実験上皮癌に対する Cryosurgery に関する研究 ——病理組織学的, 組織化学的ならびに血管造影法による観察——

二 宮 富 久

Cryosurgery for experimental carcinoma in hamster cheek pouch ——Histopathological, histochemical and microangiographic observations——

Tomihisa NINOMIYA

緒 言

凍結外科療法は, Cooper¹⁾が液体窒素を用いて腫瘍の治療をはじめて以来, 外科²⁾, 眼科^{3,4)}, 泌尿器科⁵⁾, 産婦人科⁶⁾, 皮膚科⁷⁾, 耳鼻咽喉科⁸⁾で応用されてきた。また, 口腔外科領域でも Cahan⁹⁾, Gage^{10~12)}, Zacarian¹³⁾が報告して以来, 多数の報告がみられ, その内容は, 白板症^{14,15)}, 血管腫¹⁶⁾をはじめ癌^{17~19)}に及んでいる。凍結外科の臨床応用における原理は, その温度の違いにより (1) cryo-adhesion (2) cryo-inflammation (3) cryo-solidification (4) cryo-necrosis の作用に分けられ, (1)は眼科領域で白内障摘出術に用いられ, (2)は網膜裂孔の閉鎖に応用され, (3)は脳腫瘍等の摘出に応用されている。腫瘍の治療には, 主として cryo-necrosis の原理が用いられているが, その組織細胞破壊に関する報告にはいまだ確固たるものはない。

ハムスター頬嚢粘膜癌の実験形成^{20~23)}, 組織像^{24,25)}, 組織化学²⁶⁾に関する所見については, すでに判明している報告も多数みられる。また, 口腔領域の癌の大部分は粘膜由来の扁平上皮癌である。そこで, 著者はそれとほぼ同様の組織像を呈するハムスター頬嚢粘膜癌を用いて, 凍結後の組織細胞破壊の状態を形態学および凍結後の微小循環系の変化を, 血管造影法を用いて検索した。

実験材料と実験方法

1. 実験材料

1) 動物

生後8週齢の雄ゴールデンハムスター体重100~120 g を使用した。発癌実験は1回に100匹を3回, 合計300匹

を使用した, そのなかで実験材料として用いられたものは206匹である。

2) 発 癌

ハムスター左側頬嚢粘膜に0.5% 9, 10-dimethyl-1,2-benzanthracene (以下 DMBA と略す) アセトン溶液を無麻酔下で細い毛筆で塗布し発癌させた。発癌剤の塗布は, 塗布開始後16週に至るまで週2回行った。肉眼的に4~6週の初期病変として潰瘍形成, 8~14週の乳頭腫形成, 16週以後に著しく外向性増殖を示し, 花野菜状の上皮癌が形成される。この最終時期の比較的大きい上皮癌について凍結外科療法を行った。

II. 実験方法

1) 凍結外科の方法

a. 凍結装置: Spemby 社製の冷凍外科装置 System 9 R を用いた。この装置は液化炭酸ガスを冷媒とし, 凍結用プローブ先端 (R-9015, 先端直径 12×9 mm) 温度は -60°C である。

b. 低温測定法: 腫瘍表層より温度計をプローブ直下に達するように刺入し, 凍結開始と同時に15秒間隔で9分間組織内温度を測定した。組織内温度測定器は, 宝工業株式会社の D-111, センサーは PXB-44 を用い, 温度の測定範囲は -100~70°C, その測定誤差は ±0.3% 以内である。

c. 凍結方法: 動物を麻酔 (ソムノベンチル 0.4 ml/kg) 後, 仰臥位に固定し, 実験癌の表層にプローブを直接接触させ, 90秒間凍結操作を行い, その後, 室温にて自然融解させた。凍結回数と凍結効果を観察するため1回凍結群と3回凍結群に分けた。第1群は, 腹腔内麻酔下で実験癌を週1回凍結を行った。第2群は, 腹腔内麻酔下で週3回隔日に凍結を行った。これらの第1, 2群は動物を各50匹ずつ用いた。第1群の動物は1回の凍結後7日目に, 第2群の動物は3回目の凍結後3日目, すなわち初回の凍結後7日目に屠殺し, 病理組織, 酵素組織化学, LDH アイソザイムに関する実験材料とした。第3群は, 実験癌を106匹用い, 1回の凍結後1, 3, 6, 12時間, 1, 2, 3, 5, 14日後に動物を屠殺し, 病理組織的, 電顕的研究と血管造影のために用いた。

岐阜歯科大学口腔外科学第1講座

(主任: 森 昌彦教授)

The First Department of Oral Surgery, Gifu College of Dentistry (Chief: Prof. Masahiko Mori)

受付日: 昭和58年5月9日

2) 病理組織学的方法

a. 光顕の観察: 10% ホルマリン固定後, H-E 染色を, カルノア固定後 toluidine blue (pH 7.0), Feulgen 反応を行った. この標本により, 次の酵素組織化学的所見ならびに LDH アイソザイム, 血管造影の成績等と比較した.

b. 電顕の観察: 2% グルタルアルデヒドで4°C, 2時間前固定を行い, 0.1M カコジル酸緩衝液で10分2回よく洗い, 8% ショ糖の入った0.1M カコジル酸緩衝液で12時間放置し, 1% オスミウムで後固定後, 水洗, アルコール脱水, エポン包埋を行った. 超薄切片の染色は, 酢酸ウランとクエン酸鉛で二重染色を行った. 電子顕微鏡は JEM-100B を使用した.

3) 酵素組織化学的方法

新鮮材料を -20°C の cryostat により 12 μ の連続切片を作製し, 通法に従いアルカリフォスファターゼ (ALP), コハク酸脱水素酵素 (SDH), 乳酸脱水素酵素 (LDH), グルコース 6 リン酸脱水素酵素 (G6PDH), の染色を行った. ALP は, 基質に Naphtol AS-MX phosphate と Fast Red Violet LB を用いた. また, 凍結後 1, 3, 6, 12 時間後の材料は ALP の証明のために低温アルコール固定後, パラフィン (52°C 以下) 包埋を行い ALP の局在を観察した. SDH, LDH と G6PDH の証明は, Nitro BT を用いた.

4) 組織 LDH 電気泳動法

組織湿重量の 8 倍の 0.1M, pH 7.0 リン酸緩衝液でホモジネートした. ヘレナ 電気泳動装置 (ZIPZONE CHAMBER) を用い, セルロースアセレート膜 (TITAN III ISO-VIS) で行った. 電極槽溶液には, 0.05M Tris barbital-sodium barbital buffer (pH 8.8) を用い, 試料溶液を塗布後, 180V で30分間通電泳動した. 泳動開始と同時に他のセルロースアセレート膜を LD reagent に浸漬し, 泳動終了まで遮光し, 保存した. 泳動終了後, 泳動膜と基質浸漬膜をサンドイッチ状に合わせ, 37°C, 20 分間反応させ, その後 5% 酢酸溶液に浸した. 乾燥後デンストメーター (Auto Scanner FLUR-VIS) を使用し, 570 nm で LDH アイソザイムパターンを測定した.

