凍結による皮膚損傷と回復の細胞動態論的解析

山 田 史 郎

Cell population kinetics in mouse skin epidermis after freezing

Shiro YAMADA

緒 言

凍結の生物学的利用には、細胞破壊と、細胞保護物質存在下における細胞保存の二つがある。一方、臨床医学上より考えると、生体組織の外科的摘出や一時止血のための凝固と^{1)~3)}、細胞破壊と^{4)~21)}、その目的によって二つに分けることが出来る。口腔外科領域においては、白板症、乳頭上皮肥厚症、アフター性口内炎、良性および悪性腫瘍などに対して、細胞破壊の手段として応用され効果をあげている^{16)17)19)~21)}。

組織破壊を目的とする凍結の適応範囲をみると、メニエル氏病¹⁰⁾¹¹⁾、前立腺腫瘍¹⁸⁾、直腸腫瘍¹⁴⁾、などに対するような特殊応用は例外として、多くは外界に面しているか、もしくは表層にごく近く局在している場合に利用されて、好結果を得ている。これは単に病的組織を確実に破壊することのみならず、周囲の正常組織からの回復による正常組織からの回復による正常構造の回復が得られていることに、大きな特徴があると言える。したがって凍結の臨床的応用に際しては、病的組織と正常組織の凍結後の反応態度、および周囲正常組織の回復機序を明らかにすることが重要であると考えられる。

今日まで、正常組織に対する凍結の影響については、犬の下顎骨や口腔粘膜²²⁾²³⁾、ウサギの口腔粘膜²⁴⁾、ラットの肝臓²⁵⁾、マウス耳介²⁶⁾、足²⁷⁾、あるいはハムスター cheek pouch²⁸⁾、などを用いての研究がみられる。しかしこれらの研究の多くは、凍結後の光顕的、および電顕的観察にとどまっており、対象組織の障害の発現から回復による再生までを一連のものとして、組織を構成する細胞集団の動態的解析を行なった研究は少ない。

著者は、凍結による皮膚の損傷と回復の機構を明らかにするため、表皮細胞の細胞動態的立場からマウス皮膚を使用して以下の解析を試みた。すなわち、凍結後の障

害の発現を表皮細胞の核の大きさの変化、組織学的な染色性の変化、および表皮細胞密度の変化としてとらえた。また、障害からの回復を肉眼的に潰瘍直径の経時的縮小としてとらえ、その縮小過程を組織学的に表皮細胞核数、分裂細胞数、DNA 合成細胞数、および細胞周期の変化として把握した。

材料および実験方法

C₃H/He 系マウス (雌) の3~4カ月令、体重 25~30g のものを使用した。

1) 皮膚凍結

① マウスの固定

無麻酔下で手足を糸でしばり、固定板に伸展して固定し、右側背部皮膚を伸展し、凍結予定部を脱毛した。

② 凍結方法

冷媒には液体窒素を使用した。凍結用プローベは銅製円形シリンダー (以後プローベと称す) で先端が5mm, 10mm, 15mm, 23mm の正円形の平面をもっており、内部に液体窒素を充填して使用した。

凍結時間は1分とし、プローベ内部に液体窒素を入れ、十分に沸騰した時点で凍結を開始した。凍結中はプローベを手で支え、皮膚面への荷重がプローベの重さのみ (21.2 g/cm²) になるようにした。

③ 皮下温度測定

皮下温度の測定点は、各プローベ群供に、プローベ中心直下、および中心より5mm, 10mm, 15mm, 20mm の皮下で行なった。温度測定には、Frigitronics の Tissue Temperature Indicator を用いた。

2) 凍結後の潰瘍直径の測定

凍結による皮膚損傷の発現は、潰瘍形成を指標とした。潰瘍面の長径および短径を齒科用ノギスで経時的に計測し、(長径+短径)/2 を潰瘍の直径とし、その変化を凍結後の損傷の治癒過程として測定した。

