

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 580 号		学位申請者	古閑 崇
審査委員	主査	田松 裕一	学位	博士 (歯学)
	副査	於保 孝彦	副査	山崎 要一
	副査	嶋 香織	副査	比地岡 浩志

主査および副査の5名は、令和2年12月22日、学位申請者 古閑 崇 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 口腔における瘢痕拘縮に対する今回の研究では、ラットの背部皮膚を使用したのが口腔内環境を再現できているのか。

(回答) 皮膚と口腔粘膜では、解剖学的な差異や、口腔は湿潤環境であるなどの違いがあるが、口腔での被覆材を用いた創部の観察は困難であるため、今回は背部皮膚を用いた。

質問2) ラットの背中の全層創部には何が含まれるか。

(回答) 今回の全層皮膚欠損は、ラット背部の筋膜を残し、その浅層部分を除去して欠損を作成した。

質問3) 広背筋まで切除すると長さが変わると考えられるが、広背筋は切除範囲に含まれるのか。また、切除されたなら、広背筋の再生まで観察したのか。

(回答) 今回は筋膜を残し、その浅層で切除しているため筋組織の損傷はないと考えられる。そのために、組織学的観察は筋組織まで行っていない。

質問4) 筋線維芽細胞はどのような細胞なのか。

(回答) 外部刺激により産生された TGF- $\beta$  の働きにより、線維芽細胞が筋線維芽細胞へと分化したものである。線維芽細胞と違い収縮能を持ち創部収縮の原因と考えられている。

質問5) この実験でいう瘢痕はどのような状況を指しているのか。

(回答) 本研究では、組織欠損部において、筋線維芽細胞を含む肉芽組織と上皮細胞によって置換された領域を瘢痕と定義している。

質問6) HxAlGlt $\alpha$  はどのような生体接着膜だったのか。

(回答) HxAlGlt $\alpha$  は構造的特徴として多孔性で、細胞の足場になりやすく、分子学的特徴として Hx 基を含み、VEGF などの成長因子との結合能による血管新生や細胞増殖の促進が期待できる素材である。

質問7) HxAlGlt $\alpha$  と AlGlt $\alpha$  にはどのような違いがあるのか。

(回答) HxAlGlt $\alpha$  と AlGlt $\alpha$  の違いは Hx 基の有無であり、Hx 基を導入している HxAlGlt $\alpha$  の方がより多孔性を有し、構造強度の向上や毛細管現象で細胞や毛細血管を誘導しやすいと考えられている。

質問8) HxAlGlt $\alpha$  の孔の大きさどの程度の大きさか。

(回答) 孔の大きさは 70~100  $\mu$ m である。

質問9) AlGlt $\alpha$  と HxAlGlt $\alpha$  の成長因子に対する解離定数の違いについて説明せよ。

(回答) 解離定数は小さいほど結合能力が高く、HxAlGlt $\alpha$  は AlGlt $\alpha$  と比べて VEGF とは結合能が著しく高く、bFGF とは結合能が低いと考えられる。

質問10) 歯周病のエムドゲインが一時期、問題視されたことがあったが、タラのゼラチンを原料とした HxAlGlt $\alpha$  については、未知の感染物質に関する懸念は解決済みか。

(回答) 材料の使用は、タラにアレルギーがない限りは安全と考えられる。しかし、未知の感染物質に関する懸念は完全に払拭される訳ではない。

質問11) 多孔構造のために同じように筋線維芽細胞が毛細管現象で創部に吸い込まれて、発現促進的に働くようにも思われるが、そうではないのか。

(回答) ご指摘のように、多孔構造では毛細管現象によって多くの細胞の足場となり得る。そのために本研究における筋線維芽細胞においても HxAlGlt $\alpha$  が足場として機能したのではないかと考えられる。

質問12) 被覆材の素材の構造強度と筋線維芽細胞の発現抑制は、どちらが創部収縮の抑制に貢献していると考えられるか。

(回答) 今回使用した HxAlGlt $\alpha$  と CS との間には、明らかな構造強度の差はないと考えられる。したがって、創部収縮の違いは、HxAlGlt $\alpha$  群において筋線維芽細胞の発現抑制がより貢献したのではないかと考えられる。

## 最終試験の結果の要旨

質問 13) 血管の新生を CD34 で見なかったのは何故か。

(回答) 我々が用いた CD34 染色は、素材や肉芽組織全体が染まって、新生血管を特異的に染色することができなかった。そのために  $\alpha$ -SMA を用いた新生血管の評価を行った。

