

筑波大学

博士（医学）学位論文

Hydrocolloid-sheet composed of alginate, chitin/chitosan and fucoidan as wound dressing stimulates wound healing in diabetic *db/db* mice

(遺伝性糖尿病マウスの皮膚潰瘍に対し創傷治癒促進効果を発揮するアルギン酸、キチン・キトサン、フコイダン配合ハイドロコロイドシートの研究)

2015

筑波大学

柳林 聡

## 目次

背景 . . . . .	1
目的 . . . . .	6
対象と方法 . . . . .	7
結果 . . . . .	14
考察 . . . . .	18
結論 . . . . .	26
謝辞 . . . . .	27
引用文献 . . . . .	28
図 . . . . .	38

## 1. 背景

近年、生活習慣等の変化により糖尿病患者数が増加するに伴い、糖尿病性皮膚潰瘍の治療機会が多くなっている。糖尿病性皮膚潰瘍は、血糖コントロールや創傷管理が不良であると容易に難治性となりうる。糖尿病患者の足部の難治性糖尿病性皮膚潰瘍の有症率はおよそ 15-25% であるとの報告があり [1, 2]、そのうち 14-24% が切断に至るとされている [3, 4]。このような事態を回避するためには、継続的かつ適切な血糖コントロールが不可欠であるが、病変が悪化拡大する前に、いかに早く治療を開始し、大きな侵襲を加えることなく皮膚潰瘍を治癒させるかが重要である。一方、保存療法が奏功しない場合は外科的治療を検討すべきであるが、糖尿病性皮膚潰瘍の罹患者は、心血管系をはじめ全身の動脈硬化性病変を合併する割合が高く、全身麻酔を必要とするような侵襲の大きな治療は選択できない場合も多く、今後少しでも有効な保存療法の出現が期待されている。

難治性糖尿病性皮膚潰瘍に限らず、皮膚潰瘍の保存的治療は原疾患の治療をおこないつつ、ベッドサイドでの適切な壊死組織のデブリードマンの後、各種創傷被覆材や軟膏を使用し湿潤療法を基本とした創傷管理をおこなうが、近年では持続陰圧閉鎖療法 [5, 6] などもおこなわれている。

る。さらに創傷治癒促進物質の一つである basic Fibroblast Growth Factor (FGF-2) [7, 8] や Platelet Rich Plasma (PRP) [9, 10]の局所投与などが試みられ一定の効果がみられているが、それらの効果をもってしても難治性となり、最終的には切断に至る症例も散見され、いまだ保存的治療法の決定打とはなりえていない。

その原因としては、FGF-2 や PRP の投与方法や投与後の創傷管理が不十分であったことが推察され、創傷管理の一環として創傷被覆材を使用する事についての言及は少なく、湿潤療法を基本として創傷治癒過程メカニズムに則した創傷被覆材を併用する必要があると考えた。

そのためには、単なる湿潤環境を維持するための創傷被覆材でなく、創傷被覆材そのものが創傷治癒促進作用を発揮できる被覆材の開発が望まれる。

創傷治癒過程では遊走してくる炎症性細胞や上皮細胞、角化細胞、線維芽細胞などから分泌される増殖因子と表皮あるいは真皮内のさまざまな細胞との相互作用により創傷治癒が促進される [11-13]。また、間葉系細胞や血管内皮前駆体細胞が増殖することによって血管新生が促され [14]、それにマクロファージの遊走による肉芽組織形成促進効果が加わり、皮膚潰瘍部分での真皮の構築や上皮化に重要な働きをする [15]。これらの各

種細胞や増殖因子の働きは正常な創傷治癒には不可欠であり、その欠落は糖尿病性皮膚潰瘍をはじめとする難治性皮膚潰瘍の主な原因の一つであると指摘されている [11]。さらに、局所の血流低下も難治化の大きな要因にあげられる。治癒に必要な増殖因子を潰瘍面に不足なく供給し、またそれと同時に局所の低酸素状態を改善し創傷治癒を促進させるには、血管新生が重要であると述べられている [16-18]。

したがって、保存的治療により難治性糖尿病性皮膚潰瘍を治癒させる手段の一つとして、潰瘍面に不足している増殖因子の供給と血管新生を促進させる機能を持った創傷被覆材の開発が求められる。

その上、創傷治癒を促進可能な理想的な創傷被覆材にする条件として、増殖因子の供給と血管新生作用に加え、①潰瘍面が浸軟せず適度な湿潤環境が維持可能である。②創面に固着しない。③感染巣となり得る死腔を充填できる。④生体親和性が高い。ことが挙げられる。細胞レベルで考えると、上皮細胞、角化細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞の遊走・増殖、細胞外基質の合成も創傷治癒には必要であるので、それらの誘導活性化などを併せ持つことも求められる [19-21]。

創傷治癒には線維芽細胞増殖因子ファミリーの一つである FGF-2 や、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)、上皮増殖因子 (EGF)、形質転換増殖

因子 (TGF- $\beta$ ) などの増殖因子の関与が必要である [22, 23]。なかでも創傷治癒過程では FGF-2 の役割は大きく [11, 24-26]、これらの増殖因子の吸収や保持が可能となることが、さらに高機能な創傷被覆材になるには必要である。

このような特徴を併せ持ち、創傷治癒促進効果を発揮できる構成成分の中では、すでにアルギン酸 [20, 27] やキチン・キトサン [21, 28, 29] が臨床使用されている。しかし、これらの臨床での使用形態はフィラメントやファイバー、粉末、粒状、スポンジ状などさまざまであり、あるいはそれらと綿やポリエステルを混合して利用されている [20, 30]。このような形態は理想的な創傷被覆材に求められる適度な湿潤環境の維持や創面との非固着性、扱いやすさなどを十分満たしているとはいえない。しかしながら、アルギン酸は止血や吸水作用などを [27]、さらにキチン・キトサンは抗菌活性や炎症細胞誘導作用などを有しており [21, 28, 29]、創傷被覆材の成分として非常に魅力的である。そのため、アルギン酸およびキチン・キトサンの特長を維持しつつ、しかも増殖因子を吸収・保持できるような創傷被覆材が理想的であると考えた。また、それらを、創面に固着しにくく扱いやすい剤型である、ハイドロコロイドシートとして作製することを目的とした。

そこで、アルギン酸およびキチン・キトサンに加え、藻類から抽出される多糖類のフコイダンに着目した。フコイダンは硫酸基を多く持つ多糖類であり、ヘパリンの構造に類似している。そのため、フコイダンはヘパリン親和性増殖因子である TGF- $\beta$  や FGF-2 との結合能を有し、創傷被覆材の構成成分に加えると創傷治癒促進効果が認められ [31, 32]、創傷治癒にかかわる増殖因子の吸収や保持効果を期待できる。

よって、本研究ではアルギン酸、キチン・キトサン、フコイダンを粉末状に加工し、濾紙に噴霧・固定することで臨床応用しやすい形態である、ハイドロコロイドシート (Alginate Chitin/Chitosan Fucoidan - Hydrocolloid Sheet, 以下 ACF-HS) を作製し、この ACF-HS が難治性糖尿病性皮膚潰瘍に対して創傷治癒促進効果を発揮するかどうかを検討した。比較対象としては、すでに臨床使用されているハイドロコロイド製材を貼付した群および被覆材なし群とした。

## 2. 目的

遺伝性糖尿病マウスである *db/db* マウスの背部に皮膚潰瘍を作製し、アルギン酸、キチン・キトサンおよびフコイダンを配合した創傷被覆材 (ACF-HS) 貼付群の難治性糖尿病性皮膚潰瘍モデルに対する創傷治癒促進効果を、市販され臨床使用されているハイドロコロイド製剤である ABSOCURE-surgical®貼付群、被覆材なしの control 群とで比較検討し、創傷治癒に対する効果を検討する事である。

また、ACF-HS と ABSOCURE-surgical®の吸水性を比較する事、および *db/db* マウスの比較対象として *db/+*マウスの創傷治癒過程を観察する事である。