3) 凍結後の皮膚の組織学的検索

凍結後の表皮の損傷、および再生までの過程を病理組織学的に検索するため、15mm プローベ凍結による皮膚

愛知学院大学大学院歯学研究科第一口腔外科学専攻

指導：永井巖教授

Ist Department of Oral Surgery, School of Dentistry, Aichi-Gakuin University

Director, Prof: Iwao Nagai

受付 昭和48年10月22日

を用いて、組織標本を作製した。

試料は、凍結部位よりも広い範囲で採取し、木製ブロックに伸展しピンで止め、ブアン氏液で固定し、通法にしたがい5μmのパラフィン切片とし、ヘマトキシリン・エオジン染色を施し、以下の項目について検索した。

① 細胞核径

凍結後、表皮細胞核濃縮を損傷の指標とし、その過程を核の直径の経時的变化として測定した。すなわち、凍結部位および非凍結部位の表皮細胞核の長径、短径を凍結後経時的にマイクロメーターを使用して顕微鏡下で計測した。

② 単位長さ当りの細胞核数

凍結後の皮膚損傷、および回復過程を表皮細胞集団の変化として把握するため、基底細胞層の配列に沿って50μm当りの細胞核数を計測した。

③ 潰瘍直径の測定

肉眼的計測による潰瘍直径と、組織標本からみた潰瘍直径の対応性を検討するため、組織標本からマイクロメ

ーターで潰瘍直径を求めた。

④ 表皮細胞の標識指数、分裂指数および細胞周期の測定

正常および凍結後の表皮細胞の細胞動態的解析を行なうため、表皮細胞における分裂細胞数の計測より分裂指数を、DNA 合成細胞数の計測より標識指数を、またコルヒチンによる分裂細胞の蓄積により細胞周期の測定を行なった。

分裂指数、標識指数計測のための試料は、³H-Thymidine (specific activity 13.0Ci/mM) 1.5μCi/g を腹腔内に注射後、1時間で皮膚を採取し、5μmのパラフィン切片にした。オートラジオグラフは、サクラオートラジオグラフ用乳剤 NR-M2 の乳剤塗布後 4℃ に保って4週間露出後、フジレンドール液にて4分間現像し、1.5%の酢酸液で停止の後、フジレンフィックスにて8分間定着し、水洗の後ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。

細胞周期は、コルヒチン (2.0mg/kg) 投与による分裂細胞の蓄積を利用し、³H-Thymidine の同時投与で3

図1 マウス皮下における凍結後の温度変化

直径 5mm, 10mm, 15mm, 20mm プローベを使用して1分間凍結した。測定は、プローベ直下, 5mm, 10mm, 15mm, 20mm の皮下で行った。縦軸：温度 (°C), 横軸：凍結開始後時間 (min)

時間の分裂細胞の蓄積から単位時間当りの細胞生産率を得て、以下の計算により求めた。すなわち、

$$\frac{\text{標識細胞数}}{\text{分裂細胞数}} = \frac{Ts+v}{Tb}$$

$$\frac{\text{非標識分裂細胞数}}{\text{全分裂細胞数}} = \frac{TG_2}{Tb}$$

$$\frac{\text{全分裂細胞数}}{\text{全細胞数}} = \frac{Tb}{Tc} \log_e 2$$

Ts = S 期の長さ, $TG_2 = G_2$ 期の長さ, Tc = 細胞周期の長さ, v = 効果的標識時間 (30 分), Tb = コルヒチン処理時間 (3 時間) とした²⁹⁾。凍結群では、潰瘍辺縁から正常部へ向って同心円状に 1.25mm の長さごとに区

切り、それぞれⅠ分画、Ⅱ分画、Ⅲ分画とした。各分画における全細胞数を計測し、その中の標識細胞数、分裂細胞数を計測し、標識指数、分裂指数を求めた。また細胞周期はⅠ分画でのみ測定した。非凍結群では、細胞 6000 個以上計測し、同様に標識指数、分裂指数、細胞周期を求めた。

結 果

1) 温度分布

各種の大きさのプローベを使用しての 1 分間凍結による温度分布を図 1 に示す。図 1 より、プローベ中心直下 (約 1mm の深さ) では -90°C までの温度の下降が得られた。またプローベの面が直接皮膚に接して凍結された部分 (プローベの円周内部分) の皮下では、プローベの種類にかかわらず常に -40°C 以下の温度の下降が得られた。