質問 14) コラーゲンの発現で I 型を染色した理由と III 型を染色しなかった理由は何か。

(回答) III 型コラーゲンは主に創傷治癒初期に観察されると報告されている。今回、癒痕形成を観察する上では長期である 28 日目を観察するため、先行研究を参考に I 型コラーゲンの評価を行った。

質問 15) 炎症の指標は、炎症性細胞のリンパ球と顆粒球を調べたのか。

(回答) 本研究では、創部に出現する炎症性細胞としてリンパ球と顆粒球の数を計測した。マクロファージについては計測していない。

質問 16) Fig. 2B の距離 X の 4 日目と距離 Y の 7 日目のグラフでは創部距離が HxAlGltN より CS の方が大きい。この現象を説明できるか。

(回答) 両群間に有意差は認めないので、偶然的に起こったのではないかとと思われる。

質問 17) Fig. 2B の Y 軸方向 4 日目の HxAlGltN は元の創部より大きくなっている (100% を超えている) が、この理由を説明できるか。

(回答) ラットがラットジャケットを外そうとするなど、運動を制御することができなかったために、創部の伸展が起こったのではないかと考えている。

質問 18) Fig. 2B の HxAlGltN が X 軸方向と Y 軸方向で距離が長いという結果と、Fig. 2C の創部面積は CS の創部面積が最も大きいという結果に相反するように見えるが説明できるか。

(回答) Fig. 2B はマーキング間距離を計測しているが、Fig. 2C は欠損組織の大きさだけをみている。X, Y の距離は創部収縮に影響を受けるが、創部の大きさは、創部収縮だけでなく上皮新生も合わさった結果であるので、このような違いが生じたのであろうと考えられる。

質問 19) Fig. 3 の黄色い波線の右側は何を指しているのか。

(回答) 黄色い波線上部は新生上皮で右側は創傷被覆材と肉芽組織を指している。

質問 20) Fig. 3 の HxAlGltN は術後 7 日目の  $70\mu\text{m}$  から 28 日目の  $50\mu\text{m}$  まで薄くなっており、健常皮膚の  $60\mu\text{m}$  に達していない。このような変化は、創部の封鎖にとって有益な効果を発揮していたと言えるのか。

(回答) HxAlGltN 群の上皮の厚みは健常皮膚までは厚くはないが、CS 群より厚く、健常に近い上皮の厚みとなっているので有益であると考えられる。

質問 21) Fig. 4 の HxAlGltN は血管面積が 7 日と 28 日では 10 倍程度増加しており、血管も大型化して成熟過程にあると考えられるが、組織写真では創部の治癒状況が促進されているようには見えない。なぜか。

(回答) 組織写真は、管腔形成を伴う血管と伴わない  $\alpha$ -SMA の両方が描出されているので差があるようにみえないが、管腔構造を伴う陽性細胞はハイブリッドセルカウンターにて有意な差を以て計測された。

質問 22) Fig. 4C の HxAlGltN で筋線維芽細胞の発現抑制をきたしたメカニズムは説明できるか。

(回答) メカニズムまでは今回は解析していないが、HxAlGltN を適用することにより外部からの刺激がないことや、TGF- $\beta$  が減少し筋線維芽細胞が抑制されたのであろうと推定している。

質問 23) Fig. 5 のフィブロネクチンの 4 日目、7 日目で発現があまり認められない理由は、上皮化の進展が遅いという意味か。

(回答) Fig. 3 の上皮新生距離と Fig. 5 のフィブロネクチンの発現の関連性を述べることは、本研究結果からだけでは難しいと思われる。

質問 24) 癒痕は異常なコラーゲンの増加とあるが、Fig. 6 で HxAlGltN の I 型コラーゲンが多かったのはどう解釈するか。

(回答) 両被覆材共にコラーゲン由来であるため素材そのものが創傷治癒に利用され、陽性に染色されたことが影響している可能性がある。また、HxAlGltN では、創部治癒の進行が進み、成熟した肉芽組織に認められる I 型コラーゲンが多くみられたことも考えられる。

質問 25) この素材の吸収性はどのようなものだったのか。

(回答) HxAlGltN は 7 日目には肉芽組織内に少量素材の形状を保っていたが、28 日目には HxAlGltN 構造体はなく、吸収されたと考える。

質問 26) 筋線維芽細胞の発現が少ないことは、臨床における創部治癒の面からはマイナスなのではないか。

(回答) ご指摘の通り、創部の閉鎖の観点からは、HxAlGltN は創部の閉鎖遅延を招いていると考えられるが、創部収縮においては過度な収縮を抑制していると云える。

質問 27) リミテーションという観察期間が短いとは実際どの様な状態になるまで観察したかったのか。

(回答) 創傷治癒過程でいう成熟期まで観察できれば更に知見が増えるのではないかと考えている。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (歯学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。