

キトサンオリゴ糖の静脈内投与が マウス口腔粘膜の創傷治癒に及ぼす影響

千葉 有 釜田 朗¹⁾ 菅島 正栄 田谷かほる
松渕 志帆 齋藤 高弘¹⁾ 浜田 節男

Effects of Intravenous Administration of Chitosan Oligosaccharide on the Wound Healing Process of Oral Mucosal Injury in Mice

Yu CHIBA, Akira KAMADA¹⁾, Shoei SUGASHIMA, Kahoru TAYA
Shiho MATSUBUCHI, Takahiro SAITO¹⁾ and Setsuo HAMADA

Chitosan is a natural macromolecule obtained by deacetylating chitin in a concentrated alkaline solution. Chitosan is pharmacologically active, having been shown to accelerate wound healing, inhibit tumor growth, and lower serum cholesterol. A low molecular weight form of chitosan, chitosan oligosaccharide, has also been developed, and its pharmacological activities are currently being investigated. However, the pharmacological actions that occur when chitosan oligosaccharide is administered systemically have not been fully elucidated. We previously investigated the effects of oral administration of chitosan oligosaccharide on wound healing of the oral mucosa *in vitro* and *in vivo*, and here, we investigated the effects of intravenous administration of chitosan oligosaccharides on healing of oral mucosal injury in mice. An Nd-YAG laser was used to damage the oral mucosa, and then various concentrations of chitosan oligosaccharide were intermittently administered intravenously. As a control, one group of mice underwent the wounding process, but received no chitosan.

After a certain period, the damaged oral mucosa was excised, and tissue sections were prepared for morphological observation. When compared to controls, animals treated with chitosan oligosaccharide demonstrated faster resolution of tissue unevenness and new capillary vessel formation, and greater fibroblast induction and subsequent collagen fiber production. Hence, intravenous administration of chitosan oligosaccharide might accelerate wound healing after oral mucosal injury.

Key words : chitin, chitosan, chitosan oligosaccharide, wound healing

緒 言

キトサンは自然界に広く分布する天然多糖であるキチンを脱アセチル化¹⁾することにより得られ、創傷治癒作用をはじめ、抗腫瘍作用、血清コレステロール低下作用²⁻⁴⁾などの薬理作用を有することが知られている。しかし、高分子多糖であるため水解することができず、これまではその用途が局所適用に限られてきた。

一方、現在ではキトサンを低分子化したキトサンオリゴ糖も開発可能となり、水溶性キトサンを調製することも容易になっている。そのため、近年ではキトサンの水溶液を用いたさまざまな基礎実験が試みられているが、キトサンオリゴ糖を全身投与した場合の創傷治癒過程に及ぼす影響については十分には検索されていない。そこで前回我々はキトサンオリゴ糖を腹腔内投与した場合の口腔粘膜における創傷治癒に及ぼす影響と、線維芽細胞の増殖に及ぼす影響について検討し、キトサンオリゴ糖の腹腔内投与がマウス口腔粘膜の創傷治癒を促進する可能性が有る事を報告した⁵⁾。今回、我々はキトサンオリゴ糖を静脈内投与した場合の創傷治癒過程に及ぼす影響について、H.E. およびアザン染色による病理組織標本を作成して形態学的な検索を行ったので報告する。

材料および方法

1. 実験薬物

キトサンオリゴ糖（以下COS-Y, YSK焼津水産化学工業株式会社、静岡）を、それぞれ0.1% (pH4.88)、1% (pH4.70) および5% (pH4.66) となるように滅菌生理食塩液で溶解しキトサンオリゴ糖液としたのち、0.45 μ mのフィルターを通過させて実験に供した。なお対照には注射用滅菌生理食塩液を用いた。表1にCOS-Yに含まれる各オリゴ糖の割合を示す。

2. 実験動物

7週齢のSPF・ICR雄性マウス（日本SLC、浜松）1群5～6匹を用いた。飼育は本学動物実験研究施設で行い、室温22～24℃・湿度50～60%の環境下でマウス用固形飼料（CE-2、日本クレア、東京）と水道水を自由に摂取させた。

