口腔扁平上皮癌の浸潤先進部における脈管密度の検討

—特に癌浸潤様式に伴う血管密度とリンパ管密度の推移の比較—

中 谷 弘 光¹⁾ 川 尻 秀 一²⁾ 田 中 彰²⁾
能 崎 晋 一²⁾ 野 口 夏 代²⁾ 加 藤 広 祿²⁾
長 谷 剛 志²⁾ 中 川 清 昌²⁾ 立 川 哲 彦³⁾
山 本 悦 秀²⁾

要旨：所属リンパ節転移は、口腔癌の悪性度にも最も相関する因子の一つであり、リンパ節転移の制御は臨床において重要な治療戦略である。従って、原発巣における微小リンパ管動態について高い関心が持たれてきた。しかし、微小血管との鑑別が容易でないため、なお不明な点が多い。今回われわれは、口腔扁平上皮癌における血管新生およびリンパ管新生と腫瘍の浸潤や増殖の関係を明らかにする目的で、5'-nucleotidase (5'-Nase) リンパ管染色-alkaline phosphatase (ALP) 血管染色の二重染色法を用いて微少血管、リンパ管密度と臨床的、病理組織学的因子および癌浸潤様式との関係について検討した。結果：1) 正常粘膜の血管、リンパ管密度はそれぞれ 27.4 ± 4.4 , 12.8 ± 4.0 で、また癌組織の血管、リンパ管密度はそれぞれ 9.5 ± 6.3 , 6.4 ± 1.7 であった。2) 腫瘍の大きさ、転移の有無および分化度ではいずれも有意差は認められなかったが、血管密度は非転移症例や高分化型に高い傾向にあった。一方、癌浸潤様式との関連性においては、浸潤傾向が高度のものほど血管密度が低くなる傾向がみられたが、リンパ管密度はほぼ一定で推移し、高度浸潤癌においてやや増加する傾向が認められた。

キーワード：血管新生、リンパ管新生、(血管およびリンパ) 脈管密度、2 重染色

緒 言

血管新生は腫瘍の増殖や進展において不可欠とされており¹⁾、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor: 以下 VEGF と略) の発現は多くの癌で独立した予後因子^{2,3)}とされている。かつて、リンパ管は腫瘍内には存在しないと考えられており、腫瘍リンパ管新生とリンパ節転移の関連は長く否定されてきた⁴⁾。しかし、1995 年に Kaipainen ら⁵⁾により VEGF-C が血管およびリンパ管内皮細胞増殖因子であることが報告されて以来、VEGF-C の発現とリンパ管新生の関連性がさまざまな癌^{6,7)}で報告されている。口腔癌においては、リンパ節転移と予後が密接な関係にあることから、血管新生のみならずリンパ管新生も浸潤や転移に関与している可能性が高い。そこで本研究では、ヒト口腔扁平上皮癌における血管新生およびリンパ管新生と腫瘍の浸潤や増殖との関係を明らかにする目的で、血管とリンパ管の二重染色標本を用いて癌組織の血管とリンパ管の密度を解析し、さらに臨床病

理組織学的因子との関連についても検討したので報告する。

材料および方法

1. 対象症例

1999 年 8 月から 2003 年 7 月の間に金沢大学医学部付属病院歯科口腔外科で、生検または手術を行った口腔扁平上皮癌凍結標本 26 例および昭和大学口腔病理学教室の病理ファイルより口腔扁平上皮癌と診断された口腔扁平上皮癌凍結標本 6 例の合計 32 例を対象とした。なお、対照群として正常口腔粘膜 5 例を用いた。症例の内訳は男性 21 例、女性 11 例で、年齢は 42 歳から 89 歳、平均 63.2 歳であった。原発部位は舌 13 例、下顎歯肉 9 例、上顎歯肉 2 例、口底 5 例、頬粘膜 3 例であった。病期分類は原発部位、原発腫瘍の大きさ (T 分類)、所属リンパ節転移の有無 (pN 分類) は、局所再発なき後発転移例も含め組織学的転移が確認された症例を N(+), そうでなかった症例を N(-) と分類した。病理組織学的には分化度および癌浸潤様式について分類した (表 1)。なお、癌組織および正常組織は、患者さんの同意を得た上で採取し研究に用いた。