2) 凍結後の潰瘍の直径

各種の大きさのプローベによる凍結後の肉眼的潰瘍直径の縮小を図 2 に示す。

潰瘍消失までの日数は、5mm プローベ群では 23 日、10mm プローベ群では 28 日、15mm プローベ群では 32 日であった。以上の 3 群においては、潰瘍直径は時間と共に直線的に減少し、その傾きはほぼ一定で、したがって縮小率は 3 群で同じであった。

しかし 23mm プローベ群では 85% (14 匹中 12 匹) のマウスは 2 日以内に死亡した。これは、凍結による皮膚障害だけでなく、プローベが大きき内臓などの他組織の障害により死亡したものと考えられ、マウスを使用しての皮膚障害の実験に 23mm プローベを使用することは不適当と考えられた。

3) 凍結後の表皮細胞の損傷と皮膚組織障害の発現

表皮細胞は、凍結からの融解直後よりヘマトキシリン

図 2 凍結後の皮膚潰瘍の直径

潰瘍の長径、短径を歯科用ノギスで経時的に計測し、長径+短径/2を潰瘍の直径としてプロットした。各点の上下の横線は 8 匹のマウスにおける標準偏差をあらわす。使用したプローベは、直径 5mm, 10mm, 15mm のものである。縦軸：潰瘍直径 (mm), 横軸：凍結後日数 (Days)。

図 3 凍結後の表皮細胞核の核径の変化

表皮細胞核の長径と短径を別々にマイクロメーターで測定した。各点の上下の横線は、2 検体を使用し、細胞核 100 個を計測した標準偏差を示す。縦軸：核径 (μ), 横軸：凍結後時間 (Hours)。

図 4 凍結後の表皮細胞密度の変化

表皮 50μ 長さ当りの細胞核数をマイクロメーターを使用して計測した。各点の上下の横線は、マウス 4 匹を使用して単位長さ 500 回計測による標準偏差を示す。縦軸：表皮 50μ 長さ当りの細胞核数、横軸：凍結後時間 (Hours)

に濃染する核が出現し始め、2 時間で凍結部位の表皮細胞は全てこうした濃染核に変化することを認めた (写真 1, 2)。この凍結部位の細胞核の長径、短径の変化を図 3 に示す。融解直後 (凍結開始より 10 分) に核は縮小しはじめ、2 時間でその縮小は長径、短径共に約 3/4 となり、16 時間まで持続した。凍結部位における 50μ 当りの表皮細胞核数 (細胞密度) の変化を図 4 に示す。融解直後より 2 時間にかけて細胞密度はわずかに低下し、16 時間までこの状態が持続し、16 時間から 24 時間で 0 に近接する。凍結後 16 時間および 24 時間における組織像を写真 3, 4 に示す。写真 4 の矢印より左は核の消失した状態を示している。

以上のことより、凍結による急性障害の発現は、組織の凍結からの融解と同時に、2 時間以内で表皮細胞の核濃染および核の縮小、すなわち核濃縮という形で発現し、核は 10 時間の潜伏期で表皮より消失し、凍結された皮膚は潰瘍へと移行することを認めた。

4) 潰瘍治癒過程における組織学的検索

凍結後 6 日、14 日、21 日における表皮の組織学的変化は、写真 5, 6, 7 に示すごとく潰瘍辺縁より表皮細胞が著明に増殖する。潰瘍部は、図 5 に示されるごとく、組織標本上での実測によっても直径の直線の減少がみられ、図 2 の肉眼的潰瘍縮小の結果と対応している。以上のことより、潰瘍の縮小は、潰瘍辺縁部の表皮細胞の著明な増殖によって、潰瘍面が生産された表皮細胞で被覆されることにより行なわれることを認めた。

図 6 は、凍結後 24 時間、6 日、14 日、21 日、32 日における潰瘍辺縁より正常皮膚に向かって 250μ 当りの表皮細胞核数で細胞密度をあらわす。凍結後各日数共に潰瘍辺縁より 750μ から 1000μ にかけて細胞密度が高く、そ

