

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

遠藤 光 宏

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：1992年12月26日]

[受理：1993年1月7日]

Abstract : The following experiment was undertaken to investigate the distribution and structure of lymphatic capillaries in connective tissue underlying an early DMBA-induced cancer of the tongue using golden hamsters. The left lingual margin was rubbed with a dental cleanser in the control group. In an experimental group, the left lingual margin was treated likewise and was further treated with a 0.5% 9,10-dimethyl 1,2-benzanthracene acetate solution for induction of an early tongue cancer. Lymphatic vessels in the tongues of both groups were identified by intravascular injection of Indian ink and impregnation with a silver nitrate solution and by double staining with 5'-nucleotidase-alkaline phosphatase.

In the control group, lymphatic capillaries formed a plexus directly above the muscle layer in submucosal connective tissue. A few lymphatic capillaries were found to extend as cecal lymphatic capillaries from the plexus into connective tissue papillae. In the experimental group, the lymphatic capillaries formed another layer of lymphatic network on the epithelial side in addition to a network directly above the muscle layer of connective tissue underlying the early cancer. Furthermore, the cecal lymphatic capillaries extending from the newly formed lymphatic network appeared more frequently than they did in the control group. These cecal lymphatic capillaries were thick and meandered. This pattern of the distribution and structure of lymphatic capillaries was considered to suggest hypermetabolism at the local site of early cancer formation and cancer proliferation.

The 5'-Nase-ALPase double staining is a simple method for the identification of lymphatic capillaries. This study suggested the feasibility of its application to clinicopathological research.

Key words : DMBA-induced cancer, cancer of the tongue, lymphatic capillary, 5'-Nase-ALPase double staining

緒 言

口腔領域では臨床的に最も発生頻度の高い舌癌¹⁾に関する基礎的研究が多くみられる。とく

に、ゴールデンハムスターは9,10-dimethyl 1,2-benzanthracene acetone solution (以下、DMBA 溶液と略す)により舌癌の誘発が容易な実験系である²⁾。このような誘発舌癌を用い

An experimental study on the distribution and structure of lymphatic capillaries in the connective tissue underlying induced tongue cancer.

Mitsuhiro ENDO

(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. 18 : 36 - 50, 1993

た研究には血管の構築^{3,4)}と血管の透過性^{5,6)}、舌癌の放射線照射による影響^{7,8)}、腫瘍の神経組織⁹⁾、誘発舌癌組織の核酸代謝¹⁰⁾および抗癌剤の効果^{11,12)}などに関する多数の報告がみられる。

従来、原発病巣と所属リンパ節間を連結するリンパ管についての研究はきわめて少なかった。とくに、舌癌の基礎的研究として有用なハムスターでは墨汁穿刺注入法によって Miotti¹³⁾や Hoffman ら¹⁴⁾が舌のリンパ経路を、また奈良¹⁵⁾が舌および頸部リンパ管経路について報告している程度である。一方、舌癌の転移は腫瘍の浸潤様式と密接な関連性のあることが指摘され¹⁶⁾、tumor-host relation を考慮すべきである^{17,18)}とも言われている。このことから、腫瘍宿主境界部における毛細リンパ管の分布と構築を解明することはきわめて重要である。しかしながら、いまだリンパ管の走行と形態的变化に関する詳細な報告はみられない。これは毛細リンパ管の同定が困難である¹⁹⁻²¹⁾ことに起因しているものと思われる。

これまで、リンパ管の同定は加墨汁硝酸銀水局所動脈注入法(以下、硝酸銀動注法と略す)²²⁾、色素穿刺注入法¹³⁾、過酸化水素法²⁰⁾などによって行われてきた。しかしながら、これらのうちの一つの方法によるリンパ管の同定は困難であった。最近、加藤^{21,23,24)}は毛細リンパ管の内皮細胞が強い 5'-nucleotidase (以下、5'-Nase と略す) 活性を有し、毛細血管の内皮細胞が alkaline phosphatase (以下、ALPase と略す) 強陽性である²⁵⁾ことに着目し、これらを併合わせた 5'-Nase-ALPase 二重染色法を考案した。この方法はリンパ管の容易な観察法として有用性のあることが報告されている^{21,23,24,26)}。

DMBA 誘発舌癌を用いた多くの研究は、ほとんどが扁平上皮癌についての報告^{3,5-7,9-12)}であり、その初期像についての研究は三國²⁷⁾の報告がみられるだけである。一方、現在、早期癌は臓器によって多少の範囲の差はある^{28,29)}が、形態的には上皮内癌、非浸潤癌、早期浸潤癌などがあげられている²⁹⁾。

本研究では、舌に誘発された腫瘍が組織学的

に上皮内にとどまり、基底膜を越えて浸潤していないものをいわゆる早期癌²⁹⁾として、その癌下結合組織における毛細リンパ管構築を硝酸銀動注法と 5'-Nase-ALPase 二重染色法によって検索したので、その結果を報告する。

材料および方法

1. 実験動物

実験には、生後 5 週齢の雄性ゴールデンハムスター 60 匹(体重 80 g 前後、船橋農場)を用い、紫外線灯による滅菌水および飼育用固形飼料(飼育用オリエンタル MF)を自由摂取させた。これらの条件下に岩手医科大学歯学部動物舎(温度:23±2°C,湿度:55±5%,照明時間:12 時間サイクル)で一週間の予備飼育を行い、左耳にパンチングによる実験動物番号を印記し、健康状態に異常のないことを確認してから実験に用いた。

2. 実験方法

1) 早期舌癌の誘発法

a. 対照群

30 匹のハムスターを用い、これらをエーテルで麻酔し、左側舌体辺縁中央 1/3 の部位(Fig.1)を 1 週 3 回、歯科用クレンザー(ピアス社製, No.1)で粘膜上皮層下の結合組織に達しないように注意しながら、粘膜表面が粗造になるまで数回軽く擦過した。

b. 実験群

ハムスター 30 匹を用い、対照群と同様に擦過操作を行い、乾燥後、0.5%DMBA 溶液を小筆にて塗布した。この操作を 1 週 3 回ずつ、12 週間行った。

2) 観察時期

a. 対照群

シャムオペレーション後、実験群と同期間経過したハムスターを乱数列(JIS Z 9031 乱数表)によって 30 匹を対照群として、無作為に抽出し、観察した。

b. 実験群

擦過後、0.5%DMBA 溶液を塗布した部位の粘膜が灰白色を呈して隆起し、これが直径 3 mm

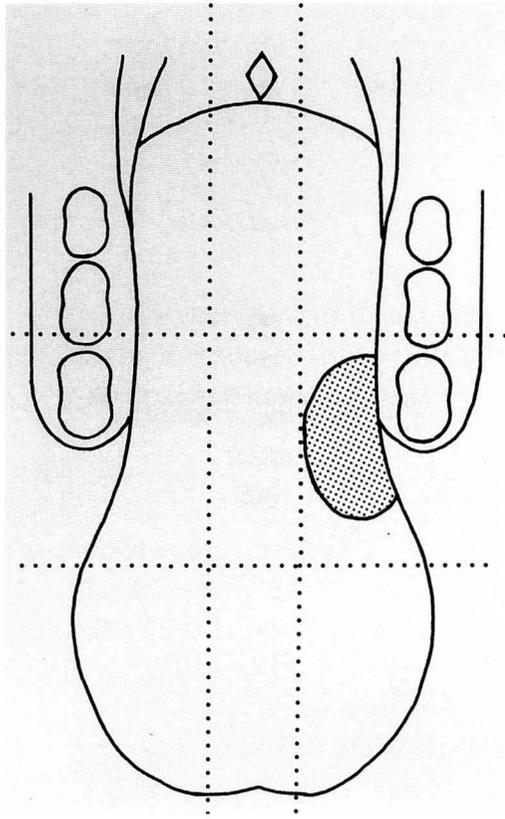


Fig.1 Site of tongue cancer induction and sectioning of specimens.

