エタノールおよびアセトアルデヒドの長期投与による ラット舌粘膜上皮の変化に関する病理組織学的研究

野村 武史・野間 弘康・柴原 孝彦

Histopathological changes in rat tongue epithelium induced by administration of long-term ethanol diet and acetaldehyde

Takeshi NOMURA・Hiroyasu Noma・Takahiko SHIBAHARA

Abstract: The purpose of this study was to clarify the effects of long-term ethanol and acetaldehyde consumption on histopathological changes in rat tongue epithelium.

One hundredeight male Wistar rats (300g body weight) were divided into 4 groups. The ethanol group (n=29) was given a 5 % ethanol diet (ORIENTAL YEAST). The control group (n=33) was fed a control diet (ORIENTAL YEAST). Moreover, the tongue epithelium was coated daily with acetaldehyde (AA) at a concentration of 180mM in the daily AA (n=22) and ethanol+AA groups (n=24). Animals were killed after 24 weeks. Their tongues were removed, and dorsal, lateral, and sublingual sites. Were studied histologically by H-E staining, histochemical anti-PCNA staining, and SEM.

In the AA and ethanol+AA groups, the keratic thickness of the dorsal and sublingual sites had significantly increased (AA: $p<0.05$, ethanol+AA: $p<0.01$, vs control and Ethanol groups). Epithelial thickness and cell number in the three sites did not significantly differ among the groups. In the ethanol, AA, and ethanol+AA groups, PCNA positive cells in the basal layer increased considerably ($p<0.01$, vs control group). Moreover, in the AA and ethanol+AA groups, PCNA-positive cells in the lower 1/3 of the epithelial layers significantly increased ($p<0.01$, vs control and ethanol groups). Nine cases of hyperkeratosis were found at the dorsal prominence of the tongue, 1 in the ethanol group (3.4%), 2 in the AA group (9.1%) and 6 in the ethanol+AA group (25.0%).

Acetaldehyde, a primary metabolite of ethanol may play a direct role in the pathogenesis of tongue cancer in the rat.

Key words: ethanol (エタノール), acetaldehyde (アセトアルデヒド), Wistar rat (ウイスター系ラット), tongue epithelium (舌粘膜上皮), histopathological change (病理組織学的変化)

緒 言

多くの疫学研究^{1~5)}は、飲酒が口腔癌の発癌リスクを高めていると報告している。また WHO (世界保健機構) の下部機関である IARC (国際癌研究委員会)⁶⁾ は、1988年に膨大な疫学研究をまとめ、アルコール飲料は人体に発癌性を有すると結論した。このように疫学的側面から、飲酒

と口腔癌の関係が解き明かされていく一方で、従来よりエタノール単独の発癌作用については否定的な意見が多く、慢性飲酒にともなう栄養障害⁷⁾ やタバコなどの他の発癌物質を口腔粘膜に浸透させる⁸⁾ といった二次的な発癌への関与が指摘されている。また動物実験においても、Maierら⁹⁾ はエタノールが口腔粘膜に及ぼす影響について病理組織学的な検討をおこなっているが、発癌を直接的に示唆する変化は認められなかったと報告している。

近年、エタノールの代謝産物であるアセトアルデヒドを分解するアルデヒド脱水素酵素 2 (以下 ALDH 2 と略す) の遺伝子型が飲酒発癌に関与している可能性があり注目されている¹⁰⁾。横山ら¹¹⁾ は、大酒家の食道癌患者に ALDH 2

東京歯科大学口腔外科学第一講座

(主任: 野間弘康教授)

The First Department of Oral and Maxillofacial surgery, Tokyo Dental College (Chief: Prof. Hiroyasu Noma)

受付日: 平成11年9月20日

Figure 1 Experimental protocol

遺伝子の変異型がきわめて多いことを発見し、飲酒による食道発癌にアセトアルデヒドが関与していることを明らかにした。このことから飲酒による口腔癌の発生にエタノールの中間代謝産物であるアセトアルデヒドが関与している可能性がある。しかし現在までエタノールとアセトアルデヒドの両者が口腔粘膜に及ぼす影響を実験的に確認した報告はない。

そこで今回著者らは、アセトアルデヒドが口腔粘膜に直接及ぼす影響を検討し、飲酒による口腔癌の発癌メカニズムを解明する目的で、エタノール含有飼料を用いたラットの長期エタノール投与とアセトアルデヒドの局所反復塗布をおこない、舌粘膜上皮の形態変化について病理組織学的に観察し、さらに細胞増殖動態との関連について追求した。

実験材料および方法

1. 実験動物

体重300g 前後の Wistar 系雄性ラット108匹を実験に用い、室温24℃、湿度70%の恒常的環境下における金属ケージ内で飼育した。実験動物の取り扱いには東京歯科大学動物実験指針に従い、ジエチルエーテルを用いた深麻酔により安楽死させた。

