

炭酸ガスレーザー照射後ラット歯肉の組織変化

—Hsp47、テネイシン C およびフィブロネクチンの発現状況—

奥羽大学歯学部口腔病態解析制御学講座

小 澤 亮

(指導教員：伊 東 博 司)

Histopathological Changes of the Rat Gingiva
after Irradiation of CO₂ Laser

—Expression of Hsp47, Tenascin-C, and Fibronectin—

Department of Oral Medical Sciences
Ozu University, School of Dentistry

Ryou Ozawa

(Director : Hiroshi Ito)

Abstract

Coagulated and necrotic rat gingiva caused by pulse CO₂ laser irradiation is gradually and steadily replaced by newly proliferated fibroblasts and blood vessels without interfering with the healing process. The present study was conducted to clarify the background of this event in terms of the expression of the proteins essential for the wound healing, i.e., heat shock protein 47 (Hsp47) as a marker for collagen production and two extracellular matrices, tenascin C (TNC) and fibronectin (FN), both of which involve in the cell proliferation, differentiation, and movement.

Laser irradiation was achieved with parameters of 5 W, 600 μ sec. pulse duration, and 326 J/cm². The gingiva dissected at different times after irradiation was processed for immunohistochemical detection of Hsp47, TNC, and FN.

One day after irradiation, Hsp47-positive fibroblasts and vascular endothelial cells increased in number in the connective tissue facing the laser wound. After three days, Hsp47-positive cells spread over the wound and mostly replaced it at day 7. The density of the Hsp47-positive cells peaked at day 14 and reduced at day 28 showing similar pattern to the normal gingiva. Such cell kinetics depicted by Hsp47 immunohistochemistry proves the steadily progress of connective tissue regeneration in the laser wound.

At day 1, *de novo* expression of TNC was observed, and thereafter the positive area was extended coincident with the spread of Hsp47-positive cells. The expression of FN was found not only in newly formed connective tissue but also in the laser wound throughout the repair process, but absent around the fibroblasts and blood vessels invading into the laser wound. The different expression patterns of the two extracellular matrices may reflect different biological mechanisms of the matrices.

Key words: CO₂ laser, heat shock protein 47, tenascin C, fibronectin, immunohistochemistry

和文抄録

パルス波炭酸ガスレーザー照射により形成されたラット歯肉凝固壊死組織は、治癒過程を阻害することなく、徐々に、かつ着実に新生線維芽細胞と毛細血管により置換される。本研究では、その置換過程の背景をなす現象を解明するために、以下に述べる、創傷治癒に必須であるタンパク質の発現状況を観察、検討した。観察、検討したタンパク質は、コラーゲン産生のマーカーとしての熱ショックタンパク 47 (Hsp47)、ならびに細胞外基質タンパクであるテネイシン C (TNC) およびフィブロネクチン (FN) であり、TNC と FN はいずれも細胞の増殖、分化および移動に関与している。

レーザー照射はピークパワー5W、パルス幅 600 μ 秒、照射エネルギー密度 326J/cm²の条件で行った。照射後、経時的に歯肉を摘出し、Hsp47、TNC および FN を検出する免疫組織化学を行った。

照射 1 日後、レーザー創に面する結合組織では Hsp47 陽性の線維芽細胞と血管内皮細胞の数が増加した。3 日後には Hsp47 陽性細胞がレーザー創内に分布し、7 日後にはレーザー創の大部分を Hsp47 陽性細胞が置換していた。Hsp47 陽性細胞の分布密度は 14 日後にピークに達し、28 日後では、分布密度が減少し、Hsp47 陽性細胞の分布様式は正常歯肉における分布様式と同様であった。Hsp47 についての免疫組織化学で示されたそのような細胞動態は、レーザー創における結合組織再生が着実に進行していることを示している。

照射 1 日後、TNC の新たな発現がみられた。その後、TNC 陽性の領域は Hsp47 陽性細胞の分布範囲に一致して広がった。FN の発現は治癒期間全体を通して、新生された結合組織のみならず、レーザー創にも観察されたが、レーザー創内に進入する線維芽細胞と血管の周囲は FN の発現を欠いていた。それら 2 種の細胞外基質の発現様式が異なっていたことはそれら細胞外基質の機能の違いを反映しているのかもしれない。

キーワード：炭酸ガスレーザー，熱ショックタンパク 47，テネイシン C，フィブロネクチン，免疫組織化学

緒言

炭酸ガスレーザーはその優れた組織切開、蒸散能力により古くから口腔外科を含む外科治療においてメスの代用として用いられ¹⁻³⁾、最近では、パルス発振方式の導入により操作性が向上し、その応用範囲が広がっている⁴⁻⁶⁾。現在国内で市販されている炭酸ガスレーザー照射装置のすべてが組織切開のみならず、止血および凝固、病変の蒸散を適応対象としており、さらに低エネルギー照射による疼痛緩和⁷⁻⁸⁾や低反応レベルレーザー治療への応用⁹⁻¹¹⁾も試みられている。

Yamasaki らは、炭酸ガスレーザーによる病変組織の凝固とその後の再生、すなわちモデリングによる口腔粘膜疾患の保存的、低侵襲性治療の可能性を探る目的で、ラット歯肉にパルス波炭酸ガスレーザー照射を行い、これに対する組織反応とその後の再生過程を病理組織学的および超微形態学的に検索した^{12, 13)}。彼らは、炭酸ガスレーザー照射により凝固壊死に陥った歯肉粘膜固有層は、再生期間を通じて排除されることなく本来の組織構築を保ち、徐々に新生結合組織である肉芽組織によって置換されることをみだし、このとき壊死組織は肉芽組織の構成細胞である線維芽細胞および血管内皮細胞が移動するための足場になると推測した。また、加藤ら¹⁴⁾はパルス波炭酸ガスレーザー照射を受けたラット顎二腹筋の治癒過程を形態学的に検討した結果、電気メス焼灼後の治癒と比べ、治癒期間が短かったと述べている。

創傷治癒では、量の多寡はあるものの新生結合組織である肉芽組織が形成される¹⁵⁾。肉芽組織の主要な細胞成分である線維芽細胞は活発に増殖し、また、コラーゲン線維を産生して組織の再生あるいは修復に関わっている。線維芽細胞のコラーゲン線維産生に深く関わるタンパク質の一つに熱ショックタンパク47(以下 Hsp47)がある。Hsp47 は 1986 年 Nagata ら¹⁶⁾が胎生ニワトリ線維芽細胞において発見した熱ショックタンパク質であり、この Hsp47 は分子シャペロン機能により、コラーゲン線維産生を促進しているとされる¹⁷⁾。線維芽細胞は、創傷治癒過程で壊死組織が肉芽組織によって吸収、置換されるとき、すなわち器質化の際に壊死組織内へと移動していく。この線維芽細胞の移動を調節する細胞外基質タンパクとしてテネイシンCが挙げられる¹⁸⁾。また、細胞が移動するときには、まず移動方向に細胞質を伸張させ、次いで、伸張した細胞質は足場の確保のために周囲の細胞外基質と接着する¹⁵⁾。この接着を行う細胞接着性

タンパクであるフィブロネクチンも創傷治癒に深く関与している¹⁹⁾。

本研究では、炭酸ガスレーザー照射後歯肉において、コラーゲン特異的分子シャペロンである Hsp47 の局在状況、ならびに創傷治癒における線維芽細胞の移動に関与する細胞外基質の構成タンパクであるテネイシンCおよび細胞接着タンパクであるフィブロネクチンの発現状況を免疫組織化学的手法により観察、検討し、炭酸ガスレーザー処置の特長である照射後組織の速やかな治癒のメカニズムを解明することを目的とした。

材料および方法

1. 実験動物

実験動物として生後7～9週齢（体重250-300g）の雄性Wistarラット70匹を用いた。飼育は奥羽大学動物実験研究施設において、水とラット用固形飼料（MF、オリエンタル酵母社、東京）を自由に摂取させて行った。実験に当たっては奥羽大学動物実験委員会の承認を得た（許可番号2012-58）。