■: Area rubbed in the control group, and area rubbed and DMBA - applied in the experimental group.

となったハムスターを乱数列にしたがって無作為に抽出し、観察した。

3) リンパ管の同定法

a. 硝酸銀動注法

実験群 15 匹と対照群 15 匹のハムスターをネブタールにて腹腔内麻酔 (0.05 mg/g) を行なってから開胸し、心尖より上行大動脈に向けてカテーテルを挿管し、瀉血用に右心耳を切開した。

下行大動脈を結紮した後、3.3% 硫酸ナトリウム溶液にて 4 ml/分 で 10 分間、灌流、瀉血した。その後、0.7% 硝酸銀溶液を 4 ml/分 で 10 分間、側管より注入し、上半身収縮、舌腫大、頸部浮腫、舌および右心耳切開部周囲が白濁することを確認し、放置した。

それから、墨汁を 4 ml/分 で 10 分間注入し、10% ホルマリン溶液に浸漬固定した。なお、これらの薬液注入の操作は薬液瓶の位置を実験台の上方 50 cm に設定して行った。

一週間、浸漬固定を施したハムスターを断頭後、摘出した舌の中央部を前額断で切り出し、通常の方法でパラフィン包埋した後、毛細リンパ管観察のために厚さ 40 μ m の連続切片を作製した。薄切の途中、組織診断のために 5 μ m の切片を随時切り出した。これらの切片を紫外線灯 (東芝社製、H-400-P) に 48 時間曝露して、黄土色になるまで発色させた後、H. E 染色およびケルンエヒトロート液にて核染色を行った。

b. 5'-Nase-ALPase 二重染色法

実験群 15 匹と対照群 15 匹にこの染色方法を施行した。まず、硝酸銀動注法と同様に頭頸部の血液循環路を確保し、同様の薬液注入方法で 0.1 M カコジル酸塩緩衝液 (pH 7.2, 7% サッカロース含) を 4 ml/分 で 10 分間、灌流、瀉血した後、同液中にホルムアルデヒドと塩化カルシウムをそれぞれ 2% と 1% の割合で含む固定液 (冷 2% ホルムアルデヒド 1% 塩化カルシウム固定液) にて 1 時間 (4 ml/分) 灌流固定した。次いで断頭後、舌を採取し、冷 4% ホルムアルデヒド 1% 塩化カルシウム固定液に 30 分間、浸漬固定した。その後、4°C 0.1 M トリスマレイン酸緩衝液 (pH 7.2) 中で十分に洗浄して、OCT 化合物 (Miles 社製) に包埋した。これを -20°C で凍結後、40 μ m の連続切片を作製した。この 40 μ m の切片を冷 4% ホルムアルデヒド 1% 塩化カルシウム固定液に 30 分間、再度浸漬固定した。酵素組織化学染色はまず最初に金属鉛法を用いた 5'-Nase 染色として、加藤^{21,24)}の反応液組成を参考に Wachstein and Meisel 法³⁰⁾を改変した反応液 (Table 1) に 37°C, 30 分間浸漬した後、1% 硫化アンモニウム溶液にて発色させた。

つぎに、アゾ色素法を用いた ALPase 染色として、Burstone 法³¹⁾を加藤^{21,24)}が改変した反応液 (Table 2) に 37°C, 30 分間浸漬した後、蒸

Table 1 Components of standard medium for 5'-Nase activity.*

Reagent	Dose
0.1 M Tris-malate buffer pH 7.2	4.0 ml
Saccharose	0.7 g
3.6 mM MgSO ₄	0.4 ml
2.0 mM levamisole	1.0 ml
3.6 mM Pb (NO ₃) ₂	0.6 ml
2.9 mM adenosine 5' monophosphate (5'-AMP)	4.0 ml

* : Wachstein and Meisel's methods for 5'-Nase staining was modified.

Table 2 Components of reaction medium for ALPase activity.*

Reagent	Dose
naphthol AS-MX phosphate	20 mg
N, N'-dimethylformamid	1 ml
fast blue BB salt	20 mg
0.1 M Tris-HCl buffer pH 9.2	20 ml

* : Kato's methods for ALPase staining was modified.

留水ですすぎ洗いし、グリセリンで封入した。

なお、5'-Nase-ALPase 二重染色法における実験群の舌病変の組織学的観察には、この 40 μm の切片を再度パラフィン包埋後、5 μm に薄切し、H. E 染色を施したものをを用いた。また、あらかじめ 5'-Nase 染色と ALPase 染色の各々の染色性の対照として基質 (5'-AMP または naphthol AS-MX phosphate) を除いた反応液または反応媒体中への浸漬前に 60 分間、60°C で処理し、すべての酵素反応が陰性であることを確認し、これらが特異的酵素反応であることを証明した。

4) リンパ管の識別

a. 硝酸銀動注法

この方法では血管内へ注入した墨汁は腔内に残り、0.7% 硝酸銀溶液だけが血管より漏出し、周囲組織を経てリンパ管に入り、硝酸銀がリンパ管内皮細胞間接合部へ沈着、還元され、黄褐色を呈するようになる²⁰⁾。したがって、血管とリンパ管の識別は墨汁粒子が残存しているものを血管とし、それ以外の管腔構造物では内皮細胞間接合部が褐色で、かつ内皮細胞の輪郭がジグザグの形態を示す、いわゆる柏の葉状を呈し、大きな扁平な内皮細胞を有するものをリンパ管^{19, 22)}と判定した。

b. 5'-Nase-ALPase 二重染色法

リンパ管は 5'-Nase 強陽性で、また血管は ALPase 強陽性であると報告されている^{21, 23-26)}。そこで、本研究では金属鉛法による捕捉剤の鉛沈着として黒褐色を呈した 5'-Nase 強陽性の管をリンパ管とし、アゾ色素法の fast blue BB によって染出され、青紫色を呈した ALPase 強陽性の管を血管と判定した。

5) 統計処理

a. ハムスターの体重測定

対照群、実験群の各々のハムスターの体重を購入時から 2 週間ごとに電磁式ばかり (alsep EX-2000 B, 研精工業社製) を用いて測定した。これらの計測値を経時的に平均値とその標準偏差を算出した。対照群と実験群における検定は Student の t 検査を 1% の危険率で行なったが、有意差は認められなかった。

b. 毛細リンパ管と血管の直径の比較

対照群、実験群のすべての標本は、毛細リンパ管と血管の存在部位、すなわち結合組織乳頭内、粘膜下結合組織内、早期癌下結合組織内の 3 ヶ所を計測し、それぞれの管腔直径の平均値とその標準偏差を算出した。計測標本数は対照群が 30 標本、実験群が 20 標本のため、両者間ならびに毛細リンパ管と血管との間における有

意差の判定には Student の t 検定を1%の危険率で行なった。

実験成績

1. 誘発粘膜病変

1) 肉眼的分類

粘膜病変の肉眼的分類^{2,4,7)}では実験群 30 匹のうち、外方腫瘤型(非浸潤性外向性腫瘤形成型)が 14 匹 (46.7%) と最も多く、ついで内方腫瘤型(浸潤性腫瘤形成型)が 7 匹 (23.3%)、表在型が 6 匹 (20.0%)、腫瘤消失浸潤型(非腫瘤形成浸潤性潰瘍型)が 3 匹 (10.0%) の順であった。

2) 組織学的分類

実験群 30 匹のすべてに扁平上皮癌が発生したが、このうち 10 匹 (33.3%) が浸潤性発育をみた高分化型の浸潤癌であり、20 匹 (66.7%)