### 3. 対象と方法

#### (ア)ACF-HS の作製

本研究に用いた ACF-HS は共同研究者である北海道工業技術センター青木央氏が担当した。ACF-HS 作製方法について簡潔に記述する [33]。

まず、アルギン酸 (和光純薬工業)、キチン (chin powder from crab shells, acetylation rate approximately 100 mol/mol/% grade, ナカライテスク)、キトサン (chitosan 5, 和光純薬工業)、および「ガゴメ昆布」といわれる北海道函館市で採取された海藻類 *Kjellmaniella crossifolia* から抽出したフコイダン [33, 34]、それぞれの乾燥粉末を準備した。これらの乾燥粉末をアルギン酸:キチン:キトサン:フコイダン (60:20:2:4 w/w) の割合で混合し、はじめに乳鉢と乳棒で均一に混ぜ合わせ、その後さらに高速混合・造粒機 (IKA-Labortechnik & Kunkel GmBh & Co. Kg, W. Germany) で混ぜ合わせた。

これら乾燥粉末の構成比率については、キトサンとフコイダンの配合比率を 1:2 とすると不溶性複合体を形成し、FGF-2 の安定化が得られる [35]。キチンはキトサンを脱アセチル化して製造するが、その際脱アセチル化されないキトサンが生じ、誤差の原因となるため、その誤差を緩和するためにキチンをキトサンの 10 倍量加えるように設定した。また、ア

ルギン酸は塩を含むため、かさばらないという特性を持ち、キチンはかさ密度の関係から重量の割に体積が大きいという性質 [34] を考慮し、アルギン酸とキチンの比率を適宜変えていくと、ACF-HS が創傷被覆材として適切な厚みや強度を保つには、アルギン酸とキチンの比率は 3 : 1 であることが最も適しており、したがって ACF-HS の各構成成分の比率は前述のように決定された。

上記の方法で作製された乾燥粉末 0.77g を滅菌された直径 70mm の濾紙 (JIS P3801 No.2 円形濾紙, 東洋濾紙株式会社) 上に均一に噴霧した。それに蒸留水を噴霧し、一部がペースト状になったところで 5 秒間 50% エタノールに浸漬しその後 1 分間蒸留水に浸漬した。それを 20 秒間 2 M  $\text{CaCl}_2$  に反応させ、アルギン酸カルシウムハイドロコロイドを合成し、その後 5% 酢酸に反応させた。こうして作製されたハイドロコロイドシートに直径 0.9mm の針 330 本 (8.6 本/ $\text{cm}^2$ ) の生け花用の剣山で多数の小孔を打ち、3 分間蒸留水に浸漬した。次に、再度 2 M  $\text{CaCl}_2$  に 20 秒間反応させリン酸緩衝液で 1 分間洗い、さらに 10 分間蒸留水で洗った。作製したハイドロコロイドシートを 10 枚まとめて 22ml の架橋試薬 (ethylene glycol diglycidyl ether, 和光純薬工業) を用いて 50% エタノール 800ml 中で反応させた。次に、pH5.8 (50%) 1 M acetate/Na-acetate 緩

衝液に 50℃、5 時間反応させた。こうして架橋されたハイドロコロイドシートは架橋試薬を蒸留水で洗い流し、70%エタノールで脱水、滅菌した。それぞれのシートを真空パックで被覆し、それを 20 秒間沸騰水中で滅菌処理をおこなった。こうして作製された ACF-HS は、乾燥重量が 1 枚 1.2-1.4g であり、真空パック後は 1 枚当たり 3.8-3.9g となった。

#### (イ) ACF-HS と ABSOCURE-surgical® (Hydrocolloid) の吸水量の比較

ACF-HS と Hydrocolloid の Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, ライフテクノロジーズ)、および DMEM に heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, ライフテクノロジーズ) を 20%加えた液体培地 (以下 DMEM+20%FBS) に対しての吸水性を比較した。

DMEM、および DMEM+20%FBS をそれぞれ 5ml 入れたプラスチックシャーレ (外径 57mm 深さ 16mm, IWAKI) に重さ 1g に調整した ACF-HS および Hydrocolloid をそれぞれ個別に浸し、最初の 30 分間は 10 分毎、その後 150 分までは 30 分毎に、それ以降は 1 時間ごとに 24 時間後まで ACF-HS、Hydrocolloid の重さを計測した。

#### (ウ) 遺伝性糖尿病マウスでの難治性皮膚潰瘍の作製

難治性糖尿病性皮膚潰瘍モデルは、*db/db* マウスの背部に作製した全層皮膚欠損創とした。*db/db* マウスは、脂肪細胞から分泌され、食欲や代謝を調節するレプチンの受容体の突然変異を発症しているマウスで、4週齢頃より肥満、高血糖、高コレステロール血症、高インスリン血症を発症する。また、インスリン抵抗性を呈するため、およそ 300-400mg/dl の高血糖状態を維持する [36, 37]。したがって *db/db* マウスは 2 型糖尿病モデルとして利用され [38]、その皮膚欠損創が難治性糖尿病性皮膚潰瘍モデルとして様々な研究ですでに使用されている [39-41]。

ペントバルビタールの腹腔内注射 (40mg/kg) による全身麻酔下で遺伝性糖尿病マウスである *db/db* マウス (C57BL/Ksj, *db/db*, 週齢 6-8, male, 日本クレア) の背部を除毛し、背部を正中で左右に分け、それぞれの中央に 1 か所ずつ直径 12mm の円形皮膚全層欠損を尖刃と剪刀を用いて作製した。被覆材貼付時に再度直径を計測すると潰瘍面の収縮作用がみられ、すべての検体で直径がおよそ 4mm 短縮した。そのため、実験開始時の円形皮膚全層欠損創の創縁に尖刃と剪刀で微調整を加え、直径 8mm の正円形となるようにした。

ACF-HS 貼付群 (ACF-HS 群)、ABSOCURE-surgical® 貼付群

(Hydrocolloid 群)、被覆材なし群 (control 群) の 3 群において実験をおこなった。どの潰瘍をどの群に割りあてるかは、それぞれの群が 6 例ずつとなるように無作為に選別した。

ACF-HS 群および Hydrocolloid 群は被覆材貼付後 4、7 日目で新しい被覆材に交換し、9 日目には被覆材そのものを除去した。その後は創面の乾燥を防ぐためにプラスチックシート (パーミロール、日東メディカル株式会社) のみを貼付した。control 群では被覆材は使用せず、乾燥を防ぐ目的でプラスチックシートのみを 0 日目から 14 日目まで貼付した。

それぞれの群を 14 日目まで観察、計測をおこなった。観察期間は、ACF-HS 群、Hydrocolloid 群ともに上皮化がほぼ完了する 14 日間とした。創傷面積については、残存皮膚潰瘍の形態が正確な正円形であったとは言い切れなかったが、潰瘍を正円形に見立てて、長径を直径として面積を算出した。また長径 (直径) の推移についても計測をおこなった。

これらすべての動物実験は防衛医科大学校動物実験ガイドラインに則り、動物実験倫理委員会により承認を受けたうえで実施した。

## (エ) 組織学的観察

皮膚潰瘍部分を含むように周囲皮膚を全層で採取した。10%ホルマリンで固定しパラフィンに包埋、ミクロトーム (REM-700 大和光機工業株式会社) で  $4\mu\text{m}$  の切片を作製した。切片の断面はマウスの前後軸と横軸とで創面に垂直な切片を作製した。

ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色で4日目、9日目、14日目の肉芽形成の厚みと新生血管数について無作為に選択した視野 ( $\times 100$ ) で1検体4か所ずつ計測し、その平均値を比較検討した。新生血管は管腔内に赤血球がみられるものを計数した。観察には共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 510 META, カールツァイス 2005年) を用いた。

また、4日目の検体に対して FGF-2 および VEGF に対する免疫染色をおこなった。

FGF-2 の免疫染色は、1次抗体は Anti-Human FGF-2 (147) Rabbit polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology #sc-79)、希釈倍率 $\times 100$ 、 $4^{\circ}\text{C}$ で一晩反応、2次抗体は、ペルオキシダーゼ標識デキストラン結合抗ウサギイムノグロブリン・ヤギ抗体 (DAKO #K4003) であり、室温で30分反応させた。発色基質は 3-3'-Diaminobenzidine-4HCl (DAB) を使用し、室温で1分間反応させた。