5) 血管造影法

a. 造影剤の注入法: 凍結 1 回後 1, 3, 6, 12 時間目の実験癌について行った. 腹腔内麻酔下にて, ハムスターを仰臥位に固定し, 腹壁切開, 内臓を一侧に圧排し, 腹大動脈から造影剤を注入した. 造影剤の注入中に内臓が乾燥するのを防ぐため加温生食水に漬したガーゼで被った. 造影剤は硫酸バリウム製剤 (リウバリゾル R) を用い, 用いた造影剤の組織は, セラチン 5% 硫酸バリウム 60% である. 腹大動脈からの造影剤の注入圧は 150 mmHg で余剰の造影剤は下大静脈側より排出した. 造影剤の注入状態は, 内臓, 舌, 歯肉などを目安とし, 組織全般にわたる均一な注入を得るには, 最低20分の注入

時間が必要であった.

b. 標本製法: 造影剤の注入が終了すると, 動, 静脈を結紮して造影剤のもれを防ぎ, 0°C の低温で 2~3 時間放置すると造影剤中のセラチンが凝固する. その後, 凍結療法が行われた癌組織を周囲の健康組織を含めて切り出し, 300~500 μ の cryostat 切片を作製し, 次の方法に従い X 線撮影をし, 観察した.

c. 軟 X 線撮影法: 軟 X 線発生装置は Softex CMB-2 を用い, Fuji Softex FG を用いて造影剤の注入を観察した. 管球とフィルムの距離は 35 cm, 撮影条件は, 40 KV, 1 mA, 30 秒で撮影後現象, 定着, 水洗を行った.

結 果

1. 実験癌凍結時およびその後の肉眼的変化

ハムスター頬囊粘膜に 0.5% DMBA アセトン溶液を週 2 回塗布すると, 塗布を開始して 16 週以後に表面が花野葉状を呈する癌が形成される. この癌は, 病理学的に大多数が扁平上皮癌であり, きわめて少ない頻度で他の腫瘍が形成されるが, 本実験においては扁平上皮癌のみを用いた. -60°C のプローベを直接実験癌に接触させることにより, 腫瘍組織が凍結される. この凍結を持続すると, 癌全体が白く凍結され, 90 秒間持続することにより実験癌の基底部の頬粘膜にまで及ぶことがある. 凍結解除後は, プローベより遠位の凍結組織から融解がみられ, 完全融解した癌は暗紫色を呈する. 凍結後 6~12 時間までは, 実験癌表面は暗紫色を呈するが, 24~48 時間後の腫瘍表面は, 灰白色を呈するようになり凍結壊死 (cryo-necrosis) の状態を呈する. 凍結後 2 週間で実験癌組織は, 凍結壊死, 脱落しほぼ粘膜色を呈するようになる. しかし, 一部には残存した癌組織がみられる.

2. 組織内温度変化

実験癌組織内の温度測定は, -60°C のプローベ直下で行った. 凍結開始後, 90 秒で実験癌内組織温度が約 -20°C に下り, この時点で凍結を解除すると, 解除後 0°C 付近までは急速な温度上昇を示し, 0°C 付近で温度上昇が横ばい状態となり, その後温度は, ゆるやかに上昇し, 徐々に凍結前の体温にまで近づくが完全に体温までは回復しなかった (図 1). 本実験において実験癌凍結後の温度到達範囲を次の 3 つに分けた. すなわち, プローベ直下の実験癌組織で凍結効果の最も著しい層 A zone, その下部で間接的に温度到達のみられる層 B zone, さらにその下部で凍結温度に左右されない生体温度層 C zone に分類した (図 2). この実験癌内組織温度変化による分類は, 組織学的, 組織化学的観察と対比できる. 本実験においては, A zone の低温測定のみとし, 組織内温度測定器の先端の直 1.3 mm であるために A zone は, およそ 1.5 mm と考えられ, -60°C のプローベの場合 A zone は, 約 -20°C であった.

図 1 組織内温度変化

図 2 表層より低温到達の違いにより生ずる病変層

B zone は、それよりも高い温度であり、C zone は体温に近い温度と予想される。

3. 病理学的所見

a. 発癌過程の所見：正常ハムスター頬囊粘膜は3～4層の上皮細胞層で成り立ち、乳頭の発育は悪く、上皮層下には薄い結合組織を介して筋層が存在する。DMBA塗布後6～8週後に易出血性の潰瘍形成がみられ、上皮索は部分的に反応性に深部結合組織中に増殖しているが、この時期においてははまだ発癌には至っていない。10～12週においては、外向性増殖を示し、良性の乳頭腫を形成する。16週以後になると、上皮細胞の増殖はさらに著

明となり、角化傾向の強い分化度の高い扁平上皮癌を形成する。細胞浸潤は、上皮癌の病巣内、随所に存在し、多数の炎症性細胞が腫瘍組織中に認められる。腫瘍上皮細胞の核は、不規則で大きささまざまな様相を呈し、分裂像もみられる。DNA量の上昇している所見がFeulgen反応でみられ、顆粒状に染色される。電顕像においては癌化に伴い上皮細胞間隙が広がり、同時にデスモゾームは乏しくなる。細胞質内には、tonofilamentが多数みられるようになり、基底膜腔の不連続性がところどころにみられるようになる。毛細血管壁は、癌化に伴い著明な変化がみられ、腫瘍間質の毛細血管壁においては、内皮細胞の管腔側への突出とともに核の突出がみられる。

b. 凍結後1～3時間の所見：この時期における特徴的变化は、プローブ直下の腫瘍組織に、急激な細胞破壊と毛細血管破綻による出血、拡張による充血、うっ血等の病変の出現である。凍結初期における腫瘍組織破壊は、A zone においてみられる。すなわち、低温が急激に伝達される腫瘍組織においてのみ細胞破壊がみられる(写真1, 2)。癌細胞はその形態をとどめることなく破壊され、ヘマトキシリンの染色性が低下し、すでに表層の腫瘍組織は壊死に陥り、細胞はおのおのの連結を喪失し、核は散乱状となっていた(核崩壊)。しかし、この領域において低温の到達した腫瘍細胞の核に toluidine blue (pH 7.0), Feulgen 反応が一部陽性を示し、凍結後短時間においてははまだ核様物質が存在することを示している。また、この時期における B zone での腫瘍細胞の破壊が一部にみられるが、著明な腫瘍細胞の破壊はみられない。電顕的には、A zone では腫瘍細胞間のデスモゾームの消失による細胞間連結の完全な喪失、細胞小器官の変性および破壊による染色性の低下がみられる。核は細胞質内小器官の破壊に比べ、破壊度が少ない。核膜の一部には破壊がみられるが、クロマチンには染色性がみられる(写真5, 6)。B zone では、光顕的には著明な腫瘍細胞破壊はみられなかったが、電顕的にはすでに細胞の変性がみられ、細胞間隙の拡大、細胞小器官の腫脹がみられる。特に、ミトコンドリアの腫脹、粗面小胞体の変性がみられる(写真7)。しかし、この凍結後短時間では腫脹したミトコンドリアの膜およびクリステの構造が一部みられ、完全な破壊はみられない。A zone における腫瘍間質の毛細血管壁は、凍結後破綻が生じ血球成分の血管外への漏出がみられる。B zone では、すべての毛細血管が拡張し、著しい血行障害がみられる。この拡張した毛細血管内皮細胞は破壊されておらず、核の Feulgen 反応は陽性を示す。つまり、低温による毛細血管の破綻は A zone に、血行障害は B zone にみられる。C zone においては、低温がこの部位まで到達しないためと、比較的太い脈管系があるために著明な変化はみられない。

