

## 研 究

VX2 舌癌の細胞増殖因子と転移抑制因子との  
発現におよぼすシスプラチンの影響

古川 康憲

岩手医科大学歯学部口腔外科学第一講座

(主任 : 工藤 啓吾 教授)

(受付 : 1999年11月16日)

(受理 : 1999年12月3日)

**Abstract :** To clarify the effect of cisplatin (CDDP) on proliferation and metastasis of rabbit VX2 tongue cancer, the cell proliferation factor (Ki-67) and the metastasis suppresser factor (nm23) were immunohistochemically investigated.

Three days after transplantation of VX2 cancer cells into the tongue in rabbits, physiological saline was administered to control groups (n=15), and 2 mg/kg and 4 mg/kg CDDP were administered to experimental groups I (n=15) and II (n=15), respectively. The rabbits were sacrificed on 7 (n=5), 14 (n=5), and 21 (n=5) days after transplantation. The tongue, deep cervical lymph node, and lung were excised, the volumes of the tongue tumor and the deep cervical lymph node were measured. Tumor foci of the lung metastasis were macroscopically counted. The excised tissues were embedded in paraffin in the conventional method and serial sections of 4  $\mu$ m thickness were prepared. The sections were used for H-E staining and immunohistochemical staining.

The Ki-67 labeling index of the tongue tumor increased in proportion to the tumor volume, and this index was significantly increased in proportion to tumors that metastasized to the deep cervical lymph node and the lung. The degree of nm23 expression in tongue tumors was decreased when the tumor was metastasized to the deep cervical lymph node and the lung, indicating a relationship between nm23 expression and tumor metastasis. As the tongue tumor grew, tumor cells metastasized to the deep cervical lymph node on the ipsilateral side with transplantation, then to the deep cervical lymph node on the contralateral side without transplantation. In experimental group I, metastasis to the deep cervical lymph node on the contralateral side was observed 21 days after transplantation, while in experimental group II, metastasis was not yet found in the lymph node on the contralateral side. Metastasis to the lung occurred after metastasis to the deep cervical lymph node was observed. In experimental group I, lung metastasis was found in most of the rabbits 21 days after transplantation, while lung metastasis was not observed in experimental group II.

Therefore, the proliferation of the VX2 tongue tumor in the rabbit was more strongly inhibited in experimental group II than that in experimental group I, showing a high expression of cancer metastasis suppresser factor. These findings suggested that administration of 4 mg/kg CDDP is effective in inhibiting metastasis because it delays metastasis to the deep cervical lymph node and the lung.

**Key words :** rabbit VX2 tongue cancer, deep cervical lymph node metastasis, lung metastasis, Ki-67, nm23

---

Influence of cisplatin for expression of the cell proliferation and the metastasis suppresser factors in the VX2 tongue cancer

Yasunori KOGAWA

(First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical University. 1-3-27 Chuo-dori, Morioka, 020-8505 Japan)

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020-8505)

*Dent. J. Iwate Med. Univ.* 25 : 16-27, 2000

## 緒 言

VX2 癌はヒト扁平上皮癌に類似した組織像を有し、腫瘍細胞の増殖が旺盛な易転移性癌として知られている。これまでもウサギ VX2 移植舌癌の転移についての追究がなされ、本腫瘍は確実に頸部リンパ節および肺へ転移することが報告されている<sup>1, 2)</sup>。このような VX2 移植舌癌モデルは腫瘍細胞の増殖能と転移との関連性を検索する実験系に適しているといえる。

腫瘍細胞増殖能の定量的な測定には PCNA<sup>3)</sup>、AgNORs<sup>2)</sup>、Ki-67 抗原<sup>4)</sup>などが使用されている。そのうち、Ki-67 抗原は細胞周期の G<sub>0</sub> 期以外の細胞増殖期である G<sub>1</sub> 期、S 期、G<sub>2</sub> 期、M 期の細胞核に現れるタンパク質で、増殖細胞が的確に染色され、種々のモノクローナル抗体があることから細胞増殖能の観察に使用されている。

一方、転移関連因子には c-erbB-2<sup>5)</sup>、CD 44<sup>6)</sup> など、多くの報告がみられるが、1988 年、Steeg ら<sup>7)</sup>はマウスメラノーマ細胞株から癌転移抑制遺伝子 nm23 を発見し、これを高転移性マウスメラノーマ細胞株へ導入すると、癌転移が抑制されることを報告した。1990 年、nm23 の遺伝子産物 Nm23 は遺伝子の相同性から多くの細胞の必須酵素であるヌクレオシド二リン酸 (NDP) キナーゼと同一であることが判明した<sup>8)</sup>。その後、nm23 は乳癌<sup>9)</sup>、胃癌<sup>10)</sup>、大腸癌<sup>11)</sup>、次いで頭頸部癌<sup>12~14)</sup> などでも、その発現と転移との関連性について検討されているが、臓器によっても転移との関連性が異なり、その詳細はまだ明らかでない。

癌の増殖と転移におよぼす腫瘍細胞増殖能と癌転移抑制遺伝子との関連性、あるいはこれらに対する抗癌剤の影響を明らかにすることは、口腔癌の治療上、転移の様相を解明する上できわめて重要であるにもかかわらず、これらに関する報告はまだみられない。

そこで、本研究ではウサギ VX2 舌癌モデルを用い、白金系抗癌剤である CDDP<sup>15)</sup> の投与が移植舌癌部、深頸リンパ節および肺への転移に

およぼす影響について免疫組織化学的に検討した。

## 材料および方法

### 1. 実験材料

#### (1) 実験動物

体重 3 kg 前後の日本白色種雄性ウサギ (日本エスエルシー) を購入後、岩手医科大学歯学部動物舎 (室温: 23±2℃, 湿度: 55±5%) にて 7 日から 14 日間予備飼育し、全身状態および口腔内に異常の認められない 45 匹を用いた。