表1 COS-Yに含まれる各オリゴ糖の割合

Chitobiose	(GlcN ₂)	9.8%
Chitotriose	(GlcN ₃)	23.8%
Chitotetraose	(GlcN ₄)	27.9%
Chitopentaose	(GlcN ₅)	23.9%
Chitohexaose	(GlcN ₆)	9.9%
Chitoheptaose	(GlcN ₇)	4.7%

(D-glucosamine : GlcN)

表2 レーザーの照射条件

項 目	条 件
発振波長	1.06 μ m
パルスエネルギー	100mJ
パルスレート	20pps
出力	2.0W
照射時間	5sec

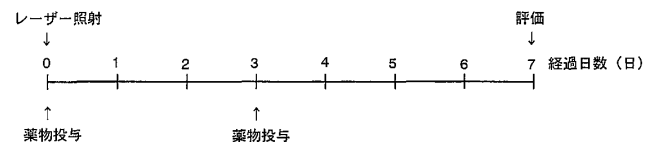


図1 実験のスケジュール

3. レーザーの照射と薬物の投与

1週間の予備飼育を終えたのち、マウス尾静脈に1/5 静注用注射針を装着したシリンジを用いて0.1%、1%および5%のキトサンオリゴ糖液、あるいは生理食塩液を体重10gあたり0.1mlの割合で投与した（キトサンオリゴ糖の用量にして10mg/kg、100mg/kgおよび500mg/kg）。続いて1%ペントバルビタールナトリウム（ネンブタール注射液、大日本製薬、大阪）を5倍に希釈して背部皮下に投与、麻酔したのち、口角部口腔粘膜部にNd-YAGレーザー（オペレーターNd1, Yoshida, 東京）により侵襲を加えて創傷を形成させた。なお、各実験群間で侵襲の規模に差異が生じないように、レーザーの照射条件は常に一定にした（表2）。

その後、レーザー照射から3日後にキトサンオリゴ糖の静脈内注射を再度同様に行い、さらに4日間（レーザー照射から1週間）飼育した（図1）。

4. 組織標本の製作と染色

レーザー照射から1週間後、マウスの延髄を脱

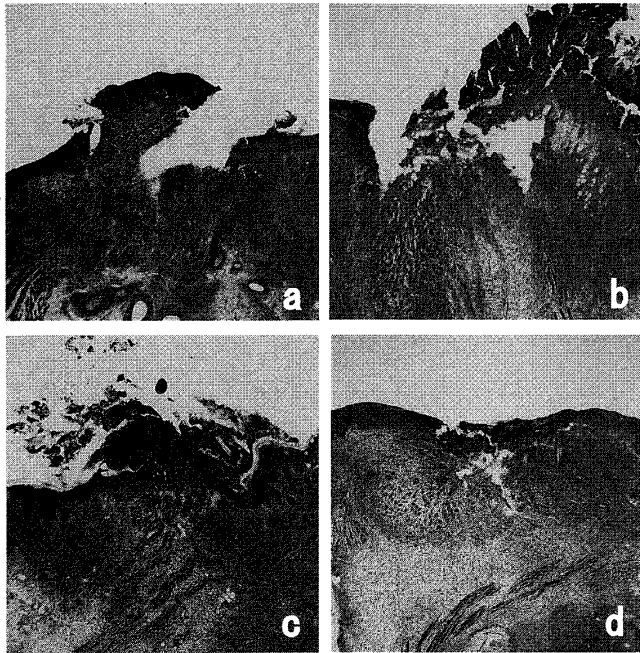


図2 H.E.染色による組織所見 (×10)

- a 対照群
- b 0.1%キトサン投与群
- c 1%キトサン投与群
- d 5%キトサン投与群

臼させて安楽死させたのち、レーザー照射部位の口腔粘膜を摘出して、直ちに10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬させ、3日間浸漬固定を行った。固定終了後、液体窒素で急速凍結を行い、続いてクリオスタットを用いて厚さ20 μm の矢状断連続切片を作成した。次にH.E.染色と、アザン染色を適法にしたがって施して病理組織標本を作成し、光学顕微鏡 (ECLIPSE E600, Nikon, 東京) により検鏡を行った。

結 果

1. H.E.染色による組織所見

1) 全体像 (×10倍)

