bFGF 含有キトサンフィルムの皮膚損傷治癒促進効果

— 遺伝的糖尿病マウス皮膚損傷モデルを用いた検討 —

水野敬輔^{*1)}, 山村恵子・矢野亨治・滝本典夫^{*2)}, 桜井恒久^{*1)}*Effect of chitosan film containing bFGF on wound healing in genetically diabetic mice*

We studied the effect of chitosan film containing bFGF on wound healing in genetically diabetic mice. Full thickness wounds of skin (2 cm²) were created on the back of each mouse. The chitosan film was prepared as follows: hydroxypropyl chitosan acetate buffer solution (6% w/v) was casted in a Teflon cast (1×1 cm) and dried. The wounds were treated with chitosan film, with chitosan film containing bFGF (0.6 μg/cm² and 2.0 μg/cm²), and without any film (control group). On the 7 day after wounding, wound area was reduced significantly in the groups treated with chitosan film and both of chitosan films containing bFGF compared with control group. On the 14 day after wounding, in chitosan film containing bFGF (2.0 μg/cm²) group, wound area was significantly reduced compared with the other groups. Histological examination revealed thickening of granulation tissue and an increase in the number of capillaries in chitosan film containing bFGF (2.0 μg/cm²) group.

These results suggested that chitosan film containing bFGF is effective on wound healing in genetically diabetic mice in a dose-dependent fashion.

Keisuke Mizuno^{*1)}, Keiko Yamamura・Kohji Yano・Norio Takimoto^{*2)}, Tsunehisa Sakurai^{*1)}

key words : chitosan, bFGF, genetically diabetic mice, wound healing, drug release

Fibroblast growth factor (FGF) は、1974 年に Gospodarowicz によって最初に報告されてから今日、広く研究の行われているサイトカインの一つである¹⁾。線維芽細胞増殖因子と命名されたが、

線維芽細胞のみならず、血管内皮細胞および神経細胞などの中胚葉や、外胚葉由来の多くの細胞に対して活性をもつことが知られている²⁾。その特性から、難治性の末梢循環不全や、糖尿病を原因とする潰瘍、あるいは褥瘡の治療における FGF の臨床応用が期待されている。キトサンは、カニ、エビなどの甲殻の構成成分であるキチンを脱アセチル化して得られる多糖体である³⁾。現在、凝集剤として排水処置に利用されているが、創傷の保護剤、あるいは薬物を sustained release させる薬物担体としても研究が進められている⁴⁾。今回筆者らは、遺伝的糖尿病マウスの皮膚欠損モデルを用いて、FGF を含有させたキトサンフィルムの皮膚欠損面積の縮小効果を検討した。

材料と方法

キトサンとして用いたハイドロキシプロピルキトサンアセテートは、ハイドロキシプロピルキトサン(日本曹達)をアセチル化することにより調製した(80%アセチル化)(図 1)。

調製方法を図 2 に示した。

FGF として、科研製薬より供与された basic FGF (bFGF) を使用した。

(1) キトサンフィルムおよび bFGF 含有キトサンフィルム

6%ハイドロキシプロピルキトサンアセテート水溶液 300 μl をテフロンキャスト(1×1 cm)に展延したものを自然乾燥し、得られたフィルムをキトサンフィルムとして用いた。

テフロンキャスト内にて 6%ハイドロキシプロピルキトサンアセテート水溶液 300 μl と bFGF 0.6 μg、および 2.0 μg をそれぞれ混和し、自然乾燥ののち得られたフィルムを bFGF 含有キトサ

^{*1)} First Department of Surgery, Nagoya University School of Medicine 名古屋大学医学部第一外科学教室

^{*2)} Department of Hospital Pharmacy, Nagoya University School of Medicine 名古屋大学医学部附属病院薬剤部

Offprint requests to : Keisuke Mizuno, M.D., The First Department of Surgery, Nagoya University School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya 466

図1 ハイドロキシプロピルキトサンアセテートの構造式

ンフィルム ($0.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, $2.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) として用いた。

