

研 究

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

松田 淳志

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)

岩手医科大学歯学部口腔病理学講座

(指導:佐藤 方信 教授)

(受付:1997年12月5日)

(受理:1998年12月27日)

**Abstract :** The proliferation kinetics of VX2 cancer cells transplanted to the tongue and its lymph node metastasis and the association of apoptosis were explored. On 7, 14, 21 and 28 days after VX 2 cancer cells were transplanted into the left muscular layer of the tongue, rabbits were sacrificed to enucleate the tongue and deep cervical lymph node. Paraffin sections, prepared according to the ordinary procedure, were observed by hematoxylin-eosin staining, argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) staining and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick end labeling (TUNEL) method.

The volume of rabbit tongue cancer increased rapidly 14 to 21 days after transplantation. The number of AgNORs in the peripheral portions of the rabbit tongue cancer cell nest was largest 14 days after transplantation. Metastasis was observed in a rabbit deep cervical lymph node on the transplantation side 14 days after transplantation. The number of AgNORs in the peripheral portions of the bilateral deep cervical lymph node metastasis was larger than that in the peripheral portions of the rabbit tongue cancer cell nest, increasing day by day with advance of the deep cervical lymph node metastasis. The apoptotic indexes of the rabbit tongue cancer and deep cervical lymph node metastasis increased day by day, then the latter exceeded the former. The number of AgNORs was correlated with the apoptotic index in the deep cervical lymph node metastasis on the transplantation side and in the rabbit tongue cancer cell nest.

Thus, the number of AgNORs in the rabbit VX2 tongue cancer cell nest, and its deep cervical lymph node metastasis, can be an indicator of proliferation activity of cancer cells. Especially, a rapid increase in the former may indicate deep cervical lymph node metastasis. It was suggested that apoptosis may be associated with the proliferation and advance of cancer cells in the rabbit tongue cancer cell nest and deep cervical lymph node metastasis.

**Key words :** rabbit VX2 tongue cancer, cervical lymph node metastasis, proliferation, apoptosis

---

Proliferation and apoptosis of rabbit VX2 tongue cancer and in deep cervical lymph node metastasis.

Atsushi MATSUDA

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

(Oral Pathology, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, 020-8505 Japan)

## 緒 言

舌は解剖学的に大小多数の脈管系が発達しているため、舌癌は局所での再発や領域リンパ節転移、さらには遠隔部への転移が比較的早期に出現する。近年、化学療法、放射線療法および外科療法などの進歩によって舌原発腫瘍は制御されるようになったにもかかわらず、頸部リンパ節から遠隔臓器へと転移し、不幸な転帰をたどる例もみられる<sup>1,2)</sup>。したがって、局所での腫瘍の進展および領域リンパ節転移の様相を細胞増殖と細胞死の両面から把握し、これに対処することは適正な治療法の選択、治療成績の向上にきわめて重要である。

これまで腫瘍細胞の増殖に関して proliferating cell nuclear antigen (PCNA)<sup>13-15)</sup>、Ki-67 抗原<sup>14,16,17)</sup>、argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs)<sup>3-10)</sup>などを用いた研究が報告されてきた。とくに AgNORs は、その数および大きさが腫瘍細胞の代謝、増殖、分化などに強く関連することから、細胞増殖判定の簡便法として利用できる可能性が報告<sup>3,4)</sup>され、口腔領域の腫瘍についてもいくつか発表がある<sup>7,8,12,14)</sup>。一方、壊死のような accidental cell death とは異なる細胞死としてアポトーシス (apoptosis, programmed cell death)<sup>18)</sup> の概念が提唱された。また、DNA が損傷された細胞はアポトーシスを起こして排除されることなどから、腫瘍細胞の増殖、進展に関与するとされている<sup>19,20)</sup>。近年、Gavrieli ら<sup>21)</sup>により DNA の断片化した細胞を可視化する terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick end labeling (TUNEL) 法が報告され、アポトーシスの定量化が可能となった。現在では、従来より検討されてきた細胞の増殖特性の変化に加えて、細胞の消退機構の特性も併せて検討することは腫瘍の病態を解明する上で有意義なことと考える。

そこで、著者は舌癌の増殖、進展と領域リンパ節への転移との関連性を追究する目的で、ウ

サギ VX 2 舌癌と一次転移リンパ節である深頸リンパ節に転移した癌細胞の増殖動態とアポトーシスの発現を経日的に検索した。

## 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 (SLC) 25 匹を購入後、岩手医科大学歯学部動物舎 (室温: 23 ± 2°C, 湿度: 55 ± 5%) にて 7 日から 14 日間飼育し、全身状態および口腔内に異常の認められないものを用いた。

#### (2) 実験腫瘍

実験に用いた VX 2 癌細胞は 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もので、ウサギ舌に移植可能であり、ヒト扁平上皮癌に類似した組織像を有する。

### 2. 実験方法

#### (1) 移植方法

VX 2 癌のウサギ舌への移植は伊藤ら<sup>22)</sup>の方法に準じて作製した VX 2 癌細胞浮遊液 0.1 ml (約  $5 \times 10^5$  個) を、舌尖より 1/3 の左側舌体辺縁部で深さが舌表面から約 2 mm の筋肉内へ移植した。

#### (2) 舌および深頸リンパ節の観察

VX 2 癌をウサギ舌に移植後 4 群 (各群 5 匹) に分け、7 日目、14 日目、21 日目、28 日目に各々 5 匹ずつ屠殺し、舌および深頸リンパ節を摘出した。そして癌の増殖状態を肉眼的に観察後、舌癌の大きさ (幅径 × 前後径 × 厚径) をノギスにて計測し、舌癌の体積 (mm<sup>3</sup>) 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 (mm<sup>3</sup>) を算出した。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、3 μm の連続切片を作製し、組織学的観察、AgNORs 染色および TUNEL 法に用いた。組織学的観察は hematoxylin-eosin (H-E) 染色を施して鏡検し、舌における癌と深頸リンパ節における転移癌の進展度を松

**Table 1.** Staging of tongue cancer and deep cervical lymph node metastasis.**Tongue cancer**

Stage I : The cancer forms localized alveolar foci in the muscle layer.

Stage II : The cancer extends nearly to the septum of the tongue.

Stage III : The cancer extends to the other side of the septum of the tongue.

**Deep cervical lymph node metastasis**

Stage 1 : Metastasis is observed from marginal sinuses to the superficial layer of the cortex and intermediate sinuses in this region.

Stage 2 : The metastatic cancer has extended to the paracortical area and intermediate sinuses in this region but occupies less than a half of the entire area of the deep cervical lymph node.

Stage 3 : The metastatic cancer has replaced most of the lymphatic tissues.

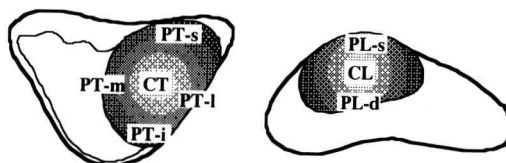
Stage 4 : The metastatic cancer has infiltrated into extranodal tissues.

