

学 位 論 文 題 名

DMBA 誘発ハムスター舌癌の
リンパ節転移に関する組織化学的研究

学位論文内容の要旨

緒 言

口腔癌における所属リンパ節転移の有無は重要な予後因子の一つであるが、これには治療を開始する時点では転移の有無を確定できない、いわゆる潜在性リンパ節転移という問題がある。従来、原発巣の生検あるいは切除標本から癌の悪性度を診断し、潜在性リンパ節転移の有無を予測する方法が検討されてきた。とりわけ、血管新生は腫瘍の増殖、進展に不可欠とされることから、多くの癌で独立した予後因子とされている。一方、リンパ節転移は癌細胞がリンパ管を経由して成立する病態であることから、血管新生のみならずリンパ管新生も癌の予後因子である可能性が考えられる。本研究では、Kato によって開発された光学顕微鏡的毛細リンパ管同定方法である 5'-nucleotidase（以下 5'-Nase）染色法によりリンパ管を同定し、9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene（以下 DMBA）誘発ハムスター舌癌におけるリンパ節転移と癌周囲のリンパ管数との相関について検討した。

実験材料ならびに方法

1. 実験材料ならびに処置内容

生後 6 週齢の雄性ゴールデンハムスターを用い、藤田らの方法に従い発癌させた。衰弱が著明、もしくは体重が 70g 以下となった時点でエーテル麻酔下に屠殺し、病理組織学的に扁平上皮癌と診断された 91 匹を用いた。これらはリンパ節転移率を高くする目的で腫瘍内を切開する Ohtake らの方法に従って、以下の 2 群を設けた。

A 群 42 匹：DMBA による発癌後、無処置とした。

B 群 49 匹：DMBA による発癌後、毎週 1 回外科用メス（No.11）にて腫瘍内に長さ

約 5mm、深さ約 2mm の切開を舌縁と平行に 2 箇所加えた。

2. 標本作製

腫瘍を前方、中央、後方に 3 分割して OCT コンパウンドに包埋、液体窒素にて凍結した後、厚さ 10 μ m の前頭断凍結連続切片を作成し、H-E、5'-Nase (リンパ管の同定)、ファクターVIII 関連抗原 (血管の同定)、および IV 型コラーゲン (基底膜の同定) の各染色を施した。リンパ節は摘出、同様に包埋し、100 μ m 間隔ごとに厚さ 10 μ m の凍結切片を作成した全割標本に H-E 染色を施した。

3. 染色

1) H-E 染色

10%ホルマリン溶液にて 10 分間固定した後、通法に従って H-E 染色を施した。

2) 5'-Nase 染色

10%ホルマリン溶液にて 20 分間固定した後、蒸留水にて 30 分間洗浄した。これを Kato の方法に従って 5'-Nase 染色液 (5'-adenosine monophosphate 25mg、2% Pb(NO₃)₂ 3ml、0.1M MgSO₄ 5ml、L-tetramisole 15mg、Sucrose 3.5g を 0.2M Tris-malate buffer (pH 7.2) 20ml と蒸留水 22ml に溶解) に 37℃で 60 分間浸漬した。その後、蒸留水で 30 分間洗浄し、0.4%硫化アンモニウム溶液に室温で 30 秒浸漬して発色させた。

3) 免疫染色

30%冷アセトン溶液にて 10 分間固定した後、1%過ヨウ素酸にて内因性ペルオキシダーゼを阻害、1%正常ヤギ血清で 30 分間ブロッキング処理し、抗ヒトファクターVIII 関連抗原ポリクローナル抗体 (Biogenesis 社製 4400-5896)、ならびに抗ヒト・マウス IV 型コラーゲンポリクローナル抗体 (LSL 社製 LB-1403) と 4℃で 1 晩反応させた。その後、ビオチン化抗ウサギ IgG 抗体で 30 分間、ペルオキシダーゼ標識アビジンで 20 分間処理し、VECTOR-VIP キットを用いて発色させ、メチルグリーンで核染色を行った。

4. 評価・解析方法

1) 舌癌の評価項目

切開操作の有無ならびに以下に示す 6 項目の計 7 項目について評価した。

a) 肉眼的最大腫瘍径の計測

b) 組織学的発育様式

H-E 染色標本にて、外向型、内向型、混合型に分類した。

c) 組織学的悪性度の評価

Anneroth らの分類に従い、4 段階評価を行った。このうち深達度は大竹がハムスター用に考案した分類を用い、3 段階に分類した。

d) 基底膜消失率の評価

抗 IV 型コラーゲン抗体により基底膜の連続性を 3 段階に分類した。

e) 血管数の算定

弱拡大の視野において癌周囲のファクターVIII 発現を強く認める、いわゆる hot spot を選択し、これを 200 倍に拡大した視野にて観察して、ファクターVIII を発現する構造物を算定し、その総数を血管数とした。