2. 実験方法

1) 長期エタノール投与ラットの作製

Lieber と Decarli の方法¹²⁾に従い、コントロール飼料で飼育した対照群（以下 Control 群と略す）と5%エタノール含有飼料で飼育した実験群（以下 Ethanol 群と略す）を設定した（Figure 1）。飼料はオリエンタル酵母社製の完全液体飼料であり、①摂取エタノール量の不足、②必要水分

Figure 2

A Portion of tongue prepared into the histological sections

B Coronal section through portion

a: Dorsal prominence   b: Giant conical papilla
c: Circumvallate papilla   d: Dorsal site
e: Lateral site   f: Sublingual site

量の不足、③必要栄養摂取量の不足、④Control との間の摂取カロリーの不均衡などの諸問題を解決し¹³⁾、最終的に1 ml 中の熱量が1 kcal になるよう調整されている。最初の1 週間は両群ともコントロール飼料を与え、摂取量が一定したところで実験群をエタノール含有飼料に変えた。エタノール濃度は1% (W/W) から段階的に上げ、最終濃度を5% (W/W) として継続した。また給餌は一日一回交換しながら自由に摂取させ、さらに栄養摂取量を調整するため、毎日給餌時に Ethanol 群の摂取量を測定し、これと同量のコントロール飼料を Control 群に与え、さらに週1 回体重測定をおこなった。そして液体飼料以外は、水分その他を一切与えずに6 か月間継続飼育した。

2) アセトアルデヒドの投与方法

Control 群, Ethanol 群に対しアセトアルデヒドの直接作用を検討するため、Control 群の舌にアセトアルデヒド溶液を塗布する群（以下 AA 群と略す）と、Ethanol 群の舌にアセトアルデヒド溶液を塗布する群（以下 Ethanol + AA 群と略す）を設定した（Figure 1）。両群とも Control 群, Ethanol 群と同様に飼料を与え、投与開始2 週後よりアセトアルデヒド溶液の塗布を開始した。アセトアルデヒド溶液は停滞性を付与するためグリセリンと混合し、最終濃度を180mM とした。そして、毎日給餌前に綿棒（白十字社製）で舌を全体的に塗布し、飼育終了の1 週間前まで継続した。

3) 観察方法

(1) 組織計量的観察

各群とも舌を肉眼的に観察し、安楽死させた後摘出を行

Figure 3 Schema of measuring epithelial thickness and cell number of epithelial layer at epithelial pegs
a: Keratic thickness b: Epithelial thickness

い、ただちに10%磷酸緩衝ホルマリン液で24時間浸漬固定した。そして舌隆起部における giant conical papilla と有郭乳頭の中央を全額断で切り出し (**Figure 2 A**), 通法に従ってパラフィン包埋し, 厚さ $3\mu\text{m}$ の薄切切片を作製してヘマトキシリン・エオジン重染色 (以下 H-E 染色と略す) を施し鏡検した。観察部位は舌の右側に統一し, 舌背部, 舌縁部, 舌下面の3部位とした (**Figure 2 B**)。そして各部位における上皮厚径および角化厚径, さらに重層細胞数を計測した。測定は接眼レンズ10倍に, 対物レンズ40倍の顕微鏡で行い, 上皮厚径と角化厚径はマイクロメーターを使用した。舌背部は乳頭間上皮細胞列を, 舌縁部および舌下面は上皮突起部最下端を選択し計測した (**Figure 3**)。計測にあたっては, 各個体から3枚の標本を抽出し, おのおの20部位を測定し, 平均値をその個体の値とした。

(2) 免疫組織化学的観察

免疫組織化学的染色は, ヒストファイン SAB-PO (M) キット (ニチレイ社製) を用いて行った。H-E 染色と同様に切片作製後, 内因性のペルオキシダーゼを阻止するために $3\% \text{H}_2\text{O}_2$ 加メタノールで15分間浸漬し, 10% ヤギ正常血清により30分間室温で非特異反応をブロッキングした。1次抗体は抗 PCNA モノクローナル抗体 (PC10, DAKO 社製) を100倍希釈し, 室温で2時間反応させた。次いでビオチン標識マウス IgG, IgA, IgM 抗体よりなる2次抗体を室温で30分間反応させた後, ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを30分間室温で反応させた。発色は $0.05\% \text{H}_2\text{O}_2$ 加 $3,3'$ ジアミノベンチジン 4 塩酸塩 トリス塩酸緩衝液による呈色反応を行い, マイヤーのヘマトキシリンで薄く核染色を施し, $1 \times 1\text{mm}$ のグリッドを装着し, 400倍の顕微鏡下で観察した。測定は各個体から3枚の標本を抽出し, 1枚につき舌背部, 舌縁部, 舌下面について, 基底細胞と基底細胞を除いた下方 $1/3$ の棘細胞層における細胞をそれぞれ500個以上計測した (**Figure 4**)。舌背部においては乳頭間細胞列を選択し計測した。そして総計測細胞数における陽性細胞数の比率を算定し, PCNA 陽性率とした。