対照群では、レーザー照射部位の表層は凹状に欠損しており、隣接する組織が茸状に隆起していた。また、粘膜固有層では比較的細胞が密に分布しており、さらにその下方に拡張した血管が多数観察された (図2 a)。0.1%キトサン投与群では対照群と同様にレーザー照射部位に凹状の欠損が見られ、その周囲組織は隆起し茸状を呈していた。また直下の粘膜固有層では細胞が密に分布していたが、さらにその下方では細胞の分布密度が粗な

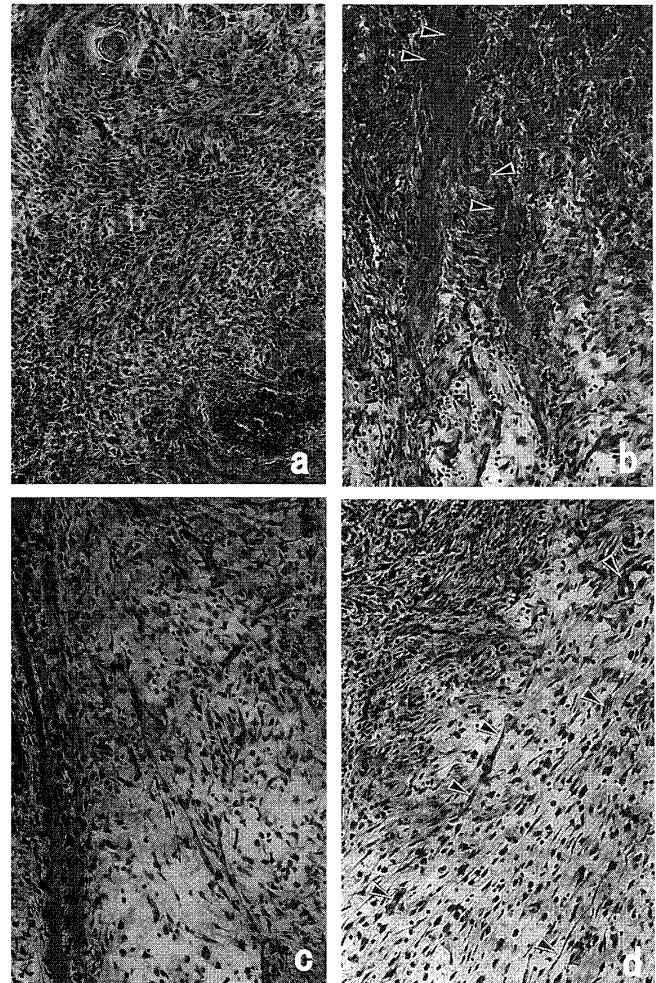


図3 H.E.染色による組織所見 (×40)

- a 対照群
- b 0.1%キトサン投与群
- c 1%キトサン投与群
- d 5%キトサン投与群

部位が存在していた (図2 b)。1%キトサン投与群のレーザー照射部位は、対照群および0.1%キトサン投与群と同様、表層に隆起が観察され上皮は変性していた。また、その下方の粘膜固有層では周囲と比較して細胞の分布密度が粗である部位が存在していた (図2 c)。一方、5%キトサン投与群ではレーザー照射部位の粘膜固有層に欠損が見られたが、表層には他の群のような隆起は観察されず比較的平坦であった。また固有層に欠損が見られた周囲組織には細胞が密に分布していたが、下方には比較的細胞の分布密度が粗な領域が認められ、その領域は他の群より大きかった (図2 d)。

