

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

小川 淳

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：1996年10月16日)

(受理：1996年11月28日)

Abstract : It is known that lymphatic capillaries surrounding tumors play a functional important role in invasion and metastasis of the cancer. In this study, absorbing substances from tissues by lymphatic capillaries around the tumor was evaluated in VX2 tongue carcinoma using horseradish peroxidase (HRP) as a tracer.

Subjects were rabbits which were 7 and 14 days after VX2 carcinoma transplantation into their tongues. HRP was infused under the mucosa of the tongue at the site of tumor transplantation, and specimens for transmission electron microscopy were prepared. HRP was absorbed by lymphatic capillary endothelial cells from surrounding tissues through intercellular endothelial spaces and pinocytotic vesicles. More vesicles were observed in 7 and 14 days after transplantation of VX2 carcinoma than in the control group. Also, the amount of HRP transferred from the abluminal side of endothelial cells through intercellular endothelial spaces and accumulated on the cell membrane of the luminal side increased after transplantation. The number of pinocytotic vesicles increased in endothelial cells in the transplanted groups as compared with the control group, and the length of adhesion apparatus in intercellular endothelial spaces was reduced.

These results suggested that the transport of substances especially via intercellular endothelial spaces and vesicles increased with progression of tumor in lymphatic capillary surrounding tumor.

Key words : lymphatic capillary absorption, VX2 tongue carcinoma, horseradish peroxidase

緒 言

悪性腫瘍の浸潤、増殖および転移に関する研究では微小循環系との関連性を示唆する報告が多く、そのほとんどが腫瘍血管の動態に関するものであった。すなわち、腫瘍の増大に伴う血管の破壊および新生¹⁾により、血管内皮細胞の物質透過関連構造が増加し、結果として毛細血管および細静脈からの物質透過性が亢進するこ

と²⁻⁵⁾が示されている。しかし、口腔癌において高頻度に認められる頸部リンパ節転移の解明には、微小循環系のもう一つの構成要素であるリンパ系の動態を検討する必要がある。しかし、光学顕微鏡下のリンパ管は血管、特に細静脈との鑑別が困難であったため十分な追究がなされていなかった。毛細リンパ管はリンパ系の入口であり、物質吸収能を有し、病変間質における巨大分子を含む多量の組織液を取り込み、

HRP absorption on endothelial cell of the lymphatic capillary in the rabbit VX2 tongue carcinoma.
Atsushi OGAWA
(First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, 020 Japan)

積極的に組織・器官の恒常性の維持に関与している⁶⁾。

近年、リンパ管と血管の鑑別には5'-nucleotidase-alkaline phosphatase 二重染色法が利用されるようになった⁷⁾。この方法を用いてハムスター DMBA 誘発舌癌^{8,9)}およびウサギ VX2 舌癌¹⁰⁾、あるいは、口腔扁平上皮癌生検材料^{11,12)}における毛細リンパ管の形態と構築について光学顕微鏡下にリンパ管の追究が行われてきた。これらの報告によると、リンパ管は腫瘍の進展に対応して屈曲、蛇行および口径の増大などの形態的变化を示し、さらに、リンパ管内皮細胞における物質吸収能の亢進が示唆されてきた。しかし、腫瘍の影響下におけるリンパ管の吸収能に焦点を絞った形態的追究は非常に少ない。本研究ではこれまでの腫瘍血管の内皮細胞における物質透過性に関連する微細構造の観察結果^{3~5)}のみでなく、リンパ管の物質吸収能についても検討を加えた。

材料および方法

1. 材料

(1) 実験動物

実験には体重3kg前後の日本白色種雄性ウサギ(船橋農場)を用いた。購入後、岩手医科大学歯学部動物舎(室温:23±2℃,湿度:55±5%)において一週間以上飼育し、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。固形飼料RC4(オリエンタル)および水道水は自由に摂取させた。

(2) 実験腫瘍

実験にはウサギに移植可能であり、ヒトの扁平上皮癌に類似した組織型を有するVX2癌¹³⁾を用いた。使用したVX2癌細胞は1993年1月に鹿児島大学歯学部口腔外科学第一講座より分与を受け、当講座においてウサギの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) 実験群

VX2癌の舌への移植は外山ら¹⁴⁾の方法に準じて行った。すなわち、生理食塩水(注射用、

大塚製薬)で容積比50%に調整したVX2癌細胞浮遊液0.1ml(細胞数 5×10^5)をpentobarbital sodiumによる静脈内麻酔(0.5mg/kg)下でウサギの舌尖より1/3の左側舌体辺縁部で、舌表面より約3mmの筋肉内に移植して舌癌モデルを作製した。観察には癌細胞移植後7日目および14日目の各群5匹ずつを用いた。

(2) 対照群

正常ウサギ舌の毛細リンパ管の物質吸収性を検索するために、無処置のウサギ5匹の舌を観察した。さらに、舌への注射針刺入の影響の有無を確認するために、実験群の移植部位と同じ部位に生理食塩水のみ0.1mlを筋肉内に注入し、7日後および14日後の各群5匹ずつ計10匹の舌を観察した。

(3) 腫瘍進達度の測定

VX2舌癌組織の大きさは移植部の前額断切片で肉眼的に最大径をノギスを用いて測定した。

(4) 物質吸収性の検索

周囲組織からの粘膜固有層内毛細リンパ管の物質吸収性を検索するために、対照群と腫瘍移植7日目および14日目の各群5匹ずつのウサギを用いた。動物は麻酔下で開胸し上行大動脈を露出、カニューレを挿入して、ヘパリン加生理食塩水にて100cmの高さから流速5ml/分で20分間頭頸部を瀉血した。次いで、舌尖より1/3の左側舌辺縁にトレーサーとして185単位/mlに調整したHRP(TypeIV, MW:40,000, Sigma)を0.1ml注入した(Fig.1)。トレーサーの注入から灌流固定の開始までの時間は予備実験を行い、観察に最適な条件である30秒後に設定した。トレーサー注入後にカコジル酸緩衝液で2倍に希釈したKarnovsky固定液(pH7.6)による灌流固定を30分間行った。

灌流固定後、舌を摘出し、さらにKarnovsky固定液に一晩浸漬、固定した後、0.1Mカコジル酸緩衝液(pH7.4, 4℃)で洗浄し、D.S.Kマイクロスライサー(DTK1000, 堂阪イーエム)を用い200μm厚切片を作製した。切片はトリス塩酸緩衝液(pH7.6)に溶解

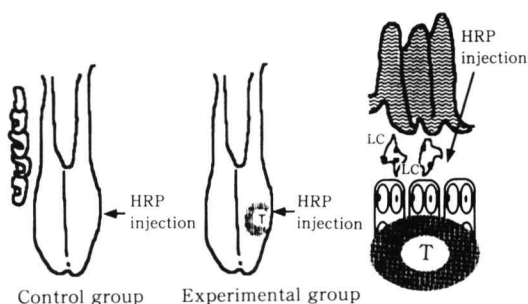


Fig. 1. Site where HRP was injected (arrow) in the control group (left) and the experimental group (center) as well as positional relationship (right) between tumor and lymphatic capillaries.

