

## 移植 VX2 舌癌の血管構築に関する 3 次元解析

武田 信洋

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解剖学第一講座

(指導：野坂洋一郎 教授)

(受付：1997 年 10 月 15 日)

(受理：1997 年 11 月 17 日)

**Abstract** : The aim of the present study was to clarify the morphological changes and location of the preexisting and neovasculatures, associated with the growth of tumor, by three-dimensional reconstruction of the distribution of arteries changing with the lapse of days after transplantation of the VX2 cancer into the rabbit tongue.

Serial sections of the specimens injected with India ink were prepared 3, 7 and 14 days after transplant. The sections were observed with a light microscopy and photographed. The micrographs were inputted into a computer as image data. Tumor vessels were then reconstructed three-dimensionally using image analysis software VoxelView. The morphology and number of furcations of tumor vessels were examined. The diameter of these vessels were also measured.

In the specimens after 3 days, tumor growth inside the vertical muscle of the tongue, dilatation and tortuousness of the preexisting capillaries adjacent to the periphery of the tumor were observed. In the specimens after 7 days, cancer nests formed by the tumor and capillaries invading the stroma were observed. These capillaries took a basket-mesh-like running course different from the capillary network in stroma surrounding the tumor, which clearly indicated that they were neovasculatures. In the specimens after 14 days, dilatations of the dorsal lingual branches and precapillary arterioles, the reduced number of furcations and precapillary arterioles inside the tumor nest were observed, accompanied by the neovasculatures. In addition, dilatation and tortuousness of the preexisting capillaries observed at 3 and 7 days after tumor transplantation were identified in the surrounding tumor stroma in association with the tumor growth.

It is suggested that the changes of tumor vessels induced by transplanted VX2 cancer into the tongue will pass through three phases : dilatation, tortuousness of the preexisting vessels and angiogenesis in order.

**Key word** : tumor vessel, three-dimensional analysis, transplanted VX2 tongue cancer, rabbit

---

Three-dimensional analysis of tumor vessels in transplanted VX2 tongue cancer.

Nobuhiro TAKEDA

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

(First Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, 020 Japan)

## 緒 言

腫瘍の増大は栄養供給源となる腫瘍血管に大きく影響を受ける。実験的移植癌の場合は癌細胞移植部における癌細胞生着時の周囲血管と癌細胞増殖に伴う新生血管および血管分布様式が重要な鍵となる。また、これら腫瘍血管の血流動態や血管構築を解析することは、腫瘍の増殖や転移の予測および治療に関して重要な情報を提供する<sup>1-9)</sup>。

一方、癌細胞は種々の血管新生因子または誘導因子を放出し、新生血管の形成に影響を与えることが報告されている<sup>10-18)</sup>。しかしこれらの因子が癌細胞生着後の増殖に際し、周囲の既存の血管のどの部位に強く影響を及ぼすのか、また、その後の血管新生が既存の血管のどの部位に由来するのかは未だ不明である。これらの問題点を解決するには癌細胞生着時から増殖に至る血管構築の動態を3次元的に観察する必要がある。現在までのところ、実質臓器の血管構築を立体的に観察するためには、墨汁注入による透明標本や走査型電子顕微鏡による血管鑄型法が用いられてきたが、これらの方法にはそれぞれ一長一短がある。腫瘍血管構築の検索には、ゴールドデンハムスターのcheek pouch method<sup>19)</sup>、背部皮下法<sup>20)</sup>、鶏受精卵の漿尿膜法<sup>21)</sup>、ウサギ角膜法<sup>22)</sup>およびear chamber法<sup>23)</sup>などを用いた光学顕微鏡による観察が行われてきた。しかしこれらの方法では血管の存在しないところに伸長してくる血管を観察しているだけで既存の血管との関連性を追究することができない。また、これらの方法はすべて2次元観察であり、生体における3次元的な血管構築を観察しているとは言えない。

近年、コンピューターを用いて複数の2次元画像を重ね合わせる3次元再構築法が多くの分野で報告されている<sup>24-27)</sup>。この方法は血管鑄型法の欠点である深部血管構築の3次元観察を容易にし、深部の血管と周囲組織の関係を観察することが可能である。さらに本法の特徴は、再構築像の回転、拡大、縮小、切断、透過など

を自由自在にコントロールすることができる。したがって観察すべき血管のみを抽出し、その走行をより詳しく追究することができる利点がある。

本研究では移植 VX 2 舌癌における動脈側の血管分布の状態を経日的、3次元的にコンピューター画像解析装置を用いて再構築し、既存の血管と新生血管の部位と形態変化を観察した。

## 材料および方法

### 1. 実験材料

#### (1) 実験動物

実験動物は体重約3kgの日本白色種雄性ウサギ(日本エスエルシー)12匹を用い、岩手医科大学歯学部動物舎(室温:23±2℃,湿度:55±5%)にて水と固形飼料(オリエンタル)を自由に与えて飼育した。一週間の予備飼育にて全身状態および口腔内に異常のないことを確認した後、実験に使用した。

#### (2) 実験腫瘍

実験に使用した VX 2 癌細胞は1993年1月から当講座でウサギ大腿部筋肉内に継代移植し、維持されているもので、ウサギ舌に移植可能であり、ヒト口腔癌のうち発生頻度の最も高い扁平上皮癌に類似した組織像を有するものである。