2. レーザー照射

炭酸ガスレーザー照射はパナラスCO5Σ（パナソニック四国レクトロニクス社、松山）を使用した。照射はレーザーの光軸が歯肉表面と直角となるよう内径15mmのコンタクトチップの方向を調整し、スーパーパルスモードにてピークパワー5W、パルス幅600μ秒、休止時間6m秒の条件で行った。ペントバルビタールナトリウム（50mg/ラット体重1kg）腹腔内注射による麻酔下、ハンドピースに装着したコンタクトチップを上顎第一臼歯口蓋側面に沿って近・遠心方向に20秒間ゆっくり動かして幅1.5mm、長さ3.0mmのレーザー創を口蓋側歯肉上（一部口蓋粘膜を含む）に形成した。この時の計算上のエネルギー密度は578J/cm²となり、照射は粘膜表面に白濁をもたらしたが、組織欠損は生じなかった（図1）。

レーザー照射領域にほぼ匹敵する範囲の歯肉を骨膜とともに幅1.5mm、長さ3.0mmの大きさに11号の外科用メスにより切除したラットを対照群とした。なお、切除時の切開線は歯肉表面と直角となるよう調整した。

3. 標本作製

照射6時間後および1, 2, 3, 7, 14, 28 日後, 麻酔下にてラット(レーザー照射群各期間5匹, 対照群各期間3匹)を屠殺し, 上顎を摘出, リン酸緩衝4%パラホルムアルデヒド(4℃)にて18時間固定した。10%EDTA(室温)による10日間の脱灰ののち, 試料をパラフィンに包埋し, 4 μ m厚さにて切片を作成した。切片にはヘマトキシリン・エオジン(以下H-E)染色を行って再生過程を病理組織学的に検索した。また, マッソン・トリクローム染色を施して再生過程におけるコラーゲン線維の分布状況を検討した。

4. 免疫組織化学

免疫染色はパラフィン切片を用いて行った。脱パラフィン後, テネイシン C 検出のためには切片を0.01 N HClに溶解した0.4%ペプシンで37℃10分間処理し, フィブロネクチン検出には切片を95℃クエン酸緩衝液(pH=6.5)中に20分間浸漬してそれぞれの抗原の賦活化を図った。リン酸緩衝生理食塩水(以下PBS)に浸漬したのち, 一次抗体としてマウス抗ラット Hsp47 モノクローナル抗体(1:1000, StressGen, USA), マウス抗ヒトテネイシン C モノクローナル抗体(1:1000, IBL, USA), マウス抗ヒトフィブロネクチンモノクローナル抗体(1:2000, Santa Cruz, USA), をそれぞれ室温で60分間反応させた。PBS洗浄後, ペルオキシダーゼあるいはアルカリフォスファターゼで標識したアミノ酸ポリマーを結合させたヤギ抗マウス抗体(ニチレイ, 東京)と30分間室温で反応させた。PBSで洗浄したのち, DAB基質キットあるいはニューフクシン基質キット(ニチレイ, 東京)にて発色させ, 核染色はヘマトキシリンで行った。一次抗体に換えてPBSで反応を行った切片を陰性対照とし, 陽性反応が全くみられないことを確認した。

また, 線維芽細胞の動態と細胞外基質の時空的関係を明らかにするためにHsp47およびテネイシン C の二重免疫組織化学的染色を行った。まず, Hsp47の発現部位を上記プロトコールに従ってDABにより褐色に発色させた。次に, 切片を95℃クエン酸緩衝液中で10分間加熱してHsp47免疫組織化学的染色のための抗体を失活させたのち, テネイシン C の発現部位を上記プロトコールに従ってニューフクシンで赤色に発色させた。

結果

1. 病理組織学的所見

1) レーザー照射群

照射6時間後、レーザー創の粘膜上皮は凝固壊死に陥っていたが、固有層では、多くの細胞が残存し、線維構造にも明らかな変化は認められなかった。照射1日後、レーザー創に隣接する口蓋粘膜上皮から上皮再生が開始され、固有層では中等度の炎症細胞浸潤が観察されたが、それ以外の組織学的変化は明らかでなかった(図2A,B)。照射後3日、レーザー創では結合組織細胞が消失し線維密度が減少したが、歯肉粘膜固有層の外形は保たれていた(図2C,D)。レーザー創に隣接する歯周靱帯、口蓋粘膜固有層および骨膜から創内への、線維芽細胞および小血管からなる肉芽組織の進入が明らかとなり、これに伴って同部では、微細な線維構造を示すコラーゲンの形成が観察された。照射7日後、再生上皮による創面の被覆がほぼ完了し、創の大部分が肉芽組織で置換されていた(図2E,F)。照射14日後、肉芽組織での線維形成が進行し、28日後、肉芽組織は、正常歯肉に近い機能的線維構築を示す結合組織へと転換した(図2G,H)。

2) メス切除群

切除6時間後、創内は凝血塊および浸出液、組織残渣で満たされていた。上皮の再生は切除後1日より開始したが、創表面ではなく切除断端に沿って深部へ伸展した。3日後、歯周靱帯および口蓋粘膜固有層から肉芽組織が増殖し、7日目には上皮による被覆がほぼ完了したが、肉芽組織形成が不十分で、歯肉固有の形態を回復するに至らず、陥凹を示した(図3A,B)。28日後、歯肉はほぼもとの外形を回復したが、細胞成分に富み、線維束形成が不十分で、正常歯肉の組織学的特徴は認められなかった(図3C,D)。

2. Hsp47 免疫組織化学

1) 無処置正常歯肉

歯肉および歯周靱帯の線維芽細胞ならびに骨芽細胞を含む骨膜細胞が強い陽性反応を示した。歯肉におけるHsp47陽性線維芽細胞は上皮直下で密に分布し、深部ではその数が少なかった(図4A)。また、歯肉では線維芽細胞に加え、粘

膜固有層内の血管壁平滑筋細胞や粘膜上皮基底細胞が Hsp47 の陽性反応を示した。

2) レーザー照射群

照射 6 時間後、レーザー創から陽性細胞が消失した。一方、レーザー創に面する歯周靱帯の線維芽細胞が Hsp47 の強陽性反応を示していた (図 4B)。照射 1 日後、レーザー創に面する歯周靱帯、口蓋粘膜固有層深部、骨膜で Hsp47 の陽性細胞数が増加した。そこでは線維芽細胞に加え、毛細血管を含む小血管での発現が目立った (図 4C)。3 日後には、これら細胞の数がさらに増加して肉芽組織を構成しつつ、創内へ進入するのが明らかになった (図 4D)。Hsp47 陽性細胞を含む肉芽組織によるレーザー創の置換は深部から進行し、レーザー創表面を伸展する再生上皮直下の結合組織は Hsp47 陽性細胞を欠いていたが、再生上皮基底細胞はつねに Hsp47 を発現した (図 4C, D)。時間の経過とともに Hsp47 陽性細胞を有する肉芽組織はその範囲を拡大し、7 日目には創のほぼ全域に広がって大部分のレーザー創を置換した (図 4E)。14 日後、再生歯肉内での Hsp47 陽性線維芽細胞の分布が最も密となり、28 日後には深部で分布が疎になって正常歯肉の Hsp47 免疫染色所見と同様であった (図 4F)。

3) メス切除群

術後 6 時間、断端に隣接する歯周靱帯および口蓋粘膜固有層では Hsp47 の発現増強は認められなかった。1 日以降、レーザー照射群同様、増生する肉芽組織を構成する線維芽細胞と毛細血管が Hsp47 を発現したが、発現部位や発現細胞数はレーザー照射群に比べ少なかった (図 4G)。28 日後、Hsp47 陽性細胞が再生歯肉全体に高い密度で観察され、正常歯肉組織構築への以降は認められなかった (図 4H)。