Abbreviations: T, tumor ; LC, lymphatic capillaries

した過酸化水素水・ジアミノベンチジン (DAB) 反応液を用いて室温で1時間反応させ、0.1 M カコジル酸緩衝液で調整した1%オスmium酸に1時間、後固定を行った。通法に従いアルコール上昇系列で脱水、Epon 812 に包埋した。Leica 型超マイクロトーム (ULTRACUTS / FSC) で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、毛細リンパ管を形態的に確認した後、ダイヤモンドナイフを使用して超薄切切片を作製し、無染色標本を日立H-7100型透過型電子顕微鏡で観察した。

なお、一部の動物では灌流固定後、舌の一次リンパ節である深頸リンパ節を摘出して、Karnovsky 固定液に浸漬して固定した。その後、DAB 反応を行い、通法に従ってエポン包埋し、トルイジンブルー染色切片を作製して光学顕微鏡用試料とした。

(5) 毛細リンパ管の鑑別

毛細リンパ管はその形態が毛細血管および細静脈と類似した特徴を有する。そのため、以下の基準に従い毛細リンパ管の鑑別を行った。

リンパ管は光学顕微鏡用トルイジンブルー染色切片では毛細血管に比べ、不定型の管状構造を有し、内皮細胞が菲薄である。これをリンパ管と判定して超薄切片を作製し、透過型電子顕

微鏡写真で最終的な鑑別を行った。毛細リンパ管の微細構造は毛細血管および細静脈と比較して、(i) 内皮細胞が菲薄で、(ii) 内皮細胞が周囲結合組織へ突出し輪郭が不規則であり、また、(iii) pericyte が欠如し、(iv) 基底板が不連続であるなどの特徴を有するものを複数の写真を総合して毛細リンパ管とした。

また、トレーサー注入試料では灌流固定を行っているため HRP は取り込まれた近在血管から速やかに流失し、組織間隙および毛細リンパ管内のみに残存することになる。このため、内腔に HRP を含む管状構造物を毛細リンパ管として観察した。

(6) 物質吸収関連構造の出現頻度の定量化

各動物の舌の超薄切切片において、1個体あたり5本のリンパ管の横断面を透過型電子顕微鏡を用いて直接倍率15,000倍で連続撮影して、最終倍率37,500倍とした写真上で細胞外形と pinocytotic vesicle (vesicle) および細胞間接着装置をトレースした後、vesicle の内皮細胞全体に占める割合 (vesicle の面積比)、および細胞間隙の長さに対する接着装置の長さの割合 (接着装置の長さの割合) を測定した (Fig. 2)。

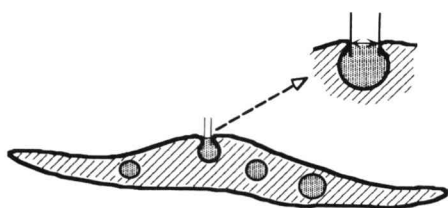
解析にはパーソナルコンピュータ (Apple) を使用し、画像解析用ソフト NIH Image (ver 1.59) を用いた。

Vesicle の割合は腫瘍血管の計測方法^{4,5)}に順じ、核を除いた細胞質面積に対する vesicle の占める面積の総和の指数とした。測定の対象とした vesicle は細胞膜に開口したものと細胞質内に散在したものに限定した。受容体と関連した動態を示すといわれる coated vesicle は計測より除外した。

計測値は InStat 2.03 for Macintosh (Graph Pad Softwear) を用いて統計学的に処理し、ノンパラメトリックによる Dunn's multiple comparisons test により、対照群および実験群における有意差 ($p < 0.01$) を検討した。

結 果

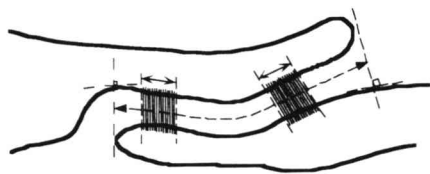
1. VX2 舌癌の腫瘍進達度



Areal ratio of vesicle

$$= \frac{\text{Total area of all vesicles}}{\text{Total area of cytoplasm except for nucleus}} \times 100 (\%)$$

A. Vesicle



Length ratio of adhesion apparatus

$$= \frac{\text{Total length of adhesion apparatus}}{\text{Total length of intercellular spaces}} \times 100 (\%)$$

B. Adhesiot apparatus

Fig. 2. Figures and formulas regarding methods of measuring the appearance frequencies of pinocytotic vesicle (A) and intercellular adhesion apparatus (B).

In pinocytotic vesicles with an opening on the cell membrane, the area of the vesicle was calculated as the minimal length of the cell membrane composing the opening.

腫瘍の最大径は移植後7日目が 8.66 ± 0.62 mm, 14日目が 13.08 ± 1.72 mmであった。腫瘍は経日的に増大し、上皮直下の毛細リンパ管網へと接近する傾向がみられた。

2. 対照群におけるリンパ管

生理食塩水を注入後7日目と14日目のウサギにおける舌の注入部毛細リンパ管は、無処置ウサギ舌の同等部位の毛細リンパ管との間には形態、HRP吸収ともに違いは認められなかったため、以下、すべて対照群としてまとめることにした。

光学顕微鏡下では毛細リンパ管は厚い角化層からなる糸状乳頭直下の粘膜固有層内に存在

し、薄い内皮細胞に囲まれ、核の内腔への突出が著しい管腔構造物として認められた。この毛細リンパ管は血管と比較して輪郭が不規則で、星型を呈していた (Fig. 3a)。

電子顕微鏡下では、粘膜固有層内の毛細リンパ管は内皮細胞の厚さが約 $0.5 \mu\text{m}$ と薄く、核以外は非薄化した形態を呈していた。内皮細胞は周囲組織へ突出し、pericyteが欠如し fenestra は認められなかった。

細胞質内には粗面小胞体、ゴルジ装置、vesicleなどの細胞内小器官が不規則に散在していた。内皮細胞の基底膜はほとんど認められず、細胞膜は直接に周囲結合組織と接していた。lymphatic anchoring filament¹⁵⁾はこの非管腔側細胞面から起こり、リンパ管周囲の結合組織を走行していた (Fig. 3b)。

内皮細胞間相互の連結は互いに向かい合って接していたり、嵌合あるいは重なり合うなど多様な形態を呈していた (Fig. 3c)。細胞間隙は約 20 nm であり、他の細胞質より電子密度の高い接着斑様構造を示した。

3. 実験群におけるリンパ管

(1) 腫瘍移植後7日目の毛細リンパ管

対照群と比較してリンパ管の内皮細胞は一段と非薄化し (Fig. 4a)、全体的に電子密度がやや高くなる傾向を呈していた。また、内皮細胞に散在する vesicle などの細胞内小器官の数が増加していた。

リンパ管の内皮細胞相互の連結は対照群よりさらに緩い状態にあり、junctionの存在する部位以外の細胞間隙は明らかに離開、拡大していた。しかし、内皮細胞間には発達が悪いが1箇所あるいはそれ以上の tight junction が存在し、完全に細胞間の開放された間隙は認められなかった (Fig. 4b)。

(2) 腫瘍移植後14日目の毛細リンパ管

リンパ管の内皮細胞は腫瘍移植後7日目に比べてさらに非薄化し、周囲結合組織への凹凸が減少し、核が平坦化していた (Fig. 5a)。細胞内小器官の分布には大きな変化はみられなかったが、vesicleの数はやや増加していた。内皮細胞