VEGF の免疫染色は、1 次抗体は Anti-Human VEGF Mouse monoclonal antibody clone : JH121 (upstate #05-443) で、希釈倍率×500、4℃で一晩反応させた。この 1 次抗体は、文献的にもマウス由来 VEGF の検出に用いられている[42,43]。ヒストファイン マウスステインキット (ニチレイ #414321) を用いて内在性のマウス免疫グロブリン (Ig) をマスキングして VEGF 様シグナルを検出した。2 次抗体は、ペルオキシダーゼ標識マウス及びウサギイムノグロブリン・ヤギ抗体 (ニチレイ #414321) で、室温で 30 分反応させた。発色基質は 3-3'-Diaminobenzidine-4HCl (DAB) を使用し、室温で 3 分間反応させた。

#### (オ) 統計処理

多標本の比較には、*post-hoc* Turkey's test を用いた。創収縮の検討では、Steel Dwass test を用いた。P 値は Stat Mate III, for Window および Statcel 3 (オーエムエス株式会社) を用いて計算をおこなった。

#### 4. 結果

##### (ア)ACF-HS の吸水性について

ACF-HS (1g)は、DMEM および DMEM+20%FBS とともに 18 時間におたって、浸軟することもなく DMEM および DMEM+20%FBS を 2.8g-3.0g まで吸水可能であった。一方、Hydrocolloid では、いずれの培地に対しても吸水性はほとんど認めなかった (図 1)。

##### (イ)背部難治性糖尿病性皮膚潰瘍の創収縮について

被覆材貼付後 0, 4, 7, 9, 14 日目のそれぞれの長径および皮膚潰瘍面積を計測した(図 2)。感染や出血などのトラブルはなかった。

4 日目までは 3 群とも創収縮効果はあまりみられず、長径、面積ともに有意差はなかったが、4 日目以降になると 7 日目では ACF-HS 群は Hydrocolloid 群、control 群両方に対し長径、面積ともに有意差を認めた (長径: Hydrocolloid 群  $P < 0.05$ , control 群  $P < 0.01$ , 面積: Hydrocolloid 群  $P < 0.05$ , control 群  $P < 0.01$ )。9 日目の長径に関しては ACF-HS 群は control 群に対して有意差を認めた ( $P < 0.05$ ) が、Hydrocolloid 群に対しては有意差を認めなかった。また、9 日目の面積については ACF-HS 群は Hydrocolloid 群、control 群両方に対して有意

差を認めた (Hydrocolloid 群  $P < 0.05$ , control 群  $P < 0.01$ )。14 日目には ACF-HS 群と Hydrocolloid 群との間に長径、面積とも有意差はなく、ACF-HS 群は control 群に対してのみ有意差を認めた (長径  $P < 0.01$ , 面積  $P < 0.05$ ) (図 3、4)。

#### (ウ) ACF-HS の血管誘導作用について

作製した 2 か所の背部皮膚潰瘍のうち、右側が control (被覆材なし) で左側に ACF-HS を貼付した *db/db* マウスにおいて、2 検体のみの観察であるが、4 日目の検体を採取する際に潰瘍の裏面まで観察したところ、control 側 (右側) から ACF-HS を貼付した潰瘍面 (左側) に向かって新生血管が伸びていく現象が観察された。さらに、ACF-HS を貼付した潰瘍底部には毛細血管の増生も観察された(図 5)。

#### (エ) 背部難治性糖尿病性皮膚潰瘍の創傷治癒過程の組織学的検討

ACF-HS 群、Hydrocolloid 群および control 群間で肉芽形成厚と新生血管数を HE 染色で比較検討した。4 日目、9 日目、14 日目に検体を採取し観察した。4 日目までには、肉眼的には創収縮には差がないにもかかわらず (図 3、4)、組織学的には 4 日目の HE 染色には ACF-HS 群で

多数の炎症細胞浸潤がみられ、肉芽組織厚に関しては ACF-HS 群で平均 0.250mm、Hydrocolloid 群で平均 0.117mm、control 群で平均 0.058mm であり、新生血管数では ACF-HS 群で平均 4.0 か所、Hydrocolloid 群は平均 0.67 か所、control 群は 0 であり、ACF-HS 群は、肉芽形成厚、新生血管数ともほかの 2 群にくらべて有意差が認められた（肉芽形成厚 P 値: 0.0004、および 0.0001、新生血管数 P 値: 0.0125、および 0.0001）(図 6, 7)。

4 日目以降 9 日目、14 日目と 3 群とも創収縮、上皮化が進んでいくが、中でも ACF-HS 群はほかの 2 群に比べ、9 日目、14 日目でも肉芽組織厚、新生血管数とも形成能が高い傾向は続いた(図 6, 7)。

さらに 4 日目の検体で VEGF と FGF-2 の免疫染色をおこない、どちらも検体数は 6 で、無作為に選択した視野 (×100) で 1 検体 4 か所ずつ計測し、その平均値について検討し VEGF については、バックグラウンドが高く VEGF 様シグナルの正確な計測が難しい条件となってしまったが、ACF-HS 群では新生血管とみられる管腔構造の周辺組織で、VEGF 様シグナルを示す細胞は Hydrocolloid 群よりも ACF-HS 群の方が多くみられる傾向があった。一方、control 群ではほとんど確認できなかった。FGF-2 に関しても、ACF-HS 群では Hydrocolloid 群よりも新生血管周

困と肉芽組織で陽性シグナルが多く観察される傾向があり、control 群では FGF-2 についても陽性シグナルの検出は困難であった (図 8)。

## 5. 考察

ACF-HS の創傷治癒促進効果は貼付後すぐには観察されず、はじめの 4 日間は肉眼的な所見である創収縮についても 3 群間に大きな差はみられなかった。しかし、貼付後 4 日を過ぎると創収縮に有意差が認められるようになり、また、新生血管数および肉芽形成厚にも有意差が認められるようになった。14 日目での創収縮に関しては ACF-HS 群と Hydrocolloid 群間では有意差がみられなかった。一方、同じ 14 日目でも肉芽形成厚や新生血管数に関しては有意に ACF-HS 群が優れていた。すなわち、ACF-HS 群と Hydrocolloid 群では創閉鎖の速さは変わらないが、ACF-HS 群には再生した組織は厚みがあり、しかも血流が豊富であると言える。このことから、ACF-HS 群は Hydrocolloid 群よりも物理的な刺激や感染に対する抵抗力が高いことが予想され、糖尿病性潰瘍の再発予防という点では優れた効果をもつものと期待される。このように、ACF-HS は Hydrocolloid を超える優れた創傷治癒促進効果をもつことが示唆された (図 3,4,7)。

創傷治癒過程の最初のステップである炎症相(0-3 日)において ACF-HS がマクロファージをはじめとする炎症細胞の誘導を活性化し [13,27,44]、FGF-2、VEGF、TGF- $\beta$  などの血管新生や肉芽形成に重要な増殖因子 [14] の分泌が惹起されると言われている。本研究では ACF-HS の特長である液

体成分の吸収・保持性に優れた効果（図 1）により、増殖因子を含んだ浸出液を吸収・保持することが可能となり、炎症相の次のステップである増殖相（3-14 日）において、それらが潰瘍面に作用し血管新生や肉芽形成、上皮化の促進へとつながったと考えている。このプロセスが ACF-HS が難治性糖尿病性皮膚潰瘍の創傷治癒を促進できる仕組みの一つであると考えられる。

皮膚潰瘍が治癒する、つまり上皮化が完了するまでの過程では、血管新生が誘導され、その新生血管を通じて増殖因子が潰瘍全域に供給され、肉芽が増殖し上皮化が進んでいくと考えられている[16, 45]。したがって、血管新生がなければ創傷治癒は進まないともいえる[14]。血管新生作用を有する増殖因子の中でも、FGF-2 および VEGF は重要な血管新生促進因子と考えられている[45]。

ACF-HS 群の 4 日目の免疫染色では FGF-2、VEGF 様シグナルともに潰瘍面での発現が他の 2 群より多い傾向がみられている（図 8）。

免疫染色の結果に加え、ACF-HS 群では、肉眼的にも潰瘍面への血管誘導現象や毛細血管新生が観察されており（図 5）、これらから、ACF-HS 群では FGF-2 と VEGF の作用により血管新生が起こり、それによって肉芽形成が促され、創傷治癒促進に寄与したものと示唆される。

