

皮膚・筋組織における癒着形成に対する 組織隔離法に関する実験的研究

(An experimental study on prevetion of adhesion between
the cutis and muscular tissue by using bioresorbable membrane)

学位論文内容の要旨

緒言

頭頸部悪性腫瘍の治療において、頸部郭清術は原発巣の制御とともに患者の予後を左右する重要な外科的治療法であるが、術後に皮下の癒着形成や癒着による頸部の硬直を生ずる場合が少なくない。このような障害は患者の QOL という観点から大きな問題であり、その軽減は患者の QOL の向上に直結するものと思われる。近年、産婦人科及び消化器外科領域において、腹膜の癒着防止に組織隔離材としてヒアルロン酸ナトリウムとカルボキシメチルセルロースからなるフィルム状の合成吸収性癒着防止材が使用され、その有用性が報告されている。しかし、皮膚・筋組織においては、著者の知る限り組織隔離法について検討している研究はなく、そのための基礎的実験モデルも確立されていない。

そこで本研究では、実験 1 として実験モデルを新たに考案し、実験 2 として皮膚・筋組織におけるヒアルロン酸ナトリウム／カルボキシメチルセルロース膜（以下 HA/CMC 膜）を用いた組織隔離法による癒着の軽減の効果について検討した。

実験 1 癒着モデルの作製

方法

生後約 7 週齢の Wistar 系雄性ラット 18 匹を用い、筋組織に与える障害の程度により次の A、B の 2 群に分けた。

A 群：左右の大腿部の皮膚に約 3×3 cm の L 字状切開を入れ、可及的に筋膜とその上層の筋層を大腿二頭筋側に残して剥離翻転した。次いで、剥離時に筋表面に残した筋層、筋膜とともに大腿二頭筋の筋束を約 10×15 mm の範囲で切除し、閉創した。

B 群：A 群と同様に皮膚弁を剥離翻転したのち、約 10×15 mm の範囲の大腿二頭筋を、底部に同筋の一部を残して、筋層、筋膜とともに切除した。

2 週、4 週、6 週後にそれぞれ安楽死させ、採取した試料より作成した連続切片に H.E. 染色を施し、病理組織学的検索により、2 つの群の創傷治癒過程を比較検討した。

結果

A 群は筋を筋束の深さで切除したため、創傷部の肉芽組織は、下層にある半膜様筋の筋上膜を介して筋と接しており、本実験期間中では皮膚と筋との明らかな癒着はみられなかった。これに対し、B 群では、筋上膜の欠如した大腿二頭筋の表面に接して肉芽組織が形成され、その後、筋周膜と連続した線維性の結合組織に置換され、4 週目には皮膚と大腿二頭筋の癒着が認められた。

以上より筋組織とともに、より肉芽組織に接する筋上膜に損傷を与えている B 群の方が、癒着形成モデルとして適切であると考えられた。

実験 2 組織隔離法を用いた実験

方法

実験 1 と同様、生後約 7 週齢の Wistar 系雄性ラット 30 匹を用い、実験 1 の結果に基づき、以下の実験を行った。

対照群は実験 1 の B 群と同様の処置を行った。実験群は対照群と同様に両側大腿二頭筋の切除を行った後、閉創前に筋切除範囲をやや超える大きさの HA/CMC 膜を創部に貼付して閉創した。

術後、経時的に実験群および対照群ともに試料を採取した。実験 1 と同様にパラフィン薄切切片を作製して HE 染色等を施し、病理組織学的検索を行った。また、創傷部の治癒過程における線維芽細胞の動態を明らかにするため、両群とも抗 BrdU モノクローナル抗体を用いた免疫染色を施し、BrdU 陽性細胞数の経時的变化を検索した。さらに、治癒過程における肉芽組織の量の指標とするため、皮膚と筋との間の肉芽組織の幅経を計測した。

なお、得られた測定値については、Mann-Whitney の U 検定を用いた統計解析を行った。

結果

病理組織学的所見

対照群では皮膚と筋との間に形成された肉芽組織が経時的に線維化し、3 週目には緻密な線維性結合組織になり、皮膚と筋との癒着がみられた。一方、実験群の損傷部には対照

群と比較し、長期にわたりマクロファージを含む肉芽組織がみられた。また、皮膚側および筋側の結合組織の間には一層の疎性結合組織が存在し、皮膚と筋との明らかな癒着は認められなかった。