が上皮組織に浸潤をみない、いわゆる早期癌^{28,29)}であった。なお、本研究に用いた病変は肉眼的分類においては外方腫瘤型または表在型で、かつ組織学的には内向性浸潤の認められない、いわゆる早期癌^{28,29)}の 20 匹である。

3) リンパ節および臓器転移

実験群についてはリンパ節および臓器を肉眼的ならびに組織学的に検索したが、いずれにも転移は認めなかった。

2. 体重の変化

対照群 30 匹の体重は購入時には 78.6 ± 4.4 g, 飼育 2 週間目では 92.3 ± 6.8 g, 飼育 14 週間目では 160.8 ± 15.3 g と順調に発育し、安定した。一方、実験群 30 匹の体重は、購入時には 75.9 ± 4.8 g, 飼育 2 週間目では 92.5 ± 6.8 g, 飼育 14 週間目では 162.8 ± 14.6 g であった。その後、病変部の直径が 5 mm を越えた 4 匹は

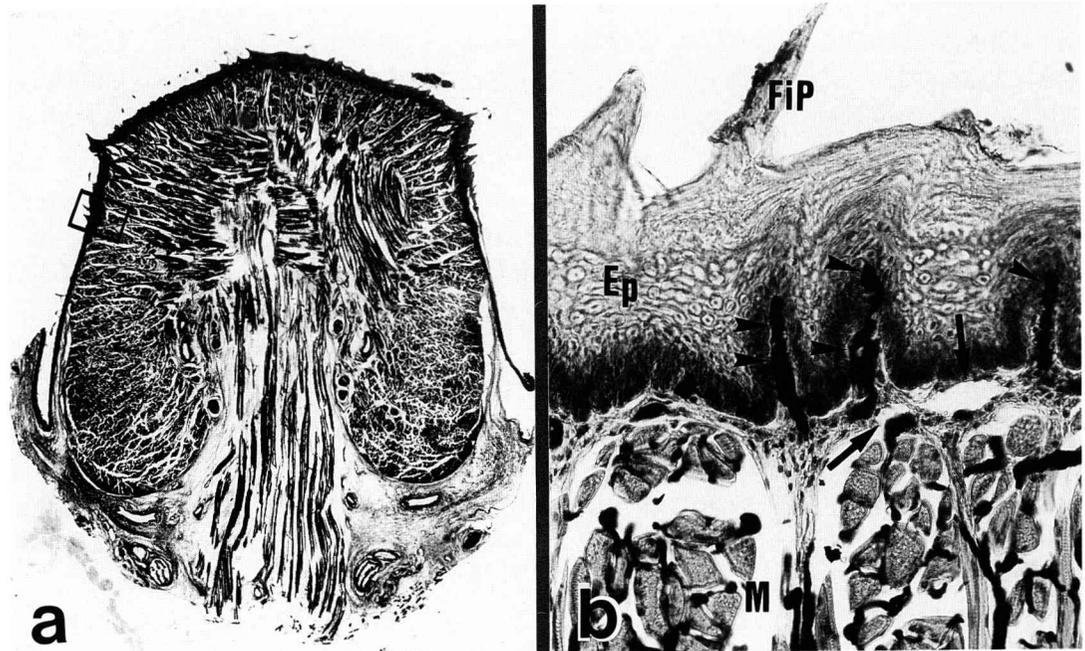


Fig. 2 Lymphatic capillaries and blood vessels at left lingual margin in the control group. (Intravascular injection of Indian ink and impregnation with silver nitrate solution)

a : Frontal section at the mid-1/3-part of the central tongue. A low filiform papilla and smooth tongue epithelium. ($\times 10$)

b : Abundant blood capillaries (arrowheads) and a few lymphatic capillaries (arrows) in connective tissue and the connective tissue papillae. (Magnification of \square - enclosed part in A, $\times 175$)

FiP : filiform papillae, Ep : epithelium, M : muscle layer

肉眼的に内方腫瘤型および腫瘤消失浸潤型で、飼育 21 週間目では 104.5 ± 12.4 g と体重の減少をきたし、飼育 26 週間目までに 4 匹とも死亡した。これらは実験には使用しなかった。

3. 光学顕微鏡的所見

1) 対照群

a. 硝酸銀動注法

糸状乳頭の高さは舌辺縁部では舌背中央部より低くなり、舌下粘膜には糸状乳頭はなく、粘膜は滑らかな角化上皮であった (Fig.2a)。粘膜下結合組織の固有層内には墨汁で満たされた毛細血管が豊富に観察され、すべての結合組織乳頭内には毛細血管ループが形成されていた。また、毛細リンパ管は非常にまばらではあるが、粘膜下結合組織内ならびに舌筋束間に散在して認められた (Fig.2b)。

さらに、舌深動脈周囲における集合リンパ管は動静脈と神経の三者間に介在して、黒褐色で円形ないし長円形の核を持つ内皮細胞はいわゆる柏の葉状の形態を呈していた (Fig.3)。

b. 5'-Nase-ALPase 二重染色法

5'-Nase 単染色を施した標本では、結合組織乳頭内から粘膜下結合組織へかけて黒褐色の小管が観察された (Fig.4a)。さらに、この同一切

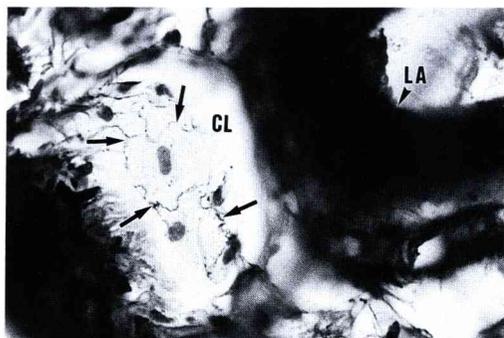


Fig.3 Characteristics of lymphatic capillary endothelium in the control group. (Intravascular injection of Indian ink and impregnation with silver nitrate solution)
Collective lymphatic vessels that have lymphatic endothelial cells forming oak-leaf-like contours. (arrows) ($\times 200$)
CL : collective lymphatic vessels,
LA : profound lingual artery

片に ALPase 染色を行なうと、先の黒褐色の小管を取り囲むような青紫色の小管と新たな青紫色の小管が出現した (Fig.4b)。

これらの青紫色の小管は ALPase 陽性で、かつ連続切片においてはループ状を呈し、粘膜下結合組織内の叢に合流し、さらに筋層を走行する太い血管に連結していることから毛細血管と判定した。一方、先の 5'-Nase 陽性で黒褐色を呈する小管は連続切片で筋層内の血管とは独立した集合リンパ管に合流していることから毛細リンパ管と判定した。

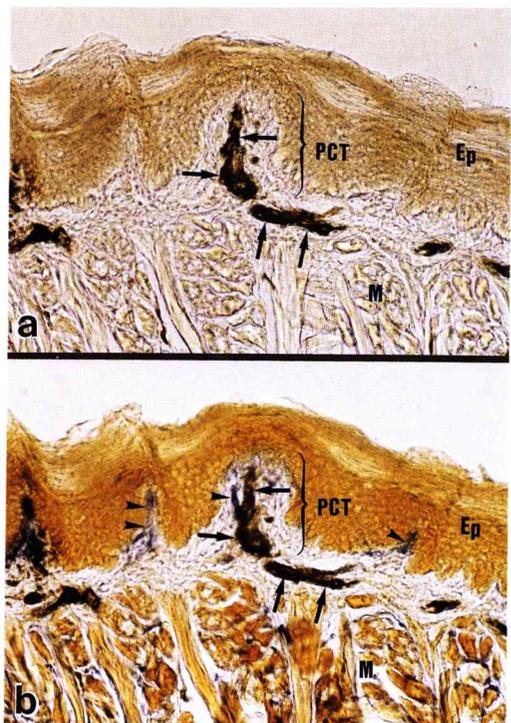


Fig.4 Comparison between lymphatic capillaries and blood vessels by staining.
a : Lymphatic capillaries that are stained in black-brown color in connective tissue papillae. (arrows) (5'-Nase single staining, $\times 100$)
b : ALPase staining of the same specimen (Fig.4a). Blood vessels that are stained in blue-violet color (arrowheads) are different from lymphatic capillaries (arrows) (5'-Nase-ALPase double staining, $\times 100$)
PCT : connective tissue papillae,
Ep : epithelium, M : muscle layer

