札幌医誌 69 (3〜6) 75〜86 (2000)

口蓋形成術術後の上顎歯槽部，口蓋粘膜の知覚に関する研究 第2報 幼若ラットの口蓋粘膜切除後の神経再生に関する免疫組織化学的研究

須田善行 野口 誠 小浜源郁
札幌医科大学医学部口腔外科学講座（主任 小浜源郁 教授）
二宮孝文 辰巳治之
札幌医科大学医学部解剖学第一講座（主任 辰巳治之 教授）

Nerve Growth Associated with the Healing Process of Two Types of Palatal Wounds in Young Rats : An Immunohistochemical Study

Yoshiyuki SUDA, Makoto NOGUCHI, Geniku KOHAMA
Department of oral surgery, Sapporo Medical University School of Medicine
(Chief : prof. G. KOHAMA)
Takafumi NINOMIYA, Haruyuki TATSUMI
Department of anatomy (Section 1), Sapporo Medical University School of Medicine
(Chief : prof. H. TATSUMI)

ABSTRACT The purpose of this study was to examine nerve growth associated with the healing process of two types of palatal wounds. Nerve growth in palatal wound following palatoplasty was studied for up to 12 weeks postoperatively using immunohistochemical techniques. For the purpose of immunohistochemical analysis two groups of rats were created according to the degree and area of surgical excision.

Group 1 involved a partial-thickness excision of mucosa (supraperiosteal) with preservation of the mucoperiosteum. Group 2 involved a full-thickness excision of mucosa including the mucoperiosteum. Palatal area (2.5×5mm) was removed along the left-maxillary first and second molars for both groups of the rats at 3 weeks of age. After 1, 3, 5, 7, 14, 21, 28, 58 and 86 days of healing, decalcified material including the alveolar bone was sectioned and stained by means of H.E and immunohistochemistry for detection of the neurofilament protein (NFP).

In group 1, nerve growth was first detected by NFP immunoreactivity seen at between 3 to 5days. At 21 days, regenerated nerve fibers were clearly observed reaching beneath the epithelium. An increase in the number of regenerated nerve fibers was seen beneath the epithelium until 21 days, but after that, the number decreased gradually until day 86.

In group 2, the denuded bone surface was completely covered by regenerated squamous epithelium at 14 days. Regenerated nerve fibers were, however, observed only in the regenerated loose connective tissue adjacent to the excisional portion. No regenerated nerve fibers in the epithelium were found in the dense collagenous part of the connective tissue. The number of regenerated nerve fibers did not increase from day 1 postoperatively until day 86.

In conclusion, it can be stated that surgical preservation of periosteum and connective tissue in the palate resulted in a rich nerve growth in the regenerated mucosal tissue. When the mucoperiosteum was excised, however, the nerve growth in the developing submucosal scar tissue was poor.

(Received April 26, 2000 and accepted June 14, 2000)

Key words: Peripheral nerve, Palatoplasty, Neurofilament protein, Immunohistochemistry, Rat

1 緒 言

口蓋裂児の初回口蓋形成術術後の成績を小浜の粘膜弁法（以下，小浜法）施行例と従来の粘膜骨膜弁法施行例を比較すると，小浜法施行例の方が歯列口蓋形態，言語成績ともに良好であった[1-3]．小浜法と従来の粘膜骨膜弁法の口蓋の治癒経過の違いは，動物モデルを用いた実験で明らかにされている[4,5]．傳庄[4]は，幼若ラットの口蓋部に口蓋形成術に準じた各種の創を形成し，その治癒経過を組織学的ならびに走査型電子顕微鏡（以下SEMと略）による観察を行い，口蓋部の創において，骨膜を保存した例では，骨の損傷は軽度であり，粘膜骨膜切除例では，骨膜ならびに骨の再生が長期間にわたり障害されることを示し，その障害の原因として，粘膜下組織の瘢痕化に伴う骨への血流障害が主なものであると述べている．さらに，傳庄ら[5]，Leenstraら[6,7]は口蓋部の瘢痕組織形成が上顎骨の発育抑制の要因となることを明らかにした．

一方，Hochbergら[8]，Andrews[9]は，口蓋裂術後患者の口腔内の立体認知についての研究を行い，構音障害を認める口蓋裂術後患者の口腔内の立体認知能力は，健常者ならびに比較的構音が良好な口蓋裂術後患者よりも劣っていることを報告した．小浜法施行例は，粘膜骨膜弁法施行例と比較すると，言語成績が良好であり，この結果は，小浜法施行例では，口蓋裂児の異常構音に関わっていると考えられている歯列口蓋形態が良好であったことのみならず上顎歯槽部粘膜および，口蓋粘膜の知覚が関与していると考え，第1報で術式別に同部粘膜の知覚を比較検討した．その結果，小浜法施行例では，上顎歯槽部粘膜と，口蓋粘膜の知覚閾値が粘膜骨膜弁法施行例と比較して有意に低く，知覚障害の程度が軽いことを明らかにした．しかし，口蓋部の治癒経過と末梢の神経再生については，組織学的検索を行った報告はみられず，なお不明な点が多い．そこで，本研究では口蓋形成術に準じた異なる創による治癒経過と末梢神経の再生経過を明らかにする目的で，幼若ラットを研究材料として免疫組織化学的に検討を行った．

2 実験方法

2・1 実験動物

実験動物は，傳庄[4]の報告に基づきWistar系の雄性ラット（生後3週齢），体重約50 g，54匹を用い実験を行った．手術部位は臼歯部左半側硬口蓋で左側上顎第1臼歯近心部から第2臼歯遠心部までとし，範囲は約2.5×5 mmとした．対照は，臼歯部右半側硬口蓋の非手術側とした．手術後，1週間抗生物質を投与した．飼育期間は，術後1日から3か月間飼育ケージに入れ，ラット飼育室（動物実験施設内）にて生存させた．

2・2 口蓋粘膜切除手術

口蓋形成手術創のモデルは傳庄[4]の報告に基づき，幼若ラットの口蓋に骨膜上のraw surface（粘膜切除群）と骨のraw surface（粘膜骨膜切除群）の2種の創を形成した．手術はエーテル吸入麻酔下に以下の方法に従って行った（Fig. 1）．

2・2・1 粘膜切除群

手術創の形成は，骨膜に達しないように，左側上顎第一臼歯および第2臼歯の口蓋側歯頸部および口蓋正中部に縦切開，左側上顎第一臼歯近心部および第2臼歯遠心部に横切開を入れ，歯科用チゼルにて口蓋動静脈を損傷しないように粘膜下のraw surfaceを形成した（Fig. 1-A）．

