

学 位 論 文 題 名

Analysis of scar tissue distribution on rat palates
-A laser Doppler flowmetric study-

（レーザードップラー血流計によるラット口蓋部瘢痕組織の解析）

学位論文内容の要旨

【緒言】

口蓋裂患者に対して、良好な鼻咽腔閉鎖機能の獲得のため push-back 法による口蓋形成手術が広く行われているが、この方法では口蓋部創面に骨が露出し、その創傷治癒の過程で瘢痕組織が形成されるため、その後の上顎骨の成長発育に抑制的な影響を与えていると考えられている。このような瘢痕組織の存在は、矯正治療における上顎歯列弓の拡大を困難なものとし、さらには治療後の後戻りの要因にもなると考えられている。したがって、矯正治療における治療方針の決定や予後の推定において、口蓋裂患者の口蓋部に存在する術後瘢痕組織の分布を把握することは非常に重要である。しかしながら、これらの瘢痕組織の分布は個々の患者で多様であり、客観的にその分布を把握することは困難であった。

一方、瘢痕組織では正常な結合組織に比べて血管分布が少ないことが知られている。そこで、当講座では、レーザードップラー血流計を用いて口蓋粘膜の血流を計測することにより、口蓋裂患者の術後瘢痕組織の分布を解析する方法を考案した。しかしながら、このヒトによる研究では、標本作製が不可能なことから、組織性状と血流計測値との対応には不明な点もあった。

そこで本研究では、ラット口蓋部に実験的に瘢痕組織を形成した後、レーザードップラー血流計を用いて総頸動脈を圧迫した時の口蓋粘膜血流量を計測し、組織学的観察を加えて本法の有効性について検討した。

【材料と方法】

生後 20 日齢、雄の Wistar 系ラット 19 匹を用い、実験群と対照群の 2 つのグループに分けて実験を行った。実験群では瘢痕組織の形成のため、ネンブタール腹腔内麻酔(10mg/kg)を施した後、両側部の第 1 臼歯前縁から第 2 臼歯後縁までの口蓋粘膜骨膜を幅、約 1mm で臼歯に沿って切除した。手術の際には大口蓋神経血管束に損傷を与えないように注意し、術後には固形飼料と水を自由に与えて飼育した。

術後 8 週目の実験群 9 匹ならびに同齢の対照群 10 匹について、口蓋外側部と口蓋内側部、計 4 つの領域に各 6 カ所の計測点を設け、安静時および両側総頸動脈を一定の圧力で圧迫して 5 秒間血流を低下させた際の口蓋粘膜の血流変化をレーザードップラー血流計(Perimed 社製、Peri

Flux PF3 および PF302 ニードルプローブ、波長 632.8nm、出力 2mW の He-Ne レーザー光)を用いて計測した。計測の際にはネンブタール腹腔内麻酔(50mg/kg)を施した後、両側の総頸動脈を露出させて実験台に頭部を固定し、ニードルプローブと粘膜との距離および角度を一定に保つようにした。

血流計測の終了後、10%中性ホルマリンで灌流固定を行い、頭蓋骨を切り出して同じ固定液で1週間浸漬固定した。その後、50%ギ酸と20%クエン酸の混合液で3週間脱灰、上昇系列のエタノールで脱水してパラフィン包埋し、厚さ7 μ mの前頭断切片標本を作製して elastica Van Gieson 染色を施して光学顕微鏡で観察を行った。また一部のラットは10%中性ホルマリンで灌流固定を行った後、10%gelatinを加えた墨汁を注入し、冷凍庫で5分間冷却させてgelatinを硬化させ、同じ固定液で3日間浸漬固定した。その後、口蓋粘膜を切り出して、30%過酸化水素水と10%ホルマリンの混合液につけて漂白し、上昇系列のエタノールで脱水して、ベンゼンを通した後、サリチル酸メチルと安息香酸ベンジルの5:1、3:1、2:1液に順次つけて透明標本を作製し、実体顕微鏡で観察を行った。

血流計測データの解析には、計測開始から総頸動脈圧迫時までを安静時、総頸動脈圧迫時から解放時までを圧迫時として、それぞれの区間における平均値を安静時の血流量と圧迫時の血流量とした。実験群ならびに対照群の各計測点において安静時の血流量、圧迫時の血流量、および安静時に対する圧迫時の血流量の変動比率を算出した後、それぞれのパラメーターについて実験群および対照群の口蓋内側部と口蓋外側部の4つの領域間における有意差の検定を student t-test により行った。

