

原 著

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——

笹原 健 児

岩手医科大学歯学部口腔外科学第一講座

(主任：工藤 啓吾教授)

岩手医科大学歯学部口腔解剖学第一講座

(主任：野坂洋一郎教授)

〔受付：1993年11月2日〕

〔受理：1993年11月24日〕

Abstract : The purpose of this study is to determine the ultrastructural changes of tumor blood vessels (TBV) and the permeability of endothelium after multiple agent combination therapy in Golden hamsters with squamous cell carcinoma of the tongue induced by dimethyl 1,2-benzanthracene acetone solution (DMBA). The animals were divided into normal tongue (control) and DMBA-induced carcinoma (experimental) groups. They were then given intraperitoneal injection of isotonic saline, Pirarubicin (THP-ADM) alone, combination of Cisplatin (CDDP) and Peplomycin (PEP) (PP combination), or a combination of THP-ADM, CDDP and PEP (TPP combination). Tannic acid solution was injected as a tracer via the heart, and the vasculature was perfused with half-strength of Karnovsky's fixative 15 seconds later. The ultrastructural changes of capillaries surrounding the cancer nests were observed by transmission electron microscopy.

Compared to the control group, TBV in the experimental group demonstrated many morphological changes such as thinning of the endothelial cells, increase of fenestrae in each endothelial cell, decrease in pinocytotic vesicles, appearance of Weibel-Palade body and discontinuity of basal lamina. Administration of the THP-ADM alone resulted in a remarkably greater increase in pinocytotic vesicles than did saline, PP and TPP combinations in both control and experimental groups. TPP combination in the experimental group induced remarkable thinning of endothelial cells, a significantly decrease in pinocytotic vesicles, significant increase in fenestrae and frequent formation of transendothelial channel, compared to treatment with saline, THP-ADM alone and PP combination. Permeation through TBV varied with a reaction of endothelial cells to the antitumor agents, morphological feature of basal lamina and changes in surrounding connective tissue. The pattern of endothelial permeability after administration of THP-ADM differed among animals treated with THP-ADM alone and those with TPP combination. The results suggested that macromolecular permeability of vascular endothelial cells was augmented by preadministration of THP-ADM.

Key words : induced tongue carcinoma, THP-ADM, CDDP, PEP, vascular permeability

An electron microscopic study on the effects after administration of antitumor agents on vascular endothelial cells in DMBA-induced tongue carcinoma.

—Dynamics of structure related to macromolecular permeability after chemotherapy with THP-ADM, CDDP and PEP combination— Kenji SASAHARA

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

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

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 18 : 189 - 209, 1993

結 言

近年、口腔癌の治療に際し、抗癌剤の単剤または併用投与が行われることが多い。とくに癌化学療法は腫瘍細胞の cell cycle を考慮し、作用点の異なる抗癌剤の多剤併用療法が施行され、より高い奏効率が得られるようになった。これら抗癌剤の効果発現を左右する因子の一つに、腫瘍への薬剤到達性があり、それには腫瘍血管の性状が重要な役割を果たしているものと考えられている。このような観点から、誘発舌癌の血管構築^{1,2)}や血管内皮細胞の透過関連構造^{3,4)}に関する電顕的追究がなされてきた。腫瘍の血管の形態^{1,5-11)}と機能^{9,12)}は、正常組織の血管と著しく異なっている。とくに腫瘍細胞は抗癌剤を投与すると空胞化、変性、癌巣形態の乱れなどを生じる^{13,14)}と同時に、腫瘍血管もその影響を受け、分布、配列、構造に変化をきたすことが報告されている^{11,15,16)}。正常組織の血管における物質透過性については、これまでも pinocytotic vesicle および fenestra が大きく関与していることが知られている¹⁷⁻²⁰⁾。一方、腫瘍血管では pinocytotic vesicle の増加、内皮細胞間隙の離開、基底膜の不連続性²¹⁾、fenestra²²⁾と、transendothelial channel^{17,23)}などの変化がみられることより、物質透過性が亢進する^{24,25)}ことが報告されている。このような腫瘍血管からの物質透過機構については、各種トレーサーを用いた電顕的、あるいは細胞化学的追究がみられる^{3,4,9)}。近年、腫瘍血管内皮細胞の物質透過関連構造の変化や、それに伴う透過機構の詳細が微小循環学の進歩に伴って次第に解明されつつある。さらに各種抗癌剤の投与による腫瘍血管内皮細胞の物質透過関連構造の出現頻度の定量化に関しては、先に佐藤⁶⁾が Cisplatin, Peplomycin の単剤投与について報告したが、多剤併用による同様の物質透過機構の変化を検索した報告は、現在のところみられない。

本研究では、ゴールデンハムスターに誘発舌癌を形成し²⁶⁾、Cisplatin, Peplomycin ならび

- | | |
|-------------------------|--------------|
| 1. Saline | 0.5ml/kg/day |
| 2. THP-ADM single agent | 0.5mg/kg/day |
| 3. PP combination | |
| CDDP | 3.5mg/kg/day |
| PEP | 2.5mg/kg/day |
| 4. TPP combination | |
| THP-ADM | 3.5mg/kg/day |
| CDDP | 3.5mg/kg/day |
| PEP | 2.5mg/kg/day |

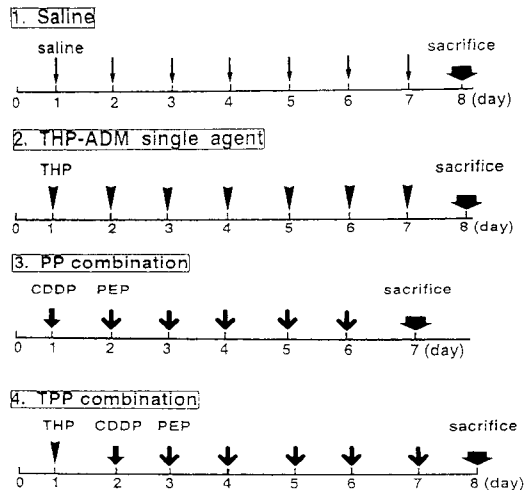


Fig.1 Procedure of intraperitoneal injection of antitumor agents .
 (→) : Saline, (▶) : THP-ADM,
 (⇨) : CDDP, (⇩) : PEP

に Pirarubicin の多剤併用後の健康舌粘膜下血管と腫瘍血管内皮細胞の物質透過関連構造の変化について、透過型電子顕微鏡を用いて比較検討した。

材料および方法

1. 実験材料

実験動物は生後 6 週齢の雄性ゴールデンハムスター 60 匹 (体重 100 g 前後、船橋農場) を購入後、岩手医科大学歯学部動物舎 (温度 : 25 ± 1°C, 湿度 : 55% ± 5%) にて一週間予備飼育を行い、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。対照群にはハムスター 20 匹の無処置健康常舌を用いた。また実験群には、ハムスター 40 匹の舌に以下の発癌操作を施行し、扁平上皮癌を誘発させた個体のうち、20 匹を実験に使用した。実験期間中の飼育には、飼育用

固形飼料 (オリエンタルMF) および水を自由に摂取させた。

2. 実験方法

1) 発癌操作および発癌剤

発癌操作はエーテル麻酔下に藤田ら²⁶⁾の方法に準じて週3回, 左側舌辺縁中央1/3部を歯科用クレンザー (ピアス社製, No.1) にて舌粘膜表面が粗糙になるまで軽く数回擦過し, 0.5%, 9, 10, -dimethyl, 1, 2 -benzanthracene acetone solution (以下DMBAと略す) を小筆にて塗布し, 乾燥させた。以上の操作を12週間施行後, 放置し, 擦過部位に肉眼的に癌を思われる易出血性, 壊死性腫瘤形成が認められた時点で試験的切除を行い, 病理組織標本を作製して鏡検した。その後, 切除創が治癒するまで約1週間放置した。組織型はWHOの分類²⁷⁾に準じて診断された。

2) 使用薬剤

薬剤は注射用生理食塩水 (以下生食と略す) (Lot No. K 2 K 92 大塚製薬 (株) 製), Pirarubicin (以下THP-ADMと略す) (Lot No. X 0380 日本化薬 (株) 製, MW : 627.65) 総量 3.5 mg / kg, Cisplatin (以下CDDPと略す)

(Lot No.610010 日本化薬 (株) 製, MW : 300.05) 総量 3.5 mg/kg, Peplomycin (以下PEPと略す) (Lot No.200150 日本化薬 (株) 製, MW : 1571.67) 総量 12.5 mg/kgを用いた。THP-ADMは注射用蒸留水, またCDDPとPEPは注射用生理食塩水に溶解して使用した。

3) 薬剤投与方法

a. 対照群

投与薬剤は1) 生食, 2) THP-ADM単剤, 3) CDDP, PEPの併用 (以下PP併用と略す), 4) THP-ADM, CDDP, PEPの併用 (以下TPP併用と略す) のそれぞれ5匹ずつに対し, 以下の要領で腹腔内に投与した (Fig.1)。

(1)生食 : 生理食塩水 0.5 ml / kg / 日を1日1回, 7日間連続投与した。

(2)THP-ADM単剤 : THP-ADM 0.5 mg / kg / 日を1日1回, 7日間連続投与した。

(3)PP併用 : 1日目にはCDDP 3.5 mg / kg, また2~6日目の5日間にはPEP 2.5 mg / kgを投与した。

(4)TPP併用 : 1日目にはTHP-ADM 3.5 mg / kg, 2日目にはCDDP 3.5 mg / kg, また3~7日目の5日間にはPEP 2.5 mg / kgを投与した。

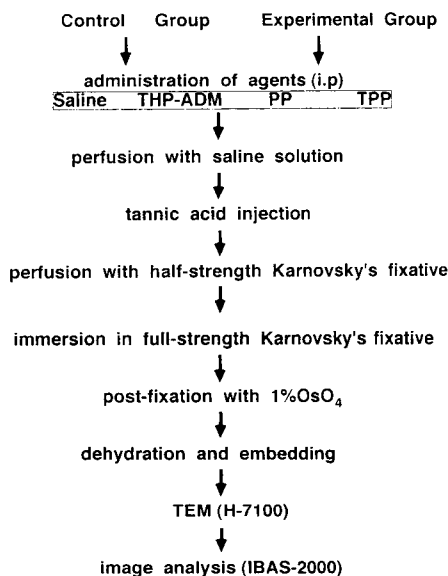
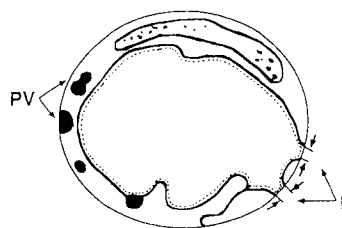


Fig.2 Preparation of vascular specimens for transmission electron microscopy.



