

Immunohistochemical and electron microscopic study of the biodegradation processes of chitin and chitosan implanted in rat alveolar bone.

池田 毅

【緒言】

キチンは、昆虫類、カニやエビの外骨格や細菌の細胞膜に存在し、N-アセチル-D-グルコサミンを基本構成単位とする生体内高分子のアミノ多糖体である。さらにキチンを脱アセチル化処理して得られるキトサンは抗菌性、マクロファージ(M ϕ)活性化能、創傷治癒促進能を有する生理活性物質として知られている。このような特性から医学領域では既に創傷被覆材、DDSにおける carieer、組織再生材など様々な成形体として臨床応用されている。創傷治癒におけるキチンおよびキトサンの特性としては、肉芽組織および表皮組織といった軟組織の再生や、骨および軟骨組織などの硬組織の治癒を促進し、しかも瘢痕拘縮が少なく、審美的に優れた治癒創を誘導するといった生体親和性を有している。

このような医学的応用、特に骨欠損症例では、まず骨補填材として填入されたキチンおよびキトサンが、生理的に吸収され、欠損部内に肉芽組織の増殖および脈管系の再生がおこり、その後欠損部が骨組織に置換されることが重要である。

そこで本研究の目的は、動物実験において骨欠損部に填入されたキチンおよびキトサンの生体内における分解動態について、免疫組織化学的および電子顕微鏡観察により微細状態を検討することである。

【材料および方法】

6週令 Wistar 系雄性ラットを用い、腹腔内麻酔を施し、下顎骨下縁に沿って皮膚切開を行い、骨膜を剥離し骨面を露出させた後、下顎骨下縁とオトガイ孔の間の骨表面から直径約 1mm、深さ約 1mm の円筒形骨窩洞を形成した。その歯槽骨内に脱アセチル化度(DDA)の異なる3種の綿状キチン・キトサン(DDA=0, 50, 100%)を填入した。術後1、2、3、4週間経過時に各々のラットを全身麻酔下で灌流固定した後、キチンおよびキトサンが填入されている部位を周囲の骨と共に注意深く摘出した。試料は通法に従いアルコール脱水後、低粘性アクリルレジンである LR-Gold にて包埋した。厚さ約 2 μ m の準超薄切片を作製し、トルイジンブルー染色およびウサギ抗ラットリゾチーム抗体を用いて Immunogold-silver staining を行い免疫組織化学的にリゾチームの局在性を光学顕微鏡にて観察した。また生体内における分解動態の詳細を確認するため、超薄切片を調整後、wheat germ agglutinin を用いたコロイド金蛋白コンプレックスで染色した後、透過型電子顕微鏡観察を行った。

なお、動物実験については、長崎大学先導生命科学支援センター動物実験施設へ実験計画を申請し承認を得た上で実施した。

【結果】

1) 免疫組織化学的検討

脱アセチル化度0%群において、術後1週間経過時には移植したキチンの周囲に多数のリゾチーム陽性の好中球が集積しており、組織の初期炎症反応が著明であった。移植後2週間経過時には炎症反応を示す所見はなく、経時的に M ϕ や多核巨細胞が増加しており4週間経過時にはそれらを含んだ肉芽組織がキチンを取り囲む像が確認できた。また、リゾチーム陽性細胞は3

週間経過時まで観察された。

脱アセチル化度 50%群では、術後 1 週間以内に急性炎症反応は消失しており、単球や M ϕ がキチンに近接していた。また、リゾチーム陽性細胞が若干確認できたが、2 週間経過時にはみられなかった。3 週間経過時には、脈管形成を伴った線維性結合組織によるキチンの被包化が明らかとなった。

脱アセチル化度 100%群では、術後 1 週間経過時に M ϕ や多核巨細胞などの貪食系細胞浸潤が確認され、毛細血管をはじめ脈管系組織の増殖が同時期の 50%群よりも著明であった。リゾチーム陽性細胞は 1 週間以内に消失しており、経時的に肉芽組織の新生が増大していた。

2) 透過型電子顕微鏡観察

脱アセチル化度 0%群においては、術後 1 週間経過時に多数のライソゾームを含んだ好中球がキチンに近接していた。また 2～3 週間経過時には、M ϕ や多核巨細胞が近接しており、4 週間時にはコラーゲン線維によりキチンを被包した線維芽細胞が確認された。しかしながら、キチン表層部における貪食像を呈する変化はみられなかった。

脱アセチル化度 50%群においては、術後 3～4 週間経過時、貪食系細胞内のファゴゾームが金コロイドで標識されたキチンを取り込んでいる像が確認された。

脱アセチル化度 100%群においては、キトサン表層部の不整状変化が 50%群よりも著明であり 3 週間以内にはキトサンを取り込んだファゴゾームを有する多核巨細胞が多数みられ、キトサン自体も線維性組織に被包されていた。

【考察】

本研究および我々の以前の報告より検討した結果、脱アセチル化度が高いものほど、すなわちキチンよりもキトサンの方が、より早期に生体内で分解吸収を受けることが明確となった。またその骨組織内での分解様相は、リゾチームなどの生体内酵素による影響よりも、多核巨細胞などの貪食作用による効果が主体であることが示唆された。さらに脱アセチル化度 100%群は、1 週間以内に急性炎症反応が消退しており、リゾチーム分泌もほぼみられないことから、より生体親和性があり骨組織再生には適した生体材料であると考えられた。