PCNA population (%)

$$\text{Basal area} = \frac{\text{PCNA positive cells}}{\text{Basal cells}} \times 100$$

$$\text{Lower } 1/3 \text{ area} = \frac{\text{PCNA positive cells}}{\text{Lower } 1/3 \text{ cells}} \times 100$$

Figure 4 Schema of counting PCNA positive cells among all cells in basal area and lower $1/3$ area

胞と基底細胞を除いた下方 $1/3$ の棘細胞層における細胞をそれぞれ500個以上計測した (**Figure 4**)。舌背部においては乳頭間細胞列を選択し計測した。そして総計測細胞数における陽性細胞数の比率を算定し, PCNA 陽性率とした。

(3) 走査型電子顕微鏡による舌背部の表面観察

各群から任意にラットを選択し, 舌隆起部における giant conical papilla と有郭乳頭の中央舌背部を一部採取し, 2% パラフォルムアルデヒド・ 2.5% グルタルアルデヒド混合固定液 (pH7.3) に24時間浸漬固定した。次いで上昇エタノール系列で脱水した後, 酢酸イソアミルに置換し, 凍結乾燥を行った。そして金パラジウムによるクールスパッ

Table 1 Weight gain during the experiment

	Start	End	Weight gain
Control	299.6±10.8	349.8±23.5	50.2±23.6
Ethanol	302.7±19.4	345.8±30.4	43.9±30.0
AA	307.2±21.3	340.2±47.6	34.4±34.0
Ethanol+AA	305.0±15.0	337.3±43.2	31.6±40.0
	NS	NS	NS

Weight: mean (g) ±SD
NS: no significant (Kruskal Wallis)

ターコーティングを施した後、走査型電子顕微鏡（日本電子社製 JSM-50A）により、舌背部の表面観察を行った。

3. 統計学的処理

組織計量学および免疫組織化学的観察項目について、正規性および等分散性（Bartlett 検定）が認められなかったため、ノンパラメトリック分散分析（Kruskal Wallis 検定）を用い、5%の危険率で有意差を認めた項目については、多重比較（Bonferroni の方法）を行い、各群間を比較検討した。統計解析ソフトは SPSS（windows 版）を使用した。

結 果

1. 体重変化

本研究で実験に用いた動物は Control 群33匹、Ethanol 群29匹、AA 群22匹、Ethanol 群24匹の計108匹であった。飼料摂取量は、各群とも1日平均約73.3kCal と良好で、栄養の偏りはみられなかった。また体重変化も、各群間で有意差は認められなかった（Table 1）。

2. 組織計量学的所見

舌背部の上皮厚径は、すべての群で有意差を認めなかったものの、Ethanol 群、AA 群、Ethanol+AA 群は Control 群より低い傾向が認められた。これに対し角化厚径は、AA 群と Ethanol+AA 群が Control 群と Ethanol 群に対して有意に増加していた（ $p<0.01$, Figure 5）。また重層細胞数は、Ethanol 群、AA 群が Control 群に対し有意に減少していた（ $p<0.05$, Figure 6）。舌縁部の上皮厚径は、すべての群で有意差を認めなかったが、AA 群は他の群と比較して低い傾向にあった（Figure 7）。角化厚径も同様に有意差はみられなかった。舌縁部は舌背部と比較して、上皮厚

Figure 5 Epithelial and keratic thickness (1) Dorsal site
A: Control B: Ethanol C: AA D: Ethanol+AA

Figure 6 Epithelial cell number (1) Dorsal site
A: Control B: Ethanol C: AA D: Ethanol+AA

径と角化厚径は低く、特に角化厚径は3部位中最も低かった。また重層細胞数は、AA 群が Control 群、Ethanol+AA 群に対して有意に減少していた（ $p<0.05$, Figure 8）。舌下面の上皮厚径はすべての群で有意差を認めなかった。これに対し角化厚径は、AA 群と Ethanol+AA 群が、Control 群に対して有意に増加していた（AA 群： $p<0.05$,

Figure 7 Epithelial and keratic thickness
(2) Lateral site
A: Control B: Ethanol C: AA D: Ethanol+AA

Figure 9 Epithelial and keratic thickness
(3) Sublingual site
A: Control B: Ethanol C: AA D: Ethanol+AA

Figure 8 Epithelial cell number
(2) Lateral site
A: Control B: Ethanol C: AA D: Ethanol+AA

Figure 10 Epithelial cell number
(3) Sublingual site
A: Control B: Ethanol C: AA D: Ethanol+AA

Ethanol+AA 群 : $p<0.01$, **Figure 9**). 重層細胞数は, 4 群間で有意差を認めなかった (**Figure 10**). 角化厚径に関しては, すべての部位を通じて Ethanol+AA 群が最も高かった. またすべての群において基底細胞直下の結合組織中に明らかな炎症性細胞浸潤は認められなかった.