組織計量学的所見

対照群では肉芽組織中の BrdU 陽性細胞数は経時的に減少する傾向を認めた。実験群でも経時的に BrdU 陽性細胞数の減少傾向を認めたが、常に対照群に対して大きい値を示していた。また、肉芽組織の幅経は対照群では3週目以降減少する傾向が著明であったのに対し、実験群ではこの減少傾向が緩やかで対照群に対して有意に高い値を示していた。

考察

癒着モデルの作製について

皮膚と筋との癒着には筋膜の存在が大きく関わっており、筋上膜を広範囲に欠如させる様な侵襲を与えることで、皮膚の結合組織と連続した癒着組織が筋周膜と連続し、結果的に皮膚と筋が癒着するものと考えられる。このことから、筋組織とともにより広範囲に筋上膜に損傷を与えたB群の方が、癒着形成モデルとして適切であると考えられた。

組織隔離法による癒着軽減効果について

実験2の対照群では肉芽組織は経時的に線維化する傾向を示し、新しく形成された結合組織中で産生されたコラーゲン線維束が経時的に太くなり、線維は緻密化し、皮膚と筋との癒着が認められた。一方、実験群では6週目においてもマクロファージの集塊を含む肉芽組織がみられた。組織計量学的所見においても、実験群では対照群に比べ、長期間肉芽組織が存在し、その線維化の過程が遅延していることを示していた。また、この肉芽組織の両端部では、皮膚側および筋側の線維化した肉芽組織の間に疎なコラーゲン線維束が介在し、皮膚と筋との明らかな癒着は認められなかった。このことより、このマクロファージを主体とする肉芽組織が皮膚と筋の間に介在している間に、皮膚側と筋側で形成された線維性結合組織がそれぞれ成熟し、緻密になる一方、マクロファージを含むこの肉芽組織は最終的に疎性の結合組織に置換され、皮膚側と筋側の線維性結合組織はこの疎性の結合組織を介して接するものと推測された。それ故、周囲の組織の線維化が完了するまでの期間よりも長く生体材料が組織に停滞していれば、物理的バリアとして有用であると考えられる。

この生体材料は腹膜の癒着防止に対しては良い成績をあげているとの報告があるが、腹膜の治癒過程と皮膚・筋組織の治癒過程は異なるため、この生体材料をすぐに臨床で応用することは今の段階では難しいが、組織に停滞する期間を調節することで皮膚と筋との癒着の軽減に応用できる可能性があるものと思われた。

結論

皮膚・筋組織における HA/CMC 膜の癒着軽減効果を明らかにする目的で、ラット大腿二頭筋の創傷治癒過程に及ぼす HA/CMC 膜留置の影響を、病理組織学的、免疫組織化学的および組織計量学的に検討し、以下の結論を得た。

1. 筋上膜を広範囲に欠如させるような侵襲を与えることで、皮下の結合組織と連続した癒着組織が筋周膜との間に形成され、皮膚と筋との癒着が認められた。
 2. HA/CMC 膜を留置した実験群の損傷部には対照群と比較し、長期にわたりマクロファージを含む肉芽組織がみられ、肉芽組織中の BrdU 陽性細胞数は高い値を示していた。
 3. 実験群では損傷後 6 週目においても肉芽組織がみられ、皮膚側および筋側の結合組織の間には一層の疎性結合組織が存在し、皮膚と筋との明らかな癒着は認められなかった。
- 以上より、HA/CMC 膜を皮膚と筋の間に留置することにより、皮膚と筋との癒着の軽減が計られることが明らかになり、皮膚・筋組織における癒着形成に対する組織隔離法として、HA/CMC 膜が有用であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則

副 査 教 授 向 後 隆 男

副 査 教 授 福 田 博

学 位 論 文 題 名

皮膚・筋組織における癒着形成に対する 組織隔離法に関する実験的研究

(An experimental study on prevetion of adhesion between
the cutis and muscular tissue by using bioresorbable membrane)

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。審査論文の概要は、以下の通りである。

本研究は、皮膚・筋組織におけるヒアルロン酸ナトリウム／カルボキシメチルセルロース膜（以下HA/CMC膜）の癒着軽減効果を明らかにする目的で、ラット大腿二頭筋の創傷治癒過程に及ぼすHA/CMC膜留置の影響を、病理組織学的、免疫組織化学的および組織計量学的に検討したものである。まず実験モデルを新たに考案し、次いで組織隔離法による癒着の軽減効果について検討した。

