

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—

瀬川 清

岩手医科大学歯学部口腔外科学第一講座（主任：藤岡幸雄教授）

〔受付：1986年10月15日〕

抄録：プロタミン（以下Pと略）とヘパリン（以下Hと略）が腫瘍血管の新生と構築におよぼす影響を形態学的に検討した。48匹のゴールデンハムスターにDMBA誘発舌腫瘍を形成後、60mg/kgのP, H, 生食を2週間で12回皮下注射した。血管内に硫酸バリウム、墨汁、Mercoxを注入し、microangiography, 光顕, 走査電顕などで観察した。舌扁平上皮癌が高率に発生し、隆起型、混合性発育型、高分化型が多かった。P群では腫瘍血管壁からの墨汁粒子の漏出が少なく、H群では多かった。腫瘍の血管面積率は、P群がH群と生食群に比べて有意に低値を示した。血管造影では多血管像はH群の腫瘍部にみられたが、P群と生食群にはみられなかった。新生血管芽数はP群で減少し、H群で増加した。癌巣周囲の血管は三層構造のドーム状を呈し、その表面を覆う毛細血管のくびれは、P群に認められた。肥満細胞は3群とも腫瘍組織内間質にはほとんどなく、腫瘍境界部の結合組織中に比較的多くみられた。これらの結果から、腫瘍間質における血管新生はPで障害され、Hで促進されることが示唆された。

Key words : angiogenesis, angioarchitecture, protamine, heparin, tongue carcinoma.

緒 言

従来、舌癌は口腔領域における悪性腫瘍のなかで最も発生頻度が高いことから、治療についても数多くの報告が行われてきた¹⁻³⁾。近年の癌に対する化学療法、放射線療法あるいは温熱療法などの併用に際し、腫瘍血管は腫瘍細胞への酸素の供給路⁴⁾、あるいは抗癌剤の到達経路として重要視されているのみでなく、微小循環に関連した超微構造や機能の特殊性⁵⁻⁷⁾などが注目されつつある。

腫瘍の血管新生は腫瘍の増殖と発育を促進することから⁸⁾、逆に血管新生阻害物質を投与すると、これらに対する抑制の可能性⁹⁾を推測す

ることができる。この点に着目したTaylor and Folkmanは¹⁰⁾、1982年肥満細胞¹¹⁻¹³⁾由来のヘパリン¹⁴⁻¹⁷⁾と腫瘍細胞から放出される tumor angiogenesis factor (T.A.F.)¹⁸⁾が、血管新生を促進するのに対し、ヘパリンの中和剤であるプロタミン¹⁹⁾が血管新生を阻害することを報告した。以来、現在まで数多くの追試^{20, 21)}が行われてきたが、その効果や作用機構についてはまだ十分に解明されていない現状にある。

一方、ハムスターの誘発舌癌²²⁾に関する研究は、1972年に藤田ら²³⁾が腫瘍を早期に、かつ高率に形成できることを報告して以来、口腔癌研究の実験モデルとして多用されている。しかし、腫瘍血管の新生ならびに構築に関する研究^{24, 25)}

Experimental study on alteration of angioarchitecture in the induced tongue carcinoma of hamster. : effects of protamine and heparin.

Kiyoshi SEGAWA

(Department of Oral Surgery I, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka 020)

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 11 : 270-290, 1986

は少なく、三次元的な血管構築に関する研究はみられない。

そこで、ハムスターのDMBA誘発舌癌の血管新生ならびに血管構築にプロタミンとヘパリンが如何なる影響をおよぼすかについて、血管内注入材を用いて光顕的ならびに走査電顕的に三次元的観察を行い、興味ある成績が得られたので報告する。

材料および方法

1. 実験動物

実験には雄性ゴールデン・ハムスター8週齢(平均体重80.8g, 60匹)を使用した。動物は購入後、動物舎(室温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 5\%$)にて1週間の予備飼育後、以下の実験に用いられた。飼育には、固型飼料MF(オリエンタル社製)を用い水道水を自由に与えた。

2. 発癌方法

藤田ら²³⁾の方法と同様に、毎週3回エーテル麻酔下に、左舌側縁中 $\frac{1}{3}$ 部を歯科用クレンザー(ピアス社製, No.1)で数回擦過し、その直後に発癌剤として0.5%9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene(以下DMBAと略)のアセトン溶液を小筆にて塗布した。約20週間、同様の

処置を繰り返し肉眼的に舌腫瘍を確認した後、2週間無処置で放置観察した。

3. 薬剤投与方法

発癌期間内に死亡した12匹を除く48匹を用いて、肉眼的に舌腫瘍の増大傾向が確認されてから硫酸プロタミン(硫酸プロタミン注射液, 清水製薬社製)(19匹), ヘパリンナトリウム(ヘパリンナトリウム注射液, ノボインダストリーA/S社製)(18匹), 生理食塩水(11匹)をそれぞれ $60\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ の割合で、頸部および背部の皮下に4日連続注射, 1日休止日の繰り返しで2週間に12回注射した。

4. 血管内注入法および観察法

1) 墨汁注入法

硫酸プロタミン(11匹), ヘパリンナトリウム(5匹), 生理食塩水(5匹)の最終投与後12時間以上経過したものに、以下の方法で墨汁(開明社製)を注入した。ヘパリン投与群のうち途中死亡例3匹は、死亡直後に墨汁を注入し血管像の観察の対象から除外した。

ネブタール麻酔下に開胸後、左右の内頸静脈を剖出した。下行大動脈を胸部で結紮してから左心室より上行大動脈にカテーテルを挿入・固定し、左右の内頸静脈に瀉血用の切開を加え

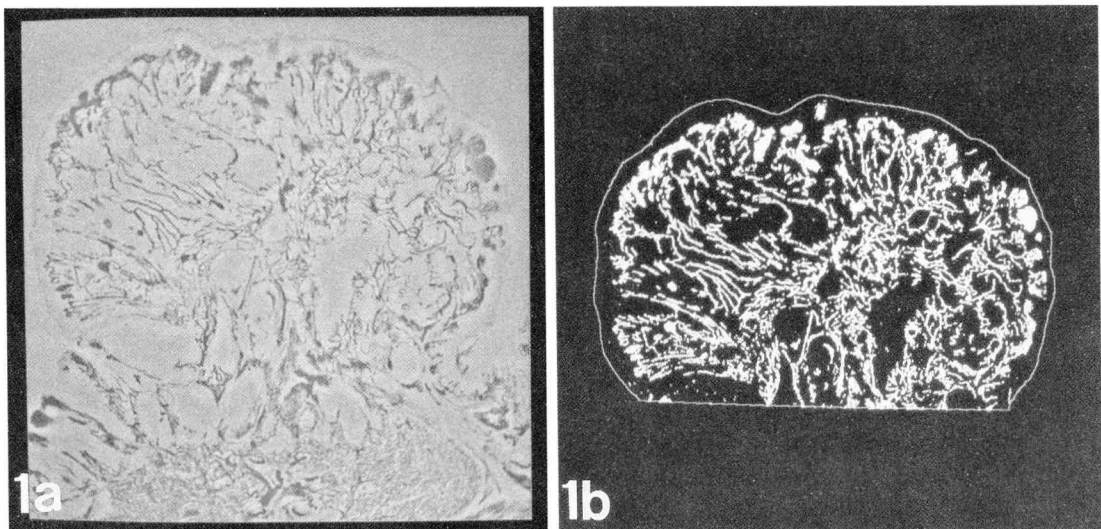


Fig. 1 Two typical pictures of the India ink preparation before (a) and after (b) vascular level analysis of the tumor.

た。まず、生理食塩水で十分に瀉血・灌流した後80~90mmHgの注入圧で舌および口腔粘膜が十分黒色となるのを目安として墨汁を注入した。注入に用いた溶液はすべて37~40°Cに加温してから使用した。注入後は上行大動脈および左右内頸静脈を結紮し、冷10%中性緩衝ホルマリン溶液に全身を1週間以上浸漬固定した後、舌を切り出した。さらにこれをトリミングし、1週間以上、10%中性緩衝ホルマリン溶液にて再固定した後に、通法にしたがってパラフィン包埋し、5 μ mと80 μ mの交互連続切片を作製した。5 μ mの切片は、カラッチのヘマトキシリン・エオジン染色(H.E.)を施し組織学的観察に供し、また一部は、肥満細胞を観察するためにトルイジンブルー(pH7.0)またはアルシアンブルー染色(pH2.5)を施して検鏡した。80 μ mの切片はキシレンにて透徹し、透明標本を作製して血管像の観察を行った。透明標本を40倍に拡大し、腫瘍全体、外向性発育部、内向性発育部のそれぞれについて画像解析装置(IBAS-2000型、カールツァイス社製)を用いて血管面積率(組織面積に対する血管の面積の割合:%)を計測した(Fig. 1)。墨汁の漏出により計測が困難な部位は、光量を調節し、H.E.染色標本と対比しながら測定を行った。計測した血管面積率は逆正弦変換法により処理後Mann-WhitneyのU testを用いて推計学的に検定を行った。

2) Microangiography

動物数はプロタミン投与群3匹、ヘパリン投与群4匹、生食投与群3匹を用いた。

左心室より挿入したカテーテルより硫酸バリウム(商品名バレックスモルトS-100、東邦化学研究所KK)を血管内に注入した。すなわち、生理食塩水にて瀉血・灌流後、まず第1液として、生理食塩水100mlに対しバレックスモルト30mgを加えたものを5ml/minの速度で注入した。そのあと第2液として、生理食塩水100mlに対しバレックスモルト30mgとゼラチン2gを加えたものを同様に注入した。注入終了後、冷10%中性緩衝ホルマリン溶液にて1週間以上

全身を固定し、舌を切り出した。

全体を超軟X線にてmicroangiogramを作製し、続いて厚さ3mmの前額断切片とし、同じくmicroangiogramを作製した。フィルムは、Fuji softex film FG(富士写真フィルム社製)を使用し、撮影条件は焦点-フィルム間距離35cm、2次電圧20KVp、管電流50mA、露出時間4分とした。Microangiogram作製後は、通法にしたがいパラフィン切片とし、H.E.染色を施し、組織学的観察に供した。一部は、肥満細胞を観察するためにトルイジンブルーまたはアルシアンブルー染色を施して検鏡した。

3) 血管鋳型法

微細な三次元的血管構築を観察するため血管鋳型標本の走査型電子顕微鏡観察を行った。実験動物数はプロタミン投与群5匹、ヘパリン投与群3匹、生食投与群3匹を使用した。血管内注入材は、毛細血管注入鋳型用樹脂 Mercocox blue(大日本インキ化学工業社製)を使用し、注入は墨汁注入法に準じて行った。生食灌流後、Mercocox(主剤30ml、硬化剤0.75g)を注入した。注入は、可及的等圧で徐々に行った。注入終了後はまず室温に10~15分間静置し、つぎに60°Cの温水で10~15分間加温後、さらに口腔内が乾燥しないように注意しながら、室温に1時間放置した。その後、目的とする舌の部分を切り出し、レジンの小プレートに即時重合レジンで固定した。これを10%KOHに24時間以上浸漬し、さらに流水下で水洗後、周囲軟組織を腐蝕、除去した。血管鋳型以外の組織が除去されたのを確認した後に、凍結乾燥し、走査電子顕微鏡用アルミニウム製載台に付着し白金蒸着を施した。

