

学位論文

「Potential of wound dressing composed of hyaluronic acid  
containing epidermal growth factor to enhance cytokine  
production by fibroblasts」

(EGF 含有ヒアルロン酸創傷被覆材の有効性：  
線維芽細胞のサイトカイン産生能促進効果)

DM10031 山本 昭子

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程  
医療工学群 再生組織工学  
指導教授 黒柳 能光

## 著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

## 要旨(和文)

### 【背景】

熱傷や難治性皮膚潰瘍の治療に多くの創傷被覆材が使用されている。また、上皮成長因子(EGF)や塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)のような細胞成長因子の凍結真空乾燥製剤も使用されている。凍結真空乾燥された細胞成長因子製剤は、臨床使用前に専用の溶解液に溶解後、冷蔵庫で保存し、調製後一定期間内に使用しなければならない。細胞成長因子の水溶液を毎日創面にスプレー式に投与し、市販の創傷被覆材をトップドレッシング材として使用する。この際に、創面に投与した細胞成長因子の水溶液の一部がトップドレッシング材に吸収されてしまう欠点がある。また、難治性皮膚潰瘍の創面には過剰なタンパク分解酵素が存在しているため、細胞成長因子の水溶液をスプレー式に局所投与しても早期に失活してしまう欠点がある。このような状況を改善する目的で、創傷治癒能力のあるヒアルロン酸(HA)のスポンジ状シートに EGF を含有した創傷被覆材を開発した。HA は特有の吸湿性、流動性そして粘弾性特性を持つため、創傷治癒に重要な生体材料である。高分子量 HA は優れた創傷治癒環境を与え、低分子量 HA は血管新生を誘導する。EGF は角化細胞の他に、線維芽細胞と血管内皮細胞の増殖を促進する。EGF は線維芽細胞を刺激し、血管内皮成長因子(VEGF)と肝細胞成長因子(HGF)の産生量を増大させる。VEGF と HGF は血管新生を促進する有力なサイトカインである。VEGF は血管内皮細胞の増殖を促進する。一方、HGF は血管新生に加えて上皮化に関わる重要なサイトカインの一つであると考えられる。最近の研究では、VEGF と HGF の同時投与は、VEGF と HGF の単独投与に比べて、新しい血管形成を相乗的に促進することが実証されている。

本研究では、HA のスポンジ状シートに EGF、アルギニン(Arg)、リン酸アスコルビル Mg(VC 誘導体: VC)を含有した新規創傷被覆材の開発を目的とする。コラーゲンゲル内にヒト線維芽細胞を組み込んだ培養真皮を培養液と空気の界面に設置して創傷面モデルを構築し、その上に新規創傷被覆材を貼付して、線維芽細胞からのサイトカイン産生能を指標として新規創傷被覆材の有効性を調べた。

### 【方法】

#### 1) 新規創傷被覆材の作製方法

本創傷被覆材は2層性のスポンジ構造である。上層は分子間架橋した高分子量 HA から成り、下層は生理活性物質を含有した低分子量 HA から成る。分子間架橋剤(エチレングリコールジグリシジルエーテル)を含有した高分子量 HA 水溶液(pH 4.0)をトレーに分注し、その上に Arg、VC を含有した低分子量 HA 水溶液(pH 10.5)を分注し、凍結真空乾燥により2層性の創傷被覆材(EGF 非含有群)を作製した。同様な方法で EGF、Arg、VC を含有した創傷被覆材(EGF 含有群)を作製した。高分子量 HA と架橋剤の比率を 10:1 および 20:1 に設定した。10:1 の EGF 非含有群をⅠ群、10:1 の EGF 含有群をⅡ群、20:1 の EGF 非含有群をⅢ群、20:1 の EGF 含有群をⅣ群とした。得られた創傷被覆材は 110℃、1 時間の条件で乾熱滅菌を行った。

#### 2) 培養真皮中の線維芽細胞によるサイトカイン産生に及ぼす創傷被覆材の効果(実験1)

コラーゲンゲルにヒト線維芽細胞を組み込んだ培養真皮を作製し、空気と培養液の界面に設置して創傷面モデルを構築し、その上に各創傷被覆材を貼付し、37℃、5%CO<sub>2</sub>条件で1週間培養した。

また、創傷被覆材を貼付しないものを対照群とした。1週間培養後、MTT assay を用いて細胞代謝活性、ELISA を用いて VEGF と HGF 産生量を測定した。

### 3) 創傷被覆材に含まれる EGF の効果の持続性 (実験 2)

コラーゲンゲルにヒト線維芽細胞を組み込んだ培養真皮を作製し、空気と培養液の界面に設置して創傷面モデルを構築し、その上に各創傷被覆材を貼付し、37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件で 3 日間培養した (第 1 期培養)。その後、各創傷被覆材を回収して他の培養真皮上に再貼付し、さらに 37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件で 3 日間培養した (第 2 期培養)。創傷面モデルにおける EGF 含有創傷被覆材の効果の持続性は、MTT assay を用いた細胞代謝活性および ELISA を用いた VEGF と HGF 産生量測定により評価した。

## 【結果】

### 1) 新規創傷被覆材の作製方法

所定量の分子間架橋剤を含有した高分子量 HA 水溶液は高い粘度を示した。一方、生理活性物質を含有した低分子量 HA 水溶液は低い粘度を示した。そのため、高粘度の高分子量 HA 水溶液の上に低粘度の低分子量 HA 水溶液を容易に分注することができた。2 層状態の水溶液を凍結し、真空乾燥する手法により 2 層性のスポンジ状シートを作製できた。使用する際には表裏を反転する。走査型電子顕微鏡より本創傷被覆材が 2 層構造であることを確認した。上層は架橋した高分子量 HA スポンジ層であり、下層は Arg、VC あるいは EGF、Arg、VC を含有した低分子量 HA スポンジ層である。

### 2) 培養真皮中の線維芽細胞によるサイトカイン産生に及ぼす創傷被覆材の効果

細胞代謝活性に関しては、EGF 非含有群 (Ⅰ群とⅢ群) は被覆材を貼付しない対照群と比べて差はみられなかった。このことから架橋剤による細胞毒性がないことが示唆された。EGF 含有群 (Ⅱ群とⅣ群) は EGF 非含有群 (Ⅰ群とⅢ群) と比べて高い細胞代謝活性を示した。この結果から乾熱滅菌後も EGF の活性が保持されていることが示唆された。VEGF 産生量に関しては、Ⅱ群はⅠ群と比較して 6.4 倍、Ⅳ群はⅢ群と比較して 4.1 倍の産生量を示した。HGF 産生量に関しては、Ⅱ群はⅠ群と比較して 5.8 倍、Ⅳ群はⅢ群と比較して 4.0 倍の産生量を示した。これらの結果は EGF 含有創傷被覆材が VEGF と HGF 産生量を効果的に増加させたことを示している。EGF 含有群 (Ⅱ群とⅣ群) においては、VEGF の産生量は約 1ng/mL に対して HGF の産生量は約 20ng/mL であった。HGF は、血管新生促進効果と表皮形成促進効果があるので創傷治癒促進に大きく寄与する。

### 3) 創傷被覆材に含まれる EGF の効果の持続性

VEGF 産生量において第 1 期培養では、Ⅳ群はⅢ群と比較して 4.1 倍の産生量を示し、さらに第 2 期培養では、Ⅳ群はⅢ群と比較して 5.4 倍の産生量を示した。HGF 産生量において第 1 期培養では、Ⅳ群はⅢ群と比較して 3.5 倍の産生量を示し、さらに第 2 期培養では、Ⅳ群はⅢ群と比較して 3.5 倍の産生量を示した。これらの結果は、創傷被覆材を置きかえた後の第 2 期培養においても EGF 含有創傷被覆材は VEGF と HGF 産生量を効果的に増大させたことを示している。すなわち、高度に水和した架橋高分子 HA スポンジ状シート内に有効濃度の EGF が保持されていたことを示している。

## 【考察】

本研究において、2層性のEGF含有創傷被覆材を凍結真空乾燥1回で製造する方法を考案した。架橋した高分子量HA水溶液(pH 4.0)をトレーに分注し、その上にArg等を含有した低分子量HA水溶液(pH 10.5)を分注し、凍結真空乾燥により2層構造スポンジシートを作製した。架橋剤は、酸性pH条件下ではHAのカルボキシル基と反応するが、塩基性pH条件下ではHAのカルボキシル基が解離した状態のため反応しない。これにより、低分子量HAのほとんどは未架橋な状態となる。なお、酸性の高分子量HA水溶液と塩基性の低分子量HA水溶液は混合するとpH中性になるためスポンジシート全体ではpH中性の特性をもつように設計されている。

実験1において、HAと架橋剤の比率を変えることにより、スポンジシートの含水時における特性を調べた。EGF非含有群(Ⅰ群とⅢ群)と比較して、EGF含有群(Ⅱ群とⅣ群)は、培養真皮中の線維芽細胞からのVEGFとHGFの産生量を顕著に増加した。Ⅱ群とⅣ群においては顕著な差はみられなかった。このことは、架橋剤の比率が10:1あるいは20:1の条件で製造した分子間架橋高分子量HAスポンジシートは、水和した状態でEGFを保持できることを示している。

実験2において、架橋剤の比率が低い20:1の条件で製造したEGF非含有創傷被覆材(Ⅲ群)とEGF含有創傷被覆材(Ⅳ群)を用いて、EGFの効果の持続性を調べた。EGF含有創傷被覆材は第1期培養と第2期培養の両方において、EGF非含有創傷被覆材と比較して、VEGFとHGF産生量を増大した。これらの結果により、架橋高分子量HAから成る高度に水和した層にEGFが有効濃度残存していたことが示唆された。

培養真皮を用いた創傷面モデルにおけるEGFとVCの相乗効果は既に当研究室の先行研究で報告している。さらにラットを用いた動物実験におけるEGF含有創傷被覆材の治癒促進効果も当研究室の先行研究で解明している。これらの知見を基にして、本研究では、分子間架橋高分子量HAからなる上層と未架橋低分子量HAからなる下層の2層性のスポンジ状シートを設計し、下層にEGF、Arg、VCを含有した新規創傷被覆材を開発した。この創傷被覆材は、創傷面モデルを用いた培養系の実験において、少なくとも6日間はEGFを有効濃度で保持していることを実証した。

## 【結論】

創傷面モデルを用いた培養系の実験より、EGF含有創傷被覆材は、少なくとも6日間EGFを有効濃度に保持し、線維芽細胞からの血管新生因子であるVEGFとHGFの産生能を高める効果を持つことが確認できた。このことから、EGF含有創傷被覆材は、現在臨床で用いられている細胞成長因子製剤の使用法、すなわち細胞成長因子の水溶液を毎日患部に使用する方法を簡素化することが可能となり、有効な治療法を提供することができる。

## 目次

1. 序論	1
2. 材料と方法	
2-1. 各種溶液の調製法	3
2-1-1. pH 緩衝溶液 (Hanks 液)	3
2-1-2. 線維芽細胞培養液 (DMEM+10%FBS)	4
2-1-3. 細胞剥離酵素溶液 (0.5%Trypsin 溶液)	4
2-1-4. 2 倍濃度の線維芽細胞培養液 (DMEM+20%FBS)	5
2-1-5. 1%コラーゲン水溶液	5
2-2. 新規創傷被覆材の作製	6
2-3. 培養真皮中の線維芽細胞によるサイトカイン産生に及ぼす創傷被覆材の効果 (実験 1)	7
2-3-1. MTT アッセイ法による細胞代謝活性の測定法	9
2-3-2. ELISA 法による細胞成長因子産生量の測定法	10
2-4. 創傷被覆材に含まれる EGF の効果の持続性 (実験 2)	13
2-5. 統計学的処理	14
3. 結果	
3-1. 新規創傷被覆材の作製	14
3-2. 培養真皮中の線維芽細胞によるサイトカイン産生に及ぼす創傷被覆材の効果 (実験 1)	14
3-3. 創傷被覆材に含まれる EGF の効果の持続性 (実験 2)	15
4. 考察	16
5. 総括	18
6. 今後の課題	18
7. 謝辞	19
8. 引用文献	20
9. 業績目録	23
10. 図表	24

## 1. 序論

皮膚欠損部を被覆して治癒を促進する機能をもつ人工皮膚は、一般的に二つに大別される。その一つは、皮膚由来の細胞を使用したもので『培養皮膚代替物』とよばれる。他の一つは、創傷面を被覆する目的で開発されたもので、文字どおり『創傷被覆材』とよばれる<sup>1)</sup>。

前者の培養皮膚代替物には、表皮由来の角化細胞を重層化した「培養表皮」、真皮由来の線維芽細胞を生体材料に組み入れた「培養真皮」、培養真皮の上に角化細胞を重層化した「培養皮膚」がある<sup>2)</sup>。患者自身の角化細胞を使用した自家培養表皮と他人由来の角化細胞と線維芽細胞を使用した同種培養皮膚が米国で市販されている。我が国においても自家培養表皮が市販されるようになり、皮膚再生医療への期待が高まっている。

後者の創傷被覆材には、合成高分子を使用した製品と天然高分子を使用した製品があり、さらに、両者を組み合わせた製品もある。合成高分子の代表例としては、伸縮性に優れたポリウレタンが使用されている。天然高分子の代表例としては、植物由来のセルロースの誘導体や海藻由来のアルギン酸が使用されている。これらの材料は吸水能力が優れており、滲出液を適度に吸収して創傷面の湿潤環境を保持する特徴をもっている。

難治性皮膚潰瘍や熱傷潰瘍の治療には、感染を抑制することの他に、もう一つ重要な機能が求められる。たとえば、糖尿病や血管壊疽に起因する慢性皮膚潰瘍は、病的な因子により肉芽組織形成が抑制される。そこで、線維芽細胞の増殖と血管新生を促進し、さらに表皮形成を促進する治療法が注目されている。その一つが、細胞成長因子の局所投与である。現在、難治性皮膚潰瘍や熱傷潰瘍の治療薬として、中国や韓国では上皮成長因子(EGF)、日本では塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)のような細胞成長因子の凍結真空乾燥製剤が市販されている。凍結真空乾燥された細胞成長因子製剤は、臨床使用前に専用の溶解液に溶解後、冷蔵庫で保存し、調製後一定期間内に使用しなければならない。細胞成長因子の水溶液を毎日創面にスプレー式に投与し、市販の創傷被覆材をトップドレッシング材として使用する。細胞成長因子の水溶液は毎日投与する必要がある、その都度、トップドレッシングの交換が必要となる。この際に、創面に投与した細胞成長因子の水溶液の一部がトップドレッシング材に吸収されてしまう欠点がある。また、難治性皮膚潰瘍の創面には過剰なタンパク分解酵素が存在しているため、細胞成長因子の水溶液をスプレー式に局所投与しても早期に失活してしまう欠点がある。さらに、bFGF 製剤の溶解液中に存在する防腐剤である塩化ベンザルコニウムは、角化細胞や線維芽細胞に細胞毒性があることも報告されている<sup>3, 4)</sup>。