2・2・2 粘膜骨膜切除群

粘膜切除群と同様の切開線とし骨に達する切開を入れ，粘膜骨膜を切除して骨面を露出した．さらに露出骨表面をガーゼにて擦過し，残っている軟組織および口蓋神経血管束を除去した．以上の操作により骨面のraw surfaceを形成した（Fig. 1-B）．

2・3 組織学的検索

2・3・1 固定法および切片作製法

手術後1，3，5，7，14，21，28，56，84日目に，6匹ずつ（粘膜切除群3匹，粘膜骨膜切除群3匹）pentobarbital sodium（Nembutal 50mg/kg body weight）をラットに腹腔内投与により深麻酔し，腹部を上にして固定台に四肢を固定した．開腹開胸の後，経心臓的にBouin液で灌流固定した．灌流固定終了後，Maedaら[10,11]の方法に従い，ただちに上顎骨の硬軟口蓋部を摘出し，さらに6時間Bouin液で追加固定した．

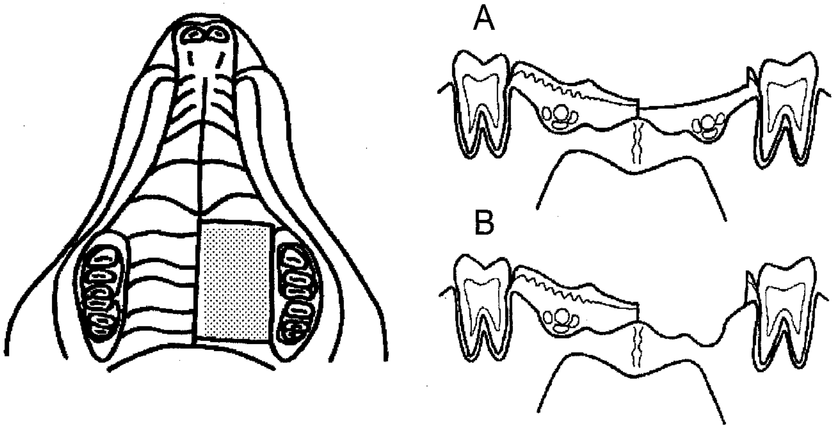

Fig. 1 Schematic drawing of the surgical technique for palatal aspects in rats. Surgical designs for rats in each of the groups are shown; surgery was performed on the left side only. A: excision of mucosa (supraperiosteum), B: excision of mucoperiosteum (denuded bone was present)

Plunk u. Rychlo 法で4日間脱灰した後，凍結処理を行い，ミクロトームにて5 μm と20 μm の凍結連続切片を製作し，前者をH-E染色に，後者を免疫組織化学的検索に供した．

2･3･2　免疫組織染色法

免疫組織染色はSAB法（ヒストファインSAB-POキット，ニチレイ）を用いた．凍結切片を，0.01M phosphate-buffered saline（以下PBS）で1回洗浄後，2%過ヨウ素酸にて内因性ペルオキシダーゼ活性を除去，PBSで1回0.1%Triton-X加PBSで2回洗浄を行い，一次抗体としてAnti-neurofilament protein monoclonal抗体（以下NFP, Sternberger社製，1：1500希釈）を試料上に滴下し，4℃, overnightでインキュベートした．0.1%Triton-X加PBSで3回洗浄し，2次抗体としてビオチン化抗マウス免疫IgG＋IgA＋IgM抗体を反応させた．室温下で，90分間インキュベート後0.1%Triton-X加PBSで3回洗浄しペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを滴下した．次いで室温下で，30分間インキュベート後PBSで3回洗浄を行いDABにて発色検鏡した．

なお，NFPの一次抗体はラット血清の混合抗体を用いpositive artefactを吸収しており，また，抗原抗体反応に対する対照試験では，染色陰性の結果を得た．

2･3･3　免疫組織学的染色成績の評価

各手術日の免疫組織化学的染色を行った切片標本を明視野顕微鏡下に，40〜200倍で観察し，標本内に赤褐色のNFP陽性の神経線維を認めた．さらに，NFP陽性の神経線維数の経時的変化を定量化する目的で，術式別の手術創から得た100切片上で末梢神経の数を計測した．対照として，非手術側の末梢神経も同じ方法で計測した．また，NFP陽性の神経線維数の評価はKangesuら[12]，Manekら[13]の評価に準じた（Table 1）．

3　成　　績

3･1　対照側

3･1･1　H-E染色所見

生後3週齢ラットの口蓋粘膜上皮は，重層扁平上皮からなり正中から口蓋側歯頸部にかけて一定の厚みを保っていた．粘膜固有層では，比較的密な線維芽細胞とコラーゲン線維から成る結合組織を認め，正中と歯冠部の中間に口蓋動静脈，口蓋神経束を認めた．また，深層においては，正中から口蓋側歯頸部にかけて血管も多くみられた．生後13週齢ラットの口蓋粘膜上皮は加齢における角質層の角化，横口蓋ヒダの明瞭化などを認めたが，基本的な構造には特に変化は認められなかった．

3･1･2　免疫組織学的染色所見

免疫組織学的染色においては，正中部から口蓋側歯頸部にかけて，粘膜上皮下の結合組織浅層では乳頭内に神経終末枝をおくものが認められ，口蓋側歯頸部に近づくにつれその数を減じていった．歯冠側周囲歯肉では歯根膜から歯肉乳頭部に細い単独の神経線維が上皮方向へと向かっているのが認められた．粘膜固有層の中，深層では神経線維は血管に伴走するものが多く認められた．口蓋神経束は粘膜固有層の深層のやや正中よりの部位に存在し，口蓋動脈に伴走し，2，3束の神経束から成る像を呈していた．免疫組織学的染色に

Table 1 *Criteria for semi-quantitative assessment of the level of immunoreactivity*

Score	Description	No. of nerve fibers per section
0	None	0
+/−	Occasional	1-2
+	Sparse	<15
++	Few	15-40
+++	Moderate	40-70
++++	Abundant	>70

おいても，加齢による変化は特には認められなかった．

3•2 粘膜切除群

3•2•1 H-E 染色所見

術後1日目で手術創は粘膜固有層の浅層までの切除創となり，周囲組織の浅層から深層にかけて炎症細胞浸潤と出血を認めた．粘膜固有層の深層にある口蓋動静脈，神経束は保存されていた．

術後3日目では，手術創の表面は，炎症細胞の滲出により剝離面が被われ，粘膜固有層の浅層から深層まで多数の炎症細胞浸潤を認めた．手術創の断端部では軽度の上皮再生像が認められた．

