

ウサギ VX2 舌癌の血管とリンパ管への侵襲 に関する超微細構造の観察

降旗 球司

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10月18日)

(受理：1999年11月17日)

Abstract : Mode of invasion into blood vessels and lymphatic vessels of VX2 tongue cancer was morphologically investigated in order to clarify a metastatic mechanism of the cancer to cervical lymph nodes.

The suspension of VX2 cancer cells was transplanted into the rabbit tongue muscle. The tongue was excised on the 7th and 14th days after transplantation. The excised specimen was processed for light and transmission electron microscopy.

On the light microscopic examination the peripheral portions of VX2 cancer nests revealed irregular boundaries, and the cancer cells invaded the vascular vessels at these portions. Observation with the transmission electron microscopy showed invasion of cancer cells into the venules and lymphatic vessels. Immunocytes were more frequently observed in the venules than in the lymphatic vessels. The invading cancer cells had no basement membranes and connected each other loosely. Between the endothelial cells of the both venule/lymphatic vessel and the cancer cells, focal contacts were seen as high density electron bands. The interendothelial space of each vascular endothelium was open in the areas invaded by the cancer cells. The three-dimensionally reconstructed image showed that the cancer cells have invaded into the internal lumen of the lymphatic vessel at only one place.

The results of this study suggest that VX2 cancer cells existing in the peripheral portion of the cancer nest has invaded into lumen through the interendothelial space of both venule and lymphatic endotheliums.

Key words : vascular invasion, VX2 tongue cancer, interendothelial space, focal contact

緒 言

舌扁平上皮癌は頸部リンパ節への転移頻度が高く、また、転移の有無は治療方法の選択や予後判定の重要な因子となっている¹⁾。癌の転移形成の過程²⁾は癌細胞の 1) 原発部位での増殖と発現形質の多様化、 2) 原発巣からの遊離、

3) 脈管(血管およびリンパ管)内への侵入、 4) 宿主免疫細胞との相互作用、 5) 標的臓器への着床および増殖、などが考えられている。これら各過程に関する多種、多様な基礎的、臨床的研究が行われているが、頭頸部領域における腫瘍組織の微小血管およびリンパ管侵襲の超微細構造に関する報告^{3, 4)}はきわめて少ない。

Ultrastructural study on blood vessels and lymphatic vessels invaded by rabbit VX2 tongue cancer

Kyuji FURIHATA (First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, Iwate 020-8505, Japan)

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020-8505)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 24 : 194-205, 1999

一方、酵素組織化学的染色法である5'-nucleotidase-alkaline phosphatase 二重染色法⁵⁾はハムスター DMBA 誘発舌癌^{6,7)}、ウサギ VX2 移植舌癌⁸⁾、ヒト口腔扁平上皮癌生検材料^{9,10)}などにおけるリンパ管の分布や動態の解明に応用されている。しかし、脈管内皮細胞の結合状態、基底膜および細胞内小器官、癌細胞と内皮細胞の結合や癌細胞の脈管への侵入部などの形態学的な追究には電顕による観察が必要である。

そこで、頸部リンパ節への易転移性腫瘍であるウサギ VX2 舌癌^{11,12)}の血管およびリンパ管への侵襲の様相を透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

材料および方法

1. 材料

(1) 実験動物

実験動物には体重約 2.5 kg の日本白色種雄性ウサギ（オリエンタルバイオサービス）を用いた。岩手医科大学歯学部動物舎（室温：22±2℃，湿度：55±5%）にて水と固形飼料 RC 4（オリエンタル）を自由に与えた。実験には購入後 1 週間、予備飼育して全身状態や口腔内に異常のないことを確認した動物を用いた。

(2) 実験腫瘍

実験腫瘍はヒト舌腫瘍のうち発生頻度の高い扁平上皮癌に類似した組織像を有し、ウサギ舌に移植可能でその頸部リンパ節へ易転移性^{11,12)}である VX2 癌¹³⁾を用いた。VX2 癌細胞は 1993 年より当講座にてウサギ大腿部筋肉内で累代移植し維持されているものである。

2. 方法

(1) ウサギ VX2 舌癌モデルの作製

VX2 癌細胞の移植は外山¹⁴⁾の方法に準じて行った。VX2 癌細胞数が約 5×10^5 個の癌細胞浮遊液 (0.1 ml) を pentobarbital sodium (ダイナポット) による静脈内麻酔 (25 mg/kg) 下にウサギ舌尖より $\frac{1}{3}$ の左側舌体辺縁部で舌表面から深さ約 3 mm の筋肉内へ移植した。観察には癌細胞移植後 7 日目、14 日目の各 3 匹、計 6 匹を用いた。

(2) 舌摘出方法

癌細胞移植後 7 日目のウサギを pentobarbital sodium (ダイナポット) による静脈内麻酔 (25 mg/kg) 下に両側総頸動脈を露出後、カニューレを挿入しヘパリン加生理食塩水にて 100 cm の高さから流速約 5 ml/min で約 5 分間頭部を瀉血した。次いで、Half-strength のリン酸緩衝 Karnovsky 固定液 (1.25 % グルタルアルデヒド-1.0 % パラホルムアルデヒド, pH 7.2) で灌流固定を約 5 分間行った。灌流固定後、舌を舌根部より一塊として摘出し、腫瘍の中心部で前額断方向に半切し、舌尖側を光学顕微鏡（以下、光顕とする）用、舌根側を透過型電子顕微鏡（以下、電顕とする）用試料とした。光顕用の舌はリン酸緩衝 Karnovsky 固定液 (2.5 % グルタルアルデヒド-2.0 % パラホルムアルデヒド, pH 7.2)、電顕用の舌はカコジル酸緩衝 2.5 % グルタルアルデヒド固定液 (pH 7.2) により、それぞれ 24 時間浸漬固定した。

(3) 光顕用試料作製方法

光顕用試料は浸漬固定後、アルコール上昇系列で脱水し、通法に従ってパラフィン包埋した。その後 4 μ m 厚切片を作製し HE 染色を行い、光顕にて観察した。

(4) 電顕用試料作製方法

電顕用試料は浸漬固定後の舌を幅と奥行きをそれぞれ約 1 mm で、高さを舌背から舌下面上皮までの直方体として細片し、カコジル酸緩衝液 (pH 7.2) で調整した 1 % オスミウム酸で 1 時間、後固定した。その後、アルコール上昇系列で脱水し、通法に従い Epon812 に包埋した。Leica 型超ミクロトーム (ULTRACUT-S または ULTRACUT-UCT) にて 1 μ m の厚切り切片を作製してトルイジン・ブルー染色を施した。光顕下に組織を確認した後、ダイヤモンドナイフを使用して超薄切片を作製した。超薄切片を酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色し、透過型電子顕微鏡 (日立 H-7100S) で観察した。