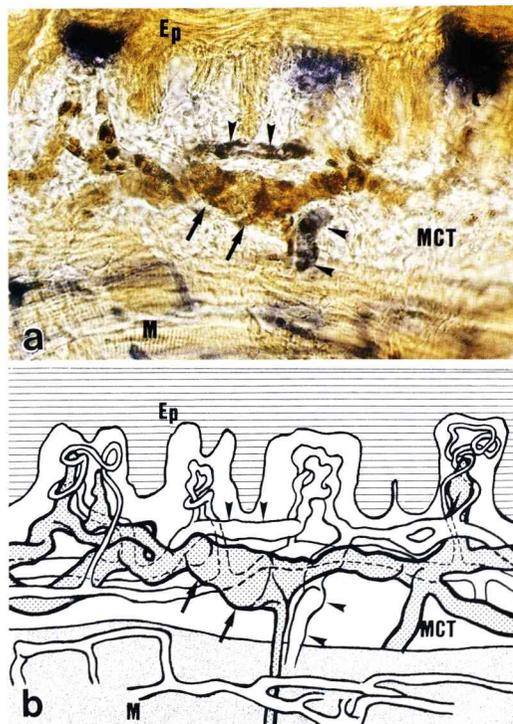


Fig. 5 Relation of lymphatic capillaries to blood vessels.
 a : Lymphatic capillaries (arrows) never intersect blood vessels (arrowheads).
 (5'-Nase-ALPase double staining, $\times 100$)
 b : Solid structure of lymphatic capillaries and blood vessels in continuous section (Fig. 5a).
 MCT : submucosal connective tissue,
 Ep : epithelium, M : muscle layer

毛細血管はすべての結合組織乳頭内に入り込んでいたのに対し、毛細リンパ管を含む結合組織乳頭は非常にまれで、大多数のものにはそれらが認められなかった。さらに、これらの両者はそれぞれ独立した脈管系で、決して吻合することはなかった (Fig. 5a, b)。なお、結合組織乳頭内にみられた毛細リンパ管の直径 ($22.8 \pm 7.4 \mu\text{m}$) と毛細血管の直径 ($7.3 \pm 1.7 \mu\text{m}$) の間には有意な差 ($p < 0.01$) が認められた。この毛細リンパ管はまれにしか観察されなかったが、結合組織乳頭内からほぼ直線的に粘膜上皮直下下行し、その粘膜下結合組織内を横走し、毛細リンパ管網を形成していた (Fig. 6)。

この粘膜下結合組織内の毛細リンパ管と血管の太さは、それぞれ直径 $13.7 \pm 4.0 \mu\text{m}$ と $10.3 \pm 3.2 \mu\text{m}$ であったが、両者の間に有意の差は認められなかった。また、これらの分布の様相は上皮に近い浅層に細動静脈が、深層に毛細リンパ管が走行していた (Fig. 7)。

舌固有筋層においてはコイル状を呈した毛細血管が筋線維に絡み付くように分布しているのに対し、リンパ管は舌筋束間を直線的に走行し、舌中隔部の集合リンパ管に合流していた (Fig. 8)。

2) 実験群

a. 硝酸銀動注法

擦過後、DMBA 溶液を塗布した部位の舌粘膜上皮細胞は不規則に配列しながら、全体的に肥厚し、核分裂像も増加し、基部では細胞の極性の消失、核細胞質比の増大、過染色性核も目立ち、舌粘膜表層には著明な角化がみられ、一部には角化球の形成が認められた。

これらの所見から舌の早期癌と診断した。この部位の癌下結合組織には拡張した多数のリンパ管、毛細血管が分布していた (Fig. 9)。また、早期癌下結合組織には毛細血管が蛇行しながら伸展し、著明な血管新生が認められ、上皮直下で密な網目状を形成していた。さらに、その下層に毛細リンパ管が受皿のごとく網目を形成して存在していた。この毛細リンパ管網は筋層直上に既存する毛細リンパ管網から伸展し、新たに形成されたもので、その内腔は凹凸不整であった (Fig. 10a-d)。

結合組織乳頭内の毛細血管ループは乳頭先端にまで到達していた。一方、毛細リンパ管は結合組織乳頭の先端までは到達しておらず、盲端で始まっていた。これらの盲端で始まる毛細リンパ管は癌下結合組織内に存在し、新たに形成された毛細リンパ管網と合流していた。これらの毛細リンパ管は対照群のそれに比べて、直径 $61.7 \pm 24.5 \mu\text{m}$ と有意 ($p < 0.01$) に拡張していた。

b. 5'-Nase-ALPase 二重染色法

癌下結合組織内には多数の毛細リンパ管と毛

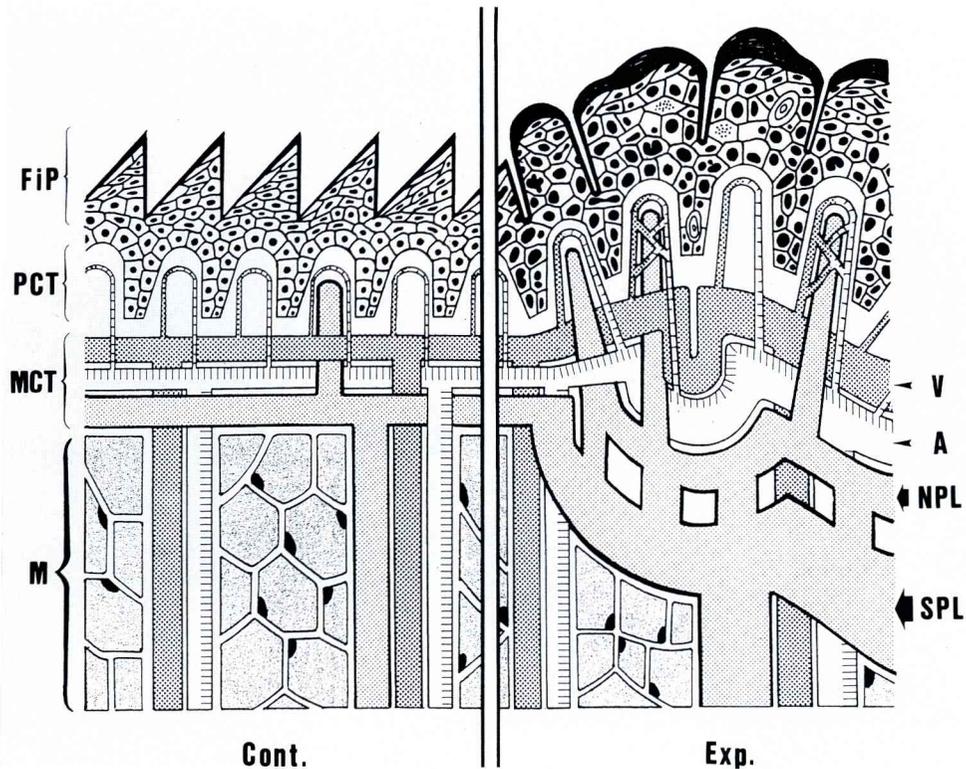


Fig. 6 Schematic presentation of distribution of lymphatic capillaries and blood vessels
 FiP : filiform papillae, PCT : connective tissue papillae, MCT : submucosal connective tissue, M : muscle layer, V : venule, A : artery, NPL : newly formed lymphatic network, SPL : lymphatic network overlying muscle layer, Cont. : control group, Exp. : experimental group

