

ラット虚血性創傷モデルを用いたヒト羊膜の  
血管新生促進作用と創傷治癒促進効果の検討

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

外科病態学講座消化器外科学分野

佐藤 将人

## 目次

1. 要約.....	3
2. 研究背景.....	7
3. 研究目的.....	9
4. 研究内容.....	10
5. 研究結果.....	18
6. 考察.....	24
7. 結論.....	34
8. 謝辞.....	35
9. 文献.....	36
10. 図の説明.....	39
11. 図.....	44

## 1. 要約

【背景】末梢動脈疾患 (Peripheral Arterial Disease; PAD)による潰瘍や壊死などの虚血性創傷に対する治療には、血行再建を行った上での創傷処置が必要である。しかし、全身状態不良などの理由により血行再建が不可能な場合、創傷治癒が得られず下肢切断になることも多い。よって、血流が低下しても局所の血管新生を促進することで創傷治癒促進効果をもたらす創傷被覆材が存在すれば非常に有用である。

今回我々は、再生医療分野で様々な用途として臨床応用されるヒト羊膜に注目した。ヒト羊膜は摘出胎盤から容易に分離・採取可能で、羊膜上皮細胞から放出されるサイトカインによる血管新生、上皮化促進、抗炎症作用を有しており、創傷治癒促進効果が期待される。実際に、眼科領域では難治性角結膜疾患に対する羊膜移植がすでに臨床応用され、保険収載されている。さらに、羊膜は免疫原性が低いという特徴があり、創傷被覆剤や移植に適しているといえる。

そこで我々は、ヒト羊膜が虚血性創傷に対して血管新生促進効果を有する創傷被覆剤になり得るといふ仮説の下、ラット虚血性創傷モデルを用いてこれまでに報告のない「ラット虚血性創傷モデルを用いたヒト羊膜の血管新生促進作用と創傷治癒促進効果」を検討した。

【目的】本研究の目的は、ヒト羊膜が有する血管新生促進作用を応用し、PADに生じる虚血性創傷に対してヒト羊膜が新しい創傷被覆剤になりうる可能性を検討することである。具体的には、羊膜貼付群と非羊膜貼付群を比較して、創傷治癒促進効果、血管新生促進効果、ならびに新鮮羊膜と凍結羊膜の創傷被覆剤としての効果の違いを

明らかにすることである。

【方法】全身麻酔下に腹部に作製した虚血創のうち、一方をヒト羊膜を貼付した羊膜貼付群、他方を非羊膜貼付群とした。羊膜貼付群と非羊膜貼付群で、創面積の創傷治癒効果、MVD (microvessel density) による血管新生促進効果を評価した。また、免疫組織化学染色により拒絶反応の有無、ELISA により IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 1、IGF-1 の 6 種類について局所のサイトカイン量を比較検討した。

【結果】①新鮮羊膜の効果の検討；評価 5 日目における創面積は、新鮮羊膜貼付群で平均値 335.4mm<sup>2</sup> (260–450mm<sup>2</sup>)、非羊膜貼付群で平均値 459mm<sup>2</sup> (306–570mm<sup>2</sup>) と、創傷治癒効果は新鮮羊膜貼付群で有意に良好であった ( $p = 0.0051$ )。MVD は、新鮮羊膜貼付群で平均値 19.0 (10.4–24.6)、非羊膜貼付群で平均値 15.1 (10.6–20.8) であり、新鮮羊膜貼付群で有意に高い血管新生を認めた ( $p = 0.0026$ )。

②凍結羊膜の効果の検討；凍結羊膜貼付群と非羊膜貼付群における創面積は、観察期間 7 日間いずれにおいても有意な差は認められず、評価 7 日目における創面積は、凍結羊膜貼付群で平均値 291.3mm<sup>2</sup> (162–416mm<sup>2</sup>)、非羊膜貼付群で平均値 235.5mm<sup>2</sup> (176–391mm<sup>2</sup>) と、統計学的有意差はないものの凍結羊膜貼付群で創傷治癒がやや遅延するという結果であった ( $p = 0.26$ )。評価 7 日目における MVD は、凍結羊膜貼付群で平均値 21.1 (19.2–23.0)、非羊膜貼付群で平均値 16.4 (14.4–17.8) と、凍結羊膜貼付群で有意に良好な血管新生を認めた ( $p = 0.005$ )。

③羊膜貼付による拒絶反応・炎症反応の解析；抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、ならびに

抗 CD68 抗体を用いた免疫組織化学染色では、非羊膜貼付群と比較して、新鮮羊膜貼付群と凍結羊膜貼付群のいずれの場合もリンパ球の浸潤、マクロファージの浸潤を認めず、拒絶反応を示唆する所見は認めなかった。ELISA による局所サイトカイン量の比較では、新鮮羊膜貼付群と凍結羊膜貼付群いずれにおいても、非羊膜貼付群と比較し本研究で測定した 6 種類全てのサイトカインの量に差を認めなかった。

【考察】新鮮ヒト羊膜を創傷被覆剤として使用した際、血管新生のマーカーである MVD が有意に高く、ヒト羊膜の貼付により血管新生が促進されることが示唆された。また、虚血創の創傷治癒促進効果は非羊膜貼付群よりも新鮮羊膜貼付群で有意に高かった。これらの結果から、新鮮ヒト羊膜は虚血性創傷に対する有用な創傷被覆材になり得ることが示唆された。しかし、臨床的にヒト羊膜を使用することを考慮すると、新鮮羊膜の使用は帝王切開の予定に依存すること、羊膜の変性の問題から採取後に使用できる時間が限られること、そして、貯蓄が困難なことなど、汎用性の点で問題がある。そこで、これらの問題点を改善するために凍結ヒト羊膜の使用を考慮した。凍結ヒト羊膜を創傷被覆剤として使用した際、MVD は新鮮羊膜と同様に非羊膜貼付群と比較し有意に高く、血管新生促進効果が示された。一方で、有意差はないものの、創傷治癒に関しては凍結羊膜貼付群が非羊膜貼付群よりも劣るという結果であった。その原因として、まず凍結羊膜の貼付により拒絶反応が惹起された可能性を考慮し検証を行ったが、新鮮羊膜、凍結羊膜いずれを貼付した場合においてもリンパ球やマクロファージの浸潤を認めず、ヒト羊膜への拒絶反応は惹起されていないと考えられる

結果であった。続いて、凍結・解凍操作により羊膜の最表層に一直列に並ぶ羊膜上皮細胞が死滅することが報告されており、羊膜上皮細胞から放出される炎症を制御するサイトカインや創傷治癒を促進するサイトカインの減少が結果に影響した可能性を考えた。そこで、局所のサイトカイン量を新鮮羊膜貼付群と凍結羊膜貼付群で、それぞれ非羊膜貼付群と比較したが、本研究で測定した6種類全てのサイトカイン量で差異は認められなかった。本研究では、創傷治癒促進効果に関しては新鮮ヒト羊膜に限られるという結果であったため、現時点において虚血性創傷に対する創傷被覆材として臨床応用するためには新鮮ヒト羊膜を使用する、もしくは、創傷治癒促進効果を新鮮ヒト羊膜と同等に維持するための凍結・解凍法の確立が必要であると考えられる。

**【結論】** ヒト羊膜を創傷被覆剤として用いることで、虚血性創傷においても血管新生が促進され、創傷治癒を改善し得ることが示された。ヒト羊膜は虚血性創傷に対する新たな創傷被覆剤の一つとして有用である可能性が示唆された。

## 2. 研究背景

末梢動脈疾患(peripheral arterial disease; PAD) は、リスクファクターとして加齢や喫煙、糖尿病などが挙げられ、世界中で 200 万人以上の罹患患者数が推定されている<sup>1-3</sup>。PAD は足関節上腕血圧比 (ankle brachial index; ABI) が 0.9 未満であることで診断される<sup>4</sup>。さらに、PAD の中でも、下肢虚血、組織欠損、神経障害、感染といった肢切断リスクを持ち、治療介入が必要な重症例を包括的高度慢性下肢虚血 (chronic limb-threatening ischemia; CLTI) と総称する。CLTI は、ABI<0.9 に加えて、安静時疼痛があり、組織欠損 (Wound)、虚血 (Ischemia)、足部感染 (foot Infection) の 3 要素で評価する Wifi 分類で grade3 の虚血を認める状態や 2 週間以上治癒しない潰瘍がある状態、壊死を認める状態の際に診断される<sup>5,6</sup>。CLTI の症例では、足病変として潰瘍や壊死などの虚血性創傷を呈する頻度が多い<sup>7</sup>。CLTI による潰瘍・壊死などの慢性虚血性創傷は創処置だけでは通常治癒に至らず、バイパス手術や血管内治療などの血行再建を必要とすることが多い。しかし、虚血性創傷を発症する患者には、高齢者や透析患者など全身状態や血管の性状が不良な患者も多く<sup>8</sup>、血行再建術の施行が困難であることも多い<sup>9,10</sup>。血行再建不能例では 1 年後に 8%しか創の改善が得られず約 30%で下肢切断が必要となると報告されている<sup>11</sup>。血行再建後も創部に十分な血流増加が得られず、複数回の手術や創処置が必要となり、創治癒に数ヶ月を要することも多く、治療中に日常生活動作 (activities of daily living ; ADL) が低下することも多い<sup>12</sup>。CLTI 症例の 5 年生存率は急性四肢虚血 (acute limb ischemia; ALI) と同等で 60%程度であるとされている<sup>13</sup>。そのため、血流の低下が

あっても局所の血管新生を促し、創傷治癒を促進する創傷被覆材が存在すれば、低侵襲な創処置のみで慢性虚血性創傷の治癒が期待でき、社会的にも非常に有用である。

そこで、今回われわれが注目したのは、胎盤の最内層を覆う羊膜である。胎生期、胎児は羊水とともに卵膜に包まれた状態で胎生する。胎盤にある卵膜は羊膜、絨毛膜、脱落膜で構成されており、羊膜は卵膜でもっとも胎児側に存在する膜組織である。羊膜は、敷石状に一系列に並ぶ羊膜上皮細胞とその外側に位置するにラミニンやIV型コラーゲンよりなる基底膜、そして絨毛膜との境界に位置する間質層で構成される<sup>14</sup>。羊膜は、platelet derived growth factor(PDGF)、basic fibroblast growth factor (bFGF)、epidermal growth factor (EGF)、vascular endothelial growth factor (VEGF)などのgrowth factor を含み、線維芽細胞の増加、間葉系幹細胞の動員、上皮化、血管新生などを促進する<sup>15-17</sup>。また、角化細胞や線維芽細胞が分化したり接着したりするための足場となる<sup>18</sup>。さらに、抗感染性を有し感染の危険性を低下させるだけでなく、抗菌性ペプチドである beta3-defensin を発現し<sup>19</sup>、major histocompatibility complex (MHC) class I の発現が弱く、MHC class II の発現がないことから免疫寛容能を有する<sup>14</sup>。その他、羊膜上皮細胞は高い多分化能を有する他、ラミニンなどの細胞外マトリックスが上皮化を促進し<sup>20</sup>、Transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and 2, Interleukin (IL) -1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL1, Insulin-like growth factor (IGF) -1 IGF など 50 以上のサイトカインやケモカインにより抗炎症・組織リモデリング作用などによって創傷治癒を促進する<sup>21-23</sup>。このよ



うに、これまで熱傷や皮膚欠損など血流障害のない非虚血性創傷での羊膜の血管新生と創傷治癒効果の有効性が複数報告されてきた<sup>24-26</sup>。また、本邦では2021年6月に凍結乾燥羊膜のEpiFix®が糖尿病性足潰瘍やII度熱傷などの非虚血性の難治性潰瘍の創傷被覆剤として保険収載された。これまでに虚血性創傷における羊膜の有効性は報告されておらず、上述したその特長から虚血性創傷においても有効である可能性が高いと考えられる。

### 3. 研究目的

本研究の目的は、ヒト羊膜が有する血管新生促進作用を応用し、PADに生じる虚血性創傷に対して、ヒト羊膜が新しい創傷被覆剤になる可能性を検証することである。具体的には、第一に、羊膜貼付群と非羊膜貼付群を比較して、創傷治癒促進効果を明らかにすることである。第二に、血管新生促進効果を明らかにすることである。