【結果と考察】

切片標本による観察の結果、対照群では、口蓋粘膜は重層扁平上皮に覆われ、その直下では水平方向に走行する膠原線維が、深部では縦方向に走行する膠原線維が観察され、弾性線維は結合組織全般にわたって分布していた。また、口蓋粘膜外側部では径の小さい血管が多数観察された。これに対して実験群では、太い膠原線維からなる緻密な癒痕組織が観察され、同領域における血管は対照群に比べて径が小さく、数も減少していた。

透明標本による観察の結果、対照群では大口蓋動脈から分枝した枝が臼歯に沿って密な血管網を構成していた。実験群では粘膜骨膜切除を行っていない内側部では対照群と同様であったが、粘膜骨膜切除を行った外側部では血管網の密度が著しく減少していた。

血流量の計測データを分析した結果、安静時の血流量および圧迫時の血流量については、対照群ならびに実験群における口蓋内側部と口蓋外側部の間で有意な差が認められた。このことは正常組織と血管分布が少ない癒痕組織との間のみならず、正常組織間でも部位による血流量の差が存在することを意味していると思われる。また対照群と実験群の同一領域間でも有意な差が認められた。このことは正常組織であっても隣接した部位で粘膜骨膜剥離が行われていることにより血流量が影響されたものと思われる。一方、血流量の変動比率を比較すると、対照群の口蓋外側部と実験群の口蓋外側部(癒痕組織形成部)では有意差が認められたものの、対照群の2領域間および対照群の口蓋内側部と実験群の口蓋内側部(正常組織部)では有意差が認められなかった。すなわち、正常組織における血流量の変動比率はどの領域でもほぼ一定の値を示したが、癒痕組

織ではそれよりも高い値を示すことが明かとなった。このことから、正常組織と瘢痕組織との識別には血流量ではなく、血流量の変動比率を用いるべきであることが示唆された。

【結論】

1. 粘膜骨膜を切除した領域における瘢痕組織の形成と血管分布密度の減少が確認された。
2. 血流の低下した状態にある瘢痕組織では、総頸動脈を圧迫して血流量を減少させた場合、その血流量の変化は正常組織よりも少なくあらわれることが示された。
3. レーザードップラー血流計を用いて安静時と圧迫時における血流量の変動比率を算出することにより、口蓋部における瘢痕組織の分布を非観血的な方法で検索することが可能であることが実験的に確認された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 飯 田 順一郎

副 査 教 授 吉 田 重 光

副 査 教 授 脇 田 稔

学 位 論 文 題 名

Analysis of scar tissue distribution on rat palates -A laser Doppler flowmetric study-

(レーザードップラー血流計によるラット口蓋部瘢痕組織の解析)

審査は主査、副査がそれぞれ申請者と個別的に会して口頭でなされ、初めに本論文の要旨の説明を求め、申請者から以下のような内容についての論述がなされた。

口蓋裂患者の口蓋形成手術における瘢痕組織の存在は、矯正治療における上顎歯列弓の拡大を困難なものとし、さらには治療後の後戻りの要因にもなると考えられている。したがって、矯正治療における治療方針の決定や予後の推定において、術後瘢痕組織の分布を把握することは非常に重要である。

一方、当講座では、レーザードップラー血流計を用いて口蓋粘膜の血流を計測することにより、口蓋裂患者の術後瘢痕組織の分布を解析する方法を考案したが、このヒトによる研究では、標本作製が不可能なことから、組織性状と血流計測値との対応には不明な点もあった。

そこで本研究では、ラット口蓋部に実験的に瘢痕組織を形成した後、レーザードップラー血流計を用いて総頸動脈を圧迫した時の口蓋粘膜血流量を計測し、組織学的観察を加えて本法の有効性について検討した。

【材料および方法】

生後 20 日齢、雄の Wistar 系ラット 19 匹を用い、実験群と対照群の 2 つのグループに分けて実験を行った。実験群では瘢痕組織の形成のため、ネンブータル腹腔内麻酔を施した後、両側部の第 1 臼歯前縁から第 2 臼歯後縁までの口蓋粘膜骨膜を幅、約 1mm で臼歯に沿って切除した。術後には固形飼料と水を自由に与えて飼育した。