ACF-HS の血管新生作用を構成成分の働きから考察すると、フコイダンに

はヘパリン親和性増殖因子である TGF- $\beta$ 、FGF-2 などを保持する作用があり、またそれらを安定化する作用も報告されている [31, 32]。すなわち ACF-HS はフコイダンを含有することで、炎症相で吸収・保持した浸出液に含まれる血管新生促進因子である TGF- $\beta$  と FGF-2 を潰瘍面に持続的に供給できるのではないかと考えている。また、FGF-2 には Platelet-derived growth factor (PDGF) を介して VEGF を活性化する作用があり [46]、FGF-2 によって活性化された VEGF が血管内皮前駆細胞を活性化することによっても血管新生が引き起こされ [14]、FGF-2 と VEGF は相補的に血管新生をおこなっていると推察できる。

一方、Hydrocolloid 群では、湿潤環境の維持は可能であるが、血管新生につながる増殖因子の吸収・保持が十分にできないことが、ACF-HS 群と比較して創傷治癒過程で肉芽形成厚や新生血管数に有意差が生じた大きな要因であると考えられた。

また、Hydrocolloid 群と control 群とでの間でみられた、血管新生数および肉芽形成厚の差 (図 7) は、潰瘍面の湿潤環境を保持できたかどうか、要因であると考えられた。潰瘍面が乾燥すると、誘導・活性化された増殖因子や細胞が枯渇し、創傷治癒が遅延することが知られている [47, 48]。

過去の報告でも、難治性糖尿病性皮膚潰瘍の創傷治癒促進には血管新生が

重要な要因の一つであるとされており [16, 45, 46]、創傷被覆材以外でも血管新生を促進させる方法として最近では、高圧酸素療法 (HBOT) [49] やアデノウイルスやセンダイウイルスをベクターとして VEGF を発現させる遺伝子治療 [14, 50] などの研究もおこなわれている。しかし、費用の問題や実用性、また副作用出現の可能性といった面を考慮すると、ACF-HS は皮膚潰瘍に貼付するだけであり、手技が簡便で汎用性が高く、副作用の出現性も低いことが考えられ、実際の臨床に用いる際には、非常に有用といえる。

ただし、本研究で難治性糖尿病性皮膚潰瘍モデルとして用いた *db/db* マウスの背部皮膚潰瘍は、実際の臨床現場で治療する機会の多い、難治性糖尿病性足病変 (diabetic foot ulcers; DFUs) を正確に反映しているわけではない。しかし、DFUs の難治性の原因は増殖因子の低下と血管新生能の低下が主であると報告されており [14, 16, 49]、本研究で示された ACF-HS の創傷治癒促進効果は DFUs の治療にも十分期待できる。しかも、死腔の充填による感染制御やキチン・キトサンによる抗菌活性を併せ持つことは、感染を併発しやすい DFUs に対しては、推奨されるべきであろう。

しかしながら、ACF-HS はすべての潰瘍で創傷治癒促進効果を発揮するわけではない。*db/db* マウスと同系の糖尿病を発症しないヘテロマウス (*db/+*) の背部皮膚潰瘍では、ACF-HS による創傷治癒促進効果はみられなかった

(図 3)。これは、糖尿病を発病しないヘテロマウス ( $db/+$ ) は、潰瘍面に治癒に必要な増殖因子がすでに含まれているからであると推察されるが、言い換えれば、遺伝性糖尿病マウスである  $db/db$  マウスの潰瘍面には増殖因子が少ないために、ACF-HS の効果が発揮されたのではないかと考えることもできる。ACF-HS の特徴の一つは、浸出液を吸収・保持し続けることによって、局所の湿潤環境を維持可能で、かつ TGF- $\beta$  や FGF-2 といった増殖因子を持続的に潰瘍面に作用させることであるので、すでに潰瘍面の増殖因子が必要量に達していると考えられるヘテロマウス ( $db/+$ ) では、ACF-HS の有用性は少ないと考えられる。実際に、ヘテロマウス ( $db/+$ ) に  $db/db$  マウスと同様の方法で背部皮膚潰瘍を作製し創傷治癒過程を観察したところ、ACF-HS 群、Hydrocolloid 群そして control 群すべてで潰瘍形成後 7 日目までには治癒した(図 3)。ACF-HS は難治性糖尿病性皮膚潰瘍などをはじめとする、局所の増殖因子の低下が原因にあるような難治性皮膚潰瘍には有用であるが、一般創傷においては市販のハイドロコロイド製剤との間で創傷治癒促進に有意差は生じないと考える。

ACF-HS の創傷被覆材として優れている点は、3 種の構成成分それぞれが単独でも創傷治癒促進に寄与する役割を持ち得るため、複合材とすることで多面的な効果を発揮できることである。

アルギン酸は止血作用を有し、潰瘍面の血腫形成などを抑制し、またマクロファージを刺激してさまざまなサイトカインの分泌を促す [27]。そのサイトカインにより惹起される炎症によって、マクロファージや血小板、線維芽細胞などから FGF-2 や VEGF といった増殖因子の放出が促進される [14]。

キチンは 1,4  $\beta$ -linked N-acetyl-D-glucosamine という線状ホモ重合体であり、キトサンはキチンを一部脱アセチル化した物質である [30]。キチン・キトサンは止血効果、抗菌活性などを有し、適度な吸水性も認められている [13, 15]。キチン・キトサンはアミノ基を有し正電荷に帯電する性質を持つため、抗菌活性を発揮できるといわれている [51]。また、組織工学的には細胞増殖の足場としての機能も有し [52, 53]、今回の研究では検証していないが、キチン・キトサンが血管新生、肉芽形成につながる細胞増殖の足場として機能し、創傷治癒促進の一役を担った可能性も考えられた。

フコイタンは、単糖類のフコース、尿酸、硫酸塩からなる多糖類でガゴメコンブという北海道函館市近海で採取される海藻から抽出され、適度な吸水性とわずかながらではあるが抗凝固活性を有する [33]。また、硫酸基を持つため、ヘパリン親和性増殖因子との結合能を持ち合わせており、FGF-1

や FGF-2、TGF- $\beta$ 1 などと結合し、特に FGF-2 の活性化と安定化に寄与する [32]。さらにフコイダンは創傷治癒に必要な細胞外マトリックスタンパク質の産生やその沈着促進作用を有する TGF- $\beta$ 1 の活性化にも寄与している [31, 32]。このようにフコイダンは、ACF-HS の中で浸出液の吸収、また、FGF-2 や TGF- $\beta$ 1 といったヘパリン親和性増殖因子の安定化と活性化という役割をも担っている。

これら 3 種類の構成成分のうち、アルギン酸とキチン・キトサンはそれぞれ単独で創傷被覆材としてすでに臨床応用されている [54, 55]。これらにフコイダンを加えた ACF-HS の創傷治癒促進効果の優位性については、アルギン酸、キチン・キトサンをみの配合剤と ACF-HS との比較をおこなうことで今後検証する必要があるだろう。

ACF-HS は、優れた吸水作用によって膨化し、死腔を充填可能で、キチン・キトサンの抗菌活性とともに感染制御機能を発揮し、アルギン酸の止血作用により血腫形成を抑制できる。また、適度に浸出液を吸収・保持することで潰瘍面に湿潤環境を提供でき、かつ固着しないので潰瘍面の安静を保てるのも大きな利点である。さらに、ACF-HS は炎症細胞を活性化し [34]、潰瘍面に不足している FGF-2 や VEGF などの増殖因子の分泌を促し、フコイダンはそれらを創面に保持することで、血管新生と肉芽増生を惹起し創傷治癒

が促進されるのではないかと考える。このように、それぞれの構成成分は単独でも創傷治癒促進効果を有するが、これらの特長が同時に発揮された結果、今までの創傷被覆材にはみられない多元的な創傷治癒促進作用が得られたと考える。ACF・HS は、保存的加療では治癒困難といわれているような難治性糖尿病性皮膚潰瘍に対しても、創傷治癒を促進する可能性を有した創傷被覆材であり、今後の臨床応用が期待される。

## 6. 結論

ACF-HS (ACF-HS 群) は、難治性糖尿病性皮膚潰瘍モデルとした、*db/db* マウスの背部皮膚潰瘍に対して、市販の創傷被覆材 ABSOCURE-surgical® 貼付群 (Hydrocolloid 群) および創傷被覆材なし群 (control 群) よりも創傷治癒促進効果が認められた。ACF-HS は多元的な機能を併せ持つ今までにない創傷被覆材であるといえる。