3. テネイシン C 免疫組織化学

1) 無処置正常歯肉

歯肉および口蓋の粘膜上皮直下結合組織、歯周靱帯、骨膜が強いテネイシン C の陽性反応を示し、粘膜固有層内部の組織は陽性反応を示さなかった (図 5A)。

2) レーザー照射群

照射後 1 日、レーザー創に隣接する歯周靱帯や口蓋粘膜固有層深部で無処置

群では認められなかったテネイシンCの陽性反応が認められた（図 5B）。3 日後、発現領域はレーザー創内に拡大し、二重免疫染色で観察するとテネイシンCの局在範囲はつねに Hsp47 陽性細胞の分布範囲と一致しており（図 5C）、伸展する肉芽組織の先端部に位置する Hsp47 陽性細胞が数多くみられ、それら Hsp47 陽性細胞の周囲にテネイシンCの発現が認められた（図 5D）。一方、創表面に位置する再生上皮直下の結合組織では、Hsp47 陽性細胞が存在しないにもかかわらずテネイシンCの発現が観察された（図 5C）。照射後 7 日目には再生歯肉固有層全域がテネイシンCを発現したが（図 5E）、14 日以降、陽性反応が歯肉固有層深部において消失し（図 5F）、28 日後では正常歯肉のテネイシンC染色所見と同様の所見がみられた。

3) メス切除群

術後 1 日、切除創に隣接する口蓋粘膜固有層で新たなテネイシンC陽性反応が観察され、3 日目以降、増生する肉芽組織に一致して陽性範囲が拡大した（図 5G）。14 日後、歯肉固有層の大部分が陽性反応を示し、28 日後もレーザー照射群に比べより広い範囲で発現を示した（図 5H）。

4. フィブロネクチン免疫組織化学

1) 無処置正常歯肉

フィブロネクチンは歯肉および口蓋の粘膜固有層の組織全域で陽性反応が認められ、その分布はコラーゲン線維の分布と概ね一致していた（図 6A）。

2) レーザー照射群

照射 6 時間および 1 日後、無処置群と比べフィブロネクチンの分布パターンに明らかな変化は認められなかった。3 日後以降、レーザー創表面で発現が消失するとともに、創内へ進入する肉芽組織の線維芽細胞や血管の周囲、および再生した骨膜層は発現を欠いていた（図 6B）。7 日後、線維化が進行した部分でフィブロネクチンの新たな発現が観察されたが、上皮直下や血管周囲など、細胞成分に富み、線維化が不十分な領域では発現がみられなかった（図 6C）。28 日後、フィブロネクチンは正常歯肉とほぼ同様の分布パターンを示していた（図 6D）。いずれの観察時点でもフィブロネクチンはメス切除群と比べ強い陽性反応を示した。

3) メス切除群

切除後3日後、増生する肉芽組織でのフィブロネクチン発現は残存する結合組織に比べ弱かった(図6E)。28日後、再生歯肉固有層全体が発現を示したが、レーザー照射群に比べて均等に発現しており、全体的に発現強度は低かった(図6F)。

考察

1986年 Nagata ら¹⁶⁾は、胎生ニワトリ線維芽細胞において、培養温度を上昇させると分子量47 kDaの糖タンパク質合成が高まることを発見し、これを新しいタイプの heat shock protein 47として報告した。Hsp47は、他の熱ショックタンパク質同様、非ストレス下でも発現し、細胞内での動態がコラーゲンの成熟や輸送と密接な関連を示すところから現在ではコラーゲン特異的分子シャペロンとして認識されている^{17,20,21)}。

Yamasaki ら¹³⁾は、本研究と同じ実験系においてレーザー照射6時間後にレーザー創に面する線維芽細胞で Hsp47 とは別のタイプの熱ショックタンパク質 Hsp25 および Hsp70 の新たな発現と発現の増強を観察し、これをレーザー照射による熱ストレスに対する防御反応と考えた。本研究において照射6時間後にレーザー創に面する線維芽細胞で Hsp47 の免疫染色性が増し、1日後に同部で血管を含む Hsp47 陽性細胞が増加する傾向が認められた。しかし、無処置対照歯肉固有層の線維芽細胞の多くが Hsp47 を発現していたことからレーザー照射6時間後の Hsp47 発現状況の変化は、照射6時間後の Hsp25 や Hsp70 の発現変化ほどには明確でなかった。したがって、本実験で観察された照射後6時間の Hsp47 染色性の増強および照射後1日における Hsp47 陽性細胞数の増加が、レーザー照射に対する熱ストレスに対する防御反応を表したものであるか否かについてはさらに検討する必要がある。ただし、その発見以後、Hsp47 に関する研究のほとんどがコラーゲン特異的分子シャペロンとしての機能を論じており、ストレス反応を主題に Hsp47 の役割を検討した報告はみあたらない。

本研究において照射後1日にレーザー創での Hsp47 発現細胞の消失とそれに面する歯周靱帯、口蓋粘膜固有層および骨膜での Hsp47 発現細胞の増加が観察された。発現消失はコラーゲン産生細胞としての機能停止、すなわち細胞壊死

を表していると考えられ、結果的に Hsp47 の発現消失はレーザー創の範囲を明示していたことになる。この範囲は Yamasaki ら¹²⁾が Hsp25 および Hsp70 の発現を通じて明らかにしたレーザー創の範囲と一致するものであった。

一方、レーザー創周囲での発現増強は分子シャペロン機能を通じたコラーゲン産生亢進、すなわち再生過程の第一歩を表したものと考えられる。3日目以降、時間の経過とともに Hsp47 発現線維芽細胞は数を増してレーザー創全域に拡がり、14日に Hsp47 陽性細胞の分布密度は極大に達して、28日にはその分布密度は減少した。このような Hsp47 発現線維芽細胞の動態はマッソン・トリクローム染色で示された肉芽組織の形成、成熟とよく一致しており、このことは、レーザー照射後に形成される凝固壊死組織を足場として展開する速やかな再生過程を明確に示したものと考えられる。Hsp47 発現とコラーゲン形成の密接な関係は、Hsp47 欠損マウスがコラーゲン形成不全による胎生致死に至ること²²⁾や線維形成性病変の進行が線維芽細胞による Hsp47 発現量とよく相関することなど²³⁻²⁵⁾から *in vivo* においても確認されている。

非照射部粘膜上皮基底細胞と同様に、レーザー創表面で伸展する再生上皮組織の基底細胞やレーザー創に面する内皮細胞および血管平滑筋細胞がコラーゲン産生を本来の機能としないにもかかわらず Hsp47 を発現した。Marutani ら²⁶⁾は Hsp47 ノックアウトマウスにおいて、基底膜タイプIVコラーゲンの欠如を認め、奥山ら²⁷⁾はヒト扁平上皮癌細胞やラット表皮細胞を用いた *in vitro* の実験で、タイプIVコラーゲンの産生と Hsp47 発現の密接な相関を確認している。したがって、本研究で観察された線維芽細胞以外の細胞における Hsp47 発現は細胞移動に関連した基底膜タイプIVコラーゲン産生を示すものかもしれない。一方、Hsp47 の発現が細胞分化の開始によって調節されとの報告がある²⁸⁾。Yamasaki ら¹³⁾は、レーザー創に面する小血管で、Hsp25 の核から細胞質への移動を観察し、この所見を再生開始に伴う細胞分化によるものであると述べていることから、本研究でみられた上皮細胞や小血管での Hsp47 発現増強が細胞分化に関連していることも考えられる。

テネイシンCは細胞外基質糖タンパク質の一つであり、形態発生中の胎生結合組織では高度に発現する。成長後のテネイシンC発現は創傷治癒および組織再生の際に発現し、細胞の増殖や移動を調節することが明らかにされている