術後5日目では，手術創の粘膜上皮中央は一部で肉芽組織が露出しているものもあるが，上皮はほぼ再生されていた．粘膜固有層の浅層では炎症細胞浸潤は軽度で，新生毛細血管も散見された（Fig. 2-A）．

術後7日目では，手術創の粘膜上皮は完全に上皮で被われ，術後5日目例と比べその厚みを増し，大小不整の乳頭の形成を認めた．粘膜固有層では比較的密な線維芽細胞と細いコラーゲン線維からなる結合組織が認められた．

術後14日目では，手術創の粘膜上皮は，術後5日目例と比べさらにその厚みを増し乳頭の形成も旺盛であった．粘膜固有層では線維芽細胞とコラーゲン線維からなる結合組織も厚みを増していた．

術後21日目では，粘膜上皮は，その厚さが一定し，不規則な乳頭の形成がさらに顕著になり，乳頭内への毛細血管の進入が多くみられた．粘膜固有層では，緻密な線維芽細胞とコラーゲン線維からなる結合組織を認め，比較的太いコラーゲン線維束も認められた（Fig. 3-A）．

術後28日目では，手術創の粘膜上皮は角質層の厚さが一定となり，口蓋ヒダ様の突起も認められ，乳頭も規則的な像を呈していた．粘膜固有層では，緻密な線維芽細胞とコラーゲン線維網から成る結合組織を認めた．

術後56日目では，手術創の粘膜上皮は一定の厚みとなり，乳頭の形成も少なくなった．粘膜固有層の結合組織は，非手術側と比べると厚みを増していた．

術後84日目では，粘膜上皮は，部分的に厚いところも認められるが，厚さはほぼ一定で，上皮突起の伸長もごく一部に認められるのみであった．粘膜固有層では，術後56日目と同様の構造を認めた．

2•2•2 免疫組織学的染色所見

術後1日目で粘膜固有層内に中小の末梢神経束を認め，その神経線維形態は正常のものが大部分を占めた．手術創の直下では比較的小さな神経束では神経線維が膨化傾向を示すものが認められた．深層において，口蓋神経は保存されていた．

術後3日目では，粘膜固有層の浅層において，膨化した神経線維と非常に微細な神経線維を含む神経束が認められた．また，微細で脆弱な単独の神経線維なども散見された．数束の神経線維束から成る口蓋神経の周囲では，結合組織内への神経線維の伸長が認められた．深層における神経束において著変は認められなかった．

術後5日目では，粘膜固有層の浅層での神経束から神経線維の伸長が認められ，単独の神経線維が上皮方向へ伸長する像も認められた．口蓋神経周囲では神経線維の伸長を認めた．深層の血管に伴走する神経束でも粘膜上皮側，口蓋側歯頚部，非手術側への神経線維の伸長が認められた（Fig. 2-B，C）．

術後7日目では，再生した粘膜上皮下の神経束では乳頭内への著しい神経線維の伸長像を認めた．また，細い単独の神経線維の伸長も多く認められた．粘膜固有層の中層では，コラーゲン線維の走行に沿って蛇行する神経束も認められた．口蓋神経周囲では，微細で短い神経線維の伸長もみられた．

術後14日目では，粘膜固有層の浅層においては，神経束から上皮方向に進展する神経線維が多く認められる．あるものでは，上皮直下まで伸長し，数本の神経線維が上皮層近くまで分布し，自由神経終末を形成する像を認めた．深層の血管に伴走する神経束では，上皮側，非手術側，口蓋側歯頚部方向へ神経線維の伸長を認めた．

術後21日目では，粘膜固有層の浅層に認められた短く細い神経線維の数は減少し，変わって血管に伴走し神経束の上皮方向への著しい伸長を認めた．神経線維は比較的長く，一部の神経束は上皮直下で終末枝を形成し，あるものは固有層内で終わっていた．粘膜固有層の中層のコラーゲン線維が骨に平行に走行している

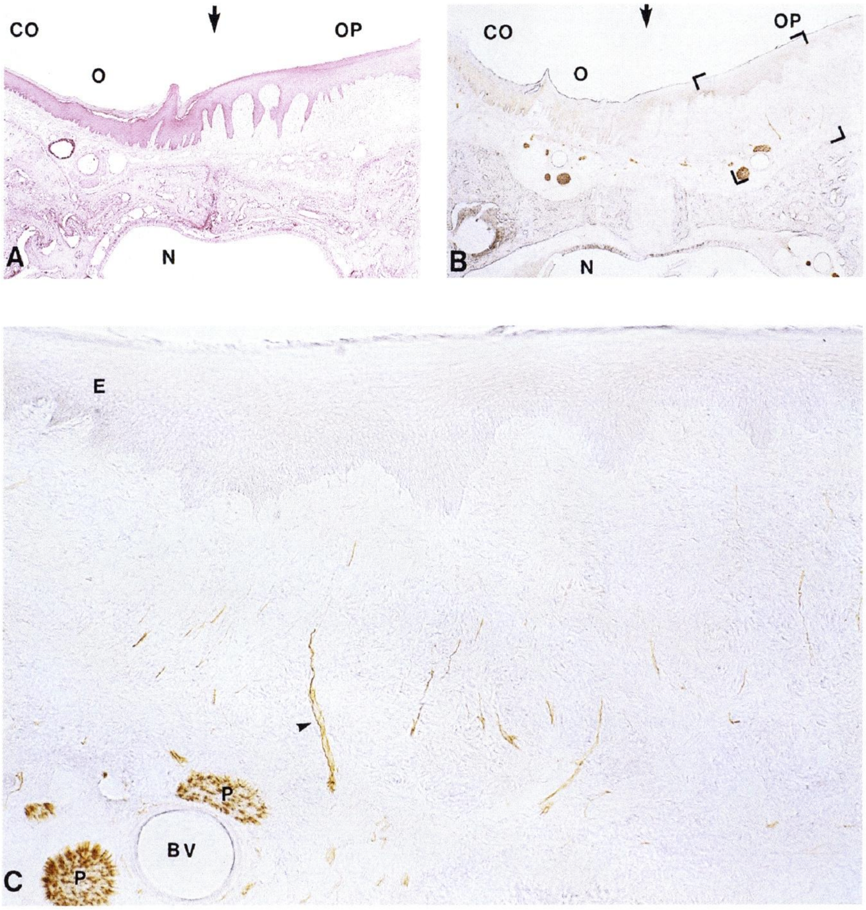

Fig. 2 Photomicrographs of cross-section of rat hard palate 5days after surgery involving excision of mucosa（A〜C）.
A : Migration has progressed and development of submucosal primitive connective tissue with slight inflammation is seen. Arrow indicates midline of hard palate. H. E.×27.
B : Immunohistochemical staining of NFP-positive nerve fibers in hard palate. Arrow indicates midline of hard palate. N. F. P.×27.
C : The site of operated side showing Fig. B with a higher magnification. Well-stained nerve fibers are growing vertically toward the epithelium（arrow heads）. N. F. P.×133. CO : control side, OP : operated side, O : oral cavity, N : nasal cavity, BV : blood vessel, E : epthelium, P : palatine nerve.