観察には、走査型電子顕微鏡(Hitachi-S430)を用いた。加速電圧は、20KVとし、写真撮影にはKodak TRI-X Pan Filmを使用した。また、組織採取時に、腫瘍の診断と組織学的観察用に組織の一部を採取し、通法によりパラフィン切片とし、H.E.染色を施して検鏡した。

実験結果

1. 形成腫瘍

1) 肉眼的分類

形成されたすべての腫瘍の肉眼的分類を頭頸部癌取り扱い規約²⁶⁾に準じて行った結果、隆起型36匹、表層型5匹、潰瘍型4匹、混在型3匹で、隆起型が最も多かった (Fig. 2)。

2) 組織学的発育形式

血管鑄型標本11匹を除く37匹の腫瘍の組織学的分類は舌の扁平上皮癌が34匹、紡錘形細胞肉腫が1匹、多形細胞肉腫が1匹、乳頭腫が1匹であった。これらの肉腫と乳頭腫は、今回の検索の対象から除外した。舌扁平上皮癌の組織学的発育形式は、関川²⁷⁾の分類により、浸潤傾向を示さず外向性に発育するもの (外向性発育型) (Fig. 3 A-a)、内向性に浸潤発育するもの (内向性発育型) (Fig. 3 B-b)、および、その発育状況がさまざま、一方向のみの発育を示さないもの (混合性発育型) (Fig. 3 C-c) の3型に分類した。その結果、外向性発育型11匹 (32.4%)、内向性発育型10匹 (29.4%)、混合性発育型13匹 (38.2%) で混合性発育型が最も多かった。また、発生した癌を分化度別にみると、高分化型が18匹 (53.0%) と過半数を占め、次に中分化型が13匹 (38.2%) と続き、低分化型は3匹 (8.8%) と最も少なかった。分化度と発育形式との関連では、高分化型の癌は外向性と内向性に発育するものがほぼ同じ割合でみられ、中分化型の多くは混合性に発育し、低分化型は外向性と混合性に発育していた (Table 1, 2)

2. 腫瘍血管の観察

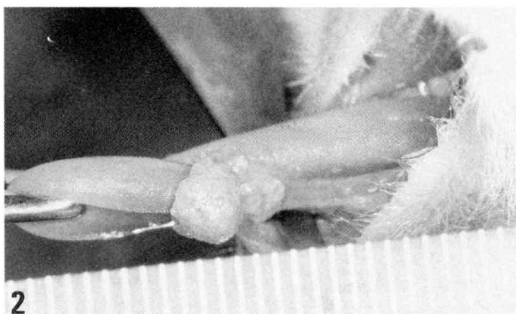


Fig. 2 An induced tumor appearing as a protruded growth in hamster tongue.

薬剤別、血管内法入材別実験数を Table 3 に示した。混合性発育を示す腫瘍を含め、腫瘍血管は腫瘍の外向性発育部と内向性発育部に分けて観察を行った。

1) Microangiography

腫瘍血管の全体像をみると、舌動脈の分枝とみられる比較的太い血管が、腫瘍の外向性発育部に向かって進入していた。末梢ではこれらの分枝が樹枝状、蛇行、拡張、あるいは造影剤の溢出によると思われる pooling などの像を呈していた (Fig. 4 a-b)。これらの所見はプロタミン群、ヘパリン群、生食群の3者に共通して観察されたが、とくにヘパリン群の外向性発育部には、多血管像を呈するものがあつた (Fig. 5)。一方、腫瘍内壊死部や癌巣相当部では、上記の分枝はみられないで造影欠損像を呈していた (Fig. 6)。

2) 墨汁注入標本と血管鑄型標本による三次元的観察 (SEM)

A) 外向性発育部

外向性に発育している癌の間質における血管像は通常、樹枝状、不規則網状、リング状またはドーム状に観察された (Fig. 7 a-b)。

イ) 樹枝状血管像

墨汁注入標本における樹枝状血管の直径は、正常乳頭直下のループに比べてはるかに太く 20-60 μm であつた。この血管像は、末端部では局限性に異常な拡張を示すことが多く、静脈瘤様を呈する部位もみられた。とくに隆起性病変の表面を被覆する上皮細胞直下には、籠状を呈する像が観察された。この部位の上皮細胞にはところどころで錯角化がみられ、とくに上皮の陥凹部は角化物で満たされ、壊死性物質を混じえた著明な炎症性細胞の浸潤がみられた。また、全体に上皮は薄くなり、一部で基底層の細胞は明るい胞体からなり、その配列は不規則であつた。上皮直下の結合組織は、やや浮腫性となつていた。この部における墨汁粒子の血管外漏出は、ヘパリン群で著明にみられ、次いで生食群に多く、プロタミン群ではきわめて少なかった (Fig. 8 A-c)。

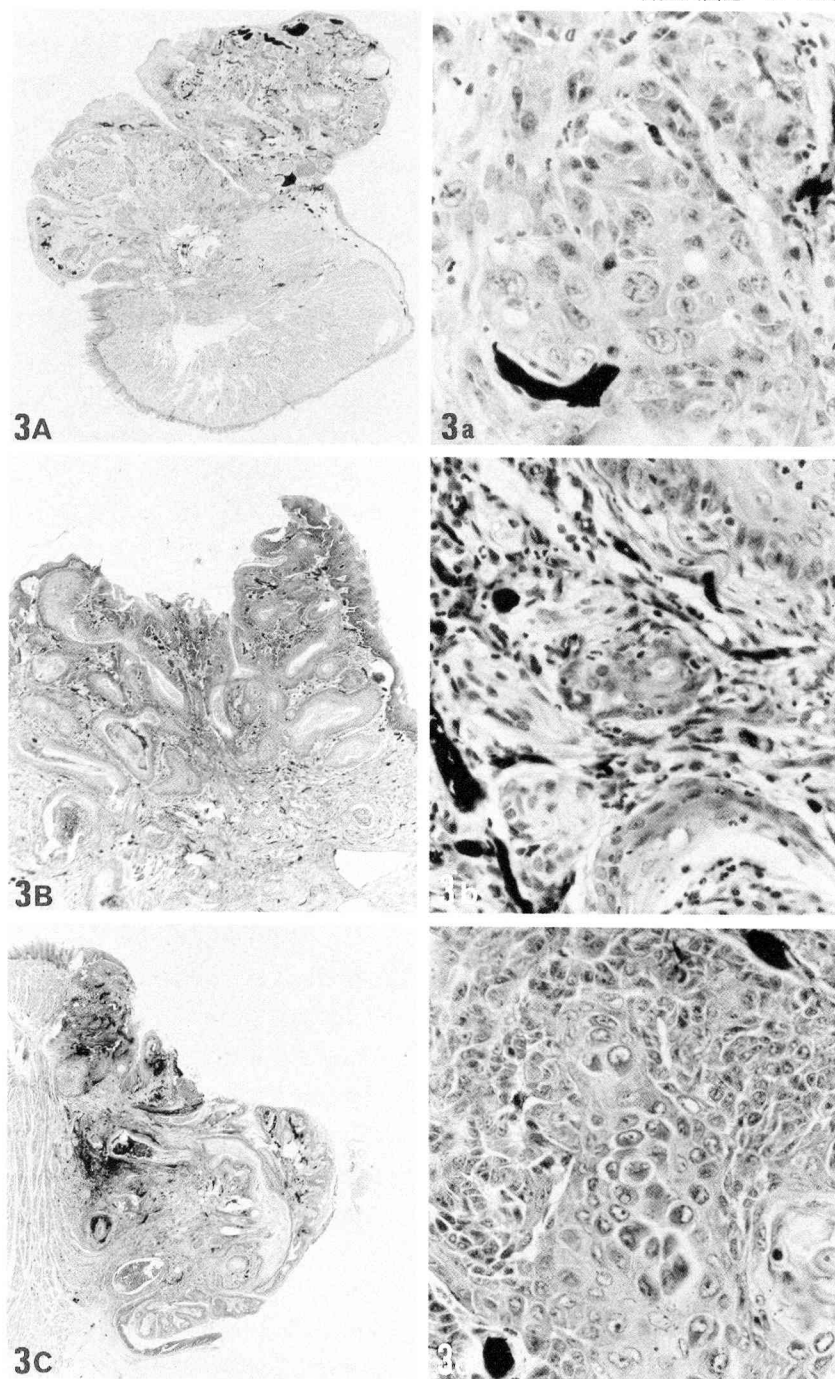


Fig. 3 Growth patterns in the squamous cell carcinomas of a tongue (H.E. stain).

A : exophytic pattern ($\times 13$). a : moderately differentiated type under higher magnification ($\times 87$).

B : endophytic pattern ($\times 33$). b : well-differentiated type under higher magnification ($\times 87$).

C : combined pattern ($\times 15$). c : moderately differentiated type under higher magnification ($\times 87$).

Table 1. Macroscopic and histological findings of squamous cell carcinomas of tongue.

Macroscopic findings		Histologic findings					
Types	No.	Differentiation			Growth patterns		
		well	moderate	poor	exophytic	endophytic	combined
Protruded	22	11	8	3	8	2	12
Superficial	5	3	2	0	1	4	0
Ulcerated	4	3	1	0	0	4	0
Mixed	3	1	2	0	2	0	1
Total (%)	34*	18 (53.0)	13 (38.2)	3 (8.8)	11 (32.4)	10 (29.4)	13 (38.2)

* Cases of experimented hamster except injection resin group.

Table 2. Growth patterns and histologic differentiation of squamous cell carcinoma of tongue.

Growth patterns	Differentiation			Total
	well	moderate	poor	
Exophytic	7	2	2	11
Endophytic	6	4	0	10
Combined	5	7	1	13
Total	18	13	3	34

Table 3. Number of experimental animals in medications and intravascular injection groups.

	Injection materials			Total
	India ink	BaSO ₄	Mercocox	
Protamine	11	3	5	19
Heparin	8 (3)	4	3	15 (3)
Saline	5	3	3	11
Total	24 (3)	10	11	45 (3)

() : Number of died hamsters during medication.

SEM像では、墨汁注入所見と同様に外向性発育部における被覆上皮直下の複雑なループは

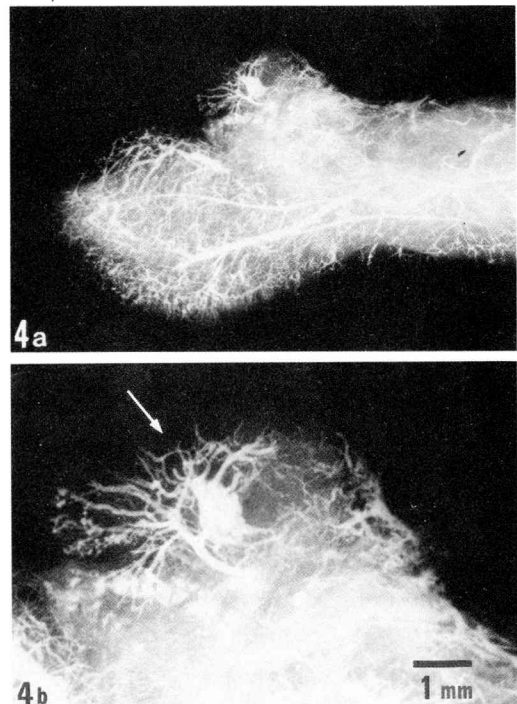


Fig. 4 Microangiogram of a saline-treated tumor. a : whole tongue. b : higher magnification of the tumor portion showing a branch-like vascular pattern and a pooling of contrast medium (arrow).

