

VX2 舌癌の 5'-Nase 染色によるリンパ管の観察

北原 朋広

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: 1995年10月13日)

(受理: 1995年11月24日)

Abstract: VX2 cancer, which is likely to metastasize, was implanted in rabbit tongue. Following tumor implantation, serial changes in the distribution of lymphatic vessels within the muscles around the tumor, in the vicinity of the tumor and within the tumor stroma were examined, on the basis of the measurement of the activity of 5'-nucleotidase (5'-Nase), an enzyme known to be abundant in lymphatic vessels. The VX2 cancer was implanted by injecting a suspension of VX2 cells into the muscles of the left periphery of each rabbit's tongue. The animals were sacrificed at 7, 10, and 14 days after transplantation. The tongue was removed from each sacrificed rabbit, and observed under a light microscope after staining with 5'-Nase.

The tongues of control rabbits, which were not injected with VX2 cells, were found to have three courses of lymphatic vessels: (1) collecting lymphatic vessels running concomitantly with the deep lingual artery, (2) collecting lymphatic vessels running to the oral floor along the bundle of the genioglossus muscles, and (3) collecting lymphatic vessels in the septum of the tongue.

Ten days after tumor implantation, the diameter of the lymphatic vessels in the vicinity of the tumor became significantly larger than the diameter of those in the control group ($P < 0.01$), indicating the formation of a network of lymphatic vessels surrounding the tumor tissue. The lymphatic vessels within the muscles around the tumor were more tortuous after tumor metastasis to lymph nodes than before metastasis. As the tumor grew and progressed, the lymphatic vessels within the tumor stroma tended to be compressed, and became flatter.

Key words: VX2 cancer, 5'-Nase staining, lymphatic vessels

緒 言

顎・口腔領域における悪性腫瘍の中で高頻度に発生する舌癌は、早期に所属リンパ節への転移をきたすことが知られている¹⁾。癌転移の有無は癌の悪性度の一つの指標であり、リンパ節転移は癌の治療、予後に及ぼす影響が大きい²⁾。このリンパ節転移に関する悪性腫瘍の発育、進

展と毛細リンパ管および集合リンパ管の関連性を検索することは、リンパ節転移機構を解明する上できわめて重要である。

近年、舌癌の脈管系に関する基礎的研究は 9,10-dimethyl 1, 2-benzanthracene acetone solution (DMBA) 誘発舌癌モデル^{3,4)}や VX2 移植舌癌モデル^{5~7)}等を用いて数多く報告されてきた。しかし、腫瘍血管についての報告は多

Observation of lymphatic vessels using 5'-Nase staining method in the VX2 tongue cancer.

Tomohiro KITAHARA

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

くみられるが、原発腫瘍と毛細リンパ管および集合リンパ管との関連性に関する詳細な報告はリンパ管の同定が光顕的に困難であるためきわめて少ない^{8,9)}。加藤¹⁰⁾は5'-nucleotidase (5'-Nase)の酵素組織化学的染色法によるリンパ管の同定法を報告している。しかし、この5'-Naseの組織化学的染色法は動物種や組織により固定時間および反応条件が異なり、十分な染色性が得られ難い。そこで遠藤¹¹⁾は加藤の条件を改良し、ハムスター舌に誘発癌を作製し、その上皮内癌の毛細リンパ管を、また、中山¹²⁾は同じく浸潤癌の毛細リンパ管を、それぞれ観察し、上皮内癌と浸潤癌では毛細リンパ管網の形成の様相が異なることを報告している。しかし、ハムスター誘発舌癌は転移する傾向に乏しいことから、著者はウサギ舌に易転移性のVX2癌を移植し、5'-Nase染色を用いてその染色条件を確立するとともに、移植腫瘍とその毛細リンパ管および集合リンパ管との関連性について検討した。

材料および方法

1. 実験材料

実験動物は日本白色種雄性ウサギ35羽(体重3kg前後、(株)船橋農場)を購入後、岩手医科大学歯学部動物舎(温度:23±2℃、湿度55±5%)において、1週間予備飼育を行い、全身状態に異常のないことを確認して用いた。なお、水および飼育用固形肥料(オリエンタル社製)は自由に摂取させた。

2. 実験腫瘍

実験腫瘍は鹿児島大学歯学部口腔外科学第一講座より恵与され、当教室にて1993年1月よりウサギ大腿部筋内に累代移植し、維持されているVX2癌を用いた。

3. 実験方法

1) 移植方法

舌への移植用癌細胞浮遊液は外山¹³⁾の方法に準じて作製し、最終的に滅菌生理食塩水(大塚製薬)で容積比50%に調整した。この癌細胞浮遊液0.05mlを、ネブタール(0.5mg/kg)麻酔

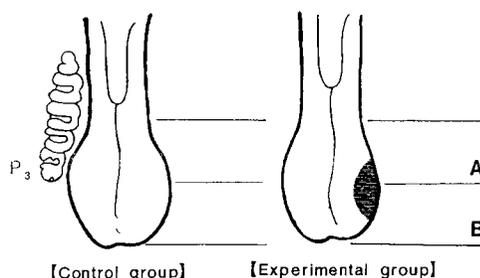


Fig.1. Site of tongue cancer transplantaion and staining of specimens.

- : tumor
- A : 5'-Nase
- B : H-E stain

下でウサギの舌尖側の1/3の部位で、左側舌体辺縁部から筋層内に皮内用注射針(26G)を3mm刺入し移植した。

2) 対照群

正常ウサギの舌組織および舌内部の毛細リンパ管および集合リンパ管を検索するために無処置ウサギ5羽を用いた。また、滅菌生理食塩水を注入した正常ウサギ15羽をネブタール麻酔下で、左側舌体辺縁中央1/3の部位に滅菌生理食塩水0.05mlを筋層内に注入した。滅菌生理食塩水を注入後、7日目例、10日目例、14日目例について、それぞれ5羽ずつを実験に用いた。

3) 実験群

癌細胞移植後、7日目例、10日目例、14日目例について、それぞれ5羽ずつを実験に用いた。VX2舌癌組織の大きさは移植部の前額断切片における肉眼的な癌組織の最大径をノギスを用いて測定した。腫瘍深達度は病理組織学的所見から、大竹¹⁴⁾の分類に準じて検討した。

4) 舌標本の採取

ウサギをネブタール麻酔下で開胸し、心尖よりカテーテルを上行大動脈に挿入して、瀉血路用に右心耳を切開した。同時に下行大動脈を結紮した後、0.1Mカゴゾル酸緩衝液(pH7.4, 7% sucrose加)を流速5ml/分で20分間注入しながら瀉血した。その後、2%冷ホルムアルデヒドに1%塩化カルシウムを加えた固定液にて

Table 1. Enzyme reaction of rabbit tongues on various fixation times.