浦<sup>23)</sup>の分類を一部改変した基準 (Table 1.) に基づいて評価した。なお、深頸リンパ節は移植側 (同側と呼ぶ) と非移植側 (対側と呼ぶ) について評価した。

**(3) AgNORs 染色およびその数の算出**

AgNORs 染色は Crocker ら<sup>5)</sup>の方法を一部改変して行った。すなわち、パラフィン切片 (3  $\mu$ m) を脱パラフィンした後、50% 硝酸銀溶液と1% 蟻酸水溶液にゼラチンを2%の割合で溶解した液を2 : 1の割合で混合し、暗室で30分間 (室温) 反応させた。染色後、十分に蒸留水にて洗浄し、5% チオ硫酸ナトリウム溶液で10秒間定着を行った。

AgNORs 数の計測は油浸レンズ下で、舌癌胞巣の辺縁部4ヵ所 (上部, 外側部, 下部, 内側部) および舌癌胞巣の中心部1ヵ所における各々100個の癌細胞核について微細顆粒状の dots 数を算出し、1核あたりの平均 AgNORs 数を求めた。深頸リンパ節においては、転移巣の辺縁部2ヵ所 (表層, 深層) と転移巣の中心



**Fig. 1.** Schema showing some parts counted the number of argyrophilic nucleolar organizer regions in the tongue cancer (left) and deep cervical lymph node metastasis (right).

Abbreviations : PT, peripheral portion of the tongue cancer; PT-s, superior; PT-l, lateral; PT-i, inferior; PT-m, medial; CT, central portion of the tongue cancer; PL, peripheral portion of the lymph node metastasis; PL-s, superficial; PL-d, deep; CL, central portion of the lymph node metastasis

部1ヵ所について同様に算出した (Fig. 1)。

**(4) TUNEL 法および apoptotic index の算出**

アポトーシス細胞を可視化する TUNEL 法は、基本的には Gavrieli ら<sup>21)</sup>の方法に従って行った。切片は通法のごとく脱パラフィン後、リン酸緩衝食塩水に Tween-20 を加えた溶液 (PBS-T) にて洗浄した。20  $\mu$ g/ml の proteinase K で15分間 (室温) 処理, PBS-T にて洗浄後, さらに室温にて20分間, 0.3%  $H_2O_2$  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, 3回洗浄後, pH 7.0, 100 mM sodium cacodylate, 1 mM  $CoCl_2$ , 50  $\mu$ g/ml gelatin, 10 nM/ml Biotin-16-dUTP (Boehringer Mannheim) と100U/ml TdT (Takara Biomedicals) の混合液で37°C, 湿潤箱内で1時間反応させた。PBS-T にて5分間, 3回洗浄後, ペルオキシターゼ標識ストレプトアビジンで室温にて20分間処理した。発色には0.02% diaminobenzidine を用い, Mayer's hematoxylin で対比染色を行った。

TUNEL 陽性細胞の算出は, 各切片の癌胞巣辺縁部から無作為に4視野を選択し, 万能写真顕微鏡 Axiophot (Zeiss) を用い, 80倍で写真撮影した。この写真原画から1500個の癌細胞を計測した後, これらの中から茶褐色の陽性細

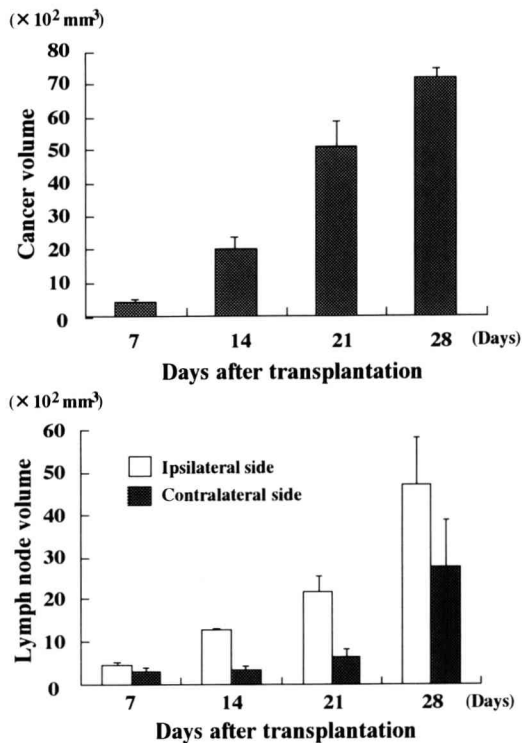


Fig. 2. Change of the tongue cancer volume (top) and deep cervical lymph node volume (bottom).

Data are presented as mean  $\pm$  SD.

胞数を算出し、陽性細胞数の割合を apoptotic index (ApI) とした。また、写真撮影の際、H-E 染色にて壊死部と判断される部位は除外した。

#### (5) 統計処理

ウサギ VX 2 舌癌の体積および深頸リンパ節の体積の有意差と AgNORs 数および ApI の有意差の検定には統計用ソフト StatView-J 4.5<sup>®</sup> (Abacus Concepts) を用いた。なお、2 群間の比較には t 検定、3 群以上の比較には Kruskal-Wallis の検定および分散分析を用いた後、Fisher's PLSD 法を用いた。さらに、これら各々の相関関係は Pearson's correlation coefficient によって検定した。

## 結 果

### 1. ウサギ VX 2 移植舌癌部の肉眼的所見

VX 2 癌移植後 7 日目の舌粘膜上皮にはほと

んど変化を認めないが、舌筋内に直径 5 mm から 8 mm 大の腫瘤を触知した。その後、癌はしだいに増大し、移植後 14 日目には直径 10 mm から 15 mm 大の腫瘤として触知でき、上部あるいは外側部には潰瘍を形成するものが 3 例にみられた。移植後 21 日目には直径 15 mm から 20 mm に増大し、全例で粘膜表面に壊死を伴う潰瘍を認めた。さらに移植後 28 日目には、直径 19 mm から 23 mm に増大し、壊死組織の脱落によって全例に実質欠損を認めた。

### 2. ウサギ VX 2 癌移植後の体積の推移

#### (1) VX 2 舌癌

VX 2 癌移植後、舌癌の体積は 7 日目が  $436.24 \pm 105.59 \text{ mm}^3$ 、14 日目が  $1999.20 \pm 538.87 \text{ mm}^3$ 、21 日目が  $5094.36 \pm 1101.22 \text{ mm}^3$ 、28 日目が  $7196.41 \pm 284.78 \text{ mm}^3$  と有意に増大した (Fig. 2)。とくにその体積は、VX 2 癌移植後 14 日目から 21 日目にかけて急激な増大をした。