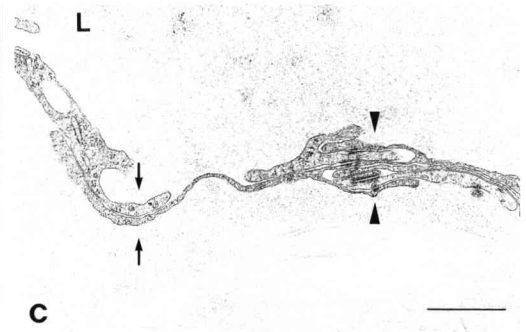
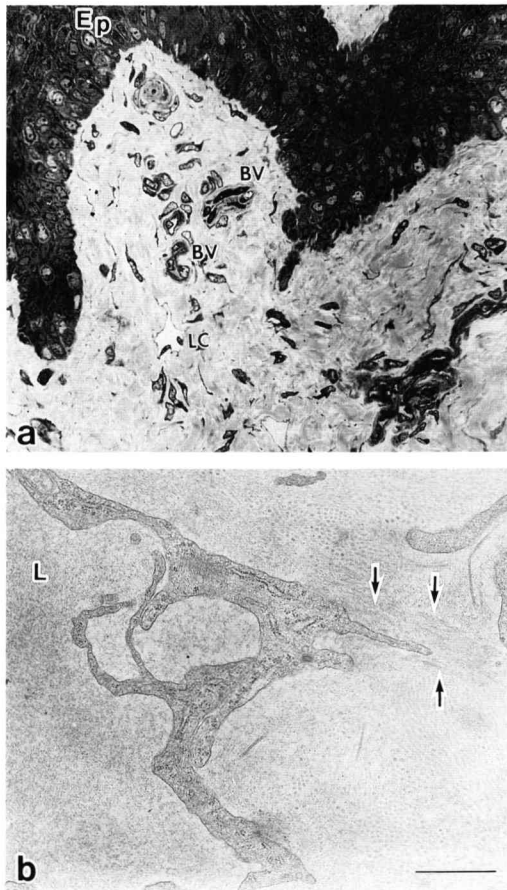


Fig.3. Lymphatic capillaries in lamina propria in normal tongue.

a : Lymphatic capillaries (LC) and blood vessels (BV) immediately below the epithelium (Ep) (toluidine blue staining, x 400).

Lymphatic capillaries were irregular in shape and showed a star-like appearance.

b : Lymphatic capillary wall is maintained by numerous anchoring filaments (arrows). L, lymphatic capillary lumen. Scale bar = 1 μ m

c : With respect to the mode of junction between endothelial cells, various morphologies were observed such as piled (arrows) or complex finger-like junction (arrow heads). L, lymphatic capillary lumen. Scale bar = 1 μ m

相互の接合様式には対照群でみられたような複雑な指状嵌合は減少していた。これらの間隙には脆弱ながら tight junction は必ず観察され、内皮細胞間隙が完全に離開するものは認められなかった (Fig.5b)。

4. トレーサーによる物質吸収動態の観察

(1) 対照群

HRP は注入 30 秒後には、すでにリンパ管腔内へと移行していた。多くの場合 HRP の存在を示す微細顆粒状物質は、毛細リンパ管の管腔および非管腔側全体にみられるのではなく、むしろ、細胞膜に蓄積する像として認められた。その分布は不規則であり、密または疎に分布する部位、あるいはほとんど存在しない部位などがみられた。リンパ管では内皮細胞の非管腔側に HRP を含む vesicle が多数認められた。こ

れらの HRP を含む vesicle は管腔側および非管腔側の細胞膜と結合あるいは開口するが、細胞質中にはほとんど観察できなかった。また、HRP は上皮接合部の狭い細胞間隙を通過後、リンパ管腔内に入り上皮接合部に蓄積していた (Fig.6)。

深頸リンパ節の光学顕微鏡用切片では髄洞内に HRP の存在を示す茶褐色の反応産物の分布が認められ (Fig.7), 舌に注入した HRP がリンパ管を介してリンパ節へと到達していることが確認された。

(2) 実験群

内皮細胞における vesicle の数は対照群と比較して増加していた。対照群では vesicle が非管腔側細胞膜に多く認められたが、実験群では管腔側細胞膜に多数存在し、しかも、そのほと

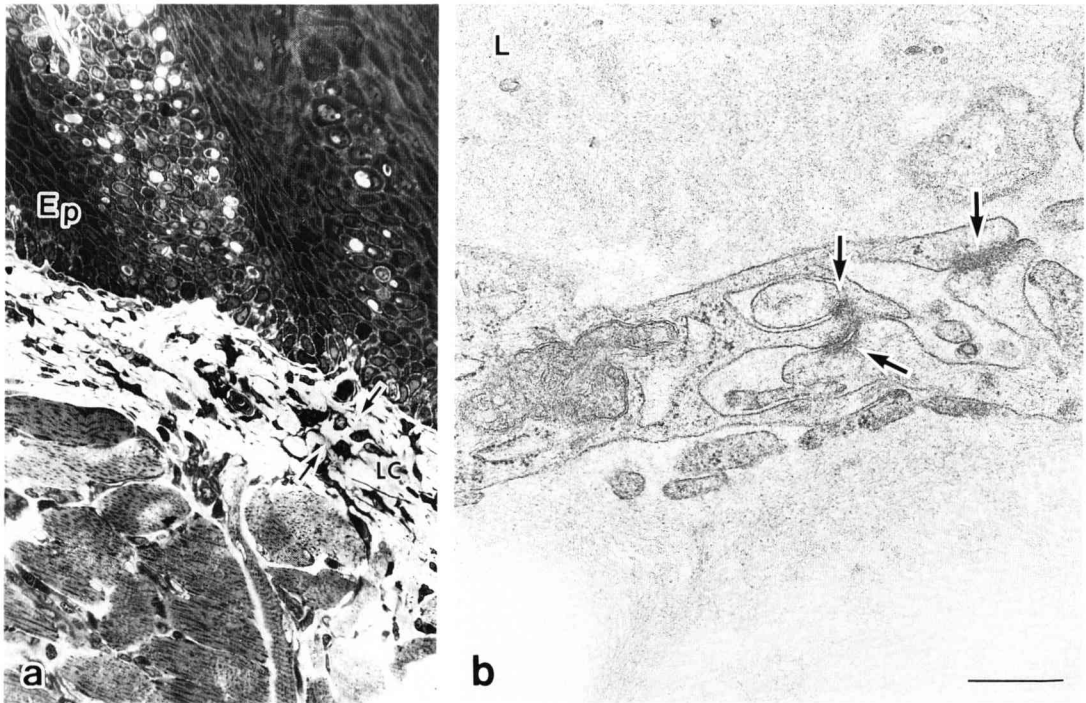


Fig.4. Lymphatic capillaries on the 7 days after tumor transplantation.