c. 凍結後6～12時間の所見：この時期における特徴

的变化は、凍結1～3時間後に起きた変化がさらに深部へ波及し、腫瘍表層組織は壊死脱落を示す。すなわち、A zone では腫瘍組織が完全に破壊され H-E 染色、toluidine blue (pH 7.0) 染色の染色性が消失する。その下部の B zone の腫瘍細胞は、H-E 染色で空胞変性がみられる。核は濃縮し、toluidine blue (pH 7.0) 染色で濃染される。無処置の腫瘍細胞では細胞質と核の比率は、核の割合が大きく Feulgen 反応では核内の DNA 量が豊富で、顆粒状の染色性がみられ、核分裂像も観察される。ところが、凍結後の B zone の腫瘍細胞は、低温の到達により核の濃縮がみられ、Feulgen 反応で DNA は顆粒状に染色されなくなる。この濃縮した核の外周には、H-E 染色、toluidine blue (pH 7.0) 染色で無染色帯がみられ、核の収縮した所見がみられた(写真3, 4)。すなわち、核の収縮したことにより細胞質内の核の占める割合が減少したことがうかがえる。顕像では、B zone の腫瘍細胞は凍結により破壊がさらに進み、腫瘍細胞間連結は消失し、ミトコンドリアのクリステは不明瞭となる。粗面小胞体は多数の空胞様を呈する。核はクロマチンが減少し、核膜の破壊がみられる(写真8)。A zone の毛細血管は完全に破壊され、その形態をほとんどみることができないが、B zone では毛細血管拡張と遊走白血球が多数浸潤している所見が顕微的に観察される。毛細血管内には赤血球の膠着が B zone にみられ血行障害が凍結後この時期まで継続している。C zone では、凍結後1～3時間の所見と同様に血行障害などもなく、まったく低温の効果が到達しないことを示している。

d. 凍結後1～2日の所見：この時期における変化は、凍結1回後の完全破壊層が明確となり、低温到達による凍結壊死部の toluidine blue (pH 7.0) 染色で非染色性を示す部分と、低温が深部の腫瘍組織まで到達せず、凍結破壊されずに toluidine blue (pH 7.0) で染色性を示す部分に明確に分けられることである(写真9～12)。このことは凍結により腫瘍組織破壊が起こるのは、プローベ直下の完全凍結破壊層に限定されることを意味している。すなわち、 -60°C のプローベを用いた場合の凍結効果は少なくとも凍結2日後に至りその効果が明らかとなり、それ以後においては腫瘍組織の破壊は現れない。そのため、toluidine blue (pH 7.0) 染色で濃染される細胞は、凍結により破壊されない腫瘍細胞を示す。H-E 染色では、完全凍結壊死した腫瘍細胞は無構造、び漫性にわずかに好酸性に染色される。壊死部と残存腫瘍組織の境界は、炎症性細胞浸潤が強くみられる。この時期においては、凍結後6～12時間にみられた B zone の血行障害部には血栓を生じる。この血栓は、無構造な好酸性で、toluidine blue (pH 7.0) 染色によって血管内の栓塞物質が青色に染色される。腫瘍間質の血管におけるこの血栓形成がみられるにもかかわらず、

その上部の腫瘍細胞の破壊はみられない(写真13, 14)。

e. 凍結後2週目の所見：凍結壊死に陥った腫瘍組織は、すでに脱落していて、この部に炎症性細胞の浸潤がみられる。B zone の下部では、凍結後の残存腫瘍細胞が増殖し、さらに深部結合織内へと浸潤した所見がみられた。この増殖形態は、無処置腫瘍組織の深部増殖と比較した場合、明らかに深部へ増殖し、2～3層の索状として増殖する傾向を示した。腫瘍組織表層では、炎症性細胞浸潤および一部壊死がみられ、この時期までには外向性増殖を示すことはなかった。また、深部の腫瘍間質には炎症性細胞浸潤はほとんどみられなかった。腫瘍細胞は、toluidine blue (pH 7.0) 染色で濃染され、増殖傾向にある所見を示した。このことは、凍結外科に際し、凍結により破壊されない腫瘍組織は著明な増殖を示すものといえる。

4. 酵素組織化学的所見

a. アルカリフォスファターゼ (ALP)：本酵素は、正常ハムスター頬嚢粘膜上皮にはみられず、毛細血管壁と炎症性細胞および再生時の線維芽細胞に陽性を示す(写真17)。癌化に伴い腫瘍間質の炎症性細胞に起因して酵素活性がみられるようになる。パラフィン切片による凍結後短時間(1～3時間)の A zone では、低温の急激な到達により腫瘍組織は壊死に陥り、間質の毛細血管は破綻し、血管壁の ALP 活性はみられないが、腫瘍組織内に多少の ALP 活性がみられる。B zone では、毛細血管の拡張がみられるが ALP 活性は陽性である。また、血管拡張により遊走白血球が血管外にみられ、ALP 活性陽性を示し、血管壁にもこの遊走白血球の付着による陽性の所見がみられる。赤血球は血管内で膠着している(写真15～20)。一方、cryostat による連続切片では、1回の凍結後7日目の本酵素の局在は、腫瘍組織表層(A zone)の凍結壊死により陰性となるが、その下部では陽性を示し、腫瘍組織の残存がうかがえる。週3回隔日に凍結後3日目、つまり最初の凍結後から7日目では、繰り返し凍結する効果がみられ A, B zone の腫瘍組織破壊が深部にまで及び、3回の凍結により腫瘍組織はほぼ完全に凍結壊死を示し、健全な結合織のみとなる(写真23)。そのために、本酵素の局在においても健全部の結合織内に陽性反応がみられ、特に壊死部との境界には強い反応がみられる。

b. コハク酸脱水素酵素 (SDH)：本酵素は、正常ハムスター頬嚢粘膜上皮の基底細胞層、棘細胞層に局在する。癌化に伴い腫瘍上皮細胞には陽性を示すが、間質および角化層には陰性である。また、癌化とともにその活性も低下する。cryostat による連続切片では、1回の凍結後7日目では、A zone の低温到達により破壊された腫瘍組織は壊死に陥り陰性となる。低温により破壊されずに残存する腫瘍上皮細胞には陽性である(写真21)。凍結週3回後3日目では、完全破壊が深部(A, B zone)