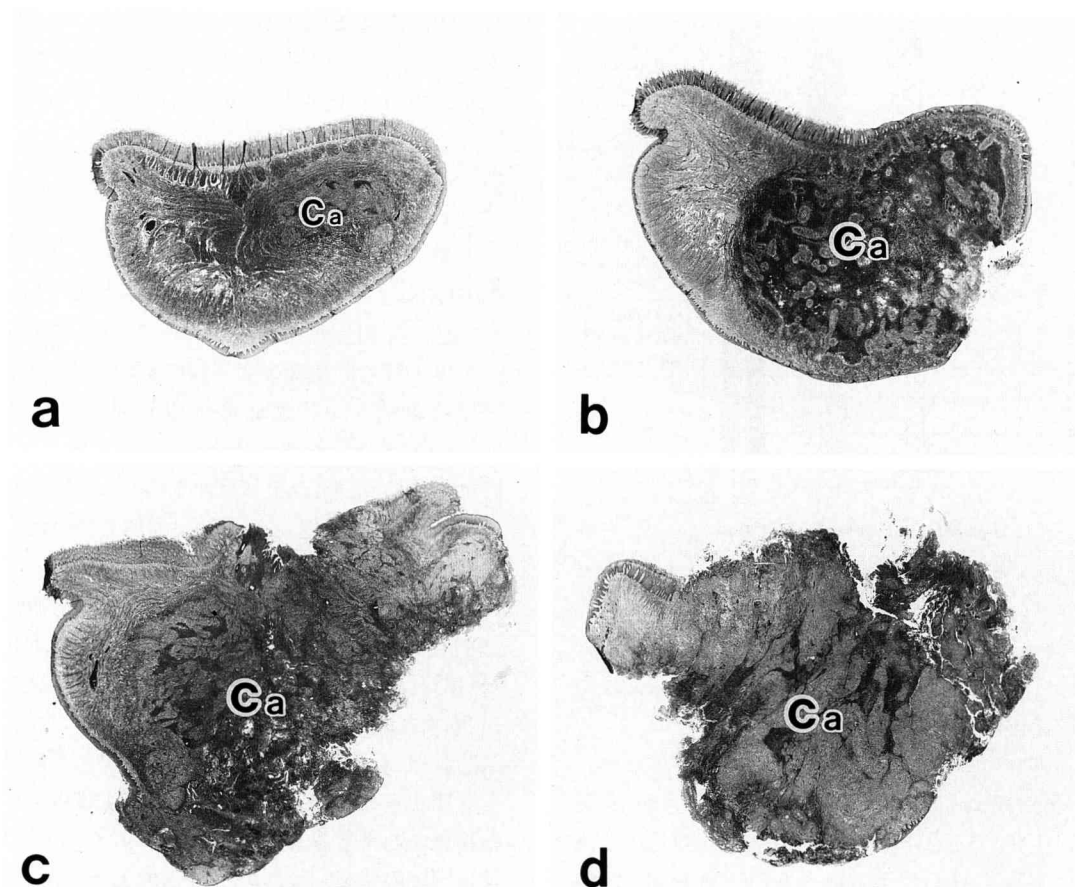
#### (2) 深頸リンパ節

VX 2 癌移植後、同側のリンパ節の体積は、7 日目が  $449.90 \pm 150.52 \text{ mm}^3$ 、14 日目が  $1276.76 \pm 103.33 \text{ mm}^3$ 、21 日目が  $2180.36 \pm 597.86 \text{ mm}^3$ 、28 日目が  $4691.87 \pm 1307.42 \text{ mm}^3$  であった。また、対側のリンパ節は 7 日目が  $286.80 \pm 169.97 \text{ mm}^3$ 、14 日目が  $353.17 \pm 42.63 \text{ mm}^3$ 、21 日目が  $634.60 \pm 204.26 \text{ mm}^3$ 、28 日目が  $2745 \pm 1385.55 \text{ mm}^3$  であった。すなわち両側の深頸リンパ節は経時的に増大し、同側では転移を認めた移植後 14 日目以降と対側では移植後 21 日目以降に急激に増大していた (Fig. 2)。

### 3. ウサギ VX 2 癌の進展度とリンパ節転移

#### (1) VX 2 舌癌

VX 2 癌移植後 7 日目では全例とも同側筋層内に局限した胞巣を形成し、筋線維束間を胞巣状、あるいは索状に浸潤、増殖していた (Stage I)。移植後 14 日目では 5 例中 4 例が強く舌中隔を圧排し (Stage II)、1 例は舌中隔を越え、対側にまで浸潤、増殖していた (Stage III)。また、胞巣中心部には壊死が認められた。移植後 21 日目では全例とも対側に浸潤増殖していた (Stage III)。移植後 28 日目にはさらに上部、下



**Fig. 3.** Low-power view of sections of the tongue specimen (H-E stain).

Tongue cancer showing stage I at 7 days (a), stage II at 14 days (b), stage III at 21 days (c) and stage III at 28 days (d) after cancer transplantation.

Abbreviation : Ca, cancer

部、対側へ癌細胞が浸潤、増殖し (Stage III)、また、胞巣中心部の壊死がより拡大していた (Fig. 3,4)。

#### (2) 深頸リンパ節転移巣

VX2 癌移植後 7 日目では、組織学的には転移を認めなかったが、移植後 14 日目と 21 日目では、全例とも同側の深頸リンパ節に転移を認めた。移植後 21 日目のうちの 4 例では対側の深頸リンパ節にも転移を認めた。移植後 28 日目になると全例に両側の深頸リンパ節に転移を認めた。また、深頸リンパ節における VX2 癌転移の進展度は、移植後 14 日目での同側は Stage 1 が 4 例、Stage 2 が 1 例であった。移植後 21 日目での同側は Stage 2 が 4 例、

Stage 3 が 1 例で、対側では Stage 1 が 2 例、Stage 2 が 2 例であった。移植後 28 日目になると同側は Stage 3 が 5 例、対側は Stage 2 が 2 例、Stage 3 が 3 例と経日的にその Stage が進行していた (Fig. 4,5)。

#### 4. ウサギ VX2 癌胞巣における AgNORs の染色性とその数の推移

AgNORs は核内に茶褐色または黒色の小型の顆粒あるいは内部が均一で大型の顆粒として観察された。また、大型の顆粒の内部には黒色の微細顆粒である dots を認めた (Fig. 6,7)。

##### (1) VX2 舌癌部

###### 1) AgNORs 数の推移

VX2 癌胞巣中心部における癌細胞の

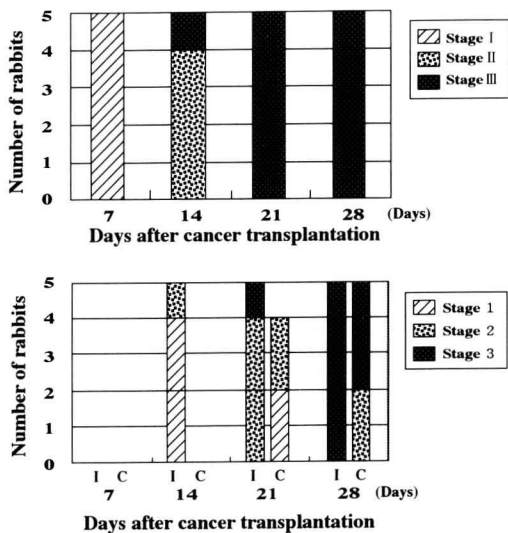


Fig. 4. Staging of the tongue cancer (top) and deep cervical lymph node metastasis (bottom).

Abbreviations : I, ipsilateral deep cervical lymph node; C, contralateral deep cervical lymph node

AgNORs 数は, VX 2 癌移植後 7 日目が  $10.56 \pm 1.16$ , 14 日目が  $9.86 \pm 0.76$ , 21 日目が  $8.78 \pm 1.09$ , 28 日目が  $7.13 \pm 0.73$  と経日的に減少していた。

一方, 癌巣辺縁部 4 ヶ所の AgNORs 数は VX 2 癌移植後の各検索日において, ほぼ同様の値を示し, 部位による顕著な差は認められなかった。また, これら VX 2 癌巣辺縁部の平均 AgNORs 数は, 移植後 7 日目が  $10.03 \pm 0.91$ , 14 日目が  $13.60 \pm 0.47$  と最も多くなり, 21 日目が  $12.59 \pm 0.44$ , 28 日目が  $11.92 \pm 0.50$  と若干の減少傾向を示していた。しかし, VX 2 癌移植後 14 日目, 21 日目および 28 日目の AgNORs 数は, 移植後 7 日目に比べて有意に多かった。なお, 癌巣辺縁部の AgNORs 数は移植後 7 日目では癌巣中心部とはほぼ同様の AgNORs 数であったが, 移植 14 日目以降は常に癌巣中心部より有意に増加していた (Fig. 6, Table 2.)。

2) VX 2 舌癌の進展度と AgNORs 数の推移  
VX 2 舌癌の進展度別にみた癌巣辺縁部の

AgNORs 数は, Stage I が  $10.03 \pm 0.91$ , Stage II が  $13.65 \pm 0.53$ , Stage III が  $12.36 \pm 0.64$  であり, Stage I に比較して Stage II および Stage III は有意に増加していた (Table 3.)。

