

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

齋藤 恒夫

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 : This study evaluated the relationship between the growth of transplanted rabbit VX-2 tongue cancer and the changes of blood flow in a lymph node with primary metastasis. Rabbits were anesthetized by injecting 25mg/kg pentobarbital sodium into the auricular vein. The gross tumor size and the blood flow in the tongues and the deep cervical lymph node of 5 animals each of the non-transplanted group and transplanted groups were measured 7, 14 and 21 days after transplantation of VX2 cancer, and their relationships were evaluated. Newly formed vessels around the transplanted tongue cancer were examined through scanning electron microscopy of vascular casts. The blood flow was measured using a laser flowmeter (ALF21, ADVANCE).

The volume of the transplanted tumor and the size of the deep cervical lymph node increased progressively. The blood flow of tongue did not increase significantly 7 days after transplantation, compared with the non-transplanted group, but it increased significantly after 14 days and decrease significantly after 21 days. The blood flow of the deep cervical lymph node did not increase significantly 7 days after transplantation, compared with the normal group, but it increased significantly after 14 and 21 days. Scanning electron microscopy of vascular cast specimens showed defects of the vasculature and newly formed vascular networks at the sites of cancer cell proliferation. Positive correlations were observed between tumor volume and tongue blood flow ; deep cervical lymph node (L. N.) blood flow and tumor volume ; the shortest diameter/the longest diameter ratio of the deep cervical lymph node (S/L) and tumor volume ; S/L and tongue blood flow ; S/L and L. N. blood flow ; tongue blood flow and L. N. blood flow. These results suggest that daily measurement of the blood flow of transplanted VX2 tongue cancer allows estimation of the presence or absence of metastasis in the deep cervical lymph node.

Key words : VX2 tongue cancer, deep cervical lymph node, laser flowmeter

緒 言

頸部リンパ節転移は口腔癌の予後を左右する重要な因子の一つであり^{1, 2)}、口腔癌の治療成績を向上させるためには、より正確な診断がき

わめて重要である。頸部リンパ節転移を判定する最低必要条件は頸部の触診にあるが、その診断には限界がある。そのため 1987 年の UICC の TNM 分類³⁾では頸部リンパ節転移の有無の判定に画像診断の評価が新たに加えられ、最近

Measurement of blood flow in the tongue and the metastatic lymph node on rabbit VX2 tongue cancer using a laser blood flowmeter.

Nobuo SAITO

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

岩手県盛岡市中央通 1 丁目 3 - 27 (〒 020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 21 : 257 - 270, 1996

ではコンピュータ断層法 (CT), 磁気共鳴画像法 (MRI), 超音波断層法 (US) などを併用している施設が多い^{4~6)}。しかし, その正診率は35%から81%⁵⁾と巾があり, 必ずしも一定した結果が得られていないことから, より信頼性の高い診断方法の確立が望まれている。

従来、頸部リンパ節転移に関する研究は数多くなされてきた^{4~17)}。しかし、その機序や病態像については必ずしも統一された見解はみられず、未だ不明な点が多い。実験的移植癌においては転移リンパ節の細胞反応¹³⁾や血管構築¹⁷⁾は経時的に変化する。松浦¹³⁾のウサギ VX2 移植舌癌モデルにおける頸部リンパ節の細胞反応は、転移形成以前より観察され、それが移植癌の進展に伴って経日的に変化したと述べている。このことからリンパ節の血流量も腫瘍組織の増殖に伴って経日的に変動することが考えられるが、これまで転移リンパ節の血流量に関する報告はほとんどみられない。一方、実験腫瘍組織の血流量は1961年にGullinoら¹⁸⁾がはじめて腫瘍の血流を測定して以来、水素ガスクリアランス法、Xeクリアランス法、交叉熱電対法など様々な方法による報告^{19~21)}が行われているが、これらはいずれも組織侵襲を伴う方法である。1975年にStern²²⁾が皮膚の血流をレーザーで捉えて以来、レーザー血流測定法は非侵襲的で簡便であることから、精度の高い血流測定法として臨床に応用されるようになってきた。しかし、口腔癌の血流動態に関する報告はない。

著者は、ウサギ VX2 舌癌と一次転移リンパ節である深頸リンパ節の血流量を経日的にレーザー血流計によって測定し、舌腫瘍組織の増殖に伴う転移深頸リンパ節の血流動態の推移について検討した。

材料および方法

1. 実験材料

(1) 実験動物

使用動物には、体重約3.0 kgの日本白色種雌性ウサギ (船橋農場) 20 匹を用い、岩手医科大

学歯学部動物舎 (室温: 23 ± 2°C, 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。約1週間、予備飼育し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、実験に供した。

(2) 実験腫瘍

腫瘍は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 VX2 癌²³⁾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され、当講座で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。

(3) 血流測定装置

血流計は Advance Laser flowmeter AFL 21 (アドバンス) を用いた。測定値は分析演算され、total blood flow として組織 100 g 当たりの1分間の血流量 (ml/min/100 g) に補正して表示される。測定範囲はプローブ接触部の周囲が約1 mm、深さは約1 mmである。

2. 実験方法

(1) 移植方法

伊藤らの方法²⁴⁾に準じてウサギ大腿部筋肉内に継代移植した VX2 癌腫瘍組織片を無菌的に取り出したのち細切し、生理的食塩水 (注射用、大塚製薬) にて数回洗浄した。この洗浄液を遠心分離器にかけ、癌細胞をペレット状に集め、生理的食塩水にて容積比50%に調整した。この VX2 癌細胞浮遊液 0.1 ml (細胞数約 5×10^5 個) を、舌尖より $\frac{1}{3}$ 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。

(2) 血流測定法

Pentobarbital sodium (ネブタール®) 25 mg/kg をウサギ耳静脈内へ投与して麻酔し、5分以上を経過してから、非移植群および実験群の VX2 癌移植後7日目、14日目、21日目 (各5匹) の舌および深頸リンパ節の血流量を D 型プローブを用いて測定した。測定に際してはプローブの接触圧を可及的に一定に保持した。測定部位は舌前方 $\frac{1}{3}$ の舌中隔部舌背と深頸リンパ節の最大豊隆部表層とした。深頸リンパ節の測

定は、麻酔後、頸部正中から皮切を加え、深頸リンパ節を露出した後、リンパ節の最大豊隆部表層にプローブを固定した。血流計は Advance Laser flowmeter AFL 21 (アドバンス) を用い、チャートスピードを 60 mm/min に設定したプリンターをレーザー血流計に接続して、5 分間 (5 秒間隔) の測定値を記録した。

(3) 血圧の測定

血圧はイヌおよびネコの非観血的血圧測定の報告²⁵⁾に準じて、血圧監視装置 BP-8800 (日本 COLIN) を用い、麻酔後の後肢前脛骨動脈にて新生児用カフ (幅 2.5 cm) を代用した。血流測定中は 1 分ごとに監視した。