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

$$F = \frac{\text{total length of fenestrae}}{\text{total length of vascular luminal circumference}} \times 100(\%)$$

Fig.3 Measurement of appearance frequency of pinocytotic vesicles and fenestrae. PV : pinocytotic vesicles, F : fenestrae

b. 実験群

誘発舌癌を形成した37匹のうちから、さらに腫瘍の大きさが5mm以上で、隆起型を呈した20匹を各投与別に5匹ずつ供した。薬剤の投与は対照群と同様に腹腔内に投与した(Table 1)。

なお、抗癌剤の投与量は、それぞれマウスのLD50の1/4の量を基準²⁸⁾に予備実験を行い、ハムスターの体重回復、飼料や水の摂取量などによって決定した。

4) 灌流およびタンニン酸の注入

薬剤投与終了24時間後、ハムスターをネンブタール(0.05 mg/g)腹腔内麻醉下で開胸し、心尖よりカテーテルを挿管して上行大動脈に固定後、瀉血用切開を右心房に加えた。下行大動脈を結紮後、カテーテルからヘパリン加(500単位/100 ml)生理食塩水にて90 cmの高さから点滴ピンを用いて3 ml/分になるように設定し、一定の圧力下で5分間、頭頸部を灌流、瀉血後、トレーサーとしてタンニン酸(Wako Pure Chemical Industries, LTD, MW: 1,700)水溶液(生理食塩水に20 µg/mlで溶解)を側管より同じ要領で注入した。タンニン酸注入開始15秒後に、0.1 M カコジル酸緩衝液で2倍に希釈したKarnovsky固定液(PH 7.4)を10分間、灌流固定した。

5) 電顕用標本の作製

灌流固定した舌を一塊として取り出し、誘発腫瘍を筋組織を含めて摘出し、さらに壊死組織

を除去して増殖旺盛な腫瘍組織の最外層を細切した。

細切試料はKarnovsky固定液(PH 7.4)に4℃にて一晚浸漬固定後、0.1 M カコジル酸緩衝液(PH 7.4)で洗浄し、1%オスミウム酸(4℃, 2時間)による後固定を施した。アルコール上昇系列にて脱水後、通法に従ってEpon 812に包埋した。Leica型超ミクロトーム(ULTRACUTS/FSC)にて厚切り切片を作製し、トルイジンブルー染色によって、観察部位を確認後、ダイヤモンドナイフにて超薄切片を作製した。酢酸ウラン・クエン酸鉛二重染色後、日立H-7100透過型電子顕微鏡にて観察した(Fig. 2)。

6) 観察部位

実験群では腫瘍組織の辺縁部に位置し、癌巣周囲を取り巻く血管群を、また対照群ではハムスター健常舌の同一部位における上皮結合組織乳頭内の毛細血管ループ細静脈側を観察し



Fig. 4 DMBA-induced carcinoma on Golden hamster tongue after 13 weeks of tumor growth, measuring 8-10 mm in diameter.

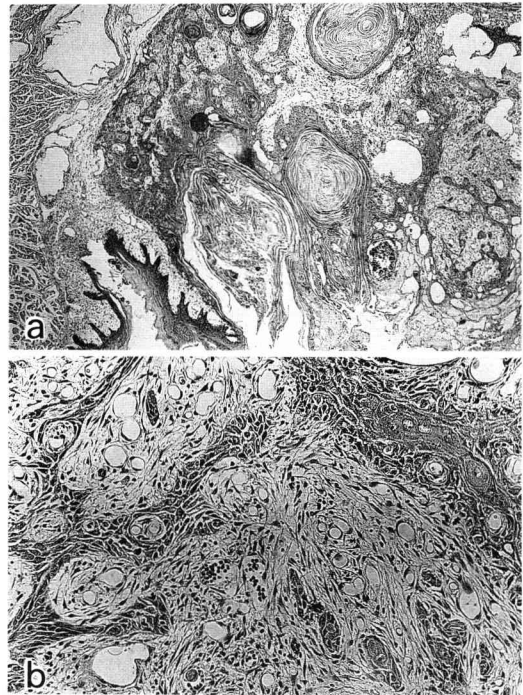


Fig. 5 Photomicrographs showing invasive, well-differentiated squamous cell carcinoma with keratinization. a: ×100, b: ×500

た。試料は厚切り切片で確認後、超薄切片上で内径 30 μm 以下の腫瘍血管を各動物から任意に 5 本ずつ採取して観察した。

7) 物質透過関連構造の出現頻度の計測

内皮細胞の透過関連構造の測定には、最終倍率を 50,000 倍とした電顕写真上で、細胞外形および pinocytotic vesicle (以下 vesicle と略す) および fenestra をトレース後、IBAS-2000 (CARL ZEISS Co., LTD) を用い、画像解析を行った。

vesicle の計測値は、核を除く細胞質面積に対する vesicle の面積の総和の割合とした²⁹⁾ (Fig.3)。なお、受容体に関連した動態を示す coated vesicle は除外した。fenestra の計測値は、管腔側細胞周長に対する fenestra の長さの総和の割合とした²⁹⁾ (Fig. 3)。厚切り切片を作製し、20 μm の間に fenestra が認められなかった場合は、久慈³⁾ の分類にしたがい、非 fenestra 型内皮細胞とみなして計測から除外した。これらに基づき、その計算値をもって出現頻度とした。これらの結果を F 検定によって対照群および各薬剤投与群間における有意差を

比較検討した。

実験結果

1. 発癌結果

発癌操作開始後、5~6 週目あたりから乳頭腫様小腫瘍の形成が認められ、その小腫瘍は次第に大きさを増し、11~13 週頃より易出血傾向となり、表面に壊死物質の付着、部分的に潰瘍形成が見られるようになり、肉眼的に癌を思わせるに至った (Fig. 4)。なお、この時点における体重の減少は特に認められなかった。発癌操作を施行した 40 匹のハムスターのうち、33 匹のハムスターの左側舌辺縁に扁平上皮癌が病理組織学的に確認された (Fig. 5a, b)。残りの 7 匹のうち、2 匹は舌辺縁以外の部位 (舌下面、口底) に扁平上皮癌が形成され、2 匹は乳頭腫の形成、また 3 匹は実験途中の麻酔死 (2 匹) と衰弱死 (1 匹) であった。これら 3 匹の死亡例を除いた扁平上皮癌の発生率は、37 匹中 35 匹 (94.6%) であった。これらの腫瘍は、外向性増殖を示したものがほとんどで、“臨床・病理頭頸部癌取り扱い規約”³⁰⁾ による肉眼的分類で

Table 1 Severity grade and size of induced tongue carcinomas.

Agents	Case No.	Grade	Tumor size (mm)	
			Administration of agents	
			Before	After
Saline	I	I	5.0 × 4.3	7.6 × 5.0
	II	II	5.8 × 3.2	6.6 × 3.6
	III	I	5.7 × 2.8	7.6 × 3.2
	IV	I	5.4 × 2.1	7.2 × 3.5
	V	I	5.7 × 3.4	8.2 × 4.1
THP-ADM single agent	I	I	5.4 × 2.5	5.0 × 2.0
	II	I	5.2 × 2.9	4.7 × 2.2
	III	II	6.4 × 4.2	6.3 × 4.1
	IV	I	6.3 × 4.0	6.0 × 4.0
	V	I	7.3 × 4.7	6.3 × 4.0
PP combination	I	I	9.6 × 5.4	8.4 × 4.3
	II	II	7.5 × 3.2	5.7 × 2.5
	III	I	6.0 × 3.0	4.5 × 2.4
	IV	I	6.5 × 3.5	5.4 × 3.1
	V	I	8.3 × 2.8	7.5 × 2.2
TPP combination	I	I	5.3 × 2.8	4.2 × 2.3
	II	I	6.2 × 2.0	5.0 × 1.7
	III	I	6.4 × 3.2	5.8 × 2.7
	IV	II	6.7 × 3.5	5.5 × 2.6
	V	I	5.8 × 2.6	4.7 × 2.4

Histopathological type is squamous cell carcinoma on all the induced carcinomas.

は隆起型が26匹、潰瘍型が5匹、混合型が2匹であった。本実験には、その隆起型26匹のなかから20匹を選んだ。その組織型はWHO分類によると、Grade Iの高分化型が15匹(75%)、Grade IIの中分化型が5匹(25%)であった。これら20匹へ前述の薬剤を投与した結果、生食投与によって腫瘍が増大したのに対し、THP-ADM単剤、PP併用、TPP併用では肉眼的には明らかな腫瘍の縮小は認められなかったが、腫瘍増殖の抑制ないしは縮小傾向が認めら

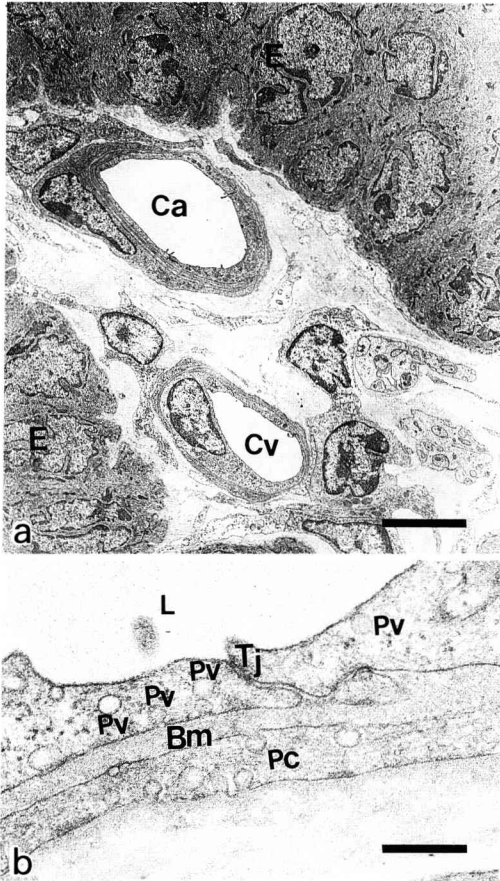


Fig. 6 Electron micrographs of saline in control group.

a : Luminal surfaces of capillaries in connective tissue papilla surrounding epithelium are flat. Endothelial cells retain continuity. (Scale bar : $5 \mu\text{m}$)

b : Intracellular spaces of endothelial cells are occupied by tight junctions and are kept at fixed distances. (scale bar : $0.5 \mu\text{m}$)

れた。これは薬剤投与開始から終了、屠殺までの期間が1週間と非常に短かったためと思われた (Table 1)。

2. 電子顕微鏡学的所見

1) 対照群

a) 生食

観察部位は、舌粘膜上皮下結合組織乳頭内の毛細血管ループ細静脈側における血管で、これらは1~数個の扁平な内皮細胞およびその基底膜から構成されていた。その周囲はコラーゲン

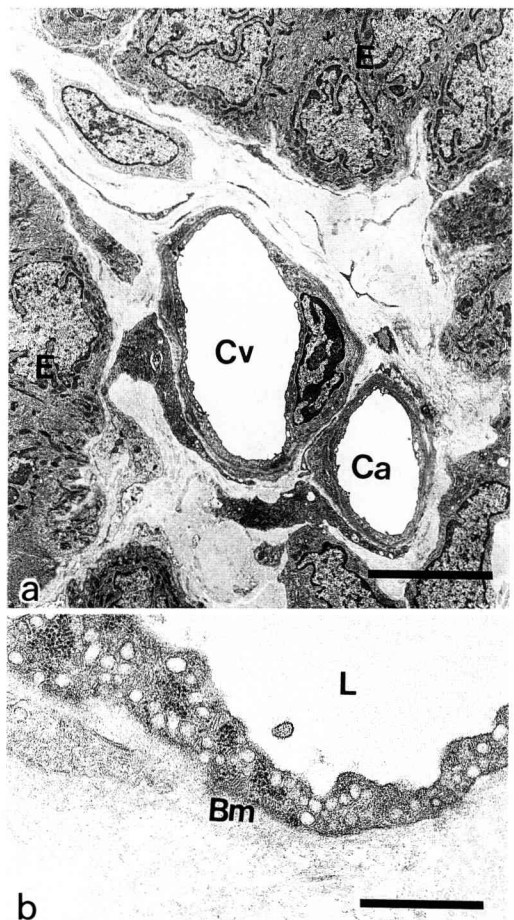


Fig. 7 Electron micrographs of THP-ADM administered singly in the control group.