正常乳頭直下のそれに比べ、巨大で著しく拡張し、先端部は球状に膨隆し、静脈瘤様に見える部分も観察された。プロタミン群のこぶ状を呈



Fig. 5 Microangiogram of the heparin-treated tumor showing hypervascularity.

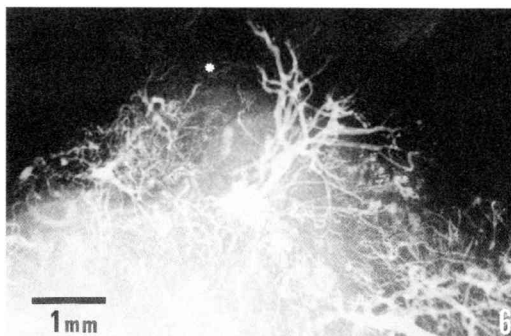


Fig. 6 Microangiogram of a saline-treated tumor. An avascular area showing a lack of contrast (*).

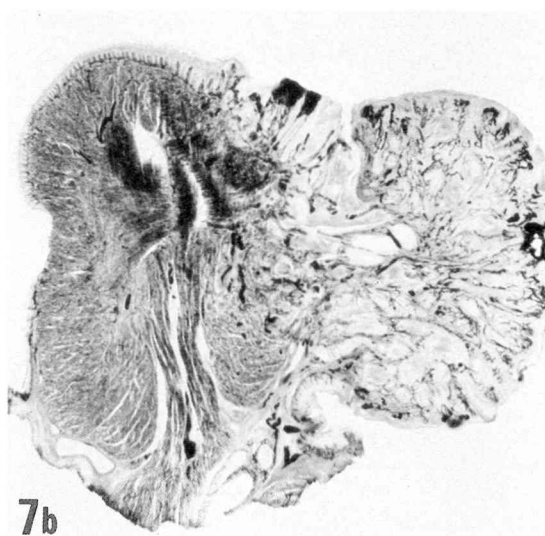
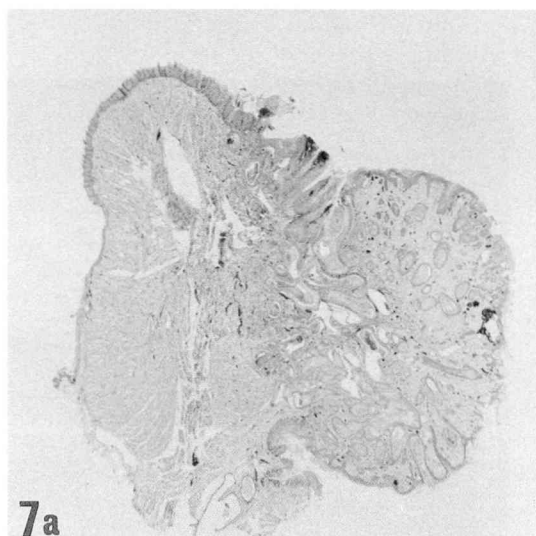


Fig. 7 Combined growth pattern of a tongue carcinoma: H.E. stain ($\times 14$). b: transparent preparation of India ink ($\times 14$).

するループは多数のくびれを有し、ヘパリン群の複雑に入り組んだ集団塊はカリフラワー様を呈していた (Fig. 9 a-d)。表層部の血管は、分岐と吻合を繰り返す、墨汁透明標本で観察されたと同様に複雑な循環経路を形成していた (Fig. 10a-b)。

ロ) 不規則網状血管像

この血管像は、墨汁注入標本では癌巣間のごく一部の小さな区域にのみみられた (Fig. 11a)。血管はその間質の豊富さに比較して少なく、角化傾向が少ない小胞巣に近接して位置していた。

SEM像でも、不規則網状血管は墨汁注入標本でみられたとほぼ同様の部位に存在し、不規則な網目様の構造を呈し、その走行も同じように緩やかなカーブを描く内径 $20\sim 30\mu\text{m}$ の血管の間を細い血管が、網目様につないでいた (Fig. 11b)。また、この部にみられる新生血管芽は角状、こぶ状、指状など種々の形状を呈し (Fig. 12a-c)、かつその表面に内皮細胞の核の圧痕を有するものや、あるいは互いに隣接した血管芽が吻合しつつある像などがみられた (Fig. 13a-b)。一方、ヘパリン群ではプロタミン群と生食群に比べ、毛細血管からのつぼみ

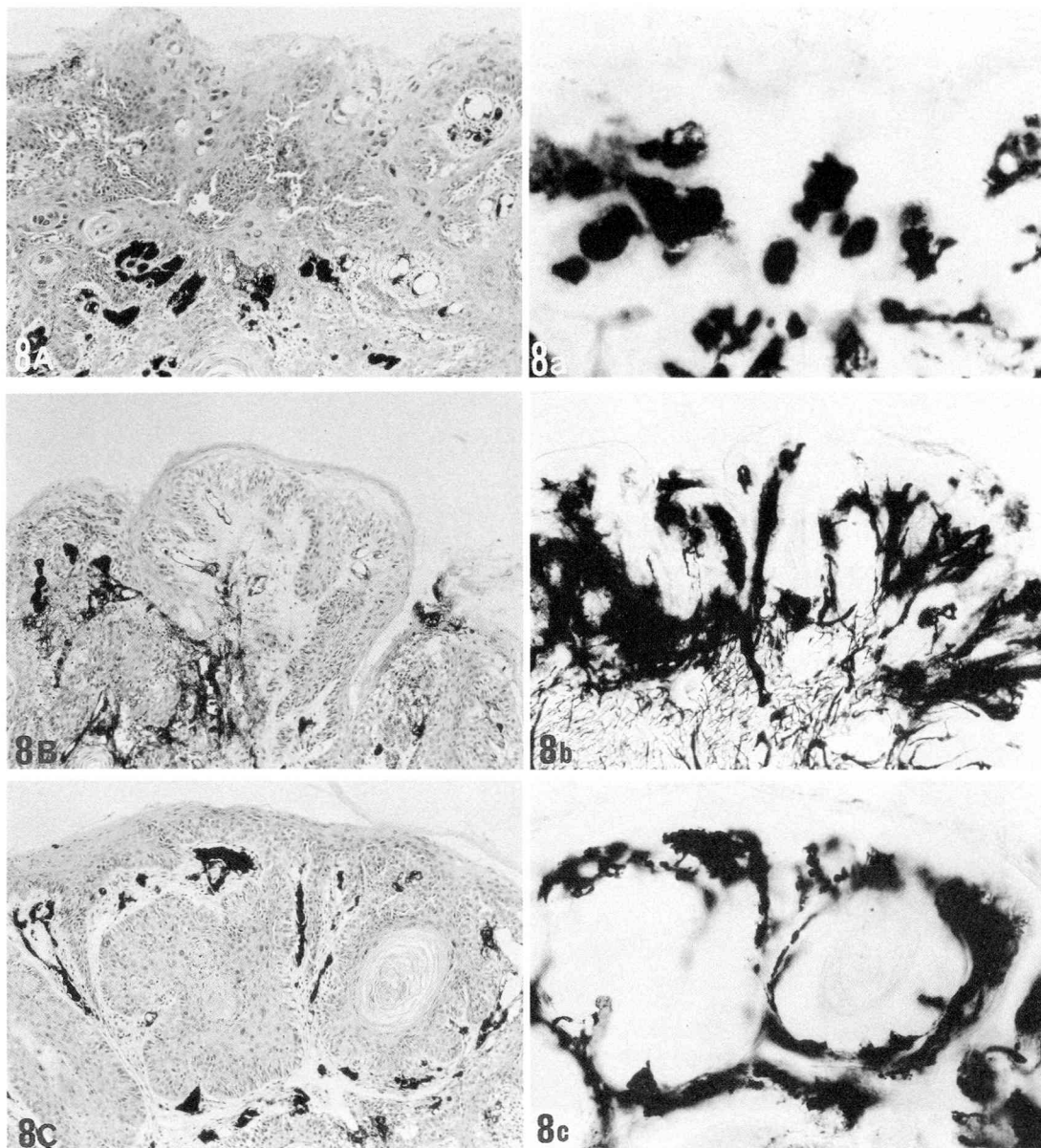


Fig. 8 Angioarchitecture and histological findings of the terminal portion of a branch-like vascular pattern ($\times 25$). A : H.E. stain. a : transparent preparation of India ink in a protamine-treated tumor. B : H.E. stain. b : transparent preparation of India ink showing extravasation of carbon particles in a heparin-treated tumor. C : H.E. stain. c : transparent preparation of India ink in a saline-treated tumor.

