VX₂ 癌上顎洞移植家兎における腫瘍および頸部リンパ節の分析電子顕微鏡所見について

北村 晃・井口 次夫

Analytical electron microscopic findings in the tumor and cervical lymphonodes of the rabbits bearing VX₂ carcinoma trasplanted into the maxillary sinus

Akira KITAMURA・Tsugio INOKUCHI

Abstract: The essential metal metabolism of the neoplastic disease has been investigated on its serum level and isoenzyme. There are few reports on the essential elements analysis of the neoplastic tissue, muscle and lymphonodes.

The VX₂ carcinoma, transplanted into the maxillary sinus of the domestic rabbits, was prepared for the research of the findings of the microscope, scanning electron microscope and X-ray microanalyzer (XMA).

The movement of phosphate and karium had little change and showed the reverse peak between the controled muscle and the tumor. The local lymphonode of the rabbit, bearing the tumor at the maxillary sinus, indicated almost the same pattern in each lymphonode on the XMA findings. The karium in the lymphonode showed the highest peak at the inner layer of the vessel.

Key words: VX₂ carcinoma, lymphonodes, analytical electron microscope

緒 言

過去われわれは、血漿中銅、亜鉛の変動について詳細な検討を加え、Cu/Zn 比の臨床的意義についても報告してきた¹⁾。また、実験的に VX₂ 癌を大腿筋肉内に移植した家兎を用いて VX₂ 癌腫瘍および各組織別に含有銅、亜鉛量を測定し、それらの腫瘍発育過程での推移を担癌生体の微量金属の面より研究してきた²⁾。VX₂ 癌を移植した家兎の実験では、上顎癌増殖態度³⁾や酵素活性⁴⁾の検討はみられるが、上顎洞内癌腫瘍および所属リンパ節の必須金属の分布に関する報告はみられない。そこで今回、われわれは、VX₂ 癌を上顎洞内に移植した家兎の癌腫瘍および頸部リンパ節における必須金属代謝をそ

れぞれの断面にて、走査型電子顕微鏡 (SEM, ASID-S) と X 線マイクロアナライザー (XMA, KEVEX 5500) にて分析検討した。今回の XMA 所見は、担癌生体における必須元素の組織断面における分布状態を示すもので、この所見について若干の考察を加え報告する。

実験動物と対象試料

実験動物としては、体重 2.5 kg 前後の雄家兎 (日本白色) を使用した。家兎は購入後、恒温条件下の動物舎にて固型飼料 (RC-4) と水で 1 週間以上飼育し、十分に環境に順応させた後、VX₂ 癌移植を行った。継代中の VX₂ 癌担癌家兎より得た VX₂ 癌細胞浮遊液約 5 × 10⁶ 個を上顎洞内に移植した。約 5 週間後に家兎を屠殺、脱血したのち、移植癌、癌周囲筋肉、および所属リンパ節の一部をそれぞれ摘出して試料とした。試料は 2 分割し、一方を光顕用としてホルマリン固定、他方は凍結乾燥を行い、走査型電子顕微鏡 (SEM) と X 線マイクロアナライザー (XMA) 用試料とした。

長崎大学歯学部口腔外科学第 2 講座

(主任: 井口次夫教授)

Second Department of the Maxillofacial and Oral Surgery, School of Dentistry, University of Nagasaki (Chief: Prof. Tsugio Inokuchi)

受付日: 昭和60年10月21日

写真 1 VX_2 癌上顎洞内移植 5 週目, 家兎頭部水平断面
(a : 等倍 b : 100倍)

写真 2 VX_2 癌上顎洞内移植家兎癌腫瘍 (癌浸潤部) (a), 癌周囲筋 (咬筋非浸潤部) (b) の SEM 像および, a, b の XMA 所見 (c, d)

写真3 健康家兎咬筋凍結乾燥 SEM 像 (a) と XMA 所見 (b)

写真4 健康家兎顎下リンパ節 SEM 像 (a) と XMA 所見 (b)