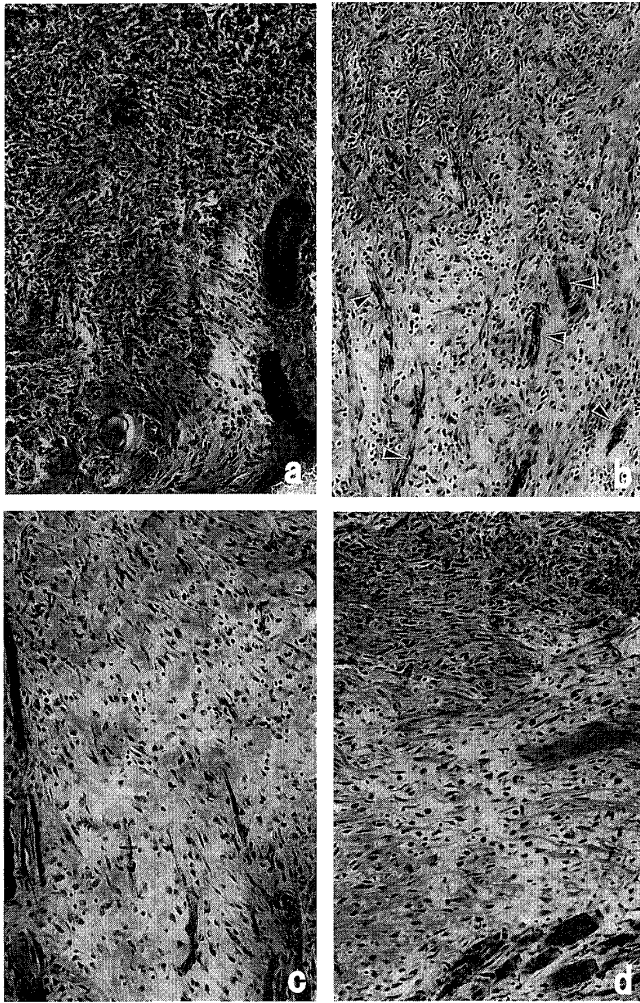


図4 アザン染色による組織所見 (×40)

- a 対照群
- b 0.1%キトサン投与群
- c 1%キトサン投与群
- d 5%キトサン投与群

2) 粘膜固有層の表層から中層 (×40倍)

対照群では、全体的に好中球の浸潤が見られ、その分布は密であった。また、線維芽細胞および血管はあまり観察されなかった (図3a)。0.1%キトサン投与群では、表層付近に好中球が密に浸潤し、その周囲に拡張した血管 (矢頭) が観察された。また中層付近では好中球は減少し、比較的細胞の分布密度は粗であった (図3b)。1%キトサン投与群では表層付近に好中球が観察されるものの、その数は対照群および0.1%キトサン投与群と比較して減少していた。また中層ではさらに好中球は減少し散在する程度となり、代わりに線維芽細胞と一部毛細血管も観察された (図3c)。

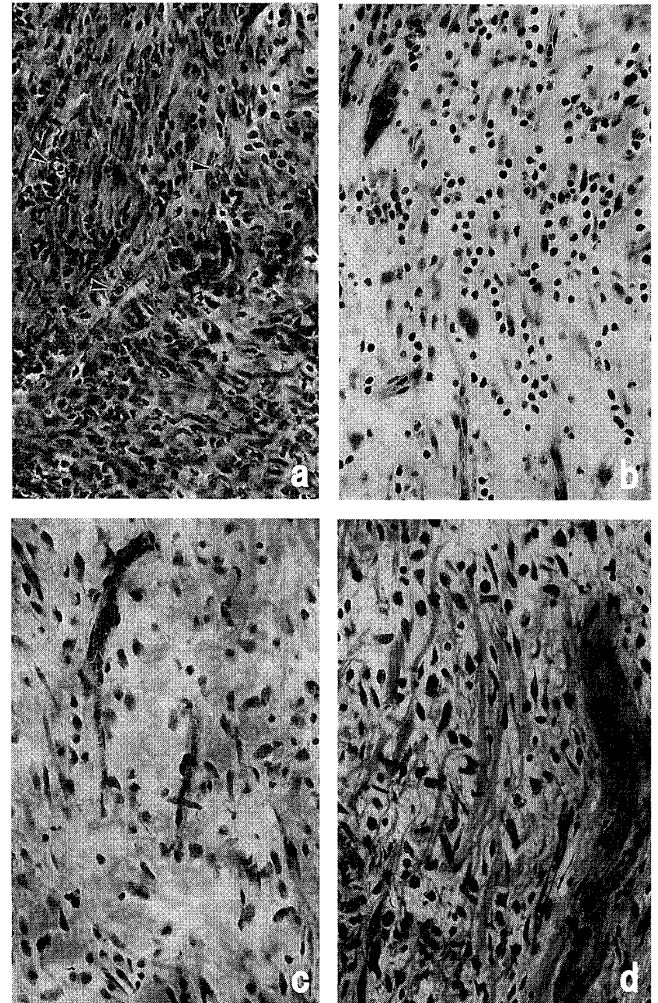


図5 アザン染色による組織所見 (×80)