このような状況を改善する目的で、ヒアルロン酸(HA)やコラーゲン(Co1)のような創傷治癒能力のある生体材料を基材としたスポンジ状シートにあらかじめ特殊なアミノ酸や細胞成長因子を複合した創傷被覆材の開発を進めている<sup>5-14)</sup>。「細胞成長因子含有創傷被覆材」は、血管新生を伴う肉芽組織形成と表皮形成を促進させる能力を付与したものであり、これも創傷治癒の機序を念頭においた設計である。特に、難治性皮膚潰瘍の創面には過剰なタンパク分解酵素が存在しているため、細胞成長因子の水溶液をスプレー式に局所投与しても早期に失活してしまう。これに対して、HAを基材とした細胞成長因子含有創傷被覆材は、溶出したHAが多量の結合水を含んだ水和層を形成してタンパク分解酵素の接近を抑制する。これによ

り細胞成長因子の活性は一定期間保持される。このような材料特性を生かした設計が、細胞成長因子の水溶液をスプレー式に局所投与する方法と大きく異なる点である<sup>15)</sup>。

本研究では、HAを基材としたスポンジ状シートにEGF、アルギニン(Arg)、リン酸アスコルビルMg(VC誘導体：VC)を含有した新規の細胞成長因子含有創傷被覆材を開発した。

HAは生体における主要な細胞外マトリックス成分である。HAは特有の吸湿性、流動性および粘弾性特性を有するため、創傷治癒に重要な生体材料である<sup>16, 17)</sup>。高分子量HAは優れた創傷治癒環境を与え、低分子量HAは血管新生を誘導する<sup>18-20)</sup>。生体外から適用するHAの有効性は広く認識されており、HAの応用は有効な組織工学製品の開発に結びつく。

EGFは角化細胞の他に、線維芽細胞と血管内皮細胞の増殖を促進する。EGFは角化細胞の遊走を刺激し、また肉芽組織形成を促進するため線維芽細胞と血管内皮細胞を刺激する<sup>21-25)</sup>。EGFは線維芽細胞を刺激し、血管内皮成長因子(VEGF)と肝細胞成長因子(HGF)の産生量を増大させる<sup>9, 11-14, 26)</sup>。VEGFとHGFは血管新生を促進する有力なサイトカインである。VEGFは血管内皮細胞の増殖を促進する。一方、HGFは肝細胞に加え、上皮細胞や血管内皮細胞の増殖を促進する。すなわち、HGFは血管新生に加えて上皮化に関わる重要なサイトカインの一つであると考えられる。最近の研究では、VEGFとHGFの同時投与は、VEGFとHGFの単独投与に比べて、新しい血管形成を相乗的に促進することが実証されている<sup>27)</sup>。

Argは、一酸化窒素(NO)産生の主要な基質である。NOは*in vitro*において、血管内皮細胞や角化細胞の増殖を刺激することが報告されている<sup>28, 29)</sup>。これらの報告は、Arg由来のNOが創傷治癒に有用であることを示している<sup>30)</sup>。また、我々の先行研究でArgが血管新生と表皮形成を促進することを実証した<sup>5-7)</sup>。

リン酸アスコルビルMg(VC誘導体：VC)は、コラーゲン合成を促進し、抗炎症作用を有する<sup>31)</sup>。また、VCの抗酸化作用により、NOは酸素フリーラジカルによる不活化から保護され、NO産生を促進することが報告されている<sup>32)</sup>。このことより、VCとArgを併用することでさらなる治癒効果が期待できる。その他にも、VCはEGFによる線維芽細胞のHGF産生能促進を増強することが報告されている<sup>14, 33)</sup>。このことより、VCとEGFを併用することでさらなる治癒効果も期待できる。

本研究では、HAを基材としたスポンジ状シートにEGF、Arg、VCを含有した新規創傷被覆材の開発を目的とする。コラーゲンゲル内にヒト線維芽細胞を組み込んだ培養真皮を培養液と空気の界面に設置して創傷面モデルを構築し、その上に新規創傷被覆材を貼付して、線維芽細胞からのサイトカイン産生能を指標として新規創傷被覆材の有効性を調べた。創傷面モデルを用いた評価系は、生体内の状態を反映したモデルであり、従来のフラスコ培養に比べ、より生体内に近い環境で評価することが可能となる。



## 2. 材料と方法

### 2-1. 各種溶液の調製法

#### 2-1-1. pH 緩衝溶液 (Hanks 液) : 1 L の調製法

- ① 1L ガラス瓶の口の部分をアルミ箔で封じ、乾熱滅菌機（三洋電機株式会社，大阪）にて 200℃、2 時間の滅菌処理を行った。また、プラスチック製の蓋を滅菌パックに封入し、オートクレーブ（株式会社トミー精工，東京）にて 121℃、20 分の滅菌処理を行った。
- ② 蒸留水 (DW) 1L をメスシリンダーにて計量し、ビーカーに入れ、以下の各種薬剤をマグネティックスターラーで攪拌しながら溶解した。
  - ・ NaCl (=58.44 ; ナカライテスク株式会社，京都) : 8g
  - ・ KCl (=74.55 ; ナカライテスク株式会社，京都) : 0.4g
  - ・ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>12H<sub>2</sub>O (=358.14 ; ナカライテスク株式会社，京都) : 0.121g
  - ・ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (=136.09 ; ナカライテスク株式会社，京都) : 0.06g
  - ・ Glucose (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>12</sub>=180.16 ; 和光純薬工業株式会社，大阪) : 1.00g
  - ・ NaHCO<sub>3</sub> (=84.01 ; 和光純薬工業株式会社，大阪) : 0.35g
  - ・ Hepes (C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S=238.31 ; 株式会社同仁化学研究所，熊本) : 4.766g
  - ・ 0.2%Phenol Red : 2.5mL
- ③ 完全に溶解した後、2N-NaOH を用いて pH7.40 に調整した。
- ④ 調製した溶液及び滅菌瓶・蓋をクリーンベンチ内に入れ、以下の操作を無菌的に実施した。
- ⑤ 滅菌用フィルター (Nalgen Nunc international, USA) を滅菌したガラス瓶の口に載せ、メスシリンダーを用いてフィルターに溶液を 1L 注ぎ、アスピレーターによる瓶内部を陰圧にすることによりろ過滅菌を行った。
- ⑥ ガラス瓶から溶液の少量をシャーレ (BD Falcon, USA) に採取し、37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下のインキュベータ（三洋電機株式会社，大阪）で 1 週間保存し、1 週間後に位相差顕微鏡 (CK2 ; オリンパス株式会社，東京) 下で汚染が無いか確かめた。
- ⑦ Antibiotec-Antimycotic 液 (peniciline G sodium 10,000 units/ml, streptomycin sulfate 10,000 μg/ml, amphotercin B 25 μg/ml ; Invitrogen Corporation, USA) をピペットを用いて 10mL 添加した。
- ⑧ 調製後、4℃で冷蔵保存した。

### 2-1-2. 線維芽細胞培養液 (DMEM+10%FBS) : 1 L の調製法

- ① 1L ガラス瓶の口の部分をアルミ箔で封じ、乾熱滅菌機にて 200℃、2 時間の滅菌処理を行った。また、プラスチック製の蓋を滅菌パックに封入し、オートクレーブにて 121℃、20 分の滅菌処理を行った。
- ② DW 1L をメスシリンダーにて計量し、ビーカーに入れ、以下の各種薬剤をマグネティックスターラーで攪拌しながら溶解した。
  - ・ Hepes : 4.766g
  - ・ NaHCO<sub>3</sub> : 0.84g
  - ・ Dulbecco's Modified Eagle Medium Powder (high glucose, with L-glutamine, with pyridoxine hydrochloride, without sodium pyruvate, without sodium bicarbonate ; Invitrogen Corporation, USA) : 1pack
- ③ 完全に溶解した後、2N-NaOH を用いて pH7.40 に調整した。
- ④ 調製した溶液及び滅菌瓶・蓋をクリーンベンチ内に入れ、以下の操作を無菌的に実施した。
- ⑤ 滅菌用フィルターを滅菌したガラス瓶の口に載せ、メスシリンダーを用いてフィルターに溶液を 1L 注ぎ、アスピレーターによる瓶内部を陰圧にすることによりろ過滅菌を行った。
- ⑥ FBS (Fetal Bovine Serum ; JRH Biosciences, USA) をピペットを用いて 100mL 添加した。
- ⑦ ガラス瓶から溶液の少量をシャーレに採取し、37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下のインキュベータで 1 週間保存し、1 週間後に位相差顕微鏡下で汚染が無いか確かめた。
- ⑧ Antibiotec-Antimycotic 液をピペットを用いて 10mL 添加した。
- ⑨ 調製後、4℃で冷蔵保存した。

### 2-1-3. 細胞剥離酵素溶液 (0.5%Trypsin 溶液) : 100mL の調製法

- ① 100mL ガラス瓶の口の部分をアルミ箔で封じ、乾熱滅菌機にて 200℃、2 時間の滅菌処理を行った。また、プラスチック製の蓋を滅菌パックに封入し、オートクレーブにて 121℃、20 分の滅菌処理を行った。
- ② pH7.40 に調整した Hanks 液 100mL をビーカーに入れ、以下の各種薬剤をマグネティックスターラーで攪拌しながら溶解した。
  - ・ Trypsin (Invitrogen Corporation, USA) : 0.5g
  - ・ EDTA-3Na (C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>8</sub>=412.24 ; 株式会社同仁化学研究所, 熊本) 1mM : (0.412g/1L=0.0412g/mL)
- ③ 調製した溶液及び滅菌瓶・蓋をクリーンベンチ内に入れ、以下の操作を無菌的に実施した。
- ④ 滅菌用フィルターを滅菌したガラス瓶の口に載せ、メスシリンダーを用いてフィルターに溶液を 100mL 注ぎ、アスピレーターによる瓶内部を陰圧にすることによりろ過滅菌を行った。

- ⑤ ガラス瓶から溶液の少量をシャーレに採取し、37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下のインキュベータで1週間保存し、1週間後に位相差顕微鏡下で汚染が無いか確かめた。
- ⑥ Antibiotec-Antimycotic 液をピペットを用いて 1mL 添加した。
- ⑦ 調製後、4℃で冷蔵保存した。

#### 2-1-4. 2 倍濃度の線維芽細胞培養液 (DMEM+20%FBS) : 500mL の調製法

- ① 500mL ガラス瓶の口の部分をアルミ箔で封じ、乾熱滅菌機にて 200℃、2 時間の滅菌処理を行った。また、プラスチック製の蓋を滅菌パックに封入し、オートクレーブにて 121℃、20 分の滅菌処理を行った。
- ② DW 500mL をメスシリンダーにて計量し、ビーカーに入れ、以下の各種薬剤をマグネティックスターラーで攪拌しながら溶解した。
 

・ Hepes	: 4.766g
・ NaHCO <sub>3</sub> (=84.01 ; 和光純薬工業株式会社, 大阪)	: 0.84g
・ Dulbecco's Modified Eagle Medium Powder	: 1pack
- ③ 完全に溶解した後、2N-NaOH を用いて pH7.40 に調整した。
- ④ 調製した溶液及び滅菌瓶・蓋をクリーンベンチ内に入れ、以下の操作を無菌的に実施した。
- ⑤ 滅菌用フィルターを滅菌したガラス瓶の口に載せ、メスシリンダーを用いてフィルターに溶液を 500mL 注ぎ、アスピレーターによる瓶内部を陰圧にすることによりろ過滅菌を行った。
- ⑥ FBS をピペットを用いて 100mL 添加した。
- ⑦ ガラス瓶から溶液の少量をシャーレに採取し、37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下のインキュベータで1週間保存し、1週間後に位相差顕微鏡下で汚染が無いか確かめた。
- ⑧ Antibiotec-Antimycotic 液をピペットを用いて 10mL 添加した。
- ⑨ 調製後、4℃で冷蔵保存した。

#### 2-1-5. 1%コラーゲン (Col) 水溶液 : 300mL の調製法

- ① Col 粉末 (医療用ブタ皮膚製コラーゲン、Type I collagen ; 日本ハム株式会社, 大阪) 3g を滅菌パックに入れ、24 時間真空引きを行うことにより、Col 粉末中の水分を除去した。
- ② 121℃、2 時間の条件で滅菌を行った。
- ③ 500mL のガラス瓶に DW 300mL とマグネティックスターラーの攪拌子をいれ、121℃、20min の条件で高圧蒸気滅菌を行い、室温に戻した。
- ④ 滅菌した DW に滅菌した Col 粉末をクリーンベンチ内で無菌的に加え、マグネティックスターラーで攪拌し、1%Col 水溶液を調製し、遮光して 4℃で保存した。

