マウス唾液と創傷治癒に関する基礎的研究

河原 康・河合俊彦・酒向 誠
神野洋輔・河合 幹

An experimental study of wound healing and saliva in mice

Kou KAWAHARA・Toshihiko KAWAI・Makoto SAKOU
Yousuke JINNO・Tsuyoshi KAWAI

Abstract: Generally, a mouth wound heals faster than one in any other region of the body. Biological factors in saliva, such as kallikrein, amilase, lysozyme, immuno-globulin, renin, nerve growth factor and epidermal growth factor may influence wound healing—that is epithelialization, contraction, collagen synthesis, and scar remodelling. In this paper, we report the effect of saliva to the standard sacral open wounds of mice, varied with the caging method as follows:

group 1: wounded mouse caged in isolation.

group 2: two wounded mice caged together.

group 3: wounded mouse caged with mouse priorly sialectomized (Sublingual and submandibular gland). The wound area was measured every 7 days after surgery.

We obtained the results as follows:

1. We realized significant differences in each group. These findings suggest that biological factors in saliva accelerate wound healing.

2. Difference in the wound healing process between groups 2 and 3 suggests that the amount and characterization of saliva effect on the wound contraction.

Key words: wound healing (創傷治癒), mice (マウス), saliva (唾液)

I. 緒 言

一般に口腔内の創傷は、身体他部に比べ治癒が早く、唾液による影響が深く関係していると考えられている。唾液腺中には、Epidermal Growth Factor (EGF), Nerve Growth Factor (NGF), 免疫グロブリン、ライソザイム、カリクレイン、レニンなどの生物学的活性物質が含まれている¹⁻⁵⁾が、それらの生理活性物質の唾液内の存在意義についてはほとんどあきらかにされていない。しかしこれらの生物学的活性物質は、実験的には上皮化、創収縮、コラーゲン合成、瘢痕形成などに代表される創傷治癒過程と関連することが報告され、とくに

EGF, NGF については実験病理学、細胞培養などの手法によって、幅広く研究されている。EGF は *in vivo* において表皮細胞層の増殖と角化促進作用があり⁶⁾, *in vitro* において培養系表皮細胞の増殖、線維芽細胞のグリコサミノグリカン合成促進作用があるといわれている⁷⁾。

また創収縮に大きく関与する線維芽細胞によって、NGF が分泌されることが知られている⁸⁾。

以上のように基礎的な研究から、少なくとも創傷治癒と唾液中のそれぞれの生理活性物質との間に何らかの関連があると推論されているが⁹⁾、これらの個々の物質の作用のみでは、生態系における唾液全体の創傷治癒に対する影響を把握することは難しいと考えられる。そこで今回われわれは、ICR 系雌マウスを使用し、その背部皮膚に全層皮膚欠損創を作成し、その後それぞれ飼育条件を変えることによって、唾液の有無による創傷治癒の変化を生じさせ、定量的に観察したので若干の考察を加えて報告する。

愛知学院大学歯学部第2口腔外科学教室

(主任: 河合 幹教授)

The Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Aichi Gakuin University (Chief: Prof. Tsuyoshi Kawai)

受付日: 平成4年1月16日

II. 実験材料

実験動物は、7～8週齢(体重30～40g)のICR系雌性マウス(静岡県実験動物農業共同組合)を使用、実験中室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60\pm 10\%$ の環境下で飼育し、固形飼料(CMF—オリエンタル酵母工業)を与え、水道水を給水瓶にて自由摂取させた。

III. 実験方法

1. 皮膚全層欠損作製法

エーテル麻酔下、背部中央の仙骨部付近を剃毛し、24時間後にネブタール腹腔内麻酔下に替刃メス(フェザー社 No. 15)を使用し、同部広背筋膜上に直径10mmの円形皮膚全層欠損を作成した。

2. 実験条件

背部に作創したマウスは、以下の3通りの条件下で飼育し創傷治癒過程を比較した。

1) 単独群: 1ケージ中に単独で飼育した群(創の自然治癒をみるための対照群)

ケージ数=5

2) ペア一群: 1ケージ中に2匹ペアで飼育した群(マウス相互で創を舐めあい、創は唾液の作用を受ける群)