## 7. 謝辞

本研究の一部は、文部科学省（科学研究費助成事業）の交付金を利用して  
おこなった。

また、マウスの飼育や専門技術についての多大なる助言をいただいた、  
防衛医科大学校動物実験センター職員の皆様に深謝いたします。

## 8. 引用文献

- [1] Lavery LA, Armstrong DG, Wunderlich RP, Tredwell J and Boulton AJ, Diabetic foot syndrome: evaluating the prevalence and incidence of foot pathology in Mexican Americans and non-Hispanic whites from a diabetes disease management cohort, *Diabetes Care* **26** (2003), 1435–1438.
- [2] Reiber GE, The epidemiology of the diabetic foot problems, *Diabetes Med.* **13** (1996), S6–11.
- [3] Ramsey SD, Newton K, Blough D, McCulloch DK, Sandhu N, Reiber GE and Wagner EH, Incidence, outcomes, and cost of foot ulcers in patients with diabetes, *Diabetes Care* **22** (1999), 382–387.
- [4] Trautner C, Haastert B, Giani G and Berger M, Incidence of lower limb amputations and diabetes, *Diabetes Care* **19** (1996), 1006–1009.
- [5] Isaac AL and Armstrong DG, Negative pressure wound therapy and other new therapies for diabetic foot ulceration: the current state of play, *Med. Clin. North Am.* **97** (2013), 899–909.
- [6] Xiaoqiang Li, Jiaqi Liu, Yang Liu, Xiaolong Hu, Maolong Dong, Hongtao Wang and Dahai Hu, Negative pressure wound therapy accelerates rats diabetic wound by promoting agenesiis, *Int. Clin. Exp. Med.* **8** (2015), 3506–3513.

- [7] Akita S, Akino K, Imaizumi T and Hirano A, A basic fibroblast growth factor improved the quality of skin grafting in burn patients, *Burns* **31** (2005), 855–858.
- [8] Kinoshita N, Tsuda M, Hamuy R, Nakashima M, Nakamura-Kurashige T, Matsuu-Matsuyama M, Hirano A and Akita A, The usefulness of basic fibroblast growth factor for radiation-exposed tissue, *Wound Repair Regen.* **20** (2012), 91–102.
- [9] Driver VR, Hanft J, Fylling CP, Beriou JM and Autologel Diabetic Foot Ulcer Study Group, A prospective randomized controlled trial of autologous platelet-rich plasma gel for the treatment of diabetic foot, *Ostomy Wound Manage.* **52** (2006), 68–87.
- [10] Suresh DH, Suryanarayan S, Sarvajnamurthy S and Puvvadi S, Treatment of a non-healing diabetic foot ulcer with platelet-rich plasma, *J. Cutan. Aesthet. Surg.* **7** (2014), 229–231.
- [11] Tsuboi R and Rifkin D.B., Recombinant basic fibroblast growth factor stimulates wound healing in healing-impairing db/db mice, *J. Exp. Med.* **172** (1990), 245–251.
- [12] Mori T, Okumura M, Matsuura M, Ueno K, Tokura S, Okamoto Y, Minami S and Fujinaga T, Effect of chitin and its derivatives on proliferation and cytokine production of fibroblasts *in vitro*, *Biomaterials* **18** (1997), 947–951.

- [13] Ueno H, Yamada H, Tanaka I, Kaba N, Matsuura M, Okumura M, Kadosawa T and Fujinaga T, Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dog, *Biomaterials* **20** (1999), 1407–1414.
- [14] Brem H and Tomic-Canic M, Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes, *J. Clin. Invest.* **117** (2007), 1219–1222.
- [15] Peluso G, Petillo O, Ranieri M, Santin M, Ambrosio L, Galabro D, Avallone B and Balsamo G, Chitosan-mediated stimulation of macrophage function, *Biomaterials* **15** (1994), 1215–1220.
- [16] Brem H, Kodra A, Golinko MS, Entero H, Stojadinovic O, Wang VM, Sheahan CM, Weinberg AD, Woo SLC, Ehrlich HP and Tomic-Canic M, Mechanism of sustained release of vascular endothelial growth factor in accelerating experimental diabetic healing, *J. Invest. Dermatol.* **129** (2009) , 2275–2287.
- [17] Brem H, Erlich P, Tsakayannis D, Folkman J, Delay of wound healing by the angiogenesis inhibitor TNP-470, *Surgical Forum* **48** (1997), 714–716.
- [18] Folkman J, Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery?, *Nature Rev.* **6** (2007), 273–286.
- [19] Purna SK and Babu M, Collagen based dressings – a review, *Burns* **26** (2000), 54–62.

- [20] Balakrishnan B, Mohanty M, Umashankar P.R. and Jayakrishnan A, Evaluation of an *in situ* forming hydrogel wound dressing based on oxidized alginate and gelatin, *Biomaterials* **26** (2005), 6335–6342.
- [21] Ishihara M, Nakanishi K, Ono K, Sato M, Saito Y, Yura H, Matsui T, Hattori H, Uenoyama M, Kikuchi M and Kurita A, Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process, *Biomaterials* **23** (2002), 833–840.
- [22] Rumalla VK and Borah GL, Cytokines, growth factors, and plastic surgery, *Plast. Reconstr. Surg.* **108** (2001), 719–733.
- [23] Maas-Szabowski N, Hans-Jurgen S and Fusenig NE, Keratinocyte growth regeneration in defined organotypic cultures through IL-1-induced keratinocyte growth factor expression in resulting fibroblasts, *J. Invest. Dermatol.* **114** (2000), 1075–1084.
- [24] Montesano R, Vassalli JD, Baird A, Guillemin R and Orci L, Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** (1986), 7297–7301.
- [25] Nissen NN, Polverini PJ, Gamelli RL and DiPietro LA, Basic fibroblast growth factor mediates angiogenic activity in early surgical wounds, *Surgery* **119** ( 1996 ), 457–465.

- [26] Takamiya M, Saigusa K and Aoki Y, Immunohistochemical study of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor expression for age determination of cutaneous wounds, *Am. Forensic Med. Pathol.* **23** (2002), 264–267.
- [27] Thomas A, Harding KG and Moore K, Alginates from wound dressing activate human macrophages to secrete tumour necrosis factor- $\alpha$ , *Biomaterials* **21** (2000), 1797–1802.
- [28] Obara K, Ishihara M, Nakamura S, Kanatani Y, Fujita M, Hattori H, Matsui T, Takase B, Ozeki Y, Saito Y, Yura H, Kikuchi M and Maehara T, Acceleration of wound healing in healing-impaired db/db mice with a photocrosslinkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2, *Wound. Rep. Reg.* **13** (2005), 390–397.
- [29] Obara K, Ishihara M, Ishizuka T, Fujita M, Ozeki Y, Maehara T, Saito Y, Yura H, Matsui T, Hattori H, Kikuchi M and Kurita A, Photocrosslinkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2 stimulates wound healing in healing-impaired db/db mice, *Biomaterials* **24** (2003), 3437–3444.
- [30] Muzzarelli RAA, Biochemical significance of exogenous chitins and chitosans in animals and patients, *Carbohydr. Polym.* **20** (1993), 7–16.

- [31] Kim BS, Park JY, Kang HJ, Kim HJ and Lee J, Fucoidan/FGF-2 induces angiogenesis through JNK-and p38-mediated activation of AKT/MMP-2 signaling, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **450** (2014), 1333–1338.
- [32] Leary RO, Rerek M and Wood EJ, Fucoidan modulates the effect of transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 on fibroblast proliferation and wound repopulation *in vitro* models of dermal wound repair, *Biol. Pharm. Bull.* **27** (2004), 266–270.
- [33] Nishide E, Anzai HN and Uchida A, A comparative investigation on the contents of fucose-containing polysaccharides from various Japanese brown algae, *Nippon Suisan Gakkaishi* **53** (1987), 1083–1088.
- [34] Murakami K, Ishihara M, Aoki H, Nakamura S-I, Nakamura S, Yanagibayashi S, Takikawa M, Kishimoto S, Yokoe H, Kiyosawa T and Sato Y, Enhanced healing of mitomycin C-treated healing-impaired wound in rats with hydro-sheets composed of chitin/chitosan, fucoidan, and alginate as wound dressings, *Wound Rep. Reg.* **18** (2010), 478–485.
- [35] Nakamura S, Nambu M, Ishikawa T, Hattori H, Kanatani Y, Takase B, Kishimoto S, Amano Y, Aoki H, Kiyosawa T, Ishihara M and Maehara T, Effect of controlled release of fibroblast growth factor-2 from chitosan/fucoidan micro complex-hydrogel on *in vitro* and *in vivo* vascularization, *J. Biomed. Mater. Res. A.* **85** (2008), 619-627.