2. 血管およびリンパ管染色 (5'-Nase-ALP 二重染色)

液体窒素にて凍結された新鮮凍結標本を $10\mu\text{m}$ の厚さに凍結切片を薄切し、シランコーティングを施したスライ

¹⁾ 市立敦賀病院歯科口腔外科 (主任：中谷弘光)

²⁾ 金沢大学大学院医学系研究科がん医科学専攻がん細胞学講座細胞浸潤学分野 (歯科口腔外科) (主任：山本悦秀教授)

³⁾ 昭和大学歯学部口腔病理学教室 (主任：立川哲彦教授)

[受付：2005 年 8 月 26 日、受理：2006 年 6 月 20 日]

表 1 対象症例

臨床的病理学的因子		症例数
性別	男性	21 例
	女性	11 例
年齢	42 歳～ 89 歳	63.2 歳
原発部位	舌	13 例
	下顎歯肉	9 例
	上顎歯肉	2 例
	口底	5 例
	頬粘膜	3 例
T 分類	T1	11 例
	T2	15 例
	T3	3 例
	T4	3 例
所属リンパ節転移の有無 (pN)		
転移 (-)		24 例
転移 (+)		8 例
分化度	高	22 例
	中	8 例
	低	2 例
癌浸潤様式	1 型	3 例
	2 型	4 例
	3 型	10 例
	4C 型	13 例
	4D 型	2 例

ドガラスに貼付させ、1時間乾燥を行った。乾燥後、4%パラホルムアルデヒド溶液にて40分間固定し、これをKatoら⁸⁾の方法に従って、5'-nucleotidase (Nase) 染色液 (0.2M Tris-maleate buffer, 20ml; distilled water, 22ml; 0.1M MgSO₄, 5 ml; 2%Pb (NO₃)₂, 3 ml; 5'-adenosine monophosphate, 25mg; L-tetramisole, 15mg; sucrose, 3.5g) に37℃で60分間浸漬した。その後蒸留水で十分に洗浄し、1%硫化アンモニウム溶液に室温で1分浸漬してリンパ管を発色した。また alkaline phosphatase (ALP) 染色液 (0.1M Tris-HCl buffer, 40ml; Naphtol AS-MX phosphate disodium salt, 40mg; Fast blue BB salt 40mg) に4℃で24時間浸漬し血管を発色した。

3. 血管およびリンパ管密度の測定

5'-Nase-ALP 標本を用い、浸潤先進部を任意3ヶ所ずつ100倍に設定した光学顕微鏡 (Nikon ECLIPSE E-600, 東京) にて写真撮影を行った。写真上にてALP染色された血管と5'-Nase陽性のリンパ管を判別し、その数を算定した。一視野中の血管およびリンパ管の数の平均を算定し、その腫瘍の密度とした。なお、5'-Naseは、血管やリンパ球も陽性反応を呈することが知られているため^{9,10)}、ALP陽性構造物または5'-Naseの両方に陽性の構造物は血管と

し、20μm以下の大きさの5'-Nase陽性構造物はリンパ球の可能性があるため、5'-Nase構造物から差し引いて残りリンパ管数として算定した。

4. 統計学的検討

各群の有意差検定は、二群間の検定においてStudent-t検定を、多群間の検定において一元配置分散分析法を用い、有意差が認められたものに対しては、FisherのPLSD法にて多重比較検定を行った。また、それらは5%未満の危険率をもって有意差ありとした。

結 果

1. 5'-Nase-ALP二重染色による血管およびリンパ管染色像および各算定値

正常口腔粘膜における血管およびリンパ管の局在は、粘膜下組織に存在し血管は比較的円形を呈するものが多く、ALP陽性で青紫色に染色されていた。また、リンパ管は円形を呈するものも認められるが、やや扁平なものが多く、5'-Naseにて茶褐色に染色されていた (写真1)。なお、正常口腔粘膜における血管密度は 27.3 ± 4.4 、リンパ管密度は 12.8 ± 4.0 であった。一方腫瘍の浸潤先進部における血管およびリンパ管は、腫瘍直下の間質部に散在性に認められ、さらに深部の筋層には既存血管と思われる大きな血管も観察された。今回の染色方法では血管とリンパ管は比較的明瞭に染め分けられ、両者の区別は容易であった。算定は新生血管およびリンパ管の旺盛な浸潤先進部を中心にを行った。その結果、血管密度は 9.5 ± 6.3 、リンパ管密度は 6.4 ± 1.7 であった (写真2, 表2)。