(5) VX2 癌細胞の電顕的鑑別点

VX2 癌細胞は周囲細胞に比べ核細胞質比が大きく、細胞外形や核が不定型で、多数の偽足

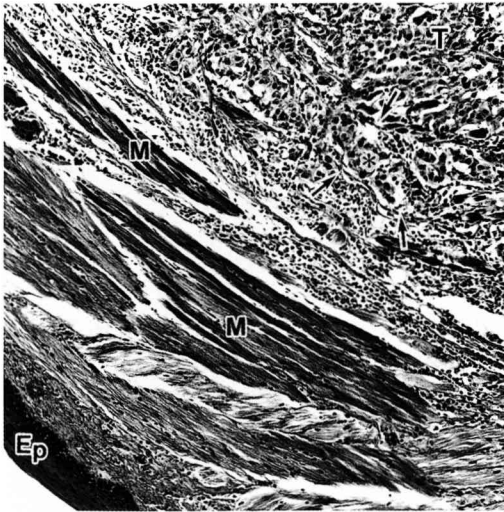


Fig. 1. Histological image of the rabbit VX2 transplantation tongue cancer (the 7 days after transplantation). VX2 cancer (T) diffusely infiltrated at the peripheral portion of the cancer nest. The cancer cells (*) are seen in the vascular vessel (arrows). Ep : epithelium on the inferior surface of the tongue, M: muscle (HE staining, $\times 100$)

様突起などの特徴を有し、その細胞質内に tonofilament¹⁵⁾がみられる。一般に tonofilament を有する上皮系細胞は脈管内や間葉組織には存在しない。

(6) リンパ管の鑑別点

リンパ管の形態は細静脈と類似しているため両者の鑑別は小川¹⁶⁾の方法に従った。

リンパ管はトルイジン・ブルー染色標本では脈管外形が不定形であり、脈管壁が菲薄¹⁷⁾である。これをリンパ管として仮に判断し、超薄切片を作製した。電顕的にリンパ管は、脈管壁が菲薄、脈管輪郭が不規則、周皮細胞および fenestra が欠如、基底膜が欠如または不連続、anchoring filament が存在する、などの特徴を有する^{18,19)}。これらの項目を複数認める脈管をさらに連続切片で総合的に判定し、リンパ管とした。

(7) 癌細胞のリンパ管内侵入部の立体再構築像の作成

リンパ管内への侵入部位の $1\ \mu\text{m}$ 厚連続切片を

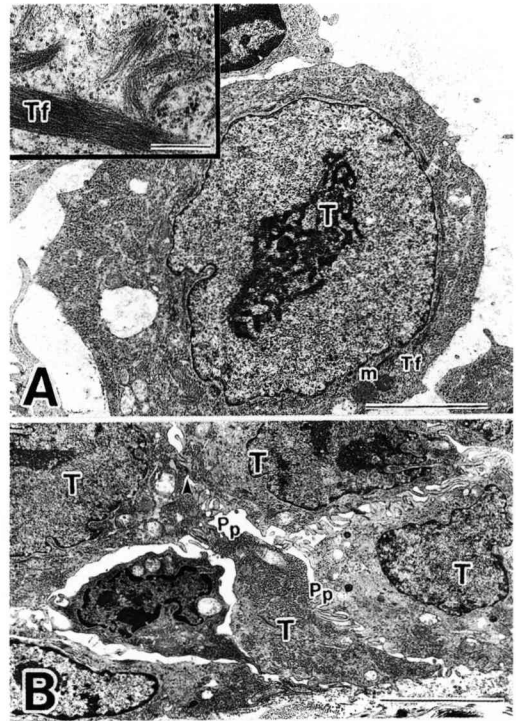


Fig. 2 Ultrastructural images of VX2 cancer cells (T).

A : Tonofilaments (Tf) are seen in the cytoplasm. m : mitochondria Scale bar = $3\ \mu\text{m}$

Insert : Magnified image of the tonofilaments in the cancer cell. Scale bar = $0.5\ \mu\text{m}$

B : The outlines of the nuclei and tumor cells are irregular in shape. An adhesion apparatus (arrowhead) is seen.

Pp : pseudopodia-like process Scale bar = $5\ \mu\text{m}$

ガラスナイフにて 30 枚作製し、トルイジン・ブルー染色を施した。各標本は切り出した順番に 40 倍の対物レンズと冷却 CCD カメラ (Hamamatsu, C5810) を介した組織像としてパーソナルコンピュータに入力し、Photoshop ver. 5.02 (Adobe) にて VX2 癌細胞とリンパ管を抽出した後、閾値処理を加えた。それらの画像を VoxBlast ver. 2.2 (VayTek, Inc.) を用いて立体画像に再構築した。

