

氏 名	三島（鈴木） 慶
（ふりがな）	（みしま（すずき） けい）
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 授 与 番 号	甲 第 75 号
学 位 審 査 年 月 日	令和 6 年 1 月 19 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 名	Topical Administration of Freeze-Dried Sheets of Hyaluronic Acid Promotes the Healing of Oral Mucositis in a Hamster Model (凍結乾燥ヒアルロン酸シートの局所投与はハムスターモデルにおける口腔粘膜炎の治癒を促進する)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 河田 了 教授 廣瀬 善信 教授 根尾 昌志

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《研究目的》

口腔粘膜炎は、発症頻度が高く治療に難渋する疾患の一つである。特に抗がん剤や放射線照射によって生じる口腔粘膜炎は、強い疼痛により構音障害、嚥下障害、睡眠障害を引き起こすため患者の QOL を著しく低下させる。これまで炎症粘膜部のクーリング、局所麻酔薬の塗布、ステロイド希釈液による含嗽などが治療法として試みられてきたが、有効な治療法は確立していない。

ヒアルロン酸(HA)は皮膚・粘膜での高い保湿効果が明らかにされており、口腔粘膜炎に対してジェルやスプレー状にして用いられている。しかし、口腔の場合唾液や嚥下などによって HA を口腔粘膜に長時間保持させることが困難なため、HA に対する十分な治療効果の検証はなされていない。申請者の研究グループは、凍結乾燥法により HA をシート状にすることに成功した。HA をシート状にして口腔粘膜に付着させることによって、薬剤が直接

患部に作用することができると考えられる。

本研究は、HA シートの粘膜炎治癒効果を検証するために、ハムスターを用いて口腔粘膜炎の動物モデルを作製し、凍結乾燥法で作製した HA シートの口腔粘膜炎に対する効果を評価することを目的として実施した。

《材料と方法》

実験動物として、シリアンハムスター（6 週齢雄）を用いた。凍結乾燥 HA シートは、HA 10 mg を室温で蒸留水 4.0 g に溶解し、直径 3.4 cm のシャーレに加え、凍結乾燥機（FDU-2200、東京理化器械）を用いて 30 Pa で 2 日間凍結乾燥する方法で作製した。対照としてカルボキシメチルセルロース（CMC）を同様の方法で作製したシート（CMC シート）を用いた。

ハムスターの実験的口腔粘膜炎は、全身麻酔下で頬粘膜に酢酸溶液を含む正方形のろ紙（8mm×8mm）を貼付することによって誘発した。粘膜炎誘発モデルとして適切な条件を決定するために、酢酸の濃度は 30%、50%、70%で、貼付時間は 3 分と 6 分で検証した。さらに、酢酸貼付後に誘発された口腔粘膜炎を肉眼的、病理組織学的に評価した。

肉眼的評価は、貼付 2 日後に粘膜炎と正常部位の境界が明瞭に区別できるようになったことから、この時点を Day 0 と設定し、連日、口腔粘膜炎の面積を測定することで炎症の状態を評価した。病理組織学的評価は、安楽死させたハムスターの頬粘膜を摘出し、10% 中性緩衝ホルマリンで固定後、パラフィン包埋し 5 μ m 連続薄切切片を作製した。切片はヘマトキシリン・エオジン（HE）染色、抗サイトケラチン抗体（マウスモノクローナル抗体）による免疫染色、アザン染色を行い、光学顕微鏡を用いて評価した。

口腔粘膜炎に対する HA シートの効果は、Day 0 から Day 4 までの 5 日間、粘膜炎を起こした部位に連日 HA シートを貼付した HA 群、対照として CMC シートを貼付した CMC 群、何も貼付しない Control 群の 3 群を対象に、肉眼的（各群 n = 8）、病理組織学的（各群 n = 6）に検討した。統計処理は JMP Pro 15.1.0、Dunnett' s test. ($p < 0.05$) を用いた。

《結果》

・粘膜炎誘発モデルの作成

50%酢酸を3分間塗布する条件で誘発したDay 0の粘膜炎領域の面積は、ろ紙の面積とほぼ同じで、炎症を起こした面積のばらつきが最も少なく、また病理組織学的に十分な炎症所見が観察された。このことから、この条件を粘膜炎誘発モデルとして用いた。

・粘膜炎の治癒過程

粘膜炎誘発モデルを用いて、経時的な粘膜炎の修復過程を肉眼的に観察した。粘膜炎を起こした部位の面積はDay 9までに急激に減少し、その後も緩徐に減少を続け、Day 27には肉眼的に消失した。病理組織学的には、Day 0に観察された粘膜の潰瘍や浮腫性変化は、Day 9までに治癒する過程が観察され、Day 27には完全に消失した。以上の結果からHAシートの効果を評価する観察期間はDay 0からDay 9が妥当であると考えられた。