#### (2) 実験腫瘍

1993 年 1 月より岩手医科大学歯学部口腔外科学第一講座にてウサギ大腿部筋肉内で累代移植により維持されている VX2 癌細胞を使用した。

#### (3) 使用抗癌剤

日本化薬株式会社より提供された Cisplatin (日本化薬ランダ®; Cisdichloro-diammine-platinum, 以下 CDDP と略す) を使用した。

### 2. 実験方法

#### (1) 移植方法

VX2 癌細胞のウサギ舌への移植は、伊藤ら<sup>16)</sup>の方法に準じて作製した VX2 癌細胞浮遊液 0.1 ml (約 5×10<sup>5</sup> 個) を、舌尖より 1/3 の左側舌辺縁部で、舌粘膜表面から約 3 mm の筋肉内へ行った。

#### (2) 薬剤の投与量

日本化薬株式会社のウサギ VX2 胆癌に対する CDDP の毒性試験では、1.75 mg/kg が推奨投与量であった。そこで、予備実験では 1 mg/kg, 2 mg/kg, 4 mg/kg, 6 mg/kg を投与し、そのうちの 2 mg/kg と 4 mg/kg とを採用した。

#### (3) 実験群と観察日

麻酔には Pentobarbital sodium (ダイナポット) 10 mg/kg をウサギ耳静脈に注入した。

CDDP は 2 mg/kg (実験群 I, 15 匹), 4 mg/kg (実験群 II, 15 匹) を生理食塩水 (扶桑) 30 ml に溶解し、VX2 癌細胞移植後 3 日目にこれらを 1 回投与した。対照群の 15 匹には生理食塩水のみ投与した。薬剤はシリンジポンプ (テルモ社製) を用いてウサギ耳静脈から 30 ml/h の

速度で注入した。VX2 癌細胞をウサギ舌に移植後 7 日目, 14 日目, 21 日目に各々 5 匹ずつ屠殺し, 舌, 深頸リンパ節および肺を摘出し各経過期間ごとに観察した。

#### (4) 舌, 深頸リンパ節および肺の観察

摘出した舌、深頸リンパ節および肺における癌の増殖状態を肉眼的に観察後、舌癌の幅径、前後径および厚径をノギスにて計測し、舌癌の体積 ( $\text{mm}^3$ ) を算出した。また、深頸リンパ節の長径、短径および厚径を同様に計測し、その体積 ( $\text{mm}^3$ ) を算出した。肺については肉眼的な転移の有無を観察した。これらを迅速に測定した後、摘出物は 10% 中性緩衝ホルマリン液にて固定し、通法のごとくパラフィンに包埋後、4  $\mu\text{m}$  の連続切片を作製し、組織学的観察、Ki-67 および nm23 免疫染色に用いた。組織学的観察は hematoxylin-eosin (H-E) 染色を施して鏡検し、舌における癌の進展度を松田の分類<sup>2)</sup>に基づいて以下のように評価した。すなわち, stage I : 腫瘍が同側筋層内に限局しているもの, stage II : 腫瘍が舌中隔を圧排しているもの, stage III : 腫瘍が舌中隔を越え対側へ浸潤・増殖しているもの, である。また、深頸リンパ節および肺についても組織学的転移の有無を観察した。なお、深頸リンパ節は移植側 (以下、同側) と非移植側 (以下、対側) について評価した。

#### (5) Ki-67 免疫染色と陽性細胞数の算定

Ki-67 免疫染色には、抗 Ki-67 抗原モノクローナル抗体 (MIB-5, 株式会社医学生物学研究所) を一次抗体として Streptavidin-biotin peroxidase complex 法 (Pathostain ABC-POD (M) Kit, 和光純薬工業株式会社) を用いた。すなわち、パラフィン切片 (4  $\mu\text{m}$ ) を脱パラフィンし、Phosphate buffered saline (PBS) に Tween-20 を加えた溶液 (PBS-T) にて洗浄後、0.01M クエン酸緩衝液 (約 pH6.0) 中で Microwave 処理 (500W, 5 分  $\times$  4 回) し、室温まで放置した。PBS-T にて洗浄後、室温で 10 分間、3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  により内因性ペルオキシダーゼを阻止した。PBS-T にて 5 分間、1 回洗浄

後、10% Normal Goat Serum により室温で 10 分間、非特異反応を除去した。PBS-T にて 5 分間、1 回洗浄後、一次抗体 MIB-5 (50 倍希釈) を 37.0°C の恒温槽にて一時間反応させた。PBS-T にて 5 分間、3 回洗浄後、二次抗体にヤギ抗マウス IgG (ビオチン結合) を用い、37.0°C の恒温槽にて 30 分間反応させた。PBS-T にて 5 分間、3 回洗浄後、ABC (ストレプトアビジンビオチン) と室温で 10 分間反応させ PBS-T にて 5 分間、3 回洗浄後、DAB (Ultra Tech DAB, IMMUNOTECH) にて発色させた。蒸留水にて洗浄後、Mayer's hematoxylin にて対比染色を行い封入した。

Ki-67 陽性細胞数の算定には、舌癌胞巣辺縁部の 4 カ所 (上部、外側部、下部、内側部) を選択し、光学顕鏡下で写真撮影した。この写真原画 1 枚から 500 個、合計 2000 個の癌細胞を観察し、これらの中から核が茶色に染色された陽性細胞数の割合を百分率で求め、Ki-67 labeling index (以下、KLI) とした。深頸リンパ節においても、転移巣の辺縁部で異なる 4 カ所について同様に算出した。肺については、4 カ所の転移巣より算出した。なお、H-E 染色にて壊死部と判断される部位は算定から除外した。

#### (6) nm23 染色および判定法

nm23 の免疫染色は一次抗体に nm23H-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. 10 倍希釈) を用いて Microwave 処理を除き Ki-67 染色の手法と同様に行った。

染色性の判定は、以下の 3 グループに分けた。すなわち, a) 強陽性: 腫瘍細胞の 50% 以上が正常舌粘膜上皮組織より強い染色性を示すもの (++) , b) 陽性: 腫瘍細胞の 50% 以上が正常舌粘膜上皮組織と同程度の染色性を示すもの (+) , c) 陰性: 腫瘍細胞の 50% 以上が正常舌粘膜上皮組織より弱い染色性を示すもの (-) , である。