- a : Thinning was noted in endothelial cells of lymphatic capillaries (LC, arrows) immediately below the epithelium (Ep) composed to those in the control group (toluidine blue staining x 300).
- b : The connection between endothelial cells was weak. The intercellular space diverged and enlarged in the sites excluding the site where tight junction (arrows) was noted. L, lymphatic capillary lumen. Scale bar = 0.5 μ m

んどに HRP の貯留が認められた。また、内皮細胞の非管腔側より細胞間隙を通過し、管腔側に蓄積する HRP の量が増加していた (Fig. 8)。腫瘍移植後 7 日目および 14 日目の 2 群間には物質吸収の形態に明瞭な差違は認められなかった。

6. 物質吸収関連構造の出現頻度

(1) Pinocytotic vesicle の面積比

リンパ管の内皮細胞における vesicle の面積比は、対照群と比較して実験群において有意に高い傾向が認められた ($p < 0.01$)。すなわち、対照群では $6.21 \pm 0.16\%$ であるのに対し、腫瘍移植後 7 日目では $12.80 \pm 0.47\%$ および 14 日目が $16.50 \pm 0.76\%$ であった (Fig.9)。なお、fenestra および pore の出現は観察したすべてのリンパ管の内皮細胞には認められなかった。

(2) 細胞間隙における接着装置の長さの割合

接着装置の割合は対照群では $30.63 \pm 0.03\%$ 、実験群では腫瘍移植後 7 日目が $17.22 \pm 0.05\%$ および 14 日目が $14.50 \pm 0.03\%$ であり、対照群と比較して腫瘍移植後 7 日目および 14 日目とも有意に減少する傾向がみられた ($p < 0.01$) (Fig.10)。

考 察

VX2 舌癌におけるリンパ管の反応を 5'-nucleotidase 染色法を用いて光学顕微鏡的に検討した北原¹⁰⁾によると、腫瘍近接部のリンパ管は癌組織を取り囲むようにネットワークを形成し、また、リンパ管の口径は腫瘍の進展に伴い経日的に増加して行くことから、これらのリンパ管は物質吸収能が増加するものと考えられ

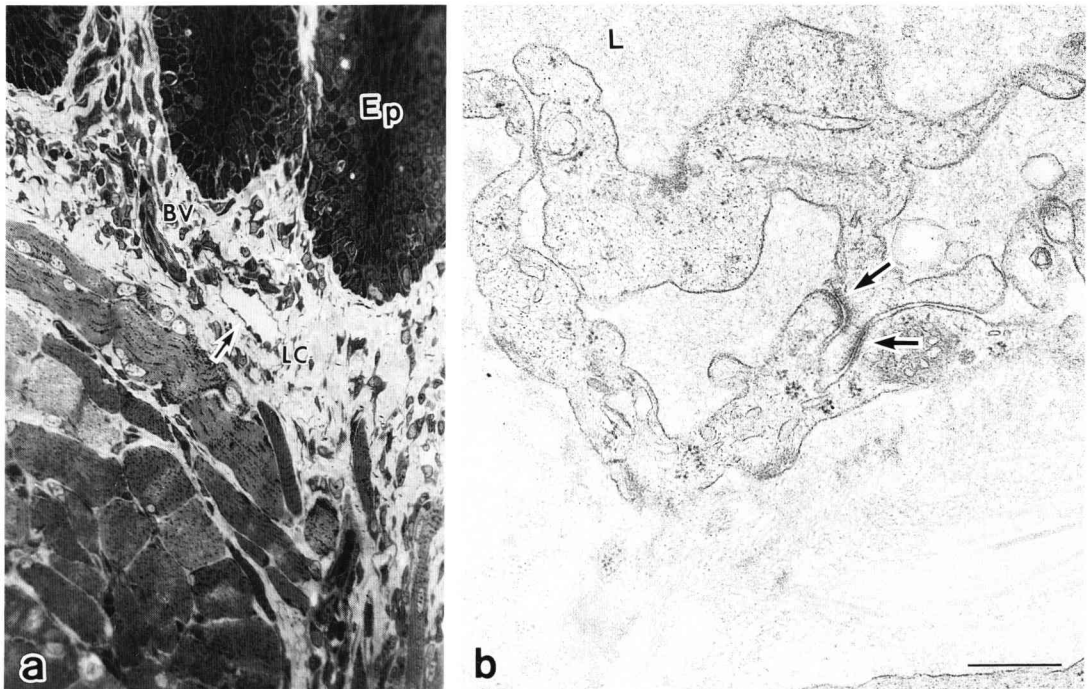


Fig.5. Lymphatic capillaries on the 14 days after tumor transplantation. a : Swelling of lymphatic capillaries (LC, arrow) was noted. Thinning of endothelial cells progressed compared to that 7 days after tumor transplantation. There was a decrease in the concavo-convex surface of peripheral connective tissues. Furthermore, nuclei became flat (toluidine blue staining x 300). Ep, epithelium ; BV, blood vessels ; The intercellular space diverged and enlarged, while tight junction (arrows) was existed. Scale bar = 0.5 μ m

ている。VX2 舌癌は舌深動脈伴行集合リンパ管を介して深頸リンパ節へ転移し、さらに、輸入リンパ管および辺縁洞からリンパ節内へと進展する^{16,17)}。本研究においても深頸リンパ節の髄洞内に HRP の存在を示す茶褐色の反応産物の分布が認められ、舌より注入した HRP がリンパ管系を介してリンパ節へと到達していることが推察された。リンパ行性転移には血管とリンパ管の接合部を介した経路も報告されている¹⁸⁾。しかし、VX2 舌癌ではリンパ系を主体とした転移経路のあることが推察され、腫瘍の浸潤および転移の発現に関して、腫瘍の周囲に存在するリンパ管の吸収能を検討することが重要である。

VX2 舌癌は内向性に増殖する傾向が顕著であり、特に筋層内における集合リンパ管は腫瘍

の増殖に伴い容易に破壊される。本研究では腫瘍の進展に伴って経時的に変化するリンパ管の物質吸収形態を検索するために、より再現性が高く、また、常に同一のものとして観察が可能である粘膜固有層内に存在する毛細リンパ管を検討した。VX2 舌癌は腫瘍移植後 7 日目および 14 日目とほぼ一定の浸潤、増殖の傾向をもって経日的に進展し、粘膜固有層内毛細リンパ管へと接近していた。

毛細リンパ管は透過型電子顕微鏡では対象動物あるいは器官により若干の違いはあるが、(i) 基底板は発達が悪く、欠如あるいは不連続である、(ii) 内皮細胞が薄い、(iii) 周囲結合組織へ内皮細胞が突出する、(iv) pericyte が欠如する、(v) 内皮細胞間の間隙および開放がみられる、(vi) pore または fenestration が存

