家兎移植 VX2 癌の下顎骨浸潤に関する走査型電子顕微鏡学的研究

吉 嶺 秀 次

Scanning electron microscopic studies on invasion of VX2 carcinoma into the mandibular bones of domestic rabbits

Shuji YOSHIMINE

Abstract: For the purpose of clarifying the growth and infiltration into the mandibular bone by carcinoma cells, VX2 carcinoma cells were transplanted into the masseter of domestic rabbits and its mode of invasion was investigated with the light microscopy and the scanning electron microscopy (SEM) as well as the electron probe X-ray microanalyser (EPMA).

The results were as follows;

1. Light microscopic examination demonstrated that VX2 carcinoma cells formed substantial cellular foci localized to the masseter in the 1st week after transplantation, then destroyed the periosteum in the 2nd week, and infiltrated and proliferated within the mandibular bone in the 3rd and 4th weeks.

2. When the bone surface adjacent to the tumor was examined with SEM, a large number of resorption lacunae being irregular in shape were found in the VX2 carcinoma cell-infiltrating site of the mandibular bone. Small bone cavities were found at the bottom of resorption lacunae. Collagen fibers were running in various directions depending on the depth, some of them formed net-like patterns while others were fragmented.

3. X-ray microanalysis of the VX2 carcinoma cell-infiltrating site using EPMA demonstrated some decrease of Ca in the region adjacent to the tumor prior to infiltration of VX2 carcinoma cells into the mandibular bone. As the infiltration of VX2 carcinoma cells into the mandibular bone progressed, the peak level of Ca decreased significantly whereas almost no change was observed in the peak of P.

These results indicate that three dimensional examination of carcinoma-infiltrating site in the jaw bone using SEM combined with investigation of Ca distribution with EPMA might be a useful clinically and applicable tool in defining the margin of carcinoma infiltration into the jaw bone.

Key words: VX2 carcinoma(VX2 癌), bone invasion(骨浸潤), scanning electron microscopy (走査型電子顕微鏡)

緒 言

口腔領域に発生する悪性腫瘍とりわけ歯肉癌は、その

鹿児島大学歯学部第1口腔外科学教室
(主任：山下佐英教授)

First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Kagoshima University Dental School (Chief: Prof. Sukehide Yamashita)

受付日：平成3年11月20日

解剖学的な位置関係から、しばしば早期に顎骨へ浸潤増殖する。そして、顎骨へ浸潤した歯肉癌の治療としては、外科的治療が主体となり、広範な顎骨切除が必要とされる場合が多い。しかしながら、術後における口腔の機能的、審美的障害を考慮すると、適切な切除範囲を設定し、確実に腫瘍を切除することが必要である。そこで、適切な顎骨の切除範囲を決定するため、従来より臨床的に腫瘍により吸収された顎骨のX線所見や、光顕による病理組織学的所見を検索し、それらと腫瘍の悪性度や予後との関連をあきらかにしようとする試みがなさ

れてきた。悪性腫瘍における顎骨の吸収や破壊様式の相違は、腫瘍による骨吸収機序の違いによって生じるものと考えられるが、骨吸収機序に関しても、いまだ解明されていない問題が多く残っている。したがって、悪性腫瘍の顎骨への浸潤増殖の態度、およびその機序の解明は臨床的にもきわめて重要である。口腔領域においては、顎骨内に実験癌を移植し、その増殖様式を観察した報告¹⁾はあるが、顎骨周囲からの顎骨への浸潤様式を電子顕微鏡学的に観察した報告²⁾は、きわめて少なく、また、顎骨の腫瘍浸潤部位において、腫瘍増殖に伴う Ca 分布の変化も、十分には知られていない。

顎骨の腫瘍浸潤部位において生ずるであろう骨内 Ca、P イオンの分布や濃度の変化を分析し、また、浸潤部位の顎骨表面における三次元的超微構造との変化を比較検討することが、腫瘍による顎骨浸潤部位の範囲を決定するパラメータとなりうるならば、手術における切除範囲を決定しうる指標となり、治療成績の向上はもとより、手術後の口腔機能の低下や審美障害を最小限に食い止められ、quality of life の向上など、その臨床的意義は大きいものと考えられる。

そこで、著者は、家兎移植 VX2 癌を用いて、癌細胞の下顎骨への浸潤状況を知る目的から、経時的に、走査型電子顕微鏡（以下 SEM）による顎骨浸潤部の観察を行い、また、顎骨浸潤部における Ca と P の分布について、電子線プローブ X 線微小分析法（以下 EPMA）により検索し、若干の知見が得られたので、その研究結果を報告する。

実験材料および方法

1. 実験材料

1) 実験動物

実験動物は、体重 3 kg 前後の成熟雑系雌性家兎 50 羽を用いた。家兎は、恒温 ($22 \pm 1^\circ \text{C}$)、恒湿 ($55 \pm 5\%$) 条件下の動物舎にて、固形飼料（オリエンタル社製 RC 5）と水で 1 週間以上飼育した健康なものを用いた。

2) 実験腫瘍

実験腫瘍は、ヒトの扁平上皮癌に類似した組織型を有し、かつ家兎に可移植性である VX2 癌を用いた。なお、VX2 癌は、1985 年より、当教室にて家兎の大腿筋肉内に累代移植、維持されているものを使用した。

実験方法

1. 移植方法

家兎下顎骨骨膜上への移植は、VX2 癌細胞浮遊液（体積比 50%）0.1 ml を、触診にて確認された下顎骨下縁より顎骨に沿って、27 ゲージ注射針を用いて可及的に骨膜上部に、ゆっくりと緩圧的に注入することにより行った。

表 1 試料作成手順

2. 実験群

実験群は、VX2 癌移植後 1, 2, 3 週目群および 4 週目群とし、それぞれ 10 羽を実験に供した。また、対照群として正常家兎 10 羽を用いた。

3. 軟 X 線による検索

各実験群および対照群の家兎を対象として、ネブタールによる耳静脈からの全身麻酔下に開胸し、左心室からヘパリン加生理食塩水を灌流させた後、カルノフスキー固定液（2.5% グルタルアルデヒドと 2% パラホルムアルデヒドの混合液、0.1 M カコジル酸緩衝液、pH 7.4）にて灌流固定後、下顎骨を腫瘍とともに一塊として摘出し、頬舌方向および矢状方向から軟 X 線撮影（軟 X 線発生装置ソフテックス CSM-2 型 CMB-2 装置、ソフテックス社製）を行った。撮影条件は、管電圧 26 kVp、管電流 20 mA、照射時間 30 秒、距離 40 cm で行った。

4. 病理組織学的観察

一塊として摘出した試料は、X 線像上における下顎骨吸収の最深達部をダイヤモンドディスクを用いた硬組織切斷機（EXAKT 社製、BS-3000）にて、前額断方向に幅約 3 mm で 3～5 分割した。分割した試料の一部は、0.1 M カコジル酸緩衝液で洗浄した後、5% EDTA 溶液を用いて冷蔵庫内に約 1 週間脱灰操作を施して、パラフィン切片を作成し、H-E 染色を行った。

5. SEM 観察ならびに X 線微量元素分析

分割した試料の一部は、0.1 M カコジル酸緩衝液で洗浄した後、実体顕微鏡下でピンセットにて外骨膜の線維層を剝離後、1% トリブシン溶液中に、24 時間、37°C の恒温器中に放置し、骨基質の表層を被覆している細胞成分と、無定形の有機性基質を消化、除去した。表層の骨基質を露出させた試料を水洗後、軟組織を可及的に除去し、カルノフスキー固定液にて固定を施し、通法に従い上昇アルコール系列にて脱水後、t-ブタノール凍結乾燥法にて乾燥を行い、カーボン蒸着を施し、高分解能 SEM（日立製、S-4000）による三次元的超微形態の観察およびエネルギー分散型 X 線分析装置（堀場製、EMAX-2700）による Ca と P の定量分析（面分析）を行った（表 1）。