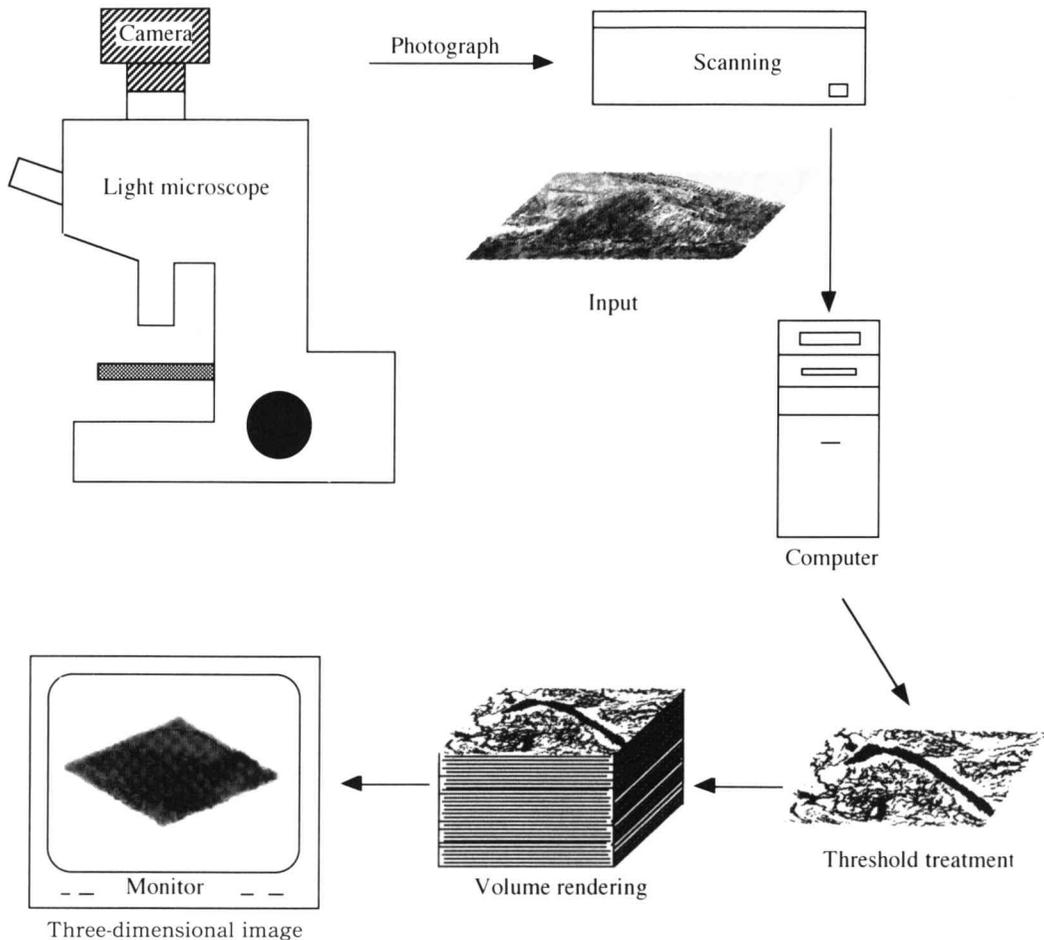
### 2. 実験方法

#### (1) 移植方法

伊藤ら<sup>28)</sup>の方法に準じて VX 2 癌をウサギ大腿部筋肉内に継代移植して作製した VX 2 癌細胞浮遊液 0.1 ml (細胞数約  $5 \times 10^5$  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 3 mm の筋肉内へ移植した。なお、非移植群には無処置のウサギを用いた。

#### (2) 墨汁注入標本の作製

Pentobarbital sodium (ダイナボット, 大日本製薬) 25 mg/kg をウサギ耳静脈内へ投与して麻酔した。実験群である VX 2 舌癌移植後 3 日目, 7 日目, 14 日目および非移植群におけるウサギ各々 3 匹ずつの両側総頸動脈および外頸静



**Fig. 1.** A three-dimensional reconstruction system is shown. A micrograph of a transparent specimen taken by light microscopy is scanned. The image is then inputted on a computer and the computer processed three-dimensional image is outputted on a monitor and observed.

脈を露出して、両側総頸動脈中枢側からカテーテルを挿入し、ヘパリン加滅菌生理的食塩水約 500 ml で灌流し、両側の外頸静脈に切開を加えて瀉血路とした。両側外頸静脈より透明な生理的食塩水が流出した時点で 5% 中性緩衝ホルマリンにて灌流固定を 15 分間施し、次いで墨汁を 110 mmHg 前後の圧力で注入した。なお、注入は両側外頸静脈より墨汁が流出するまで灌流した。墨汁注入後、両側総頸動脈および外頸静脈を結紮し、直ちに断頭、頭頸部を 10% 中性緩衝ホルマリンに浸漬固定した。一週間後、舌を摘出し、再度、浸漬固定を行った。舌は通法に従いパラフィンに包埋した後、30  $\mu$ m 厚の連続

切片をスライドガラスに貼付し、脱パラフィン後、直ちに封入し、連続透明標本を作製した。

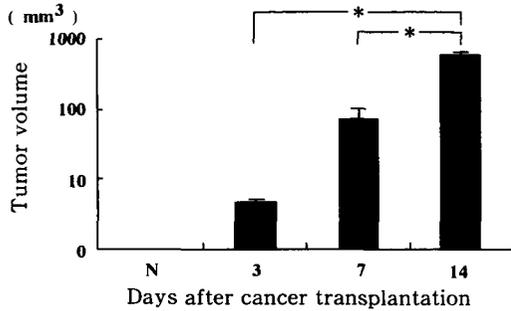
### (3) 3次元再構築法 (Fig. 1)

#### a) 撮影

撮影部位は腫瘍胞巣内部および腫瘍周囲間質の血管網が観察できる部位を選択した。また、光学顕微鏡による撮影は 2.5 倍、10 倍、25 倍で行った。

#### b) 画像入力、閾値処理 および位置合わせ

透明標本は連続的に光学顕微鏡 (OLYMPUS BH2) を通してカメラ (OLYMPUS C-35AD-2) で撮影した後、GT-8000 スキャナー (エプソン) にて Power Macintosh 9500 (アップル)



**Fig. 2.** Daily changes in tumor volume are shown in logarithmic scale. The tumor volume increased abruptly at 3 to 14 days after transplantation of VX2 cancer.  
\* :  $p < 0.05$   
Abbreviation : N, nontransplantation group

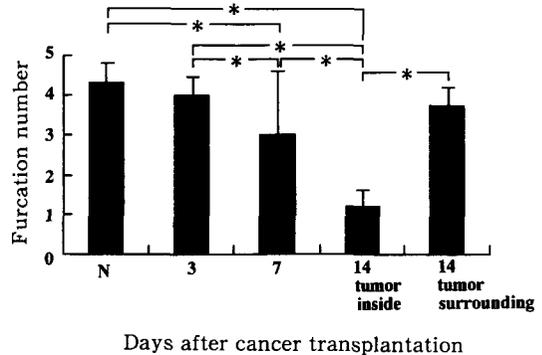
へ画像を入力(解像度 300 dpi)した。入力した画像は画像処理用ソフト, Photoshop 3.0 (Adobe) を用いて腫瘍胞巣内部および腫瘍周囲間質の血管を明確に描出し, 目標とする部位以外の像を消去するために閾値処理を行った<sup>24)</sup>。連続切片の位置合わせは, 基準とした画像上で任意に断面の明確な血管を3つ以上選択し, 次の画像上へ先に選択した血管を平行に移動した。その後, 血管断面が一致した位置を基準とし, 順次, 切片の重ね合わせを行った。

c) 画像の3次元再構築

画像は閾値処理および位置合わせをした後, VoxelView 1. 2. 1 (I & M) を用いて3次元再構築を行った。このソフトは入力した2次元データをボリュームレンダリング法<sup>25)</sup>によって3次元化して出力するものである。また, 2次元データはコンピュータのメモリ容量の関係から, 20枚から50枚の画像ごとにVoxelViewにて処理を行った。

(4) 光学顕微鏡による観察

3次元再構築画像をもとに観察項目に合致する切断面の切片を抽出して詳細に観察し, 非移植群では腫瘍移植相当部における細動脈から舌筋周膜内の毛細血管に至る間の血管分岐回数を計測し, 舌深動脈, 舌背枝, 細動脈および毛細血管の血管径を測定し, 周囲組織との関係を検



**Fig. 3.** Number of vascular furcations from the precapillary arterioles to the capillaries is listed. The number decreased with the lapse of days, but the number of furcations of the vessels surrounding the tumor stroma at 14 days increased more than this inside the tumor nest.  
\* :  $p < 0.05$   
Abbreviation : N, nontransplantation group

索した。実験群では VX 2 移植舌癌 3 日例, 7 日例, 14 日例における細動脈から腫瘍胞巣内部あるいは周囲間質の毛細血管に至る間の血管分岐回数を計測した。なお, 血管径の測定および周囲組織との関係は非移植群と同様に行った。

また, 各々の計測値の有意差については, 統計用ソフト StatView-J 4.5 (ABACUS Concepts) を用いて多重検定 (Bonferroni/Dunn) を行った ( $p < 0.05$ )。

結 果

1. VX 2 移植舌癌の経日的変化

VX 2 移植舌癌 3 日例では, 腫瘍を触知することはできなかったが, 透明標本では腫瘍は垂直舌筋の筋周膜内に増殖していた。その結果, 腫瘍は垂直舌筋筋束あるいは横舌筋筋束を一塊として外側へと圧排し, 腫瘍増殖部には血管が認められなかった。VX 2 移植舌癌 7 日例では, 腫瘍は移植相当部にび慢性的腫瘍として認められ, 直径約 7 mm から 12 mm の硬結を触知できた。透明標本では腫瘍はその増殖に伴って胞巣を形成し, 垂直舌筋および横舌筋のいくつかの筋束を取り込んでいた。VX 2 移植舌癌 14 日例で