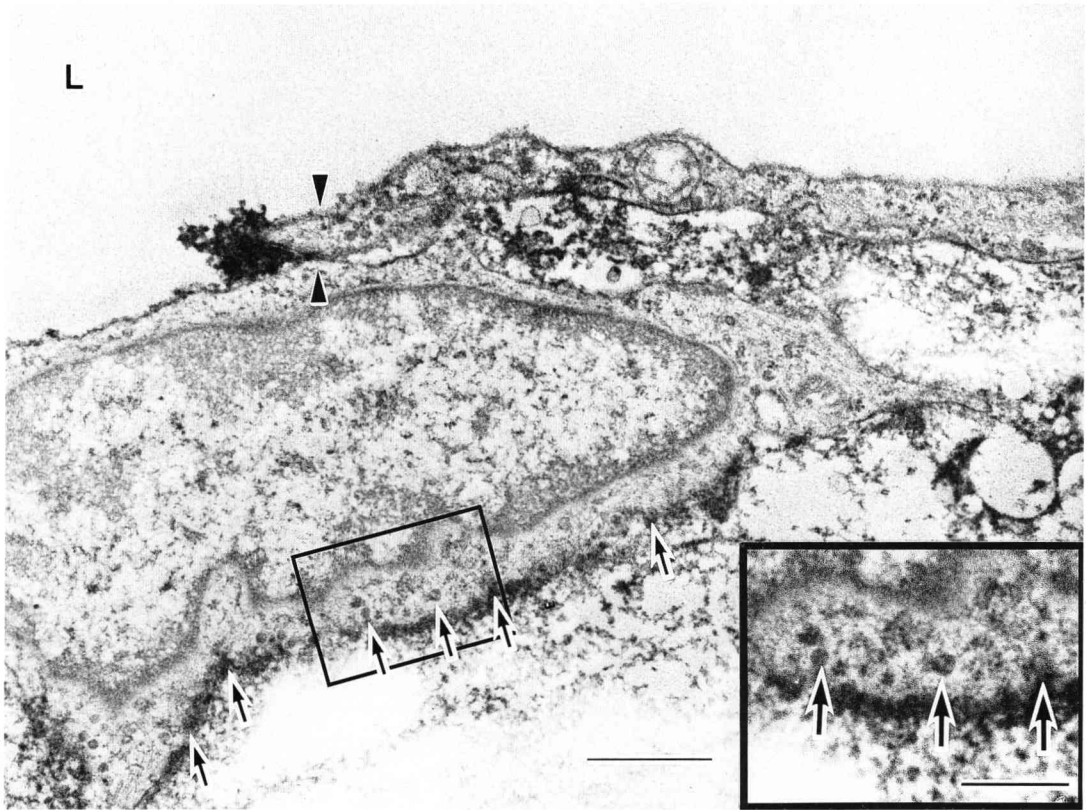


Fig. 6. Lymphatic capillary of the endothelial cells after HRP infusion in the control group.

A large number of pinocytotic vesicles (arrows) containing HRP were observed on the basal side of endothelial cells. HRP passed through the intercellular space (arrow heads) from the abluminal side, then accumulated within the lymphatic capillary lumen (L) (unstained). Scale bar=1 μm
 Insertion : Magnification of encircled with square. Scale bar=0.5 μm

在しない, (vii) anchoring filament が存在する, などの特徴が報告されている^{19, 20)}。VX2 舌癌の毛細リンパ管は舌糸状乳頭下の結合組織内に存在し, 内腔の形状は不整で, 特に内皮細胞が不規則に周囲結合組織へ突出することにより特徴づけられ, 他の器官でみられた毛細リンパ管の形態と基本的には同様であった。

毛細リンパ管の持つ大きな機能は過剰な組織間液の吸収にあり^{6, 21)}, その吸収様式には様々な経路が報告されてきた²²⁻²⁵⁾。吸収は使用トレーサーによる違いはあるが, (i) 内皮細胞内飲み込み小胞により運ばれる^{22, 23)}, (ii) 物質により内皮細胞内小胞と内皮細胞間の両方による^{24, 25)}, に大別できる。リンパ管には血管内皮細

胞に認められる fenestra および endothelial projection などの経路は存在しない。VX2 舌癌における腫瘍血管は fenestration および endothelial gap が主要な物質透過の経路であり, 内皮細胞間隙や pinocytotic vesicle の関与は少ないことが報告されている²⁶⁾。毛細血管内皮細胞に比較して, 大型の物質吸収に関与するといわれている毛細リンパ管内皮細胞の物質吸収経路を検索するため, 本研究では分子量 40,000 の HRP をトレーサーとして使用した。HRP は注入された粘膜固有層から周囲組織へと拡散し, リンパ管内に取り込まれる。一部 HRP は血管内にも取り込まれるが, 固定液の動脈灌流により HRP は近在血管内からは流れ

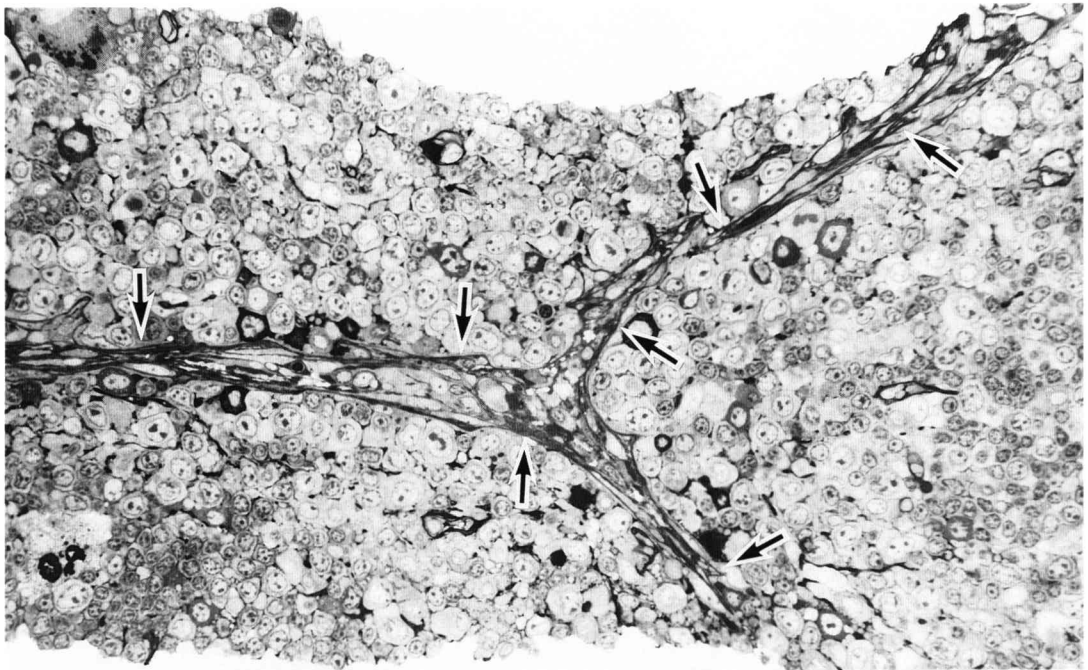


Fig. 7. Reactive products (arrows) suggesting the presence of HRP were distributed in the deep cervical lymph nodes involving even the medullary sinus (toluidine blue staining x 300).

去り、血管腔内には認められなかった。その結果、リンパ管では内皮細胞の非管腔側にHRPを含むvesicleを多数認め、また、HRPは非管腔側から細胞間隙を通過してリンパ管腔内に入ったところの内皮細胞膜上に蓄積していた。すなわち、毛細リンパ管内皮細胞では、HRPは周囲組織から細胞間隙およびpinocytotic vesicleを吸収経路として移動すると考えられる (Fig. 11)。さらに、この吸収様式を定量化するためにpinocytotic vesicleおよび細胞間隙における接着装置の長さの割合を検討した。

対照群では内皮細胞のHRPを含むvesicleは非管腔側に多く認められたが、実験群の腫瘍移植後7日目および14日目ではHRPを含むvesicleは非管腔側にはほとんどみられず、管腔側の内皮細胞膜に開口するものが数多く観察された。vesicleの局在は対照群では非管腔側にみられたが、実験群では管腔側に移動していたことから、腫瘍周囲組織ではvesicleを経路とするリンパ管内皮細胞の物質吸収能が亢進し

ていることを示唆していた。しかしながら、対照群および実験群ともHRPの蓄積するvesicleは細胞膜に結合あるいは開口するものが大多数を占め、内皮細胞質内にはHRPの蓄積するvesicleはほとんど認められなかった。