2. 血管およびリンパ管密度と臨床的病理組織学的因子との関連性

1) 腫瘍の大きさ (T分類)

腫瘍の大きさ (T分類) と血管およびリンパ管密度の関係について、血管密度では T1 症例 10.4 ± 9.2 、T2 症例 9.2 ± 5.2 、T3 症例 9.1 ± 0.4 、T4 症例 8.1 ± 0.9 、リンパ管密度では T1 症例 6.1 ± 1.7 、T2 症例 6.4 ± 2.2 、T3 症例 7.0 ± 1.6 、T4 症例 7.4 ± 1.8 となり血管密度およびリンパ管密度は腫瘍の大きさに対して有意差は認められず、統計学的にも関連性はなかった ($p = 0.958$) (表3)。

2) 所属リンパ節転移の有無 (pN分類)

所属リンパ節転移の有無と血管およびリンパ管密度の関係については、再発なき後発転移例も含め組織学的に転移が確認された症例をN(+), そうでなかった症例をN(-)と分類した。血管密度は転移症例 5.1 ± 2.1 、非転移症例 9.7 ± 7.3 と非転移症例に高く認められたが有意差はなかった。また、リンパ管密度では転移症例 6.6 ± 1.6 、非転移症例 5.9 ± 2.4 と差がなかった (表4) ($P = 0.102$)。

3) 病理組織学的分化度

写真 1 正常粘膜における 5'-Nase-ALP 染色による、血管およびリンパ管の二重染色像 血管 (矢印, 青色), リンパ管 (矢尻, 茶色); ($\times 100$)

写真 2 癌組織における 5'-Nase-ALP 染色による、血管およびリンパ管の二重染色像 T: 腫瘍 血管 (矢印, 青色), リンパ管 (矢尻, 茶色); ($\times 100$)

表 2 正常粘膜と癌組織の血管およびリンパ管密度

	正常粘膜	癌組織
血管密度	$27.4 \pm 4.4(5)$	$9.5 \pm 6.3(32)$
リンパ管密度	$12.8 \pm 4.0(5)$	$6.4 \pm 1.7(32)$

() は症例数

表 3 血管およびリンパ管密度と腫瘍の大きさ (T 分類) との関係

密度	腫瘍の大きさ (T 分類)				平均
	T1	T2	T3	T4	
血管密度	$10.4 \pm 9.2(11)$	$9.2 \pm 5.2(15)$	$9.1 \pm 0.4(3)$	$8.1 \pm 0.9(3)$	9.5 ± 6.3
リンパ管密度	$6.1 \pm 1.7(11)$	$6.4 \pm 2.2(15)$	$7.0 \pm 1.6(3)$	$7.4 \pm 1.8(3)$	6.4 ± 1.7

One-factor ANOVA

N.S.

() は症例数

表 4 血管およびリンパ管密度と所属リンパ節転移の有無との関係

	所属リンパ節転移の有無 (pN)		
	転移 (+)	転移 (-)	平均
血管密度	$5.1 \pm 2.1(8)$	$9.7 \pm 7.3(24)$	9.5 ± 6.3
リンパ管密度	$6.6 \pm 1.6(8)$	$5.9 \pm 2.4(24)$	6.4 ± 1.7

Student-t test

N.S.

() は症例数

病理組織学的分化度と血管およびリンパ管密度との関係において血管密度は、高分化型 9.8 ± 7.9 , 中・低分化型 5.7 ± 1.8 と有意差は認められなかった。一方、リンパ管密度では、高分化型 6.5 ± 2.7 , 中・低分化型 6.1 ± 2.7 となり有意差は認められなかった (表 5) ($P = 0.159$)。

4) 癌浸潤様式

血管密度と癌浸潤様式との関係においては、1 型 $24.7 \pm$

8.4 , 2 型 13.0 ± 5.8 , 3 型 6.8 ± 1.9 , 4C 型 5.0 ± 1.6 , 4D 型 3.3 ± 0.4 となり、浸潤傾向が高度のものほど血管密度が低くなる傾向がみられ統計学的にも有意な差を認めた ($P < 0.01$)。一方リンパ管密度では、1 型 9.1 ± 1.3 , 2 型 5.9 ± 1.0 , 3 型 5.7 ± 2.2 , 4C 型 7.0 ± 1.1 , 4D 型 9.3 ± 0.3 とほぼ一定で推移したが高浸潤癌においてやや高い傾向があり、統計学的に有意な差を認めた ($P < 0.01$) (図 1)。