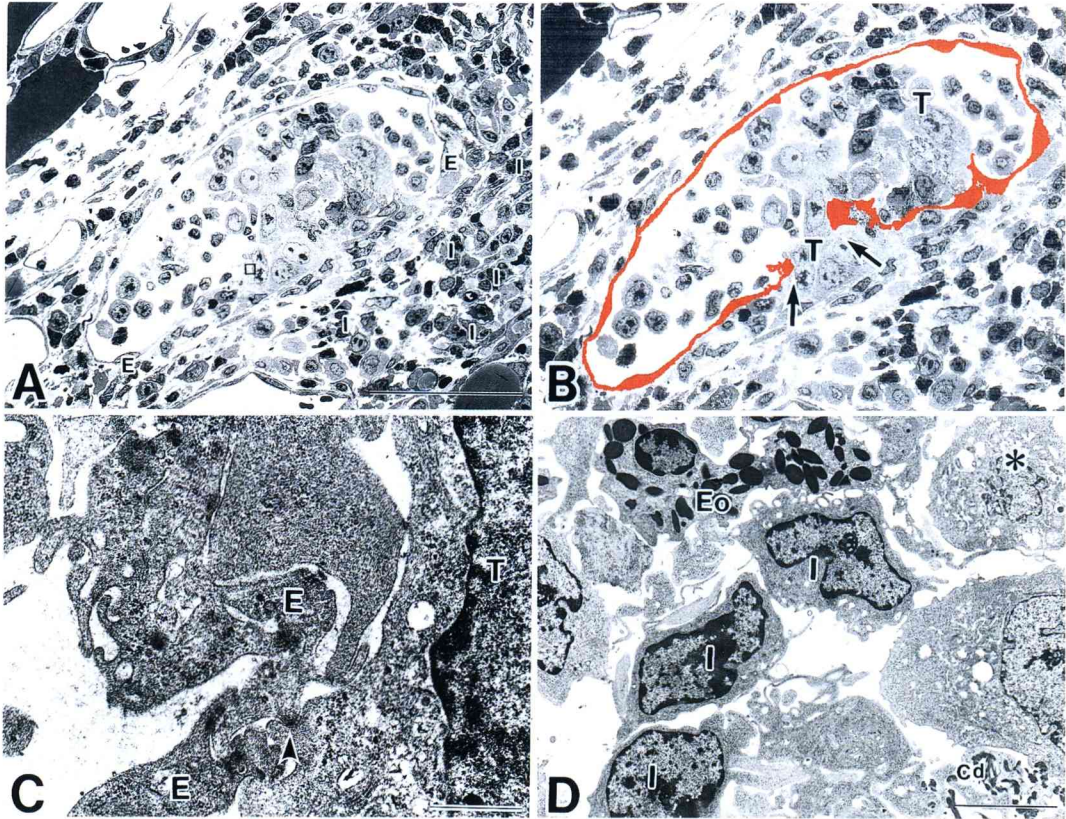


Fig. 3. TEM images of invasion area of VX2 cancer cells into a venule.

A : Many immunocytes (I) are seen in the perivascular tissue. E : endothelial cell Scale bar = 50 μm

B : A trace image of endothelial cells (red color) in Fig. 3 A. The cancer cells invading from an open space between two endothelial cells can be seen (arrows). T : VX2 cancer cell

C : Enlargement of an edge of the opening in the interendothelial space (square in Fig. 3 A). A focal contact (arrowhead) is present between the cancer and endothelial cells. Scale bar = 0.5 μm

D : Magnified image of the cancer cell group in a preceding area in the venules. Immunocytes (I) and cell debris (Cd) are seen. Note that cancer cells in the venule are spherical in shapes (*). Eo : eosinophil Scale bar = 5 μm

結 果

1. VX2 舌癌組織

HE 染色標本では VX2 癌細胞は周囲細胞に比べて大型で核細胞質比が大きく、核分裂像も多く認められた。これら癌細胞は舌組織内を胞巣状に増殖するが、浸潤先進部すなわち癌胞巣周辺部では数個で細胞塊を形成し、癌胞巣の境界は不規則となり、それらの部位で脈管管腔内に癌細胞塊が存在する場合もみられた (Fig. 1)。

電顕的には VX2 癌細胞は周囲細胞より大型で核細胞質比が大きく、その細胞質内に tonofilament や多くのミトコンドリア、リボゾームなどを有していた (Fig. 2 A)。癌細胞間距離は多様で、浸潤先進部ではその距離が特に広く、癌細胞は互いに多数の偽足様突起を伸ばし周囲の癌細胞と嵌合し、その結合部にはしばしば接着装置が高電子密度帯として認められた (Fig. 2 B)。また、腫瘍基底膜は隣り合う癌細胞間には認められなかったが、癌細胞塊と周囲組織との境界部に時折り認められた。

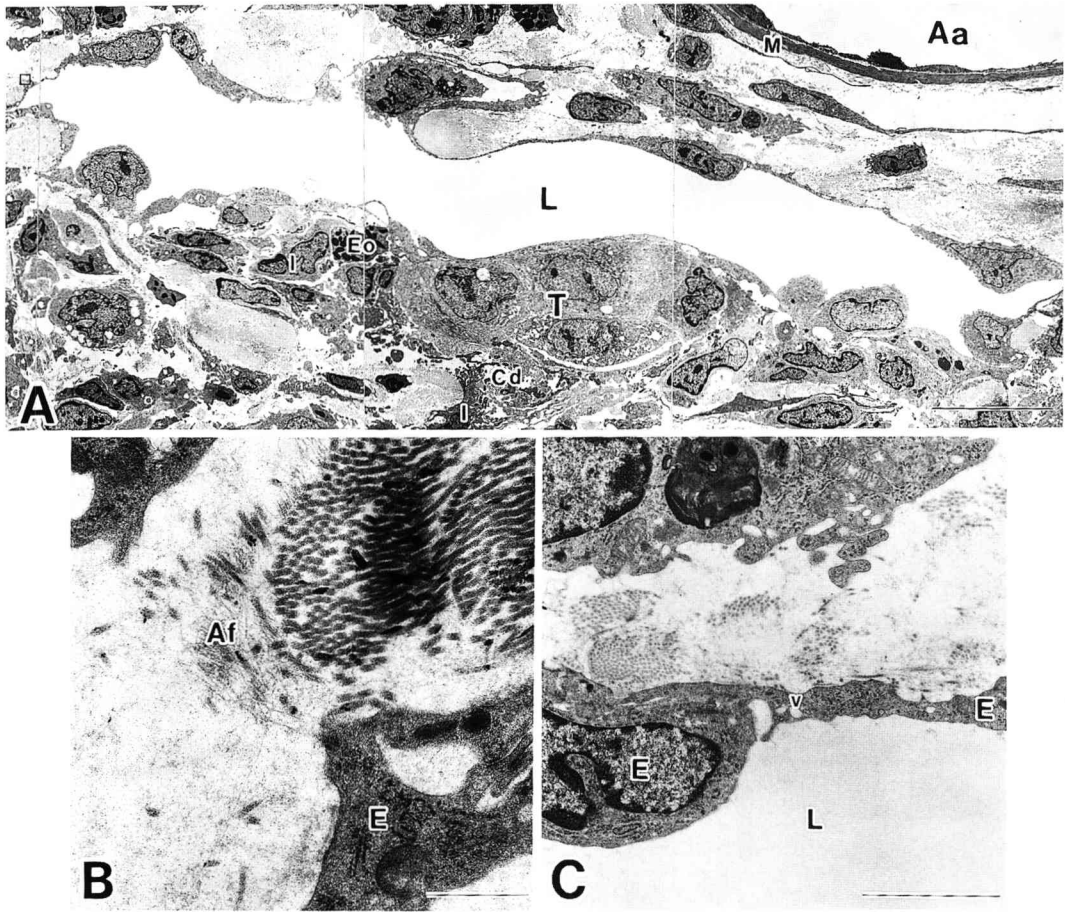


Fig. 4. TEM images of a lymphatic vessel adjacent to the VX2 cancer cells.

