

キチン、キトサンの
肉芽組織形成促進効果に関する基礎的研究

Effects of Chitin and Chitosan
on Acceleration of Granulation Tissue Formation

山口大学大学院連合獣医学研究科
臨床獣医学大講座
外科治療学専攻(鳥取大学)

Surgical Treatment Course (Tottori University),
Department of Veterinary Clinics,
United Graduate Schools of Yamaguchi University

小嶋一夫
Kazuo Kojima

2001

目 次

	頁
緒 言	1
第1章 キチン、キトサンにより誘導された肉芽組織の組織学的検索	4
第1項 濃度による肉芽組織への影響	4
1. 要約	4
2. 実験目的	4
3. 材料および方法	4
1) 実験材料	4
2) 実験方法	5
4. 結果	6
1) 肉眼的所見	6
2) 組織学的所見	6
付図・付表	7
第2項 キチン、キトサンの埋設時間による肉芽組織への影響	12
1. 要約	12
2. 実験目的	12
3. 材料および方法	12
1) 実験材料	12
2) 実験方法	13
4. 結果	13
1) 肉眼的所見	13
2) 組織学的所見	13
付図	15
第3項 考察	22

第2章	キチン、キトサンのコラーゲン合成能に及ぼす影響	23
第1項	キチン、キトサンにより誘導された肉芽組織中のコラーゲン量	23
1.	要約	23
2.	実験目的	23
3.	材料および方法	23
1)	実験材料	23
2)	染色方法	23
3)	画像解析	23
4.	結果	24
	付表	25
第2項	キチン、キトサンのプロリルヒドロキシラーゼ活性に及ぼす影響	26
1.	要約	26
2.	実験目的	26
3.	材料及び方法	26
1)	実験材料	26
2)	実験方法	27
4.	結果	27
	付図	29
第3項	考察	32

第3章 キチン、キトサンの細胞外マトリックスに及ぼす影響	34
第1項 グリコサミノグリカン(GAG)およびプロテオグリカン(PG)含有量 への影響	34
1. 要約	34
2. 実験目的	34
3. 材料および方法	34
1) 実験材料	34
2) 染色方法	34
3) 画像解析	34
4. 結果	35
付表	36
第2項 コンドロイチン硫酸(CS)含有量に及ぼす影響	37
1. 要約	37
2. 実験目的	37
3. 材料および方法	37
1) 実験材料	37
2) 実験方法	37
4. 結果	38
付表	39
第3項 考察	40

第4章 ネコにおけるキチン、キトサンによる肉芽組織への影響	42
第1項 肉芽組織の組織学的検索	42
1. 要約	42
2. 実験目的	42
3. 材料および方法	42
1) 実験材料	42
2) 実験方法	43
4. 結果	43
1) 肉眼的所見	44
2) 組織学的所見	44
3) 埋植材の厚さ	45
4) 付図・附表	46
第2項 肉芽組織中のコラーゲンのタイピング	52
1. 要約	52
2. 実験目的	52
3. 材料および方法	52
1) 実験材料	52
2) 免疫染色方法	52
3) 画像解析	53
4. 結果	53
付図	54
第3項 考察	56
総括および結論	58
謝 辞	61
引用文献	62

本学位論文に関係した内容は以下に示す学術雑誌に投稿し、掲載されている。主軸をなす部分は論文No. 1および2であり、その他の部分は以下に示す学会において口頭発表を実施した。

論文

1. Kojima, K., Okamoto, Y., Miyatake, K., Kitamura, Y., and Minami, S. (1998). Collagen typing of granulation tissue induced by chitin and chitosan. *Carbohydr. Polym.*, 37, 109-113.
2. Kojima, K., Okamoto, Y., Miyatake, K., Tamai, Y., Shigemasa, Y., and Minami, S. (2001). Optimum dose of chitin and chitosan for organization of non-woven fabric in the subcutaneous tissue. *Carbohydr. Polym.*, in press.

口頭発表

1. 小嶋一夫、木下久則、岡本芳晴、南 三郎、松橋 皓(1994).
組織欠損に対するキチン含浸ポリエステル不織布(キチパックP)の応用、
第50回獣医麻酔外科学会(鳥取市).
2. 小嶋一夫、岡本芳晴、南 三郎、松橋 皓(1997).
キチンおよびキトサンのコラーゲン産生に及ぼす影響、
第123回日本獣医学会(藤沢市).
3. 小嶋一夫、岡本芳晴、宮武克行、南 三郎、小嶋一矢、藤瀬 浩(2000).
キチン・キトサンの肉芽形成に及ぼす影響、
第14回キチン・キトサンシンポジウム(吹田市).

緒 言

生体は、感染や外傷あるいは外科手術などの外的侵襲により損傷を受けると、生体防御反応を駆使して自己組織の修復を達成するが、この反応には侵襲によってはじめて発動するというタイムラグが不可避である。侵襲が加わると、補体が最初の活性を引き起こし、産生されたケミカルメディエーターがその局所に存在する白血球やマクロファージならびに血小板を活性化するとともに、損傷近位の血管内皮細胞を活性化させ、炎症細胞の効率的な誘導を開始する(小川, 1994)。この反応が、早ければ早いほど病原微生物からの脅威を最小限にすることができる。このようなミクロな生体反応を理解できなかった時代においても、様々な創傷治癒促進を目的とした治療法があみ出されてきた。イカの軟骨、タコの口吻軟骨およびマッシュルームなどを利用した民間療法などはその典型で(Allan, *et al.*, 1984)、現在ではこれらの物質に創傷治癒促進物質として今や認知されているキチンが含有されていることは周知の事実である。

キチンは、N-アセチル-D-グルコサミン残基が β -(1,4)-結合したムコ多糖であり、地球上に広く分布するバイオマスである。菌界、植物界においては主にカビ、酵母、キノコなど菌類の細胞壁や藻類に(Bartnicki-Garcia, 1968)、動物界では原生動物から有鬚動物にまで(Muzzarelli, 1977)、特に甲殻類や昆虫の骨格物質としてその存在が確認されている。キチンの化学構造はセルロースと類似しており、年間生成量は $1 \times 10^9 \sim 10^{11}t$ と言われ(Allan, *et al.*, 1978 ; Muzzarelli, 1977)、セルロースの年間生産量($1 \times 10^{11}t$)に匹敵する(Muzzarelli, 1977)。しかし、キチンはセルロースが人類の文明の発展に寄与したほどには利用されてこなかった。これはセルロースと異なり、キチンが強固な分子内および分子間水素結合を有し、そのため結晶が極めて強靱で水に不溶性であることと、溶媒となるものが極めて限られていることが最大の原因とされる(Muzzarelli, 1977 ; Nagai, *et al.*, 1984)。

1970 年になり、Prudden, *et al.*(1970)が鮫の軟骨中のアセチル-D-グルコサミンによる創傷治癒促進効果検討する過程で、そのポリマーであるキチンにその効果を初めて発見し、その後 Yano, *et al.*(1985)がラットにおいて、中島ら(1985)がウサギにおいて皮膚縫合創の癒合強度の増強効果を確認し、1985 年に初の創傷被覆材としてのキチン製品(ベスキチンW、ユニチカ、京都)が商品化された。医薬分野における応用が現実となり関心を集めたが、その後医学界においては画期的な進展を見ることなく現在に至っている。

一方、キトサンは自然界では菌類の1種であるケカビ (*Mucor rouxii*) の細胞壁に存在するが (Bartnicki-Garcia, 1968)、その精製には莫大な経費を必要とするため、現在市販されているキトサンはキチンを化学処理で脱アセチル化することによって得られた人工物である。キトサンはキチンと相違して反応性に富むアミノ基を多く含み、酸性領域で可溶性となるため工業的に応用性は高く、様々な蛋白吸着剤として応用が進められてきた。しかし、原材料であるキチンをさらに化学処理することなどから、廃液処理材や農薬代理品として現存する物質とのコスト面と機能性の面で魅力が乏しく、付加価値の高い医薬品への応用が熱望されてきた。Allan, *et al.* (1984) が熱傷の治療に使用した場合に疼痛の緩和があるという記述を残しているが、人体への応用は現在に至るまでほとんどなされていないのが現状である。Malette, *et al.* (1986) が犬におけるキトサンの創傷治癒を報告しているが、臨床応用に関する報告は Minami, *et al.* (1992b) が初めてであり、それ以降日本においては獣医学領域でキチン、キトサンの研究が発展した。これらの成績によって、世界初の動物用医用材料が製品化された。

創傷治癒に対するキチンおよびキトサンの臨床応用はその基礎的研究に先行し、それにより *in vivo* における種々のデータが得られた。その特色は過剰な肉芽や瘢痕を伴わず、血管に富んだスムーズな肉芽組織形成の促進にある。これまでに過剰な肉芽形成の制御ならびに瘢痕形成の惹起などのメカニズムの解明のために様々な基礎的研究を重ねられてきた。それらの投与部位の組織所見では、創傷初期において多数の多形核白血球 (PMN) およびマクロファージの遊走、集簇がみられ、次いで線維芽細胞および多数の多核巨細胞の出現、豊富な新生血管を伴う肉芽の形成、および薄く滑らかな上皮の再生が確認されている (Okamoto, *et al.*, 1993a, 1995)。また、生理活性の面からでは、キチンおよびキトサンは白血球を活性化し、それ自体が走化因子である (Minami, *et al.*, 1993) だけでなく、補体活性の副経路を動かして C3a, C5a を産生することにより PMN の遊走、集簇を促すことが報告されている (Minami, *et al.*, 1998)。また、マクロファージの遊走を活性化すると報告もある (Peluso, *et al.*, 1994 ; Nishimura, S., *et al.*, 1986)。このマクロファージはインターロイキン-8、FGF、TGF- β 、TGF- α など多様なサイトカインを分泌し、いわゆるサイトカインネットワークを構築する (Folkman and Klagsbrun, 1987 ; Gromack, *et al.*, 1990 ; Koch, *et al.*, 1992 ; Bennett, *et al.*, 1993)。さらに、キチンおよびキトサンが直接、線維芽細胞や血管内皮細胞に作用して、両細胞の遊走および増殖に関連するインターロイキン-8 を分泌させることも確認されている (Mori, *et al.*, 1997 ; 入江, 1997)。また、キチンおよびキトサンの投与部位周辺の滲出液からはプロスタグランジン E₂、インターロイキン-1 が検出された (Minami, *et al.*, 1995 ; Tanigawa, *et al.*,

1992)。ポリマーであるキチンは、様々な化学的処理によって新たなる機能性高分子の作出が試みられている。例えば、脱アセチル化度の変化、分子量の影響、硫酸化、カルボキシメチル化、リン酸化等の化学的修飾を施すことにより、抗腫瘍活性 (Nishimura, K., and Azuma, 1992 ; Nishimura, K., *et al.*, 1984, 1985, 1986 a, b ; Nishimura, S., *et al.*, 1986 ; Murata, *et al.*, 1989, 1992 ; Tokoro, *et al.*, 1988 ; Saiki, *et al.*, 1990 ;) やアジュバント活性 (Nishimura, K., *et al.*, 1985, 1986 a, b ; Nishimura, S., *et al.*, 1986 ; Suzuki, K., *et al.*, 1984, 1986 ; Tokoro, *et al.*, 1988)、感染抵抗性 (Nishimura, K., *et al.*, 1984 ; Suzuki, K., *et al.*, 1984, 1986 ; Iida, *et al.*, 1987 ; Azuma, *et al.*, 1988 ; Tokoro, *et al.*, 1988) 等が増強されるとの報告がある。このように、キチンおよびキトサンの基礎的な生物活性作用機序は組織学的に、免疫学的に少しずつ明らかにされつつあるが全容は未だ明らかではない。また、肉芽組織を構成する大きな成分としてコラーゲンやプロテオグリカンといった細胞外マトリックスがあるが、キチンおよびキトサンに関連した報告は少なく、キトサンのモノマーであるグルコサミンの経口投与が細胞外マトリックスを誘導することにより軟骨損傷の治癒過程を促進するとの報告 (Tapadinhas, *et al.*, 1982 ; Theodosakis, *et al.*, 1997 ; Kajimoto, *et al.*, 1998) やヘパリン・キトサン複合体が皮膚の創傷治癒を促進する (Kratz G, *et al.*, 1997) とした報告がみられる程度である。

さらに、最も基本的な創傷治癒促進に影響するキチンおよびキトサンの濃度については、全く報告が見られない。投与量については、毒性試験に関するものしか見られない (Mita, 1987 ; Seo, 1990 ; Minami, 1996)。本研究では、創傷治癒におけるキチンおよびキトサンの肉芽形成促進作用機序を明らかにする目的で、第一章ではキチン、キトサンにより誘導される肉芽組織に対する使用用量および埋設時間の影響を組織学的に検討した。第二章では、キチンおよびキトサンのコラーゲン合成能に及ぼす影響を検討するために、肉芽組織中のプロリルヒドロキシラーゼ活性を測定するとともに、組織切片にマッソントリクローム染色を施し、画像解析からコラーゲン量を測定した。第三章では、細胞外マトリックスの主要成分であるグリコサミノグリカンとプロテオグリカンについて、それぞれの特殊染色であるアリュースャンブルー染色とサフランin-O 染色を組織切片に施し、画像解析により測定した。さらに、グリコサミノグリカン中のコンドロイチン硫酸を高速液体クロマトグラフィー法を用いて定量した。第四章では、臨床応用においてその効果が最も顕著に現れるネコを用いて、キチン、キトサンによる肉芽組織への影響および誘導されるコラーゲンのタイピングを行い、キチンおよびキトサンの肉芽形成促進作用についてコラーゲンを中心に、総合的に検討した。

第1章 キチン、キトサンにより誘導された肉芽組織の組織学的検索

第1項 濃度による肉芽組織への影響

1. 要約

ラットを用いて、キチン、キトサン懸濁液およびリン酸塩緩衝液を含浸させたポリエステル不織布(キチン-NWF、キトサン-NWF およびコントロール)を皮下に埋植し、誘導される組織反応を肉眼的および組織学的に観察した。さらに、キチン、キトサンの濃度が肉芽組織形成に及ぼす影響についても検討した。

肉眼的所見では、1.0 および 10 mg のキチン懸濁液を含浸させたキチン-NWF、0.1 および 1.0 mg のキトサン懸濁液を含浸させたキトサン-NWF において、NWF 周囲に形成される組織は薄く滑らかであった。一方、50 mg キチン-NWF および 10 mg キトサン-NWF では、その組織は厚く粗造であった。また、これらの埋植材周囲の組織において浮腫等の肉眼的な炎症反応が観察された。

組織学的所見では、コントロール群と比較すると 1.0 および 10 mg キチン-NWF、0.1 および 1.0 mg のキトサン-NWF において、埋植材の器質化が明らかに促進されていた。50 mg キチン-NWF および 10 mg キトサン-NWF における器質化はわずかであり、埋植材中に多くの炎症性細胞が観察された。これらの結果より、キチンおよびキトサンの至適濃度は、それぞれ 1.0 ~ 10 mg/ml、0.1 ~ 1.0 mg/ml であると思われた。したがって、キトサンの組織反応の強さはキチンの約 5 ~ 10 倍と考えられた。

2. 実験目的

肉眼的および組織学的観察により、キチンおよびキトサンの組織反応に及ぼす影響を投与量から評価するとともに、それらによって引き起こされる組織反応の強さを検討した。

3. 材料および方法

1) 実験材料

(1) 実験動物

8 匹の Wister 系のラット(雌、体重 270~300 g: 浜口実験動物、兵庫)を用いた。

(2) 供試薬

イカ甲から得られた微粉末のキチンおよびベニズワイガニから得られたキチンを脱アセチル化し、微粉末状にしたキトサン(サンファイブ、鳥取)をエチレンオキシドガス(EOG)で滅菌し、リン酸塩緩衝液(PBS, pH 7.2)で 50 mg/ml の濃度に懸濁して使用した。キチンは、平均粒径 3.5 μm 、脱アセチル化度 10 %、分子量 370 kD、灰分 1 % 以下、タンパク含量 0.8 % 以下、重金属(鉛、カドミウム、砒素など) 10 ppm 以下で、キトサンは平均粒径 3.5 μm 、脱アセチル化度 80 %、分子量 80 kD、灰分 1.2 % 以下、タンパク含量 0.1 % 以下、重金属 10 ppm 以下であった。分子量および脱アセチル化度は、それぞれゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)および¹H 核磁気共鳴(NMR)分析を用いて計測した。実験にはこれらの懸濁液を PBS で希釈して、キチンについては 1.0、10 および 50 mg/ml、キトサンについては 0.1、1.0 および 10 mg/ml の濃度に調整したものをを用いた。

(3) 埋植材

EOG で滅菌したポリエステル不織布(NWF : Sontara8100, Dupont, USA, 1.0 × 1.0 cm²)に、0.1 ml のキチン懸濁液(1.0、10 および 50 mg/ml)またはキトサン懸濁液(0.1、1.0 および 10 mg/ml)を含浸させて用いた。また、0.1 ml の PBS を NWF に含浸させ、コントロールとした。0.1 mg/ml のキチン懸濁液を含浸させた NWF を 0.1 mg キチン-NWF とし、他の埋植材についても同様に命名した。

2) 実験方法

ラットを 2 群に分け(各 n=4)、それぞれキチン群およびキトサン群とした。硫酸アトロピン(0.05 mg/kg. 田辺. 大阪)、塩酸ケタミン(15 mg/kg. 三共. 大阪)およびプロピオニルプロマジン(0.05 mg/kg. コンベレン. バイエル. 東京)を筋肉内投与し麻酔導入後、背側肋骨上部を剪毛し、クロルヘキシジン(ヒビテン. アストラゼネカ. 大阪)で消毒を行った。各ラットの背側正中に、約 10 cm 長の皮膚切開創を作製した。

キチン群では、1 匹目のラットに 1 mg キチン-NWF、10 mg キチン-NWF、50 mg キチン-NWF および NWF を右側頭、右側尾、左側尾および左側頭部にそれぞれ埋植した。左右の埋植材の間隔は、2 cm であり、上下間は 3 cm であった(図 1-1)。2 匹目ではこれらの材料を右側尾、左側尾、左側頭、右側頭部の順に、3 匹目では左側尾、左側頭、右側頭、右側尾部の順に、4 匹目では左側頭、右側頭、右側尾、左側尾部の順に埋植した。キトサン群においても同様に埋植をおこなった。そして埋

植材の四隅を 3-0 ナイロン糸で単純結節縫合し、皮膚には直径 0.15 mm ワイヤーを用いて 1.0 cm 間隔で単純結節縫合を施した。術後7日目にラットを安楽死させ、各埋植材を周囲組織とともに採材し、肉眼的に観察した。各サンプルを 10%ホルマリンリン酸緩衝液で固定し、脱水処理を行い、パラフィン包埋して 3 ~ 4 μ m 厚の切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