## 2-2. 新規創傷被覆材の作製

- ① ステンレスタンクに蒸留水(DW)2Lを入れ、攪拌機で一晩攪拌しながら高分子量ヒアルロン酸(HMW-HA)(バイオヒアルロン酸ナトリウム HA20:分子量 2,000 kDa;株式会社資生堂, 東京) 20gを溶解し、1%HMW-HA水溶液を調製した(pH 6.8)。
- ② ①で作製した1%HMW-HA水溶液のうち1Lを別のステンレスタンクに移し、10倍希釈HClによりpH4.0に調整した。
- ③ 分子間架橋剤である水溶性エポキシ化合物(EX810)(エチレングリコールジグリシジルエーテル; ナガセ化成, 大阪) 1.0gをDW 2mLと混合し、1%HMW-HA水溶液に加え攪拌した。
- ④ 50mL シリンジ(テルモ株式会社, 東京)を用いて、③で調製した1%HMW-HA水溶液 20mLを5cm×8cmプラスチックトレーに分注した。
- ⑤ 乾熱滅菌器(MOV-212S: 三洋電機株式会社, 大阪)を用いて50℃、1時間静置し、架橋反応の促進と水溶液の濃縮を行った後、4℃で1時間冷却した。
- ⑥ ①で調製した残りの1%HMW-HA水溶液 1Lをオートクレーブ(High-Pressure Sterilizer BS-245: 株式会社トミー精工, 東京)で120℃、1時間処理して部分的加水分解を行い、LMW-HA(分子量 150KDa; 粘度測定)水溶液を調製した。
- ⑦ DW20mLにアルギニン(Arg)(L-アルギニン; 純正化学株式会社, 東京) 1gを溶解し、Arg水溶液を調製した。
- ⑧ DW20mLにビタミンC誘導体(VC)(リン酸L-アスコルビル Mg; 昭和電工株式会社, 東京) 1gを溶解し、VC水溶液を調製した。
- ⑨ Arg水溶液 20mLとVC水溶液 20mLを⑥で調製したLMW-HA水溶液 1Lに注ぎ混合し、2N-NaOHによりpH10.5に調整後、4℃で1時間冷却した。
- ⑩ ⑨で調製したLMW-HA混合水溶液の内、500mLを別のステンレスタンクに移し、50mLシリンジを用いて、20mLを⑤の1%HMW-HA水溶液が入ったプラスチックトレーに静かに分注した。
- ⑪ 4℃で2時間冷却後、-85℃のディープフリーザー(三洋電機株式会社, 大阪)で急速凍結し、凍結真空乾燥機(Labconco Corporation, USA)で凍結真空乾燥処理を3日間行い、2層性スポンジ状シートのⅠ群(10:1 EGF非含有創傷被覆材)を作製した。
- ⑫ DW10mLにEGF(rh-EGF; Shanghai Haohai Biological Technology Co., Ltd, China) 1000μgを溶解し、EGF水溶液を調製した。
- ⑬ ⑨で調製したLMW-HA混合水溶液の残りの500mLにEGF水溶液 10mLを注ぎ混合し、同様の方法によりⅡ群(10:1 EGF含有創傷被覆材)を作製した。
- ⑭ 水溶性エポキシ化合物(EX810) 0.5gをDW 2mLと混合した溶液を使用し、①～⑬の操作と同様な方法で、Ⅲ群(20:1 EGF非含有創傷被覆材)とⅣ群(20:1 EGF含有創傷被覆材)を作製した。

\* 10:1と20:1は高分子量HA水溶液とEX810の比率を示している。

- ⑮ 得られたⅠ～Ⅳ群の創傷被覆材をハイブリッド滅菌バック（株式会社ホギメディカル，東京）で包装し、乾熱滅菌器で 110℃、1 時間の条件で滅菌処理した。
- ⑯ Ⅲ群の創傷被覆材の架橋高分子量 HA スポンジ層の表面、Arg、VC を含有した低分子量 HA スポンジ層の表面、2 層構造スポンジの断面を走査型電子顕微鏡で観察した。

【各成分の含有量：実際の単位は  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  であるがスポンジ状シート表面  $1\text{cm}^2$  あたりで表示】

- ・ EGF :  $1\mu\text{g}/\text{cm}^2$
- ・ Arg :  $500\mu\text{g}/\text{cm}^2$
- ・ VC :  $500\mu\text{g}/\text{cm}^2$

### 2-3. 培養真皮中の線維芽細胞によるサイトカイン産生に及ぼす創傷被覆材の効果（実験 1）

- ・ 凍結保存した細胞の解凍および  $175\text{cm}^2$  培養フラスコへの細胞播種
- ① 水を細胞解凍用の容器に五分目くらいまで入れ、 $-152^\circ\text{C}$  で凍結保存してある細胞保存チューブを入れて、軽くゆすりながら解凍した。
  - ② チューブ内の細胞浮遊液を予め Hanks 液を 10mL 加えた 50mL 遠沈管（住友ベークライト株式会社，東京）へ移した。
  - ③  $4^\circ\text{C}$ 、1500rpm、5min で遠心分離した。
  - ④ 遠心分離後、上清を吸引除去し、培養液（DMEM+10%FBS）を所定量（必要なフラスコ枚数 $\times$ 2mL）添加し、静かにピペッティングをしてよく攪拌した。
  - ⑤  $175\text{cm}^2$  培養フラスコ（BD Biosciences, USA）に各々培養液を 28mL 入れ、④の細胞浮遊液を 2mL ずつ添加した。
  - ⑥ フラスコ内の培養液が均一になるようにゆっくりと縦、横に揺らしながら攪拌した。
  - ⑦  $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$  条件下のインキュベータで 1 週間培養した。
- ・ 細胞継代
- ① 位相差顕微鏡下でフラスコ内のヒト線維芽細胞がコンフルエント状態になっていることを確認した。
  - ② 各フラスコ内の培養液を吸引除去した。
  - ③ 各フラスコに Hanks 液を 10mL 加えて洗浄し、吸引除去した。
  - ④ 0.5%Trypsin 溶液を 2mL 加えて 3～5 分間酵素処理し、細胞を剥がした。
  - ⑤ 位相差顕微鏡下で細胞が剥がれていることを確認した。
  - ⑥ 各フラスコに Hanks 液を所定量加えて攪拌し、フラスコ内の細胞浮遊液を 50mL 遠沈管に回収した。
  - ⑦  $4^\circ\text{C}$ 、1500rpm、5min で遠心分離した。
  - ⑧ 遠心分離後、上清を吸引除去し、培養液を所定量（必要なフラスコ枚数 $\times$ 2 mL）添加し、静かにピペッティングをしてよく攪拌した。
  - ⑨  $175\text{cm}^2$  培養フラスコに各々培養液を 28mL 入れ、⑧の細胞浮遊液を 2mL ずつ添加した。

- ⑩ フラスコ内の培養液が均一になるようにゆっくりと縦、横に揺らしながら攪拌した。
- ⑪ 37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下のインキュベータで1週間培養した。
  - ・ 細胞の採取
- ① 位相差顕微鏡下でフラスコ内のヒト線維芽細胞がコンフルエント状態になっていることを確認し、細胞写真を撮影した（倍率：40 倍）。
- ② 各フラスコ内の培養液を吸引除去した。
- ③ 各フラスコに Hanks 液を 10mL 加えて洗浄し、吸引除去した。
- ④ 0.5%Trypsin 溶液を 2mL 加えて 3～5 分間酵素処理し、細胞を剥がした。
- ⑤ 位相差顕微鏡下で細胞が剥がれていることを確認した。
- ⑥ 各フラスコに Hanks 液を所定量加えて攪拌し、フラスコ内の細胞浮遊液を 50mL 遠沈管に回収した。
- ⑦ 4℃、1500rpm、5min で遠心分離した。
- ⑧ 遠心分離後、上清を吸引除去し、培養液を所定量（フラスコ枚数×2 mL）添加し、静かにピペティングをしてよく攪拌した。
- ⑨ 細胞浮遊液を遠沈管のフタに少量採取し、血球計算盤を用いて位相差顕微鏡下で細胞数をカウントした。
- ⑩ 下記の式より、全細胞数と細胞密度を求めた。

全細胞数＝平均細胞数×10<sup>4</sup> cells/mL×細胞浮遊液量 mL

細胞密度＝平均細胞数×10<sup>4</sup> cells/mL×細胞浮遊液量 mL/フラスコ枚数/175cm<sup>2</sup>

・ 培養真皮作製

- ① 培養真皮 1 枚につき、以下の式を用いて細胞密度が 2×10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup> となるように細胞浮遊液を調製し、50mL 遠沈管チューブに回収し、4℃、1500rpm、5min で遠心分離した。

$$\text{細胞浮遊液量} = \frac{2 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2 \times 40 \text{ cm}^2}{\text{平均細胞数} \times 10^4 \text{ cell/mL}}$$

- ② 上清を吸引除去した後に、2 倍濃度培養液 (DMEM+20%FBS) を所定量加え軽く攪拌し、細胞浮遊液を作製した。
- ③ 50mL 遠沈管に 2 倍濃度培養液と無菌下で調製した 1%Col 水溶液を各々 12mL ずつ分注し、等量混合を行い、よく攪拌した。
- ④ 滅菌した 10cm×10cm のポリスチレンディッシュ（株式会社サンプラテック，大阪）内で予め滅菌したナイロンメッシュを入れた 8cm×5cm のプラスチックトレーに、③で調製した混合溶液を 24mL 分注した。

\* 2 倍濃度培養液と 1%Col 水溶液は、10℃以下に冷却しておき、混合操作は 10℃以下で行った。

- ⑤ 37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下のインキュベータで1日間静置してゲル化させた。
- ⑥ 翌日、線維芽細胞を組み込んだコラーゲンゲルを 10cm×10cm のポリスチレンディッシュへ移し、培養液を 50mL 添加し、37℃、5%CO<sub>2</sub> のインキュベータで6日間培養し、培養真

皮（8cm×5cm）を作製した。

- ・ 創傷面モデルを用いた新規創傷被覆材の有効性評価
- ① 滅菌した 10cm×10cm のポリスチレンディッシュに滅菌したステンレスメッシュを置き、その上に 4cm×5cm に裁断した培養真皮を載せた。培養液を 60mL 加え、培養真皮を培養液と空気の界面に設置して創傷面モデルを構築した。さらに培養真皮上に各創傷被覆材を貼付し、37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下のインキュベータで 1 週間培養した。また、創傷被覆材を貼付しないものを対照群とした。培養真皮を培養液と空気の界面に設置した創傷面モデルを図 1 に示した。
- ② 1 週間培養後、MTT assay を用いて細胞代謝活性を測定した。また培養 1 週間後における培養上清を採取し、ELISA を用いて VEGF、HGF および KGF 産生量を測定した。  
\*但し、KGF 産生量に関しては、対照群、Ⅲ群およびⅣ群のみ用いた。

### 2-3-1. MTT アッセイ法による細胞代謝活性の測定法

ミトコンドリアは真核生物の細胞内器官で、酸化リン酸化反応によるエネルギー産生場として重要な役割を担っている。また、活発に増殖する細胞ではエネルギー産生能が高く、細胞が破壊されると極端にミトコンドリアの機能が低下することが知られている。ラットの組織抽出液を用いた電子伝達系の解析から、MTT などのテトラゾリウム塩がミトコンドリアの脱水素酵素のよい基質となることが報告され、生存性の高い細胞ほど分解される MTT 量が多く、その結果生じるホルマゼン量が生存細胞数とよく対応する。特に、MTT（黄色）は DMSO などの有機溶媒にて分解されると青紫色のホルマゼンに変わるので単に吸光度を測定することにより細胞の生存能が測定できる。

- ① MTT（3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide: C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>N<sub>5</sub> SBr=414.3:Research Organics Inc., USA）を、ビーカーの周囲をアルミホイルで遮光しながら PBS(-)にて 5mg/mL の濃度になるようにスターラーで攪拌しながら溶解した。シリレンジ（テルモ株式会社，東京）の先端に 20 μm フィルター（倉敷紡績株式会社，大阪）を装着し、ろ過滅菌し、黄色の MTT 溶液とした。
- ② 培養液と MTT 溶液を 9:1 の割合で混合したものを最終的な MTT 測定溶液とし、測定に必要な量を算定して事前に調製した。
- ③ 各培養真皮を 3×4cm の大きさに裁断し、各試料に MTT 測定溶液を 6mL（培養液 5.4mL + MTT 溶液 0.6mL）均等量加え、37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下のインキュベータで 3.5 時間静置した。
- ④ 50mL 遠沈管にセルストレイナー（BD Falcon, USA）を取り付け、その上に 6 等分に切った試料を載せた。
- ⑤ ③の MTT 測定溶液をピペットを用いてセルストレイナーを通して④の遠沈管に入れ、4℃、2500rpm、5min の条件で遠心分離を行った。
- ⑥ パスツールピペットを用いて上清を吸引除去し、その中にセルストレイナー上にある試料を全て入れた。

- ⑦ DMSO (Dimethyl Sulfoxide ;ナカライテスク株式会社, 京都) を 5mL 各試料が入った 50mL 遠沈管に入れ、遮光して一晩反応させ、青紫色のホルマザンを抽出した。
- ⑧ 96 穴マイクロプレートに抽出液を 200  $\mu$ L ずつ入れ、プレートリーダー (Microplate Reader Model No. iMark™ ; Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) を用いて 570nm で吸光度を測定した。

### 2-3-2. ELISA 法による細胞成長因子産生量の測定法

Quantikine ELISA kit (R&D systems, Inc., USA) の説明書に準じて各種細胞成長因子量を測定した。これは、ELISA 法とよばれ、マイクロプレート上に、モノクローナル抗体がコーティングされている。そして、そこに試料を添加することにより、試料溶液中の抗原がコートされている抗体に結合する。さらに、ペルオキシダーゼ標識ポリクローナル抗体で抗原と結合させ、発色気質を加えることで吸光度を測定でき、定量可能となる。

#### ・ VEGF 産生量の測定法

##### (1) 使用キット

- ① Quantikine VEGF (No. DVE00 ; R&D system, inc., USA) を使用前に室温に戻した。

##### (2) Standard 溶液の調製

- ① VEGF Standard を 1mL の Calibrator Diluent RD5K に溶解した (最低 15 分間は放置し、途中で Vortex を用いて撹拌した)。
- ② 7 本のマイクロチューブを用意し、Calibrator Diluent RD5K を 500  $\mu$ L 入れた。
- ③ Standard 溶液を 500  $\mu$ L 取り、マイクロチューブの 1 本に入れ、Vortex を用いて撹拌した。
- ④ ③のマイクロチューブから 500  $\mu$ L 取り、別のマイクロチューブの 1 本に入れ、Vortex を用いて撹拌した (倍希釈)。
- ⑤ 同様の操作を繰り返し、1000、500、250、125、62.5、31.2、15.6pg/mL、及び 0 pg/mL (RD5K のみ) の VEGF Standard 溶液を調製した。

##### (3) 洗浄液の調製

- ① Wash Buffer Concentrate を蒸留水で 25 倍希釈して洗浄液を調製した。

##### (4) 反応

- ① プレート (8×12 ウェル) を必要な分だけ用意した。
- ② 各ウェルに Assay Diluent RD1W を 50  $\mu$ L 分注した。
- ③ サンプル (必要に応じて希釈)、Standard 溶液を 200  $\mu$ L 加えた。
- ④ 軽くプレートミキサーで混合した。
- ⑤ 室温で 2 時間静置した。
- ⑥ ウェル内の溶液をデカンテーションで捨てた。
- ⑦ (3) で調製した洗浄液 400  $\mu$ L を勢いよく加えた。
- ⑧ ペーパータオルなどの上に叩きつけて、ウェル内の水気を完全に切った。
- ⑨ ⑦、⑧を 2 回繰り返した。