#### (7) 統計処理

測定した数値は平均値  $\pm$  標準誤差 (mean  $\pm$  SE) で表した。ウサギ VX2 舌癌および深頸リ

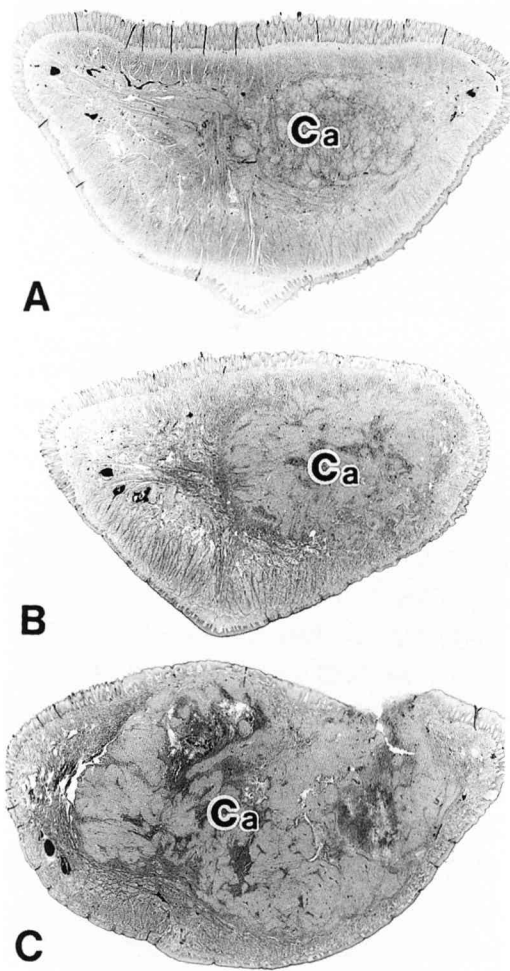


Fig. 1. Low-power view of sections of the tongue specimen (H-E stain). Tongue cancer in the control group showing stage I at 7 days after transplantation (A), stage II at 14 days after transplantation (B) and stage III at 21 days after transplantation (C). Abbreviation : Ca, cancer

ンパ節の体積の関係、また、Ki-67陽性細胞数および KLI の関係は統計用ソフト StatView-J 4.5® (Abacus Concepts) を用いて統計処理し、Mann-Whitney test にて検定を行った。

## 結 果

### 1. 舌、深頸リンパ節および肺の変化

#### (1) 舌

##### 1) 対照群

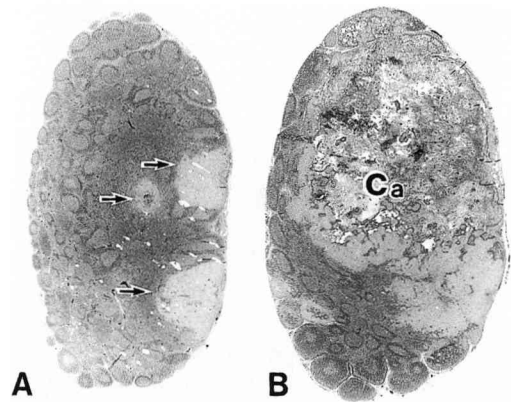


Fig. 2. Low-power view of the deep cervical lymph node (H-E stain).

Lymph node metastasis in the control group is indicated by arrows in the paracortical area and intermediate sinuses at 14 days after transplantation (A), and replaced most of the lymphatic tissues at 21 days after transplantation (B).

Abbreviation : Ca, cancer

VX2 癌移植後 7 日目の舌癌は、舌粘膜上皮に変化を認めず、同側筋層内に限局した胞巣を形成していた。腫瘍は胞巣状あるいは索状に筋線維束間へ浸潤、増殖し (Stage I)、直径 5 mm から 8 mm 大の腫瘍として触知された (Fig. 1 A)。移植後 14 日目では、その腫瘍は直径 10 mm から 15 mm の大きさとなり、5 例中 3 例では上部あるいは外側部に潰瘍を形成し、4 例では強く舌中隔を圧排し (Stage II, Fig. 1 B)、1 例では対側にまで浸潤、増殖していた (Stage III)。移植後 21 日目になると、腫瘍は直径 17 mm から 22 mm に増大し、5 例とも対側に浸潤、増殖し (Stage III)、粘膜表面に壊死を伴う潰瘍がみられ、2 例に壊死組織の脱落による実質欠損がみられた (Fig. 1 C)。

#### 2) 実験群 I

VX2 癌移植後 7 日目の舌癌は、対照群の移植後 7 日目とほぼ同様に直径 4 mm から 8 mm 大の腫瘍として触知された。移植後 14 日目も、その腫瘍は対照群と同様に直径 10 mm から 15 mm 大となり、5 例中 2 例では上部あるいは外側部に潰瘍を形成していた。移植後 21 日目になると、腫

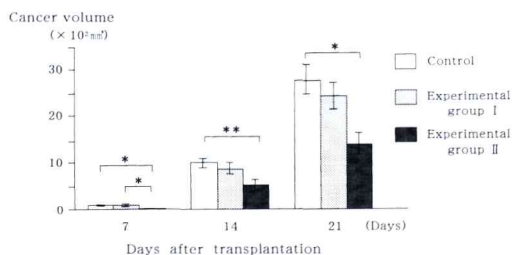


Fig. 3. Changes in VX2 tongue cancer volume after transplantation.  
Data are presented as mean  $\pm$  SE.  
\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$ : Significant difference