f) リンパ管数の算定

血管同様 5'-Nase の hot spot を選択し、その数を算定した。ただし 5'-Nase は全身に広く存在し、末梢神経、血管、リンパ球も陽性を呈するため、まず 40~100 倍の H-E ならびに IV 型コラーゲン染色標本にて神経組織を確認し、これを除外した 5'-Nase の hot spot を選択した。これを 200 倍の拡大にて 5'-Nase、ファクターVIII 染色標本の同部位をそれぞれ写真撮影し、この写真上で 5'-Nase 陽性構造物の数を算定した。次に、この 2 枚の写真を比較し、ファクターVIII と 5'-Nase の両者に陽性の構造物は血管、20 μ m 以下の大きさの 5'-Nase 陽性構造物はリンパ球の可能性があると判定し、5'-Nase 陽性構造物の数からそれぞれを差し引きした数をリンパ管数とした。

2) リンパ節は転移の有無を検索した。

3) 統計学的解析

舌癌の各評価項目を独立変数、リンパ節転移の有無を従属変数とし、単純ロジスティック解析を行い、 $p < 0.05$ となる因子を有意な危険因子と判定した。有意な因子は多変量ロジスティック解析を行い、その相対危険度について検討した。ただし、各評価値は腫瘍の前方、中央、後方の切片のうち最も評点の高い切片の値を個体の代表値とした。

結 果

1.各因子と転移について

リンパ節転移の有意な危険因子は、切開操作、内向型の組織学的発育様式、核異型度、深達度、基底膜消失率、血管数、リンパ管数であった。

2.各因子の相対危険度について

上記の有意な因子を独立変数としてリンパ節転移の有無について多変量ロジスティック解析を行うと、有意な危険因子は切開操作、血管数、リンパ管数であった。切開操

作では、操作を行わない A 群をオッズ比の基準 1.0 とすると、B 群はオッズ比 23.9 となり、切開操作を行うことにより、リンパ節転移の危険度は約 24 倍になることが示された。血管数、リンパ管数は、本研究で設定した視野において 1 本多く観察されるごとに、リンパ節転移の危険度は、それぞれ 1.3 倍、1.2 倍になることが示された。

考 察

本研究では実験動物モデルとして DMBA 誘発ハムスター舌癌を用いた。これは種々の程度の組織学的悪性度を示す扁平上皮癌が生ずることから、臨床的な予後因子の検討が可能であるためである。

1. 血管数とリンパ節転移について

ヒト舌は元来血管が豊富な組織であるため、血管数がリンパ節転移に相関しないとの報告もみられるが、本研究での多変量ロジスティック解析では血管数の p 値が最も小さく、リンパ節転移のきわめて有意な危険因子と考えられる。血管数とリンパ節転移が相関する理由としては、血管数が多い腫瘍では浸潤・増殖能が高度で、腫瘍と接するリンパ管が増加すること、また血管とリンパ管は伴走するため、血管が新生することで、伴走するリンパ管と腫瘍の接触が増加することなどがあげられている。

2. リンパ管数とリンパ節転移について

悪性黒色腫と悪性中皮腫ではリンパ管数とリンパ節転移は相関しないとされているが、これらの腫瘍は、転移の起点となる癌細胞の浸潤・遊走能が高いために、リンパ管の数に依存することなく高い転移能を示すが、DMBA 誘発ハムスター舌扁平上皮癌においては、これらの腫瘍に比較すると転移能が劣るために、癌細胞侵入門戸としてのリンパ管の数がリンパ節転移に影響するものと考えられる。

結語

DMBA 誘発ハムスター舌癌を用い、発癌後無処置群と発癌後腫瘍に切開を加える外科的侵襲群を設け、原発巣の病理組織学的ならびに組織化学的検索を行い、血管数のみならずリンパ管数がリンパ節転移の有意な危険因子であることを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 福 田 博

副 査 教 授 吉 田 重 光

副 査 教 授 向 後 隆 男

学 位 論 文 題 名

DMBA 誘発ハムスター舌癌の リンパ節転移に関する組織化学的研究

審査担当者全員が一堂に会して、口頭にて審査を行った。

最初に、論文提出者から研究内容の説明を受けた。説明の要旨は以下の通りであった。

口腔癌における所属リンパ節転移の有無が重要な予後因子の一つであることから、原発巣の生検あるいは切除標本から癌の悪性度を診断し、潜在性リンパ節転移の有無を予測する方法が検討されてきた。本研究では、舌癌のリンパ節転移と血管新生ならびにリンパ管新生の関連を明らかにすることを目的として、癌周囲のリンパ管数とリンパ節転移との相関について検討した。