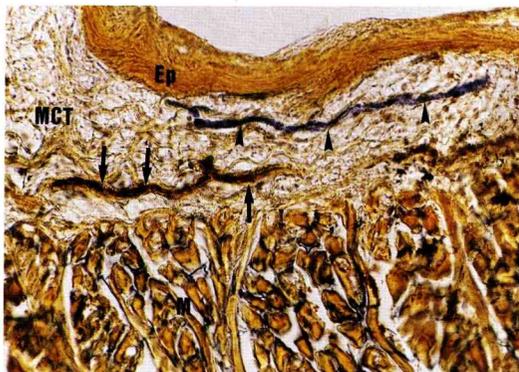


Fig. 7 Positional relation of lymphatic capillaries to blood vessels. (5'-Nase-ALPase double staining)
 Blood vessels are near to epithelium (arrowhead) and lymphatic capillaries far from it (arrows). (× 100)
 MCT : submucosal connective tissue, Ep : epithelium, M : muscle layer

細血管が観察され、その直径は毛細血管（直径 $24.6 \pm 9.8 \mu m$ ）に比較して、伴走した毛細リンパ管（直径 $61.7 \pm 24.5 \mu m$ ）の方が太かった (Fig. 11a-c)。

癌下結合組織内における毛細リンパ管および毛細血管の数は対照群に比べて増加し、共にその太さを増し、蛇行するように走行していた。その上、毛細リンパ管は毛細血管より太く、蛇行の程度もより高度であった (Table 3, Fig. 6)。また、このような毛細リンパ管は 5'-Nase 活性を示す褐色の程度が強く、対照群には存在しない癌下結合組織の新生した毛細リンパ管網において、最も強く濃染されていた (Fig. 12)。さらに、結合組織乳頭内の毛細リンパ管や筋層直上の毛細リンパ管網も対照群と比較すると 5'-Nase 活性は強陽性であった。なお、舌筋内



Fig. 8 Collective lymphatic vessels in lingual muscle layer.
(5'-Nase-ALPase double staining)
Collective lymphatic vessels exist in muscle layer, and joined at the lingual septum.
Collective lymphatic vessels (arrows)
(× 140)
M : muscle layer, LS : lingual septum

では毛細リンパ管の分布および走行は対照群と比較して大きな違いが認められなかった。

考 察

1. 誘発病変について

誘発病変の肉眼的分類では、従来の報告^{2,4,7)}と同様、内方腫瘤型よりも外方腫瘤型が多く認められた。また、組織学的分類では扁平上皮癌が100%であるとする報告^{2,3,6,32)}がみられるが、著者の今回の研究でも全例に扁平上皮癌の発生をみた。一方、組織学的な浸潤の程度は上皮下結合組織に浸潤をみない、いわゆる早期癌^{28,29)}が66.7%を占め、その他は浸潤癌であった。この結果は舌癌形成過程の初期段階における舌粘

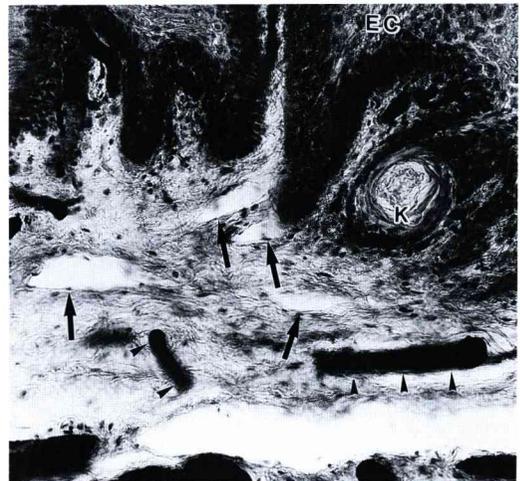


Fig. 9 Lymphatic capillaries in the experimental group. (Intravascular injection of Indian ink and impregnation with silver nitrate solution)
Irregular proliferation of mucosal epithelium. Abundant blood capillaries (arrowheads) and extending lymphatic capillaries (arrows) (× 350)
EC : early cancer, K : keratinization

膜病変直下の毛細リンパ管分布と構築の観察を目的とするため、擦過を軽く粘膜上皮下層の結合組織に達しないように注意して行なったこと、炎症による二次的酵素反応を避けるため、発癌操作施行後、放置期間を3週間以上としたことによるものと考えられた。また、舌癌形成過程は1) 粘膜の過角化、肥厚期、2) 乳頭腫様小腫瘤形成期、3) 乳頭腫形成期、4) 癌形成期と4期に分けられている^{2,4,8)}。しかし、浸潤増殖をきたした誘発舌癌では、毛細リンパ管の新生、増殖による構築の変動を招来することが推測される。したがって、癌周囲の毛細リンパ管の明瞭な組織の形態変化を観察するためには、誘発舌癌の初期⁸⁾と考えられている癌形成期以前の時期における毛細リンパ管の組織学的変化を知ることがきわめて重要である。とくに、5'-Nase-ALPase二重染色法によるリンパ管の同定に際しては、癌が内向性に大きく浸潤し過ぎると、炎症や正常組織の高度破壊によって同定基準が消失する。さらに、浸潤が拡大することによって脈管の新生、増殖による構築の

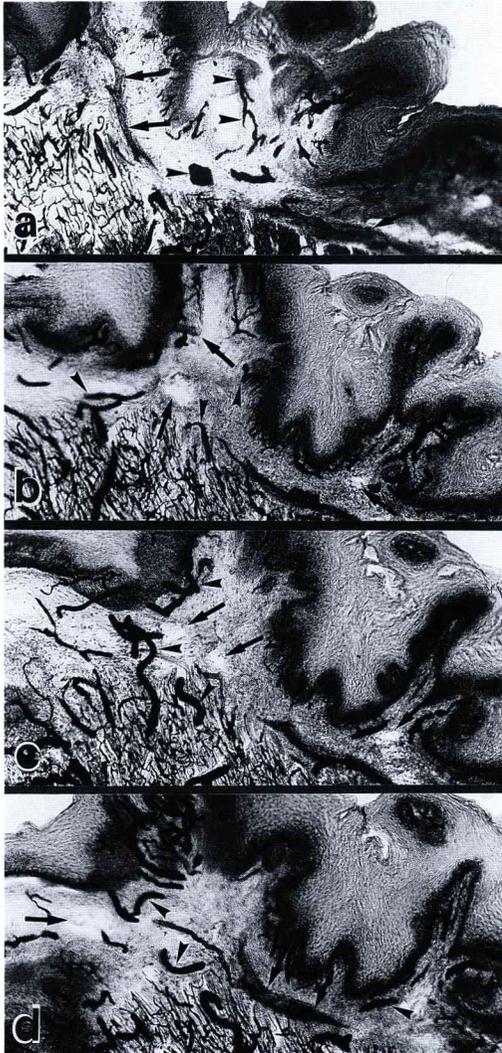


Fig. 10 Structure of lymphatic capillaries in the experimental group. (Intravascular injection of Indian ink and impregnation with silver nitrate solution, continuous section, $\times 100$)
 a-d : Lymphatic capillaries (arrows) and blood vessels (arrowheads) extend and meander underlying early cancer of the tongue.