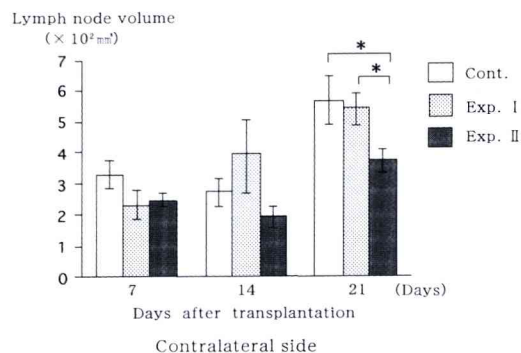
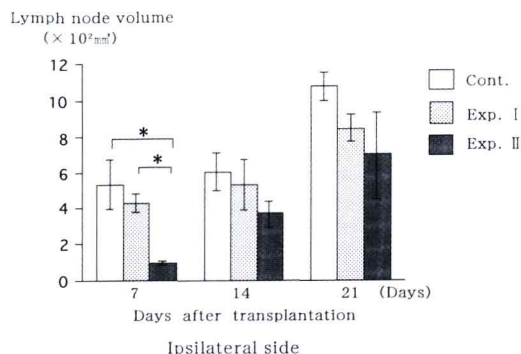


Fig. 4. Changes in deep cervical lymph node volume after transplantation.  
Data are presented as mean  $\pm$  SE.  
\* $p < 0.05$ : Significant difference  
Abbreviation: Cont., control; Exp. I, experimental group I; Exp. II, experimental group II

瘍は直径17 mmから21 mmに増大し、5例とも粘膜表面に壊死を伴う潰瘍を形成し、2例では壊死組織の脱落による実質欠損がみられた。

### 3) 実験群 II

VX2 癌移植後7日目の舌癌は、舌粘膜上皮

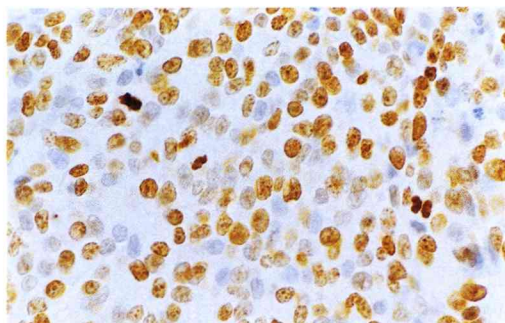


Fig. 5. Histological features disclosed by Ki-67 staining of VX2 tongue cancer.  
Nuclei of Ki-67 positive tumor cells were brown and dark brown in all sections as seen in tongue tumor cells in the control group at 14 days after transplantation.

にほとんど変化がみられず、舌筋層内に直径3 mmから5 mm大の腫瘍として触知された。移植後14日目では、その腫瘍は直径8 mmから12 mm大に増大したが、上部あるいは外側部に潰瘍はみられなかった。移植後21日目になると、腫瘍は直径12 mmから17 mmに増大し、1例では粘膜表面に壊死を伴う潰瘍がみられた。

### (2) 深頸リンパ節

VX2 癌移植後7日目では、対照群、実験群 I, 実験群 IIとも組織学的転移は認められなかった。移植後14日目では、対照群の全5例と実験群 Iの4例に同側深頸リンパ節への転移が認められた (Fig. 2 A) が、実験群 IIでは転移がみられなかった。移植後21日目では、全ての群の5例とも同側深頸リンパ節に、また、対照群および実験群 Iでは対側深頸リンパ節にも各々5例および4例で転移が認められた (Fig. 2 B) が、実験群 IIでは対側への転移はみられなかった。

### (3) 肺

肺転移巣は肉眼的に灰白色の小結節として肺表面にみられた。VX2 癌移植後7日目では、全ての群で組織学的に肺転移は認められなかった。移植後14日目では、対照群および実験群 Iの各々1例に転移が認められた。移植後21日目では、対照群の5例および実験群 Iの4例にそれぞれ転移が認められたが、実験群 IIでは肺転

**Table 1.** Changes of the Ki-67 labeling index in the tongue cancer, metastasis of lymph node / lung and staging according to 3 groups at each time observed after transplantation.

Days after transplantation		Metastasis		Stage			KLI of tongue cancer mean $\pm$ SE (%)
		LN	Lung	I	II	III	
7	Cont.	0	0	5	0	0	54.2 $\pm$ 1.9
	Exp. I	0	0	5	0	0	52.7 $\pm$ 1.5
	Exp. II	0	0	5	0	0	49.5 $\pm$ 2.0
14	Cont.	5	1	0	4	1	66.2 $\pm$ 1.9
	Exp. I	4	1	0	5	0	66.5 $\pm$ 4.2
	Exp. II	0	0	3	2	0	57.0 $\pm$ 1.4
21	Cont.	5 (5)	5	0	0	5	74.4 $\pm$ 1.2
	Exp. I	5 (4)	4	0	0	5	72.5 $\pm$ 1.4
	Exp. II	5	0	0	4	1	64.4 $\pm$ 1.4

( ) : Contralateral \*p&lt;0.01, \*\*p&lt;0.05 : Significant difference

Abbreviation : KLI, Ki-67 labeling index ; Cont., control group ; Exp. I, experimental group I ; Exp. II, experimental group II ; LN, deep cervical lymph node

移がみられなかった (Data not shown)。

なお、転移がみられた肺では、その結節の数および転移部位については実験群間に差異はなかった。

## 2. ウサギ VX2 癌の進展度と転移

VX2 癌移植後 7 日目では、全ての群で各々 5 例とも進展度は Stage I で、転移形成はみられなかった。移植後 14 日目の対照群では、5 例中 4 例が Stage II、1 例が Stage III で、同側リンパ節転移が 5 例に、肺転移が 1 例に認められた。移植後 14 日目の実験群 I では、5 例とも Stage II で、同側リンパ節転移が 4 例、肺転移が 1 例に認められた。移植後 14 日目の実験群 II では、5 例中 3 例が Stage I、2 例が Stage II であったが転移は認められなかった。移植後 21 日目の対照群では、5 例とも Stage III で、いずれも両側リンパ節転移および肺転移が認められた。移植後 21 日目の実験群 I では、5 例とも Stage III で、同側リンパ節転移が 5 例に、対側リンパ節転移および肺転移が各々 4 例に認められた。移植後 21 日目の実験群 II では、4 例が Stage II、1 例が Stage III で、同側リンパ節転移が 5 例に認められたが、対側リンパ節および肺転移は認められなかった (Table 1)。