a : Collagen fibers surrounding blood vessels are dense. (Scale bar : $5 \mu\text{m}$)

b : In cytoplasm, an apparent increase in vesicles is recognized. (Scale bar : $0.5 \mu\text{m}$)

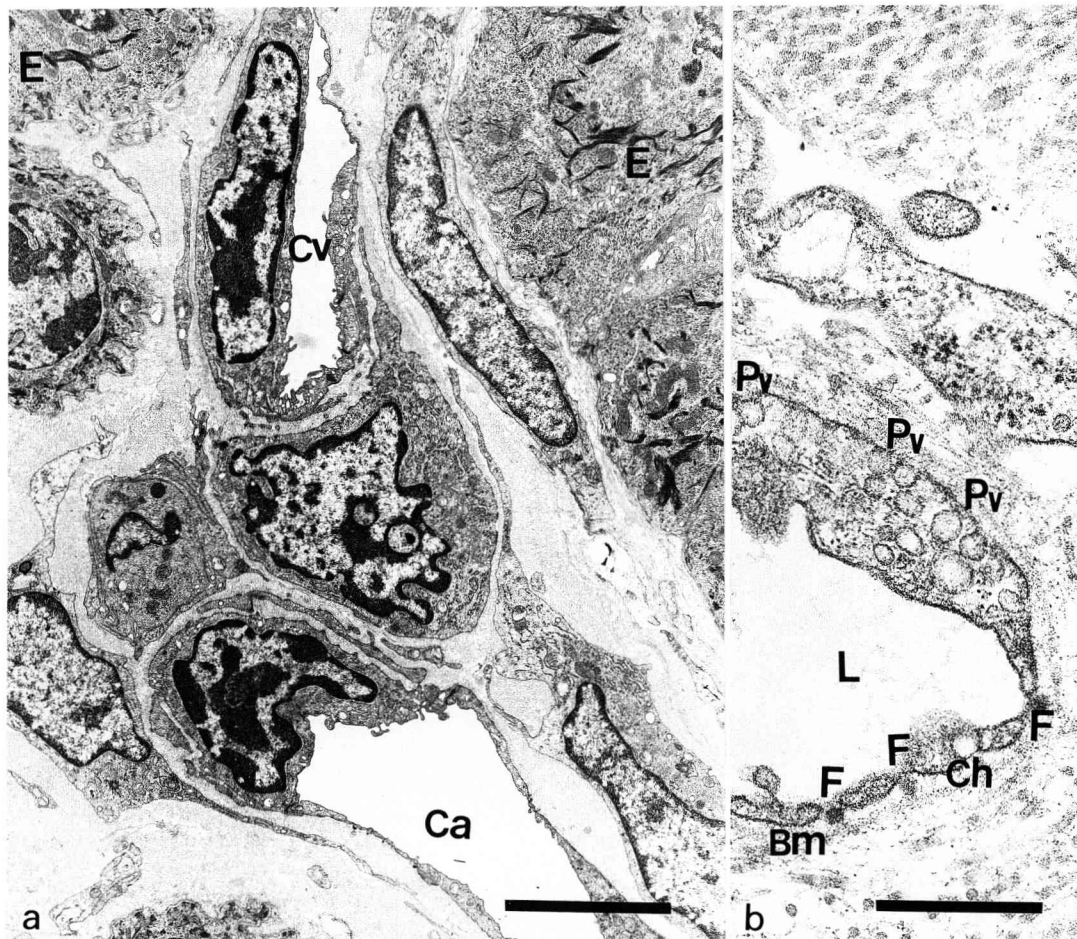


Fig. 8 Electron micrographs of PP combination in the control group.
 a : Endothelial cells are thin and a number of fenestrated blood vessels appear. Basal lamina in some areas are two- or three- layers. Epithelium cells are irregular in shape. (Scale bar : 5 μm)
 b : Appearance of fenestrae and partial formation of transendothelial channel are recognized in thin endothelial cells. Thick endothelial cells have a larger number of vesicles compared to the saline group, although less compared to THP-ADM. (Scale bar : 0.5 μm)

線維束で囲まれ、上皮層は規則的に配列し、連続した基底膜を有していた。また数個の内皮細胞は相互に隣接し、その細胞間隙は管腔側から非管腔側までほぼ均一に保たれ、複数の tight junction により閉鎖された血管腔を形成していた。これら血管内皮細胞の管腔側は平滑で、endothelial projection (以下 projection と略す) や marginal fold (以下 fold と略す) はほとんど観察されなかった。

内皮細胞の核は多少の凹凸はあるものの、内皮細胞の形態にはほぼ沿った楕円形ないしは三カ

月状を呈していた。核周囲の細胞質は厚い部位ではミトコンドリアや粗面小胞体が多数分布し、稀にはゴルジ装置もみられた。細胞質は核から離れるにつれて薄くなり、全体的に直径 50 ~ 70 nm の vesicle が分布していた (Fig. 6 a, b)。

b) THP-ADM 単剤

THP-ADM の単剤では、生食を投与した血管に比べて、内皮細胞はやや肥厚し、核はやや凹凸不整を呈していた。細胞質内は vesicle が著明に増加し、1 つないしは数個の vesicle が捻

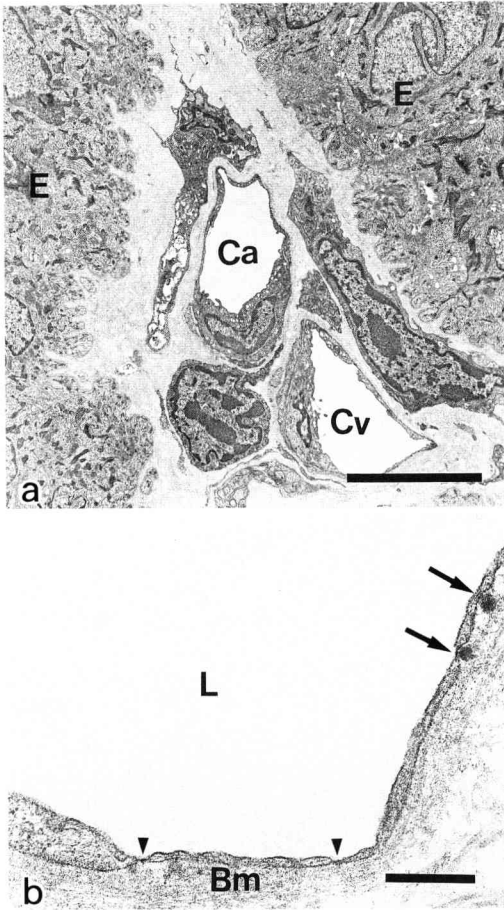


Fig. 9 Electron micrographs of TPP combination in the control group.
 a : Endothelial cells are very thin. Change of surrounding tissue is remarkable, indicating disarrangement of collagen fibers and diffused edematization. (Scale bar : 5 μ m)
 b : In cytoplasm of the thinnest endothelial cells, a remarkable increase in fenestrae is detected but pinocytotic vesicles are scarcely present. (Scale bar : 0.5 μ m)
 Tannic acid complexes are recognized just under the fenestrae. (\rightarrow)
 However, tannic acid complexes are not seen under the fenestrae. (\blacktriangledown)

珠状に癒合したり、あるいは癒合した vesicle が管腔側から非管腔側に連続し、いわゆる transendothelial channel (以下 channel と略す) を形成する所見も認められた。周囲の上皮細胞には特に変化はみられなかったが、血管壁周囲のコラーゲン線維が非常に密になってい

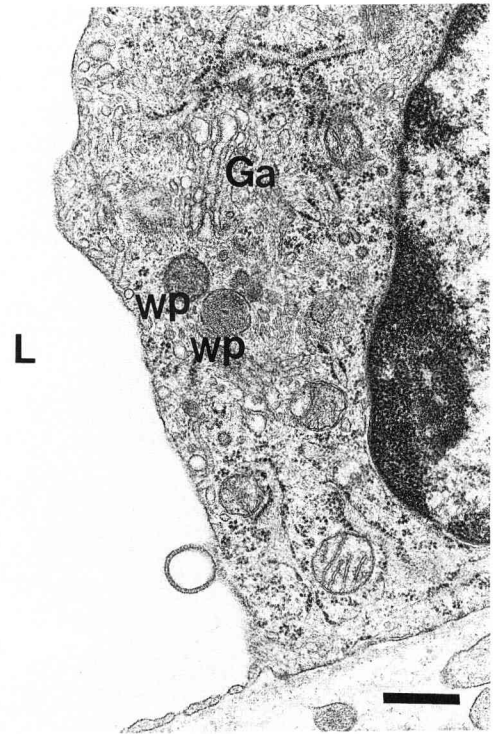


Fig. 10 Electron micrograph of experimental saline group. In tumor blood vessels, appearance of W-P body is a characteristic finding. It is never observed in the control group. (Scale bar : 0.5 μ m)

た。内皮細胞の細胞内小器官にはミトコンドリアが多数分布しているものの、特に際立った変化は認められず、基底膜も連続性を保っていた (Fig. 7 a, b)。

c) PP 併用

PP 併用投与の血管内皮細胞は菲薄化し、fenestra を有する血管が多数出現していた。内皮細胞の管腔側には発達した projection や fold がみられた。生食投与時に比べ、核は凹凸不整が著明となり、細胞質内の vesicle は THP-ADM 単剤よりは少ないものの比較的多く分布していた。基底膜は血管全周を連続的に取り囲んでいるが、一部においては多層化を呈していた。また舌粘膜上皮では、基底層の細胞が基底膜側に小さな突起を出し、基底膜もそれに沿って凹凸不整になっていた。コラーゲン線維は粘膜固有層では THP-ADM 単剤よりは