## 4. 研究内容

### I. 倫理的事項

本研究は東北大学大学院医学系研究科倫理委員会にて承認を得た研究である〔受付番号：2020-1-220〕。また、動物実験は東北大学動物実験専門委員会の承認を得て行った〔受付番号：2020 医動-102-1〕。

### II. 研究方法

#### (1) 羊膜採取

ヒト羊膜の採取を行うにあたり、東北大学大学院医学系研究科倫理委員会にて承認を得た〔受付番号：2020-1-220〕。羊膜は、東北大学病院産科で待機的帝王切開を受ける妊婦に対し、文書で同意を得て採取を行った。B 型肝炎ウイルス (hepatitis B virus; HBV)、C 型肝炎ウイルス (hepatitis C virus; HCV)、ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus; HIV)、梅毒といった血液感染症を有する妊婦は羊膜採取の対象から除外した。羊膜の採取は東北大学病院手術室にて、帝王切開による分娩後に摘出された胎盤から無菌操作で採取した。摘出された胎盤は、まず臍帯から血液が流出しないようにコッヘル鉗子で把持した状態で臍帯を切離し、胎盤の羊膜側に付着した血液は生理食塩水を用いて可及的に除去した。羊膜は胎盤の胎児側を構成する薄い膜組織であるが、その直下の絨毛膜を損傷しないように羊膜のみを鑷子で把持し、剪刀で割を入れた。割を入れた部分から剪刀を適宜使用し、羊膜を絨毛膜から剥離するようにして約 3cm の正方形大に採取した。採取した羊膜は生理食塩水の

中に入れて洗浄した。新鮮羊膜として使用する際は、採取後に氷上に静置のうえ 6 時間以内を使用した。採取した羊膜を凍結保存する際は、東北大学病院臨床研究推進センター (CRIETO) 再生医療ユニットの協力体制の下に以下の工程で保存した。採取した羊膜を、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline; 以下 PBS) 1 mL を添加したクライオチューブに入れた。クライオチューブは CoolCell® (コーニング社、コーニング、ニューヨーク州、アメリカ合衆国) に入れて -80 °C のフリーザーに 90 分以上静置のうえ、凍結保存した。凍結保存した羊膜を使用する際には、37 °C、1 分で解凍し、氷上に静置した状態で 6 時間以内に使用した。

## (2) ラット虚血性創傷モデルの作製

雄性ラット (Jcl:SD、生後 9 週、体重 300-350g) を使用し、全身麻酔下に以下の処置を行った。全身麻酔として吸入麻酔薬のイソフルラン (イソフルラン®吸入麻酔液、MSD アニマルヘルス株式会社、東京、日本) を使用、麻酔器はオールインワン小動物用麻酔器 (室町機械株式会社、東京、日本) を使用し麻酔の導入および維持を行った。安楽死の方法として、全身麻酔維持下に開腹開胸の状態では放血を行い、直視下に呼吸停止及び心停止を確認した。

Hofmann らが発表したラット虚血性創傷モデル<sup>27</sup>を参考にし、使用するラットモデルを構築した。解剖学的に下腹壁動静脈は大腿動静脈からそれぞれ分岐し、腹部の

表皮や真皮、皮下組織を含む皮膚や腹筋群を栄養する<sup>28</sup>。このモデルでは、下腹壁動脈・神経束を切離することで動脈血流と神経系を遮断し、腹部に表皮や真皮、皮下組織を含む皮膚と腹直筋群の筋膜で形成する皮弁を形成することで実臨床での虚血性創傷に近い状態にすることが可能である。以下にラット虚血性創傷モデルの作製の工程を示す。ラットの左右の鼠径部を切開し、両側の下腹壁動脈・神経束を結紮切離した（図 1a）。鼠径部を閉創後、3 辺の皮膚を切開し、腹部に縦 8cm×横 6cm の表皮や真皮、皮下組織を含む皮膚と筋膜を含む皮弁を作成した（図 1b）。皮弁作成後に皮弁は元の状態に縫合し、皮弁の腹部左右の皮膚全層を筋膜も含めて径 2.0cm で切除し虚血創を形成した。片側の創部に新鮮ヒト羊膜または凍結ヒト羊膜を貼付し、辺縁の 4 箇所を固定した（図 1c）。反対側には羊膜を貼付しなかった。両側の創の湿潤環境を保つために、脱脂綿で両側の虚血創をそれぞれ覆い、その上にガーゼで両側の創部全体が被覆されるように腹部に覆い、脱脂綿とガーゼがずれないように腹部を弾性包帯を適度に巻きつけて固定糸で固定した（図 1d）。新鮮ヒト羊膜の有効性を検討した際には、連日にわたって虚血創の創面積を計測し、術後 5 日目に適切な方法で安楽死させた。凍結ヒト羊膜の有効性を検討した際には、術後 3 日目に凍結ヒト羊膜を新たな凍結ヒト羊膜に交換のうえ、連日にわたって虚血創の創面積を計測し、術後 7 日目に適切な方法で安楽死させた。新鮮ヒト羊膜の有効性の評価を行った際は、ラット 12 匹、24 か所の虚血創を作成した。同じ個体の片側の虚血創に新鮮ヒト羊膜を貼付した。凍結ヒト羊膜の有効性の評価を行った際は、ラット 6 匹、12 か所の虚血

創を作成した。新鮮ヒト羊膜を貼付した時と同様に、同じ個体の片側の虚血創に凍結ヒト羊膜を貼付した。

なお、新鮮ヒト羊膜を貼付した際には、5日間ヒト羊膜を交換しなかったことに対して、凍結ヒト羊膜を貼付した際には、3日ごとに交換した。これは、新鮮ヒト羊膜を使用した際に、5日目でヒト羊膜が乾燥を来し始めたためである。新鮮ヒト羊膜は待機的帝王切開術において娩出された胎盤から羊膜を採取し、6時間以内に速やかに使用するため、常に採取することができないことから5日間同一の新鮮ヒト羊膜の貼付を継続した。一方で、凍結ヒト羊膜は、採取後に冷凍保存することで貯蔵することが可能であることから、乾燥した状態を防ぐことを目的に3日ごとに交換した。また、連日の創部の観察時には、創部から弾性包帯やガーゼ、脱脂綿を創傷治癒に影響のないよう愛護的に都度除去したうえで創部の観察を行い、観察終了後に再度脱脂綿で虚血創をそれぞれ覆い、その上からガーゼで両側の虚血創を覆った上で、弾性包帯を適度に腹部に巻きつけ固定糸で固定した。

### (3) 創傷治癒効果の有効性の評価

創面積は、ラットの頭尾側方向を長径、頭尾側方向と直行する方向を短径として、長径と短径の積を創面積と定義する(図2)。連日にわたり創面積を計測し、羊膜貼付群と非羊膜貼付群で創傷治癒の程度を比較した。

#### (5) 血管新生促進効果の病理学的評価

創周囲皮膚と筋肉を含む創全体を摘出し、羊膜貼付群と非羊膜貼付群で病理学的評価を行った。摘出した標本は 10%リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定する。血管新生促進効果を評価する指標として **microvessel density (MVD)** を用いた。MVD は光学顕微鏡の 40 倍の低倍率で染色されている血管密度の高い部位を 5 視野検索し、400 倍の高倍率の 1 視野あたりの血管数を測定し、平均値を算定した指標である。MVD は腫瘍領域での血管新生の指標として用いられる<sup>29,30</sup>。MVD の測定にあたり抗  $\alpha$ -SMA 抗体と抗 CD34 抗体の二重染色により 1 視野あたりの血管数を測定し、羊膜貼付群と非羊膜貼付群で血管数の密度を比較検討した (図 3)。なお、MVD の測定にあたっては、筋層上部の肉芽において、1 つの検体につき血管密度の高い部位を無作為に 5 視野抽出し 1 人の計測者により測定した。

免疫組織化学染色として、抗 CD34 抗体 (abcam、ケンブリッジ、イギリス)、抗  $\alpha$ -SMA 抗体 (Agilent、カリフォルニア州、アメリカ合衆国) によりプレパラートを作成し、光学顕微鏡 (システム生物顕微鏡 BX53、オリンパス株式会社、東京、日本) で病理学的評価を行う。なお、光学顕微鏡を用いて血管数の測定等を行うために、イメージングソフトウェア cellSens™ Standard (オリンパス株式会社、東京、日本) を使用した。

#### (4) 拒絶反応に関する病理学的評価

ヒト羊膜をラットの虚血創に貼付することで拒絶反応が生じうる可能性を考慮し、抗 CD4 抗体と抗 CD8 抗体、抗 CD68 抗体を使用した免疫組織化学染色により、羊膜貼付群と非羊膜貼付群でリンパ球およびマクロファージの浸潤の程度を比較した。

免疫組織化学染色として、ヘマトキシリン・エオジン染色、および免疫組織化学染色として抗 CD4 抗体 (abcam、ケンブリッジ、イギリス)、抗 CD8 抗体 (abcam、ケンブリッジ、イギリス)、抗 CD68 抗体 (abcam、ケンブリッジ、イギリス) によりプレパラートを作成し、光学顕微鏡 (システム生物顕微鏡 BX53、オリンパス株式会社、東京、日本) で病理学的評価を行った。

#### (6) ELISA による局所サイトカイン量の評価

摘出標本を 4% パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde; PFA) で固定し、10% スクロース液、15% スクロース液、20% スクロース液にそれぞれ 1 時間段階的に浸透した後、O.C.T.Compound (フナコシ株式会社、東京、日本) を注いだ容器を液体窒素に浮かべて凍結した後、-80 °C のフリーザーで凍結保存した。この凍結保存した標本 1g あたりに、滅菌水 : RIPA バッファー (10 倍濃縮) (ナカライテスク株式会社、京都、日本) : 1% SDS (ナカライテスク株式会社、京都、日本) を 8 : 1 : 1 の割合で混合した溶液を 3ml 添加する。氷冷した状態で、ポリトロンホモジナイザー Model PT-MR10-35GT (和研薬株式会社、京都、日本) で組織を破碎し、氷上で 1 時間放置し、遠心分離 (4°C、10,000xg) を 10 分間行った後に上清を回収し、総タンパク質抽

出液とした。この抽出液を用いて、炎症性・抗炎症性サイトカインに対する ELISA を行い、局所のサイトカイン量を比較して抗炎症効果を検討した。炎症性サイトカインとして、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  を、抗炎症サイトカインとして、IL-10、TGF- $\beta$  1 を、創傷治癒を促進するサイトカインとして IGF-1 を測定した。IL-1 $\beta$  はリンパ球やマクロファージの浸潤や細胞死を誘導する炎症性サイトカイン<sup>23,31</sup>、IL-6 は CD4+リンパ球などの分化・誘導に関与する炎症性サイトカイン<sup>32</sup>、TNF- $\alpha$  はマクロファージを誘導する炎症性サイトカインである<sup>23,31</sup>。また、IL-10 は Th1 細胞や NK 細胞、マクロファージの活性を抑制する抗炎症性サイトカイン<sup>33</sup>、TGF- $\beta$  1 はリンパ球やマクロファージの分化・誘導を抑制する抗炎症性サイトカイン<sup>34</sup>である。そして IGF-1 は細胞分裂などにより創傷治癒を促進するサイトカインである<sup>23</sup>。数多くのサイトカインの中から本研究ではこれらのサイトカインに着目し、局所のサイトカイン量を検証した。ELISA 法の施行にあたり、IL-1 $\beta$  OmniKine™ ELISA Kit, Rat (コスモ・バイオ株式会社、東京、日本)、IL-6 OmniKine™ ELISA Kit, Rat (コスモ・バイオ株式会社、東京、日本)、TNF- $\alpha$  OmniKine™ ELISA Kit, Rat (コスモ・バイオ株式会社、東京、日本)、IL-10 ELISA Kit, Rat (コスモ・バイオ株式会社、東京、日本)、TGF- $\beta$  1 ELISA Kit, Rat (コスモ・バイオ株式会社、東京、日本)、IGF-1 ELISA Kit, Mouse (コスモ・バイオ株式会社、東京、日本)を使用した。