Perfusion fixation	Prefixation	Postfixation	5'-Nase reaction	
120	30	30	—	
		60	—	
		90	—	
	60	30	30	—
			60	—
			90	—
	90	30	30	—
			60	±
			90	—
90	30	30	—	
		60	±	
		90	±	
	60	30	30	±
			60	±
			90	—
	90	30	30	±
			60	±
			90	—
60	30	30	±	
		60	—	
		90	±	
	60	30	30	±
			60	—
			90	±
	90	30	30	+
			60	++
			60	++

Fixation time : min

流速 5 ml/分で 60 分間、灌流して固定した。次いで舌隆起後方の舌根部付近から前方部を、口底部では舌小帯を切除し、顎舌骨筋を含む舌を一塊として摘出した。実験群では摘出舌を腫瘍中央部から前額断で二分し、後方部は 5'-Nase 染色用に、前方部はヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色用に用いた。また、対照群では生理食塩水注入部の舌尖より 1/3 の部位より前額断方向に二分し、実験群と同様に標本を採取した (Fig.1)。

5) 酵素組織化学染色

ゴールデンハムスター舌^{11,12)}に用いた 5'-Nase の染色条件では、ウサギ舌の 5'-Nase 反応の陽性像が一定しなかった¹⁵⁾ので、染色条件

を検討し、以下の方法で本研究を行った。すなわち、灌流固定を施した標本は、それぞれ 4% 冷ホルムアルデヒド + 1% 塩化カルシウム固定液に 90 分間浸漬固定 (前固定) した。前固定後、0.1 M トリスマレイン酸緩衝液 (pH 7.4, 4°C) で洗浄し、O.C.T 化合物 (MILES 社製) にて包埋、凍結 (-20°C) 後、クリオスタット (Bright 社製) で 40 μm の厚さで連続切片を作製し、再度 4% 冷ホルムアルデヒド + 1% 塩化カルシウム固定液に 60 分間浸漬 (後固定) した。その後、切片を 0.1 M トリスマレイン酸緩衝液 (pH 7.4, 4°C) で洗浄した。5'-Nase 染色の基質液は遠藤¹¹⁾の方法に準じ、37°C で 30 分間浸漬して反応させた。その後、0.1 M トリスマレイン酸緩

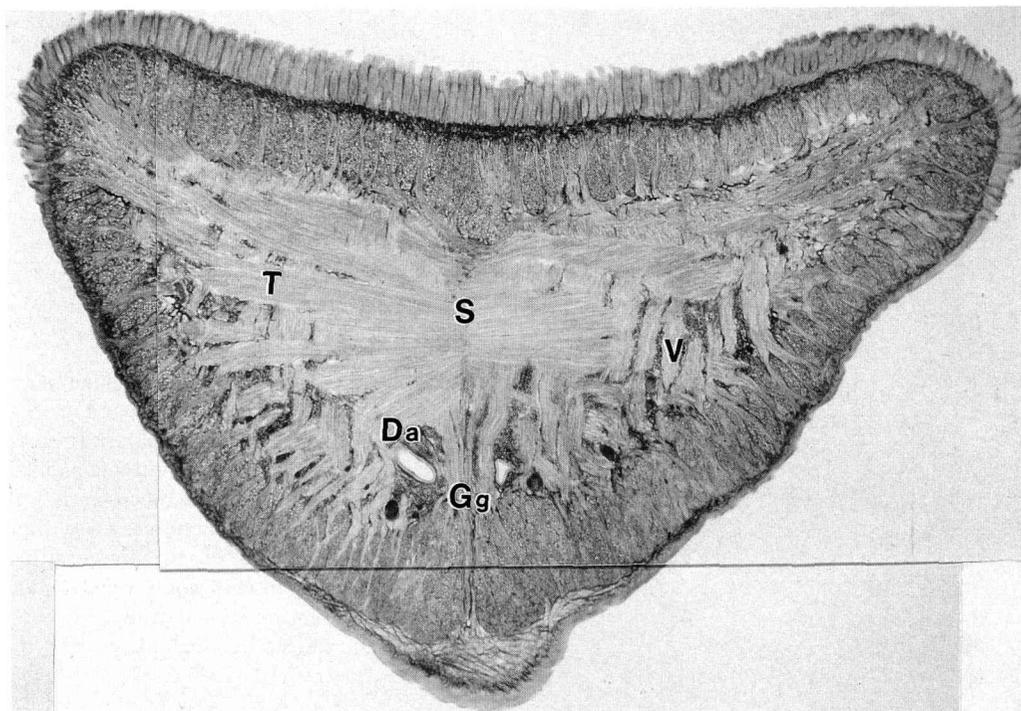


Fig. 2. Frontal section of the normal rabbit tongues. 5'-Nase staining, ×10.

Abbreviation :

S ; septum of the tongue.

T ; transverse muscle of the tongue.

V ; vertical muscle tongue.

Da ; deep lingual artery.

Gg ; genioglossus muscle.

衝液 (pH 7.4, 4°C) で洗浄し, 1.0% 硫化アンモニウム溶液に 2 分間浸漬して発色させ, 蒸留水で洗浄, 封入後, 光学顕微鏡下でリンパ管の観察を行った。なお, 組織学的観察のため前方部の標本は通法に従って再度ホルマリン固定し, パラフィン包埋後, 薄切し, ヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色を施した。

6) リンパ管口径の計測

腫瘍周囲リンパ管, 腫瘍近接リンパ管, 腫瘍間質内リンパ管および対照群の縦舌筋, 垂直舌筋, 横舌筋の筋束間リンパ管を 35 倍に拡大した写真上でノギスを用いて計測し, 部位ごとに平均値とその標準偏差を算出した。さらに部位別に各群間でノンパラメトリックスによる Dunn's multiple comparisons 検定 ($P < 0.01$) を行った。

結 果

1. 5'-Nase 染色の固定条件の検討

ウサギ舌における 5'-Nase 反応の至適条件は灌流固定 60 分, 前固定 90 分, 後固定 60 分, 5'-Nase 反応 30 分であった (Table 1)。なお, 基質液の組成および反応時間は遠藤の方法¹³⁾が最適であった。

2. 正常舌の組織所見とリンパ管

組織学的には舌表面は厚い角化層からなる糸状乳頭を形成し, 重層扁平上皮で覆われていた。その下層には薄い粘膜固有層 (約 90 μm 程度) がみられ, 結合組織乳頭の発達は悪く, これに続いて舌の大部分を占める発達の良好な舌筋層が存在していた。内舌筋には上縦舌筋, 下縦舌筋の横断面および横舌筋, 垂直舌筋が認め

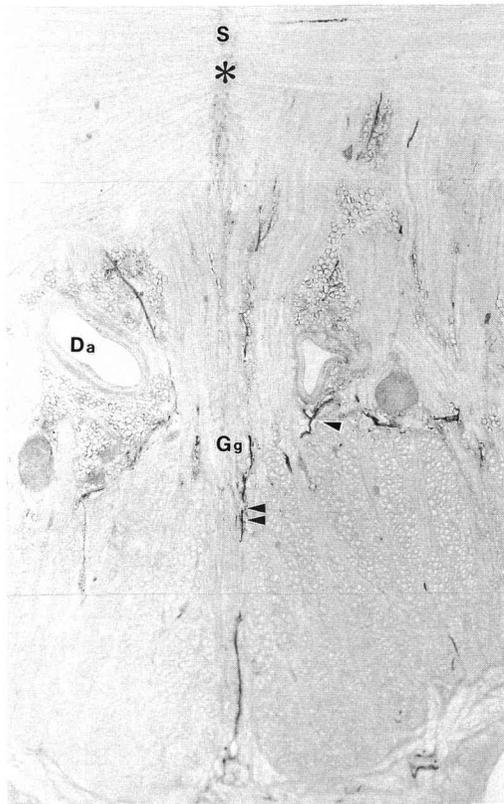


Fig.3-a. Estimation of the course of lymph flow within rabbit tongues. 5'-Nase staining, $\times 20$.