【実験1】

生後約7週齢のWistar系雄性ラット18匹を用い、筋組織に与える障害の程度により2群に分けた。A群：左右の大腿部の皮膚に約30×30 mmのL字状切開を入れ、可及的に筋膜とその上層の筋層を大腿二頭筋側に残して剥離翻転した。次いで、剥離時に筋表面に残した筋層、筋膜とともに大腿二頭筋の筋束を約10×15mmの範囲で切除し、閉創した。B群：A群と同様に皮膚弁を剥離翻転したのち、約10×15mmの範囲の大腿二頭筋を、底部に同筋の一部を残して、筋層、筋膜とともに切除した。2週、4週、6週後にそれぞれ安楽死させ、採取した試料より作成した連続切片にH.E.染色を施し、病理組織学的検索により、2つの群の創傷治癒過程を比較検討した。結果は、A群では、創傷部の肉芽組織は下層にある半膜様筋の筋上膜を介して筋と接しており、本実験期間中では皮膚と筋との明らかな癒着はみられなかった。これに対し、B群では、筋上膜の欠如した大腿二頭筋の表面に接して肉芽組織が形成され、その後筋周膜と連続した線維性の結合組織に置換され、4週目には皮膚と大腿二頭筋の間に癒着が認められようになり、癒着形成モデルとして用いることが確認された。

【実験2】

生後約7週齢のWistar系雄性ラット30匹を用いた。実験1のB群と同様の処置を行った後、実験群では両側大腿二頭筋切除部に筋切除範囲をやや超える大きさのHA/CMC膜を貼付し、一方対照群では何も貼付せずに閉創した。術後、経時的に実験群および対照群ともに試料を採取した。実験1と同様にパラフィン薄切切片を作製し

てHE染色等を施し、病理組織学的検索を行った。また、創傷部の治癒過程における線維芽細胞の動態を明らかにするため、両群とも抗BrdUモノクローナル抗体を用いた免疫染色を施し、BrdU陽性細胞数の経時的变化を検索した。さらに、治癒過程における肉芽組織の量の指標とするため、皮膚と筋との間の肉芽組織の幅経を計測した。えられた測定値については、Mann-WhitneyのU検定を用いて統計解析を行った。

病理組織学的検索において、対照群では皮膚と筋との間に形成された肉芽組織が経時的に線維化し、3週目には緻密な線維性結合組織になり、皮膚と筋との癒着がみられた。一方、実験群の損傷部には対照群と比較し、長期にわたりマクロファージを含む肉芽組織がみられ、また皮膚側および筋側の結合組織の間には一層の疎性結合組織が存在し、皮膚と筋との明らかな癒着は認められなかった。これらの結果は、HA/CMC膜を皮膚と筋の間に留置することにより、皮膚と筋との癒着を軽減しうることを示唆している。なお、組織隔離法を行わなかった場合は、肉芽組織は経時的に線維化する傾向を示し、新しく形成された結合組織中で産生されたコラーゲン線維束が経時的に太くなり、線維は緻密化し、皮膚と筋との癒着が形成されたのに対し、組織隔離法を行った場合には6週目においてもマクロファージの集塊を含む肉芽組織がみられ、組織計量学的にも長期間肉芽組織が存在し、肉芽組織の両端部では、皮膚側および筋側の線維化した肉芽組織の間に疎なコラーゲン線維束が介在していた。それ故、癒着軽減の機序としては、このマクロファージを主体とする肉芽組織が皮膚と筋の間に介在している間に、皮膚側と筋側で形成された線維性結合組織がそれぞれ成熟し、緻密になる一方、マクロファージを含むこの肉芽組織は最終的に疎性の結合組織に置換され、皮膚側と筋側の線維性結合組織はこの疎性の結合組織を介して接するためと推測された。従って、周囲の組織の線維化が完了するまでの期間よりも長く生体材料が組織に停滞していれば、物理的バリアとして有用であると考えられた。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された。本研究は、HA/CMC膜を用いた組織隔離法により皮膚と筋との癒着を軽減しうることを明らかにした点が高く評価された。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認められた。