

学位論文審査の結果及び最終試験の結果の要旨

学位申請者氏名	坂井 謙三	
学位論文名	Pathological Analysis of Cell Differentiation in Cholesterin Granulomas experimentally induced in Mice (実験的に誘発したマウスのコレステリン肉芽腫における細胞分化に関する病理学的検討)	
論文審査委員	主査:	松本歯科大学 教授 佐原 紀行 (印)
	副査:	松本歯科大学 教授 篠原 淳 (印)
	副査:	松本歯科大学 准教授 田所 治 (印)
	副査:	(印)
	副査:	(印)
	副査:	(印)
最終試験	実施年月日	2015 年 11 月 12 日
	試験方法	<input type="checkbox"/> 口答 ・ 筆答
学位論文の要旨		
<p>【諸言】 コレステリン肉芽腫には多数のマクロファージと多核巨細胞が出現する。しかし、その細胞性格について、さらに、線維芽細胞や毛細血管内皮細胞がどこから供給されるのかなどの知見は乏しい。そこで、実験的にコレステリン肉芽腫を惹起させ、増殖する細胞種とその動態を明らかにすべく病理学的に検討した。</p> <p>【材料・方法】 ddY マウス(7 週齢)と GFP 骨髄移植マウスを用い皮下にコレステリン 10mg を埋入し、埋入 2 週間から最長 6 か月まで病理組織学的、免疫組織化学的、ならびに免疫蛍光二重染色により比較検討した。</p> <p>【結果】 病理組織学的には ddY マウスと GFP 骨髄移植マウスを用いたがその病理組織像について相違はなかった。埋入 2 週例では、肉芽組織がコレステリン結晶の塊の周囲から一部を置換していた。その中心部は大きな不規則な形状の空隙として観察された。これらの細胞は主に、マクロファージや多核巨細胞であった。大きな空隙に接する内部に毛細血管はほとんどなかった。大きな空隙に接する部分ではマクロファージや多核巨細胞の核の染色性は極めて悪かった。3 週例では、さらに中心部に行くに従いマクロファージや異物巨細胞の増殖があったが細胞核の消失により細胞形態を有せず、ただコレステリン結晶を分割するような構造とし観察された。3 か月例では、器質化していた。これらの部には、線維芽細胞と膠原線維と毛細血管の増生があり、コレステリンの分割化が進んでいた。最外層には線維芽細胞が膠原線維の走向に増殖しており、毛細血管もみられた。6 か月例では、中心にあった大きな不規則な形状のコレステリン結晶はほぼ線維芽細胞や膠原線維に置き換わっていた。最表層の被膜には、線維芽細胞と膠原線維と毛細血管が存在していた。免疫組織化学的検討では、CD68 について、コレステリン空隙の周囲に増殖した円形の核を持つ細胞や多核の巨細胞は明確に CD68 陽性を示した。埋入 2 週の増殖した肉芽組織の細胞はほぼすべて GFP 陽性であった。肉芽組織内には、極めて少量の線維芽細胞と膠原線維が介在しており、その線維芽細胞は GFP 陰性だった。しかし、6 か月経過すると、マクロファージと多核巨細胞の間には、多量の線維性組織が入り込み、これらを分割していた。その膠原線維と線維芽細胞間と毛細血管が介在していた。この大部分は GFP 陰性を示した。しかし、一部の紡錘形の核を持つ線維芽細胞は GFP 陽性を示した。次に、CD31 陽性細胞はほぼ肉芽組織の周辺部に限局していた。最外層の線維性組織内には内層と比べ多くの CD31 陽性が認められた。免疫蛍光二重染色による検討では、GFP-CD68 の組み合わせについて、CD68 陽性のマクロファージと異物巨細胞は GFP 陽性を明確に示した。紡錘形細胞の一部には GFP のみ陽性の細胞も存在していた。GFP-CD31 の組み合わせでは、一部の血管内皮細胞は GFP と CD31 の二重陽性を示した。</p>		