術後 8 週目の実験群 9 匹ならびに同齢の対照群 10 匹について、口蓋外側部と口蓋内側部、計 4 つの領域に各 6 カ所の計測点を設け、安静時および両側総頸動脈を一定の圧力で圧迫して 5 秒間血流を低下させた際の口蓋粘膜の血流変化をレーザードップラー血流計(Peri Flux PF3 および PF302 ニードルプローブ、波長 632.8nm、出力 2mW の He-Ne レーザー光)を用いて計測した。

血流計測の終了後、10%中性ホルマリンで灌流固定を行い、頭蓋骨を切り出して同じ固定液で 1 週間浸漬固定した。その後、通法に従ってパラフィン包埋し、厚さ 7 μ

mの前頭断切片標本を作製して elastica Van Gieson 染色を施して光学顕微鏡で観察を行った。また一部のラットは灌流固定を行った後、10%gelatin を加えた墨汁を注入し、同じ固定液で3日間浸漬固定した。その後、口蓋粘膜を切り出して、透明標本を作製し、実体顕微鏡で観察を行った。

血流計測データの解析には、計測開始から総頸動脈圧迫時までを安静時、総頸動脈圧迫時から解放時までを圧迫時として、それぞれの区間における平均値を安静時と圧迫時の血流量とした。実験群ならびに対照群の各計測点において安静時の血流量、圧迫時の血流量、および安静時に対する圧迫時の血流量の変動比率を算出した後、それぞれのパラメーターについて実験群および対照群の口蓋内側部と口蓋外側部の4つの領域間における有意差の検定を student t-test により行った。

【結果と考察】

切片標本による観察の結果、対照群では、口蓋粘膜は重層扁平上皮に覆われ、その直下では水平方向に走行する膠原線維が、深部では縦方向に走行する膠原線維が観察され、弾性線維は結合組織全般にわたって分布していた。また、口蓋粘膜外側部では径の小さい血管が多数観察された。これに対して実験群では、太い膠原線維からなる緻密な癒痕組織が観察され、同領域における血管は対照群に比べて径が小さく、数も減少していた。

透明標本による観察の結果、対照群では大口蓋動脈から分枝した枝が臼歯に沿って密な血管網を構成していた。実験群では粘膜骨膜切除を行っていない内側部では対照群と同様であったが、粘膜骨膜切除を行った外側部では血管網の密度が著しく減少していた。

血流量の計測データを分析した結果、安静時および圧迫時の血流量については、対照群ならびに実験群における口蓋内側部と口蓋外側部の間で有意な差が認められた。このことは正常組織と血管分布が少ない癒痕組織との間のみならず、正常組織間でも部位による血流量の差が存在することを意味していると思われる。また対照群と実験群の同一領域間でも有意な差が認められた。このことは正常組織であっても隣接した部位で粘膜骨膜剥離が行われていることにより血流量が影響されたものと思われる。一方、血流量の変動比率を比較すると、対照群の口蓋外側部と実験群の口蓋外側部（癒痕組織形成部）では有意差が認められたものの、対照群の2領域間および対照群の口蓋内側部と実験群の口蓋内側部（正常組織部）では有意差が認められなかった。すなわち、正常組織における血流量の変動比率はどの領域でもほぼ一定の値を示したが、癒痕組織ではそれよりも高い値を示すことが明かとなった。このことから、正常組織と癒痕組織との識別には血流量ではなく、血流量の変動比率を用いるべきであることが示唆された。

本研究は矯正治療上重要となる口蓋裂患者における癒痕組織の存在を、客観的に正確に把握することを目的として、レーザードップラー血流計によりこの目的を達成するために動物実験を行い、基礎的な検討を加えたものである。その結果、総頸動脈を圧迫した場合の口蓋における血流の変動比率を用いる事が最適な指標である事を見出している。実際の臨床においては大口蓋動脈を圧迫する事により、簡便に検査することが可能な手法であり、今後の矯正臨床の発展に寄与するところの大きい結果を提示したものと、高く評価できるものである。加えて、試問の内容から、申請者は臨床的ならびに基礎的な広い学識を有していると認められた。従って、申請者は博士（歯学）の学位を授与される資格を有するものと認められた。