状を呈した出芽像が数多く観察された (Fig. 14)。

ハ) 癌巣周囲の血管像

墨汁注入標本では、癌巣周囲の血管は、数本ないし十数本からなり、その径は約15~50 μm とやや太く、ほぼリング状に配列していた。

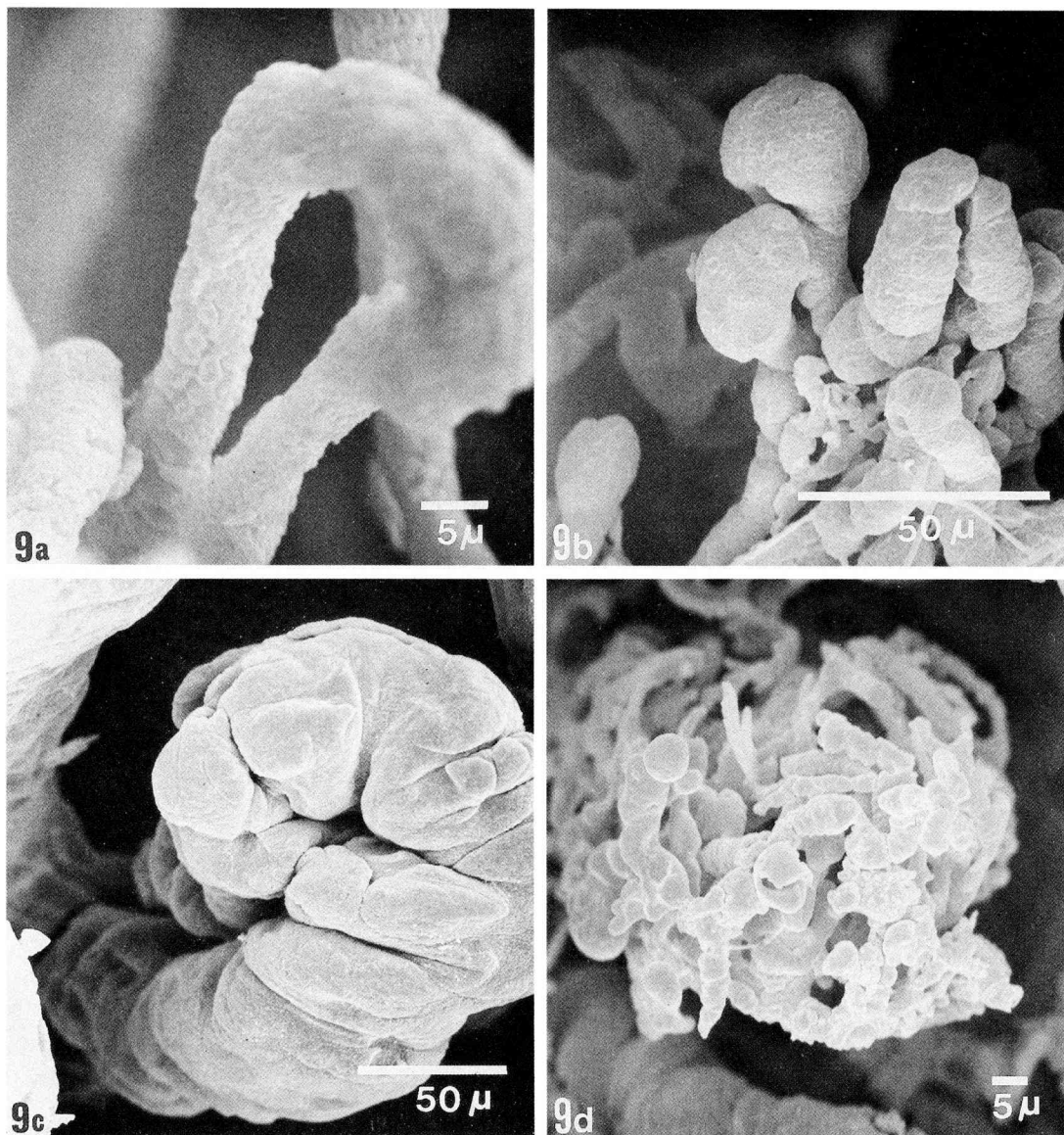


Fig. 9 Blood vessels in the superficial layer of a tumor (SEM).
 a : a varix-like loop in a heparin-treated tumor ($\times 700$).
 b : globular loops in the heparin-treated group ($\times 1600$).
 c : a huge loop with constrictions in the protamine-treated group ($\times 400$).
 d : many protrusions of dead end capillaries in the heparin-treated group ($\times 800$). of tumor in the heparin-treated group.

これらの血管の内側に数層の大小不整の核を有する viable な腫瘍細胞が比較的密に配列し、中心部には壊死または角化がみられ、癌真珠を形成しているものもあった。血管数はヘパリン

群と生食群に多く、これらの群では墨汁粒子の血管外への漏出が認められたのに対し、プロタミン群ではほとんど認められなかった (Fig.15 A-c)。

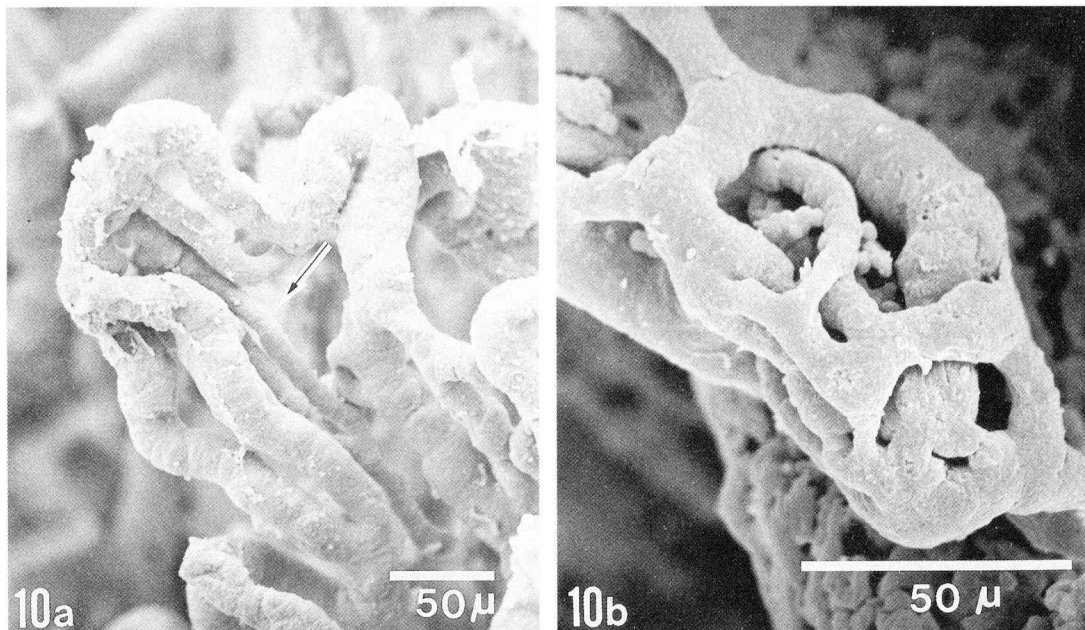


Fig.10 Blood vessels in the superficial layer of a tumor (SEM).
 a : complex loop showing an arterial limb (arrow) (×260).
 b : many anastomoses of the capillaries (×700).

SEM像では、癌胞巣を取り囲んでいたと思われる血管群は、ドーム状を呈していた。数本ないしは十数本の内径が15~50 μmのやや太い血管が軸となり、その内層および外層を毛細血管が二重に覆い、内層は細かい網目状を呈していた (Fig.16)。プロタミン群では、ヘパリン群と生食群に比べて軸となっている太い血管の数がやや少なく、また表面の毛細血管には走行中に多数のくびれがみられた。しかし、ヘパリン群と生食群ではその走行に規則性があり、くびれもなく、拡張像が認められた (Fig.17a-c)。

B) 内向性発育部

外向性発育部でみられた樹枝状血管像はみられず、不規則網状血管像と癌胞巣周囲の血管像のほかに、既存血管破壊像、被圧排血管像がみられた。

イ) 不規則網状血管像

不規則網状血管は、癌胞巣間や既存血管破壊像部のやや腫瘍よりのところのみみられ、内向性浸潤部の小胞巣に近接して存在し、不規則な網状を呈する血管として認められた。不規則

網状血管数は、プロタミン群と生食群に比べてヘパリン群に多い傾向がみられた。ヘパリン群では、この部での墨汁粒子の血管外漏出がプロタミン群と生食群に比べて多かった。

ロ) 癌胞巣周囲の血管像

墨汁注入標本では、内向性発育部における癌胞巣は、外向性発育部に比べて小さいものが多く、その血管構築は同様であったが、リング状形態の直径が小さかった。また、SEM像においても小さなドーム状の血管が多数集合している像が観察された (Fig.18a-c)。

ハ) 既存血管破壊像および被圧排血管像

墨汁注入所見では、既存血管破壊像部の血管は腫瘍浸潤による筋層血管網の破壊部分に一致してみられた。先端はやや拡張し、その部から数本の新生毛細血管が分枝していた (Fig.19a)。また、この破壊部ではヘパリン群と生食群において、墨汁粒子の漏出が多数認められたが、プロタミン群においてはほとんど認められなかった。一方、この血管破壊像部は、組織学的には腫瘍が多数の小胞巣を形成し、浸潤増殖してい

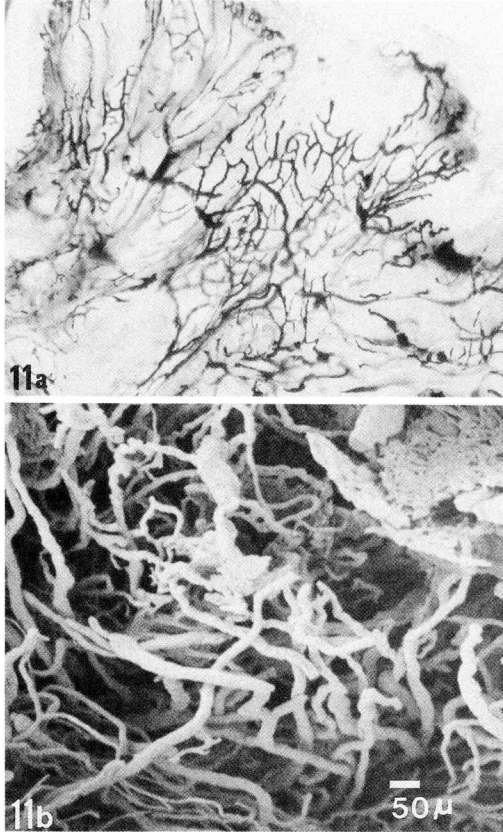


Fig.11 Irregular netlike vessels in the transparent preparation of India ink (a) ($\times 40$) and SEM (b) ($\times 80$).

る部位に一致し、筋束間の結合組織に腫瘍細胞が入りこむように浸潤していた。

筋層血管網は腫瘍細胞による破壊の程度が弱いときは腫瘍組織によって圧排され、柵状の被圧排血管像として認められた。その血管は拡張し、破壊されたと思われる断端では、墨汁粒子の血管外漏出がみられ、これはヘパリン群と生食群にやや多く、プロタミン群には少なかった (Fig.20a-b)。SEM像では、腫瘍と正常筋層との境界部と思われる部分に、墨汁注入所見とほぼ同様の既存血管破壊像と被圧排血管像が認められた (Fig.19b, 20c)。

C) その他

イ) 特異な血管像

腫瘍表層下のやや深部にアルファベットのA文字様で、ループ状を呈する巨大な血管像があり、その屈曲部には多数の小窩がみられた (Fig.21a-b)。

一方、腫瘍の深部や周辺部には、強い蛇行を示す細動脈や細静脈が認められた。これらと投与薬剤との関連性については明らかでなかった。

ロ) 肥満細胞

肥満細胞は腫瘍内部の間質中にはほとんど存在しないで、腫瘍と正常組織との境界部の血管に近接して比較的多く認められた。また、プロ

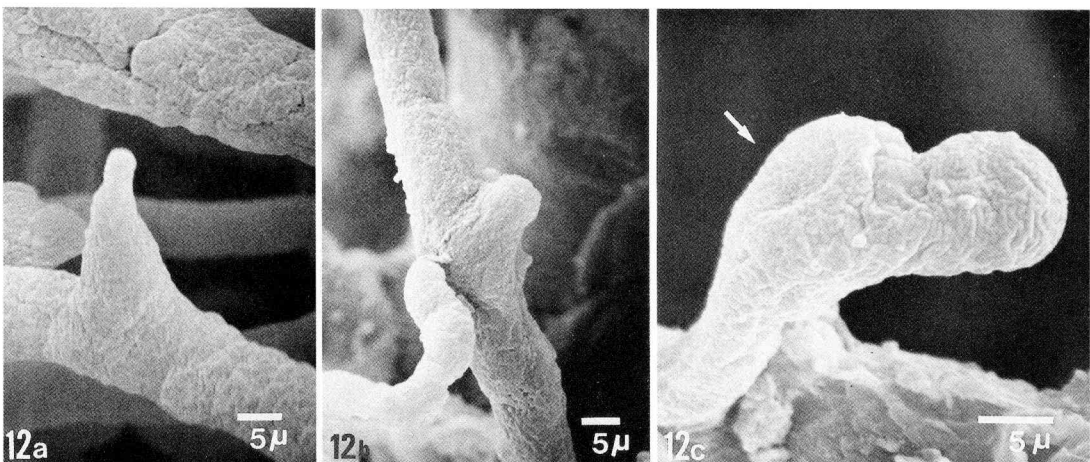


Fig.12 Variant capillary sprouts (SEM). a : A horn-like form ($\times 1000$). b : A bump-like form ($\times 900$). c : A thumb-like form with a imprint of endothelial cell nucleus (arrow) ($\times 1900$).