## (7) 統計解析



統計解析には統計ソフト JMP® Pro 15.0.0 (SAS 社、ケーリー、ノースカロライナ州、アメリカ合衆国) を使用した。虚血創の創面積、MVD、局所サイトカイン量について比較した。比較検定は Wilcoxon 検定を用いて検定し、 $p < 0.05$  を統計学的な有意差とした (\*  $p < 0.05$ )。

## 5. 研究結果

### I. ラット虚血性潰瘍モデルの作製

研究方法のとおり、全身麻酔下にラット虚血性創傷モデルを作製した（図 1）。ラット虚血性創傷モデルの作製後、観察期間中に全ての虚血創で明らかな感染や重大な有害事象はなく、安全に実験を遂行できた。

### II. 新鮮羊膜貼付群と非羊膜貼付群の比較

#### ① 創傷治癒促進効果の評価

ラット虚血性創傷モデル作成後の創面積の経過（図 4a）と推移を（図 4b）に示す。犠牲死を行った術後 5 日目における創面積は、新鮮羊膜貼付群の平均値  $335.4\text{mm}^2$ （ $260\text{--}450\text{mm}^2$ ）、非羊膜貼付群の平均値  $459\text{mm}^2$ （ $306\text{--}570\text{mm}^2$ ）と、創傷治癒は新鮮羊膜貼付群で有意に良好であった（ $p = 0.0051$ ）（図 4c）。

#### ② 血管新生促進効果の評価

新鮮羊膜貼付群の MVD の平均値は  $19.0$ （ $10.4\text{--}24.6$ ）、非羊膜貼付群の平均値は  $15.1$ （ $10.6\text{--}20.8$ ）で、新生血管の増生に関して新鮮羊膜貼付群で統計学的に有意に高かった（ $p = 0.0026$ ）（図 4d）。

### III. 凍結羊膜貼付群と非羊膜貼付群の比較

#### ① 創傷治癒促進効果の評価

ラット虚血性創傷モデル作成後の創面積の経過（図 5a）推移を（図 5b）に示す。犠牲死を行った術後 7 日目における創面積は、凍結羊膜貼付群の平均値  $291.3\text{mm}^2$

(162–416mm<sup>2</sup>)、非羊膜貼付群の平均値 235.5mm<sup>2</sup> (176–391mm<sup>2</sup>) で、2 群間で統計学的に有意な差は見られなかったものの、非羊膜貼付群で創傷治癒が良好な傾向を認めた ( $p = 0.26$ ) (図 5c)。

## ② 血管新生促進効果の評価

凍結羊膜貼付群の平均値は 21.1 (19.2–23.0)、非羊膜貼付群の平均値は 16.4 (14.4–17.8) で、新生血管の増生に関しては凍結羊膜貼付群で統計学的に有意に高かった ( $p = 0.0039$ ) (図 5d)。

## III. 拒絶反応の評価

免疫組織化学染色を用いて拒絶反応の有無について羊膜貼付群と非羊膜貼付群で比較した。

### ① 新鮮羊膜貼付群と非羊膜貼付群

抗 CD4 抗体と抗 CD8 抗体を用いた免疫染色では新鮮羊膜貼付群と非羊膜貼付群の双方でリンパ球の浸潤は認めなかった。また、抗 CD68 抗体を用いた免疫染色においても新鮮羊膜貼付群と非羊膜貼群の双方でマクロファージの浸潤は認めなかった (図 6a)

### ② 凍結羊膜貼付群と非羊膜貼付群

抗 CD4 抗体と抗 CD8 抗体を用いた免疫染色では凍結羊膜貼付群と非羊膜貼付群の双方でリンパ球の浸潤は認めなかった。また、抗 CD68 抗体を用いた免疫染色にお

いても凍結羊膜貼付群と非羊膜貼付群の双方でマクロファージの浸潤は認めなかった（図 6b）。

以上のように、新鮮羊膜貼付群も凍結羊膜貼付群も、非羊膜貼付群と比較して、拒絶反応を示唆する所見は認めなかった。

#### IV. 新鮮羊膜と凍結羊膜の組織学的な評価

Hematoxylin and Eosin (HE) 染色を用いて、新鮮羊膜と凍結羊膜を比較し、凍結・解凍操作を行うことによる組織学的な変化について検討した。新鮮羊膜では羊膜上皮細胞が一行に保たれているのに対して、凍結羊膜では一部の羊膜上皮細胞が脱落を認められた（図 7）。

#### V. ELISA による局所サイトカイン量の評価

研究方法のごとく、局所サイトカイン量を ELISA により測定した。炎症性サイトカインとして、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  を測定した。

##### ① 新鮮羊膜貼付群と非羊膜貼付群

IL-1 $\beta$  の測定結果は、新鮮羊膜貼付群の平均値は 47.8pg/ml (37.5–62.9pg/ml)、非羊膜貼付群の平均値は 48.6pg/ml (36.2–71.0pg/ml) と、2 群間で差を認めなかった ( $p=0.84$ ) (図 8a)。IL-6 の測定結果は、新鮮羊膜貼付群の平均値は 43.6pg/ml (9.0–107.1pg/ml)、非羊膜貼付群の平均値は 44.9pg/ml (12.9–56.6pg/ml) と、2 群間で差

を認めなかった ( $p = 0.13$ ) (図 8b)。TNF- $\alpha$  の測定結果は、新鮮羊膜貼付群の平均値は 69.0pg/ml (51.0–96.9pg/ml)、非羊膜貼付群の平均値は 81.6pg/ml (48.7–120.6pg/ml) と、2 群間で差を認めなかった ( $p = 0.36$ ) (図 8c)。

## ② 凍結羊膜貼付群と非羊膜貼付群

IL-1 $\beta$  の測定結果は、凍結羊膜貼付群の平均値は 16.9pg/ml (15.4–18.0pg/ml)、非羊膜貼付群の平均値は 16.7pg/ml (14.2–21.1pg/ml) と、2 群間で差を認めなかった ( $p = 0.75$ ) (図 8d)。IL-6 の測定結果は、凍結羊膜貼付群の平均値は 39.1pg/ml (35.2–45.9pg/ml)、非羊膜貼付群の平均値は 39.3pg/ml (21.1–53.0pg/ml) と、2 群間で差を認めなかった ( $p = 0.81$ ) (図 8e)。TNF- $\alpha$  の測定結果は、凍結羊膜貼付群の平均値は 51.8pg/ml (21.2–100.1pg/ml)、非羊膜貼付群の平均値は 72.7pg/ml (21.2–209.8pg/ml) と、2 群間で差を認めなかった ( $p = 0.81$ ) (図 8f)。

以上のように、新鮮羊膜貼付群も凍結羊膜貼付群も、非羊膜貼付群と比較して、局所の炎症性サイトカイン量に差は見られなかった。

また、抗炎症サイトカインとして、IL-10、TGF- $\beta$  1 を測定した。

## ① 新鮮羊膜貼付群と非羊膜貼付群

IL-10 の測定結果は、新鮮羊膜貼付群の平均値は 56.8pg/ml (16.2–108.2pg/ml)、非羊膜貼付群の平均値は 50.4pg/ml (20.2–88.6pg/ml) と、2 群間で差を認めなかった ( $p = 0.99$ ) (図 8g)。TGF- $\beta$  1 の測定結果は、新鮮羊膜貼付群の平均値は 456.3pg/ml (105.4–973.9pg/ml)、非羊膜貼付群の平均値は 431.5pg/ml (123.0–693.3pg/ml) と、

2 群間で差を認めなかった ( $p = 0.91$ ) (図 8h)。

② 凍結羊膜貼付群と非羊膜貼付群

IL-10 の測定結果は、凍結羊膜貼付群の平均値は 337.8pg/ml (184.8–525.9pg/ml)、非羊膜貼付群の平均値は 298.8pg/ml (241–395.5pg/ml) と、2 群間で差を認めなかった ( $p = 0.58$ ) (図 8i)。TGF- $\beta$ 1 の測定結果は、凍結羊膜貼付群の平均値は 120.2pg/ml (60.7–156.6pg/ml)、非羊膜貼付群の平均値は 84.3pg/ml (29.2–136.9pg/ml) と、2 群間で差を認めなかった ( $p = 0.23$ ) (図 8j)。

以上のように、新鮮羊膜貼付群も凍結羊膜貼付群も、非羊膜貼付群と比較して、局所の抗炎症性サイトカイン量に差は見られなかった。

最後に、創傷治癒を促進するサイトカインとして、IGF-1 を測定した。

① 新鮮羊膜貼付群と非羊膜貼付群

IGF-1 の測定結果は、新鮮羊膜貼付群の平均値は 34.2pg/ml (14.7–65.2pg/ml)、非羊膜貼付群の平均値は 28.1pg/ml (15.8–50.7pg/ml) と、2 群間で差を認めなかった ( $p = 0.56$ ) (図 8k)。

② 凍結羊膜貼付群と非羊膜貼付群

IGF-1 の測定結果は、凍結羊膜貼付群の平均値は 22.1pg/ml (7.7–69.1pg/ml)、非羊膜貼付群の平均値は 16.5pg/ml (8.8–27.8pg/ml) と、2 群間で差を認めなかった ( $p = 0.94$ ) (図 8l)。

以上のように、新鮮羊膜貼付群も凍結羊膜貼付群も、非羊膜貼付群と比較して、局

所の創傷治癒を促進するサイトカイン量に差は見られなかった。

## 6. 考察

本研究では、ヒト羊膜の虚血性創傷における創傷治癒・血管新生促進効果を評価する目的として、小動物虚血性創傷モデルを用いてヒト羊膜の有効性の検証を行った。本研究の結果、新鮮ヒト羊膜を創傷被覆剤として用いることで、虚血性創傷の創面積の縮小が有意に良好で、創傷治癒効果を強く示唆する結果であった。また、MVD も有意に高いことから血管新生促進効果を強く示唆する結果が得られた。しかし、凍結ヒト羊膜を貼付した際は、MVD は有意に高く血管新生促進効果が示されたものの、虚血性創傷の創面積の縮小は見られず、創傷治癒効果は認められなかった。この原因として、まず異種移植による拒絶反応を疑ったが、新鮮ヒト羊膜と凍結ヒト羊膜のいずれを創傷被覆剤として使用した場合も、免疫組織化学染色ではリンパ球やマクロファージの浸潤を認めず、拒絶反応は否定的だった。また、組織学的評価により、凍結・解凍操作により羊膜上皮細胞が一部脱落する羊膜の変性を認めたことから、局所サイトカイン量の変化も考慮し、ELISA 法で炎症性サイトカインとして IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  を、抗炎症サイトカインとして IL-10 と TGF- $\beta$  1 を、創傷治癒を促進するサイトカインとして IGF-1 を測定した。しかし、非羊膜貼付群と比較して、新鮮羊膜貼付群、凍結羊膜貼付群いずれにおいても、これらの局所サイトカイン量の有意な増減は認められなかった。

CLTI による潰瘍・壊死などの虚血性創傷は創処置だけでは治癒せず、バイパス術や血管内治療などの血行再建術を必要とする。しかし、CLTI をきたす患者の多くは高齢者や透析患者など全身状態や血管の性状が不良な患者も多く<sup>8</sup>、血行再建術が困