EPMA の分析条件は、加速電圧20 kV, 出力電流 5×10^{-10} nA, 測定時間200秒, 測定範囲 1 kcps と一定にした。

実験結果

1. 軟X線所見

軟X線所見では、対照群の正常家兔下顎骨は、緻密質と海綿質よりなり、特に歯槽部および下顎骨下縁部では、緻密質が大部分を占めていた（写真1）。移植後3週目より下顎骨体部皮質骨部に虫喰状の骨吸収像が認められるようになり、4週目には下顎骨下縁部にも虫喰状の骨吸収像が認められた（写真2）。

2. 病理組織学的所見

対照群である正常家兔の下顎骨は、厚く充実した緻密質と薄い梁にはぐれた海綿質とからなっており、緻密質の骨基質は層板構造を呈し、層板構造はおもにハバース管を中心としてほぼ同心円状に配列するハバース層板、ハバース層板とハバース層板の間には介在層板および内・外基礎層板から構成されている。また、層板構造内にフォルクマン管が散見される部位も観察された。また、骨基質には多数の骨小腔が点在し、そのなかには比較的クロマチンに富み配列が不規則な核と、やや塩基好性で明調な細胞質からなる骨細胞が認められた（写真3）。

移植後1週目では、VX2 癌細胞は移植部位の咬筋内に限局した充実性胞巣を形成し、また、腫瘍胞巣を取り囲むように軽度のリンパ球、好酸球や形質細胞を主とした炎症性細胞浸潤が認められた（写真4）。

移植後2週目になると、VX2 癌細胞は周囲組織に浸潤性増殖を開始し、筋組織に沿い、また、組織間隙へと浸潤傾向を示し、骨膜に達していた。腫瘍の辺縁部およびその周辺部では第1週目と比較して、より著明なリンパ球、好酸球や形質細胞などの炎症性細胞の浸潤が認められた（写真5）。

移植後3週目では、VX2 癌細胞が下顎骨の皮質骨へ浸潤増殖している像が観察された。皮質骨は、虫喰状に破壊され、腫瘍組織の最先端部では、著しく拡大したハバース管内やフォルクマン管内へと VX2 癌細胞が浸潤、増殖し小胞巣を形成しており、管壁の吸収や拡大などがより著しい部位では、互いに融合し、不定形の吸収像を呈している部位も観察された。また、吸収、拡大したハバース管やフォルクマン管の管内壁に、比較的少数の破骨細胞が認められた（写真6）。

移植後4週目では、VX2 癌細胞は、索状または塊状に増殖し、皮質骨の大部分を虫喰状に破壊しながら増殖していた。VX2 癌細胞の浸潤に伴いハバース管やフォルクマン管の管内壁に破骨細胞が散在し、管内壁の吸収、拡大、さらに融合などの所見が、3週目に比較して一層著明にまた広範囲に認められた（写真7）。

3. SEM 所見

1) 対照群

正常成熟家兔の下顎皮質骨の表面の大部分は、休止状態を呈し、形成も吸収も認められず、低倍率の所見では、多少の起伏はあるが比較的平坦な構造を呈し、表面を形成している密な膠原原線維束は、全体的には一定方向に走行する部分が多く、互いに交錯していた（写真8）。拡大像では、定向性を示す密な膠原原線維で形成されている部分が多く観察されたが、膠原原線維束の側方からは、多数の膠原原線維束が分枝し、隣接している膠原原線維と結合し、各所に密な網状構造が形成されている部分が認められた（写真9）。網状構造を呈している膠原原線維には直径30 nm 前後の顆粒状構造物が付着しており、部分的には、きわめて多数の顆粒状構造物の付着が観察され、膠原原線維は、直径が80~90 nm で周期的な横紋構造が明瞭に認められた（写真10）。

2) 実験群

VX2 癌移植後1週目においては、対照群におけるSEM所見とはほぼ同様の所見を呈していた。

VX2 癌移植後2週目における骨表面の低倍率の所見では、移植後1週目の所見と大部分は同一の所見を呈するが、一部に表面が凹凸不整で骨縁は、不規則、不定形の湾状や圧痕状の吸収窩が観察された（写真11）。一方、同部の高倍率の所見では、窩底に膠原原線維が露出されている吸収窩が多数観察され、膠原原線維は部分的には密で一定方向に走向しているが、一個の吸収窩底においても、窩底の浅部と深部では、膠原原線維の走向が異なり、膠原原線維の断端が観察される部分も認められた（写真12）。

VX2 癌移植後3週目における皮質骨表面の低倍率の所見では、表面は凹凸不整で広範囲にわたってきわめて多数の不定形で大小さまざまな吸収窩が観察された（写真13）。一方、同部の高倍率の所見では、各吸収窩は種種異なった走行を示す膠原原線維束や破骨細胞の骨基質吸収によって断裂している膠原原線維が認められるところもあり、吸収断端は丸みをおびていた（写真14）。

VX2 癌移植後4週目における腫瘍浸潤部位の低倍率の所見では、移植後3週目と比較して表面が著しく凹凸不整で、きわめて不規則、不定形を呈し、それらの骨表面にはきわめて多数の骨吸収窩が密在していた（写真15）。一方、同部の高倍率の所見では、各吸収窩は3週目と比較して一段と大きく、しかも深く、窩底は不整で鋭利な像を呈し、3週目と同様に窩内の深さによって種種異なった走行を示す膠原原線維束や吸収により露出した骨細管や骨小腔などの像が多数認められた（写真16）。吸収窩底には、3週目と同様に露出したきわめて密な網状構造を呈している膠原原線維が認められるが、破骨細胞の骨基質吸収によって断裂している膠原原線維が3週目と比較して多数認められ、かつ吸収窩底の膠原原線維

表 2 Ca, P 重量%濃度

	対照群	1 週目	2 週目	3 週目	4 週目
Ca(WT%)	64.92	63.67	61.24	60.51	57.75
P (WT%)	31.42	31.68	32.46	34.97	33.87
Ca/P	2.07	2.01	1.89	1.73	1.71

表 3 Ca/P 比率

の走行が不規則であった (写真17)。

4. X線微量元素分析成績

1) 対照群

正常下顎骨の皮質骨部を EPMA を用いて面分析した結果, Ca, P, S などの元素が検出された (写真18)。なお, 同部の面分析により元素分布を検索した結果 Ca と P が主成分であることが確認された (写真19)。ついで, Ca と P の定量分析を行った結果, 平均 wt %値は, Ca 64.9%, P 31.4%で, Ca/P 比は2.07であった。

2) 実験群

移植後1週目の下顎骨皮質骨部の面分析では, 対照群と同様に Ca と P のピークが検出され, Ca と P の定量分析では平均 wt %値は Ca 63.7%, P 31.7%を示し, Ca/P 比は2.01であり, 対照群との間に統計的に有意差は認められなかった。移植後2週目においても, Ca と P の定量分析の結果は Ca 61.2%, P 32.5%で, Ca/P 比は1.89であり, 対照群との間に有意差は認められなかった。移植後3週目では, Ca と P の定量分析の結果は Ca 60.5%, P 34.9%で, Ca/P 比は1.73と著明に低下し, 統計的に対照群との間に有意差が認められた。移植後4週目では, 面分析でも, Ca のピークと分布は著明に低下し, 相対的に P のピークの上昇が認められた (写真20)。面分析の Ca と P の面分析像でも対照像に比し Ca 分布の低下が認められた (写真21)。Ca と P の定量分析の結果では, Ca 57.7%, P 33.9%で, Ca/P 比は1.71を呈し, 対照群との間に統計的に有意差が認められた (表 2, 3)。

