冷凍創治癒過程の組織化学的研究

松村 隆 司

Histochemical study on healing process of the oral mucosal wound of the rat following cryotherapy

Takashi MATSUMURA

緒 言

冷凍外科は近年口腔外科領域において各種疾患¹⁻⁷⁾に対して広く用いられ、劇的な効果が報告されている。しかし結果は必ずしも一定していない。そこでこれに対して種々の基礎的な実験⁸⁻¹¹⁾が行われ、本学においても渡辺¹²⁾は凍結時の温度勾配について、また天羽¹³⁾は凍結後の骨組織の変化を、橋本¹⁴⁾は神経線維に対する影響を、阪口¹⁵⁾は歯牙への影響を、和久¹⁶⁾は血管に及ぼす影響を、さらに Iida¹⁷⁾ は炎症組織を凍結したあとの経過について報告している。

凍結後にみられる組織の変化には著明な浮腫の出現や組織修復がほぼ終わるまで壊死上皮が創部をおおっているなど特異な経過が認められる。特に臨床的には頬や舌など口腔軟組織を凍結したときに浮腫が著しく患者に不快感や不安感を与える場合が多く、この点患者管理面で配慮を要する。しかし一方、冷凍創には瘢痕形成の少ないことが観察されており、これは本療法の好ましい一面である。

今回わたくしは凍結創におけるこの特異な修復過程を組織学的および組織化学的に検索した。

実験材料と使用器械

1. 実験動物

体重 200 g 前後の雄性ウィスター系ラットを使用し、実験期間中はオリエンタル固形飼料と水道水を用いて飼育した。

2. 凍結用器械

Frigitronics 社の冷凍外科装置(写真 1-A)を使用した。この装置は亜酸化窒素を冷媒とし、各種プローベが

写真 1-A 冷凍外科装置 (Frigitronics Cryosurgical System)

写真 1-B 凍結用プローベ (直径 5 mm の円柱形)

用意されているので症例により使いわけが可能である。今回使用したプローベ(写真 1-B)は直径 5 mm の円柱形で T-hermister が装備され、Footcontroller により制御される。

3. 温度測定用器械

Bailey 社の CRYO-THERMOMETER BAT-5 (写真 2-A)を使用した。この器械は直径 0.32 mm の銅-ニッケル熱電対針(写真 2-B)を装備し、測定範囲は 100〜200°C までで、その測定誤差は 1% 以内である。

大阪歯科大学口腔外科学教室第 2 講座 (主任: 岡野 博郎教授)

Second Department of Oral Surgery, Osaka Dental University (Chief: Prof. Hakuro Okano)

受付日: 昭和 53 年 1 月 25 日

写真 2-A 温度計

写真 2-B 温度測定用の熱電対針 (直径 0.32 mm)

実験方法

実験 I プローベの冷凍能力

1) **プローベの表面温度**: 被験体に圧接されるプローベ表面の温度をプローベに直接、熱電対針を接触させて測定し、凍結器機の温度計に表示されるプローベ内部の温度との誤差を調べた。

2) **組織内温度**: 外頰部より温度針をプローベ直下に達するように刺入し、温度計とプローベの距離を 1 mm と 2 mm にして測定した。

実験 II 組織の変化

クロロホルム吸入麻酔下でラット頬粘膜に圧接法により 1 分間凍結を行い、術後 24 時間、2, 3, 4, 5, 7, 10, 14 および 20 日におおの 3 匹ずつ屠殺し試料を採取した。

1) **組織学的観察**: 通法によりヘマトキシリン・エオジン (以下 H-E と略す) およびワン・ギーソン染色を行った。

2) **組織化学的観察**: 凍結切片は Naphtol AS-MX

図 1 1分間凍結を行ったときのプローベ表面と内部の温度

図 2 1分間凍結を行ったときの組織内温度

を基質とする Burston の方法で alkaline phosphatase (以下 ALPase と略す) を、また Nitro-BT を electron acceptor とする Mori の方法で glucose-6-phosphate dehydrogenase (以下 G6PDH と略す) を検索した。

実験結果

実験 I プローベの冷凍能力

1) **プローベの表面温度**: 冷却を行った場合のプローベ表面の温度は、器機に表示するプローベ内部の温度より約 5°C 高い値を示す (図 1)。

2) **組織内温度**: 室温 $20 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 5\%$ において -20°C の温度域は粘膜下 1 mm と 2 mm の間の深さに達していた (図 2)。