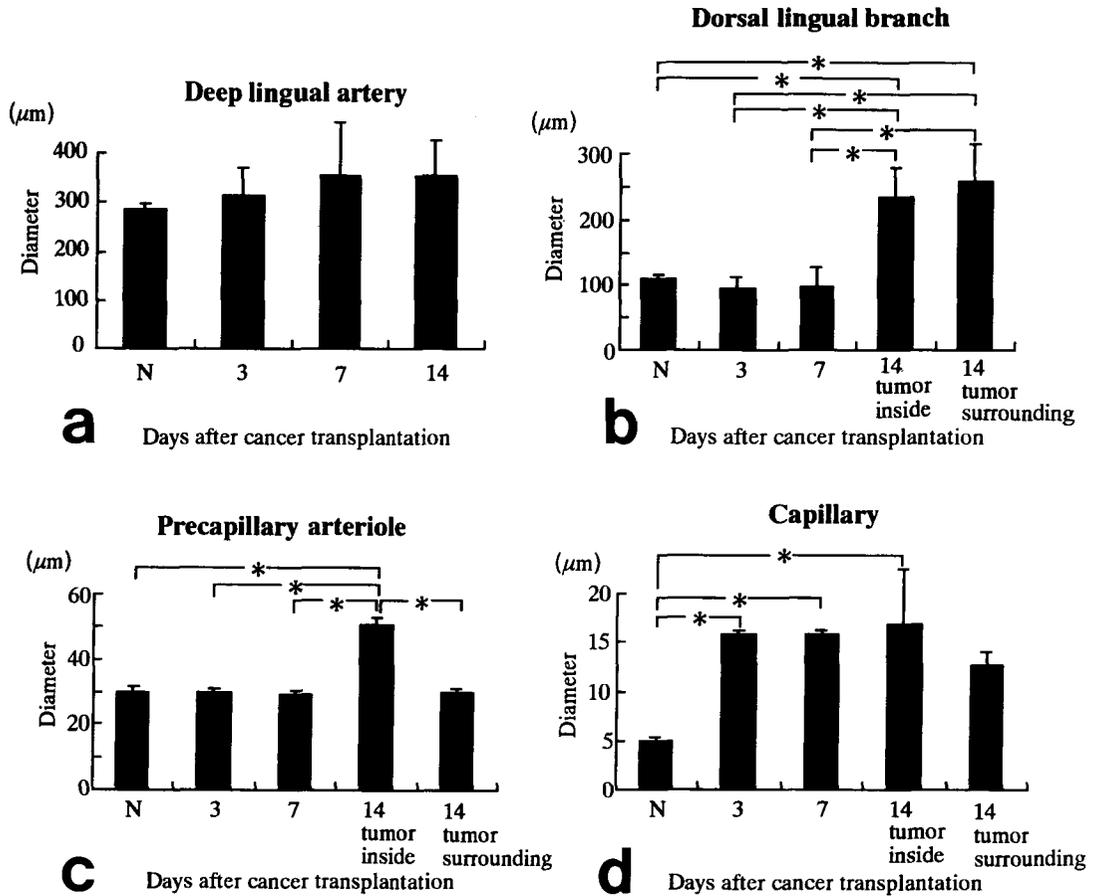


Fig. 4. Daily changes in vascular diameter are listed. No change was observed even at 14 days in the deep lingual artery. The diameter of the dorsal lingual branches and precapillary arterioles increased at 14 days, but the diameter of the precapillary arterioles surrounding the tumor stroma at 14 days was thinner than inside the tumor nest. Capillary diameter was thicker even at 3 days. \* :  $p < 0.05$

Abbreviation : N, nontransplantation group

は、腫瘍硬結の最大径は約 20 mm に増大し、舌粘膜表面に潰瘍の形成を認め、腫瘍の中心部は壊死に陥り、筋層は不明瞭であった。腫瘍の体積は透明標本で計測すると VX2 移植舌癌 3 日例では  $4.8 \pm 0.4 \text{ mm}^3$ 、7 日例では  $71.4 \pm 30.1 \text{ mm}^3$ 、14 日例では  $614 \pm 105.2 \text{ mm}^3$  と経日的に有意な増加を示した (Fig. 2)。

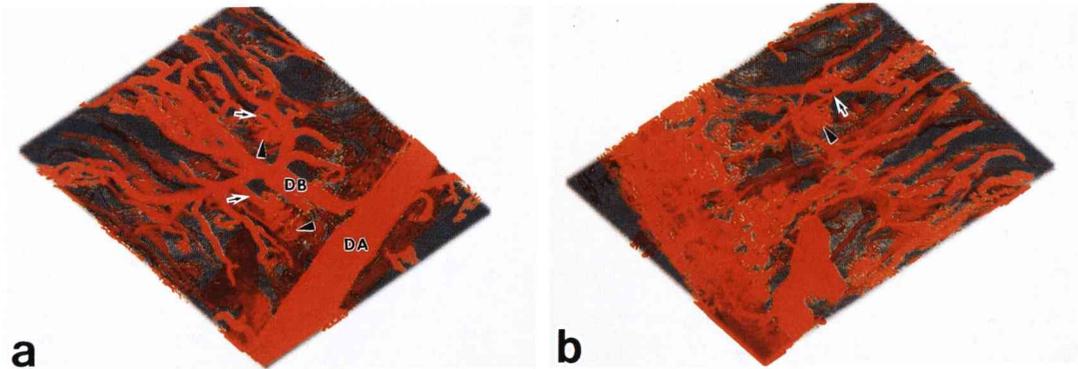
## 2. 血管形態

### (1) 非移植群

腫瘍移植部位に相当する舌前方 1/3 では、舌背枝は舌深動脈からほぼ垂直に分岐し、舌背

に向かっていった。細動脈は垂直舌筋、横舌筋および上縦舌筋の内筋周膜を經過し、筋内膜内に毛細血管網を形成していた。舌深動脈、舌背枝、細動脈および毛細血管の口径は、それぞれ平均  $289.7 \mu\text{m}$ 、 $108.5 \mu\text{m}$ 、 $29.7 \mu\text{m}$  および  $4.9 \mu\text{m}$  であった。また、舌背枝の分枝である細動脈から毛細血管に至る間の血管分岐回数は平均 4.3 回であった (Fig. 3, 4, 5)。

毛細血管の走行方向は各内舌筋群の筋線維と一致していた。その結果、これらの毛細血管は垂直舌筋では舌の上下方向、横舌筋では斜方向



**Fig. 5.** Vascular three-dimensional reconstruction (Nontransplantation group)

a : There were DBs that branched off almost vertically from the DA toward the dorsal tongue. The branches (arrows) from the DB repeated furcations about 4 times until they reached capillaries (arrow heads) formed in the endomysium, after passing through the vertical and transverse muscle of the tongue and the perimysium intimum of the longitudinal muscle.

b : Back view of "a". Vascular networks which are invisible in the front view can be seen. Abbreviations : DA, deep lingual artery ; DB, dorsal lingual branch

または横方向，舌背付近の上縦舌筋では舌の前後方向へ，それぞれ走行していた (Fig. 6)。

## (2) 実験群

### (a) VX2 移植舌癌 3 日例

癌細胞は移植部に生着し，増殖を開始する VX2 移植舌癌 3 日例では，血管の形態は非移植群とほぼ同様で，舌背枝は舌深動脈から垂直に分岐し，舌背に向かっていった。腫瘍に近接した舌背枝は腫瘍の増殖により外側へ軽度圧排されていたが，細動脈の分岐回数には非移植群と比較して大きな変化を認めなかった (Fig. 3)。