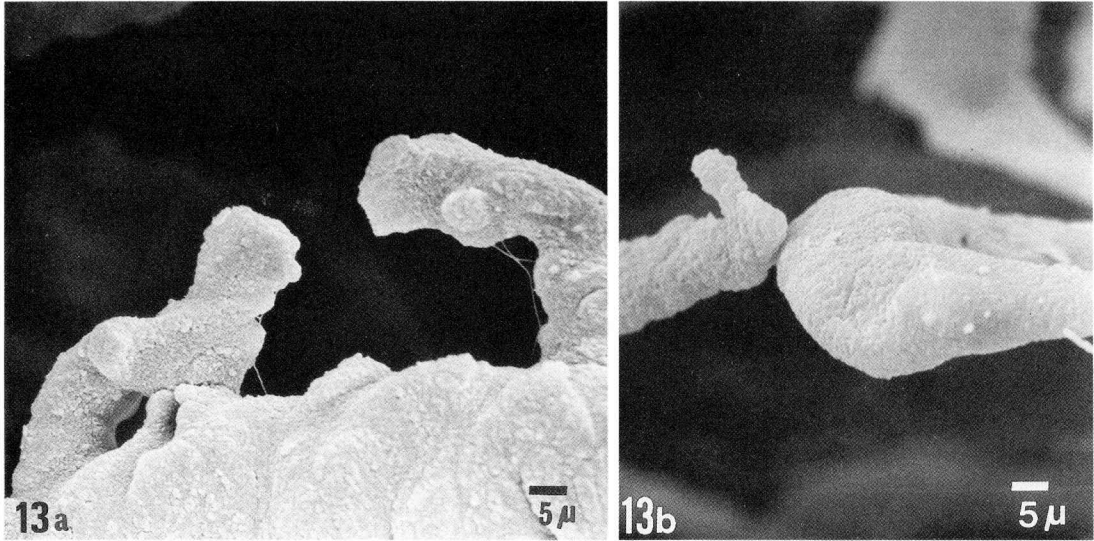


Fig.13 Process of capillary-anastomose (SEM).
 a : Pre-anastomose of capillaries ($\times 800$). b : Contact capillaries ($\times 800$).

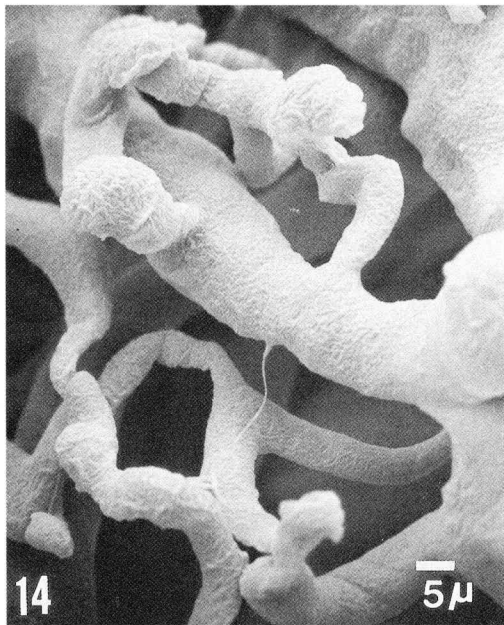


Fig.14 Bud-like capillary sprouts of irregular netlike vessels in the heparin-treated tumor ($\times 870$) (SEM).

タミン群, ヘパリン群および生食群の3群間における数の差異については明らかでなかった (Fig.22)。

3. 血管面積率

墨汁透明標本上の腫瘍全体に占める血管の面積の割合は, 腫瘍全体ではプロタミン群が18.4%, ヘパリン群が26.1%, 生食群が23.8%で, プロタミン群が低値を示していた。プロタミン群とヘパリン群の間には $p < 0.01$ で, またプロタミン群と生食群との間には $p < 0.05$ で有意差が認められた。しかしヘパリン群と生食群との間には有意差が認められなかった。

外向性発育部では, プロタミン群が19.5%, ヘパリン群が28.5%, 生食群が24.9%であった。プロタミン群とヘパリン群の間には有意差 ($p < 0.01$) が認められたが, プロタミン群と生食群, ヘパリン群と生食群の間には有意差が認められなかった。

内向性発育部では, プロタミン群が18.0%, ヘパリン群が32.4%, 生食群が24.2%であった。プロタミン群とヘパリン群の間には有意差 ($p < 0.01$) が認められたが, プロタミン群と生食群, ヘパリン群と生食群の間には有意差が認められなかった。また, プロタミン群, ヘパリン群および生食群のいずれにおいても外向性発育部と内向性発育部の間では, 有意差は認められなかった (Fig.23)。

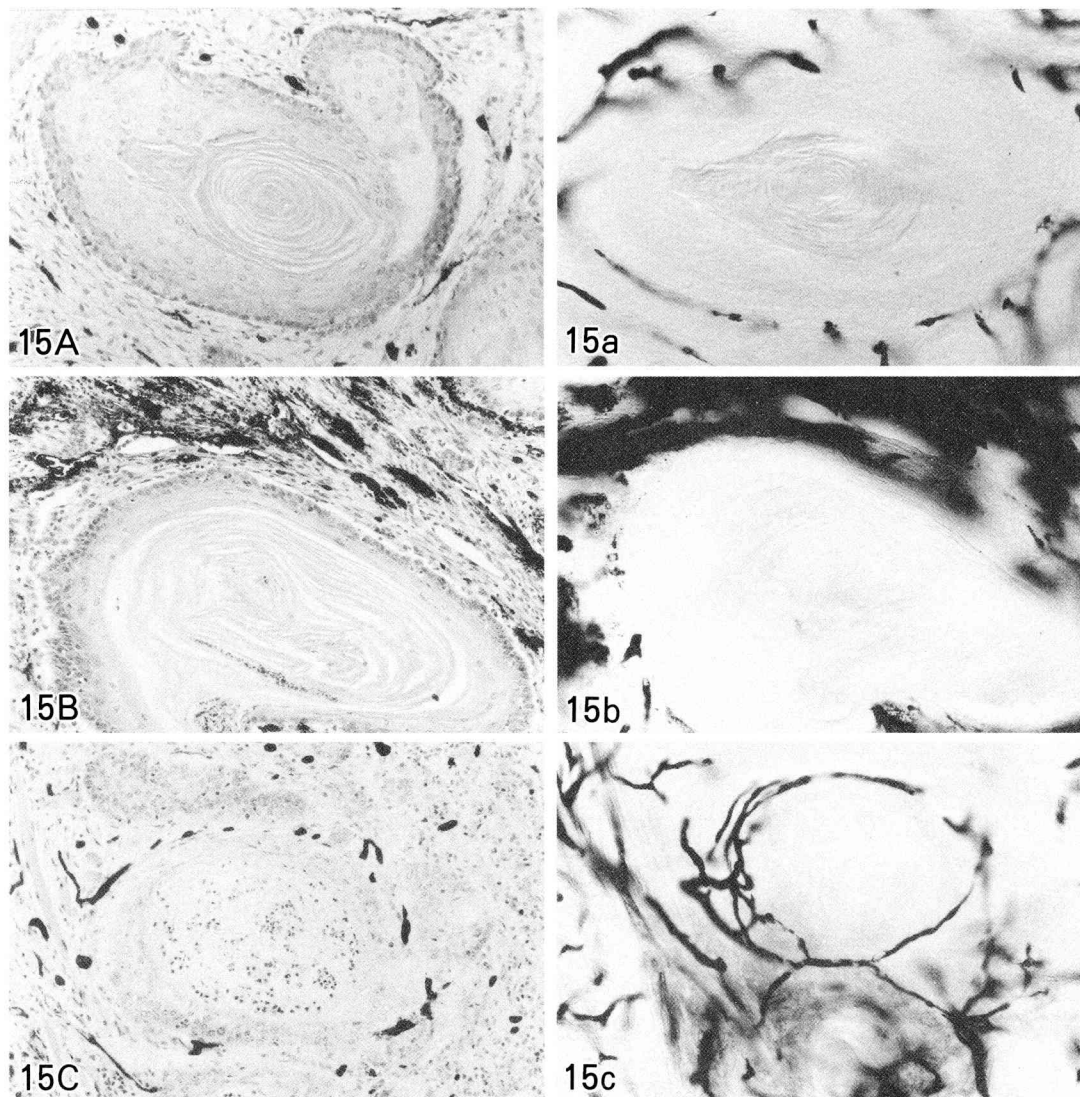


Fig.15 Vascular patterns surrounding a large carcinoma cell nest ($\times 30$). A : a protamine-treated tumor (H.E. stain). a : transparent preparation of India ink of Fig.A. B : a heparin-treated tumor (H.E.stain). b : extravasation observed in the transparent preparation of India ink of Fig.B. C : a saline-treated tumor (H.E. stain). c : ring-like vascular pattern observed in the transparent preparation of India ink of Fig.C.

考 察

1. 形成腫瘍について

DMBA誘発舌癌は、乳頭腫を基盤として癌化するものも多い^{28, 30)}のに対し、上皮内癌から微浸潤癌を経て扁平上皮癌へと増殖、発育するも

のは、きわめて少ないとされている²⁸⁾。このような傾向は、本実験においてもみられ、肉眼的に隆起型および混在型の扁平上皮癌であったものは発癌の様相から類推すると、乳頭腫から癌化したものと思われる。扁平上皮癌の発生は高率で、かつ肉眼形態分類では、隆起型が最も多

かった。また、組織学的分化度は高分化型が過半数を占め、次いで中分化型が続き、低分化型がきわめて少ないなど諸家の報告^{28, 29)}とほぼ同様の傾向を示していた。

一方、紡錘形細胞肉腫と多形細胞肉腫の2例は、藤田ら²⁹⁾の報告にみられる線維肉腫に該当

するが、これらはDMBAとクレンザーの擦過による影響が、上皮直下の間質にまで及んだときに発生するものと考えられた。また、今回は肉腫を除外しているの、その組織の発生由来については触れなかった。

最近は、間質に対する発癌剤や、炎症性変化の影響を可及的に少なくするためにDMBAの単純塗布^{25, 30)}や4NQOの経口投与による発癌実験が行われる傾向にある²⁷⁾。しかしながら、同一部位への発癌にはきわめて困難さを伴うことから、本実験では臨床上也最も多い舌側縁の高分化型扁平上皮癌³¹⁾を高率に形成し得る本法を用いた。

2. 腫瘍血管の新生と構築について

腫瘍細胞の分裂と増殖が旺盛な部位では、血管新生が活発であるといわれている²⁷⁾。本実験の外向性発育部における被覆上皮直下にみられる結合組織内の樹枝状血管末端部、あるいは不規則網状血管のSEM像では、新生血管芽と做される膨隆が盲端状に多数出芽し、これが隣接する他の血管芽と接触、吻合してループ状に新生血管を形成しつつある像が観察された。一方、同一腫瘍においては不規則網状血管の観察される腫瘍浸潤部の先端に、異型性の強い癌細胞が多く認められた。これらの所見から、腫瘍細胞

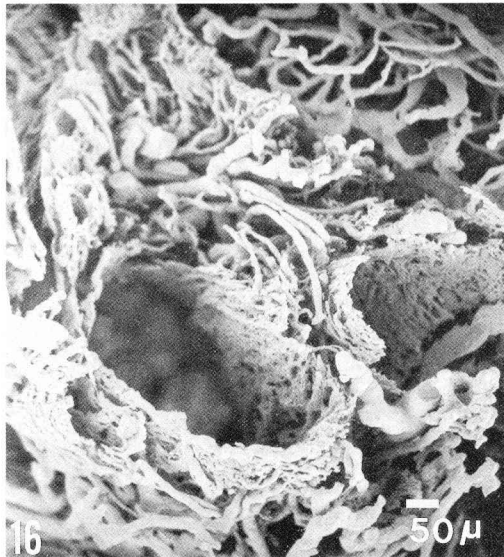


Fig.16 A cylindrical vascular pattern consisting of 3 vessel layers surrounding a large carcinoma cell nest ($\times 165$) (SEM).