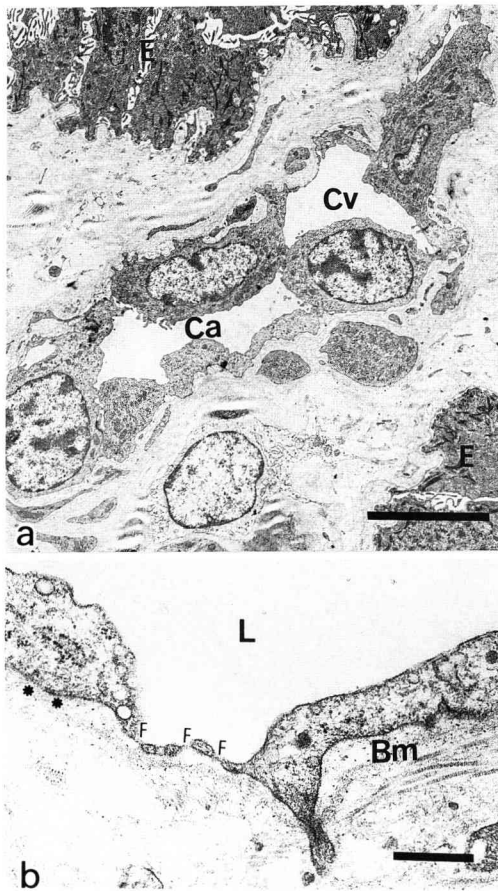


Fig.11 Electron micrographs of experimental saline group.
 a : Many fenestral blood vessels appear in this group. Lumen is narrowed and irregular. Basal cells are irregular and basal lamina is partially ruptured on the epithelial basal layer of tumor. (Scale bar : 5 μ m)
 b : Endothelial cells are partially thin and appearance of fenestrae is recognized in this group. Basal lamina slightly disappears (*). (Scale bar : 0.5 μ m)

少ないものの、生食投与時に比べると密に配列していた (Fig. 8 a, b)。

d) TPP 併用

血管内皮細胞の菲薄化は顕著となり、fenestraを有する血管が大多数を占めていた。また管腔側には projection が認められ、菲薄化した細胞質内には vesicle はほとんど認められなかった。とくにミトコンドリアの変性像が

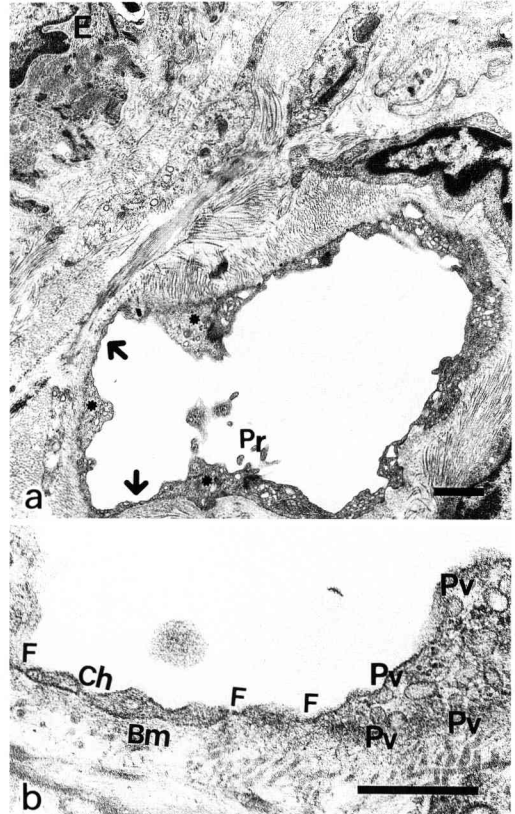


Fig.12 Electron micrographs of THP-ADM administered singly in the experimental group.
 a : Endothelial cells are irregular in shape with partial thickening (*) and thinning (\rightarrow). (Scale bar : 1 μ m)
 b : A comparatively greater number of vesicles are present at the thickened part. Basal lamina is not clear and is indistinguishable from surrounding connective tissue. (Scale bar : 0.5 μ m)

観察された。血管壁周囲組織の変化も著明となり、血管周囲にはコラーゲン線維の配列の乱れ、瀰漫性の浮腫性変化も認められた (Fig. 9 a, b)。

2) 実験群

a) 生食

実験群の腫瘍血管は対照群の血管に比べて菲薄化して、不規則な形態を呈し、多数の fenestra を有していた。核の形態は凹凸不整で、核周辺部にはミトコンドリアや粗面小胞体が分布していた。1 ~ 2 個の Weible-Palade

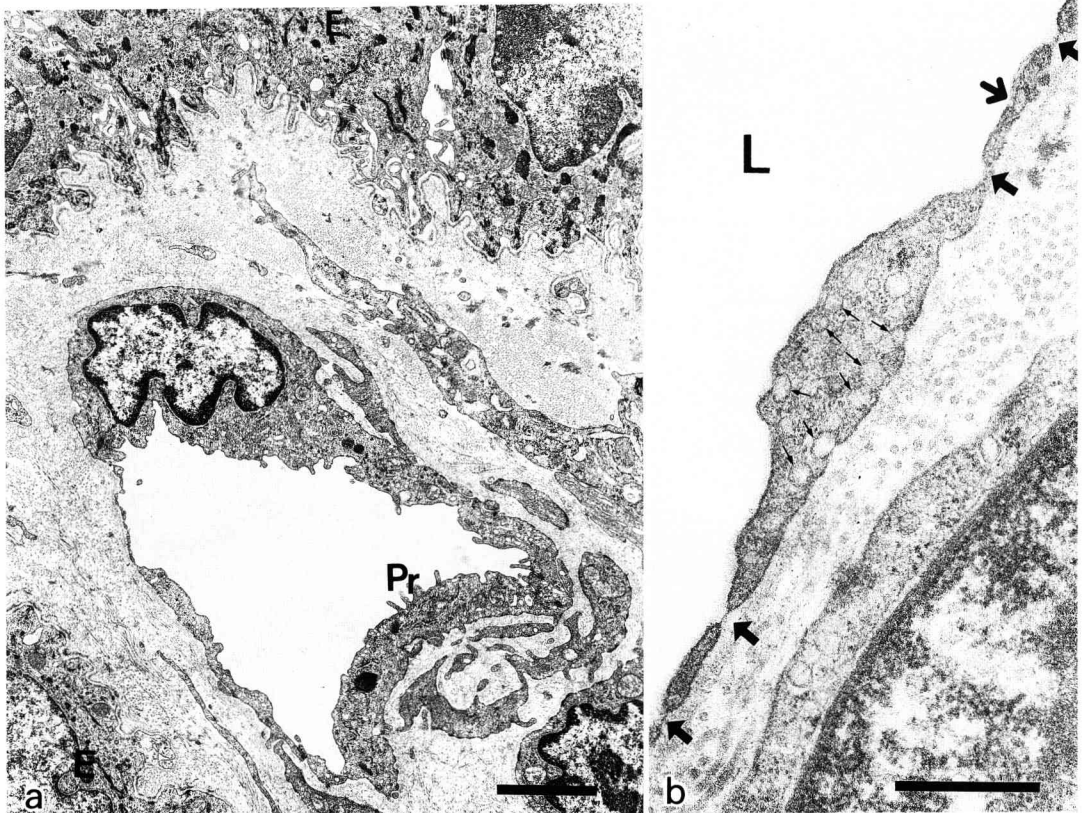


Fig. 13 Electron micrographs of PP combination in the experimental group.

a : On the luminal side of this endothelial cell, many endothelial projections are recognized, and nucleus is irregular in shape. (Scale bar : 2 μm)

b : In this endothelial cell, fenestrae (\rightarrow), vesicles ($-$) and transendothelial channel (\rightarrow) are seen. (Scale bar : 0.5 μm)

body (以下 W-P body と略す) が観察された (Fig. 10)。vesicle は対照群に比べて少なく、管腔側には projection や fold はほとんど観察されなかったが、管腔は狭窄し、凹凸不整を呈していた。腫瘍血管を取り巻く基底膜は部分的に不明瞭となり、基底膜の不連続性が認められた。癌巣における腫瘍細胞の上皮基底層では、基底側の細胞は不規則で、細胞間隙の拡大が著明となり、デスモゾーム結合が破壊されていた。上皮基底膜には断裂が認められ、血管壁周囲のコラーゲン線維は密ではあるものの、その配列は対照群に比べて乱れていた (Fig. 11 a, b)。

b) THP-ADM 単剤

内皮細胞は部分的に肥厚したり、または菲薄化して不規則な形態を呈していた。肥厚部では

vesicle が比較的多く存在していた。一方、菲薄部には vesicle はほとんど認められず、ところどころに fenestra が散見された。内皮細胞の管腔側には projection が観察された。基底膜は部分的に不明瞭となり、周囲結合組織との区別は困難であった (Fig. 12 a, b)。

c) PP 併用

内皮細胞の管腔側には、projection が多数認められ、その核は凹凸不整を呈していた。内皮細胞は一段と菲薄化を呈し、fenestra が増加し、THP-ADM 単剤投与時に比べて vesicle は少なくなっていたが、生食、TPP 併用投与時よりは比較的多く存在していた。細胞内小器官は W-P body およびミトコンドリアの変性像が認められた。基底膜は不明瞭となり、血管壁周囲のコラーゲン線維は THP-ADM 単剤ほどでは

ないが、生食投与のものに比べてより密に配列し、また瀰漫性の浮腫性変化も認められた (Fig. 13 a, b)。

d) TPP 併用

内皮細胞は菲薄化がさらに著明となり、変性、淡明化を呈する血管が多く認められた。それらの内皮細胞には fenestra の数も増加し、個々の内皮細胞に数個みられるものから連続してみられるものもあった。細胞内小器官には、ミトコンドリアが変性したと思われる構造物や拡張した粗面小胞体、大小さまざまな空胞の増加などが観察され、vesicle の著明な減少が認められた。血管周囲組織には、腫瘍胞巣の崩壊、すなわち細胞質内に空胞が多数散在し、ミトコンドリアやリボゾームの減少、腫瘍細胞間隙の開大などが観察され、また血管壁周囲のコラーゲン線維が粗になっていた。粗面小胞体は豊富で、紡錘形の細長い細胞質を有する線維芽細胞、あるいは細胞外形が不整で、同定が困難な間葉系細胞も認められ、その他多核白血球や形質細胞などの炎症性細胞も散在していた (Fig. 14 a, b)。

3. 物質透過関連構造の出現頻度

1) pinocytotic vesicle の出現頻度

血管内皮細胞における vesicle の出現頻度は (Fig. 15), 投与薬剤のすべてにおいて対照群の血管が実験群の腫瘍血管に比べて高かった。なお、対照群における各薬剤間の出現頻度は生食, THP-ADM 単剤, PP 併用, TPP 併用投与時には、それぞれ $7.47 \pm 0.27\%$, $16.90 \pm 0.40\%$, $10.11 \pm 0.62\%$, $8.98 \pm 0.28\%$ と、各抗癌剤投与が生食投与に比べて有意に高い頻度を示した。とくに THP-ADM 単剤が生食投与と比較して、約 2.3 倍高い頻度を示した。一方、実験群における同様の頻度は生食, THP-ADM 単剤, PP 併用, TPP 併用投与時には、それぞれ $4.98 \pm 0.29\%$, $14.01 \pm 0.04\%$, $8.74 \pm 0.42\%$, $5.42 \pm 0.19\%$ となり、THP-ADM 単剤が生食投与に比べて約 2.8 倍も高かったが、TPP 併用では僅かに高い程度であった。