<実験材料ならびに方法>

1. 実験材料ならびに処置内容

生後6週齢の雄性ゴールデンハムスターを用い、藤田らの方法に従い9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene（以下DMBA）を擦過塗布し発癌させた。発癌後無処置群（42匹）と、発癌後に毎週1回外科用メスにて腫瘍内に切開を加える群（49匹）を設け、衰弱が著明もしくは体重が70g以下となった時点で屠殺し、病理組織学的に扁平上皮癌と診断された91匹を用いた。

2. 標本作製

腫瘍を前方、中央、後方に3分割して凍結し、厚さ10 μ mの凍結連続切片を作成し、H-E、5'-nucleotidase（以下5'-Nase：リンパ管の同定）、ファクターVIII関連抗原（血管の同定）、およびIV型コラーゲン（基底膜の同定）の各染色を施した。リンパ節は、100 μ m間隔ごとに厚さ10 μ mの凍結切片を作成した全割標本にH-E染色を施した。

3. 評価・解析方法

1) 舌癌の評価項目は、切開操作の有無、肉眼的最大腫瘍径、組織学的発育様式、組織学的悪性度、基底膜消失率、血管数、リンパ管数である。このうち血管数は、弱拡大の視

野において癌周囲のファクターVIII発現を強く認める、いわゆるhot spotを選択し、これを200倍に拡大した視野にて算定した。またリンパ管数は、5'-Naseのhot spotを選択して算定した。ただし5'-Naseは、末梢神経、血管、リンパ球も陽性を呈するため、まず神経組織を確認し、これを除外した5'-Naseのhot spotを選択した。これを200倍の拡大にて5'-Nase、ファクターVIII染色標本の同部位をそれぞれ写真撮影し、この写真上で5'-Nase陽性構造物の数を算定した。次に、この2枚の写真を比較し、ファクターVIIIと5'-Naseの両者に陽性の構造物は血管、20 μ m以下の大きさの5'-Nase陽性構造物はリンパ球の可能性があると判定し、5'-Nase陽性構造物の数からそれぞれを差し引きした数をリンパ管数とした。

2) リンパ節は転移の有無を検索した。

3) 統計学的解析

舌癌の各評価項目を独立変数、リンパ節転移の有無を従属変数とし、単純ロジスティック解析を行い、 $p < 0.05$ となる因子を有意な危険因子と判定し、有意な因子は多変量ロジスティック解析を行い、その相対危険度について検討した。ただし、各評価値は腫瘍の前方、中央、後方の切片のうち最も評点の高い切片の値を個体の代表値とした。

<結果>

リンパ節転移の有意な危険因子は、切開操作、内向型の組織学的発育様式、核異型度、深達度、基底膜消失率、血管数、リンパ管数であり、これら因子の相対危険度について多変量ロジスティック解析を行うと、有意な危険因子は切開操作、血管数、リンパ管数であった。

<考察>

ヒト舌は元来血管が豊富な組織であるため、血管数がリンパ節転移に相関しないとの報告もみられるが、本研究では血管数のp値が最も小さく、リンパ節転移のきわめて有意な危険因子と考えられる。血管数とリンパ節転移が相関する理由としては、血管数が多い腫瘍では浸潤・増殖能が高度で、腫瘍と接するリンパ管が増加すること、また血管とリンパ管は伴走するため、血管が新生することで、伴走するリンパ管と腫瘍の接触が増加することなどがあげられている。リンパ管数はリンパ節転移と相関しないとする報告が悪性黒色腫と悪性中皮腫でなされている。これらの腫瘍は、転移の起点となる癌細胞の浸潤・遊走能が高いために、リンパ管の数に依存することなく高い転移能を示すが、DMBA誘発ハムスター舌扁平上皮癌においては、これらの腫瘍に比較すると転移能が劣るために、癌細胞侵入門戸としてのリンパ管の数がリンパ節転移に影響するものと考えられる

<結論>

DMBA誘発ハムスター舌癌においては、血管新生のみならず、リンパ管新生もリンパ節転移の危険因子である可能性が示唆された。

・以上が研究内容の要旨であった。

続いて、各審査担当者から、本研究、関連論文、さらに、一般的事項などについて以下

のような種々の質問があった。

1. 研究内容に関して

- 1) 実験群において、切開を加えた目的と意義、さらに、切開を加えたことによる炎症反応の影響および腫瘍組織の性状の変化について
- 2) factorVIII、5'Nase、vEGFについて、血管、リンパ管、神経線維の染色性の違い
- 3) 本研究領域に関する国内外研究状況と本研究の独創性について
- 4) 本研究における現時点での問題点と今後の研究の方向性
- 5) 本研究結果の臨床への応用について

2. 一般的事項として

- 1) リンパ管および血管の構造、さらに、その類似性と相違について
- 2) リンパ管の発生および新生について
- 3) がんの転移について

論文提出者はこれらの質問に対して明快に回答した。

本論文の研究内容が高く評価されるとともに、本論文提出者が本研究を中心に広い学識を有していることが認められ、博士（歯学）を授与するに値するものと判断された。