実験 II 組織の変化

1) 組織学的観察

凍結後 24 時間: 凍結部を取り囲むように炎症細胞浸潤が認められ、特に好中球が多い。上皮の一部は融解壊死を起こし染色性の低下がみられるとともに、毛細血管の破綻と内皮細胞の核の消失、また一部に水腫が認められる (写真 3)。

凍結後 2 日: 凍結部を取り囲む炎症細胞浸潤が著明と

写真 3 凍結後24時間 (H-E 染色) ▼凍結部

写真 4-A 凍結後2日 (H-E 染色)

写真 4-B 凍結後2日 (ワン・ギーンソン染色)

なり、凍結部全域に強い水腫がみられる。また上皮ならびに皮下組織は融解壊死が著明となり、痂皮となって創部をおおっている(写真4-A)。ワン・ギーンソン染色においても凍結部の上皮ならびに直下の皮下組織は無構造になり、さらにその直下には強い水腫がみられるが、間質にはまだ新生したコラーゲン線維を認めない(写真4-B)。

写真 5-A 凍結後3日 (H-E 染色)

写真 5-B 凍結後3日 (ワン・ギーンソン染色)

凍結後3日：凍結部を取り囲む炎症細胞浸潤は帯状に幅広く認められる。痂皮はまだ残存して創部をおおっており、この直下の間質には水腫が著明である(写真5-A)。またワン・ギーンソン染色において間質にはまだ新生のコラーゲン線維の出現を認めない(写真5-B)。

凍結後7日：痂皮は剝離脱落し始め、その下に創縁部より新生の上皮が伸展している。また毛細血管の新生とともに紡錘形の大きな核を有する線維芽細胞がみられる(写真6-A)。ワン・ギーンソン染色においても創縁部より新生した上皮の伸展がみられ、また間質に幼若なコラーゲン線維の出現が認められる(写真6-B)。

凍結後14日：創部は新生した上皮でおおわれており、その直下の間質はコラーゲン線維で粗に満たされている(写真7-A)。ワン・ギーンソン染色においても新生されたコラーゲン線維が間質部を粗に満たしている(写真7-B)。

凍結後20日：創部をおおう新生された上皮の厚さも周辺部正常上皮と同様の厚さになり、また上皮下はコラーゲ

写真 6-A 凍結後7日 (H-E 染色)

写真 6-B 凍結後7日 (ワン・ギーンソン染色)

写真 7-A 凍結後14日 (H-E 染色)

写真 7-B 凍結後14日 (ワン・ギーンソン染色)

写真 8-A 凍結後20日 (H-E 染色)

写真 8-B 凍結後20日 (ワン・ギーンソン染色)

ン線維により満たされている (写真 8-A)。ワン・ギーンソン染色で間質部はすでに成熟したコラーゲン線維で満たされている (写真 8-B)。

2) 組織化学的観察

凍結後24時間：凍結部を取り囲む炎症細胞浸潤部に ALPase 活性が認められる (写真 9)。

凍結後2日：凍結部を取り囲む炎症細胞浸潤部に ALPase 活性が細い帯状に認められる (写真 10)。

凍結後3日：炎症細胞浸潤部の ALPase 活性は幅の広い帯状に認められる (写真 11)。

凍結後4日：炎症細胞浸潤部に帯状にみられた ALPase 活性陽性部はこの時期より活性の低下および消

写真 9 凍結後24時間 ALPase, ▼凍結部

写真 12 凍結後4日 ALPase

写真 10 凍結後2日 ALPase

写真 13 凍結後7日 ALPase

写真 11 凍結後3日 ALPase

写真 14 凍結後14日 ALPase

退傾向を示し始める (写真 12)。

凍結後7日：一時消退した ALPase 活性がこの時期より再びコラーゲン合成の旺盛な間質部に認められる (写真 13)。一方、伸展しつつある上皮に G6PDH 活性

を認める。

凍結後14日：創部は新生された上皮でおおわれているが、上皮下では ALPase 活性が依然として残っている (写真 14)。また新生された上皮の顆粒層には G6PDH