- ▶ : Collecting lymphatic vessel running concomitantly with the deep lingual artery.
- ▶ : Collecting lymphatic vessel running to the oral floor along the muscular bundles of the genioglossus muscle.
- * : Collecting lymphatic vessel in the septum of the tongue.

られ、横舌筋は正中の舌中隔部から起始していた。外舌筋には舌中隔下方にオトガイ舌筋の斜断像が観察された (Fig.2)。

舌の血管は舌深動脈本幹が舌中隔の下方でオトガイ舌筋を挟んで左右の舌下面正中より認められ、動脈は舌内部全体に分布していた。

舌の毛細リンパ管は上皮直下の結合組織乳頭内から盲端で始まり、その口径は $10.00 \pm 2.82 \mu\text{m}$ で、舌粘膜固有層内の毛細リンパ管網に合流していた。さらに舌粘膜固有層内毛細リンパ管網は縦舌筋筋層内の筋束間を走行するリンパ管

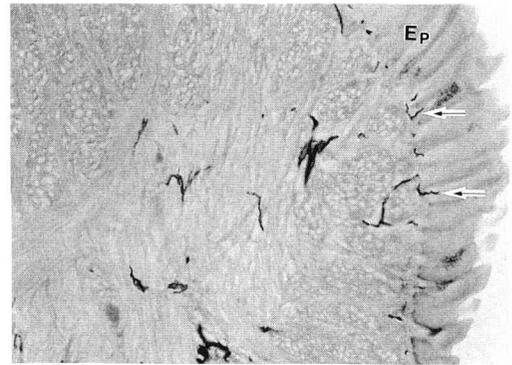


Fig.3-b. Lymphatic vessels of saline solution group. 5'-Nase staining, $\times 30$.

The lymphatic capillaries (arrows) within the connective tissue papilla and the lamina propria mucosae as well as the major lymphatic vessels within the muscle layer of the tongues in the saline solution group were similar to those in the normal group.

Ep : Mucosal epithelium.

との合流がみられた。この筋束間を走行する集合リンパ管は太さ $13 \mu\text{m}$ 程度であった。舌背正中付近からのリンパ管は上縦舌筋、垂直舌筋および横舌筋筋束間を通過して下方に向かい、その後オトガイ舌筋筋束間を走行するリンパ管と合流していた。

舌辺縁部では縦舌筋から横舌筋筋束に沿って舌中隔方向に横走するもの、および垂直舌筋筋束に沿って舌深動脈の方向へ向かい舌深動脈伴行集合リンパ管に合流するものが認められた。すなわち、ウサギ舌内のリンパ経路は、1) 舌背や舌辺縁部から舌深動脈に向かう舌深動脈伴行集合リンパ管、2) オトガイ舌筋に沿って口底に向かう集合リンパ管、および3) 横舌筋筋束に沿って舌中隔に向かう舌中隔内集合リンパ管の経路が認められた (Fig.3-a)。

3. 滅菌生理食塩水を注入した舌の組織所見

滅菌生理食塩水 0.05 ml 注入後の7日例、10日例、14日例とも正常ウサギ舌と比較して結合組織乳頭、粘膜固有層および筋層の解剖学的形態変化はみられなかった。また、結合組織乳頭内、粘膜固有層内の毛細リンパ管および筋層内

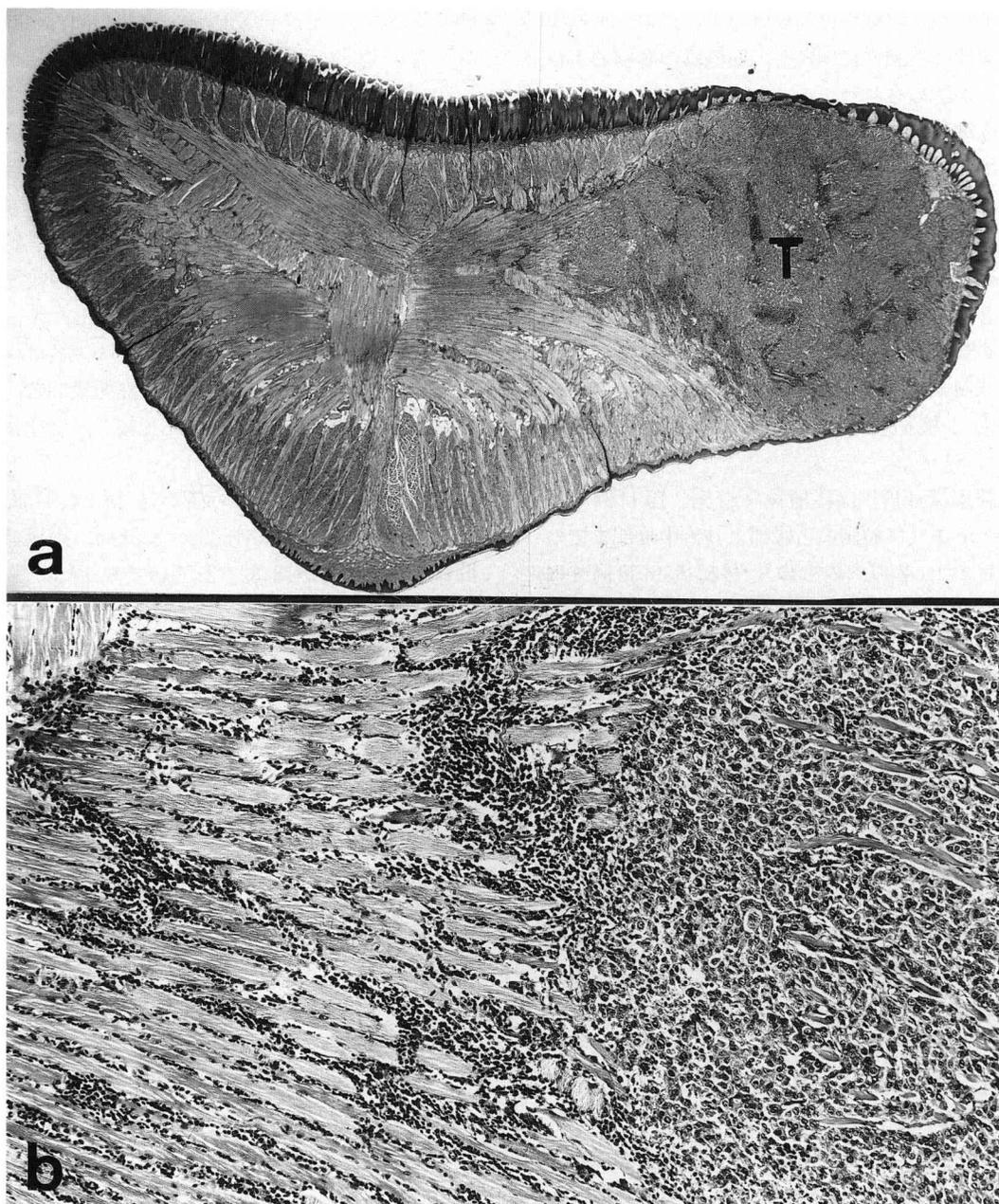


Fig.4. a : Frontal section at the 14 days after transplantation. H-E staining, $\times 10$. T : tumor
b : Infiltration of tumor cells and inflammatory cells.