## 3. ウサギ VX2 癌移植後の体積の推移

### (1) VX2 舌癌

VX2 癌移植後の対照群、実験群 I および実

験群 II における舌腫瘍体積は各経過期間ごとに増大し、とくに、移植後 14 日目から 21 日目にかけて著明に増大した。移植後 14 日目から 21 日目では、深頸リンパ節転移および肺転移の増加する時期であった。また、移植後 7 日目、14 日目、21 日目における実験群 II の体積は、対照群および実験群 I のそれぞれに比べ有意に小さかった (Fig. 3)。

### (2) 深頸リンパ節

VX2 癌移植後の対照群、実験群 I および実験群 II における同側および対側深頸リンパ節の体積は、それぞれ各経過期間ごとに増大していた。対照群および実験群 I の同側深頸リンパ節は、転移の認められた移植後 14 日目以降になると急激に増大した。対照群と実験群 I の対側深頸リンパ節は、転移の認められた移植後 21 日目以降に増大する傾向があった (Fig. 4)。

## 4. Ki-67 染色陽性細胞指数の推移

Ki-67 陽性細胞は核が茶色または茶褐色に染色された (Fig. 5)。

### (1) VX2 舌癌

#### 1) KLI の推移

VX2 舌癌巣部における KLI は、対照群、実験群 I および実験群 II において、それぞれ VX2 癌移植後各経過期間ごとに増加した。また、移植後 14 日目および 21 日目の実験群 II の KLI は、対照群および実験群 I のそれに比べ有

**Table 2.** Change of the Ki-67 labeling index in the tongue cancer and metastasis of lymph node / lung according to staging of VX2 tongue cancer.

		Stage		
		I (n=18)	II (n=15)	III (n=12)
KIL of tongue cancer mean $\pm$ SE		*		
		56.2 $\pm$ 0.9	64.5 $\pm$ 1.1	72.9 $\pm$ 0.9
Number of metastasis	LN	0 (0%)	12 (80.0%)	12 (100%)
	Lung	0 (0%)	1 (6.7%)	10 (83.3%)

\*p&lt;0.01 : Significant difference

Abbreviation : KLI, Ki-67 labeling index ; LN, deep cervical lymph node

**Table 3.** Change of the Ki-67 labeling index in the tongue cancer and staging with / or without metastasis of VX2 tongue cancer.

		Metastasis		
		Non (n=21)	LN (n=13)	Lung (n=11)
KLI of tongue cancer mean $\pm$ SE (%)		*		
		53.7 $\pm$ 1.0	65.5 $\pm$ 1.0	73.5 $\pm$ 0.7
Stage	I	18	0	0
	II	3	11	1
	III	0	2	10

\*p&lt;0.01 : Significant difference

Abbreviation : KLI, Ki-67 labeling index ; LN, deep cervical lymph node

意に低かった (Table 1)。

## 2) VX2 舌癌の進展度と KLI の推移

VX2 舌癌の腫瘍進展度別にみた KLI は, Stage I と比較して Stage II および Stage III で有意に増加していた (Table 2)。

## 3) KLI と深頸リンパ節および肺転移

VX2 舌癌の深頸リンパ節転移および肺転移別にみた舌癌胞巣部の KLI は, 転移が深頸リンパ節から肺へと進展するにつれて有意に増大していた (Table 3)。

## (2) 深頸リンパ節転移巣

同側深頸リンパ節転移巣の KLI は, 移植後 14 日目の対照群が 59.7 $\pm$ 0.4%, 実験群 I が 59.4 $\pm$ 0.6%, 移植後 21 日目の対照群が 70.6 $\pm$ 0.5%, 実験群 I が 70.0 $\pm$ 0.3%, 実験群 II が 59.8 $\pm$ 0.5% であり, 対照群および実験群 I では各経過期間

ごとに増加する傾向にあった。実験群 II の移植後 21 日目の KLI は, 対照群および実験群 I の 14 日目のそれと同じ値であった。

対側深頸リンパ節転移巣の KLI は, 転移の認められた移植後 21 日目の対照群が 59.7 $\pm$ 0.4%, 実験群 I が 59.7 $\pm$ 0.9% であり, それぞれ移植後 14 日目の同側と同じ値であった。

## (3) 肺転移巣

肺転移巣の KLI は, 転移の認められた対照群および実験群 I では, それぞれ移植後 14 日目が 44.3 $\pm$ 0.7%, 39.8 $\pm$ 0.3%, 移植後 21 日目が 62.2 $\pm$ 0.7%, 60.7 $\pm$ 0.3% であり, 各々経過にしたがって増大していた。

## 5. ウサギ VX2 癌における nm23 免疫染色

nm23 抗体はウサギ舌の正常粘膜上皮の基底細胞層の細胞と, 腫瘍細胞の細胞質に茶色また



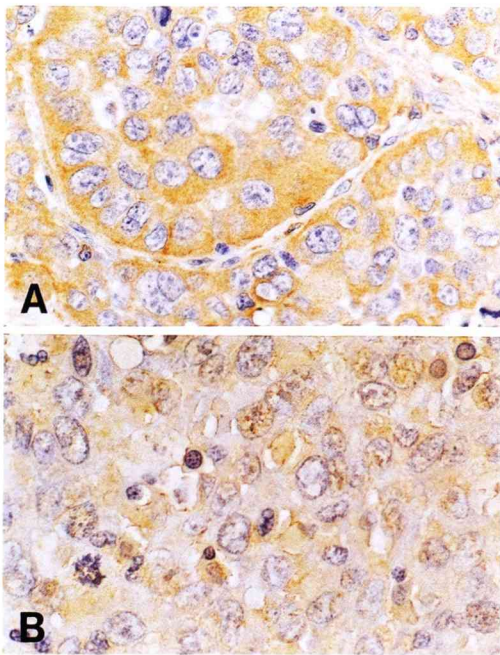


Fig. 6. Histological features disclosed by nm23 staining of VX2 tongue cancer. Cytoplasm of positive tumor cells were brown and dark brown by nm23 staining. A : Strong staining in experimental group II at 7 days after transplantation. B : Positive staining in experimental group I at 7 days after transplantation.