- A : Cancer cells (T), immunocytes (I), and cell debris (Cd) are seen in close to the lymphatic vessel (L). An arteriole (Aa) surrounded by a muscular layer (M) can be seen. Eo : eosinophil Scale bar = 10 μ m
- B : Magnified image of a part of the lymphatic vessel (square in Fig. 4 A). The basement membrane of the endothelial cell (E) is not continuous. Af : anchoring filament Scale bar = 1 μ m
- C : Endothelial cells without contact of the cancer cells. Endothelial cells are flat and have few free-ribosomes. v : vesicle Scale bar = 5 μ m

2. 血管侵襲所見

脈管侵入像が光顕下に認められた部位を電顕的に観察すると、VX2 癌細胞の細静脈への侵入像は認められたが、細動脈への侵入像は認められなかった。

VX2 癌細胞の集塊が細静脈に侵入していたが、その部位は腫瘍による組織破壊性の退行性変化を受けていない組織間質であった。この細静脈は扁平で、一層の内皮細胞からなり、血管には周皮細胞がみられた。細静脈内皮細胞の基底膜は癌細胞侵入部位以外では、一部不連続な

部分も認められたものの、ほぼ全周に存在していた。癌細胞塊は細静脈内皮細胞間隙を押し広げるように管腔内へ侵入していた (Fig. 3 A, B)。

侵入する癌細胞と内皮細胞開口部との間には高電子密度を示す focal contact が認められた (Fig. 3 C)。細静脈管腔内では侵入した VX2 癌細胞に近接する好酸球、リンパ球などの免疫担当細胞や、cell debris などが認められた。細静脈に侵入する VX2 癌細胞は基底膜を欠き、先端部の癌細胞は偽足様突起が少なく、類円形を

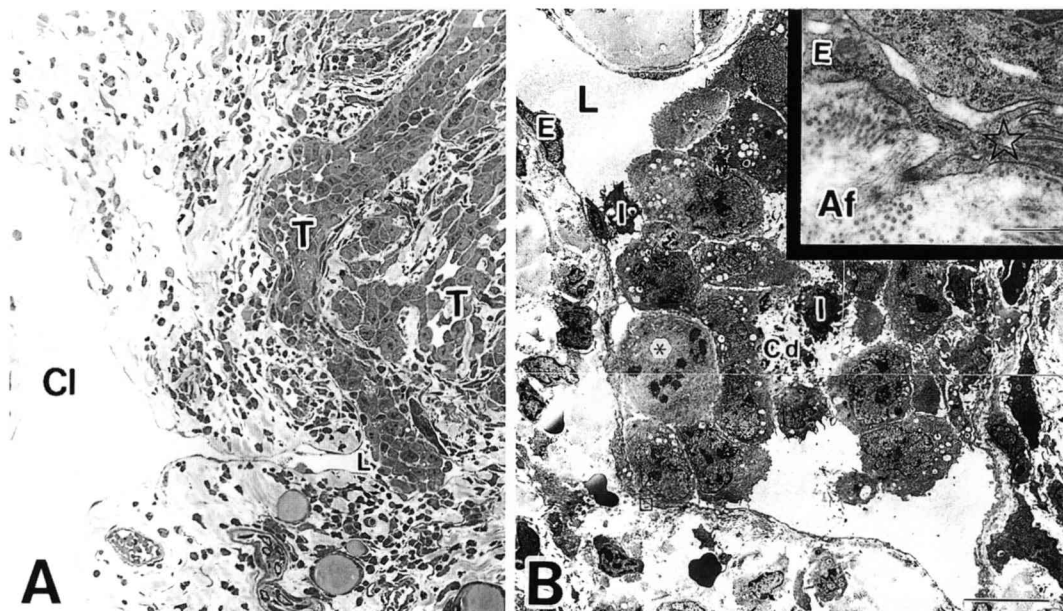


Fig. 5. Light microscopy (A) and TEM (B) images of a lymphatic vessel invaded by VX2 cancer cells.

A : Cancer cell (T) group is present within the lymphatic vessel (L). This lymphatic vessel connects with a collecting lymphatic vessel (Cl) shown on the left in the image. (Toluidine blue staining, $\times 250$).

B : Spherical cancer cells and a mitotic cancer cell (*) are present in the lymphatic vessel. Pseudopodia-like processes are a few and short in these cancer cells. Cd : Cell debris, I : immunocyte cell Scale bar = 20 μm

Insert shows magnified image of square in Fig. 5 B. The basement membrane of the lymphatic vessel is indistinct. Anchoring filaments (Af) and fork-like junctions (☆) are shown. Scale bar = 1 μm

呈していた (Fig. 3 D)。

3. リンパ管侵襲所見

(1) VX2 癌細胞に近接するリンパ管

癌細胞周囲部の結合組織内では細動脈と伴行するリンパ管が認められたが、リンパ管は血管に比べて少なかった。

このリンパ管にVX2 癌細胞、免疫担当細胞、変性組織などが近接していた。リンパ管は一層の連続する内皮細胞からなり、内皮細胞の厚さには薄い部分や厚い部分が存在し不揃いであった (Fig. 4 A)。リンパ管は不連続な基底膜や anchoring filament を有していた (Fig. 4 B)。同一リンパ管でも、癌の非接触側の内皮細胞は全体的に平坦で pinocytotic vesicle や細胞内小器官などがみられた (Fig. 4 C)。

(2) VX2 癌細胞のリンパ管内侵入

VX2 癌細胞のリンパ管内への侵入像はリン

パ管の分布が少ないこともあり、細静脈への侵入像に比べて少なかった。しかし、癌細胞周囲部では癌細胞の集塊が外形の不正なリンパ管内へ侵入していた (Fig. 5 A)。

管腔内の癌細胞は偽足様突起により互いに嵌合し、細胞内に豊富なミトコンドリアを有し、細胞分裂や cell debris、少数の免疫担当細胞などがみられた。また、これら偽足様突起は少数で短く、外形が類円形を呈していた。リンパ管内皮細胞の核は管腔内へ突出したり、扁平化するなど不定形を呈していた。癌細胞に近接したリンパ管周囲組織には変性像が認められた (Fig. 5 B)。このリンパ管には基底膜はほとんどみられず、anchoring filament が不定間隔に存在し、内皮細胞同士の fork-like junction などが認められた。内皮細胞質内には pinocytotic vesicle やミトコンドリアなどがみられた (Fig.