表 5 血管およびリンパ管密度と病理組織学的分化度との関係

	病理組織学的分化度		
	高分化型	中, 低分化型	平均
血管密度	9.8 ± 7.9(22)	5.7 ± 1.8(10)	9.5 ± 6.3
リンパ管密度	6.5 ± 2.7(22)	6.1 ± 2.7(10)	6.4 ± 1.7
Student-t test	N.S.		() は症例数

- a) 正常粘膜と2型, 3型, 4C型, 4D型との比較 $p < 0.01$
 b) 1型と2型, 3型, 4C型, 4D型との比較 $p < 0.01$
 c) 2型と3型, 4C型, 4D型との比較 $p < 0.01$

- d) 正常粘膜と1型, 2型, 3型, 4C型, 4D型との比較 $p < 0.01$
 e) 1型と2型, 3型との比較 $p < 0.05$
 f) 4D型との比較 $p < 0.05$

図 1 浸潤様式から見た血管とリンパ管の密度の推移の比較

考 察

血管新生は, 1970 年代初め Folkman¹⁾ が基礎研究をはじめて以来, 分子レベル, 細胞レベルでの解析が行われるようになってきた。その後, 多くの研究者が癌の転移や

予後と腫瘍周囲の血管密度との関連性についての検討を行い, 他臓器の癌では血管密度が増すにつれ転移が認められるようになることが報告¹¹⁾ されている。しかしながら, 口腔癌において未だ一定の見解は得られておらず, 臨床例の検討で血管密度の低い癌で転移が多くなることが報

告¹²⁾されている。

一方、腫瘍とリンパ管数に関する報告では、かつてリンパ管数の増加は、腫瘍が誘導する現象とは考えられておらず、観察されるリンパ管は機能していないとされてきた^{13,14)}。しかし最近、リンパ管内皮細胞増殖因子として VEGF-C の存在の報告やリンパ管特異的マーカーとして lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor (LYVE-1)¹⁵⁾ や D2-40¹⁶⁾ が開発され、リンパ管の増殖は腫瘍と関連したリンパ管新生とみなされ、浸潤や転移との相関について議論されるようになってきた。しかし、同一標本上で血管とリンパ管を識別することは非常に困難である。そこでわれわれは免疫組織化学染色も含め各種染色方法を行い検討したところ、5'-Nase-ALP 二重染色法が血管とリンパ管を最も明確に識別できた。そこで今回われわれは血管およびリンパ管新生と口腔扁平上皮癌の浸潤・転移との関係を明らかにすることを目的に、5'-Nase-ALP 二重染色を使用し本研究を行った。その結果、臨床病理組織学的因子である T 分類、pN 分類、分化度、また転移の有無と原発部位においては関連性が認められなかったが、血管密度と癌浸潤様式との関係については、浸潤様式の高度なものほど血管密度が減少する傾向がみられた。一方、リンパ管密度を算定した結果、ほぼ一定に推移したが、低～中等度浸潤型の 2, 3 型でやや低下し、高度浸潤癌の 4C 型、4D 型でやや増加する傾向がみられた。また、著者ら¹⁷⁾ が行った DMBA 誘発ハムスター舌癌モデルを使用した血管およびリンパ管密度の検討でも、4C 型で高値を示し同様の結果が得られている。