(2) VX 2 癌の深頸リンパ節転移巣

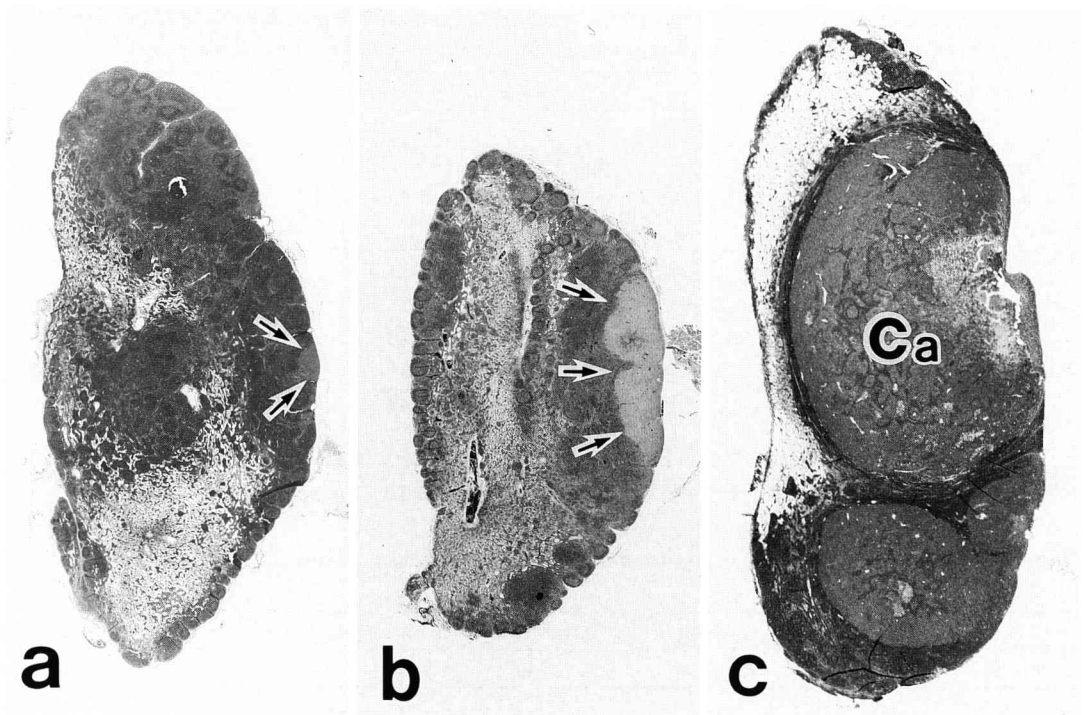
1) AgNORs 数の推移

同側の深頸リンパ節転移巣中心部の AgNORs 数は VX 2 癌移植後 14 日目が  $14.06 \pm 1.49$ , 21 日目が  $9.40 \pm 1.19$ , 28 日目が  $9.02 \pm 1.09$  と経日的に減少する傾向を示していた。同側の深頸リンパ節転移巣辺縁部における AgNORs 数は, 転移が認められた移植後 14 日目が  $15.18 \pm 0.84$ , 21 日目が  $15.80 \pm 0.70$ , 28 日目が  $17.30 \pm 0.21$  と経日的に増加していた。また, 同側の深頸リンパ節転移巣辺縁部の表層と深層における AgNORs 数をみると, 移植後 14 日目では表層と深層でほぼ同様の値を示したが, 21 日目では表層が  $16.64 \pm 0.62$ , 深層が  $14.96 \pm 0.99$ , 28 日目では表層が  $18.14 \pm 0.30$ , 深層が  $16.47 \pm 0.51$  といずれの検索日においても深層が有意に減少した。移植後 14 日目では転移巣中心部と転移巣辺縁部の AgNORs 数はほぼ同様の値を示したが, 移植後 21 日目と 28 日目では転移巣中心部の AgNORs 数は, 転移巣辺縁部のそれと比較して有意に減少した。また, 同側の深頸リンパ節転移巣における癌巣辺縁部の AgNORs 数は舌癌巣辺縁部の AgNORs 数と比較してすべての検索日でも有意に増加した (Fig. 7, Table 4.)。

対側の深頸リンパ節転移巣における AgNORs 数は, 同側の深頸リンパ節のそれと同様に転移巣中心部では経日的に減少し, 転移巣辺縁部では増加の傾向を示した。

2) VX 2 転移癌の進展度と AgNORs 数の推移

VX 2 癌転移巣辺縁部の AgNORs 数を進展度別にみると, Stage 1 が  $14.78 \pm 0.60$ , Stage 2 が  $15.67 \pm 0.58$ , Stage 3 が  $16.61 \pm 0.90$  であり, VX 2 癌の進展に伴って有意に増加していた (Table 3.)。また, 同側および対側の深頸リンパ節転移巣間には AgNORs 数に明らかな



**Fig. 5.** Low-power view of sections of the deep cervical lymph node specimen (H-E stain). Lymph node metastasis showed by arrows of stage 1 (a) and stage 2 (b), and by Ca of stage 3 (c). Abbreviation : Ca, cancer

**Table 2.** Change of the number of argyrophilic nucleolar organizer regions in the tongue cancer.

| Observed portion/<br>direction | Days after cancer transplantation |            |            |            |
|--------------------------------|-----------------------------------|------------|------------|------------|
|                                | 7                                 | 14         | 21         | 28         |
| Central                        | 10.56±1.16                        | 9.86±0.76  | 8.78±1.09  | 7.13±0.73  |
| Peripheral                     | 10.03±0.91                        | 13.60±0.47 | 12.59±0.44 | 11.92±0.50 |
| Superior                       | 10.16±0.94                        | 13.32±0.97 | 12.70±0.36 | 11.94±0.47 |
| Lateral                        | 10.30±1.09                        | 13.86±0.60 | 12.63±0.81 | 12.04±0.37 |
| Inferior                       | 9.74±0.77                         | 13.63±0.40 | 12.44±0.41 | 11.76±0.81 |
| Medial                         | 9.93±0.98                         | 13.60±0.20 | 12.56±0.31 | 11.93±0.55 |

Data are presented as mean ±SD \*p<0.05, \*\*p<0.01 : Significant difference

差違を認めなかった。

5. ウサギ VX2 癌の TUNEL 陽性細胞と ApI の推移

TUNEL 法によって標識された陽性細胞の核

は、円形または不整形のものが多く、アポトーシスに特徴的な濃縮ないしは濃縮傾向を示すものや、一見通常の形態を示すものなどが認められた。また、一部には、核縁が濃く中心部が淡

**Table 3.** Change of the number of argyrophilic nucleolar organizer regions according to the each stage in peripheral portion of the tongue cancer and deep cervical lymph node metastasis.

| Observed region                     | Stage of the advanced cancer |                  |                   |
|-------------------------------------|------------------------------|------------------|-------------------|
|                                     | Stage I                      | Stage II         | Stage III         |
| Tongue                              | 10.03±0.91 (n=5)             | 13.65±0.53 (n=4) | 12.36±0.64 (n=11) |
| Bilateral deep cervical lymph nodes | 14.78±0.60 (n=6)             | 15.67±0.58 (n=9) | 16.61±0.90 (n=9)  |
| Ipsilateral                         | 14.93±0.71 (n=4)             | 15.84±0.72 (n=5) | 17.09±0.55 (n=6)  |
| Contralateral                       | 14.81±0.67 (n=2)             | 15.29±0.53 (n=4) | 15.66±0.61 (n=3)  |