テネイシンCは、無処置の正常ラットでは、歯肉・口蓋粘膜上皮直下と骨膜および一部の歯周靱帯に限局して観察され、固有層の大部分では欠如していた。このテネイシンC発現欠如部位においてHsp47陽性細胞の増加に伴ってテネイシンCの発現が認められ、3日以降、Hsp47陽性細胞のレーザー創内進入拡大と一致してテネイシンC発現範囲が拡大した。このような発現パターンはこれまでの創傷治癒での観察結果と一致している²⁹⁻³¹⁾。一般に創傷治癒におけるテネイシンCの役割は抗接着効果にあり、なかでもフィブロネクチン介在性細胞接着をブロックすることが報告されている³²⁾。細胞はこれによって細胞外基質との接着から解放されて運動性を確保すると考えられている。また、テネイシンCはその分子上に、接着と抗接着の両ドメインを有し、細胞との結合は種々のレセプターを介して行われることが報告されている³³⁾。本研究の二重染色で、先頭に立ってレーザー創内に進入するHsp47陽性線維芽細胞や毛細血管の周囲がつねにテネイシンCの発現を示したが、この所見はHsp47陽性線維芽細胞がテネイシンC介在性の接着と接着解除を繰り返すことによって移動することを示唆している。テネイシンCの発現はレーザー照射後の壊死組織表面に沿って移動する再生上皮直下にも観察された。再生上皮直下の壊死組織には結合組織細胞が存在しないため、再生上皮直下のテネイシンCは上皮細胞自身によって産生、分泌されたものであり、この部のテネイシンCが再生上皮の移動に深く関与しているとみなされる。上皮細胞によるテネイシンC発現について、Aukhilら³⁴⁾は皮膚創傷治癒における再生表皮基底細胞がテネイシンC遺伝子を発現することを認め、また、Witbyら³⁵⁾は胎児の創傷治癒における早期のテネイシンC沈着と迅速な上皮化との関連を報告している。

レーザー照射28日後には、テネイシンCの消失および局在化が観察された。この変化はHsp47陽性細胞分布の変化と一致していた。一方、同じ28日後のメス切除群では、テネイシンCの発現とHsp47陽性細胞の存在がより広範に認められた。テネイシンCおよびHsp47の過剰発現あるいは発現の持続は、ともに病的状況を反映するとみなされており^{24,25,36)}、この点からもレーザー創の速やかな再生過程がうかがわれる。

フィブロネクチンは血液中、細胞表面、組織の細胞外基質に存在する細胞接

着性高分子糖タンパク質であり、コラーゲンやフィブリンなどの生体高分子に結合する。細胞接着、細胞伸展、細胞走化性および移動、オプソニン効果、細胞分化調節など多様な生理作用を持つところからフィブロネクチンは組織再生にきわめて重要な役割を演じる³⁷⁾。フィブロネクチンは、肝細胞によって合成され血液中に分泌される二量体血漿フィブロネクチンと、局所において線維芽細胞や血管内皮細胞から産生される多量体細胞性フィブロネクチンとの二種に大別される。

ラット口腔組織においてフィブロネクチンは歯肉・口蓋粘膜固有層および歯周靱帯のほぼ全域に免疫組織化学的発現を示した。その分布パターンはコラーゲン線維の分布によく一致した。フィブロネクチンの分布パターンとコラーゲン線維の分布とが一致するというフィブロネクチンの免疫組織化学的染色性はレーザー照射後も認められた。同様の所見が Nakasone ら³¹⁾によってレーザー照射後の胎生および新生マウス鼻唇領域で観察されている。Yamasaki ら¹²⁾は電子顕微鏡観察を含む形態学的検索から、本研究と同じレーザー照射エネルギー密度は細胞生存の閾値を超えるがコラーゲン線維変性 *denaturation* の閾値以下であると述べている。一方、玉村ら³⁸⁾は、より高いエネルギー密度のレーザー照射によって形態学的に変性を来した細胞外基質は炎症反応により速やかに分離、排除されることを観察している。レーザー創では組織凝固により血液供給が絶たれており、また線維芽細胞、血管内皮細胞ともに存在しないので、ここでのフィブロネクチンの発現は照射前のフィブロネクチンの残存と考えられる。このようなフィブロネクチンの残存が、本研究で観察されたレーザー創内での線維芽細胞や血管組織の速やかな分布拡大に関与していることが示唆される。

フィブロネクチンの発現は、レーザー創内に増殖進入する肉芽組織では低下あるいは消失し、再生過程が進み線維形成が進むとその部で再び増強した。この所見から、レーザー創では、まず再生開始時に既存のフィブロネクチンにより細胞の増殖、分化が促進され、次いで細胞移動に関連してその発現が一旦低下し、その後線維形成の進行に合わせてフィブロネクチンが新たに発現してくるという過程が推測される。

本研究は、炭酸ガスレーザー照射後歯肉におけるフィブロネクチンの免疫組織化学的発現状況とテネイシンCのそれとが異なっていることを示した。レー

ザー創の内部に進入する肉芽組織ではテネイシンCの発現がみられると同時に、フィブロネクチンの発現消失が認められた。このような発現状況の違いは、フィブロネクチンが正常結合組織の細胞外マトリックスを構成する分子であるのに対し、テネイシンCは創傷治癒などの際に結合組織細胞外マトリックスを変化させる役割を持つ³⁹⁾という、両者の機能の違いを反映しているのかもしれない。

結論

本研究では、パルス波炭酸ガスレーザー照射によって凝固壊死に陥ったラット歯肉の再生過程を免疫組織化学的に検索した。

照射1日後、レーザー創周囲組織でHsp47発現線維芽細胞や血管内皮細胞が増加した。3日目以降、Hsp47発現細胞は壊死組織内に進入し、7日後に歯肉のほぼ全域に存在して、14日後には分布密度最大に達し、28日後に分布密度が減少して正常組織に近い所見を示した。これらの所見は、メス切除後と比べて結合組織再生の速やかな進行をうかがわせる。

テネイシンCは照射1日後増加したHsp47発現細胞周囲で新たに発現し、これら細胞の分布拡大に一致して、テネイシンC発現範囲は拡大したが、再生完了時には発現範囲が上皮直下に限局していた。フィブロネクチンは再生期間を通じて壊死組織および新生結合組織のみならずレーザー創壊死組織においても発現したが、レーザー創内に進入する線維芽細胞や血管周囲では発現を欠いていた。レーザー照射後、フィブロネクチンの発現がテネイシンCの発現より先行していたことは、それら細胞外基質タンパクの機能の違いを反映しているのかもしれない。

本論文の要旨は第56回奥羽大学歯学会（平成25年11月9日 郡山）において発表した。

文献

- 1) Fisher, S. E., Frame, J. W.: The effect of the carbon dioxide surgical laser on oral tissues. Br. J. Oral Maxillofac. Surg, **22**; 414-425 1984.

- 2) Thomson, P. J., Wylie J.: Interventional laser surgery: an effective surgical and diagnostic tool in oral precancer management. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **31**; 145-153 2002.
- 3) Ishii, J., Fujita, K., Komori, T.: Laser surgery as a treatment for oral leukoplakia. *Oral Oncology* **39**; 759-769 2003.
- 4) Hobbs ER, Bailin PL, Wheeland RG, Ratz JL.: Superpulsed lasers: Minimizing thermal damage with short duration, high irradiance pulses. *J. Dermatol. Surg. Oncol.* **13**; 955-964 1987.
- 5) Walsh, J. T., Flotte, T. J., Anderson, R.R., Deutsch, T. F.: Pulsed CO₂ laser tissue ablation: Effect of tissue type and pulse duration on thermal damage. *Lasers Surg .Med.* **8**; 108-118 1988.
- 6) Fitzpatrick, R. E., Ruiz-Esparza, J., Goldman, M. P.: The depth of thermal necrosis using the CO₂ laser: A comparison of the superpulsed mode and conventional mode. *J. Dermatol. Surg. Oncol.* **17**; 340-344 1991.
- 7) 榎原絵理, 榎原正人, 坂本英治, 鱒見進一, 関根明子, 小林一行, 長野孝俊, 松井康太郎, 山口広康, 新井高: 顎関節周囲への CO₂ レーザー照射時における顔面皮膚表面温度変化の検討. *日レ歯誌* **15**; 67-72 2004.
- 8) 善入寛仁, 吉川一志, 山本一世: 知覚過敏症モデル象牙質へのレーザー照射が透過性に与える影響について. *日歯保存誌* **51**; 48-62 2008.
- 9) 五味一博, 八島章博, 白河哲, 金指幹元, 関根章子, 小林一行, 長野孝俊, 松井康太郎, 山口博康, 新井高: 高出力レーザーの低出力照射がラット骨髓細胞三次元培養の石灰化におよぼす影響. *日レ歯誌* **16**; 10-15 2005.
- 10) 田島直人: ラット脛骨組織の骨形成能に対する炭酸ガスレーザー照射の影響について. *日レ歯誌* **16**; 23-30 2005.
- 11) 大河内瑠夏: ラット脛骨における炭酸ガスレーザー骨誘導初期変化について. *奥羽大歯学誌* **36**; 49-60 2009.
- 12) Yamasaki, A., Tamamura, K., Sakurai, Y., Sakurai, Y., Okuyama, N. Yusa, J., Ito H.: Remodeling of the rat gingiva induced by CO₂ laser coagulation mode. *Lasers Surg. Med.* **40**; 695-703 2008.
- 13) Yamasaki, A., Ito, H., Yusa, J., Sakurai, Y., Okuyama, N., Ozawa, R.: Expression of