写真 15 凍結後14日 G6PDH

写真 16 凍結後20日 G6PDH

の強い活性が残っている (写真 15)。

凍結後20日：間質部にみられた ALPase 活性は消退している。また上皮層にみられた G6PDH 活性も周囲の正常上皮と同様の活性に復している (写真 16)。

考 察

Fraser¹⁸⁾ および岡野¹⁹⁾は冷凍療法について術中、術後の疼痛がなく出血および感染もみられず、ほとんどの症例に対して外来で短時間内に行うことができ、しかも局所凍結による全身的な影響はきわめて少ないので、幼児や高齢者さらに全身衰弱の著しい患者にも繰り返し行えると述べている。一般に超低温により組織が破壊される機構にはいくつかの説^{20~23)}があり、Whittaker⁹⁾、法貴²⁴⁾、山田²⁵⁾、飯田^{26~28)}も詳細に報告しているが、現在のところ定説はないようである。ブローベの冷凍能^{29,30)}、組織の種類および解剖学的な環境因子により組織の温度変化や反応が異なり^{8,10,11,27,31,32)}、加えてブローベ表面の温度は室温、湿度など外部環境に左右され、さらにブローベと生体組織の接触状態も冷凍効果を左右する因子である。そこで本実験に使用する冷凍装置の能力を調べるために臨床で広く行われている圧接法³³⁾を用い1分間組織凍結を行い、 -20°C の臨界温度域がどの程度組織の深部に達しているか、および組織内の温度がどのような温度曲線を描くかについて検討した。それによると臨界温度域は粘膜下1mmから2mmの間にあり、温度曲線は冷凍開始後に急激に下降し、 -38°C あたりで横這いとなり、そののちの水解に際しては緩徐に上昇することがわかった。そこで本実験では冷凍条件(室温 $20\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60\pm 5\%$ 、圧接法で1分間凍結)を一定として組織に与える影響の均一化をはかった。

冷凍創は出血を伴わず、その修復は壊死上皮を痂皮として残したまま行われるため術後の経過に特異な点が見られる。

1) 浮 腫

Natiella ら⁸⁾は冷凍創を組織学的に検索し術後の著明な浮腫の出現を特徴の1つとしてあげているが、本実験でも凍結後24時間から3日にかけて浮腫および炎症細胞浸潤が次第に顕著になり、凍結後3日がそのピークであった。さらにこの過程を組織化学的な面、とりわけエネルギー代謝に関与する酵素系からみると、ALPase 活性は壊死組織直下およびそれを取り巻く炎症細胞浸潤部に一致して認められ、凍結後24時間から3日にかけてその活性を強めていき、3日がそのピークで幅の広い帯状にみられた。創傷という刺激に対して血管間葉系は敏感に反応し、漿液の浸出とともに好中球を主とする炎症細胞を多数創傷部位に動員させるが、本実験でもこの反応が特に強く Natiella ら⁸⁾の報告と一致していた。その理由は冷凍創では壊死上皮が痂皮として創部をおおうこと、また凍結境界部の非凍結側での血管透過性の亢進およびリンパ組織への影響によるものと考えている。このことは受傷後、一定時間経過後に創部が血餅でおおわれる通常の開放創に比し、術後経過での大きな相違である。

2) 治癒の経過

阪本³⁴⁾は切創および焼灼創を組織学的および組織化学的に検索し、正常動物における口腔粘膜創は術後12時間から24時間において高度の急性炎症反応を呈し、2日から4日において上皮細胞の増殖および間葉組織の修復が始まる。6日になると組織修復機転が著明となり、12日から16日で大略治癒するものであると述べている。秋田³⁵⁾は外傷治癒機転を3期にわけ詳細に報告しており、また中村³⁶⁾はラット背部に直径5mmのスキン・パンチを施し、その治癒過程を組織学的および組織化学的に検索している。結果をみると正常動物における切創や焼灼創の治癒経過はおおむね阪本³⁴⁾の報告と差のない経過をとっていた。わたくしの行った実験では、炎症細胞浸潤部に出現する ALPase 活性は凍結後3日がピークで幅の広い帯状に認められ4日より消退し始めていたが、