難であることも多い<sup>9,10</sup>。血行再建後も創部に十分な血流増加が得られず、複数回の手術や創処置が必要となり、創治癒に数ヶ月を要することも多い<sup>12</sup>。そのため、補助療法を組み合わせた集学的な治療が必要である。現在、補助療法の一つとして LDL アフェレシス療法がある。LDL アフェレシス療法を行うことで、血中 LDL-C や フィブリノゲンの除去による微小循環障害の改善の他に、ブラジキニンの産生、一酸化窒素の産生や血管内皮機能の改善が報告されている<sup>35</sup>。しかし、CLTI の虚血性創傷への報告はなく、観血的な治療であることに加えて、創傷治癒を促進する報告はない。また、高気圧酸素療法も補助療法の方法の一つだが、本治療の有効性の報告は糖尿病性足病変を対象としたものがほとんどであり、CLTI に対する有効性は示されていない<sup>36</sup>。その他に保険適応外の治療法として、血管新生療法、和温療法がある。血管新生療法として、末梢血単核球移植、自己骨髄単核球細胞移植、HGF や VEGF、FGF の遺伝子治療がある。自己骨髄単核球細胞移植を行うことで、ABI の改善や安静時の疼痛の改善を示す報告はあるが、CLTI の虚血性創傷への有効性は示されていない<sup>37</sup>。和温療法は、PAD 患者の血管内皮前駆細胞である CD34 陽性細胞が末梢血中に誘導されることや endothelial nitric oxide synthase の上昇により微小循環の改善が示され<sup>37,38</sup>、虚血性創傷への有効性の報告もある<sup>39</sup>。しかし、より重度な下肢虚血である CLTI での有効性の報告はない。最後に、局所補助療法として局所陰圧閉鎖療法があり、感染組織を十分に除去できた場合に TIME (tissue, infection/inflammation, moisture imbalance and edge of wound) 理論に基づ

く wound bed preparation を達成できれば創傷治癒の改善が期待される<sup>40</sup>が、CLTI に対する微小循環の改善の報告はない。

これまでに、ヒト羊膜は VEGF などの成長因子を含み、非虚血性創傷において血管新生を促進する効果を有することが報告されているが<sup>15-17</sup>、虚血性創傷において血管新生を促進する報告はない。本研究では、新鮮ヒト羊膜と凍結ヒト羊膜のいずれを貼付した場合も MVD が有意に高く、ヒト羊膜が虚血性創傷における血管新生促進効果を有することが示唆された。以上から、血行再建術が行いえない場合に、局所の血管新生により血流を改善する創傷被覆剤として、ヒト羊膜は有用であることが示唆される。先行研究において虚血性創傷にヒト羊膜を貼付し血管新生促進効果を観察した研究は検索しうる限りなく、本研究が初めてである。

ヒト羊膜は血管新生促進作用以外にも多彩な特長を有しており、その1つとして羊膜上皮細胞から放出される TGF- $\beta$  などのサイトカインによる抗炎症作用や組織リモデリング作用があり、これらの作用による創傷治癒促進効果が報告されている<sup>21,22</sup>。しかし、難治性である虚血性創傷におけるヒト羊膜の創傷治癒効果を明らかにした研究は報告されていない。本研究において新鮮ヒト羊膜を虚血創に貼付した場合に、有意な創面積の縮小を認めたことからヒト羊膜が虚血性創傷における創傷治癒効果を有することが示唆された。一方で、本研究において凍結ヒト羊膜を虚血創に貼付した場合に、虚血性創傷における創傷治癒効果は認められなかった。この理由としては、第一に、異種移植による拒絶反応を考慮した。ヒト羊膜は免疫原性が低いことが知られ

ている<sup>21,22</sup>が、拒絶反応が生じる可能性は否定できない。そこで、拒絶反応が生じている場合には、リンパ球やマクロファージの浸潤が局所で生じることが想定されることから、本研究では免疫組織化学染色により評価した。しかし、抗 CD4 抗体および抗 CD8 抗体による免疫化学染色では羊膜の貼付の有無に関わらずリンパ球の浸潤を認めず、抗 CD68 抗体による免疫染色においてもマクロファージの浸潤を認めなかった。以上から、ヒト羊膜を貼付したラット虚血性モデルにおいて拒絶反応が生じた可能性が低いことが示唆された。第二に、凍結および解凍・解凍操作により羊膜に何らかの変性が生じたことが疑われた。Zhong らは、新鮮ヒト羊膜と凍結ヒト羊膜を電子顕微鏡で比較観察し、PBS を保存液として凍結保存した場合に羊膜上皮細胞の脱落や空胞変性を指摘している<sup>41</sup>。本研究でも、新鮮ヒト羊膜と凍結ヒト羊膜を HE 染色で比較すると、凍結ヒト羊膜では羊膜上皮細胞の一部脱落を認めた。今日において、眼科領域などでは羊膜の凍結保存方法として細胞保存液にグリセロールを添加することで羊膜上皮細胞の生存率を維持することが多い<sup>42</sup>が、グリセロールを添加することで羊膜間葉系細胞の機能の低下も示唆されている<sup>43</sup>。また、Ward らは静脈性潰瘍に対して、PBS のみを保存液とした凍結ヒト羊膜を用いて治療を行った場合に新鮮ヒト羊膜と比較して、創傷治癒効果に差を認めなかったと報告している<sup>44</sup>。そのため、本研究では羊膜にグリセロールを添加せずに PBS のみで凍結保存することとしたが、ヒト羊膜の凍結・解凍法の至適化は今後の課題である。また、羊膜は主に抗炎症性サイトカインの TGF- $\beta$ 1 により線維芽細胞が活性化し上皮化を促進する<sup>42</sup>ことが示唆

されているが、羊膜の凍結方法の違いによる TGF- $\beta$ 1 のサイトカイン量の変化について示す報告は検索しうる限りではなかった。これらのことから、凍結・解凍操作による羊膜上皮細胞の変性により、羊膜上皮細胞から放出される抗炎症作用や組織リモデリング作用によって創傷治癒を促進するサイトカインの減少も考えられた<sup>21,22</sup>。そこで、本研究では IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  の炎症性サイトカイン、IL-10 と TGF- $\beta$ 1 抗炎症サイトカイン、IGF-1 の創傷治癒を促進するサイトカインについて、それぞれ局所サイトカイン量を ELISA により比較したが、有意差は認められなかった。一方で、Ward らは静脈性潰瘍に対して新鮮ヒト羊膜と凍結ヒト羊膜を用いて治療を行い創傷治癒効果に差を認めなかったと報告しており、<sup>44</sup>また、Add らは瘢痕性類天疱瘡患者を対象に、新鮮ヒト羊膜と凍結ヒト羊膜のいずれを角膜のグラフトとして用いた場合も羊膜上皮細胞の生着率は変わらないことを報告している<sup>45</sup>。これらのことから、ヒト羊膜は凍結操作により羊膜上皮が変性するものの、依然として創傷治癒効果は維持される可能性があると考えられる。そのため、凍結羊膜の虚血性創傷への有効性に関しては、創傷治癒効果を維持することを目的とした凍結・解凍法の至適化の検証が今後必要であると考えている。第三に、新鮮ヒト羊膜を貼付した場合と凍結ヒト羊膜を貼付した場合で、ヒト羊膜の交換方法に違いがあったことが考えられた。新鮮ヒト羊膜を貼付した際には、5 日間ヒト羊膜を交換しなかったことに対して、凍結ヒト羊膜を貼付した際には、3 日ごとに交換した。これは、新鮮ヒト羊膜を使用した際に、5 日目でヒト羊膜が乾燥を来し始めたためである。新鮮ヒト羊膜は待機的帝王切開術

において娩出された胎盤から羊膜を採取し、6時間以内に速やかに使用するため、常に採取することができないことから5日間同一の新鮮ヒト羊膜の貼付を継続した。一方で、凍結ヒト羊膜は、採取後に冷凍保存することで貯蔵することが可能であることから、新鮮ヒト羊膜を貼付した時よりもさらに乾燥した状態を防ぐ目的に3日ごとに交換した。この交換頻度の違いが新鮮羊膜と凍結羊膜の創傷治癒促進作用に影響したと仮定した場合、羊膜の交換操作により創傷治癒を阻害する物理的刺激が加わってしまっていた可能性が第一に考えられた。しかし、本研究では凍結羊膜を愛護的に交換したため、交換頻度が増えたことが一因とは必ずしも言えないと考えた。

本研究で得られた知見には、いくつかの **limitation** がある。第一に、本研究では、虚血性創傷として **Hofmann** らのラット虚血創モデル<sup>27</sup>を参考に虚血創を作成した。**Hofmann** らは虚血の度合いを **minimal, mild, moderate, severe** の3通りを示し、それぞれの血流障害度合いを **Laser Doppler** で検証のうえ、虚血性モデルの妥当性を報告しており、本実験もこの実験モデルを参考にしている。本研究では、皮膚と筋膜下の層で挙上し、虚血創作成時には筋膜層を含む皮弁全層をくり抜き作成している。一方で、**Hofmann** らは皮弁を筋膜下の層で挙上し、虚血創作成時には皮弁に含まれる筋膜層を残存している。この点において、本実験モデルと **Hofmann** らのラット虚血創モデルと完全には同一ではなく擬似モデルとなっている。しかし、損傷なく連続性を保持した状態で皮弁から筋膜のみ剥離し虚血創の底面として残存することは困難であったことや、本実験で虚血創の底面となった筋層まで虚血にすると腹筋群の萎縮

を伴う可能性があったため、類似モデルを採用することとした。そのため、本実験で虚血創とした創部における虚血の程度の評価について検証する余地がある。第二に、本実験では虚血処理した個体での虚血創の創傷治癒や血管新生について検討しているが、虚血処理をしていない個体での創傷治癒や血管新生についても、本虚血モデルを比較する背景として今後検討することが望ましいと考えられる。第三に、新鮮羊膜貼付群と非羊膜貼付群の比較の推移（図 5）と凍結羊膜貼付群と非羊膜貼付群の比較の推移（図 6）において、非羊膜貼付群の推移を比較すると凍結羊膜貼付群と比較した際の非羊膜貼付群の創面積の方がより漸減しており対照群として推移が異なっている。本来対照群としては同じ推移となるべきだが、この原因としては術後のドレッシング時に弾性包帯の固着の強度の若干の違いなども考えられる。また、新鮮羊膜と凍結羊膜の影響をそれぞれの非羊膜貼付群で受けた可能性も考えられる。創治癒は個体差もそれなりにあり、一定程度の差異が出ることも推測されたが、よりこれらの影響を除外するためには、同一個体で新鮮羊膜貼付群、凍結羊膜貼付群、非羊膜貼付群などの 3 群間などで比較検討することで、対照群の差異や制約を除外できる可能性が考慮された。また、本実験ではラット同一個体内に羊膜貼付群と非羊膜貼付群の虚血創を貼付しているが、創部が左右にあるかといった物理的な創傷部位の違いだけでも創傷治癒に影響が生じていることも推測され、同一個体に複数の創傷を形成するモデルではなく、1 個体に 1 創傷のモデルとして、新鮮羊膜貼付群、凍結羊膜貼群、非羊膜貼付群、非虚血群の比較検討を行い再度検証する必要性も考慮された。第四に、本

研究では虚血創の創傷治癒の比較として、羊膜貼付群と非羊膜貼付群で比較しているが、創部に羊膜を貼付した状態と何も貼付していない状態では創部の酸素状態に差異が生じている可能性がある。血管新生は低酸素状態で生じやすいことが示されている<sup>46,47</sup>ことから、この差異について、羊膜貼付群と免疫抗原性のない構造物を貼付した群で同様の酸素条件下になるように調整のうえ、虚血創の創傷治癒や血管新生についてさらに検討することも今後の課題であると考えられる。第五に、連日の創部の観察時には、虚血創の創部から脱脂綿とガーゼを都度除去したうえで創部の観察を行っている。ガーゼあるいは脱脂綿でのドレッシングでは、羊膜貼付側では創面が羊膜に守られ損傷することはないが、非羊膜貼付側であるコントロール側ではガーゼや脱脂綿を剥がす度に、線維性のドレッシング材に細胞が入り込むことで創面の新規上皮や肉芽組織を損傷し、非羊膜貼付群の創傷治癒に影響を与えた可能性が考慮された。そのため、創面の新規上皮や肉芽組織の保護を羊膜貼付群と非羊膜貼付群で同一の条件にするためにも、今後において非固着性かつ透明で同様の酸素条件下となるドレッシング材を用いた比較も検討事項と考えられる。第六に、創治癒の評価方法に関して本研究では創面積の縮小のみで評価を行っている。しかし、創治癒は収縮と上皮化で生じ、虚血性創傷の創治癒障害は主に上皮化不全で生じる<sup>48</sup>ため、単に創面積の縮小のみで創治癒を評価することは十分ではない可能性が考慮される。そのため、創治癒としてHE染色において、上皮化の進行や肉芽形成などを定量的に評価することも今後検証の余地がある。第七に、血管新生の評価としては、MVDを用いて血管数を評価した。