部位においては，短い神経束がコラーゲン線維と平行に走行している像も認められた（Fig. 3-B，C）．

術後28日目では，粘膜固有層において乳頭内に伸長する神経線維の数を術後21日例と比較すると差異が認められなくなった．口蓋神経周囲では比較的太い神経束を認めた．

術後56日目では，粘膜固有層の浅層における神経線維は減少傾向を認め，乳頭内への神経線維の伸長はわずかであった．口蓋神経周囲からの神経線維の伸長は認められなくなり，周囲の神経束も水平方向に伸長するものも少なくなった．手術創における神経線維束の数は非手術側に比べると多いが，その分布には類似の傾向が認められた．

術後84日目では，粘膜固有層の浅層から中間層にかけて神経線維束が散見され，口蓋神経周囲ではコラーゲン線維の走行と同様に水平方向に走行する神経束を認め，非手術側と類似の像を呈していた（Fig. 4-A，B，C）．

3･3　粘膜骨膜切除群

3･3･1　H-E 染色所見

術後１日目の口蓋側の手術創の骨面には炎症性細胞を含む細菌集塊が付着し，粘膜上皮断端部では，多形

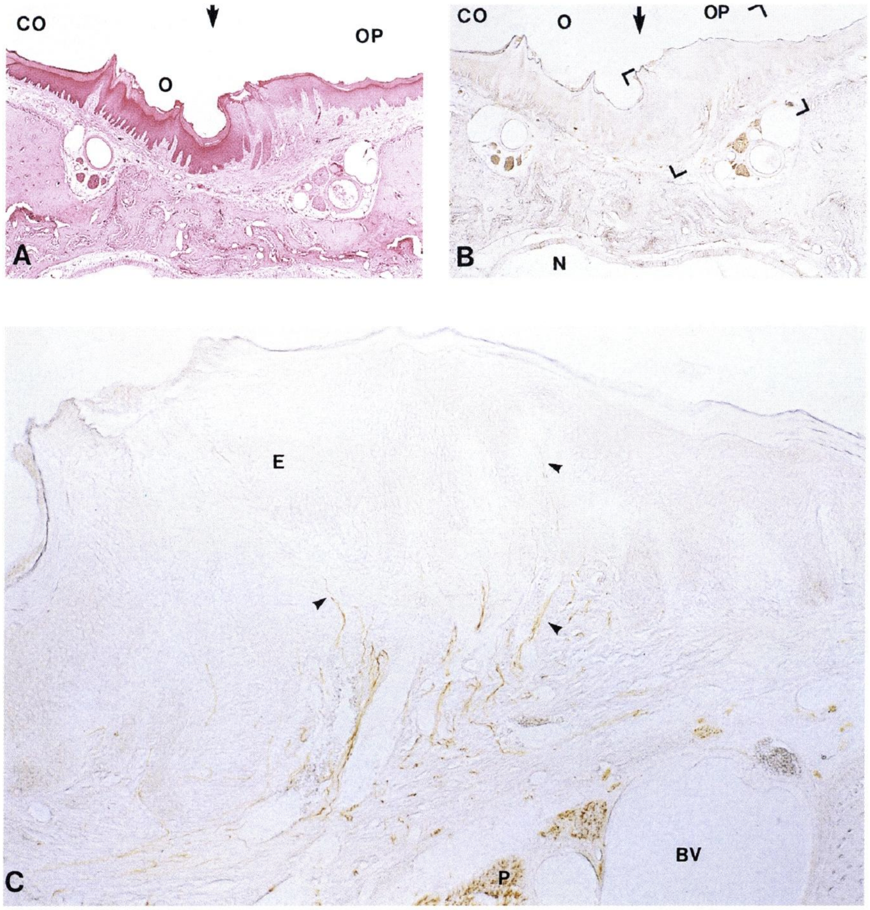

Fig. 3 Photomicrographs of cross-section of rat hard palate 21days after surgery involving excision of mucosa (A ～C).
A : long rete ridges are noted in papillary region and moderate number of blood vessels are seen beneath the epithelium in comparison with that in control side. H. E.×27.
B : Immunohistochemical staining of NFP-positive nerve fibers in hard palate. Arrow indicates midline of hard palate. N. F. P.×27.
C : The site of operated side showing Fig. B with a higher magnification. Nerve fibers reach the epithelium (arrow heads). N. F. P.×133. CO : control side, OP:operated side, O : oral cavity, N : nasal cavity, BV : blood vessel, P : palatine nerve, E : epithelium.

核白血球を主体とした炎症性細胞の高度な浸潤を認め，一部が変性，あるいは壊死に陥っていた．

術後3日目では，手術創のほとんどは口蓋骨が露出し，露出骨表面の骨細胞は核の変性壊死を認め，歯冠部と非手術側の粘膜上皮の断端部に高度の炎症性細胞浸潤を認め，非手術側断端では幼若な肉芽組織が認められた．

術後5日目では，手術創の中央部は高度の炎症性細胞浸潤を伴う肉芽組織の形成を認めた．粘膜上皮の断端では，軽度の上皮再生を認めた．

術後7日目では，手術創では口蓋側歯頚部，非手術側の断端からの上皮の再生が認められたが，中央部ではまだ炎症性細胞浸潤を認める線維性結合組織が露出していた．新生された毛細血管も至る所で散見され，口蓋骨骨面では壊死性変化が認められ，周囲から線維性肉芽組織に置換される像を呈していた．

術後14日目では，手術創はほぼ粘膜上皮の再生を認めたが，一部線維性肉芽組織を露出しているものも認めた．中央部では炎症性細胞浸潤を伴った幼若肉芽組織内で，多くの毛細血管と線維芽細胞を認めた（Fig. 5-A）．