4. 結果

1)肉眼的所見

1.0 および 10 mg キチン-NWF において、NWF 周囲の肉芽組織はコントロールと同様に滲出液の浸出ならびに腫脹は認められず、スムーズであった。50 mg キチン-NWF では滲出液の浸出ならびに腫脹を伴った過剰な炎症反応が周囲組織で見られた。

0.1 mg キトサンにおける肉芽組織はコントロールと同様に炎症を伴わない滑らかなものであったが、1.0 mg キトサン-NWF ではわずかに滲出液の貯留と腫脹が観察された。10 mg キトサン-NWF では NWF 周囲の肉芽組織は厚く粗造で、重度の滲出液の貯留と炎症反応を伴っていた。

2)組織学的所見

組織学所見を表 1-1 に示した。組織反応は埋植材の内部および外部(周囲組織)で評価した。1.0 および 10 mg キチン-NWF では、コントロール(図 1-2)と比較して組織の器質化が明らかに促進されていた(図 1-3)。しかし、50 mg キチン-NWF においては巨細胞の発現と器質化はわずかで、多くの多形核白血球を含む炎症性細胞が NWF 内で観察された(図 1-4)。0.1 および 1.0 mg キトサン-NWF における組織学的所見は 1.0 および 10 mg キチン-NWF のものと類似していた。しかし、10 mg キトサン-NWF では、炎症細胞がフェルト内で顕著に観察され、器質化は 50 mg キチン-NWF と同様にわずかであった。

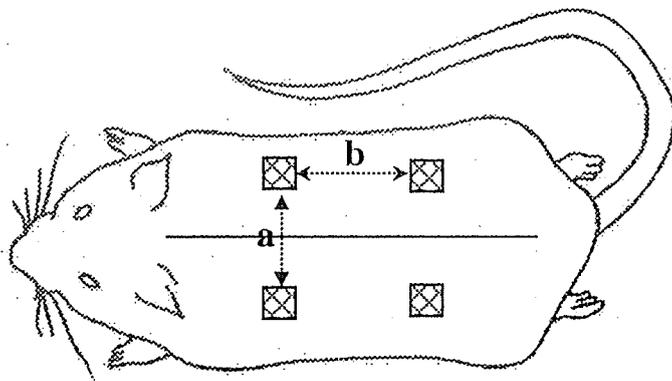


図 1 - 1 各種NWFの埋植部位

a: 2 cm、 b: 3 cm

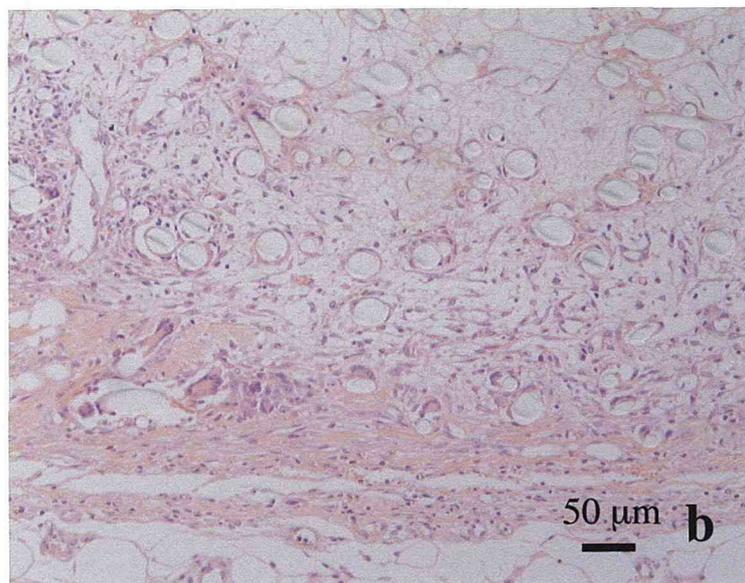
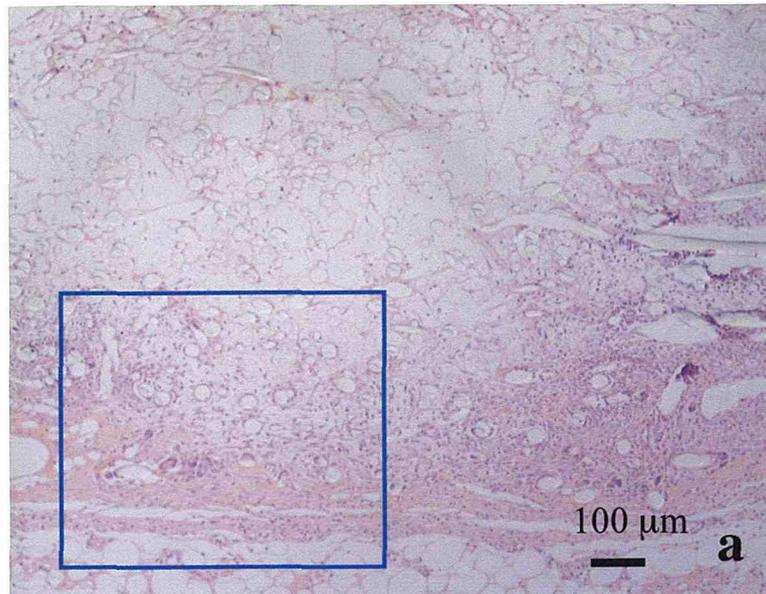


図1-2 コントロールの組織学的所見（7日目）
器質化はNWFの周辺部にのみ観察される。
a: 低倍像、b: aの区画部高倍像

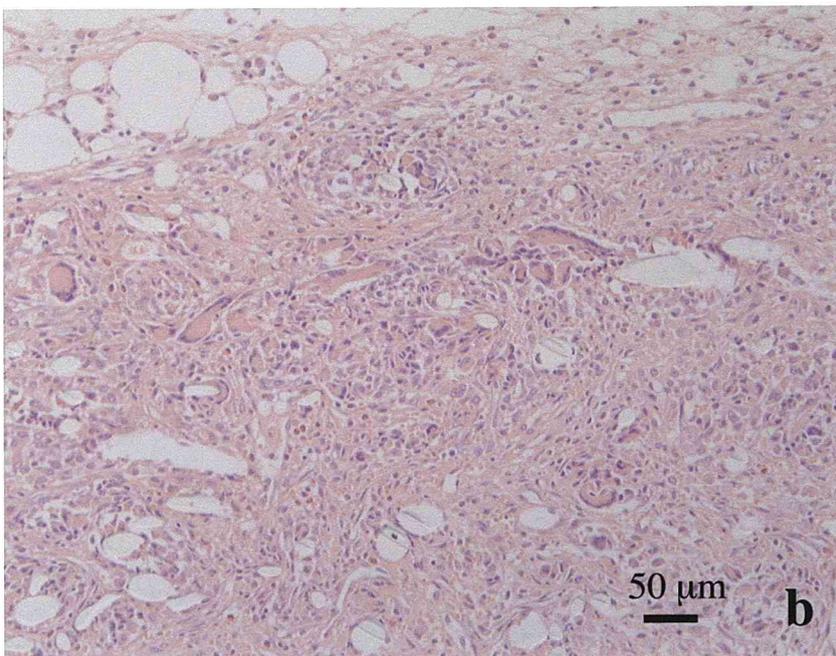
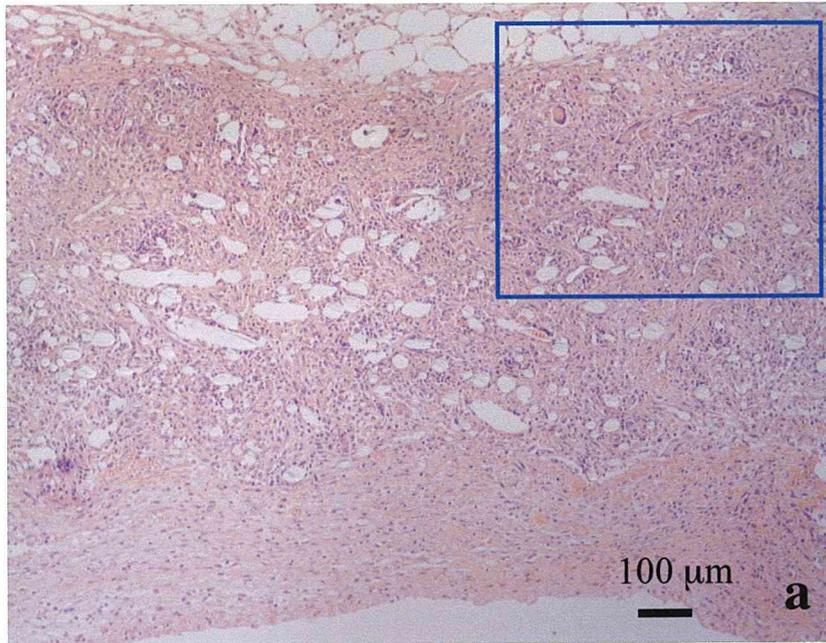


図 1 - 3 10 mg キチン-NWFの組織学的所見（7日目）
NWFの良好な器質化が認められる。
a: 低倍像、b: aの区画部高倍像

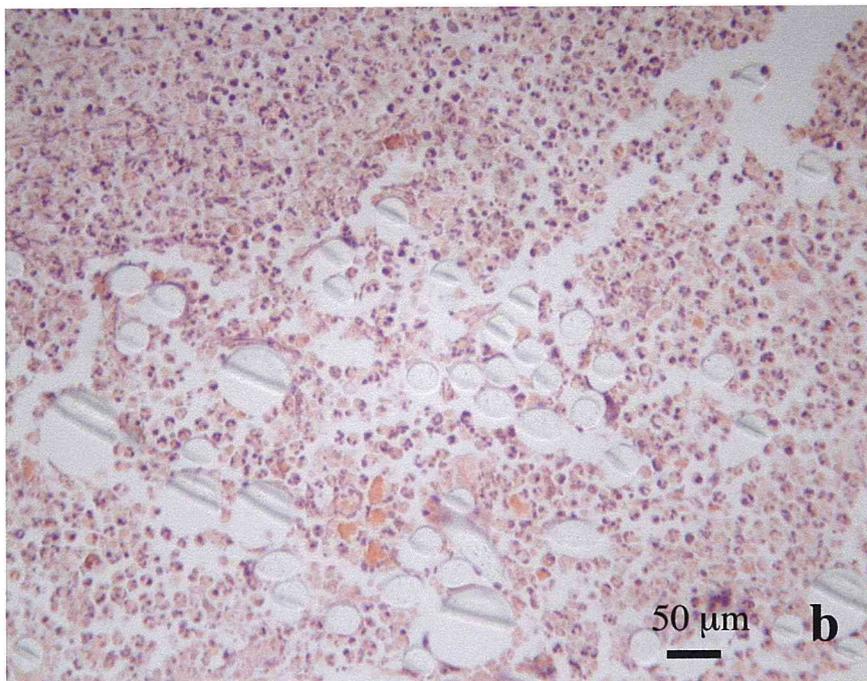
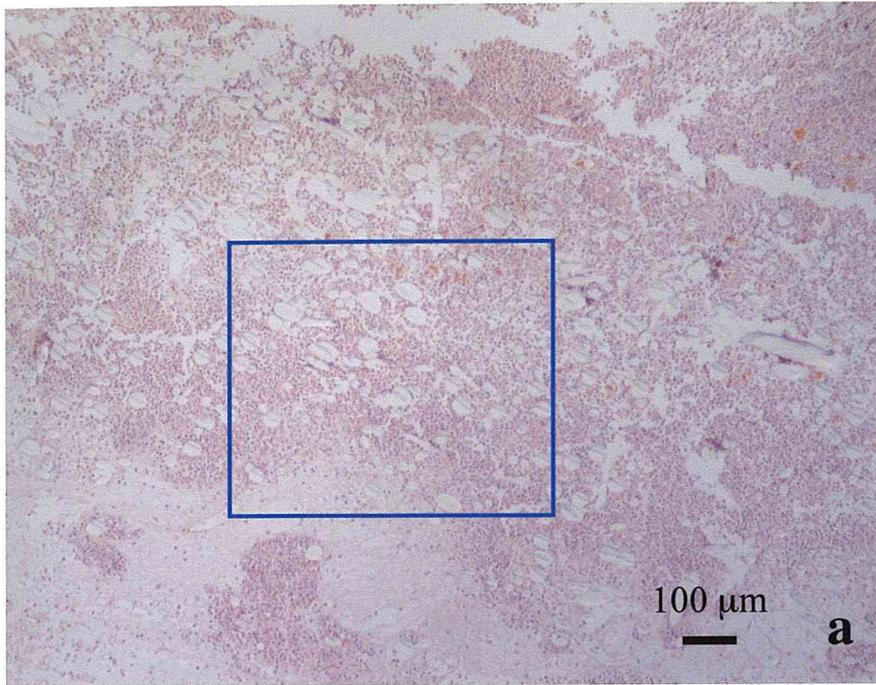


図 1 - 4 50 mg キチン-NWFの組織学的所見 (7日目)
器質化は10 mgキチン-NWF (図 1 - 3) に比較して不良で (a) 、
NWF内に多数の炎症性細胞の集簇がみられる (b) 。
a: 低倍像、b: aの区画部高倍像

表 1-1 各投与量における組織学的反応所見（7日目）

	投与量* (mg)	埋植材中の 肉芽組織	埋植材周囲の 肉芽組織	炎症性 細胞	多核巨 細胞	血管 新生
コントロール	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
キチン	0.1	++	+/-	+	+	+
	1	+++	+	+	++	+
	5	+	+++	+++	+	+/-
キトサン	0.01	++	+/-	+	+	+
	0.1	++	++	+	+	+
	1	+	+++	+++	+/-	+/-

-: なし, +/-:軽度, +:中等度, ++:重度, +++:極めて重度

* : NWF (1 x 1 cm²) に含浸させた量。各濃度のキチン (1, 10, 50mg/ml) およびキトサン (0.1, 1, 10mg/ml) を0.1ml含浸させた。

第2項 キチン、キトサンの埋設時間による肉芽組織への影響

1. 要約

ポリエステル不織布(NWF)に、第1項の実験により判明した至適濃度のキチンを含浸させたキチン-NWF、キトサンを含浸させたキトサン-NWF および PBS を含浸させた NWF をラットの背側皮下組織に埋植し、2、4、7、11、14 日後に採材し、それらによって誘導された肉芽組織について肉眼的および組織学的観察を行った。

肉眼的にはキチンの 10 mg/ml、キトサンの 1 mg/ml およびコントロールで 11 および 14 日目に漿液の貯留を少数例で認めた。また、キチン、キトサン両群とも 7 日目以降同じように滑らかな肉芽組織の形成を認めた。

組織学的には両群ともコントロール群より早く、7 ~ 11 日目にかけて NWF のほぼ全面に肉芽組織の浸潤が認められ、器質化が完成した。

2. 実験目的

肉眼的および組織学的観察により、至適濃度のキチンおよびキトサンの組織反応に及ぼす影響を経時的に評価した。

3. 材料および方法

1) 実験材料

(1) 実験動物

30 匹の Wister 系のラット(雌、体重 270 ~ 300 g : 浜口実験動物、兵庫)を用いた。

(2) 供試薬

第1章、第1項で用意したキチンおよびキトサンの懸濁液を用いた。

(3) 埋植材

EOG で滅菌した NWF (1.0 × 1.0 cm²) に 0.1 ml のキチン懸濁液 (1.0、10 mg/ml) またはキトサン懸濁液 (0.1、1.0 mg/ml) を含浸させて用いた。コントロールとして 0.1 ml の PBS を NWF に含浸させた。1 mg/ml のキチン懸濁液を含浸させた NWF を 1 mg キチン-NWF とし、他の埋植材についても同様に命名した。

2) 実験方法

ラットを 2 群に分け(各 n=15)、それぞれキチン群およびキトサン群とした。さらに、各群を 5 つの小群に分けた(各 n=3)。硫酸アトロピン(0.05 mg/kg. 田辺. 大阪)、塩酸ケタミン(15 mg/kg. 三共. 大阪)およびプロピオニルプロマジン(0.05 mg/kg. コンベレン. バイエル. 東京)を筋肉内投与し麻酔導入後、背側肋骨上部を剪毛し、クロルヘキシジン(ヒビテン. アストラゼネカ. 大阪)で消毒を行った。各ラットの背側正中に、約 10 cm 長の皮膚切開創を作製した。キチン群の各小群の 1 匹目のラットに 1 mg キチン-NWF、10 mg キチン-NWF および NWF を切開線の左側 1 cm の部位に頭側より 3 cm 間隔で埋植し、右側についても同様に行った(図 1-5)。2 匹目のラットには頭側より NWF、1 mg キチン-NWF、10 mg キチン-NWF の順、3 匹目には 10 mg キチン-NWF、NWF、1 mg キチン-NWF の順で同様に埋植を行った。キトサン群についても同様に行った。各埋植材の四隅を 3-0 ナイロン糸で単純結節縫合し、皮膚には直径 0.15 mm ステンレスワイヤーを用いて 1.0 cm 間隔に単純結節縫合を施した。

術後 2、4、7、11 および 14 日目にキチンおよびキトサン群からそれぞれ任意に 1 小群を選び、ラットを安楽死し、埋植材を採材した。各サンプルを 10% ホルマリンリン酸緩衝液で固定し、脱水処理を行い、パラフィン包埋して 3~4 μm 厚の切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、組織学的に観察した。

4. 結果

1) 肉眼的所見

肉眼的所見では、コントロール、キチンおよびキトサン群の間にほとんど差がみられなかったが(図 1-6)、11 日目にコントロールで 3 例、1 mg キトサン-NWF で 1 例、10 mg キチン-NWF で 2 例、14 日目では、コントロールで 2 例、1 mg キトサン-NWF で 1 例、10 mg キチン-NWF で 2 例に少量の淡赤色滲出液の貯留が見られた。それら以外では 7 日目以降の埋植材では滑らかな薄い肉芽組織が見られた。

2) 組織学的所見

術後 2 日目の組織学的所見はコントロール群では炎症性細胞は極めて軽度に浸潤し、フィブリンネットワークは見られなかった。キチンおよびキトサン群では炎症性細胞が軽度に浸潤し、フィブリンネットワークが軽度に観察された(図 1-7)。4 日目では、