腫瘍は垂直舌筋筋膜内で増殖し，舌の上下方向に走行する毛細血管を取り囲み，隣接する横舌筋の毛細血管を圧排していた。また，それら筋内膜内の毛細血管は腫瘍増殖部に近接して走行し，腫瘍周囲の既存の血管に類似していた (Fig. 7)。しかしその毛細血管の口径は非移植群に比べて口径が  $16.0 \mu\text{m}$  と有意に太く，蛇行も認められた (Fig. 4d, 8)。

### (b) VX2 移植舌癌 7 日例

腫瘍は数個の癌胞巣を形成していた。舌背枝は癌胞巣によって取り囲まれ，その走行方向は乱れ，斜走していた。舌背枝の細動脈は分岐し

て数本の分枝を出し，癌胞巣を取り囲むように籠目状の毛細血管網を形成していた。これらの毛細血管は既存の血管の走行とは明らかに異なり，腫瘍の増殖に伴って形成された新生血管であることを示していた (Fig. 9)。舌背枝の細動脈は腫瘍周囲間質の毛細血管網に到達し，その分岐回数は VX2 移植舌癌 3 日例と比較して有意に減少していた (Fig. 3)。

舌背枝とその細動脈の口径は平均  $97.0 \mu\text{m}$  (Fig. 4b) と  $29.2 \mu\text{m}$  (Fig. 4c) であり，非移植群および VX2 移植舌癌 3 日例との間にいずれも有意差を認めなかった。しかし毛細血管の口径は平均  $15.8 \mu\text{m}$  (Fig. 4d) であり，非移植群に比べて有意に太かった (Fig. 10)。

### (c) VX2 移植舌癌 14 日例

腫瘍の血管壁は非常に薄くなって透過性が亢進し，腫瘍胞巣内部では注入圧による墨汁の漏出がみられた。さらに舌背枝は腫瘍によって圧排され，非移植群とは異なり舌深動脈から分岐した直後に垂直に走行することなく，斜走していた。この部に形成された新生血管は中心性動脈となり，舌背枝から直接，毛細血管網を形成していた。これらはその分岐形態や走行から明らかに既存の血管と異なり，新生血管とみなす

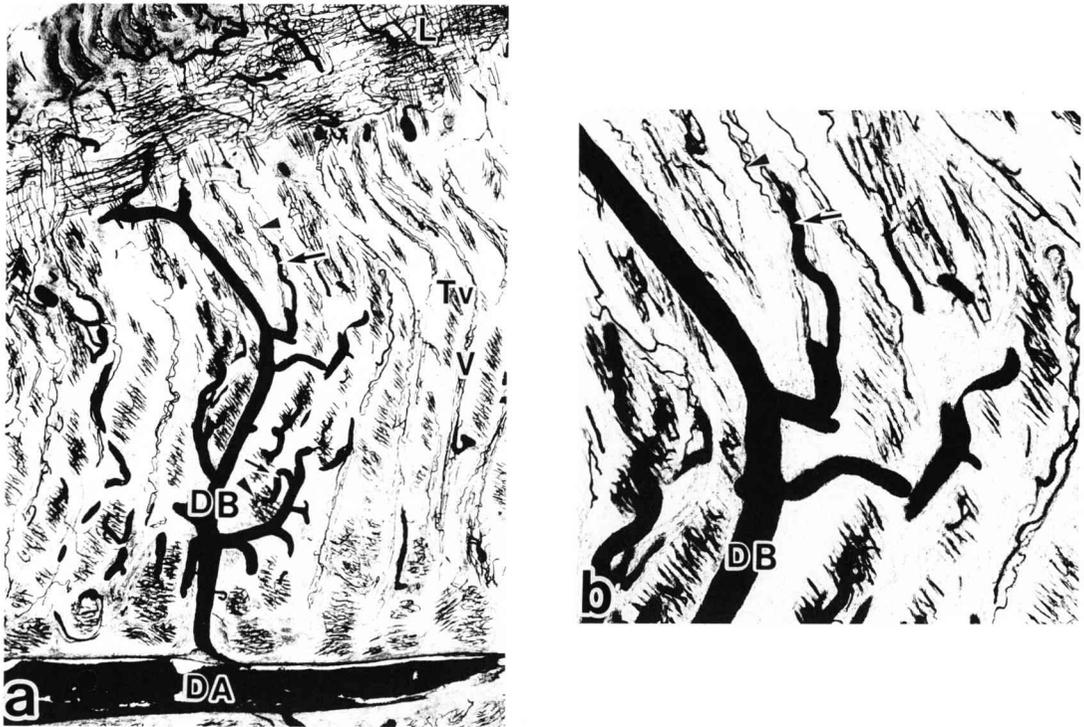


Fig. 6. Pictures of nontransplanted specimens injected with India ink are shown (a :  $\times 10$ , b :  $\times 25$ ).

a : The DA ( $300\ \mu\text{m}$ ) furcates into DB ( $110\ \mu\text{m}$ ). Precapillary arterioles (arrows,  $28\ \mu\text{m}$ ) branch off from the DB and pass through the perimysium internum. Then, capillaries (arrow heads,  $4.5\ \mu\text{m}$ ) branch off from the precapillary arterioles and run inside the endomysium.

b : Magnified view of "a"

Abbreviations : DA, deep lingual artery ; DB, dorsal lingual branch ; Tv, transverse muscle ; V, vertical muscle ; L, longitudinal muscle