- a 対照群
- b 0.1%キトサン投与群
- c 1%キトサン投与群
- d 5%キトサン投与群

5%キトサン投与群では1%キトサン投与群と類似し、表層付近に好中球が密に観察されたが、中層では好中球の数は減少するとともに比較的規則的に配列する線維芽細胞と毛細血管 (矢頭) が多数認められた (図3d)。

2. アザン染色による組織所見

1) 粘膜固有層の表層から中層 (×40倍)

対照群では表層から中層に多数の好中球が浸潤しており、その分布密度は密であった。また中層付近では拡張した血管が認められた (図4a)。0.1%キトサン投与群では表層付近に比較的多数の好中球の浸潤が観察された。中層では、好中球の数は減少し拡張した血管 (矢頭) が多数認めら

れた（図4b）。1%キトサン投与群では、対照群および0.1%キトサン投与群と比較して表層から中層にかけて好中球の数は減少し散在する程度であった。一方で紡錘形の線維芽細胞と一部コラーゲン線維が認められるようになり毛細血管も多数観察された（図4c）。5%キトサン投与群では、表層付近に好中球の浸潤が観察されるものの、中層では多数の線維芽細胞と比較的規則的に配列するコラーゲン線維が観察され、一部太い線維束も認められた（図4d）。

2) 粘膜固有層中層（×80倍）

対照群では、変性したコラーゲン線維とともに多数の好中球の浸潤が観察され細胞の分布密度は密であった。また、拡張した毛細血管（矢頭）も多数認められた（図5a）。0.1%キトサン投与群では、好中球の浸潤は認められるものの対照群と比較するとその数は減少し散在する程度であった。また毛細血管は観察されたが、線維芽細胞およびコラーゲン線維はあまり見られなかった（図5b）。1%キトサン投与群では、対照群および0.1%キトサン投与群と比較して明らかに好中球の数は減少するとともに、紡錘形の線維芽細胞と不規則な配列のコラーゲン線維が観察され、毛細血管も多数認められた（図5c）。5%キトサン投与群では1%キトサン投与群と同様に好中球の数は減少していた。一方、多数の線維芽細胞とともに規則的な配列を有するコラーゲン線維が認められ、一部太い線維束となっていた（図5d）。

考 察

キトサンはセルロースと類似の化学構造⁶⁾を有しキチン进行处理することで得られる。すなわちN-アセチルグルコサミン（GlcNAc）が β 1,4グリコシド結合した直鎖の多糖を脱アセチル化したものがキトサンである。これまでこれらキチン・キトサンと、そのオリゴ糖に対する生体反応については多数の検討がなされ、マクロファージをはじめとする免疫担当細胞の活性化やIL-1、IL-2およびIL-8などを誘導すること^{7,8)}、さらにPDGFやTGF- β 1などの血小板由来のサイトカイン放出能などについても報告がなされている⁹⁾。我々は前報⁵⁾において、キトサンオリゴ糖の全身投与

がマウス口腔粘膜の創傷の治癒を促進する可能性のあることを報告したが、皮膚の創傷は促進されないとする報告¹⁰⁾もみられ、キトサンオリゴ糖の全身投与が創傷の治癒過程に及ぼす影響については未だ不明な点が多い。そこで今回は薬物の吸収に関する影響を排除するためキトサンオリゴ糖の投与方法を静脈内投与に変更するとともに、従来のH.E.染色に加えてコラーゲン線維と毛細血管などを観察する目的で病理組織切片にアザン染色を施して観察を行ったが、その所見はキトサンオリゴ糖の腹腔内投与と同様に静脈内投与においても創傷の治癒が促進されたことを示唆するものであった。