(4) 舌移植部腫瘍および深頸リンパ節の肉眼的観察

舌腫瘍の大きさは、触知可能な硬結をもって表わし、便宜的に腫瘍の幅径、前後径、厚さをノギスで計測し、腫瘍体積 (mm³) とした。また、深頸リンパ節は摘出した後、長径および短径をノギスにて計測し、短径/長径比 (以下、S/L 比) を求めた。

(5) 血管鑄型標本の走査型電子顕微鏡的観察

鑄型走査型電子顕微鏡法による血管の観察には、メタクリレート注入剤 (メルコックス® : 大日本インキ工業) を用いた。ネブタール® の静脈内麻酔下で両側総頸動脈にカテーテルを挿入し結紮固定した。そして両側内頸静脈に切開を加え、ヘパリン加滅菌生理的食塩水約 500 ml にて灌流し瀉血後、1% グルタルアルデヒド溶液にて灌流固定を行った。その後、直ちにメルコックス® をカテーテルから 110 mmHg 前後の圧力で注入し、樹脂の硬化を確認してから舌および両側深頸リンパ節を摘出した。摘出した舌および深頸リンパ節を 2.5% 次亜塩素酸ナトリウム溶液に約 24 時間浸漬し、軟組織を腐蝕させた後、流水にて水洗し、直ちに凍結乾燥後、アルミニウム試料台に付着させて白金蒸着を施し鑄型標本とした。血管鑄型標本の観察には H-800 走査型電子顕微鏡 (日立) を用いた。

(6) 統計処理

血流測定値、舌腫瘍体積および深頸リンパ節の短径、長径および S/L 比の有意差の検定には統計用ソフト InStat 2.03® (Graphpad Softwear) を用いて、ノンパラメトリックスによる Dunn's multiple comparisons test を行った。さらにこれら各々の相関関係については統計用ソフト StatView-J 4.5® (ABACUS Concepts) を用いて Pearson's correlation coefficient にて検定した。

結 果

1. ウサギの血圧

血圧は体動の影響を受けるため麻酔施行前には測定し得なかった。麻酔施行後の血圧は非移植群と VX2 癌移植実験群との間には有意差がなく、収縮期血圧が 71 mmHg から 92 mmHg、拡張期血圧が 42 mmHg から 54 mmHg の範囲で変動していた。

2. 舌腫瘍の経日的変化

VX2 癌移植後 7 日目では、視診では移植相当部にび慢性の腫脹を認めたが、上皮には明らかな変化を認めなかった。しかし、触診では直径約 7 mm から 9 mm の腫瘤を触知した。14 日目になると腫瘍は直径約 10 mm から 15 mm と増大傾向を示し、5 例中 1 例に粘膜表面に潰瘍の形成を認めた。さらに VX2 癌移植後 21 日目になると腫瘍は直径約 17 mm から 23 mm と増大し、全例とも粘膜表面に壊死を伴う潰瘍を認めた。

腫瘍体積 (mm³) は、VX2 癌移植後 7 日目では 591.05 ± 90.44、14 日目では 2024.61 ± 580.82、そして 21 日目では 7393.51 ± 865.14 と経日的に増大したが、腫瘍増大の速さは一定ではなく、VX2 癌移植後 14 日目から 21 日目に急激に増大した (Fig.1)。

3. 深頸リンパ節の大きさ

深頸リンパ節の長径 (mm) は、VX2 癌非移植群では 11.86 ± 0.80 であったのに対し、VX2 癌移植後 7 日目には 17.62 ± 0.82、14 日目には 20.06 ± 1.19、そして 21 日目には 21.34 ± 0.72 と経日的に増加していたが、各群の間に有意差は認められなかった。一方、深頸リンパ節の短

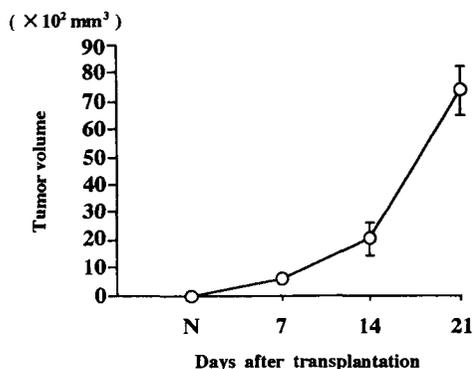


Fig. 1. The volume (mm³) of the VX2 tongue cancer increased progressively after transplantation, but the rate of the increase was not constant, being higher between 14 and 21 days after transplantation. Data are presented as mean + SD. * $p < 0.01$: Significantly different from the value of each group. N: Non-transplanted group.

径 (mm) は、VX2 癌非移植群が 3.24 ± 0.33 であったのに対し、VX2 癌移植後 7 日目には 5.24 ± 0.50 、14 日目には 7.56 ± 0.64 、そして 21 日目には 11.56 ± 0.53 と経時的に有意に増加していた。深頸リンパ節の S/L 比は、VX2 癌非移植群が 0.27 ± 0.04 、移植後 7 日目が 0.29 ± 0.01 と有意な変化を示さなかったが、移植後 14 日目には 0.38 ± 0.03 、さらに移植後 21 日目には 0.54 ± 0.02 と移植後 14 日目を降になると有意に増加していた (Fig. 2)。

4. 舌の血流測定値

舌の血流測定値 (ml/min/100 g) は、VX2 癌非移植群が 22.70 ± 2.34 であったのに対して、VX2 癌移植後 7 日目には 25.37 ± 4.92 と有意差を認めなかったが、移植後 14 日目には 46.48 ± 4.81 と有意に増加した。しかし移植後 21 日目には 38.16 ± 2.68 と移植後 14 日目例と比較して有意に減少した (Fig. 3-A)。いずれの測定値も前述の血圧の変動範囲内では影響を受けなかった (Fig. 3-B)。

5. 深頸リンパ節の血流測定値

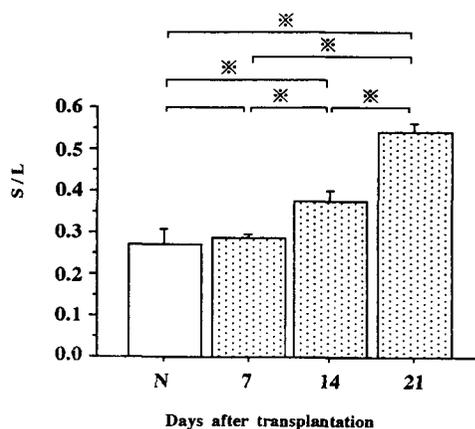


Fig. 2. The shortest diameter / longest diameter ratio of the deep cervical lymph node showed no significant changes 7 days after transplantation, but it increased significantly after 14 or more days. S/L: The shortest diameter / longest diameter ratio of the deep cervical lymph node. Data are presented as mean + SD. * $p < 0.01$: Significantly different from the value of each group. N: Non-transplanted group.