以上, VX2 癌細胞が下顎骨へ浸潤, 進展するに従い, Ca の低下と P のわずかな増加, すなわち Ca/P 比の低下が認められた。

考 察

1. 家兎移植 VX2 癌の顎骨浸潤様式について

口腔癌の実験モデルとしては, DMBA などの化学性発癌物質を用いた腫瘍発生実験^{3,4)}と吉田肉腫⁵⁻⁷⁾, Walker 腫瘍⁸⁾, VX2 癌^{9,10)}, VX7 癌¹¹⁾などの可移植性腫瘍を用いた移植実験とが知られている。このうち, 化学性発癌剤による実験モデルを用いた顎骨浸潤に関する研究は, 堀本²⁾, 戸塚¹²⁾, 臼井¹³⁾らの DMBA 誘発ハムスター歯肉癌の顎骨浸潤に関する研究がある。一方, 可移植性腫瘍を用いた顎骨浸潤に関する研究は, VX2 癌を用いた林¹⁾と中尾¹⁴⁾の研究がある。しかし, これらの報告は, 光顕レベルでの観察が大部分で, 電顕の検索を行ったものは少なく, しかも, SEM により実験腫瘍の顎骨浸潤について三次元的微細構造の検索を行った報告は皆無である。そこで, 今回, 著者は, 正常家兎の下顎角骨膜上に VX2 癌を移植し, 下顎骨への浸潤, 増殖状況を光顕のならびに SEM 的に検索し, また, EPMA による VX2 癌顎骨浸潤部の Ca と P の分布の動態についても比較検討を行った。本実験に使用した VX2 癌は, ショープ乳頭腫¹⁵⁾・癌系列に属するウイルス産生の可移植性癌として, 本教室で累代移植されているものである。本腫瘍の増殖態度は, 非角化性で低分化型の細胞が小胞巣を形成しながら, 索状あるいはびまん性に浸潤増殖し, ヒトの口腔癌で最も多い扁平上皮癌に類似しており, 移植率も高く, 増殖期間も比較的早いことなどから, 口腔癌モデルとして広く用いられている。

口腔癌の下顎骨への浸潤様式については, これまでの報告^{12-14,16-23)}からすれば, 口腔癌の深部増殖に伴って, まず, 癌細胞に近接した皮質骨の表面が窩状に吸収し, やがて腫瘍の増殖とともにそれらが増大し, 凹凸不正で, いわゆる虫喰状の吸収像となり, さらに, ハバース管やフォルクマン管, 歯根膜腔あるいは下顎管などの本来下顎骨に存在する抵抗性の弱い隙や管を介して, 癌細胞が下顎骨髄腔内へと浸潤増殖すると報告されている。また, 癌が下顎骨へ浸潤する際の骨膜の反応に関しては, 相反する2つの見解^{1,12,14,24-27)}が存在する。すなわち, 顎骨浸潤に関する従来の報告^{1,12,14)}では, 一般に骨膜は癌浸潤に対しなんらの抵抗性を示さないと考えられていた。一方, 福辻ら²⁴⁾は, 口腔癌により浸潤されたヒト下顎骨の臨床病理学的検索ならびにラット大腿骨部

への多和肉腫の移植実験を併せて行い、腫瘍が増殖するにつれて、浸潤部の骨膜に反応性肥厚が認められることを示し、骨膜は癌浸潤に対して抵抗性を有すると報告している。Martin²⁵⁾や大庭ら²⁶⁾も、同様に歯肉癌の初期では骨膜は癌浸潤に対して肥厚し、その結果防御的に働いていると述べている。

本実験では、骨膜が肥厚などの癌浸潤に対して防御的に働いている所見は認められなかった。これは本実験の観察間隔が1週間単位ということもあり、腫瘍浸潤における微妙な変化をとらえるには、期間が長すぎたのか、また、この VX2 癌の浸潤増殖が早いいため、骨膜の反応性変化が認められなかったのかは不明である。今回の検索において、骨膜が吸収、破壊され消失した後、ついで皮質骨の吸収破壊が開始され、骨膜が消失した骨表面では破骨細胞が散在性に配列し、皮質骨の表層部が吸収、破壊される所見が認められた。皮質骨の癌細胞による吸収や破壊の程度は、VX2 癌細胞の深部増殖の程度とほぼ比例する関係を示しており、特に癌巣と皮質骨の破壊吸収の程度とは密接に関係する所見が認められた。すなわち、深部増殖傾向の少ない VX2 癌細胞によるものでは、癌巣と皮質骨の間に比較的多量の間質が介在し、皮質骨表層部には、特別に異常所見は認められなかったが、VX2 癌細胞が骨膜に達するものでは、介在する間質は比較的小なく、癌巣が浸潤した部の皮質骨には、あきらかな吸収像や破壊像が観察された。

皮質骨の吸収や破壊に伴うハバース管やフォルクマン管の拡大に関して、これまでにさまざまな報告^{1,12,14,24,26,28-31)}が行われている。Ono ら²⁸⁾は、マイクロラジオグラフィーを用いて口腔癌浸潤による顎骨の変化の検索を行い、下顎骨では皮質骨表層部の吸収と同時に、ハバース管内壁が吸収されることによる管の拡大が観察されたことを報告している。大庭ら²⁶⁾も、ハバース管内壁に骨新生と吸収とが初期の歯肉癌において観察されたことを報告している。

悪性腫瘍による骨の吸収、破壊様式を組織学的にみると、一般に虫喰状吸収と平滑状吸収とに分類^{12,32-34)}されている。このうち虫喰状の吸収は、悪性腫瘍に特徴的な浸潤様式とされているが、これらの吸収様式は腫瘍の組織型、悪性度さらに細胞学的分化度などに左右されることが報告^{12,32)}されている。戸塚¹²⁾は、下顎歯肉癌の実験的研究で、高分化型扁平上皮癌により下顎骨が吸収される場合、平滑状吸収が主体で、低分化型扁平上皮癌による吸収の場合、皮質骨の吸収や破壊はきわめて高度で、しかも広範囲にわたってあきらかな虫喰状吸収が認められたと報告している。出雲³²⁾は、ヒト下顎歯肉扁平上皮癌の下顎骨浸襲に伴う骨吸収について病理組織学的に検討し、破骨細胞性の骨吸収の著しい亢進が認められる浸潤型と、骨吸収の程度が低く、骨吸収縁が比較的平滑である圧排型の2型に分類し、浸潤型の組織像を呈す

るものの方が、予後不良であると報告している。

また、中尾¹⁴⁾は、VX2 癌を下顎歯肉内へ移植した実験的研究で、VX2 癌組織と皮質骨との間に間質が存在する場合、皮質骨表面が窩状に吸収され、また一部は凹凸不整でいわゆる虫喰状の吸収像を呈しており、VX2 癌細胞の増殖とともに虫喰状を示す吸収像の範囲が広がったと報告している。