- heat-shock proteins, Hsp70 and Hsp25, in the rat gingiva after irradiation with a CO₂ laser in coagulation mode. *J. Periodont. Res.* **45**; 323-330 2010.
- 14) 加藤美菜, 遊佐淳子, 桜井裕子, 伊東博司: 凝固モード炭酸ガスレーザー照射後ラット顎二腹筋の組織変化. *奥羽大歯学誌* **39**; 43-55 2012.
 - 15) 仁木利郎: IV組織修復・再生とその機構. 標準病理学 (坂本穆彦, 北川昌伸, 仁木利郎編) 第4版; 19-26 医学書院 2010
 - 16) Nagata, K., Saga, S., Yamada, K.M.: A major collagen-binding protein of chick embryo fibroblasts is a novel heat shock protein. *J. Cell Biol.* **103**; 223-229 1986.
 - 17) Satoh, M., Hirayoshi, K., Yokota, S.I., Hosokawa, N., Nagata, K.: Intracellular interaction of collagen specific stress protein hsp47 with newly synthesized procollagen. *J. Cell Biol.* **133**; 469-483 1996.
 - 18) Lotz, M. M., Burdsal, C. A., Erikson, H. P., McClay, D. R.: Cell adhesion to fibronectin and tenascin: Quantitative measurements of initial binding and subsequent strengthening response. *J. Cell Biol.* **109**; 1795-1805 1989.
 - 19) Pankov, R., Yamada, K.M.: Fibronectin at a glance. *J. Cell Sci.* **115**; 3861-3863 2002
 - 20) Saga, S., Nagata, K., Chen, W.T., Yamada, K.M.: pH-dependent function, purification and intracellular location of a major collagen-binding glycoprotein. *J. Cell Biol.* **105**; 517-527 1987.
 - 21) Nagata, K., Hirayoshi, K., Ohara, M., Saga, S.: Biosynthesis of a novel transformation-sensitive heat shock protein that bind to collagen. *J. Biol. Chem.* **263**; 8344-8349 1988.
 - 22) Nagai, N., Hosokawa, M., Itohara, S., Adachi, E., Matsushita, T., Hosokawa, N., Nagata, K.: Embryonic lethality of molecular chaperone hsp47 knockout mice is associated with defects in collagen biosynthesis. *J. Cell Biol.* **150**; 1499-1505 2000.
 - 23) Razaque, M.S., Hossain, M.A., Kohno, S., Taguchi, T.: Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rat is associated with increased expression of collagen-binding heat shock protein (HSP) 47. *Virchows Arch.* **432**; 455-460 1998.
 - 24) Sunamoto, M., Kuze, K., Iehara, N., Takaoka, H., Nagata, K., Kita, T., Doi, T.:

- Expression of heat shock protein 47 is increased in remnant kidney and correlates with disease progression. *Int. J. Exp. Pathol.* **79**; 133-140 1998.
- 25) Kuroda, K., Tsukifuji, R., Shinkai, H.: Increased expression of heat shock protein 47 is associated with over expression of Type I procollagen in systemic sclerosis skin fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* **111**; 1023-1028 1998.
 - 26) Marutani, T., Yamamoto, A., Nagai, N., Kubota, H., Nagata, K.: Accumulation of type IV collagen in dilated ER leads to apoptosis in Hsp47-knockout mouse embryos via induction of CHOP. *J. Cell Sci.* **117**; 5913-5922 2004.
 - 27) 奥山典子, 遊佐淳子, 伊東博司 : ヒト口腔扁平上皮癌細胞 HSC-3 における Hsp47 の発現. *奥羽大歯学誌* **37**; 161-171 2010.
 - 28) Takechi, H., Hirayoshi, K., Nakai, A., Kudo, H., Saga, S., Nagata, K.: Molecular cloning of a mouse 47-kDa heat shock protein (HSP47), a collagen-binding stress protein, and its expression during differentiation of F9 teratocarcinoma cells. *Eur. J. Biochem.* **206**; 323-329 1992.
 - 29) Mackie, E. J., Halfter, W., Liverani, D.: Induction of tenascin in healing wounds. *J. Cell Biol.* **107**:2757-2767 1988.
 - 30) Kanno, S., Fukuda, Y.: Fibronectin and tenascin in rat tracheal wound healing and their relation to cell proliferation. *Pathol. Int.* **44**; 96-106 1994.
 - 31) Nakasone, A., Shibata, S., Suzuki, S., Yamashita, Y., Ohoyama, K. : Laser burn wound healing in naso-labial region of fetal and neonatal mice. *Oral Diseases* **13**; 45-50 2007.
 - 32) Chiquet-Ehrismann, R., Kalla, P., Pearson, C. A., Chiquet, M.: Tenascin interferes with fibronectin. *Cell* **53**; 383-390 1988.
 - 33) Spring, J., Beck, C., Chiquet-Ehrismann, R.: Two contrary function of tenascin: Dissection of the active sites by recombinant tenascin fragments. *Cell.* **59**; 325-334 1989.
 - 34) Aukhil, I., Sahlberg, C., Thesleff, I.: Basal layer of epithelium expresses tenascin mRNA during healing of incisional skin wound. *J. Periodont. Res.* **31**; 105-112 1996.
 - 35) Witby, D. J., Longaker, M. T., Harrison, M. R., Adzick N. S., Ferguson, M. W. J.:

Rapid epithelization of fetal wounds is associated with the early deposition of tenascin. *J. Cell Sci.* **99**; 583-586 1991.

- 36) Darkowski, A., Schuppan, D., Orfanos, C. E., Zouboulis, C. C.: Increased expression of tenascin C by keloids in vivo and invitro. *Brit. J. Dermatol.* **141**; 50-56 1999.
- 37) 下岡正志, 伊井一夫: フィブロネクチン, ラミニン. *代謝* **26**; 209-219 1989.
- 38) 玉村清治, 奥山(石坂)典子, 櫻井裕子, 伊東博司: 炭酸ガスレーザー凝固モード照射に対する組織反応 —照射条件が壊死範囲ならびに再生過程におよぼす影響について. *奥羽大歯学誌* **38**; 9-19 2011.
- 39) 吉田利通, 石垣共基, 今中-吉田京子: 組織リモデリングにおけるテネイシンの役割. *生体の科学* **59**; 123-128 2008.