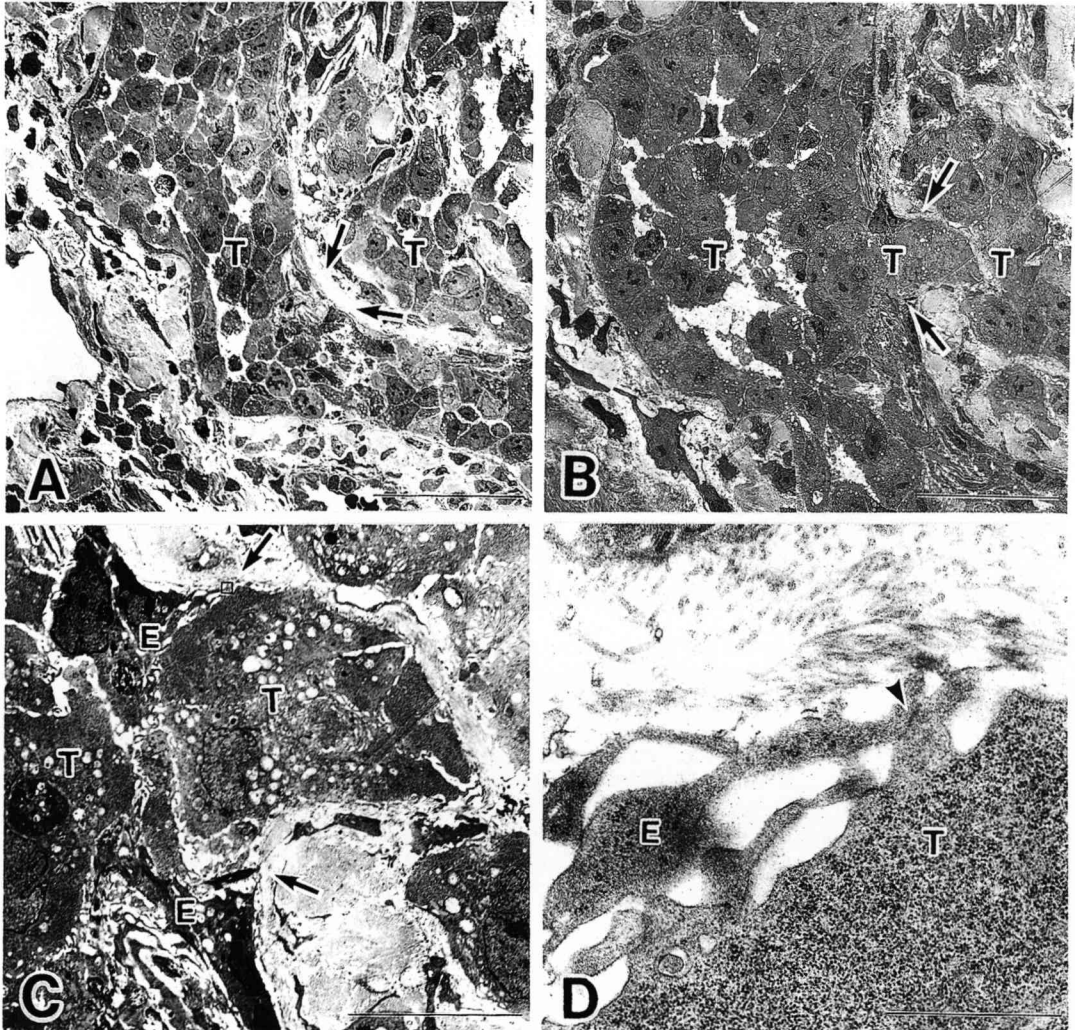


Fig. 6. TEM findings of the invading areas of VX2 cancer cells in the lymphatic vessels

- A : Intravascular cancer cells (T) and extravascular cancer cells are not connected (arrows). Scale bar = 50 μm
- B : TEM image of serial section of Fig. 6 A. Cancer cells are invading into the lumen of the lymphatic vessel through a narrow open space between endothelial cells (arrows : corresponding to the site in Fig. 6 A). Scale bar = 30 μm
- C : Magnified image of Fig. 6 B. Thin endothelial cells (E) and strong chromatin aggregation in the nuclei are observed. Numerous free ribosomes and vacuoles are seen in the invading cancer cells. Scale bar = 10 μm
- D : Magnified image of square in Fig. 6 C. Cancer cell and endothelial cell partly contact with each other and focal contact (arrowhead) is present between both cells. Scale bar = 1 μm

5 B 挿入図)。

脈管内外の癌細胞は非薄で脆弱な内皮細胞により隔てられていたが (Fig. 6 A), 連続切片で観察していくと, リンパ管基底膜欠如部のある一か所から, 癌細胞がリンパ管内への侵入して

いた (Fig. 6 B)。腫瘍侵入部の内皮細胞は開口し, 侵入する癌細胞塊の両側には一部変性しつつある内皮細胞がみられた (Fig. 6 C)。これらのリンパ管に侵入する癌細胞にも基底膜はなく, 癌細胞と内皮細胞との間に高電子密度帯の

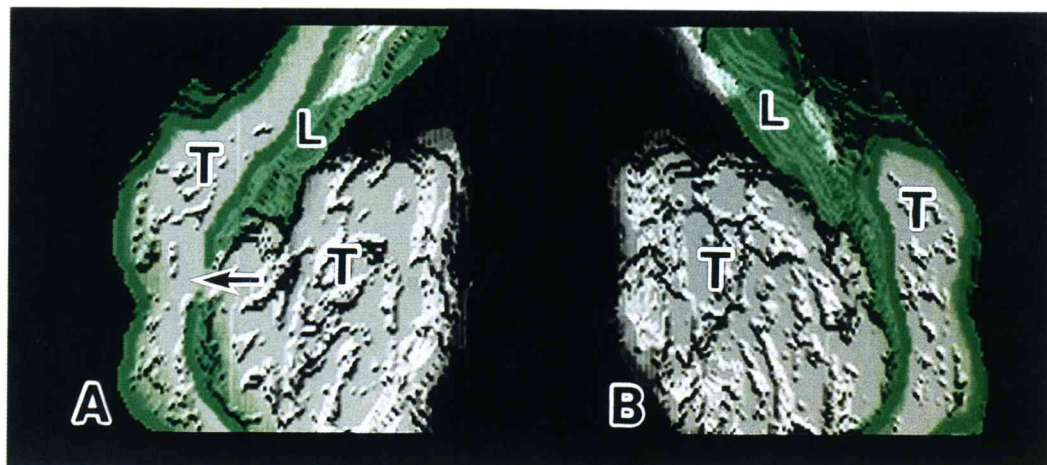


Fig. 7. Three-dimensionally reconstructed image of the invading area of VX2 cancer into the lymphatic vessel.

