家兎口蓋粘膜創傷治癒時のリシルオキシターゼ活性と 病理組織所見について

神谷 祐 司

Lysyl oxidase activity and histological findings during healing of palatal mucosa of rabbit

Yuji KAMIYA

Abstract: The purpose of this paper is to investigate the mechanism of scar formation on the palate which can inhibit maxillary development after cleft palate surgery. After 4 types of operations (elevation of the mucoperiosteum, excision of the mucosa, excision of the periosteum, and excision of the mucoperiosteum) were carried out on rabbit palates, the healing process was studied histologically and biochemically by measuring lysyl oxidase activity which is necessary for collagen cross-linking.

The results were as follows.

The lysyl oxidase activity increased sharply and peaked at 4 days after elevation of the mucoperiosteum or excision of the mucosa when fibroblast had histologically appeared in the wound.

On the other hand, the activity increased gradually up to 14 days after periosteum excision, or excision of the mucoperiosteum, showing histologically remodeling of the underlying bone.

The results suggest that it is very important to avoid periosteum injury and to decrease the wound area exposing the bone without the mucoperiosteum as much as possible for growth of the maxilla after cleft palate surgery.

Key words: wound healing, palatal mucosa, lysyl oxidase

結 言

口蓋裂の手術の目的は、口蓋の形態的および機能的改善にある。しかしながら、手術の目的は達しながらも、術後の顎発育障害に悩まされることがしばしば経験される。この顎発育抑制をひき起こす原因は、先天性の発育不全因子の存在を説くものもいるが¹⁾、一般的に手術による影響が大きいとされている^{2~8)}。

当教室でも、広瀬²⁾が模型計測で、立松³⁾は側方頭部

X線規格写真で、同一患者の長期的な観察を行い、口蓋裂の手術がその後の顎発育に影響を与えると報告している。一方、このことは、Herfert⁴⁾、Kremenak^{5~7)}、Searls⁸⁾による動物実験でも証明されている。

以上のごとく、臨床的にも、実験的にも口蓋裂の手術がその後の顎発育に大きな影響を及ぼしていることは明らかであるが、この手術という外科的侵襲についての基礎的な研究は比較的少ない。皮膚における創傷治癒の研究は古くから数多くなされているが、口蓋粘膜の創傷治癒に関する研究は少ない。皮膚と口蓋粘膜の創傷治癒を比較した場合、環境面では、食物通過という物理的・化学的刺激や、外界からの細菌や口腔常在菌などの持続的感染を避け難い条件下にある口蓋粘膜と、比較的細菌感染や物理化学的刺激を避けうる皮膚の創傷治癒では当然のことながら差がみられるであろう。また口蓋裂の手術創を考えた場合、粘膜骨膜が欠損することによって骨が露

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：昭和62年5月25日

出し、開放創となることがあることなど、創自体も皮膚の創とは違ったものになることなど、口蓋粘膜の創傷治癒は皮膚の創傷治癒の単なるアナロジーではなく、口腔粘膜に固有のものとして取り上げなければならない。

口蓋における粘膜骨膜欠損創は、口蓋裂手術時、ことに一般的に用いられている口蓋弁後方移動術においてよくみられる創であるが、この創は基本的には治癒過程の初期において、創収縮と上皮化がみられるといわれており^{9,10}、さらに安部¹¹は瘢痕組織が主役をなし、この硬い結合組織は長期間にわたり瘢痕拘縮として顎発育の抑制に働くと報告している。このように、口蓋粘膜における創傷治癒の研究は、形態の見地に立った病理組織学的研究は散見される^{9,11~16}が、局所のコラーゲンの動態としてとらえた生化学的研究は、大西¹⁰、須佐見²⁰の報告をみるのみできわめて少ない。

そこで著者は、口蓋形成術後の顎発育抑制因子と考えられる瘢痕組織の形成機構の解明のために、家兎口蓋粘

膜に各種の創を作製し、その治癒過程において、コラーゲン架橋形成に不可欠の酵素であるリシロオキシダーゼ活性の経日的変化を追求し、あわせて病理組織学的検索を行ったので報告する。

研究 方 法

1. 実験材料

実験動物として体重 2.5 kg の雌の日本白色家兎を 168 羽を用いた。耳静脈よりネブタール (Somnopentyl) 0.5 ml/kg を静脈内投与して全身麻酔を施した後、次項に述べる 4 群の実験群に供した。飼育は飼育用固形飼料と水道水により行った。飼育期間は、手術の治癒過程を経日的に観察しうるように、術後 12, 4, 7, 14 日とし、各群の各期日に 8 羽ずつ (リシロオキシダーゼ活性測定用 5 羽、組織学的検索用 3 羽) を屠殺し実験に供した。なお、用いた家兎の暦齢と体重の関係は図 1 のごとくである。

2. 手術群と作創法

手術群は、口蓋形成術時に考えられる創として、図 2 のごとく 4 群の創を設定した。ネブタール 0.5 ml/kg を耳静脈より注入し麻酔後、仰臥位に固定し、頭部を下垂位に保持した後、2つの開口器にて最大開口位をとり、1%キシロカイン (1/8 万エピレナミン入り) にて局所麻酔後、硬口蓋の片側に歯牙と口蓋縫線により限定した画一性をもった範囲に作創した。止血は圧迫止血にて行った。

A 群：粘膜骨膜剝離

口蓋正中部に切開を加え、口蓋神経血管束を損傷しないように左側硬口蓋の粘膜骨膜を剝離し、もとに戻し縫合した。

図 1 実験用家兎の暦齢と体重

図 2 口蓋作創の模型図

図3 基質の調製(1)