図の解説

図1 レーザー照射直後のラット上顎口蓋側歯肉

照射部が白濁（＊）しているが、粘膜表面の欠損は認められない。

図2 レーザー照射群の病理組織学的所見

A, B : レーザー照射 1 日後。歯肉上皮は凝固壊死に陥り剥脱しつつあるが、マッソン・トリクローム染色で青色に染色された歯肉固有層の組織構築に明らかな変化は認められない。矢印はレーザーの照射方向を示す。LW, レーザー創。

C, D : レーザー照射 3 日後。レーザー創 (LW) で線維の消失が観察されるが歯肉固有層の外形は保たれている。

E, F : レーザー照射 7 日後。上皮再被覆と結合組織による固有層再生がほぼ完了し、歯肉は元の輪郭を回復している。

G, H : レーザー照射 28 日後。歯肉は成熟した線維束からなる正常な組織像を示している。

A, C, E, G : H-E 染色

B, D, F, H : マッソン・トリクローム染色

図3 メス切除群の病理組織学的所見

A, B : メス切除 7 日後。上皮再被覆は完了しているが、結合組織の再生が不十分なため（＊）歯肉本来の形態を回復するに至っていない（矢印）。

C, D : メス切除 28 日後。歯肉形態はほぼ回復しているが、固有層は線維束に乏しい未熟な線維組織からなる

A, C : H-E 染色

B, D : マッソン・トリクローム染色

図4 Hsp47 の免疫組織化学的所見

A : 無処置正常歯肉。上皮直下固有層および歯周靱帯の線維芽細胞、骨細胞などの骨膜細胞、粘膜上皮基底層が強い陽性反応を示す、固有層中心部では陽性細胞が少ない。

B：レーザー照射 6 時間後。レーザー創（LW）から陽性細胞が消失している。レーザー創に面する歯周靱帯の線維芽細胞が強い陽性反応を示す（矢印）。NE、壊死上皮。

C：レーザー照射 1 日後。レーザー創（LW）に隣接する固有層や骨膜（*）で発現亢進が認められる。固有層ではとくに毛細血管および小血管が目立つ（矢印）。

D：レーザー照射 3 日後。陽性細胞のレーザー創（LW）内への進入が進行している（*）。再生上皮（RE）基底層が陽性反応を示す。

E：レーザー照射 7 日後。陽性細胞が歯肉固有層全域に分布している。

F：レーザー照射 28 日後。固有層深部で陽性細胞の減少傾向が伺われる（*）。

G：メス切除 3 日後。メス創に隣接する口蓋粘膜固有層および歯周靱帯から陽性細胞の増生，進入が認められるが（*）その量はレーザー照射群に比べ少ない。

H：メス切除 28 日後。歯肉全域に陽性細胞が密に分布している。

図5 テネイシンCの免疫組織化学的所見

A：無処置正常歯肉。発現は上皮直下，歯周靱帯，骨膜に局限しており，大部分の固有層では発現がみられない。

B：レーザー照射 1 日後。レーザー創（LW）に面する口蓋粘膜固有層内部で発現がみられる（矢印）。

C：レーザー照射 3 日後。Hsp47・テネイシンC二重免疫組織化学的染色。褐色に染色された Hsp47 発現細胞のレーザー創（LW）内進入に一致して，赤色で示されるテネイシンC発現が認められる。再生上皮（RE）直下にテネイシンC陽性反応が認められるが（矢印），近傍の結合組織には Hsp47 陽性細胞は見あたらない。

D：レーザー照射 3 日後。図 C 枠内の拡大。レーザー創（LW）に進入する肉芽組織の最先端に位置する Hsp47 陽性細胞（褐色）の周囲にテネイシンC陽性反応（赤色）が観察される。

E：レーザー照射 7 日後。再生歯肉固有層全体に陽性反応が観察される。

F：レーザー照射 28 日後。歯肉粘膜固有層から口蓋粘膜固有層にかけて陽性反

応が消失している（*）。

G：メス切除3日後。増生する肉芽組織（*）が発現を示す。

H：メス切除28日後。隣接口蓋粘膜を含め再生歯肉組織全体に陽性反応が認められる。

図6 フィブロネクチンの免疫組織化学的所見

A：無処置正常歯肉。歯肉および口蓋粘膜固有層，歯周靱帯の全域で陽性反応が認められ，その分布はコラーゲン線維の分布に一致している。

B：レーザー照射3日後。表層を除くレーザー創（LW）のほぼ全域で陽性反応が認められるが，進入する線維芽細胞や血管の周囲（*）再生骨膜（矢印）では陽性反応は認められない。