3. 免疫組織化学的所見

PCNA は, 基底細胞の核を中心に種々の程度に陽性反応を示した (**Figure 11**). また, 核に均一に染色されるものと微細顆粒状を呈するものがみられた. Control 群および Ethanol 群における PCNA 陽性細胞は, 基底細胞から上の 1~2 層の細胞を中心に発現していた. AA 群と Eth-

Figure 11 Immunohistochemical staining with PCNA antibody (PC10) of dorsal tongue epithelium, $\times 400$

A: Control B: Ethanol C: AA D: Ethanol+AA

nol+AA 群の PCNA 陽性細胞は、基底細胞層だけでなく棘細胞層の上方まで発現を認めた。

各部位における PCNA 陽性率は、基底細胞層、棘細胞層ともに Control 群と比較して Ethanol 群、AA 群、Ethanol+AA 群に有意に増加していた ($p < 0.01$, Figure 12~14). さらに棘細胞層では、AA 群と Ethanol+AA 群が Ethanol 群と比較して有意に増加していた ($p < 0.01$). ま

た各部位を比較すると、全体的に舌背部の陽性率が最も高く、舌下面が低い値を示した。

4. 走査型電子顕微鏡による舌背部の表面観察

Control 群における舌隆起部後方の表面形態は、基部から数本の細糸に分岐する円錐形の糸状乳頭が密生しており、鞘状構造を示した二次乳頭が後方咽頭側へ傾斜し、各乳頭

Figure 12 PCNA population of dorsal site
A: Control B: Ethanol C: AA D: Ethanol+AA

Figure 14 PCNA population of sublingual site
A: Control B: Ethanol C: AA D: Ethanol+AA

Figure 13 PCNA population of lateral site
A: Control B: Ethanol C: AA D: Ethanol+AA

が一定の間隔で規則正しい配列をなしていた (Figure 15). これに対し, Ethanol 群と Ethanol+AA 群は, 二次乳頭が不規則にさまざまな方向へ傾斜し, 径の細小化を認めた. また AA 群は, 二次乳頭の萎縮や鞘状構造の消失を認める

ものもあった. Control 群を除く他の 3 群の乳頭の萎縮性変化はおおむね同様の所見であり, 大きな相違は認められなかった.

5. 舌に発生した角化病変の観察

肉眼的および組織学的に, 明らかな変化を認めたのは, Ethanol 群で 1 病変 (3.4%), AA 群で 2 病変 (9.1%), Ethanol+AA 群で 6 病変 (25.0%) の計 9 病変で, 特に Ethanol+AA 群が高い発生率を示した (Table 2). またすべての病変は過角化症であり, 舌隆起部における giant conical papilla と有郭乳頭の間に発生した. 部位は舌背部 4 病変, 舌縁部 2 病変, 舌下面 3 病変で, 肉眼的に乳頭状や白色, びらんであった. このうち舌背部に発生した病変は, 本来の糸状乳頭の形態が失われ, 組織学的に外築性の乳頭状増殖を示すもの (Figure 16A) や錯角化病変で一部に内向性増殖を示すもの (Figure 16B), 最表層に種々の厚さの角化層を有した, ヒト白板症に類似した組織像を呈するもの (Figure 16C) などが認められた. また多数の核分裂像や, 滴状の上皮突起の形成が一部に認められたものの (Figure 16B), 異型性は軽度であった. またすべての病変の上皮厚径, 角化厚径, 重層細胞数, PCNA 陽性率は, Control 群の平均値と比較して著明に増加していた.