コントロール群では炎症性細胞およびフィブリン析出が 2 日目よりやや増加したが、NWF 内への肉芽組織の浸潤はほとんどみられなかった。キチンおよびキトサン群では炎症性細胞や線維芽細胞が多数出現し、NWF 辺縁からの肉芽組織の浸潤が見られた(図 1-8)。7 日目では、コントロール群において NWF 辺縁に肉芽組織浸潤が観察された。キチンおよびキトサン群では、大半のサンプルにおいて NWF のほぼ全面に肉芽組織の浸潤が観察された。また、多核巨細胞も多数観察された(図 1-9)。11 日目ではコントロール群においても NWF の器質化は 50 ~ 70 % にまで増加した。キチンおよびキトサン群においては、全てのサンプルで NWF の約 9 割以上が器質化していた。多核巨細胞は 7 日目より増加していた(図 1-10)。14 日目では、コントロールにおいてもほぼ 100 % の器質化が見られたが、不完全な器質化を示す例も観察された。キチンおよびキトサン群では 11 日目と同様に十分な器質化が認められた(図 1-11)。さらにいずれの濃度の埋植材においても器質化に差はみられなかった。

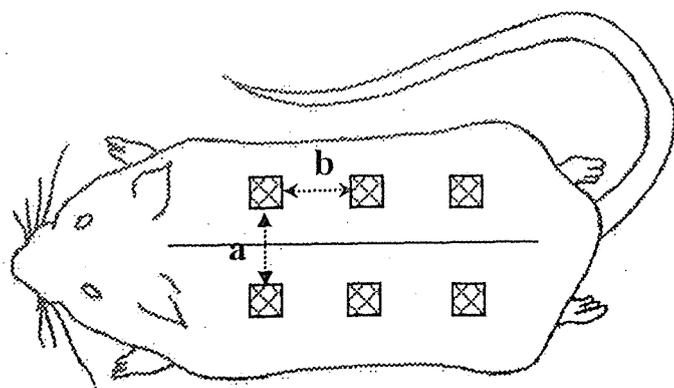


図 1-5 各種NWFの埋植部位

a: 2 cm、 b: 3 cm

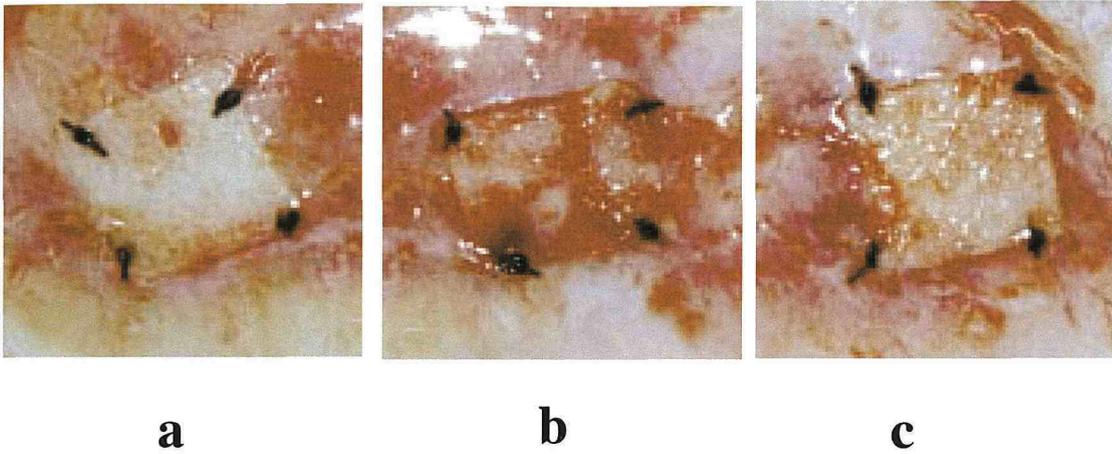
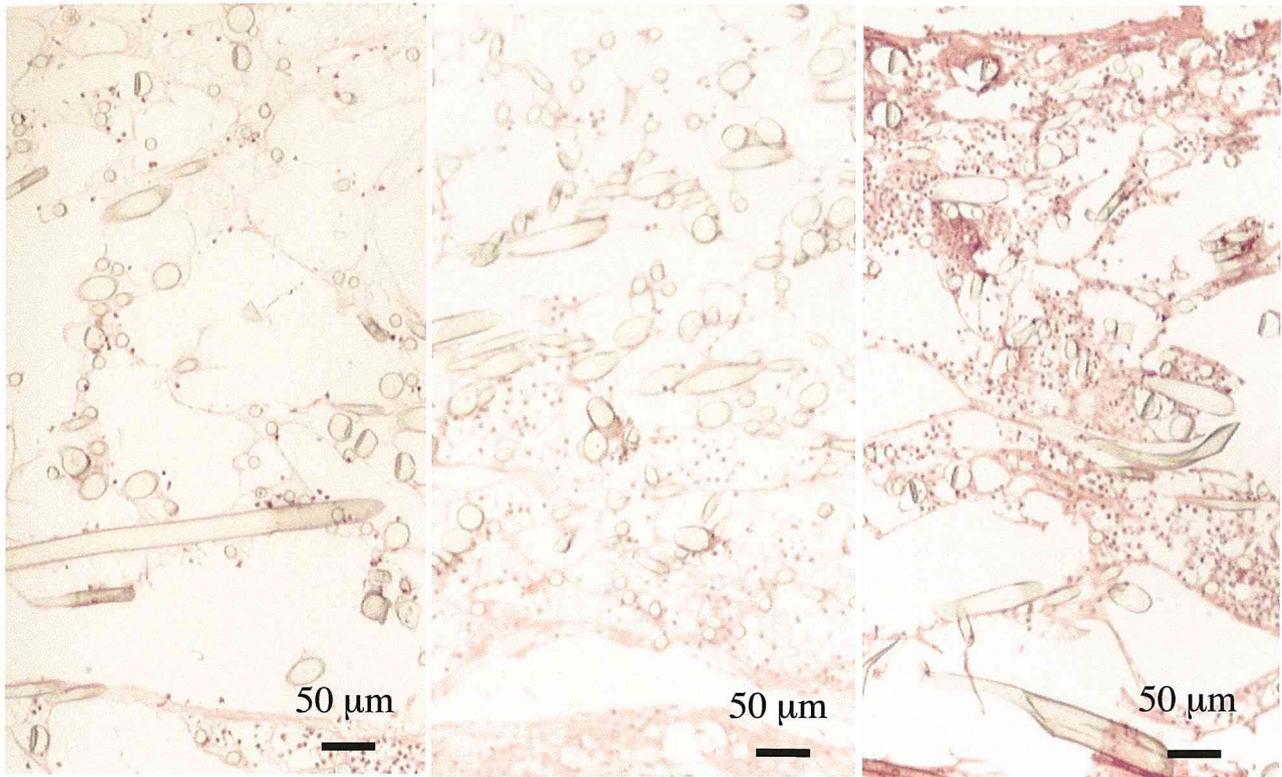


図 1 - 6 7 日目の埋植部位の肉眼的所見
肉眼的に各群間に大きな差はみられられない。
a: コントロール群、b: キチン群、c: キトサン群

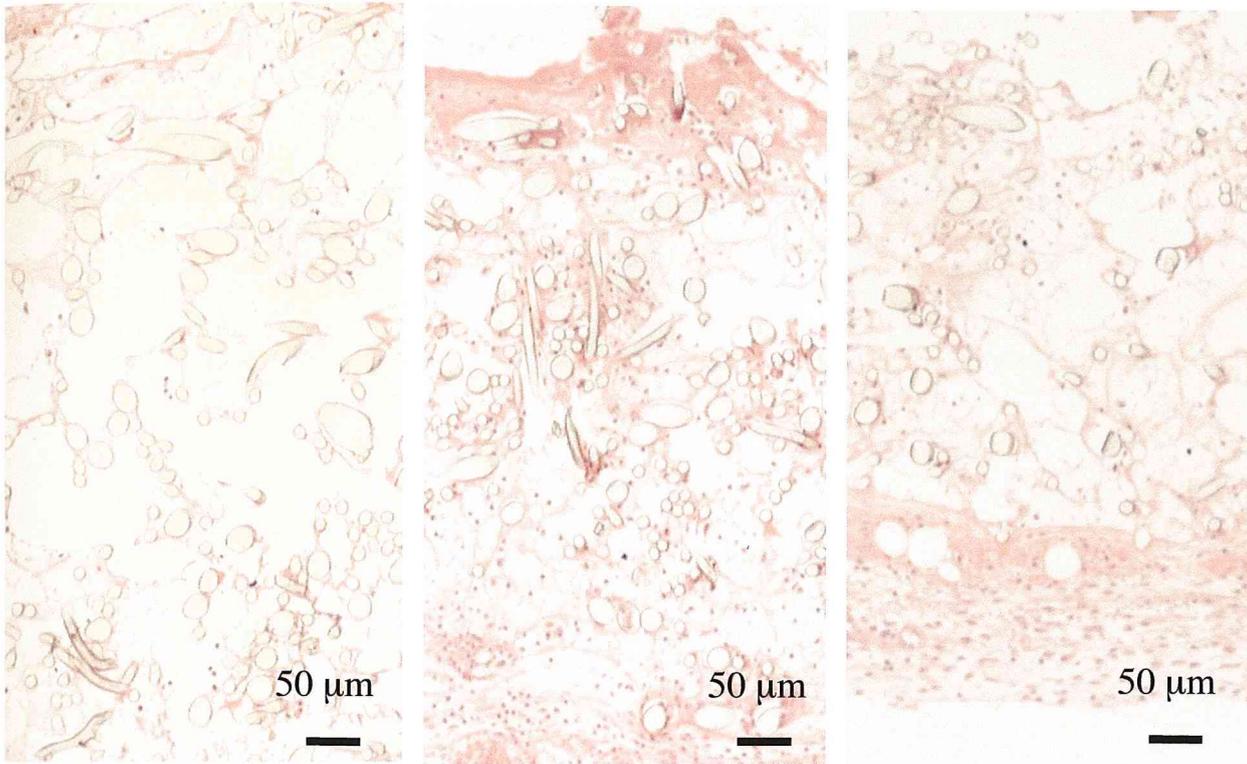


コントロール

キチン 1 mg

キトサン 1 mg

図 1-7 2日目の組織学的所見

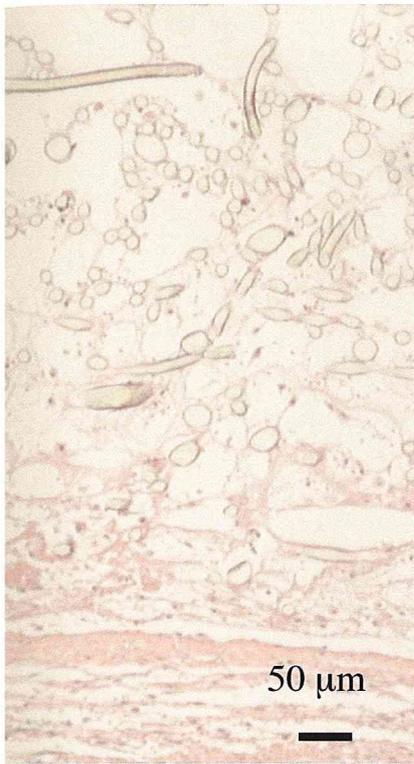


コントロール

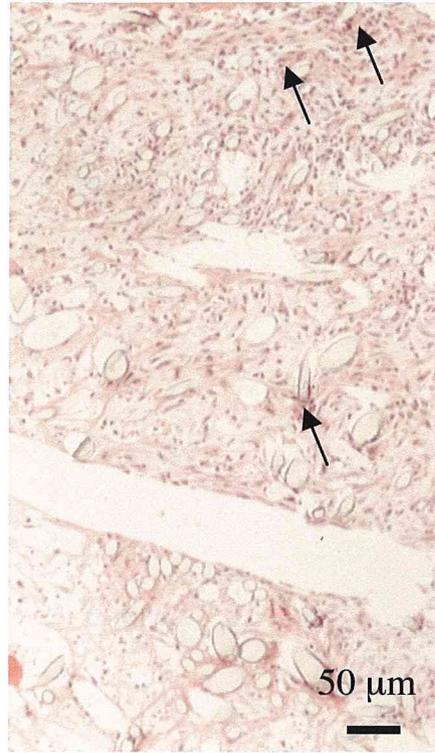
キチン 1 mg

キトサン 1 mg

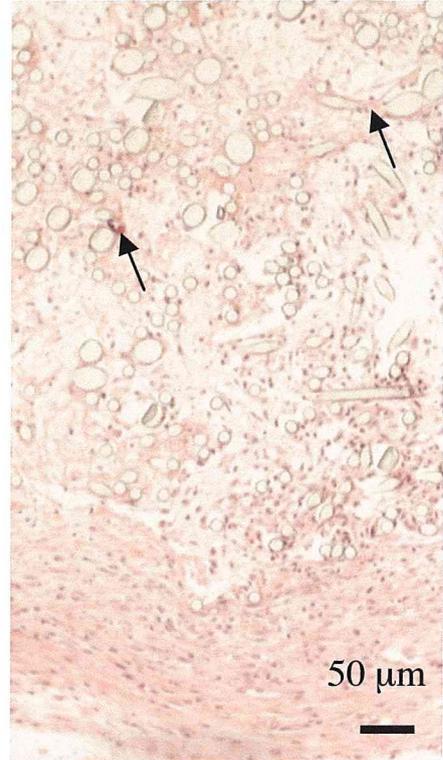
図 1 - 8 4 日目の組織学的所見



コントロール

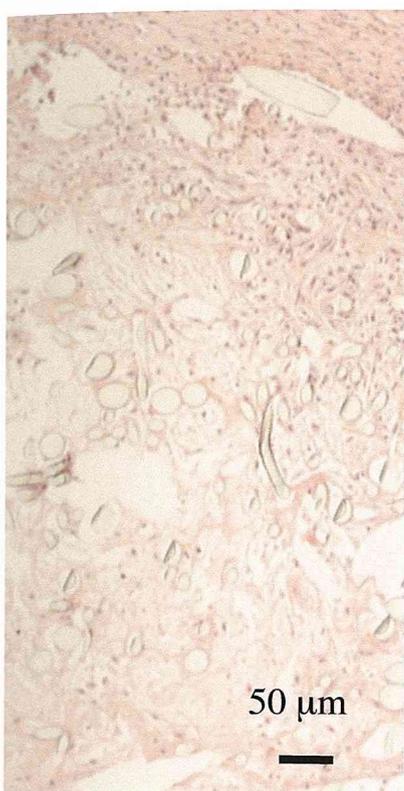


キチン 1 mg

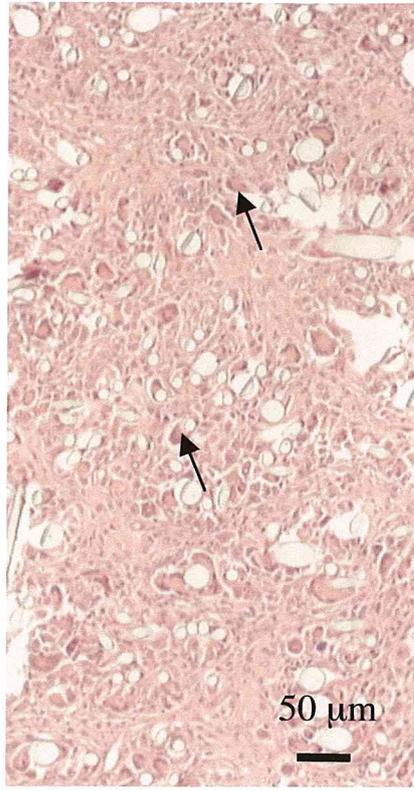


キトサン 1 mg

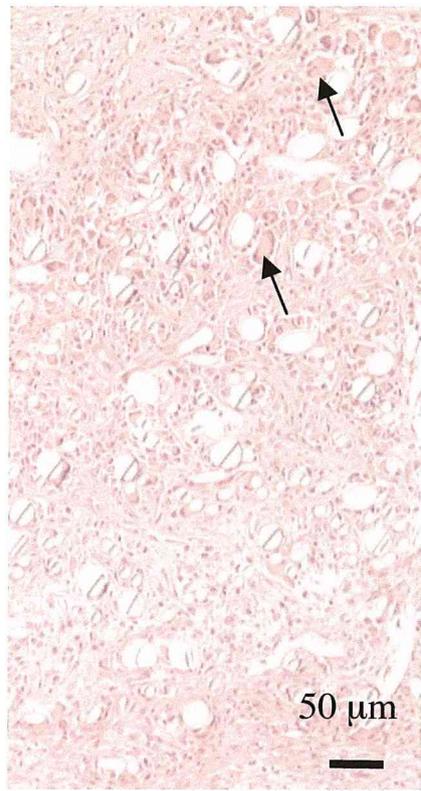
図 1 - 9 7 日目の組織学的所見
矢印：多核巨細胞



コントロール

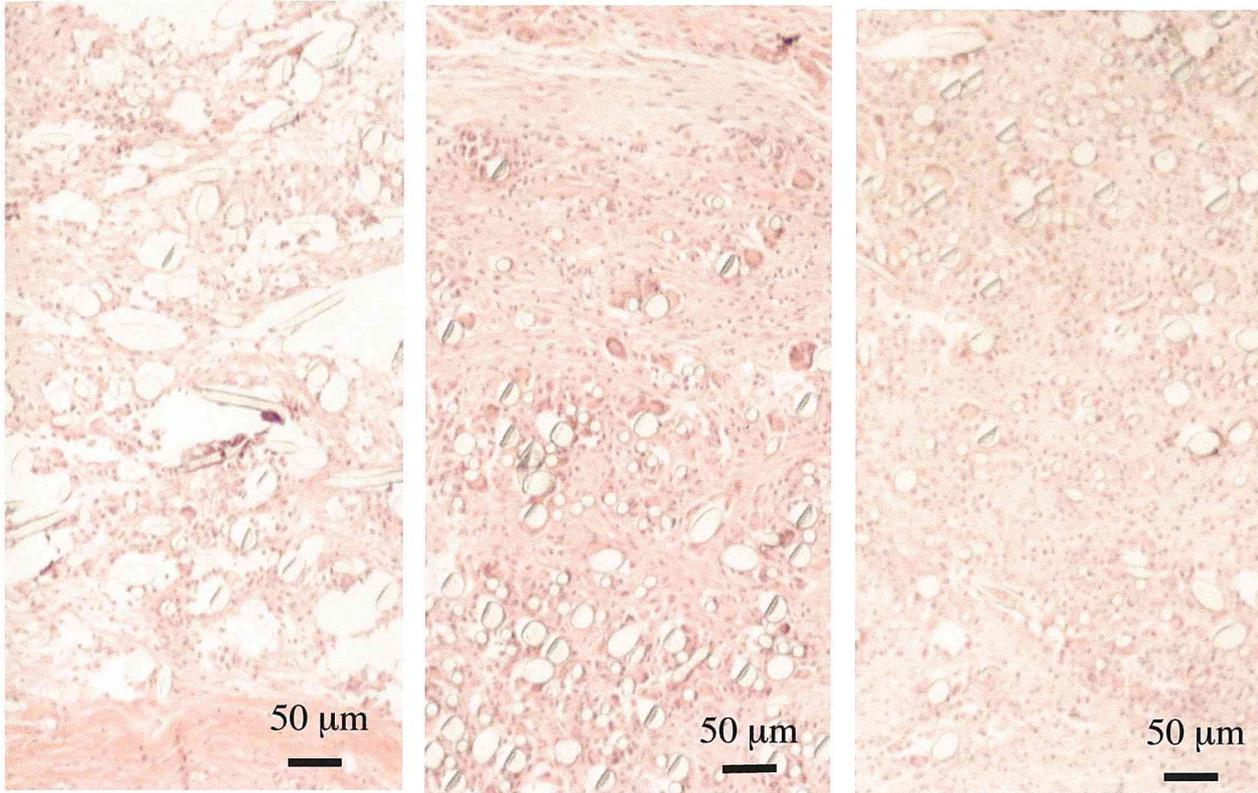


キチン 1 mg



キトサン 1 mg

図 1 -10 11日目の組織学的所見
矢印：多核巨細胞



コントロール

キチン 1 mg

キトサン 1 mg

図 1-11 14日目の組織学的所見
コントロール群はキチンおよびキトサン群と比較して
十分な器質化がみられていない。

第3項 考察

キチンおよびキトサンの組織反応への影響を検討するため、キチンおよびキトサンにより誘導された肉芽組織を検索した。その結果、キチンおよびキトサンは NWF に良性の肉芽組織の形成を誘引し、その至適濃度は、キチンでは 1.0 ~ 10 mg/ml、キトサンでは 0.1 ~ 1.0 mg/ml であった。また器質化を完成するに要する時間は約 7 ~ 11 日を要した。