しかし、新生血管の機能性については検討できておらず、血管腔の面積や血管造影による開存性の評価により機能性に関してさらなる検討を行うことが今後の課題である。また、羊膜による創傷治癒改善の一つの要因である血管新生において、主に VEGF や bFGF などが関与している<sup>23</sup>ことから MVD が増加する要因として今後定量評価を行うことも一つの課題である。第八に、羊膜の凍結方法に関して、至適化はまだ十分行われていない。先述のように、今日においては眼科領域などでは羊膜の凍結保存方法として細胞保存液にグリセロールを添加することで羊膜上皮細胞の生存率を維持することが多い<sup>42</sup>が、グリセロールを添加することで羊膜間葉系細胞の機能の低下も示唆されている<sup>43</sup>。また、Ward らは静脈性潰瘍に対して、PBS のみを保存液とした凍結ヒト羊膜を用いて治療を行った場合に新鮮ヒト羊膜比較して、創傷治癒効果に差を認めなかったと報告している<sup>44</sup>。本研究では羊膜にグリセロールを添加せず PBS のみで凍結保存しているが、凍結方法の違いによる羊膜への影響に関しては十分に行えていない。そのため、凍結方法として、グリセロールの添加や他の緩衝液を用いた羊膜の凍結方法に関して更なる検討が必要である。

本研究の結果から新鮮ヒト羊膜を虚血性創傷に貼付すると創傷治癒効果と血管新生促進効果が得られるものの、臨床的にヒト羊膜を使用することを考慮すると、新鮮羊膜の使用は帝王切開の予定に依存し、時間と経過とともに新鮮羊膜が変性する問題から採取後に使用できる時間が限られること、そして、新鮮羊膜を貯蓄することが極めて難しい点から臨床応用できる症例が限られる。そこで、これらの問題点を改善す



るために新鮮ヒト羊膜を凍結保存し、使用時に解凍することで羊膜を採取する予定や貯蓄性にとらわれずに簡便に使用することを考慮した。しかし、凍結ヒト羊膜を虚血性創傷に用いた場合、血管新生促進効果は得られるものの創傷治癒促進効果は認められなかった。本研究では、凍結ヒト羊膜を用いた場合に、創傷治癒促進効果が失われる原因を特定できておらず、今後、創傷治癒効果を維持する凍結・解凍方法の確立を、動物実験等を含めた検討を重ね、臨床応用を目標として更に検証する必要がある。

本研究では、これまでに報告のないヒト羊膜の虚血性創傷に対する血管新生促進作用・創傷治癒促進作用を検証し、ヒト羊膜が虚血性創傷に対する有用な創傷被覆剤の1つになる可能性を明らかにした。これまで熱傷、皮膚欠損など非虚血性創傷におけるヒト羊膜の創傷治癒や血管新生の有効性が報告され<sup>24</sup>、すでに眼科領域では羊膜移植が臨床応用されていることもあり、虚血性創傷に対しても創傷被覆剤として応用できる可能性は高い。今後、さらなる知見を蓄積することで、ヒト羊膜がヒト虚血性創傷を改善しうる治療の1つの選択肢となりえれば非常に有意義である。

## 7. 結論

ヒト羊膜が虚血性創傷に対して有用な創傷被覆剤になる可能性を考慮し、ラット虚血性創傷モデルを用いてこれまでに報告のない虚血性創傷モデルに対する羊膜の血管新生促進効果と創傷治癒促進効果を検討した。

ラット虚血性創傷モデルの虚血創に対して、羊膜貼付群では、非羊膜貼付群と比較して血管新生がより促進され、創傷治癒が改善した。羊膜は虚血性創傷に対する創傷治癒促進効果を促す新たな創傷被覆剤の一つとして有用である可能性が示唆された。

## 8. 謝辞

本研究の過程において、ご指導とご鞭撻を賜りました外科病態学講座消化器外科学分野 亀井尚教授、並びに海野倫明教授に心より感謝を申し上げます。

また、本研究過程において直接のご指導を賜りました、外科病態学講座消化器外科学分野 戸子台和哲講師、JCHO 仙台病院血管外科 菅原宏文血管外科医長に深謝いたします。実験用羊膜上皮細胞を採取するにあたりご協力いただきました、発生・発達医学講座周産期医学分野 齋藤昌利教授、星合哲郎講師に厚く御礼申し上げます。

また、この実験に際し大変お世話になりました、東北大学病院臨床研究推進センター (CRIETO) 再生医療ユニット 伊藤貴子助教、沖田ひとみ助手、東北大学大学院医学系研究科附属動物実験施設 末田輝子主任臨床検査技師、外科病態学講座消化器外科学分野 古川靖子技能補佐員に心より感謝を申し上げます。

## 9. 文献

1. Criqui MH, Aboyans V. Epidemiology of peripheral artery disease. *Circ Res*. 2015;116(9): 1509-1526.
2. Aboyans V, Sevestre MA, Désormais I, Lacroix P, Fowkes G, Criqui MH. [Epidemiology of lower extremity artery disease]. *Presse Med*. 2018;47(1): 38-46.
3. Farber A. Chronic Limb-Threatening Ischemia. *N Engl J Med*. 2018;379(2): 171-180.
4. Fowkes FG, Murray GD, Butcher I, et al. Ankle brachial index combined with Framingham Risk Score to predict cardiovascular events and mortality: a meta-analysis. *Jama*. 2008;300(2): 197-208.
5. Conte MS, Bradbury AW, Kolh P, et al. Global vascular guidelines on the management of chronic limb-threatening ischemia. *J Vasc Surg*. 2019;69(6s): 3S-125S.e140.
6. Gerhard-Herman MD, Gornik HL, Barrett C, et al. 2016 AHA/ACC Guideline on the Management of Patients With Lower Extremity Peripheral Artery Disease: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2017;135(12): e686-e725.
7. Mills JL, Sr., Conte MS, Armstrong DG, et al. The Society for Vascular Surgery Lower Extremity Threatened Limb Classification System: risk stratification based on wound, ischemia, and foot infection (WIFI). *J Vasc Surg*. 2014;59(1): 220-234.e221-222.
8. Abou-Zamzam AM, Jr., Gomez NR, Molkara A, et al. A prospective analysis of critical limb ischemia: factors leading to major primary amputation versus revascularization. *Ann Vasc Surg*. 2007;21(4): 458-463.
9. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg*. 2007;45 Suppl S: S5-67.
10. Becker F, Robert-Ebadi H, Ricco JB, et al. Chapter I: Definitions, epidemiology, clinical presentation and prognosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2011;42 Suppl 2: S4-12.
11. Abu Dabrh AM, Steffen MW, Undavalli C, et al. The natural history of untreated severe or critical limb ischemia. *J Vasc Surg*. 2015;62(6): 1642-1651.e1643.
12. Miyahara T, Suhara M, Nemoto Y, et al. Long-Term Results of Treatment for Critical Limb Ischemia. *Ann Vasc Dis*. 2015;8(3): 192-197.
13. Umetsu M, Akamatsu D, Goto H, et al. Long-Term Outcomes of Acute Limb Ischemia: A Retrospective Analysis of 93 Consecutive Limbs. *Ann Vasc Dis*. 2019;12(3): 347-353.
14. Umezawa A, Hasegawa A, Inoue M, et al. Amnion-derived cells as a reliable resource for next-generation regenerative medicine. *Placenta*. 2019;84: 50-56.
15. Koob TJ, Rennert R, Zabek N, et al. Biological properties of dehydrated human amnion/chorion composite graft: implications for chronic wound healing. *Int Wound J*. 2013;10(5): 493-500.
16. Huang G, Ji S, Luo P, et al. Accelerated expansion of epidermal keratinocyte and improved dermal reconstruction achieved by engineered amniotic membrane. *Cell Transplant*. 2013;22(10): 1831-1844.
17. Cheung CY, Singh M, Ebaugh MJ, Brace RA. Vascular endothelial growth factor gene expression in ovine placenta and fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 1995;173(3 Pt 1): 753-759.

18. Mahmoudi-Rad M, Abolhasani E, Moravvej H, Mahmoudi-Rad N, Mirdamadi Y. Acellular amniotic membrane: an appropriate scaffold for fibroblast proliferation. *Clin Exp Dermatol.* 2013;38(6): 646-651.
19. Buhimschi IA, Jabr M, Buhimschi CS, Petkova AP, Weiner CP, Saed GM. The novel antimicrobial peptide beta3-defensin is produced by the amnion: a possible role of the fetal membranes in innate immunity of the amniotic cavity. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;191(5): 1678-1687.
20. Steed DL, Trumpower C, Duffy D, et al. Amnion-derived cellular cytokine solution: a physiological combination of cytokines for wound healing. *Eplasty.* 2008;8: e18.
21. Franz MG, Payne WG, Xing L, et al. The use of amnion-derived cellular cytokine solution to improve healing in acute and chronic wound models. *Eplasty.* 2008;8: e21.
22. Payne WG, Wachtel TL, Smith CA, Uberti MG, Ko F, Robson MC. Effect of amnion-derived cellular cytokine solution on healing of experimental partial-thickness burns. *World J Surg.* 2010;34(7): 1663-1668.
23. Koob TJ, Lim JJ, Masee M, Zabek N, Denozière G. Properties of dehydrated human amnion/chorion composite grafts: Implications for wound repair and soft tissue regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2014;102(6): 1353-1362.
24. Kogan S, Sood A, Granick MS. Amniotic Membrane Adjuncts and Clinical Applications in Wound Healing: A Review of the Literature. *Wounds.* 2018;30(6): 168-173.
25. Zelen CM, Snyder RJ, Serena TE, Li WW. The use of human amnion/chorion membrane in the clinical setting for lower extremity repair: a review. *Clin Podiatr Med Surg.* 2015;32(1): 135-146.
26. Zelen CM, Serena TE, Denoziere G, Fetterolf DE. A prospective randomised comparative parallel study of amniotic membrane wound graft in the management of diabetic foot ulcers. *Int Wound J.* 2013;10(5): 502-507.
27. Hofmann AT, Neumann S, Ferguson J, Redl H, Mittermayr R. (\*) A Rodent Excision Model for Ischemia-Impaired Wound Healing. *Tissue Eng Part C Methods.* 2017;23(12): 995-1002.
28. Casal D, Pais D, Iria I, et al. A Model of Free Tissue Transfer: The Rat Epigastric Free Flap. *J Vis Exp.* 2017(119).
29. Sun HC, Tang ZY, Li XM, Zhou YN, Sun BR, Ma ZC. Microvessel density of hepatocellular carcinoma: its relationship with prognosis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1999;125(7): 419-426.
30. Wang WQ, Liu L, Xu HX, et al. Intratumoral  $\alpha$ -SMA enhances the prognostic potency of CD34 associated with maintenance of microvessel integrity in hepatocellular carcinoma and pancreatic cancer. *PLoS One.* 2013;8(8): e71189.
31. Shu J, He X, Zhang L, Li H, Wang P, Huang X. Human amnion mesenchymal cells inhibit lipopolysaccharide-induced TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production in THP-1 cells. *Biol Res.* 2015;48: 69.
32. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(10): a016295.
33. Couper KN, Blount DG, Riley EM. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol.* 2008;180(9): 5771-5777.
34. Prud'homme GJ. Pathobiology of transforming growth factor beta in cancer, fibrosis and