Control

Ethanol

AA

Ethanol+AA

Figure 15 Scanning electron micrographs of dorsal tongue epithelium

Table 2 Number of tongue lesions with hyperkeratosis

Rat NO.	Group	Site	Clinical findings	Epithelial thickness	Kertic thickness	Cell number	PCNA population*	Incidence
1	Ethnol	Dorsal	Papillose	104.8μm	110.8μm	10.0	53.9%	3.4%
2	AA	Dorsal	White	101.5	135.6	8.8	49.2	9.1
3	AA	Sublingual	White	175.4	97.7	14.4	35.3	
4	Ethanol+AA	Dorsal	White+Erosive	125.6	116.5	13.0	45.3	25.0
5	Ethanol+AA	Dorsal	No finding	110.8	96.2	8.6	42.4	
6	Ethanol+AA	Lateral	No finding	110.8	65.0	10.0	41.3	
7	Ethanol+AA	Lateral	Erosive	97.1	82.1	10.3	50.5	
8	Ethanol+AA	Sublingual	White	136.2	55.8	13.8	53.2	
9	Ethanol+AA	Sublingual	White	220.0	98.8	17.2	40.7	

*Lower 1／3 area

考 察

飲酒は喫煙とならんで、回避可能な口腔癌のリスクファクターである。近年では、一般健常者の中から高度飲酒、喫煙歴をもつハイリスクグループを抽出し、上部消化管癌のスクリーニングを行い、早期癌を効率よく発見する試みもされている^{14, 15)}。以上より、飲酒による口腔発癌のメカニズムの一端を探ることは、癌の治療のみならず一次予防の観点からも重要であるといえる。

今回著者らは、飲酒単独による口腔粘膜の局所作用を検討し、特にアセトアルデヒドによる直接作用と発癌との因果関係について考察を行った。

1. 飲酒によるエタノールの局所作用について

Lieber ら¹²⁾の考案した5%エタノール含有飼料は、ビールのエタノール含有量と同等であり、Control 群との間で栄養学的に偏りがみられずエタノールによる影響を観察するのに適したモデルと考えられた。過去の動物実験では、いずれの臓器においてもエタノールの単独投与で癌を発生させたという報告はない¹⁶⁾。本研究においても、Ethanol 群で1個体に乳頭状病変を認めたのみであったことから、エタノール自体の発癌性はないと思われる。一般にエタノールが及ぼす口腔粘膜の障害は、中性脂肪よりなる粘膜上皮の阻止帯や表層細胞間の membrane coating granule によるバリアーの破壊(バリアー・ブレイカー説)¹⁷⁾が広く支持されている。Squire ら¹⁸⁾は、エタノールが溶媒となり、タバコなどに含まれるニトロソアミンやベンゾピレンなどの発癌物質を上皮基底細胞まで浸透させると報告した。ま

た望月ら¹⁹⁾は、ラット舌隆起部における4-nitroquinoline 1-oxide 発癌剤の局所侵入経路として、糸状乳頭間を指摘した。本研究におけるラット舌背部のSEM像では、Ethanol 群がAA群やEthanol+AA群と同様の萎縮性変化を認めたことから、エタノールによる糸状乳頭の配列不正や、二次乳頭の形態学的変化は、発癌物質の局所侵入や停滞性を高めている可能性があると考えられた。すなわちエタノールにおける発癌への関与は間接的であると思われる。

2. 飲酒によるアセトアルデヒドの局所作用について

アセトアルデヒドの代謝酵素であるALDH2の遺伝子型は、ALDH2*1／2*1(正常型)、ALDH2*1／2*2(ヘテロ欠損型)、ALDH2*2／2*2(ホモ欠損型)の3つが存在する²⁰⁾。このうちALDH2*1／2*2とALDH2*2／2*2は不活性型のALDH2*2をコードしており、飲酒によって生じるアセトアルデヒドの代謝が遅延するため、最大血中濃度がそれぞれ正常型の6倍、19倍になる²¹⁾。横山ら¹¹⁾は、大酒家の食道癌患者に、ALDH2*1／2*2の欠損型が著しく多いことを発見し、アルコールの肝臓での代謝により引き起こされる高アセトアルデヒド血症が、食道粘膜の発癌に関与している可能性を示した。一方著者ら²²⁾は、口腔癌患者に対し同様の研究を行ったが、食道癌ほど欠損型は多く認められず、口腔粘膜の発癌に高アセトアルデヒド血症による間接的な影響は少ないと考えられた。一方、ヒト舌組織においては、ADHの酵素活性が高いのに対し、ALDH2の酵素活性は低く、飲酒により局所で産生されたアセトアルデヒドが速やかに代謝されず、停滞しやす

Figure 16 Histopathologic features of dorsal tongue lesions with hyperkeratosis, left: H&E stain, $\times 100$, right upper: dorsal prominence, right lower: H&E stain, $\times 400$
A: Rat No. 1 B: Rat No. 2 C: Rat No. 4