[36] 「日本チャールス・リバー (株) 研究分野別ジャクソン研究所マウスの紹介」

<http://jaxmice.jax.org/diabetes/index.html> (2015. 7. 1.)

[37] 「日本クレア株式会社 2型糖尿病モデルマウス」

[http://www.clea-japan.com./animalpege/a\\_1/b\\_3.html](http://www.clea-japan.com./animalpege/a_1/b_3.html) (2015. 7. 1.)

[38] Hummel KP, Dicki MM and Coleman DL, Diabetes, a new mutation in the mouse,

*Science* **153** (1966), 1127–1128.

[39] Lee P-Y, Chesnoy S, and Huang L, Electroporatic delivery of TGF-1b1 gene works synergistically with electric therapy to enhance diabetic wound healing in db/db mice, *J.*

*Invest. Dermatol.* **123** (2004), 791–798.

[40] Sullivan S, Underwood R, Gibran N, Siqle RO, Usui ML, Carter WG and Olerud JE, Validation of a model for the study of multiple wounds in the diabetic mouse

(db/db), *Plast. Reconstr. Surg.* **113** (2004), 953–960.

[41] Galiano R, Tepper O, Pelo C, Bhatt KA, Callaghan M, Bastidas N, Bunting S, Steinmetz HG and Gurtner GC, Topical vascular endothelial growth factor accelerates

diabetic wound healing through increased angiogenesis and by mobilizing and recruiting bone marrow-derived cells, *Am. J. Pathol.* **164** (2004), 1935–1947.

- [42] Grunstein J, Masvad JJ, Hickey R, Giordano F and Johnson RS, Isoforms of vascular endothelial growth factor act in a coordinate fashion to recruit and expand tumor vasculature, *Mol. Cell. Biol.* **20** (2000), 7282-7291.
- [43] Xing CG, Zhu BS, Fan XQ, Liu HH, Hou X, Zhao K and Qin ZH, Effects of LY294002 on the invasiveness of human gastric cancer *in vivo* in nude mice, *World J. Gastroenterol.* **15** (2009), 5044-5052.
- [44] Mori T, Murakami M, Okumura M, Kadosawa T, Uede T and Fujinaga T, Mechanism of macrophage activation by chitin derivatives, *J. Vet. Med. Sci.* **67** (2005), 51-56.
- [45] Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP and Brem H, The role of vascular endothelial growth factor in wound healing, *J. Surg. Res.* **153** (2009), 347–358.
- [46] Tsutsumi N, Yonemitsu Y, Shikada Y, Onimaru M, Tanii M, Okano S, Kaneko K, Hasegawa M, Hashizume M, Maehara Y and Sueishi K, Essential role of PDGFR  $\alpha$ -p70S6K signaling in mesenchymal cells during therapeutic and tumor angiogenesis *in vivo*: role of PDGFR  $\alpha$  during angiogenesis, *Circ. Res.* **94** (2004), 1186–1194.

- [47] Svensjo T, Pomahac B, Yao F, Slama J and Eriksson E, Accelerated healing of full-thickness skin wounds in a wet environment, *Plast. Reconstr. Surg.* **106** (2000), 602–614.
- [48] Hackl F, Kiwanuka E, Philip J, Gerner P, Aflaki P, Diaz-Siso JR, Sisk G, Caterson EJ, Junker JP and Eriksson E, Moist dressing coverage supports proliferation and migration of transplanted skin micrografts in full-thickness porcine wounds, *Burns* **40** (2014), 247–280.
- [49] Stoekenbroek RM, Santema TB, Legemate DA, Ubbink DT, van den Brink A and Koelemay MJW, Hyperbaric oxygen for the treatment of diabetic foot ulcers: A systematic review, *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* **47** (2014), 647–655.
- [50] Masaki I, Yonemitsu Y, Komori K, Ueno H, Nakashima Y, Nakagawa K, Fukumura M, Kato A, Hasan MK, Nagai Y, Sugimachi K, Hasegawa M and Sueishi K, Recombinant Sendai virus-mediated gene transfer to vasculature: a new class of efficient gene transfer vector to the vascular system, *FASEB J.* **15** (2001), 1294–1296.
- [51] Dutta J, Tripathi S and Dutta PK, Progress in antimicrobial activities of chitin, chitosan and its oligosaccharides: A systematic study needs for food application, *Food Sci. Technol. Int.* **18** (2012), 20-31.

- [52] Kamarul T, Krishnamurthy G, Salih ND, Ibrahim NS, Raghavendran HR, Suhaeb AR and Choon DS, Biocompatibility and toxicity of poly (vinyl alcohol) /N, O-carboxyethyl chitosan scaffold, *Scientific World J.* **2014** (2014), 905103.
- [53] Dinescu S, Ionita M, Pandele AM, Galateanu B, Iovu H, Ardelean A, Costache M and Hermenean A, Invitro cytocompatibility evaluation of chitosan/graphene oxide 3D scaffold composites designed for bone tissue engineering, *Biomed. Mater. Eng.* **24** (2014), 2249–2256.
- [54] Ding X, Shi L, Liu C and Sun B, A randomized comparison study of Aquacel Ag and alginate silver as skin graft donor site dressings, *Burns* **39** (2013) 1547-1550.
- [55] Martin FT, O’Sullivan JB, Regan PJ, McCann J and Kelly JL, Hydrocolloid dressing in pediatric burns may decrease operative intervention rates, *J. Pediatr. Surg.* **45** (2010), 600-605.

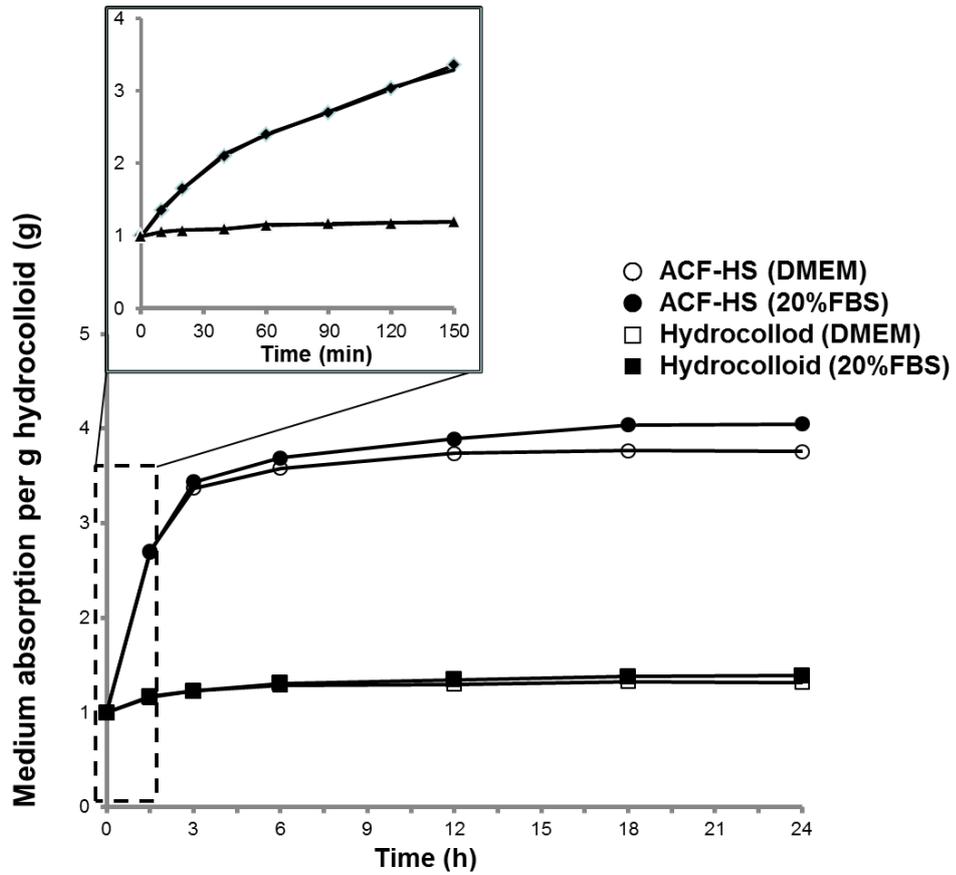


図 1

ACF-HSおよびHydrocolloid(ASOCURE-surgical®)の液体培地の吸収量について： 重さ1gのACF-HSのDMEMに対する吸収量(○)、DMEM+20%FBSに対する吸収量(●)、および1gのHydrocolloidのDMEMに対する吸収量(□)、DMEM+20%FBSに対する吸収量(■)を経時的に測定した。Hydrocolloidは、液体培地をほとんど吸収することはなかったが、ACF-HSは18時間にわたって持続的に自重のおよそ3倍の液体培地を吸収した。