B群: 粘膜除去

右側硬口蓋の粘膜上皮を15番のメスにて、骨膜を損傷しないように除去した。

C群: 骨膜除去

口蓋正中に切開を加え、粘膜骨膜を剥離し翻転し、15番のメスにて口蓋神経血管束を切断しないよう注意して骨膜を除去し、もとに戻し縫合した。

D群: 粘膜骨膜除去

左側口蓋粘膜に正中を越えないよう硬口蓋中央に直径6mmの円形の切開を加え、粘膜骨膜を除去した。なお、規格をもたせるため、器具は直径6mmの円筒の器具を作製した。

3. 観察方法**(1) リシルオキシダーゼ活性測定**

前述のように屠殺した家兎の手術側の口蓋粘膜を、歯牙と口蓋縫線で限定した範囲で骨膜および肉芽組織を含め注意深く採取し、採取後蒸留水にて血液および食物残渣を洗い流し、可及的速やかに実験に供した。なお、D群の粘膜骨膜除去で6mmの円形に切除したのは、片側全てを除去すると術直後の組織量が不足するため、円形切除し周囲の限定された健常組織とともに採取した。

① 基質の調製(図3, 4)

基質の調製は、Siegel と Martin²¹⁾の方法に準じて行った。

すなわち、15~17日目のニワトリ胚の前頭骨40匹分を無菌的に取り出し、リシンおよびグルタミン酸を除いたEagle's minimum essential medium にアスコルビン酸 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、ベンジルペニシリン 2,000 u/ml 、ストレプトマイシン 100 u/ml 、 β -Aminopropionitrile (以下 β -APN) 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を加えた培養液を1 $\text{ml}/10$ 匹分の割合で加え、L-[4,5- ^3H] リシン (New England Nuclear 社製) を20 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 加え¹⁹⁾、気相を O_2 95%、 CO_2 5%とした後、シリコンゴム栓をして37°Cで18時間振盪培養を行った。その培地を捨て水洗し、組織を細切した

図4 基質の調製(2)

図5 酵素材料の調整

後、3 $\text{ml}/10$ 匹分の量の1M NaCl-0.05M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を加え、4°C 下に約4時間ゆっくりと攪拌しながら中性塩可溶性コラーゲンを抽出した。その後、60,000 Xg 遠心沈澱により分離した上清を、透析チューブに入れて、0.16M NaCl-0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) に対して6時間以上、3度透析をくり返した。透析後ただちに比放射能を測定し、これを基質として使用した。

② 酵素材料の調製(図5)

前述のごとく作創し、各時期に屠殺し得られた口蓋粘膜の組織を水洗し、可及的速やかに酵素材料として供した。また、対照として正常口蓋粘膜組織 (骨膜を含む) を酵素材料とした。なお、大西¹⁹⁾のリシルオキシダーゼの基礎的検討により、本酵素活性測定実験において、基質の安定性が低いため毎回基質を調製し、酵素材料採取

表 1 実験結果

群 \ 日	1	2	4	7	14
粘膜骨膜剥離群	585.2±136.0	732.4±229.5	1,193.8±220.2	767.4±114.4	573.6±232.1
粘膜除去群	748.6±168.9	711.8±225.1	1,191.8±289.3	992.2±314.2	784.2±320.9
骨膜除去群	530.2±235.4	450.6±152.0	631.0±200.4	1,107.2±170.5	1,457.2±386.5
粘膜骨膜除去群	598.8±253.1	704.0±202.6	654.8±167.0	1,233.2±147.6	1,191.8±268.6

cpm/mg protein

図 8 実験結果

クあたりの値とした。各群で得られた5回の値の平均値とそのSDは表1のごとくで、これをグラフで示すと図8のようになる。対照の正常口蓋粘骨膜は10回行った値の平均±SDを示している。

A群では、1日目は正常粘骨膜組織とほぼ等しいが、その後漸次上昇し、4日目で1,193.8±220.2とピークを示し、以後下降し14日目ではほぼ正常組織の範囲まで低下した。B群は1日目の値はやや高く、2日目とほぼ同じ値を示し、4日目で1,191.8±289.3のピークを示し、その後ゆるやかに下降し、14日目でも正常組織よりやや高い活性値を示している。C群では、術後1日、2日目はほぼ正常組織の範囲にあり、その後4日目より上昇し、7日目、14日目と上昇をつづけており、14日目でも1,457.2±386.5と高い活性を示していた。D群では、術後早期では実際の創の組織が少ないため限定された範囲の健常組織も含め測定したが、術後1日、2日、4日も正常組織よりわずかに高い値を示しており、その後7日で急激に高い値を示し、14日目でも1,191.8±268.6とほぼ同じように高い活性値を示した。

以上4群を各群で比較してみると、A群とB群は多少の差はあるにしても、術後4日目にピークを示しその後徐々に正常組織に近づいている点で類似していることがわかる。さらにC群とD群は術後1日、2日、4日の早期の時点では正常組織よりわずかに高い活性を示し、その後7日、14日で高い活性を示すことで類似性を認める。それぞれ類似性を認めるA、B群とC、D群とを比較してみると、2群間での手術の差は、骨膜を残しているか否かであることがわかる。すなわち、骨膜が存在する創では、術後早期の4日目でリシンオキシダーゼ活性のピークがみられ、骨膜を除去した創では早期の活性は低く、14日目でも高い活性を示している。

2. 病理学的所見

(1) 粘骨膜剥離群 (A群)

術後1日目では、粘膜下層に出血がみられ軽度の炎症性細胞性浸潤を認めた。骨膜は不鮮明で、口蓋骨表層の骨細胞の変性壊死が認められた(写真2)。

術後2日目では、粘膜下層の出血は1日目とあまり変わらず、出血層上の粘膜組織に炎症性細胞浸潤が少しみ

写真 1 口蓋粘膜の正常組織 (H-E, ×32)

写真 3 A群4日目 (H-E, ×32)
出血層の器質化がはじまっている。

写真 2 A群1日目 (H-E, ×32)
粘膜下層に出血がみられる。

写真 4 A群4日目 (H-E, ×100)
出血層上の結合組織が密になってきて
いる。線維細胞の出現がみられる。

られた。骨細胞は変性壊死をきたしていた。骨膜は不鮮明で線維性組織の集まりとしてみられた。

術後4日目では、出血層は多少残るが周辺より一部結

合組織が認められ、出血層上の結合組織が密になってきていた。炎症性細胞浸潤は軽度になってきており、出血層の器質化が開始されていた。表層の骨は変性壊死をき

写真 5 A群7日目 (H-E, $\times 32$)
線維性結合組織が密になっている。

写真 6 A群14日目 (H-E, $\times 32$)
骨表層には一部新生骨陵がみられる。

写真 7 B群1日目 (H-E, $\times 32$)