深頸リンパ節の血流測定値 (ml/min/100 g) は、VX2 癌非移植群が 13.26 ± 2.96 であったのに対し、VX2 癌移植後 7 日目には 14.08 ± 3.69 、14 日目には 20.30 ± 2.46 、さらに移植後 21 日目には 22.72 ± 1.97 と経時的に有意な増加を示していた (Fig. 4-A)。深頸リンパ節においても血流量は血圧の変動の影響を受けなかった (Fig. 4-B)。

6. 血管鑄型標本の走査型電子顕微鏡所見

舌の血管鑄型法による電顕所見では、VX2 癌移植後 3 日目には移植相当部に一致して血管網の欠如部位が観察され、その周囲に太さの増した血管 ($65 \sim 106 \mu\text{m}$) と新生血管網が認められた (Fig. 5-a, b)。VX2 癌移植後 7 日目には移植相当部に著明な血管新生を認めた。すなわち、移植相当部を中心とした新生血管網が観察され、移植癌細胞の増殖部位に一致して血管網が城郭状に欠如していた (Fig. 6-a, b)。さらに

A

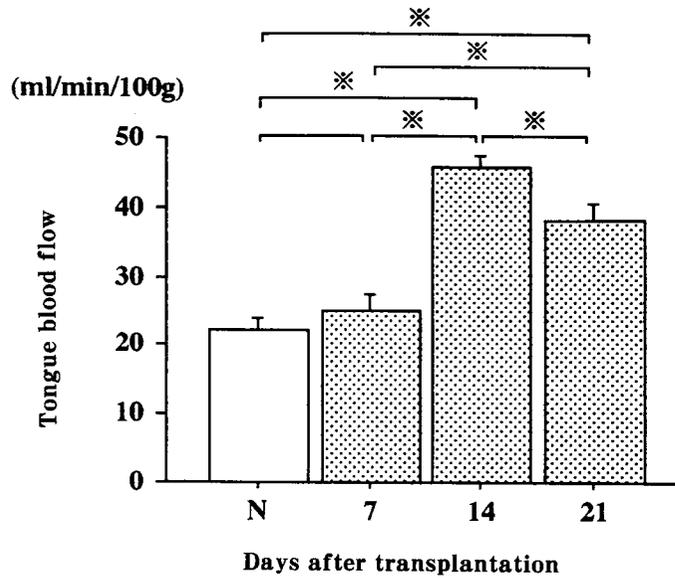


Fig.3-A. The blood flow of the transplanted tongue cancer was not significantly different 7 days after transplantation, but it increased significantly after 14 days and decreased significantly after 21 days. Data are presented as mean + SD. * $p < 0.01$: Significantly different from the value of each group.

B

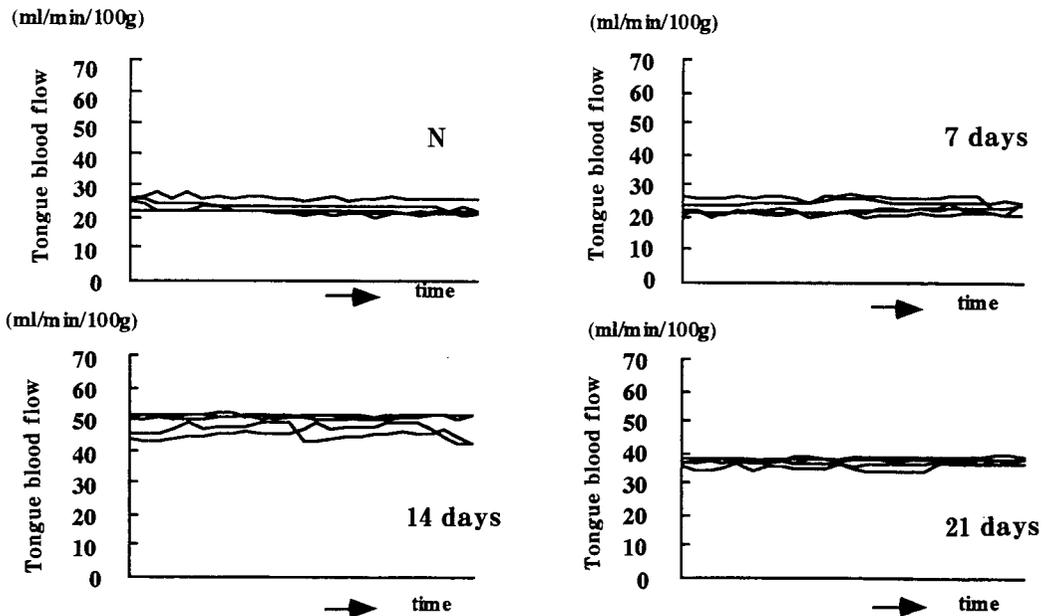


Fig.3-B. The values in the non-transplanted group or the tumor transplanted groups were not affected by changes in the blood pressure. N: Non-transplanted group.

A

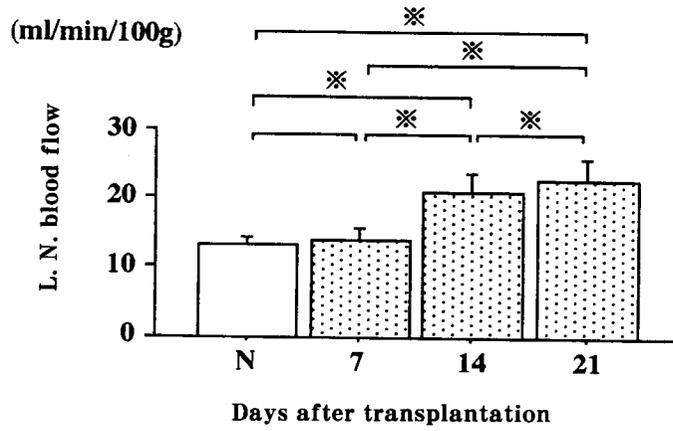


Fig.4-A. The blood flow of the deep cervical lymph node increased progressively. Data are presented as mean + SD. * $p < 0.01$: Significantly different from the value of each group.

B

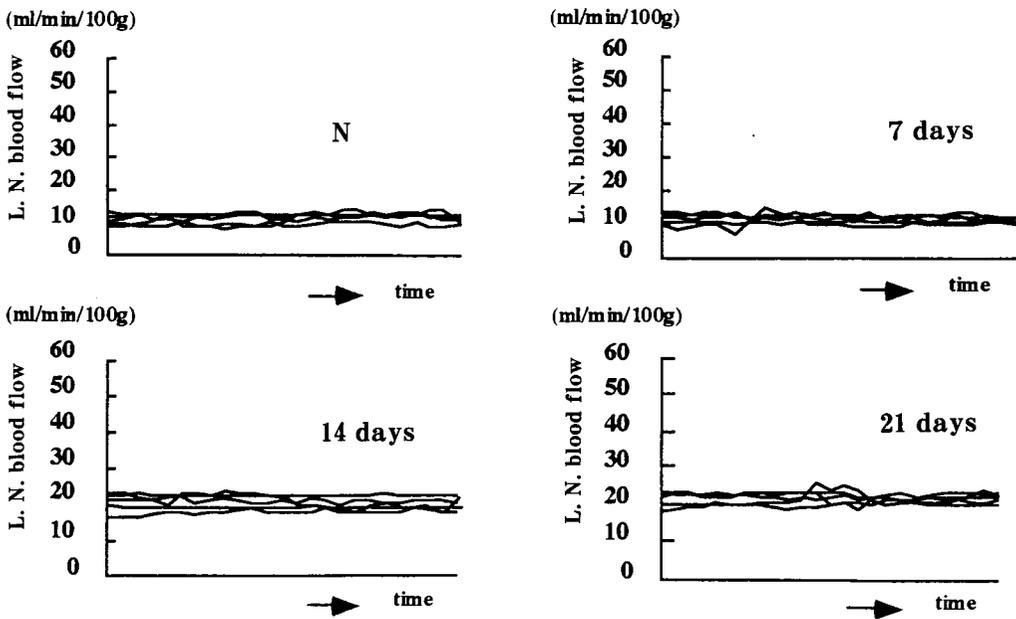


Fig.4-B. The values in the non-transplanted group or the tumor transplanted groups were not affected by changes in the blood pressure. N: Non-transplanted group.