いことが明らかになっている²³⁾。また、中等度飲酒（エタノール0.5g/kg body weight）後におけるヒト唾液中のアセトアルデヒド濃度は、最大143 μ Mで、肝臓での代謝を介した最大血中濃度の7 μ Mよりはるかに高濃度になり、この多くはエタノールが口腔内細菌によりアセトアルデヒドに代謝されるといった報告²⁴⁾もある。すなわち、飲酒によって口腔内で生じたアセトアルデヒドが、口腔粘膜に直接影響を与えている可能性があることを強く示唆している。アセトアルデヒドの発癌性は、蒸気化した1500ppmのアセトアルデヒドをラットに28か月間吸入させ、鼻腔、咽頭に発癌させた報告²⁵⁾があり、IARC²⁶⁾ではグループ2B（ヒトにおける発癌性が疑われる）の発癌物質に指定している。本研究のSEM像で認められた糸状乳頭の配列不正や、二次乳頭の形態学的変化は、発癌物質であるアセトアルデヒドがラット口腔粘膜に直接侵入し作用している可能性がある。しかし一方ではHomannら²⁷⁾が、Wistar系ラットに120mMのアセトアルデヒド水溶液を摂取させ舌、食道、胃粘膜を詳細に観察したが、病変は認められなかったと報告している。今回著者らは、アセトアルデヒドによる病変の発生を確認するため、180mMという比較的高濃度のアセトアルデヒド溶液を舌に直接塗布し局所作用を検討した結果、8個体に角化病変が確認された。角化病変の発現部位は、すべてgiant conical papillaeを除く舌隆起部であり、これは発癌剤により誘発されるラット舌癌の好発部位²⁸⁾と同様であった。このうちEthanol+AA群の発生率が最も高いのは、前述のエタノールによる局所浸透性の増加とアセトアルデヒドによる細胞傷害との相互作用による可能性が高いと考えられた。

3. エタノールおよびアセトアルデヒドによる舌粘膜上皮の組織計量学的変化について

ラット舌粘膜における上皮厚径の変化は、エタノール投与により口底部で有意に増加したという報告⁹⁾と、アセトアルデヒドの投与により有意に低下したという報告²⁷⁾がある。著者の結果では、エタノールとアセトアルデヒドがすべての部位の上皮厚径と重層細胞数に著明な影響を与えず、両者の報告を支持する結果とならなかった。角化厚径については、著者らの結果から舌背部と舌下面の角化亢進にアセトアルデヒドが関与している可能性が示唆された。角化とは、基底細胞で分裂増殖し、棘細胞を経て角化細胞まで分化する現象を意味する。したがって後述のアセトアルデヒドによる上層の棘細胞における増殖活性の増加が、角化を亢進する一つの要因になっている可能性が高い。ラット舌縁部についてはエタノールおよびアセトアルデヒドの影響を受けなかった。

4. エタノールおよびアセトアルデヒドによる舌粘膜上皮のPCNAの発現について

PCNAは非ヒストン核蛋白質（分子量36kD、等電点4.8）で、増殖サイクルのG1後期からS期の細胞核内に蓄積し、DNAポリメラーゼ δ の補助因子としてDNA合成に関与しており²⁹⁾、ヒト腫瘍の検索に広く用いられている³⁰⁻³²⁾。Shinら³³⁾は、頭頸部扁平上皮癌とそれに隣接した前癌病変において、正常粘膜から前癌病変、扁平上皮癌と段階的にPCNAの発現率が増加すると報告した。また上皮異形が高度になるほど上層の細胞でPCNAが発現するという報告もある³⁴⁾。エタノールとアセトアルデヒドに関しては、いずれも舌粘膜上皮の増殖活性が高まると報告されており^{9, 27)}、著者の結果はこれらを支持していた。さらにアセトアルデヒドでは、基底細胞だけでなく、上層の棘細胞までPCNAの発現率が増加しており、異常な増殖活性が認められた。部位別の検索では、舌背部が舌縁部、舌下面と比べ高い陽性率を示したが、この理由としてラット舌背部における乳頭下と今回計測した乳頭間を形成する細胞は性質が異なり、乳頭間の細胞は増殖活性が高く、この部位の基底細胞から分裂した細胞が乳頭部へ移動する³⁵⁾ことに起因していると考えられた。角化異常をともなう口腔粘膜上皮の増殖活性の亢進は、生体の外来刺激に対する防御反応の一つと考えられるが、修復のため分裂期にある細胞は発癌物質の標的となりやすく、上皮異形の悪性転化を示唆する重要な所見とする報告^{28, 36, 37)}もある。ヒトにおける慢性飲酒は、他の環境要因や代謝が関わる複雑な生体反応にともなうため、本研究のごとく単一の経路による粘膜変化は考えにくい。しかし飲酒発癌のメカニズムの一つとして、エタノールにより浸透性が増加した口腔粘膜に、局所で代謝されたアセトアルデヒドによる角化亢進や棘細胞にいたる増殖活性が加わり、角化病変へと進展し、上皮異形を経てやがて一部は癌化への変化を辿る可能性はある。すなわち飲酒単独による口腔発癌のメカニズムに、代謝産物であるアセトアルデヒドが関与している可能性が示唆された。