至適濃度の投与により、多形核白血球やマクロファージが活性化し、多核巨細胞や線維芽細胞誘引されるとともに、新生血管を伴った良性の肉芽組織を形成した。これらは以前の報告 (Okamoto, *et al.*, 1993 a, b ; Usami, *et al.*, 1994 ; Peluso, *et al.*, 1994 ; Minami, *et al.*, 1993, 1997c) と一致する所見であった。一方高濃度の使用では多数の炎症性細胞を伴う過剰な炎症反応を誘導し、逆に肉芽形成が抑制されていることが判明した。この所見は、臨床家がこれらの物質を過剰に投与した時に体験する激しい浸出と化膿様反応と類似しており、これらの反応はキチン、キトサンの PGE₂ 産生等による血管拡張作用 (Minami, *et al.*, 1995 ; Tanaka, *et al.*, 1997) および血管透過性の亢進から説明される現象である。また、これらの一連の炎症反応の発端は、C5a によっても発生することが指摘されている。C5a はキトサンの過剰投与 (200mg/kg) で観察されるイヌの出血性肺炎 (Minami *et al.*, 1996) の原因とも考えられているキチンおよびキトサンの肉芽形成能に関する報告は少なく、Suzuki, Y., *et al.*, (1999) は DAC 度の上昇によって補体の活性度が上昇することを報告し、アミノ基の量と組織反応の強さを類推する報告がみられるが、直接的な効果に関する報告はみられない。今回の成績が示すように、キトサンがキチンと同程度の組織反応を引き起こすには、キチンの 1/5 ~ 1/10 の濃度でよいことが明らかとなった。この成績は、アミノ基の保有量がキトサンでキチンのほぼ 10 倍であることと関連し、補体の活性効果と併せて生体反応を考える上で重要な結果と考える。

第2章 キチン、キトサン のコラーゲン合成能に及ぼす影響

第1項 キチン、キトサンにより誘導された肉芽組織中のコラーゲン量

1. 要約

ポリエステル不織布(NWF)にキチン、キトサン懸濁液およびリン酸緩衝液を含浸させたキチン-NWF、キトサン-NWF および NWF をラットの背側皮下に埋植し、誘導された肉芽組織の組織標本を作製の後、マッソントリクローム染色を施し、画像解析処理によりコラーゲン線維の量を測定した。コラーゲン線維は、キチン群の 1.0 および 10 mg/ml、キトサン群の 0.1 mg/ml で減少傾向が見られた。特に 10 mg/ml キチンでは有意に減少していた。これらの濃度は、過剰な肉芽形成を惹起せず器質化する至適濃度の実験結果と一致した。

2. 実験目的

創傷治癒の中心的役割を果たすコラーゲン線維の産生に、キチン、キトサンがいかに影響を及ぼすか否かについて検討するために、肉芽組織中のコラーゲン線維を組織切片に対するマッソントリクローム染色を実施し、顕微鏡下で観察するとともに画像解析法を用いて客観化した。

3. 材料および方法

1) 実験材料

第 1 章第 1 項の実験においてラットより採材した埋植材を使用した。

2) 染色方法

埋植材を 10 % リン酸緩衝液ホルマリンで固定し、アルコールと 100 % キシレンで脱水した。次いでサンプルをパラフィンに包埋し、3 ~ 4 μm の厚みの切片を作製し、マッソントリクローム染色を行った。

3) 画像解析

染色組織標本の 200 倍像を Photograb ab-300 version 1.0(マッキントッシュソフトウェア、Fujifilm、東京)を用いて取り込み、Adobe Photoshop 5.0(マッキントッシュソフトウェア、Adobe System、東京)を用いてデジタル化し、画素数として

120,000 ピクセル(20,000 ピクセルを無作為に 6 ケ所)に対して、マツソントリクロームの青い色調の占めるピクセル数を画像処理により数値化した。得られた結果は統計解析ソフト STATISTICA (Design Technologies Inc. U.S.A.-Japan, Tokyo) を用い、ダンカンの多重検定法 (Duncan's multiple range) 検定法で統計処理を実施した。

4. 結果

1) キチン、キトサンにより誘導された肉芽組織中のコラーゲン量

結果を表 2-1 に示した。マツソントリクローム染色陽性ピクセル数は、コントロール (160.5 ± 9.5) に比べてキチンの 1.0 (146.0 ± 4.2) および 10 mg (144.7 ± 5.3) で減少する傾向が見られた。特に、キチンの 10 mg では有意に減少した ($p < 0.05$)。一方、キトサンについてはコントロールとほぼ同様の成績であった。

表 2-1 肉芽組織に対するコラーゲン染色標本の画像解析所見

	投与量* (mg)	マッソントリクローム 染色
コントロール	-	160.5** +/- 9.5 ^a
キチン	0.1	146.0 +/- 4.2 ^a
	1	144.7 +/- 5.3 ^b
	5	158.9 +/- 5.3 ^a
キトサン	0.01	155.6 +/- 7.8 ^a
	0.1	168.8 +/- 6.2 ^a
	1	161.3 +/- 7.0 ^a

Ab : 異なる肩文字は有意差を示す ($p < 0.05$)。

* : NWF ($1 \times 1 \text{ cm}^2$) に含浸させた量。各濃度のキチン (1, 10, 50mg/ml) およびキトサン (0.1, 1, 10mg/ml) を0.1ml含浸させた。

** : 12,000ピクセル中の陽性ピクセル数を示す。

第2項 キチン、キトサンのプロリルヒドロキシラーゼ活性に及ぼす影響

1. 要約

至適濃度のキチン、キトサンおよび PBS を含浸させたポリエステル不織布(NWF、 $1 \times 1 \text{ cm}^2$)をラットの背側皮下に埋植し、4、7、11 および 14 日目に採材した。誘導された肉芽組織中のプロリルヒドロキシラーゼを、Hutton, *et al.*, (1966)の方法で測定することによりコラーゲン合成を評価した。埋植後 4 日目まで全ての群において活性は低かった。10 mg/ml キチン-NWF 群を除いて他はほぼ同様の動きを示し、4 日目より 14 日目にかけて活性は直線的に増加を見せた。キチン群においては、やや少ない傾向があるが約 10 倍の活性増加を示した。10 mg/ml キチン-NWF では、4 日目から 7 日目にかけて急激に増加し、その後プラトーを示した。これらの結果は組織学的所見と一致した。

2. 実験目的

創傷治癒過程において、種々のサイトカインにより線維芽細胞が遊走、集簇および増殖し、その細胞内でコラーゲンが合成され、細胞外に分泌され欠損組織の再構築が行われる。このコラーゲンの合成過程において、コラーゲン独特のアミノ酸であるプロリンの水酸化反応があり、この反応はプロリルヒドロキシラーゼによって触媒されている。この酵素活性はコラーゲン合成と平行して上昇し、コラーゲン合成活性の有力な指標となっている。今回の実験では、プロリルヒドロキシラーゼ活性を指標にし、キチンおよびキトサンがコラーゲン合成に与える影響を検討した。

3. 材料および方法

1) 実験材料

(1) 実験試料

第 1 章、第 2 項で採材した埋植材を実験試料として用いた。

(2) ^3H 標識プロトコラーゲンの作製

1 日齢の鶏有精卵(66 個:東明サイエンス、神奈川)を孵卵器にて 10 日間飼育した。孵卵器内の温度を 38°C に設定し、湿度も一定に保った。また、1 日に 15 回の転卵を行った。9 日目に血管の走行の有無(特に太い血管)により生死の群分けを行った。10 日齢の発育鶏卵から胎児を取り出した後、ハサミで断頭し、体部をク

レブスリンゲル緩衝液で洗浄し、シャーレの中でその体部をハサミで細切したものをプロトコラーゲン材とし、L-3,4-³H-proline (American Radiolabeld Chemicals Inc. Lot Number 990923) で標識した。その作製手順を図 2-1 に示した。

2) 実験方法

プロリルヒドロキシラーゼ活性の測定方法は Hutton, *et al.*, (1966) の方法に準拠し、その方法を以下に要約した。

採材した埋植材と ³H 標識のプロトコラーゲンの水酸化反応を行った(図 2-2)。埋植材は第 1 章、第 2 項の方法により試料の採材までを行い、その 1/2 片を利用し、また、Lowry 法により肉芽組織中のタンパク質をあらかじめ測定した。この操作により、遊離した ³H₂O を液体シンチレーションカウンター (Liquid scintillation system: Aloka) を用いて測定し、埋植材中のタンパク質重量あたりのプロリルヒドロキシラーゼ活性値をもとめ、これをコラーゲン合成能の指標とした。Student's *t*-T 検定法により、0 日目と各日数との有意差検定を実施した。

4. 結果

1) キチン、キトサンのプロリルヒドロキシラーゼ活性に及ぼす影響

埋植日数の経過に伴うタンパク質重量あたりのプロリルヒドロキシラーゼ活性の変化を図 2-3 に示した。

コントロール群では、4 日目まではその活性に変化は見られなかったが、4 日目以降 14 日目にかけて次第に増加を示し、4 日目に比べて 7 日目では 5.5 倍、11 日目では 8 倍、14 日目では 9.5 倍の活性増加を示した。

キチン群では、1.0 および 10 mg キチン-NWF とも 4 日目までコントロール同様変化は見られなかったが、1.0 mg キチン-NWF は 7 日目で 4 倍、11 日目で 5.3 倍、14 日目で 7 倍と直線的な活性増加を示した。一方、10 mg キチン-NWF では 4 日目から 7 日目にかけて急上昇を示し、7 日目で 8.5 倍となり、その後プラトーとなり、11 日目および 14 日目で 9 倍となった。

キトサン群では、0.1 および 1 mg キトサン-NWF ともコントロール群と類似し、4 日目までは変化なく、7 日目で 4.5 倍、11 日目で 9 倍、14 日目で 11 倍の増加を示した。しかしながら、これらの活性数値にはかなりのばらつきが見られ、有意差は認められなかった。有意差の認められなかった原因は、とくにコントロールにおける数値のバラツキによるものであった。

埋植日数の経過に伴う湿重量あたりのプロリルヒドロキシラーゼ活性値も計量したが、タンパク質重量あたりの値と類似した。

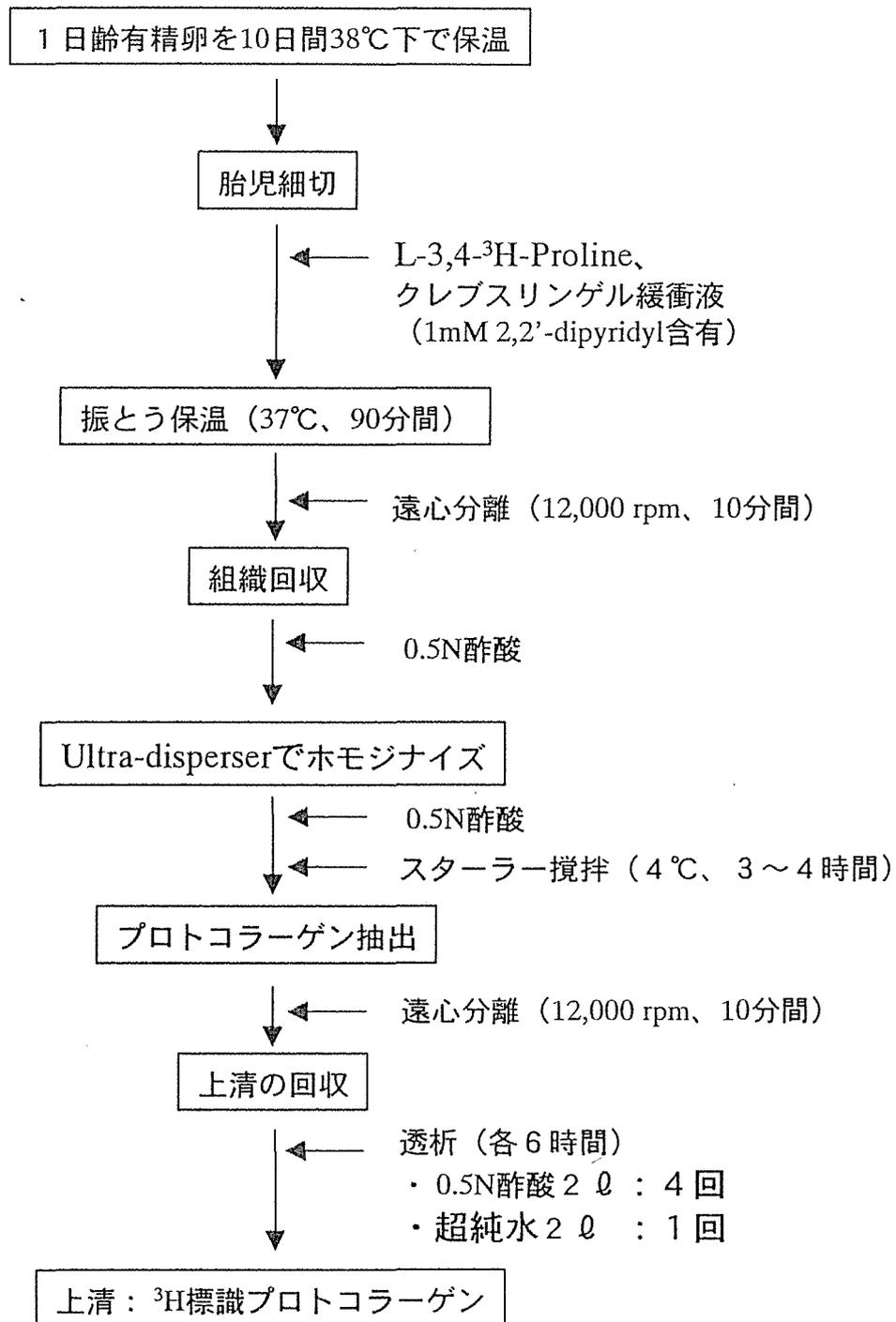


図 2-1 ³H標識プロトコラーゲン作製の手順

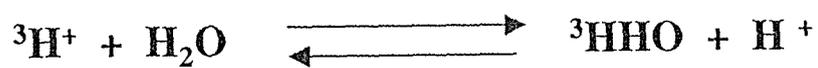
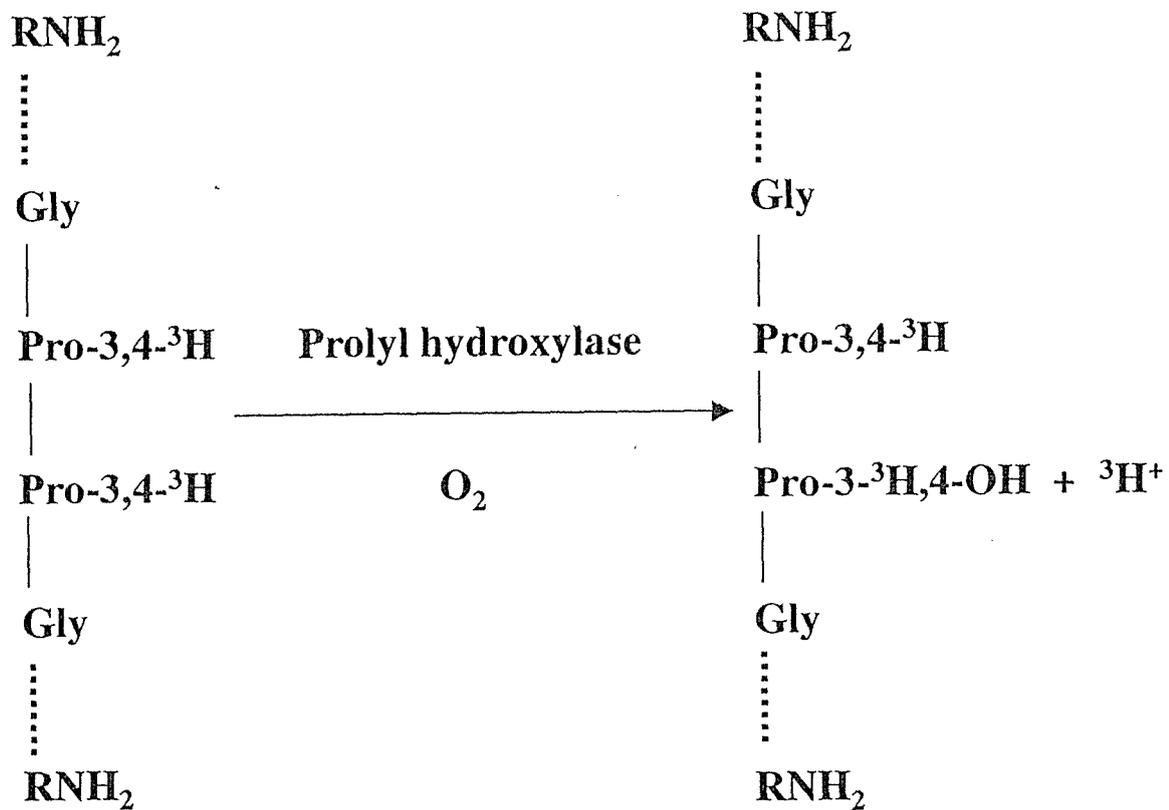