図 5 組織標本上より計測した潰瘍直径の変化

直径 15mm プローベを使用して凍結後、組織標本上でマイクロメーターを使用して潰瘍直径を計測した。各点の上下の線は、マウス 4~8 匹の標準偏差を示す。縦軸：潰瘍直径 (mm)、横軸：凍結後時間 (Days)

図 6 回復過程における表皮の細胞密度の変化

標本的一端より他端まで走査し、250μ 当りの細胞核数を計測し、潰瘍中心点で左右に平均化してプロットした。格子紋様の部分は、マウス 4~8 匹の標準偏差を示す。a: 凍結後 24 時間、b: 凍結後 6 日、c: 凍結後 14 日、d: 凍結後 21 日、e: 凍結後 32 日で上皮化完了直後と考えられる標本、f: 凍結後 32 日で上皮化完了後 7 日位経過したと考えられる標本。

表 1 凍結処置後および無処置表皮における標識指数, 分裂指数の変化
潰瘍辺縁より外縁に向けて 1.25mm づつ区切り, I, II, III 分画とし, 各分画の全細胞数を計測し, 標識細胞, 分裂細胞より, 標識指数, 分裂指数を求めた。

	Total Cells	Labelled Cells	Labelling Index (%)	Metaphase Cells	Mitotic Index (%)
Control	6726	130	1.93	19	0.28
6 day	I. 2969	181	6.10	17	0.57
	II. 2664	30	1.13	5	0.19
	III. 1941	17	0.88	3	0.15
14 day	I. 2475	154	6.22	30	1.21
	II. 2510	22	0.88	14	0.56
	III. 2272	20	0.88	4	0.18
21 day	I. 2890	229	7.92	29	1.00
	II. 3082	47	1.52	20	0.65
	III. 2661	23	0.86	3	0.11

れより外縁では急激に細胞密度は低下し, 非凍結群と同様の値に移行する (図 6b, c, d). 潰瘍辺縁より正常密度になるまでの距離は, 6 日で約 1.5mm, 14 日, 21 日で約 3mm であり, 14 日, 21 日ではほとんど差はみられない。

潰瘍辺縁よりの各分画における ^3H -Thymidine による標識指数, 分裂指数を表 1 に示す。標識指数は, I 分画では非凍結群の 3~4 倍の値を示すが, II, III 分画では非凍結群レベルもしくはそれ以下である。分裂指数も, I 分画では高く非凍結群の 2~4 倍である。II, III 分画ではややばらつきはあるが, 非凍結群レベルもしくはそれ以下の値を示しており, I 分画で細胞生産が旺盛に行なわれていることを示している。

表 2 凍結処置および無処置表皮における細胞周期の変化
コルヒチン(2mg/kg)および ^3H -Thymidine(1.5 $\mu\text{Ci/g}$)の同時投与による 3 時間の分裂期細胞の蓄積を利用して求めた。(詳しくは本文参照) 凍結群の細胞周期は, I 分画においてのみ計測した。

	Tc	Tg ₁	Ts	Tg ₂
	(hours)			
Control	237.6	225.9	6.7	4-5
6 day	70.3	60.4	7.6	2.3
14 day	68.0	57.8	7.8	2.4
21 day	65.3	55.5	7.1	2.7

I 分画における細胞周期を表 2 に示す。細胞周期は 65~70 時間で, 各日数については差はほとんどなく, 非凍結群の 238 時間の約 1/3 である。各期をくらべてみると, S 期は凍結群では 7.1~7.8 時間で, 非凍結群の 6.7 時間とくらべて余り差はなく, G₂ 期も凍結群は 2.3~2.7 時間で, 非凍結群の 4 時間強に比し大差はないように思われる。これに対して G₁ 期は 55.5~60.4 時間と凍結後各日数の間では差はほとんどないが, 非凍結群の 225.9 時間と比較すると約 1/4 に短縮する。以上のことより, 細胞周期の短縮は, G₁ 期の短縮に大きく依存していることを認めた。