C：レーザー照射7日後。再生歯肉固有層が陽性反応を示したが，部分的に，特に上皮直下領域は陽性反応を示さなかった（*）。

D：レーザー照射28日後。正常組織とほぼ同様の分布パターンを示している。

E：メス切除3日後。増生する肉芽組織での陽性反応（*）は周囲組織に比べ弱い。

F：メス切除28日。再生歯肉固有層が陽性反応を示すが，レーザー照射群に比べ陽性反応は弱い。

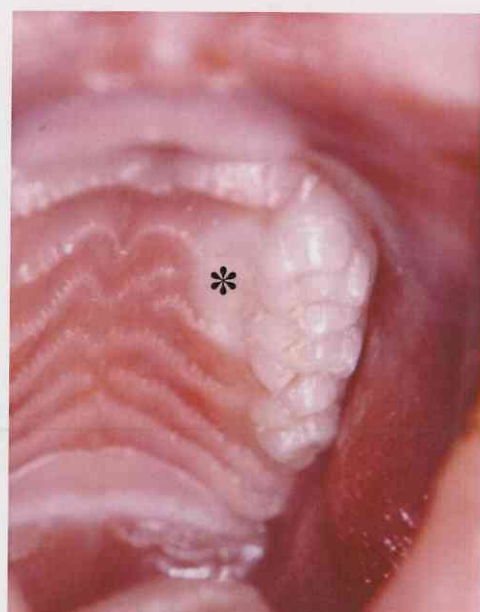


图 1