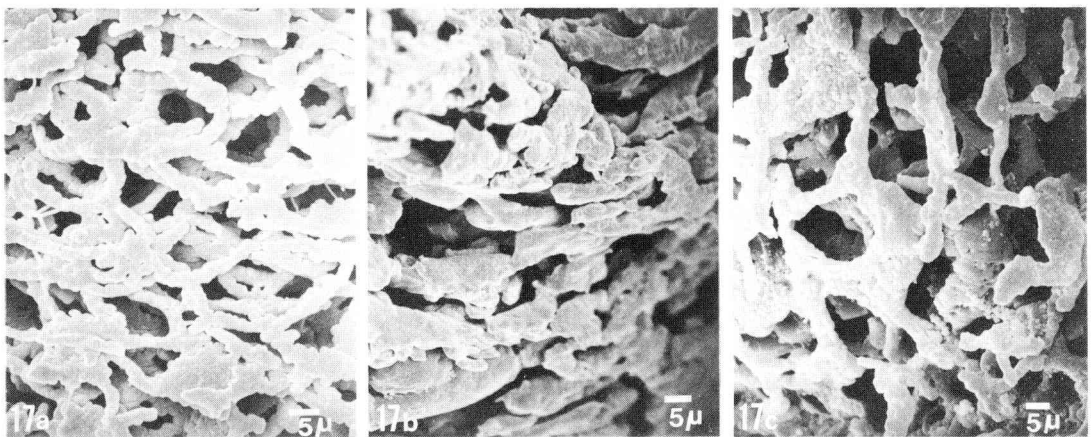


Fig.17 Outer surface of the cylindrical vessels (SEM). a : many constricted capillaries can be observed in the protamine-treated group ($\times 710$). b : dense capillaries in the heparin-treated group ($\times 600$). c : dilated capillaries in the saline-treated group ($\times 600$).

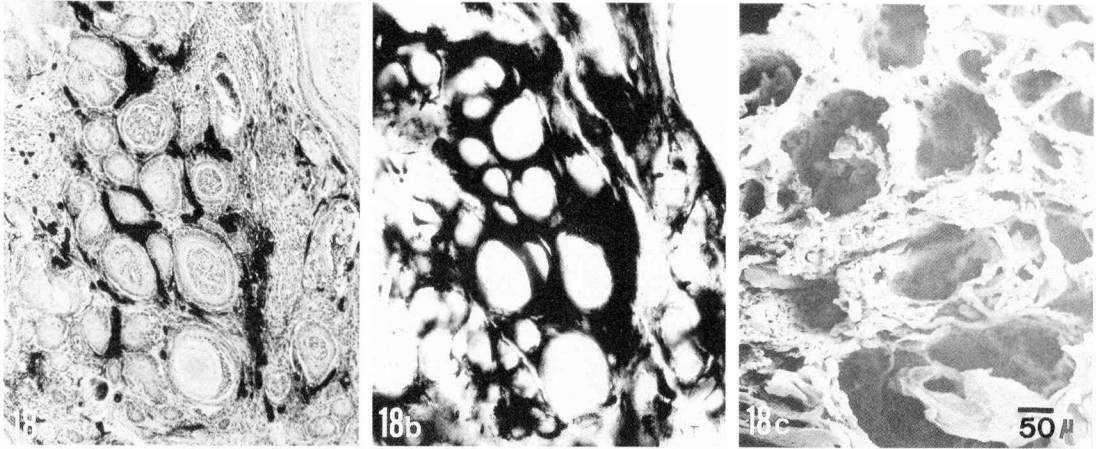


Fig.18 A vascular pattern surrounding many small carcinoma cell nests at the endohypic growth portion. a : H.E. (×16). b : transparent preparation of India ink of Fig. a (×16). c : SEM (×86).

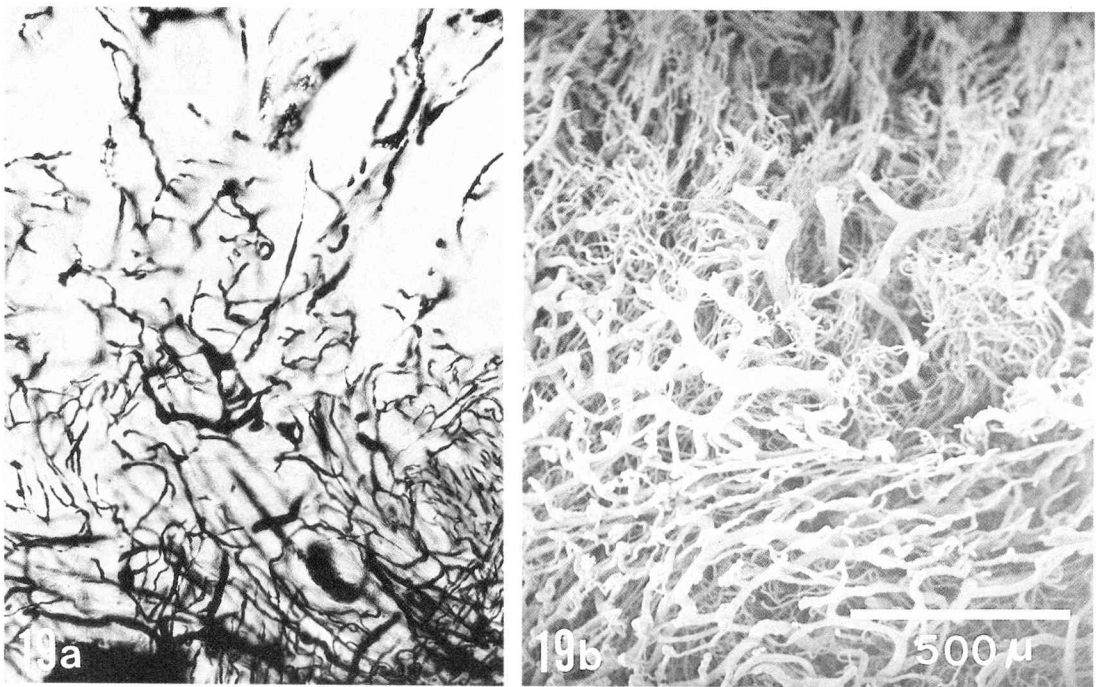


Fig.19 a : Vascular destruction in a transparent preparation of India ink (×23). b : vascular expansion and truncation (SEM) (×56).

と血管新生が深く関与していると考えられる。また、Gabbert ら³²⁾は腫瘍細胞の分裂が血管から $80\mu\text{m}$ 以内の範囲にみられると述べていることは興味深い。腫瘍の血管新生と肥満細胞との関連については、移植腫瘍を用いた実験で報告

されている¹²⁾。本実験の腫瘍間質には肥満細胞がきわめて少なく、境界部に多いことから、腫瘍内部とその境界部では肥満細胞の機能が異なることが示唆される。また、肥満細胞は宿主の免疫反応にも関係するといわれているが³³⁾、肥

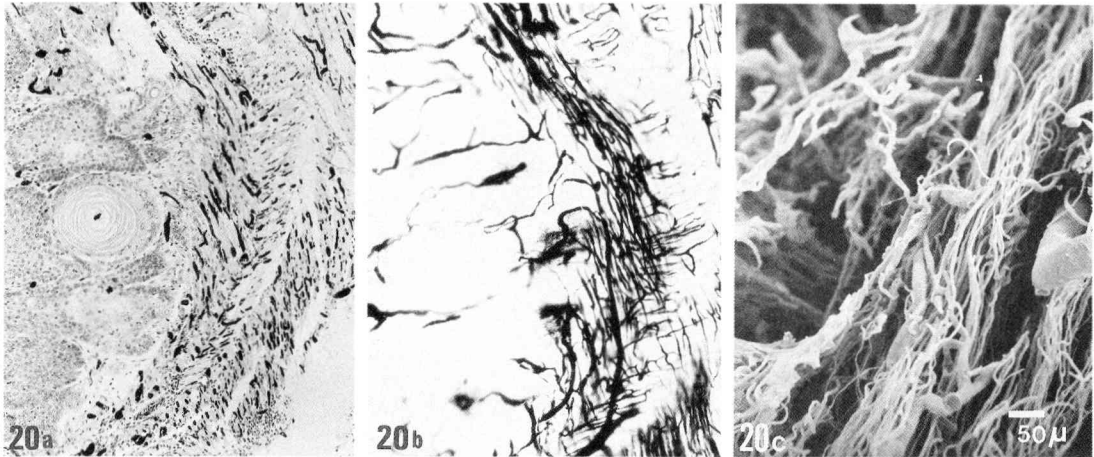


Fig.20 Vascular displacement. a : H.E. stain (×16). b : transparent preparation of India ink (×16). c : SEM (×82).