・HAシートの有効性の検討

Day 0からDay 9までの各シート群の粘膜炎部への貼付による治癒効果を、肉眼的、病理組織学的に評価した。HA群は、Control群と比較して粘膜炎の面積はDay 2 ($p<0.01$)、Day 3 ($p<0.05$)、Day 4 ($p<0.01$) で、それぞれ有意な縮小を認めた。CMC群は、Control群と比較して有意差がなかった。Day 2の病理組織像では、HA群は、CMC群、Control群と比較して、炎症性細胞浸潤や浮腫性変化の顕著な減少、良好な粘膜上皮の再生、表層コラーゲン線維の平行性を維持した太い束が観察された。

《考察》

HAは細胞外マトリックスの重要な構成成分であり、創傷治癒に重要な役割を果たすことが古くから知られている。近年、HAが生体内で保湿効果だけでなく様々な活性を示すことが解明され、生体材料、医薬品として研究・開発が進んでいる。本研究では、酢酸を用いた口腔粘膜炎誘発の動物モデルを決定し、申請者らの研究グループが凍結乾燥法で新規作製したHAシートが口腔粘膜炎の治癒を促進するか否かを検証した。

肉眼的、病理学的観察では、粘膜炎部位にHAシートを貼付した群は、Control群と比較して有意に治癒が早かった。一方、CMCシート群はControl群と比べるとやや早い傾向が

みられたものの有意差はなかった。CMC シートには口腔粘膜炎を口腔環境の刺激から保護する作用があると考えられるが、HA シートはこの物理的保護効果に加え、HA の持つ保湿効果、抗炎症作用および抗浮腫作用によって創部の細胞増殖・分化を高め、粘膜炎治癒を促進したものと考えられる。しかしながら、詳細な治癒促進のメカニズムについてはさらなる検討が必要である。

口腔粘膜炎の病態を検討する動物モデルは、過去にいくつか報告されているが、いずれも作製が困難で再現性に課題があった。本研究で申請者らが考案した口腔粘膜炎誘発モデルは、一定濃度の酢酸を染み込ませたろ紙をハムスター頬粘膜に短時間塗布することにより口腔粘膜炎を誘発するもので、容易でかつ再現性の高いものであった。

近年、開発されている分子標的薬や免疫チェックポイント阻害剤などの副作用、造血幹細胞移植前処置時などの有害事象に口腔粘膜炎が挙げられる。口腔粘膜炎が重症化した場合は、やむなく治療の中断に至る症例がある。こうした治療中の有害事象の軽減や予防法の確立は口腔外科領域では喫緊の課題である。HA シートの有効性をハムスター口腔粘膜炎誘発モデルで実証した本研究結果は、今後の臨床での HA シート実用化の基礎的データとなることが期待される。

論文審査結果の要旨

口腔外科領域において、口腔粘膜炎は単純なアフタ性口内炎、再発性口内炎、ウイルス性口内炎、薬剤誘発性の口腔粘膜炎、頭頸部領域の放射線照射による口腔粘膜炎など、多彩な原因から発症するもので、その治療に難渋することが多い。重症化した口腔粘膜炎は、強い疼痛により構音、嚥下、睡眠といった重要な機能が著しく障害される。しかし口腔内の唾液分泌や嚥下などによる口腔運動により薬剤の患部への留置が困難であるため、その治療は確立しておらず、臨床医は対応に苦慮している。

申請者は、皮膚・粘膜での保湿効果や様々な生体活性が明らかにされているヒアルロン酸 (HA) に着目し、長期的な効果を発揮することが可能な凍結乾燥法 HA シートを用いて、ハムスター頬粘膜を用いた粘膜炎誘発動物モデルにおける粘膜治癒への修飾効果を検討した。粘膜炎誘発モデルとしては、50%酢酸を 3 分間塗布する条件とした。経時的な粘膜炎の修復過程は肉眼的および病理組織学的に観察し、観察期間は酢酸塗布後 2 日目の Day 0 から Day 9 とした。HA シートを用いた HA 群はカルボキシメチルセルロース (CMC) 群、Control 群と比較して粘膜炎の面積を有意に縮小させた。病理組織学的にも、HA 群では、CMC 群、Control 群と比較して、炎症性細胞浸潤や浮腫性変化の顕著な減少、良好な粘膜上皮の再生、表層コラーゲン線維の平行性を維持した太い束が観察された。以上より、凍結乾燥 HA シートの貼付による局所投与が口腔粘膜炎の治癒促進に有効であることが示唆された。

凍結乾燥 HA シートはヒトにおいても口腔粘膜炎の治療に有用な可能性があり、安全性などの実証を積み重ねることで臨床応用に近づくことが期待される。この一連の研究は、臨床現場のニーズを視野にいたした口腔粘膜炎治療法の実用化の一助となるものであり、極めて重要な研究成果と考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 13 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Journal of Hard Tissue Biology

32(4), 223-230, 2023 Oct

doi: 10.2485/jhtb.32.223