術後21日目では，粘膜上皮は完全に再生され，大小

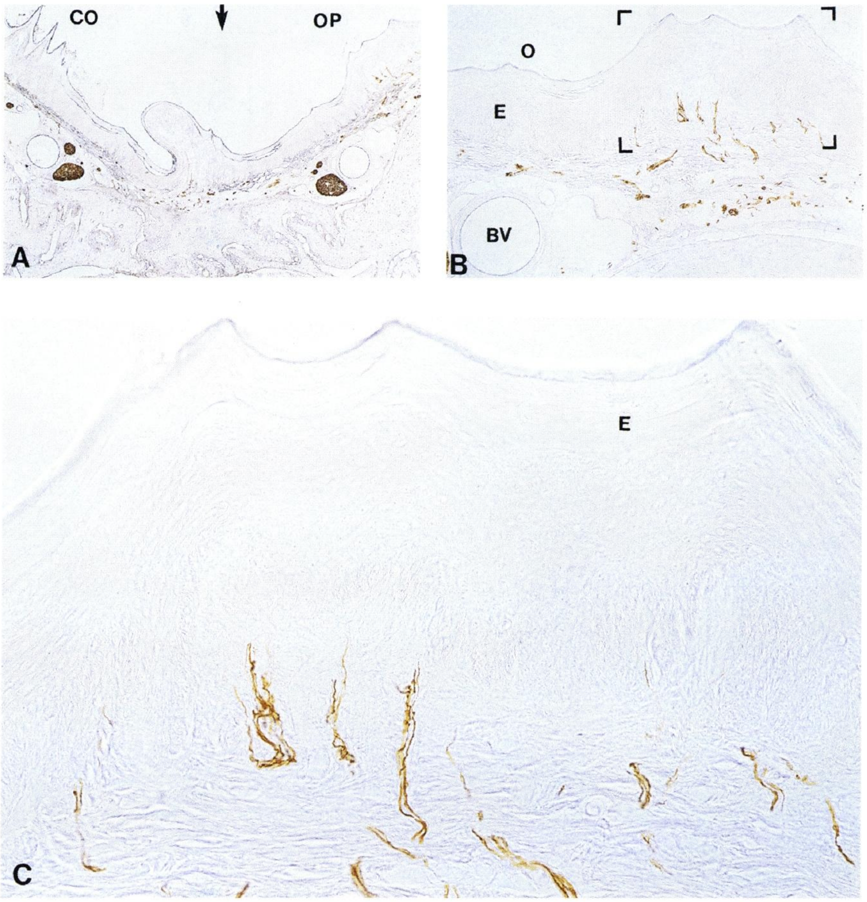

Fig. 4 Photomicrographs of cross-section of rat hard palate 84days after surgery involving excision of mucosa（A〜C）.
A : Immunohistochemical staining of NFP-positive nerve fibers in hard palate. Arrow indicates midline of hard palate. N. F. P.×27.
B : The site of operated side in hard palate. N. F. P.×68.
C : The site showing Fig. B with a higher magnification. Nerve fibers close to the epithelium. N. F. P.×270. CO : control side, OP : operated side, O : oral cavity, BV : blood vessel, E : epithelium.

の乳頭の形成が認められた．粘膜固有層では線維芽細胞や細いコラーゲン線維で満たされ，新生毛細血管も多く散見された（Fig. 6-A）．

術後 28 日目では，粘膜上皮の乳頭の形成が著しく，粘膜固有層の線維芽細胞，コラーゲン線維も密になり，厚みを増す傾向にあった．

術後 56 日目では，粘膜上皮は厚い角質層を有し，大小の乳頭形成を認めた．粘膜固有層は非手術側と比較して著しく厚く，緻密な線維芽細胞とコラーゲン線維が縦横に走行し，口蓋骨に近い結合組織ではではコラーゲン線維束が骨面に平行に走行する像を呈していた．