これらの理由は不明であるが、癌の浸潤部では血管やリンパ管の破壊と新生が同時に活発に行われているように思われた。著者らは、臨床例と実験誘発舌癌モデルを用いた実験の双方で浸潤様式の高度な癌において血管密度が低くなる結果を得ている。しかしながら同じ発癌モデルを用いた実験で VEGF の発現を観察した結果では、浸潤様式が高度になるほど VEGF の発現は高度になり、血管新生の能力は浸潤様式の高度な癌ほど高いことが予想された。これらの結果を総合すると、浸潤様式の高度な 4C 型や 4D 型の腫瘍では多くの新生血管を作るが、周囲組織への浸潤破壊がそれを上回るため、結果として血管密度が低くなることが予想された。またこれらの浸潤様式 4C 型や 4D 型の腫瘍は低酸素状態でも活発に活動することが可能なため、血管新生を待たず周囲へ浸潤して行くのではないかと考えられた。一方、リンパ管は血管密度ほど大きな変化はなく、比較的恒常的な状態であるように見受けられたが、VEGF-C の発現が高浸潤癌で高いという報告もあるため、癌の浸潤先進部では血管と同様にリンパ管も破壊と新生が同時に活発に行われているように思われる。今回の結果からは、概ね一定の値で推移しながらも詳細に見てみる

と、浸潤様式 1 型から 3 型までは、リンパ管密度が徐々に減少しているため、癌細胞の浸潤能が上がるにつれリンパ管の破壊が進行し、リンパ管数が減少したと思われる。しかし、浸潤様式 4C 型、4D 型の高度浸潤癌では癌細胞によるリンパ管の破壊を上回るリンパ管新生が起こっているものと思われた。以上の結果より次のような仮説が考えられた。

1) 癌組織の初期増殖に必須である腫瘍血管新生は、一定以上の大きさになった高度浸潤癌では、その必要性が低下し、癌の浸潤性に相応する血管破壊能に凌駕される。

2) 一方、リンパ管密度は腫瘍の進行に関わりなく概ね一定で推移するが、高度浸潤癌でやや亢進することは破壊よりも新生が勝っていることを意味し、高いリンパ節転移形成率との関連性が示唆される。

結 語

口腔扁平上皮癌の浸潤増殖過程における血管新生およびリンパ管新生の変化とその意義の解明を目的として、ヒト口腔扁平上皮癌において臨床病理組織学的因子と同一標本で算定を行った血管密度およびリンパ密度との関係について検討を行ったところ以下の結論を得た。

1. 二重染色により得られた標本から同時に算定した正常粘膜と癌組織の血管およびリンパ管密度は、正常粘膜で血管密度 27.3 ± 4.4 、リンパ管密度 12.8 ± 4.0 で、癌組織で血管密度 9.5 ± 6.3 、リンパ管密度 6.4 ± 1.7 であった。

2. 腫瘍の大きさ、所属リンパ節転移の有無および病理組織学的分化度と血管およびリンパ管密度との関連性ではいずれも有意差はなく、血管密度は非転移症例に高く、また高分化型に高い傾向があった。

3. 癌浸潤様式において浸潤傾向が高度のものほど血管密度が低くなる結果であった。一方リンパ管密度では、ほぼ一定値で推移したが、低～中等度浸潤癌でやや低下し、高浸潤癌においてやや増加する傾向があった。

以上、口腔扁平上皮癌の血管密度は腫瘍の浸潤様式に応じて減少したのに対し、リンパ管密度は高度浸潤例でやや高い値を示した。

文 献

- 1) Folkman, J.: Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res* 43 : 175-203, 1985.
- 2) Smith, B.D. and Smith, G.L.: Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein levels in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 18 : 2046-2052, 2000.
- 3) Gasparini, G.: Prognostic value of vascular endothelial growth factor in breast cancer. *Oncologist* 5 : 37-44, 2000.
- 4) Folkman, J.: Tumor angiogenesis and tumor growth. *N Engl J Med* 334 : 920-921, 1996.