すなわち、今回我々が用いたNd-YAGレーザーによる口腔粘膜の創傷は通常、レーザーの照射部位は蒸散・陥没し、その後反応性の周囲組織の隆起と、好中球を主体とする炎症性細胞の強い細胞浸潤がみられ、その後、下層からの線維芽細胞の誘導と上皮の形成が行われるが⁵⁾、今回の条件では5%キトサン群に周囲組織の隆起は認められなかった（図2a~d）。また、H.E.染色標本による観察から、キトサン投与群と比較して対照群においては炎症性の細胞浸潤が著しく、線維芽細胞および毛細血管の誘導も遅延している様子であった（図3a~d）。そこで、アザン染色を施した標本で粘膜固有層にかけて詳細に検索を行った結果、1%および5%キトサン投与群において多数の線維芽細胞の出現とコラーゲン線維の産生が見られ、さらに多数の毛細血管が確認され、コラーゲン線維については一部太い線維束になっていた（図4a~d, 5a~d）。以上のような結果は、キトサンの静脈内投与はYAGレーザーによる口腔粘膜の創傷において、レーザー照射部位における組織の陥凹を早期に解消するとともに、創傷の治癒過程に観察される毛細血管の新生と線維芽細胞の誘導、さらにそれらに続くコラーゲン線維の産生が促進されることを示唆していると思われる。

*In vivo*における薬物投与について、その投与方法と用量の決定が実験成績に与える影響は非常に大きいと言える。前報において腹腔内への連続投与を行った場合、10%まで濃度を上げると線維芽細胞がほとんど見られなくなり、毛細血管の新生

も逆に抑制される傾向を示した。今回、静脈内投与によりキトサンの血中濃度が急激に上昇した場合の創傷治癒に及ぼす影響は不明だったため、濃度を10%より落とすとともに、1週間に2回の間歇投与とした。実験の結果、対照群と比較してキトサン投与群における組織学的な相違点は散見されるものの、キトサンの投与量の相違による差異は認められなかった。この点については投与方法の違いによっては薬物の至適濃度と組織所見が異なってくることも考えられるため、今後はこれらについてのさらなる検討が必要であると考えられる。

一般に創傷の治癒とは傷害を受けた組織が、組織反応によって修復される過程をさし、そこには多数の細胞増殖因子が関与するとされている。すなわち血管の破壊と血小板の凝集に始まり、肉芽の形成と再上皮化を経て、マトリックスの形成と再構築期に至るまでに、血小板由来細胞増殖因子 (PDGF)、トランスフォーミング細胞増殖因子 β (TGF- β)、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、上皮細胞増殖因子 (EGF) をはじめ様々なサイトカインが関与している¹¹⁻¹⁴⁾。一方、創傷治癒とキチン・キトサンの関連について矢野ら⁹⁾は、ビーグル犬の血液を用いた実験で、キトサンによりPDGFおよびTGF- β 1の放出量が増加したとし、これらも創傷治癒が促進する一つの要因ではないかと述べ、また中村ら¹⁵⁾は線維芽細胞を用いてキチンのFGFおよびEGFの産生誘導能を調べた上で、キチンはマクロファージや線維芽細胞からの炎症性メディエーターの産生誘導能は低いにも関わらず、組織修復に関する因子は、むしろ高い産生誘導能を示したと報告している。しかし、未だ十分に明らかにされていない点も多い。

多様な薬理作用を示すキチン・キトサンが創傷治癒に関与するサイトカイン類にどのような影響を及ぼすか興味のある所だが、その一方、用いるキチンあるいはキトサンの分子量^{16,17)}、脱アセチル化度^{18,19)}、そしてオリゴ糖の場合は糖数^{7,20)}の相違により生物活性が大きく異なることもよく知られており、今後はこれらも含めて更に検討を進める必要があると思われる。

結 論

キトサンオリゴ糖の静脈内投与が創傷治癒過程に及ぼす影響について、マウス口腔粘膜の創傷に対し検討したところ、対照群と比較してキトサンオリゴ糖の静脈内投与群は、レーザー照射部位における組織の陥凹が早期に消失したのに加え、毛細血管の新生と線維芽細胞の誘導、さらに、それに続くコラーゲン線維の産生が促進される傾向にあり、キトサンオリゴ糖の静脈内投与は口腔粘膜の創傷治癒を促進させる可能性があることが示唆された。

