

論文の内容の要旨

氏名：三宅悠介

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：An experimental study of wound healing after applying a gelatin-based hydrogel sheet to the resected part of rat submandibular gland

（ラット顎下腺切除部にゼラチンベースハイドロゲルシートを用いた創傷治癒の研究）

唾液腺炎や唾石症などの疾患あるいは外傷や放射線治療などによって、唾液腺組織が変性、萎縮、壊死に陥った場合、臨床的には種々の対処が必要となる。しかし、対処や治療法の基盤となるエビデンスを構成する唾液腺組織の萎縮・再生過程は、未だ十分には解明されていない。このため、実験動物の唾液腺に、導管結紮、外科的切除あるいは放射線やレーザーの照射などの侵襲を加え、その後の唾液腺組織の萎縮と再生過程を病理組織・免疫組織化学的に検討する研究が現在も積み重ねられている。

唾液腺の外科的部分切除後の再生では、導管断端部あるいは介在部導管の上皮細胞の分裂・増殖によって腺房細胞が新生されると考えられている。しかし、新生を担う細胞の増殖や分化が生じる時系列・範囲と侵襲の種類・強度との関係については未だ不明な点が多い。萎縮・再生過程における epidermal growth factor, fibroblast growth factor, nerve growth factor などの成長因子の局在パターンは免疫組織化学的な研究によって報告されているが、治療目的での成長因子等の投与を至適化させる量的及び時空間的な情報に関わる基礎研究は少ないのが現状である。

近年開発されたゼラチンベースの徐放用ハイドロゲルシートはこうした研究に役立つと考えられる。このシートは、成長因子などの生理活性物質について、①局所投与を可能にし、②分解や失活を低減・安定化し、③約2週間の徐放が期待できる、などといった特徴を有するとされる。そこで、著者は成長因子の局所投与・徐放実験に先行する基礎研究として本研究を企画した。すなわち、実験的侵襲を加えるための規格化した外科的施術の下で成長因子を含まない徐放シートを埋入した場合、唾液腺組織において時空間的にどのような変化と再生が生じるのかを病理組織学的に検討した。

まず徐放シートを移植するために、ラット顎下腺に直径3mmの生検トレパンを用いて円形の切除部を形成した。ラット顎下腺は幅径よりも頭尾径がやや長い楕円体であるため、腺外導管や大きな脈管・神経が出入しない尾側中央に切除部を形成し、ここに同じ大きさの徐放シートを移植した。移植3, 5, 7, 10, 14, 21日後に顎下腺を摘出し、通法に従ってパラフィン切片を作製した。病理組織学的な観察のためにヘマトキシリン-エオジン染色を施した。腺房細胞とその成熟度の視認のために分泌顆粒を赤染させる過ヨウ素酸シッフ染色を行った。また、proliferating cell nuclear antigen (PCNA) の特異抗体による免疫組織化学的染色によって、侵襲部位における萎縮・再生過程での細胞増殖活性の分布・変化を検討した。

円形切除を行った結果、切除部の近傍には萎縮領域と壊死領域が認められ、切除部から離れた領域には組織学的な変化が認められなかった。後者をコントロールとしての正常領域とし、前2者に注目することとした。萎縮領域は、円形切除部の尾側端を除く周囲すなわち頭側と側方に出現し、壊死領域は切除部尾側端に出現した。

術後3日目、円形切除部に移植した徐放シートは縮小した。萎縮領域では、腺房細胞は萎縮・減少し、PCNA陽性の萎縮腺房細胞とPCNA陽性の介在部導管がわずかに観察された。壊死領域では、形態不明瞭で核が消失した腺房細胞や導管細胞が散在していた。しかし、核の消失をみない萎縮腺房細胞も存在し、それらの約半数はPCNA陽性であった。術後5日目、萎縮領域では、術後3日目と比べてPCNA陽性の萎縮腺房細胞が減少し、導管様構造物（線条部、介在部、顆粒管のどれとも判別できない管腔構造）の出現をみた。この導管様構造物を構成する細胞の一部はPCNA陽性であった。壊死領域においても、PCNA陽性の導管様構造物の出現が始まっていた。術後7日目、徐放シートのサイズは約3分の1にまで減少し、シートの網目構造も細くなっていた。萎縮領域でみられた腺房細胞やPCNA陽性の腺房細胞の数は本実験期間中で最も少なかった。壊死領域では、PCNA陽性の導管様構造物が5日目よりも増加していた。また、（腺房細胞再生過程に出現するとされる）扁平上皮細胞巣が観察され、その一部はPCNA陽性であった。術後10日目、徐放シートの存在は確認できたがその大部分が消失して

いた。萎縮領域では、再生した腺房細胞による終末部形態が観察されるようになり、同細胞のPAS陽性顆粒も増加していた。新生腺房細胞の多くはPCNA陽性であり、一方、PCNA陽性の導管様構造物は術後7日目よりも減少していた。壊死領域においても、新生腺房細胞が現れ始めており、PCNA陽性の導管様構造物は術後7日目よりも減少していた。術後14日目、徐放シートは確認できなくなっていた。萎縮領域では、術後10日目よりも新生腺房細胞の成熟が進行していた。すなわち、導管様構造物の端では成熟した腺房細胞に混ざって未熟な腺房細胞が観察され、PCNA陽性を示す腺房細胞および導管様構造物が減少していた。一方、壊死領域では、PCNA陽性の導管様構造物は術後10日目と同程度であり、PCNA陽性の新生腺房細胞数は術後10日目より増加していた。術後21日目、萎縮領域の組織像は、コントロールとした正常領域の組織像と同等レベルになっており、腺房細胞と導管様構造物でPCNA陽性を示す細胞数は術後14日目より減少していた。一方、壊死領域では、腺房細胞と導管様構造物でPCNA陽性を示す細胞数は術後14日目と比較して変化がなかったが、新生腺房細胞の総数は増加していた。

以上の時系列に沿った所見から、1) 製品スペックでの徐放は約2週間とされるが、シートは移植後10日目でその大部分が消失すること、2) 萎縮および壊死の領域いずれでも術後3-7日で萎縮、7-21日で再生としての組織変化が生じること、さらに、3) 再生過程での導管様構造物の出現状況および同構造でみられたPCNA陽性細胞数の推移から、腺房細胞の再生は導管から生じると考えられることが明らかとなった。

本研究では、円形切除部に徐放シートを移植するという新たな手法を試み、規格化した外科的施術や当該シート材料の移植という侵襲が唾液腺組織に引き起こす病理組織学的変化を調べた。切除部の位置に起因する唾液腺組織の侵襲応答・治癒過程とその時系列に関して得られた知見は、今後展開される成長因子等の徐放性投与実験の実施に有用であると考えられる。