図 2-2 プロリンの水酸化と³HHOの遊離の原理

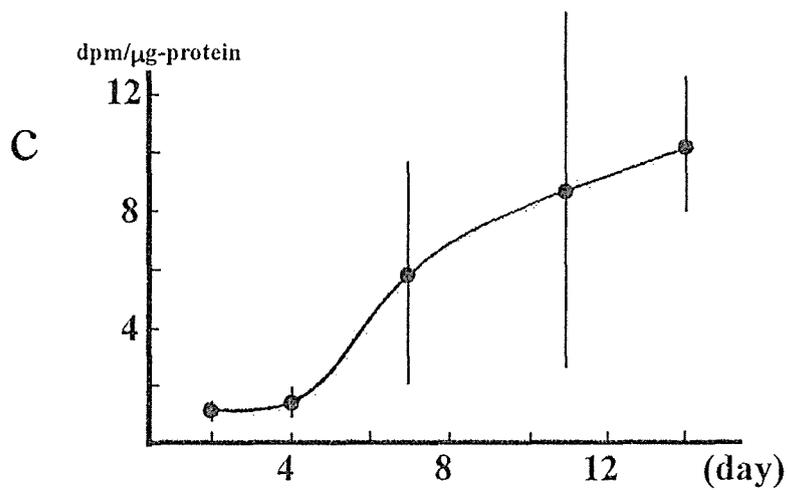
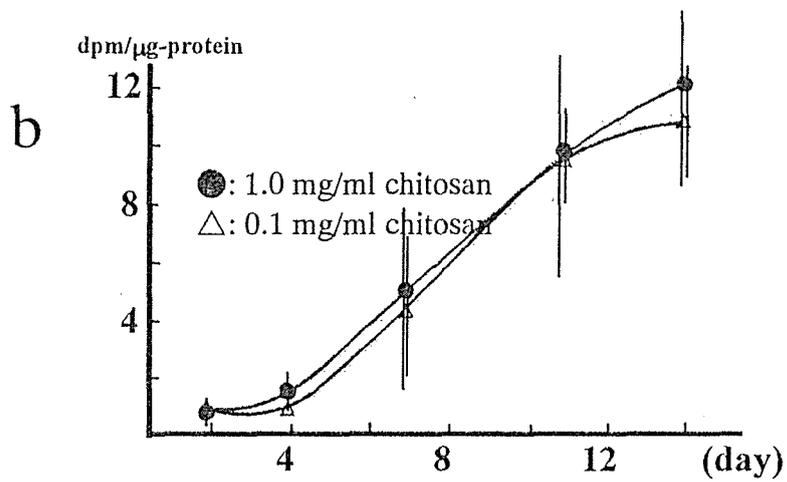
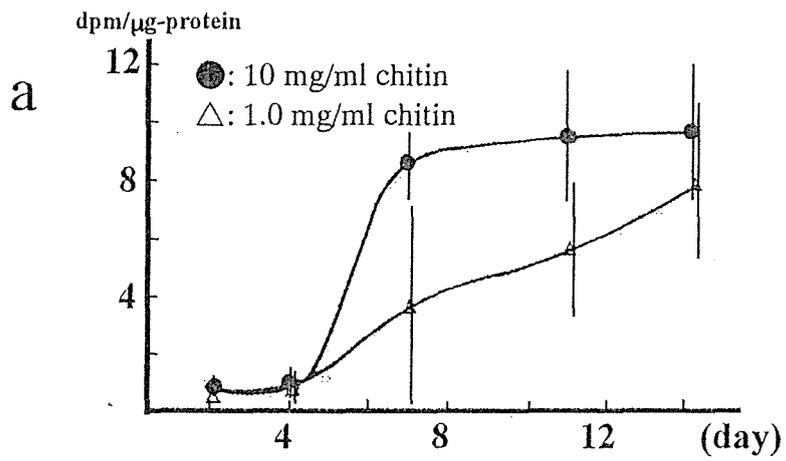


図 2-3 プロリルヒドロキシラーゼ活性

a: キチン、b: キトサン、c: コントロール

第3項 考察

細胞外マトリックスの主要成分であるコラーゲンは、その抗原性から現在までに 19 種類発見されており、その発現部位や合成される細胞を異にする。免疫組織化学を用いて分子の有無や量の多少および発現部位を調べることはできるが、どの細胞が産生し、その細胞が何細胞であるかを決めるのは困難とされている。一般に肉芽組織中の I 型および III 型コラーゲンは線維芽細胞で、IV 型コラーゲンは基底膜を挟む上皮と内皮細胞あるいは間質細胞で産生されるといわれている。マッソントリクローム染色では IV 型コラーゲンは染色されず、その他の線維性結合組織が染色されることから、皮下組織では I および III 型コラーゲンが主に染色されると考えられる。一方、プロリルヒドロキシラーゼはコラーゲン合成細胞内でプロコラーゲンの合成に必要な酵素であり、プロコラーゲン量と比例する。今回のマッソントリクローム染色により、コラーゲン線維量を調べた結果では、7 日目のコラーゲン量はキチン群の 1.0 および 10 mg/ml (特に 10 mg/ml) で他に比べて減少を示した。一方、同時期のプロリルヒドロキシラーゼはばらつきが見られるもののいずれも増加を示した。とくに 10 mg/ml キチンでは急上昇した。この逆説的な結果を説明するにはプロコラーゲンがコラーゲン線維になる過程で抑制が働いたと考えられる。細胞外に分泌されたプロコラーゲンは、プロコラーゲン・ペプチダーゼにより分解されトロポコラーゲン(コラーゲン分子)となり会合、架橋によりコラーゲンの微細線維となる。また、プロコラーゲンの両端にはプロペプチドが存在する。このプロペプチドには、①3本鎖らせん形成、②プロコラーゲンの微細線維形成抑制、③細胞内コラーゲン合成の調節等の機能があるとされている(McLaughlin & Bulleid, 1998)。今回の成績は、キチンもしくはそのオリゴマーやモノマーがプロコラーゲン・ペプチダーゼやプロペプチドに関与し、架橋結合に関与する事によりコラーゲン微細線維の合成を抑制した可能性が示唆された。

コラーゲンの合成、分解を考えるに当たって、炎症の存在は重要な因子である(Clark and Denver, 1985)。キチンおよびキトサンは体液との接触によって補体を活性化させ(Minami, *et al.*, 1997a,b)、その成分の一つである C3a は肥満細胞を刺激し、ヒスタミンおよび LTB₄ の組織内濃度を上昇(Gervasomi, *et al.*, 1986, Bischoff, *et al.*, 1990)させる。また、キチンおよびキトサンの線維芽細胞に対する直接刺激が IL-6 および IL-8 を放出させる(Mori, *et al.*, 1997)。これらの炎症のメディエーターが血管の透過性を著しく亢進し、細胞外マトリックスは浸出液によって膨化を引き起こす。さらに、C5a は LTB-4、IL-8 とともに好中球の強烈な遊走因子であり、

好中球は血管から遊走する際に多量のタンパク分解酵素を放出する(Wada, *et al.*, 1996)。また、好中球とキチンおよびキトサンが接触することによって、好中球からマクロファージ遊走因子であるオステオポンチンを放出し(上野ら, 2000)、これに向かってマクロファージが二次的な細胞浸潤を開始することが知られている。これらの炎症細胞はいずれもコラーゲナーゼ産生能をもち、遊走細胞としての機能を発揮するために細胞外マトリックスを破壊していく。この過程がキチンおよびキトサンの生体活性作用として理解されているが、今回のコラーゲン量およびコラーゲン産生刺激(プロリルヒドロキシラーゼ)の成績から考察すれば、線維芽細胞の外側では遊走細胞の活性によってコラーゲンの合成阻害と分解が進行し、血管内皮細胞や線維芽細胞等の組織形成細胞の移動を容易にしていると考えられる。その結果、キチンではコントロールと比較してコラーゲン量の減少としてとらえることができたと理解された。一方、線維芽細胞は異物であるキチンおよびキトサンを隔離するために細胞内ではプロコラーゲンの産生を増加させると推察される。プロリルヒドロキシラーゼ活性はキチンでは約 1 週間でプラトーとなり、キトサンでは、活性がさらに上昇していた。この所見は、キチンおよびキトサンの生体内における分解速度(Minami, *et al.*, 1993 ; Okamoto, *et al.*, 1995)と関係すると考えた。キチンは約1週間で分解され、キトサンは分解にほぼ 1 ヶ月を要するとされている。生体はこれらの物質に対して炎症を引き起こすが、分解とともにその反応は消退する(Okamoto, *et al.*, 1995)ことが知られている。

今回のコラーゲン量とプロリルヒドロキシラーゼ活性の成績は、コラーゲンと線維芽細胞のキチンおよびキトサンに対する反応を如実にとられた成績と理解された。また、今回のコントロールにおけるプロリルヒドロキシラーゼ活性の成績は、キチンと相違し、キトサンと類似する成績を示した。このコントロールの成績は、Madden & Peacock (1968)の新鮮縫合創のプロリルヒドロキシラーゼ活性の成績と類似した。一方、キトサン群では起炎物質であるキトサンが消失しない限り炎症は持続するため、プロリルヒドロキシラーゼ活性はさらに上昇してゆくものと推察した。

第3章 キチン、キトサンの細胞外マトリックスに及ぼす影響

第1項 グリコサミノグリカン(GAG)およびプロテオグリカン(PG)含有量への影響

1. 要約

第1章、第1項の濃度による肉芽組織への影響を検討する実験と同様に、キチン、キトサン、PBS を含浸させた NWF をラットの背側皮下に埋植した。1 週間後に採材し、組織標本作製後、グリコサミノグリカン(GAG)を測定するためにアリュースャンブルー染色を、また、プロテオグリカン(PG)の測定のためにサフラニン-O 染色を実施した。画像解析処理により、GAG ではキチン群が他の 2 群より増加し、PG ではキチン群が他の 2 群より減少していることが判明した。これにより、キチンは細胞外マトリックスの主成分である GAG や PG の産生に関与していることが示唆された。

2. 実験目的

細胞外マトリックスの主要成分である GAG や PG が、肉芽組織形成時にキチンおよびキトサンにより受ける影響を検討するため、肉芽組織標本にアリュースャンブルーおよびサフラニン-O 染色を施し、画像解析処理により数量化した。

3. 材料および方法

1) 実験材料

第1章、第1項の実験においてラットより採材した埋植材を使用した。

2) 染色方法

第2章、第2項 3. 2) に準じ、アリュースャンブルーおよびサフラニン-O 染色をおこなった。

3) 画像解析

第2章、第2項 3. 3) に準じてグリコサミノグリカンではアリュースャンブルー染色による青い色調のピクセル数、プロテオグリカンではサフラニン-O 染色による赤い色調のピクセル数を画像処理により測定した。得られた結果は、統計解析ソフト STATISTICA (Design Technologies Inc. U.S.A.-Japan, Tokyo) を用い、ダンカン

の多重検定法 (Duncan's multiple rage) 検定法で統計処理を実施した。

4. 結果

1) グルコサミノグリカン(GAG)およびプロテオグリカン(PG)含有量への影響

結果を表 3-1 に示した。GAG においてはキチンが他の2群に比べて増加し、PG はキチンが他の2群に比べて減少を示した。統計解析の結果、GAG に関してはキチンの 10 mg/ml と 50 mg/ml の間で、PG についてはキチンの 1 mg/ml、10 mg/ml、50 mg/ml の間で有意差 ($p < 0.05$) がみとめられた。

表 3-1 肉芽組織に対するグリコサミノグリカンおよびプロテオグリカン染色標本の画像解析所見

	投与量* (mg)	アリユージャンブルー 染色	サフラニンO 染色
コントロール	-	95.6 ** +/- 3.9 ^a	218.7 +/- 25.6 ^{a'}
キチン	0.1	99.6 +/- 5.7 ^a	189.5 +/- 2.9 ^{b'}
	1	103.4 +/- 3.3 ^b	185.8 +/- 3.0 ^{b'}
	5	101.8 +/- 5.1 ^b	186.9 +/- 5.5 ^{b'}
キトサン	0.01	93.7 +/- 4.5 ^a	211.9 +/- 15.1 ^{a'}
	0.1	92.7 +/- 3.4 ^a	214.3 +/- 6.2 ^{a'}
	1	97.8 +/- 3.0 ^a	212.8 +/- 6.4 ^{a'}

ab, a'b' : 異なる肩文字は有意差を示す (p<0.05)。

* : NWF (1 x 1 cm²) に含浸させた量。各濃度のキチン (1, 10, 50mg/ml) およびキトサン (0.1, 1, 10mg/ml) を0.1ml含浸させた。

** : 12,000ピクセル中の陽性ピクセル数を示す。

第2項 コンドロイチン硫酸(CS)含有量に及ぼす影響

1. 要約

至適濃度のキチン、キトサンおよび PBS を含浸させたポリエステル不織布(NWF)をラットの背側皮下に埋植した。1 週間後に採材し、その 1/2 片を利用してグリコサミノグリカン(GAG)の一種であるコンドロイチン硫酸(CS)を測定し、キチンおよびキトサンの影響を検討した。キチン群では他の 2 群に比べて CS の量は少なかった。

2. 実験目的

GAG は、ヘキソサミンとヘキスロン酸の 2 糖の繰り返しを作る 1 本の単純なコイル状の糖鎖で、現段階では 6 種類のものが知られている。先の実験で、キチン群において GAG が増加する成績が得られたので、GAGの一種であるコンドロイチン硫酸の定量を試みた。

3. 材料および方法

1) 実験材料

第1章、第2項の実験において、7 日目にラットより採材した埋植材の 1/2 を使用した。

2) 実験方法 (概略)

- (1) サンプル(約 50 ~ 100 mg)に 1.25 % アクチナーゼ E(科研製薬)を加えて 55 °C で一晩消化を行った。
- (2) 酵素を不活化するため 100 °C で 5 分加熱した。
- (3) 遠心分離後、上清の一部を採取しコンドロイチナーゼ ABC を加えて 37 °C で 2 時間消化させた。
- (4) 酵素分解物は 10,000 カットで限外濾過を行った。
- (5) 濾液中の CS 由来不飽和2糖を高速液体クロマトグラフィーにて分離定量した。

3) 統計解析

得られた結果は、統計解析ソフト STATISTICA (Design Technologies Inc.

U.S.A.-Japan, Tokyo) を用い、ダンカンの多重検定法 (Duncan's multiple range) 検定法で統計処理を実施した。

4. 結果

コンドロイチン硫酸(CS)含有量に及ぼす影響

定量の結果を表 3-2 に示した。キチン群では他の2群より CS の合成は有意に減少を示した ($p < 0.05$)。

表 3-2 肉芽組織中のコンドロイチン硫酸量

	投与量* (mg)	コンドロイチン硫酸量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
コントロール	-	0.98 +/- 0.11
キチン	0.1	0.74 +/- 0.16**
	1	0.77 +/- 0.08**
キトサン	0.01	0.92 +/- 0.12
	0.1	0.96 +/- 0.10

* : NWF ($1 \times 1 \text{ cm}^2$) に含浸させた量。各濃度のキチン (1, 10 mg/ml) およびキトサン (0.1, 1mg/ml) を0.1ml含浸させた。

** : コントロールに対して有意差あり ($p < 0.05$) 。

第3項 考察

創傷治癒過程において肉芽組織を構成する主要成分は細胞、線維、ならびに細胞外マトリックスである。この細胞外マトリックスもまた種々の成分よりなり、その主たるものの中には酸性ムコ多糖と呼ばれるグリコサミノグリカン(GAG)、および GAG がコアタンパク質に共有結合した複合体であるプロテオグリカン(PG)がある。この GAG や PG とキチン、キトサンとの関連について触れた報告は著者の検索した範囲では見あたらない。一方、キトサンの構成糖であるグルコサミン(GlcN)が関節軟骨の PG および GAG を増加させ、軟骨損傷の治癒過程を促進する報告(Tapadinhas, *et al.*, 1982 ; Theodosakis, *et al.*, 1997 ; Kajimoto, *et al.*, 1998)がなされている。キチンおよびキトサンが皮下に投与された場合、これらの分解産物である GlcN およびアセチル-D-グルコサミン(GlcNAc)がその局所で PG や GAG の産生に関連するか否かについて画像解析と組織抽出の両面から検索した。その結果、GAG はキチン群において他の 2 群に比べ増加し、キトサン群ではコントロールとほぼ同じ値を示した。このことは、GAG の合成をキチンが促進させているか、もしくはキチンが生体内でリゾチームにより分解され GlcNAc が GAG 合成の材料として使用されている可能性を示唆するものである。GAG は二糖の巨大な重合体で、一方は常に GlcN またはガラクトサミンといったアミノ糖で、他方はグルクロン酸またはイズロン酸といったウロン酸からなる。この長い鎖状の多糖はコイル状の構造をとる。そのため高い粘性や弾性をもち、多量の水を吸収し、正荷電分子に親和性を示す。また、糖残基中への硫酸基の結合により、他の様々な細胞外マトリックスと結合する性質を持つ(Yoshihara, 1994)。この性質は、キチンの誘導する肉芽組織が滑らかで弾力に富み、みずみずしいという特徴と一致する。

一方、PG はキチン群において他の 2 群に比べて有意な減少が見られた。このことは、キチンにより 1) PG の合成が阻害される、2) コアタンパクの合成が阻害される、3) PG の分解酵素(ストロメライシン等)が活性化される、等の生体反応が考えられるが、これらについては将来的な研究に期待せざるを得ない。PG の合成とその格子支持体となるコラーゲン量との関係で、第 2 章で言及したようにキチンではコラーゲン量は他群より減少しており、このことが本章での成績に関連する可能性を指摘したい。PG はコアタンパク質に 1 本以上の GAG 鎖が共有結合した複合体の総称で、大きさも形も性質も多彩で GAG 鎖も 1~数百本、ポリペプチド鎖も 10 ~ 400,000 kD、水に可溶性、不溶性、細胞膜に付着するもの、基底膜に存在するもの

