ブレオマイシン含有ポリ乳酸マイクロスフェアの 単回注射による皮膚線維化モデルマウスの作製

渋 沢 弥 生¹

はじめに

全身性強皮症は炎症に続いて引き起こる皮膚および内臓諸臓器の線維化、血管障害、免疫異常などを特徴とする膠原病の1つである。コラーゲン代謝異常、血管障害、自己免疫などの異常が複雑に絡み合っており病態が形成されることが考えられている。またサイトカイン異常もあり、transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) が線維化を誘導し、connective tissue growth factor (CTGF) がこれを維持する、という2段階線維化仮説も提唱されている。しかしながら、真の発症原因はいまだ不明である。

疾患の病態解明や治療法の確立の上で動物モデルは大変重要な役割を果たしてきた。全身性強皮症のモデルマウスとしては、ブレオマイシン (以下、BLM と略) 皮下投与による皮膚線維化マウスが有名である。このモデルマウスは BLM 溶液を連日または隔日、3-4 週間に亘ってマウス背部に皮下注射をすることで誘導される。今回、ブレオマイシン含有ポリ乳酸マイクロスフェア (以下、BLM-PLA-MS と略) を作製し、これを一回注射することで皮膚線維化を誘導する方法を確立した。

方 法

BLM-PLA-MS は溶媒蒸発法で作製し、BLM 含有量を測定後、in vitro での徐放試験を行った。次に、0.5mg のマイクロスフェアを PBS で懸濁し、これを剃毛した C3H マウスの背部皮下に注射した。コントロールとして、BLM を含有しないマイクロスフェア (以下 control-PLA-MS と略) を同量、同様に注射した。注射後7日目と21日目に皮膚を採取し、組織学的所見の検討、コラーゲン量、タイプIコラーゲンの mRNA の発現量を測定した。さらに monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), connective tissue growth factor (CTGF) についても mRNA の発現レベルを測定した。mRNA の発現レベルはリアル

タイム PCR で解析し、内因性コントロールで補正した。

結 果

組織学的に、7日目で真皮肥厚と膠原線維の膨化がみられ、21日目ではさらに真皮は肥厚していた。マイクロスフェア自体に対する炎症反応はみられたものの、軽度であった (図1)。真皮の厚さの測定ではコントロールに比し、BLM-PLA-MS を注射した皮膚では、7日目で1.4倍、21日目で1.9倍であった。注射21日目の皮膚可溶性コラーゲン量は BLM-PLA-MS 注射皮膚は control-PLA-MS 注射皮膚の約1.4倍であった。タイプIコラーゲンの mRNA の発現レベルは、BLM-PL-MS 注射皮膚では control-PLA-MS 注射皮膚に対し7日目で約2.2倍、21日目では約3.1倍であった。

また BLM-PLA-MS 注射皮膚では、MCP-1 mRNA 発現レベルが7日目で顕著に上昇し、TGF- β_1 mRNA 発現レベルが7日目、CTGF mRNA 発現レベルが21日目で上昇していた。

考 察

従来の方法では、BLM 溶液を連日または隔日、3-4 週

1 群馬県前橋市大友町3-26-8 老年病研究所附属病院皮膚科
平成20年12月4日 受付

論文別刷請求先 〒371-8511 群馬県前橋市昭和町3-39-22 群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学 渋沢弥生

図1 組織像

間に亘ってマウス背部に皮下注射をすることで皮膚線維化が誘導される。¹ ポリ乳酸は、生体内分解性、生体適合性、生体内吸収性という特徴を持つため薬物徐放などの放出制御を目的とした薬物担体として幅広く研究や臨床応用されている。^{2,3} この徐放技術を皮膚線維化モデルの作製に応用した。従来の BLM 水溶液を注射する方法では BLM はすぐに拡散してしまうが、BLM-PLA-MS は注射部位に BLM の有効濃度を効果的かつ持続的に保つことができる。その結果、注射回数と必要な BLM 総量を減らし皮膚線維化を誘導することができたと考えている。また、全身性強皮症の病態形成に関連すると考えられるサイトカイン異常もこのモデルにおいて確認できた。⁴ BLM-PLA-MS 注射は皮膚線維化モデルマウス作製のために、簡単で有効な方法となりうる。

謝 辞

本研究のご指導を賜りました群馬大学大学院医学系研究科皮膚科学 石川 治教授、根岸 泉講師、京都大学

再生医科学研究所 田畑泰彦教授に深謝いたします。

文 献

1. Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, et al. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* 1999; 112: 456-62.
2. Jalil R, Nixon JR. Biodegradable poly (lactic acid) and poly (lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties. *J Microencapsul* 1990; 7: 297-325.
3. Tabata Y, Ikada Y. Macrophage phagocytosis of biodegradable microspheres composed of L-lactic/glycolic acid homo- and copolymers. *J Biomed Mater Res* 1988; 22: 837-58.
4. Shibusawa Y, Negishi I, Tabata Y, Ishikawa O. Mouse model of dermal fibrosis induced by one-time injection of bleomycin- poly (L-lactic acid) microspheres *Rheumatology* 2008; 47: 454-7.