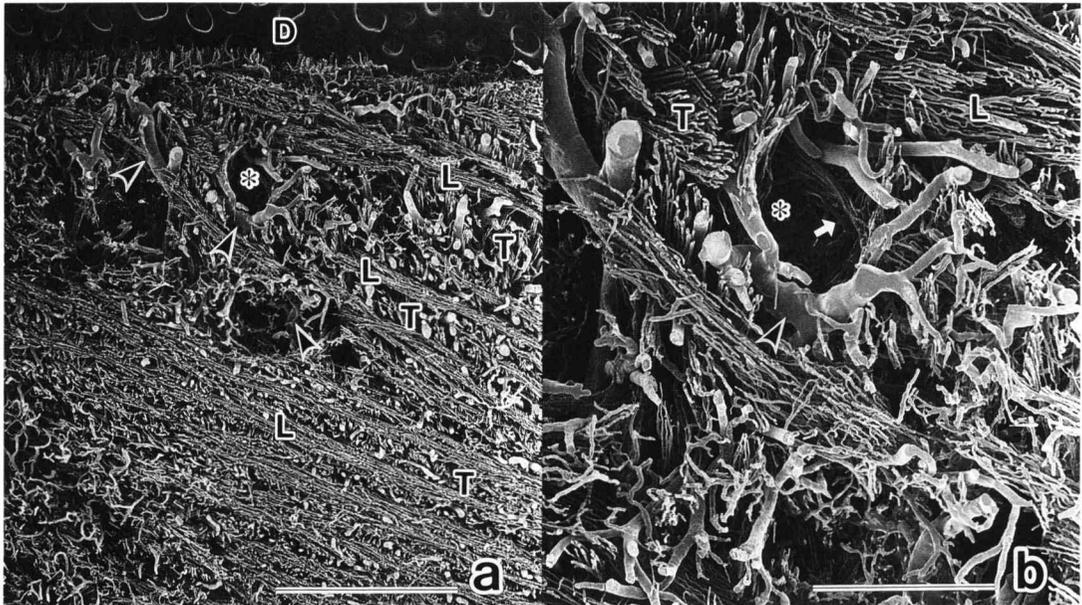


Fig.5. Defects of the vasculature (asteric) at sites of tumor transplantation were observed 3 days after transplantation of VX2 cancer. a : Dilated vessels and newly formed vascular networks were observed around the defects. Scale bar=1500 μm b : An enlargement of the same region. Scale bar=600 μm D : Lingual dorsum, L : Blood vessels in the longitudinal muscle, T : Blood vessels in the transverse muscle, \blacktriangleright : Dilated vessels, \Rightarrow : Newly formed vascular networks

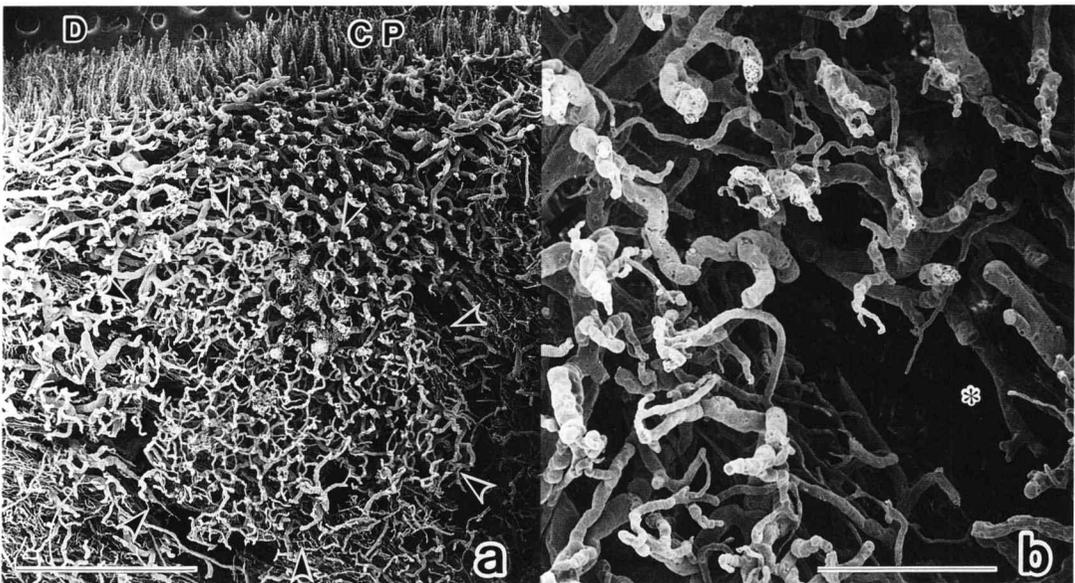


Fig.6. Newly formed vascular networks (surrounding part with arrow heads) centering around the transplantation sites were observed 7 days after transplantation of VX2 cancer. a : Castle wall-like defects were observed in the vascular network at the sites of the growth of transplanted cancer cells. Comparing with 3 days group, capillary loops underlying the mucous epithelium of the lingual dorsum (D) were higher and more meandering. Scale bar=1500 μm b : An enlargement of the same region. * : A part of castle wall-like defects of vascular networks. Scale bar=300 μm D : Lingual dorsum, CP : Capillary loops

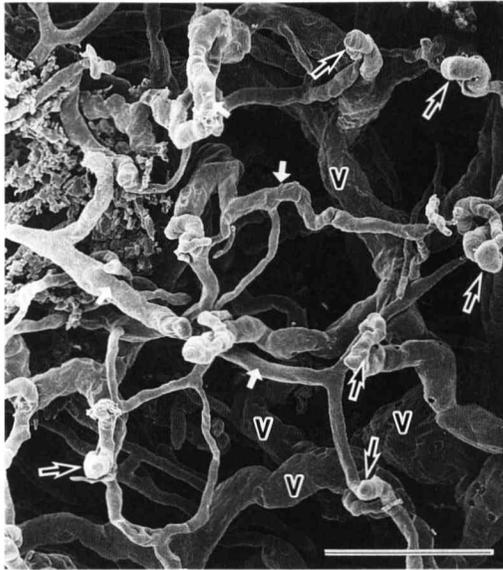


Fig.7. Newly vascular networks were formed from venule, hemispheric projections of vascular buds (→) are observed in the existing capillaries of the tongue. Scale bar=150 μ m
 ⇨ : Newly formed vascular networks,
 V : Venule