腫瘍血管における高分子の物質透過にはvesicleなどの内皮細胞内のオルガネラによる経路が最も重要であり、また、このオルガネラ自体の機能も亢進するとされている²⁷⁾。これらの構造は物質輸送のみならず細胞内カルシウム濃度の調節、あるいは、細胞内情報伝達に参与するものである²⁸⁾。腫瘍の存在する舌では、血管内皮細胞の物質透過性亢進^{3~5)}が明らかにされており、リンパ管内皮細胞内にvesicleの増加がみられたことは、リンパ管の持つ周囲組織の恒常性維持という役割⁶⁾を考えると、毛細リンパ管内皮細胞は積極的にその吸収機能を亢進しているものと推察される。すなわち、腫瘍影響下におけるリンパ管の吸収能の亢進は、単なるanchoring filament^{15, 29)}による物理的な管

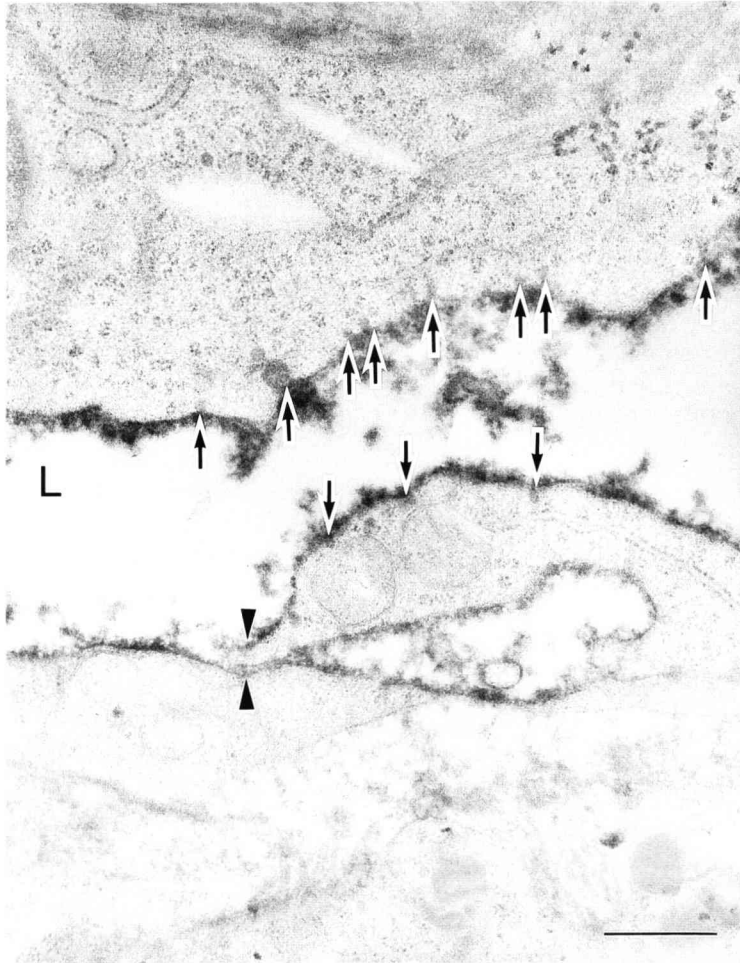


Fig.8. Lymphatic capillary endothelial cells after HRP injection in the experimental group (7 days after tumor transplantation).

A large number of pinocytotic vesicles (arrows) were present on the cell membrane on the luminal side. They passed through the intercellular space (arrow heads) from the abluminal side of endothelial cells. The level of HRP accumulating on the luminal side (L) increased (unstained). Scale bar = 1 μ m

腔の拡大によるものだけではないと考える。

毛細リンパ管内皮細胞の結合部には (i) 細胞の両端同士が接合した end-to-end junction, (ii) 一方の端が他方の上に重なる overlapping junction, (iii) 互いに接した部分がフォーク状を呈す folk-like junction, などが観察された。腫瘍が進展するにつれて、内皮細胞の間隙には嵌合を示すような複雑な形態が減少し、単なる重なりを示すようなものが増加

する傾向がみられた。また、対照群におけるリンパ管と比較して、腫瘍移植後7日目および14日目では細胞間隙に占める接着装置の割合が有意に減少していた。これらの所見から腫瘍の接近によりリンパ管の細胞間隙は物質吸収を効率よく行うために、より単純で loose な形態に変化しているものと思われた。リンパ管では物質の輸送が完全に解放された内皮細胞間隙によって行われるという報告もみられる³⁰⁾。しかし、

Areal ratio

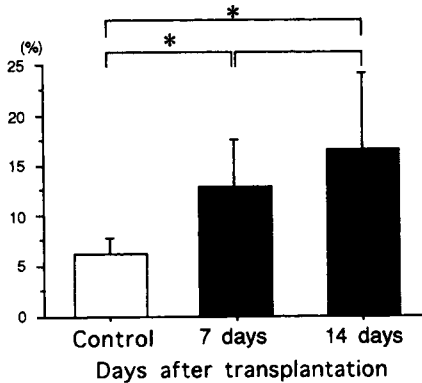


Fig.9. Areal ratio of pinocytotic vesicles in lymphatic capillary endothelial cells.

The ratio of vesicles in lymphatic capillary endothelial cells was significantly higher in the experimental group compared to that in the control group ($p < 0.01$). However, in the experimental group, findings did not significantly differ between 7 and 14 days after transplantation. Mean \pm SD,

* $p < 0.01$

Length ratio

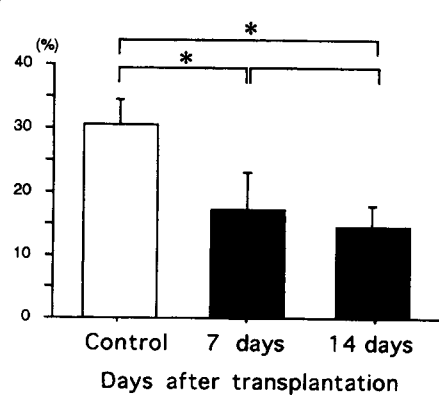


Fig.10. Length ratio of adhesion apparatus in the intercellular space of lymphatic capillary endothelial cells.

The ratio of adhesion apparatus device in the intercellular space was significantly decreased in the experimental group 7 and 14 days after transplantation compared to that in the control group ($p < 0.01$). However, in the experimental group, there was no significant difference between 7 and 14 days after transplantation. Mean \pm SD,

* $p < 0.01$

腫瘍移植後 14 日目においても内皮細胞間には tight junction が存在し、完全な離開を示すものは認められなかった。リンパ管の管腔は灌流圧が高くなるに従い、内皮細胞間が拡張し人工的に開口部が生じる³¹。この所見は内皮細胞間隙の微細構造を検討する場合、特に留意すべき点である。新鮮な標本または血管の灌流固定がなされた標本では内皮細胞間接合部の離開は存在しないことが示されている³²。本実験群で観察したリンパ管には内皮細胞間の完全離開は認められず、対照群に比べると少ないが、細胞間に必ず接着装置が存在していた。

細胞間隙において物質が tight junction を通過して輸送されるか否かに関しては議論が多い^{33,34}。毛細リンパ管の内皮細胞には fenestra による吸収経路は存在せず、vesicle による物質吸収にかなりの時間を要することが報告されている。また、HRP が非管腔側より細胞間隙を通過して管腔側に蓄積する像が認められた。毛

細血管を構成する内皮細胞間隙を接合する tight junction が必ずしも連続的ではなく、そのほとんどは不連続的であり、巨大分子も通過可能であるともいわれており³⁴、毛細リンパ管の内皮細胞間隙を通過する物質は tight junction の不連続部を通過して管腔内に吸収されることが推察された。