- ⑩ 各ウェルに VEGF Conjugte を 200  $\mu$  L 分注した。
  - ⑪ 軽くプレートミキサーで混合した。
  - ⑫ 室温で 2 時間静置した。
  - ⑬ 反応終了 15 前に、Color Reagent A と B を等量混合して基質溶液を調製し、遮光して保存した。
  - ⑭ ウェル中の VEGF Conjugte をデカンテーションで捨て、⑦-⑨の操作を行った。
  - ⑮ 各ウェルに基質溶液を 200  $\mu$  L 分注した。
  - ⑯ 軽くプレートミキサーで混合した。
  - ⑰ 遮光して、室温で 20 分間静置した。
  - ⑱ Stop Solution を 50  $\mu$  L 加えた。
  - ⑲ 軽くプレートミキサーで混合した。
- (5) 測定
- ① プレートリーダーにて 450nm (back は 570nm) で吸光度を測定した。

#### ・ HGF 産生量の測定法

- (1) 使用キット
- ① Quantikine HGF (No. DHG00 ; R&D system, inc., USA) を使用前に室温に戻した。
- (2) Standard 溶液の調製
- ① Calibrator Diluent RD5P を蒸留水で 5 倍希釈した。
  - ② HGF Standard を 1mL の蒸留水に溶解した (最低 15 分間は放置し、途中で Vortex を用いて攪拌した)。
  - ③ 7 本のマイクロチューブを用意し、Calibrator Diluent RD5P を 1 本に 900  $\mu$  L、6 本に 500  $\mu$  L 入れた。
  - ④ Standard 溶液を 100  $\mu$  L 取り、Calibrator Diluent RD5P が 900  $\mu$  L 入ったマイクロチューブに入れ、Vortex を用いて攪拌した。
  - ⑤ ④のマイクロチューブから 500  $\mu$  L 取り、別のマイクロチューブの 1 本に入れ、Vortex を用いて攪拌した (倍希釈)。
  - ⑥ 同様の操作を繰り返し、8000、4000、2000、1000、500、250、125pg/mL、及び 0 pg/mL (希釈した RD5P) の Standard 溶液を調製した。
- (3) 洗浄液の調製
- ① Wash Buffer Concentration を蒸留水で 25 倍希釈して洗浄液を調製した。
- (4) 反応
- ① プレート (8×12 ウェル) を必要な分だけ用意した。
  - ② 各ウェルに Assay Diluent RD1W を 150  $\mu$  L 分注した。
  - ③ サンプル (必要に応じて希釈する)、Standard 溶液を 50  $\mu$  L 加えた。
  - ④ 軽くプレートミキサーで混合した。
  - ⑤ 室温で 2 時間静置した。

- ⑥ ウェル内の溶液をデカンテーションで捨てた。
  - ⑦ (3)で調製した洗浄液 400  $\mu$ L 勢いよく加えた。
  - ⑧ ペーパータオルなどの上に叩きつけて、ウェル内の水気を完全に切った。
  - ⑨ ⑦、⑧を3回繰り返した。
  - ⑩ 各ウェルに HGF Conjugte を 200  $\mu$ L 分注した。
  - ⑪ 軽くプレートミキサーで混合した。
  - ⑫ 室温で1時間45分間静置した。
  - ⑬ 反応終了15前に、Color Reagent A と B を等量混合して基質溶液を調製し、遮光して保存した。
  - ⑭ ウェル中の HGF Conjugte をデカンテーションで捨て、⑦-⑨の操作を行った。
  - ⑮ 各ウェルに基質溶液を 200  $\mu$ L 分注した。
  - ⑯ 軽くプレートミキサーで混合した。
  - ⑰ 遮光して、室温で30分間静置した。
  - ⑱ Stop Solution を 50  $\mu$ L 加えた。
  - ⑲ 軽くプレートミキサーで混合した。
- (5) 測定
- ① プレートリーダーにて 450nm (back は 570nm) で吸光度を測定した。

## ・ KGF 産生量の測定法

### (1) 使用キット

- ① Quantikine KGF (No.DKG00 ; R&D system, inc., USA) を使用前に室温に戻した。

### (2) Standard 溶液の調製

- ① KGF Standard を 1mL の蒸留水に溶解した (最低 15 分間は放置し、途中で Vortex を用いて攪拌した)。
- ② 7 本のマイクロチューブを用意し、Calibrator Diluent RD5R を 1 本に 900  $\mu$ L、6 本に 500  $\mu$ L 入れた。
- ③ Standard 溶液を 100  $\mu$ L 取り、Calibrator Diluent RD5R が 900  $\mu$ L 入ったマイクロチューブに入れ、Vortex を用いて攪拌した。
- ④ ③のマイクロチューブから 500  $\mu$ L 取り、別のマイクロチューブの 1 本に入れ、Vortex を用いて攪拌した (倍希釈)。
- ⑤ 同様の操作を繰り返し、2000、1000、500、250、125、62.5、31.2pg/mL、及び 0 pg/mL (RD5R のみ) の KGF Standard 溶液を調製した。

### (3) 洗浄液の調製

- ① Wash Buffer Concentrate を蒸留水で 25 倍希釈して洗浄液を調製した。

### (4) 反応

- ① プレート (8×12 ウェル) を必要な分だけ用意した。
- ② 各ウェルに Assay Diluent RD1-25 を 100  $\mu$ L 分注した。

- ③ サンプル（必要に応じて希釈）、Standard 溶液を 100  $\mu$  L 加えた。
  - ④ 軽くプレートミキサーで混合した。
  - ⑤ 室温で 3 時間静置した。
  - ⑥ ウェル内の溶液をデカンテーションで捨てた。
  - ⑦ (3) で調製した洗浄液 400  $\mu$  L を勢いよく加えた。
  - ⑧ ペーパータオルなどの上に叩きつけて、ウェル内の水気を完全に切った。
  - ⑨ ⑦、⑧を 3 回繰り返した。
  - ⑩ 各ウェルに VEGF Conjugate を 200  $\mu$  L 分注した。
  - ⑪ 軽くプレートミキサーで混合した。
  - ⑫ 室温で 1 時間 45 分静置した。
  - ⑬ 反応終了 15 前に、Color Reagent A と B を等量混合して基質溶液を調製し、遮光して保存した。
  - ⑭ ウェル中の KGF Conjugate をデカンテーションで捨て、⑦-⑨の操作を行った。
  - ⑮ 各ウェルに基質溶液を 200  $\mu$  L 分注した。
  - ⑯ 軽くプレートミキサーで混合した。
  - ⑰ 遮光して、室温で 30 分間静置した。
  - ⑱ Stop Solution を 50  $\mu$  L 加えた。
  - ⑲ 軽くプレートミキサーで混合した。
- (5) 測定
- ① プレートリーダーにて 450nm (back は 570nm) で吸光度を測定した。

#### 2-4. 創傷被覆材に含まれる EGF の効果の持続性（実験 2）

実験 1 と同様の方法で、創傷面モデルを構築し、Ⅲ群とⅣ群の創傷被覆材を用いて行った。

- ① 滅菌した 10cm×10cm のポリスチレンディッシュに滅菌したステンレスメッシュを置き、その上に 4cm×5cm に裁断した培養真皮を載せた。培養液を 60mL 加え、培養真皮を培養液と空気の界面に設置して創傷面モデルを構築した。さらに培養真皮上に各創傷被覆材を貼付し、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下のインキュベータで 3 日間培養した(第 1 期培養)。また、創傷被覆材を貼付しないものを対照群とした。
- ② 3 日培養後、各創傷被覆材を回収して他の培養真皮上に再貼付し、さらに 37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下のインキュベータで 3 日間培養した(第 2 期培養)。また、創傷被覆材を貼付しないものを対照群とした。実験 2 の手順を図 2 に示した。
- ③ 第 1 期培養、第 2 期培養の各々において、3 日培養後、MTT assay を用いて細胞代謝活性を測定した。また培養 3 日後における培養上清を採取し、ELISA を用いて VEGF および HGF 産生量を測定した。

この実験は、創傷面モデルで EGF 含有創傷被覆材の EGF の効果の持続性を評価するために考案した。

## 2-5. 統計学的処理

結果は平均値±標準誤差（SEM）を用いた。統計学的有意差検定は Tukey-Kramer test を用いて行った。

## 3. 結果

### 3-1. 新規創傷被覆材の作製

所定量の分子間架橋剤を含有した高分子量 HA 水溶液は高い粘度を示した。一方、生理活性物質を含有した低分子量 HA 水溶液は低い粘度を示した。そのため、高粘度の高分子量 HA 水溶液の上に低粘度の低分子量 HA 水溶液を容易に分注することができた。2 層状態の水溶液を凍結し、真空乾燥する手法により 2 層性のスポンジ状シートを作製できた。使用する際には表裏を反転する。走査型電子顕微鏡より本創傷被覆材が 2 層構造であることを図 3 に示した。上層は架橋した高分子量 HA スポンジ層であり、下層は Arg、VC を含有した低分子量 HA スポンジ層である。また、このスポンジ状シートは、多孔質構造を有していることも観察された。

### 3-2. 培養真皮中の線維芽細胞によるサイトカイン産生に及ぼす創傷被覆材の効果（実験 1）

創傷面モデルにおいて各創傷被覆材の存在下で 1 週間培養後の培養真皮内の線維芽細胞の細胞代謝活性を MTT assay を用いて測定した。MTT assay での OD 値は、線維芽細胞の細胞代謝活性に相当する。各創傷被覆材の存在下での MTT assay で得られた OD 値を図 4 に示した。各群の OD 値の詳細は以下の通りであった。

対照群：0.454、Ⅰ群（10:1 EGF 非含有創傷被覆材）：0.463、Ⅱ群（10:1 EGF 含有創傷被覆材）：0.633、Ⅲ群（20:1 EGF 非含有創傷被覆材）：0.503、Ⅳ群（20:1 EGF 非含有創傷被覆材）：0.645

細胞代謝活性に関しては、EGF 非含有群（Ⅰ群とⅢ群）は創傷被覆材を貼付しない対照群と比べて差はみられなかった。このことから架橋剤による細胞毒性がないことが示唆された。また、EGF 含有群（Ⅱ群とⅣ群）は EGF 非含有群（Ⅰ群とⅢ群）と比べて高い細胞代謝活性を示した。このことから乾熱滅菌後も EGF の活性が保持されていることが示唆された。

創傷面モデルにおいて各創傷被覆材の存在下で 1 週間培養後の培養真皮内の線維芽細胞からの VEGF 産生量を図 5 に示した。各群の VEGF 産生量の詳細は以下の通りであった。

対照群：0.16 ng/mL、Ⅰ群：0.15 ng/mL、Ⅱ群：0.96 ng/mL、Ⅲ群：0.26 ng/mL、Ⅳ群：1.06 ng/mL

VEGF 産生量に関しては、Ⅱ群はⅠ群と比較して 6.4 倍、Ⅳ群はⅢ群と比較して 4.1 倍の産生量を示した。

創傷面モデルにおいて各創傷被覆材の存在下で 1 週間培養後の培養真皮内の線維芽細胞からの HGF 産生量を図 6 に示した。各群の HGF 産生量の詳細は以下の通りであった。

対照群：3.68 ng/mL、Ⅰ群：3.95 ng/mL、Ⅱ群：22.98 ng/mL、Ⅲ群：5.13 ng/mL、Ⅳ群：20.61 ng/mL

HGF 産生量に関しては、Ⅱ群はⅠ群と比較して 5.8 倍、Ⅳ群はⅢ群と比較して 4.0 倍の産生

量を示した。これらの結果は、EGF 含有創傷被覆材が VEGF と HGF 産生量を効果的に増大させたことを示している。EGF 含有群（Ⅱ群とⅣ群）においては、VEGF の産生量は約 1ng/mL に対して HGF の産生量は約 20ng/mL であった。HGF は、血管新生促進効果と表皮形成促進効果があるので創傷治癒促進に大きく寄与する。

創傷面モデルにおいて各創傷被覆材の存在下で 1 週間培養後の培養真皮内の線維芽細胞からの KGF 産生量を図 7 に示した。各群の KGF 産生量の詳細は以下の通りであった。

対照群：0.04 ng/mL、Ⅲ群：0.06 ng/mL、Ⅳ群：0.06 ng/mL

KGF 産生量に関しては、Ⅳ群はⅢ群と対照群と比較して増加傾向は確認されたが、産生量ごくわずかなため顕著な差異がみられなかったと考えられる。

### 3-3. 創傷被覆材に含まれる EGF の効果の持続性（実験 2）

創傷面モデルで 3 日間培養した第 1 期培養(A)と第 2 期培養(B)で得られた OD 値を図 8 に示した。各群の OD 値の詳細は以下の通りであった。

#### 【第 1 期培養(A)】

対照群：0.520、Ⅲ群：0.589、Ⅳ群：0.795

#### 【第 2 期培養(B)】

対照群：0.552、Ⅲ群：0.556、Ⅳ群：0.701

EGF 含有群（Ⅳ群）は EGF 非含有群（Ⅲ群）と比べて、第 1 期培養と第 2 期培養の両方において高い細胞代謝活性を示した。この結果から創傷被覆材を置きかえた後の第 2 期培養においても EGF 含有創傷被覆材は細胞代謝活性を効果的に増大させたことを示している。この結果は、培養真皮中の線維芽細胞を刺激するのに必要な濃度で EGF が被覆材中に残存していることを反映している。

創傷面モデルで 3 日間培養した第 1 期培養(A)と第 2 期培養(B)で得られた VEGF 産生量を図 9 に示した。各群の VEGF 産生量の詳細は以下の通りであった。

#### 【第 1 期培養(A)】

対照群：0.16 ng/mL、Ⅲ群：0.17 ng/mL、Ⅳ群：0.69 ng/mL

#### 【第 2 期培養(B)】

対照群：0.10 ng/mL、Ⅲ群：0.12 ng/mL、Ⅳ群：0.67 ng/mL

VEGF 産生量において第 1 期培養では、Ⅳ群はⅢ群と比較して 4.1 倍の産生量を示し、さらに第 2 期培養では、Ⅳ群はⅢ群と比較して 5.4 倍の産生量を示した。この結果も、培養真皮中の線維芽細胞を刺激するのに必要な濃度で EGF が被覆材中に残存していることを反映している。