周囲筋層の既存の毛細血管から血管芽を示す半球状の突起が認められた (Fig.7)。

7. 癌の進展と血流量の相関関係

舌腫瘍体積と舌血流量の経日的変化の相関関係は相関係数 $R = 0.525$ であった (Fig.8-A)。また、腫瘍体積と深頸リンパ節の血流量の経日的変化の相関関係は相関係数 $R = 0.663$ であり (Fig.8-B), 舌腫瘍体積と舌血流量の相関よりも高い相関関係を示した。腫瘍体積と深頸リンパ節の S/L 比の経日的変化との間には、相関係数 $R = 0.991$ と極めて強い相関が認められた (Fig.8-C)。また、舌の血流測定値と深頸リンパ節の S/L 比の経日的変化との相関関係は相関係数 $R = 0.633$ (Fig.8-D), 深頸リンパ節の血流量と深頸リンパ節の S/L 比の経日的変化との相関係数は $R = 0.760$ (Fig.8-E) であり、舌の血流量との間よりも高い相関を示した。舌の血流量と深頸リンパ節の血流量の経日的変化との相関関係は、相関係数 $R = 0.971$ と極めて

強い相関を認めた (Fig.8-F)。

考 察

1. ウサギの全身循環動態

組織血流量は全身循環動態の変化の影響を受けやすいことが報告されている^{26,27)}。本実験においても循環動態のモニターを必要とした。本実験では、血圧の測定は臨床応用の観点から可及的に生体侵襲を避けるため非観血的血圧測定を選択した。動物実験において循環動態をモニターする場合、動脈にカテーテルを挿入して計測する観血的血圧測定法が用いられることが多い。しかし、観血的血圧測定法は測定手技が煩雑で熟練を要する。これに対し非観血的血圧測定法は非侵襲的で測定手技も極めて簡便であり、さらに同一個体に対して何回も行うことができるので非常に有用な方法である。ウサギの血圧測定については非観血的血圧測定に関する報告はみられなかったが、小宮山の報告²⁵⁾に準じて新生児用カフ (幅 2.5 cm) を代用することによって血圧の測定が可能であった。

腫瘍血管は血流の自動調節能を欠いており²⁸⁾, Suzuki ら²⁹⁾ は angiotensin II によって平均動脈圧を一定に維持すると正常組織の血流量を増すことなく、腫瘍血流のみを数倍に増加し得ることを報告した。本実験においては pentobarbital sodium (ネプタール®) 25 mg/kg を耳静脈より麻酔し、自発呼吸下で血流を測定した。pentobarbital sodium には呼吸抑制作用と末梢血管拡張作用があり、その作用は注入量だけでなく注入速度によっても影響を受ける。前述の量を緩徐に注入した後の血圧は収縮期血圧が 71 mmHg から 92 mmHg, 拡張期血圧が 42 mmHg から 54 mmHg の間で変動していたが、血流量は血圧変動の影響を受けなかった。すなわち、舌背部の末梢血流量は、麻酔薬の用量を一定にし、注入速度を緩徐にすることによって、血圧の影響を受けないものと考えた。

2. 血流測定法

本実験では血流測定の際に麻酔は不可欠で

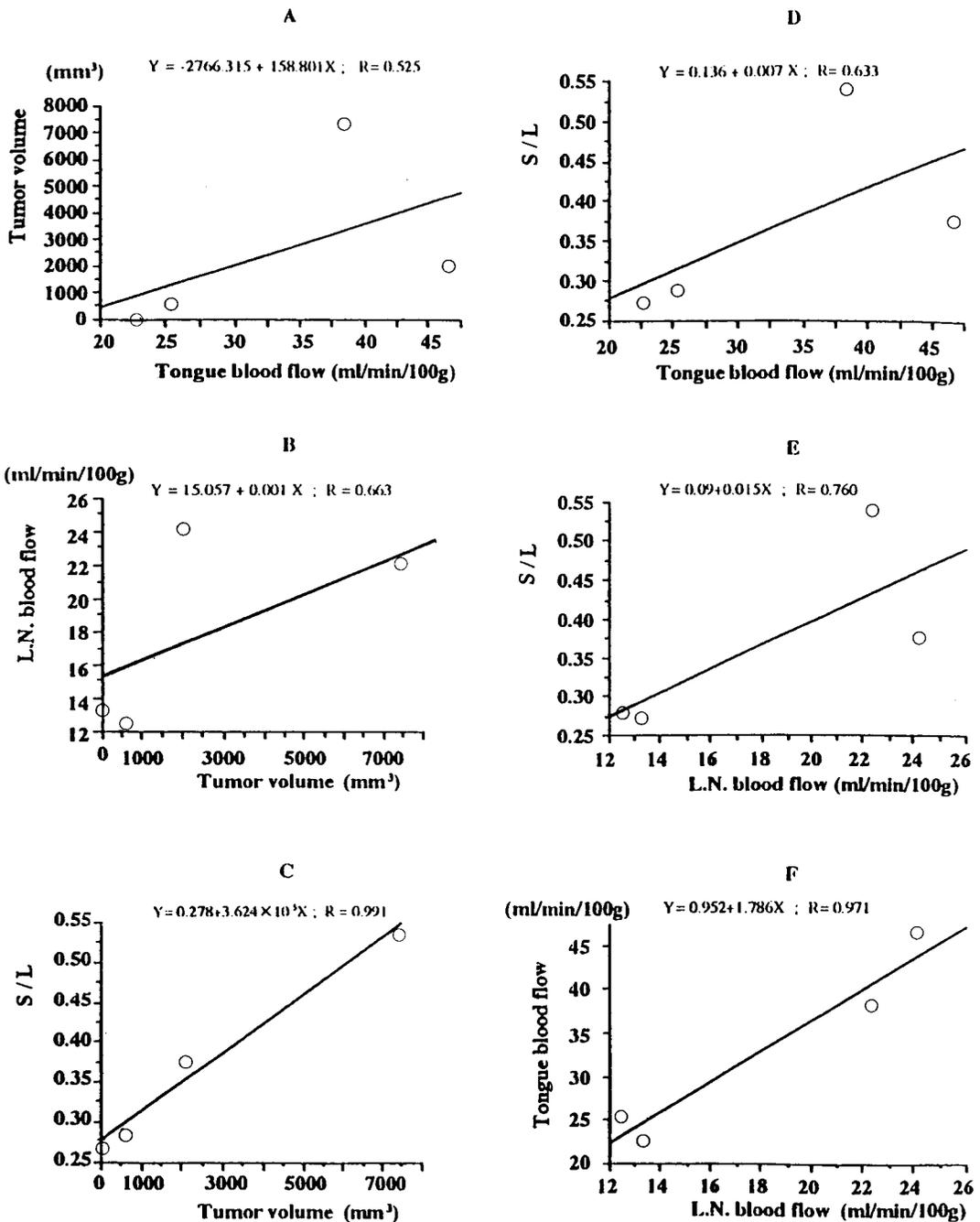


Fig. 8. Positive correlations were observed between tumor volume and tongue blood flow, between deep cervical lymph node (L. N.) blood flow and tumor volume, between the shortest diameter / the longest diameter ratio of the deep cervical lymph node (S/L) and tumor volume, between S/L and tongue blood flow, between tongue blood flow and tumor volume of the deep cervical lymph node.