上皮化結合組織は壊死を起こし、壊死組織下を断端上皮が進展しはじめている。

写真 8 B群4日目 (H-E, $\times 32$)

炎症性細胞浸潤が多量にみられる、上皮下、壊死組織下の結合組織は密になっている。

写真 9 B群7日目 (H-E, $\times 60$)

炎症性細胞浸潤は軽度になっている。壊死組織下の結合組織は密になっている。

たしていた (写真3, 4)。

術後7日目では、出血層はほとんどなくなり、骨に沿って線維性結合組織が密になってきており、出血層の器質化が進んでいることを認めた (写真5)。

術後14日目では、出血層はなくなり、骨表層には密な結合組織で被れた骨芽細胞層を表面にもつ新生骨陵が認められた。粘膜下組織は非手術側と同様であった (写真6)。

写真 10 B群14日目 (H-E, $\times 32$)
上皮化は完成され, 上皮下の結合組織
は密になっている。

写真 12 C群1日目 (H-E, $\times 32$)
骨表面上に多量の出血を認める。

写真 11 B群14日目 (H-E, $\times 150$)
新生された上皮の下では結合組織が上皮と平行にな
っている。

(2) 粘膜除去群 (B群)

術後1日では粘膜下組織には炎症性細胞浸潤が多くみられ, 骨膜上にも軽度みられた。骨膜は非手術側に比べやや不鮮明になっていた。上皮断端部は壊死組織下を伸展しはじめていた (写真7)。

術後2日目では, 粘膜下組織の炎症性細胞浸潤は1日目と同じ程度であったが, 骨表面上では増していた。骨膜は不鮮明であった。壊死組織下の結合組織はやや密になっておりその上を断端部上皮が進展していた。

術後4日目では, 炎症性細胞浸潤が多量に認められた。進展上皮は錯角化を呈しており上皮下および壊死組

写真 13 C群4日目 (H-E, $\times 32$)
出血層上の結合組織は密になってい
る。

織下の結合組織は密になってきていた。骨膜はやや厚みを増し, 密な線維性組織となってきた (写真8)。

術後7日目では, 炎症性細胞浸潤は軽度になっていた。上皮下の結合組織は4日目と同じようであった。骨

写真 14 C群7日目 (H-E, $\times 32$)
骨上の粘膜組織は密な線維組織となっている。新生骨陵が少量認められる。

写真 15 C群14日目 (H-E, $\times 32$)
骨表面上に新生骨陵が多量に認められる。

膜はやや厚くなっているが鮮明になってきていた (写真 9)。

術後14日目では、上皮化は完成されていた。新生上皮

写真 16 D群1日目 (H-E, $\times 32$)

粘膜断端に出血層を認め、骨露出部では骨細胞の広範な変性壊死を認めた。

写真 17 D群2日目 (H-E, $\times 32$)

粘膜断端部に密な線維組織がみられ、その部分を被うように上皮が進展をしている。

は薄く平坦で、上皮脚の形成はみられなかったが、錯角化がみられた。上皮下の結合組織は密になってきており上皮と平行になっていた。骨膜は鮮明となり、骨表面に新生骨の添加を認めた (写真 10, 11)。

(3) 骨膜除去群 (C群)

術後1日目では、骨表面上に多量の出血が認められ、炎症性細胞浸潤は軽度認められた。粘膜組織内および骨内の毛細管の拡張、うっ血が認められ、骨細胞の広範な変性壊死がみられた (写真 12)。

術後2日目では、出血層は多少少なくなってきたが、粘膜組織内および骨内の毛細管の拡張、うっ血は1日目と同様であった。出血層に接する粘膜組織はやや密となっていた。

術後4日目では、出血層がみられ、炎症性細胞浸潤がわずかに認められた。出血層上の結合組織はさらに密になってきていた。毛細管の拡張、うっ血は多少減ってきていた。骨内には破骨細胞がみられた (写真 13)。

術後7日目では、骨上の粘膜組織は密な線維組織となっており、骨表面では、一部腐骨が分離され、骨芽細胞

写真 18 D群4日目 (H-E, ×32)

上皮の進展はさらにすすんでいる。

写真 20 D群14日目 (H-E, ×24)

上皮は骨面に接するまで進展している。広範な腐骨分離が認められる。

写真 19 D群7日目 (H-E, ×40)

腐骨の分離が広範に認められる。骨髄内の新生骨の添加吸収がおう盛に認められる。

写真 21 D群14日目 (H-E, ×60)

進展上皮下の結合組織と新生骨上の結合組織は移行的になっている。

層のある新生骨陵が少量認められた。骨膜ははっきり認められなかった。骨髄内の血管の変化は、非手術側と変わらなかった (写真 14)。

術後14日目では、骨表面上に骨芽細胞層のある新生骨陵が多量に認められた。新生骨上の粘膜組織には骨膜様の線維性組織が認められた (写真 15)。

(4) 粘膜骨膜除去群 (D群)

術後1日目では、粘膜断端に炎症性細胞浸潤がみられ出血層も認められた。骨表面上は一部赤血球を含むフィブリン様物質で被れていた。骨細胞の広範な変性壊死を認めた。断端部の上皮の進展はあまり認められなかった (写真 16)。

術後2日目では、粘膜断端に密な線維組織がみられた。骨露出部は多量の菌塊とフィブリン様物質がみられた。断端部の上皮は1～2層が骨に向い断端の粘膜を被うように進展していた。骨細胞の広範の変性壊死が認められ、骨髄内には破骨細胞と骨芽細胞が混在していた (写真 17)。

術後4日目では、断端部上皮の進展は粘膜断端を被うように進展し、錯角化を伴っていた。粘膜断端の上皮で

被れた組織は非手術側に近づいてきていた。骨細胞の壊死は進行し、骨髄内での新生骨の添加が認められた (写真 18)。

術後7日目では、上皮の進展はさらに進み一部骨と接し、錯角化を認めた。炎症性細胞浸潤が断端部にまだ認められた。腐骨の分離が広範囲に進み、骨髄内の新生骨の添加吸収がおう盛に認められた。分離骨下面には密な結合組織が認められた (写真 19)。