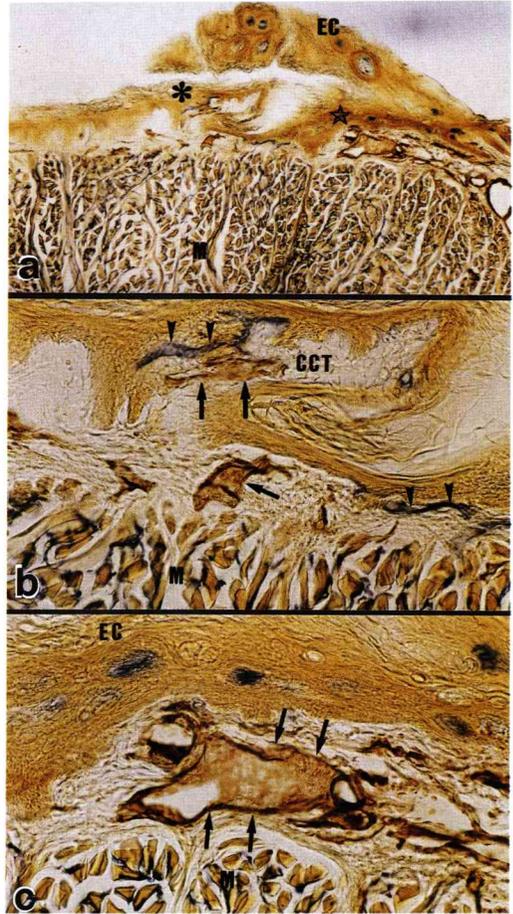


Fig. 11 Lymphatic capillaries in the experimental group.
 (5'-Nase-ALPase double staining)
 a : Abundant lymphatic capillaries and blood vessels underlying early cancer of the tongue. ($\times 20$)
 b : Winding lymphatic capillaries (arrows) exist near blood vessels (arrowheads) (Magnification of * - marked region in A, $\times 200$)
 c : Thick and winding lymphatic capillaries (arrows) (Magnification of ☆ - marked region in A, $\times 200$)
 EC : early cancer, M : muscle layer, CCT : connective tissue underlying cancer

Table 3 Comparison between diameter of lymphatic capillaries and blood vessels.

region	(Number)	Diameter (μm)			
		lymphatic capillaries		blood vessels	
PCT	(30)	22.8 \pm 7.4	*	7.3 \pm 1.7	*]
MCT	(30)	13.7 \pm 4.0	*	10.3 \pm 3.2	
CCT	(20)	61.7 \pm 24.5	*	24.6 \pm 9.8	

* : $P < 0.01$

PCT : papillae of connective tissue, MCT : connective tissue underlying mucosa,
 CCT : connective tissue underlying cancer

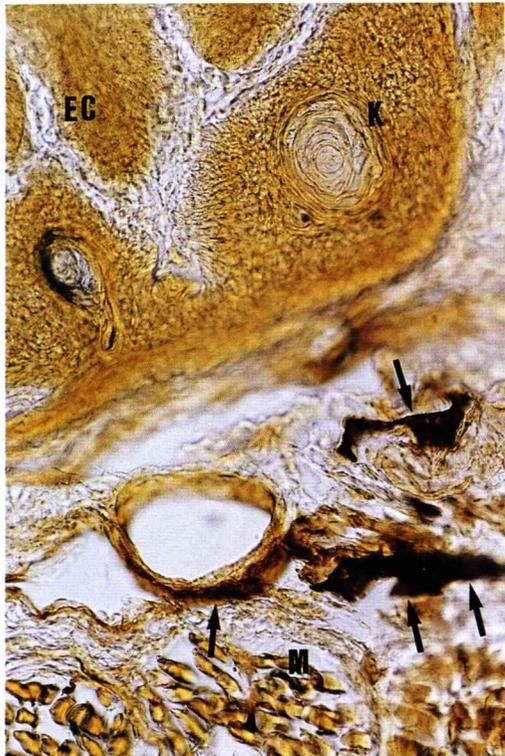


Fig.12 5'-Nase activity in the experimental group.
 (5'-Nase-ALPase double staining)
 Extending and deeply stained lymphatic capillaries (arrows) in connective tissue underlying cancer. ($\times 275$)
 EC : early cancer, K : keratinization,
 M : muscle layer

変動を招来することが推測された。すなわち、内向性腫瘍によって様々な反応性変化をきたした組織ではリンパ管の基本的な変動が観察できなくなることが懸念される。したがって、腫瘍宿主境界部における毛細リンパ管の分布と構築を観察する際には、早期癌について検討するこ

とが重要であると思われた。

実験動物の体重は、二村⁹⁾および立石³³⁾らによって報告された対照群とほぼ同様に推移した。すなわち、肉眼的に内方腫瘤型および腫瘤消失浸潤型を呈した例では舌粘膜病変の直径が5 mmを越えると体重の減少をきたし、飼育26週間目までにいわゆる口腔腫瘍死した。実験群として用いた20匹は全例ともほぼ対照群と同様に体重が推移し、舌摘出時の全身臓器の組織にも転移は認められなかった。したがって、早期舌癌形成が全身状態に悪影響を及ぼすことはなかったものと思われた。

2. 転移について

ゴールデンハムスターの所属リンパ節には顎下リンパ節、深頸リンパ節、耳下腺リンパ節などがある。しかし、深頸ならびに耳下腺リンパ節は帽針頭大と小さいので、正常リンパ節を肉眼的に発見することは困難である。また、顎下リンパ節には舌の集合リンパ管が下顎横筋、顎二腹筋前腹および顎舌骨筋の筋隙に存在する筋隙内リンパ管網を介してここに流入する¹⁵⁾。そのため、所属リンパ節の中でもこの顎下リンパ節への転移が最も早期に、かつ高率に起こり得る部位であることが推測された。そこで、実験群では顎二腹筋前腹の後縁と胸鎖乳突筋および胸骨舌骨筋で構成された三角隙に存在する小豆大の顎下リンパ節を検索したが、転移は認められなかった。この結果は浸潤型の癌ではリンパ節転移が高頻度に認められたという大竹³²⁾の報告とは異なっていた。この相違は本実験では上皮内にとどまる早期舌癌に限定したためであり、毛細リンパ管の形態変化は認められたが、

その損傷は起こっていないことによるものと考えられた。

3. リンパ管の同定法について

硝酸銀動注法は信頼性の高いリンパ管同定法として知られている³⁴⁾。この方法では内皮細胞間接合部に銀粒子が沈着し、内皮細胞の外形がいわゆる柏の葉状を呈することが識別の基準となっている。当然、血管内皮細胞間接合部にも銀粒子が沈着するため、血管内に色素を注入することによって血管は識別される。これに対して、5'-Nase-ALPase 二重染色法は近年開発されたリンパ管同定法の中では簡便で、かつ識別能が高いと言われている^{21, 23, 24, 26)}。そこで、著者はこの染色法の有用性を確認することを目的に、5'-Nase 単染色を施して観察した後、同一切片を ALPase 染色によって二重染色を行った。その結果を硝酸銀動注法と比較することによって、毛細リンパ管と毛細血管の識別が可能であり、それらの分布が一致していることが確認できた。

5'-Nase-ALPase 二重染色法は、酵素組織化学的手法のため、各組織によって基質液の濃度および固定時間を変更して行う必要がある。そこで、著者は加藤らの報告^{21, 23, 24, 26)}を参考にして、ゴールデンハムスターの舌に対しては二倍希釈の固定液を用いて灌流固定することによって固定時間を短縮し、5'-Nase 活性のための基質液の濃度を種々の程度に変えて検討してみたところ、実験方法で述べた基質液の濃度で良好な染色性が得られた。したがって、5'-Nase-ALPase 二重染色法は単独でも毛細リンパ管と毛細血管の識別が可能であり、組織学的検索に際しては、容易に用い得る方法と考えられた。臨床面からみても、灌流固定が不可能な生検材料でも凍結切片を作製した後、浸漬固定を施すことによって、5'-Nase 活性の低下をひき起こす固定時間を短縮することが可能であると考えられた。一方、硝酸銀動注法はリンパ管と血管とを識別するためには、血管内に色素を注入する必要があり、生検材料へ応用することは不可能である。すなわち、5'-Nase-ALPase 二重