あった。しかし、予備実験においては同一個体に対する頻回の麻酔によりウサギが衰弱することが判明した。さらに深頸リンパ節の計測に際しては、皮切を加えて深頸リンパ節を露出することが必要であった。これらのことから血流の測定は同一個体で VX2 癌非移植群、VX2 癌移植後 7 日目、14 日目、そして 21 日目と経日的な計測は行わなかった。しかし、測定値に大きな個体差がみられなかったことから、実験の結果は経日的変化を捉えているものと考えた。

レーザー血流計は組織内に特殊な針を挿入することなくプローブを任意の測定部位に軽く接触させるだけで血流量の瞬間値が連続的に表示される。また、測定範囲が半径約 1 mm の半球部分であるため、任意の局所の血流測定が可能である。再現性についてもプローブの接触圧を一定に保つことによって十分に得られた。しかし、レーザー血流計によって得られる値は絶対値ではなく、(1) 検出散乱光の平均拡散行程長が一定である、(2) 局所平均ヘマトクリットの供給が一定である、(3) 赤血球の平均散乱特性が一定である、(4) ドップラーシフトされた光が検出光の 40 % 以下である、などの仮定に基づいて計算された相対値である³⁰⁾。しかし、前述の仮定を満たしていれば測定値の絶対値化は可能である。本実験では測定値の絶対値化は行っていないが、レーザー血流測定法と水素ガスクリアランス法による測定値との間には相関係数 $R = 0.83$ から $R = 0.95$ と有意の正の相関が認められている³¹⁾。以上のことからレーザー血流測定法は末梢の血流動態を知る上で、十分に目的を達することができる方法であり、また、測定手技が極めて簡便で再現性もあることから、臨床的にも応用可能な方法であると考えた。

3. 腫瘍の進展と舌の血流

固形腫瘍が一定の大きさを越えて増殖するには、腫瘍新生血管の存在が不可欠とされ、従来より腫瘍の大きさが 2 mm 以上になると血管新生が生じる³²⁾といわれている。VX2 癌は 1 mm までは血管新生なしに腫瘍が増大する³³⁾ことが報告されている。血管鑄型標本の観察から VX2 癌

移植後 3 日目には、癌細胞が活発に増殖している移植相当部位に一致して血管系の欠除が認められた。一方、VX2 癌移植後 7 日目になると移植相当中心部には新生血管網が認められるようになった。加えて癌細胞が最も活発に増殖している癌増殖外縁部には、血管の欠除している部位が認められた。さらにその周囲の筋層の血管網から癌増殖外縁部に向かって血管新生を示す血管芽が認められた。このことは (1) 癌細胞の増殖が進行するにしたがって、癌増殖の中心部には、中心性の血管新生が起こり、癌細胞の増殖が最も活発な外縁部に向かって血管網が広がる、(2) 同時に外縁部の周囲では癌の増殖に伴って周囲組織および血管網を圧迫して既存血管を破壊する、(3) 同時に周囲から癌組織中心部へ延びる新生血管が出現しているなどのことが考えられる。

このような血管構築の変化を本実験の計測部位である舌背中央部で考えてみると、癌の増殖に伴って VX2 癌移植後 14 日目までの血流量は増加し、癌周囲の新生血管の増加と一致する。一方、移植後 21 日目になると癌細胞の増殖は舌中隔にまで至り舌深動脈との距離が接近し、圧迫するようになる。近年、癌局所における NO のような血管調節因子として働くフリーラジカルの定常状態が崩れるため、血流維持や血小板凝集抑制作用が破綻し、微小循環障害を惹起するといわれている³⁴⁾。また、VX2 癌移植後 21 日目の血流量の減少は癌が増大すると舌深動脈に接近し、癌局所の白血球から産生される NO の影響を受けやすくなるので結果的には微小循環障害を引き起こし、さらに舌深動脈の圧迫によって血液供給量が減少し、その結果、VX2 舌癌移植側全体の血流量が減少することが推測された。すなわち、この血流量の低下は必ずしも癌組織局所の血管構築の変化によるものではないと考えられた。

腫瘍の大きさの拡大とともに壊死巣が増大するため、一個の固形腫瘍の単位重量当たりの血流量は減少する。一方、組織血流量は非常に限られた範囲内の局所の血流量であり、これらは

区別されなければならない³⁵⁾。本実験における測定範囲はプローブ接触部位の半径約1mmの半球部分の組織血流量である。本実験では舌の血流測定に際し、舌前方 $\frac{1}{3}$ の舌中隔部舌背の血流を測定した。この測定値はいわゆる腫瘍血流量ではなく、プローブ接触部位の半径約1mmの半球部分の組織血流量であり、左側舌縁に移植した VX2 癌が増殖に伴って舌中隔に接近し、さらには舌中隔を越えて増殖していく過程における舌中隔舌背の血流量の変化を表している。今後、部位別の正常組織の血流量や炎症状態による血流の変化など、さらに詳細に解明すれば臨床的にも原発巣における血流量の違いを把握することができ、癌の進展範囲の推測が可能であることが示唆された。

4. 腫瘍の進展と深頸リンパ節の血流

現在まで、転移リンパ節の血流量の変化を経日的に観察した報告はみられない。口腔癌の頸部リンパ節転移については、対象症例の違いや頸部郭清手術の有無、さらには検索の方法や時期、治療法などによってその転移率にかなりの差異が認められる。特に舌癌においてはリンパ節転移が最も高い頻度を示すといわれている^{36, 37)}。また、口腔領域のリンパ流の多くが顎下および上内頸静脈リンパ節群に注ぐことから口腔癌のリンパ節転移はこの部位の転移が多いといわれている。

松浦¹³⁾は、VX2 舌癌の転移リンパ節の細胞反応が転移形成以前から認められることから、リンパ節の細胞反応がリンパ節転移の指標になり得ると報告している。毛細血管後細静脈は細動脈、毛細血管、細静脈とともにリンパ節の微小血液循環系を構成し、T細胞領域である傍皮質に多く分布している。この血管は内皮細胞が円柱上皮様に背が高くなっていることから、高内皮小静脈 (high endothelial venule, HEV) と呼ばれている。深頸リンパ節における傍皮質の肥厚は VX2 癌移植後は経日的に皮質側へ増大する¹³⁾ことから、本実験における深頸リンパ節の血流の増大は傍皮質の肥厚ともなって HEV が増加したためであると考えられた。