今回の実験で観察されたように、組織学的にみた VX2 癌細胞の下顎骨への浸潤度は、解剖学的区分により以下のように分類できた。

第1度：VX2 癌細胞が、咬筋内に限局し、骨膜面には達していないもの。

第2度：VX2 癌細胞が、骨膜面にまで達したもの。

第3度：VX2 癌細胞が、下顎骨体部に浸潤したもの。

また、VX2 癌細胞が下顎骨体部に浸潤増殖したものの軟X線像では、骨吸収縁が不整で、病変部は、びまん性に虫喰像を呈し、X線的にいわゆる浸潤型といわれる像を呈していた。また、この時期の病変部の病理組織学的所見では、癌実質の境界が不明瞭かつ不整で、索状あるいは小巣状を呈し、骨梁間への浸潤が著明で、骨髓腔、ハバース管、フォルクマン管などのなかに、孤立した VX2 癌細胞が多数認められ、典型的な浸潤型の像を呈していた。吸収窩の形態は、正常骨でみられる生理的骨吸収の辺縁のスムーズさとは大きく異なり、辺縁は凹凸不整であった。

ところで、悪性腫瘍による骨の吸収、破壊機序については、主に2つの説^{9,10,12-14,35-37)}があり、腫瘍細胞により活性化された破骨細胞をはじめとする、いわゆる骨細胞による吸収と、腫瘍細胞自身による吸収の2種類に大別され、さらに腫瘍細胞自身による吸収機序は、腫瘍細胞自身が直接、骨に接して骨基質を吸収する機序³⁵⁻³⁷⁾と、なんらかの骨溶解物質の放出により結果的に骨の吸収に腫瘍細胞が関与する^{9,10)}2種類があるといわれている。

戸塚¹²⁾、白井¹³⁾、中尾¹⁴⁾らは、悪性腫瘍の顎骨浸潤による骨の吸収や破壊は、腫瘍によって活性化された破骨細胞による骨の吸収が主要な役割を占めると述べている。今回の研究においても、吸収窩の表面には、破骨細胞が多数観察され、しかも、癌巣と吸収窩表面との間に分布する結合織、脈管が少ないもののほど破骨細胞が増加する傾向が認められた。これらの所見より、VX2 癌による下顎骨の吸収、破壊は、主として破骨細胞により行われ、破骨細胞の作用は、癌巣と密接に関連していることが示唆された。Galasko^{9,10)}は、著者らと同じ VX2 癌を用いて移植実験を行い、骨の吸収、破壊は、破骨細胞を介するものと、腫瘍細胞自身による骨吸収の両者が認められたとし、VX2 腫瘍細胞からプロスタグランジンなどの何らかの破骨細胞活性化因子が分泌されているのではないかと推察している。

2. 家兎移植 VX2 癌顎骨浸潤部の走査型電顕所見について

骨組織の SEM による観察は、Boyde ら^{38,39)}による一連の報告後、内外ともに多数の報告⁴⁰⁻⁵³⁾が認められる。Boyde ら^{38,39)}は、皮質骨を 1,2-ethane diamine によって処理することにより、付着有機物質を除去した後、骨表面の観察を行い、明瞭な膠原線維像を観察し得たと報告している。また、皮質骨表面において、骨改造の状態を SEM で詳細に観察し、吸収期、形成期、休止期の各時期に分類した SEM 所見を示し、さらに骨皮質における断面の三次元的超微形態の観察も行っている。

本邦においても、蟹江ら⁴⁰⁾が、長管骨の SEM 像により骨表面における改造現象をとらえ、吸収期、形成期、休止期の各相により膠原線維の立体構築の差異が認められることを報告している。

一方、顎口腔領域においても、滝口ら⁴¹⁻⁴³⁾は、SEM による顎骨各部の発育および老化に伴う骨表面の改造についての研究や、発育期の軟骨基質の石灰化に伴う微細構造上の変化^{41,44)}、層板骨と胎児骨の骨小腔壁の基質形成に伴う微細構造上の変化^{45,46,51,52)}について一連の研究結果を報告している。

滝口ら⁴³⁾は、カイウサギの成熟した大腿骨と脛骨の骨の休止面を SEM にて観察し、骨の休止面を構成している膠原線維束は、全体的には不規則な走向を呈しているが、各部分の膠原線維束は互いに交錯していると述べている。また、膠原線維を強拡大で観察すると、膠原線維上には直径 30 nm 前後の顆粒状構造物が認められたと述べ、著者の観察した対照群の SEM 所見とほぼ一致した。

一方、腫瘍による骨吸収面を SEM で観察した報告は非常に少なく、伊藤ら⁵³⁾、松本ら⁵⁴⁾、出雲³²⁾のヒト扁平上皮癌の顎骨浸潤部の報告が認められるのみである。伊藤ら⁵³⁾は、ヒト扁平上皮癌による顎骨吸収面では、骨面のほぼ全体が吸収窩で覆われ、吸収の強さをうかがわせたが、吸収窩底は、種々異なった方向に走行する膠原線維が認められたと報告している。また、松本ら⁵⁴⁾は、ヒト扁平上皮癌による顎骨の吸収面は、大きな凹凸があり、ほぼ全面に大小の不整形、または、類円形の多数の吸収窩が認められ、吸収の著しい部位では、大きな空洞となり、蜂窩状を呈していたが、吸収窩底は、滑らかで基質の膠原線維束が観察されたと報告している。

さらに、出雲³²⁾は、ヒト下顎歯肉扁平上皮癌における骨吸収面を SEM で観察し、低倍率の所見では、浸潤型の腫瘍と対面する骨面は、著しく凸凹不整で骨縁は鋭利、きわめて不整形、不定形を呈し、その表面には多数の骨吸収窩が密在したのに対し、圧排型では、比較的平滑な形状を呈するが、表面には、多数の骨吸収窩を伴う部位が認められたとし、高倍率の所見では、浸潤型の吸収窩

は深く、窩底は不整、鋭利な像を呈し、窩内の深さによって一定の走行を示す膠原線維束、吸収によって露出した骨細管などの像が認められたのに対し、圧排型では、吸収窩は比較的浅く、辺縁は、なだらかな吸収窩像を呈し、窩底は一部に石灰化を伴う網状の膠原線維からなる像が多く認められ、一部には、顆粒状の構造物が認められたと述べている。

一方、堀本²⁾は、DMBA 誘発ハムスター歯肉癌の顎骨浸潤部の透過型電顕（以下 TEM）による観察を行い、腫瘍の浸潤に伴い腫瘍が骨に接近すると、骨表面には破骨細胞が集簇し、破骨細胞は発達した波状縁（ruffled border）を有し、細胞質には豊富なライソゾームや空胞、ミトコンドリアが認められ、腫瘍浸潤に伴う活発な局所的骨吸収を示したと報告しているが、骨吸収面については詳しく報告していない。

ところで、今回の著者の研究のごとく、実験腫瘍による下顎骨吸収面を SEM で観察した報告は、いまだ認められない。

今回、著者は、家兎移植 VX2 癌の下顎骨浸潤面を SEM で観察した結果、低倍率の所見では、出雲³²⁾のいう浸潤型のヒト歯肉扁平上皮癌の下顎骨吸収面の SEM 所見とほぼ一致し、凹凸不整で、不規則、不定形の所見を呈し、骨表面には、多数の骨吸収窩が観察された。高倍率の所見では、吸収窩は深く、不整で、窩底には、種の走行を示す密な膠原線維や網状構造を示したり、破骨細胞の骨吸収によって断裂している膠原線維が多数観察された。また、本研究において、吸収面の窩底にきわめて密な膠原線維が露出している吸収窩が観察されたが、このことは、骨吸収においては破骨細胞が骨基質から、まず無機結晶を消化吸収したために、吸収窩底に膠原線維が露出されたものと考えられ、吸収窩底に膠原線維が露出されている吸収面は、吸収が進行している部分であると思われる。