以上のことより, 凍結により生じた潰瘍の治癒は, 潰瘍辺縁の I 分画の 1.25mm の部分における表皮細胞の細胞周期の短縮を伴う急速な細胞増殖により行なわれている。続く II, III 分画では, 標識指数, 分裂指数の低下が見られたことより, 生産された細胞は角化層の存在することから見て, 分化し正常皮膚構造への移行を示す。細胞密度の点では, 潰瘍辺縁より 3mm 隔てれば, 正常な細胞密度となる。

5) 潰瘍消失後の肉眼的および組織学的検索

潰瘍消失後の皮膚は, 肉眼的にはほぼ正常に回復し, 体毛におおわれ, わずかに線状の瘢痕を残すのみであった。組織学的にみると, 32 日の標本では写真 8a にみられるように, 上皮化直後の肥厚した表皮と, 写真 8b のごとく表皮層はすでに正常に近い厚さに回復したものの 2 群よりなっている。この 2 群の表皮 250 μ 当りの細胞

核数を図 6 e, f に示す。上皮化直後の肥厚層を認める標本では、中央部で細胞核数は非凍結群と較べて有意の差は認められず、2mm 離れた付近に若干の増加を認めるが、3mm では非凍結細胞核数と有意の差はなかった。これに対して表皮層が正常に近い厚さを示す標本では、すべての部で非凍結細胞核数とくらべて有意の差はなかった。

考 按

凍結による細胞への致死効果は、氷結晶の産生により生ずる。氷結晶の産生温度は、細胞内原形質に含有される電解質の存在によって影響を受け、 -10°C から -20°C であり、氷結晶の出現のために、細胞は細胞内構造物の破壊により致死的損傷を受ける。著者の実験では -40°C 以下に凍結された表皮細胞は、凍結からの融解と共に核濃縮の出現を認めた。さらにこの核濃縮を起こした細胞は、16時間の潜伏期において24時間以内に表皮層より消失し、皮膚組織の障害として潰瘍に移行した。このことは、一度凍結された細胞は不可逆的な障害を生じ、それにより壊死におちいることを示している。現在までにマウス²⁶⁾、ラット²⁵⁾、における実験で2時間以内に凍結部細胞の核濃縮の出現をみている報告はあるが、致死効果との関係は明らかでなく、われわれの実験では、凍結による細胞の致死障害は、細胞の凍結の融解と同時にすでに発現しているものと考えられる。

凍結による細胞の死について Gage は、凍結された細胞は無選択にすべて死ぬと述べ、凍結によって生残する細胞が存在するのは、その組織容積が大きく、全体が凍結されないことに帰因することを指摘している²⁰⁾。われわれの実験や Gage の意見は、凍結による細胞の致死効果は、X線³⁰⁾や紫外線³¹⁾による細胞の致死効果とは異なり、凍結されれば全細胞が直ちに壊死に致ることを意味する。したがって、凍結による正常組織や腫瘍に対するこの無条件的致死効果が今日必ずしも認められていないのは、標的である組織や腫瘍が凍結されなかったことに帰因するものと考えられる。

以上のことを腫瘍凍結後の再発についてみると、一回凍結、あるいは反復凍結を行なってさえもいざんとして腫瘍の完全な治療効果は認められず、ある頻度での再発があることが報告されている¹⁸⁾²⁰⁾²¹⁾³²⁾。森田の実験においても、凍結回数に依存して確かに腫瘍抑制効果はみられるが、回数を増してもある一定の再発があることを報告し、これらの再発場所は腫瘍最深部もしくは腫瘍辺縁であると述べている³³⁾。以上のことより、腫瘍凍結後の再発は、腫瘍容積が大きく腫瘍全体が凍結され得なかったこと、解剖学的には血管の存在、腫瘍の組織内浸潤などにより全腫瘍細胞が必ずしも凍結されず、凍結をまぬがれた細胞が存在していることに原因し、これらの未凍結細胞が再発に大きく関与しているものと考えられ