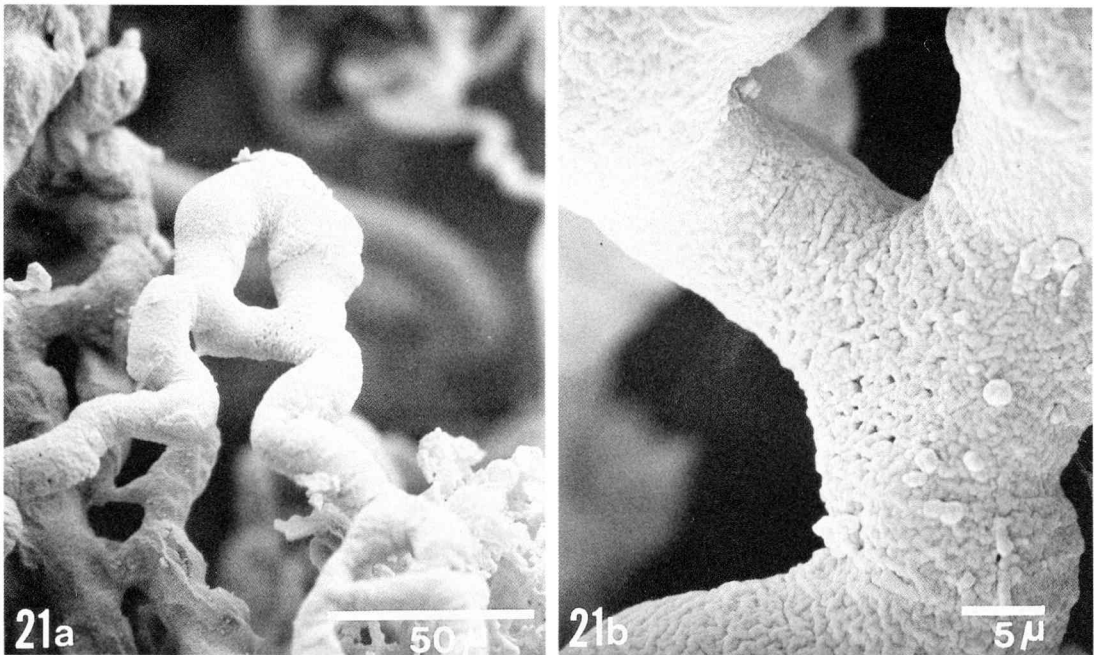


Fig.21 Malformation of a tumor vessel (SEM).
a : A huge loop (×550) . b : Many small pits at an elbow-shaped bend (×2100).

満細胞の機能についてはいまだ不明である。本実験ではプロタミン群，ヘパリン群および生食群の3群間における肥満細胞の分布および数についての差異は明らかでなかった。一方，吉田らは³⁰⁾肉腫の固有間質と周囲組織由来の偶然間質とは明らかに異なった性質を有すると述べて

いることから，肥満細胞の果たす役割が，腫瘍の固有間質と偶然間質では異なり，その分布にも差異があったものと思われる。

Hudlická³⁵⁾は，血管新生には血流増加が重要な促進因子であると述べている。本実験のプロタミン投与群でも，舌深動脈付近まで浸潤し

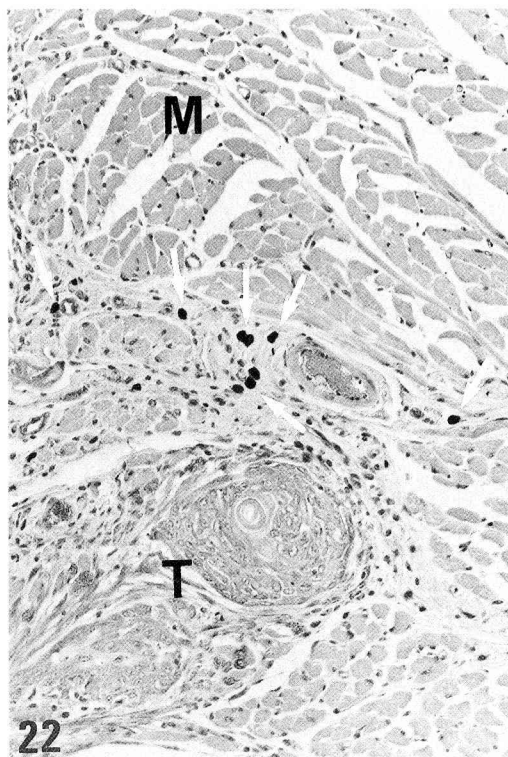


Fig.22 Distribution of mast cells (arrows) at the border area between muscle tissue (M) and the tumor tissue (T) ($\times 42$, toluidine blue stain).

た混合性発育型腫瘍の血管面積率は、29.0%と高値を示していた。このことは、腫瘍の血管新生に際しては、宿主から局所腫瘍への血流の増大が大きく関与することを示唆している。

腫瘍の外向性発育部では、表層部の血管像が樹枝状、ループ状、あるいはアーケード状を呈するのに対し、癌巣周囲では円形のネット状やリング状に観察された。しかし、立体的にはその直径が15~50 μm の比較的太い血管を中心にその内外を毛細血管が網状に走行する三層構造のドーム状を呈し、腫瘍細胞を取り囲んでいた。このように腫瘍細胞に近接しているこれら血管層は、物質交換の盛んな部分と考えられた。この三層構造をなすドーム状血管は、SEM像において詳細に観察することができた。

一方、A文字状を呈する巨大な腫瘍血管にはその屈曲部に限局して、多数の小窩が観察され

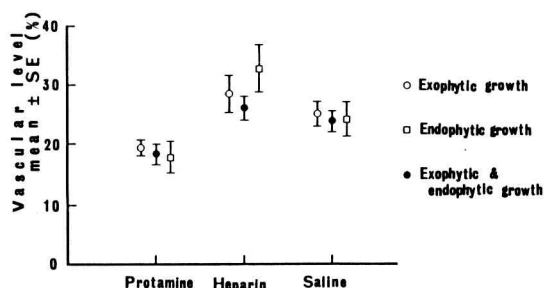


Fig.23 Vascular levels of the tumors in the treated groups.

るものもあった。これは透過電顕でみられる血管内皮細胞のluminal projectionに対応するものと思われる²⁵⁾。このような血管は血流が緩徐となり、物質透過が活発に行われる部分であると考えられている³⁶⁾。一方、内向性発育部では小癌巣周囲の血管と既存血管破壊像がその主体をなし、外向性発育部に見られる樹枝状血管像はみられなかった。

3. プロタミンとヘパリンの腫瘍血管構築への影響について

Majewskiら²¹⁾によれば、ヘパリンは血管内皮細胞の脂質代謝を促進し、またShing³⁷⁾らはT.A.F.とヘパリンの複合体が、血管内皮細胞の表面に付着し、血管新生を促進すると述べている。

一方、プロタミンはヘパリンの中和剤であることから、T.A.F.とヘパリンの複合体が内皮細胞へ付着するのを阻害する結果、血管新生に対しては逆に抑制的に作用するものと思われた。本実験では、プロタミン群はヘパリン群と生食群に比べ新生血管芽が少ない傾向にあり、また血管面積率においても低値を示したことから、プロタミンが血管新生を抑制していると思われた。また、樹枝状血管にくびれの多いループや、癌巣周囲におけるドーム状血管の表面に多数のくびれが認められたことなどから、プロタミンが内皮細胞の伸縮性に対して、抑制的に働いていることが窺われた。プロタミン群では癌巣周囲の血管と樹枝状血管に墨汁粒子の血管外漏出が少なかった。Ackerman³⁸⁾によれば、新生腫瘍血管は透過性が亢進していると述べてい

る。このことについて、秦ら^{38, 40)}は新生腫瘍血管において血管の内皮細胞間隙からも透過性を認めている。

一方、ヘパリン投与群の墨汁注入標本では、明らかに墨汁粒子の血管外への漏出が多く、血管透過性が異常に亢進している像が観察された。これはヘパリンの血管透過性亢進作用⁴¹⁾の結果によるものと思われる。本実験におけるヘパリン群の microangiography では、多血管像を呈し、また墨汁注入標本では癌胞巣周囲に血管数が多く、かつ血管密度が増加し、さらにSEM像では血管芽が多数認められるなど、腫瘍の血管新生を促進していることを裏付ける所見が多かった。しかし、画像解析装置を用いた血管面積率の計測結果では、ヘパリン群が生食群に比較して、有意差はみられなかった。

一方、ヘパリンは毛細血管内皮細胞の遊走ならびに増殖を促進する。Folkman は⁴²⁾ある種のステロイドの存在下では、血管新生に対し阻害作用を示すことがあると述べているが、その作用機序については現在まだ明確にされていない。

癌の間質量と血管密度とは互いに相関性があり²⁵⁾、また腫瘍血管は腫瘍細胞に近接して多数存在することもある⁴³⁾が、腫瘍の増殖に際しては血管が環境を提供するだけである³²⁾、などの報告がみられる。本実験のプロタミン群では、間質の豊富な部位においても血管密度が低く、逆にヘパリン群では間質が少なくとも血管密度が高いなどの傾向がみられ、これら薬剤の腫瘍間質内における血管新生に対する影響が窺われた。

4. 血管面積率について

腫瘍内に占める血管の割合を定量的に解析するために血管面積率を計測した。腫瘍自体の血管密度が高い場合は、血管面積率も高値を示す⁴⁴⁾。これに対し、癌真珠の占める割合が多いものや、中心部に壊死巣が存在するものでは、血管面積率が低値を示す²⁴⁾。本実験に使用した舌扁平上皮癌は、中心壊死部のとくに大きいものがなかったため、血管面積率への影響は少な

かった。

5. 腫瘍血管と臨床との関連について

腫瘍血管は癌化学療法における抗癌剤の病巣部への到達性の上からきわめて重要である。腫瘍血管の機能的ならびに形態的な特殊性については、その血流の自動調節能の欠如^{5~7)}および透過性の亢進^{38~40)}、あるいは異常走行やその幼稚形態などが知られている。本実験でも外向性発育部の上皮直下に存在する樹枝状血管や癌胞巣周囲を取り囲むドーム状血管像は、癌胞巣に近接して豊富な血管が分布しているため、治療効果を上げることが期待できるものと考えられた。しかし、豊富な血管も腫瘍が増殖すると壊死し、臨床において癌進展症例の治療効果が必ずしも十分でない場合が多いことと一致するものと思われる。腫瘍血管は腫瘍細胞に酸素およびグルコースなどの栄養源を運搬する経路として重要である^{45, 46)}。最近注目されている温熱化学療法や放射線療法における高酸素療法も、腫瘍内の微小循環を利用するものである。そのためにも腫瘍の血管構築を把握することは、その微小循環を理解する上で重要であると考えられる。そこで、Folkman らが提示した新しい抗腫瘍療法⁹⁾は、血管新生を阻害し間接的に腫瘍発育に対する抑制効果を期待するものであった。現在でも腫瘍の血管新生を阻害する物質が次々に発見されており^{47, 48)}、今後の研究成果が期待されている。

結 論

ゴールデンハムスター誘発舌腫瘍に対して、プロタミンおよびヘパリンを投与して、腫瘍内の血管構築の変化について検討し、以下の結論を得た。

1. DMBA誘発舌扁平上皮癌は高率に発生し、肉眼的には隆起型が、また組織学的には混合性発育を示すものが多く、かつ高分化型が過半数を占めていた。
2. 墨汁注入所見では、プロタミン投与によって腫瘍血管での墨汁粒子の漏出が抑制されたが、逆にヘパリン投与によってその墨汁粒子

- の漏出が増加していた。
3. 走査電顕的観察では、角状、こぶ状および指状を呈する新生血管芽数がプロタミン群では減少し、ヘパリン群では逆に増加する傾向にあった。
 4. 樹枝状血管では、プロタミン群にくびれを有するループが認められたが、既存血管破壊像部では、3群間の所見に著明な差異は認められなかった。
 5. 癌巣周囲を取り囲むと考えられる血管群は、走査電顕的観察によるとドーム状を呈し、かつ三層構造をなして、表層の毛細血管にプロタミン群では多数のくびれが認められた。
 6. 肥満細胞は腫瘍組織間質にはほとんど認められず、腫瘍と正常筋組織との境界結合組織中に認められた。しかし、プロタミン群、ヘパリン群および生食群の3群間における数の差異は明らかでなかった。
 7. 画像解析による血管面積率は、プロタミン群がヘパリン群および生食群に比較して有意に低値を示していた。しかし、ヘパリン群は生食群に比較して高値を示したが、有意差が