Data are presented as mean ±SD \*p<0.01 : Significant difference

**Table 4.** Change of the number of argyrophilic nucleolar organizer regions in the deep cervical lymph node metastasis.

| Observed portion | Days after cancer transplantation |            |            |            |
|------------------|-----------------------------------|------------|------------|------------|
|                  | 7                                 | 14         | 21         | 28         |
| Ipsilateral      |                                   |            |            |            |
| Central          | —                                 | 14.06±1.49 | 9.40±1.19  | 9.02±1.09  |
| Peripheral       | —                                 | 15.18±0.84 | 15.80±0.70 | 17.30±0.21 |
| Superficial      | —                                 | 15.24±0.76 | 16.64±0.62 | 18.14±0.30 |
| Deep             | —                                 | 15.11±0.96 | 14.96±0.99 | 16.47±0.51 |
| Contralateral    |                                   |            |            |            |
| Central          | —                                 | —          | 9.00±2.00  | 8.77±0.62  |
| Peripheral       | —                                 | —          | 14.90±0.49 | 15.64±0.50 |
| Superficial      | —                                 | —          | 15.52±0.48 | 16.18±0.29 |
| Deep             | —                                 | —          | 14.27±0.89 | 15.64±0.50 |

Data are presented as mean ±SD \*p<0.05, \*\*p<0.01 : Significant difference

い環状に染色されるものも散見された。これらの陽性細胞は癌巣内に散在性、無秩序に分布しており、特に局在していることはなかった (Fig. 8)。

#### (1) VX 2 舌癌部

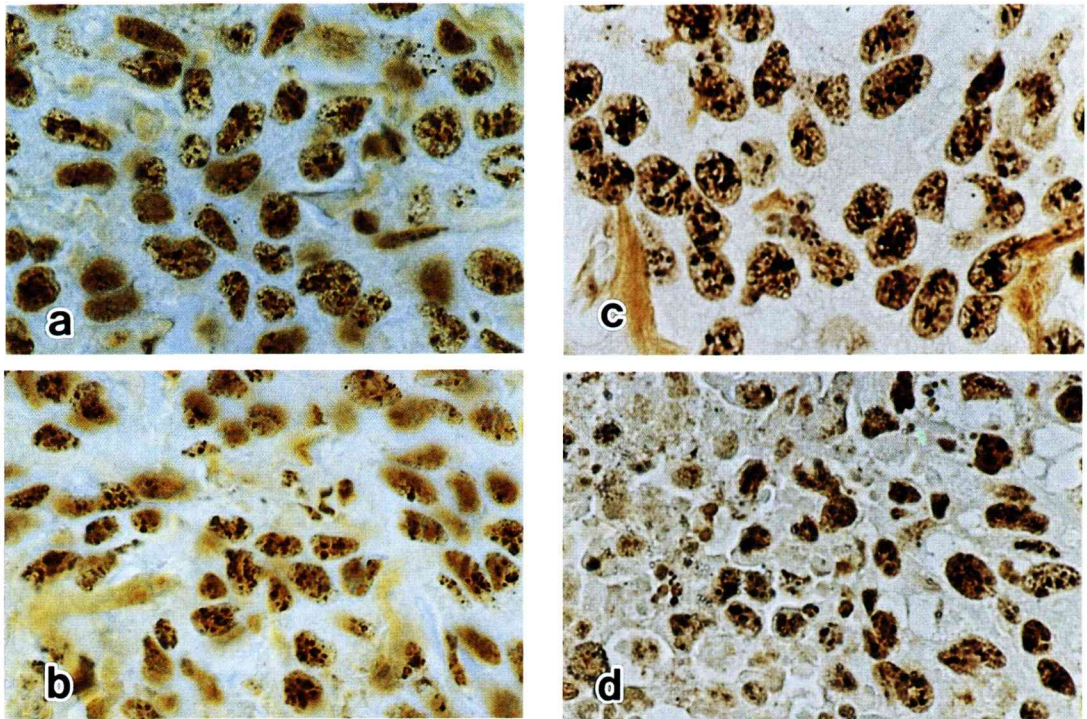
VX 2 舌癌の ApI は移植後 7 日目が 0.62 ± 0.08, 14 日目が 1.65 ± 0.21, 21 日目が 2.29 ±

0.58, 28 日目が 2.70 ± 0.31 と経日的に高くなる傾向を示した (Fig. 9, Table 5.)。

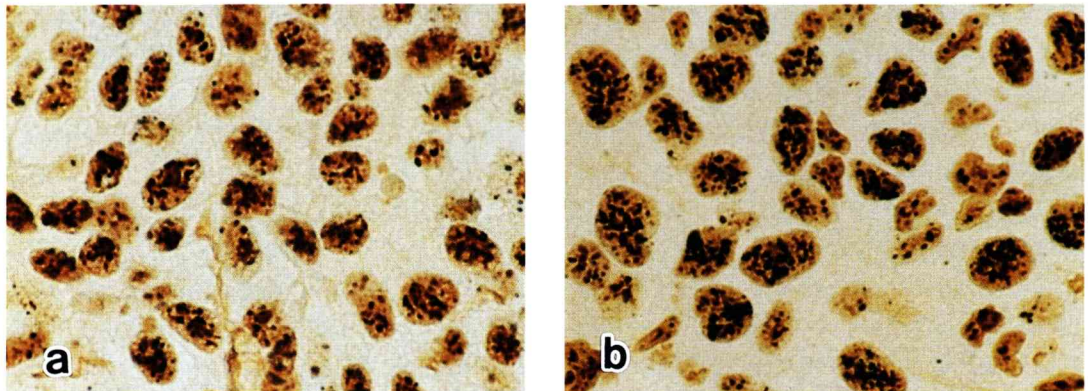
癌の進展度別にみた ApI は Stage I が 0.62 ± 0.08, Stage II が 1.62 ± 0.23, Stage III が 2.43 ± 0.51 と Stage の進展に伴い有意に高くなっていった (Table 6.)。

#### (2) VX 2 癌の深頸リンパ節転移巣





**Fig. 6.** Histological feature disclosed by argyrophilic nucleolar organizer regions staining of the tongue cancer in peripheral portion (a) and central portion (b) at 7 days, and in peripheral portion (c) and central portion (d) at 14 days, after cancer transplantation.

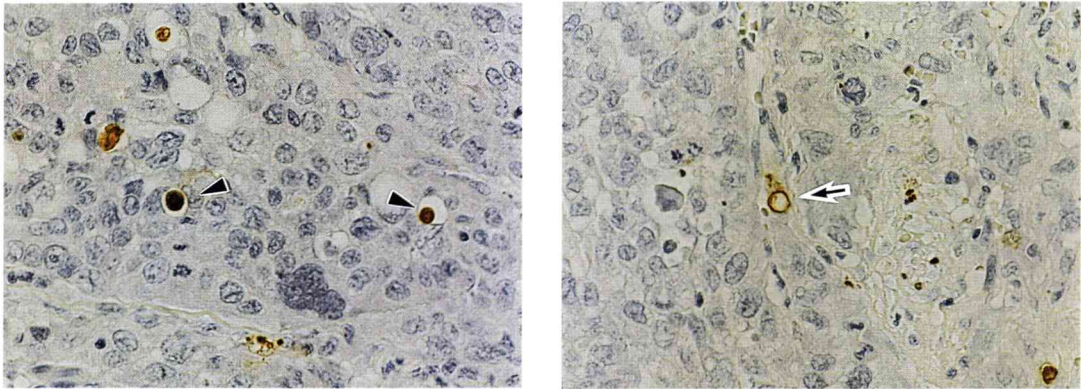


**Fig. 7.** Histological feature disclosed by argyrophilic nucleolar organizer regions staining in the peripheral portion of the tongue cancer (a) and deep cervical lymph node metastasis (b) at 28 days after cancer transplantation.