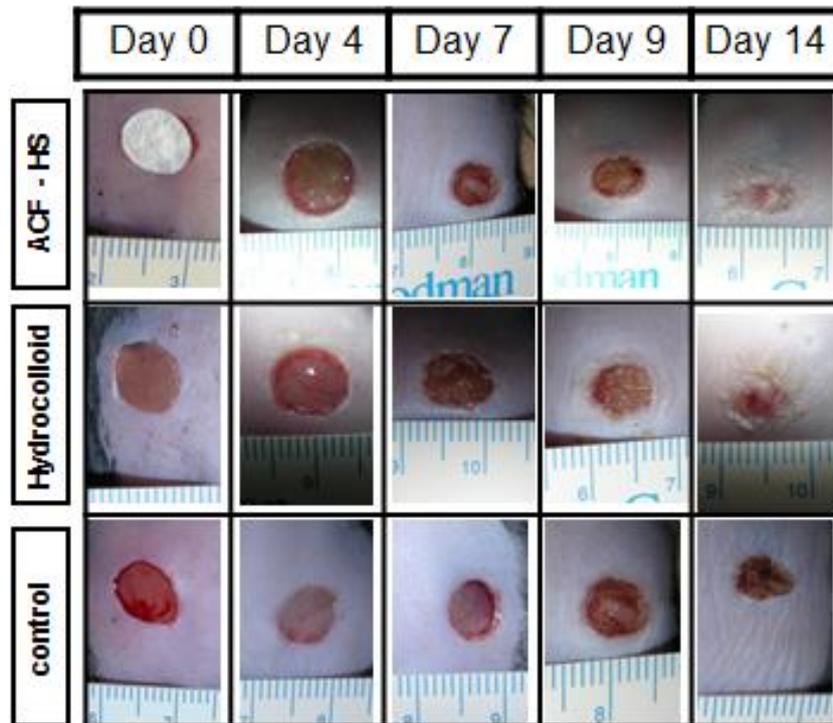


図2

ACF-HS群、Hydrocolloid群およびcontrol群の遺伝性糖尿病マウス(*db/db mouse*)の背部皮膚潰瘍の経時的変化。4日目まではそれぞれの創収縮に差はみられないが、4日目以降はACF-HS群、Hydrocolloid群、control群の順に創収縮が進んでいった。

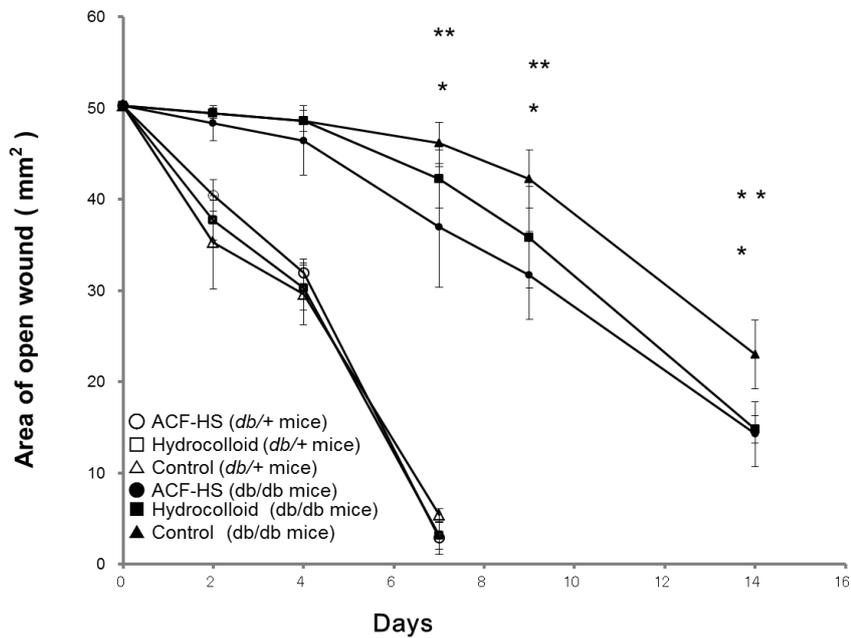
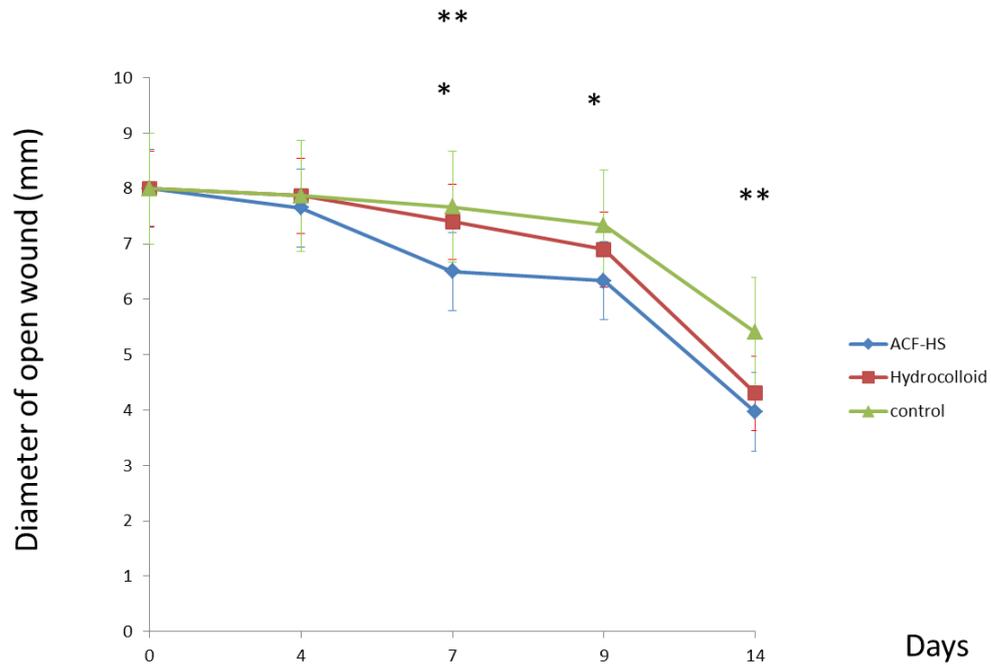


図3

遺伝性糖尿病マウス $db/db$ (黒色記号)およびヘテロマウス $db/+$ (白ぬき記号)の創収縮の経過。皮膚潰瘍形成後4, 7, 9, 14日目の潰瘍面積を計測した。7日目、9日目で、ACF-HS群は、Hydrocolloid群に対してもcontrol群に対しても有意に創収縮がみられた。14日目はACF-HS群とHydrocolloid群間には有意差はなく、control群に対して有意差を認めた。一方、 $db/+$ では3群とも7日目には創閉鎖が完了した。

ACF-HS(●,○)、Hydrocolloid(■,□)、control(▲,△)

(Data represent the mean  $\pm$  SD of six determinations. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , Steel Dwass test)



\* P < 0.05, \*\*P < 0.01

図 4

遺伝性糖尿病マウス *db/db* マウス背部皮膚潰瘍の直径(長径)の経時的変化。面積と同様に 4 日目までは 3 群間に有意差はなかった。7 日目は ACF-HS 群は Hydrocolloid 群、control 群に対してそれぞれ有意差あり。9 日目は control 群に対して有意差あり。14 日目は ACF-HS 群と Hydrocolloid 群間には有意差がなかったが、ACF-HS 群と control 群間には有意差が認められた。(Data represent the mean  $\pm$  SD of six determinations.