冷凍創はこの炎症細胞浸潤の期間が長く治癒経過は全体的に遅延する傾向を示していた。

3) 瘢 痕

中村³⁶⁾や谷岡³⁷⁾および Kawakatsu ら³⁸⁾はコラーゲン合成と ALPase の密な関係について報告しているが、本実験でも炎症細胞浸潤部に相当する ALPase 活性陽性部は凍結後3日をピークに4日より消退していき、次にコラーゲンが新生される凍結後7日ごろより再び凍結部皮下組織に ALPase の強い活性を認めた。このコラーゲンの成熟化に密に関与する ALPase 活性は、創部がほぼ上皮で被覆される凍結後14日ではいまだ高い値を示し、20日ではほぼ正常状態に復した。また G6PDH は周辺部より修復しつつある新生の上皮顆粒層に強い活性を示し^{39, 40)}、凍結後14日ごろの創部をほぼ被覆した上皮でも依然強い活性を残していた。しかし、凍結後20日の創部上皮が周辺部正常上皮とほぼ同様の厚さに復した時点では、周囲の上皮と同様の活性に復していた。上皮は間質部より栄養をうけているため、創傷治癒に際しては間質部の炎症が消退したあとに上皮の伸展が始まるとされているが、冷凍創においても凍結後7日ごろより周辺部からの上皮の伸展がみられた。この上皮の伸展がみられる凍結後7日ごろまで壊死上皮が痂皮として創部をおおっていることは、日常臨床で創露出面の大きな場合に皮膚移植を施し瘢痕を防ぐことを考えると、冷凍外科療法において Poswillo¹⁰⁾ が報告している瘢痕形成の少ない点は、この治癒経過によるものであり臨床所見ともよく符合していた。

結 論

正常ラット頬粘膜に冷凍創をつくり組織学および組織化学的検索を行い、次のような結論を得た。

1. プローベ表面の温度と器機表示のプローベ内部の温度との間に約5°Cの差がみられた。
2. -20°Cの臨界温度域はプローベ直下において粘膜下1mmから2mmの間にあった。
3. 臨界温度域直下の ALPase 活性は凍結後3日ごろおよび7日ごろの2相性に現われ、前者は炎症と後者はコラーゲン合成、特にコラーゲンの成熟化に密に関与していた。
4. 冷凍創は炎症細胞浸潤の時期が長く、一般に創傷治癒は遅れるが、臨床的にも組織学的にも瘢痕形成は少ない。
5. G6PDH は上皮の新生過程とよく符合しており、伸展しつつある上皮の顆粒層に強い活性を示し、修復された上皮が周辺部正常上皮と同様の厚さに復した時期に、周囲の上皮と同様の活性に復した。

和51年10月10日、北九州) および第253回大阪歯科学会例会(昭和52年8月20日、大阪)において発表した。

なお、稿を終わるにあたり、御校閲をいただいた岡野博郎教授に深謝し、また御助言をいただいた飯田武助教授に感謝するとともに、種々御協力いただいた教室員各位に深甚の謝意を申し述べます。

文 献

- 1) Emmings, F.G., et al.: Cryotherapy for benign lesions of oral cavity. *J Oral Surg* 25: 320 1976.
- 2) Emmings, F.G., et al.: Combined curettage and cryotherapy for recurrent ameloblastoma of the mandible. *J Oral Surg* 29: 41 1971.
- 3) Sako, K., et al.: Cryotherapy of intraoral leukoplakia. *Amer J Surg* 124: 482 1972.
- 4) Gage, A.A., et al.: Cryotherapy for cancer of the lip and oral cavity. *Cancer* 15: 1646 1965.
- 5) 飯田 武, 他: 頬粘膜部に発生した血管腫(2例)の冷凍外科療法. *口科誌* 22: 258 1973.
- 6) 飯田 武, 他: 上顎に発生した中心性血管腫の冷凍外科療法. *口科誌* 23: 245 1974.
- 7) 飯田 武, 他: Ameloblastomaの搔爬凍結併用療法. *口科誌* 21: 402 1972.
- 8) Natiella, J.R., et al.: Tissue response to cryosurgery of oral cavity in rhesus monkeys. *Pathol* 98: 183 1974.
- 9) Whittaker, D.K.: Cryosurgery of the oral mucosa. A study of the mechanisms of tissue damage. *Dent Practit* 22: 445 1972.
- 10) Poswillo, D.E.: A comparative study of the effects of electrosurgery and cryosurgery in the management of benign oral lesions. *Brit J oral Surg* 9: 1 1971.
- 11) Shepherd, J.P.: Effects of lowered temperatures on rat pulp and gingivae. *Oral Surg* 42: 386 1976.
- 12) 渡辺邦一: 冷凍外科に関する実験的研究. *組織内温度と組織変化*. *日口外誌* 20: 5 1974.
- 13) 天羽 峻: 冷凍外科に関する実験的研究. *顎骨内温度と組織変化*. *日口外誌* 21: 439 1975.
- 14) 橋本良知: 冷凍外科に関する実験的研究. *神経の損傷と回復*. *日口外誌* 22: 753 1976.
- 15) 阪口 晴: 冷凍外科に関する実験的研究. *家兎下顎歯牙に及ぼす影響*. *日口外誌* 23: 464 1977.
- 16) 和久勝彦: 創傷治癒に伴う血管の立体的研究. *冷凍外科が血管系におよぼす影響*. *日口外誌* 24: 198 1978.
- 17) Iida, T.: The effects of deep freezing on normal and inflamed hamster cheek pouch. *J Osaka dent Univ* 3: 82 1969.