- A : The cancer (T : shown in gray) invades into the lymphatic vessel (L : green) at one place (arrow).
 B : In a view of different angle the lymphatic vessels is continuous without the opening of cancer invasion.

focal contact が認められた (Fig. 6 D)。

(3) リンパ管侵入部の立体再構築像

リンパ管に侵入した癌細胞は管腔内に充満していた。癌細胞がリンパ管に近接する部分は広範囲に及ぶが、管腔内への侵入口は一か所のみであった (Fig. 7)。

考 察

舌筋内は比較的組織間隙が広く、脈管の密度が高い。ヒト舌扁平上皮癌は舌筋内へ内向性に浸潤し、その様式や深度は頸部リンパ節転移と密接に関連する^{20,21)}。癌細胞の血管およびリンパ管侵襲は転移形成に至る重要な初期段階の一過程である。ウサギVX2舌癌は組織学的にヒト舌扁平上皮癌の低分化型に類似^{8,11,14)}し、頸部リンパ節へ確実に転移^{11,12,22)}するが、脈管侵襲に関する電顕的追究の報告はまだみられない。本実験モデルの移植後7日例では癌細胞が自立増殖し脈管侵襲も明らか¹⁴⁾である。また、頸部リンパ節転移は組織学的に7日例ではみられないが、14日例になると全例に確認^{11,12,22)}されることから、7日から14日にかけてが転移時期であると推定された。

VX2癌細胞は電顕的には上皮系細胞特有の

tonofilamentが細胞質内に認められることから中胚葉由来の細胞と鑑別することができた。また、VX2癌細胞周囲部のリンパ管にはanchoring filamentの存在、不連続な基底膜、周皮細胞およびfenestraの欠如、などの特徴^{17~19)}があり、血管との鑑別に有用であった。

光顕的にはVX2癌細胞は舌体内を胞巣状に増殖するが、その周辺部では境界が不規則となっていた。電顕的には増殖先進部のVX2癌細胞は増殖中心部の癌細胞に比べ、外形が多型性で、多数の偽足様突起によって嵌合しているが、細胞間間隙が広く、基底膜がないことから運動および移動能の高いことが窺われた。癌細胞の運動性は癌細胞がマクロファージと細胞融合することによって高まる²³⁾とされている。VX2舌癌においても多数のマクロファージや免疫担当細胞が間質内で癌細胞と混在している像がしばしば観察され、増殖するVX2癌細胞はその状況に応じて多様な形態や性質を呈する。

外山¹⁴⁾や小西¹³⁾はウサギVX2舌癌細胞は、その増殖先進部で静脈内にもみられると報告している。本実験の光顕像では、細静脈は癌により圧排され、不定形を呈したり内皮細胞が菲薄化

し、リンパ管の形態と類似しているため両者の鑑別が困難であった。しかし、この部位を電顕的に観察すると、癌細胞がリンパ管に接触したり、細静脈およびリンパ管に侵入する像を区別して捉えることができた。一方、細動脈への侵入像は認められなかった。すなわち、細動脈は内皮細胞の厚さが薄いものの外周を単層の筋細胞層に囲まれ、その構造が細静脈やリンパ管に比べて強固で、形態的に他の脈管に比べ癌の浸潤に対する抵抗性が高く、癌細胞の侵入像を観察できなかつたものと推察される。

VX2 癌細胞に近接するリンパ管の内皮細胞は著しい菲薄化と肥厚化した部分とが混在し、核も扁平化や管腔内に突出する、などの形態変化が特徴的であった。これらは癌細胞と内皮細胞との接触によるリンパ管の形態変化であると考えられる。内皮細胞質内に pinocytotic vesicle や細胞内小器官などがみられ、内皮細胞の破壊や開口像はみられず、その機能を保持していることが窺われる。

腫瘍組織からは種々の細胞外基質分解酵素とよばれる酵素が同定され、腫瘍の浸潤に関わる自己基底膜の欠如や細胞外基質の分解に関与している²⁴⁾。細静脈およびリンパ管へ侵入する癌細胞は基底膜を欠き、細静脈およびリンパ管内皮細胞の基底膜は癌細胞の侵入部位には認められなかった。このようにウサギ VX2 舌癌においても腫瘍組織に細胞外基質分解酵素²⁴⁾と同等の物質が発現し、癌の浸潤や脈管内への侵入に関与している可能性が示唆された。

本研究では統計学的解析は行っていないが、癌細胞の脈管への侵入像は血管に比べてリンパ管で少なかった。VX2 癌細胞移植後 7 日例および 14 日例では、癌細胞が周囲組織に胞巣を取り囲むように密な腫瘍血管網を形成²⁵⁾しつつ増殖するが、宿主の防御反応により生物学的活性を失う癌細胞もある。このような癌組織周囲ではリンパ管は血管網の外層に位置し、その数も血管に比べ著しく減少している⁸⁾ため、リンパ管へ到達し、侵入できる癌細胞は少ないものと推考される。

細静脈やリンパ管内に侵入しつつある VX2 癌細胞塊は浸潤先進部にみられる癌細胞群と同様に、それぞれの癌細胞が偽足様突起を長く延ばし緩い嵌合を形成していた。すなわち、癌細胞は運動能および細胞変形能に融通性を持った細胞塊として脈管内に侵入することが示唆される。

細静脈内やリンパ管内に侵入した VX2 癌細胞は細胞質にミトコンドリアが多く、分裂像のみみられる細胞もあり、生物活性の高いことが窺われた。また、これら癌細胞の一部は偽足様突起が少なく、長さも短くなり、細胞外形は類円形を呈していた。これは癌細胞が体液内で浮遊しやすいように球状化をきたした結果であろう。Kawaguchi ら²⁶⁾は浮遊して増殖する癌細胞は細胞基質接着能が弱く、転移しやすいと述べている。VX2 癌細胞が高頻度に転移することを考え併せると、浮遊する VX2 癌細胞は細胞外基質²⁶⁾との接着能が弱いものと考えられる。

癌細胞が血管から脱出するときにはカドヘリン²⁷⁾やインテグリン²⁸⁾などを介して内皮細胞と接着する。これら接着分子は細胞間の接着のみならず、情報伝達^{27, 28)}にも関与することが知られているが、脈管侵入時における癌細胞と内皮細胞との形態学的接着についてはこれまでも報告がみられない。今回の観察では、侵入する癌細胞と細静脈およびリンパ管内皮細胞との間に細胞間接着装置である focal contact²⁹⁾が認められ、この構造は癌細胞移動時の足場の役割や、あるいは両細胞間の相互作用による細胞接着の調整などへ関与しているものと考えられる。なお、本実験では灌流固定を行っているにも関わらず、静脈内に留まる癌細胞や多様な免疫担当細胞がみられた。この原因には血流の物理的停滞、癌による血小板凝集因子活性化³⁰⁾およびトロンボプラスチン活性化³¹⁾、さらには focal contact を介する癌細胞と内皮細胞との接着が強固であることなどが考えられる。

癌細胞の脈管内への侵入様式は静脈およびリンパ管では内皮細胞間隙の通過³²⁻³⁶⁾や癌細胞に

よる内皮細胞の破壊^{4, 36, 37)}、静脈では内皮細胞壁の貫通³⁸⁾、新生リンパ管では内皮細胞による癌細胞の取り込み³⁹⁾、などがあげられている。Ono ら⁴⁾はハムスター移植舌癌を電顕的に観察したところ、癌細胞がリンパ管および静脈の内皮細胞を断裂し侵入していたと述べている。また、脈管内に侵入する悪性腫瘍の細胞数は悪性黒色腫³⁵⁾では一個の細胞として、肺癌³²⁾や胃癌^{36, 37)}、舌癌⁴⁾では数個の細胞塊として侵入することが観察されている。