実験結果

移植後5週目では、上顎洞内に移植された VX₂ 癌腫は骨を破壊し、周囲筋に浸潤する (写真1-a)。その境界は比較的明瞭である (写真1-b)。電顕像では、癌腫、筋肉ともに網目状を呈していた (写真2-a, b)。VX₂ 癌腫とその周囲筋および対照家兎咬筋のそれぞれの XMA 所見では (写真2-c, d, 3-b) に示すごとく左側より、リン (P)、イオウ (S)、塩素 (Cl)、カリウム (K) のピークがみられ、8.00 の銅 (Cu)、8.64 の亜鉛 (Zn) のピークと思われるものもみられた。

また、癌腫と周囲筋では、2.00 の P、3.34 の K との比が逆転しており、また癌腫では S のピークが相対的に低かった (写真2-c, d)。

健康な咬筋では、VX₂ 癌腫および周囲筋に比べ Cl のピークが低かった (写真3-b)。また、健康家兎リンパ節断面でのリンパ濾胞は電顕的にも確認でき、この XMA 所見では左側より筋肉と同様に、P、S、Cl、K、Cu および Zn のピークがみられた (写真4-a, b)。

VX₂ 癌上顎洞内移植家兎の患側顎下リンパ節 (写真

5, 6, 7)、および患側深頸リンパ節 (写真8) では、5週目でリンパ節洞内は拡張し、洞内腔は増生剝離した洞内皮細胞、好中球の出現がみられ、洞カタルの所見を呈していた (写真5~7, 8-b)。これらの凍結乾燥リンパ節の内腔は拡大し、絨毛状を呈し、中央の粗な部分と辺縁の密な部分に分かれているものもみられた (写真5-a, 6-a, 8-a)。これら各リンパ節の XMA 所見では、前述の筋肉、VX₂ 癌腫と同様、P、S、Cl、K に強いピークがみられ、また、Cu、Zn のピークもみられた。すなわち、リンパ節では、P のピークは K より高く、Cl と S のピークがこれに続いていた。これらのパターンはおおむね各リンパ節で共通していたが、電顕像で明らかに、リンパ節断面で洞内の空洞化された部分には、血液成分も散見され、そのリンパ節の血管壁を思わせる内部では、K の動きが大きかった (写真8-e, f)。

考察

従来行われている組織片の固定、脱水包埋法では、その過程で大半の電解質元素は流失してしまい、特殊な電解質に対する沈澱固定法で、沈澱として、組織、細胞内

写真 5 VX₂ 癌上顎洞内移植家兎顎下リンパ節凍結乾燥断面 (a), 一部強拡大辺縁 (c), 中央部 (d) SEM 像, c, c の XMA 所見 (d, f), 同一リンパ節光顕写真 (b)

写真 6 VX₂ 癌上顎洞内移植家兎顎下リンパ節凍結乾燥剖面 (a), 一部強拡大 (c) SEM 像, c の XMA 所見 (d), 同一リンパ節光顕写真 (b)

に残るもの以外はX線分析法でとらえることができない。そこで、水平³⁾は電解質元素などのX線分析には可溶性標識化合物の流出を止める凍結切片法が最も信頼できる方法と述べている。しかしながら、凍結乾燥切片は、電顕像が悪いため、今回の実験では同一組織を2分割し、光顕にて組織を確認した。また、VX₂ 癌組織と周囲筋肉との境は、両者間に乾燥時組織片に亀裂が生じることに容易に識別し得た。

Saubermann ら⁶⁾は、種々の固定および試料作製法が常に生体条件に最も近い結果をもたらしているかという疑問をもち、標本作製過程における電解質の凝集、拡散、移動の可能性を指摘した。そして、凍結状態にて電顕像をみた結果、湿性凍結超薄切片が、X線分析上最も生体の自然の状態に近いと説明している。また一方で、凍結置換法を採用しての放射性アイソトープや原子吸光装置を用い、試料作製過程の電解質流失を実験的に検討した Harvey らの報告も散見される⁷⁾。これらの報告は、いずれも生体試料の形態観察と同時に電解質の定量・定性分析を行うことの困難さを示すものである。

現在のところ、凍結乾燥法は電解質を含む細胞成分をよりよく試料片に保存するといわれている。したがって今回、XMA で検索した試料はすべて新鮮組織を凍結乾燥した試料であり、電解質の流失はなかったものと思わ