(2) 方法

9 週齢の遺伝的糖尿病マウス (C57BL/KSJdb/db マウス) を日本クレアより購入した。購入したマウスは室温 $23 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 5\%$ 、明暗各 12 時間、新鮮空気による換気 13 回/時に設定した飼育室で飼育し、餌は日本クレア CA-1 を、水は水道水をそれぞれ自由に摂取および摂水させた。動物は 1 週間予備飼育したのち、実験に供した。マウスの背部を剃毛し、3 日後エーテル麻酔下で直径 1.6 cm (面積約 2.0 cm^2) の皮膚を切除した。対象マウスをランダムに 4 群に分け、① 皮膚切除のみ行ったコントロール群、② キトサンフィルム貼付群、③ bFGF 含有 ($0.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) キトサンフィルム貼付群、④ bFGF 含有 ($2.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) キトサンフィルム貼付群とした。処置施行後、感染予防のためトブラマイシン 6 mg/マウスの皮下注を行った。潰瘍の表面は、汚染を回避するためポリウレタン製フィルムドレッシングで被覆した。術後 1 週間は毎日、その後は週 3 回被覆更新し、同時に潰瘍の面積測定を行い、4 週間観察した。創傷作製後 7 日、14 日、21 日、28 日で、各群の皮膚欠損面積を比較し、分散分析にて検定を行った。 $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。術後 1 週間目に屠殺したマウスの背部の皮膚を切除し、ホルマリンで固定したのち、HE 染色を行い組織学的検討を行った。

図2 ハイドロキシプロピルキトサンアセテートの調製のフローチャート

結果

(1) 皮膚欠損部治癒効果

皮膚欠損面積の経時的変化を図 3 に示した。

7 日目の皮膚欠損面積の比較では、コントロール群に対しキトサンフィルム貼付群および含有量の異なる 2 種類の bFGF 含有キトサンフィルム貼付群は有意に縮小していた。さらに、bFGF 含有キトサンフィルム群 ($2.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) においては、キトサンフィルム群にしても、有意差をもって皮膚欠損面積の縮小が認められた。14 日目の比較では、bFGF 含有キトサンフィルム群 ($2.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) の皮膚欠損面積は他のすべての群に対して有意に縮小していた。一方、21 日目および 28 日目では、すべての群間で有意差は認められなかった。

(2) 組織学的所見

図 4 に、皮膚欠損作成後 7 日の組織所見を示した。コントロール群では潰瘍部位への好中球浸潤が強く、fibroblast およびマクロファージは他の群と比較して少なく、肉芽組織は薄かった (図 4 A)。キトサンフィルム単独貼付群では好中球浸潤はコントロール群よりやや弱く、マクロファージおよび異物巨細胞が認められた。また、肉芽組織

図 3 皮膚欠損傷マウスの創傷面積推移に対するキトサンフィルムおよび bFGF 含有キトサンフィルムの効果

図 4 創傷作成後 7 日目の組織学的所見

- A. コントロール群：潰瘍部位への好中球浸潤が強く、fibroblast およびマクロファージは他の群と比較して少ない。肉芽組織は薄い。（×90，左下は×360）
- B. キトサンフィルム貼付群：好中球浸潤はコントロール群よりやや弱く、マクロファージおよび異物巨細胞が認められる。また、肉芽組織はコントロール群よりも厚い。（×90）
- C. bFGF 含有キトサンフィルム（2.0 µg/cm²）：fibroblast およびマクロファージは多く認められるが、異物巨細胞は観察されない。また、肉芽組織もコントロールにくらべて厚く成熟しており、新生血管も多く認められる。（×90，左下は×360）

はコントロール群よりも厚かった(図4B). bFGF含有キトサンフィルム($2.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)においては, fibroblast およびマクロファージは多く認められたが, 異物巨細胞は観察されなかった. また, 肉芽組織もコントロールにくらべて厚く成熟しており, 新生血管も多く認められた(図4C).

考 察

bFGF が血管新生および肉芽形成促進作用を有し, 創傷治癒に有効であることはすでに多くの研究者により報告されている^{5,6)}. 臨床の場合においても, bFGF を褥瘡や糖尿病で原因とする難治性の潰瘍に局所投与する試験が行われており, 近々製品化される予定である.

キトサンは, カニ, エビなどの甲殻の構成成分であるキチンを脱アセチル化して得られる多糖体であり, キチンとは異なり水溶性で, アセチル化体は生体で分解される特徴を有する. 医療材料としての応用には, キチンは人工皮膚として用いられ, キトサンは創傷保護剤として期待されている. Okamoto らはイヌを用いた解放創モデルにおいて, キチン, キトサンが創傷治癒に有効であったとしている⁷⁾. また, キトサンはそれ自身に抗菌作用があり, さらにマクロファージを活性化するといわれており, 感染した創に対してキトサンを使用し有効であったとも報告している⁸⁾.