までおよび腫瘍上皮組織での本酵素活性は消失し、すでに腫瘍組織は完全に破壊され結合織のみとなる(写真24)。また、凍結後の本酵素は残存腫瘍組織上部および腫瘍組織の破壊により結合織のみとなった組織上部に異なった大小さまざまな顆粒状を呈するホルマザン形成がみられる。

c. 乳酸脱水素酵素 (LDH) : 本酵素は、正常粘膜上皮層の角化層以外に強い活性がみられる。癌化に伴い腫瘍上皮組織にはさらに強陽性となる。間質においても陽性を示す。cryostat による連続切片の結果では、凍結1回後7日目では、A zone の壊死部には陰性で、低温到達がみられず残存した腫瘍上皮組織および間質には陽性を示す。つまり、壊死部を除き凍結前の活性がみられた。凍結3回後3日目では、腫瘍組織はA, B zone に至るまで完全に壊死に陥り、酵素活性はみられなくなり、低温による深部までの腫瘍組織破壊により活性が消失した所見を示した。凍結後腫瘍組織の壊死脱落により結合織内にわずかに活性がみられ、正常組織内における活性と同様な所見がみられた。

d. グルコース 6 リン酸脱水素酵素 (G6PDH) : 本酵素は、正常粘膜上皮の棘細胞層、顆粒層に強い活性を示す。癌化に伴い腫瘍上皮組織に強陽性を示す。間質においてはほとんど陰性である。凍結1回後7日目では、A zone では陰性であるが、低温到達がなく破壊されなかった B zone には陽性を示す。週3回凍結後3日目では、低温到達が深部まで及び、腫瘍組織は完全に破壊され SDH, LDH と同様に壊死部には陰性となる。凍結による腫瘍組織破壊が深部に及び、結合織のみとなった組織の表層に非常に強い帯状の G6PDH 活性がみられる(写真25)。すなわち、これは凍結後の生体の vital reaction によるものと解される。

5. 微小循環系における凍結後の形態変化および血管造影後の所見

凍結後の形態変化について短時間の変化を H-E 染色および電顕的観察を行った。正常ハムスター頬嚢粘膜における毛細血管は、乳頭層に点在して、それほど多くはない。癌化に伴い、腫瘍組織の増殖とともに毛細血管の著しい新生が間質にみられ、腫瘍組織内で密となる。腫瘍間質の毛細血管の形態はループ状を呈する。電顕的に内皮細胞の形態も変化し、管腔側に突出し、それに伴い核も同様に突出してくる(写真26, 27)。Pinocytotic vesicles は正常内皮細胞、腫瘍組織内内皮細胞ともにみられ、pericyte も同様である。腫瘍組織内では、いたるところに血管新生を思わせる像が多数みられ、腫瘍組織では血流が増加している所見がみられる。凍結後の著明な変化は、1時間以内に電顕的に観察される。A zone では、内皮細胞膜および細胞内小器官の破壊と核の破壊がみられ、赤血球の血管外への漏出が著明にみられる(写真28)。B zone では、内皮細胞の拡張がみられ、一

図3 LDH アイソザイムパターン

部に細胞内小器官の変性(ミトコンドリアの腫脹)がみられるが、A zone よりは破壊度が少なく、血管内腔には赤血球の凝集がみられる(写真29, 30)。血管造影の結果、凍結後1時間では、まだかなりの血流がA zone 以外にみられ、腫瘍組織内血管に造影剤の注入がみられる。凍結後3時間では、一部の拡張した血管の血流を残して、A, B zone ほとんどの血管に造影剤の注入がみられなくなる。凍結後6時間では、A, B zone にまったく造影剤が注入されない。しかし、C zone では、低温の効果を受けてないために、この時期でも造影剤は注入される。すなわち、凍結後6時間で腫瘍組織内A, B zone は完全に血行障害を生じている(写真31~34)。

6. LDH アイソザイム

正常ハムスター頬嚢組織は、LDH 4, 5 の高い骨格筋型を示す。頬嚢癌では、さらに LDH 5 の上昇した所見を呈し、LDH 1, 2 の低下がみられる。凍結1回後7日目では、酵素組織化学の結果が示すように癌組織の大部分が残存する。そのため、凍結効果は表層に限局し、LDH アイソザイムパターンは癌のそれと同様なパターンを示す。しかし、凍結3回後3日目では、A, B zone まで低温が到達し、癌組織が完全に破壊され、壊死脱落を生ずる。そのため、その下部では結合織のみとなる。この場合に、酵素組織化学の結果、結合織内にわずかな LDH 活性がみられたことから、正常組織の結合織および筋に局在する LDH アイソザイムパターンを示し、癌で上昇していた LDH 5 が著明に低下し、LDH 1, 2 の多少の上昇がみられる(図3)。

考 察

生体組織を凍結した場合の細胞破壊に関する報告によると、凍結融解による細胞内外の氷晶形成による障害、塩害、細胞膜の Lipoprotein complex の変性および2次的な血栓形成に伴う細胞破壊等がおもなものである²⁷⁻³⁷⁾。氷晶形成による細胞破壊は、細胞外の変化が

原形質膜を介して細胞内の水が細胞外へ流出し、細胞外氷晶が拡大する。すなわち、細胞内においては脱水現象が起り、外圧が高まる結果、機械的障害により細胞破壊が生じるといわれている。この脱水による原形質膜の破壊は、凝固変性によるといわれている。また、細胞内凍結は、ブラッシングと呼ばれる樹枝状の氷晶の拡大と再結晶現象により原形質破壊を生じる。そのために凍結により細胞は決定的障害を受けることになる²⁸⁾。塩害による破壊は、脱水により細胞内の水溶液は高濃度となり、pH の変化などにより強い影響を受けるといものである²⁹⁾。細胞膜を構成する Lipoprotein complex の凍結による変化に関しては、細胞内凍結により特に著しい変性を受けるとされている。これらの諸説は、単一な遊離細胞を凍結した場合に考えられる変化であり、温血動物の臓器または腫瘍組織等の生体の一部を凍結し、その破壊をみる場合には低温到達状態と循環系等が作用し、単純な変化として取り扱うことはできない。また、凍結の結果生じた循環障害による細胞破壊も考えられている³⁰⁾。これは、微小血管系の動脈側に瞬間的な収縮が起り、ついで静脈側には拡張が生じ、血行停止はまず細静脈に発展し、つづいて毛細血管、最後に細動脈に起こる結果とされている。このように、凍結による生体の組織破壊については現在に至るも多くの説があり、いまだ決定的な考え方はないものと考えられる。

1. 低温到達と細胞破壊

凍結温度の深部への到達が腫瘍組織破壊に大きく左右する。渡辺³⁸⁾は、家兎腰背部を用い、天羽³⁹⁾は家兎の頸骨を用いて生体組織内の温度変化を測定し、その結果、プローベ先端温度が -196°C であっても、接触部直下の温度は -100°C 以上であり、 -20°C を境に壊死部と生存部を分けることができ、凍結による組織破壊は -20°C が一つの目安となると報告している。本実験において腫瘍組織を先端温度 -60°C のプローベを用いて凍結すると、プローベ直下の組織内温度が -20°C に到達することが判明し、病理学的にもこの部の腫瘍組織破壊が著明であった。このことは、 -60°C のプローベを用いた場合の破壊は、表層においてみられることを意味している。しかも、腫瘍組織のプローベ直下で -20°C に達するのに90秒を要し、その後凍結を続行しても大きな温度変化はみられず、腫瘍組織表層においてのみ破壊効果がみられる温度に達しているものと考えられる。Gage⁴⁰⁾は、骨細胞の破壊は 0°C で、皮膚、粘液腺細胞は -10°C で、メラノサイトは $-3\sim-14^{\circ}\text{C}$ で、扁平上皮は -30°C で死滅すると述べ、Neel ら^{41,42)}は、腫瘍組織の破壊には -30°C 以下の温度が必要で、繰り返し凍結することで1回目の凍結よりさらに深部への低温伝導性を高められるとしている。凍結外科療法において最す効果をみるには、rapid freezing and slow thawing が重要とされ、腫瘍の治療のための凍結外科療法は、深

部組織の破壊が重要目標とされる。そのために、いかにして深部へ増殖している腫瘍細胞を破壊するかという手段を得ることにある。すなわち、短期間に繰り返し凍結操作を行うことは、腫瘍組織破壊の目的では重要な事項であり、深部腫瘍組織の破壊を可能にしている。本実験においても、凍結1回と3回を比較した場合、腫瘍組織破壊に著明な差異がみられ、繰り返し凍結操作の重要性がうかがえた。

Iida ら⁴³⁾は、凍結後の腫瘍組織破壊を経時的に観察し、凍結後24時間で、凍結された腫瘍組織と凍結されない腫瘍組織では、異なった H-E 染色性を示すと述べている。凍結後1週間目では、壊死に陥り、炎症性細胞がみられ、凍結後2週間目には、表層の上皮再生がみられ、4週間目では腫瘍組織の増殖、浸潤がみられると報告している。門田⁴⁾は、扁平上皮癌症例の凍結後の電顕像について報告し、比較的障害の軽い場合には、核の輪廓は不整形となり、クロマチン顆粒が核膜周辺に凝集し、ミトコンドリアは腫大し、クリステが減少、消失し、粗面小胞体は腫大して ribosome は部分的に脱落し、電子密度の低い無構造物質を入れると述べている。また、細胞障害の強い場合には、核膜の不連続部の出現、核質の胞体内への流出を認める。細胞内小器官は変性に陥るとしている。本実験では、凍結後1~3時間で、プローベ直下において、腫瘍細胞は壊死に陥り、HE の染色性が低下し、バラバラになった核のみが Feulgen 反応陽性を示し、すでに腫瘍細胞破壊の所見がみられた。この所見は、凍結6時間後においてもみられる。凍結後12時間では、核の Feulgen 反応は陰性となり、腫瘍表層の完全な細胞破壊がみられた。一般に、腫瘍細胞では細胞質内での核の占める割合は大きく、核内の DNA 量が顆粒状に多量 Feulgen 反応でみられるのが特徴である。しかし、凍結後6時間の完全破壊層下部の腫瘍細胞においては核の濃縮がみられ、細胞質内での核の占める割合が小となって、細胞間隙の拡大により細胞は円形状を呈する。電顕像においても表層の A zone では、急激な温度到達により、細胞膜の破壊、核崩壊、細胞内小器官の破壊がみられ、完全に細胞の形態をみることができない。その下部の B zone では、表層の A zone の破壊よりは軽度で、細胞間隙の拡大、desmosome の一部消失、細胞内小器官の腫大および核のクロマチンの凝集がみられる。すなわち、凍結による B zone の破壊は表層の A zone の破壊とは異なった所見がみられる。このことは、腫瘍細胞の表層と深部では、低温到達の違いにより細胞障害の程度が異なり、A, B zone では凍結壊死に関する異なった所見が得られたものと考えられる。

2. 凍結後の細胞破壊と組織細胞化学⁴⁴⁾

凍結後の腫瘍細胞破壊を電顕所見と酵素組織化学的所見とを比較した場合、プローベ直下では、凍結後短時間

に細胞内各器官の電子密度が低下し、なかには無構造様を呈するものがあり、酵素活性もみられない。しかし、その下部では、円形状および類円形状を呈したミトコンドリアがみられ、そのクリステは不明瞭となるが、この marker enzyme である SDH は、組織化学的にさまざまなホルマザン顆粒として観察され、凍結後短時間においてはまだ SDH の活性がみられるものと考えられる。LDH 活性は、低温到達による腫瘍組織の破壊により壊死部ではその活性は消失し、残存腫瘍組織には陽性を示す。この場合の LDH 活性陽性部で、壊死部と残存腫瘍組織との境界部の染色性が異なる。すなわち、凍結による腫瘍細胞破壊により境界部では残存腫瘍組織の染色性よりも低下し、び漫性に染色されている。このことは LDH の活性が細胞破壊により外へ漏出したものと考えられる。凍結 1 回では、腫瘍組織表層の壊死部に陰性を示し、残存腫瘍組織には陽性を示したが、凍結 3 回行うことで、さらに深部腫瘍組織まで低温到達がみられ、残存腫瘍組織の破壊を導き、腫瘍性の LDH 活性は消失してくるものと考えられる。そのため、凍結後の LDH アイソザイムパターンをみた場合でも、凍結 1 回では残存腫瘍の LDH 活性が存在するために腫瘍性パターンを示すが、凍結 3 回行うことで完全な腫瘍組織の壊死脱落をみるためにその部では LDH 活性が通常の骨格筋型を示すものと考えられる。G6PDH の活性は、凍結 1 回では残存腫瘍組織に陽性を示し、凍結 3 回行うことで、腫瘍組織の完全な壊死脱落をみ、この活性は陰性となる。ところが、LDH 活性と異なる点は、凍結 3 回後 3 日目に壊死部と健全部の境界に強い活性が LDH よりも早い時点で出現することである。この反応は、松村⁴⁵⁾が報告している上皮再生の際に出現する反応と一致しているものと考えられる。

通常 ALP 活性は、正常粘膜上皮細胞にはみられず、腫瘍化に伴う炎症性細胞浸潤と線維形成過程の細胞に反応がみられる。ALP 活性は、凍結後短時間では壊死部でもわずかに陽性をみ、残存腫瘍間質においても陽性を示す。すなわち、凍結壊死部におけるわずかな反応は、炎症性細胞の破壊によるもので、凍結後短時間では ALP 活性が壊死部にも存在するものと考えられる。残存腫瘍間質の反応は、本来凍結により破壊されなかった炎症性細胞および血清中のものと考えられる。また、凍結による毛細血管の拡張により腫瘍間質には主として好中球の浸潤がみられ、この浸潤性細胞は繰り返して凍結することさらに破壊されることが予想される。そのために、凍結 1 回後に壊死部境界に出現した ALP 陽性反応は、浸潤性細胞によるものと考えられる。

3. 凍結による腫瘍内微小循環系の変化

凍結後の局所微小循環系の変化^{30,46-52)}は、重要な病変の 1 つである。本実験においても血管等の病変を組織学的、電顕的方法、ALP 活性による毛細血管内皮細胞、

血管造影法⁵³⁾で観察した。

上皮性腫瘍組織⁵⁴⁻⁶²⁾は、その腫瘍細胞の増殖に伴って毛細血管の新、増生が著しく、その血管等の形態は造影法により観察されている。このような血管系に富む腫瘍組織の凍結による微小循環系の変化についての詳細な報告は少ない。本実験では、プローベ直下で腫瘍組織が完全に破壊される A zone に毛細血管の内皮細胞の破壊による出血がみられること、その下部の B zone では、腫瘍組織内の血管が著しく拡張していることなどが判明した。これらの状態を ALP 染色で観察すると、A zone では血管壁の ALP 活性は消失している。その下部の B zone では、拡張した毛細血管壁に ALP 活性がみられ、血管壁(内側)に白血球が付着している。この部位においては凍結後 1 日目で血栓形成がみられ、HE 染色で eosinophilic で、無構造な染色性を示す。すなわち、この血栓形成は、凍結による刺激で血管内皮細胞に変化が生じ、血管壁に血小板、フィブリンの付着による血流の停止と、血管内外の透過性の不均衡等の諸因子、つまり血液凝固機転が生じたものと考えられる。これまでの報告³⁰⁾では、凍結後生じる血栓形成が 2 次的に細胞破壊につながると思われる。しかし、腫瘍組織を凍結した場合においては、血栓形成のみみられる血管の上部腫瘍細胞が生存し、増殖する所見がみられた。凍結により腫瘍組織内毛細血管の変性する場合には、低温度による血管内皮細胞の破壊(A zone)と、内皮細胞は破壊されないが、低温による障害がみられる種類があるものと考えられる。血栓形成がみられるにもかかわらず、腫瘍細胞の残存が観察されるのは、腫瘍細胞破壊に必要な低温度にまで及ばなかったことを示している。このことは、2 次的な血行障害による腫瘍細胞の変化はみられないものと考えられ、低温到達範囲に一致して腫瘍細胞の破壊、つまり凍結壊死(cryonecrosis)が生じるものと考えられる。臨床的に血管腫の治療に凍結外科療法が応用されているのは、凍結による血栓形成が一要因としてあげられる。

血管造影の結果、凍結後 1 時間では、腫瘍組織内の B zone では造影剤の注入がみられるが血流が減少しているために造影剤の注入が少なく、凍結後 3 時間では、B zone においては拡張した太い血管以外には造影剤の注入がみられなくなり、血行障害が進行しているものと考えられる。さらに、凍結後 6 時間では、A, B zone には造影剤の注入は全くみられなくなり完全な血行停止が生じている。しかし、C zone では、低温到達がみられないためと、この部では、腫瘍組織内への栄養血管が太いために全く影響を受けていない。

以上のことより、腫瘍組織の完全破壊を得るためには、深部組織への低温到達が直接腫瘍組織破壊に重要であることが判明した。そのためには、凍結方法、回数、プローベの温度等が重要な因子となり、臨床的に応用す

る場合でも、腫瘍の増殖形式、その大きさ、解剖学的位置を十分に考慮しなければならないものと考えられる。

結 論

ハムスター頬嚢実験癌に対する凍結外科療法の効果を組織学、酵素組織学、電気泳動法、および血管造影法により、凍結融解後、経目的に観察することで以下の結論を得た。

1. 凍結後の腫瘍組織内温度変化について

-60°C のプローベを用いた場合、腫瘍組織内表層で -20°C に達するまでに 90 秒を要し、それ以上の凍結を続行しても温度低下はほとんどみられなかった。また、凍結 1 回と 3 回を比較した場合、腫瘍組織内温度到達に変化がみられ、凍結 3 回では深部まで低温の到達がみられ、腫瘍組織の完全な壊死脱落がみられた。つまり、腫瘍組織の破壊には、凍結回数が比例的関係を示した。

2. 病理学的変化について

光顕的に腫瘍組織破壊は、プローベ直下の低温が直接到達する層 (A zone) に最も著しい破壊像がみられ、細胞質内に変性、核の崩壊がみられたが、その下部 (B zone) では、凍結融解後 6~12 時間目に細胞の空胞変性、核の濃縮した像がみられた。Toluidine blue (pH 7.0) では、細胞質は無染色性に、核のみが濃染された像がみられた。低温到達のみられない部位 (C zone) では、腫瘍細胞は残存し、toluidine blue (pH 7.0) 染色で細胞質、核ともに濃染された。電顕的には、A zone では急激な細胞破壊により細胞構造が不明瞭となり、電子密度の低い無構造様物で占められる。B zone では、凍結融解後 1~3 時間に細胞間隙の拡大、desmosome の消失がみられ、細胞内小器官は腫大し、核の電子密度が低下し、一部に核膜の断断がみられた。

3. 微小循環系の変化について

凍結融解後 1~3 時間の A zone では、急激な低温により血管破綻が生じ、赤血球の漏出がみられた。B zone では、血管壁の拡張がみられ、血管内に赤血球の膠着がみられた。この B zone での内皮細胞は、HE 染色、Feulgen 反応ともに陽性であった。

4. 酵素組織化学について

パラフィン切片による凍結融解後短時間の ALP 活性は、A zone にわずかに陽性を示し、B, C zone では強くみられる。また、B zone では拡張した内皮細胞に ALP 活性が陽性を示し、血管外にも ALP 活性の浸潤細胞がみられた。凍結切片による ALP 活性は、凍結 1 回後 7 日目では、表層の壊死部 (A zone) では陰性で、B, C zone の残存腫瘍組織には強い反応がみられた。凍結 3 回 3 日後では、腫瘍組織は完全に破壊され壊死に陥り、ALP 活性は陰性を示すが、境界部には強い活性がみられた。SDH 活性は、凍結融解後壊死部には陰性で、

境界部には大小さまざまなホルマザン顆粒形成がみられ、残存腫瘍組織には強陽性を示した。LDH 活性は、凍結 1 回後 7 日目では、壊死部に陰性で、残存腫瘍組織に陽性を示した。凍結 3 回後 3 日目では、腫瘍組織の LDH 活性はみられなかった。G6PDH 活性は、壊死部では陰性で、凍結 3 回後 3 日目では、境界部に最も強い反応がみられた。

5. LDH アイソザイムについて

ハムスター頬粘膜癌における腫瘍組織のパターンは、LDH 1, 2 の低下と、LDH 5 の著明な上昇がみられた。凍結 1 回後 7 日目では、腫瘍組織の残存により、LDH アイソザイムは、腫瘍性パターンを示した。凍結 3 回後 3 日目では、腫瘍組織の完全な壊死脱落により、正常パターンに近似したものを示した。

本研究にあたり終始ご懇篤なご指導、ご校閲を賜った森昌彦教授に深甚なる謝意を表します。また、終始ご協力いただいた本学口腔外科学教室各位に感謝の意を表します。

引 用 文 献

- 1) Cooper, I.S.: Cryogenic surgery: A new method of destruction or extirpation of benign or malignant tissues. *New Eng J Med* 268: 743 1963.
- 2) Klavin, J.V., Shingleton, W.W. and Fuson, R.L.: Effects of gastric freezing on dogs. *Cryobiology* 2(6): 328 1966.
- 3) 門田正義, 法貴 昭: 眼瞼、眼窩腫瘍に対する冷凍手術. *臨眼* 25: 1727 1971.
- 4) 門田正義: 冷凍手術の腫瘍に及ぼす変化に関する臨床的並びに組織学的観察. *日眼会誌* 77 (10): 155 1973.
- 5) Kaplan, J., Brosman, S. and Kudish, H.: The effect of cryogenic freezing of the dog bladder. *J Urol* 97: 261 1967.
- 6) Ostergard, D.R. and Toumsend, D.E.: The treatment of vulvar condyloma acumiata by cryosurgery. *Cryobiology* 5(5): 340 1969.
- 7) Zarcarian, S.A. and Adham, M.: Cryotherapy of cutaneous malignancy. *Cryobiology* 2(4): 212 1966.
- 8) 法貴 昭: クライオサージャリーの検討——扁平上皮癌を中心として. *耳喉* 42: 571 1970.
- 9) Cahan, W.G.: Cryosurgery of malignant and benign tumors. *Fed Proc* 24: 241 1964.
- 10) Gage, A.A., Koepf, S., Wehrle, D. and Emings, F.G.: Cryotherapy for cancer of the lip and oral cavity. *Cancer* 18: 1646 1965.
- 11) Gage, A.A.: Cryotherapy for oral cancer, *JAMA* 204: 844 1968.
- 12) Gage, A.A.: Cryosurgery for oral and pharyn-

- geal carcinoma. *Am J Surg* 118: 669 1969.
- 13) Zacarian, S.A.: Cryosurgery of tumors of skin and oral cavity. ed. 1, Thomas Pub, Springfield, 1973, p 55.
- 14) Sako, K., Marchetta, D. and Hayes, R.: Evaluation of cryosurgery in the treatment of intra-oral leukoplakia. *J Cryosurgery* 2: 239 1969.
- 15) Goode, R. and Spooner, T.: Office cryotherapy for oral leukoplakia. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 75: 968 1971.
- 16) Huang, T., Kim, K., Lynch, J., Doyle, J. and Lewis, R.: The use of cryotherapy in the management of intra-oral hemangioma. *South Med J* 65: 1123 1972.
- 17) Chandler, J.R.: Cryosurgery for recurrent carcinoma of the oral cavity. *Arch Otol* 97: 319 1973.
- 18) Leopard, P.J. and Poswillo, D.E.: Practical cryosurgery for oral lesions. *Br Dent J* 136: 185 1974.
- 19) Malmström, M. and Loikomaa, H.: Experiences with cryotherapy in the treatment of oral lesions. *Proc Finn Dent Soc* 76: 117 1980.
- 20) Salley, J.J.: Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the syrian hamster. *J Dent Res* 33(2): 253 1954.
- 21) Salley, J.J.: Histologic changes in the hamster cheek pouch during early hydrocarbon carcinogenesis. *J Dent Res* 36(1): 48 1957.
- 22) Santis, H., Shklar, G. and Chauncey, H.H.: Histochemistry of experimental induced leukoplakia and carcinoma of the hamster buccal pouch. *Oral Surg* 17(2): 207 1964.
- 23) Shklar, G.: The effect of cortisone on the induction and development of hamster-pouch carcinoma. *Oral Surg* 23(2): 241 1967.
- 24) Mock, D. and Main, J.H.: The effect of DMBA on hamster cheek pouch mucosa in vitro. *J Oral Pathol* 9: 270 1980.
- 25) Marefat, M.P., Albright, J.T. and Shklar, G.: Ultrastructural alterations in experimental lingual leukoplakia and carcinoma. *Oral Surg* 47(4): 334 1979.
- 26) Mori, M., Miyaji, T., Murata, I. and Nagasuna, H.: Histochemical observations on enzymatic processes experimental carcinogenesis in hamster cheek pouch. *Cancer Res* 22(11): 1323 1962.
- 27) Meryman, H.T.: Mechanics of freezing in living cells and tissues. *Science* 124: 515 1956.
- 28) 朝比奈英三, 久田洋子, 江村牧人: 急速凍結融解された腫瘍細胞の生存. *低温科学生物編* 25: 81 1972.
- 29) 法貴 昭: cryosurgery の展望. *耳喉* 44(5): 307 1972.
- 30) 法貴 昭: クライオサージェリーと微小循環. *耳喉* 44(1): 63 1972.
- 31) 法貴 昭: cryosurgery. *日耳鼻* 79: 712 1976.
- 32) 永井 徹: 凍結外科 cryosurgery, その経験と展望. *歯界展望* 44(6): 872 1974.
- 33) Whittaker, D.K.: Low temperature surgery of the oral mucosa: A review of the biological factors and clinical applications. *J Dent* 2(3): 92 1974.
- 34) Whittaker, D.K.: Ice crystals formed in tissues during cryosurgery. 1, Light microscopy. *Cryobiology* 11: 192 1974.
- 35) Whittaker, D.K.: Ice crystals formed in tissues during cryosurgery. II. Electron microscopy. *Cryobiology* 11: 202 1974.
- 36) David, T., Wilkes, I. and Fraunfelder, F.T.: Principles of cryosurgery. *Ophthalmic Surg* 10(8): 21 1979.
- 37) Seim, H.B. III.: Mechanisms of cold-induced cellular death. *Vet Clin North Am* 10(4): 755 1980.
- 38) 渡辺邦一: 冷凍外科に関する実験的研究, 組織内温度と組織変化. *日口外誌* 20(5): 406 1974.
- 39) 天羽 峻: 冷凍外科に関する実験的研究, 顎骨内温度と組織変化. *日口外誌* 21(4): 61 1975.
- 40) Gage, A.A.: What temperature is lethal for cells?. *J Dermatol Surg Oncol* 5(6): 495 1979.
- 41) Neel, H.B. III., DeSanto, L.W.: Cryosurgical control of cancer: Effects of freeze rats, tumor temperature and ischemia. *Ann Otol* 82: 716 1973.
- 42) Neel, H.B. III., Ketcham, A.S. and Hammond, W.G.: Cryonecrosis of normal and tumor bearing rat liver potentiated by inflow occlusion. *Cancer* 28: 1211 1972.
- 43) Iida, T. and Iranpour, B.: The effect of deep freezing on hamster cheek pouch carcinoma. *Oral Surg* 34(5): 844 1972.
- 44) Johnson, B.E. and Daniels, F. Jr.: Enzyme studies in experimental cryosurgery of the skin. *Cryobiology* 11: 222 1974.
- 45) 松村隆司: 冷凍創治療過程の組織化学的研究. *日口外誌* 24(2): 217 1978.
- 46) Zacarian, S.A., Ston, D. and Clater, M.: Effects of cryogenic temperatures on microcirculation in the golden hamster cheek pouch. *Cryobiology* 7: 27 1970.
- 47) Whittaker, D.K.: Cryosurgery of the oral mucosa: A study of the mechanisms of tissue damage. *Dent Pract* 22(12): 445: 1972.
- 48) Buch, B., Papert, A.I. and Shear, M.: Microscopic changes in rat tongue following experi-