2) fenestra の出現頻度

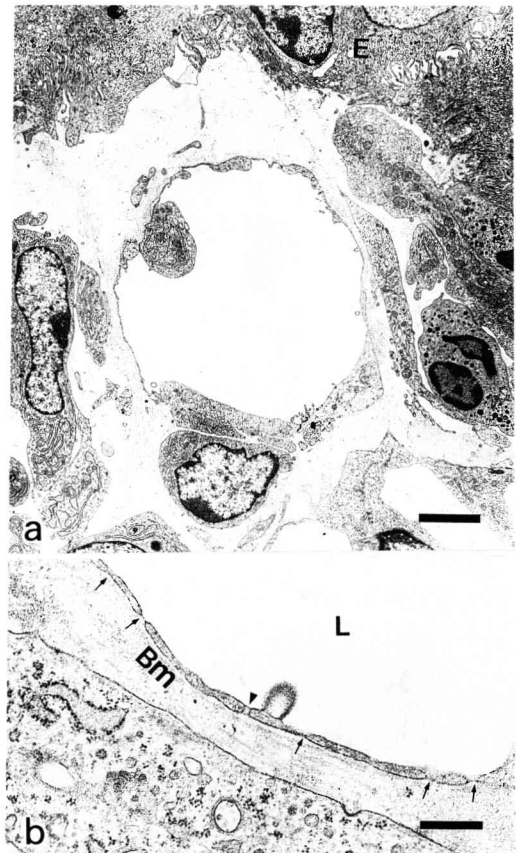


Fig. 14 Electron micrographs of TPP combination in the experimental group.

a : Endothelial cells are thinnest, and there are many light-colored blood vessels. (Scale bar : $0.5 \mu\text{m}$)

b : In this endothelial cell, the number of fenestrae (\rightarrow) increased. There is an arrangement of fenestrae (\rightarrow) in each endothelial cell. Furthermore, a transendothelial channel (\blacktriangleright) appeared. (Scale bar : $5 \mu\text{m}$)

fenestra の出現頻度 (Fig. 16) は、すべての薬剤投与において実験群の腫瘍血管が対照群の血管に比べて高かった。対照群における各薬剤間の出現頻度は生食, THP-ADM 単剤, PP 併用, TPP 併用投与時には、それぞれ $0.11 \pm 0.05\%$, $0.52 \pm 0.10\%$, $2.27 \pm 0.18\%$, $0.54 \pm 0.11\%$ であり、各抗癌剤投与時には生食投与時に比べて、すべての fenestra の出現頻度が有意に高く、とくに PP 併用時には最も高かった。一方、実験群における同様の出現頻度は生

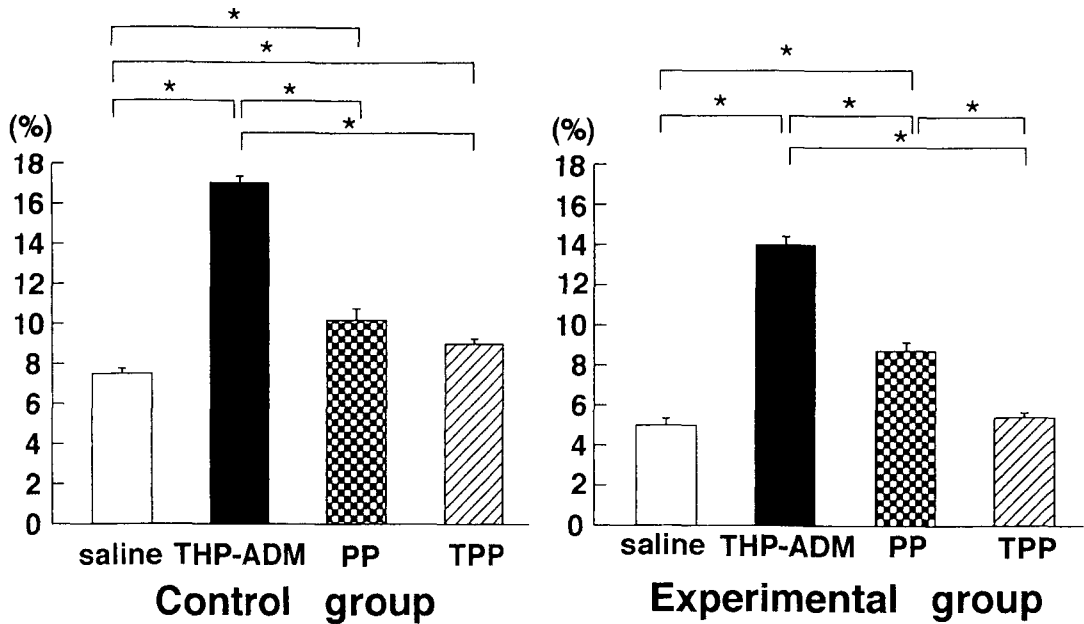


Fig.15 Frequency of appearance of pinocytotic vesicles. By single administration of THP-ADM, pinocytotic vesicles increase significantly more than by administration of saline, PP and TPP combinations in both control and experimental groups. Values are expressed as mean and S.E. (* P <0.05)

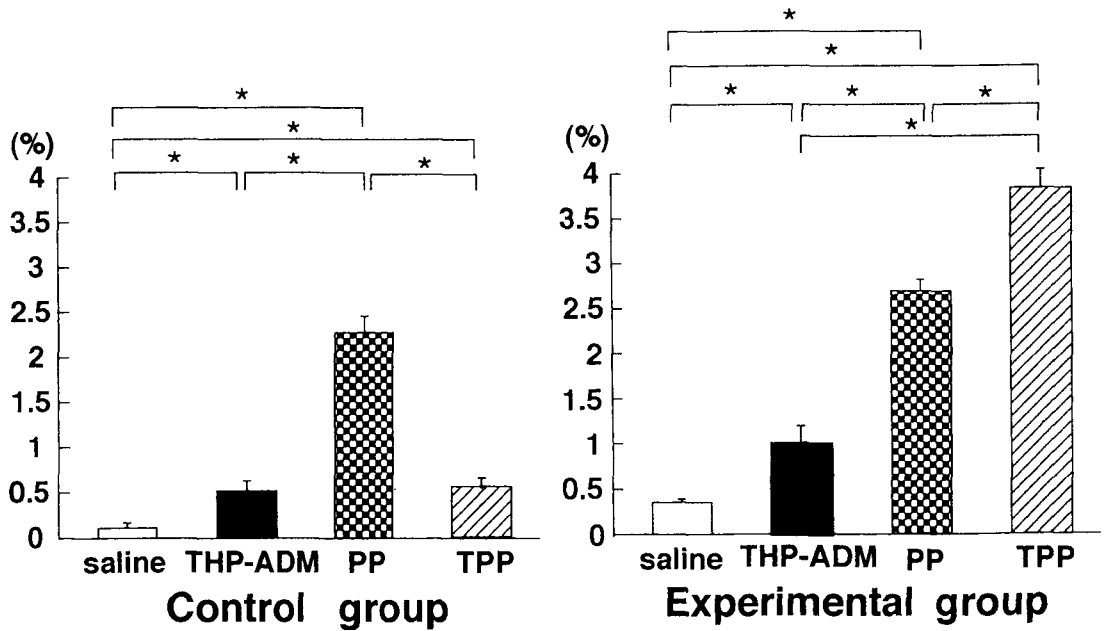


Fig.16 Frequency of appearance of fenestrae. TPP combination induced the highest frequency, compared to saline, THP-ADM alone and PP combination in the experimental group. Values are expressed as mean and S.E. (* P <0.05)

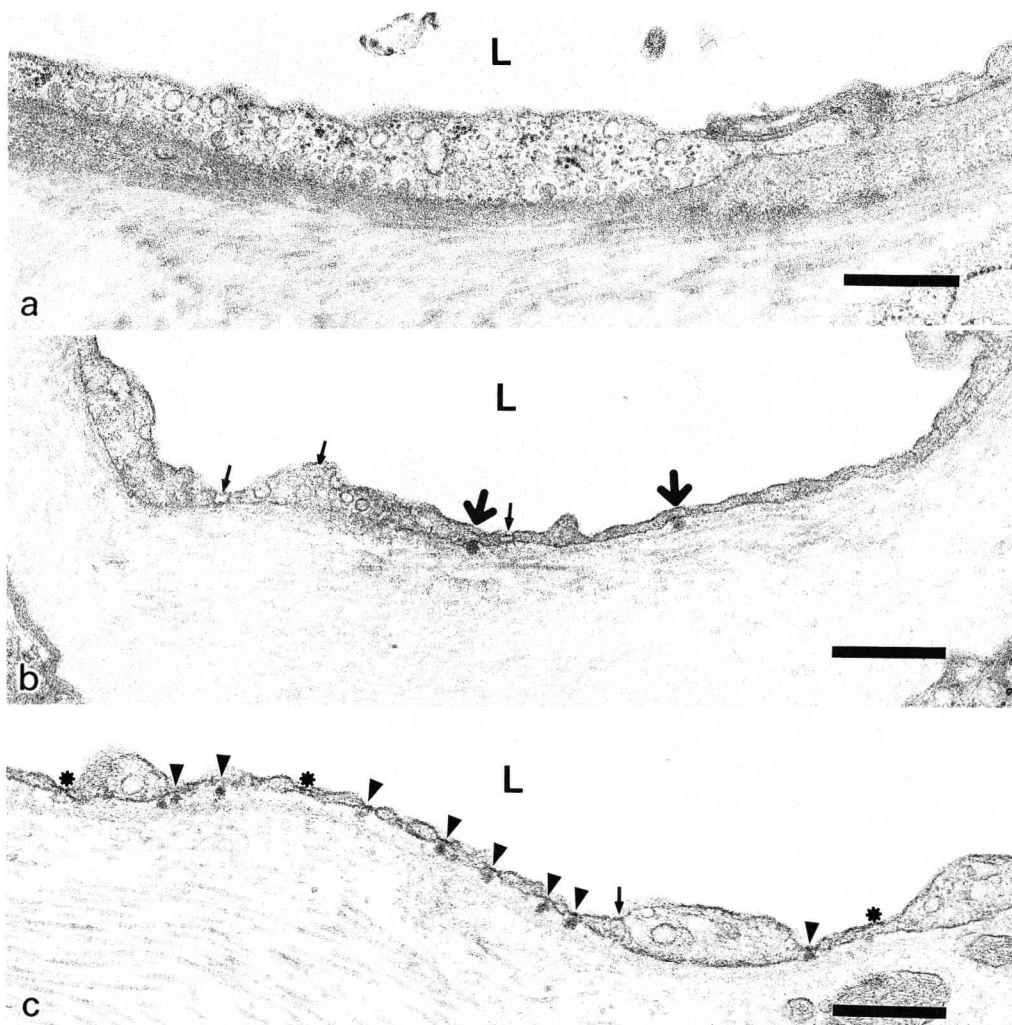


Fig. 17 Tannic acid complexes on the abluminal side in the control group.
 a : Single administration of THP-ADM. Tannic acid complexes are found in almost all of the opened vesicles and are observed on the vascular abluminal side. (Scale bar : 0.5 μ m)
 b : TPP combination administration. There are tannic acid complexes exactly at the transendothelial channels (\rightarrow). However, some tannic acid complexes are not observed at these areas (\rightarrow). (Scale bar : 0.5 μ m)
 c : TPP combination administration. There are tannic acid complexes exactly under some fenestra (\blacktriangleright) but, are not at other fenestrae (*). (Scale bar : 0.5 μ m)

食, THP-ADM 単剤, PP 併用, TPP 併用投与時には, それぞれ $0.34 \pm 0.05\%$, $1.02 \pm 0.15\%$, $2.67 \pm 0.14\%$, $3.82 \pm 0.21\%$ と, PP および TPP 併用投与時に高かった。とくに TPP 併用投与時には, 対照群では PP 併用投与時より低かったが, 実験群では逆に最も高かった。