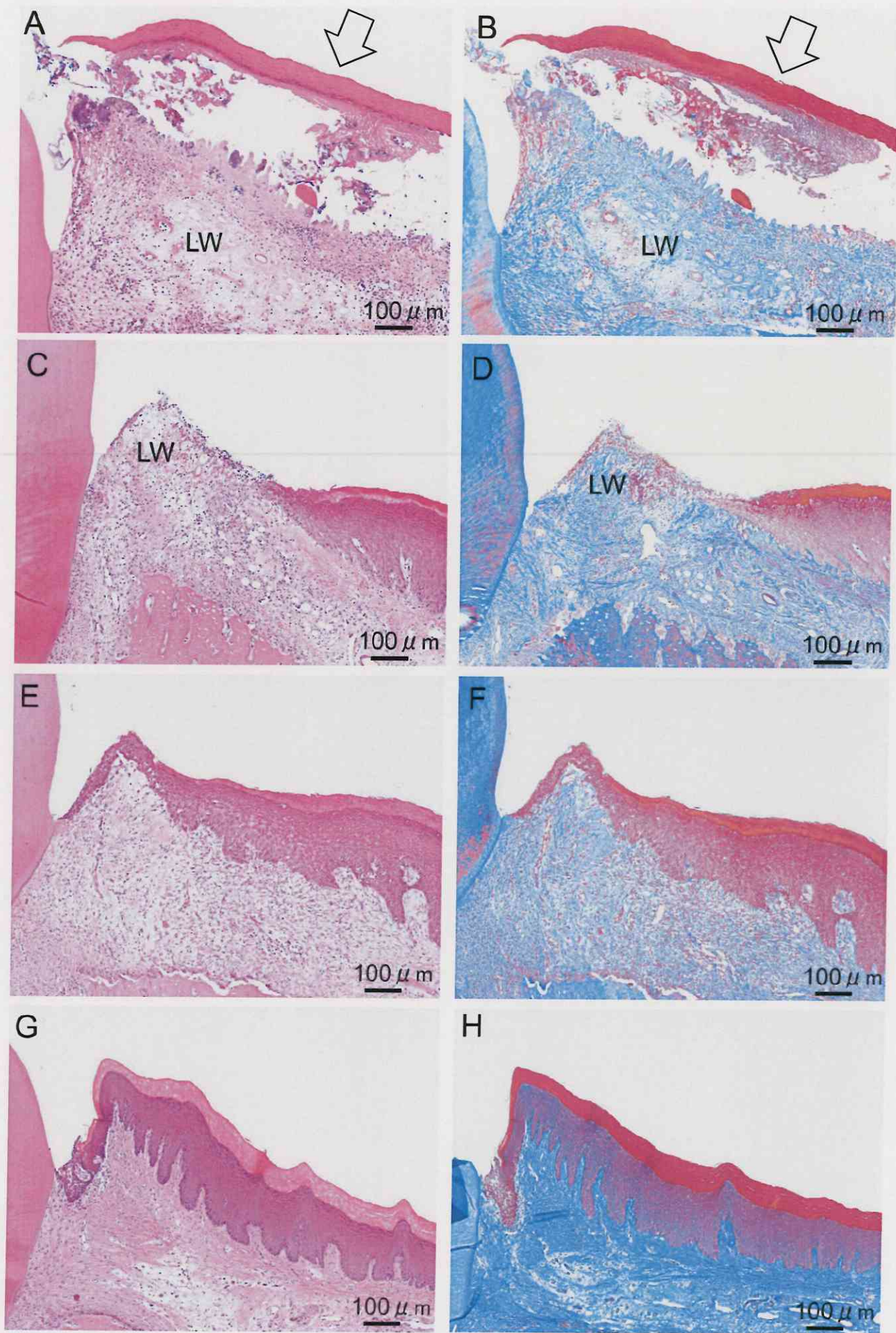


图2

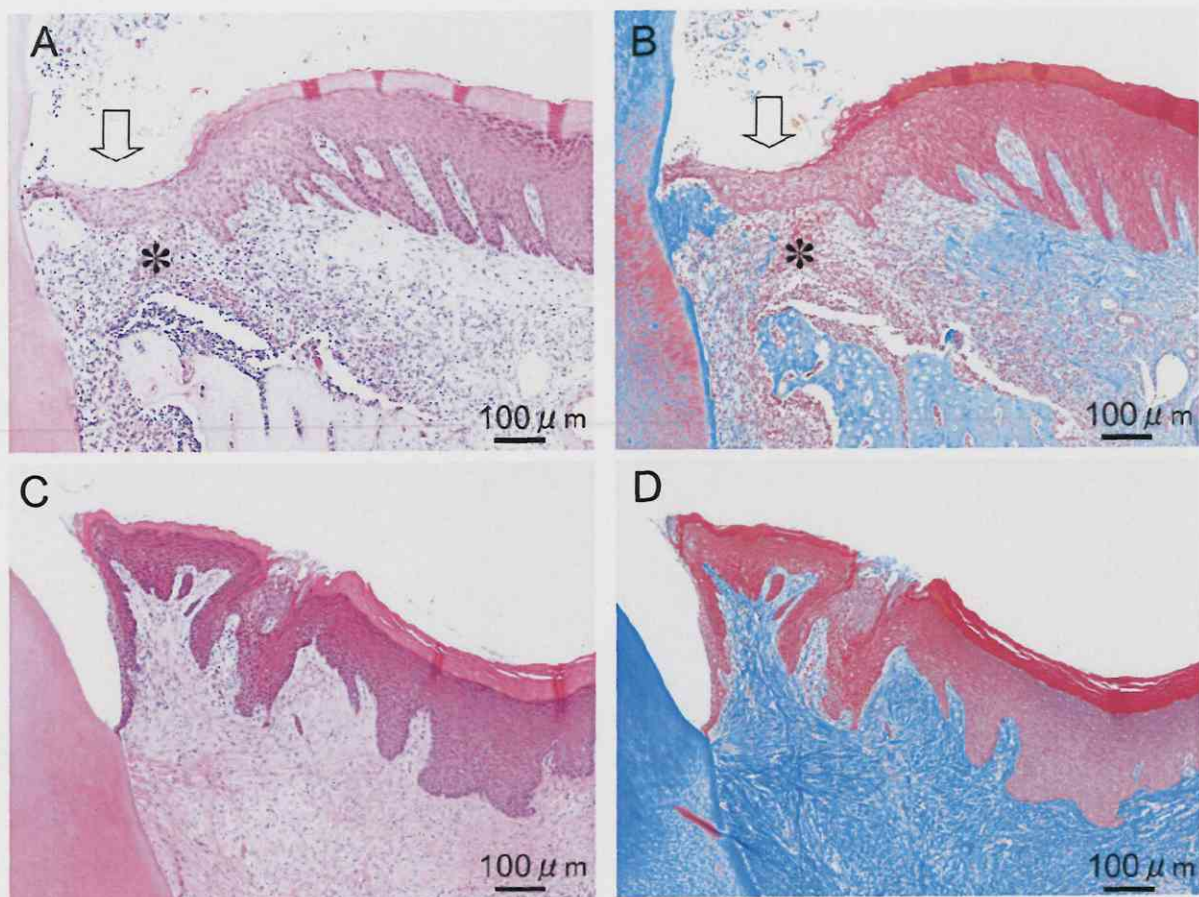


图3

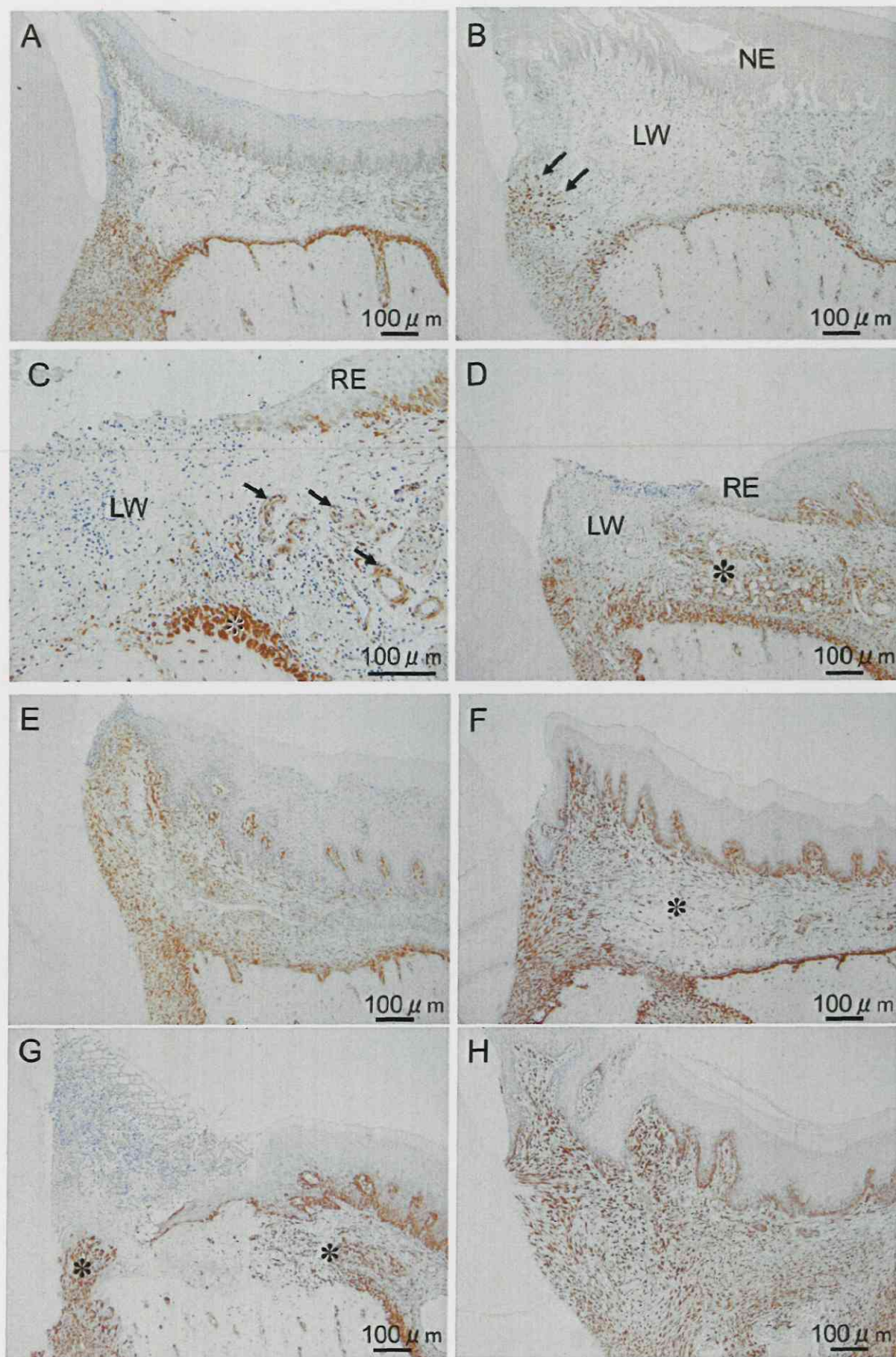


図4

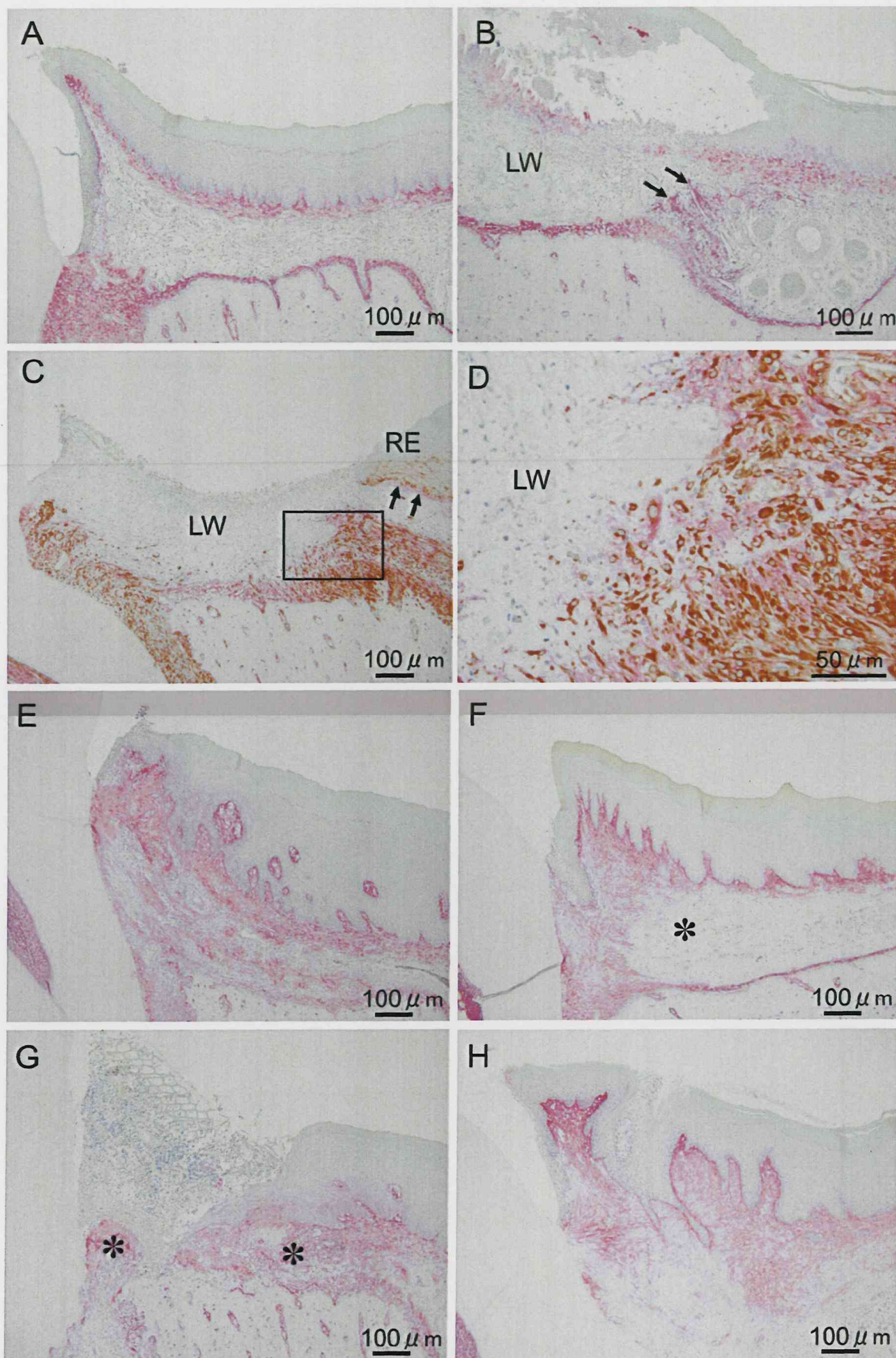


図5

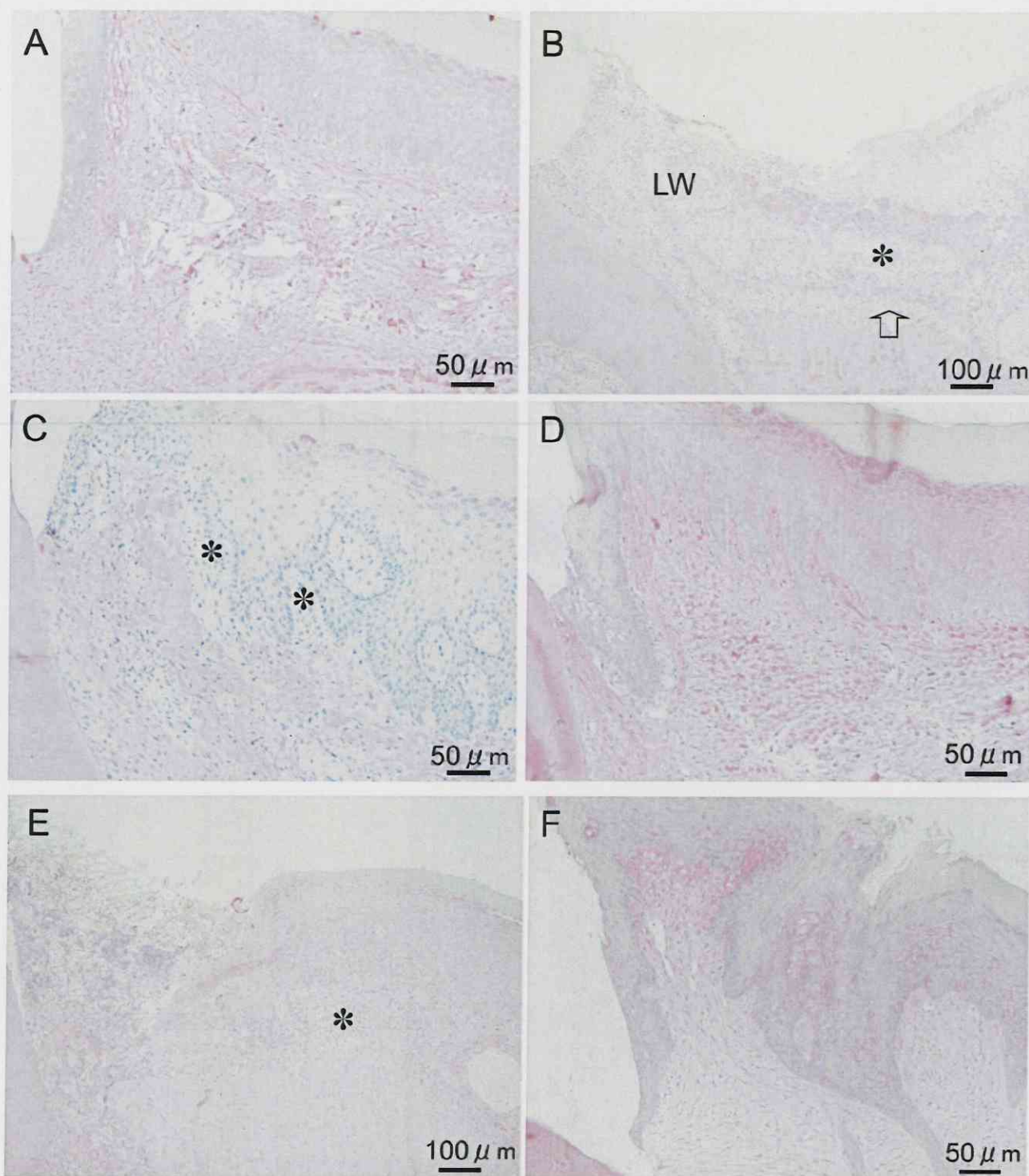


図6