染色法は信頼性の高い硝酸銀動注法³⁴⁾の代用として、十分に用いることが可能であると考えられた。

舌癌の治療成績を病期別³⁵⁾にみると、5年累積生存率は stage I, II, III, IV と stage の進展に伴って低下することが報告^{36, 37, 38)}されている。舌癌の転移頻度は頸部リンパ節が最も高く³⁹⁾、頸部リンパ節非転移症例では80%以上の5年累積生存率が得られるのに対し、転移症例では40%台⁴⁰⁾と明らかに低下している。頭頸部領域における所属リンパ節転移の外科的治療は、頸部郭清術が有用であるが、選択的郭清と予防的郭清のどちらを選択すべきかに関しては、なお議論が多い^{41, 42)}。このように、リンパ行性転移は病理組織学的検索によって確定診断がなされるが、臨床的には潜在性転移や後発転移の予測はきわめて困難である。したがって、リンパ行性転移の様相を追究するためには、毛細リンパ管の分布ならびに組織学的変化、とくに腫瘍宿主境界部を詳細に観察することが、きわめて重要であると言える。

4. 毛細リンパ管の分布と機能について

対照群では結合組織乳頭内にみられた直径 $22.8 \pm 7.4 \mu\text{m}$ の毛細リンパ管は、毛細血管の直径 $7.3 \pm 1.7 \mu\text{m}$ に比較し、有意 ($p < 0.01$) に太かったが、その分布はまれであった。一方、粘膜下結合組織内では毛細リンパ管と血管は、各々 $13.7 \pm 4.0 \mu\text{m}$ と $10.3 \pm 3.2 \mu\text{m}$ の太さであり、これらの間に有意な差は認められなかった。対照群の毛細リンパ管と毛細血管の構築は他臓器における分布とほぼ類似していた^{26, 43, 44)}。また西丸⁴⁵⁾はリンパ管系が網状毛細管に始まり、集合毛細リンパ管となり、次いで小リンパ管に移行すると報告している。本研究の実験成績もおおむねこれに一致していたが、結合組織乳頭内にまれに認められた盲端で始まる毛細リンパ管については大谷⁴⁶⁾の述べている小腸の絨毛中の中心乳糜腔と呼ばれるリンパ管の様相によく類似していた。したがって、舌の粘膜下結合組織の毛細リンパ管はほとんどが毛細リンパ管網として始まるが、必要に応じてその叢から

結合組織乳頭内へ伸張し、盲端として始まるものも存在することが確認された。

実験群においては既存の筋層直上に存在する毛細リンパ管網から伸張した毛細リンパ管が、上皮直下に新たに受皿のごとく毛細リンパ管網を形成していた。このリンパ管網からはさらに癌下結合組織内に盲管を伸張しており、この盲管の出現率は対照群に比べて高かった。結合組織乳頭内の毛細血管ループは乳頭先端まで到達していたが、毛細リンパ管はその先端までは到達しておらず、対照群の毛細リンパ管に比べて、直径 $61.7 \pm 24.5 \mu\text{m}$ と有意 ($p < 0.01$) に拡張して、内腔は凹凸不整であった。以上のことから癌化にともなって、増殖が活発となった上皮細胞の代謝産物を取り込むために血管の伸張に遅れて毛細リンパ管網が発達したものと考えられた。

粘膜下結合組織の毛細リンパ管網から筋束間を下降した集合リンパ管は対照群、実験群共に舌中隔部で左右の太い集合リンパ管に合流していたことから、既存の報告^{15,47)}のように、たとえ小さな単発性病巣であっても、反対側もしくは両側性にリンパ節転移が起こり得るものと思われた。

本研究におけるリンパ管の指標とした酵素である 5'-Nase は生理的機能として物質輸送と核酸代謝に重要な役割を演ずるものと考えられている^{24,48,49)}。とくに毛細リンパ管は対照群に比べて実験群がより一層濃染し、褐色に検出された。このような染色性の増強はリンパ管の 5'-Nase 活性が癌下結合組織では著しく亢進していることを示しているものと思われる。さらに、癌下結合組織の毛細リンパ管は病変による代謝産物の吸収を増大するために蛇行し、拡張するものと推察される。本研究における実験群の毛細リンパ管の変化は、毛細リンパ管レベルの機能が活発化した様相を呈していたものと考えられる。この意味から、筋層直上の毛細リンパ管網の上皮側に新たに形成された毛細リンパ管網は癌実質の代謝産物を捉えるために活発に機能している部位であり、5'-Nase 染色によ

て最も強く濃染されたことはこのことを裏付けている。

上記のごとく、5'-Nase-ALPase 二重染色法は、毛細リンパ管と毛細血管とを識別し得る光顕的鑑別法としては簡便、かつ有用であった。そこで、この方法は誘発舌癌の間質におけるリンパ管の分布と構築、さらにはその活性の有無を観察することによって、臨床病理学的研究にも応用し得る可能性のあることが示唆された。

結 論

DMBA によるハムスター舌の誘発早期癌下結合組織における毛細リンパ管の分布と構築を硝酸銀動注法と 5'-Nase-ALPase 二重染色法を用いて観察し、次の結論を得た。

1. 毛細リンパ管の分布と構築は硝酸銀動注法と 5'-Nase-ALPase 二重染色法の両者が一致していた。
2. 毛細リンパ管と毛細血管の位置的関係は、上皮に近い浅層には毛細血管網が、その深層に毛細リンパ管網が存在していた。
3. 対照群の粘膜下結合組織には筋層直上に一層の毛細リンパ管網が存在していたが、早期癌下結合組織では上皮側にさらに一層の毛細リンパ管網が形成されていた。
4. 対照群ではすべての結合組織乳頭内に毛細血管ループが存在していたのに対し、毛細リンパ管が入り込んでいる結合組織乳頭はまれであった。一方、舌の早期癌下結合組織には毛細血管が数多く新生し、これに伴走する毛細リンパ管は有意に太さを増し、蛇行していた。
5. 早期癌下結合組織では毛細リンパ管に高い 5'-Nase 活性が認められ、リンパ管の旺盛な機能亢進が窺われた。
6. 5'-Nase-ALPase 二重染色法は毛細リンパ管と毛細血管を光顕的に識別できるだけでなく、毛細リンパ管の形態的な変化および機能亢進の程度を 5'-Nase 活性の相違から知り得た。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご懇篤なるご指導、ご

校閲を賜った恩師、藤岡幸雄名誉教授ならびに工藤啓吾教授に深甚なる感謝の意を表します。併せて、本研究の遂行にあたり、終始ご指導、ご教示を賜りました本学口腔解剖学第一講座野坂洋一郎教授ならびに口腔病理学講座佐藤方信教授、鈴木鍾美名誉教授に深謝いたします。また、数々のご教示、ご助言をいただいた口腔解剖学第一講座藤村朗助教授に深謝いたします。さらに、多くのご助力、ご便宜を戴いた口腔病理学講座武田泰典講師ならびに口腔外科学第一講座福田喜安講師をはじめ、ご協力を戴きました関連講座の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