- immunologic disease, and therapeutic considerations. *Lab Invest.* 2007;87(11): 1077-1091.
35. Tsurumi-Ikeya Y, Tamura K, Azuma K, et al. Sustained inhibition of oxidized low-density lipoprotein is involved in the long-term therapeutic effects of apheresis in dialysis patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(5): 1058-1065.
36. Abidia A, Laden G, Kuhan G, et al. The role of hyperbaric oxygen therapy in ischaemic diabetic lower extremity ulcers: a double-blind randomised-controlled trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2003;25(6): 513-518.
37. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet.* 2002;360(9331): 427-435.
38. Shinsato T, Miyata M, Kubozono T, et al. Waon therapy mobilizes CD34+ cells and improves peripheral arterial disease. *J Cardiol.* 2010;56(3): 361-366.
39. Tei C, Shinsato T, Miyata M, Kihara T, Hamasaki S. Waon therapy improves peripheral arterial disease. *J Am Coll Cardiol.* Vol 50. United States 2007:2169-2171.
40. Leaper DJ, Schultz G, Carville K, Fletcher J, Swanson T, Drake R. Extending the TIME concept: what have we learned in the past 10 years?(\*). *Int Wound J.* 2012;9 Suppl 2(Suppl 2): 1-19.
41. Zhong Y, Ye W, Shen X, Cheng Y, Sun J, Wang K. [The effect of frozen storage for amniotic membrane ultrastructure]. *Yan Ke Xue Bao.* 2001;17(4): 202-205, 216.
42. Gholipourmalekabadi M, Farhadhosseinabadi B, Faraji M, Nourani MR. How preparation and preservation procedures affect the properties of amniotic membrane? How safe are the procedures? *Burns.* 2020;46(6): 1254-1271.
43. Shortt AJ, Secker GA, Lomas RJ, et al. The effect of amniotic membrane preparation method on its ability to serve as a substrate for the ex-vivo expansion of limbal epithelial cells. *Biomaterials.* 2009;30(6): 1056-1065.
44. Ward DJ, Bennett JP, Burgos H, Fabre J. The healing of chronic venous leg ulcers with prepared human amnion. *Br J Plast Surg.* 1989;42(4): 463-467.
45. Adds PJ, Hunt CJ, Dart JK. Amniotic membrane grafts, "fresh" or frozen? A clinical and in vitro comparison. *Br J Ophthalmol.* 2001;85(8): 905-907.
46. Krock BL, Skuli N, Simon MC. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes Cancer.* 2011;2(12): 1117-1133.
47. Tandara AA, Mustoe TA. Oxygen in wound healing--more than a nutrient. *World J Surg.* 2004;28(3): 294-300.
48. Alizadeh N, Pepper MS, Modarressi A, et al. Persistent ischemia impairs myofibroblast development in wound granulation tissue: a new model of delayed wound healing. *Wound Repair Regen.* 2007;15(6): 809-816.

## 10. 図の説明

### 図 1. ラット虚血性潰瘍モデルの作製

- a. 下腹壁動静脈・神経束を結紮切離した。
- b. 3 辺の皮膚を切開し、腹部に縦 8cm x 横 6cm の皮弁を形成した。
- c. 片側の虚血創に新鮮ヒト羊膜、または、凍結ヒト羊膜を貼付し、辺縁の 4 箇所を固定した。
- d. 両側の虚血創をガーゼで被覆のうえ、ガーゼがずれないように腹部を包帯で覆った。

### 図 2. 虚血創の創面積の定義

創面積は、ラットの頭尾側方向を長径、頭尾側方向と直行する方向を短径とし、長径と短径の積を創面積と定義する。

### 図 3. $\alpha$ -SMA(+)/CD34(+) MVD の測定

MVD の測定にあたり、抗  $\alpha$ -SMA 抗体と抗 CD34 抗体の二重染色により 1 視野あたりの血管数を測定した。

### 図 4. 新鮮羊膜貼付群と非羊膜貼付群の比較

- a. 新鮮羊膜貼付群と非羊膜貼付群の創面積の経過
- b. 新鮮羊膜貼付群と非羊膜貼付群の創面積の推移

- c. 創傷治癒効果の評価：創傷治癒効果は、新鮮羊膜貼付群で高く、統計学的有意差 ( $p = 0.0046$ ) を認めた。
- d. 血管新生促進効果の評価：血管新生促進効果は、新鮮羊膜貼付群で高く、統計学的有意差 ( $p = 0.0026$ ) を認めた。

#### 図 5. 凍結羊膜貼付群と非羊膜貼付群の比較

- a. 凍結羊膜貼付群と非羊膜貼付群の創面積の経過
- b. 凍結羊膜貼付群と非羊膜貼付群の創面積の推移
- c. 創傷治癒効果の評価：創傷治癒効果は、統計学的差 ( $p = 0.26$ ) が見られなかったものの、非羊膜貼付群で創傷治癒が良好な傾向を認めた。
- d. 血管新生促進効果の評価：血管新生促進効果は、凍結羊膜貼付群で高く、統計学的有意差 ( $p = 0.0039$ ) を認めた。

#### 図 6. 拒絶反応の評価

免疫組織化学染色を用いて、異種移植による拒絶反応の有無についてヒト羊膜貼付群と非羊膜貼付群で比較した。

- a. 新鮮羊膜貼付群と非羊膜貼付群：抗 CD4 抗体と抗 CD8 抗体を用いた免疫染色では、リンパ球の浸潤の差は認めなかった。また、抗 CD68 抗体を用いた免疫染色においても、マクロファージの浸潤の差は認めなかった。



- b. 凍結羊膜貼付群と非羊膜貼付群：抗 CD4 抗体と抗 CD8 抗体を用いた免疫染色では、リンパ球の浸潤の差は認めなかった。また、抗 CD68 抗体を用いた免疫染色においても、マクロファージの浸潤の差は認めなかった。

#### 図 7. 新鮮羊膜と凍結羊膜の組織学的な評価

HE 染色を用いて、新鮮羊膜と凍結羊膜を比較し、凍結・解凍操作を行うことによる組織学的な変化について検討した。新鮮羊膜では羊膜上皮細胞が一行に保たれているのに対して、凍結羊膜では一部の羊膜上皮細胞が脱落しているものの、一定程度は保たれていた。

#### 図 8. ELISA 法による局所サイトカイン量の評価

非羊膜貼付群と比較して、新鮮羊膜貼付群と凍結羊膜貼付群のそれぞれの局所のサイトカイン量を評価した。

##### ① 炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ の解析

- a. IL-1 $\beta$  : 新鮮羊膜貼付群の平均値 47.8pg/ml、非羊膜貼付群の平均値 48.6pg/ml と差はなかった ( $p = 0.84$ )。
- b. IL-6 : 新鮮羊膜貼付群の平均値 43.6pg/ml、非羊膜貼付群の平均値 44.9pg/ml と差はなかった ( $p = 0.13$ )。
- c. TNF- $\alpha$  : 新鮮羊膜貼付群の平均値 69.0pg/ml、非羊膜貼付群の平均値

81.6pg/ml と差はなかった ( $p = 0.36$ )。

d. IL-1 $\beta$  : 凍結羊膜貼付群の平均値 16.7pg/ml、非羊膜貼付群の平均値 16.7pg/ml

と差はなかった ( $p = 0.75$ )。

e. IL-6 : 凍結羊膜貼付群の平均値 39.1pg/ml、非羊膜貼付群の平均値 39.3pg/ml

と差はなかった。 ( $p = 0.75$ )