リンパ流は (i) 毛細血管透過性の亢進、(ii) 静水圧の増加、(iii) 血漿膠質圧の減少、などによって増加する³⁵。また、腫瘍血管においては旺盛な細胞増殖に対応する酵素や栄養素が供給されるため、一般に血管は非常に漏れやすい状態にあり、高分子物質の透過性は正常血管と比較して数倍高い状態にある³⁶。腫瘍周囲における毛細リンパ管は腫瘍血管の透過性を補正し、また、腫瘍の進展に伴い出現する代謝産物を吸収して組織や器官の恒常性を維持する役割⁶を果たすため、その機能が亢進しているこ

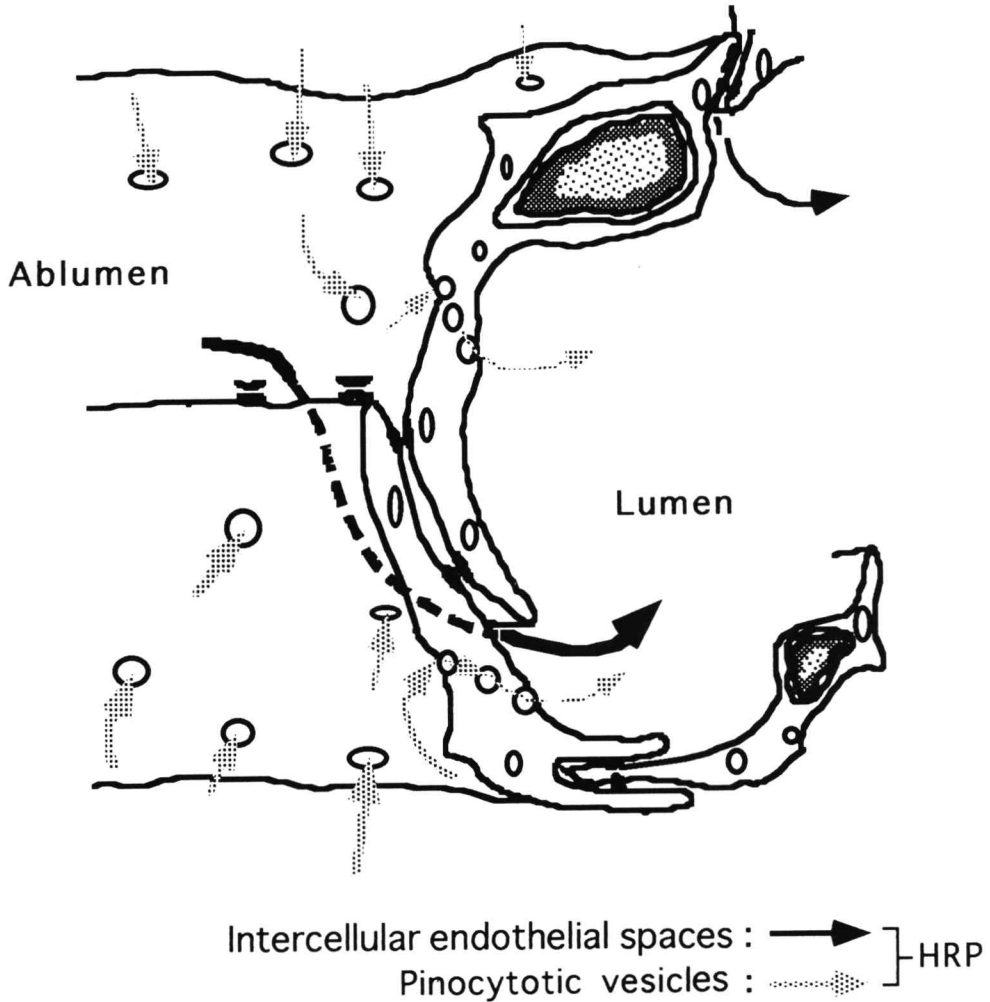


Fig.11. Route of absorption of HRP (arrows) in lymphatic capillary endothelial cells. HRP was absorbed by lymphatic capillaries via peripheral tissues, the intercellular spaces and pinocytotic vesicles.

とが考えられる。

本研究における物質吸収関連構造の経時的出現頻度から、VX2 癌細胞移植部位と離れた位置で、しかも、腫瘍細胞増殖の直接的影響を被らない時期、すなわち、腫瘍移植後7日目すでに粘膜固有層内毛細リンパ管に吸収能の亢進が認められたが、14日目においてもこの変化に大きな差は観察されなかった。腫瘍移植後21日目ではVX2 舌癌は粘膜固有層にまで進展し、一部壊死像を呈するようになり、また、リンパ管は萎縮し、吸収能の低下していることが

推測されている^{10,17)}。これらの報告と本研究の結果を併せ考えると、腫瘍の存在によるリンパ管の吸収能の亢進は、腫瘍移植後7日目でピークに達し、それが14日目まで維持され、それ以降は低下するものと考えられる。

胸膜腔にはリンパ管が直接に開口し、細胞の出入りの可能性を示唆する報告³⁷⁾がみられる。しかし、本研究に用いたウサギ舌にはそのようなリンパ管の開口部は認められなかった。一方、赤血球あるいは異種蛋白は、リンパ管中へ内皮細胞間隙を介して侵入することが報告^{38,39)}

されている。本研究の毛細リンパ管では、特に細胞間隙の接着装置が減少していることから、間隙を経路とする物質の通過が増加しており、腫瘍が進展してリンパ管に接近するようになると、腫瘍細胞のリンパ管内侵入が容易になることが予想される。

悪性腫瘍の浸潤、転移機構には複雑な過程が存在するため^{40,41)}、ひとつの実験モデルによって説明することは適切ではない。従って、本研究ではこの過程の全てを考察することはできない。しかし、腫瘍の進展に伴ってリンパ管の物質吸収能の亢進が示唆されたことは、腫瘍の浸潤、転移という生物学的現象を解明するためには、腫瘍と腫瘍周囲組織の微小循環に毛細リンパ管の果たす役割がきわめて重要であることを示唆している。

結 論

HRP をトレーサーに用いて、ウサギ VX2 舌癌モデルにおける腫瘍周囲毛細リンパ管の組織中らの物質吸収動態を経日的に検討し、以下の結論を得た。

1. VX2 舌癌は経日的にはほぼ一定の割合で増大し、観察対象の上皮直下に存在する毛細リンパ管へ接近する傾向がみられた。

2. リンパ管の形態は対照群と比較して腫瘍移植後 7 日目および 14 日目では、内皮細胞が対照群と比較してさらに菲薄化し、内皮細胞に散在する vesicle などの細胞内小器官の数が増加していた。また、内皮細胞相互の接合は複雑な嵌合を示す間隙が減少していた。

3. 対照群のリンパ管では内皮細胞の非管腔側に HRP を含む vesicle が多数認められた。さらに、HRP は非管腔側から細胞間隙を通過し、リンパ管腔内の入り口に蓄積していた。

4. 腫瘍移植後 7 日目および 14 日目では対照群の非管腔側細胞膜に存在していた vesicle が管腔側細胞膜に多数認められた。また、内皮細胞の非管腔側より細胞間隙を通過し、管腔側に蓄積する HRP の量が増加していた。