れる。

XMA 所見上、Pのピークは2.00のK α で、Kのピークは3.58のK β である。水平³⁾は、低加速下では検出器は低X線エネルギースペクトル野に限られ、高加速に従い、高エネルギー野までX線エネルギーが検出されると報告している。したがって、今回の正常家兎咬筋および正常リンパ節断面での20 kV加速では、低エネルギーのP, Cl, S, Kなどが検出されたと思われる。このような条件下での筋肉のXMAは、正常家兎咬筋においてK:Pの比率は、バックグラウンドを除くと2:1に近くなった。Russ (1974)⁸⁾の定量的検討では、薄い切片内の元素濃度 (concentration) は、X線エネルギー強度 (I) に比例すると報告されているが、われわれのブロックでの断面表面分析も定量的な一面を示唆する所見であり、その有用性の一端を示したものと思われる。今回の定性分析では、周囲筋、VX₂ 癌・対照正常咬筋ともに同一時間、同一条件下で凍結乾燥させ、測定部位も摘出部位の中心に割を入れ、定性分析ながらもその測定条件をほぼ一定にしたものである。

人体のK⁹⁾の98パーセントは細胞内にあり、マグネシウム (Mg) とともに細胞内陽イオンを構成し、糖質代謝、心筋、骨格筋の電気的生理現象とも関連し、発熱、慢性消耗性疾患、組織崩壊などの細胞内蛋白異化亢進が

写真 7 VX_2 癌上顎洞内移植家兎顎下リンパ節凍結乾燥断面 (a), 一部拡大 (c) SEM 像, c の XMA 所見 (d), 同一リンパ節顕写真 (b)

あると多量の K イオン変動が血清中にみられる。それゆえ、血清 K イオンは必ずしも全体の K 代謝異常の指標とはなりがたい。K 欠乏時創傷の肉芽のあがりが悪いといわれ、 VX_2 癌腫瘍内では、正常組織の破壊と、 VX_2 癌細胞の増殖が行われ、タンパク質代謝も変化し、担癌生体における Ca, P イオン¹⁰⁾とともに K も変化していることが推察されるにもかかわらず、XMA 所見上、周囲筋と癌腫瘍内の K の顕著な動きはなかった。しかし、リンパ節の血管内壁での XMA では K のピークが強く、悪性腫瘍、洞カタルなどによる組織崩壊による K の細胞外液中への移動によるものと考えられた。

また、Cl¹¹⁾の70パーセントは細胞外液で、アミラーゼ活性は Cl を必要とし、Cl の吸収はナトリウム (Na) の能動輸送と共役している。しかし、Cl とタンパク質の結合は強く、体液や組織ではタンパク質と遊離しないとされている。ちなみに、リンパ液は 348 mg/dl、血漿は 369 mg/dl の塩素濃度である。

P¹²⁾は生体内の有機化合物の代謝には必須であり、アデノシン 3 リン酸 (ATP) のような高エネルギー化合物の形で細胞中に存在し、クレアチンリン酸は主として筋肉内にみられる。P の欠乏も明らかな臨床症状を起こすことはまれであるが、悪性腫瘍のように貧血を伴う場合、低無機リン血症がみられる場合もある。

担癌生体の顎部リンパ節の4種類のリン酸エステル (ベータグリセリン酸、アデノシン 3 リン酸、リホラビン 5 リン酸、5'-リン酸) の活性を調べた Pakhawy の報告¹³⁾では、慢性リンパ節炎で3つのリン酸エステルの活性に変化がみられたのに対し、リンパ肉腫ではベータグリセリン酸とアデノシン 3 リン酸に活性がみられ、他の2種類は活性がみられなかった。このように同じリン酸エステルでも病態によりその活性に差がみられ、その時のリンパ節の P 濃度にも当然差がみられたものと思われる。一般に無機リン酸¹⁴⁾は、血清中に遊離の形で存在し、腎不全では、尿中への排泄機能が低下し、高 P 血症を起こすともいわれる。 VX_2 癌上顎洞移植 5 週目では、家兎はおおむね食餌、水分摂取ともに悪くなり、当然、リン酸エステルの代謝異常をきたしていると思われるが、リンパ節における P の特異的な変化は定性分析上示されなかった。