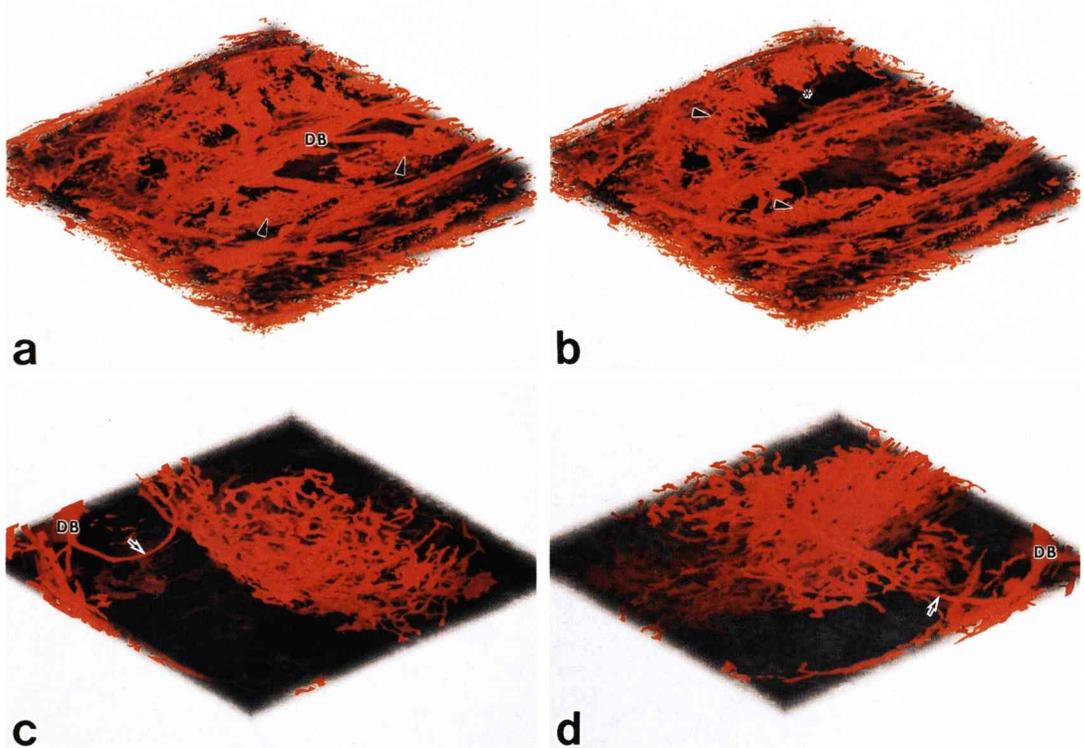
ことができた (Fig. 11)。

一方、腫瘍周囲間質の血管は VX 2 移植舌癌 3 日例および 7 日例と同様に拡張や蛇行がみられた。細動脈の分岐回数は非移植群および VX 2 移植舌癌 3 日例に近似し、平均 3.7 回であり、腫瘍胞巣内部における細動脈の分岐回数と比較して有意に多くなっていた (Fig. 3)。舌背枝の口径は VX 2 移植舌癌 14 日例になると、平均  $250.0\ \mu\text{m}$  (Fig. 4b) に増大し、腫瘍胞巣内部および周囲間質とも非移植群、VX 2 移植舌癌 3 日例および 7 日例に比べ有意に拡張していた。また、腫瘍胞巣内部における細動脈の口径は、平均  $50.2\ \mu\text{m}$  (Fig. 4c) と増大し、非移植群、VX 2 移植舌癌 3 日例、7 日例および 14 日例の腫瘍周囲間質に比べ有意に太かった。なお、腫

瘍胞巣内部における毛細血管の口径は、平均  $17.0\ \mu\text{m}$  (Fig. 4d) で、非移植群に比較すると有意に拡張していたが、腫瘍周囲間質における毛細血管の口径は平均  $12.6\ \mu\text{m}$  であり、非移植群、VX 2 移植舌癌 3 日例、7 日例および 14 日例の腫瘍胞巣内部との間に有意差を認めなかった (Fig. 4d, 12)。

## 考 察

VX 2 移植舌癌の体積は、経日的に増大し、とくに VX 2 移植舌癌 7 日例から 14 日例にかけて有意な増大が認められた。このような体積増大の傾向は、腫瘍における血管構築の変化、とくに新生血管の増加とほぼ一致していた。このことは、腫瘍体積の増大に血管新生が重要な



**Fig. 7.** Vascular three-dimensional reconstruction (3 days after transplantation)

a : The DB can be seen adjacent to the tumor. The capillaries (arrow heads) on the tumor stroma are dilated.

b : Inner view of "a". Vascular distribution is not seen in the area with tumor growth (\*). Mild dilatation and tortuousness were found only in the capillaries (arrow heads) which surround the cancer nest.

c : Magnified view of the deep vessel in the area indicated by \* in the picture "b". Branches (arrow) from the DB form a capillary network surrounding the cancer nest.

d : Back view of "c".

Abbreviation: DB, dorsal lingual branch

役割を担っていることを示唆している。

ウサギの舌深動脈は左右舌半分のほぼ中央をやや舌下面よりに前走し、舌背枝は舌深動脈から分岐し、ほぼ垂直方向に内筋周膜内を通過して立ち上がり、細動脈を経て筋内膜内で毛細血管網を形成する<sup>29,30)</sup>。この舌背枝は本実験期間内で腫瘍の大きさが最大となる VX 2 移植舌癌 14 日例においても、2 本から 3 本含まれる程度であった。

VX 2 移植舌癌 3 日例では、腫瘍は最大径が 2 mm から 3 mm 程度であり、腫瘍内にはまだ新生血管を必要としないが<sup>10)</sup>、本実験では、腫瘍は

垂直舌筋と横舌筋の筋周膜内で増殖し、これら筋束を圧排していた。しかし拡張した毛細血管の走行は腫瘍増殖部位から離れた腫瘍周囲の毛細血管の走行と類似していた。このことから VX 2 移植舌癌 3 日例の筋内膜に認められた毛細血管は新生血管ではなく、既存の毛細血管が拡張、蛇行していたものと考えられる。なお、VX 2 移植舌癌 3 日例における舌深動脈、舌背枝および細動脈などの走行方向や、血管径は非移植群との間にほとんど差異を認めなかった。すなわち、腫瘍周囲間質における既存の毛細血管のみが拡張することにより透過性を亢進し、

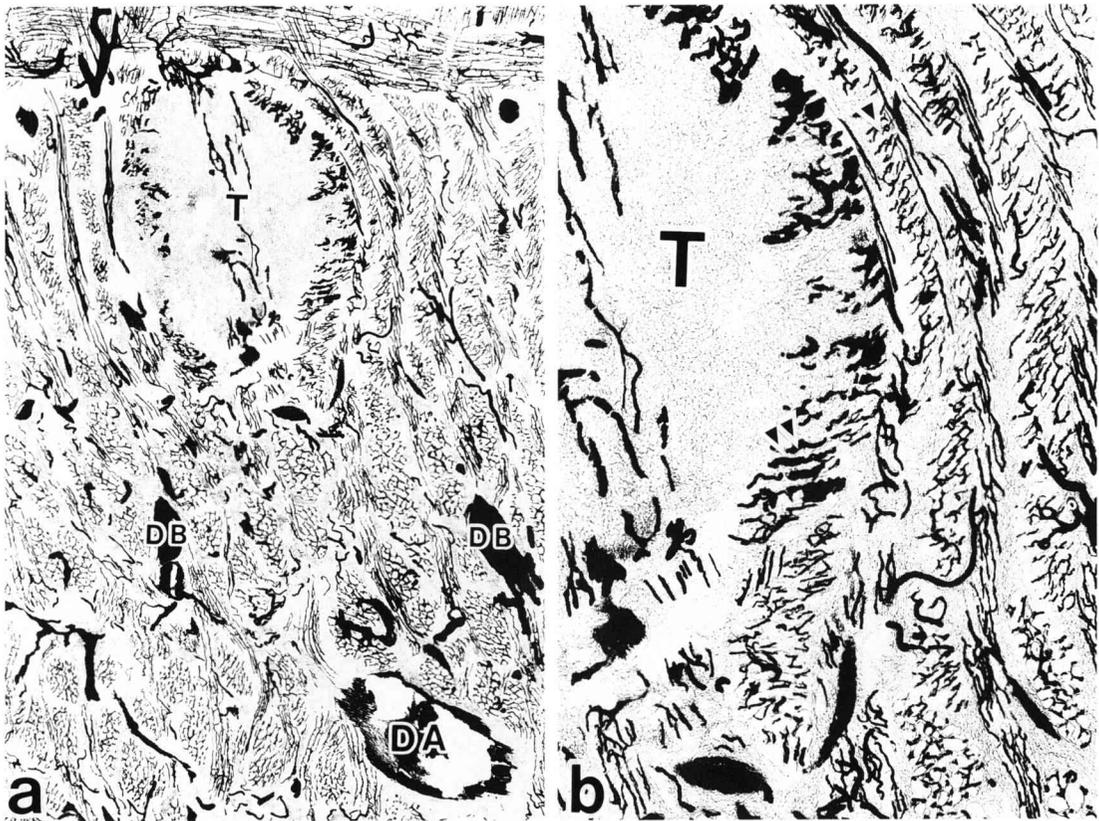


Fig. 8. Pictures of specimens injected with India ink at 3 days are shown (a :  $\times 10$ , b :  $\times 25$ ).