創傷面モデルで3日間培養した第1期培養(A)と第2期培養(B)で得られた HGF 産生量を図 10 に示した。各群の HGF 産生量の詳細は以下の通りであった。

【第1期培養(A)】

対照群：1.27 ng/mL、Ⅲ群：1.70 ng/mL、Ⅳ群：5.95 ng/mL

【第2期培養(B)】

対照群：0.77 ng/mL、Ⅲ群：1.49 ng/mL、Ⅳ群：5.25 ng/mL

HGF 産生量において第1期培養では、Ⅳ群はⅢ群と比較して 3.5 倍の産生量を示し、さらに第2期培養では、Ⅳ群はⅢ群と比較して 3.5 倍の産生量を示した。これらの結果は、創傷被覆材を置きかえた後の第2期培養においても EGF 含有創傷被覆材は VEGF と HGF 産生量を効果的に増大させたことを示している。すなわち、高度に水和した架橋高分子 HA スポンジ状シート内に有効濃度の EGF が保持されていることを示している。

#### 4. 考察

本研究において、2層性の EGF 含有創傷被覆材を凍結真空乾燥1回で製造する方法を考案した。架橋した高分子量 HA 水溶液(pH 4.0)をトレーに分注し、その上に Arg 等を含有した低分子量 HA 水溶液(pH 10.5)を分注し、凍結真空乾燥により2層構造スポンジシートの創傷被覆材を作製した。架橋剤は、酸性 pH 条件下では HA のカルボキシル基と反応するが、塩基性 pH 条件下では HA のカルボキシル基が解離した状態のため反応しない。これにより、低分子量 HA のほとんどは未架橋な状態となる。なお、酸性の高分子量 HA 水溶液と塩基性の低分子量 HA 水溶液は混合すると pH 中性になるためスポンジシート全体では pH 中性の特性をもつように設計されている。

市販の凍結真空乾燥された細胞成長因子製剤は、難治性皮膚潰瘍や熱傷潰瘍の治療に使用されている。細胞成長因子製剤はまず専用の溶解液に溶解する必要がある、細胞成長因子の水溶液は創面にスプレー式に投与し、トップドレッシング材として市販の創傷被覆材を創面に置く。さらに、これらの細胞成長因子の水溶液は毎日投与する必要がある。このような状況を改善する目的で、HA スポンジ状シートから成る EGF を含有した創傷被覆材を開発した。この研究は、*in vitro* で線維芽細胞のサイトカイン産生能を促進する EGF 含有創傷被覆材の有効性を調べることを目的とした。特に、EGF が HA のスポンジシート内に残存しているか、容易に放出するかを調べるために EGF 含有創傷被覆材の EGF の効果の持続性に焦点を当てた。

実験1において、HA と架橋剤の比率を変えることにより、スポンジ状シートの含水時における特性を調べた。EGF 非含有群(Ⅰ群とⅢ群)と比較して、EGF 含有群(Ⅱ群とⅣ群)は、培養真皮中の線維芽細胞からの VEGF と HGF の産生量を顕著に増大した。Ⅱ群とⅣ群においては顕著な差はみられなかった。このことは、HA と架橋剤の比率が 10:1 あるいは 20:1 の条件で製造した架橋高分子量 HA スポンジシートは、水和した状態で EGF を保持できることを示している。

Ⅳ群において、VEGF 産生量は約 1ng/mL であるが HGF 産生量は約 20ng/mL であることから、HGF 産生量は VEGF 産生量の約 20 倍産生していることが確認された。HGF は、肝細胞以外にも

上皮細胞や血管内皮細胞に対して増殖促進、運動性亢進、形態形成促進などの作用を示す。このことから、HGF は創傷治癒における表皮形成、血管新生に寄与する細胞成長因子の一つである。

実験 2 において、架橋剤の比率が低い 20:1 の条件で製造した EGF 非含有創傷被覆材 (Ⅲ群) と EGF 含有創傷被覆材 (Ⅳ群) を用いて、EGF の効果の持続性を調べた。EGF 含有群 (Ⅳ群) は第 1 期培養と第 2 期培養の両方において、EGF 非含有群 (Ⅲ群) と比較して、VEGF と HGF 産生量を増大した。これらの結果は、架橋高分子量 HA から成る高度に水和した層に EGF が有効濃度残存していたことが示唆された。

細胞表面レセプターに EGF が結合することにより、線維芽細胞増殖反応が開始される。DNA 合成の開始には少なくとも 8-12 時間細胞に EGF にさらす必要がある<sup>34, 35)</sup>。十分な治療効果を得るためには、創傷部位に EGF の有効濃度が持続的に保持されなければならない<sup>35, 36)</sup>。水和した架橋高分子量 HA スポンジシート内に、線維芽細胞に刺激を与える有効濃度の EGF が残存していたことが示唆された。この研究における結果は、EGF 含有創傷被覆材は創傷面モデルにおいて合計 6 日間線維芽細胞から VEGF と HGF の産生能を促進することが実証された。<sup>37)</sup>

本研究において、細胞機能を評価する方法として、コラーゲンゲルに線維芽細胞を組み込んで作製した培養真皮を培養液と空気の界面に設置した創傷面モデルを評価系として用いた。コラーゲンゲルに線維芽細胞を組み込む方法は、Bell により考案され、生体内の状態を反映するモデルになると考えられている<sup>38)</sup>。さらに本実験では、コラーゲンゲル内に支持体としてナイロンメッシュを組み込んだ。ナイロンメッシュを組み込むことにより、線維芽細胞を組み込んだコラーゲンゲルの収縮を抑制することでゲル内の張力が上昇する。それに応じて線維芽細胞の表現型が変化し、創部の線維芽細胞と近い表現型となり、従来のフラスコ培養に比べて、より創傷面に類似した評価系となりうる<sup>39)</sup>。よって、この創傷面モデルを用いることで、本創傷被覆材を貼付した際に生じる線維芽細胞の応答を培養系でシンプルに評価することが可能となる。

創傷治癒における Arg と VC の効果は、さらなる研究が必要である。培養真皮を用いた創傷面モデルにおける EGF と VC の相乗効果は既に当研究室の先行研究で報告している。さらにラットを用いた動物実験における EGF 含有創傷被覆材の創傷治癒促進効果も実証した<sup>14)</sup>。これらの知見を基にして、本研究では、分子間架橋高分子量 HA からなる上層と未架橋低分子量 HA からなる下層の 2 層性のスポンジ状シートを設計し、下層に EGF、Arg、VC を含有した新規創傷被覆材を開発した。我々は、本創傷被覆材の創傷治癒促進効果を評価するため、ラットを用いた動物実験を行い、創傷治癒促進効果を確認した。この動物実験の結果は、他で報告した<sup>13)</sup>。

## 5. 総括

細胞成長因子を創傷面に局所投与する場合、一定期間、細胞成長因子が細胞に接触することにより細胞分裂および細胞成長因子産生が開始される。本研究で開発した創傷被覆材は、高度に水和した分子間架橋高分子量 HA のスポンジ層内に、分子間未架橋低分子量 HA および EGF 等の生理活性物質が有効濃度で残留するように設計されている。

創傷面モデルを用いた培養系の実験より、EGF 含有創傷被覆材は、少なくとも 6 日間 EGF を有効濃度に保持し、線維芽細胞からの血管新生因子である VEGF と HGF の産生能を高める効果を持つことが確認できた。本研究と平行して行ったラットを用いた動物実験において、EGF 含有創傷被覆材が治癒促進効果を発現することが確認されている。このことから、EGF 含有創傷被覆材は、現在臨床で用いられている細胞成長因子製剤の使用法、すなわち細胞成長因子の水溶液を毎日患部に使用する方法を簡素化することが可能となり、有効な治療法を提供することができる。

## 6. 今後の課題

組織工学におけるキーワードである、細胞・細胞成長因子・生体材料を応用した皮膚再生医療において、HA と Col からなる生体材料にヒト線維芽細胞を組み込んだ培養真皮は、難治性皮膚潰瘍や熱傷潰瘍への適用において優れた結果を得ている<sup>40)</sup>。培養真皮の創傷治癒における有効性は、ヒト線維芽細胞が産生する細胞成長因子による創傷治癒促進効果、また生体材料である HA や Col による創傷治癒促進効果の相乗効果による。細胞を用いた組織工学製品は、きわめて高い機能を有するが、製造コストが高く、操作性や保存などの観点から、一般的な治療方法として普及させるのは容易ではない。そこで、本研究は、HA を基材とした EGF 含有創傷被覆材の開発であり、組織工学のキーワードである細胞成長因子と生体材料を応用した皮膚再生医療の研究である。細胞成長因子を組み込んだ創傷被覆材は、作製方法、操作性、保存等が簡便で低コストであるため非常に扱いやすい組織工学製品である。従来の細胞成長因子製剤が創面での速やかな酵素分解のため連日スプレー投与を原則とする点に対し、本創傷被覆材を用いることで、難治性皮膚潰瘍や熱傷潰瘍の患者に対して毎日の治療が改善されると考えられる。

さらに、トップドレッシング材として EGF 含有創傷被覆材を同種培養真皮と併用することで、同種培養真皮中の線維芽細胞に刺激を与え血管新生因子である VEGF および HGF 産生能を高めることが報告されている<sup>26)</sup>。このことから、同種培養真皮の機能を高める新しい医療技術の確立が可能となり得るであろう。

本研究で開発した、HA を基材とした EGF、Arg、VC 含有創傷被覆材は、幅広い治療において簡便に使用できるものであり、特殊な治療に使用する培養真皮と共に皮膚再生医療の普及に大きな貢献をもたらすものと考えられる。



## 7. 謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導を賜りました北里大学人工皮膚研究開発センター黒柳能光教授に心より感謝申し上げます。

生化学実験において、技術面および知識面におけるご指導を賜りました、松本靖広博士、于あかね博士、鈴木龍介博士に感謝申し上げます。

共同実験者として、有用な結果を得るべく共に研究を進めた、清水菜穂子さんに感謝申し上げます。

また、充実した有意義な研究室生活を送ることができたのも、于あかね博士、鈴木龍介博士、小川徹也さん、近藤慎也さん、富岡了一さん、松崎卓弥さん、飯島英美さん、澤麻奈美さん、峰尾昌奈さん、猪俣智詞さん、新山勇人さん、野口裕也さん、赤崎泰吾さん、宇津原章弘さん、倉林牧子さん、古賀久美子さん、丸山亜由美さん、砂金優花さん、清水菜穂子さん、豊田大地さん、林一成さん、青木美帆さん、岩淵成美さん、大前美月さん、石田大貴さん、石原恵依子さん、磯野恵理さん、稲吉一磨さん、大野悠さん、遠井綾子さん、黒柳美里さん皆様と共に研究室生活を過ごせたからです。ありがとうございました。

黒柳能光教授には、修士2年、博士4年の計6年間、学位取得まで多大なご指導を賜りました。常に、患者さんの役に立つ研究、臨床に繋がる基礎研究を志す黒柳能光教授のもとで、培養真皮の研究、創傷被覆材の開発に携わる機会を与えていただいたことに感謝申し上げます。博士課程に進むという機会を与えていただいたのも、黒柳能光教授のお陰であります。博士号取得は、私にとって一生の宝物となりました。黒柳能光教授には、感謝敬服の念に堪えません。

博士課程1年目の9月に第1子（長女：果歩）出産のため、研究室を一時休みました。子供を育てながらの学生生活は、時間的な制限もあり、一人では成し遂げることはできませんでした。黒柳能光教授のご理解、また研究室の皆様の助けがあったからこそ成し遂げることができました。深く感謝申し上げます。

最後に、大学院博士課程を修了できましたのも、両親、家族の温かい支えがあったからこそであります。ここに心より感謝申し上げます。

## 8. 引用文献

- 1) 黒柳能光：培養表皮・培養真皮・培養皮膚の実用性. 再生医療 2005;4:509-15.
- 2) 黒柳能光：人工臓器—最近の進歩；人工皮膚. 人工臓器 2005;34:187-90.
- 3) Damour O, Zhi Hua S, Lasne F, Villan M, Rousselle P, Collombel C. Cytotoxicity evaluation of antiseptics and antibiotics on cultured human fibroblasts and keratinocytes. Burns 1992;18:479-85.
- 4) 久保美代子、森口隆彦：フィブラスト®スプレー添付溶解液および塩化ベンザルコニウムのI型コラーゲン上で培養した正常ヒトケラチノサイト，正常ヒト線維芽細胞に対する細胞毒性について. 日本皮膚科学会誌 2011;121:1607-20.
- 5) Matsumoto Y, Arai K, Momose H, Kuroyanagi Y. Development of a wound dressing composed of a hyaluronic acid sponge containing arginine. J Biomater Sci Polym Ed 2009;20:993-1004.
- 6) Matsumoto Y, Kuroyanagi Y. Development of wound dressing composed of hyaluronic acid sponge containing arginine and epidermal growth factor. J Biomater Sci Polym Ed 2010;21:715-26.
- 7) 松本靖広、中野幹人、黒柳能光：ヒアルロン酸を基材としたアルギニン含有創傷被覆材の糖尿病マウスにおける創傷治癒促進効果. 熱傷 2010;36:145-54.
- 8) 中野幹人、松本靖広、黒柳能光：ヒアルロン酸を基材とした上皮成長因子含有創傷被覆材の開発：糖尿病をマウスを用いた動物実験評価. 褥瘡会誌 2011;13:45-53.
- 9) Kondo S, Kuroyanagi Y. Development of a wound dressing composed of hyaluronic acid and collagen sponge with epidermal growth factor. J Biomater Sci 2012;23:629-43.
- 10) Kondo S, Niiyama H, Yu A, Kuroyanagi Y. Evaluation of a wound dressing composed of hyaluronic acid and collagen sponge containing epidermal growth factor in diabetic mice. J Biomater Sci 2012;23:1729-40.
- 11) Yu A, Matsuda Y, Takeda A, Uchinuma E, Kuroyaangi Y. Effect of EGF and bFGF on fibroblast proliferation and angiogenic cytokine production from cultured dermal substitutes. J Biomater Sci 2012;23:1315-24.
- 12) Yu A, Niiyama H, Kondo S, Yamamoto A, Suzuki R, Kuroyanagi Y. Wound dressing composed of hyaluronic acid and collagen containing EGF or bFGF: comparative culture study. J Biomater Sci 2013;24:1015-26.
- 13) 清水菜穂子、山本昭子、黒柳能光：ヒアルロン酸を基材とした上皮成長因子含有機能性創傷被覆材の開発：培養系および動物実験における創傷治癒効果の評価. 日本創傷・オーストミー・失禁管理学会誌 2013;17:40-9.
- 14) Niiyama H, Kuroyanagi Y. Development of novel wound dressing composed of hyaluronic aid and collagen sponge containing epidermal growth factor and vitamin C derivative. J Artif Organs in press.
- 15) 黒柳能光：難治性皮膚潰瘍の治療に使用する人工皮膚. 褥瘡会誌 2011;13:14-23.