術後14日目では、上皮は骨面に接するまで進展し断端の粘膜を被っていた。腐骨分離を認め、腐骨下面では骨芽細胞のみられる新生骨の増生がおう盛に認められ、腐

骨上面には菌塊が多量に認められた。進展上皮下の結合組織と新生骨上の結合組織とは移行的になっていた(写真20, 21)。

考 察

口蓋裂の手術は、現在では一般的に1歳半前後に行われており、その手術法は口蓋弁後方移動術が多く用いられている。しかしながら、正常な言語獲得のために行われるこの早期の機能的再建も、顎発育の面からみれば、思わしくないこととなることがある。

この口蓋裂の手術と顎発育障害についての論議は古くからあり、1940年代よりはじまっている。Graber²⁴⁾は、幼児期における口蓋形成術がその後の顎発育に大きな影響を及ぼすことを強調している。その後現在に至るまで数多くの研究報告がなされてきたが、その多くは、口蓋裂の手術が顎発育にとって抑制因子として働くというもので、広く一般に認められている。当教室においても、広瀬²⁾は同一患者の上顎模型の縦断的な計測を行うことにより、口蓋形成術後に顎各径の減少を認めその後も発育抑制を認めたと報告し、口蓋形成術が顎発育の抑制に大きな影響を及ぼしていると述べている。また、立松³⁾も口唇裂、口蓋裂児の側貌頭部X線規格写真を用いて口唇形成術、口蓋形成術の顎、顔面頭蓋の側貌形態に及ぼす影響をみたところ、口蓋形成術が主因をなすと報告している。

一方、この顎発育障害の因子を手術に求めてみると、現在広く用いられている口蓋弁後方移動術については粘膜骨膜の剥離と移動、口蓋動脈の切断による血液供給不足の問題、骨露出創の存在、創収縮(Wound Contraction)と瘢痕収縮(Scar Contraction)の問題などが考えられる。これら数々の因子の究明のために、今まで多くの動物実験がなされてきている。Lynch²⁵⁾は、手術後によって生じる瘢痕組織の機械的拘束力をあげており、Kremenak^{5~7)}らは粘膜骨膜弁の切除創、すなわち口蓋形成術における粘膜骨膜弁の移動によって引き起こされる開放創である骨露出創の存在をあげ、さらには創収縮を早期の重要な発育抑制因子としてあげている。また、安部¹¹⁾は粘膜骨膜切除による骨に対する直接的障害と、創治癒後の瘢痕組織による瘢痕拘縮を主因にあげている。このような基礎的研究をふまえ近年では、口蓋形成術も口蓋弁後方移動術のみでなく、顎発育に及ぼす影響を少なくしようとする手術方法も種々考案されるようになった。1974年 Perco²⁶⁾は骨膜を弁に含まない粘膜弁による閉鎖法を発表し、さらに上石²⁷⁾も同様の粘膜弁法による口蓋形成術を発表し、ともに骨露出創を少なくし瘢痕拘縮を極力少なくする手術法が考えられるようになった。

この瘢痕組織の形成を生化学的立場より見てみると、

表2 コラーゲンの合成過程
(文献29から引用)

1. Pro *d*-鎖の合成とペプチド鎖の集合期
 - ① ペプチド鎖合成
 - ② プロリンとリジンの水酸化(ビタミンC, Fe^{2+} , *d*-ケトグルタル酸を必要とする)
 - ③ ヒドロキシリシンへの糖の添加
 - ④ ジスルフィド結合形成
 - ⑤ 三重らせん形成
2. 細胞内移動と分泌期
 - ⑥ 非ヘリクス部分へ糖添加
 - ⑦ 細胞外への分泌
3. プロコラーゲンからトロポコラーゲンへ変換
 - ⑧ プロコラーゲンペプチダーゼによる分子の限定切断
4. 線維形成と架橋結合の時期
 - ⑨ トロポコラーゲン分子の集合
 - ⑩ リジンの酸化酵素によるリシンおよびヒドロキシリジンの脱アミノ反応(Cu^{2+} を必要とする)
 - ⑪ 架橋構造の形成とその安定化

創傷治癒におけるコラーゲンの生合成としてとらえることができる。近年コラーゲンの研究も盛んに行われるようになり、創傷治癒とコラーゲン代謝について多くの報告をみるようになった^{28, 29)}。そのなかで、瘢痕形成、瘢痕拘縮、ケロイド形成など過剰な組織反応をみる場合、コラーゲンの架橋形成が重要な意義を持っていると報告されている^{29~31)}。一般的に、軟組織での創傷治癒過程を形態学的変化でみると、炎症相、上皮化、細胞相、線維形成相に分けられ³²⁾、コラーゲン線維の分泌合成は線維形成相にて行われる。このようにして肉芽組織、結合組織が形成された後にも、コラーゲン線維は架橋結合の導入とその成熟によって安定化してゆく。このコラーゲンの合成過程は表2で表される²⁹⁾。この過程のなかで、架橋結合を形成するときに、架橋結合の前駆体の形成がリシロキシンダーゼという酵素により行われる。本酵素は、リシン(またはヒドロキシリシン)残基のε-アミノ基を酸化的脱アミノし、架橋結合の前駆体であるアリシン(またはヒドロオキシアリシン)を形成する酵素で、細胞の外でフィブリルを形成したコラーゲンに作用すると考えられている³¹⁾。

本酵素は、1968年に Pinnell と Martin²²⁾により報告されて以来、数多くの研究がなされ、ウトリ胚³³⁾、歯髄³⁴⁾、抜歯窩肉芽³⁵⁾、熱傷瘢痕組織³⁶⁾、カラゲニン肉芽腫¹⁹⁾などで証明されており、現在ではこの酵素は精製され諸性質が明らかになってきた³⁷⁾。下郷³⁵⁾は、肉芽組織中での活性存在および線維の増生時期に応じた上昇を