Boyde ら⁵⁰⁾も SEM によって、骨基質の吸収面を三次元的超微形態学的に検索し、骨吸収に際しては、膠原線維の破壊に先行して無機結晶の骨基質からの消化吸収が行われると報告している。さらに、骨基質の吸収窩底面に無機結晶が離脱した膠原線維が、破骨細胞の波状縁間に認められるという TEM 所見での報告^{60,61)}もある。また、TEM による検索では、破骨細胞の波状縁間と波状縁に続いている破骨細胞の細胞質内空胞には、針状の無機結晶が明瞭に認められ^{62,63)}、このことより無機結晶の破骨細胞による消化吸収が確認されている。Baron ら⁶⁴⁾は、骨吸収については、破骨細胞の波状縁と骨表面の間の狭い領域が酸性の pH を呈し、破骨細胞から分泌された酸性水解酵素の活性化により、有機性基質の変性が促進された結果生じたものと報告し、破骨細胞が、波状縁から骨基質に向けて酸性水解酵素を分泌するとともに、波状縁の形質膜に局在する 100 kd-タンパク

によって、 H^+ を骨基質に向けて放出し、波状縁と骨表面間の pH を酸性領域に下げる有機酸を分泌する機能を有することを報告している。

一方、本研究においては、吸収窩底に露出されている膠原線維は、部分的には密で方向性を示し、隣接している吸収窩底においても、同程度の深さの部分では、膠原線維の走向は一定方向であるが、同一の吸収窩底においても、窩底の浅部と深部とでは、膠原線維の走向が異なっていた。このことは、吸収窩底の深さの差異によって、異なった骨層板を構成していた膠原線維が露出されたものと考えられた。骨基質の無機結晶が離脱され、吸収窩底に露出された膠原線維は、破骨細胞の細胞質空胞内には取り込まれていないが、破骨細胞の波状縁部には認められている^{60,61}。杉原ら⁶⁵も、腎性骨異栄養症（以下 ROD）の顎骨病変を SEM で観察し、ROD の線維骨の吸収窩底において表面に微絨毛を有した直径 20~30 μm の破骨細胞が細長い細胞質突起すなわち波状縁で、吸収窩底の膠原線維と連絡している所見を報告している。吸収窩底に露出された膠原線維は、破骨細胞内には取り込まれず、波状縁の表面付近で迅速に溶解されるものと考えられている^{60,61}。骨吸収時の膠原線維は、破骨細胞のライソゾーム酵素が細胞外に放出されることによって溶解され、ある程度溶解された膠原線維は、破骨細胞内に取り込まれ、破骨細胞内のライソゾームによって、完全に消化されるという見解⁶⁶がある。本研究においても、吸収窩の辺縁部では、破骨細胞によって膠原線維が断裂されたために、吸収窩縁部と休止面との隣接部には、膠原線維の断端が認められた。また、骨基質から遊離した疎な網状構造を呈している膠原線維が、吸収窩の最表層に認められる部分も観察された。なお、この膠原線維網は破骨細胞のライソゾーム酵素によって溶解されつつあるものと考えられた。また、吸収窩底に露出されている膠原線維上には、直径 30 nm 前後の顆粒状構造物が付着していて、部分的にはきわめて多数の顆粒状構造物の付着も観察されたが、この膠原線維上に観察される顆粒状構造物は、いわゆる石灰化顆粒であり、吸収が進行していない吸収面や、吸収窩縁では、同様な直径 30 nm 前後の石灰化顆粒が密に存在し吸収面や吸収窩縁を形成していた。吸収面における吸収窩には、膠原線維が露出しているものもあれば、窩底がかなり平滑で、吸収窩縁は幅広く、丸みをおびて、きわめて密な石灰化基質で残存している部分も観察された。

3. 家兎移植 VX2 癌顎骨浸潤部における Ca と P の動態について

微小部の構成元素を知る X 線微量元素分析法は、1913 年 Moseley⁶⁷が、原子番号とその元素特有の X 線波長の関係を見出し EPMA を報告して以来、Castaing らが改良を加え、電子ビームにより発生した特性 X 線の分析

のために波長分散型 X 線検出器を作製し、定量 X 線分析のための標準試料も検討して、EPMA の定量分析の理論を確立した⁶⁸。

1971年に Russ⁶⁹により、シリコン・ダイオードを用いたエネルギー分散型 X 線検出器が考案され、EPMA は一段と利用性を広め、かつ、SEM や TEM の著しい進歩や普及と相まって、医学・生物学における電子顕微鏡レベルでの微小部 X 線分析を盛んなものとした。EPMA の原理は、数 keV~50 keV に加速した電子線を直径 1 μm 程度に絞り、これを電子ビームとして試料上に焦点を結ばせ、試料上より発生する特性 X 線を分光分析し、試料を構成する元素群の定性ならびに定量分析を非破壊的に行うものである。EPMA によって得られる情報は、二次電子像、反射電子像、吸収電子像、透過電子像、そして X 線像があり、そのうち、二次電子像が SEM 像であり、X 線像を前述のごとく試料の X 線微量元素分析法に用いている。X 線微量元素分析には、線分析、面分析、点分析とそれらの定性、定量分析がある。線分析とは、試料の一方における特定元素の濃度勾配を知る目的で行い、また、面分析とは、試料表面の二次電子像（SEM 像）を観察したのち、同じ面の X 線像を観察することにより、試料表面での特定元素の濃度勾配を観察するもので、定性分析として用いられている。

本研究のように、VX2 癌細胞が顎骨部に浸潤増殖した場合に起こる顎骨の反応や変化を、試料を破壊することなく経時的に同時に観察する手段として、EPMA による微量元素分析法と三次元的超微構造（SEM 像）の変化を対応して観察できることは、きわめて有利である。

EPMA を用いた生体硬組織の研究には、須賀⁷⁰や Wirsing ら⁷¹の歯牙組織の分析、山崎ら⁷²の下顎骨骨折治癒過程における骨組織中の各種金属イオンの元素分析、Brooks ら⁷³の健康長管骨 Ca イオンの元素分析などがある。一方、病的硬組織を対象とした EPMA の研究は、霜⁷⁴の異所性石灰化組織の分析、高田ら⁷⁵の実験的クル病骨端成長軟骨の分析、増田ら⁷⁶の線維性骨異形成症の分析、杉原ら⁶⁵の ROD の顎骨病変の分析などの報告が認められる。杉原ら⁶⁵は、顎骨に発症した ROD の線維骨の EPMA による分析を行い、P, Ca, Si, S, Al などの元素が検出されたと報告し、また、定量分析では、正常顎骨に比較して P の増加と Ca の低下が認められ、かつ Al が検出されたことにより、ROD の石灰化障害に Al の関与が示唆されたと報告している。これらの報告は、いずれも病的骨組織を用いて各元素の分布パターンを検討し、骨組織内での無機イオン動態を分析して、病態の解明を試みている。著者は、実験的 VX2 癌の下顎骨浸潤部位において生ずるであろう骨内 Ca, P イオンの濃度変化を EPMA にて分析し、また、浸潤部位の顎骨表面における三次元的超微構造との変化を比較検

討し、これらの所見が顎骨浸潤部位の範囲を決定するパラメーターとなりうるならば、手術における切除範囲を決定しうる指標となり、治療成績の向上はもとより、手術後の口腔機能の低下や審美障害を最小限に食い止められ、quality of life の向上など、その臨床的意義は大きいと考え、本研究を行った。

