

京都大学	博士（医学）	氏名	坂本道治
論文題目	Efficacy of gelatin gel sheets in sustaining the release of basic fibroblast growth factor for murine skin defects (マウス皮膚欠損創モデルにおける塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) 徐放性ゼラチンゲルシートの有効性)		
(論文内容の要旨)			
【背景】			
ゼラチンを用いて塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) を保持・徐放する方法の有効性が報告されているが、その多くは凍結乾燥された素材に成長因子を含浸させて用いるため、創の形状に応じて素材の形を自由に変えることはできなかった。そこでこれまでの方法とは異なり、ゼラチン溶液に成長因子を混ぜ、望む形状に整えたあとで架橋すれば、自由な形状を得ることができる。この方法は、ポケット状に陥凹した創面や、血管吻合部などに適した治療法となる可能性がある。この方法で作製したゼラチンゲルシート (GGS) の bFGF の保持徐放能および、マウス皮膚欠損モデルにおいて創傷治癒に与える効果について検討した。			
【方法】			
〈GGS の作製〉			
ゼラチン溶液を 1% グルタルアルデヒド溶液 (GA) で架橋することで、6.5, 13, 26wt% の 3 種類の濃度の GGS を作製した。bFGF 含有 GGS は、ゼラチン溶液に bFGF を加えたあとに GA を加え、すみやかに攪拌することで作製した。			
〈破断強力・粘弾性測定〉			
上記の 3 種類の濃度のゼラチンゲルにプローベで圧を加え、ゲルの破断強力を測定した。また、キュートメーターを用いて粘弾性を測定した。			
〈bFGF 徐放実験〉			
bFGF 含有 GGS を、コラゲナーゼで溶解し、ゼラチンゲルの溶解速度と bFGF 放出量との関係を調べた。			
〈マウス皮膚欠損モデルを用いた創傷治癒促進効果の検討〉			
C57BL マウスの背部に皮膚全層欠損創を作製した。これを 5 群に分け、bFGF を含有しない GGS を貼付するもの (control 群)、それぞれ 1, 3.5, 7, 14 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の bFGF を含有する GGS を貼付するもの (bFGF1, 3.5, 7, 14 群) を作製した。1, 2, 3 週後に安楽死させて組織を採取し、肉眼的な創面積の評価に加え、組織学的な新生上皮長、肉芽形成、血管新生について評価した。			
【結果】			
ゼラチンの濃度が高いほど破断強力は高く、粘弾性は小さくなった。この結果から、13wt% のゼラチンが最適と判断した。徐放実験では、PBS に浸漬した最初の 24 時間で、ゼラチンゲルの 39.4% が溶解し、この間に 0.28 μg の bFGF が放出された。その後、コラゲナーゼを加えると速やかに GGS は溶解され、残りの bFGF が放出された。動物実験においては、術後 2 週の時点での創面積は			

bFGF1, 3.5 群では control 群より小さい傾向にあり、bFGF 7, 14 群では逆に control 群よりも大きかった。新生上皮長は、bFGF 1, 3.5 群では control 群よりも有意に長かった。肉芽組織の厚さと断面積、新生血管の数と断面積については、bFGF の用量依存性に大きくなった。

【考察】

徐放実験の結果より、bFGF 含有 GGS の溶解に伴って bFGF が徐放されることが確認された。動物実験の結果から、bFGF 1, 3.5 群では上皮化を促進し、bFGF 7, 14 群では血管新生および肉芽形成が促進された。2 週の時点で、bFGF 7, 14 群の創面積が control 群よりも大きかったのは、過剰な肉芽形成によるものと考えられた。このことから、将来的にこの治療法を臨床応用する際には、上皮形成を促進したい場合には低用量、肉芽形成を促進したい場合には高用量の bFGF の使用が適すると考えられた。

【結論】

GGS は、bFGF を徐放することが可能であり、自由に成形が可能な素材として有用であると考えられた。等電点の異なるゼラチンを用いることで、bFGF 以外の成長因子を徐放することにも応用できる可能性がある。

(論文審査の結果の要旨)

創傷治癒の促進を目的として、ゼラチンを用いて塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) を保持・徐放する治療手技の有効性が報告されているが、これまでの方法は凍結乾燥された素材に成長因子を含浸させて用いるため、使用時に創の形状に応じて素材の形を自由に変えることはできなかった。そこで、bFGF を加えたあとにゼラチン溶液を 1% グルタルアルデヒド溶液 (GA) で架橋することで、自由に必要な形状に成型できる素材 (ゼラチンゲルシート : GGS) を考案し、この物性・徐放能・創傷治癒に与える効果について検討した。

6.5, 13, 26wt% の 3 種類の濃度の GGS の破断強力および粘弾性を比較した結果、13wt% が最適と考えられた。この 13wt% GGS からの bFGF 徐放能を測定した結果、ゼラチンの溶解に伴って、bFGF が放出されることが確認できた。マウスに作製した皮膚欠損創に濃度の異なる bFGF 含有 GGS を貼付し、その治癒を比較した結果、bFGF 1, 3.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 投与群では上皮化が促進され、bFGF 7, 14 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 投与群では血管新生および肉芽形成が促進された。このことから、GGS は、bFGF を徐放することが可能であり、自由に成型が可能な素材として有用であると考えられた。また、上皮形成の促進を優先したい場合には低用量、肉芽形成促進を優先したい場合には高用量の bFGF の使用が適すると考えられた。

以上の研究はゼラチンを用いた成長因子の新しい徐放システムの解明に貢献し難治性皮膚潰瘍などの創傷治療に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 28 年 7 月 11 日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降