認めたことから、本酵素の生理学的意義はコラーゲンの生合成に関与すると述べており、さらに本酵素の活性の変化は病理組織学的な検索による線維の消長にはば一致していると述べている。大西¹⁹⁾は、カラゲニン肉芽腫における本酵素の経時変化を検討し、カラゲニン注入7日目に本酵素の活性ピークをみ、従来報告されているプロリル水酸化酵素と2日の時間のずれが生じたことは、本酵素は細胞外に分泌されたコラーゲンの架橋形成に関与するという特性をあらわすものとしている。さらに、Hayakawa³⁶⁾らは熱傷肉芽中に本酵素の活性をほとんど認めなかったが、その後に発生する肥厚性瘢痕の中に本酵素が受傷後2〜3か月で急激に出現、上昇し2〜3年高く、その後正常範囲に戻ることを報告している。以上のごとく、本酵素は創傷治療過程においてコラーゲンの成熟と関連があり、病理組織学的な線維の消長とも一致し、さらに肥厚性瘢痕の形成時に活性が高いことが報告されている。

そこで著者は、口蓋裂の術後の顎発育の抑制因子と考えられる瘢痕組織の形成を観察するために、リシルオキシダーゼの活性の経日的変化とその病理組織学的変化を口蓋裂手術時に想定される4種の創について比較検討してみた。

1. 実験材料および方法について

口蓋裂の手術は一般に生後1年半に行われるので、実験動物もその年齢に応じた幼若なものを使用することが望ましいが、口蓋の手術に際し十分な視野と試料が得られること、口蓋手術時の麻酔および出血などに耐えられる体力を持つことの2点より、家兎の体重2.5 kgを選択した。体重2.5 kgといえば、表1から考えれば家兎では生後3か月〜4か月で人では少年期にあたるものとする。また4種の創とは、口蓋裂の手術時に想定される創と、口蓋粘膜の創傷治療に関して重要な意義を持つといわれる¹⁹⁾骨膜の存在意義をみるために、A群（粘膜骨膜剝離群）、B群（粘膜除去群）、C群（骨膜除去群）、D群（粘膜骨膜除去群）の4群を作製した。D群においては、術後早期には創自体に組織が少ないため、創の治療に関与していると考えられる周囲の健全組織を含めて採取するため、片側口蓋粘膜中央に直径6 mmの穴をあけ、規定区域の組織を採取した。

2. リシルオキシダーゼ活性と病理組織学的所見

リシルオキシダーゼは、前に述べたごとくコラーゲン架橋形成の第一段階でリシン残基の酸化的脱アミノ反応を触媒する酵素で、下郷³⁵⁾によれば、本酵素の存在は病理組織学的な検索による線維の消長にはば一致しているといわれている。コラーゲンを分泌する細胞は、線維芽細胞や骨芽細胞などがあげられ、創傷部へは創周囲の結合組織に由来する線維芽細胞が遊走し、コラーゲン分子を合成、放出し新しい結合組織が形成するといわれている³⁸⁾。また、柄崎³⁹⁾によれば、培養線維芽細胞の正常発

育相は増殖誘導期、対数期、および細胞接触による増殖阻止が起こる定常期の3期に分けられ、増殖対数期の終りから定常期にはいるとき、コラーゲン前駆体に作用する酵素であるリシルオキシダーゼの活性が急激に高くなるといわれている。これらのことより、リシルオキシダーゼの活性の上昇は、コラーゲンを合成分泌する細胞である線維芽細胞や骨芽細胞の増殖およびこれらの細胞から分泌された架橋前のコラーゲンが存在することと一致すると考えられる。

以上のことを観察するために、今回リシルオキシダーゼの活性と病理組織学的所見とを比較してみた。

今回の創の4群のうち、骨膜の残存するA群、B群はリシルオキシダーゼの活性値はほぼ同じようなパターンを示し、術後4日目に活性のピークを示し、以後漸次正常組織に近づいてきた。これは、大西¹⁹⁾のカラゲニン肉芽腫におけるリシルオキシダーゼ活性のピークが7日目にあることと比較するとA、B群の方がやや早期にピークがあらわれていた。また、Cohen⁴⁰⁾らのラット皮膚開放創でのコラーゲン量が7日目頃にピークを示し、急速に減少するという報告とも異なっている。コラーゲン量とリシルオキシダーゼの活性のピークとを同一次元では考えにくい、細胞内でコラーゲンが合成され、その後細胞外に放出されたところでリシルオキシダーゼが作用するため、リシルオキシダーゼの活性ピークはコラーゲン量のピークよりやや遅れることが考えられる。このように考えると、皮膚カラゲニン肉芽腫、および皮膚開放創と比較すると、骨膜を残した口蓋粘膜の創（A群、B群）は早期にコラーゲンの生合成、分泌が行われているといえる。このことは、創傷治療過程においてコラーゲン合成が早期に正常に戻ることを早期治療と考えると、一般的に口腔粘膜の創は皮膚創より早く治療するといわれていること¹⁵⁾とも一致している。

次に、骨膜のみを除去したC群では、術後4日目までのリシルオキシダーゼの活性は正常粘膜組織とあまり変わらないが、7日目より急激に高い活性を示し、14日目ではさらに高い活性値を示していた。このことは、C群ではコラーゲンの合成、分泌が術後7日、14日たっても盛んに行われていると考えられる。さらに粘膜骨膜を除去したD群もC群ともほぼ同様な結果で、術後7日で急激な活性の上昇をみ、14日も7日目とほぼ同じ程度の高い活性値を示した。

ただし、D群では術後早期においては創の閉鎖がみられないので計測に十分な組織量が得られないため、規格性をもたせた周囲の健全組織も含めたものである。創は肉眼的には術後7日目で作創時の直径の約半分の大きさで骨の露出が残っていたが、14日目ではほぼ創の閉鎖をみている。