は茶褐色に染色されて検出されたが、その染色程度は様々であった (Fig. 6 A, B)。また、一次抗体の代わりに、正常マウス血清を用いた negative control では染まらず、ウサギ VX2 舌癌においても特異的に検出されることが示された。

#### (1) VX2 舌癌細胞巣部における nm23 の染色性と転移との関連

ウサギ VX2 舌癌における nm23 の染色性を各群 5 例について検索した (Table 4)。nm23 の染色性は移植後 7 日目、14 日目および 21 日目と各々経過にしたがって低下し、とくに対照群および実験群 I で実験群 II と比べて染色性が弱かった。

また、転移別にみた nm23 の染色性は、転移例に比べて非転移例で染色性が強い傾向にあった (Table 4, 5)。

#### (2) VX2 舌癌の進展度と nm23 染色性

VX2 舌癌の進展度別にみた舌癌細胞巣部の nm23 の染色性は、腫瘍の進展度が進むに伴い染色性が減弱する傾向にあった (Table 5)。

#### (3) nm23 の染色性と KLI

nm23 の染色性別にみた舌癌の KLI は、染色性が低下するに伴い有意に増大していた (Table 5)。

#### 6. ウサギ VX2 癌の CDDP 投与と KLI および nm23 発現との関連

CDDP 投与群におけるウサギ VX2 舌癌の KLI は、とくに実験群 II が対照群および実験群 I に比べて有意に低かった。また、nm23 の染色性は実験群 II が他の 2 群に比べてより強い傾向にあった。

## 考 察

口腔癌のリンパ節転移および遠隔転移の有無は、治療効果や予後を左右する重要な因子である。本研究では VX2 移植舌癌の腫瘍細胞増殖能と深頸リンパ節および肺への転移について検索するため、腫瘍細胞増殖能の定量的測定に、Ki-67 抗原を認識するモノクローナル抗体である MIB-5 を使用した。Ki-67 陽性細胞指数は分裂細胞の頻度と強く相関<sup>17)</sup>し、腫瘍の増殖活性の指標や、悪性腫瘍の予後因子として有用であることが報告されている<sup>18, 19)</sup>。これまでも腫瘍細胞の増殖能の検索に PCNA<sup>3)</sup>、AgNORs<sup>2)</sup>などを用いた成績の報告がある。VX2 舌癌については松田<sup>2)</sup>が AgNORs は腫瘍の増大に伴って増加し、腫瘍細胞増殖能の指標となり得ることを示した。本研究においても、VX2 舌癌の Ki-67 陽性細胞数は各経過期間ごとに増加し、同様な結果が得られたことから、Ki-67 抗原は VX2 舌癌においても腫瘍細胞増殖能の一つの指標となり得るものと考えられた。

本研究における舌腫瘍の細胞増殖能は非転移例に比べ深頸リンパ節転移および肺転移例が有意に高かった。このことから、舌腫瘍の細胞増殖能は腫瘍の生物学的悪性度の有用なマーカーになり得るものと考えられる。また、腫瘍進展



**Table 4.** nm23 staining with or without metastasis according to 3 groups at each time observed after transplantation.

Days after transplantation	Group	nm23 staining of tongue cancer					
		++	+	-	++	+	-
		Number of nonmetastasis			Number of metastasis		
7	Cont.	0	3	2	0	0	0
	Exp. I	0	4	1	0	0	0
	Exp. II	3	2	0	0	0	0
14	Cont.	0	0	0	0	2	3
	Exp. I	0	0	1	0	1	3
	Exp. II	1	2	2	0	0	0
21	Cont.	0	0	0	0	1	4
	Exp. I	0	0	0	0	2	3
	Exp. II	0	0	0	0	1	4
Total		4	11	6	0	7	17

Abbreviation : ++, strong positive ; +, positive ; -, negative ;

Cont., control group ; Exp. I, experimental group I ; Exp. II, experimental group II

**Table 5.** Changes of the number of metastasis, staging and Ki-67 labeling index in the tongue cancer according to nm23 staining of VX2 tongue cancer.

		nm23 staining of tongue cancer		
		++ (n = 4)	+(n = 18)	-(n = 23)
Metastasis	Non	4 (100%)	11 (61.1%)	6 (26.1%)
	LN	0	2 (11.1%)	11 (47.8%)
	Lung	0	5 (27.8%)	6 (26.1%)
Stage	I	4	11	3
	II	0	4	11
	III	0	3	9
KLI of tongue cancer mean $\pm$ SE (%)		<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <math>48.6 \pm 2.1</math> </div> <div style="text-align: center;"> <math>57.5 \pm 1.7</math> </div> <div style="text-align: center;"> <math>67.8 \pm 1.4</math> </div> </div>		

\*p&lt;0.01 : Significant difference

Abbreviation : ++, strong positive ; +, positive ; -, negative ; LN, deep cervical lymph node ; KLI, Ki-67 labeling index

度別に腫瘍細胞増殖能と転移との関連性を検討すると、両者間に相関が認められ、このことは腫瘍細胞増殖能が癌細胞の増殖、進展と転移能とに深く関わっていることを示している。

Steeg ら<sup>7)</sup>が報告した遺伝子 nm23 は、癌転移抑制因子として種々の臓器癌において転移との関連性が検討されている。しかし、口腔扁平上皮癌については、その報告が少なく<sup>12)</sup>、いまだ転移との関連が明らかでない。本研究では nm23 の発現は、リンパ節転移例では陰性が多