る。

凍結による細胞の壊死により、皮膚は潰瘍を形成する。この潰瘍部は創傷治癒の場合と同様に痂皮でおおわれる。痂皮は縮小しながら治癒するまで存在し、痂皮の脱落時には、痂皮下では潰瘍部の上皮化は完了している。これは組織学的には潰瘍へと移行した組織障害の発現と対応して潰瘍辺縁から正常表皮細胞の増殖により図 6 にみられる過程を経て、皮膚の再生が行なわれることを示している。

潰瘍部組織修復のための表皮細胞の増殖開始については、致死線量の X 線照射では照射後10日前後の表皮細胞の消失する時期と対応して周囲表皮細胞の増殖がみられ、障害を受けた細胞が消失して始めて周囲の表皮細胞の増殖が開始されることが報告されている³⁴⁾。このことは、表皮細胞の欠失が増殖開始の引き金となっていると考えられる。凍結後においては著者は、この表皮細胞増殖の開始について十分な検討は加えなかったが、組織学的に24時間で核が表皮より消失していること、また潰瘍縮小の開始が近似的に1日であって(図 2, 5)それ以後直線的に縮小すること、また48時間で潰瘍辺縁での分裂像の高まりをみていること³⁵⁾、などから凍結後24時間以後48時間以内に、細胞増殖が開始されているものと推定される。

こうした辺縁部の表皮細胞の増殖開始によって、潰瘍に発展した皮膚損傷部が縮小し、治癒が進行する。治癒過程における表皮細胞増殖の形について Howes は、創傷治癒過程においては一定の速度で上皮化が行なわれること、さらに再生上皮が欠損部に相接する状態となると増殖が停止することを報告している³⁶⁾。また X 線および紫外線の致死線量照射による潰瘍治癒も周囲正常表皮細胞の増殖によるものであることが報告され³¹⁾、山口らはその細胞増殖は G₁ 期の短縮を特徴とする細胞周期の短縮によって行なわれていると述べている³⁴⁾。著者の実験では、表皮の再生が、周囲表皮細胞の辺縁から 1.25mm の部分における細胞周期の短縮を伴った急速な増殖によって行なわれていることを認めている。これらのことにより、外傷性創傷、X線や紫外線の致死線量照射、凍結など加えられた皮膚損傷の障害源は違っても、回復に関しては、損傷部辺縁の正常表皮細胞から増殖が開始され、またその細胞周期が短縮する点で全て同様な経過をたどっているものと考えられる。

凍結による皮膚潰瘍を修復する表皮細胞の増殖層は、表 1 にみられるように潰瘍辺縁の1分画(1.25mm)に存在している。細胞増殖による肥厚層は、図 6 c, d より求めると約 3mm に達し、それより外縁は細胞数としては正常と有意の差はなくなる。増殖層の正常細胞数への移行時間は図 2, 5 より $3000\mu/250\mu/\text{日}=12\text{日}$ を要している。しかし上皮化完了時点での正常細胞数への移行時間は、図 5 の潰瘍縮小の直線より理論上は $26\text{日}+12\text{日}=$

38日を要すると推定されるが、凍結後32日で最早や正常細胞数を示した標本があること（写真 8b, 図6f）より、上皮化完了後は上皮化進行過程よりも短時間に肥厚部は正常細胞数にもどると考えられる。このことは、上皮化完了の時点で肥厚部の正常細胞数への移行に関して何らかの調節機構が働いていることを示唆している。

写真 凍結後の表皮の組織学的変化
標本は全てヘマトキシリン・エオジン染色を施した。写真右下の横棒は100 μ の長さを示す。

写真 1 無処置

写真 2 凍結後2時間。凍結された表皮細胞の全ての核に核濃縮を見る。

写真 3 凍結後16時間。核濃縮の状態のまま核は表皮に存在する。

結 論

凍結療法を行なう際、問題となる病的組織をとりまく正常組織の凍結障害と、その回復機構をあきらかにするため、C₃H/He系マウス皮膚を用いて、細胞動態的に解析を行なった。