4. トレーサーによる物質透過の観察

1) 対照群

生食および THP-ADM 単剤投与では, 大部分の vesicle 内にタンニン酸結合物が含まれていた。PP および TPP 併用投与では, 細胞質内にタンニン酸結合物を含まない vesicle も観察された。管腔側および非管腔側に開口している vesicle 内にはタンニン酸結合物が認められ,

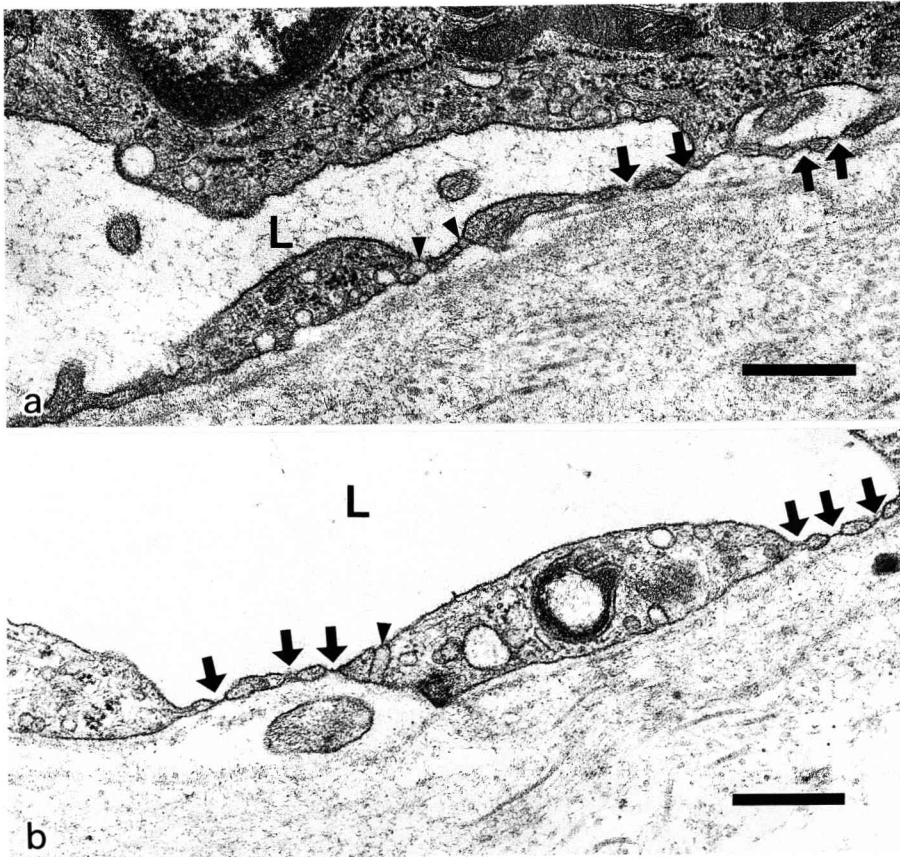


Fig. 18 Tannic acid complexes on the abluminal side in the experimental group. Almost no tannic acid complexes are found at the fenestrae and transendothelial channel (a and b).

(Scale bar : 0.5 μ m)

(\rightarrow) : Fenestra without tannic acid complexes

(\blacktriangleright) : Transendothelial channel without tannic acid complexes

Abbreviations

Ca : Arterial limb of capillary loop Cv : Venous limb of capillary loop

L : lumen PV : pinocytotic vesicles F : fenestra E : epithelium

Ch : transendothelial channel Pr : endothelial projection Bm : basal membrane

Tj : tight junction Ga : Golgi apparatus Pc : pericyte

非管腔側にタンニン酸結合物の蓄積が認められた (Fig. 17 a)。TPP 併用投与では細胞質の菲薄化に伴って channel も観察され、その直下にもタンニン酸結合物の蓄積が認められた (Fig. 17b)。

一方、fenestra の出現は生食、THP-ADM 単剤投与ではほとんど認められなかったが、PP および TPP 併用投与ではそれが多かった。またその fenestra 直下にタンニン酸結合物が蓄積しているとは限らなかった (Fig. 17c)。

細胞間隙は生食、THP-ADM 単剤投与では均一であったが、PP および TPP 併用投与では細胞間隙の拡大がみられたものの、いずれも数カ所に tight junction があり、それによってタンニン酸結合物の通過が阻止され、管腔側から非管腔側へと連続的に蓄積している所見は認められなかった。

2) 実験群

THP-ADM 単剤および PP 併用投与を除くと、生食および TPP 併用投与では非管腔側の

タンニン酸結合物の蓄積は特別に顕著ではなかった。THP-ADM 単剤では生食, PP 併用, TPP 併用投与に比べると, vesicle が多数分布し, 開口している vesicle 内にタンニン酸結合物が認められた。しかし生食および TPP 併用投与では vesicle が少なく, とくに TPP 併用投与ではタンニン酸結合物を含んだ所見は観察されなかった。一方, fenestra と channel からのタンニン酸結合物の通過は THP-ADM 単剤, PP 併用投与および TPP 併用投与では, その直下に対照群のようなタンニン酸結合物の蓄積がほとんど認められなかった (Fig. 18 a, b)。また内皮細胞の細胞間隙は対照群と同様に, tight junction によってタンニン酸結合物の通過が阻止されていた。

考 察

口腔癌の治療に高い奏効率を示す多剤併用療法は, 作用点の異なる薬剤の相互作用による相乗効果と抗腫瘍スペクトラムの拡大を期待することができる^{31,32)}。TPP 併用投与は, エールリッヒ腹水癌では経時的細胞数や cell cycle の作用面から THP-ADM の先行投与が非常に効果がすぐれており, 体重の減少も比較的少なく, 毒性による死亡例もみられなかったと報告されている³³⁾。臨床的にも橋本ら³⁴⁾, 浅井ら³⁵⁾によると口腔癌に対する TPP 併用療法は奏効率が 90~100% であり, またリンパ節転移陽性群に対しても有効であり, neoadjuvant chemotherapy³⁶⁾ としての有用性が高かった^{34,35)}。したがって著者は臨床的に使用されている TPP 併用, とくに THP-ADM, CDDP, PEP の順に投与した際の血管の物質透過性について検討を加えた。

1. 誘発舌扁平上皮癌の発生について

これまで誘発舌癌²⁸⁾は, 外向性腫瘍がほとんどを占め^{4,37,38)}, 扁平上皮癌が 100% に形成されている。本研究では, 乳頭腫の形成が麻醉死などを除いた 37 匹中 2 匹に認められたが, これは擦過操作の機械的損傷の影響が考えられた。擦過は粘膜下組織に達しないよう十分に注

意をしたが, 深さが粘膜下組織に達したものでは, 炎症による二次的組織反応が起こり, 粘膜が癒痕化を呈し, 癌の形成が遅れ, 所定期間後に癌が誘発された。なお実験動物の体重変化は, 潰瘍型の 5 匹および混合型の 2 匹では腫瘍が内向性に増殖し, 生検後には体重が減少をきたし, 25~27 週目までにいわゆる口腔腫瘍死に至った。また隆起型の 20 匹はすべて対照群にくらべて体重の減少は認められず, 舌の試料採取時における剖検では, 遠隔転移は全く認められなかった。

2. 腫瘍血管の内皮細胞の形態的特徴

1) 血管型

Bennett ら³⁹⁾は, 毛細血管を有窓型毛細血管, 連続型血管, 不連続型血管の 3 型に分類している。これら毛細血管の形態は臓器や生理的条件によっても多様性を示す⁴⁰⁾。すなわち脳の血管は連続型血管ではあるが, 炎症, 腫瘍, 外傷などの病的状態下では透過性が亢進し, 部分的に有窓型になる^{41,42)}。また肺癌の腫瘍血管は, 連続型や有窓型, あるいは gap を有する不連続型などが報告されている⁶⁾。これに対し, 口腔粘膜扁平上皮癌の腫瘍血管は有窓型の血管が多く, 発生母組織の血管形態にかかわらず, gap や fenestra が観察される^{9,11,43)}。しかし本研究に用いた DMBA 誘発舌癌では, 連続型血管や有窓型血管^{3,4)}がみられ, VX 2 癌の腫瘍血管^{9,43)}とは異なり, gap を有する不連続型の毛細血管は観察されなかった。このような腫瘍血管の形態的相違は, 誘発舌癌が外向性腫瘍で, 高分化型がほとんどを占める^{3,4,37,38)}のに対し, VX 2 癌は内向性腫瘍で低分化型である⁴⁴⁾, などによるものと考えられる。

2) 腫瘍血管の形態的特徴および透過関連構造の出現頻度と透過機能について

生食投与後の腫瘍血管は対照群の血管と比較し, 内皮細胞の非薄化が顕著となり, fenestra の増加, 基底膜の一部不明瞭化, 隣接する細胞間の junction の拡大などがみられ, これらは内皮細胞の形態的变化によるものと考えられる。また junction には内皮細胞間の拡大は認

Table 2 Comparison of tannic acid complex and frequency of appeared permeability-related structure.

Group	Agents	Pinocytotic vesicle		Fenestra		Intercellular space
		FA(%)	TAC*	FA(%)	TAC*	Form
Cont	Saline	7.47	/	0.11	/	Uniformity
	THP-ADM	16.90	++	0.52	+	Expand
	PP	10.11	±	2.27	+	Expand
	TPP	8.98	±	0.54	++	Expand
Exp	Saline	4.98	+	0.34	+	Expand
	THP-ADM	14.01	+	1.02	++	Expand
	PP	8.74	-	2.67	-	Expand
	TPP	5.42	-	3.82	-	Expand

* : The saline of the control group shows standard data compared with other agents.

Cont : Control group. Exp : Experimental group. FA : Frequency of appearance.

TAC : Accumulation of tannic acid complex.