5. 転移リンパ節の診断

頸部リンパ節転移の評価は CT, MRI, シンチグラフィ、US などの画像診断の進歩に伴いより正確な評価が可能になりつつあるが、絶対的な診断法はなく、数種類の画像診断の総合的な評価によって診断がなされる^{4, 9)}。US は触診の延長と考えられ全く侵襲がなく、操作性の良さや繰り返し検査が行えること、触診のみでは判別不可能なリンパ節も描出できる、などの長所を有している。しかし、US の質的診断すなわち、良性、悪性の鑑別に関してはいまだに正確な診断基準が確立されていない。石井ら⁴⁾は US によって頸部を多方向に走査した場合、5 mm 程度のリンパ節は描出可能であるとしている。

一方、CT では 5 mm から 10 mm のリンパ節を発見することは困難である³⁷⁾。造影 CT は被曝の問題、造影剤によるアレルギーの問題、US と比較して手軽に頻回に行い得ないなどの欠点はあるが、質的診断に関してはかなり信頼できる^{38, 39)}。従来より、腫大したリンパ節が腫瘍性か非腫瘍性かの鑑別は困難であると考えられてきた。US におけるリンパ節の質的診断は主にリンパ節の大きさによってなされており、確立された判断基準はないが、8 mm から 10 mm 以上を転移陽性とする報告が多い^{40, 41)}。唐司ら⁴²⁾は食道癌頸部リンパ節の大きさが 10 mm 以上、S/L 比が 0.5 以上であれば転移が示唆されるとしている。本実験における深頸リンパ節の短径は長径と比較して経日的に高い増加率を示し、S/L 比は経日的に増加して次第に球形に近づいた。さらに S/L 比は腫瘍体積との間に、相関係数 $R = 0.991$ と極めて強い有意な正の相関を示した。転移性リンパ節は比較的球形に近く、転移陰性リンパ節は平坦であると報告されている⁴¹⁾。VX2 舌癌は内向性腫瘍であり、腫瘍体積が増大するにしたがって舌の深部へ増殖し、腫瘍が深部に浸潤するほどリンパ節転移を起しやす⁴³⁾。以上のことは S/L 比と腫瘍体積との極めて強い相関関係を支持するものと考えられる。

本実験において、移植側深頸リンパ節の血流

量と癌細胞を移植した舌粘膜の血流量の間には、相関係数 $R = 0.971$ という極めて強い有意な正の相関が認められた。さらに、深頸リンパ節の血流量と S/L は相関係数 $R = 0.761$, S/L と腫瘍体積との間には相関係数 $R = 0.991$ と極めて強い有意な正の相関を示した。このことから舌の血流量を測定することによって、深頸リンパ節への転移の推測が可能であることが示唆された。佐藤ら⁴⁰⁾は近年開発された超音波カラードップラー法を用いて、リンパ節内部に血流が認められたものはすべて転移陰性であったと報告している。

本実験では VX2 癌移植後 21 日目に至るまで深頸リンパ節の血流は経日的に増加し、佐藤ら⁴⁰⁾の報告とは異なっていた。このことは超音波カラードップラー法はプローブに対して向かってくる血流と遠ざかる血流のみを描出するのに対し、レーザー血流測定法は血流の方向に関係なく測定することができる。さらに佐藤ら⁴⁰⁾はリンパ節の内部血流を描出しているのに対し著者は最大豊隆部から半径約 1 mm の半球部分の血流量を計測していることや、測定器械の感度が優れていることなどが影響しているものと考えた。

口腔癌の大部分を占める扁平上皮癌の転移リンパ節では、腫瘍細胞の増殖によって中心部が壊死をきたすことが知られている。一方、非腫瘍性の腫大したリンパ節においてはリンパ節の血管構築は保たれ、リンパ節の内部血流は存在するものと考えられる。このことよりリンパ節の血流動態の同定は転移リンパ節を鑑別するための新たな要素になりうるものと考えた。

結 論

ウサギ VX2 舌癌モデルを用いて舌および深頸リンパ節の血流量をレーザー血流計によって経日的に観察し、以下の結果を得た。

1. レーザー血流測定法は測定手技が極めて簡便で、再現性もあり、末梢の任意の局所の血流動態を知る上で有用な測定法であった。

2. ウサギにおいても新生児用カフ (幅 2.5

cm) を用いることによって非観血的血圧測定は可能であり、ウサギを pentobarbital sodium (ネンブタール®) 25 mg/kg で麻酔した後の血圧は、収縮期血圧が 71 mmHg から 92 mmHg, 拡張期血圧が 42 mmHg から 54 mmHg の間で変動していた。

3. 舌および深頸リンパ節の血流量は、上記の血圧の範囲内では血圧の変動による影響を受けなかった。

4. 舌の血流量は非移植群と比較して VX2 癌移植後 7 日目には有意差はなく、移植後 14 日目には舌の血流量は有意に増加したが、移植後 21 日目には移植後 14 日目と比較して舌の血流量は有意に減少した。

5. 深頸リンパ節の血流量は、非移植群と比較して VX2 癌移植後 7 日目には有意差はなかったが、移植後 14 日目から 21 日目と経日的に有意に増加した。

6. 舌腫瘍体積と深頸リンパ節の S/L の間には相関係数 $R = 0.991$, 舌の血流測定値と深頸リンパ節の血流測定値の間には相関係数 $R = 0.971$ と極めて強い相関を認めた。

7. レーザー血流計 (Advance) を用いて舌および深頸リンパ節の血流量の変化を捉えることによって、癌の進展および転移の推測が可能であることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本実験に終始ご懇篤なご指導、ご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謝いたします。また本実験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解剖学第一講座藤村 朗助教授に衷心より謝意を捧げます。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。VX2 癌細胞の提供に関し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御礼申し上げます。