など様々であるが、その性質の多くは結合している GAG 鎖の個性によると考えられている。一般に、PG や GAG は細胞外マトリックス中に単に混在しているのではなく、他のコラーゲン線維や接着性糖タンパク質(フィブロネクチン等)と認識結合反応により高次の構造体として存在している(坂倉, 1994)。また、それらはインテグリンなどの細胞表面レセプターを介し細胞内のアクチン線維にも結合しているし、さらに様々な細胞増殖因子とも結合し細胞活性を調節すると言われている。当然、PG が減少すれば細胞外マトリックスも減少し、肉芽組織の産生も減少すると考えられ、このことは、キチン誘導の肉芽組織が過剰にならない一因ではないかと考える。今回の実験で、キトサンはほぼコントロールと同様の値を示し、GAG や PG の合成に影響を及ぼさなかった。キトサンも分解されて D - グルコサミンとなり GAG の合成材料となりうるが、皮下に埋植した場合、臨床的および実験的に容易に分解されない事がわかっているので GAG や PG の合成に利用されなかったと推測される。なお、GAG と PG 相互の量的な関係は、今回は判断出来なかった。今回の実験で、GAG を構成する糖鎖の1つである CS の定量を行ったが、キチン群においてはコントロール群と比較して減少を示した。先の画像解析による GAG 増加のデータを説明するためには、CS 以外の糖鎖が増加したと言わざるを得ない。本来、CS が多数結合しているアグリカン(Doege, 1991)のような PG の存在場所は軟骨組織が主で、一般の肉芽組織中の GAG を評価するには適さないのかもしれない。PG や GAG に関しては今後急速に発展する分野であり、GAG の構成成分である GlcN や GlcNAc のポリマーであるキトサンやキチンがこの分野で注目を集めつつある。現段階では、ポリマーの局所投与が直接 PG や GAG の合成に関わっているとは考えがたいが、今後の研究に期待するところである。

第4章 ネコにおけるキチン、キトサンによる肉芽組織形成への影響

第1項 肉芽組織形成への影響

1. 要約

ポリエステル不織布にキチンおよびキトサンを含浸したキチン-NWF、キトサン-NWF および無処置の NWF を猫の腹壁に埋植し、それらによって誘導された肉芽組織を肉眼的および組織学的に評価した。埋植材の厚みは、3 群とも実験期間を通して漸次増加したが、キチン-NWF が最も薄かった。埋植材内部では、キチンおよびキトサンとも肉芽形成を促進したが、周囲組織における肉芽の増生は NWF と比べてキチン群でより少なく、キトサン群で多かった。埋植材内部では、キチンおよびキトサン群とも 6 日目にはほぼ中心部まで肉芽組織の侵入が見られ、炎症性細胞はキトサン群で顕著であった。埋植材の周辺組織では、多核巨細胞および多数の血管新生が他の群に比べてキチン-NWF で多数見られた。14 日目では 3 群とも完全な器質化がみられたが、キトサン群のみ炎症性細胞が存続しており、キトサン粒子の残存が確認された。

2. 実験目的

キチン、キトサンが動物において創傷治癒を促進する事はすでに知られている (Malette, *et al.*, 1986 ; Minami, *et al.*, 1992)。これらの材料で処置された創傷は、過剰な肉芽組織や瘢痕形成を伴わないという大きな特色のため、多方面で使用されている。しかしながら、治癒過程における作用機序には未知の点が多く、それを明らかにするために今までラットを使用し、基礎的研究を重ねてきた。小動物臨床現場ではキチン、キトサンは猫で最も汎用されており、それは創傷治癒効果が顕著であることに起因する。キチン、キトサンの肉芽形成効果について猫を用いて、ラットと同様の方法で検討した。

3. 材料および方法

1) 実験材料

(1) 実験動物

浜口実験動物(兵庫)より購入した平均体重 2.5 kg、1 歳の日本猫 9 頭を使用した。全ての猫は臨床的、血液学的に健康で、FeLV、FIV、FIP の抗体いずれも陰性で

あった。

(2) 埋植材

ポリエステル不織布(NWF)、キチン 1.4 mg/cm² を含浸させた NWF(キチン-NWF)およびキトサン 0.1 mg/cm² を含浸させた NWF(キトサン-NWF)の 3 種類を用意した。NWF、キチンおよびキトサンの性状は前述の第 1 章、第 1 項 3. の通りである。これらの材料は、使用前にエチレンオキサイドガス(EOG)で滅菌した。

2) 実験方法

猫を任意に A、B、C の 3 群に分けた。麻酔前投薬として硫酸アトロピン(0.05 mg/kg, 硫酸アトロピン注, 田辺製薬, 大阪)、および塩酸キシラジン(2 mg/kg, セラクタール, バイエル, 東京)を皮下投与し、続いて塩酸ケタミン(20 mg/kg, ケタラール, 三共製薬, 大阪)を静脈内投与した。猫は仰臥位に保定し、腹部無菌手術の準備を行った。皮膚は剣状突起後縁より恥骨前縁まで正中切開し、皮下組織を鈍性に剥離した。腹壁に全層に及ぶ欠損孔(直径 2 cm)を 3 ヶ所(上腹部の左右に第 1 孔、第 3 孔、下腹部の片側に第 2 孔)に作製した。埋植材を直径 2 cm に裁断し、A 群では第 1 孔から NWF、キチン-NWF、キトサン-NWF の順に縫合した。B 群ではキトサン-NWF、NWF、キチン-NWF の順に、C 群ではキチン-NWF、キトサン-NWF、NWF の順に埋植材の縫合を行った。縫合には、3-0 のナイロン糸を用いて単純結節縫合を行った。皮下組織は 3-0 吸収糸で連続縫合し、皮膚は直径 0.15 mm のワイヤーを用いて単純結節縫合を施した。術後 3、6 および 14 日目に、各群の猫 1 頭ずつをペントバルビタールナトリウム(88 mg/kg, ネンブタール, 大日本製薬, 大阪)の静脈内投与により安楽死した。皮膚を除去した後、各埋植材を肉眼的に評価し、周囲組織とともに採材した。採材した試料を 10 % ホルマリンリン酸緩衝液で固定し、アルコールと 100 % キシレンで脱水した。その後、サンプルをパラフィン包埋し、厚さ 3 ~ 4 μ m の切片を作製してヘマトキシリンエオジン染色を行った後 組織学的観察を行った。また、ビデオマイクロメーター(VM31, Olympus, Japan)を用い、各切片について無作為に 5 ヶ所の厚さを測定し、平均値を算出した。得られた結果は、Studebt's- T 検定法で統計処理を実施した。

4. 結果

1) 肉眼的所見

(1) 3 日目

キトサン-NWF において少量の赤色滲出液が貯留し、周囲組織に浮腫がみられた。NWF およびキチン-NWF の場合は滲出液あるいは浮腫は見られなかった。キチン-NWF および NWF の両面に僅かな癒着が見られたが、キトサン-NWF では腹腔側のみが癒着していた。

(2) 6 日目

全ての埋植材周囲において肉芽組織の増殖が観察された。キチン-NWF の場合は他に比べて組織が薄く、滑らかであった。全ての埋植材において外側の癒着が強く、癒着側の明らかな血管新生が観察された。

(3) 14 日目

キトサン-NWF で肉芽組織が著しく増殖し、外側でより強い癒着がみられた。キチン-NWF では、非常に滑らかな肉芽組織の形成がみられた。NWF はキトサン-NWF とキチン-NWF の中間程度の肉芽組織形成を示した。

2) 組織学的所見

埋植材の組織学的所見を表 4-1 に、埋植材周囲組織の組織学的特徴を表 4-2 に示した。

(1) 3 日目

①埋植材

全ての標本において、埋植材辺縁に少量の肉芽組織が観察された。埋植材の中心部に炎症性細胞が見られた(図 4-1)。

②周囲組織

周囲組織にはほとんど肉芽組織の形成が見られなかった。

(2) 6 日目

①埋植材

キチンおよびキトサン-NWF で、肉芽組織が埋植材中心部へ侵していたが、NWF では見られなかった。巨細胞の出現は全標本でみとめられ、炎症性細胞(多形核白血球)の浸潤は他の埋植材に比べてキトサン-NWF で顕著であった(図 4-2)。

②周囲組織

全ての埋植材周囲で、炎症性細胞の散在する肉芽組織が軽度～中等度に形成されていた。巨細胞および血管新生は、他の埋植材に比べてキチン-NWF で著明であった。埋植材の境界部で組織球の集簇がみられ、この現象はキチン-NWF でより顕著であった。

(3) 14 日目

①埋植材

炎症性細胞はキチン-NWF および NWF では消失していたが、キトサン-NWF では消失せず散在していた。キチン粒子は 6 日目までに埋植材から消失したが、キトサン粒子は実験期間を通して埋植材中に観察された(図 4-3)。

②周囲組織

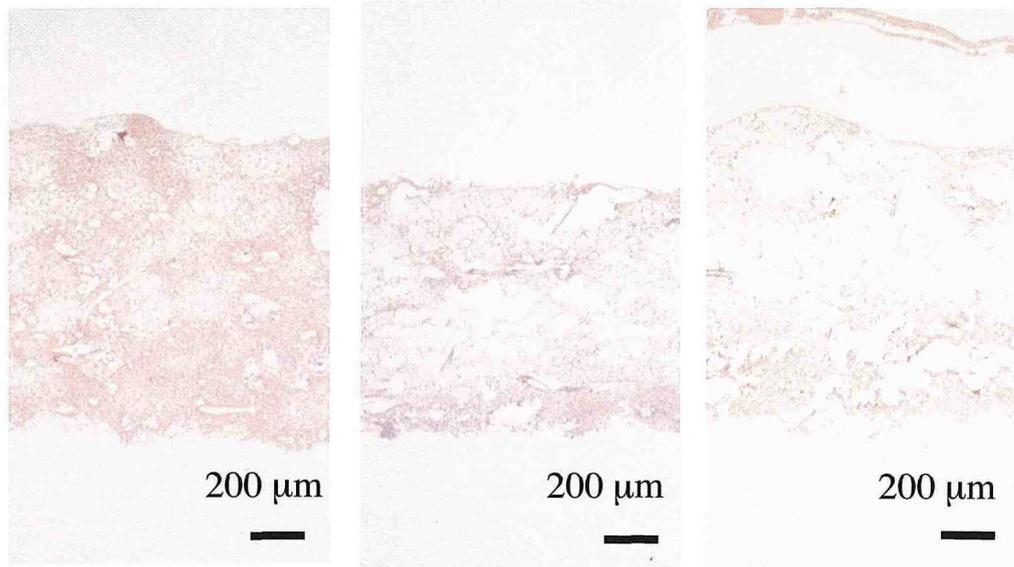
6 日目と同様に埋植材の境界部で組織球の蓄積がみられた。この現象はキチン-NWF でより顕著であった。

(4) キチンおよびキトサン粒子の消化性

キチンでは 6 日目に粒子がわずかに観察され、14 日目では完全に消失していた。キトサンではすべての材料に粒子が観察された。

3) 埋植材の厚さ

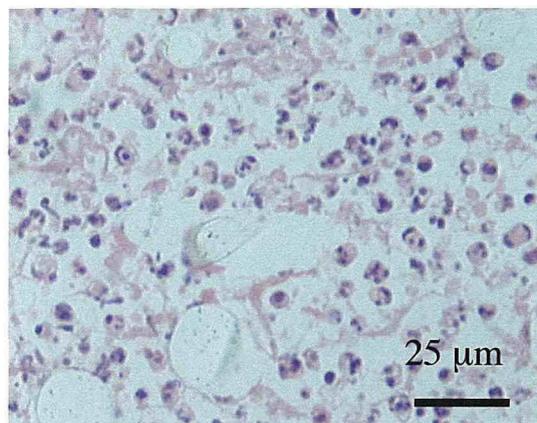
埋植材の厚さに関するデータを表 4-3 に示した。全ての埋植材で実験期間を通して厚さが漸次増加したが、キチン-NWF が最も薄かった。6 日目のキチン-NWF と NWF、14 日目のキチン-NWF とキトサン-NWF の間に有意差 ($p < 0.05$) が見られた。



コントロール

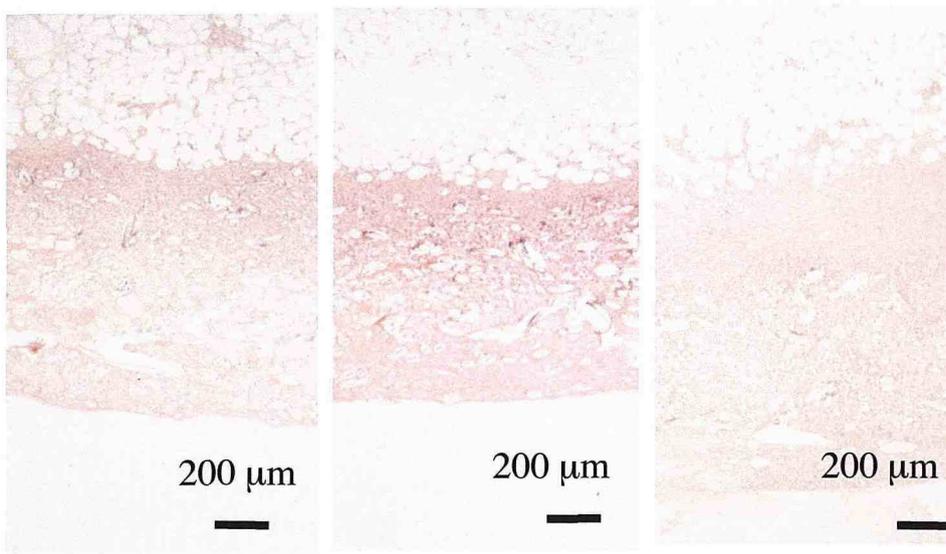
キチン

キトサン



キチンの高倍像

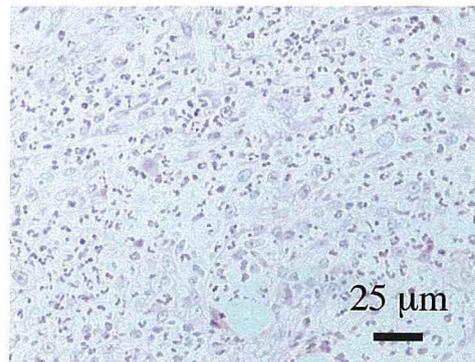
図 4-1 埋植材の組織学的所見（3日目）



コントロール

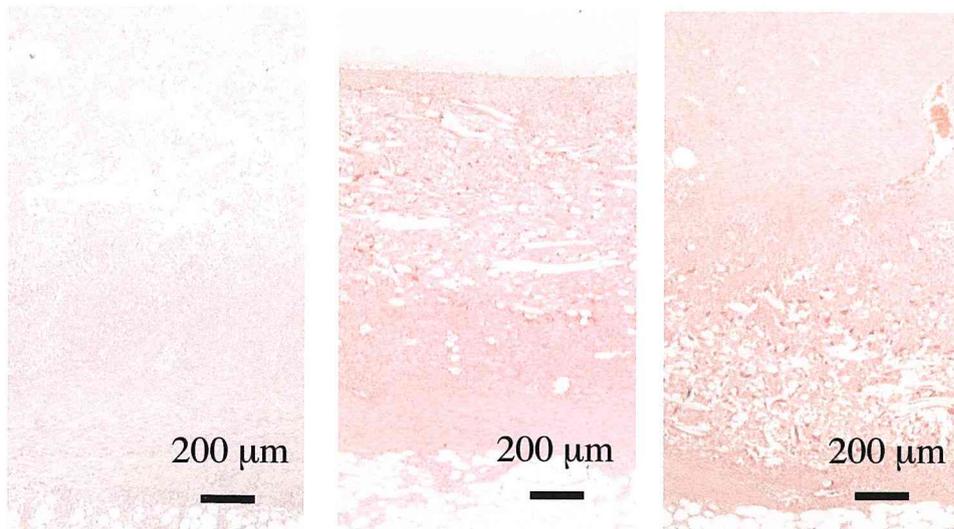
キチン

キトサン



キトサン高倍像

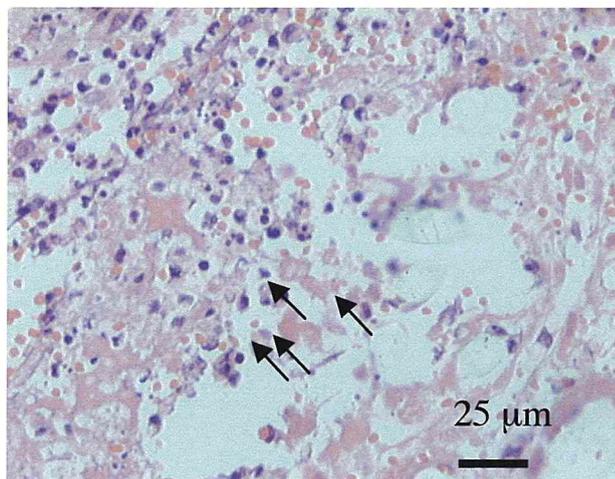
図 4 - 2 埋植材の組織学的所見 (6 日目)



コントロール

キチン

キトサン



キトサンの高倍像

図 4 - 3 埋植材の組織学的所見 (14日目)
矢印はキトサン粒子を示す。

表 4 - 1 埋植材内に形成された肉芽組織の組織学的所見

(日)	成分	コントロール	キチン	キトサン
3	線維芽細胞	-	-	-
	炎症性細胞	+	++	++
	巨細胞	-	-	-
	組織球	-	-	-
	血管新生	-	-	-
6	線維芽細胞	+	++	++
	炎症性細胞	+	+	++
	巨細胞	+	++	+
	組織球	+	+	+
	血管新生	+	++	++
14	線維芽細胞	+++	+++	+++
	炎症性細胞	+	+	++
	巨細胞	+++	+++	+++
	組織球	+++	+++	+++
	血管新生	++	+++	+++

-: なし, +: 軽度, ++: 中等度, +++: 重度

表 4 - 2 埋植材周囲に形成された肉芽組織の組織学的所見

(日)	成分	コントロール	キチン	キトサン
6	炎症性細胞	+++	++	+++
	巨細胞	+	++	+
	組織球	+	+	+
	血管新生	+	++	+
14	炎症性細胞	++	++	++
	巨細胞	+	++	+
	組織球	+	++	+
	血管新生	+	++	++

-: なし, +: 軽度, ++: 中等度, +++: 重度

表 4-3 形成された肉芽組織の厚さ

埋植材 \ 採材日	3	6	14 (日)
コントロール*	1063 +/- 120 ^{a**}	1346 +/- 88 ^a	2931 +/- 428 ^{ab}
キチン	895 +/- 37 ^a	975 +/- 75 ^b	1902 +/- 659 ^a
キトサン	1117 +/- 180 ^a	1148 +/- 316 ^{ab}	3869 +/- 672 ^b

* : ポリエステル不織布 (乾燥時厚さ600mm)

** : 平均 +/- 標準偏差 (mm)

a,b : 異なる肩文字は有意差あり (p<0.05)

第2項 肉芽組織中のコラーゲンのタイピング

1. 要約

ポリエステル不織布にキチンおよびキトサンを含浸したキチン-NWF、キトサン-NWF および無処置の NWF を猫の腹壁に埋植し、それらによって誘導された肉芽組織中のコラーゲンのタイプを免疫組織化学染色(ABC 法)および画像解析処理により数量化した。キチン-NWF は厚さが最も薄かったにも関わらず、埋植材内部ではタイプ I、III、およびIV型 コラーゲンが、いずれのステージでも他群より高い割合で合成され、周囲組織でも 14 日目にタイプIIIおよびIV型コラーゲンの割合が高かった。埋植材内部においてキトサンにより誘導されたコラーゲンの型はコントロールの NWF と類似していた。