1. -40°C以下に凍結された表皮細胞の障害は、凍結の融解と同時に核濃縮として発現する。この核濃縮を生じた細胞は、16時間の潜伏期の後24時間以内に消失する。上述の変化によって皮膚に潰瘍を生ずる。

写真 4 凍結後24時間。矢印より左は凍結された部位で、核は表皮より消失している。

写真 5 凍結後6日

写真 6 凍結後14日

写真 7 凍結後21日

5, 6, 7 共に, 凍結部位は潰瘍が形成され, 潰瘍辺縁より表皮細胞の著明な増殖がみられる。

写真 8-a 凍結後32日。上皮化完了直後と考えられる標本。表皮細胞の増殖による肥厚がみられる。

写真 8-b 凍結後32日。上皮化完了後7日を経過したと考えられる標本。表皮は正常構造をとりつつあり, 表皮肥厚も認められない。

2. 凍結により生じた皮膚潰瘍の回復は, 周囲の表皮細胞の増殖により行なわれる。この時の潰瘍縮小の速度は, 障害の大きさにかかわらず一定であった。

3. 潰瘍縮小は, 潰瘍辺縁の表皮細胞の細胞周期の短縮を伴った急速な細胞増殖によって行なわれる。

4. 潰瘍縮小に関与する表皮細胞の増殖は, 潰瘍辺縁

1. 25 mm の部分に局限して行なわれる。この辺縁の増殖層は組織学的に肥厚層として存在する。

5. 上皮化完了後, この肥厚層は短期間に正常細胞数にもどる。このことは肥厚部の正常構造化に関して何らかの調節機構が働いていることを示唆している。

稿を了えるに臨み, 御指導, 御校閲いただきました教室主任, 永井巖教授に感謝致しますと共に, 本研究のための場を快よくお引き受け下さった愛知県がんセンター研究所放射線部松沢大樹部長に深謝致します。

本研究に際し, 論文作製までの間, 直接御指導下さいました愛知県がんセンター研究所放射線部坪内進研究員に深謝致します。さらに, 種々有意な助言と協力をいただきました同放射線部の方々に感謝致します。

本研究の要旨は, 第27回日本口腔科学会総会にて発表した。

文 献

- 1) Cooper, I. S. : Cryogenic freezing of brain tumors for excision or destruction in situ. *J Neurosurgery* 20 : 921-930 1963.
- 2) Bluestone, C. C. and Smith, H. C. : Intranasal freezing for severe epistaxis. *Arch Otolaryng* 85 : 119-121 1967.
- 3) Allington, H. V. : Liquid nitrogen in the treatment of skin diseases. *California Medicine* 72 : 153-155 1950.
- 4) Ostergard, D. R., Tounsend, D. E. and Hirose, F. M. : Treatment of chronic cervicitis by cryotherapy. *Am J Obstet Gynec* 102 : 426, 432 1968.
- 5) Ostergard, D. R., Tounsend, D. E. and Hirose, F. M. : The long-term effect of cryosurgery of the uterine cervix. *J Cryosurgery* 2 : 17-22 1969.
- 6) Collins, R. J., Golab, A., Pappas, H. J. and Paloucek, F. P. : Cryosurgery of the human uterine cervix. *Obst Gynec* 30 : 660-667 1967.
- 7) Ostergard, D. R. and Tounsend, D. E. : The treatment of vulva condyloma acuminata by cryosurgery : A preliminary report. *Cryobiology* 5 : 340-342 1969.
- 8) Hill, C. L. : Cryosurgical tonsillectomy. *Arch Otolaryng* 87 : 434-435 1968.
- 9) Peason, R. W. : Clinical experience with cryotherapy of the head and neck. *Laryngoscope* 78 : 623-631 1968.
- 10) House, W. F. : Cryosurgical treatment of Meniere's disease. *Arch Otolaryng* 84 : 616-629 1966.
- 11) Wolfson, R. J., Cutt, R. A., Ishiyama, E. and Myers, D. : Cryosurgery of the labyrinth-Preliminary report of a new surgical procedure. *Laryngoscope* 76 : 733-757 1966.
- 12) Cooper, I. S. : Cryogenic surgery : A new method of destruction or extirpation of benign or malignant tissues. *New England J Med* 268 : 743-749 1963.
- 13) Cahan, W. G. : Cryosurgery of the uterus : Description of technique and potential application. *Am J Obstet Gynec* 88 : 410-414 1964.
- 14) Cooper, I. S. : Cryogenic surgery for cancer. *Fed Pro* 24 : S 237-240 1965.
- 15) Cahan, W. G. : Cryosurgery of malignant and benign tumors. *Fed Pro* 24 : S 241-248 1965.
- 16) Barton, R. T. : Cryosurgery in nose and throat tumors. *JAMA* 204 : 570-573 1968.
- 17) Gage, A. A. : Cryosurgery for cancer. *Cryobiology* 5 : 241- 1969.

