ハムスター下顎歯肉における DMBA 誘発癌と 神経のかかわりについて

岡 本 勝

九州歯科大学口腔病理学講座 (指導: 福山 宏教授)

平成 14 年 2 月 25 日受理

Relationship between DMBA-induced Carcinoma of Mandible Gingiva in the Hamster and Nerve Fibers

Masaru Okamoto

Department of Oral Pathology (Director: Prof. Hiroshi Fukuyama)
Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

It has not yet been demonstrated as a conclusion whether or not the nerve fibers may play a role in developing a tumor.

To clarify the relationship between DMBA-induced carcinoma of the gingiva and the nerve tissue, 42-day-old male Syrian golden hamsters (n=48) were used.

After the left inferior alveolar nerve was cut at the mandibular foramen, the gingival surface at the lower first molar on both sides was scratched with a barbed broach. Subsequently, a 2.0 % solution of DMBA in acetone was smeared with a small brush on the gingival surface three times a week until gross tumors were developed. At 0, 1, 4, 8, 12, 20, 22 and 24 weeks postoperatively, the animals were deeply anesthetized and perfused transcardially with isotonic saline followed by the modified Bouin solution for subsequent neurohistopathological examinations.

The following results were obtained:

1. Tumor growth was observed in both the experimental and control groups. Macroscopically, the gingival surface with the nerve cut showed with time an elevation followed by ulceration, polyps, and exophytic type tumors with mixed features. Histologically, it indicated the nature of a carcinoma.

2. The tumors in the experimental group showed a faster development and a greater expansion than those in the control group.

3. As the mucous epithelium changed into carcinoma, nerve tissues were damaged by the tumor cells and the distribution of nerve fiber was decreased. However, regenerated nerve fibers were also found in the tumors of both groups.

4. The regenerated nerve fibers terminated in the intercellular space of the tumor cells and their stromal tissue in the experimental and control groups.

5. Endings of the regenerated nerve fibers in the tumor of the experimental and control

groups were not of specific type, but free nerve endings.

These results suggest that the gingival branch of the inferior alveolar nerve might exhibit some effects on the process of carcinogenesis, in addition to its original sensory function.

Key words: DMBA / Syrian golden hamster / Squamous cell carcinoma / Nerve fiber

緒 言

器官発生と神経のかかわりにおいて, Lumsden (1979)¹⁾ と Chiego (1995)²⁾ らは神経が動物種によっては器官発生過程を調整すると述べており, また, Lumsden¹⁾ や Halstead-Tarlo (1968)³⁾, Northcutt ら (1983)⁴⁾ は神経が創傷治癒における調節, すなわち, 傷害, 刺激に対する防御因子として存在すると報告している. そこで, 腫瘍の発育伸展にも神経の関与が推測される. 癌とは局所の細胞に対し増殖や分化の障害を来し, そして, 上皮が形態変化を伴って悪性化しては周囲を破壊, 拡大してゆくものと考えられている. これらの過程で発癌部位に関わる神経が, 腫瘍化に伴ってどのような動態を示すのか, またその意義については異論があり, 今日でも結論は出されていない.

発癌実験によく用いられる化学物質として9, 10—dimethyl-1, 2-benzanthracene (以下DMBA), 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO), urethan, 20-methylcholanthreneなどが今日よく知られているが, 特にDMBAはハムスターには効率良く発癌することから, ハムスターは実験腫瘍モデルとして定着している.¹⁴⁻²⁰⁾

そこで, 癌の発生過程と神経の形態学的あるいは, 機能的関係を明らかにするために, DMBAを用いたハムスターの誘発癌実験モデルを用い, 発癌領域における支配神経の切断実験を加え, 癌化に伴う神経の役割を神経組織学的に検索した. その結果, 癌化の過程に神経が関係していることを示唆する結果を得たので, その概要について述べる.

実験材料及び実験方法

I. 実験動物とその飼育条件

雄性ゴールデンシリアンハムスターの生後7週齢(平均体重90g)のものを48匹使用した. 実験期間中, 動物は約22℃の恒温室内でディスポーザブル・ケージを用い, 1ケージ1頭ずつ飼育した. 試料は, 通常の固形試料(MF, オリエンタル)で, 飲料水は水道水を, 給水瓶にて自由に摂取させた.