術後 84 日目では，術後 56 日例と同様に乳頭を認め，粘膜固有層では骨面に平行に走行する太いコラーゲン線維束の層を認めた．

2･3･2　免疫組織学的染色所見

術後 1 日目では，非手術側の粘膜上皮の断端部，口蓋側歯頚部周囲歯肉にも神経線維の染色像は認められなかった．

術後 3 日目では，口蓋側歯頚部の周囲歯肉，非手術側の上皮粘膜の断端部に非常に微細で脆弱な神経線維をわずかに認めるのみであった．

術後 5 日目では，口蓋側歯頚部の周囲歯肉に術後 3 日例と同様の非常に微細で脆弱な神経線維をわずかに認めた．また，非手術側の粘膜上皮断端部の小神経束

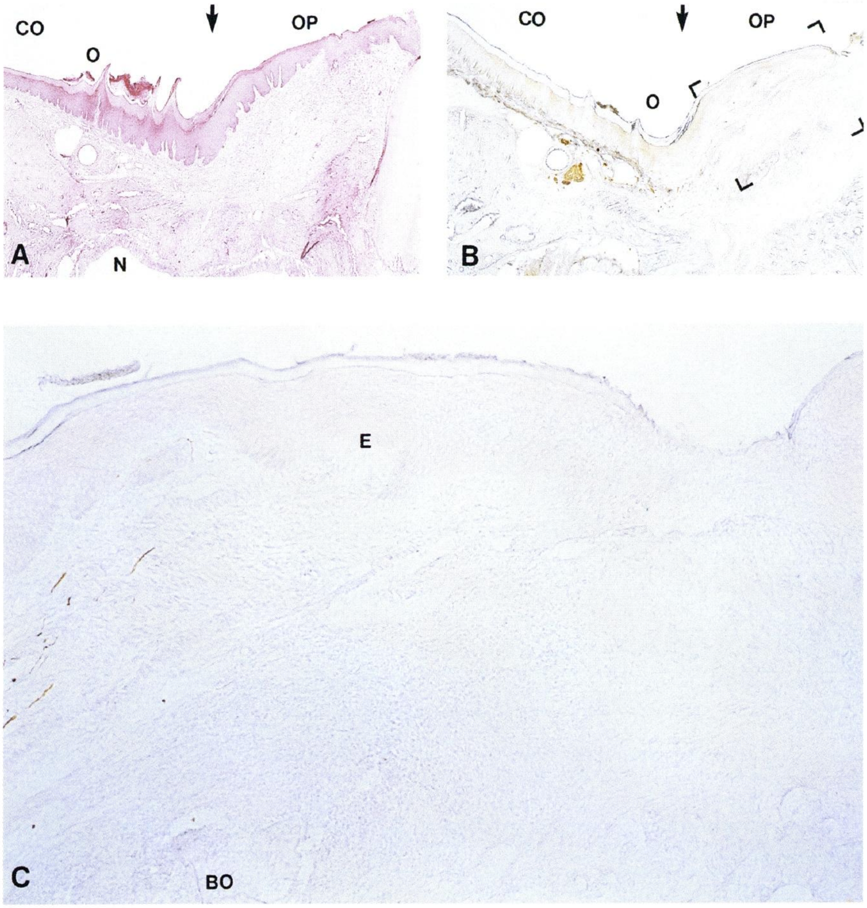

Fig. 5 Photomicrographs of cross-section of rat hard palate 14days after surgery involving excision of mucoperiosteum(A～C).
A : The surface of the denuded bone is covered by regenerated squamous epithelium. Submucosa is filled with fibrobrasts and short collagen fibers. Arrow indicates midline of hard palate. H. E.×27.
B : Immunohistochemical staining of NFP-positive nerve fibers in hard palate. Arrow indicates midline of hard palate. N. F. P.×27.
C : The site of operated side showing Fig. B with a higher magnification. There is no evidence of neural immunostaining below the excision wound except in areas near the edge of re-epithelium. N. F. P.×133.
CO : control side, OP : operated side, O : oral cavity, N : nasal cavity, BO : bone, E : epithelium.

からの手術側への単独の神経線維の延長をまれに認めるが，神経線維が正中を越え手術側断端に進入する像は認められなかった．

術後7日目では，非手術側の粘膜固有層で手術側に伸長する単独の神経線維をわずかに認めるが，術後5日例と同様の所見であった（Fig. 5-B，C）．

術後14日目では，再生粘膜の固有層内での神経の染色像は認められず，口蓋側歯頚部では，歯根膜周囲の小神経線維から再生上皮方向への細い単独の神経線維の伸長が認められ，また，非手術側では粘膜固有層の深層の手術側への単独もしくは数本の神経線維の伸長を認めるのみであった．

術後21日目では，口蓋側歯頚部の歯根膜から粘膜固有層へ，非手術側断端では手術側への小神経束を認めるも，術後14日例と比較して顕著な変化は認められなかった（Fig. 6-B，C）．

術後28日目以降では，口蓋側歯頚部，非手術側で小神経束を認めるも，手術創中央部への神経線維伸長はなく，術後14日例と同様の所見を認め，手術創中央部での神経の再生も認められなかった．

3･4 両手術群における免疫組織学的染色成績の比較

以上述べた免疫組織学的染色所見の各群の比較を

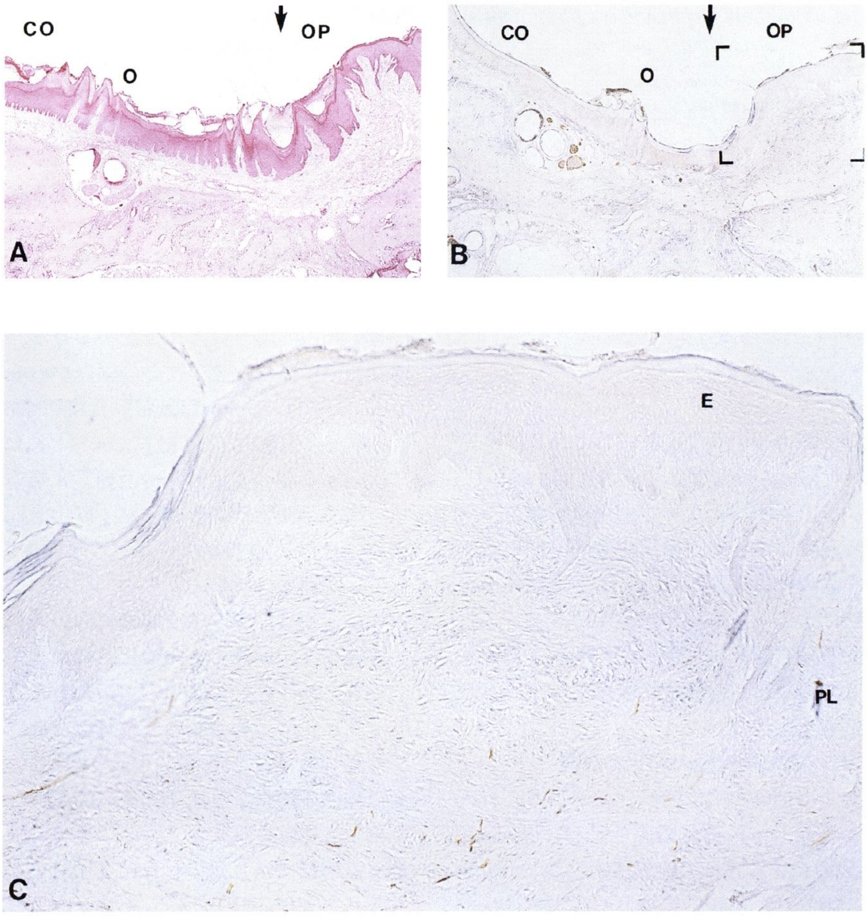

Fig. 6　Photomicrographs of cross-section of rat hard palate 21days after surgery involving excision of mucoperiosteum（A～C）.
A : Dense fibrobrasts and short collagen fibers exist in thick connective tissue beneath epithelium.　H. E.×27.
B : Immunohistochemical staining of NFP-positive nerve fibers in hard palate.　Arrow indicates midline of hard palate.　N. F. P.×27.
C : The site of operated side showing Fig. B with a higher magnification.　There was no evidence of neural immunostaining below the excision wound except for regeneration of single nerve fibers in areas at the edge of re-epithelium.　N. F. P.×133.　CO : control side, OP : operated side, O : oral cavity, E : epithelium, PL : periodontal ligament.

Table 2 に示す．すなわち，対照側では神経束数にほとんど変化がみられなかったが，粘膜手術側では術後早期から神経線維の伸長が著しくみられ，術後 28 日目まで継続し，その後，神経線維の数がやや減少する経過を示していた．一方，粘膜骨膜切除側では，組織学的には術後 14 日目にほぼ完全な粘膜上皮の再生がみられ，免疫組織学的所見では歯冠部周囲の歯肉粘膜，非手術側断端部の粘膜にごくわずかに神経線維が認められるのみで，経時的にはほとんど神経線維数に変化が認められなかった．

4　考　　察

本研究では，傳庄[4]の報告に基づきヒト口蓋形成術手術創のモデルとして，ラットの硬口蓋部に各種口蓋形成手術法に準じた 2 種類の手術創を形成してその治癒経過ならびに神経の再生を免疫組織化学的に観察した．

4･1　実験モデルについて

硬口蓋部の創傷治癒については，動物実験モデルで傳庄ら[4, 5]，Leenstla ら[6, 7]が口蓋形成術に関する組織学的検索を行っており，硬口蓋の手術創の治癒経過な