なお、本論文の要旨は第 21 回日本微小循環学会 (1996 年 2 月, 豊中市), 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。本実験の一部は日本私学振興財団平成 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) 山田健久, 藤内 祝, 林 康司, 山家 誠, 粕谷幸生, 光藤健司, 新美 敦, 上田 実: 口腔癌の治療と予後に関する臨床的研究, 日口外誌, 41 : 671-676, 1995.
- 2) 影本正之, 広川 裕, 柏戸宏造, 和田崎晃一, 勝田静知, 原田康夫, 高田和彰, 下里常弘, 井内康輝: 舌癌における頸部リンパ節転移の予後への影響と制御に関する検討, 広島医学, 41 : 1553-1557, 1988.
- 3) UICC: *TNM classification of malignant tumors. 4th ed.*, Springer-Verlag, Berlin, pp13-35, 1987.
- 4) 石井純一, 天笠光雄, 篠塚恵造, 塩田重利, 立花忠夫: 口腔癌頸部リンパ節の超音波および CT による診断, 日癌治, 25 : 2526-2532, 1990.
- 5) 西村泰一, 吉田裕一, 大坪誠治, 竹川政範, 末次博, 松田光悦, 北 進一, 池畑正宏: 口腔扁平上皮癌における頸部郭清例の検討, 日口外誌, 37 : 1810-1818, 1991.
- 6) 宮川 明, 平塚博義, 小浜源郁: 口腔癌の潜在的頸部リンパ節転移に関する臨床的, 病理組織学的研究, 札幌医誌, 62 : 43-53, 1993.
- 7) 大竹克也: 口腔癌のリンパ節転移に関する実験的研究, 日口外誌, 35 : 290-302, 1989.
- 8) 橋 武彦: 実験腫瘍のリンパ節転移—その免疫学的検討, *Oncologia* 23 : 7-14, 1990.
- 9) 山口孝二郎: 口腔扁平上皮癌のリンパ節転移に関する画像診断学的検討, 日口外誌, 37 : 1571-1590, 1991.
- 10) Zätterström U. K., Wennerberg J., Ewers S. B., Willé R., and Attewell R. : Prognostic factor in head and neck cancer : Histologic grading, DNA ploidy and nodal status. *Head Neck* 13 : 477-487, 1991.
- 11) Chiu M. H., Lam K. H., Wei, W. I., Lau S. K., and Lam L. K. : Occult lymph node metastasis in small oral tongue cancers. *Head Neck* 14 : 359-363, 1992.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 川越弘就, 梅田正博, 中谷 徹, 西松成器, 武宜昭, 寺延 治, 中西孝一, 島田桂吉: ヒト口腔癌組織のヌードマウス舌への同所性移植による浸潤, リンパ節転移モデルの作製, 口科誌, 44 : 563-568, 1995.
- 15) 黒川英雄, 中村貴司, 村田朋之, 丸岡由佳, 杉本忠雄, 小西稔尉, 梶山 稔: 舌癌 (VX2 癌) の頸部リンパ節転移に関する実験的研究, 日口外誌, 41 : 751-758, 1995.
- 16) 深川淳至, 篠原正徳, 原田 猛, 中村誠司, 池辺哲郎, 嶋田 誠, 岡 増一郎: 口腔扁平上皮癌 T1 症例における頸部リンパ節転移の免疫組織学的検討, 口腔腫瘍, 7 : 60-69, 1995.
- 17) 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.
- 18) Gullino P. M., and Grantham F. H. : Studies on the exchange of fluids between host and tumor. II. The blood flow of hepatomas and other tumors in rats and mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 27 : 1465-1491, 1961.
- 19) 柏木 徹: 肝血流測定 RI, 総合臨床, 37 : 1068-1071, 1988.
- 20) Mishima, Y., Shigematsu, H., Horie, Y., and Satoh, M. : Measurement of local blood flow of the intestine by hydrogen clearance method : Experimental study. *Jpn. J. Surg.* 9 : 63-70, 1979.
- 21) 和田裕治, 飯島一彦, 米沢利英: ハロセン麻酔下におけるニトログリセリン低血圧の各種臓器血流に及ぼす影響, 麻酔 34 : 1208-1215, 1985.
- 22) Stern, M. : In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering. *Nature* 254 : 56-60, 1975.
- 23) 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.
- 24) 伊藤洋平: 移植癌, 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.
- 25) 小宮山典寛: イヌとネコの非観血的血圧測定の臨床応用について, 小動物臨床 12 : 15-26, 1993.
- 26) 鈴木磨郎: 腫瘍血管の機能的特性: 昇圧化学療法的基础として, 抗研誌, 36 : 93-105, 1985.
- 27) Toker, C. : Some observations on the deposition of metastatic carcinoma within cervical lymph nodes. *Cancer* 16 : 364-374, 1963.
- 28) Krylova, N. V. : Characteristics of microcirculation in experimental tumors. *Bibl. Anat.* 10 : 301-303, 1969.
- 29) Suzuki, M., Hori, K., Abe, I., Saito, S., and Sato, H. : A new approach to cancer chemotherapy: Selective enhancement of tumor blood flow with angiotensin II. *J. Natl. Cancer Inst.* 67 : 663-669, 1981.
- 30) Druce, H. M., Bonner, R. F., Patow, C., and Choo, P. : Response of nasal blood flow to neurohormones as measured by laser-doppler velocimetry. *J. Appl. Physiol.* 57 : 1276-1283, 1984.
- 31) 井戸健一, 寺田友彦, 川本智章, 吉田行雄, 堀口

- 正彦, 田中昌宏, 木村 健, 安田是和, 柏井昭良 : レーザードップラー法による犬肝組織血流測定を試み : 水素ガスクリアランス法との比較, 日消誌, 81 : 1269, 1984.
- 32) 前田 浩 : 腫瘍新生血管の特性に基づく腫瘍選択的薬剤の開発とその治療効果, 代謝, 23 臨時増刊号 : 249-258, 1986.
- 33) Lörelius, L. E., and Stridbeck, H. : Age related changes in tumor vascularity angiography and vascular casts of the VX2 tumor in the rabbit hind leg. *Acta radiol. Diagnosis* 25 : 529-533, 1984.
- 34) 土屋雅春, 秋葉保忠, 森 三樹二, 末松 誠, 福村 大, 三浦総一郎, 石井裕正 : 血管内皮細胞障害とフリーラジカル, 現代医療, 26 : 1987-1994, 1994.
- 35) 堀 勝義, 鈴木磨郎 : 腫瘍組織における微小循環, 現代医療, 26 : 1814-1825, 1994.
- 36) 草間幹夫, 岸 豊子, 堀越 勝, 稲垣由香, 阿部和夫, 岩本紀久, 榎本昭二 : 口腔癌の頸部リンパ節転移に関する臨床的, 病理組織学的研究, 日口外誌, 37 : 370-379, 1991.
- 37) Hajek, P. C., Salomonowitz, E., Turk, R., Tascholakoff, D., Kumpan, W., and Czembirek, H. : Lymph nodes of the neck : Evaluation with US. *Radiology* 158 : 739-742, 1986.
- 38) Mancuso, A. A., Maceri, D., Rice, D., and Hanafee, W. : CT of cervical lymph node cancer. *Am. J. Roentgenol.* 136 : 381-385, 1981.
- 39) 立花忠夫, 天笠光雄, 岩城 博, 横尾恵美子, 佐藤和子, 塩田重利, 桑原雄二, 奥山武雄 : CT scan による口腔癌頸部リンパ節転移の診断について, 日口外誌, 28 : 1277-1285, 1982.
- 40) 三浦寿美子, 多田信平 : 頸部リンパ節の診断—超音波, CT, MRI—, 画像診断, 9 : 251-258, 1989.
- 41) 古川政樹 : 超音波断層法による頭頸部癌の頸部リンパ節転移の検討, 耳鼻, 35 : 876-888, 1989.
- 42) 唐司則之, 小野田昌一, 磯野可一 : 食道癌頸部リンパ節転移における超音波断層法の検討—短長径比 (S/L) と癌巣占拠率の関連について—, 超音波医学, 14 : 501-509, 1987.
- 43) Poste, G., and Filder, I. J. : The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* 283 : 139-146, 1980.
- 44) 佐藤直之, 川辺良一, 海野 智, 石川好美, 大村進, 水木信之, 藤田浄秀, 竹林茂生 : 超音波カラードブラ断層法による口腔癌頸部リンパ節転移の血流に関する検討, 日口外誌, 41 : 677-681, 1995.