結 語

エタノールおよびアセトアルデヒドによるラット舌粘膜上皮の病理組織学的変化について検索を行い、以下の結果を得た。

1. 上皮厚径は、舌背部、舌縁部、舌下面のすべての部位で有意な変化を認めなかった。

2. 重層細胞数は、すべての部位で、組織学的に著明な変化を認めなかった。

3. 舌背部と舌下面では、AA群とEthanol+AA群の角化厚径が有意に増加し、アセトアルデヒドにより角化が亢

進していると考えられた。

4. 基底細胞層における PCNA 陽性率は、すべての部位で, Ethanol 群, AA 群, Ethanol+AA 群が著明に増加していた。さらに AA 群と Ethanol+AA 群では, 下方 1/3 の棘細胞層における PCNA の発現率が有意に増加し, アセトアルデヒドによる異常な増殖動態が観察された。

5. 舌背部の表面観察では, Ethanol 群と Ethanol+AA 群で 2 次乳頭の走向や配列に不規則化が認められ, エタノールによる影響と考えられた。

6. 肉眼のおよび組織学的に病変が発生したのは, Ethanol 群で 1 個体 (3.4%), AA 群で 2 個体 (9.1%), Ethanol+AA 群で 6 個体 (25.0%) であり, すべてが過角化症であった。

7. 飲酒による発癌のメカニズムの一つとして, エタノールにより口腔内で生成されるアセトアルデヒドが, 口腔粘膜に直接影響を与えている可能性が示唆された。

稿を終るに臨み, 終始御懇篤なる御指導, 御検閲を賜った市立川崎病院外科 大森 泰先生ならびに国立療養所久里浜病院内科 横山 顕先生に深甚なる感謝の意を捧げます。また, 本実験に際して御便宜, 御高閲を賜った本学病理学講座 井上孝助教授, 村松 敬講師に心から感謝申し上げます。さらに, 統計処理に関して御助言を頂いた本学数学科 菅野隆三教授に御礼申し上げます。そして本学口腔外科学第一講座教室員各兄に心から感謝の意を表します。

引用文献

- 1) Wynder, E.L., Bross, I.J., et al.: A study of the etiological factors in cancer of the mouth. *Cancer* 10: 1300-1323 1957.
- 2) Graham, G., Dayal, H., et al.: Detention, diet, tobacco, and alcohol in the epidemiology of oral cancer. *J Natl Cancer Inst* 59: 1611-1616 1977.
- 3) Blot, W.J., McLaughlin, J.K., et al.: Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 48: 3282-3287 1988.
- 4) Hirayama, T.: Epidemiology of cancer of the mouth. *Cancer Inst Monogr* 62: 179-183 1982.
- 5) 野村武史, 柴原孝彦, 他: 口腔癌における発癌要因に関する研究—喫煙, 飲酒に関する検討—. *頭頸部腫瘍* 24: 83-89 1998.
- 6) International Agency for Research on Cancer.: Alcohol drinking. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans 44, IARC, Lyon, 1988, p153-177.
- 7) Lieber, C.S., Seitz, H.K., et al.: Alcohol-related disease and carcinogenesis. *Cancer Res* 39: 2863-2885 1979.
- 8) Squire, C.A., Cox, P., et al.: Enhanced penetration of nitrosomornicotine across oral mucosa

