

学 位 論 文 題 名

キトサンによる創傷治癒促進の機構解析

学位論文内容の要旨

キトサンは創傷被覆材として獣医療において臨床応用され、その有効性は広く知られている。キトサン適応時の特徴として肉芽形成の促進および感染抵抗性が挙げられる。しかし、その詳細な作用機序については解明されていない。そこで本研究では、肉芽形成促進の作用機序の解明を目的として、以下の研究を行った。

第1章では、キトサンの皮膚創傷治癒促進効果を検索するため、イヌ背部皮膚に実験的欠損創を作成し、キトサン散布による創作成後15日間における組織学的変化を客観的に評価するとともに、コラーゲンをタイピングして対照群と比較検討した。

組織学的所見では、キトサン散布により創作成後3日目に表層部への多形核白血球(PMN)の重度浸潤および滲出液の増量を示唆する浮腫性の組織像が認められた。マクロファージの出現は3日目から認められ、キトサンを貪食した異物巨細胞が観察された。細胞分裂像は、3日目では対照群で多く認められたが、6日目ではキトサン群でより多く認められた。肉芽形成はキトサン群の9日目および15日目で有意に増加し、特にコラーゲン線維の増加が顕著であった。I型、III型およびIV型コラーゲンについて免疫染色によりタイピングした結果、肉芽床に認められたコラーゲンはIII型コラーゲンが主体であり、コラーゲンの構成は通常の創傷治癒の場合と同様であった。

以上の通り、キトサンを適用した創傷部では、PMNおよびマクロファージの遊走促進とコラーゲン産生増加による顕著な肉芽形成促進が認められた。

第1章で作出したキトサン適用肉芽組織中のPMN中にオステオポンチン

(OPN)が免疫組織化学的に認められた。糖結合リン酸化蛋白である OPN は、肉芽腫性病変で認められ、その形成に関与するとされている。

第2章では *in vitro* における PMN の OPN 産生能を評価するため、刺激物質としてリポポリサッカライド(LPS)、ラテックスビーズ、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)およびキトサンを各々添加した培養液でヒト PMN を培養した。その結果、逆転写・ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)法により刺激物質の存在下で PMN の OPN メッセンジャーリボ核酸(mRNA)の発現に増強傾向が認められ、G-CSF およびキトサンの刺激により OPN mRNA の発現は有意に増強した。さらに、PMN 培養上清中の OPN 量を酵素免疫測定(EIA)法により測定した結果、刺激物質の存在下で OPN 産生量の増加傾向が認められた。OPN は活性化マクロファージ、T-リンパ球および血管内皮細胞で産生されることがこれまでに報告されている。しかしながら、PMN が OPN を産生するという報告はない。

本研究により PMN の OPN 産生能が明らかとなり、創傷治癒において PMN が OPN を介して細胞遊走を促進するという新たな役割を有することが示唆された。さらに、キトサンは OPN を介して細胞遊走を増強し、肉芽形成を促進することが推測された。

これまでに、キトサン自体がマクロファージの活性化能を有していることが報告されている。しかし、キトサンにより活性化されたマクロファージの創傷治癒への関与については明らかではない。そこで第3章では、細胞外マトリクス(ECM)の産生に対するキトサンの影響の解析を目的として、(1)線維芽細胞の ECM の産生に対するキトサンの影響、(2)マクロファージの増殖因子産生に対するキトサンの影響について検討した。

はじめに、L929 マウス線維芽細胞をキトサンで刺激し、ECM 産生に対する影響を検索した。その結果、キトサンにより ECM 産生増加は認められなかった。次いで、マクロファージをキトサンで刺激し、ECM 産生を促進する増殖因子である形質転換増殖因子(TGF)- β 1 および血小板由来増殖因子(PDGF)の産生に対する影響を検索した。その結果、キトサンはこれらの増殖因子の産生を亢進し、特に PDGF の産生を顕著に誘導した。以上の結果

より、キトサンにより、マクロファージからの増殖因子の産生が亢進され、組織修復が促進されるものと推測された。

本研究では、*in vivo* の実験ではイヌを用い、*in vitro* の実験ではヒトもしくはマウスの細胞を用いた。ヒトの細胞を用いた理由は、イヌの OPN、TGF- β 1 および PDGF の遺伝子発現に関して、本研究に応用できる文献がなく、また、ヒト用の測定ツールがそろっているためである。

しかしながら、イヌとヒトとではキトサンに対する反応が異なる可能性もあり、同一動物種を用いた系統的研究が必要と思われるものの、本研究により得られた成績をまとめると以下のように結論づけられる。

(1) 創傷へのキトサンの適用により、創傷治癒過程初期の炎症期に PMN の遊走促進および活性化がはかられる。(2) 創部にした PMN はマクロファージの遊走促進および活性化作用を有する OPN を産生する。キトサンは PMN の OPN 産生を亢進させる。(3) 創部にしたマクロファージは増殖因子(TGF- β 1、PDGF)を産生する。キトサンはマクロファージの増殖因子産生を亢進させる。(4) 増殖因子により線維芽細胞の増殖および ECM 産生が亢進する。(5) 結果として肉芽形成が促進される。

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	栗 原	幹 典
副 査	教 授	梅 村	孝 司

学 位 論 文 題 名

キトサンによる創傷治癒促進の機構解析

キトサンは創傷治癒促進を目的として獣医療において臨床応用されている。しかしながら、その詳細な促進機構の解明には至っていない。

申請者はキトサンによる創傷治癒の促進機構を解明する目的で、以下の研究を行った。はじめに、イヌ背部皮膚に実験的欠損創を作出し、創作成後15日間の組織学的検索を行った。その結果、多形核白血球(PMN)およびマクロファージの遊走促進とⅢ型コラーゲン産生増加による肉芽形成促進が認められた。次に、マクロファージの遊走促進・活性化能を有し、肉芽形成への関与が示唆されているオステオポンチン(OPN)に着目し、PMNのOPN産生に対するキトサンの影響について検討した。その結果、PMNのOPN産生能が明らかとなり、さらにキトサンがPMNのOPN mRNAの発現を増強し、さらにOPNの産生量を増加させることを明らかにした。

キトサンのマクロファージ活性化能についてはすでに報告されているが、創傷治癒への関与については不明である。そこで最後に、線維芽細胞の細胞外マトリクス(ECM)産生、およびマクロファージの形質転換増殖因子(TGF)- β 1および血小板由来増殖因子(PDGF)の産生に対するキトサンの影響について検討した。その結果、キトサンによるECM産生増加は認められなかったものの、増殖因子の産生を誘導し、特にPDGFの産生は顕著に増加した。

本研究の成績より、キトサンによる創傷治癒促進機構は、(1)PMNの遊走促進・活性化、(2)OPNの産生亢進、(3)マクロファージの遊走促進・活性化、増殖因子産生の亢進、(4)線維芽細胞の増殖およびECM産生亢進に基づく肉芽形成促進などによって構成されているものと考えられた。

以上のように申請者は、キトサンの創傷治癒促進機構、特に肉芽形成促進作用

の解明に貢献した。また、PMNのOPN産生能を見いだし、創傷治癒における新たな概念を提唱した。よって、審査員一同は、上野博史氏が博士(獣医学)の学位を授与される資格を有するものと認めた。