- 5) Kaipainen, A., Korhonen, J., et al.: Expression of the *fms*-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 3566-3570.
- 6) Yonemura, Y., Endo, Y., et al.: Role of vascular endothelial growth factor C expression in the development of lymph node metastasis in Gastric cancer. *Clin Cancer Res* 5 : 1823-1829, 1999.
- 7) Akagi, K., Ikeda, Y., et al.: Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression in human colorectal cancer tissues. *Brit J Cancer* 83 : 887-891, 2000.
- 8) Kato, S. and Miyauchi, R.: Enzyme-histochemical visualization of lymphatic capillaries in the mouse tongue: light and electron microscopic study. *Okajimas Fol. Anat Jpn* 65 : 391-404, 1989.
- 9) Zimmermann H.: 5'-nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem J* 285 : 345-365, 1992.
- 10) 牧野修治郎 : DMBA 誘発ハムスター舌癌のリンパ節転移に関する組織化学的研究. *日口外誌* 47 : 479-494, 2001.
- 11) Igarashi, M., Dhar, D.K., et al.: The prognostic significance of microvessel density and thymidine phosphorylase expression in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer* 82 : 1225-1232, 1998.
- 12) Moriyama, M., Kumagai, S., et al.: Immunohist chemical study of tumour angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Oral oncol* 33(5) : 369-374, 1997. Biddinger PW, Duperier FD.: Tumor angiogenesis as a prognostic indicator in T2-T4 oral cavity squamous cell carcinoma; A clinical-pathologic correlation. *Head Neck* 19 : 276-280, 1997.
- 13) Dumont, A.E.: Factor VIII-related antigen.: *J Nat Cancer Inst* 85 : 674-676, 1993.
- 14) Folkman, J.: Angiogenesis and tumor growth. *New Eng J Med* 334 : 920-921, 1996.
- 15) Banerji, S., Ni, J., et al.: LYVE-1, a New Homologue of the CD44 Glycoprotein, Is a Lymph-specific Receptor Hyaluronan. *J Cell Biol* 144 : 789-801, 1999.
- 16) Kahn, H.J. and Marks, A.: A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. *Lab Invest* 82 : 1255-1257, 2002.
- 17) Nakaya, H., Kawashiri, S., et al.: Influences of angiogenesis and lymphangiogenesis on cancerous invasion in experimentally induced tongue carcinoma. *J Oral Pathol Med* 34 : 89-92, 2005.

**Studies on vessel densities at invasive front of oral squamous
cell carcinoma, with special reference to comparison
between blood and lymph vessel densities
according to mode of cancer invasion**

Hiromitsu Nakaya¹⁾, Shuichi Kawashiri²⁾, Akira Tanaka²⁾,
Shinichi Nozaki²⁾, Natsuyo Noguchi²⁾, Koroku Kato²⁾,
Takashi Hase²⁾, Kiyomasa Nakagawa²⁾, Tetsuhiko Tachikawa³⁾
and Etsuhide Yamamoto²⁾

¹⁾ Department of Dentistry and Oral Surgery, Municipal Tsuruga Hospital
(Chief: Hiromitsu Nakaya)

²⁾ Oral & Maxillofacial Surgery, Department of Cell & Tissue Biology,
Division of Cancer Medicine, Kanazawa University
Graduate School of Medical Science
(Chief: Prof. Etsuhide Yamamoto)

³⁾ Showa University School of Dentistry, Department of
Oral Pathology and Diagnosis
(Chief: Prof. Tetsuhiko Tachikawa)

Abstract

Regional lymph node metastasis is closely related to the prognosis of squamous cell carcinoma of the oral cavity, and control of lymph node metastasis is an important therapeutic strategy. Therefore, microlymphatic movement is of concern in the primary lesion. However, there are many ambiguous points in that it can be difficult to distinguish between blood vessels and lymph vessels. This study was conducted in order to clarify the various relationships among angiogenesis, lymphangiogenesis, and tumor invasion in cancers of the oral cavity. Using a double stain of 5'-nucleotidase-alkaline phosphatase, blood and lymph vessel densities were measured simultaneously. Thereafter, the relationship between clinicopathological factors and blood and lymph vessel densities was investigated.

Results: 1) Blood and lymph vessel densities in normal mucosal epithelium were 27.4 ± 4.4 and 12.8 ± 4.0 , respectively. On the other hand, those of cancer cases were 9.5 ± 6.3 and 6.4 ± 1.7 , respectively. 2) Among the clinicopathological factors, T category, N category and grade of tumor differentiation did not correlate with blood and lymph vessel densities in metastatic or moderately to poorly differentiated cases. On the other hand, regarding the mode of invasion, the more diffuse the mode of invasion the higher the blood vessel density. However, the lymph vessel density was generally similar in each grade of mode of invasion with a slight increase in highly invasive carcinoma.

Key words : angiogenesis, lymphangiogenesis, (blood and lymph) vessel densities, double stain

Requests for reprints to: Dr. Nakaya H., Department of Dentistry and Oral Surgery, Municipal Tsuruga Hospital, 1-6-60, Mishima-machi Tsuruga, 914-8502 Japan