Table 2 *Density of immunoreactive nerve fibers demonstreated by neurofilament protein*

Days	Control	Excision of mucosa (Supraperiosteum)	Excision of mucoperiosteum
1	++	+	0
3	++	++	0
5	++	+++	0
7	++	++++	+/−
14	++	++++	+
21	++	++++	+
28	++	+++	+
56	++	+++	+
84	++	+++	+

らびに上顎骨発育障害との関係を報告している．今回使用した実験動物には，幼若期より全成長期を通して，短期間に創形成後の治癒過程ならびに末梢神経の再生状態を観察する必要があったため，比較的早期に成熟するラットを実験動物に選択した．ヒトと実験動物との成長の比較において，Losken ら[14]の報告では，ラットは生後3週齢を幼若期，8週齢を若年期，12週齢を成熟期と定義しており，口蓋形成手術創のモデルとして利用しうると考えた．

4･2 手術創における末梢神経の同定と意義

創傷治癒に関する神経組織学的研究におけるこれまでの報告では，従来，末梢神経の証明には，Bielschowsky 法をはじめとする各種の鍍銀法が応用されてきた[15,16]．近年，特異性，再現性に優れた酵素抗体法で神経組織抗原を応用することにより，より簡便に末梢神経の証明が可能となった[12,13,17]．しかし，固定液の種類や固定時間で染色性が影響され，特に脱灰標本での免疫組織化学的手法による末梢神経の証明は困難とされていた．Maeda ら[10,11]が考案した手法は，脱灰標本で凍結切片を製作し，神経組織抗原である NFP 使用による免疫組織化学的検索を可能にした．現在，口蓋形成術に関する組織学的検索[4-7,18-21]は数多く行われ，上顎骨成長障害との関連は示唆されているが，口蓋形成術に準じた創の治癒経過と末梢神経の再生について神経組織抗原を使用した免疫組織化学的検索は全く報告されていない．本研究において，著者らはラット口蓋粘膜の創傷治癒過程での末梢神経の証明に NFP を応用し，Maeda ら[10,11]の手法を応用した免疫組織化学的検索を行った．

4･3 口蓋形成術手術創と末梢神経の再生の関係について

創傷における末梢神経の再生過程は，手術侵襲によって惹起される炎症と手術創によって大きく影響されると考えられている[12,13,22,23]．口蓋部の創傷治癒機転は，骨膜を保存した粘膜切除例と粘膜骨膜切除例とでは異なり，傳庄[4]によると，粘膜骨膜切除例では骨膜を剝離した口蓋骨の露出創となり，口蓋側の骨の血流障害に加えて，機械的刺激および感染による炎症性変化が，長期間にわたって持続し，骨新生は低下する傾向があった．また，SEM 所見によると著しい炎症と骨の壊死性変化がみられ，粘膜下組織の瘢痕化に伴い骨膜および骨の再生能，骨の血管孔の再構築が障害された．さらに骨小腔の形成もほとんど認められず，骨面に密な線維性組織の付着を認めたとの報告がある[4]．また，Selliseth ら[24]は，ラット口蓋粘膜骨膜切除の創傷治癒における脈管再生過程を SEM にて観察し，口蓋骨の露出創では切除断端の非手術側で毛細管末端の内皮細胞の芽状突起より血管網が形成され，露出骨面上を遊走し術後20日目で再生粘膜での新しい脈管再生が得られると報告している．

Waris[25]は，ラット皮膚瘢痕内の末梢神経再生について観察し，成熟した瘢痕組織内では末梢神経の再生が障害され，変性に陥ることがあり，また，瘢痕組織内で認められる再生した末梢神経は脈管の再生に沿って伸長していると述べている．さらに，線維化した瘢痕組織の収縮により正常組織の断端面からの末梢神経の再生も示唆されている．このように，粘膜骨膜を剝離する術創では，露出した口蓋骨骨面の壊死による治癒遅延と末梢の循環不全があり，さらに術後の瘢痕組織形成により末梢神経の再生が遅延すると考える．本研究では，上皮の再生が完了する術後14日目までには非手術側断端の粘膜固有層ならびに歯根膜周囲の小神経線維から再生上皮方向への細い単独の再生神経線維の伸長のみを認め，術後21日目以降では周囲組織からの単独の神経線維伸長は認められるが，手術創中央部への再生神経線維の伸長は認められなかった．この結果は，粘膜骨膜切除による末梢神経の完全切除と，術後の露出骨と密に結合した瘢痕組織による末梢の神経再生への障害によるものと考えた．

一方，粘膜切除例における口蓋部の創傷治癒過程では，傳庄[4]によると，上皮が再生し炎症が消退する術後14日目には，組織学的に非手術側と類似の所見を呈し，SEM 所見では，術後7日目まで骨の吸収窩がみられ，術後14日目になって骨面の形状，血管の構築ならびに骨小腔が，非手術側と同様の所見を示していたと報告している．本実験では，上皮の再生が完了する術後5日目頃より粘膜固有層の中小の神経束より神経線維の伸長が認められ，術後7日目から21日目頃まで粘膜上皮

で乳頭内への著しい再生神経線維の伸長像を認めた．しかし，コラーゲン線維の緻密化が進むにつれ上皮直下の細い単独の神経線維数は減少し，術後84日目では非手術側と比較すると粘膜上皮下の神経線維数は多いものの，非手術側と類似した像を呈していた．この結果は，粘膜切除での末梢神経の温存と早期の脈管再生が可能な治癒環境，ならびに瘢痕組織が少ない治癒過程により，末梢神経の再生障害が最小限に抑えられたものと考える．

以上より，術創の違いによる再生神経数，再生形態の差異が明らかとなり，第1報の術式別の上顎歯槽部，口蓋粘膜の知覚閾値の差異は末梢神経の再生の差によるという仮説を裏付ける結果となった．口蓋部創傷治癒における末梢神経再生の為の良好な条件として骨膜を温存した粘膜切除が必須であり，口蓋裂児の口蓋形成術の適応にあたって，上顎発育障害，構音障害が少ないもの，特に口蓋の知覚を保存する観点からは，術後に上顎歯槽部，口蓋粘膜に骨面のraw surfaceを生じない小浜法など[26-29]の術式が，より大きな利点を有するものと，実験を通して示唆した．

