

# 学 位 論 文 要 旨

氏 名          黒柳 美里



論 文 題 目

Development of cultured dermal substitute composed of hyaluronic acid and collagen spongy sheet containing fibroblasts and epidermal growth factor

(ヒアルロン酸とコラーゲンのスポンジ状シートに線維芽細胞と上皮成長因子を含有した培養真皮の開発)

指 導 教 授 承 認 印

東京正明



## Development of cultured dermal substitute composed of hyaluronic acid and collagen spongy sheet containing fibroblasts and epidermal growth factor

(ヒアルロン酸とコラーゲンのスポンジ状シートに線維芽細胞と上皮成長因子を含有した培養真皮の開発)

氏名 黒柳 美里

### 【緒言】

創傷治療の基本は、創傷治癒過程が順調に進む環境を創成することである。様々な細胞が細胞成長因子を産生し相互に刺激を与えながら損傷した皮膚組織を再生する。この細胞成長因子の作用が破綻した場合に治癒が遅延して慢性潰瘍となる。第1の方法は、創傷被覆材を創傷面に貼付する治療法である。第2の方法は、細胞成長因子を創傷部位に局所投与する治療法である。細胞成長因子製剤を水溶液に溶かしてスプレーで連日噴霧し、その上に創傷被覆材を貼付する。細胞成長因子を毎日投与するため、創傷被覆材も毎日交換する必要があるため効率性の低い治療法である。第3の方法は、細胞成長因子含有創傷被覆材を創傷面に貼付する治療法であり約1週間継続して貼付できるため効率性を向上できる。第4の方法は、培養した皮膚由来の細胞を生体材料と組み合わせた皮膚代替物を創傷部位に約1週間貼付する治療法である。他人の皮膚由来の線維芽細胞を生体材料と組み合わせて製造する同種培養真皮は、線維芽細胞成長因子の他に、血管内皮成長因子 (VEGF) や肝細胞成長因子 (HGF) などの血管新生因子を産生放出することにより治癒を促進する効果がある。通常、同種培養真皮を創傷面に貼付した上に適切な被覆材を併用する。この被覆材に培養真皮の活性を積極的に高める機能を付与することにより、より優れた治療が可能となる。第4の方法をさらに改良した治療法の確立を目指して、本研究では上皮成長因子 (EGF) 含有の被覆材積層型培養真皮を開発した。

### 【実験】

#### ① ヒアルロン酸 (HA) とコラーゲン (Col) を基材とした被覆材積層型培養真皮の製造

分子間架橋剤を混合した高分子量 HA 水溶液を凍結真空乾燥してスポンジ状シートを製造した。このスポンジ状シートを蒸留水でリンスして未反応架橋剤を除去した。高分子量 HA 水溶液、低分子量 HA 水溶液、熱変性 Col 水溶液を等量混合した水溶液を調製し、リンスしたスポンジ状シートの上層に分注し、凍結真空乾燥により2層性のスポンジ状シートを製造した。分子間架橋 HA スポンジを下層、Col を含有したスポンジを上層とした。上層表面に UV 照射を行い Col 分子間に架橋を導入して被覆材積層型培養真皮の基材 (I 群) を製造した。高分子量 HA 水溶液、低分子量 HA 水溶液、熱変性 Col 水溶液を等量混合した水溶液に EGF を配合し、同様の方法で EGF 含有基材 (II 群) を製造した。通常の2倍濃度の培養液を使用してウシ胎児血清非含有の線維芽細胞浮遊液を調製し、1%コラーゲン水溶液と等量混合して容器に分注し、分子間架橋 HA スポンジ層を下にして基材を浸漬し、37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件でゲル化して培養真皮を製造した。

#### ② 被覆材積層型培養真皮の機能評価

培養真皮を製造後、医療機関への輸送ならびに手術日までの保存時間が実質的な研究課題である。効果を維持できる保存時間を調べる目的で培養真皮製造後、1日、3日、5日間保存した後に空気と培養液の界面に設置して創傷面貼付モデルを構築し、37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件で6日間培養した (6日間創傷面に貼付したモデル)。MTT assay を用いて細胞代謝活性、ELISA を用いて VEGF と HGF の産生量を測定した。

### 【結果と考察】

培養真皮を製造する際に、ウシ胎児血清を含有した培養液を使用すれば保存時間を延ばすことが可能である。しかしながら、コラーゲンゲル内に含まれたウシ胎児血清をリンス操作で除去することは容易ではない。そのゆえ、本研究ではウシ胎児血清を含有しない培養液を使用して培養真皮を製造した。この条件下では線維芽細胞の機能を長時間維持することは容易ではない。そこで、本研究では培養真皮の基材の上層に含有した EGF が線維芽細胞の機能保持にどのように寄与するかを調べた。培養真皮を製造して 1 日、3 日、5 日間保存した後に創傷面貼付モデルを構築して 6 日間培養した条件では、EGF を含有していない培養真皮（I 群）と比較し EGF を含有した培養真皮（II 群）は、高い細胞代謝活性と高い VEGF および HGF 産生能を示した。これは、基材に含まれる EGF の効果である。II 群において、1 日および 3 日間保存した培養真皮に比べて、5 日間保存した培養真皮は細胞代謝活性の低下が観察された。しかし、I 群よりも高い値を保持していた。II 群において、VEGF 産生量に関しては、5 日間保存しても VEGF の産生量の低下は観察されなかった。一方、HGF の産生量に関しては、5 日間保存した場合は HGF の産生量の低下が観察された。しかし、I 群よりも高い値を保持していた。被覆材積層型培養真皮は、臨床使用する日程に合わせて製造する。製造後 3～5 日以内であれば効果を維持できることから遠距離輸送が可能と考えられる。しかも、リンス操作を必要としないので高い細胞活性を維持した状態で臨床使用が可能である。