2. 実験目的

創傷治癒過程において細胞外マトリックスの主要成分の1つであるコラーゲンは、損傷組織の再構築における重要成分である。Minami, *et al.* (1997 c) は腱組織においてキチンがIIIおよびIV型コラーゲンを誘導すると報告した。また、ヒドロキシプロリンの増加を伴わずに皮膚縫合の引っ張り強度が増加するとの報告(Yano, *et al.*, 1985)もある。しかし、キチンおよびキトサンとコラーゲンとの関連に触れた報告は数少ない。そこで、本実験ではキチンおよびキトサンにより誘導される肉芽組織内のコラーゲンを、創傷治癒に関連するといわれる I、III およびIV 型について型分けし、その肉芽組織の特性との関連を検討した。

3. 材料および方法

1) 実験材料

本章第 1 項で作製した切片を用いた。

2) 免疫染色方法

本章第 1 項で作製した切片に免疫組織化学染色(ABC 法)を施し、コラーゲンタイプ I、III および IV についてタイプ分けを行った。具体的には、本章第 1 項で採材した試料から作製した切片を脱パラフィンおよび脱水処理し、過ヨウ素酸に 10 分間曝して内因性ペルオキシダーゼを失活させた。また、抗ウサギ IgG ヤギ血清の非特異的結合を防ぐため、切片を 5 % 正常ヤギ血清中で 10 分間インキュベートした。

免疫組織化学に関しては、まず切片をコラーゲンの各型に対して 400 倍に希釈したウサギ抗血清で室温で 30 分間処理した。実験に先立ち、これらの抗血清は猫コラーゲンと交差反応を示すことを確認したが、タイプ I、III および IVコラーゲン間では交差反応は見られなかった。次いで切片を 100 倍に希釈したペルオキシダーゼ結合抗ウサギ IgG ヤギ血清で室温で 30 分間処理し、ジアミノベンチジンで 10 分間染色してヘマトキシリン溶液で対比染色した。

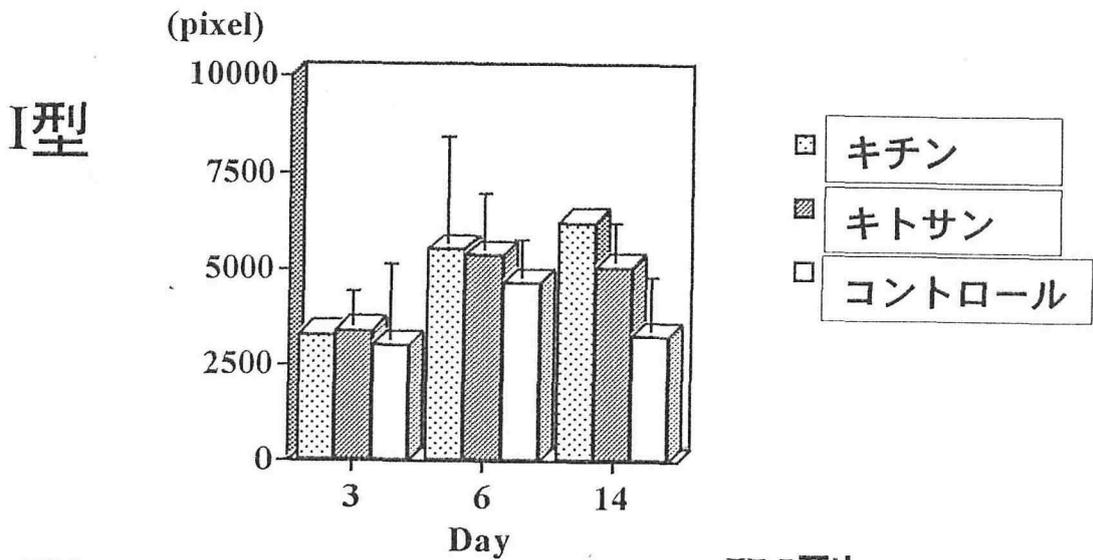
3) 画像解析

コラーゲン染色を施した切片の画像解析は、イメージプロセッサー(MV4000, Nippon Data General Co. Ltd, Japan)とマルチカラーデータシステム(4200F, NAC Co. Ltd, Japan)を用い Minami, *et al.*, (1996)の方法に準じた。100 倍率の光学顕微鏡下で観察した組織像から任意の 3 視野をテレビカメラを通して、直接 MV4000 にとりこみ、XYGDMP および GCONVERT プログラムを用いて2色の色修正を行った。色修正は以下のように実施した。

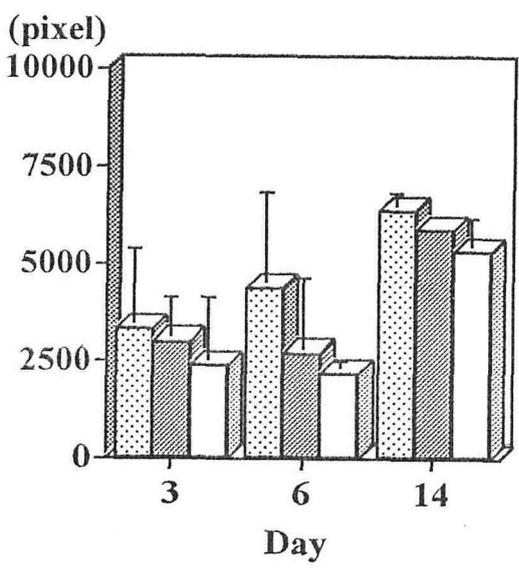
- (1) 各切片の背景(染色されない間隙部分やポリエステル線維)の明暗度を入力画面上で同じグレーレベルに変換した。
- (2) 染色部位の明度分布を測定した。
- (3) 入力画面全体をポジ領域とネガ領域に分け、2色のヒストグラムを HGRAM プログラムにより解析した。各色の明度の平均は3つの入力画面から算出した。最終的に各色を入力画面 100,000 ピクセルあたりのピクセル数で示した。

4. 結果

1) 埋植材内部および周囲組織中の各コラーゲン型を画像解析した結果を図 4-4 および図 4-5 に示した。実験期間を通じてキチン群は他の群に比べ、いずれの型のコラーゲンも高い割合(特にIV型コラーゲン)であった。さらに、14 日目のキチン群は周囲組織においてもIII、IV 型コラーゲンの割合が高かった。埋植材内部においてキトサン群およびコントロール群の大略は実験期間を通じて類似性を示した。



III型



IV型

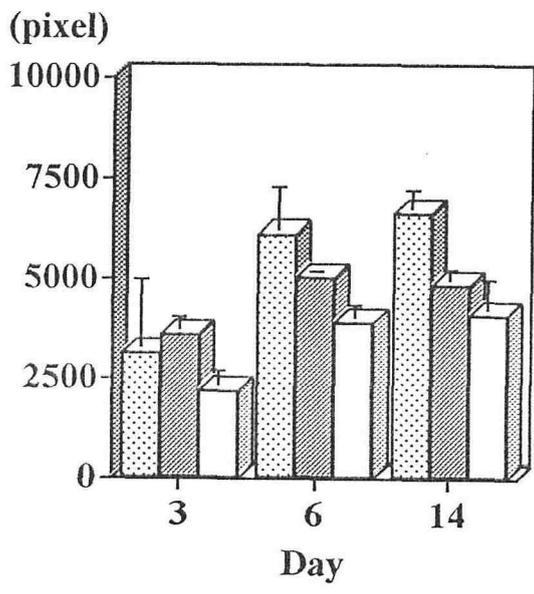


図 4-4 埋植材内に形成された肉芽組織内の型別コラーゲン量

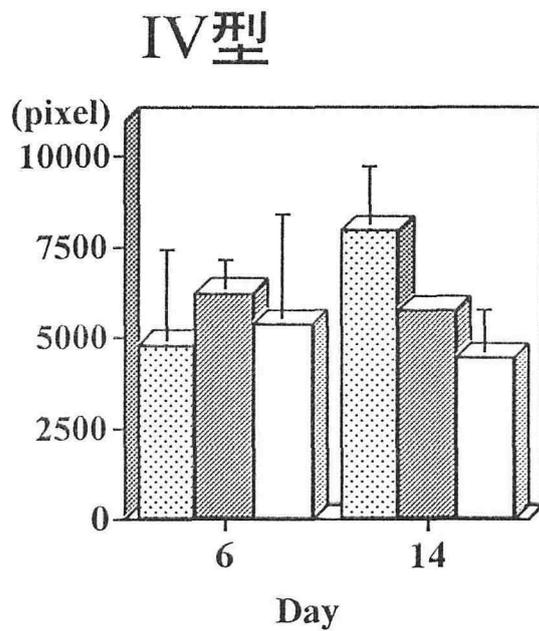
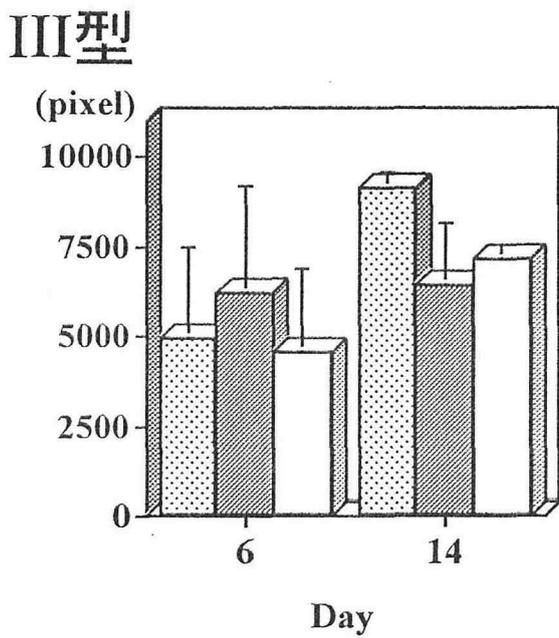
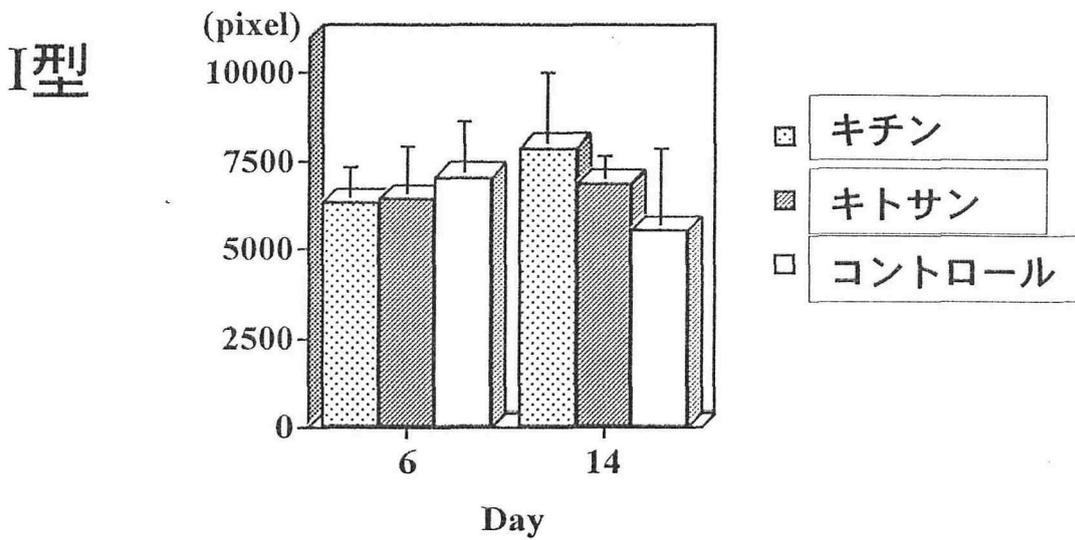


図 4-5 埋植材周囲に形成された肉芽組織内の型別コラーゲン量

第3項 考察

キチン-NWF に誘引された肉芽組織は、実験期間を通じてコントロールより薄いことが明らかとなった。これは、今までキチン誘導の肉芽組織が肉眼的に薄いとされていたことを支持するものである。また、キトサン誘導の肉芽組織が最も厚くなることも判明したが、埋植材内の組織学的所見では炎症性細胞以外大差なく、その厚みの差は埋植材の周囲に形成された肉芽組織に由来することが明らかになった。キトサン粒子が埋植材中に常に観察されたことから、キトサンに対する持続的な炎症反応によって過剰な肉芽組織が形成されるものと思われる。臨床の場でキトサンを持続的に投与する事により過剰な肉芽組織が形成されることを経験しているが、この結果と一致するものである。先の実験で、ラットにおいて 0.1 mg キトサンが誘導する肉芽組織は、少数例で滲出液の貯留が見られものの薄くて滑らかであった。猫においては同濃度のキトサンにより過剰な肉芽組織が形成された。この点で、猫はラットに比べてキトサンに対する感受性が強いと判断される。先に、ラットにおいてキチンおよびキトサンの至適濃度の設定を行ったが、猫に対してはさらに最適なキトサン量を決定する必要を認めた。

猫においてもキチン-NWF による肉芽組織形成が少量であることに関しては、ラットの所見と同様な結果であり、そのメカニズムについても同様であると考えた。また、合成されたコラーゲンは比率的には I、III、およびIV型が同様に合成されており、さらに異物巨細胞の細胞質にもこれらの抗体に対して陽性所見を呈したことから、コラーゲンの分解に巨細胞が関連していることが明らかとなった。一般に創傷治癒過程において、まずIII型コラーゲンが合成され組織の枠組みをつくり、次いでI型コラーゲンが合成され組織が修復されると考えられている(畑, 1998)。今回の実験ではIおよびIII型は、6日目より14日目にかけて両者とも増加しているが、その比率は変わらなかったため、この説には一致しなかった。また Minami, *et al.*, (1993) が行った血管の乏しいとされる牛の腱組織におけるコラーゲン合成実験ではIII型およびIV型コラーゲンが誘導されたが、今回の実験では、I型コラーゲンも誘導された。このことから、成熟なコラーゲンは血液供給の豊富な組織において、より迅速に誘導される事が示唆された。

キチン、キトサンが誘導する創傷治癒の機序に関しては、その肉芽形成促進作用に注目した報告が数多くなされてきた。しかし、瘢痕をとみなわない良性の肉芽組織が形成されるには、ある時点で創傷治癒活動は不活化されるはずであり、その時期

や介在物質等の解明が最重要であると考え。今回の研究によって、キチンおよびキトサンの投与によって遊走細胞や線維芽細胞の活性はコントロール群より迅速に発現し、コラーゲン合成と分解がより早く促進することにより、瘢痕を作らない治癒過程が発現すると理解された。

総括 および 結論

キチンおよびキトサンの創傷治癒促進効果を理解する目的で、皮下に埋設したキチンおよびキトサン含浸不織布(NWF)中に誘導された肉芽組織を回収し、様々な分析を実施することで以下の成績を得た。

1. NWF に対するキチンおよびキトサン添加至適濃度を、ラットを用いて検討した。
1.0 および 10 mg/ml キチン-NWF、0.1 および 1.0 mg/ml キトサン-NWF において誘導された肉芽組織は、肉眼的には炎症反応もなく、薄くて滑らかであった。組織所見では、7 日目に埋植材のほぼ中心部まで肉芽組織が浸潤し、7 ~ 11 日目には埋植材は器質化されていた。しかし、50 mg/ml キチンおよび 10 mg/ml キトサン-NWF において形成された肉芽組織は、厚く粗造で周囲に浮腫、滲出液の貯留等の炎症反応が見られた。組織所見でも、埋植材中に多数の炎症性細胞が観察され、NWF の器質化はわずかであった。以上の結果から、至適濃度はキチンは 1~10 mg/ml、キトサンは 0.1~1.0 mg/ml であった。組織所見では、キチンとキトサンで、それぞれ 1 mg/ml と 0.1 mg/ml、10 mg/ml と 1 mg/ml が極めて類似しており、キトサンはキチンの 1/10 の量でほぼ同様な組織反応を引き起こすことが明らかとなった。
2. 肉芽組織の主成分であるコラーゲン線維の動態を、マツソトリクローム染色標本の画像解析処理により検討した。コラーゲン線維量はキチンの 1.0 および 10 mg、キトサンの 0.1 mg でコントロールと比較して減少傾向が見られ、キチンの 10 mg では有意な減少が見られた。また、肉芽組織中のプロリルヒドロキシラーゼを測定し、コラーゲンの合成能を検討した。プロリルヒドロキシラーゼ活性は 10 mg/ml キチンを除いてキチン群、キトサン群およびコントロール群ともほぼ同様の動きを示し、4 日目まで活性は低く、その後ばらつきはあるものの直線的増加を示し、14 日目には 4 日目の約 10 倍に達した。10 mg/ml キチンにおけるプロリルヒドロキシラーゼ活性は 4 日目まで低く、4 日目から 7 日目にかけて約 8.5 倍の急増を示し、その後プラトーに達した。両者の成績から、10 mg/ml キチンを皮下に投入すると線維芽細胞におけるコラーゲン合成は極めて活性化されるが、7 日で活性化は頭打ちとなり、このことがコラーゲン量の減少と良好な器質化を引き起こす重要な所見と考えた。
3. コラーゲンとともに細胞外マトリックスの主要成分であるグルコサミノグリカン(GAG)およびプロテオグリカン(PG)に及ぼす影響を、アリユウシャンブルー染色お

よびサフラニン-O染色標本の画像解析処理により測定するとともに、GAGの主要糖鎖であるコンドロイチン硫酸(CS)を高速液体クロマトグラフィーで定量した。埋植7日目の材料において、コントロールと比較して、キチン群ではGAGの沈着量が増加し、PGは逆に減少していた。一方キトサン群では、GAGおよびPGの量はコントロールと大差がなかった。この原因は、キトサン群では組織における炎症反応がキチン群と比較して存続しており、コントロール群では他の群より器質化が遅れていることが重要な要因ではないかと推測した。一方、CSの定量の結果、キチン群におけるCSの量はコントロール群およびキトサン群より減少しており、キチン群におけるGAGの増加は他の糖鎖の増加によるものと考えられた。