同側の深頸リンパ節転移巣の ApI は、移植後 14 日目が  $1.96 \pm 0.21$ , 21 日目が  $2.33 \pm 0.33$ , 28 日目が  $3.10 \pm 0.47$  と経日的に高くなっていった。また、舌癌部の ApI と比較して各

検索日におけるリンパ節転移巣の ApI は高値を示した。対側の深頸リンパ節転移巣の ApI の経日的変化は、同側の ApI とほぼ同様の増加傾向を示した (Table 5.)。





**Fig. 8.** Various forms of apoptotic nuclei detected with terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick end labeling (TUNEL) method. Positive cells presenting brown stain and showing concentration (arrow heads) or ring form (arrow) of some cell nuclei.

転移巣の進展度別にみた ApI は、Stage 1 が  $1.93 \pm 0.13$ 、Stage 2 が  $2.20 \pm 0.15$ 、Stage 3 が  $3.32 \pm 0.98$  と癌の進展に伴って有意に高くなっていった。また、同側および対側の深頸リンパ節転移巣における ApI には明らかな差違を認めなかった (Table 6.)。

#### 6. ウサギ VX2 癌の AgNORs と ApI との関連

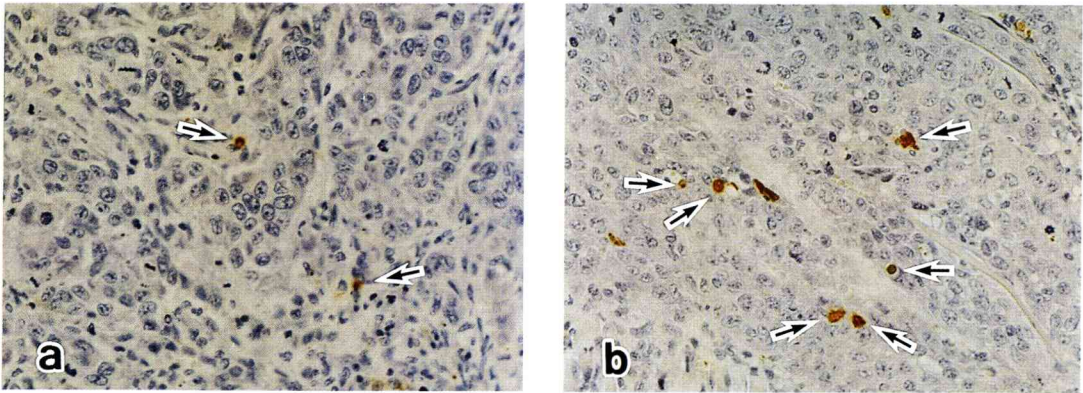
VX2 舌癌の体積とその癌巣辺縁部の AgNORs 数の経日的変化 (相関係数  $R = 0.271$ ) には明らかな相関は認められなかった。しかし、舌癌の体積と ApI の経日的変化 (相関係数  $R = 0.916$ )、AgNORs と ApI の経日的変化 (相関係数  $R = 0.455$ ) には相関がみられた。

同側の深頸リンパ節の体積とリンパ節転移巣辺縁部における AgNORs 数の経日的変化 (相関係数  $R = 0.755$ )、リンパ節体積とリンパ節転移巣辺縁部における ApI の経日的変化 (相関係数  $R = 0.711$ ) には強い相関がみられた。また、リンパ節転移巣辺縁部の AgNORs 数と ApI の経日的変化 (相関係数  $R = 0.734$ ) に強い相関を認めた。なお、対側の深頸リンパ節においては明らかな相関が認められなかった。

## 考 察

### 1. AgNORs 数と癌細胞の増殖活性

これまで細胞の増殖動態の評価には 5-bromodeoxyuridine<sup>3)</sup>、PCNA<sup>13-15)</sup> および Ki-67 抗原<sup>14,16,17)</sup>、DNA フローサイトメトリーによる S 期細胞数<sup>5)</sup>などの方法が用いられてきた。しかし、これらの方法には検体の取り扱いが煩雑であったり、高価な抗体や機器を用いるなど、その応用には制約があった。近年、これらの方法による結果と AgNORs 数がよく相関するところから AgNORs が腫瘍細胞増殖能を示す指標として用いられている<sup>8,12-14)</sup>。AgNORs は、ribosomal RNA を転写する DNA の loop で、この DNA が RNA polymerase I により ribosomal RNA に転写される<sup>9)</sup>。このように活性化された NORs は、蛋白合成能をもったリボゾーム形成に関与している。関連蛋白として、RNA polymerase I や C 23 protein、B 23 protein など<sup>10)</sup>があり、これらの蛋白の銀親和性を利用して、Howell と Black<sup>11)</sup> は NORs に対する銀染色法を改良し、パラフィン切片においても容易に施行できる one-step 法を報告した。それ以来、AgNORs は種々の臓器組織で腫瘍細胞の増殖活性の面から検討され<sup>5,6,8,12-14)</sup>、その良性、悪性の鑑別、悪性度の指標に有用であることが報告されている。しかし、AgNORs を算出する際にその対象をどのような構造物にするかについては種々の見解が



**Fig. 9.** Histological feature detected with terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick end labeling (TUNEL) method. Positive cells (arrows) of the tongue cancer at 7 days (a) and at 28 days (b) after cancer transplantation.

あり、一致していないが、核小体内部および外部の small black dots をすべて計測する方が腫瘍の生物学的性状をよりの確に示すものと考えられている<sup>6,7)</sup>。そこで本研究では核内のすべての微細顆粒の dot を算出した。

悪性腫瘍の増殖、進展ないしはその予後などを判断する上で組織学的部位別の増殖動態を知ることが重要である。著者は VX 2 癌をウサギ舌に移植し、その進展に伴う部位別の癌細胞の増殖動態とこれに関与するアポトーシスの発現を組織学的に追究した。舌に移植した VX 2 癌は経日的に進展し、移植後 14 日目から 21 日目にかけて急激に増大した。これまで癌細胞の増殖動態をその部位別に検索した報告は少ない。池田<sup>9)</sup>はヒト口腔扁平上皮癌の増殖動態を AgNORs 数から検討し、腫瘍胞巣辺縁部の核内 AgNORs 数は胞巣中心部のそれより有意に多く、胞巣辺縁部では腫瘍細胞の持つ増殖活性を最もよく示していると考え、症例ごとの増殖活性の評価はこの部位で測定するのが妥当であると報告している。

著者の検索では VX 2 舌癌における AgNORs 数は癌胞巣中心部よりも辺縁部で有意に多くみられ、癌細胞の増殖は胞巣中心部より辺縁部で活発であることを示唆し、またこれは癌胞巣周囲間質への旺盛な浸潤を示唆する所見と考え

た。AgNORs 数はヒトの口腔扁平上皮癌の増殖活性とよく相関するといわれる<sup>8,12,14)</sup>。なお、舌癌胞巣辺縁部の AgNORs 数は VX 2 癌移植後 14 日目に最多となり、以後、若干減少する傾向をみせた。このような AgNORs 数の推移は VX 2 舌癌の移植早期には増殖活性がさかんで、移植後 14 日目以降は一定の増殖活性を有しながら増殖しているものと考えた。