文 献

- 1) キチン, キトサン研究会編: キチン, キトサン実験マニュアル 第1版; 9-17 技報堂出版 東京 1991.
- 2) Prudden, J. F., Migel, P., Hanson, P., Friedrich, L. *et al.*: The discovery of a potent pure chemical wound-healing accelerator. *Amer J Surg* **119**; 560-564 1970.
- 3) Suzuki, K., Tokoro, A., Okawa, Y., Suzuki, S. *et al.*: Effect of N-acetylchito-oligosaccharides on activation of phagocytes. *Microbiol Immunol* **30**; 777-787 1986.
- 4) Jennings, C. D., Boleyn, K., Bridges, S. R., Wood, P. J. *et al.*: A comparison of the lipid-lowering and intestinal morphological effects of cholestyramine, chitosan, and oat gum in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* **189**; 13-20 1988.
- 5) 千葉 有, 釜田 朗, 松渕志帆, 田谷かほるほか: キトサンオリゴ糖の創傷治癒促進作用. *奥羽大歯学誌* **31**; 23-32 2004.
- 6) Gardner, K. H. and Blackwell, J.: Refinement of the structure of β -chitin. *Biopolymers* **14**; 1581-1595 1975.
- 7) 鈴木茂生: キチン, キトサンおよび低分子同族体オリゴ糖の生物活性. *Biotherapy* **14**; 965-971 2000.
- 8) Mori, T., Okumura, M., Matsuura, M., Ueno, K. *et al.*: Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts *in vitro*. *Biomaterials* **18**; 947-951 1997.
- 9) 矢野利映子, 岡本芳晴, 宮武克行, 南 三郎: キチン, キトサンの血小板に及ぼす影響. *日獣医誌* 131回講演要旨集; 136 2001.
- 10) 島村きみ, 石田陽子, 二山未央, 村中美緒ほか: キトサンオリゴ糖がマウスの皮膚創傷治癒過程に及ぼす影響. *形態・機能* **4**; 66 2006.

- 11) 竹原和彦：創傷治癒と細胞増殖因子. *Surgery Frontier* **10**; 127-130 2003.
 - 12) 木山輝郎, 恩田昌彦, 徳永 昭, 小野寺博之ほか：創傷治癒への新しい関与. *Biomedical Perspectives* **9**; 214-219 2000.
 - 13) 川畑正博：増殖因子の創傷治癒における役割—TGF- β に焦点をあてて—. *救急医学* **24**; 1595-1598 2000.
 - 14) 曾我部浩一：マウス抜歯創傷治癒過程におけるサイトカインの局在. *九州歯会誌* **50**; 173-182 1996.
 - 15) 中村 幹, 徳久道生, 富永尚宏, 空閑祥浩ほか：キチンの線維芽細胞増殖および上皮成長因子産生に及ぼす影響. *日口外誌* **43**; 157-164 1997.
 - 16) 松永常典, 柳口嘉次郎, 山田志津香, 林 善彦：生理活性天然素材キトサンの分子量の違いが歯髄創傷治癒に及ぼす影響. *日歯保存誌* **47**; 16 2004.
 - 17) 岡本芳晴, 名古屋禎, 佐宮武克行, 藤瀬 浩ほか：キチン・キトサンの分子量が創傷治癒に及ぼす影響. *日獣医誌* 129回講演要旨集; 154 2000.
 - 18) 富永和宏, 富永尚宏, 徳久道生, 木船絃爾ほか：歯肉由来線維芽細胞様細胞および骨芽細胞に及ぼすキチンの脱アセチル化の影響. *日口外誌* **44**; 941-950 1998.
 - 19) 日高勇一, 森 厚二, 中島三晴, 五十嵐俊男ほか：キチン・キトサンに関する研究—その8. 合成ハイドロキシアパタイト含有キチン・キトサンフィルムのラット頭蓋骨骨膜下における病理組織学的検索—. *日口腔インプラント誌* **11**; 362-369 1998.
 - 20) 内田 泰：キチン・キトサンおよび関連化合物の抗菌性とその応用. *化学工業* **10**; 793-799 1991.
- 著者への連絡先：千葉 有, (〒963-8611)郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部口腔病態解析制御学講座歯科薬理学分野
Reprint requests: Yu CHIBA, Department of Oral Medical Science (Division of Dental Pharmacology), Ohu University School of Dentistry.
31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan