9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene の塗布による口蓋粘膜癌の実験的形成

賀来 亨・藤田浄秀・小田島哲世・五十嵐稔明・佐々木元賢

Experimental production of palatal carcinoma by local application of 9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene

Tohru KAKU・Kiyohide FUJITA・Tetsuyo ODAJIMA

Toshiaki IGARASHI・Motomasa SASAKI

はじめに

従来、発癌物質の粘膜面塗布による口腔粘膜癌の実験的形成は、ハムスターの頬嚢という特殊な部位以外では困難とされていたが、われわれは雄ハムスターの舌側縁中 1/3 部に 0.5% 9, 10-dimethyl-1, 2-benzanthracene (以下 DMBA と略) のアセトン溶液を塗布することにより、従来の報告にみられない程短期間に、しかもほぼ 100% の発癌率で舌癌を形成しうることを見出した^{1), 2)}。その後、われわれは舌の種々の部位にも舌癌の形成を試みたが、その実験過程において口蓋や口唇、歯肉などにもたまたま腫瘍の形成が認められた事実から、ハムスターでは頬嚢以外の口腔粘膜も DMBA に強い感受性を有していると考えられ、したがってハムスターは口腔粘膜癌の実験的形成ならびに口腔粘膜癌に関する研究のためにはまことにすぐれた動物と考えられることを指摘した^{3), 4)}。さらにわれわれは下顎唇側歯肉部において第 29 週末日までに全例において歯肉癌が形成されるのを確認し、先に報告した⁵⁾。

今回われわれは、ハムスターの硬口蓋部において粘膜癌の形成を試み、ハムスターの口蓋粘膜も DMBA に強い感受性を有することを確認し、同時に機械的損傷が粘膜癌形成に及ぼす影響をも検討したので、ここに報告する。

実験材料と方法

実験動物は、生後約 2 カ月の雄ハムスター (Mesocricetus auratus) 40 匹で、常時固型飼料 (オリエンタル NMF) と水を与えた。

大学口腔外科学教室 (主任: 佐々木元賢教授)
Department of Oral Surgery, Sapporo Medical College
(Chief: Prof. Motomasa Sasaki)
受付 昭和48年 7 月 7 日

発癌剤は DMBA の 0.5% アセトン溶液とし、毎週 3 回、エーテル麻酔下に口蓋粘膜前 1/3 部を実験部位として、発癌剤を塗布した。

実験動物は 3 群に分け、第 I 群 15 匹には鎌形スクーラの尖端で数回擦過すると同時に発癌剤の塗布を、第 II 群 15 匹には発癌剤の塗布のみを行い、第 III 群 10 匹にはアセトンのみを塗布し、実験対照群とした。

局所および全身諸臓器の肉眼的ならびに組織学的検索は、原則的には腫瘍死を来した動物の剖検によったが、衰弱が著明で数日のうちに死亡すると思われた 1 匹は断頭屠殺した。また第 27 週末日まで生残ったものは断頭屠殺し、全例に剖検を行った。

実験成績

第 I 群: 擦過および DMBA 塗布群

ハムスターの口蓋には著明な口蓋皺襞が認められる (写真 1)、実験初期における、この部の擦過操作によって少量の出血が認められ、粘膜上皮が挫滅されるが、この粘膜の損傷は次回実験日すなわち 48~72 時間後までには肉眼的に治癒しており、潰瘍状態は認められない。第 1 週目のおわり頃には、擦過部位に一致して発赤が認められる。かくて擦過と塗布をくり返すにしたがって、次第に口蓋皺襞が消失し、粘膜は厚さを増し、表面が粗糙となり、第 8 週目頃には擦過によって出血しやすくなる (写真 2)。第 11 週目までには、実験動物全例において実験部位の口蓋皺襞は消失し、擦過によって出血しやすい状態となる。

早い例では、実験開始後第 13 週目に処置部位に限局した小腫瘍の形成が認められるが (写真 3)、多くの例では第 17 週目頃より腫瘍の形成あるいは潰瘍の形成が認められる。

実験開始後第 25 週目に 1 匹が死亡した。生き残っていた残り 14 匹は第 27 週末日に屠殺された。

写真 1 ハムスターの正常な口蓋。 写真 2 実験開始後第 8 週目。第 I 群。処置部位の口蓋粘膜は発赤し、口蓋皺襞が消失している。 写真 3 実験開始後第 18 週目。第 I 群。処置部位に半球状の腫瘍が認められる。この腫瘍は実験開始後第 13 週目に認められ、次第に大きさを増した例である。 写真 4 実験開始後第 24 週目。第 I 群。処置部位に凹凸不平の半球状に隆起した、易出血性の腫瘍が認められ、口蓋中 1/3 部の正中線は潰瘍状を呈している (隆起型 Protruded type)。 写真 5 実験開始後第 24 週目。第 I 群。口蓋中 1/3 部に腫瘍の表面が粘膜面より陥凹して認められ、潰瘍面が正中線に沿って細長く形成されている (陥凹型 excavated type)。 写真 6 実験開始後第 26 週目。第 I 群。写真 3 に認められた腫瘍の表面が次第に壊死におちいり、壊瘍状となり、広い潰瘍面を形成している (平坦型 flat type)。

写真 7 実験開始後第24週目。第 I 群。処置部位の口蓋粘膜はほとんど隆起せず、広い潰瘍面を形成している (平坦型 flat type)。

写真 8 実験開始後第27週目。第 II 群。軟口蓋に乳頭腫様腫瘤形成が認められる。

写真 9 実験開始後第27週目。第 II 群。口蓋中 1/3 部に乳頭腫様小腫瘤の形成が認められ、その部の正中線は潰瘍状を呈している。

写真 10 組織像。実験開始後第25週目。写真 6 と同一例。腫瘍の表面は壊死組織でおおわれ、周囲結合組織にはやや角化傾向の認められる腫瘍組織が浸潤している。H-E 染色, $\times 30$ 。

写真 11 組織像。写真 10 の一部拡大。腫瘍組織と口蓋粘膜の移行部。著明な基底細胞の増殖が認められる。H-E 染色, $\times 80$ 。

写真 12 組織像。写真 10 の一部拡大。やや分化度の低い扁平上皮癌の組織像が認められる。H-E 染色, $\times 100$ 。

われわれの実験による口蓋における腫瘍の形成過程は、1)はじめ処置部位に腫瘍が形成され、これが次第に増大する例(写真4)、2)腫瘍が形成されることなしに、はじめから潰瘍が形成される例(写真5)、3)増大した腫瘍、あるいははじめやや粘膜面よりもりあがっていた腫瘍の表面が壊死に陥り、潰瘍状となり、その潰瘍が口蓋に広がる例(写真6、7)など多彩をきわめる。したがって各動物により、あるいは同一例でも観察の時期によって肉眼的に種々の形態の腫瘍が認められたが、死亡時あるいは第27週末日の屠殺時の観察結果では、1)腫瘍が口蓋粘膜面より外方に半球状に隆起し、外見上腫瘤として認められる例、すなわち隆起型 protruded type は4例(写真4)、2)腫瘍が口蓋粘膜面よりほとんど隆起せず、広い潰瘍面を形成している例、すなわち平坦型 flat type は5例(写真6、7)、3)腫瘍の表面が口蓋粘膜面よりも陥凹して認められ、しかも潰瘍面が口蓋正中線に沿って細長く形成される例、すなわち陥凹型 excavated

type は3例(写真5)、4)外見上、悪性変化が認められなかった例は3例の割合で認められた。

組織学的検索により、隆起型4例、平坦型5例、陥凹型3例のすべてにやや分化度の低い扁平上皮癌が認められ、腫瘍組織周辺の健常と思われる上皮も基底膜は凹凸が認められ、著明な基底細胞の増殖が認められた(写真10、11、12)、残り3例には悪性変化は認められなかった。また肉眼的な腫瘍の形態と組織像との間には一定の関係は認められなかった。局所リンパ節の転移は認められなかった。

第II群：DMBA 塗布群

この群では、第I群にみられた初期の発赤、潰瘍は認められず、第18週頃まで、塗布部位の粘膜は特記すべき変化は認められない。第19週頃より粘膜はやや粗糙となり、皺襞が浅くなり、数例に発赤も認められた。第20週目に処置部位よりやや後方の粘膜に乳頭腫様小腫瘤の形成が認められ、数例に軟口蓋に乳頭腫様小腫瘤形成が認

写真 13 組織像。実験開始後第27週末日に断頭屠殺した例。第II群。写真9と同一例。腫瘍組織が周囲結合組織に浸潤している。腫瘍組織基底層の細胞の数が増し、下方への延長が著しい。H-E染色。×30。

写真 14 組織像。写真13の一部拡大。異型性を有する扁平上皮癌の組織像を呈する。中心部には角化、錯角化が認められる。H-E染色。×80。

写真 15 組織像。実験開始後第27週末日に断頭屠殺した例。第II群。写真8と同一例。層構造ならびに細胞の異型性は認められず乳頭腫の組織像である。腫瘍組織下部に口蓋腺組織が認められる。H-E染色。×30。

写真 16 組織像。実験開始後第27週末日に断頭屠殺した例。第II群。粘膜が増生している部分で、軟口蓋部に存在する唾液腺の導管開口部に扁平上皮が深く入りこんでいる。H-E染色。×30。

められた (写真 8, 9)・第 27 週末日までに生残っていた 15 匹全例を断頭屠殺した。

組織学的検索により 15 例中 4 例にやや分化度の低い扁平上皮癌が認められ (写真 13, 14), 4 例に乳頭腫が認められた (写真 15)・局所リンパ節の転移は認められなかった。

第 III 群 : アセトン塗布群

この群では著変は認められなかった。

考 察

われわれは、ハムスターでは頬嚢以外の口腔粘膜も DMBA に強い感受性を有していると考え、ハムスターは口腔粘膜癌の実験的形成ならびに口腔粘膜癌に関する研究のためにすぐれた動物と先に指摘した^{3), 4)}。これをさらに確認するために、今回われわれは口蓋粘膜前 1/3 部において粘膜癌の形成を試みた。鎌形スケラ⁵⁾の尖端で数回擦過すると同時に 0.5% DMBA アセトン溶液を塗布した第 I 群では実験開始後第 27 週末日までに 80.0% の発癌率で粘膜癌の形成を認め、また、0.5% DMBA アセトン溶液の塗布のみをおこなった第 II 群では同じく第 27 週末日までに 26.7% の発癌率で粘膜癌形成を認めた。

口蓋粘膜に粘膜癌の形成を試みた実験は、われわれの調べた範囲では文献的に少ない。Salley & Kreshover⁶⁾ (1959) は albino hamster を用いて、口蓋粘膜に 0.5% DMBA アセトン溶液を塗布することにより、実験開始後第 16 週目に、生検の結果 19 匹中 10 匹 (発癌率 54%) に扁平上皮癌を認めている。また同様に 0.5% 3,4-Benzpyrene アセトン溶液を塗布することにより、第 46 週目に 18 匹中 3 匹 (発癌率 16%) に扁平上皮癌の形成を認めている。しかし、Salley & Kreshover の実験では発癌剤を口蓋のどの部位に塗布したか、また腫瘍が口蓋のどの部位に形成されたか明らかでない。Stormby & Wallenius⁷⁾ (1964) は Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) を用いて、大唾液腺と上頸神経節を外科的に切除し、減唾液状態にした手術群において手術 4 週後に 0.5% DMBA アセトン溶液を口蓋の後方より前方へと口蓋全体に週 3 回、4~6 カ月塗布し、15 匹中 10 匹 (発癌率 67%) に、また非手術群にも同様に塗布することにより、16 匹中 6 匹 (発癌率 37.5%) に、それぞれ扁平上皮癌を認めた。この Stormby & Wallenius の実験では、腫瘍が口蓋の中 1/3 部より後方すなわち軟口蓋にかけて腫瘍が多発し、口蓋前 1/3 部は腫瘍の形成が少なく、手術群と非手術群の発癌率の差は口蓋中 1/3 部において認められ、口蓋前 1/3 部、口蓋後 1/3 部すなわち軟口蓋では差は認められなかったと報告し、また両群とも口蓋前 1/3 部に粘膜癌形成が少ないのは、舌運動によって、発癌物質が局所に長くとどまり持続的に作用することが妨げられるからであり、口蓋後 1/3 部すなわち軟口蓋に腫瘍が形成されやすいのは、同部は舌運動の影響がほとんどなく、嚥下作

用により、この部に発癌物質が蓄積した結果であると推測している。

われわれの実験では第 I 群の隆起型、平坦型はスケラの擦過部位、すなわち口蓋前 1/3 部に一致して粘膜癌の形成を認めたが、陥凹型は口蓋前 1/3 部に擦過と塗布をくりかえしたにもかかわらず中 1/3 部に粘膜癌形成が認められた。第 II 群では口蓋前 1/3 部に発癌剤を塗布したにもかかわらず、口蓋前 1/3 部には腫瘍は形成されず、中 1/3 部、後 1/3 部に腫瘍が形成され、少数例において、頬粘膜に小腫瘤形成が認められた。われわれの実験では、機械的損傷を与えずに、発癌剤の塗布のみを行った第 II 群では第 27 週末日までに 26.7% の粘膜癌形成を認めた。前述のように Stormby & Wallenius⁷⁾ は口蓋粘膜癌形成において週 3 回、4~6 カ月の発癌剤塗布により、手術群では 67%、非手術群では 37.4% の発癌率を認めたと報告している。この成績と比較するとわれわれの成績は著しくおとっている。これは口蓋粘膜癌の形成実験の部位的な困難性によると思われる。口蓋の前 1/3 部は Stormby & Wallenius⁷⁾ の実験においても腫瘍が形成されたのは手術群、非手術群あわせて 3 例であった。先に報告した歯肉癌の形成実験⁸⁾ では発癌剤のみの塗布により第 29 週末日までに 100% の発癌率を認めたが、口蓋粘膜癌形成の発癌率が低いのは固有口腔においては舌運動、唾液による発癌の困難性が関係していると思われる。

口腔粘膜癌の実験的形成に機械的損傷が影響を及ぼす事実は多数の研究者によって強調されているが^{9)~10)}、われわれも舌癌の実験的形成において、機械的損傷の意義について報告し^{1), 2)}、今回の口蓋粘膜癌形成においても、機械的損傷を加え発癌剤を塗布した第 I 群と発癌剤の塗布のみの第 II 群において、第 I 群に短期間高率に粘膜癌形成が認められた。すなわち、擦過と同時に発癌剤を塗布することによって形成される初期の潰瘍およびその後の粘膜損傷は、塗布した発癌剤の局所への停滞と粘膜上皮の下層ないし粘膜下の結合組織への到達を容易にするとともに、これらの損傷の修復過程にある粘膜上皮は一層発癌剤の作用を受けやすくなることが、口蓋粘膜癌の形成をはやめたものと考えられる。