の集合リンパ管においても正常ウサギ舌と同様の所見が認められた (Fig.3-b)。すなわち結合組織乳頭内毛細リンパ管, 粘膜固有層内毛細リンパ管, および筋束間リンパ管の太さは, 正常ウサギ舌との間に有意差 ($P < 0.01$) は認めら

れなかった。

4. 実験群の所見

1) 組織学的所見

移植 VX2 癌組織は移植後 7 日例, 10 日例, 14 日例とも舌の移植側に限局し, 筋層内に生着

していた。癌細胞は筋線維の走行に沿って筋線維束間に浸潤性に増殖し、筋線維の萎縮および消失が認められた。

癌細胞は大小不同の多角形を呈し、核は類円形でヘマトキシリンに淡染し、核/細胞質比は大であった。移植後14日頃より癌組織中央部の癌細胞が壊死し、癌組織の周囲には慢性炎症性細胞の浸潤がみられた (Fig.4-a,b)。

2) VX2舌癌の腫瘍深達度

VX2舌癌の最大径は移植後7日例では 6.68 ± 0.24 mm, 移植後10日例では 9.24 ± 0.41 mm, そして移植後14日例では 12.22 ± 1.17 mmであった。

腫瘍深達度¹⁴⁾は移植後7日例, 10日例ではGrade I (移植側の舌縁部より舌中隔部までの深さの1/2以内のもの), 移植後14日例ではGrade II (舌中隔部付近にまで及ぶもの)に相当していた。したがってVX2舌癌は経日的にはほぼ一定の浸潤, 増殖傾向を示し, 移植後14日目例でも舌中隔および上皮を越える範囲の腫瘍はなかった。

3) 癌組織とリンパ管の位置関係による分類

癌組織とリンパ管との位置関係から, 1) 癌組織周囲の筋周膜内を経過する集合リンパ管, 2) 癌組織とリンパ管が近接し, 結合組織で覆われている集合リンパ管, および3) 癌組織間質内リンパ管などが認められた。これらをそれぞれ癌組織近接リンパ管, 癌組織周囲リンパ管, 癌組織間質内リンパ管の3つに分類した。

4) 5'-Nase染色

a. 移植後7日例

上皮直下の粘膜固有層内および結合組織乳頭内には毛細リンパ管が認められ, さらに縦舌筋, 垂直舌筋筋層内の筋束間を走行する集合リンパ管が認められた。移植後7日例では縦舌筋, 垂直舌筋および横舌筋内に生着した癌組織 (Fig.5-a)における癌組織近接リンパ管と癌組織間質内リンパ管は少なかった。癌組織周囲リンパ管の形態は対照群と変わらず, 筋束間を筋束に沿って走行していた (Fig.5-b)。口径は癌組織近接リンパ管が 16.46 ± 5.88 μ m, 癌組織周

囲リンパ管が 14.72 ± 5.61 μ m, 癌組織間質内リンパ管が 12.53 ± 2.85 μ mであった。

b. 移植後10日例

腫瘍深達度¹⁴⁾はGrade Iの範囲にあるが, 筋層内に移植した癌組織は移植後7日例より, さらに舌中隔, 口底方向に進展していた (Fig.6-a)。癌組織周囲リンパ管の形態は屈曲し, 蛇行する傾向を示していた。さらに癌組織近接リンパ管は癌組織を取り囲むように分布し, ネットワークを形成し (Fig.6-b,c,d), その数は移植後7日例よりも増加していた。癌組織間質内リンパ管の数は移植後7日例と比較し, 変化は認められなかった。

口径は癌組織近接リンパ管が 18.14 ± 4.93 μ m, 癌組織周囲リンパ管が 13.66 ± 3.58 μ m, 癌組織間質内リンパ管が 13.32 ± 3.30 μ mであった。

c. 移植後14日例

腫瘍深達度はGrade IIを示し, 移植後10日例よりもさらに舌背上皮, 舌中隔および口底方向に進展, 増殖し, 癌組織中央部では癌細胞の壊死が認められた (Fig.7-a,b,c)。

癌組織近接リンパ管, 癌組織周囲リンパ管の数は減少し, 癌組織間質内リンパ管の数が増加していた。口径は癌組織近接リンパ管が 18.63 ± 5.70 μ m, 癌組織周囲リンパ管が 13.99 ± 3.32 μ m, 癌組織間質内リンパ管が 13.98 ± 2.37 μ mであった。

5) リンパ管の経日的な口径の比較

癌組織近接リンパ管は経日的にその口径を増し, 移植後10日例では対照群に比べて有意 ($P < 0.01$) に太さが増大していた (Fig.8-a)。癌組織周囲リンパ管は経日的に変化はなく, 対照群の筋束間リンパ管との間に有意差は認められなかった (Fig.8-b)。癌組織間質内リンパ管は癌組織移植後, 経日的にその口径をやや増大しているが, 対照群の筋束間リンパ管との間に有意差は認められなかった (Fig.8-c)。

考 察

1. VX2舌癌の発育様式

VX2癌は1940年Rousら¹⁶⁾により可移植性

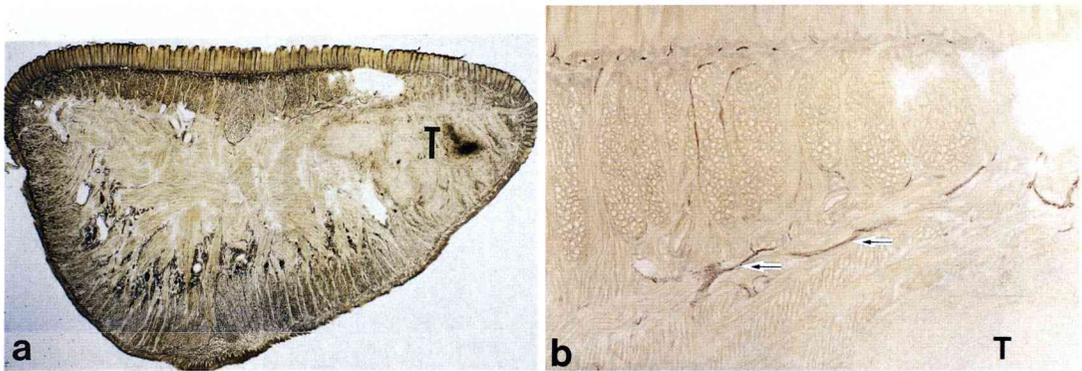


Fig.5. a : Frontal section at the 7 days after transplantation. 5'-Nase staining, $\times 10$. T : tumor
b : Lymphatic vessels (arrows) within the muscles around tumor.