認められなかった。

8. ゴールデンハムスターDMBA誘発舌癌の血管新生に対し、プロタミンは抑制的に、またヘパリンは促進的に作用することが示唆された。

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導、御校閲を賜った、岩手医科大学歯学部口腔外科学第一講座 藤岡幸雄教授、ならびに同口腔解剖学第一講座 野坂洋一郎教授に深甚なる謝意を表します。

さらに、御鞭撻と御示唆を賜りました本学口腔病理学講座 鈴木鍾美教授、また御教示、御助言を頂いた佐藤方信助教授に厚く謝意を表します。

また、終始御指導、御鞭撻を頂いた本学口腔外科学第一講座 工藤啓吾助教授に心から謝意を表します。また、御協力下さいました教員各位に感謝いたします。

なお、本論文の要旨の一部は、第28回歯科基礎医学会総会（1986年9月15日、東京）において口演、発表した。

Abstract : The effects of protamine and heparin on tumor angiogenesis and angioarchitecture were investigated. Following production of DMBA-induced tumor in golden hamster tongues, protamine, heparin, saline in ratio of 60mg/kg/day were administered subcutaneously 12 times over 2 weeks. Vascular pictures through intravascular injection of BaSO₄ solution, India ink, and injection resin were observed by means of angiography, microscopy and SEM. There were macroscopically many protruded tumors and histologically squamous cell carcinomas. They were characterized by combined and well-differentiated growth types. In the protamine group extravasation of carbon particles from the tumor vessel walls were slight, but was much more frequent in the heparin group. The vascular level was significantly lower in the protamine than in both the heparin and saline groups. Hypervascularity of the tumor was observed by means of microangiography in the heparin group, but not in the protamine and saline groups. Newly formed vascular buds were infrequent in the protamine group, but more frequent in the heparin group.

The angioarchitecture around the carcinoma cell nests looked like a cylinder composed of 3 vascular layers. Numerous constrictions of the capillaries on the outer surface of the cylinder were apparent in the protamine group. Mast cells were not observed in the tumor sites of all 3 groups, but near by vessels surrounding the tumor. Thus, it is suggested that tumor angiogenesis was inhibited by protamine and promoted by heparin.

文 献

- 1) 竹田千里, 鷺津邦雄 : 舌がん, 癌の臨床, 20 : 301—310, 1974.
- 2) 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.
- 3) 工藤啓吾, 瀬川 清, 入江雅之, 久慈昭慶, 福田喜安, 山口一成, 宮沢政義, 藤岡幸雄 : 舌癌4例に対するRa針組織内照射後の再発と潰瘍, 壊死の処置に関する検討, 日口外誌, 32 : 423—428, 1986.
- 4) Denekamp, J. : Vascular endothelium as the vulnerable element in tumours. *Acta. Radiol. Oncol.* 23 : 217—225, 1984.
- 5) 鈴木磨郎, 堀 勝義, 阿部郁夫, 斎藤祥子, 佐藤春郎 : 腫瘍血管の機能的特殊性, 癌と化療, 6 suppl. II : 287—291, 1979.
- 6) 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.
- 7) 田中健蔵, 福本純雄 : 腫瘍血管の特性とその癌治療における意義, 癌と化療, 10 : 1564—1568, 1983.
- 8) 松山正春 : 実験動物腫瘍の微細血管構築とその形態計測に関する研究, 岡山医学会誌, 90 : 697—716, 1978.
- 9) Folkman, J. : Anti-angiogenesis : New concept for therapy of solid tumors. *Ann. Surg.* 175 : 409—416, 1972.
- 10) Taylor, S. and Folkman, J. : Protamine is an inhibitor of angiogenesis. *Nature.* 297 : 307—312, 1982.
- 11) Roche, W.R. : Mast cell and tumor angiogenesis : The tumor-mediated release of an endothelial growth factor from mast cell. *Int. J. Cancer.* 36 : 721—728, 1983.
- 12) Fraser, R.A. and Simpson, J.G. : Role of mast cells in experimental tumour angiogenesis. Development of the vascular system. Pitman Books, London (Ciba Foundation symposium 100) : pp 120—131, 1983.
- 13) 梶川欽一郎 : 肥満細胞, 梶川欽一郎監修 : 結合組織, 第1版, 金原出版, 東京, 103—115ページ, 1984.
- 14) Folkman, J., Taylor, S. and Spillberg, C. : The role of heparin in angiogenesis. Development of the vascular system. Pitman Books, London (Ciba Foundation symposium 100) : pp 132—149, 1983.
- 15) 宮園浩平, 岡部哲郎, 石橋 俊, 浦部晶夫, 高久史磨 : 血管内皮細胞増殖に対するヘパリンの影響, 血液と脈管, 16 : 508—513, 1985.
- 16) 松田 保 : ヘパリン, 血液と脈管, 12 : 1—12, 1981.
- 17) Carr, J. : The anti-inflammatory action of heparin : Heparin as an antagonist to histamine, bradykinin and prostaglandin E₁. *Thromb. Res.* 16 : 507—516, 1979.
- 18) 日本組織培養学会編 : Tumor angiogenesis factor (TAF, 腫瘍血管新生因子) : 細胞成長因子, Growth factors. 第1版, 朝倉書店, 東京, 105—108ページ, 1984.
- 19) 榎橋民生, 後藤 宏 : プロタミン (硫酸プロタミン), 麻酔科医のためのくすり, 第1版, 真興交医書出版部, 東京, 156—158ページ, 1985.
- 20) Heuster, L.S., Taylor, S.H. and Folkman, J. : Prevention of carcinomatosis and bloody malignant ascites in the rat by inhibitor of angiogenesis. *J. Surg. Res.* 36 : 244—250, 1984.
- 21) Majewski, S., Kaminski, M.J., Sumurlo, A., Kaminska, G. and Malejczyk, J. : Inhibition of tumour-induced angiogenesis by systemically administered protamine sulphate. *Int. J. Cancer* 33 : 831—833, 1984.
- 22) Dachi, S.F. : Experimental production of carcinomas of the hamster tongue. *J. Dental. Res.* 46 : 1480, 1967.
- 23) 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.
- 24) 小林光通 : DMBA 誘発ハムスター舌癌に対する放射線効果の研究, 歯学, 68 : 700—733, 1980.
- 25) 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.
- 26) 日本頭頸部腫瘍学会編 : 臨床・病理, 頭頸部癌取り扱い規約, 金原出版, 東京, 15—24ページ, 1982.
- 27) 関川一嘉 : 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) 誘発ラット舌癌の微細血管構築に関する研究, 歯科学報, 83 : 1099—1135, 1983.
- 28) 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2編 舌癌形成過程の組織学的研究, 口科誌, 22 : 64—75, 1973.
- 29) 藤田浄秀, 賀来 亨, 小田島哲世, 佐々木元賢 : 舌癌の実験的形成に関する研究, 第10編 舌側縁前1/3部における舌癌形成過程の組織学的研究, 日口外誌, 21 : 250—258, 1975.
- 30) 藤田浄秀, 賀来 亨, 小田島哲世, 早津良和, 鈴木明人, 玄番涼一, 佐々木元賢 : 舌癌の実験的形成に関する研究, 第11編 舌側縁中1/3部における発癌剤の単純塗布による舌癌形成過程の組織学的研究, 日口外誌, 22 : 259—268, 1976.
- 31) 佐藤方信, 佐島三重子, 島山節子, 鈴木鍾美 : 加齢と舌癌に関する病理学的検討, 口科誌, 33 : 237—243, 1984.
- 32) Gabbert, H., Wagner, R. and Höhn, P. : The relation between tumor cell prolifera-

- tion and vascularization in differentiated and undifferentiated colon carcinomas in the rat. *Virchows arch (Cell Pathol)*. 41 : 119-131, 1982.
- 33) 北村幸彦 : 肥満細胞の分布と機能, 日医新報, 3251 : 137, 1986.
- 34) 吉田富三, 島内琢磨, 鶴崎 宏, 佐々木仁一 : 肉腫の間質について, 病理誌, 3 : 122-130, 1944.
- 35) Hudlická, O. : Growth of capillaries in skeletal and cardiac muscle. *Cir. Res.* 50 : 451-461, 1982.
- 36) Fujimura, A., Itoh, I. and Nozaka, Y. : Morphometric analysis of the capillary loop endothelium underlying sulcular epithelium. *The Bull. Tokyo dental Coll.* 28, 1987. (in press)
- 37) Shing, Y., Folkman, J., Sullivan, R., Butterfield, C., Murray, J. and Klagsbrun, M. : Heparin affinity : Purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science*. 223 : 1296-1299, 1984.
- 38) Ackerman, N.B. : Differences in vascular permeability between normal and tumor vessels produced by vasoactive agents. *Surg. Forum*. 24 : 105-107, 1973.
- 39) 秦 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.
- 40) 秦 順一 : 腫瘍血管と間質, 血管新生の病理, 下里幸雄, 玉置憲一 (編) : 人癌とヌードマウス, 第1版, 医歯薬出版, 東京, 53-59ページ, 1982.
- 41) Grollman, A. and Grollman, E.F. : Pharmacology and therapeutics, 7th ed., Lea and Febiger, New York. p.516, 1970.
- 42) Folkman, J., Langer, R., Linhardt, R.J., Haudenschild, C. and Taylor, S. : Angiogenesis inhibition and tumor regression caused by heparin or a heparin fragment in the presence of cortisone. *Science*. 19 : 719-725, 1983.
- 43) 秋里和夫 : 胃癌の微細血管構築に関する研究, 慶応医学, 50 : 21-36, 1973.
- 44) Hori, K., Suzuki, M., Abe, I., Saito, S. and Sato, H. : Increase in tumor vascular area due to increased blood flow by angiotensin II in rats. *J. Natl. Cancer Inst.* 74 : 453-459, 1985.
- 45) Gullino, P.M., Grantham, F.H., and Courtney, A.H. : Utilization of oxygen by transplanted tumors in vivo. *Cancer Res.* 27 : 1020-1030, 1967.
- 46) Vaupel, P., Braunbeck, W., Schulz, V., Gunther, H. and Thews, G. : Critical O₂ and glucose supply and microcirculation in tumor tissue. 7th Europ. Conf. Microcirculation, Aberdeen 1972, part II, *Bibl. Anat.*, No.12, pp527-533, (Karger, Basel, 1973).
- 47) Gross, J., Azizkhan, R.G., Biswas, C. Bruns, R.R., Hsieh, D.S.T. and Folkman, J. : Inhibition of tumor growth, vascularization, and collagenolysis in the rabbit cornea by medroxyprogesterone. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 78 : 1176-1180, 1981.
- 48) Rong, G.H., Alessandri, G. and Sindelar, W.F. : Inhibition of tumor angiogenesis by hexuronyl hexosaminoglycan sulfate. *Cancer*. 57 : 586-590, 1986.