く、逆に非転移例では強陽性および陽性が多かった。これは乳癌における Bevilacqua ら<sup>20)</sup>の報告と同様に、VX2 舌癌においても nm23 が転移と相関することを示している。一方、腫瘍細胞増殖能は nm23 の発現が陰性の場合、それが強陽性および陽性の場合と比較すると有意に高かった。このような nm23 の発現の差異は、癌細胞の転移を含めた増殖能にも関与することを示唆するものである。VX2 移植舌癌における nm23 の発現は、深頸リンパ節への転移がみ

られないときには強く、逆にその転移があるときには弱く、その発現の程度に差異がみられた。このような差異は、ヒト舌癌においても nm23 の発現が一つの予後予測因子になり得るものと考えられる。さらに、nm23 には二つのアイソフォーム<sup>21)</sup>が存在し、臓器によって発現の程度が異なる。乳癌では転移と nm23H-1 とが相関する<sup>22)</sup>が、舌癌では転移と nm23H-2 とが深く関与している<sup>10)</sup>という報告がみられるものの、詳細はまだ不明で、今後の検討が必要である。

CDDP<sup>15)</sup> は DNA 二重鎖構造に直接作用し、クロスリンクを形成して DNA の合成阻害作用を引き起こすことにより抗腫瘍作用を及ぼす<sup>23)</sup>。なお、本実験に使用したウサギに対する CDDP の投与量は、予備実験の 1 mg/kg では効果が認められず、6 mg/kg では毒性が強く死亡したため、2 mg/kg と 4 mg/kg とを採用した。また、CDDP 4 mg/kg は体重 60 kg のヒトに換算すると 240 mg に相当し、一般に臨床で使用されている CDDP の約 3 倍量となる。

藤澤<sup>24)</sup>はウサギ VX2 舌癌に CDDP を投与し、舌腫瘍の増大が抑制されたと述べている。本研究においても、実験群 II の CDDP 4 mg/kg の投与量では、対照群および実験群 I の CDDP 2 mg/kg の投与量に比べて舌腫瘍の増大を抑制することが明らかで、さらに、実験群 II では対照群および実験群 I に比べ深頸リンパ節転移が約 7 日遅れて現れ、しかも肺転移は認められなかった。このことは CDDP の投与が舌腫瘍の増殖を抑制するとともに、深頸リンパ節転移および肺転移を遅延ないし抑制する効果のあることを示している。

また、実験群 II の CDDP 4 mg/kg を投与した舌腫瘍部および深頸リンパ節転移巣の腫瘍細胞増殖能は、対照群および実験群 I に比べ有意に低かった。しかし、転移の抑制は腫瘍細胞増殖能の抑制だけではなく、種々の要因により起こっていると考えられている。実際、CDDP 4 mg/kg 投与の実験群 II では、対照群および実験群 I と比較すると nm23 染色性が陽性ないしは

強陽性になる場合が多く、深頸リンパ節転移および肺転移が少なかった。このことから CDDP の投与は、腫瘍細胞増殖能を抑制するのみならず、nm23 の発現を強め、転移を抑制するものと考えられた。

本研究では、同側深頸リンパ節転移巣の腫瘍細胞増殖能は肺転移の認められないものに比べ転移の認められるものが有意に高く、また、肺転移は同側深頸リンパ節転移後に発生していた。このようなことから、深頸リンパ節へ転移し、増殖した癌細胞が肺に転移する可能性も考えられる。

ウサギ VX2 舌癌の腫瘍細胞増殖能は、深頸リンパ節転移および肺転移と相関するのに対し、nm23 の発現は腫瘍が増殖し転移が生じたものでは減少する傾向にあった。ウサギ VX2 舌癌に対する CDDP 4 mg/kg 投与の実験群 II は、CDDP 2 mg/kg 投与の実験群 I に比べて腫瘍細胞増殖能を抑制し、深頸リンパ節および肺への転移を遅延ないし抑制していた。また、実験群 I および実験群 II では、対照群に比べ nm23 の発現が強く、転移を遅延ないし抑制する効果があることから、CDDP の投与は nm23 の発現に関与することが示唆された。

以上の結果、口腔癌の治療薬である CDDP は、VX2 癌細胞の増殖抑制と転移抑制に効果のあることを裏付けていた。

## 結 論

VX2 舌癌の増殖と転移に及ぼすシスプラチンの影響を明らかにするため、移植後 7 日目、14 日目および 21 日目の細胞増殖因子 Ki-67 と癌転移抑制遺伝子 nm23 について免疫組織化学的に検索し、以下の結論を得た。

1. 舌腫瘍の細胞増殖能は、舌腫瘍体積の増大に伴って増加し、また、腫瘍が深頸リンパ節や肺に転移するようになると有意に増加した。しかし、CDDP 4 mg/kg 投与群の腫瘍細胞増殖能は生食投与群および CDDP 2 mg/kg 投与群に比べ有意に低かった。

2. 舌腫瘍の nm23 は、CDDP 2 mg/kg から 4

mg/kgへの増量に伴って強く発現し、腫瘍が進展し転移するようになると逆にその発現が弱くなることから、nm23と腫瘍転移とは関連性のあることが示唆された。また、腫瘍細胞増殖能が高くなると、nm23の発現が逆に弱くなり、両者は逆相関の傾向にあった。

3. 深頸リンパ節転移は、舌腫瘍の増大に伴って同側に、次いで反対側に認められた。CDDP 2 mg/kg投与量では移植後21日目になると反対側にも転移するが、CDDP 4 mg/kgの投与量では反対側への転移を認めなかった。

4. 肺転移はいずれも深頸リンパ節転移後に発生し、CDDP 2 mg/kgの投与量では移植後21日目においても殆どに転移したが、CDDP 4 mg/kgの投与量になると、その転移を認めず、抑制することが示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に際し終始ご懇篤な指導と校閲を賜りました工藤啓吾教授、ならびに本学口腔病理学講座佐藤方信教授に衷心より謝意を捧げます。また、本研究の遂行にあたり数々のご教示とご助言をいただきました口腔病理学講座畠山節子講師、口腔外科学第一講座大屋高德助教授、横田光正講師に深く感謝いたします。さらに種々のご協力をいただきました口腔外科学第一講座、口腔病理学講座および関連講座の諸先生に厚く御礼申し上げます。

