子化キトサン、N-

アセチル-D-グルコサミンおよびD-グルコサミン)にて有意な変化を認めなかった。

サイトカイン誘導能については、キトサン 500 μ g/ml 添加によって、IL-6 と TNF- α の産生を誘導した。またすべての供試物質にて IL-8 の産生を誘導した。

最後に、キチン・キトサンの創傷治癒促進作用はマクロファージの活性化を介しているのではないかと考え、キチン・キトサンのマクロファージに対する作用について検討した。

BALB/c マウス腹腔マクロファージ(PM)をキチンおよびその誘導体を添加して培養したところ、キトサンのみでマクロファージのスライドガラスへの付着性が低下した。この付着性の低下は、アネキシンVを用いたフローサイトメトリーによる解析で、細胞がアポトーシスを起こすためと考えられた。MRL-lpr/lpr および MRL+/+ マウス PM を用いた実験では、MRL+/+ マウス PM に比較して MRL-lpr/lpr マウス PM で付着性が低下せず、ヨウ化プロピジウム陽性細胞率も減少した。表面抗原については、キトサンの添加により Fc レセプター、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラス I および II、マンノースレセプター、Fas および トランスフェリンレセプターの発現が増加した。キチンでは MHC クラス I および II、低分子化キトサンでは MHC クラス II の発現が増加した。Macrophage inflammatory protein (MIP)-2 産生誘導能については、キトサンのみでコントロールの約 2 倍の産生が観察された。一酸化窒素産生は常在 PM ではすべての供試物質で検出限界以下であったが、チオグリコレート誘導 PM ではキトサン 50 μ g/ml 添加によって対照の約 2 倍の産生が観察された。

本研究の結果、キチン・キトサンは線維芽細胞および血管内皮細胞の増殖性には直接影響を及ぼさないものの、それらの細胞からの IL-8 の分泌を誘導することにより、好中球の集簇、血管新生あるいは表皮細胞の増殖促進作用を表すものと考えられた。さらに、キトサンは PM に対してアポトーシスを誘導し、Fas の発現増強および Fas 異常マウスである MRL-lpr/lpr マウス PM の細胞死が減少したことから、アポトーシス誘導は Fas-Fas リガンドシステムによるものであり、急激な活性化を抑制するためではないかと思われた。キトサンはマクロファージに対して各種表面抗原の増強、MIP-2 の産生を誘導したことから、貪食能の増強、T 細胞の活性化、好中球の集簇、表皮細胞の増殖促進などの作用を介して創傷治癒に関与していると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 永 徹
副 査 教 授 斉 藤 昌 之
副 査 教 授 梅 村 孝 司
副 査 教 授 上 出 利 光 (免疫研)

学 位 論 文 題 名

キチン・キトサンの創傷治癒促進機構の解析に関する研究

キチン・キトサンは、創傷被覆材として製剤化され、その有効性は広く認識されている。キチン・キトサンを用いた場合の特徴として、血管新生の豊富な肉芽組織の増生および感染抵抗性が挙げられる。しかしその作用機序の詳細についてはほとんど解明されていない。申請者は線維芽細胞、血管内皮細胞およびマクロファージなどの創傷治癒において重要な細胞に及ぼす、キチン・キトサンの直接的作用について検討し、次のような結果を明らかにした。

まず、キチンおよびその誘導体の線維芽細胞に対する増殖活性、およびサイトカイン誘導能について検討し、線維芽細胞に対して増殖活性を持たないこと、およびインターロイキン (IL)-8 産生誘導能を持つことを明らかにした。

次に、キチンおよびその誘導体の血管内皮細胞に対する増殖活性およびサイトカイン誘導能について検討した。その結果、線維芽細胞と同様に血管内皮細胞に対しても増殖活性を示さず、サイトカイン誘導能については、キトサンがIL-6と腫瘍壊死因子- α の産生誘導能を持つこと、またすべての供試物質がIL-8の産生誘導能を持つことを明らかにした。

最後に、キチン・キトサンのマウス腹腔マクロファージ(PM)に対する作用について検討した。その結果、キトサンはPMに対して、Fcレセプター、主要組織適合遺伝子複合体クラス I (H-2D^d) および II (I-A^d)、マンノースレセプター、トランスフェリンレセプター、およびFasの発現の増強、IL-8スーパーファミリーに属するMIP-2の産生誘導、およびFas-Fasリガンドシステムによるアポトーシスを誘導することを明らかにした。

以上のように申請者は、キチン・キトサンの創傷治癒促進効果はIL-8およびマクロファージの活性化を介している可能性が高いことを明らかにし、キチン・キトサンの創傷治癒促進効果の機序の解明に貢献した。よって審査員一同は、森 崇氏が博士(獣医学)の学位を授与される資格を有するものと認めた。