- mental cryosurgery. *J Oral Pathol* 8: 94 1979.
- 49) Bowers, W.D. Jr., Hubbard, R.W., Daum, R.C., Ashbaugh, P. and Nilson, E.: Ultrastructural studies of muscle cells and vascular endothelium immediately after freeze-thaw injury. *Cryobiology* 10: 9 1973.
- 50) 西尾 仁: 凍結によるマウス皮膚血管系機能の障害と回復. *愛院大歯誌* 12: 23 1974.
- 51) Rabb, J.M., Renaud, M.L., Brandt, P.A. and Whitt, C.W.: Effect of freezing and thawing on the microcirculation and capillary endothelium of the hamster cheek pouch. *Cryobiology* 11: 508 1974.
- 52) Giampapa, V., OH, C. and Anfse, A. Jr.: The vascular effect of cold injury. *Cryobiology* 18: 49 1981.
- 53) 上田 実, 鳥居修平, 岡 達 ラット皮膚の microangiography の手技. *形成外科* 13(6): 627 1980.
- 54) Neyazaki, T., Ikeda, M., Mitsui, K., Kimura, S., Suzuki, M. and Suzuki, C.: Angioarchitecture of pulmonary malignancies in humans. *Cancer* 26: 1246 1970.
- 55) Vracko, R. and Benditt, E.P.: Basal lamina: The scaffold for orderly cell replacement. Observations on regeneration of injured skeletal muscle fibers and capillaries. *J Cell Bio* 55: 406 1972.
- 56) 藤本 淳, 竹重順夫: 血管内皮の構造と機能. *細胞* 4(7): 2 1972.
- 57) 浜 清: 毛細血管の微細構造. *血液と脈管* 3(5): 69 1972.
- 58) Folkman, J.: Tumor angiogenesis factor. *Cancer Res* 34: 2109 1974.
- 59) Hirano, A. and Matsui, T.: Vasucular structures in brain tumors. *Hum Pathol* 6(5): 611 1975.
- 60) Ludatscher, R.M., Gellei, B. and Barzilai, D.: Ultrastructural observations on the capillaries of human thyroid tumors. *J Pathol* 128(2): 57 1978.
- 61) 鈴木磨郎, 堀 勝義, 阿部郁夫, 他: 腫瘍血管の機能的特殊性. *癌と化学療法* 6: 287 1979.
- 62) 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(2): 175 1982.
-

写 真 説 明

写真 1, 2 凍結 1 回後 1～3 時間目の組織破壊像

A zone の表層では、すでに核崩壊、細胞の壊死像がみられる。その下部では、核の濃縮、細胞の空胞変性がみられる。(H-E, $\times 100$).

写真 3, 4 凍結 1 回後 6～12 時間目の組織破壊像

低温の影響が B zone に及び、核の濃縮がみられ、核の周囲に無染色性がみられる(写真 3: H-E, $\times 100$ 写真 4: H-E, $\times 400$).

写真 5, 6 凍結 1 回後 1～3 時間目の A zone の電顕像

細胞間隙の拡大, desmosome の消失がみられ、細胞小器官は破壊され、電子密度も低下している(写真 5: $\times 5,000$ 写真 6: $\times 12,300$).

写真 7 凍結 1 回後 1～3 時間目の B zone の電顕像

細胞間隙の拡大、細胞小器官の腫脹、核周辺に小空胞様構造がみられる($\times 9,600$).

写真 8 凍結 1 回後 6～12 時間目の B zone の電顕像

細胞間隙はさらに拡大し、desmosome の消失がみられ、細胞小器官の変性および崩壊、核周辺に大空胞様構造がみられる($\times 20,160$).

写真 9～12 凍結 1 回後 1 日目の組織破壊像

低温到達のみられた腫瘍細胞では、細胞質の無染色性と核の濃縮された像がみられるが、低温到達のみられない腫瘍細胞は残存し、濃染される(写真 9, 11: H-E $\times 100$ 写真 10, 12: Toluidine blue (pH 7.0) $\times 100$).

写真 13, 14 凍結 1 回後 1 日目の血栓形成のみられた腫瘍間質(写真 13: H-E, $\times 100$ 写真 14: Toluidine blue (pH 7.0), $\times 100$).

写真 15, 16 凍結 1 回後 1～3 時間目の B zone

拡張した毛細血管像がみられる(写真 15: H-E, $\times 40$ 写真 16: H-E, $\times 400$).

写真 17～20 凍結 1 回後 1～3 時間目の ALP 局在

血管壁および白血球に陽性を示す ALP 活性は、凍結後血管壁には陰性で、血管外の浸潤性細胞に陽性を示す(写真 18: $\times 40$ 写真 17, 19, 20: $\times 400$).

写真 21 凍結週 1 回後 7 日目の SDH 局在

残存腫瘍細胞に強陽性を示す。境界部では、大小さまざまなホルマザン顆粒がみられる($\times 40$).

写真 22 凍結週 1 回後 7 日目の G6PDH 局在

残存腫瘍細胞に強陽性を示す($\times 40$).

写真 23～25 凍結週 3 回後 3 日目の酵素局在

凍結 3 回行うことにより腫瘍組織は完全に壊死に陥り、酵素活性はみられない。境界部に強い活性がみられる(写真 23: ALP, $\times 100$ 写真 24: SDH, $\times 100$ 写真 25: G6PDH, $\times 100$).

写真 26 正常ハムスター頬囊粘膜毛細血管像($\times 5,000$).写真 27 実験癌毛細血管像($\times 8,500$).

写真 28 凍結 1 回後 1～3 時間目の A zone

内皮細胞の完全なる破綻がみられる($\times 6,800$).

写真 29, 30 凍結 1 回後 1～3 時間目の B zone

内皮細胞に障害がみられ、血管内に血球成分の残留がみられる。血管壁のミトコンドリアは不明瞭である(写真 29: $\times 8,200$ 写真 30: $\times 48,000$).

写真 31 無処置実験癌の血管造影像

腫瘍間質毛細血管の新、増生により表層でループ状を呈する大数の毛細血管がみられる。

写真 32 凍結後 1 時間目の血管造影像

A zone の毛細血管には造影剤の注入がみられず、B zone では多少の造影剤の注入がみられる。

写真 33 凍結後 3 時間目の血管造影像

A, B zone のほとんどの毛細血管には造影剤の注入がみられない。

写真 34 凍結後 6 時間目の血管造影像

A, B zone の完全な血行停止がみられる。C zone では、従来の血行がみられる。