なお、本論文の要旨は第44回日本口腔外科学会(1999年10月、東京)において発表した。本研究の一部は日本私学振興財団の平成10年度大学院重点特別経費の補助を受けて行った。

## 文 献

- 1) 松浦政彦：ウサギVX2 舌癌モデルにおける頸部リンパ節ならびにリンパ節の細胞反応，日口外誌，42：29-41，1996。
- 2) 松田淳志：ウサギVX2 舌癌とその深頸リンパ節転移巣の増殖とアポトーシスの発現に関する病理学的研究，岩医大歯誌，23：1-15，1998。
- 3) 持山達郎：VX2 移植口底癌の進展様式と領域リンパ節転移に関する免疫組織学的研究，福岡歯大誌，22：547-563，1995。
- 4) Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H.-H., Schwab, U., and Stein, H.: Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J. Immunol.* 133: 1710-1715, 1984.
- 5) Yamamoto, T., Ikawa, S., Akiyama, T., Semba, K., Nomura, N., Miyajima, N., Saito, T., and Toyoshima, K.: Similarity of protein encoded by the human *c-erbB-2* gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 319: 230-234, 1986.
- 6) Seiter, S., Arch, R., Reber, S., Komitowski, D., Hofmann, M., Ponta, H., Herrlich, P., Matzku, S., and Zöller, M.: Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. *J. Exp. Med.* 177: 443-455, 1993.
- 7) Steeg, P. S., Bevilacqua, G., Kooper, L., Thorgeirsson, U. P., Talmadge, J. E., Liotta, L. A., and Sobel, M. E.: Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *Natl. Cancer Inst.* 80: 200-204, 1988.
- 8) Kimura, N., Shimada, N., Nomura, K., and Watanabe, K.: Isolation and characterization of a cDNA clone encoding rat nucleoside diphosphate kinase. *J. Biol. Chem.* 265: 15744-15749, 1990.
- 9) Fukuda, M., Ishii, A., Yasutomo, Y., Shimada, N., Ishikawa, N., Hanai, N., Nagata, N., Irimura, T., Nicolson, G. L., and Kimura, N.: Decreased expression of nucleoside diphosphate kinase  $\alpha$  isoform, an nm23-H2 gene homolog, is associated with metastatic potential of rat mammary adenocarcinoma cells. *Int. J. Cancer* 65: 513-537, 1996.
- 10) 白子隆志，佐治重豊，深田代造，宮 喜一，梅本敬夫，国枝克行，杉山保幸，鷹尾博司，加藤元久，永田 緑：早期胃癌における PCNA, laminin, p53, nm23, c-erbB-2 のリンパ節転移高危険因子に関する検討，日消外会誌，30：8-14，1997。
- 11) 田中知行：大腸癌における転移抑制遺伝子産物 nm23/NDPkinase の免疫組織化学的検討 - 肝転移予測因子としての有用性について -，慈恵医大誌，111：219-226，1996。
- 12) 大月 要：ヒト口腔扁平上皮癌における nm23/NDP キナーゼの発現様式と頸部リンパ節転移に関する研究，岡山歯誌，15：73-86，1996。

- 13) 石戸谷淳一, 小口直彦, 木村直道, 鳥山 稔: 頭頸部扁平上皮癌における癌転移抑制遺伝子 nm23 の発現と Heterogeneity, 頭頸部腫瘍, 21: 6-12, 1995.
- 14) 宮崎英隆: 頭頸部癌における nm23/NDP キナーゼの発現と癌転移抑制作用に関する研究, 口腔病会誌, 65: 189-196, 1998.
- 15) Rosenberg, B., Van Camp, L., and Krigas, T.: Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 205: 698-699, 1965.
- 16) 伊藤洋平: 移植腫瘍, 宮川正澄, 佐藤春郎, 蝶良義彦 監修: 実験腫瘍学, 第1版, 朝倉書店, 東京, 554-557 ページ, 1966.
- 17) Weidner, N., Moore II, D. H., and Vartanian, R.: Correlation of Ki-67 antigen expression with mitotic figure index and tumor grade in breast carcinomas using the novel "paraffin"-reactive MIB 1 antibody. *Hum. Pathol.* 25: 337-342, 1994.
- 18) 小宮山和正: 舌癌の増殖能に関する免疫組織化学的研究: Ki-67 抗原発現と組織学的悪性度との関連性について, 日口腔外会誌, 41: 179-190, 1995.
- 19) Wintzer, H-O., Zipfel, I., Schulte-Monting, J., Hellerich, U., and von Kleist, S.: Ki-67 immunostaining in human breast tumors and its relationship to prognosis. *Cancer* 67: 421-428, 1991.
- 20) Bevilacqua, G., Sobel, M. E., Liotta, L. A., and Steeg, P. S.: Association of low nm23 RNA levels in human primary infiltrating ductal breast carcinomas with lymph node involvement and other histopathological indicators of high metastatic potential. *Cancer Res.* 49: 5185-5190, 1989.
- 21) Shimada, N., Ishikawa, N., Munakata, Y., Toda, T., Watanabe, K., and Kimura, N.: A second form ( $\beta$  isoform) of nucleoside diphosphate kinase from rat, Isolation and characterization of complementary and genomic DNA and expression. *J. Biol. Chem.* 268: 2583-2589, 1993.
- 22) Tokunaga, Y., Urano, T., Furukawa, K., Kondo, H., Kanematsu, T., and Shiku, H.: Reduced expression of nm23-H1, but not of nm23-H2, is concordant with the frequency of lymph-node metastasis of human breast cancer. *Int. J. Cancer* 55: 66-71, 1993.
- 23) 太田和男: シスプラチン, 癌治療・今日と明日, 4: 32-36, 1982.
- 24) 藤澤完爾: ウサギ VX2 舌癌におけるシスプラチンの組織内蓄積量と血管構築との関連性, 岩医大歯誌, 24: 1-15, 1999.