

論 文 要 旨

Efficacy of gelatin hydrogel impregnated with concentrated platelet lysate in murine wound healing

(濃縮血小板ライゼートを含浸させたゼラチンハイドロゲルによるマウス創傷治癒における有効性)

関西医科大学形成外科学講座
(指導：楠 本 健 司 教授)

Sharon Claudia Notodihardjo

【研究目的】

血小板ライゼート (PL) は、血小板から調整した細胞成長因子のカクテルである。細胞成長因子を多量に含む PL と細胞成長因子を保持し徐放する創傷被覆材であるゼラチンハイドロゲル (GH) の併用における細胞成長因子の徐放を評価し、異なる PL 濃度でのマウスの創傷治癒実験を行い、効果の差と、PL と GH の併用治療の有効性を検討することを目的とした。

【研究方法】

ゼラチンハイドロゲル (GH) (等電点 5.0、分子量 99,000、牛由来) を glutaraldehyde で架橋して凍結乾燥した。ヒト PL (hPL) は、 -80°C 凍結ヒト濃厚血小板液を 37°C に 3 回凍結融解して血小板由来の細胞成長因子を得た。これを遠心分離し、ミリポアフィルターを通して上澄み液を得ることで hPL を調整した。濃度を 1、2、3 倍 (hPL1、hPL2、hPL3) とし、3 群の PDGF-BB、VEGF、TGF- β 1 を ELISA で計測した。凍結乾燥後、 4°C で 9 か月間保存した。一方、この hPL の生理活性を評価するために、DMEM、DMEM+10%FBS、DMEM+1%hPL1 の培地でヒト線維芽細胞を 48h 培養を行い、細胞数を計測した。動物実験では、C57bl6J/Jcl マウス (総数 $n=126$ 、雄、8-9 週令) を使用し、isoflurane で麻酔し、背部を剃毛し除毛後、直径 6mm の円形状に panniculus carnosus を含む皮膚全層欠損創を作成した。あらかじめ作成した直径 6mm の GH シートディスクを用いた。マウスを 6 群 (各群 $n=21$) に分け、1 群 (control) : $100\mu\text{L}$ の生理食塩水を創面に滴下、2 群 : $100\mu\text{L}$ の生理食塩水を含浸させた GH 貼付、3 群 : $100\mu\text{L}$ の hPL1 を含浸させた GH 貼付、4 群 : $100\mu\text{L}$ の hPL2 を含浸させた GH 貼付、5 群 : $100\mu\text{L}$ の hPL3 を含浸させた GH 貼付、6 群 : $100\mu\text{L}$ の hPL1 を創面に滴下、とした。術 4、7、14 日に写真撮影を行い、 $n=7$ で皮膚欠損創部分を切り出し、HE 染色、Azan 染色、抗 CD31 免疫染色を行った。摘出組織画像を術 0 日に対して術 4、7、14 日の画像を比較した。上皮形成は、術 4、7、14 日の HE 染色画像を用い、創縁の毛根から上皮化最先端までの新生上皮の長さの総和を計測した。肉芽増生は、術 4、7、14 日の Azan 染色画像にて創傷の中央と中央から両創縁側へ $500\mu\text{m}$ の 3 か所の厚みを計測した。毛細血管の数と領域の評価は、術 4、7 日の抗 CD31 免疫染色画像を用いた。

【結果】

hPL1、hPL2、hPL3 での PDGF-BB、VEGF、TGF- β 1 含有量は、概ね濃度に比例した有意差 ($p<0.05$) を示した。ヒト線維芽細胞の増殖を検討し、1%PL1 の付加群が、10%FBS 付加群を有意に上回り ($p<0.01$)、 4°C で 9 か月間凍結乾燥で保存した PL が、細胞成長因子を保持して生理活性を維持することを示唆した。マウスの創傷治癒実験で、創部の観察で hPL1 滴下群 (6 群) は、control 群 (1 群) と差がなかった。G-hPL1 群 (3 群) は、周囲瘢痕の瘢痕拘縮を力学的に制限したことで術 4 日より広い創であったこと以外は、control 群と明らかな差はなかった。術 4、7 日で、control 群が、最も創面積が小さかった。摘出標本の

検討で、新生上皮は、control 群（1 群）と hPL1 滴下群（6 群）は創面に沿って延び、GH 群は厚く増生した肉芽の先端を巻き込み、術 14 日で G-hPL2 群（4 群）と G-hPL3 群（5 群）が長い上皮形成を示した。肉芽は、G-hPL3 群（5 群）が術 4、7、14 日で最も多く増生していた。血管新生は、G-hPL2 群（4 群）と G-hPL3 群（5 群）が術 4、7 日に促進されていた。

【考察】

本研究では、4 °C で、9 か月間凍結乾燥状態で保存した hPL が、その生理活性を有する細胞成長因子を保持したことを初めて明らかにした。マウスの創傷治癒実験では、G-hPL2 群（4 群）と G-hPL3 群（5 群）で肉芽増生や血管新生を促し、特に G-hPL3 群で創傷治癒の早期に血管新生を促進し、厚い肉芽増生と上皮の延長を認めた。hPL と GH の併用は、創傷治癒の 3 要素である上皮形成と肉芽増生、血管新生において創傷治癒の量と質の再生に有効性を示した。hPL の細胞成長因子を保持した GH がその崩壊と共に細胞成長因子を徐放することにより創傷治癒に合理的に有効性を発揮することを示唆した。

【結語】

本研究では、近交系マウスを使用し、hPL2、hPL3 を付与した GH が、創傷治癒で上皮化、肉芽増生、血管新生を促進し、PL と GH の併用治療が創傷治癒に有効であることを初めて示した。次の段階として、本治療法の前臨床として、糖尿病モデルマウスや慢性創傷モデルマウスでの創傷治癒の有効性を検討する予定である。