4. ラットを用いた基礎的成績を、より大型の動物で検討するべく臨床的に創傷治癒効果を顕著に示すネコを用いて実験を行った。ネコの腹壁にキチンおよびキトサンを含浸させたポリエステル不織布を埋植し、誘導される肉芽組織の経時的变化を肉眼的および組織学的に検索した。さらに、肉芽組織中のコラーゲンを免疫組織化学染色および画像解析処理により型分けを行った。器質化された埋植材の厚みは、いずれの群も実験期間を通じて漸次増加したが、ラットと同様にキチン-NWFが最も薄かった。埋植材内部においては、キトサン群で炎症性細胞が多数出現した点を除いてキチン群とキトサン群の間に大差はなく、両群とも6日目には中心部までの肉芽組織の侵入が観察された。NWFの周囲組織はキトサン群において最も厚く、キチン群において最も薄かった。キチン群において、辺縁部に多数の多核巨細胞および新生血管が観察された。キトサン群における肉芽組織の過剰形成の原因は、7日以降もキトサン粒子が残存し炎症反応が持続するためと考えられた。埋植材内部のコラーゲンは、キチン群においてI、IIIおよびIV型とも他の群に比べると多く含まれることが判明し、また、キトサン群およびコントロール群はともに類似した割合を示した。周囲組織中のコラーゲンはキチン群では14日目にIIIおよびIV型が多いことが判明した。

以上の成績は、臨床的に経験されてきたキチン、キトサンの過剰投与が引き起こす生体反応を実験的に証明するとともに、至適用量を明らかにするものである。創傷治癒促進を目的としてキチン、キトサンを使用する場合には、この至適用量を念頭においた治療法が極めて重要となる。至適用量を用いれば本来異物であるポリエステル不織布を容易に器質化するが、過剰投与はいたずらに異物反応を助長することになり、治療を目的とした場合には失敗を招く結果になると考えられる。今日、これらの物

質を用いた治療例は極めて多いが、至適用量を明確にした報告はみとめられない。さらに、今回の実験からも明らかのように、キチン、キトサンもそれ自体が異物であり、これらによって引き起こされる生体反応を、過剰反応に進行する以前に停止させることが必要である。この効果については、キチンがキトサンより優れていることをコラーゲン合成酵素であるプロリルヒドロキシラーゼ活性の成績から明らかにした。この作用はキチンの分解吸収が至適用量では約 7 日で完了し、これにともなって、キチンの生体活性効果も完了すると考えられた。キトサンは分解吸収が生体内では極めて遅く、このことが過剰反応を引き起こす原因と考えられた。キトサンはキチンの 1/10 でほぼ同程度の反応を引き起こせることから、極めて経済的であり、産業動物への応用が期待できる。この用量の差はキチンとキトサンの C2 位に保有するアミノ基の量の差に一致し、創傷治癒のための生体反応の強度はこのアミノ基の量に左右される。しかし、生体反応を終息させるには、それ自体が分解吸収される必要があり、そのためにキチンが多く保有するアセトアミド基の存在が極めて重要であると結論された。

謝 辞

本研究は鳥取大学農学部教授 南 三郎 博士の御鞭撻と御懇篤なる御指導ならびに御校閲の賜物であり、ここに深甚なる謝意を表します。

研究の遂行ならびに論文の作成にあたり、終始ご懇篤な御指導と御校閲を賜りました山口大学農学部教授 田浦保穂 博士ならびに鳥取大学農学部助教授 岡本芳晴 博士に衷心より敬意と感謝の意を表します。さらに、平成7年4月から1年半にわたり主指導教官として御指導ならびに御校閲をいただいた鳥取大学農学部教授 林 隆敏 博士に深甚なる謝意を表します。

また、本研究の推進にご支援を賜りました麻布大学獣医学部教授 藤瀬 浩 博士、鳥取大学農学部助手 宮武克行 博士、生化学工業株式会社 杉浦信夫 博士ならびにエーザイ株式会社 田中一郎 博士に謹んで感謝の意を表します。さらに本研究の遂行ならびに論文の作成にあたり、貴重な御助言を賜りました鳥取大学農学部元教授 松橋 皓 博士に心より深謝いたします。

また、キチンおよびキトサン製材をご提供いただいた鳥取市サンファイブ株式会社 大田寿門部長に深謝いたします。

最後に本研究の遂行にあたって多大なご協力をいただいた鳥取大学農学部獣医学科家畜外科教室員各位に謝意を表します。

引用文献

1. Allan, G.G., Fox, J.R., and Kong, N. (1978): A critical evaluation of the potential sources of chitin and chitosan. In: Proc. 1st Int. Conf. Chitin/Chitosan, Ed., Muzzarelli, R.A.A. and Pariser, E.R., ed., MIT Sea Grant Program, Massachusetts, pp.64-78.
2. Allan, G.G., Altman, L.C., Bensinger, R.E., Ghosi, D.K., Hirabayashi, Y., Neogi, A.N., and Neogi, S. (1984): Biomedical applications of chitin and chitosan. In: Chitin, Chitosan and Related Enzymes. Ed., Zikakis, T.P. Academic press, Orland, pp.119-133.
3. Azuma, I., Iida, J., Nishimura, K., Ishihara, C., Tokura, S. and Yamamura, Y. (1988): Prevention of sendai virus infection with synthetic MDP and chitin derivatives in mice. *Adv. Biosci.*, 68, 29-37.
4. Bartnicki-Garcia, S. (1968): Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Ann. Rev. Microbiol.*, 22, 87-95.
5. Bennett, N.T. and Schultz, G.S. (1993): Growth factors and wound healing : Part II. Role in normal and chronic wound healing. *Am. J. Surg.*, 166, 74-81.
6. Bischoff, S. C., DeWeck, A. L., Dahinden, C. A. (1990): Interleukin 3 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor render human basophills responsive to low concentratons of complement component C3a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 6813-6817.
7. Clark, R. A. F. and Denver, M. D. (1985): Cutaneous tissue repair : Basic biologic considerations. I. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 13, 701-725.

8. Doedje, K. J., Sasaki, M., Kimura, T., Yamada, Y. (1991): Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. *J. Biol. Chem.*, 266, 894-902.
9. Folkman, J. and Klagsbrun, M. (1987): Angiogenic factors. *Science*, 235, 442-447.
10. Gervasoni, J. E., Conrad, D. H., Hugli, T. E., Schwarz, L. B., Ruddy, S. (1986): Degradation of human anaphylatoxin C3a by rat peritoneal mast cells: a role for the secretory granule enzyme chymase and heparin proteoglycan. *J. Immunol.*, 136, 285-292.
11. Gromack, D.T., Porras-Reyes, B. and Mustoe, T.A. (1990): Current concepts in wound healing: growth factor and macrophage interaction. *Adv. Understanding Trauma Burn Injury*, 30, suppl., 129-133.
12. 畑隆一郎(1990): 創傷治癒とコラーゲン合成制御, *細胞*, 22, 163-166.
13. Hutton, J. J., Tappel, A. L. Jr. and Udenfriend, S. (1996): A rapid assay for collagen proline hydroxylase. *Anal. Biochem.*, 16, 384-394.
14. Iida, J., Une, T., Ishihara, C., Nishimura, K., Tokura, S., Mizukoshi, N. and Azuma, I. (1987): Stimulation of non-specific host resistance against Sendai virus and *Escherichia coli* infection by chitin derivatives in mice. *Vaccine*, 5, 270-274.
15. 入江由希子 (1997): キチンおよびその関連物質のヒト血管内皮細胞に対する活性効果, 北海道大学, 卒業論文.
16. Kajimoto, O., Sakamoto, K., Takamori, Y., Kajitani, N., Imanishi, T., Matsuo, R. and Kajitani, Y. (1998): Therapeutic activity of oral glucosamine hydrochloride in osteoarthritis of the knee. A placebo-controlled, double-blind, cross-over study. *Jpn. J. clin. Nutr.*, 20, 41-47.

17. Koch, A. E., Polverini, P.J., Kunkel, S.T., Harlow, L. A., Dipietro, L.A., Elner, S.G. and Strieter, R.M. (1992): Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*, 258, 1798-1801.
18. Kratz, G., Amander, C., Swedenborg, J., Back, M., Falk, C., Gouda, I. And Lorm, O.(1997): Heparin-chitosan complexes stimulate wound healing in human skin. *Scand J. Plast Reconstr Surg Hand Surg.*, Jun, 31, 119-123.
19. Madden, J. and Peacock, E. E. Jr.(1968): Studies on the biology of collagen during wound healing. *Surgery*. 64. 288-294.
20. Malette, W.G., Quialey, H.J.JR. and Adickes, E.D. (1986): Chitosan effect in vascular surgery, tissue culture and tissue regeneration. In: *Chitin in Nature and Technology*, Eds. Muzzarelli, R.A.A., Jeuniaux, C. and Gooday, G.W., Plenum Press, New York, 435-442.
21. Mcelaughlin, S. H., and Bulleid, N.J. (1998): Molecular recognition in procollagen chain assembly. *Matrix. Biol.*, 16, 369-377.
22. Minami, S., Okamoto, Y., Tanioka, S., Sashiwa, H., Saimoto, H., Matsubishi, A. and Shigemasa, Y. (1993): Effect of chitosan on wound healing. In: *Carbohydr. Polym.*, Ed., Yalpani, M., ATL Press, Illinois, pp.141-152.
23. Minami, S., Okamoto, Y., Matsubishi, A., Sashiwa, H., Saimoto, H., Shigemasa, Y., Tanigawa, T., Suzuki, T. and Tanaka, Y.(1995): Polymeric N-acetyl-D-glucosamine (chitin) induces prostaglandin E2 in dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, 57, 377-378.
24. Minami, S., Oh-oka, M., Okamoto, Y., Miyatake, K., Matsubishi, A., Shigemasa, Y. and Fukumoto, Y.(1996): Chitosan-inducing hemorrhagic pneumonia in dogs. *Carbohydr. Polym.*, 29, 241-246

25. Minami, S., Mura-e, R., Okamoto, Y., Sanekata, T., Matsushashi, A., Tanioka, S. and Shigemasa, Y.(1997 a): Systemic effect of chitin by intravenous administration in dog. *Carbohydr. Polym.*, 33, 243-249.
26. Minami, S., Masuda, M., Suzuki, H., Okamoto, Y., Matsushashi, A., Kato, K. and Shigemasa, Y.(1997 b): Subcutaneous injected chitosan induces systemic activation in dogs. *Carbohydr. Polym.*, 33, 285-294.
27. Minami, S., Okamoto, Y., Miyatake, K., Matsushashi, A., Kitamura, Y., Tanigawa, T., Tanaka, Y. and Shigemasa, Y.(1997 c): Chitin induces typeIV collagen and elastic fiber in implanted non-woven fabric of polyester. *Carbohydr. Polym.*, 29, 295-299.
28. Minami, S., Suzuki, H., Okamoto, Y., Fujinaga, T. and Shigemasa, Y. (1998): Chitin and chitosan activate complement via the alternative pathway. *Carbohydr. Polym.*, 36, 151-155.
29. Mita, Y.(1987): Character of chitosan and its application to cosmetics. In *Development and Application of Chiton and Chitosan*. Kogyo-gijyutsu-kai, Tokyo, pp.248-269.
30. Mori, T., Okumura, M., Matsuura, M., Ueno, K., Tokura, S., Okamoto, Y., Minami, S. and Fujinaga, T. (1997): Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblast in vitro. *Biomaterials*, 18, 947-951.
31. Murata, J., Saiki, I., Nishimura, S., Nishi, N., Tokura, S. and Azuma, I. (1989): Inhibitory effect of chitin heparinoids on the lung metastasis of B16-BL6 melanoma. *Jpn. J. Cancer Res.*, 80, 866-872.

32. Murata, J., Saiki, I., Azuma, I. and Tokura, S. (1992): Inhibitory effect of sulfated chitin derivatives on the lung metastasis of murine melanoma cells. In: Chitin Derivatives in Life Science, Eds. Tokura, S. and Azuma, I., Organizing Committee of International Symposium on Chitin Derivatives in Life Science and Japanese Society for Chitin/Chitosan, Tokyo, pp.68-76.
33. Muzzarelli, R.A.A. (1977): Chitin, Pergamon Press, New York, pp, 6-43.
34. Nagai, T., Sawayanagi, Y., Nambu, N. (1984): Chitin, Chitosan and Related Enzymes (Zikakis, J. ed), 21-39, Academic Press, London.
35. 中島正治, 渥美和彦, 木船紘爾(1985): キチンによる吸収性縫合糸の創傷治療促進効果の検討, 最新医学, 40, 1958-1960.
36. Nishimura, K., Nishimura, S., Nishi, N., Saiki, I., Tokura, S., and Azuma, I. (1984): Immunological activity of chitin and its derivatives, Vaccine, 2, 93-99.
37. Nishimura, K. and Azuma, I., (1992): Immunomodulating activities of chitin derivatives. In: Chitin Derivatives in Life Science, Eds. Tokura, S. and Azuma, I., Organizing Committee of International Symposium on Chitin Derivatives in Life Science and Japanese Society for Chitin/Chitosan, Tokyo, pp.7-11.
38. Nishimura, K., Nishimura, S., Nishi, N., Numata, F., Tone, Y., Tokura, S., and Azuma, I. (1985): Adjuvant activity of chitin derivatives in mice and guinea-pig. Vaccine, 3, 379-384.
39. Nishimura, K., Ishihara, C., Ukei, S., Tokura, S. and Azuma, I. (1986a): Stimulation of cytokine production in mice using deacetylated chitin. Vaccine, 4, 151-156.

40. Nishimura, K., Nishimura, S., Seo, H., Nishi, N., Tokura, S. and Azuma, I. (1986b): Macrophage activation with multi-porous beads prepared from partially deacetylated chitin. *J. Biomed, Materi. Res.*, 20, 1359-1372.
41. Nishimura, S., Nishi, N. and Tokura, S. (1986): Bioactive chitin derivatives. Activation of mouse peritoneal macrophages by o-(carboxymethyl) chitins. *Carbohydrate Res.*, 146, 251-258.
42. 小川道雄 (1994): サイトカインによる好中球の活性化と臓器障害, *医学のあゆみ*, 169, 845-849.
43. Okamoto, Y. (1993): Mechanisms of wound healing acceleration by a natural polysaccharide, beta-chitin and its clinical effects. Ph.D. thesis, Hokkaido University, Hokkaido, pp.31-47.
44. Okamoto, Y., Minami, S., Matsushashi, A., Sashiwa, H., Saimoto, H., Shigemasa, Y., Tanigawa, T., Tanaka, Y. and Tokura, S. (1993 a): Polymeric N-acetyl-D-glucosamine(chitin) induce histionic activation in dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, 55, 739-742.
45. Okamoto, Y., Minami, S., Matsushashi, A., Sashiwa, H., Saimoto, H., Shigemasa, Y., Tanigawa, T., Tanaka, Y. and Tokura, S. (1993b): Application of polymeric N-acetyl-D-glucosamine (chitin) to veterinary practice. *J. Vet. Med. Sci.*, 55, 743-747.
46. Okamoto, Y., Shibazaki, K., Minami, S., Matsushashi, A., Tanioka, S. and Shigemasa, Y. (1995): Evaluation of chitin and chitosan on open wound healing in dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, 57, 851-854.
47. Peluso, G., Petillo, O., Ranieri, M., Santin, M., Ambrosio, L., Calabro, D., Avallone, B. and Balsamo, G. (1994): Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. *Biomaterials*, 15, 1215-1220.

48. Prudden, J.F., Migel P., Hanson, P., Friedrich, L., and Balassa, L. (1970): The discovery of a potent pure chemical wound-healing accelerator. *Am. J. Surg.*, 119, 560-564.
49. Saiki, I., Murata, J., Nakajima, M., Tokura, S. and Azuma, I. (1990): Inhibition by sulfated chitin derivatives of invasion through extracellular matrix and enzymatic degradation by metastatic melanoma cell. *Cancer Res.*, 50, 3631-3637.
50. 坂倉照好(1994): 孤独な細胞外マトリックス, 羊土社, 東京, pp. 47.
51. Seo, H.(1990): Processing and utilization of chitin and chitosan. *Sen-I Gakkaishi*, 46, 564-569.
52. Suzuki, K., Okawa, Y., Hashimoto, K., Suzuki, S. and Suzuki, M. (1984): Protecting effect of chitin and chitosan on experimentally induced murine candidiasis. *Microbiol. Immunol.*, 28, 903-912.
53. Suzuki, K., Tokoro, A., Okawa, Y., Suzuki, S. and Suzuki, M.(1986): Effect of N-acetylchito-oligosaccharides on activation of phagocytes. *Microbiol. Immunol.*, 30, 777-787.
54. Suzuki, Y., Okamoto, Y., Morimoto, H., Sashiwa, H., Saimoto, H., Tanioka, S., Shigemasa, Y. and Minami, S. (1999): Influence of physico-chemical properties of chitin and chitosan on complement activation. *Carbohydr. Polym.* 420, 307-310.
55. Tanaka, Y., Tanioka, S-i., Tanaka, M., Tanigawa, T., Kitamura, Y., Minami, S., Okamoto, Y., Miyashita, M. and Nanno, M. (1997): Effects of chitin and chitosan particles on BALB/c mice by oral and parenteral administration. *Biomaterial*, 18, 591-595.

56. Tanigawa, T., Tanaka, Y., Tomita, K., Sasaki, T., Sashiwa, H., Saimoto, H., Shigemasa, Y., Okamoto, Y., Minami, S. and Matsushashi, A. (1992): Effect of chitin on the production of interleukin-1 β in human blood monocytes. *Yonago Acta Medica*, 35, 147-150.
57. Tapadinhas, M. J., Rivera, I. C. and Bignamini, A. A. (1982): Oral glucosamine sulfate in the management of arthrosis: Report on a multicentre open investigation in Portugal. *Pharmatherapeutica*, 3, 157-168.
58. Theodosakis, J., Adderly, B. and Fox, B. (1997): New hope for beating osteoarthritis. In: *The arthritis cure*, ST. Martin's Press, New York, pp.29-52.
59. Tokoro, A., Tatewaki, N., Suzuki, K., Mikami, T., Suzuki, S. and Suzuki, M. (1988): Growth-inhibitory effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor. *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 784-790.
60. 上野博史, 村上光晃, 奥村正裕, 廉沢剛, 上出利光, 藤永徹 (2000): 好中球はオステオポンチン産生能を有する. 第129回獣医学会講演要旨集, pp.140.
61. Usami, Y., Okamoto, Y., Minami, S., Matsushashi, A., Kumazawa, N. H., Tanioka, S. and Shigemasa, Y. (1994): Chitin and chitosan induce migration of bovine polymorphonuclear cells. *J. Vet. Med. Sci.*, 56, 761-762.
62. Wada, T., Yokoyama, H. and Kobayashi, K. (1996): Cytokines and cellular adhesion molecules in neutrophil chemotaxis. *Clinical Immunology*, 28, 399-403.
63. Yano, H., Iriyama, K., Nishiwaki, H. and Kifune, K. (1985): Effects of N-Acetyl-D-glucosamine on Wound Healing in Rats. *Mie Medical Journal*, 35, 53-56.
64. Yoshihara, M. and Shiina, M. (1994): Cartilage metabolic marker: proteoglycan. *Bone*, 8, 87-95.

END