ケージ数=4

3) 唾液腺摘出ペア一群: 顎下腺と舌下腺を摘出したマウスと作創したマウスをペアで飼育した群

ケージ数=4

エーテル麻酔下、頸部正中を5%クロールヘキシジン溶液で消毒。同部に約1cmの皮膚切開をおいた後両側の顎下腺、舌下腺を摘出したものを唾液腺摘出群とした。切開創は、絹糸にて縫合して一次閉鎖した。摘出手術は実験の1週間前に行い、動物に体重変化がなくまた他の病的状態がないことを確認して実験に使用した。

3. 創収縮の定量的観察法

創傷治癒過程を肉眼的、定量的にとらえるために、創形成日を0日とし、24時間ごとに7日間写真撮影を行い面積計測を行った。

撮影時、メジャーをいれた透明なプラスチックプレートにマウス背部創面におき創面がフラットに表示されるようにし、35cmの固定焦点距離で写真撮影を行った。ついでメジャーを利用して写真を同一に拡大後、イメージスキャナー(EPSON社, GT 4000)でパーソナルコンピュータ(Macintosh SE)に入力した後、面積計測機能をもつアプリケーション(Canvas 2.0)を使用して創面の画像をトレースし面積を求めた(図1)。創形成直後の面積を100とし、その後の創面積を%で表した。また各データは各個体の面積測定値の平均 ± 1 標準偏差

図1 創面積計測法

写真1 各写真の左隅の数字は創形成後の経過日数を示す。

値(SD)で表した。各群間の有意差検定には、対応のないt検定を使用し、5%の危険率で有意差を判定した。

IV. 結果

単独群、ペア一群の間で作創後3日目ごろより創収縮にあきらかな差が認められ、ペア一群の方により早い創の収縮を認めた(写真1, 図2)。

創面積の計測値の経日的変化は各群間であきらかな差がみられた。創面積減少がもっとも早いのはペア一群で、次に唾液腺摘出ペア一群、単独群の順であった。ペ

図2 実験期間中における単独群，ペア群，唾液腺摘出ペア群の創面積減少経過
(創形成直後の面積を100として，その後の面積を%表示した)

ア群と単独群の創面積の差は術後1日目で約15%，2日目で約22%，3日目からその差は著しくなり約30%程度の差が認められた。唾液腺摘出ペア群も単独群より創面積の減少が速い傾向があったが，ペア群に比べれば遅延傾向が認められ，創面積の減少曲線はペア群と類似していた(写真1，図2)。

V. 考 察

Madden¹⁰⁾らは，われわれと同様の実験方法における測定誤差について報告しており，数人の計測者によって同一の写真をくり返し計測すると2%以下の測定誤差があると述べている。われわれも予備実験において写真撮影，トレースと面積計測をくり返し，同一創面において計測すると約1%以内の測定誤差にとどまるとの結果を得たので以降の実験を継続した。したがって今回の実験結果におけるペア群・唾液腺摘出ペア群と単独群との実験結果間にみられる創収縮過程の著しい相違は，創形成後の飼育環境すなわち互いの創の舐め合いの有無を反映していると考えられる。マウス唾液中には，EGF，NGF，カリクレイン，アミラーゼ，免疫グロブリン，ライソザイム，レニンなどの生物学的活性物質が含まれており，これらが創縁からの上皮細胞の遊走，増殖に基づく上皮再生と，創縁の皮膚全層の求心性移動による創収縮の2つ¹¹⁾に代表される創面の治癒過程に何らかの影響を及ぼしていると現在考えられている。

EGFは，創傷治癒に関する*in vitro*の実験でマウスの線維芽細胞や表皮細胞系など未分化な分裂期細胞の増殖，分化を刺激する一方，創傷治癒の初期に細胞遊走の支持組織であるフィブロネクチンの合成を促進するともいわれている⁷⁾。また表皮細胞層の増殖と角化促進を有することも病理的検索によって知られている⁸⁾。

Liら¹²⁾は創傷治癒に関して，創縁および創床の線維芽細胞の細胞遊走にNGFが関与していると考察している。また逆に線維芽細胞がNGFを分泌し創傷治癒に関与しているとの報告も存在する⁸⁾。

なお，EGFは，雄マウス顎下腺1gあたり1mgと多量に含まれており，雌ではその約1/15と性差がある。NGFは，雄マウス顎下腺1mgあたり404.00±50.300ng，雌では51.00±3.300ngの含有量であるとされている⁹⁾。

以上のことから今回の実験ではEGF，NGFの影響を極力排除する目的で雌マウスを使用した，われわれの実験結果は両者の含有量が少ない雌でも唾液の存在による影響を示しており，実験に雄を使用すればより顕著な相違を得たのではないかと考えられる。