ウサギ VX2 癌細胞の細静脈とリンパ管への侵入経路は、侵入する癌細胞の両側に別々の内皮細胞が存在することから、内皮細胞間隙が考えられた。この際、侵入する VX2 癌細胞は一個ではなく、常に集塊をなして脈管内へ侵入していた。これら脈管侵襲の様相は癌細胞や動物の違いによって多様性^{32~39)}がみられ、転移機序解明の複雑性が窺われる。また、ウサギ VX2 舌癌では癌細胞が侵入するリンパ管の内皮細胞に萎縮や核クロマチン凝集などの変性像がみられ、内皮細胞間隙は閉鎖することもなく、漸次、増大する癌胞巣によって破壊されるものと推察される。本実験では癌細胞に近接する細静脈やリンパ管の基底膜が広範囲に、しかも数か所で欠如していたが、癌細胞が脈管に侵入する部位はそのうちの一か所の内皮細胞間隙のみであり、脈管基底膜の欠如している部分にも癌細胞の侵入を阻止する機構の存在が示唆された。なお、血管とリンパ管への癌細胞侵入の様相には差異がある。血管はほぼ全周に基底膜が存在するため、癌細胞が内皮細胞に接するにはその基底膜を分解あるいは破壊する必要がある。しかし、リンパ管の基底膜は不連続、脆弱であるため、脈管に近接した癌細胞は血管に比べ容易にリンパ管内に侵入できることが推察される。

以上より、癌細胞の細静脈およびリンパ管内への内皮細胞間隙を介して侵入する機序は、癌細胞の 1) 間質内浸潤および脈管との遭遇、2) 細胞外基質および基底膜の分解または破壊、3) 内皮細胞との接着、4) 内皮細胞間隙の開口、などの過程に要約できる。

血管内の多くの癌細胞は NK 細胞⁴⁰⁾などによる攻撃や免疫担当細胞の産生する活性酸素の作用⁴¹⁾などで 24 時間から 48 時間以内に変性、崩壊に至る⁴²⁾との報告があり、細静脈内の VX2 癌細胞も同様の経過をたどるものと予想される。リンパ管内の免疫担当細胞は細静脈内に比べて少なかったことより、リンパ管内の癌細胞はこのような影響を受けにくく、リンパ節に至るまで生存し続け、転移できる可能性が高い。

結 論

ウサギ VX2 舌癌細胞による血管およびリンパ管への侵襲の様相を光顕的、電顕的に観察し、以下の結論を得た。

1. VX2 癌細胞は舌体内を胞巣状に増殖し、その先進部では境界が不明瞭となり、一部の癌細胞は細静脈およびリンパ管へ侵入していた。
2. 細静脈およびリンパ管へ侵入する癌細胞は細胞同士の間隙が広く、結合が緩やかで、細胞外形は多形性を呈していた。侵入する癌細胞および癌細胞侵入部の脈管基底膜は欠如していた。
3. 癌細胞は細静脈およびリンパ管へ侵入すると、先端部の癌細胞は多形性から類円形へと球状化し、浮遊しやすくなるものと推察された。
4. 癌細胞が細静脈およびリンパ管壁へ接すると内皮細胞との間に focal contact が出現し、この構造は両細胞間の情報伝達に関与しているものと考えられた。
5. 細静脈およびリンパ管内へ侵入する癌細胞の両側に別々の内皮細胞が存在し、その様相から癌細胞の侵入経路は内皮細胞間隙であることが示唆された。
6. 癌細胞に近接する免疫担当細胞は細静脈内に比べてリンパ管内が少なく、前者に比べ後者が癌細胞の生存に有利であることを示唆していた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に終始ご懇篤なる指導と校閲を賜りました工藤啓吾教授ならびに終始ご指導とご助言をいただきました本学口腔解剖学第一講座野坂洋一郎教授と口腔病理学講座佐藤方信教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究の遂行にあたり数々の御助言をいただきました口腔解剖学第一講座藤村 朗助教授に深く感謝いたします。さらに、本研究に対しご指導頂きました口腔外科学第一講座大屋高徳助教授ならびに横田光正講師、ご協力頂きました口腔外科学第一講座および関連講座の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