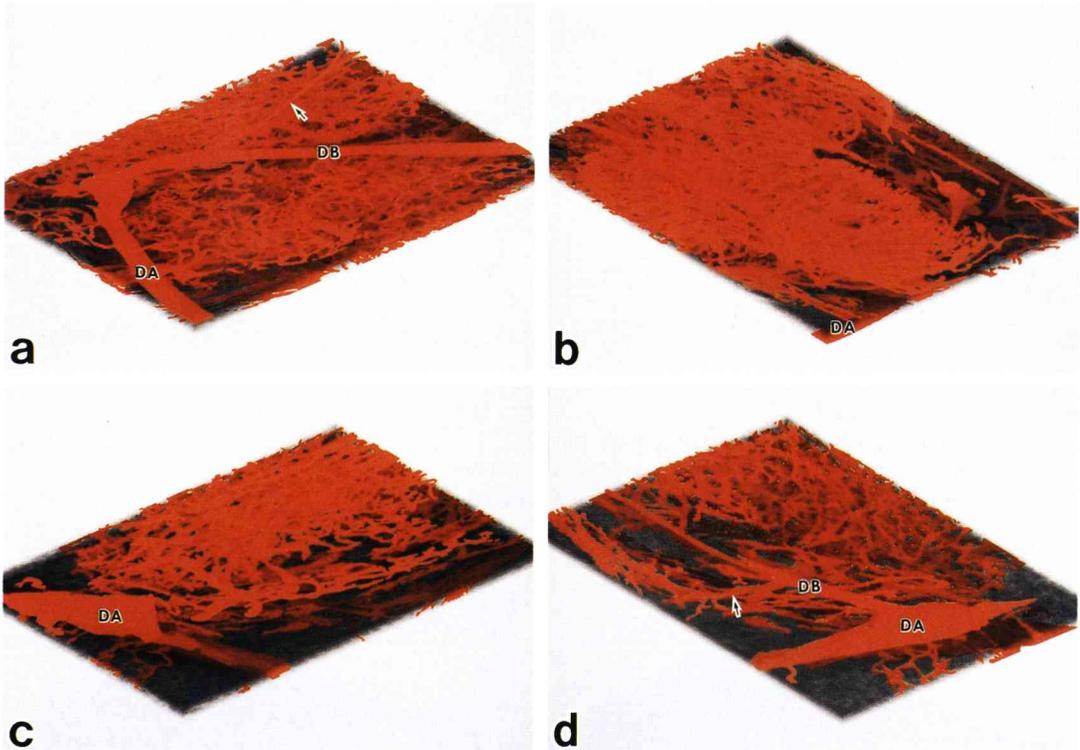
a : Positional relationships between the DA ( $300\mu\text{m}$ ) and the DB ( $100\mu\text{m}$ ) are shown.

b : The running direction was similar between the dilated capillaries (double arrow head,  $17\mu\text{m}$ ) on the tumor stroma and the capillaries (arrow head,  $4.5\mu\text{m}$ ) distributed in the transverse muscle of the tongue adjacent to the tumor.

Abbreviations : DA, deep lingual artery ; DB, dorsal lingual branch ; T, tumor

腫瘍の成長に必要な栄養供給を行っているものと推察される。山浦<sup>20)</sup>によると腫瘍血管とは、(1)腫瘍の栄養血管であり、(2)腫瘍細胞に近接して存在し、(3)腫瘍細胞の影響により腫瘍独自の変化を受けている血管である、と定義している。本実験における VX 2 移植舌癌 3 日例では、腫瘍周囲間質における既存の血管の形態変化は、上記の腫瘍血管の定義に合致する。この時期では、筋内膜内に分布する既存の毛細血管の口径は、非移植群における毛細血管の約 3.8 倍に拡張しており、腫瘍から放出される種々の因子<sup>10-18)</sup>によって、まず最初に影響をうけるのは腫瘍に近接する既存の毛細血管であることを示している。

VX 2 移植舌癌 7 日例になると、腫瘍は増殖拡大しながら胞巣を形成し、舌背枝や舌深動脈を取り囲むようになる。腫瘍胞巣内部における毛細血管の口径は、VX 2 移植舌癌 3 日例との間に差異を認めなかったが、非移植群に比較すると有意に太くなっていた。しかし舌背枝と細動脈の口径には有意差が認められなかった。この時期には、これらの血管はまだ腫瘍血管ではなく、腫瘍からの影響をほとんど受けていないものと思われる。また、VX 2 移植舌癌 7 日例では腫瘍胞巣内部における毛細血管の走行は、腫瘍増殖部から離れた腫瘍周囲間質の毛細血管の走行と類似性を認めなかった。したがって腫瘍胞巣内部の新生血管は腫瘍から放出される因



**Fig. 9.** Vascular three-dimensional reconstruction (7 days after transplantation)

a : The precapillary arterioles (arrow) branching off from the DB repeated furcations several times, and finally formed a capillary network distributed in the cancer nest. The mean times of furcations required for the arteries to reach the capillary network surrounding the tumor stroma after the precapillary arterioles branched off from the DB was 3 times.

b : Back view of "a".

c : A basket-mesh-like capillary network encircling the cancer nest.

d : Back view of "c". A dense vascular network (arrow) was seen in the cancer nest.

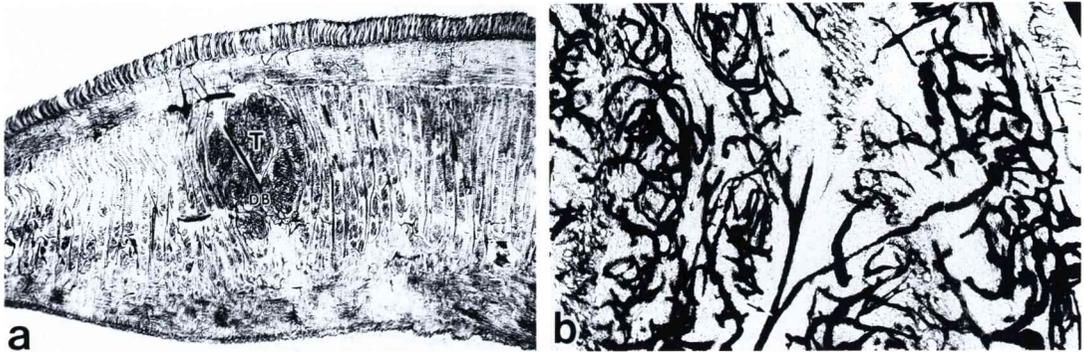
Abbreviations : DA, deep lingual artery ; DB, dorsal lingual branch

子<sup>10~18)</sup>によって誘導され、籠目状の異常な走行を示すようになるものと思われる。

VX 2 移植舌癌 14 日例では腫瘍中心部は壊死組織となり、血管は認められなかった。それは腫瘍の急速な増大に伴う腫瘍血管の断絶、狭窄などによって有効な血液量が維持できなくなるためと考えられている<sup>31)</sup>。この時期には、腫瘍胞巣内部および周囲間質の舌背枝は腫瘍の増大に伴って著しく圧排され、有意に太さが増大していた。このことは新生した毛細血管が拡張することによって透過性が亢進し<sup>32,33)</sup>、この血管に多量の血液を送り込むためにさらに舌背枝が拡張したものと考えられる。斎藤<sup>4)</sup>は腫瘍中