- 16) Chen WY, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair Regen* 1999;7:79-89.
- 17) Laurent TC, Fraser JR. Hyaluronan. *FASEB J* 1992;6:2397-404.
- 18) West DC, Hampson IN, Arnold F, Kumar S. Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science* 1985;228:1324-6.
- 19) Sattar A, Rooney P, Kumar S, Pye D, West DC, Scott I, Ledger P. Application of angiogenic oligosaccharides of hyaluronan increases blood vessel numbers in rat skin. *J Invest Dermatol* 1994;103:576-9.
- 20) Lees VC, Fan TP, West DC. Angiogenesis in a delayed revascularization model is accelerated by angiogenic oligosaccharides of hyaluronan. *Lab Invest* 1995;73:259-66.
- 21) Carpenter G, Cohen S. Human epidermal growth factor and the proliferation of human fibroblasts. *J Cell Physiol* 1976;88:227-37.
- 22) Carpenter G, Cohen S. Epidermal growth factor. *Annu Rev Biochem* 1979;48:193-216.
- 23) Cohen S, Taylor JM. Epidermal growth factor; chemical and biological characterization. *Recent Progr Horm Res* 1974;30:533-50.
- 24) Cohen S, Savage CR Jr. Recent studies on the chemistry and biology of epidermal growth factor. *Recent Progr Horm Res* 1974;30:551-74.
- 25) Cohen S, Carpenter G. Human epidermal growth factor; isolation and chemical and biological properties. *Proc Natl Acad Sci* 1975;72:1317-21.
- 26) Sawa M, Kuroyanagi Y. Potential of a cryopreserved cultured dermal substitute composed of hyaluronic acid and collagen to release angiogenic cytokine. *J Biomater Sci* 2013;24:224-38.
- 27) Xin X, Yang S, Ingle G, Zlot C, Rangell L, Kowalski J, et al. Hepatocyte growth factor enhances vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro and in vivo. *Am J Pathol* 2001;158:1111-20.
- 28) Stallmeyer B, Kampfer H, Kolb N, Pfeilschifter J, Frank S. The function of nitric oxide in wound repair:inhibition of inducible nitric oxide-synthase severely impairs wound reepithelialization. *J Invest Dermatol* 1999;113:1090-8.
- 29) Witte MB, Barbul A. Arginine physiology and its implication for wound healing. *Wound Rep Reg* 2003;11:419-23.
- 30) Curran JN, Winter DC, Bouchier-Hayes D. Biological fate and clinical implications of arginine metabolism in tissue healing. *Wound Repair Regen* 2006;14:376-86.
- 31) Farris PK. Topical vitamin C: a useful agent for treating photoaging and other dermatologic conditions. *Dermatol Surg* 2005;31:814-8.
- 32) Heller R, Münscher-Paulig F, Gräbner R, Till U. L-ascorbic acid potentiates nitric oxide Synthesis in endothelial cells. *J Biol Chem* 1999;274:8254-60.

- 33) Wu YL, Gohda E, Iwao M, Matsunaga T, Nagao T, Takebe T, et al. Stimulation of hepatocyte growth factor production by ascorbic acid and its stable 2-glucoside. *Growth Hormone and IGF Research* 1998;8:421-8.
- 34) Lee AR. Enhancing dermal matrix regeneration and biomechanical properties of 2nd degree-burn wounds by EGF-impregnated collagen sponge dressing. *Arch Pharm Res* 2005;28:1311-6.
- 35) Buckley A, Davidson JM, Kamerath CD, Wolt TB, Woodward SC. Sustained release of epidermal growth factor accelerates wound repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:7340-4.
- 36) Franklin TJ, Gregory H, Morris WP. Acceleration of wound healing by recombinant human urogastrone (epidermal growth factor). *J Lab Clin Med* 1986;108:103-8.
- 37) Yamamoto A, Shimizu N, Kuroyanagi Y: Potential of wound dressing composed of hyaluronic acid containing epidermal growth factor to enhance cytokine production by fibroblasts. *J. Artificial Organs* 2013;16:489-94.
- 38) Bell E, Ivarsson B, Merrill C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:1274-8.
- 39) Grinnell F. Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices. *Trends Cell Biol* 2003;13:264-9.
- 40) Kuroyanagi Y, Kubo K, Matsui H, Kim HJ, Numari S, Mabuchi Y, et al. Establishment of banking system for allogeneic cultured dermal substitute. *Artif Organs* 2004;28:13-21.

## 9. 業績目録

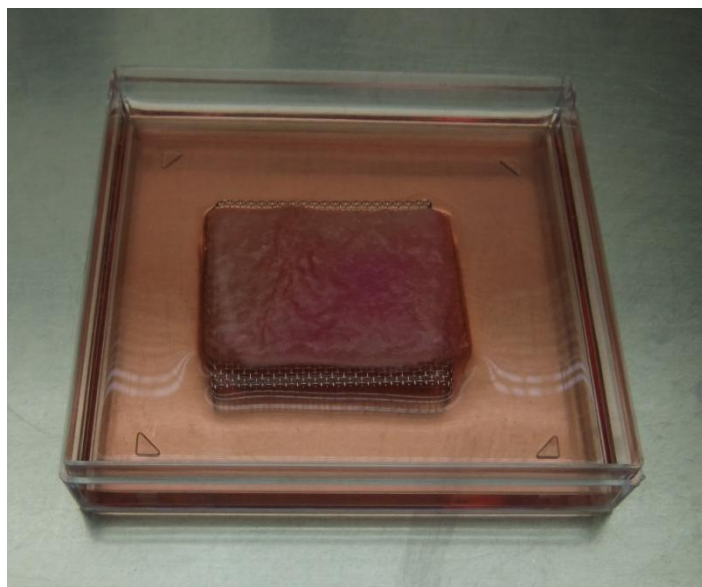
### < 学術論文 >

- 1) Yamamoto A , Shimizu N , Kuroyanagi Y : Potential of wound dressing composed of hyaluronic acid containing epidermal growth factor to enhance cytokine production by fibroblasts. J Artif Organs , 16:489～494, 2013.
- 2) Yu A, Niiyama H, Kondo S, Yamamoto A , Suzuki R, Kuroyanagi Y : Wound dressing composed of hyaluronic acid and collagen containing EGF or bFGF: comparative culture study. J Biomater Sci Polym Ed , 24(8):1015～1026, 2013.
- 3) 清水菜穂子、山本昭子、黒柳能光：ヒアルロン酸を基材とした上皮成長因子含有機能性創傷被覆材の開発：培養系および動物実験における創傷治癒効果の評価。  
日本創傷・オストミー・失禁管理学会誌、17(1):40～49, 2013.
- 4) Hashimoto A, Kuroyanagi Y: Standardization for mass production of allogeneic cultured dermal substitute by measuring the amount of VEGF, bFGF, HGF, TGF- $\beta$ , and IL-8. J Artif Organs , 11:225～231, 2008.

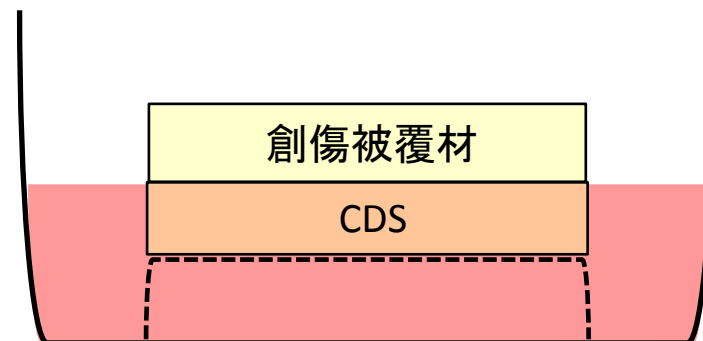
### < 学会発表 >

- 1) 山本昭子、清水菜穂子、黒柳能光 : 分子間架橋ヒアルロン酸を基材とした治癒促進物質含有創傷被覆材の設計  
第 11 回日本再生医療学会総会（横浜） 2012. 6. 12-14  
[発表形式：一般講演（口頭発表）]
- 2) 山本昭子、清水菜穂子、黒柳能光 : 分子間架橋ヒアルロン酸を基材とした治癒促進物質含有創傷被覆材の設計  
第 14 回日本褥瘡学会学術集会（横浜） 2012. 9. 1-2  
[発表形式：一般講演（口頭発表）]
- 3) Yamamoto A, Shimizu N., Kuroyanagi Y : Potential of wound dressing composed of hyaluronic acid containing epidermal growth factor to enhance cytokine production by fibroblasts  
the 4th asian biomaterials congress（香港） 2013. 6. 26-29  
[発表形式：一般講演（ポスター発表）]

## 10. 図表



(A)



(B)

# 図1. 構築した創傷面モデル

(A) 培養真皮を培養液と空気の界面に設置した創傷面モデル

(B) 創傷面モデルのイメージ断面図

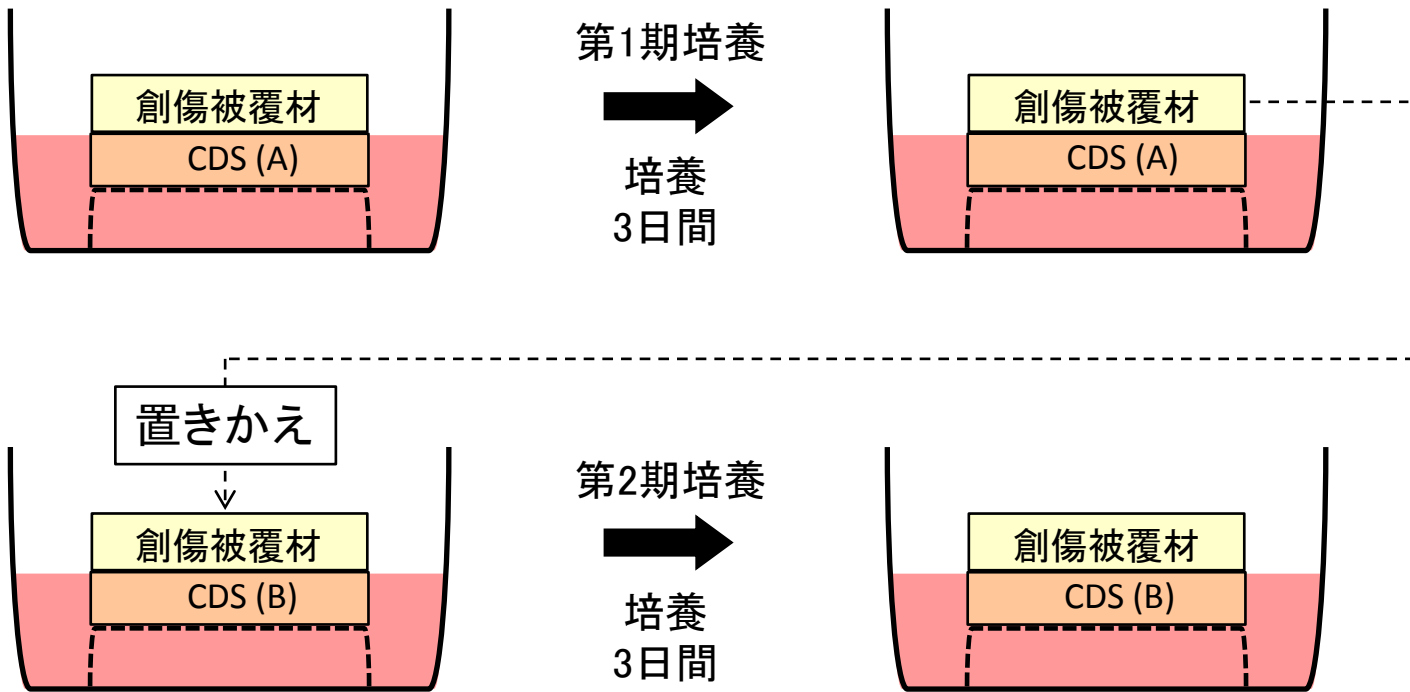
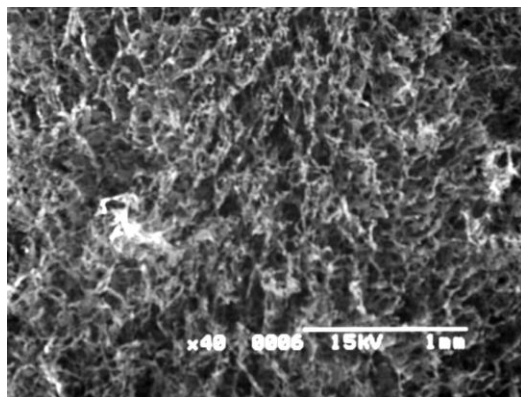


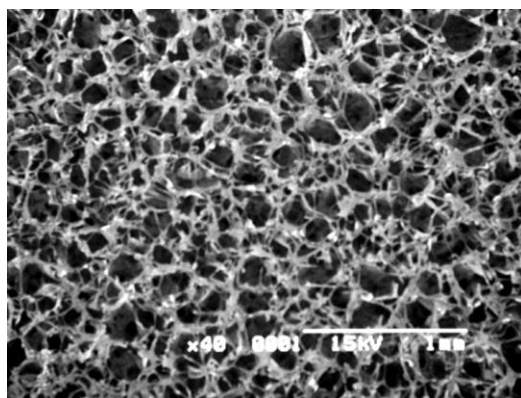
図2. 実験2の手順

CDS(A)を培養液と空気の界面に設置して創傷面モデルを構築した。さらにCDS(A)の上に創傷被覆材を貼付し、37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下で3日間培養した(第1期培養)。その後、創傷被覆材を回収してCDS(B)に再貼付し、さらに37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下で3日間培養した(第2期培養)。

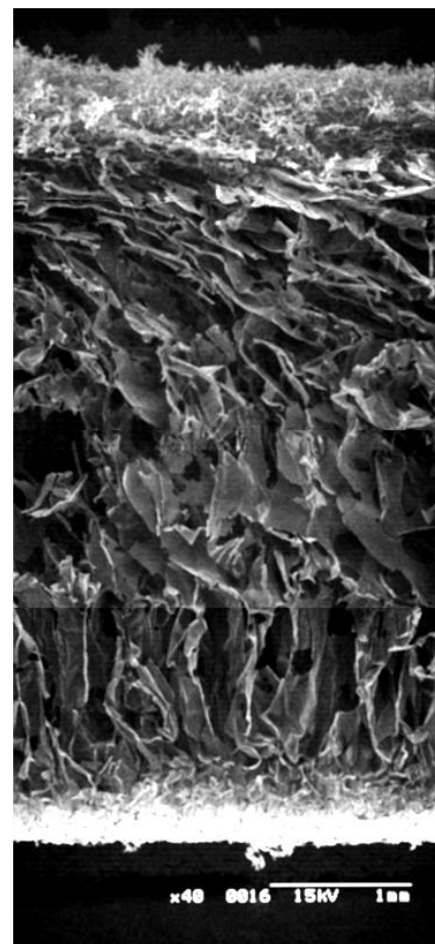




(A)