- in the presence of ethanol. *J Oral Pathol* 15: 276-279 1986.
- 9) Maier, H., Weidauer, H., et al.: Effect of chronic alcohol consumption on the morphology of the oral mucosa. *Alcohol Clin Exp Res* 18: 387-391 1994.
- 10) Wight, A.J. and Ogden, G.R.: Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer—a review. *Oral Oncol* 34: 441-447 1998.
- 11) Yokoyama, A., Muramatsu, T., et al.: Esophageal cancer and aldehyde dehydrogenase-2 genotypes in Japanese males. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5: 99-102 1996.
- 12) Lieber, C.S. and DeCarli, L.M.: Fatty Liver in the rat after prolonged intake of ethanol with a nutritionally adequate new liquid diet. *J Nutr* 91: 331-336 1967.
- 13) Lieber, C.S. and DeCarli, L.M.: The feeding of ethanol in liquid diets. *Alcohol Clin Exp Res* 10: 550-553 1986.
- 14) Yokoyama, A., Ohmori, T., et al.: Successful screening for early esophageal cancer in alcoholics using endoscopy and mucosa iodine staining. *Cancer* 76: 928-934 1995.
- 15) Yokoyama, A., Ohmori, T., et al.: Cancer screening of upper aerodigestive tract in Japanese alcoholics with reference to drinking and smoking habits and aldehyde dehydrogenase-2 genotype. *Int J Cancer* 68: 313-316 1996.
- 16) Müller, P., Hepke, B., et al.: Tissue damage in the rabbit oral mucosa by acute and chronic direct toxic action of different alcohol concentrations. *Exp Pathol* 24: 171-181 1983.
- 17) Davenport, H.W.: Ethanol Damage to canine oxyntic glandular mucosa. *Proc Soc Exp Biol Med* 126: 657-662 1967.
- 18) Squire, C.A., Lesch, C.A., et al.: Penetration pathways of different compounds through epidermis and oral epithelia. *J Oral Pathol* 17: 512-516 1988.
- 19) 望月 彰: 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) 局所侵入経路とラット舌隆起部乳頭の超微形態に関する実験的研究. *歯科学報* 86: 777-804 1986.
- 20) Higuchi, S., Matsusita, M., et al.: Aldehyde dehydrogenase genotypes in Japanese alcoholics. *Lancet* 343: 741-742 1994.
- 21) Yamamoto, K., Ueno, Y., et al.: Genetic polymorphism of alcohol and aldehyde dehydrogenase and the effects on alcohol metabolism. *アルコール研究と薬物依存* 28: 13-25 1993.
- 22) Nomura, T., Noma, H., et al.: Aldehyde dehydrogenase 2 and glutathione S-transferase M1 polymorphisms in relation to the risk for oral cancer in Japanese drinkers. *Oral Oncol* 36: 42-44 2000.
- 23) Dong, Y.J., Peng, T.K., et al.: Expression and

- Activities of class IV alcohol dehydrogenase and class III aldehyde dehydrogenase in human mouth. *Alcohol* 13: 257-262 1996.
- 24) Homann, N., Somer, H.J., et al.: High acetaldehyde levels in saliva after ethanol consumption: Methodological aspects and pathogenetic implications. *Carcinogenesis* 18: 1739-1743 1997.
- 25) Woutersen, R.A., Appleman, L.M., et al.: Inhalation toxicity of acetaldehyde in rats. III. Carcinogenicity study. *Toxicology* 41: 213-231 1986.
- 26) International Agency for Research on Cancer.: Allyl compounds, aldehydes, epoxides and peroxides. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans 36, IARC, Lyon, 1985, p101-132.
- 27) Homann, N., Kärkkäinen, P., et al.: Effect of acetaldehyde on cell regeneration and differentiation of the upper gastrointestinal tract mucosa. *J Natl Cancer Inst* 89: 1692-1697 1997.
- 28) 高木多加志: 4-Nitroquinoline 1-Oxide 誘発ラット舌癌の発生過程における細胞動態に関する実験的研究. *歯科学報* 86: 777-804 1986.
- 29) 守内哲也, 和泉伸一: PCNA (DNA ポリメラーゼ δ 補助蛋白質). *細胞* 21: 99-103 1989.
- 30) Casasco, A., Giordano, M., et al.: PC10 monoclonal antibody to proliferating cell nuclear antigen as probe for cycling cell detection in developing tissues. *Histochem* 99: 191-199 1993.
- 31) Yu, C. and Filipe, M.: Update on proliferation-associated antibodies applicable to formalin-fixed paraffinembedded tissue and their clinical applications. *Histochem J* 25: 971-978 1993.
- 32) 岩井正行, 姚立, 他: 舌扁平上皮癌の増殖核抗原 (PCNA) による免疫組織化学的検討. *日口外誌* 40: 1-5 1994.
- 33) Shin, D.M., Voravud, N., et al.: Sequential increase in proliferating cell nuclear antigen expression in head and neck tumorigenesis: a potential biomarker. *J Natl Cancer Inst* 85: 971-978 1993.
- 34) Steinbeck, R.G., Moegge, J., et al.: DNA content and PCNA immunoreactivity in oral precancerous and cancerous lesions. *Oral Oncol Eur J Cancer* 29B: 279-284 1993.
- 35) Hume, W.J., Potten, C.S., et al.: Advances in epithelial kinetics-An oral view. *J Oral Pathol* 8: 3-22 1979.
- 36) Hume, W.J.: A theoretical consideration of some biological parameters involved in cell kinetic investigations of oral leukoplakia and abnormal states in stratified squamous epithelium. *J Oral Pathol* 10: 375-385 1981.
- 37) Yama, M., Inoue, T., et al.: Immunohistochemical study of PCNA and p53 in oral epithelial dysplasia: In relation to histopathological findings. *Oral Med Pathol* 1: 63-70 1996.