以上のごとく、D群の計測した組織は作創部の組織のみを計測した他の3群と多少異なるが、単位面積あたり

のコラーゲンの生合成としてとらえれば、D群もC群と同様に術後7日、14日でコラーゲンの合成、分泌が盛んに行われていると考えられる。C群、D群はともに骨膜を除去した創で、この2つの群はA群、B群と比較してコラーゲンの合成、分泌は遅くまで行われていると考えられ、さらに、前述の皮膚創と比較してもC群、D群は治癒が遅いと考えられた。以上4群のリシルオキシダーゼ活性を比較してみると、骨膜が存在するA群、B群と骨膜が存在しないC群、D群と大きく2つのパターンに分かれることがわかる。骨膜が存在すれば、コラーゲンの生合成は早期に行われ、骨膜が存在しなければ口蓋粘膜創傷部のコラーゲン生合成、分泌は遅くまで行われていると考えられる。

すなわち、創傷部のコラーゲン合成、分泌から考えれば、骨膜を残存させる口蓋裂の手術法は目的的方法といえる。コラーゲンの創傷治癒過程における役割は、この他にさらにその量と機能も重要であるので一概にこの結果から顎発育との関連について述べられないが、コラーゲンの生合成が遅くまで盛んに行われていることは、瘢痕組織も長期にわたり作られ続けていることとなり、それに伴う瘢痕収縮も大きく顎の発育に作用することが推察される。

以上のように生化学的に観察したものを、次に病理組織学的に観察してみた。A群では、術後1日目、2日目では粘膜下層に出血層がみられるのみで線維芽細胞はほとんどみられず、4日目では線維芽細胞が多量に認められるようになった。さらに7日目では粘膜下層の線維性結合組織が多量にみられるようになり、14日目ではそれがさらに増加し一部骨新生も認めた。これらの所見より、リシルオキシダーゼの活性がピークになっている4日目では、線維芽細胞によるコラーゲンの合成分泌が最も盛んに行われていることが考えられ、その後の7日目、14日目では分泌されたコラーゲンの成熟が進み線維性結合組織の増加として観察され、この時期においてはすでにコラーゲンの合成分泌はあまり行われていないと考えられた。またB群では、術後1日目、2日目では上皮下の結合組織の壊死が認められ、その壊死組織下に上皮の進展を認めるのみで線維芽細胞は少なく、4日目では多量の炎症性細胞浸潤と線維芽細胞の出現を認めた。さらに7日目では多量の線維芽細胞と線維性結合組織の増加を認め、14日目では上皮の完成された直下において線維性結合組織の配列が上皮と平行に整ってきていることが認められた。これらの所見とリシルオキシダーゼの活性を考えあわせると、術後4日目でのコラーゲンの合成分泌が最も盛んで、7日目でも線維芽細胞が多量に認められるが、この時点ではすでにコラーゲンの成熟としての線維性結合組織も多く認められることより、コラーゲンの合成分泌のピークはすでに過ぎているものと考えられた。14日目では、線維性組織は張力方向への配列が進んでお

り、コラーゲンの成熟はさらに進んでいると考えられた。C群では、術後1日目でみられた出血層上の結合組織の膨加は2日目でやや回復し、4日目では非手術側の結合組織より密となっていた。さらに7日目では、結合組織の状態はあまり変わらないが、骨表面上での骨の改造機転が認められ、14日目ではさらにそれが進んでいた。これらの所見とリシルオキシダーゼの活性をみると、類似した創のA群でみられる4日目の活性のピークがC群ではみられないが、このことは骨膜が存在するか否かで線維芽細胞によるコラーゲンの合成分泌に差が出てくると推察された。また、その後の7日目、14日目でリシルオキシダーゼの活性が上昇するのは、骨の改造機転が進行しているのと同じし、骨芽細胞よりのコラーゲンの合成分泌が盛んに行われていることが考えられた。さらにD群では、術後2日目では線維芽細胞の出現をみ、4日目ではさらにその数が増しているが、その時期でのリシルオキシダーゼの活性の上昇は認められていない。このことは、本酵素活性を測定した組織が創を作製した周囲の正常組織も含んでいるため、創に接する部の本酵素活性上昇が希釈されたと考えられた。しかしながら、その後の7日目、17日目では、露出骨の変性壊死が進み、壊死骨下面の肉芽と上皮下の結合組織は移行的になっており、同部の線維芽細胞も多く、さらに壊死骨下に於ける新生骨も認められることから、この時期にリシルオキシダーゼの活性の上昇がみられるのは、線維芽細胞のみでなく骨芽細胞よりのコラーゲンの合成分泌が盛んに行われているものと考えられた。

以上のことから、骨膜を残存させたA群、B群では創の治癒過程において、術後4日目では線維芽細胞の出現がみられ、この時期にリシルオキシダーゼの活性が最も高く、創におけるコラーゲンの合成分泌が最も盛んな時期であると考えられた。その後の7日目、14日目では、線維芽細胞から分泌されたコラーゲンの成熟が進み、線維性結合組織の増加および配列の整列化が進んでゆくと考えられた。一方、骨膜を除去したC群、D群では、術後7日目、14日目では、骨の改造が進行しており骨の新生がみられた。この時期のリシルオキシダーゼの活性の上昇がみられることから、線維芽細胞のみならず骨芽細胞のコラーゲン分泌が遅くまで続くと考えられた。このことは、コラーゲンの分泌が創傷治癒における初期の過程であることを考えると、遅くまでコラーゲン分泌が続いているC群、D群は、創の治癒が遅れると考えられ、さらには、その後の瘢痕組織の増加にもつながるものと考えられた。また、粘膜下組織と腐骨下の肉芽組織との直接的結合は顎骨の発育に対し抑制的に働くものと考えられ、伝庄¹⁷⁾も同様な所見を述べている。また、安部¹¹⁾はこの骨の改造が術後長期にわたり持続していることを報告し、その上にある瘢痕組織が瘢痕収縮として顎骨の発育に多大な抑制力として働くことと述べているが、本実験で

も術後14日目で分離された腐骨下での新生骨の添加をみており、この時期のコラーゲンの合成分泌が盛んに行われていると考えられた。さらに、安部¹¹⁾の述べているように今後も骨の改造が持続することが予想され、それに伴うコラーゲン分泌が続き、瘢痕収縮も長期にわたり持続し、顎発育にとって大きな抑制力として働くであろうと考えられた。