(B)



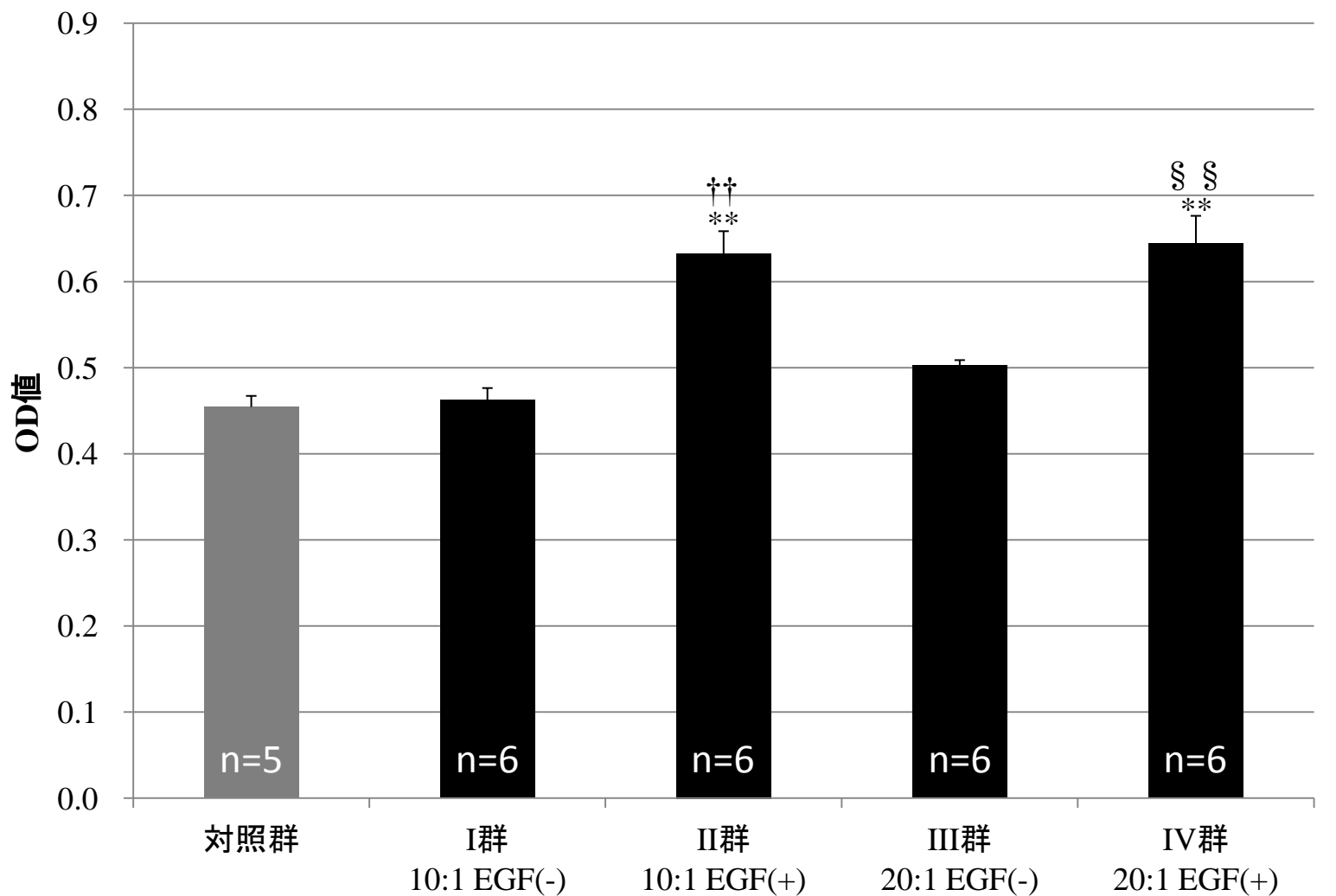
(C)

図3. 創傷被覆材の走査型電子顕微鏡写真(III群;20:1 EGF非含有創傷被覆材)

(A) 架橋高分子量HAスポンジ層の表面

(B) Arg、VCを含有した低分子量HAスポンジ層の表面

(C) 2層構造スポンジの断面(上層:架橋高分子量HAスポンジ層、下層: Arg、VCを含有した低分子量HAスポンジ層)



(平均値±SE)  
 \*\*  $P < 0.01$  vs. 対照群, ††  $P < 0.01$  vs. I群(10:1 EGF非含有), § §  $P < 0.01$  vs. III群(20:1 EGF含有)