心部に壊死部が存在するにもかかわらず、血流が増加するのは腫瘍周囲間質における新生血管の増加によるものと述べている。VX 2 移植舌癌 14 日例では同じ圧力で注入した墨汁が腫瘍胞巣内部に限って漏出していた。これは腫瘍胞巣内部における新生血管の透過性が著しく亢進する<sup>32,33)</sup>ことに起因すると考えられる。

本実験における観察の主眼は、動脈側の血管においたので、VX 2 移植舌癌 7 日例および 14 日例では細動脈および舌背枝における走行の異常および新生血管の分岐が観察された。このことは静脈側から起こる血管新生<sup>7,22,34)</sup>が、動脈側の細動脈および舌背枝へと移行していくことを

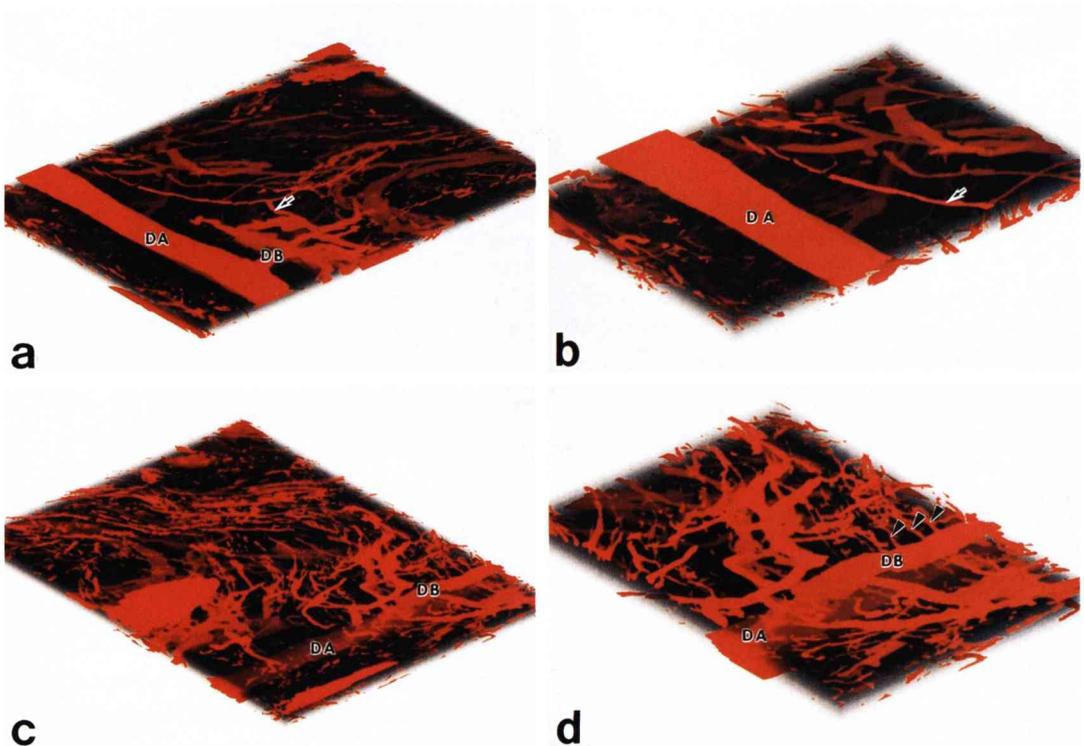


**Fig. 10.** Pictures of specimens injected with India ink at 7 days are shown (a :  $\times 2.5$ , b :  $\times 25$ ).

a : There were DBs ( $100\ \mu\text{m}$ ) that were surrounded in the cancer nest.

b : Magnified view of \* in the picture "a". The precapillary arterioles (arrow) formed vascular networks (arrow heads,  $15\ \mu\text{m}$ ) surrounding the cancer nests.

Abbreviations : DB, dorsal lingual branch ; T, tumor



**Fig. 11.** Vascular three-dimensional reconstruction (14 days after transplantation)

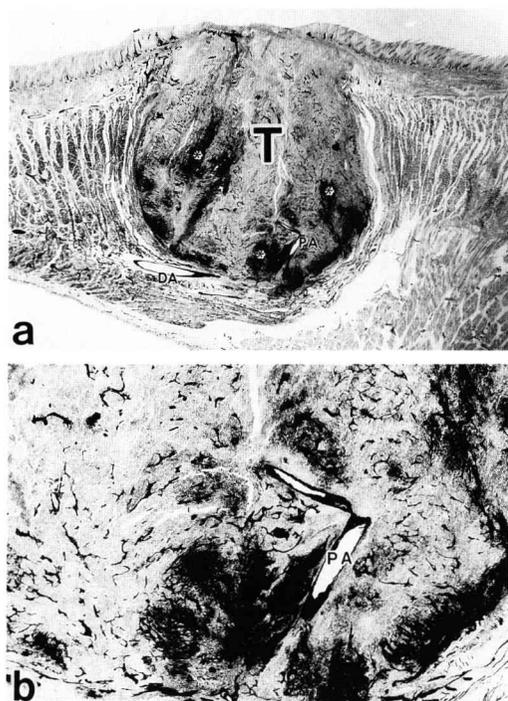
a : Penetrating arteries (arrow) , which had branched off from the DB and run inside the tumor nest.

b : Magnified view of "a".

c : The DB inside the tumor nest was shifted by the tumor, so that they could not run in perpendicularly to the DA immediately after their furcation and had lost their orientation.

d : Magnified view of "c". Anastomosis of neovasculatures (arrow heads) to the DB can be seen.

Abbreviations : DA, deep lingual artery ; DB, dorsal lingual branch



**Fig. 12.** Pictures of the specimens injected with India ink at 14 days are shown (a :  $\times 2.5$ , b :  $\times 10$ ).

a : The DA was dilated to  $300\mu\text{m}$ . There were no vessels in the central necrotic lesion of the tumor. Leakage of India ink by infusion pressure occurred due to increased permeability of tumor vessels (\*). A penetrating artery can be seen in the tumor nest.

Abbreviations : DA, deep lingual artery ; PA, penetrating artery ; T, tumor

示しているように思われる。

細動脈から毛細血管に至る間の血管分岐回数は、VX 2 移植舌癌 3 日例、7 日例および 14 日例における腫瘍胞巣内部では経日的に減少した。しかし VX 2 移植舌癌 14 日例における腫瘍周囲間質の血管分岐回数は、非移植群、VX 2 移植舌癌 3 日例、7 日例と有意差を認めなかった。このような血管分岐回数の増減は、腫瘍胞巣内部では腫瘍が増殖して毛細血管から舌深動脈の舌背枝に至る間の血管を取り込むようになるために血管分岐回数が減少するのに対し、腫瘍周囲間質では VX 2 移植舌癌 3 日例お

よび 7 日例における同様に血管の拡張や蛇行などの形態変化を繰り返すため、血管分岐回数が増えないものと思われる。このことは柳ら<sup>34)</sup>が述べている vascular density index の増加と一致しており、腫瘍の増大によって毛細血管網が密になったことを示している。VX 2 移植舌癌 14 日例にみられる腫瘍胞巣内部の毛細血管網は、腫瘍の増殖によって破壊、消失するが、腫瘍周囲間質の毛細血管網と交通しているので、その交通枝が中心性動脈の役割を演じるようになり、腫瘍胞巣内部に新たな毛細血管網を形成しながら腫瘍を増大させていくものと考えられる。なお、舌深動脈は本実験期間内では形態的变化が認められず、腫瘍による直接の影響を受けていなかった。

