

京都大学	博 士（医 学）	氏 名	神 田 則 和
論文題目	Evaluation of a novel collagen/gelatin scaffold for achieving the sustained release of basic fibroblast growth factor in a diabetic mouse model (糖尿病マウスを用いた線維芽細胞増殖因子徐放機能を持つ新規コラーゲン/ゼラチン足場材料の有効性評価)		
(論文内容の要旨)			
全層皮膚欠損創の治療に、シリコーンシートとコラーゲンスポンジ（CS）からなる二層性人工真皮が臨床使用され十年以上が経過した。人工真皮を創面に貼付後、CSに線維芽細胞と毛細血管が侵入し、CSが分解吸収され真皮様組織が形成されるには数週間を要する。人工真皮は貼付早期には血流がないため感染に弱く、褥瘡などの難治性潰瘍に使用しても感染して生着しないことが多い。感染を防ぐ目的で抗生物質や抗菌剤の徐放型人工真皮が開発されているが、菌交代症や銀の持つ組織障害のため臨床応用に至っていない。このためCS内での血管再生を促進することで、感染抵抗性を持たせることを考え、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）を徐放することとした。CS自体にbFGFの徐放効果を持たせるためbFGFを静電的に吸着する酸性ゼラチンを 10%含有するコラーゲン/ゼラチン混合スポンジ（CGS）を開発した。健常マウス（C57BL/6J）に作成した全層皮膚欠損創にbFGF含浸CGSを用いると、真皮様組織の形成に要する時間が従来の 1/2 から 1/3 に短縮されることを確認した。この時のbFGF含浸濃度は 7μg/cm² が最も効果が高かった。この結果を受け、ヒト難治性潰瘍モデルとして遺伝的糖尿病マウスの大転子部に作成した褥瘡を用いてbFGF含浸CGSの有効性を検討した。本研究では i）CGSのbFGF保持可能濃度及び放出の検討、ii）難治性潰瘍モデルでの有効bFGF含浸濃度の検討を行った。 まず、CGSに生理食塩水（コントロール群）、bFGF 群（7、14、28、50 μ g/cm²）を含浸させ、コラゲナーゼ溶液を入れた試験管内に入れ 37℃でCGSを溶解させ、溶解開始後 1、2、4、6 時間後のCGSの溶解率およびELISA法による溶液中のbFGF濃度を測定した。いずれのbFGF濃度でも、bFGFはCGSに吸着され、CGSの溶解に従い持続的に放出されることを確認した。 次に、糖尿病マウスの大転子部に 500 g/cm²の圧力（2 時間×2 回、2 時間間隔）で荷重を行い、直径 8mmの褥瘡を作成した。荷重 5 日後に大腿骨上まで壊死組織を除去し、生理食塩水およびbFGF（7、14、28、50 μ g/cm²）を含浸させたCGS（直径 8mm、厚さ 3mm）を貼付し縫合固定した。評価項目は、創面積、上皮進展距離、新生血管面積で行った。創面積は、移植後 1 週でbFGF14 μ g/cm²含浸群のみがコントロール群より創が縮小していた。移植後 2 週ではbFGF7、14 μ g/cm²含浸群がコントロール群とbFGF50 μ g/cm²含浸群より創が縮小していた。上皮進展距離は、移植後 1 週でbFGF7、14 μ g/cm²含浸群がコントロールより上皮が進展していた。移植後 2 週でbFGF14 μ g/cm²含浸群のみがコントロールとbFGF50 μ g/cm²含浸群より上皮が進展していた。新生血管面積は移植後 2 週でbFGF7、14、28 μ g/cm²含浸群がコントロール群より面積が大きかった。全評価項目でbFGF14 μ g/cm²含浸群はコントロール群よりもすぐれており、CGSにbFGFを 7 から 14 μ g/cm²含浸した群が創傷治癒を促進する一方で、過度のbFGFは必ずしも真皮様組織形成や表皮形成を促進しないことがわかった。 本治療法は、使用する直前に室温で bFGF を CGS に散布するだけで、細胞製剤			

の様な厳密な管理を必要としない臨床使用しやすい治療法である。また、従来の人工真皮では適応がなかった難治性潰瘍でも高い効果を示した。CGS は、原理的に bFGF 以外にも、正電荷である多血小板血漿 (PRP) に含まれる血小板由来増殖因子 (PDGF) 、形質転換増殖因子 (TGF-β) も吸着、徐放可能であると思われ、bFGF が臨床使用できない国では、患者本人および他者からの PRP を使用することで問題を解決できると予想している。 また、CGS の使用は皮膚再生目的以外にも有望である。再生医療においてコラーゲンスポンジは最も一般的な足場であり、成長因子との併用は真皮、表皮、脂肪、骨、軟骨などの再生において効果的である。成長因子の徐放が可能な CGS は再生医療における足場としても有用であると考えられる。			
(論文審査の結果の要旨) 全層皮膚欠損創の治療に用いられる人工真皮 (コラーゲンスポンジ : CS) は、真皮様組織を形成するのに数週間を要し、貼付早期には血流がなく感染に弱いため褥瘡などの難治性皮膚潰瘍に適応しづらい。このため血管新生を促進し真皮様組織形成期間を短縮することで、感染抵抗性を持たせることを考え、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) を徐放可能な酸性ゼラチンを 10%含有するコラーゲン/ゼラチン混合スポンジ (CGS) を開発した。 健常マウスに作成した全層皮膚欠損創にbFGF含浸CGSを用いると、真皮様組織の形成に要する日数が従来の 1/2 から 1/3 に短縮した。この時のbFGF含浸濃度は 7µg/cm²が最も効果が高く 14µg/cm²、50µg/cm²がこれに次いだ。 この結果を受け、ヒト難治性潰瘍モデルとして遺伝的糖尿病マウスの大転子部に圧力を付加して作成した褥瘡を用いてbFGF含浸CGSの有効性を検討した。まず、in vitroでbFGFがCGSに吸着されCGSの溶解に従い持続的に放出されることを確認した。次に褥瘡モデルに生理食塩水およびbFGF (7、14、28、50 µ g/cm²) を含浸させたCGSを貼付し、1 週間後および 2 週間後に創面積、上皮進展距離、新生血管面積の評価を行った。全評価項目でbFGF14 µ g/cm²含浸群は対照群よりもすぐれており、7µg/cm²群がこれに次いだ。本研究で、CGSとbFGFの併用療法の有効性が示されたことが、新規人工真皮としてのCGSの医師主導治験実施につながった。 以上の研究は新規人工真皮に含浸する bFGF の有効性とその濃度設定に貢献し難治性皮膚潰瘍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 2 4 年 3 月 2 7 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、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			