5. リンパ管の内皮細胞における vesicle の

出現頻度は、対照群と比較して実験群で有意に高い傾向を認めた。

6. 細胞間隙における接着装置の割合は対照群と比較し、腫瘍移植後 7 日目および 14 日目では有意に減少していた。

7. リンパ管の内皮細胞における HRP の吸収には、細胞間隙と vesicle を介した 2 経路が関与し、腫瘍の進展に伴い、これらリンパ管の物質吸収能が亢進することが示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、ご懇切なるご指導、ご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解剖学第一講座野坂洋一郎教授と口腔病理学講座教授佐藤方信教授にご深謝致します。また、数々のご教示、ご助言をいただきました口腔解剖学第一講座藤村 朗助教授および笹原健児博士、また、ご協力いただきました関連講座の諸先生方に厚くお礼申し上げます。VX2 癌細胞の提供に関してご協力いただいた鹿児島大学歯学部口腔外科学第一講座山下佐英教授に厚く謝意を表します。

なお、本論文の要旨は第 21 回日本微小循環学会総会(1996年2月,千里市)および第 50 回日本口腔科学会総会(1996年4月,鹿児島市)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7年度大学院重点特別経費の補助を受けて行った。

文 献

- 1) Folkman, J.: What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl. Cancer Inst.* 82: 4-6, 1990.
- 2) Nagy, J. A., Brown, L. F., Senger, D. R., Lanir, N., Van De Water, L., Dvorak, A. M., and Dvorak, H. F.: Pathogenesis of tumor stroma generation: a critical role for leaky blood vessels and fibrin deposition. *Biochim. Biophys. Acta.* 948: 305-326, 1988.
- 3) 久慈昭慶: ハムスター誘発舌扁平上皮癌の血管透過性に関する電子顕微鏡的研究, 岩医大歯誌, 13: 290-307, 1988.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Crystal, R. G., and West, J. B.: The lung: Scientific Foundations. 1st ed., Raven Press Ltd., New York, pp779-786, 1991.
- 7) Kato, S., and Miyachi, R.: Enzyme-histochemical visualization of lymphatic capillaries in the mouse tongue: Light and electron microscopic study. Okajimas Folia Anat. Jpn. 65: 391-404, 1989.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 遠藤光宏, 中山温史, 福田喜安, 斎藤恒夫, 瀬川清, 横田光正, 大屋高德, 工藤啓吾, 佐藤方信: 口腔癌における毛細リンパ管の酵素組織化学的染色法—5'-Nase-ALPase 二重染色法の標本作製条件について—, 頭頸部腫瘍, 20: 44-49, 1994.
- 12) Varma, A. K., and Mori, M.: Oral Oncology IV B. Proceedings of the 4th International Congress on Oral Cancer. Macmillan India Limited, New Delhi, pp 237-240, 1995.
- 13) Kidd, J. G., and Rous, P.: A transplantable rabbit carcinoma originating in a virus-induced papilloma and containing the virus in masked or altered form, J. Exp. Med. 71: 813-838, 1940.
- 14) 外山勲吾: 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) Leak, L. V., and Burke, J. F.: Ultrastructural studies on the lymphatic anchoring filaments. J. Cell Biol. 36: 129-149, 1968.
- 16) 陳寛宏, 藤村朗: ゴールデンハムスターの舌におけるリンパ管の走行, 岩医大歯誌, 19: 91-102, 1994.
- 17) 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.
- 18) Lippman, M. E., and Dickson, R. B.: Breast Cancer: Cellular and Molecular Biology. Kluwer Academic Publishers, Boston, pp223-238, 1988.
- 19) Fraley, E. E., and Weiss, L.: An electron microscopic study of the lymphatic vessels in the penile skin of the rat. Am. J. Anat. 109: 85-101, 1961.
- 20) 森堅志: 末梢リンパ管の形態学的研究法, 微細構造, 並びに血管との位置関係, 解剖誌, 54: 1-20, 1979.
- 21) Kotani, M.: The lymphatic and lymphoreticular tissues in relation to the action of sex hormones. Arch. Histol. Cytol. 53 (suppl.): 1-76, 1990.
- 22) 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.
- 23) Dobbins, III, W. O., and Rollins, E. L.: Intestinal mucosal lymphatic permeability: An electron microscopic study of endothelial vesicles and cell junctions. J. Ultrastruct. Res. 33: 29-59, 1970.
- 24) Casley-Smith, J. R.: A fine structural study of variations in protein concentration in lacteals during compression and relaxation. *Lymphology* 12: 59-65, 1979.
- 25) Azzali, G.: Transendothelial transport of lipids in the absorbing lymphatic vessel. *Experientia* 38: 275-277, 1982.
- 26) 辻本守考: VX2 腫瘍内血管における外因性 peroxidase および ferritin の透過性に関する電顕的・細胞化学的研究, 日口外誌, 28: 341-359, 1982.
- 27) Kohn, S., Nagy J. A., Dvorak, H. F., and Dvorak, A. M.: Pathways of macromolecular tracer transport across venules and small veins. Structural basis for the hyperpermeability of tumor blood vessels. *Lab. Invest.* 67: 596-607, 1992.
- 28) Fujimoto, T.: Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. *J. Cell. Biol.* 120: 1147-1157, 1993.
- 29) Leak, L. V.: Electron microscopic observations on lymphatic capillaries and the structural components of the connective tissue-lymph interface. *Microvasc. Res.* 2: 361-391, 1970.
- 30) Ladman, A. J., Padykula, H. A., and Strauss, E. W.: A morphological study of fat transport in the normal human jejunum. *Am. J. Anat.* 112: 389-419, 1963.
- 31) Castenholtz, A.: Morphological characteristics of initial lymphatics in the tongue as shown by scanning electron microscopy. *Scan. Electron Microsc.* III: 1343-1352, 1984.
- 32) 藤川和生, 鈎スミ子: 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.
- 33) Coomber, B. L., and Stewart, P.A.: Morphometric analysis of CNS microvascular endothelium. *Microvasc. Res.* 30: 99-115, 1985.
- 34) Bundgaard, M.: The three-dimensional organization of tight junctions in a capillary endothelium revealed by serial-section electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 88: 1-17, 1984.
- 35) Fawcett, D.W.: A text book of histology. 1st ed, W. B. Saunders Co., Philadelphia, pp400-404, 1986.
- 36) Dvorak, H. F., Nagy, J. A., Dvorak, J. T., and

- Dvorak, A. M.: Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules. *Am. J. Pathol.* 133 : 95-109, 1988.
- 37) 黄 政典, 飯村 彰: ラット肋骨胸膜の stomata とリンパ管, *リンパ学*, 15 : 1-11, 1992.
- 38) 鈎スミ子, 水谷容子, 藤川和生, 西 厚生, 宮越 一穂, 豊田徳雄, 大嶋雅美, 神原 忠: リンパ管の構造とリンパ流, *脈管学*, 19 : 151-157, 1979.
- 39) Shimada, T., Zhang, L., and Oya, M.: Architecture and function of the extravascular fluid pathway : special reference to the macula cribiformis in the diaphragm. *Acta. Anat. Nippon* 70 : 140-155, 1995.
- 40) Blood, C.H., Zetter, B. R.: Tumor interactions with the vasculature : angiogenesis and tumor metastasis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1032 : 89-118, 1990.
- 41) Sugino, T., Kawaguchi, T., and Suzuki, T.: Sequential process of blood-borne lung metastases of spontaneous mammary carcinoma in C3H mice. *Int. J. Cancer* 55 : 141-147, 1993.