(様式第 13 号)

【考察】 病理組織学的に埋入 2 週間例では、コレステリンの塊の残存による大きな空隙に接する部分ではマクロファージや多核巨細胞の核の染色性は極めて悪かった。これは、毛細血管がほとんど進入していないため細胞が壊死しているものと考えられた。3 か月例では肉芽組織に置換していた。コレステリン空隙の周囲に増殖した円形の核を持つ細胞や多核の巨細胞は明確に CD68 陽性を示した。興味深いのは、CD31 陽性の血管内皮細胞の GFP 陽性を呈するものが確認されたことである。今まで、血管内皮細胞が傷害刺激等により骨髄から移動してきた細胞から分化することに関して、若干の報告はあるが、これを明確に示したものはない。GFP-CD31 の蛍光二重染色による検討では、形態学的に明瞭な血管において、両陽性の血管内皮細胞が認められ、移植骨髄細胞由来である事が判った。以上の結果、毛細血管内皮細胞も骨髄間葉細胞由来であることが明らかになった。今回の実験系では 6 か月と言う長期にわたって肉芽組織形成が継続的になされていたためであろう。

学位論文審査結果の要旨

本研究は ddY マウス(7 週齢)と GFP 骨髄移植マウスを用い、皮下にコレステリン結晶(10mg)を埋入しコレステリン肉芽腫を誘発させ、埋入 2 週間から最長 6 か月まで病理組織学的、免疫組織化学的、さらに GFP、CD68や CD31などの免疫蛍光二重染色によりコレステリン肉芽腫を形成する細胞などの由来について検討している。

GFP-CD68 の免疫蛍光二重染色では、コレステリン結晶を取り囲んだマクロファージと異物巨細胞は CD68 と GFP にとも陽性を明確に示し、これらの細胞が移植骨髄細胞に由来する明らかにした。また、GFP-CD31 の免疫蛍光二重染色では、肉芽組織の一部の血管内皮細胞は GFP と CD31 に共染を示したことから、コレステリン肉芽腫周囲に盛んに新生される血管の内皮細胞の一部は移植骨髄由来である可能性を示唆している。

本研究の結果はコレステリン肉芽腫周囲におこる病理学的反応に特異的なものか判断はできないが、GFP 骨髄移植マウスを用い、慢性炎症さらにはその治癒過程に出現する様々な細胞の由来を解析できることを示した意義ある研究で、学位論文に値するものである。

最終試験結果の要旨

申請者の学位論文を中心に口答試問を行った。質問事項は以下に記したものである(順不同)。

1. 本研究に使用した GFP 骨髄マウスには移植時から全身に GFP 陽性細胞が移動していないか？
2. GFP 陽性をした血管内皮と判断した細胞はリンパ管内皮である可能性はないか？
3. ddY マウスを用いた実験系と GFP 骨髄移植マウスを用いた実験系における相違点は？
4. 今回のマウスの実験結果とヒトにおける臨床例とどのように異なるのか？
5. コレステリン以外の異物を埋入した場合の組織反応に差はあるのか？
6. 埋入局所におけるコレステリンの局在に変化はあるのか？
7. 形成された肉芽腫には長期的にどのような変化が惹起されるのか？
8. CD31 の免疫染色にて、血管内皮ばかりでなくマクロファージや異物巨細胞も陽性では？
9. GFP マウスの実験系について N 数が小さすぎないか？
10. 形成された肉芽組織の周囲と内部についてどのような違いがあるのか？

以上の質問に対し申請者からは明確な回答がえられたので、本審査会合議の結果、申請者は博士(歯学)として十分な学力及び知識を有するものと認め、最終試験を合格と判定した。

判定結果	合格	・	不合格
------	----	---	-----

備考

- 1 学位論文名が外国語で表示されている場合には、日本語訳を()を付して記入すること。
- 2 学位論文名が日本語で表示されている場合には、英語訳を()を付して記入すること。
- 3 論文審査委員名の前に、所属機関・職名を記入すること。