本実験ではペア群と唾液腺摘出ペア群の間に大きな差がみられたが，この差は唾液量の差，あるいは顎下腺のないことによる差を示すものと考えられる。また唾液腺摘出群が単独群より治癒促進傾向を示したことは，同様に耳下腺・小唾液腺よりの分泌唾液の影響を示唆していると考えられる。

しかしHutsonの述べる創のlickingの結果すなわち痂皮の除去による影響⁹⁾も否定できないので，本実験における創面積収縮率の差(図2)は，マウスが創をlickingすることによる唾液そのものの影響に，舌の機械的因子が関与していることも考えられる。

創傷治癒に伴う創収縮機序については，線維芽細胞あるいはコラーゲン線維が大きく関与するとの従来の説に対し，最近ではGabbiani¹³⁾による筋線維芽細胞説も広く支持されている。筋線維芽細胞(myofibroblast)は肉芽組織中に存在し，形態学的に線維芽細胞と平滑筋細胞の両者の特徴を部分的に備えた細胞で，肉芽組織に平滑筋細胞拮抗剤を局所的に塗布することにより，創収縮が一時停止することが実験的に知られている^{10,14)}。

今回の実験結果のみでは，唾液は創傷治癒の2つの要素：すなわち筋線維芽細胞による創縁の皮膚全層の求心性移動，あるいは創縁からの上皮細胞の遊走・増殖に基づく上皮再生のいずれに影響しているかは明確でないが，比較的早期から治癒に差を認めることから恐らく両者に影響しているのではないかと推察される。今後この点については，さらに詳細に検討する必要があると考えている。

VI. 結 論

ICR 系マウスを使用し、その唾液が背部皮膚の創傷治癒に及ぼす影響を定量的に検討した。

1. ペアー群・唾液腺摘出ペアー群と単独群との間に創収縮率に有意の差がみられ、唾液中の生物学的活性因子が創傷治癒に促進的に作用することが推測された。

2. 唾液腺摘出ペアー群とペアー群の差は、唾液の量と質が創収縮に影響することを推測させた。

引用文献

- 1) Cohen, S. and Carpenter, G.: Human epidermal growth factor: chemical and biological properties. *Proc Nat Acad Sci USA* 72: 1317-1321 1975.
- 2) Varon, S., Nomura, J., et al.: The isolation of the mouse nerve growth factor proyein in a high molecular weight form. *Biochemistry* 6: 2202-2209 1967.
- 3) Fleming, A.: On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc Roy Soci Lond (Biol)* 93: 306-317 1922.
- 4) Werle, E. and Roden, P.: Über des Vorkommen von Kallikrein in der Speicheldrüsen und in Mundspeichel. *Biochem Z* 286: 213-219 1936.
- 5) Gresik, E., Michelakis, A., et al.: Immunocytochemical localization of renin in the submandibular gland of the mouse. *J Histochem Cytochem* 26: 855-861 1978.
- 6) Franklin, J.D., Lynch, J.B.: Effects of topical applications of epidermal growth factor on wound healing. *Plast Reconst Surg* 64: 766-770 1979.
- 7) Falanga, V., Zitelli, J.A., et al.: Wound healing. Periodic synopsis. *J Am Acad Dermatol* 19: 559-563 1988.
- 8) Young, M., Oger, J., et al.: Selection of a nerve growth factor by primary chick fibroblast cultures. *Science* 187: 361-362 1975.
- 9) Hutson, J.M., Niall, M., et al.: Effect of salivary glands on wound contraction in mice. *Nature* 279: 793-795 1979.
- 10) Madden, J.W., Morton, D.J., et al.: Contraction of experimental wounds. I. Inhibiting wound contraction by using a topical smooth muscle antagonist. *Surgery* 76: 8-15 1974.
- 11) Luccioli, G.M., Kahn, D.S., et al.: Histologic study of wound contraction in the rabbit. *Ann Surg* 160: 1030-1040 1964.
- 12) Li, A.K.C. and Maryjokoroly.: Mechanical and humoral factors in wound healing. *Br J Surg* 68: 738-743 1981.
- 13) Gabbiani, G., Hirschel, B.J., et al.: Granulation tissue as contractile organ: A study of structure and function. *J Exp Med* 135: 719-734 1972.
- 14) Morton, D. Jr., Madden, J.W., et al.: Effect of local smooth muscle antagonist on wound contraction. *Surg Form* 23: 511-512 1972.