The intramuscular lymphatic vessels courses tended to along the muscles. T : tumor

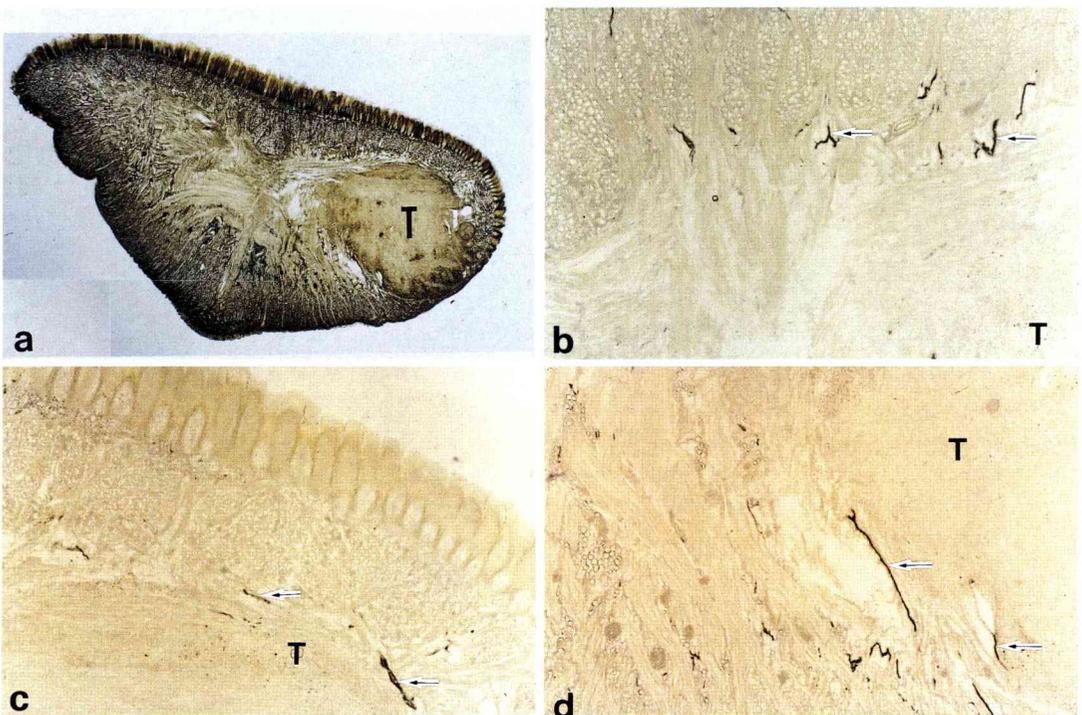


Fig.6. a : Frontal section at the 10 days after transplantation. 5'-Nase staining, $\times 10$. T : tumor
b : Lymphatic vessels (arrows) within the muscles around tumor. Lymphatic vessels within the muscles around tumor were flexed and tortuous as compared with the after transplanted 7 days. T : tumor
c and d : Lymphatic vessels (arrows) in the vicinity of tumor. Lymphatic vessels in the vicinity of tumor formed a network surrounding tumor tissue. T : tumor

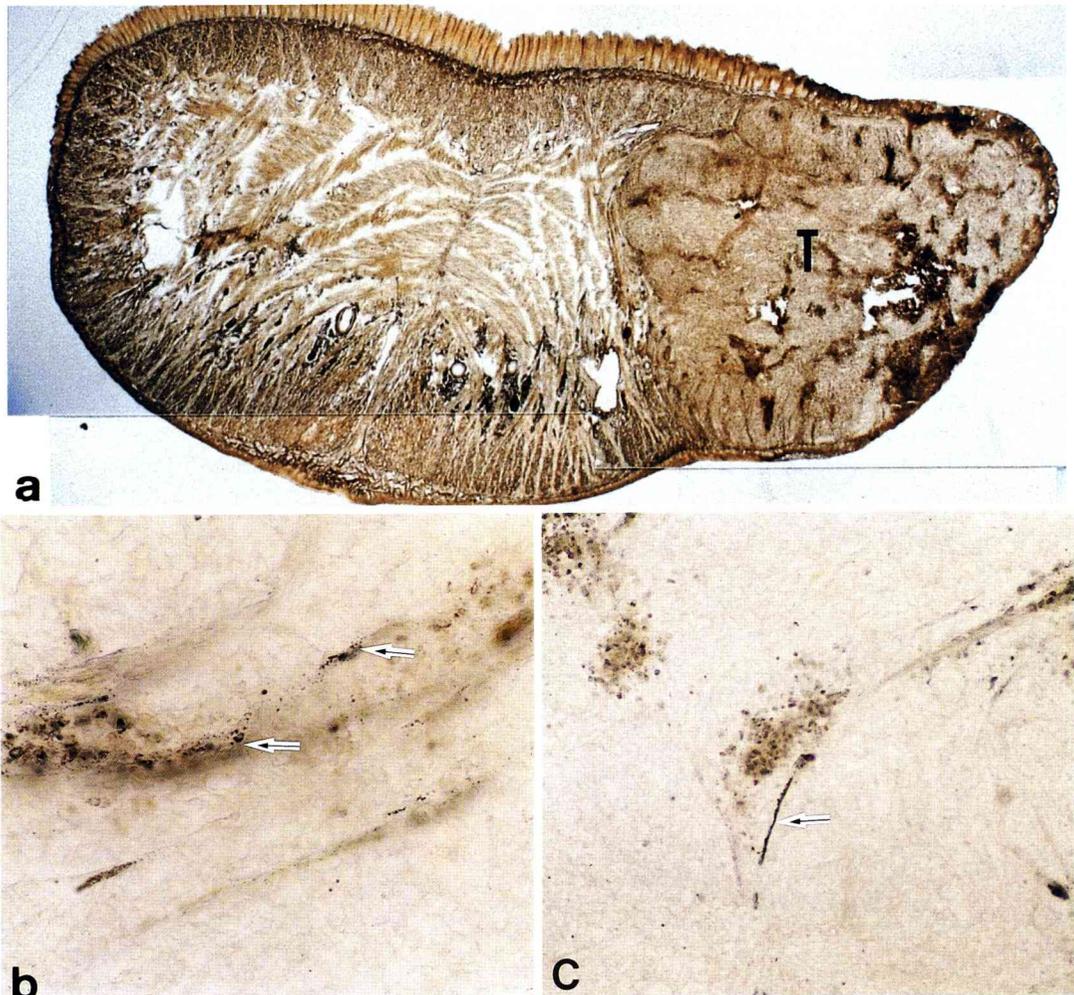


Fig. 7. a : Frontal section at the 14 days after transplantation. 5'-Nase staining, $\times 10$. T : tumor
 b and c : Lymphatic vessels (arrows) within tumor stroma. The lymphatic vessels existed in the tumor stroma and morphology tended to be compressed and became flatter.