められるものの、必ず数カ所の tight junction によって接合が保たれていた。なお、tight junction は連続的ではなく⁴⁵⁾、細胞間隙の拡大が物質透過を容易にしている可能性の高いことを示唆している。しかし、トレーサーが細胞間隙に入っていないことから、この部を通過しなかったものと考えられる。vesicle および fenestra の出現頻度を比較すると、vesicle は対照群の血管が腫瘍血管に比べて高かったのに対し、fenestra は逆に腫瘍血管において高かった。また腫瘍血管では、W-P body のような特異な細胞内小器官の出現も報告されている^{11, 46, 47)}。このような W-P body の出現は、血管新生との関与⁴⁷⁾やヒスタミンを含むこと^{11, 48)}から、物質透過性の亢進にも関与しているものと思われる。本研究においても、腫瘍血管における W-P body の出現は原¹¹⁾の報告よりは少なく、1個の内皮細胞あたり平均1~2個認められた (Fig. 10)。しかし W-P body が、対照群の血管内皮細胞に認められなかったことはきわめて興味深く、これは透過性だけでなく、血管新生にも関与している可能性がある。しかしこのような所見が認められない血管もあり、この点について Denekamp⁴⁹⁾は腫瘍血管内皮細胞の turn over time が正常に比べ20~2,000倍も速いと述べている。このことから腫瘍血管では、種々の段階の血管が出現するので、それに応じて形態も多彩に変化するものと思われる。

一方、抗癌剤投与後の腫瘍血管については、

これまでも BLM, PEP, CDDP 投与後の血管内皮細胞の変化に関する報告^{4, 15, 43)}はみられるが、THP-ADM, PP および TPP 併用後の物質透過の変化に関する報告はみられない。BLM および PEP は正常粘膜下毛細血管内皮細胞に変化をもたらし、とくに PEP は内皮細胞の非薄化や fenestra の出現によって血管透過性を亢進させ⁵⁰⁾、また CDDP では PEP に比べて vesicle および fenestra の出現頻度が高く、腫瘍血管の物質透過性ははるかに上回る⁴⁾ことが報告されている。本研究に用いた THP-ADM の単剤投与は、CDDP や PEP とは異なった内皮細胞の反応を示した。すなわち対照群および実験群の血管内皮細胞は、vesicle が著明に増加し、とくに前者においてそれが顕著で、その出現頻度も有意に高値を示した。また1つあるいは数個の vesicle が捻珠状に癒合し、いわゆる channel を形成したり、vesicle の増加に伴い、ミトコンドリアも増加していた。このように THP-ADM の単剤投与では、vesicle による物質輸送が旺盛となり、さらに一部においては channel も形成されて物質透過性が亢進し、その物質輸送にエネルギーが消費されるため、ミトコンドリアも増加するものと考えられる。なお実験群の腫瘍血管では、vesicle の他に多数の fenestra の出現が観察され、より一層透過性が亢進し、さらに projection の増加は血流の停滞を促し、物質透過の一助となっているものと考えられた²⁹⁾。

PP 併用投与では、対照群の血管内皮細胞も菲薄化し、生食投与ではほとんど観察されなかった有窓型血管が認められるようになり、fenestra の出現頻度も生食、THP-ADM 単剤、TPP 併用投与に比べて有意に高値を示した。一方、実験群の腫瘍血管は内皮細胞の菲薄化が進み、fenestra の出現頻度も PP 併用投与後の対照群の血管より高かった。これは CDDP および PEP の両者は血管内皮細胞に対して類似した作用があり、内皮細胞の菲薄化と fenestra の形成を促進させることが考えられた。vesicle は腫瘍血管ではやや減少傾向を示したものの、対照群の血管との間に有意差は認められなかった。PP 併用投与では fenestra および vesicle の 2 つの物質透過関連構造が、THP-ADM 単剤および TPP 併用投与のいずれの投与方法よりも比較的高頻度に出現することから、PP 併用投与时における物質透過機構は、fenestra と vesicle の両者を介する物質輸送が活発化し、透過性が亢進するものと思われる。

TPP 併用投与では、内皮細胞の菲薄化はさらに顕著となり、fenestra の出現頻度が対照群の血管では PP 併用投与に比べて有意に減少しているものの、vesicle は比較的高い頻度を示していた。これは THP-ADM が加わることによって内皮細胞の部分的肥厚が生じ、THP-ADM の特徴的作用として vesicle が増加をきたす結果によるものと思われる。一方、実験群の腫瘍血管では対照群の血管と全く反対の結果が得られた。すなわち TPP 併用投与によって fenestra の出現頻度は最高値を示し、vesicle の形成に著明な抑制がみられた。これは THP-ADM の投与後に CDDP、PEP を投与したことによって内皮細胞の物質透過機構に変化が生じ、物質輸送の主体が vesicle から fenestra を介する輸送に移行したものと推測される。

3. 抗癌剤投与による血管障害について

これまでも BLM ないし PEP 投与による血管障害作用の報告が多数みられる^{11, 15, 50~54}。これらの血管障害は治療に際し、血管の閉塞が腫瘍

細胞の壊死をもたらすため抗腫瘍効果をあげているという説⁴⁹もある。また逆に血管閉塞は、臨床上的治療効果が得られず⁵⁴、さらに PEP の長期投与は抗腫瘍効果の減少や、手術後の創傷治癒遅延の原因となることから、腫瘍血管に対する抗癌剤の副作用はきわめて重要な側面を有することも指摘されている^{11, 53}。THP-ADM の単剤投与では、対照群および実験群の血管はともに血管内皮細胞の反応が良好で、変性や壊死に陥った血管はほとんど観察されなかった。また血管周囲組織への影響は、対照群の血管では血管壁周囲にコラーゲン線維が密になっていたが、浮腫様変化や上皮組織には明かな変化は認められず、THP-ADM は物質透過性を亢進させ、血管内皮細胞の障害も比較的少なく、したがって周囲組織への障害も軽微であるものと推察された。

PP 併用および TPP 併用投与では血管内皮細胞の形態的变化に及ぼす影響が強く、変性した内皮細胞を有する血管が多く見られるようになり、また基底膜の不連続性、多層化も見られ、血管壁周囲のコラーゲン線維の配列の乱れ、浮腫性変化などが観察された。これらは少なくとも血管内皮細胞ならびに血管周囲組織に異常をきたし、血管障害が惹起されたものと考えられる。すなわち TPP 併用では透過性亢進を促す THP-ADM をまず最初に投与し、次いで CDDP、最後に血管障害を惹起しやすい PEP を投与すると、内皮細胞の機能面からはきわめて有効であると考えられた。しかしこのような変化が局所のみならず、全身においても起こっているであろうことは、腹腔内投与であることから明らかである。今後は投与方法についても十分に考慮すべき余地がある。

4. トレーサーによる物質透過について

トレーサーの物質透過機構に関しては、組織によって各透過関連構造の動態が異なり^{55~57}、正常組織と比較した炎症時の変化⁵⁸や腫瘍血管に対する抗癌剤の種類による差異⁹が報告されている。本研究ではトレーサーとしてタンニン酸を用いた結果、生食、THP-ADM 単剤、PP 併

用, TPP 併用投与後では, 対照群の血管と実験群の腫瘍血管はそれぞれ物質透過に明らかな差異が認められた。すなわち対照群の血管は THP-ADM 単剤投与では管腔側, 非管腔側および細胞質中のほとんどの vesicle にタンニン酸結合物の蓄積が認められた。このことより THP-ADM 単剤投与では, vesicle を経由した物質輸送が, 盛んに行われていることが示唆された。PP 併用および TPP 併用投与では, THP-ADM 単剤投与に比べて vesicle が少なく, 細胞質中にはタンニン酸結合物を含まない vesicle も認められた。またこれら併用投与後では fenestra の出現が多くなり, channel も形成され, それらの直下にある基底膜の lamina densa の内側にタンニン酸結合物の蓄積が認められた。しかし fenestra によっては, タンニン酸結合物の蓄積が認められないものも存在していた。このことは PEP が最後に投与されることにより, 血管障害⁵³⁾が惹起された結果による可能性も考えられる。対照群の血管における各薬剤投与間のタンニン酸透過量の比較では, THP-ADM の単剤投与が最も多く, 次いで TPP 併用, PP 併用, 生食の順であり, THP-ADM は物質透過性の優れた抗癌剤であると言える (Table 2)。

一方, 実験群の腫瘍血管では全般的に対照群の血管に比べ, 非管腔側のタンニン酸結合物の蓄積は不明瞭で, 透過量が少ないように思われた。各投与薬剤間で比較すると, THP-ADM 単剤投与では対照群の血管と同様に vesicle が多数分布し, 開口している vesicle 内にはタンニン酸結合物が含まれ, 非管腔側にタンニン酸結合物の蓄積が認められた。しかし PP 併用および TPP 併用投与では, 明らかな蓄積は認められなかった。また fenestra および channel からの透過は, THP-ADM 単剤ではそれらの直下にタンニン酸結合物の蓄積が認められたが, PP 併用投与, TPP 併用投与时ではそれがほとんど観察されず (Fig.18 a, b), あたかも物質透過関連構造の出現頻度と透過性亢進との相関性はないものと思われた。しかしこのことは,

本実験が抗癌剤の投与終了から 24 時間後の血管内皮細胞に対して検討されたものであり, 抗癌剤の通過後に現れる前述の PEP による血管障害によるものと思われ, とくに実験群の腫瘍血管では, PEP による内皮細胞の反応がより顕著に現れたためであると推測された。ゆえに今後は, この PEP の投与日数ならびに投与量における内皮細胞への経時的变化については, なお検討の余地があるものと考えられた。

細胞間隙は必ず数カ所において tight junction によって閉塞され, 腫瘍血管であってもそこからのタンニン酸結合物の通過は認められず, 透過に関与している所見とは見做し難かった。したがってその透過量は THP-ADM 単剤投与が著明で, 次いで生食, PP 併用, TPP 併用投与の順に減少し (Table 2), 対照群の血管の透過量とは明らかな相違を示していた。

このように抗癌剤の腫瘍血管からの透過性を左右する因子には, 1) 抗癌剤の薬理作用に対する血管内皮細胞の反応, 2) 血管を圍繞している基底膜の状態や血管周囲組織の構造, などが考えられる。一方, 臨床的に抗腫瘍効果の持続という点から TPP 併用投与について考察すると, THP-ADM の先行投与によって vesicle を増加させ, 血管外への物質輸送を促し, 次いで投与される CDDP は内皮細胞の非薄化と fenestra の出現を惹起し⁹⁾, 最後に投与される PEP を血管外へ容易に通過させる働きがあるものと思われる。なおこのような PEP は, 殺細胞作用が強いため血管障害を惹起し, 腫瘍の血管新生を抑制するという二重の効果があるように思われた。

結 論

ゴールデンハムスター誘発舌癌に対する抗癌剤の多剤併用による腫瘍血管内皮細胞の形態学的変化および物質透過性を明らかにするため, 生食, THP-ADM 単剤, PP 併用, TPP 併用投与後の健常舌粘膜下血管および腫瘍血管を透過型電子顕微鏡を用いて観察し, 以下の結論を得た。

1) 実験群のDMBA誘発舌扁平上皮癌は94.6%と高率に発生し、これらは隆起型を示す外向性腫瘍がほとんどで、病理組織学的には高分化型が75%、中分化型が25%であった。

2) 実験群の腫瘍血管は対照群の血管とは形態的に異なり、血管内皮細胞が菲薄化し、個々の内皮細胞におけるvesicleの減少、fenestraの増加、junctionの形態異常、さらにはW-P bodyの出現や、基底膜の不連続性などが認められた。

3) 抗癌剤投与後の各薬剤間における物質透過関連構造の変化を比較すると、実験群および対照群ともにTHP-ADM単剤投与では生食、PP併用、TPP併用投与に比べてvesicleの出現が有意に高頻度を示した。TPP併用投与では血管内皮細胞の菲薄化が進行し、vesicleの抑制が見られ、fenestraの出現頻度が高値となり、ときにはchannelの形成も認められるようになった。

4) 全般的に対照群の血管に比べて実験群の非管腔側におけるタンニン酸結合物の蓄積は不明瞭であった。各薬剤投与群間におけるタンニン酸結合物の蓄積の比較では、対照群の血管はTHP-ADM単剤、TPP併用、PP併用、生食の順に、また実験群の腫瘍血管はTHP-ADM単剤、生食、PP併用、TPP併用の順に多くみられた。