悪性腫瘍においてはリンパ節転移が高率に発現する。リンパ節転移を制御し、あるいは原発巣の組織学的所見から事前にリンパ節への転移を予測できれば適切な対応がとられその予後の改善が期待される。早津ら<sup>12)</sup>は AgNORs 数の算出は悪性度の評価の一助となり、予後を判断する上での要因になると述べている。著者の研究では VX 2 癌移植後 14 日目には同側、21 日目には対側の深頸リンパ節への転移をみた。同側のリンパ節転移をみた移植後 14 日目の舌癌胞巣辺縁部の AgNORs 数は実験経過中で最も多かった。この時期に深頸リンパ節への転移がみられたことは AgNORs 数の算出によってその数が増減することから癌細胞の増殖活性を知り、リンパ節転移の可能性を推察する一助になるものと思われた。

持山<sup>15)</sup>は VX 2 癌をウサギ口底部に移植し領域リンパ節転移した腫瘍について stage が進展



**Table 5.** Change of the apoptotic index in the tongue cancer and deep cervical lymph node metastasis.

| Observed region          | Days after cancer transplantation |           |           |           |
|--------------------------|-----------------------------------|-----------|-----------|-----------|
|                          | 7                                 | 14        | 21        | 28        |
| Tongue                   | 0.62±0.08                         | 1.65±0.21 | 2.29±0.58 | 2.70±0.31 |
| Deep cervical lymph node |                                   |           |           |           |
| Ipsilateral              | —                                 | 1.96±0.21 | 2.33±0.33 | 3.10±0.47 |
| Contralateral            | —                                 | —         | 2.11±0.11 | 3.17±1.51 |

Data are presented as mean±SD \*p<0.05, \*\*p<0.01 : Significant difference

するにしたがってPCNA陽性率が有意に高くなる」と述べている。また、Kakejiら<sup>16)</sup>はヒト胃癌のリンパ節転移巣をKi-67抗原とAgNORs数について検討し、その結果、両者は相関を示し、リンパ節転移巣の癌細胞の増殖活性は原発巣より高かったと述べている。本研究においてもVX2舌癌部と深頸リンパ節転移巣における癌細胞の増殖動態をAgNORs数の算出によって経日的に比較観察したところ、Kakejiら<sup>16)</sup>と同様にリンパ節転移巣辺縁部のAgNORs数は舌癌部より多い傾向がみられ、より癌細胞の増殖活性が高い癌細胞が転移したものと推測された。

## 2. アポトーシスの発現と癌細胞

アポトーシスの概念が提唱されてから日は浅い。アポトーシスは遺伝子に支配された細胞の死であり、個体発生における器官形成、生体の正常組織の分裂増殖などに重要な役割をもち、ネクロシスとは本質的に異なる<sup>18)</sup>。近年、癌や自己免疫疾患などの発症にアポトーシスが関わっていることが指摘されている<sup>19, 20, 24)</sup>。また、アポトーシスは癌細胞が生体にとって危険な細胞であるとして排除する防衛機構として働くともいわれている<sup>24)</sup>。本研究ではアポトーシス細胞の周囲には炎症性細胞浸潤を認めなかったが、このような所見はKerrら<sup>18)</sup>の見解と一致していた。

これまでのところ口腔癌の増殖とアポトーシスの発現についての報告は少ない。ヒトの口腔

癌ではアポトーシス細胞がび慢性に散在している症例に転移が多くみられるとの報告があり<sup>25)</sup>、ヒトの食道癌におけるアポトーシスは高分化型では角化巣を中心に発現し、低分化型では癌巣内に無秩序に認められている<sup>26)</sup>。著者の研究では舌癌巣およびリンパ節転移巣に検出されたアポトーシス細胞は癌巣の一部に局在することなく、癌巣全体に無秩序に散在していた。このようなアポトーシスの局在性は上記の報告のごとくVX2癌が易転移性であり、低分化型扁平上皮癌の細胞特性を反映しているものと考えた。

ヒトの乳癌の研究ではApIの高い症例ほど病期・リンパ節転移が進行して予後不良の傾向が認められている<sup>28)</sup>。本研究のリンパ節転移巣ではアポトーシスが転移の早期から発現し、ApIは経日的に高くなっていった。その上、各検索日においてリンパ節転移巣のApIは舌癌部のそれより高く、転移巣の進展によってApIは有意に上昇する傾向があった。このような様相は舌癌部に比較して、リンパ節転移巣では癌細胞の増殖の回転が速い結果を反映していると考えられる。その結果、癌細胞増殖活性の高い部位では細胞分裂回転が速まり、その過程の中で脱落していくアポトーシス細胞も増加するものと推察される。すなわち組織切片上で観察したアポトーシスは単に細胞死だけではなく、腫瘍細胞の増殖を反映しているものと思われた。

現在では、関連遺伝子の変異によるアポトー

**Table 6.** Change of the apoptotic index according to each stage of the tongue cancer and deep cervical lymph node metastasis.

| Observed region                     | Stage of the advanced cancer |                 |                  |
|-------------------------------------|------------------------------|-----------------|------------------|
|                                     | Stage I                      | Stage II        | Stage III        |
| Tongue                              | 0.62±0.08 (n=5)              | 1.62±0.23 (n=4) | 2.43±0.51 (n=11) |
| Bilateral deep cervical lymph nodes | 1.93±0.13 (n=6)              | 2.20±0.15 (n=9) | 3.32±0.98 (n=9)  |
| Ipsilateral                         | 1.88±0.12 (n=4)              | 2.22±0.18 (n=5) | 3.05±0.43 (n=6)  |
| Contralateral                       | 2.03±0.07 (n=2)              | 2.15±0.07 (n=4) | 3.86±1.66 (n=3)  |

Data are presented as mean ±SD \*p<0.01 : Significant difference

シスの発現異常が発癌，さらにその進展のいずれにも関連していることが明らかになってきた。しかし，これまで腫瘍細胞の増殖とアポトーシスの発現についての研究は意外に少ない<sup>26-29)</sup>。ヒトの食道扁平上皮癌における細胞増殖とアポトーシスを評価することにより癌の増殖速度，すなわち悪性度を推察することが可能であるとの報告がある<sup>26)</sup>。Leonciniら<sup>27)</sup>はヒトの non-Hodgkin リンパ腫では腫瘍細胞の増殖とアポトーシスの発現は相関していると報告している。今回の著者の研究結果でも AgNORs 数と ApI には相関性がみられ，とくに舌癌部よりもリンパ節転移巣でこの関連性が強かった。ヒトの乳癌の発生およびその進展とアポトーシスの関連が示唆され<sup>28)</sup>，ヒトの食道扁平上皮癌の増殖には癌細胞の増殖能のみならずアポトーシスも重要な要素として関与しているとの報告がある<sup>26)</sup>。さらに，良性腫瘍よりも悪性腫瘍にアポトーシスの発現が強いという傾向は種々の腫瘍で観察されている<sup>18,29)</sup>。堀ら<sup>28)</sup>はヒトの乳癌の研究では腫瘍が進行すればするほど，その腫瘍細胞を死に至らしめようとする力も強くなり，アポトーシスの発現が目立ってくると推察している。

本研究においても，VX 2 舌癌部や深頸リンパ節転移巣では癌細胞の増殖能の増大に伴って AgNORs 数は増加し，ApI も高くなったこと

から，アポトーシスが VX 2 舌癌と転移巣の癌細胞の増殖あるいは癌の進展と関連している可能性が示唆された。しかしながら，アポトーシスが癌細胞の増殖の結果生じた現象なのか，あるいはまた癌細胞に対する種々な反応因子がもたらした結果なのかは現時点では不明である。近年，アポトーシスの誘導や抑制が遺伝子により制御されることも解明されてきた<sup>30)</sup>。今後はアポトーシスの誘導および抑制遺伝子発現との関連性からも詳細に研究されることが望まれる。