また, 本研究で用いたアセチルプロピルキトサンは生体適合性が高く, 薬物の担体としての応用も研究されている. Yamamura らは, キトサンをbFGFの担体として用いてゴアテックスディスクに吸着させたものを, ウサギの皮下に植え, bFGFの放出について検討を行った. その結果, 24時間後において60%以上のbFGFがディスクに残存しており, キトサンのsustained releaseの担体としての有用性を報告している⁹⁾. また, bFGFなどのように, 少量で作用発現する高い薬理活性を有する薬物においては, 投与量の設定が重要となる. 今回の実験では, キトサンフィルムに薬物の既知量を予め含有させることが容易で, 正確な投与量の設定が可能となった.

本実験では, 難治性潰瘍モデルとされる糖尿病

マウスの皮膚欠損モデルを用いて, bFGF含有キトサンフィルムの効果を検討した. その結果, 創傷作製後2週まではbFGFの容量に依存して創傷面積の縮小効果が認められた. しかし, 3週以後においては有意な差は認められず, 創傷の治癒日数の短縮も認められなかった. 創傷作製後1週の標本の組織学的所見では, bFGF含有キトサンフィルム投与群で肉芽組織の肥厚, 線維芽細胞の増加を認めた. これらの結果より, bFGF含有キトサンフィルムから活性を有するbFGFが放出されたことにより, 創傷治癒の初期の段階を促進したと考えられる. 投与後3週以降において, bFGF含有キトサンフィルムがコントロール群およびキトサンフィルム群との間に創傷面積の差がなくなった理由については, 創傷作製後単回投与であったためにbFGFの効果が持続しなかったと思われる. さらに創傷部位の感染などによる影響も考えられる. 今後, bFGF含有キトサンフィルムを複数回投与し, 単回投与との違いを検討する予定である.

結 語

bFGF含有キトサンフィルムは, 遺伝的糖尿病マウスの皮膚創傷面積の縮小促進に効果が認められた. bFGFの薬物担体としてのキトサンフィルムの有用性が認められた.

文 献

- 1) Gospodarowicz D: Localization of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* 249: 123-127, 1974.
- 2) Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L: Molecular and biological characterization of fibroblast growth factor, an angiogenic factor which also controls the proliferation and differentiation of mesoderm and neuroectoderm derived cells. *Cell Differ.* 19(1): 1-17, 1986.
- 3) 矢吹 稔, 石川文保, 大宝 明, 島原健三, 戸倉清一・他: 最後のバイオマスキチン, キトサン. (キチン, キトサン研究会・編), 技報堂出版, 1988.
- 4) Hou W, Miyazaki S, Takeda M, Komai T: Sustained release of indometacin from chitosan granules. *Chem. Pharm. Bull.* 33(9): 3986-3992, 1985.
- 5) Okumura M, Okuda T, Nakamura T, Yajima M: Acceleration of wound healing in diabetic mice by basic fibroblast growth factor. *Biol. Pharm. Bull.*

- 19(4) : 530-535, 1996.
- 6) Hebda PA, Klingbeil CK, Abraham JA, Fiddes JC : Basic fibroblast growth factor stimulation of epidermal wound healing in pigs. J. Invest. Dermatol. 95 : 626-631, 1990.
- 7) Okamoto Y, Sibasaki K, Minami S, Matsuhashi A, Tanioka S et al. : Evaluation of chitin and chitosan on wound healing in dogs. J. Vet. Med. Sci. 57(5) : 851-854, 1995.
- 8) Okamoto Y, Tomita T, Minami S, Matsuhashi A, Kumazawa N et al. : Effects of chitosan on experimental abscess with *Staphylococcus aureus* in dogs. J. Vet. Med. Sci. 57(4) : 765-767, 1995.
- 9) Yamamura K, Sakurai T, Yano K, Yotsuyanagi T : Sustained release of basic fibroblast growth factor from the synthetic vascular prosthesis using hydroxypropylchitosan acetate. J. Biome. Mater. Res. 29 : 203-206, 1995.