5) 抗癌剤の腫瘍血管からの物質透過性は、抗癌剤に対する血管内皮細胞の反応、基底膜の状態、あるいは血管周囲結合組織の形態的变化などによって異なっていた。

6) THP-ADMの投与に際し、その単剤投与とTPP併用投与では物質透過関連機構の様相が異なっていた。特にTPP併用時にはTHP-ADMの先行投与により、血管内皮細胞の物質透過性が亢進することを示唆していた。

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、岩手医科大学歯学部口腔外科学第一講座 藤岡幸雄名誉教授ならびに工藤啓吾教授に深甚なる謝意を表します。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同口腔解剖学第一講座 野坂洋一郎教授ならびに同口腔病理学講座 佐藤方信教授に厚く謝意を表します。さらに統計処理に直接御助言、御指導を賜りました岩手医科大学教養部数学科 一戸孝七教授に厚く謝意を表します。また数々のご教示、ご助言を戴いた同口腔解剖学第一講座 藤村 朗助教授に厚く謝意を表します。さらに多くのご助力、ご便宜を戴いた同口腔外科第一講座 大屋高德助教授をはじめ、ご協力戴きました関連講座の諸先生方ならびに教室員各位に厚く御礼申し上げます。

なお、本論文の要旨の一部は、第47回日本口腔科学会総会(1993年5月13日、弘前市)および第1回アジア微小循環学会(1993年9月28日、大阪市)において発表した。

引用文献

- 1) 松嶋典彦：実験的舌癌における血管構築ならびに腫瘍血管の超微構造，日口外誌，28：175 - 191，1982.
- 2) 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.
- 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) 山浦玄嗣：腫瘍血管の形態と機能に関する実験的研究，抗研誌，23：100 - 120，1971.
- 6) Seng, A.E.：肺癌毛細血管の電子顕微鏡的研究，抗研誌，26：214 - 232，1973.
- 7) Long, D.M.：Capillary ultrastructure in human metastatic brain tumors. *J Neurosurg.* 51：53 - 58，1979.
- 8) 奏 順一，玉置憲一，赤塚 明，佐藤 勉：腫瘍血管新生に関する形態学的研究，最新医学，36：1841 - 1845，1981.
- 9) 辻本守孝：VX 2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.
- 10) 中塚 孝雄：ハムスター頬嚢の7, 12-Dimethylbenz (a) anthracene発癌過程における血管変化の機能的および形態的变化の研究，名市

- 大医誌, 36:269-284, 1985.
- 11) 原 広子: 口腔粘膜扁平上皮癌における腫瘍血管の電顕的観察 特に内皮細胞を中心にして, 日口外誌, 33:270-289, 1987.
 - 12) 鈴木磨郎: 腫瘍血管の機能的特性, 昇圧癌化学療法的基础として, 坑研誌, 36:93-105, 1985.
 - 13) 右田信行: 家兎上顎癌におよぼす制癌剤動注の影響に関する光顕的および電顕的研究, 九州歯会誌, 25:309-333, 1971.
 - 14) 大根光朝: ラット口腔原発の化学誘発扁平上皮癌に対する Bleomycin の影響, 歯科学報, 78:191-212, 1978.
 - 15) 二山孝司: 実験的悪性腫瘍の微細血管系に及ぼす抗癌剤の影響に関する研究, 日整会誌, 54:33-45, 1980.
 - 16) Lazo, J.S.: Endothelial injury caused by anti-neoplastic agents. *Biochem. pharmacol.* 35:1919-1923, 1986.
 - 17) Simionescu, N., Simionescu, M., and Palade, G. E.: Permeability of muscle capillaries to small heme-peptides, Evidence for the existence of patent transendothelial channels. *J. Cell. Biol.* 64:586-607, 1975.
 - 18) 山元寅男: 血管透過の形態, 脈管学, 18:5-10, 1978.
 - 19) Bundgaard, M.: Pathways across the vertebrate blood-brain barrier: Morphological viewpoints. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 481:7-19, 1986.
 - 20) Simionescu, M. and Simionescu, N.: Functions of the endothelial cell surface. *Ann. Rev. Physiol.* 48:279-293, 1986.
 - 21) Long, D. M.: Capillary ultrastructure and the blood-brain barrier in human malignant brain tumors. *J. Neurosurg.* 32:127-144, 1970.
 - 22) Vick, N.A. and Bigner, D. D.: Microvascular abnormalities in virally-induced canine brain tumors. Structural bases for altered blood-brain barrier function. *J. Neurol. Sci.* 17:29-39, 1972.
 - 23) Kobayashi, S.: Occurrence of unique colloidal particles in snake blood and their transport across the capillary wall. A proposal of a new hypothesis on the permeability of the blood capillaries. *Arch. Histol. Jpn.* 31:511-528, 1970.
 - 24) Peterson, H.I. and Appelgren, L.: Tumour vessel permeability and transcapillary exchange of large molecules of different size. *Bibl. Anat.* 15:262-265, 1977.
 - 25) Heuser, L.S. and Miller, F.N.: Differential macromolecular leakage from the vasculature of tumors. *Cancer* 57:461-464, 1986.
 - 26) 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, 日口誌, 21:999-1012, 1972.
 - 27) Wahi, P.N.: Histological typing of oral and oropharyngeal tumors 1st ed., WHO Co., Geneva, pp 17-18, 1971.
 - 28) 瀬戸 匠: 肺扁平上皮癌の治療に関する研究, 第1編。ハムスター移植ヒト肺扁平上皮癌細胞株に対する各種制癌剤の感受性について, 岡山医誌, 101:573-579, 1989.
 - 29) Fujimra, A., Itoh, I., Nozaka, Y.: Morphometric analysis of the capillary loop endothelium underlying sulcular epithelium. *Bull. Tokyo dent. Coll.* 28:23-33, 1987.
 - 30) 日本頭頸部腫瘍学会編: 臨床・病理頭頸部癌取扱規約, 第2版, 金原出版, 東京, 15-24 ページ, 1991.
 - 31) 甲能直幸, 犬山征夫, 増野清二, 堀野正敏: 頭頸部癌に対する多剤併用療法, 日耳鼻, 84:54-61, 1981.
 - 32) Green, M.R.: Chemotherapy of head and neck cancer. *Head & Neck Surgery*, 1:75-86, 1978.
 - 33) 細田兵之助: Ehrlich 腹水癌に対する 4'-O-tetrahydropyranlyadriamycin, Cisplatin, Peplomycin による併用効果の検討, 慶応医学, 63:635-644, 1986.
 - 34) 橋本賢二, 鈴木浩之, 北川善政, 山口万枝, 山田一郎, 謝 誠輝, 田代悦章, 松下文彦, 上田吉生, 式守道夫, 福田廣志: 口腔癌に対する TPP (THP-ADM, CDDP, PEP) 動注化学療法の試み, 日口外誌, 39:819-822, 1993.
 - 35) 浅井昌大, 菅澤 正, 田山二郎: 頭頸部扁平上皮癌に対する CDDP-THP-PEP 併用療法 (PTP療法) の試み, 37:716-720, 1991.
 - 36) 犬山征夫, 増野精二, 藤井正人, 田中寿一, 高岡哲郎, 甲能直幸, 堀野正敏: 頭頸部癌に対する Neo-adjuvant chemotherapy の検討, 癌と化学療法, 10:786-791, 1983.
 - 37) 藤田浄秀: 舌癌の形成におよぼす機械的刺激の影響について, 横浜医学, 32:107-115, 1981.
 - 38) 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.
 - 39) Bennet, H.S., Luft, J.H. and Hampton, J.C.: Morphological classifications of vertebrate blood capillaries. *Am. J. Physiol.* 196:381-390, 1959.
 - 40) Palade, G.E. and Bruns, R.R.: Structural modulations of plasmalemmal vesicles. *J. Cell Biol.* 37:633-649, 1968.
 - 41) Van Deurs, B.: Structural aspects of brain barriers with special reference to the permeability of the cerebral endothelium and choroidal epithelium. *Int. Rev. Cytol.* 65:117-191, 1980.
 - 42) 猪口哲夫, 村上正浩: 毛細血管の微細構造, 特に, 血管透過性に関わる諸構造について, 細胞, 13:429-436, 1981.
 - 43) 石神哲郎: 家兎 VX 2 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.
- 44) 外山勤吾 : VX 2 癌移植による家兔舌癌の病理組織学的研究, 九州歯会誌, 32 : 340 - 356, 1978.
- 45) Bundgaard, M. : The three-dimensional organization of tight junction in a capillary endothelium revealed by serial-section electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 88 : 1 - 17, 1984.
- 46) Hirano, A. and Matsui, T. : Vascular structures in brain tumors. *Hum. Pathol.* 6 : 611 - 621, 1975.
- 47) Kumar, P., Kumar, S., Marsden, H.B., Lynch, P. G. and Earnshaw, E. : Weibel-Palade bodies in endothelial cells as a marker for angiogenesis in brain tumors. *Cancer Res.* 40 : 2010 - 2019, 1980.
- 48) Ueda, H., Doi, Y., Sakamoto, Y., Hamasaki, K. and Fujimoto, S. : Simultaneous localization of histamine and factor VIII-related antigen in the endothelium of the human umbilical vein. *Anat. Rec.* 232 : 257 - 261, 1992.
- 49) Denekamp, J. : Vascular endothelium as the vulnerable element in tumours. *Acta. Radiol. Oncol.* 23 : 217 - 225, 1984.
- 50) 島岡成和 : 抗癌物質がラット舌粘膜下毛細血管およびその周囲組織に及ぼす影響, 特に電顕的観察について, 日口外誌, 32 : 1581 - 1593, 1986.
- 51) 西下 明, 木村郁郎, 高田広美 : 腫瘍および肺の血管に及ぼす Bleomycin の影響, 脈管学, 11 : 23 - 26, 1971.
- 52) 外木守雄 : 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) 誘発ラット舌癌に対する Peplomycin の影響について, 第1編 Peplomycin の健常ラット舌粘膜上皮におよぼす影響について, 歯科学報, 88 : 1 - 20, 1988.
- 53) 外木守雄 : 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) 誘発ラット舌癌に対する Peplomycin の影響について, 第2編 Peplomycin の4NQO 誘発舌粘膜病変におよぼす影響について, 歯科学報, 88 : 973 - 1012, 1988.
- 54) Burkhardt, A., Höltje, W.J. and Gebbers, J.O. : Vascular lesions following perfusion with bleomycin, electron-microscopic observations. *Virchows Arch. Path. Anat. and Histol.* 372 : 227 - 236, 1976.
- 55) Florey, L. : The missing link : The structure of some types capillary. *Q. J. Exp. Physiol.* 53 : 1 - 5, 1968.
- 56) Clementi, F. and Palade, G.E. : Intestinal capillaries. I. Permeability to peroxidase and ferritin. *J. Cell Biol.* 41 : 33 - 58, 1969.
- 57) Hurley, J.V. and McCallum, N.E.W. : The degree and functional significance of the escape of marker particles from small blood vessels with fenestrated endothelium. *J. Path.* 113 : 183 - 196, 1974.
- 58) 藤村 朗 : ゴールデンハムスターの付着上皮下毛細血管に関する研究, 第2編 歯髓炎と毛細血管構築の関連性について, 歯科学報, 87 : 485 - 506, 1987.