なお、本論文の要旨は第36回日本口腔外科学会総会(1991年10月、大阪)、第46回日本口腔科学会総会(1992年4月、名古屋)において発表した。

引用文献

- 1) 小浜源郁：舌癌の診断と外科療法，清水正嗣，小浜源郁編；口腔癌診断と治療 第1版，デンタルダイヤモンド，東京，244-263ページ，1989。
- 2) 藤田浄秀，賀来 亨，佐々木元賢，小野江為則：舌癌の実験的形成に関する研究 第1編 9，10-dimethyl-1, 2-benzanthraceneの塗布による舌癌の実験的形成，口科誌，21:999-1012, 1972。
- 3) 瀬川 清：ハムスター誘発舌癌の血管構築変化に関する実験的研究 特にプロタミンとヘパリンの影響について，岩医大歯誌，11:270-290, 1986。
- 4) 甲斐康正：DMBA 誘発ハムスター舌癌血管構築に関する放射線学的研究，歯学，73:1525-1545, 1986。
- 5) 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。
- 6) 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。
- 7) 井上豊明，那須優則，甲斐康正，古本啓一：放射線照射後のDMBA 誘発ハムスター舌癌の腫瘍血管側および周辺側の細胞動態の変動，歯学，77:343-354, 1989。
- 8) 和田寿夫：DMBA 誘発ハムスター舌癌細胞動態におよぼす放射線照射の影響，歯学，75:537-554, 1987。
- 9) 二村 光：実験的ハムスター舌腫瘍における神経組織像について，九州歯会誌，42:705-732, 1988。
- 10) 逢坂文博：DMBA 誘発舌癌における pyrimidine nucleotide の合成と 5-Fluorouracil 代謝，歯科学報，86:1119-1132, 1986。
- 11) 中川洋一：舌癌担癌ハムスターにおける制癌剤の体内動態についての検討，鶴見歯学，12:259-276, 1986。
- 12) 赤沢 登，大西 克，大矢隆志，繁田幸慶，石田寿夫，中西孝一，島田桂吉：DMBA 誘発ハムスター舌腫瘍形成と治療に関する研究 第V編 ハムスター舌腫瘍形成過程に及ぼす細胞表面酵素阻害物質(ベスタチン)の影響について，口科誌，33:73-82, 1984。
- 13) Miotti, V.R. : Die Lymphknoten und Lymphgefäße des Syrischen Goldhamsters. *Acta Anat.* 46:192-216, 1961.
- 14) Hoffman, R.A., Robinson, P.F. and Magalhaes, H. : Gross anatomy, in: The golden hamster. Its biology and use in medical research, 1st ed., Iowa State Univ. Press, Ames, pp 91-109, 1968.
- 15) 奈良栄介：ゴールドンハムスター舌におけるリンパ管経路の研究，岩医大歯誌，16:95-108, 1992。
- 16) 山本悦秀，砂川 元，小浜源郁：口腔粘膜癌の浸潤様式とBleomycin感受性，癌の臨床，27:1583-1589, 1981。
- 17) Eneroth, C.M. and Moberger, G. : Histological malignancy grading of squamous cell carcinoma of the palate. *Acta Otolaryng.* 75:293-295, 1973.
- 18) Willén, R. and Nathanson, A. : Squamous cell carcinoma of the gingiva: Histological classification and grading of malignancy. *Acta Otolaryng.* 75:299-300, 1973.
- 19) 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。
- 20) 孝富士喜久生，橋本 謙，児玉一成，吉田力，武田仁良，掛川暉夫：過酸化水素法による胃壁内リンパ管の検討，日消外会誌，22:2576-2581, 1989。
- 21) 加藤征治：酵素組織化学的方法によるリンパ管の確定法，リンパ学，12:13-21, 1989。
- 22) 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。
- 23) 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.
- 24) Kato, S. : Histochemical localization of 5'-nucleotidase in the lymphatic endothelium. *Acta Histochem. Cytochem.* 23:613-620, 1990.
- 25) Vetter, W. : Alkalische Phosphatasen in Mastzellen, Blut- und Lymphgefäßen der Rattenzunge. 5'-Nucleotidase-, unspezifische

- alkalische Phosphatase- und Polyphosphatase (ATPase) aktivität unter besonderer Berücksichtigung des pH. *Z. Anat. Entwickl. -Gesch.* 130:153-176, 1970.
- 26) 安永 昭, 内田雄三, 加藤征治: ヒト大腸粘膜固有層の微小循環系の酵素組織化学的検索, *リンパ学*, 14:13-17, 1991.
- 27) 三國誠文: 口腔領域における腫瘍ならびに腫瘍性病変の病理形態学的研究, DMBA 塗布によるハムスターの実験的舌癌形成過程における初期像の検討, *日大歯学*, 58:444-450, 1984.
- 28) 歯科医学大事典編集委員会: 歯科医学大事典, 縮刷版, 第1版, 医歯薬出版, 東京, 1600 ページ, 1989.
- 29) 相沢 幹, 菊地浩吉編: 新病理学総論, 第14版, 南山堂, 東京, 497 ページ, 1991.
- 30) Wachstein, M., and Meisel, E.: Histochemistry of hepatic phosphatase at a physiological pH. *Am. J. Clin. Pathol.* 27:13-23, 1957.
- 31) Burstone, M.S.: Enzyme histochemistry. Academic Press, New York, pp 275-256, 1962.
- 32) 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.
- 33) 立石 晃: 実験的ハムスター舌腫瘍形成に関する研究, *九州歯会誌*, 40:1179-1203, 1986.
- 34) 里村紀作, 谷川允彦: リンパ管観察法, *リンパ学*, 5:1-6, 1982.
- 35) Hermanek, P. and Sobin, L.H.: TNM Classification of malignant tumours. 4th Ed, International Union Against Cancer Geneva Co, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 13-35, 1987.
- 36) 藤岡幸雄: 口腔悪性腫瘍の臨床について, *岩医大歯誌*, 17:65-75, 1992.
- 37) 小浜源都: 舌癌-診断と外科療法, *日口外誌*, 35:1710-1714, 1989.
- 38) 工藤啓吾, 瀬川 清, 長 浩臣, 藤岡幸雄, 石井 秀彦, 中里滋樹: 舌癌 31 症例の治療成績に関する検討, *日口外誌*, 32:211-216, 1986.
- 39) 佐藤方信, 佐島三重子, 畠山節子, 守田裕啓, 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.
- 40) 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.
- 41) 高田和彰, 遠藤邦彦, 中村孝次郎, 坂本知二, 諸山隆正, 吉賀浩二: 口腔領域悪性腫瘍の頸部リンパ節転移に関する臨床統計的検討, *日口外誌*, 34:872-878, 1988.
- 42) Feinmesser, R., Freeman, J.L., Feinmesser, M., Noyek, A. and Mullen, J.B.M.: Role of modern imaging in decision-making for elective neck dissection. *Head & Neck* 14:173-176, 1992.
- 43) 木原卓三郎: リンパ管系の解剖, *脈管学*, 6:15-18, 1966.
- 44) 島田達生, 中村賢一: 末梢リンパ管の走査電顕的検索, *リンパ学*, 5:161-163, 1982.
- 45) 西丸和義: リンパ管の研究について, *リンパ学*, 5:137-138, 1982.
- 46) 大谷 修: 腸の血流とリンパ管-形態学の新しい知見, *医学のあゆみ*, 147:336-340, 1988.
- 47) Feind, C. R.: The lymphatics in cancer, 1st ed., W. B. Saunders Co, Philadelphia, pp 59-230, 1972.
- 48) 松原茂樹, 玉田太郎, 埴原恒彦, 斎藤多久馬: ヒト胎盤における 5'-nucleotidase 活性局在に関する電顕酵素細胞化学的研究, 5'-nucleotidase の阻害剤, AOPCP の細胞化学への導入を中心に, *自治医大紀要*, 10:85-92, 1987.
- 49) 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.