須賀⁷⁰⁾は、歯牙について EPMA を応用した多くの研究報告を行い、生物試料における EPMA による元素の定量分析を理論的には可能としながらも、生物試料の場合は金属や鉱物と異なり、複雑な組織の構造を有するので、分析試料と標準試料とを同一条件で測定することは非常に困難であり、面分析などによる元素分布や濃度変化の観察を行うにとどまると、生物試料における EPMA の定量分析の困難性を述べている。生物試料を、エネルギー分散型 X 線分析器で、定量分析をする際には、分析上、種々の問題点が生じ、その解決方法も確立されているとはいいがたい。そのために、分析結果として示された定量値は、現段階では生物試料に関する限り、信頼性に乏しい点もあるが、本研究のように、経時的な骨破壊を検索するために、半定量的に用いるのならば、この方法はきわめて有効であるといえることができる。今回、著者は、固定、脱水、洗浄などの試料作製過程における条件や観察時の条件を可及的に一定にして面分析や重量濃度の検索を行った。

また、今回比較を行った数値は、Ca/P 濃度の半定量的数値で、骨などの硬組織試料を用いた測定値におおの X 線強度 (counts per second: cps) 値を用いることは、イオン流出などの影響も考えられ、現段階では試料作製上非常に困難な問題が存在するため、おのおの Ca/P 濃度を比較することにより、相対的な評価を行うことが最良であると考えられた。

従来より腫瘍組織内における無機イオン、特に Ca および P 代謝は腫瘍の増殖に密接に関連していることが報告^{77, 78)}されている。Ca イオン活性に関しては、腫瘍細胞が正常細胞に比較し格段に高く⁷⁷⁾、腫瘍細胞が高 Ca 濃度の状態にあるために、腫瘍細胞の分裂や増殖が活発になるであろうと報告⁷⁸⁾されている。また、橋本⁷⁹⁾は、ラット肝癌細胞内の Ca を原子吸光法により測定し、正常肝細胞より数倍高いことを報告している。一方、正常の顎骨組織における EPMA による分析結果では、藤本ら⁸⁰⁾が、下顎頭軟骨基質を分析し、軟骨基質の石灰化に伴い、S の減少と Ca および P の増加による負の相関性を報告し、基質を構成している膠原原線維上の球状構造物と Ca とは、何らかの関連性があると報告している。

また、足立ら⁸¹⁾は、幼若家兎下顎骨の Ca と P イオン動態に及ぼす放射線の影響を EPMA で分析し、Ca イオンは照射群において全期間中、非照射部位より低値を示し、一方、P イオンは非照射部位と同程度か、やや高

い値を示したことより、Ca イオンの動態が放射線による顎骨破壊の 1 つの目安となりうると報告している。

一方、担癌顎骨について Ca や P などの無機イオンの動態を検索した報告は、わずかに足立ら⁸²⁾のヒト口腔癌の下顎骨浸潤症例についての報告のみであり、実験腫瘍の顎骨浸潤部の Ca と P イオンの動態を検索した報告は、いまだ認められない。

足立ら⁸²⁾は、口腔悪性腫瘍患者の摘出下顎骨を用いて、腫瘍浸潤部と腫瘍を含まない下顎皮質骨の Ca と P 各イオン動態との関係を検討した結果、下顎骨中の Ca イオンは、すでに腫瘍浸潤に先立ち濃度の低下が認められるが、P イオンについては、変化は認められなかったと報告している。さらに、臨床あきらかに癌組織が下顎骨を浸潤破壊するにつれて、Ca イオンはさらに低下する傾向を示し、かつ P イオンも Ca イオンほどではないが、若干低下する傾向が認められたと報告している。本研究においても、VX2 癌細胞の顎骨浸潤に先だって、腫瘍近接部位での Ca イオンに若干の低下が認められ、VX2 癌細胞の顎骨浸潤が進行するに従って、顎骨浸潤部位での Ca イオンの低下が認められたことは、足立ら⁸²⁾の報告とほぼ同様の結果が得られた。P イオンに関しては、本研究においては、ほとんど変化は認められなかった。

以上の結果より、顎骨内の Ca イオンは、腫瘍組織と密接に関連した反応系を有していると考えられ、Ca イオンは顎骨への癌浸潤による器質的变化に先行して、その動態が変化することより、Ca の動態を正確に認識することにより、癌の浸潤範囲を明確に把握することが可能であれば、癌の顎骨浸潤部における EPMA による Ca の分布様式と SEM による三次元的微細構造の観察は、臨床的にもきわめて大きな意義を有するものと思われる。

結 語

家兎移植 VX2 癌を下顎角骨膜上に注入し、癌細胞の下顎骨への経時的浸潤状況を顎骨浸潤部の光顕的ならびに SEM による観察と、EPMA による Ca と P の動態について検索し、次の結論を得た。

1. 光顕的検索では、移植 1 週目で、VX2 癌細胞は、咬筋内に局限した充実性胞巣を形成し、2 週目で VX2 癌細胞は骨膜に達し、さらに、3, 4 週目では VX2 癌細胞が顎骨内へ浸潤増殖している像が観察された。

2. 腫瘍に接する骨面の SEM による観察では、VX2 癌細胞の顎骨浸潤部では、湾状や圧痕状の不定形の吸収窩が連続して多数観察された。吸収窩底面には骨小腔が露出し、深さにより種々異なった方向に走行し、網状を呈したり、断裂している膠原原線維が観察された。

3. VX2 癌の顎骨浸潤部の EPMA による X 線微量元

素分析では、VX2 癌細胞の顎骨浸潤に先だって腫瘍近接部位での Ca に若干の低下が認められ、さらに VX2 癌細胞の顎骨浸潤が進展するにつれて、Ca のピークは著しく低下したが、P のピークはほとんど変化が認められなかった。

以上の結果より、顎骨癌浸潤部の SEM による三次元的観察と EPMA による Ca 分布動態を知ることは、癌の浸潤範囲を知る方法の 1 つとして、その臨床応用への示唆が得られたと考えられた。

稿を終えるにあたり、本研究に終始ご懇切なるご指導とご校閲を賜りました鹿児島大学歯学部第 1 口腔外科学教室山下佐英教授に深く感謝いたします。また、ご援助、ご鞭撻を頂いた第 1 口腔外科学教室杉原一正講師はじめ教室員各位に厚くお礼申し上げます。