この論文要旨は、第21回日本口腔外科学会総会(昭

- 18) Fraser, J., et al.: Observations on ultra frozen tissue. *Brit J Surg* 54: 770 1967.
- 19) 岡野博郎：口腔領域における凍結療法. 日歯医師会誌 29: 454 1976.
- 20) Mandeville, A.F., et al.: Some observations on the cryobiology of blood vessels. *Laryngoscope* 77: 1328 1967.
- 21) Meryman, H.T.: Mechanics of freezing living cells and tissues. *Science* 124: 515 1956.
- 22) Armand, M.K., et al.: Tissue freezing. A theory for injury and survival. *Cryobiology* 2: 99 1965.
- 23) Goldwyn, R.M., et al.: Cryosurgery for large hemangiomas in adults. *Plast reconstr Surg* 43: 605 1969.
- 24) 法貴 昭：クライオサージェリーと微小循環. 耳喉 44: 69 1972.
- 25) 山田史郎：凍結による皮膚損傷と回復の細胞動態論的解析. 日口外誌 19: 518 1973.
- 26) 飯田 武：冷凍外科の現況. 歯界展望 48: 915 1976.
- 27) 飯田 武, 他：血管腫に対する Cryosurgery. 日口外誌 23: 41 1977.
- 28) 飯田 武：口腔領域の冷凍外科. 看護技術 18: 152 1972.
- 29) Hurt, W.C., et al.: Some clinical and histologic observations of gingiva treated by cryotherapy. *J Periodont* 43: 151 1972.
- 30) Mayers, P.D., et al.: The histological reaction of clinically normal gingiva to freezing. *J Periodont* 42: 346 1971.
- 31) Grimmett, H.: Liquid nitrogen therapy. Histologic observations. *Arch Derm* 48: 7 1967.
- 32) 亀谷寿彦：Cryosurgery の現況と将来. 外科治療 28: 461 1973.
- 33) 法貴 昭：Cryosurgery. 日耳鼻 79: 712 1976.
- 34) 阪本義樹：創傷治癒過程の組織化学的研究. 阪大歯学雑誌 4: 643 1959.
- 35) 秋田八年, 他：外傷治癒機転. 最新医学 16: 1850 1961.
- 36) 中村正之：創傷治癒過程におけるグルココルチコイドの影響および亜鉛の効果. 阪大歯学雑誌 19: 105 1974.
- 37) 谷岡博昭：創傷治癒過程の酸性 Phosphatase に関する組織化学的研究 (特にアルカリ性 Phosphatase, Esterase との関係について). 日口外誌 8: 268 1962.
- 38) Kawakatsu, K., et al.: Histochemical evaluation of enzymatic activities in human squamous cell cancer. *Cancer Res* 23: 539 1963.
- 39) 岡本次郎：唾液腺多形性腺腫の組織化学的研究. 日口外誌 23: 212 1977.
- 40) Mori, M.: Histochemical evaluation of enzymes in ameloblastic tumors-acanthomatous and granular cell ameloblastoma. *J Oral Surg* 28: 825 1970.