図4. 実験1における各創傷被覆材貼付による培養真皮中の線維芽細胞の細胞代謝活性

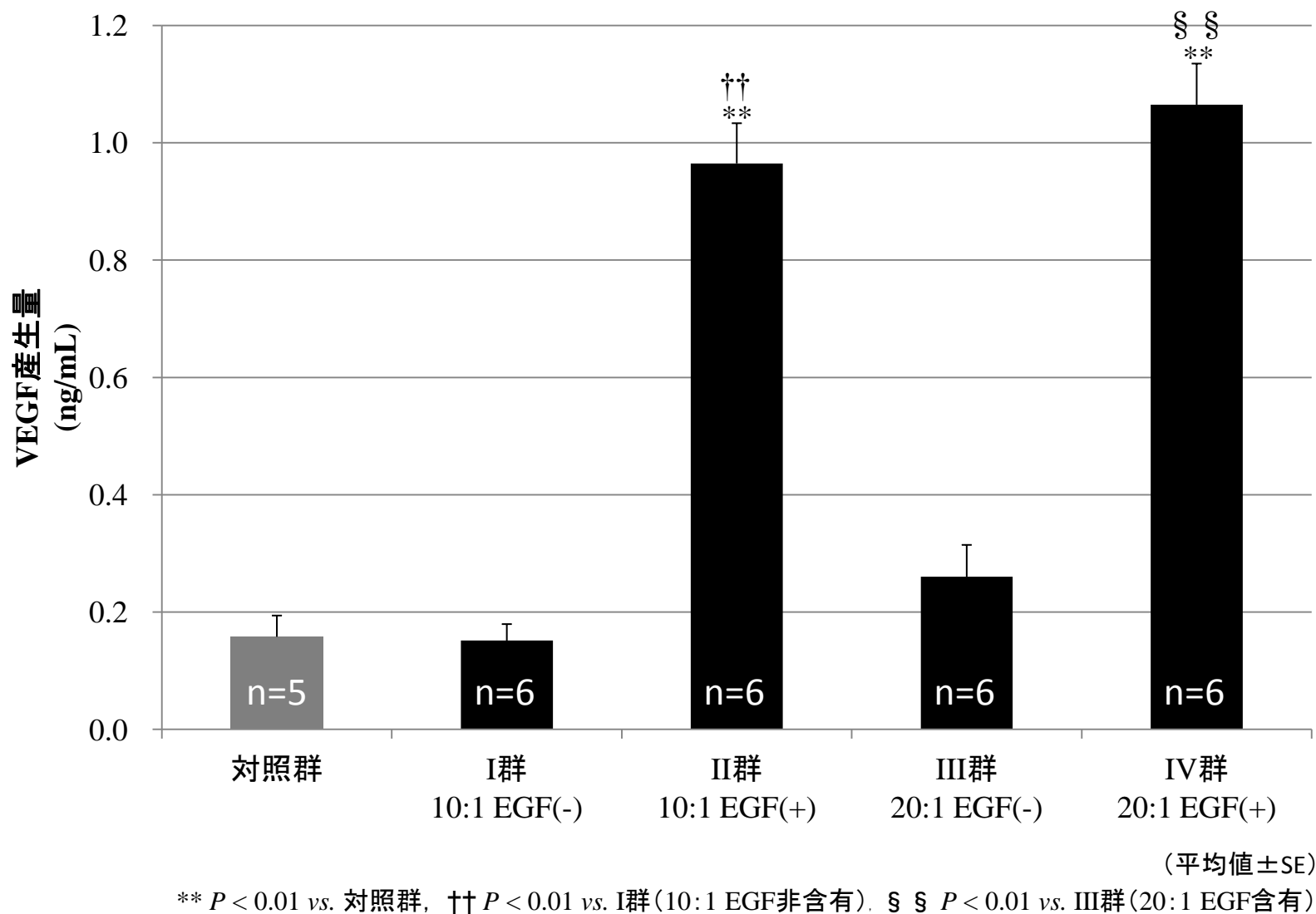


図5. 実験1における各創傷被覆材貼付による培養真皮中の線維芽細胞のVEGF産生量

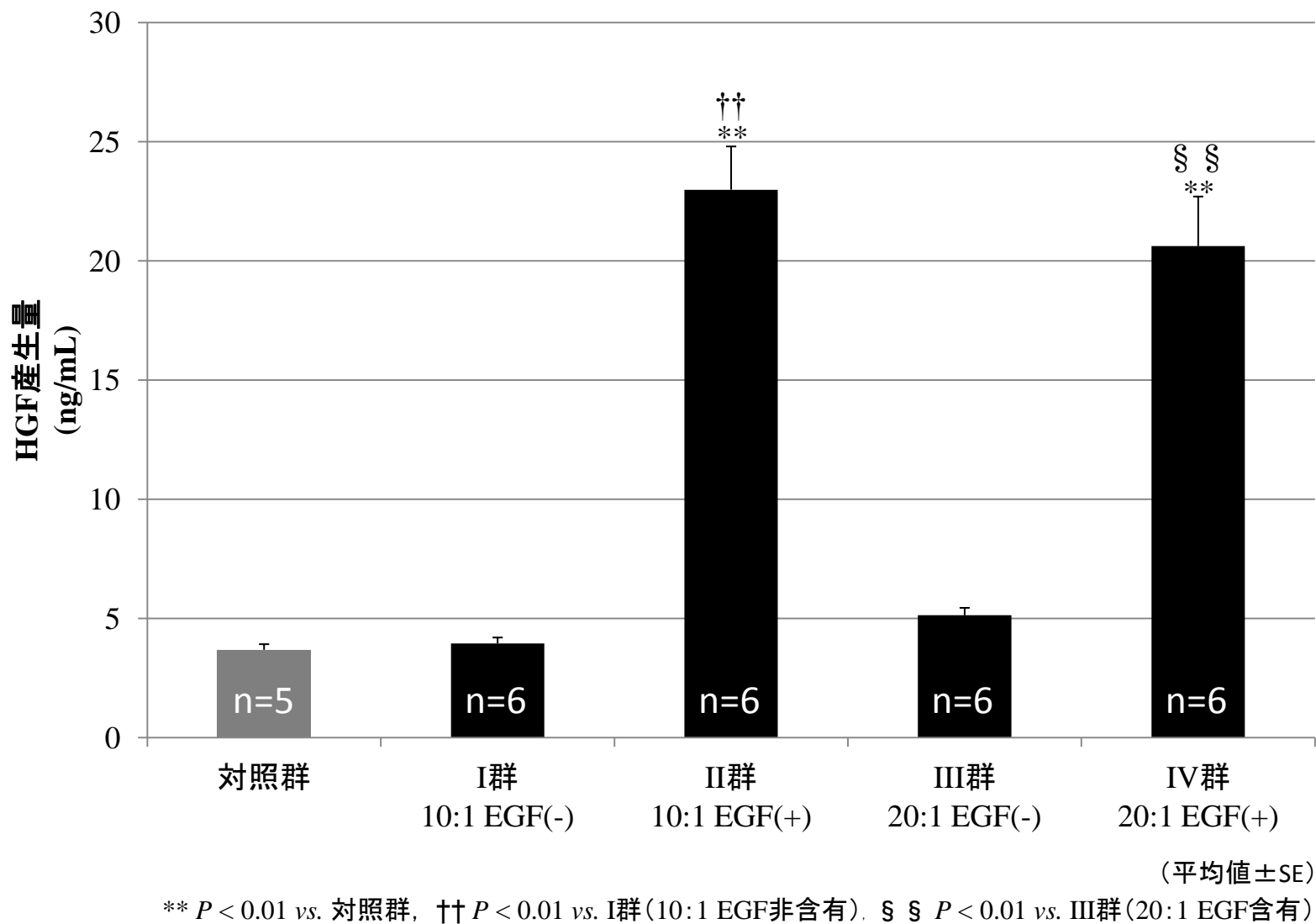


図6. 実験1における各創傷被覆材貼付による培養真皮中の線維芽細胞のHGF産生量

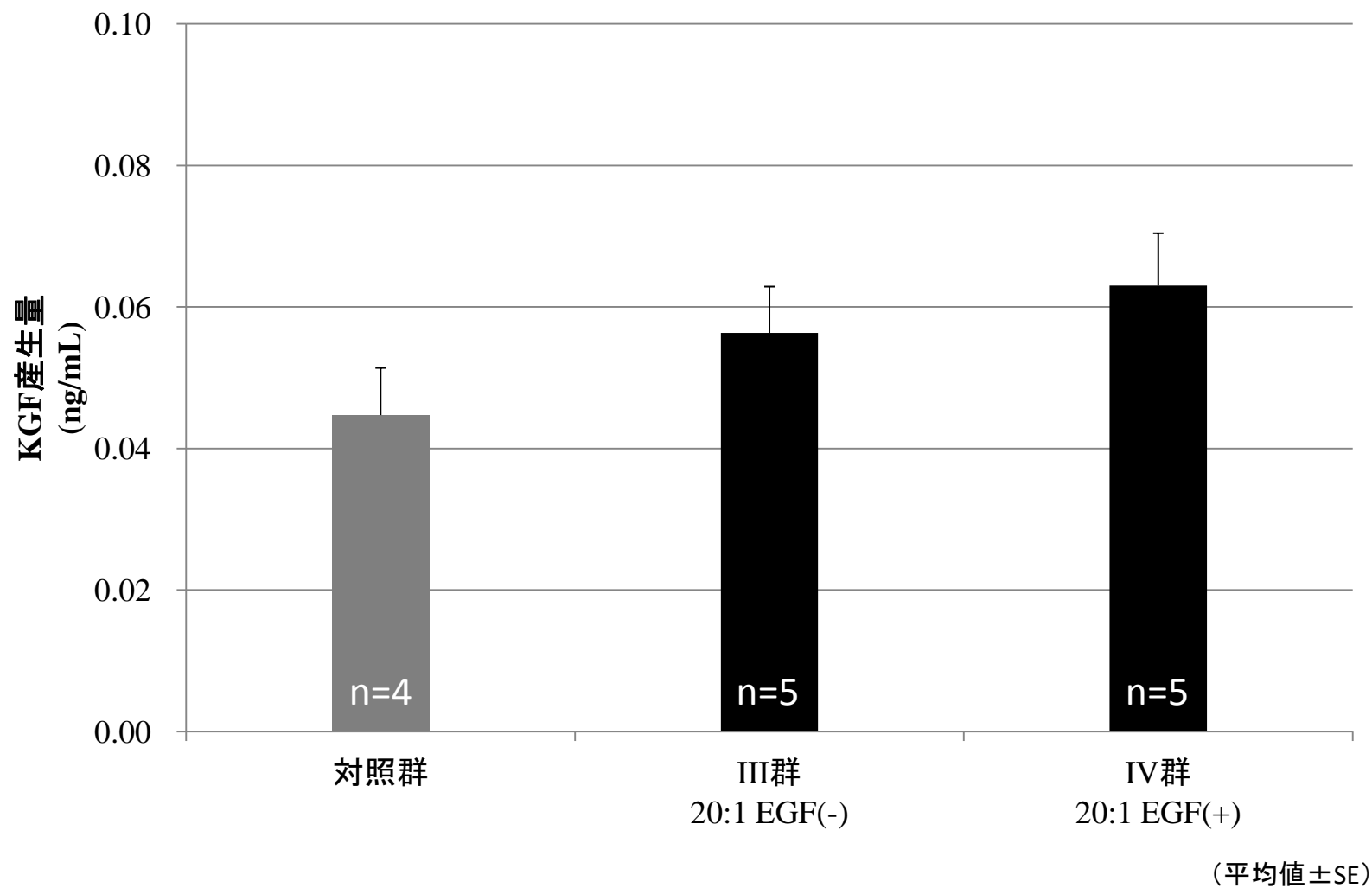
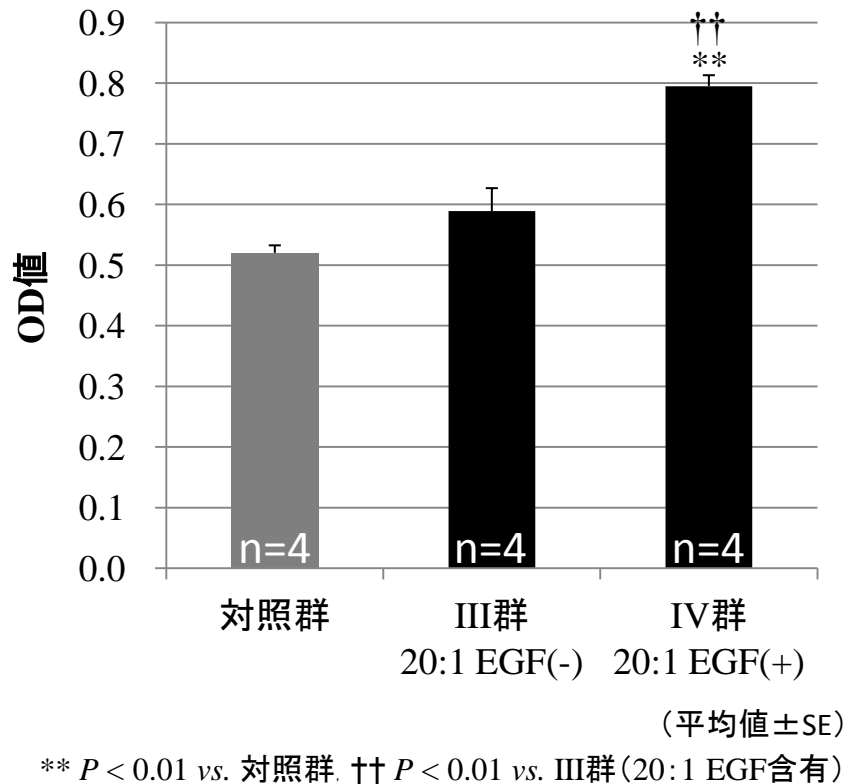
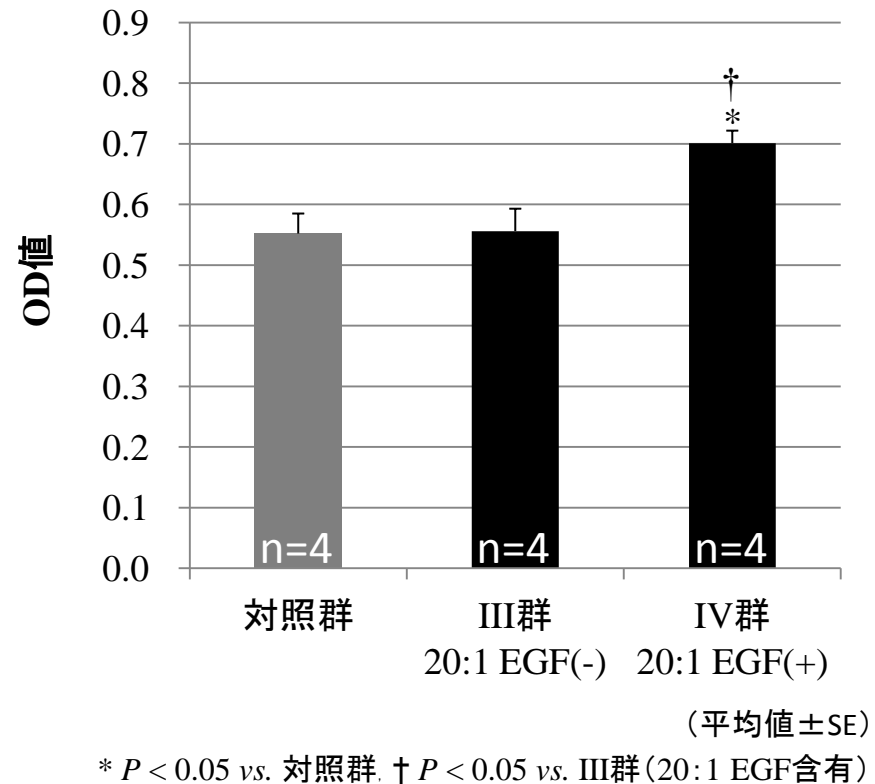


図7. 実験1における各創傷被覆材貼付による培養真皮中の線維芽細胞のKGF産生量

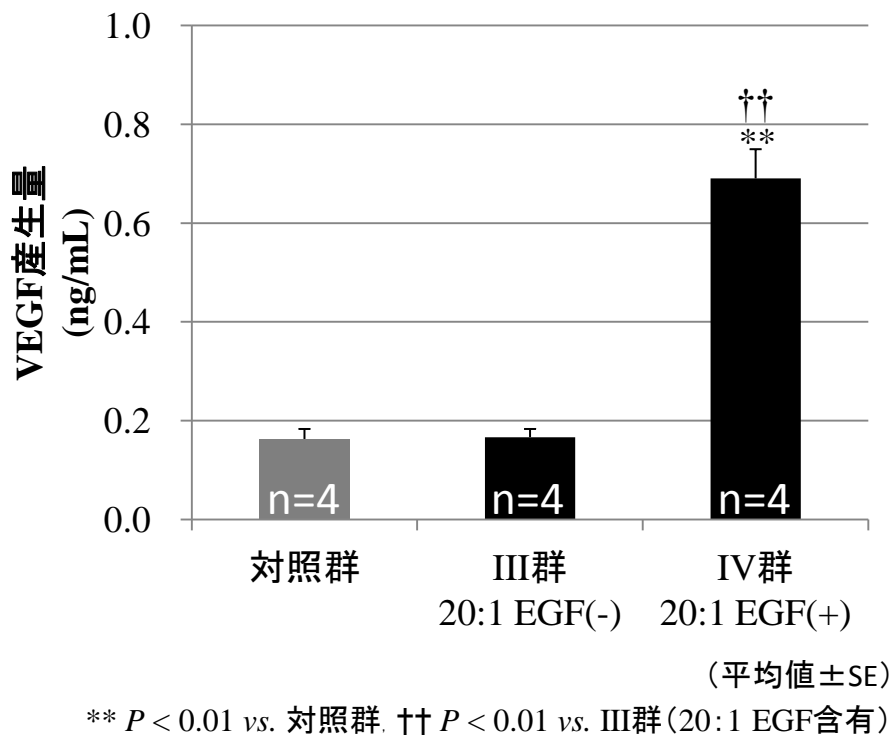


第1期培養(A)

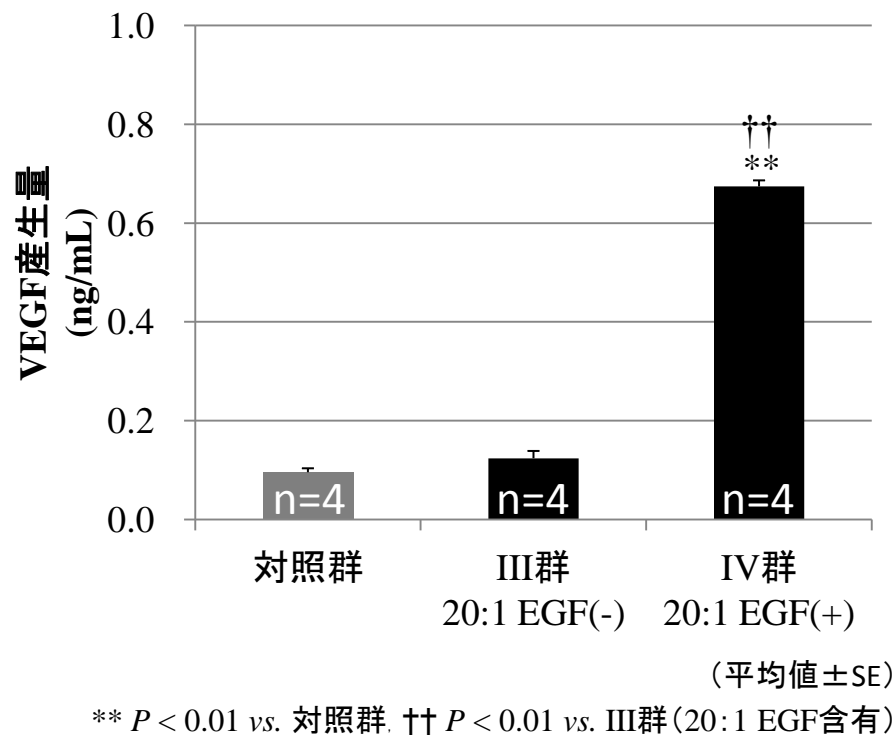


第2期培養(B)

図8. 実験2における各創傷被覆材貼付による培養真皮中の線維芽細胞の細胞代謝活性



第1期培養(A)



第2期培養(B)

図9. 実験2における各創傷被覆材貼付による培養真皮中の線維芽細胞のVEGF産生量

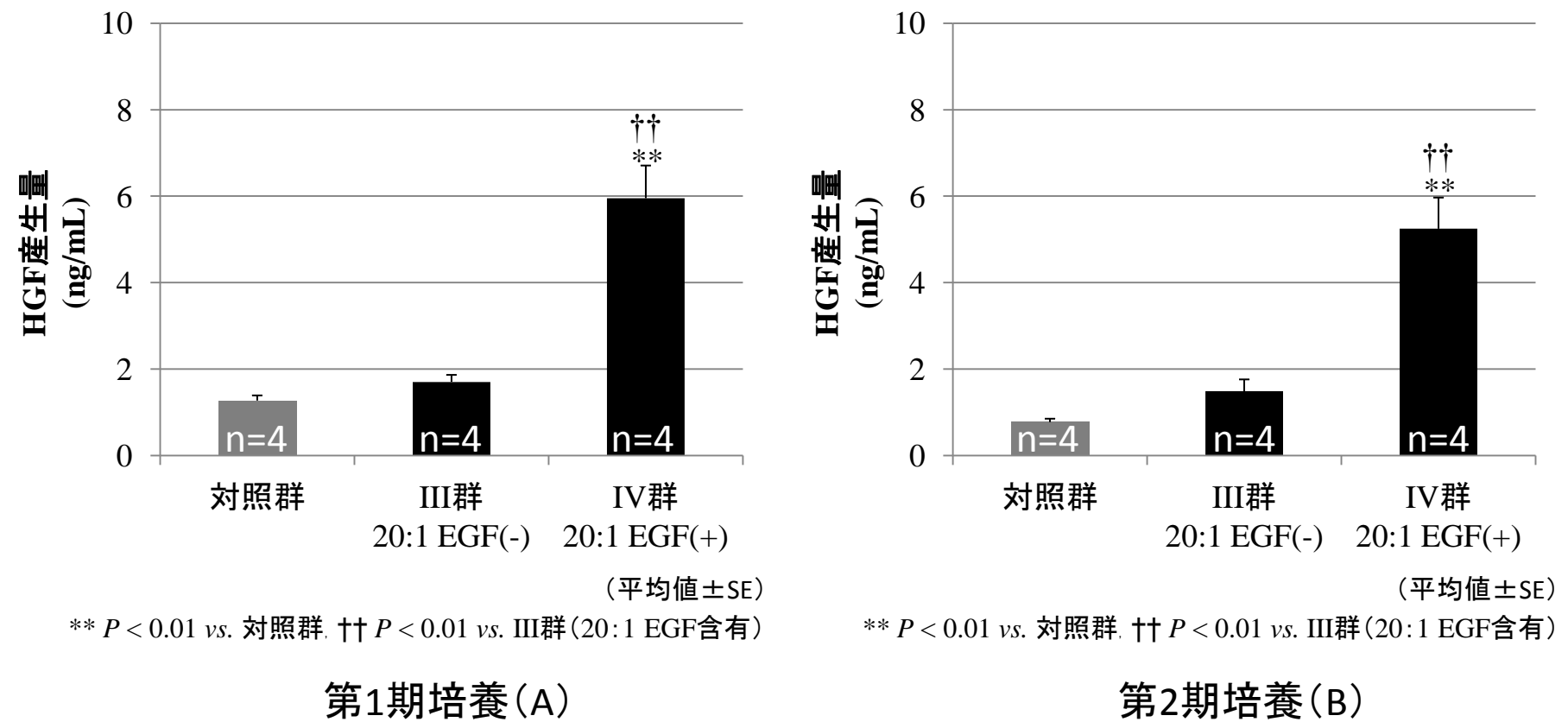


図10. 実験2における各創傷被覆材貼付による培養真皮中の線維芽細胞のHGF産生量