なお、本論文の要旨は、第 35 回日本口腔外科学会総会（平成 2 年 10 月、岡山）において発表した。

引用文献

- 1) 林 嘉仁：家兎下顎骨内における VX2 癌の増殖に関する実験的研究。九州歯会誌 44: 39-60 1990.
- 2) 堀本 進：DMBA 誘発ハムスター歯肉癌の顎骨浸潤に関する電顕的研究。日口外誌 37: 30-49 1991.
- 3) 藤田浄秀，賀来 享，他：舌癌の実験的形成に関する研究。口科誌 21: 999-1012 1972.
- 4) 藤田浄秀，賀来 享，他：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.
- 5) 井上隆之：耳鼻咽喉領域への吉田肉腫移植の動物実験並びに腫瘍内血行系の考察。日耳鼻 64: 704-718 1961.
- 6) Jacobson, P.A., Eneroth, C.M., et al.: Histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. Acta Radiol 12: 1-8 1973.
- 7) 島田惣四郎：吉田肉腫を移植したラット顎下腺について。歯科医学 23: 1503-1522 1960.
- 8) 法貴 正：移植腫瘍の転移に関する実験的研究。I. 顎下部移植時の顎頭部リンパ節への転移形成について。歯科医学 28: 590-614 1965.
- 9) Galasko, C.S.B.: Mechanisms of bone destruction in the development of skeletal metastases. Nature 263: 507-508 1976.
- 10) Galasko, C.S.B. and Bennet, A.: Relationship of bone destruction in skeletal metastases to osteoclast activation and prostaglandins. Nature 263: 508-510 1976.
- 11) Ito, Y., Kimura, I., et al.: Comparative studies on pathogenesis of two strains of transplantable carcinomas of rabbits, VX2 and VX7. Proc Soc Exp Biol Med 127: 1106-1111 1968.
- 12) 戸塚靖則：DMBA 誘発ハムスター口腔癌の顎骨浸潤に関する病理組織学的研究。日口外誌 27: 337-356 1981.
- 13) 白井康裕：実験的歯肉癌の顎骨浸潤に関する病理組織学的研究。口科誌 35: 570-601 1986.
- 14) 中尾元彦：家兎歯肉癌 (VX2 癌) の下顎骨侵襲に関する実験的研究。九州歯会誌 40: 188-204 1986.
- 15) 伊藤洋平，螺良義彦：ショープ乳頭腫。医学のあゆみ 53: 795-801 1965.
- 16) 梶山 稔，大野彰彦，他：下顎歯肉癌の顎骨侵襲に関する研究。癌臨 24: 4-10 1978.
- 17) 富田喜内，戸塚靖則：口腔癌の下顎骨浸潤について。北海道歯誌 1: 8-16 1980.
- 18) 畠山節子，佐藤方信，他：実験的悪性腫瘍の顎骨浸潤に関する病理学的研究。歯基礎誌 24: 359-369 1982.
- 19) 杉浦正幸：口腔領域における移植腫瘍による浸潤発育様式の病理組織学的研究。口科誌 32: 350-371 1983.
- 20) 戸塚靖則，水越孝典，他：下顎歯肉扁平上皮癌の臨床的研究。日口外誌 31: 36-51 1985.
- 21) Barttelbort, S.W., Bahn, S.L., et al.: Rim mandibulectomy for cancer of the oral cavity. Am J Surg 154: 423-428 1987.
- 22) Slootweg, P.J. and Müller, H.: Mandibular invasion by oral squamous cell carcinoma. J Craniomaxillofac Surg 17: 69-74 1989.
- 23) 中澤光博，加納康行，他：下顎歯肉扁平上皮癌の顎骨吸収様式と予後との関連性。口科誌 40: 589-599 1991.
- 24) 福辻範彦：口腔内悪性腫瘍の下顎骨浸潤に関する臨床的・病理組織学的研究。耳鼻臨床 69: 439-451 1976.
- 25) Martin, H.: Cancer of the gums. Am J Surg 54: 769-806 1941.
- 26) 大庭 健，徳富敏信，他：下顎歯肉癌にみられる骨破壊の X 線像と組織学的所見との比較研究。日医放会誌 34: 820-834 1974.
- 27) Marchetta, F.C., Sako, K., et al.: The periosteum of the mandible and intraoral carcinoma. Am J Surg 122: 711-713 1971.
- 28) Ono, T., Iizuka, T., et al.: Radiographic and histologic studies of the lesions of the jaw by invasion of oral carcinoma. Bull Stom Kyoto Univ 14: 1-12 1974.
- 29) Panagopoulos, A.P.: Bone involvement in maxillofacial cancer. Am J Surg 98: 898-903 1959.
- 30) 塩田 覚，竹谷智子：口腔領域に誘発した非上皮性腫瘍の初期浸潤様相に関する実験的研究。金医大誌 7: 65-76 1982.
- 31) Enneking, W.F. and Flynn, L.: Effects of VX2 carcinoma implanted in bone in rabbits.

- Cancer Res 28: 1007-1013 1968.
- 32) 出雲俊之: 下顎歯肉扁平上皮癌における骨吸収像. 口病誌 53: 343-356 1986.
- 33) 佐藤彰吾: 上顎癌の病理組織学的研究. 日耳鼻 64: 719-734 1961.
- 34) 赤星至朗: 大切片標本による上顎癌の病理組織学的研究. 日耳鼻 67: 862-888 1964.
- 35) Wezeman, F.H., Guzzino, K.M., et al.: Multicellular tumor spheroid interactions with bone cells and bone. Anat Rec 213: 111-120 1985.
- 36) Koefler, H.P., Mundy, G.R., et al.: Production of bone resorbing activity in poorly differentiated monocytic malignancy. Cancer 41: 2438-2443 1978.
- 37) Eilon, G. and Mundy, G.R.: Direct resorption of bone by human breast cancer cells *in vitro*. Nature 276: 726-728 1978.
- 38) Boyde, A. and Hobbell, M.H.: Scanning electron microscopy of lamellar bone. Z Zellforsch 93: 213-231 1969.
- 39) Boyde, A. and Hobbell, M.H.: Scanning electron microscopy of primary membrane bone. Z Zellforsch 99: 98-108 1969.
- 40) 蟹江良一, 今泉 司, 他: 長管骨の走査電顕像と bone metabolism. 整形外科基礎科学 5: 55-63 1978.
- 41) 滝口励司, 藤本 誠: ラットの顎頭の発育に伴う改造についての走査電子顕微鏡的研究. 口科誌 28: 137-140 1979.
- 42) 滝口励司, 江川 薫, 他: ラットの骨口蓋の走査電子顕微鏡的研究. 歯基礎誌 21: 285-291 1979.
- 43) 滝口励司, 中村輝夫, 他: 骨の休止面の走査電子顕微鏡的研究. 歯基礎誌 24: 570-576 1982.
- 44) 江川 薫, 新村明達, 他: 下顎頭の軟骨内骨化についての走査電子顕微鏡的研究. 歯基礎誌 22: 661-665 1980.
- 45) 谷内良弘, 中村輝夫, 他: 皮質骨の走査電子顕微鏡的研究. 歯基礎誌 22: 400-406 1980.
- 46) 申 富雄, 杉山 裕, 他: 胎児骨の基質形成についての走査電顕所見. 歯基礎誌 22: 470-474 1980.
- 47) 谷内良弘: 形成期の骨表面の超微形態学的研究. 歯科医学 44: 125-137 1981.
- 48) 江川 薫: 骨基質形成面の立体超微形態学的研究. 歯基礎誌 24: 623-632 1982.
- 49) 申 富雄, 江川 薫: 成熟骨の表層の立体超微形態学的研究. 昭歯誌 5: 31-37 1985.
- 50) 谷内茂徳, 江川 薫: 老化骨の表層の立体超微形態学的研究. 昭歯誌 5: 127-134 1985.
- 51) 山下義久, 横田芳彦, 他: 成熟骨表層基質の立体超微形態の増齢変化. 昭歯誌 8: 145-151 1988.
- 52) 横田芳彦, 江川 薫: 骨基質表層の経時的な立体超微形態学的変化についての研究. 昭歯誌 8: 307-315 1988.
- 53) 伊藤信明, 工藤啓吾, 他: 病的顎骨吸収面に関する走査電顕の観察—とくに腫瘍について—(抄). 口科誌 27: 593-594 1978.
- 54) 松本英彦, 倉地洋一, 他: 顎骨疾患における骨吸収面の走査電子顕微鏡的観察—第1報 腫瘍性病変について—(抄). 口外誌 29: 721-722 1980.
- 55) Chambers, T.J., Thomson, B.M., et al.: Effect of substrate composition on bone resorption by rabbit osteoclasts. J Cell Sci 70: 61-71 1984.
- 56) Boyde, A., Ali, N.N., et al.: Resorption of dentine by isolated osteoclasts *in vitro*. Br Dent J 156: 216-220 1984.
- 57) Chambers, T.J. and Fuller, K.: Bone cells predispose bone surfaces to resorption by exposure of mineral to osteoclastic contact. J Cell Sci 76: 155-165 1985.
- 58) Murrills, R.J., Shane, E., et al.: Bone resorption by isolated human osteoclasts *in vitro*: Effects of calcitonin. J Bone Miner Res 4: 259-268 1989.
- 59) Boyde, A. and Lester, K.S.: Electron microscopy of resorbing surfaces of dental hard tissues. Z Zellforsch 83: 538-548 1967.
- 60) Cameron, D.A.: The fine structure of bone and calcified cartilage. Clin Orthop 26: 199-228 1963.
- 61) Holtrop, M.E. and King, G.J.: The ultrastructure of the osteoclast and its functional implications. Clin Orthop 123: 177-196 1977.
- 62) Dudley, H.R. and Spiro, D.: The fine structure of bone cells. J Biophys Biochem Cytol 11: 627-649 1961.
- 63) Bonucci, E.: The organic-inorganic relationships in bone matrix undergoing osteoclastic resorption. Calcif Tissue Int 16: 13-36 1974.
- 64) Baron, R., Vignery, A., et al.: Lymphocytes, macrophages and the regulation of bone remodeling. Peck, W.A.; Bone and Mineral Research, Annual 2, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1984, p 175-243.
- 65) 杉原一正, 松井竜太郎, 他: 顎骨に発症した腎性骨異栄養症の走査型電子顕微鏡による観察(抄). 第23回日本臨床電子顕微鏡学会 予稿集 99 1991.
- 66) Vaes, G.: Lysosomes and the cellular physiology of bone resorption. Dingle, J.T. and Fell, H.B.; Lysosomes in Biology and Pathology. 1st Ed, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1969, p 217-253.
- 67) Moseley, H.G.J.: The high frequency spectra of the elements, part II. Phil Mag 26: 1024-1034 1913.
- 68) 水平敏知, Russ, J.C.: 分析電子顕微鏡—微小部X線分析の理論と生物学的応用—. 第1版,