以上、本実験より得られた結果より考えると、口蓋裂の手術において顎骨骨膜を可及的に愛護的に扱い、粘膜骨膜除去創 (Raw Surface) の範囲を最小限にとどめることが、瘢痕組織およびそれに伴う瘢痕収縮による顎発育の抑制力を減少させることにつながると考えられた。このことから臨床的な意義を求めるには多少問題はあるが、骨膜を愛護的に扱うという点で、骨膜に侵襲の加わらない粘膜弁法^{26, 27)}、さらに Raw Surface の範囲を最小限にとどめるという点から、Hotz 床による術前顎矯正^{41, 42)}により口蓋の披裂幅を狭小化する方法や、二段階口蓋裂手術法⁴³⁻⁴⁵⁾により硬口蓋への手術侵襲を減らす方法は、顎発育の点からみれば優れた手術法と考えられた。

結 語

家兎口蓋粘膜に4種類の創、すなわち粘膜骨膜剝離 (A群)、粘膜除去 (B群)、骨膜除去 (C群)、粘膜骨膜除去 (D群) の創を作り、その経時的な治癒過程を観察するために、生化学的にコラーゲンの架橋結合に関与する酵素であるリシロキシダーゼの活性の変化を測定するとともに、病理組織学的観察を行い次の結果を得た。

1. リシロキシダーゼの活性は、A群、B群で術後4日目にピークがあり、以後漸次正常粘膜骨膜の値に近づいてきた。また、C群、D群では術後4日目でも本酵素の活性の上昇は認められなかったが、術後7日目より高い活性を得、14日目でもともに高い活性値を示した。すなわち、骨膜を保存した創のA、B群は術後早期にコラーゲンの合成分泌が行われており、骨膜を除去した創のC、D群は術後14日たってもコラーゲンの合成分泌が盛んに行われていることがわかった。

2. 病理組織学的所見では、A群、B群ともに術後4日目より線維芽細胞がみられ、その後7日目、14日目と線維性結合組織の増加と配列の規則性がみられた。C群、D群では、術後4日目に線維芽細胞を認め、7日目、14日目の線維性結合組織の増加も認めるが、さらに術後7日目頃より腐骨の分離、および新生骨の添加がみられ、骨の改造が認められた。さらに、腐骨下面の肉芽組織と粘膜下組織とは移行的に結合しており、これらは、顎発育にとって抑制的な力として作用することが考えられた。

3. 上記の1, 2より、骨膜保存の創であるA、B群は

術後4日目にコラーゲンの合成分泌が最も盛んで、それは線維芽細胞出現の時期と一致していた。骨膜を除去した創のC、D群では、術後4日目より、7日目、14日目の方がコラーゲンの合成分泌が盛んで、これは術後4日目より出現する線維芽細胞のみならず、その後出現する芽細胞からのコラーゲンの合成分泌によるものと考えられた。さらにコラーゲンの合成分泌が遅くまで続くことは、創の治癒が遅れ、瘢痕組織の増加にもつながると考えられた。

4. 以上の所見を臨床的立場よりみた場合、口蓋裂の手術に際しては、骨膜を可及的に愛護的に扱うこと、粘膜骨膜欠損創 (Raw Surface) の範囲をできるだけ少なくすることが、術後の顎発育の抑制を少なくすることにつながると考えられた。

稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なるご指導、ご校閲を賜った愛知学院大学歯学部第2口腔外科学教室河合幹教授ならびに生化学教室早川太郎教授に深く感謝致します。また本研究に対し終始ご教示ならびにご鞭撻を頂いた大西正信講師、服部吉幸講師ならびにご協力頂いた第2口腔外科学教室各位に深甚なる謝意を捧げます。

本研究の一部は、昭和61年10月第31回日本口腔外科学会総会において発表した。

なお、本研究の一部は昭和62年度文部省科学研究費補助金奨励研究 (A) 課題番号62771753の補助を受けた。

引 用 文 献

- 1) Monroe, C.W.: The surgical factors influencing bone growth, in the middle third of the upper jaw in cleft palate. *Plast Reconstr Surg* 24: 481-497 1959.
- 2) 広瀬恒久: 口蓋形成術後における上顎歯弓の経時的変化の観察。口蓋裂単独症例について。日口蓋誌 4: 15-47 1979.
- 3) 立松 充: 口唇・口蓋裂の披裂形態とその形成手術が術後の顎、顔面頭蓋の側貌形態におよぼす影響について (側方頭部X線規格写真による)。日口蓋誌 5: 1-18 1980.
- 4) Herfert, O.: Fundamental investigations into problems related to cleft palate surgery. *Brit J Plast Surg* 11: 97-105 1958.
- 5) Kremenak, C.R., Huffman, W.C., et al.: Growth of maxillae in dogs after palate surgery: I. *Cleft Palate J* 4: 6-17 1967.
- 6) Kremenak, C.R., Huffman, W.C., et al.: Growth of maxillae in dogs after palate surgery: II. *Cleft Palat J* 7: 719-736 1970.
- 7) Kremenak, C.R., Huffman, W.C., et al.: Maxillary growth inhibition by mucoperiosteal denervation of palatal shelf bone in non-cleft beagles. *Cleft Palate J* 7: 817-825 1970.