- 18) Gill, W., Long, W., Fraser, J. and Lee, P. : Cryosurgery for neoplasia. *Brit J Surg* 57 : 494-502 1970.
- 19) Emmings, F.G., Koepf, S.W. and Gage, A.A. : Cryotherapy for benign lesions of the oral cavity. *J Oral Surgery* 25 : 320-326 1967.
- 20) Gage, A.A., Koepf, S.W., Wehrle, D. and Emmings, F. : Cryotherapy for cancer of the lip and oral cavity. *Cancer* 18 : 1646-1651 1965.
- 21) Gage, A. A. : Cryotherapy for oral cancer. *JAMA* 204 : 565-569 1968.
- 22) Emmings, F. G., Neiders, M. E., Green, G. W., Koepf, S. W. and Gage, A. A. : Freezing the mandible without excision. *J Oral Surgery* 24 : 145-155 1966.
- 23) Passy, V., D'Ablaing, G., Turnbull, Jr.F.M. and von Leden, H. : Cryosurgery : A comparison of the clinical and histological response to epinephrine. *Laryngoscope* 81 : 1917-1925 1970.
- 24) Ernst, F.D., Gängler, P. and Pilz, W. : Die Wirkung extrem tiefer Temperaturen auf die Mundschleimhaut des Kaninchens. *Dtsch Stomat* 20 : 891-895 1970.
- 25) Fraser, J and Gill, W. : Observations on ultra frozen tissue. *Brit J Surgery* 54 : 770-776 1967.
- 26) 法貴昭 : クライオサージェリーと微小循環, 耳喉 49 : 63 ~70 1970.
- 27) Hardenbergh, E. and Ramsbottom, R. : Experimental frostbite : The effect of "Double Freeze" on tissue survival in the mouse foot. *Cryobiology* 5 : 336-339 1969.
- 28) Iida, T. : The effects of deep freezing on normal and inflamed hamster cheek pouch. *J Osaka Dental University* 3 : 82-94 1969.
- 29) Blenkinspp, W.K. : Cell population in the epithelium of the oesophagus, trachea and ureter in mice. *J Cell Sci* 5 : 593-401 1969.
- 30) Withers, H.R. : The dose-survival relationship for irradiation of epithelial cells of mouse skin. *Br J Radiol* 40 : 187-194 1967.
- 31) Blum, H.F., Butler, E.G., Dailey, T.H., Doube, J.R., Mawe, R.C. and Soffen, G.A. : Irradiation of mouse skin with single doses of ultraviolet light. *JNCI* 22 : 979-993 1959.
- 32) Myers, R.S., Hammond, W.G. and Ketcham, A. S. : Cryosurgery of experimental tumors. *J Cryosurgery* 2 : 225-228 1969.
- 33) 森田仁 : 固形腫瘍に対する凍結の制癌効果 : 細胞動態的解析, 口科誌 20 : 860~868 1971.
- 34) Yamaguchi, T. and Tabachnick, J. : Cell kinetics of eidermal repopulation and persistent hyperplasia in locally β -irradiated guinea pig skin. *Radiation Research* 50 : 158-180 1972.
- 35) 山田史郎 : 未発表, 資料
- 36) Howes, E.L. : The rate and nature of epithelization in wounds with loss of substance. *Surg Gyn Obst* 76 : 738-745 1943.