口蓋は、ヒトでもハムスターでも角化層の発達した厚い粘膜でおおわれ、しかも下層には上顎骨があり、上皮と下部の骨膜とは固く結合し、特徴ある組織構造を呈している。この部におけるヒトの口蓋腫瘍では小幡¹¹⁾ は外向性腫瘍を呈する例が多く、とくに硬口蓋部の腫瘍はその傾向が強く、それは骨性口蓋および歯槽突起によって内向性の発育が制御されるからであろうと推測している。はたして小幡の推測が正しいかどうかはハムスターを使用することによって、特徴ある組織構造を有する口蓋に粘膜癌を形成し、形成過程や形成される腫瘍の形態ならびに腫瘍組織と粘膜下組織、骨組織との相互に及ぼす影響を検討することにより明らかになるであろう。

なお唾液腺導管が発癌の部位の一つと考えられている¹²⁾。唾液腺導管開口部に扁平上皮が深く入りこんでいる所見が観察された(写真16)が、導管上皮が発癌の母地となる所見はなかった。

われわれはハムスターを用いて、舌癌が短期間高率に形成されることを認め、その後、口唇部においてもそれを確認し、今回は口蓋における粘膜癌の形成を報告した。いずれもハムスターを使用することによって、口腔粘膜のいずれの部位にも粘膜癌が高率に形成されることが可能となった。

ただ、口蓋粘膜癌の形成はさきに報告した舌癌の形成実験^{1), 2)}に比し、やや形成日数を要し、発癌率が低かった。

結 語

われわれはハムスターの口蓋粘膜に毎週3回、鎌形スケラの尖端で擦過すると同時に0.5% DMBA アセトン溶液を塗布することにより、実験開始後第27週末日までに80.0%の発癌率で口蓋粘膜癌の形成を認め、ハムスターの口蓋粘膜も DMBA に強い感受性を有し、口腔粘膜癌の実験的形成のためにすぐれた実験動物と思われることを確認した。

この鎌形スケラの尖端で擦過すると同時に DMBA アセトン溶液の塗布を行った群では、DMBA アセトン溶液の塗布だけを行った群と比べて有意の差をもって発癌率が高かった。

稿を終るにあたり、御校閱いただきました小野江為則教授に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Fujita, K., Kaku, T., Sasaki, M. and Onoé, T.: Experimental production of lingual carcinomas in hamsters by local application of 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene. *J Dent Res* 52: 327~332 1973.
- 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) 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. *北海道歯科医師会誌* 28: 5~14 1973.
- 4) 藤田浄秀, 賀来 亨, 佐々木元賢: 舌癌の実験的形成に関する研究 第4編 舌癌形成の部位的差異に関する研究. *口科誌* 22: 362~374 1973.
- 5) 藤田浄秀, 賀来 亨, 五十嵐稔明, 佐々木元賢: 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene の塗布による歯肉癌の実験的形成. *日口外誌* 19: 266~270, 1973.
- 6) Salley, J.J., and Kreshover, S.J.: The effect of topical application of carcinogens on the palatal mucosa of the hamster. *OS OM & OP* 12: 501~508 1959.
- 7) Stormby, N.G. and Wallenius, K.: Effect of reduced salivation on oral tumor induction on hamsters by 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene. *Odont Revy* 15: 186~209 1964.
- 8) Renstrup, D., Smulow, J. and Glickman, I.: Carcinogenesis and mechanical irritation in the cheek pouch of the hamster. *J Dent Res* 649 1961.
- 9) Goldhaber, P.: Further studies on experimental oral carcinogenesis. *J. Dent Res* 38: 18 1958.
- 10) Fujino, H., Chino, T. and Imai, T.: Experimental production of labial and lingual carcinoma by local application of 4-nitroquinoline N-oxide. *J Nat Cancer Inst* 35: 907~918 1965.
- 11) 小幡幸雄: 口蓋腫瘍の診断と処置 2. 臨床診断について. *口科誌* 21: 325~326 1972.
- 12) 田代英雄: 口腔粘膜癌発癌様相に関する臨床的病理学的研究. *口科誌* 22: 176~198 1973.