- 8) Searls, J.C. and Biggs, D.R.: Surgically induced maxillary growth inhibition in rats. *Cleft Palate J* 11: 1-16 1974.
- 9) 鳥飼勝行, 吉里勝利, 他: 口蓋粘膜の創傷治療の実験的研究 創収縮と上皮化の組織構造依存性について. *形成外科* 24: 450-456 1981.
- 10) Stark, R.B.: *Plastic Surgery*. 1st Ed, Harper and Row, New York, 1962, p 2-8.
- 11) 安部正之: 口蓋における粘膜骨膜欠損創の治療に関する実験的研究. *長崎医学会誌* 56: 279-291 1981.
- 12) Searls, J.C., Kremenak, C.R., et al.: Quantitative Characterization of Changes in Cellularity and Collagen Fiber Size in Contracting Palatal Wounds. *Cleft Palate J* 16: 373-380 1979.
- 13) Squier, C.A. and Kremenak, C.R.: Myofibroblasts in Healing Palatal Wounds of the Beagle Dog. *J Anat* 130: 585-594 1980.
- 14) Kahnberg, K.E. and Thilander, H.: Healing of experimental excisional wounds in the rat palate. *Int J Oral Surg* 11: 44-51 1982.
- 15) 稲村とし江: 走査電顕による口蓋粘膜の創傷治療過程の観察. *鶴見歯学* 6: 41-61 1980.
- 16) 伝庄信也, 小松世潮, 他: 幼犬の口蓋粘膜切除による上顎骨発育の変化に関する実験的研究. *札幌医誌* 50: 499-512 1981.
- 17) 伝庄信也: 幼若ラットの口蓋における各種手術創の治療過程に関する組織学的ならびに走査電子顕微鏡的研究. *札幌医誌* 51: 243-260 1982.
- 18) 伊藤正夫, 岡 達, 他: 口蓋粘膜の創傷治療に関する実験的研究 Rat 口蓋手術創傷の上皮形成速度に影響を与える要因について. *日口外誌* 31: 1029-1045 1985.
- 19) 大西正信: 創傷治療におけるリシルオキシダーゼ活性 実験的肉芽腫および口蓋粘膜創について. *日口外誌* 27: 1329-1336 1981.
- 20) 須佐美隆史: 家兎口蓋粘膜コラーゲンの加齢および創傷治療に伴う生化学的变化. *歯基礎誌* 27: 64-79 1985.
- 21) Siegel, R.C. and Martin, C.R.: Collagen Crosslinking: Enzymatic synthesis of lysine-derived aldehydes and the production of cross-linked components. *J Biol Chem* 245: 1653-1658 1970.
- 22) Pinnell, S.R. and Martin, G.R.: The cross-linking of collagen and elastin. Enzymatic conversion of lysine in peptide linkage to *D*-amino adipic- γ -semialdehyde (Allysine) by an extract from bone. *Proc Natn Acad Sci USA* 61: 708-716 1968.
- 23) Hartree, E.F.: Determination of Protein: A modification of the Lowry Method that gives a linear Photometric Response. *Anal Biochem* 48: 422-427 1972.
- 24) Graber, T.M.: Craniofacial Morphology in Cleft Palate and Cleft Lip Deformities. *Surg of Gynec & Obst* 88: 359-369 1949.
- 25) Lynch, J.B. and Peil, R.: Retarded Maxillary Growth in Experimental Cleft Palates, Mechanical Binding of Scar Tissue in Puppies. *Am Surg* 32: 507-511 1966.
- 26) Perco, M.A.: Primary closure of the cleft palate using a palatal mucosal flap: An attempt to prevent growth impairment. *J Max Fac Surg* 2: 40-43 1974.
- 27) 上石 弘: 口蓋粘膜弁による口蓋形成術. *形成外科* 12: 790-796 1979.
- 28) 永井 裕, 藤本大三郎編: コラーゲン代謝と疾患. 講談社サイエンスフィック, 東京, 1982, 206-213頁.
- 29) 久保木芳徳: 創傷治療の生化学的メカニズム. *歯科ジャーナル* 14: 433-444 1981.
- 30) Peacock, E.E. Jr.: Biology of wound repair. *Life Sci* 4: 1-9 1973.
- 31) Knapp, T.R., Daniels, J.R., et al.: Pathologic Scar Formation: Morphologic Biochemical Correlates. *Am J Pathol* 86: 47-63 1977.
- 32) Siegel, R.C., Fu, J.C.C., et al.: Collagen Crosslinking: The Substrate Specificity of Lysyl Oxidase. *Adv Exp Med Biol* 74: 438-446 1976.
- 33) Stassen, F.L.H.: Properties of Highly Purified Lysyl Oxidase from Embryonic Chick Cartilage. *Biochim Biophys Acta* 438: 49-60 1976.
- 34) Shimozato, K., Kawai, T., et al.: A lysyl oxidase distinct from amine oxidase in bovine dental pulp. *Arch Oral Biol* 21: 495-497 1976.
- 35) 下郷和雄: リシルオキシダーゼ, 実験的肉芽腫における存在について. *口科誌* 23: 380-390 1974.
- 36) Hayakawa, T., Hino, M., et al.: Lysyl oxidase activity in human normal skin and postburn scar. *Clin Chim Acta* 71: 245-250 1976.
- 37) Siegel, R.C. and Fu, J.C.C.: Collagen Crosslinking: Purification and substrate specificity of lysyl oxidase. *J Biol Chem* 251: 5779-5785 1976.
- 38) 早川太郎, 飯島憲一: 創傷治療に関する免疫生化学的機序. *歯科ジャーナル* 12: 413-421 1980.
- 39) 柄崎修一: 培養細胞のコラーゲン形成 蛋白質, 核酸, 酵素 24: 50-60 1979.
- 40) Cohen, K. and Moore, C.: Orset and Localization of Collagen Synthesis during Wound Healing in Open Rat Skin Wounds. *Proc Soc Exp Biol Med* 160: 458-462 1979.
- 41) Hotz, M.M., Gnoinski, W.N., et al.: Early Maxillary Orthopedics in CLP Cases: Guideline for Surgery. *Cleft Palate J* 15: 405-411 1978.

- 42) 栗田賢一、小牧完二、他：Hotz 型人工口蓋床による口唇口蓋裂早期治療，第Ⅱ報 口唇口蓋裂症例における顎発育への早期効果，日口蓋誌 12巻1号掲載予定.
- 43) Perco, M.A.: Two-Stage Closure of Cleft Palate. J Max -fac Surg 7: 76-80 1979.
- 44) Hotz, M.M. and Gnoinski, W.N.: Effects of Early Maxillary Orthopaedics in Coordination with Delayed Surgery for Cleft Lip and Palate. J Max -fac Surg 7: 201-210 1979.
- 45) 宮崎 正編集：口蓋裂，その基礎と臨床，二段階口蓋粘膜弁法，医歯薬出版，東京，1982，336-341頁.
-