なお、本論文の主旨は第53回日本口腔科学会総会（1999年4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) 福田喜安, 村上裕子, 泉沢 充, 島田 学, 大内治, 松田淳志, 大屋高徳, 工藤啓吾: 口腔扁平上皮癌における頸部リンパ節転移様式と転帰に関する検討, *口腔腫瘍*, 9: 261-268, 1997.
- 2) 中森正二, 明渡 均: 転移, 有吉 寛, 西條長宏, 佐々木康綱, 福岡正博, 渡辺 亨 編集幹事: 臨床腫瘍学, 第1版, 癌と化学療法社, 東京, 148-149ページ, 1996.
- 3) Lanny, G. C., Dennis, K. B., Joan, R., and Steven, D. S.: Microvascular invasion in cancer of the oral cavity and oropharynx. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 113: 1191-1195, 1987.
- 4) Ono, Y., Nakajima, T., and Saku, T.: Vascular invasion of O-1 N, hamster squamous cell carcinoma with high potential of lymph node metastasis: Ultrastructural comparison between lymphatics and blood vessels. *Pathol. Int.* 48: 254-264, 1998.
- 5) Kato, S., and Miyauchi, R.: Enzymehistochemical visualization of lymphatic capillaries in the mouse tongue: Light and microscopic study. *Okajimas Folia. Anat. Jan.* 65: 391-404, 1989.
- 6) 遠藤光宏: 舌の誘発癌下組織における毛細リンパ管の分布と構築に関する実験的研究, *岩医大歯誌*, 18: 36-50, 1993.
- 7) 中山温史: 誘発舌癌における毛細リンパ管の酵素組織化学的観察, *日口外誌*, 41: 104-113, 1995.
- 8) 北原朋広: VX2 舌癌の 5'-Nase 染色によるリンパ管の観察, *岩医大歯誌*, 20: 270-283, 1995.
- 9) 小川 淳, 中山温史, 遠藤光宏, 北原朋広, 斎藤恒夫, 武田信洋, 松田淳志, 福田喜安, 工藤啓吾: 口腔扁平上皮癌における間質内リンパ管に関する酵素組織化学的検討, *日口外誌*, 42: 975-979, 1996.
- 10) Nakayama, A., Ogawa, A., Fukuta, Y., and Kudo, K.: Relation between lymphatic vessel diameter and clinicopathologic parameters in squamous cell carcinomas of the oral region. *Cancer* 86: 200-206, 1999.
- 11) 小西稔尉: VX2 舌癌の領域リンパ節転移に関する実験的研究, *九州歯会誌*, 47: 122-134, 1993.
- 12) 松浦政彦: ウサギVX2 舌癌モデルにおける頸部リンパ節転移ならびにリンパ節の細胞反応, *日口外誌*, 42: 29-41, 1996.
- 13) Kidd, J. G., and Rous, D. P.: A transplantable rabbit carcinoma originating in a virus-induced papilloma and containing the virus in masked or altered form. *J. Exp. Med.* 71: 813-849, 1940.
- 14) 外山勤吾: VX2 癌移植による家兎舌癌の病理組織学的研究, *九州歯会誌*, 32: 340-356, 1978.
- 15) Kuo, J. H.: Ultrastructural study of effects of cisplatin on VX2 carcinoma cells. *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.* 33: 35-50, 1990.
- 16) 小川 淳: ウサギVX2 舌癌における毛細リンパ管内皮細胞の HRP 吸収性, *岩医大歯誌*, 21: 242-256, 1996.
- 17) 久保寛倫, 前田洋一, 植木 実, 杉本 修, 大槻勝紀, 鉤スミ子: 毛細リンパ管と毛細血管, 細静脈の光学顕微鏡的鑑別法について—樹脂包埋準超薄切片を用いたトルイジン・ブルー染色およびパラフィン切片免疫組織化学染色法—, *リンパ学*, 12: 33-39, 1989.
- 18) 藤川和生, 鉤スミ子: 肝小葉間結合組織における毛細リンパ管の電子顕微鏡的研究, *解剖誌*, 50: 129-137, 1975.
- 19) Leak, L. V., and Burke, J. F.: Fine structure of the lymphatic capillary and the adjoining connective tissue area. *Am. J. Anat.* 118: 785-810, 1966.
- 20) Fukano, H., Matsuura, H., Hasegawa, Y., and Nakamura, S.: Depth of invasion as a predictive factor for cervical lymph node metastasis in tongue cancer. *Head Neck* 19: 205-210, 1997.
- 21) 木村幸紀, 柳澤昭夫, 鎌田信悦, 岡野友宏: 舌癌筋層内浸潤部の組織像とリンパ節転移, *頭頸部腫瘍*, 24: 116-120, 1998.
- 22) 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.
- 23) Kerbel, R. S., Lagard, A. E., Dennis, J. W., and Donaghue, T. P.: Spontaneous fusion in vivo between normal host and tumor cells. Possible contribution to tumor progression and metastasis studied with a lectin resistant mutant tumor. *Mol. Cell Biol.* 3: 523-538, 1983.
- 24) 滝野隆久: マトリックスメタロプロテアーゼ, 垣添忠生, 関谷剛男 編集: 癌 分子メカニズムか

- ら病態・診断・治療まで, 羊土社, 東京, 99-101 ページ, 1996.
- 25) 武田信洋: 移植VX2 舌癌の血管構築に関する3 次元的解析, 岩医大歯誌, 22: 228-241, 1997.
- 26) Kawaguchi, T., Igarashi, S.: Substrate adhesiveness and experimental metastatic potential of rat ascites hepatoma AH7974-derived variant sublines. *Clin. Exp. Metastasis* 10: 225-238, 1992.
- 27) 竹市雅俊: がん細胞の接着と転移—カドヘリンはどう関わるか—, *Oncologia*, 26: 149-156, 1993.
- 28) Nicolson, G. L.: Tumor and host molecules important in the organ preference of metastasis. *Semin. Cancer Biol.* 2: 143-154, 1991.
- 29) 藤原敬己, 神宮司洋一, 増田道隆: 細胞骨格と接着因子, 腎と透析, 37: 451-458, 1994.
- 30) Sugimoto, Y., Oh-hara, T., Watanabe, M., Saito, H., Yamori, T., and Tsuruo, T.: Acquisition of metastatic ability in hybridomas between two low metastatic clones of murine colon adenocarcinoma 26 defective in either platelet-aggregating activity or in vivo growth potential. *Cancer Res.* 47: 4396-4401, 1987.
- 31) Kohga, S.: Thromboplastic and fibrinolytic activities of ascites tumor cells of rats, with reference to their role in metastasis formation. *Gann.* 69: 461-470, 1978.
- 32) Paku, S., Paweletz, N., Spiess, E., and Aulenbacher, P., Werling, H. O. and Knierim, M.: Ultrastructural analysis of experimentally induced invasion in the rat lung by tumor cells metastasizing lymphatically. *Anticancer Res.* 6: 957-966, 1986.
- 33) Carr, I., Levy, M., Orr, K., And Bruni, J.: Lymph node metastasis and cell movement: ultrastructural studies on the rat 13762 mammary carcinoma and walker carcinoma. *Clin. Exp. Metastasis* 3: 125-139, 1985.
- 34) Constantinides, P., Hewitt, D., and Harkey, M.: Vessel invasion by tumor cells An ultrastructural study. *Virchows Archiv. A Pathol. Anat. Histol.* 415: 335-346, 1989.
- 35) Deutsch, A., Lubach, D., Nissen, S., and Neukam, D.: Ultrastructural studies on the invasion of melanomas in initial lymphatics of human skin. *J. Invest. Dermatol.* 98: 64-67, 1992.
- 36) 荒木京二郎: 癌の浸潤初期とリンパ管侵襲の電顕的研究—N-methyl-N-nitrosoguanidine (MNNG) 誘発ラット胃癌における観察—, 岡山医誌, 91: 659-669, 1979.
- 37) 長尾孝一, 松寄 理, 井出源四郎: 胃癌の血管侵襲と腫瘍塞栓形成について—剖検例における血行性肝転移症例を中心として—, 癌の臨床, 21: 148-158, 1975.
- 38) Peter, P. H., Bruyn, D., and Cho, Y.: Vascular endothelial invasion via transcellar passage by malignant cells in the primary stage of metastases formation. *J. Ultrastruct. Res.* 81: 189-201, 1982.
- 39) 東梅誠太郎: 吉田肉腫の大網への浸潤および脈管侵入に関する電顕的研究, 福島医誌, 31: 31-46, 1981.
- 40) Hanna, N.: The role of natural killer cells in the control of tumor growth and metastasis. *Biochem. Biophys. Acta.* 780: 213-226, 1985.
- 41) Glaves, D.: Intravascular death of disseminated cancer cells mediated by superoxide anion. *Invasion Metastasis* 6: 101-111, 1986.
- 42) Reid, G. H., and Gibbins, J. R.: Fate of cultured cells after injection into the circulation of syngeneic animals. *Cancer Res.* 39: 4724-4731, 1979.