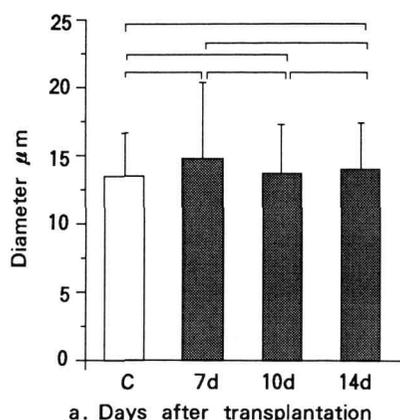
癌として確立され、移植生着率が高く、ヒトの舌扁平上皮癌に組織学的にも類似していることが報告されている。本実験に用いた VX2 舌癌もヒトの舌扁平上皮癌に組織学的に類似し、その進展、増殖は経日的に一定の傾向を示し、その増殖速度もきわめて速く、所属リンパ節への転移巣形成も容易であった。

今井¹⁷⁾はヒト舌癌の発育形態について組織学的に癌実質の拡がりを表在型、組織内型、脈管内型、腔内型に分類している。本実験は移植癌

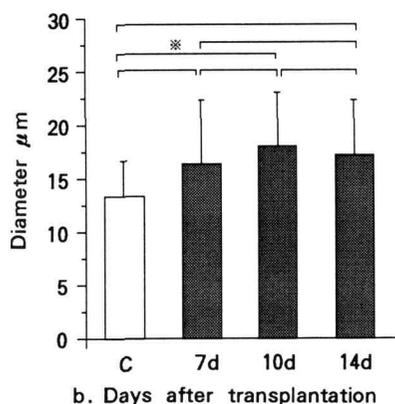
であるため、上記分類をそのまま適用することはできないが、癌細胞が筋線維束や筋線維間の走行に沿って浸潤する組織内型に一致し、ヒト舌癌に類似した発育様式を示していた。

2. リンパ管同定法

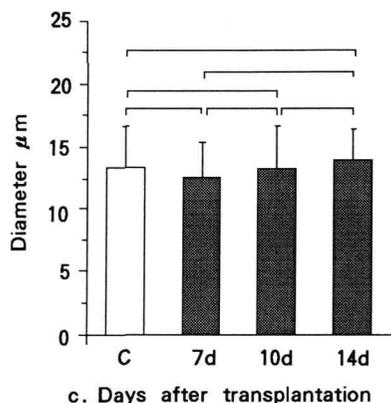
近年、報告されているリンパ管同定法のなかでも 5'-Nase 染色はリンパ管に対する識別能が優れているといわれている^{18,19)}。しかし 5'-Nase 染色法は酵素組織化学的手法であることから、動物種や組織によってリンパ管壁の 5'-Nase 反



a. Days after transplantation



b. Days after transplantation



c. Days after transplantation

Fig.8. Comparison diameter of lymphatic vessels.

a : Lymphatic vessels within the muscles around tumor.

C ; control

b : Lymphatic vessels in the vicinity of tumor.

mean±S.D. (*p<0.01)

c : Lymphatic vessels within tumor stroma.

応陽性像が必ずしも一定しないため、用いる動物種や組織によって固定条件を変更する必要があると報告されている¹⁰⁾。そこで、ウサギ舌に対して、種々の固定時間および反応液濃度、反応温度、反応時間で検索した結果、観察部位の初期固定が最も重要であり 5'-Nase 基質液組成、濃度、反応温度、時間は遠藤の条件^{11,20)}が最適であることが明らかとなった。そこで灌流固定時間、前固定時間、後固定時間を種々に変えて検討した結果、最も良好な染色性が得られた固定時間を採用した。いわゆる酵素組織化学における固定は、酵素の活性を失わずに組織構造を保ち、酵素の局在を本来の部位に留めるという相反することを満足する必要がある。すなわち生理的または病的な部位における酵素の局在を検索するためには、その目的とする組織に最も適した固定を行うことにより良好な染色性が得られることになる。したがって移植舌癌のような組織内型に浸潤し、炎症や正常組織の破壊によってリンパ管の同定が困難な場合においても、固定時間を変更することによってリンパ管の同定が可能となり、本研究におけるウサギ移植舌癌のリンパ管の観察に応用することができた。さらに 5'-Nase の動物種や組織による染色性の差は染色基質液の組成ではなく、固定時間を変更することにより調整することができた。

3. ウサギ舌内のリンパ経路

臨床的に舌癌の転移頻度は頸部リンパ節が最も高く²¹⁾、剖検例についても同様の結果がみられ²²⁾、所属リンパ節転移への対応が口腔癌患者の予後を左右する重要な因子である^{23,24)}。実験的にも山本²⁵⁾はイヌ、ネコの舌の部位別リンパ管経路について、西田²⁶⁾はウサギのリンパ経路について口底および頸部リンパ節の輸入および輸出リンパ管を観察している。また、奈良²⁷⁾はゴールデンハムスターの舌の部位別による所属リンパ節へのリンパ管経路を、陳と藤村²⁸⁾はゴールデンハムスター、マウス、ラットの舌内におけるリンパ管の走行について報告している。とくに、ゴールデンハムスターの舌内部におけるリンパ経路は舌深動脈伴行集合リンパ管と

舌中隔内集合リンパ管およびオトガイ舌筋筋束に沿って口底に向かう三つの経路が存在するといわれている²⁸⁾。

ウサギの舌ではゴールデンハムスターの舌に認められる舌中隔内集合リンパ管²⁸⁾の明確な像は認められなかったが、舌辺縁部から横舌筋に沿って舌中隔方向に向かうリンパ管が観察されたことから、舌中隔内集合リンパ管の存在する可能性が示唆された。また、オトガイ舌筋について、Dabelow²⁹⁾はヒトの舌では舌正中溝と舌中隔の間では左右のオトガイ舌筋線維が交叉すると報告しており、及川³⁰⁾は左右オトガイ舌筋の筋線維が舌中隔を越えて正中部舌背面との間においてX状に交叉し、それらは非常に密に走行し、反対側の舌背粘膜に付着していると述べている。ヒトの舌のオトガイ舌筋はその前額断的広がり、左右下縦舌筋の内側縁を経過して横舌筋中に進入し、舌背に向かって放散している。ウサギ舌の実験部位のみの観察では舌背に向け放散しているオトガイ舌筋と垂直舌筋との区別が不明瞭なため、オトガイ舌筋の交叉は確認できなかったが、その可能性のあることも推測された。

本研究で用いた VX2 癌細胞による反対側転移は移植腫瘍細胞の量や移植時の注射針の刺入の深さなどの移植手技によって、腫瘍進展度が経日的に異なっている³¹⁾。しかし腫瘍が舌中隔や口底部に達すると、反対側転移の頻度が高いことから、オトガイ舌筋筋束間を走行する集合リンパ管および舌中隔内集合リンパ管の交叉経路を経由して反対側へ転移する可能性が示唆された。