5 要　　約

口蓋形成術に準じた異なる創による治癒経過と末梢神経の再生経過を明らかにする目的で，幼若ラットを研究材料として免疫組織化学的に観察を行い，次の結果を得た．

1. 粘膜切除群では，術後早期より粘膜下組織での上皮方向への末梢の神経再生を認めた．一方粘膜骨膜切除群の創面では，粘膜下組織での末梢の神経再生は認められず，創周囲組織からの末梢の神経再生をわずかに認めるだけであった．
2. 末梢の神経再生の障害は，粘膜骨膜切除による末梢神経組織の消失と粘膜下組織の瘢痕化が主なものであると考えられた．

本実験は「動物実験に関する指針」（日本実験動物学会）に基づいて行った．

謝　辞

稿を終えるにあたり，ラット口蓋粘膜切除術式に関してご助言，ご教示いただいた傳庄信也博士，組織標本写真にご協力いただいた中央写真室伊藤秀樹氏に深謝致します．本研究に対して，ご助言，ご協力をいただいた教室員各位，お世話になった動物実験施設部の各位に感謝いたします．

文　　献

1. 小浜源郁．私の行った口蓋形成手術と成績　粘膜弁変法と粘膜骨膜弁法の比較．日本口蓋裂学会雑誌 1991, 16：151-160.
2. 玄番涼一，小松世潮．唇・顎・口蓋裂患者の歯列・口蓋形態に関する研究　口蓋弁後方移動術後の歯列・口蓋形態の特徴．日本口蓋裂学会雑誌 1983, 8：67-84.
3. 伊藤静代．口蓋裂術後の顎口蓋形態の異常に伴う口蓋化構音のメカニズムに関する研究．昭和63年度科学研究費補助金（一般研究B）研究成果報告，1989.
4. 傳庄信也．幼若ラットの口蓋における各種手術創の治癒過程に関する組織学的ならびに走査電子顕微鏡的研究．札幌医学雑誌 1982, 51：243-260.
5. 傳庄信也，小松世潮，北　進一，小田島哲世．幼犬の口蓋粘膜骨膜切除による上顎発育の変化に関する研究．札幌医学雑誌 1982, 50：499-512.
6. Leenstra TS, Kuijpers-Jagtman AM, Maltha JC, Freihofer HPM. Palatal surgery without denudation of bone favours dentoalveolar develop ment in dogs. J Oral Maxillofac Surg 1995, 24：440-444.
7. Leenstra TS, Kohama G, Kuijpers-Jagtman AM, Maltha JC, Freihofer HPM. Supraperiosteal flap technique versus mucoperisteal flap technique in cleft palate surgery. Cleft Palate J 1996, 33：501-506.
8. Hochberg I, Kabcenell J. Oral stereognosis in normal and cleft palate individuals. Cleft Palate J 1967, 4：47-57.
9. Andrews JR. Oral form discrimination in individuals with normal and cleft palates. Cleft Palate J 1970, 10：92-98.
10. Maeda T, Iwanaga T, Fujita T, Kobayashi S. Immunohistochemical demonstration of nerves in the predentin and dentin of human third molars with the use of an antiserum against neurofilament protein (NFP). Cell Tissue Res 1986, 243：469-475.
11. Maeda T, Iwanaga T, Fujita T, Kobayashi S. Distribution of nerve fibers Immunoreactive to neurofilament protein in rat molars and periodontium. Cell Tissue Res 1987, 249：13-23.
12. Kangesu T, Manek S, Terenghi G, Gu, X-H, Navsaria HA, Polak JM, Green CJ, Leigh IM. Nerve and blood vessel growth in response to grafted dermis and cultured keratinocytes. Plast Reconstr Surg 1998, 101：1029-1038.
13. Manek S, Terenghi G, Nishikawa H, Green CJ, Polak JM. Neovascularisation precedes neural changes in the rat groin skin flap following denerva-

tion: an Immunohistochemical study. Br J Plast Surg 1993, 46: 48-55.
14. Losken A, Mooney MP, Siegel MI. A comparative study of mandibular growth patterns in seven animal models. J Oral Maxillofac Surg 1992, 50: 490-495.
15. 迫田隅男. 舌の創傷治癒に関する神経組織学的研究. 九州歯科学会雑誌 1976, 30: 401-422.
16. 安東 紳. 咽頭弁移植創の治癒に関する神経組織学的研究. 九州歯科学会雑誌 1980, 34: 398-410.
17. Gu XH, Ternghi G, Kangesu T, Navsaria HA, Springall DR, Leigh IM, Green CJ, Polak JM. Regeneration pattern of blood vessels and nerves in cultured keratinocyte grafts assessed by confocal laser scanning microscopy. Br J Dermatol 1995, 132: 376-383.
18. Bardach J, Morris HL. Multidisciplinary management of cleft lip and palate. Saunders, Philadelphia, 1990.
19. Ross RB, Johnston MC. Cleft lip and palate. Williams & Wilkins, Baltimore, 1972.
20. Wijdeveld MGMM, Grupping EM, Kuijpers-Jagtman AM, Maltha JC. Wound healing of the palatal mucoperiosteum in beagle dogs after surgery at different ages. J Craniomaxillofac Surg 1987, 15: 51-57.
21. Cornelissen AMH, Stoop R, Von den Hoff HW, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. Myofibroblasts and matrix components in healing palatal wounds in the rat. J Oral Pathol Med 2000, 29: 1-7.
22. Alvarez OM, Goslen JB, Eaglstein WH, Welgus HG, Stricklin GP. Wound healing. In: Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, ET AL., editors. Dermatology in general medicine. 3rd ed. New York, MacGraw-Hill, 1987, 321-336.
23. Clark RA. Cutaneous tissue repair: basic biologic considerations. J Am Acad Dermatol 1985, 13: 701-725.
24. Selliseth NJ, Selvig KA. Revascularization of an excisional wound in gingiva and oral mucosa. A scaning electron microscopic study using corrosion cast in rats. Scanning Micros 1995, 9: 455-468.
25. Waris T. Innervation of scar tissue in the skin of the rat.Scand J Plast Reconstr Surg 1978, 12: 173-180.
26. 小浜源郁. 口唇裂・口蓋裂. 小児科診療 1993, 1: 79-86.
27. Perko MA. Primary closure of the soft palate using a palatal mucosal flap: an attempt to prevent growth impairment. J Maxillofac Surg 1974, 2: 40-43.
28. Perko MA. Two-stage closure of cleft palate. J Maxillofac Surg 1979, 7: 76-80.
29. 上石 弘. 口蓋粘膜弁による口蓋形成術. 形成外科 1979, 22: 790-796.

別刷請求先：
(〒060-8543) 札幌市中央区南1条西16丁目
札幌医科大学口腔外科学講座 須田善行