f. TNF- $\alpha$  : 凍結羊膜貼付群の平均値 51.8pg/ml、非羊膜貼付群の平均値

72.7pg/ml と差はなかった ( $p = 0.81$ )。

② 抗炎症性サイトカイン IL-10、TGF- $\beta$  1、IGF-1 の解析

g. IL-10 : 新鮮羊膜貼付群の平均値 56.8pg/ml、非羊膜貼付群の平均値 50.4pg/ml

と差はなかった ( $p = 0.99$ )。

h. TGF- $\beta$  1 : 新鮮羊膜貼付群の平均値 456.3pg/ml、非羊膜貼付群の平均値

431.5pg/ml と差はなかった ( $p = 0.91$ )。

i. IGF-1 : 凍結羊膜貼付群の平均値 34.2pg/ml、非羊膜貼付群の平均値 28.1pg/ml

と差はなかった ( $p = 0.56$ )。

j. IL-10 : 凍結羊膜貼付群の平均値 337.8pg/ml、非羊膜貼付群の平均値

298.8pg/ml と差はなかった ( $p = 0.58$ )。

k. TGF- $\beta$  1 : 凍結羊膜貼付群の平均値 120.2pg/ml、非羊膜貼付群の平均値

84.3pg/ml と差はなかった ( $p = 0.23$ )。

l. IGF-1 : 凍結羊膜貼付群の平均値 22.1pg/ml、非凍結羊膜貼付群の平均値

16.5pg/ml と差はなかった ( $p = 0.94$ )。

11. ㊦



図1a. 下腹壁動静脈・神経束の結紮切離

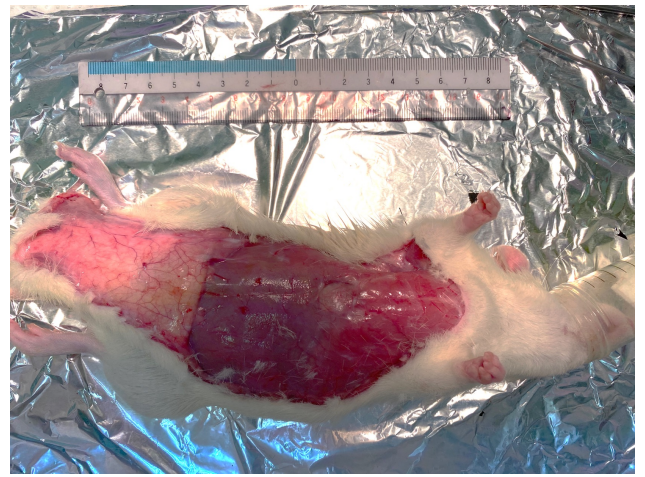


図1b. 腹部皮膚全層の皮弁の作製

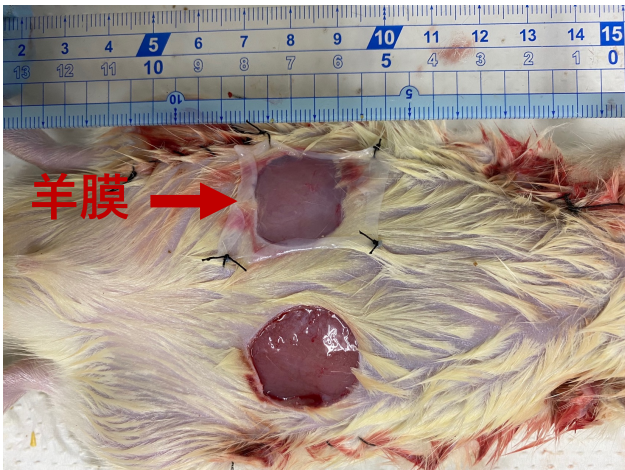


図1c. 羊膜の貼付



図1d. 創部の保護

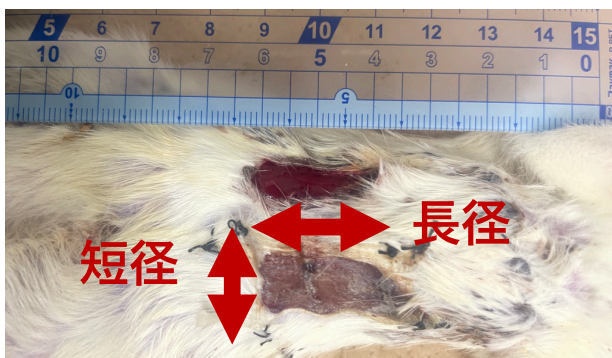


図2. 虚血創の創面積の定義

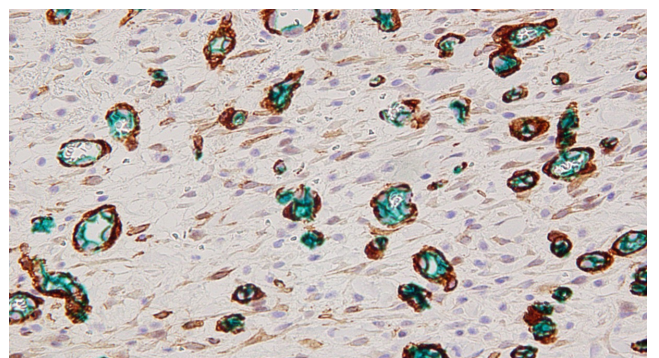


図3.  $\alpha$ -SMA(+) / CD34(+) MVDの測定  
red :  $\alpha$ -SMA, green : CD34

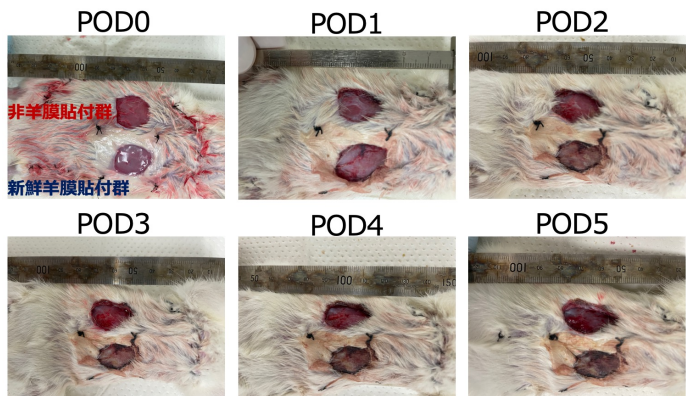


図4a. 新鮮羊膜貼付群と非羊膜貼付群の創面積の経過

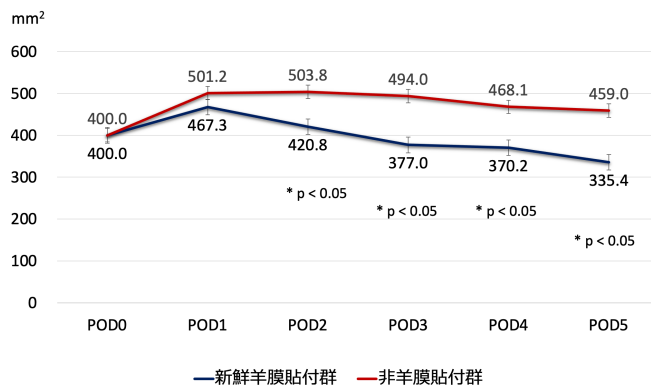


図4b. 新鮮羊膜貼付群と非羊膜貼付群の創面積の推移

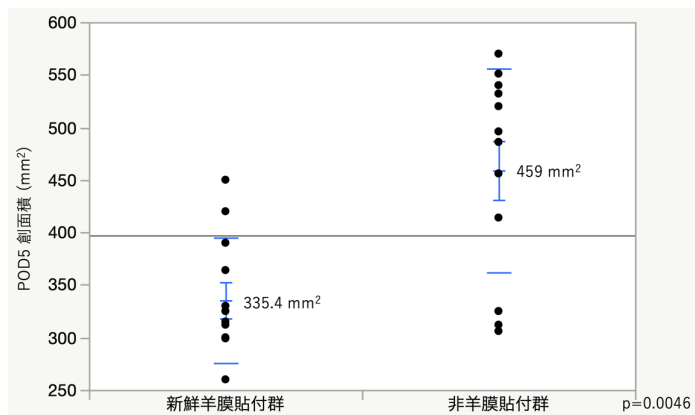


図4c. 新鮮羊膜貼付群と非羊膜貼付群の創面積の比較

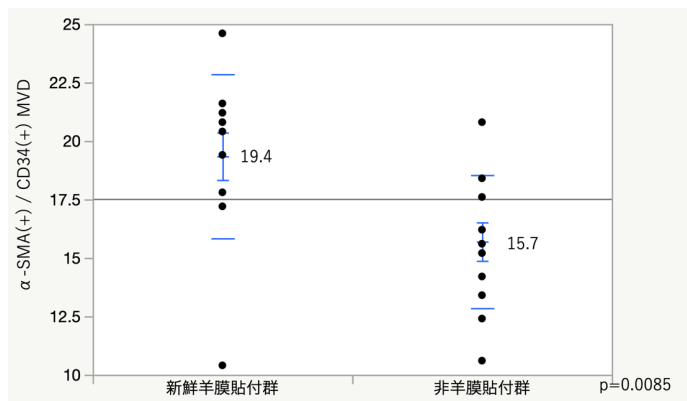


図4d. 新鮮羊膜貼付群と非羊膜貼付群の $\alpha$ SMA(+) / CD34 (+) MVDの比較

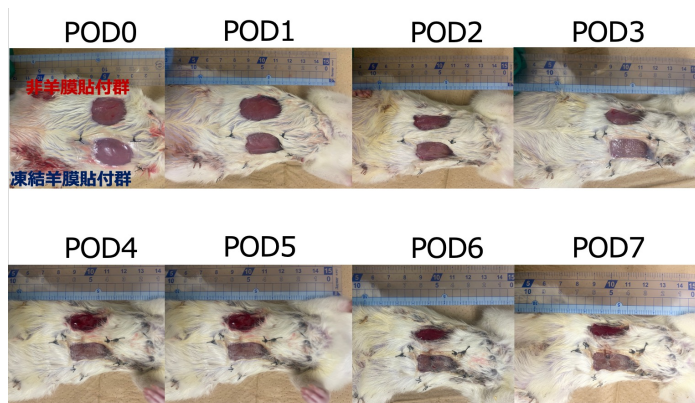


図5a. 凍結羊膜貼付群と非羊膜貼付群の創面積の経過

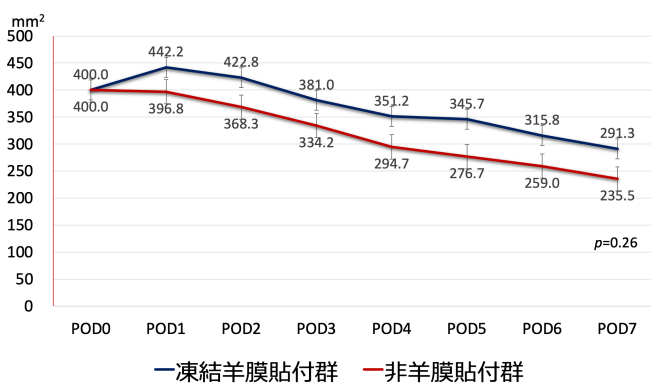