4. VX2 舌癌の進展とリンパ管

臨床的には舌原発腫瘍の進展、発育につれて深部への増殖も強まり、周縁部の癌細胞が遊離し、脈管内へ侵入する機会が増加するものと考えられる。これまでも VX2 移植舌癌の深頸リンパ節への転移について石沢⁷⁾、小西³²⁾、永井³³⁾は、移植側では7日までは認められず、10日以降になると深頸リンパ節の体積が増大し、転移が認められるようになると報告している。ま

た、移植側の深頸リンパ節転移は移植後14日例では全例に認められ⁷⁾、さらに移植後21日以降ではオトガイ下リンパ節にも転移がみられたが^{9,31)}、本実験においても同様の傾向がみられた。これらのことから、ウサギ VX2 舌癌は癌組織の増殖、進展とともに移植後7~10日頃に、深頸リンパ節へ転移するものと考えられた。この時期には癌細胞の影響を受けたリンパ管は、内皮細胞の増殖が旺盛となり、口径の増大、屈曲や蛇行などの形態変化をきたすものと推測された。リンパ節転移が始まる移植後10日例においては癌組織近接リンパ管の数も増え、その口径は14日例よりも太かった。また癌組織周囲リンパ管は筋肉の萎縮に伴う筋線維束間の拡大部では、屈曲、蛇行を呈していた。

以上のように、VX2 癌が小さく、舌中隔、口底、オトガイ舌筋付近などまで及んでいない時期には、深頸リンパ節への反対側転移の頻度が同側転移に比べて著しく低いことから³¹⁾、深頸リンパ節への転移経路の主流は舌深動脈伴行集合リンパ管によるものであると考えられた。しかしながら舌中隔に及んでいない大きさの癌でも、同側リンパ節転移に遅れて反対側リンパ節への転移が認められることは、リンパ節に流入した癌細胞が生着し、増殖できる環境が整うために、ある程度の時間と細胞数が必要であるものと考えられた。また、横舌筋に沿って舌中隔方向へ走行している集合リンパ管は口径が細く、数も少なかった。本研究よりさらに観察期間を延長した報告³¹⁾によると、VX2 移植舌癌細胞は反対側頸部リンパ節へ転移することが述べられている。癌の増殖が進行し、舌中隔や口底に近接すると、上記転移経路に加えてオトガイ舌筋筋束間集合リンパ管および舌中隔内集合リンパ管から転送された癌細胞が反対側頸部リンパ節へ転移するものと思われた。

一方、DMBA 誘発舌癌を用いて上皮内癌の毛細リンパ管を観察した遠藤¹¹⁾によれば、粘膜固有層内毛細リンパ管網から伸長した毛細リンパ管が、上皮直下に新たに毛細リンパ管網を形成していたと言う。しかし、浸潤癌を用いた中

山¹²⁾は、腫瘍の浸潤、増殖が始まると、周囲の毛細リンパ管は破壊されては再生し、常に一層の毛細リンパ管網を構成し、その口径を増大しながら癌の浸潤と増殖に対応していたが、リンパ管の染色性は明らかに低下していたと報告している。これらのことから舌癌においては、腫瘍の大きさ、発生部位、深達度などがリンパ節転移を予測する上で重要な因子の一つであることが示唆される。

臨床的には癌細胞がいつリンパ節に転移巣を形成するかを知ることは困難であり、転移を認めた時点ではすでに転移巣がある程度進展していることが多い。さらにリンパ節転移が疑われない場合でも、早期にリンパ節に細胞反応が認められたり³¹⁾、病理組織学的に転移が証明される¹⁵⁾ことから、癌細胞はかなり早期に所属リンパ節へと転移するものと考えられている³⁰⁾。

リンパ管の口径についての詳細な報告はヒトでは未だないが、西丸³⁵⁾はヒトの腸間膜の毛細リンパ管の収縮性について検索し、毛細血管に比べて伸展性が大きく、活動時には口径が著しく太くなると述べている。また、中山¹²⁾は浸潤癌における腫瘍直下の毛細リンパ管の口径が増大したと報告している。リンパ管の口径が太くなる理由として、癌組織は正常組織に存在する既存の血管系を利用して成長するが、移植後7日例の腫瘍では、間質からの過剰な液体成分の回収が既存のリンパ系によって行われる。しかし移植後10日例のように、さらに腫瘍が成長すると、新生血管の量が増加し、癌細胞や他の要因により血管へ圧迫が加わり、血管内圧が上昇する³⁶⁾。その結果、高分子などの液体成分が多量に間質中に滲出するが、間質中にはリンパ管の数が少なく、形態的にも圧迫されているため、口径は大きな変化を示さず、したがって液体成分の効率的な回収ができないものと考えられた。一方、増殖旺盛な腫瘍近接部では癌組織を取り囲むようにリンパ管網が形成され、組織液の吸収機能を補うために口径が太くなっているものと推察された。また、リンパ管の吸収機能は急激な腫瘍の進展に追いつかず、一部のリ

ンパ管は口径の増大がみられるものの、大部分のリンパ管は腫瘍により圧迫され、破壊されることによって組織液の貯留が生じ、移植側の舌の浮腫が顕著になるものと考えられた。また、この時期にはリンパ管の染色性が低下する傾向にあり、5'-Naseの働きを推察するうえできわめて重要である。5'-Naseは細胞代謝、物質輸送に関わる^{18,37)}ものと考えられているが、未だ詳細は不明である。一般的に5'-Nase活性は腫瘍細胞では低下し、細胞の増殖と5'-Nase活性の強さとは逆比例の関係にあることが報告³⁸⁾されている。本実験では癌細胞の増殖が旺盛な部位は腫瘍近接部であるが、この部位は転移が認められるようになる10日例ではリンパ管の5'-Nase活性が最も強く、逆に転移が全例に認められる14日例ではその活性が比較的弱かった。このことからVX2移植癌においても、5'-Naseは細胞増殖、細胞代謝の調整および物質輸送などに大きく関与しているものと考えられた。VX2舌癌では癌の発育、進展の場が筋組織であり、癌の進展、増殖が速いことから、リンパ管の様相はDMBA誘発舌癌における浸潤癌に類似しており、癌組織を取り囲むように一層のリンパ管網が形成され、その口径が増大していた。このような変化は癌細胞がリンパ管網を介することによって転移しやすい状況にあることが推測された。また、同じようなリンパ管構築を示すDMBA誘発舌癌では、VX2舌癌より転移率が低かった。これには接着因子や5'-Naseなどが深く関わっているものと考えられた。

結 論

ウサギ VX2 移植舌癌における毛細および集合リンパ管を5'-Nase染色法によって経日的に観察し、以下の結論を得た。

1. VX2 癌移植後の舌における腫瘍深達度は7日例および10日例ではGrade I、移植後14日例ではGrade IIに相当し、移植腫瘍の発育は経日的にほぼ一定の速度で浸潤、増殖する傾向を示した。

2. ウサギ舌における5'-Nase反応は固定条

件を調整することによって一定の組織像を観察し得るとともに、リンパ管を識別することが可能であった。

3. ウサギ舌内部における主要リンパ流には、舌深動脈伴行集合リンパ管、オトガイ舌筋に沿って口底に向かう集合リンパ管および舌中隔内集合リンパ管の三つの経路が推察された。