\*P<0.05, \*\*P<0.01, Steel Dwass test)



図 5

4 日目の糖尿病性皮膚潰瘍の裏面像。ACF-HS を貼付した皮膚潰瘍の周囲には毛細血管の増生がみられ、対側(control)から ACF-HS を貼付した皮膚潰瘍に向かって血管が新生している様子が観察できた(白矢印)。

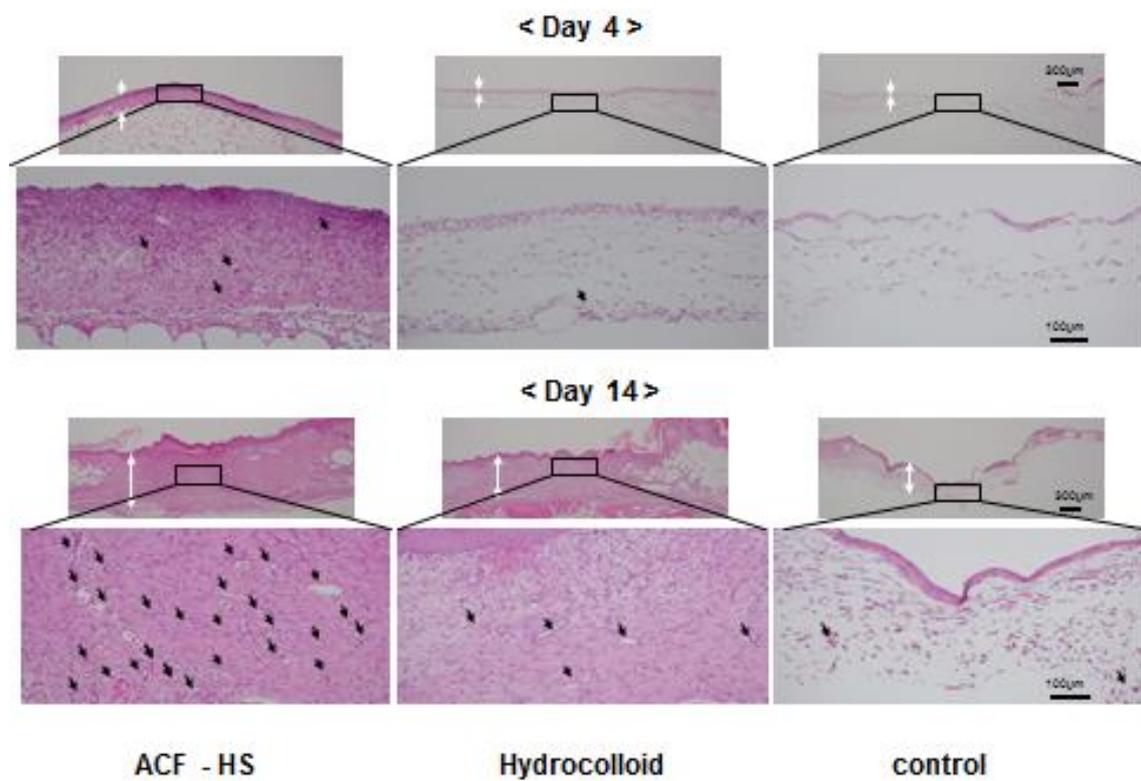


図6

それぞれの被覆材貼付後4日目および14日目のHE染色像。白矢印(⇔)は肉芽の厚さ、黒(➔)は赤血球を含んだ血管の断面を示す。

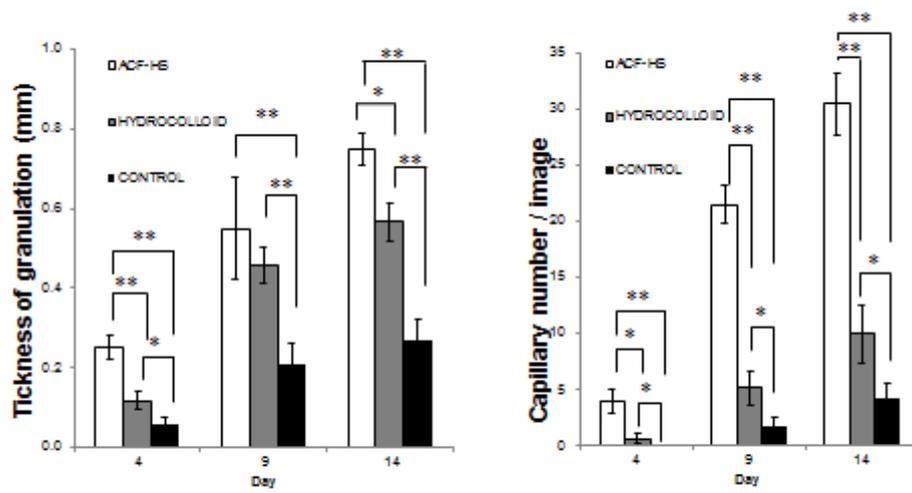
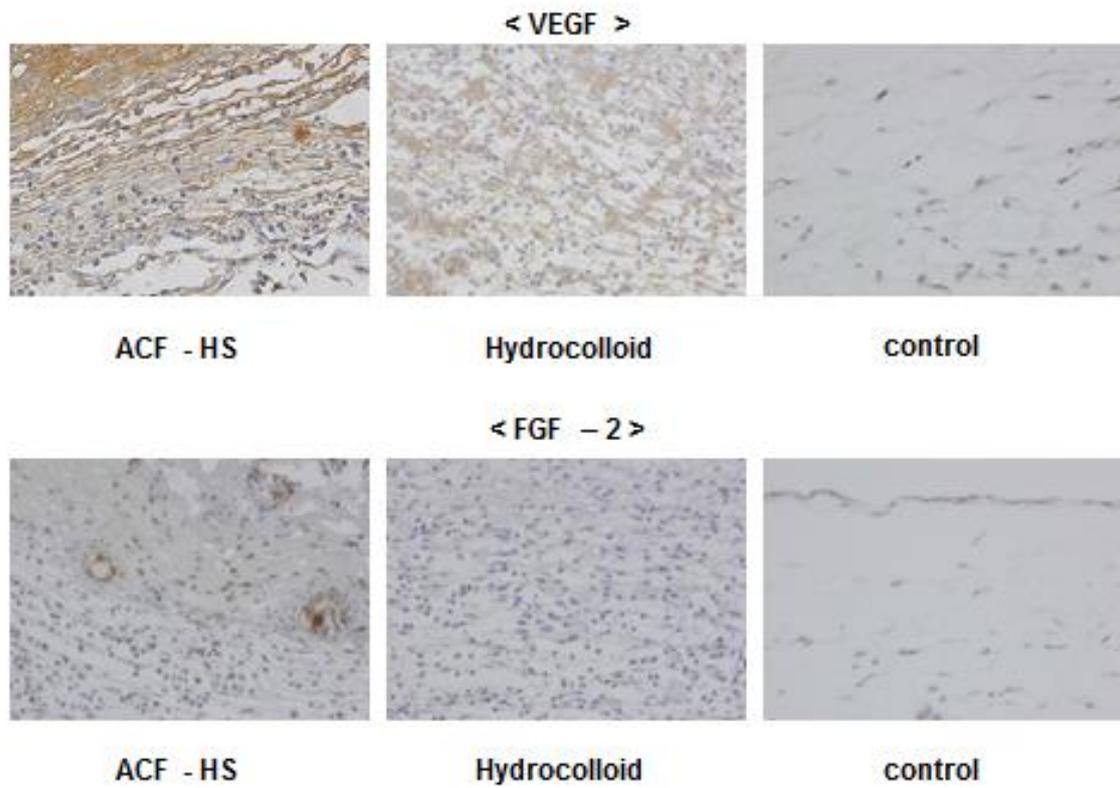


図7

肉芽形成および血管新生についての比較。形成された肉芽の厚さは4日目、14日目ではACF-HS群がHydrocolloid群、control群に対して有意差をもって優れていた。9日目はcontrol群に対してのみ有意差がみられた。血管新生数は4日目、9日目、14日目すべてでACF-HS群はHydrocolloid群、control群に対して有意差をもって多かった。(Data represent the mean  $\pm$  SD of six determinations. \*P<0.05, \*\*P<0.01, *post-hoc* Turkey's test)



**図8**

VEGFおよびFGF-2に対する免疫組織学的染色。4日目のACF-HS、Hydrocolloid、control群それぞれの免疫組織学的染色をおこなった。正確な判定は困難ではあったが、VEGF様シグナルはACF-HSでの血管周囲での発現が多くみられ、Hydrocolloidではそれは数か所にとどまり、controlではほとんど検出できない。FGF-2でも同様の傾向がみられた。