## 結 論

ウサギ移植 VX 2 舌癌における腫瘍胞巣内部および周囲間質の 3 次元血管構築を経日的に観察し、以下の結論を得た。

1. VX 2 移植舌癌 3 日例では、腫瘍は垂直舌筋内で増殖し、腫瘍に近接した既存の毛細血管は拡張および蛇行を示した。

2. VX 2 移植舌癌 7 日例では、腫瘍が急速に増殖し、いくつかの癌胞巣を形成した。癌胞巣の間質に侵入した毛細血管は、腫瘍周囲間質の血管網とは異なった籠目状の走行を示し、腫瘍の増殖に伴う新生血管と考えられた。

3. VX 2 移植舌癌 14 日例の腫瘍胞巣内部では、舌背枝および細動脈の拡張や、細動脈の分岐回数の減少、それに伴う墨汁漏出を示す著明な新生血管像などが認められた。

4. VX 2 移植舌癌 14 日例の腫瘍周囲間質では、腫瘍の増殖に伴い、前期間例における同様な既存毛細血管の拡張や蛇行、細動脈分岐回数の増加などがみられた。

5. 腫瘍血管は腫瘍の増殖に伴って既存の毛細血管の拡張および蛇行に始まり、細動脈および舌背枝の拡張、血管新生などの形態変化を経て形成されていた。

## 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、横田光正講師と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51回日本口腔科学会総会(1997年4月, 新潟市)において発表した。本実験の一部は日本私学振興財団平成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) Jain, R. K. : Determinants of tumor blood flow: a review. *Cancer Res.* 48 : 2641-2658, 1988.
- 2) 石神哲郎 : 家兎 VX2 癌に及ぼす抗癌剤の影響に関する電子顕微鏡学的研究, 日口外誌, 36 : 1-20, 1990.
- 3) 松島典彦 : 実験的舌癌における血管構築ならびに腫瘍血管の超微構造, 日口外誌, 28 : 175-191, 1982.
- 4) 斎藤恒夫 : レーザー血流計を用いたウサギ VX2 舌癌における舌および転移リンパ節の血流動態, 岩医大歯誌, 21 : 257-270, 1996.
- 5) 畑 毅 : 実験的口腔癌における転移リンパ節の血管構築の変化, 口科誌, 43 : 386-400, 1994.
- 6) 柳 健一, 大島宣雄 : 腫瘍微小循環血流の解析, 脈管学, 35 : 1073-1077, 1995.
- 7) 堀 勝義, 鈴木磨郎, 阿部郁夫, 斎藤祥子, 丹田滋 : 腫瘍血管新生と微小増殖巣の血管支配の検討, 癌と化学療法, 14 : 961-970, 1987.
- 8) 本田武司 : 家兎舌癌 (VX2 癌) の増殖過程における栄養動脈の変化に関する実験的研究, 九州歯会誌, 35 : 221-238, 1981.
- 9) 秦 順一, 玉置憲一, 赤塚 明, 佐藤 勉 : 腫瘍血管新生に関する形態学的研究, 最新医学, 36 : 1841-1845, 1981.
- 10) Folkman, J., and Klagsburn, M. : Angiogenic factor. *Science* 235 : 442-447, 1987.
- 11) Sweiki, D., Itin, A., Soffer, D., and Keshet, E. : Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated. *Nature* 359 : 843-845, 1992.
- 12) Ferrara, N., Houck, K., Jakeman, L., and Leung, D. W. : Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr. Rev.* 13 : 18-32, 1992.
- 13) Folkman, J., and Shing, Y. : Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 267 : 10931-10934, 1992.
- 14) Folkman, J. : Tumor angiogenesis. *Adv. Cancer Res.* 43 : 175-203, 1985.
- 15) Warren, B. A. : Tumor angiogenesis. *Tumor Blood Circulation*, pp. 49-75, CRC Press Inc., Boca Raton, 1979.
- 16) Risau, W. : Angiogenic growth factors. *Prog. Growth Factor Res.* 2 : 71-79, 1990.
- 17) 三上康和 : 頭頸部扁平上皮癌細胞の Basic Fibroblast Growth Factor 産生と血管新生, 耳展, 36 : 685-695, 1993.
- 18) 神田 滋, 宮園浩平 : 血管新生の生物学, 実験医, 13 (増刊) : 11-14, 1995.
- 19) Sanders, A. G. : Microcirculation of normal and malignant tissue. *J. Anat.* 97 : 631, 1963.
- 20) 山浦玄嗣 : 腫瘍血管の形態と機能に関する実験的研究, 抗研誌, 23 : 100-120, 1971.
- 21) Ausprunk, D. H., Knighton, D. R., and Folkman, J. : Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois : A structural and autoradiographic study. *Dev. Biol.* 38 : 237-248, 1974.
- 22) Gimbrone, M. A. Jr., Cotran, R. S., Leapman, S. B., and Folkman, J. : Tumor growth and neovascularization : An experimental model using the rabbit cornea. *J. Natl. Cancer Inst.* 52 : 413-427, 1974.
- 23) 浅野牧茂, 吉田敬一, 田多井吉之介 : Rabbit Ear Chamber による微細循環動態の研究法について, 生体の科学, 13 : 285, 1962.
- 24) 三浦 岳, 小森 優, 高橋 隆, 塩田浩平 : コンピュータグラフィックスによるヒト胚子連続切片からの三次元立体画像の再構築—フリーソフトウェア “NIH Image” を用いた試み—, 解剖誌, 70 : 353-361, 1995.
- 25) 瀬川彰久 : 共焦点レーザー顕微鏡とコンピューターグラフィックス (ポリウムレンダリング法) による細胞骨格の三次元観察, 解剖誌, 67 : 100-106, 1992.
- 26) 雁金理華子 : コンピュータ三次元再構築法による蝸牛内構造の計測とその有効性, 耳展, 40 : 補 1 : 52-58, 1997.
- 27) 安達裕一郎, 森満 保 : コンピュータ三次元再構築法によるヒト鼓室腔の発生—特に耳管上陥凹の発生—, 耳鼻, 40 : 778-791, 1996.
- 28) 伊藤洋平 : 移植癌, 宮川正澄, 佐藤春郎, 螺良義彦監修 : 実験腫瘍学, 第1版, 朝倉書店, 東京, 554-557 ページ, 1966.
- 29) 高橋和人 : Microarteriogram による口腔付近の微細血管の解剖学的研究 そのII イヌ・ウサギ・ラット・ヒツジの舌, 歯科学報, 62 : 533-545, 1962.
- 30) Barone, R., Pavaux, C., Blin, P. C., and Cuq, P. ;

- 望月公子 訳, ウサギの解剖図譜, 学窓社, 東京, 123-152 ページ, 1977 : ATLAS D'ANATOMIE DU LAPIN, MASSON ET CIE, Paris, 1973.
- 31) Denekamp, J., Hill, S. A., and Hobson, B. : Vascular occlusion and tumour cell death. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 19 : 271-275, 1983.
- 32) 佐藤友美 : 誘発舌扁平上皮癌における血管内皮細胞の微細構造に関する研究—特にペプロマイシンとシスプラチンによる透過性の差異について—, 日口外誌, 37 : 327-340, 1991.
- 33) 笹原健児 : 抗癌剤投与が誘発舌癌の腫瘍血管内皮細胞におよぼす影響に関する電顕的研究—特にTHP-ADM, CDDP, PEP 併用による物質透過関連構造の動態について—, 岩医大歯誌, 18 : 189-209, 1993.
- 34) Yanagi, K., and Ohshima, N. : Angiogenic vascular growth in the rat peritoneal disseminated tumor model. *Microvasc. Res.* 51 : 15-28, 1996.