4. 癌組織近接リンパ管の口径は VX2 癌移植後 10 日例では、対照群との間に有意差 ($P < 0.01$) が認められ、毛細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ていた。

5. 癌組織周囲における集合リンパ管の走行は転移の認められない時期に比べると屈曲し、蛇行していた。また、癌組織間質内リンパ管の形態は癌の発育、進展の影響によって圧迫され、圧平される傾向がみられた。

謝 辞

稿を終るに臨み、御懇切なる御指導、御校閲を賜りました工藤啓吾教授、ならびに終始御指導と御助言をいただきました本学口腔解剖学第一講座野坂洋一郎教授と口腔病理学講座佐藤方信教授に深甚なる感謝の意を表します。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当教室ならびに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 39 回日本口腔外科学会総会 (1994 年 11 月, 名古屋市), 第 49 回日本口腔科学会総会 (1995 年 4 月, 岐阜市) および第 12 回国際口腔顎顔面外科学会 (1995 年 6 月, ブタペスト) において発表した。本研究の一部は文部省科学研究費 (奨励研究 A, 課題番号 07771703) および日本私学振興財団の平成 6 年度大学院重点特別経費の補助を受けて行った。

文 献

- 1) 中間義郎: 口腔癌の頸部リンパ節転移に関する研究, 日口外誌, 28: 1667 - 1684, 1982.
- 2) 新垣 晋: 口腔領域悪性腫瘍の頸部リンパ節転移に関する臨床病理学的研究, 日口外誌, 25: 784 - 797, 1979.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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 - 腫瘍血管の変化を中心として -, 日口外誌, 36: 1 - 20, 1990.
- 6) 中村貴司: 家兎舌癌 (VX₂ 癌) の増殖に関する神経組織学的研究, 九州歯会誌, 45: 76 - 98, 1991.
- 7) 石沢 新: 微粒子活性炭吸着ペプロマイシンと OK-432 のリンパ節転移抑制効果に関する実験的研究, 日口外誌, 38: 1104 - 1119, 1992.
- 8) 内野滋雄, 市川早苗, 中村陽市: リンパ管の微細分布と微細構造, 脈管学, 29: 353 - 356, 1989.
- 9) 岡田英吉, 熊田時正: パラフィン切片を用いたヒト剖検組織の毛細リンパ管と毛細血管の鑑別染色法, リンパ学, 15: 21 - 30, 1992.
- 10) 加藤征治: 酵素組織化学的方法によるリンパ管の確定方法, リンパ学, 12: 13 - 21, 1989.
- 11) 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.
- 12) 中山温史: ハムスター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, 1994.
- 13) 外山勤吾: VX2 癌移植による家兎舌癌の病理組織学的研究, 九州歯会誌, 38: 340 - 356, 1978.
- 14) 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.
- 15) 北原朋広, 松浦政彦, 小川 淳, 佐藤方信, 藤村朗, 野坂洋一郎, 工藤啓吾: 家兎 VX2 舌癌におけるリンパ管の分布と構築 (抄), 口科誌, 44: 212, 1995.
- 16) Rous, P., and Kidd, J. G.: 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.
- 17) 今井 環: 人体癌腫発育状況の形態的考察, 日病誌, 43: 22 - 32, 1954.
- 18) Kato, S., and Miyauchi, R.: Enzyme histochemical visualization of lymphatic capillaries in the mouse tongue light and electron microscopic study. *Okajimas Folia Anat. Jpn.* 65: 391-404,

- 1989.
- 19) Kato, S. : Histochemical localization of 5'-nucleotidase in the lymphatic endothelium. *Acta Histochem. Cytochem.* 23 : 613 - 620, 1990.
- 20) 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.
- 21) 立花忠夫 : 口腔領域扁平上皮癌の頸部リンパ節転移に関する臨床的ならびに病理組織学的研究, 口病誌, 2 : 521 - 544, 1985.
- 22) 佐藤方信, 佐島三重子, 畠山節子, 森田裕啓, 鈴木鍾美 : 日本病理剖検輯報に基づく舌癌剖検症例の統計的検討 (第Ⅲ報), 日口外誌, 34 : 2576 - 2585, 1988.
- 23) Lindberg, R. : Distribution of cervical lymph node metastases from squamous cell carcinoma of upper respiratory and digestive tracts. *Cancer* 29 : 1446 - 1449, 1972.
- 24) Spiro, R. H., and Alfonso, A. E. : Cervical node metastasis from epidermoid carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Am. J. Surg.* 128 : 562 - 567, 1974.
- 25) 山本一子 : 哺乳動物の舌に発するリンパ管経路の比較解剖学的研究, 慈恵医大誌, 95 : 1174 - 1188, 1980.
- 26) 西田邦彦 : 家兎のリンパ管系に就いて, 熊本医会誌, 28 : 295 - 318, 1954.
- 27) 奈良栄介 : ゴールデンハムスター舌におけるリンパ管経路の研究, 岩手医大歯誌, 16 : 95 - 108, 1992.
- 28) 陳 寛宏, 藤村 朗 : ゴールデンハムスター舌におけるリンパ管の走行, 岩手医大歯誌, 19 : 91 - 102, 1994.
- 29) Dabelow, R. : Vorstudien zu einer Betrachtung der Zunge als funktionelles System. *Morph. Jahrb.* 91 : 33 - 76, 1951.
- 30) 及川 良 : ヒト胎児舌筋の走行及び分布に関する研究, 歯科学報, 73 : 485 - 527, 1973.
- 31) 松浦政彦, 北原朋広, 斎藤恒夫, 中山温史, 佐藤方信, 藤村 朗, 野坂洋一郎, 工藤啓吾 : 家兎 VX 2 舌癌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 (抄), 口科誌, 44 : 211, 1995
- 32) 小西稔慰 : VX 2 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.
- 33) 永井省二 : 口腔癌におけるフィブロネクチンおよびフィブリノーゲンの動態に関する実験的研究, 日口外誌, 36 : 465 - 477, 1990.
- 34) 篠原正徳, 鴨田 誠, 原田 猛, 竹之下康治, 岡増一郎 : 口腔癌の頸部リンパ節転移に関する臨床的・病理組織学的検討, 頭頸部腫瘍, 16 : 113 - 118, 1990.
- 35) 西丸和義 : リンパ管系に関する研究総括, 広島医学, 18 : 109 - 126, 1965.
- 36) 鈴木麿郎, 堀 勝義, 阿部郁夫, 斎藤祥子, 佐藤春郎 : 腫瘍血管の機能病理学的研究, 癌の臨床, 28 : 592 - 598, 1982.
- 37) 山科正平 : 5'-nucleotidase と thiamine pyrophosphatase, 日本組織細胞化学会編 : 組織細胞化学 1980, 学際企画, 東京, : 61 - 71 ページ, 1980.
- 38) Fritzson, P. : Dephosphorylation of pyrimidine nucleotides in the soluble fraction of homogenates from normal and regenerating rat liver. *European. J. Biochem.* 1 : 12 - 20, 1967.