また、 VX_2 癌移植家兎の血漿および諸組織中の Cu, Zn を調べた長坂¹⁵⁾の報告で、Zn は周囲筋では減少し、逆に腫瘍中では増加していた。同時に Cu は腫瘍中で周囲筋の 200 パーセント以上の増加を示していた。今回の定性分析は、同一試料台での VX_2 癌腫瘍と周囲筋の XMA による検討であり、Cu のピークに若干の差がみられたものの、ピークも小さく、その差異が確かなもの

写真 8 VX₂ 癌上顎洞内移植家兎深頸リンパ節凍結乾燥断面 (a), 一部拡大 (c, e) SEM 像, c, e の XMA 所見 (d, f), 同一リンパ節光顕写真 (b)

であるか否かは不明である。

結 論

1. 家兎上顎洞内に移植された VX_2 癌腫、周囲筋（咬筋非浸潤部）、健常咬筋および所属リンパ節の断面XMA所見では、P, S, Cl, K, Cu および Zn のピークがみられた。
2. VX_2 癌と健常咬筋および周囲筋（咬筋非浸潤部）では、P と K の比が逆転していた。
3. 移植5週目の頸部リンパ節では、洞カタルを示し、P のピークが強く、Cl, S のピークがこれに続き、その他の各リンパ節でもほぼ同様の XMA 所見を示した。

本研究は昭和53・54年度、文部省科学研究費奨励研究（A）によった。

引 用 文 献

- 1) 犬塚貞光, 荒木貞夫, 他: 悪性腫瘍患者血中銅および亜鉛量 (殊に Cu/Zn) について. 臨床病理 21: 632-635 1973.
- 2) 長坂公治, 北村 晃, 他: VX_2 癌移植家兎の血漿中銅および亜鉛量について (抄). 九州歯会誌 31: 192-193 1977.
- 3) 杉村正仁, 榎本雅有, 他: 家兎 VX_2 Carcinoma 移植による上顎洞癌モデルについて. 口科誌 22: 380-393 1973.
- 4) 岡部多加志: VX_2 癌上顎洞内移植家兎の組織における Superoxide dismutase アイソエンザイムの存在様式に関する研究. 九州歯会誌 34:

752-763 1981.

- 5) 水平敏知, Russ, J.C.: 分析電子顕微鏡. 日本メディカルセンター, 東京, 1978, 243-287頁.
- 6) Saubermann, A.J. and Echlin, P.: The preparation, examination and analysis of frozen hydrated tissue section by scanning transmission electron microscopy and X-ray microanalysis. J Microsc 105: 155-191 1975.
- 7) Harvey, D.M., Hall, J.L., et al.: The use of freeze substitution in the preparation of plant tissue for localization studies. J Microsc 107: 189-198 1976.
- 8) Russ, J.C.: The direct element ratio model for quantitative analysis of thin sections. in: Microprobe analysis as applied to cell and tissue, T. Hall., P. Echlin and R. Kaufmann, eds (Acad. Press, London, N.Y.), 1974, p 269.
- 5) より引用.
- 9) 玄香昭夫: カリウム. 日本臨床 40: 347-349 1982.
- 10) 安達 勇, 山口 建, 他: 悪性腫瘍における Ca, P 代謝異常. 日本臨床 40: 2751-2757 1982.
- 11) 小出 輝: 塩素. 日本臨床 40: 350-352 1982.
- 12) 川浦幸光, 佐藤日出夫, 他: 悪性腫瘍にみられるカルシウム, リンの代謝異常. 外科診療 23: 481-483 1971.
- 13) Pakhawry, M.T., Tarkhan, A.A., et al.: Histochemistry of normal and diseased human lymphonodes. Acta Anat 95: 279-286 1976.
- 14) 藤田拓男: 無機リン. 日本臨床 40: 358-359 1982.
- 15) 長坂公治: VX_2 癌移植家兎における血漿および諸組織中の亜鉛, 銅量に関する研究. 九州歯会誌 32: 833-851 1979.