- 日本メディカルセンター, 東京, 1978, 1-4頁.
- 69) Russ, J.C.: Energy dispersion X-ray analysis: X-ray and electron probe analysis. 1st Ed, Am. Soc. Testing & Materials, Philadelphia, 1971, p 154-179.
- 70) 須賀昭一: X線マイクロアナライザーによる生物組織, 特に硬組織の研究について. 歯学 55: 217-224 1967.
- 71) Wirsing, A., Judd, G., et al.: Electron probe microanalysis of human enamel microstructure. J Dent Res 53: 491-494 1974.
- 72) 山崎安仁, 田代教平, 他: XMA による下顎骨骨折の治癒機転に関する実験的研究 第3報. 日口外誌 24: 1303-1304 1978.
- 73) Brooks, E.J., Tousimis, A.J., et al.: The distribution of calcium in the epiphyseal cartilage of the rat tibia measured with the electron probe X-ray microanalyzer. J Ultrastruct Res 7: 56-60 1962.
- 74) 霜 礼次郎: 骨, 軟骨および異所性石灰化組織の X線マイクロアナリシスに関する研究 (骨皮質ならびに骨端軟骨の電子走査像と元素分析). 東京慈恵会医誌 87: 820-841 1972.
- 75) 高田晃平, 山本吉蔵: 正常ならびに実験的クル病骨端成長軟骨の走査電子顕微鏡的観察およびエネルギー分散型X線分析計による元素分析. 骨代謝 8: 79-87 1974.
- 76) 増田正樹, 玉井達人: 顕微X線法および走査型電子顕微鏡による Fibrous dysplasia の研究. 日口外誌 27: 1863-1873 1981.
- 77) Balk, S.D., Whitfield, J.F., et al.: Roles of calcium, serum, plasma, and folic acid in the control of proliferation of normal and Rous sarcoma virus-infected chicken fibroblasts. Proc Natl Acad Sci USA 70: 675-679 1973.
- 78) Mitchell, R.S., Elgas, R.J., et al.: Proliferation of Rous sarcoma virus-infected, but not of normal, chicken fibroblasts in oxygen-enriched environment: Preliminary report: Proc Natl Acad Sci USA 73: 1265-1268 1976.
- 79) 橋本省三: 悪性腫瘍組織内微量元素定量分析と臨床応用. 文部省研究報告集録 (昭50) 癌編: 587-589 1976.
- 80) 藤本 誠, 谷内良弘, 他: 下顎頭軟骨のエネルギー分散X線分析. 歯基礎誌 22: 412-417 1980.
- 81) 足立邦彦, 繁田幸慶, 他: 幼若家兎下顎骨のCa, P イオン動態に及ぼす放射線の影響. 口科誌 32: 470-476 1983.
- 82) 足立邦彦, 伝 春光, 他: 担癌下顎骨におけるCa, P イオンの動態について. 口科誌 32: 454-469 1983.

写真説明

- 写真 1 軟X線所見：正常家兎下顎骨
- 写真 2 軟X線所見：移植後 3 週目 虫喰状の骨吸収像（矢印）が観察される。
- 写真 3 対照群（H-E 染色，弱拡大）
- 写真 4 移植後 1 週目（H-E 染色，弱拡大）癌細胞は咬筋内に限局した充実性胞巣を形成している。
- 写真 5 移植後 2 週目（H-E 染色，弱拡大）癌細胞が骨膜に達している像が観察される。
- 写真 6 移植後 3 週目（H-E 染色，弱拡大）癌細胞が皮質骨を虫喰状に破壊した像が観察される。
- 写真 7 移植後 4 週目（H-E 染色，弱拡大）癌細胞が皮質骨を著しく破壊した像が観察される。
- 写真 8 対照群（SEM 像：低倍率）膠原原線維束は，一定方向に走行する部分が多く観察される。
- 写真 9 対照群（SEM 像：高倍率）膠原原線維束から側方へ分枝している膠原原線維も認められ，網状構造の部分も観察される。
- 写真 10 対照群（SEM 像：高倍率）膠原原線維上に顆粒状構造物と横紋構造が観察される。
- 写真 11 移植後 2 週目（SEM 像：低倍率）一部に湾状や圧痕状の吸収窩が観察される。
- 写真 12 移植後 2 週目（SEM 像：高倍率）窩底の浅部と深部では膠原原線維は異なった走行を示している。
- 写真 13 移植後 3 週目（SEM 像：低倍率）きわめて多数の不定形で大小さまざまな吸収窩が観察される。
- 写真 14 移植後 3 週目（SEM 像：高倍率）骨基質吸収によって断裂している膠原原線維も認められる。
- 写真 15 移植後 4 週目（SEM 像：低倍率）きわめて多数の骨吸収窩が観察される。
- 写真 16 移植後 4 週目（SEM 像：高倍率）種々の走行を示す膠原原線維が観察される。
- 写真 17 移植後 4 週目（SEM 像：高倍率）骨基質吸収によって断裂された膠原原線維が多数観察される。
- 写真 18 対照群（スペクトル像）Ca と P のスペクトルのピークが同レベルである。
- 写真 19 対照群（Ca と P の面分析像）Ca と P は同様な分布を示している。
- 写真 20 移植後 4 週目（スペクトル像）正常群と比較して Ca スペクトルのピークの低下が認められる。
- 写真 21 移植後 4 週目（Ca と P の面分析像）P と比較して Ca 分布が対照群に比し減少している。

写真 1

写真 2

写真 3

写真 4

写真 5

写真 6

写真 7

写真 8

写真 11

写真 9

写真 12

写真 10

写真 13

写真 14

写真 16

写真 15

写真 17

写真 18

写真 20

写真 19

写真 21