## 結 論

VX 2 癌をウサギ舌に移植し，舌および深頸リンパ節における癌細胞の増殖動態とアポトーシスの関与を検索し，以下の結果を得た。

1. ウサギ舌に移植した VX 2 癌は，経日的に増大し，移植後 14 日目から 21 日目にかけては急激な増大を示した。
2. 深頸リンパ節転移は移植側では VX 2 癌移植後 14 日目，非移植側では移植後 21 日目から認められ，この時期は移植した舌癌が急激に増大した時期であった。
3. 舌癌巣および深頸リンパ節転移巣辺縁部の AgNORs 数は癌巣中心部より多く，辺縁部において癌細胞の旺盛な増殖活性が示唆された。

4. 舌癌胞巣辺縁部の AgNORs 数は移植側の深頸リンパ節転移が認められた VX 2 癌移植後 14 日目に最大となり、その後は漸減した。
5. 深頸リンパ節転移巣における胞巣辺縁部の AgNORs 数は舌癌胞巣のそれよりも多く、また、転移巣の進展に伴いさらに増加していた。
6. 舌癌胞巣におけるアポトーシス細胞は、VX 2 癌移植後 7 日目から発現し、ApI は漸増する傾向がみられた。
7. 深頸リンパ節転移巣の ApI は舌癌胞巣のそれよりもやや高く、また、転移巣の進展に伴い漸増する傾向がみられた。
8. AgNORs 数と ApI の経日的変化は VX 2 癌移植側の深頸リンパ節転移巣辺縁部 ( $R = 0.734$ ) および舌癌の胞巣辺縁部 ( $R = 0.455$ ) において相関がみられた。
9. 以上の結果から、舌癌胞巣と深頸リンパ節転移巣の進展におけるアポトーシス出現の相違は各々の部位における細胞増殖回転の違いを反映していると考えられた。

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、ご指導とご助言をいただきました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、ご助言をいただきました、口腔外科学第一講座大屋高德助教授、横田光正講師、口腔病理学講座教室員諸兄に深く感謝いたします。さらにご協力いただきました口腔外科学第一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 13 回国際口腔顎顔面外科学会および第 42 回日本口腔外科学会総会 (1997 年 10 月、京都市) 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 8 年度大学院重点特別経費の補助を受けて行った。

## 文 献

- 1) 大谷隆俊：口腔癌の臨床病理学的研究，口病誌，21：93-102, 1954.
- 2) Harrold, C. C. : Management of cancer of the floor of the mouth. *Am. J. Surg.* 122 : 487-493, 1971.
- 3) Tanaka, T., Takeuchi, T., Nishikawa, A., Takami, T., and Mori, H. : Nucleolar organizer regions in hepatocarcinogenesis induced by N-2-fluorenylacetamide in rats : Comparison with bromodeoxyuridine immunohistochemistry. *Jpn. J. Cancer Res.* 80 : 1047-1051, 1989.
- 4) Derenzini, M., Pession, A., Farabegoli, F., Trere, D., Badiali, M., and Dehan, P. : Relationship between interphasic nucleolar organizer regions and growth rate in two neuroblastoma cell lines, *Am. J. Pathol.* 134 : 925-932, 1989.
- 5) Crocker, J., Macartney, J. C., and Smith, P. J. : Correlation between DNA flow cytometric and nucleolar organizer region data in non-Hodgkin's lymphomas. *J. Pathol.* 154 : 151-156, 1988.
- 6) Orrell, J. M., Evans, A. T., and Grant, A. : A critical evaluation of AgNOR counting in benign naevi and malignant melanoma. *J. Pathol.* 163 : 239-244, 1991.
- 7) 武井則之, 安東基善, 長谷川博雅, 川上敏行, 枝重夫：核小体形成体のための鍍銀染色法の検討，松本歯学，20：172-179, 1994.
- 8) 池田 敦：口腔扁平上皮癌の術前治療効果に関する研究 - Ag-NORs と組織学的治療効果との関係 - ，神奈川歯学，28：66-78, 1993.
- 9) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, D. W. : Molecular biology of the cell. Garland Publishing, Inc., New York, pp. 424-426, 1983.
- 10) Hernandez-Verdun, D. : The nucleolar organizer regions. *Biol. Cell* 49 : 191-202, 1983.
- 11) Howell, W. M., and Black, D. A. : Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer : a 1-step method. *Experientia* 36 : 1014-1015, 1980.
- 12) 早津良和, 松村耕治, 辻 龍雄, 井上 敬, 森本宏志, 篠崎文彦：口腔扁平上皮癌および良性疾患における核小体形成体 (Ag-NORs) の発現に関する検討，日口外誌，38：891-895, 1992.
- 13) 丸森健司, 河村正敏, 高村光一, 小松信男, 保田尚邦, 津嶋秀史, 佐藤 徹, 横川京児, 角田明良, 渋沢三喜, 新井一成, 草野満夫：大腸癌における proliferating cell nuclear antigen および argyrophilic nucleolar organizer regions 染色法を用いた細胞増殖能の検討，日消外会誌，28：813-818, 1995.
- 14) 村井正彦：口腔異形成病変における Ag-NORs

- 染色, PCNA 及び MIB-1 免疫組織化学染色を用いた細胞増殖能の研究, 日大口腔科学, 20: 169-182, 1994.
- 15) 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.
- 16) Kakeji, Y., Korenaga, D., Tsujitani, S., Maehara, Y., and Sugimachi, K.: Predictive value of Ki-67 and argyrophilic nucleolar organizer region staining for lymph node metastasis in gastric cancer. *Cancer Res.* 51: 3503-3506, 1991.
- 17) 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, 日口外誌, 41: 179-190, 1995.
- 18) Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., and Currie, A. R.: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239-257, 1972.
- 19) Carson, D. A., and Ribeiro, J. M.: Apoptosis and disease. *Lancet* 341: 1251-1254, 1993.
- 20) Arends, M. J., and Wyllie, A. H.: Apoptosis: Mechanisms and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 32: 223-254, 1991.
- 21) Gavrieli, Y., Sherman, Y., and Ben-Sasson, S. A.: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119: 493-501, 1992.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) 大西芳秋, 木崎治俊: アポトーシスと疾患, *Hum. Cell*, 7: 27-31, 1994.
- 25) 谷口泰子, 小田島哲世, 田中信幸, 米倉宣幸, 佐藤友昭, 仲盛健治, 小浜源郁: 口腔扁平上皮癌におけるアポトーシス細胞の発現様式と臨床病理学的所見 (抄), 日癌会総会記事, 55: S301, 1996.
- 26) 小出直彦: 食道癌の細胞増殖と細胞死に関する組織化学的研究, 信州医誌, 42: 379-388, 1994.
- 27) Leoncini, L., Vecchio, M. T., Megha, T., Barbini, P., Galieni, P., Pileri, S., Sabattini, E., Ggerlinzoni, F., Tosi, P., Kraft, R., and Cottier, H.: Correlations between apoptotic and proliferative indices in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Am. J. Pathol.* 142: 755-763, 1993.
- 28) 堀 眞佐男, 長谷川 博, 小泉澄彦, 小野久之, 中山秀次: 乳癌におけるアポトーシス関連 DNA 断片化の検出, 癌の臨床, 42: 717-722, 1996.
- 29) 奥山修兒, 横田欽一, 結城正光: 胃上皮性腫瘍における細胞増殖と細胞死 (アポトーシス) - 内視鏡的切除組織からの解析 -, 日消誌, 92: 130-139, 1995.
- 30) 橋本嘉幸: アポトーシスの概説 - そのがんとの関係 -, 蛋白質 核酸 酵素, 38: 102-108, 1993.