図5b. 凍結羊膜貼付群と非羊膜貼付群の創面積の推移

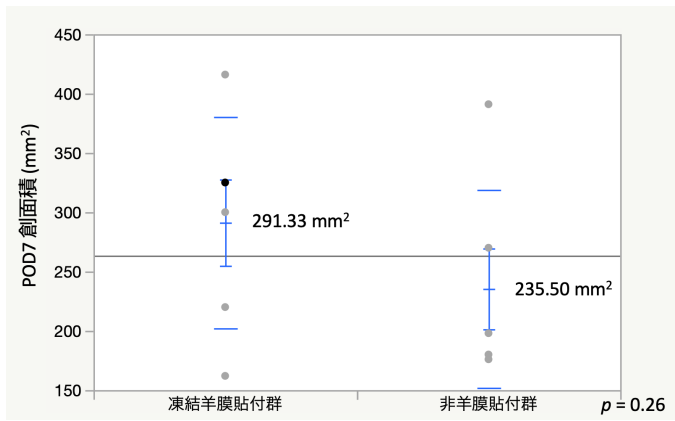


図5c. 凍結羊膜貼付群と非羊膜貼付群の創面積の比較

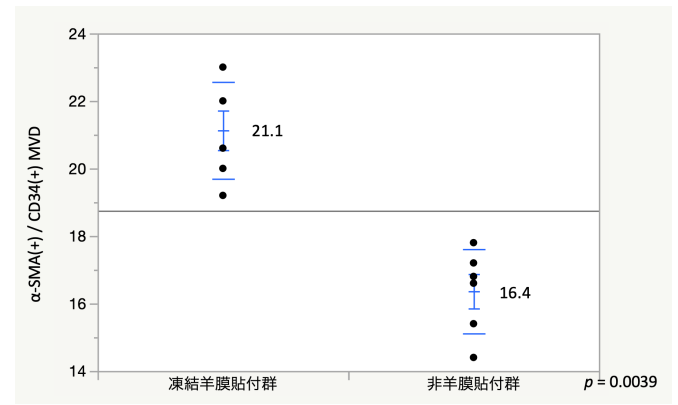


図5d. 凍結羊膜貼付群と非羊膜貼付群のalpha-SMA(+) / CD34(+) MVDの比較

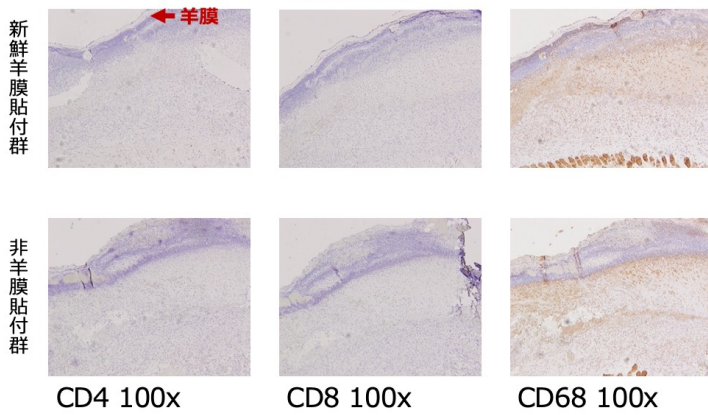


図6a. 新鮮羊膜貼付群と非羊膜貼付群における免疫化学染色

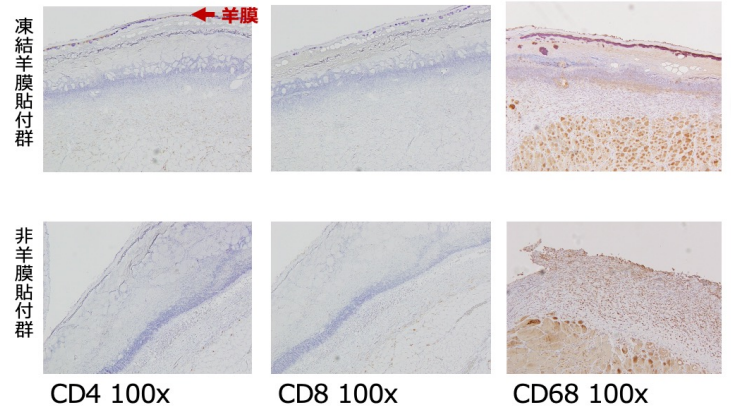


図6b. 凍結羊膜貼付群と非羊膜貼付群における免疫化学染色

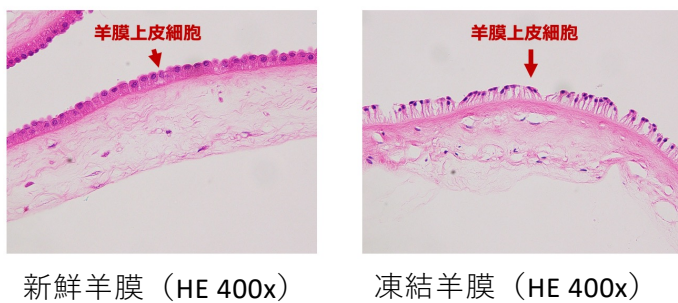


図7. 新鮮羊膜と凍結羊膜の病理組織学的な評価

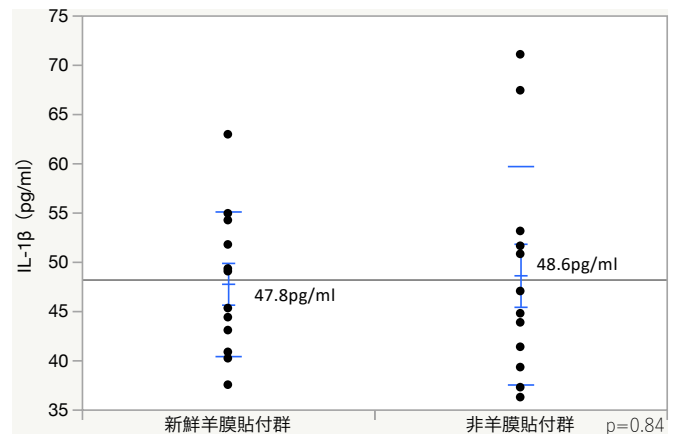


図8a. 新鮮羊膜貼付群と非羊膜貼付群のIL-1βのサイトカイン量の比較

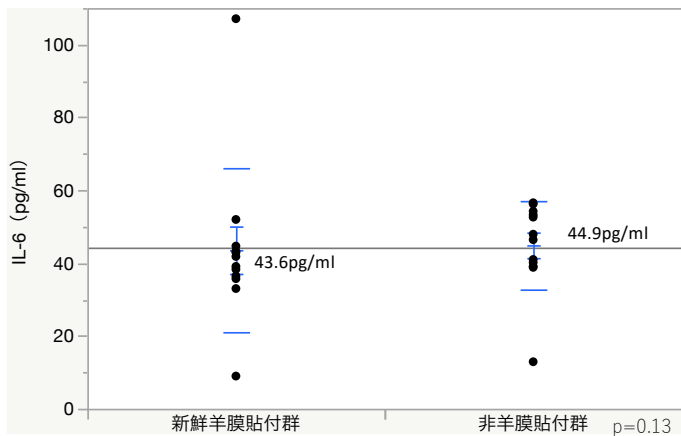


図8b. 新鮮羊膜貼付群と非羊膜貼付群のIL-6のサイトカイン量の比較

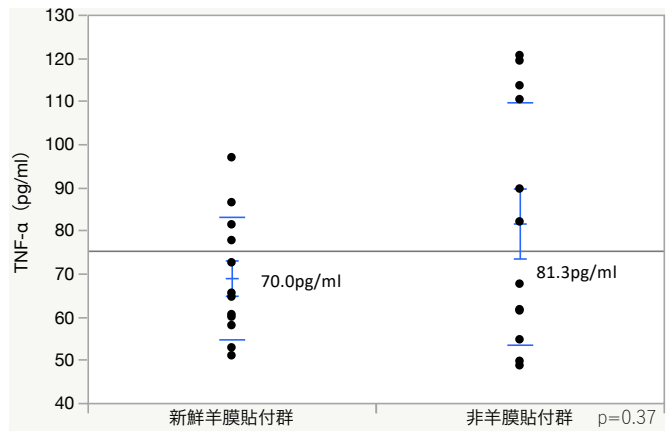


図8c. 新鮮羊膜貼付群と非羊膜貼付群のTNF-αのサイトカイン量の比較

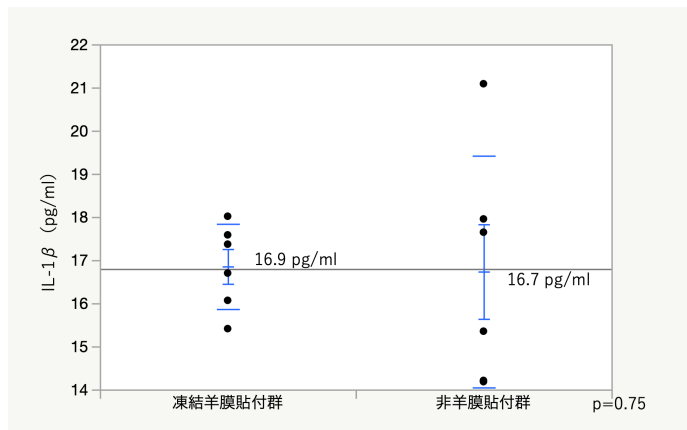


図8d. 凍結羊膜貼付群と非羊膜貼付群のIL-1βのサイトカイン量の比較

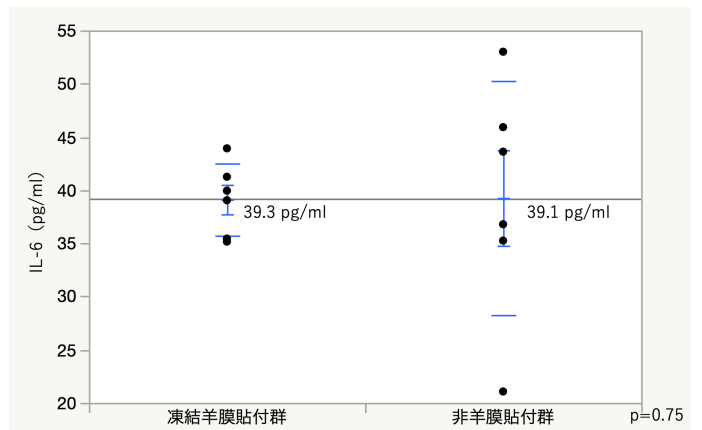


図8e. 凍結羊膜貼付群と非羊膜貼付群のIL-6のサイトカイン量の比較

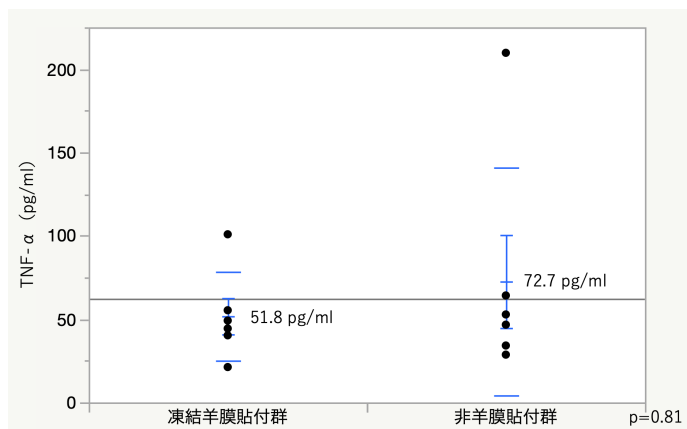


図8f. 凍結羊膜貼付群と非羊膜貼付群のTNF-αのサイトカイン量の比較

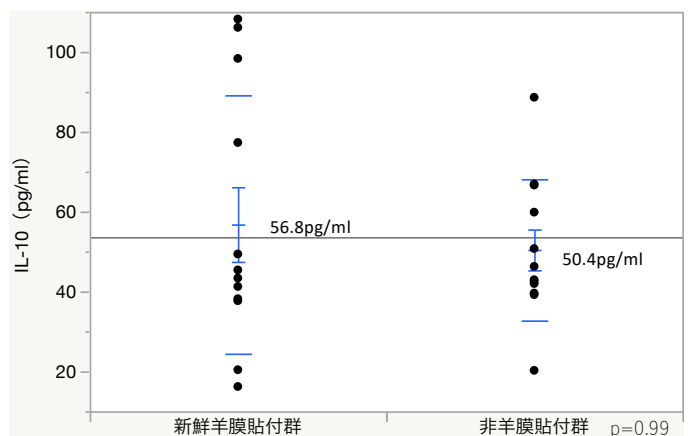


図8g. 新鮮羊膜貼付群と非羊膜貼付群のIL-10のサイトカイン量の比較



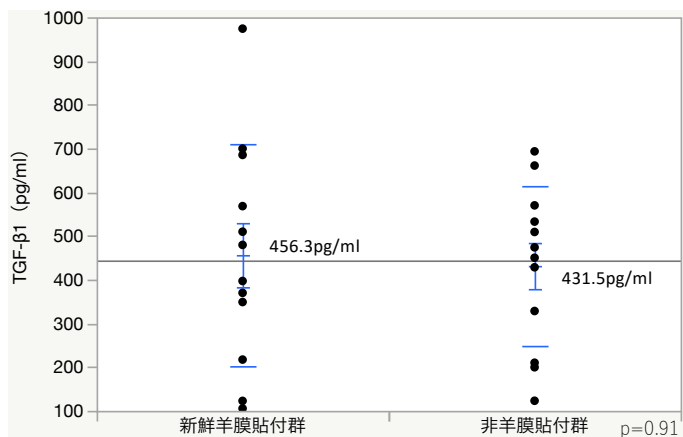


図8h. 新鮮羊膜貼付群と非羊膜貼付群のTGF-β1のサイトカイン量の比較

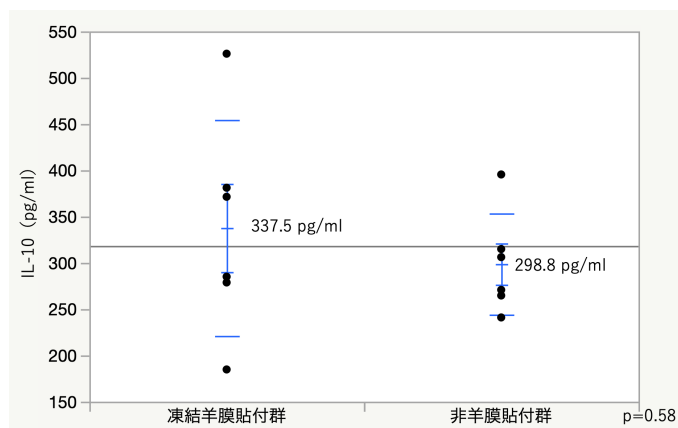


図8i. 凍結羊膜貼付群と非羊膜貼付群のIL-10のサイトカイン量の比較

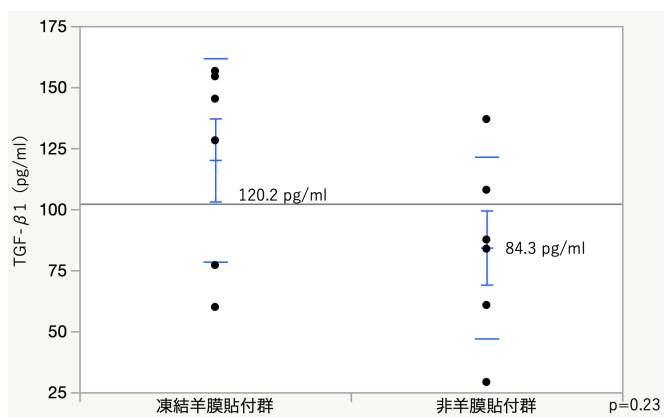


図8j. 凍結羊膜貼付群と非羊膜貼付群のTGF-β1のサイトカイン量の比較

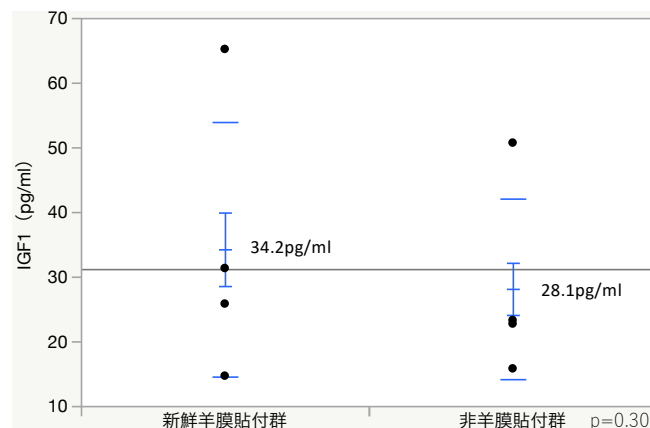


図8k. 新鮮羊膜貼付群と非羊膜貼付群のIGF-1のサイトカイン量の比較

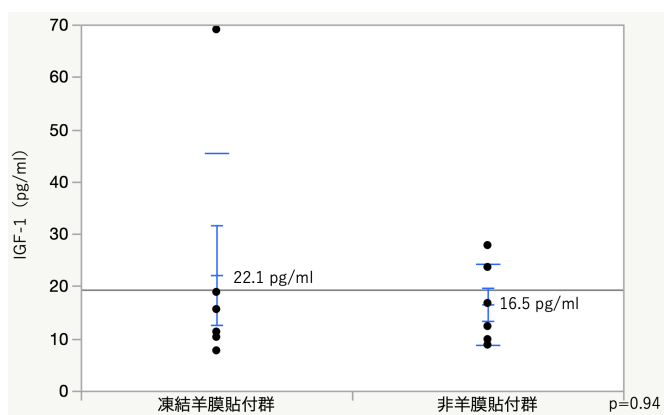


図8l. 凍結羊膜貼付群と非羊膜貼付群のIGF-1のサイトカイン量の比較