なお, この実験は, 九州歯科大学動物実験委員会の認可に基づいて行った.

II. 実験方法

頰側歯肉粘膜発癌部における神経の関わりを検索するため, 各実験動物の下顎左側の下歯槽神経切断後その支配領域に発癌させた発癌群を実験群, 下顎右側に非切断で発癌させた発癌群を対照群とした. そして, 両群を0, 1, 4, 8, 12, 20, 22, 24週の観察期間毎に8群に分け, 各群に6匹をあてて観察を行った(図1).

実験手順については, A. 左下歯槽神経切断術, B. 神経切断一週間後両側下顎歯肉頰粘膜にDMBA塗布処置の開始(塗布期間6カ月)およびその後の経過観察, C. 試料採取と標本作成および病理組織学的検索, D. 統計学的分析にわけて説明する.

A. 下歯槽神経切断術

ハムスター腹腔内投与による5%ペントバルビタールナトリウム(15mg/kg, 大日本製薬)麻酔下に, 下歯槽神経切断術をRehak (1963)⁵⁾の方法で行なった. すなわち左側の耳下腺咬筋部を剃毛し, 皮膚切開を加えた後, 頰囊・咬筋の剥離・下顎孔付近の骨削除を行った. そして, 可及的無傷的に左下歯槽神経と左下歯槽動静脈を分離し, 速やかに左下歯槽神経だけを下顎孔の高さで約3mm切除した後, 切断端を焼灼した. 剥離した組織を復位後, 塩酸オキシテトラサイクリン(30mg/kg, 昭和薬品)を散布縫合し, 1週間後に抜糸した.

B. 神経切断一週間後, DMBA塗布の開始(塗布期間

図1 観察期間.

6 カ月) および経過観察

藤田ら (1972)⁶⁾ の方法に準じ、無麻酔下でハムスター下歯槽神経支配領域の下顎左右第一大臼歯頬側歯肉粘膜をクレンザーで擦過し、直ちに歯科用レジン毛筆を使って 2.0% DMBA アセトン溶液を週 3 回塗布した。そして 1, 4, 8, 12, 20, 22, 24 週にわたって経過観察を行った。粘膜面の擦過と DMBA 塗布を対照群とした。

C. 試料採取と標本作成および病理組織学的検索

実験動物は、5% ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) の腹腔内投与による麻酔下で、ヘパリン (50 Unit, 清水製薬) を腹腔内投与して開腹、開胸し、左心室より頭部を生理食塩水で灌流し、次にブアン変法神経固定液で灌流固定させた。その後直ちに下顎を摘出し、さらに同固定液で浸漬固定した。次に、20% ギ酸クエン酸ナトリウム脱灰、5% 硫酸ナトリウム溶液による中和、流水にて十分に水洗した後、通法によりパラフィンにて包埋を行った。そして、標本、擦過部位を中心に舌尖側より前額断で、Hematoxylin-Eosin 重染色用に 6 μ m、神経染色用に 12 μ m の連続切片を作成した。染色は Hematoxylin-Eosin 重染色、および Ungewitter (1951)⁷⁾ の尿素-硝酸銀法を Powers (1952)⁸⁾、上野 (1961)⁹⁾ らが改良した神経染色を行った後、光学顕微鏡で観察した。

D. 統計学的分析

試料採取に先立ち、体重測定、実験部位の肉眼的観察を行い、ノギスにて腫瘍の計測をした。腫瘍は、ほぼ球形の発育をしていたので最大長径のみを求めた。腫瘍の経時的な大きさの変化と左右差については Fisher の PLSD 検定を行い、統計学的な評価を行った。有意水準はいずれも $p < 0.05$ とした。

結 果

I. 腫瘍平均径の推移と発癌過程における肉眼所見

対照群、実験群ともに実験群での左下歯槽神経切断時を基準 (0 週) として、擦過と塗布開始を行った (図 2)。

A. 対照群

1, 4 週は、実験部位の粘膜所見に顕著な炎症所見はみられなかった。8 週後では実験部位に一致して粘膜面はやや発赤、粗造化し、わずかに歯肉が隆起していた。12 週後においては、炎症所見に加えてびらん、潰瘍の形成がみられ (図 3, 4)、 2.50 ± 0.49 mm の乳頭腫様の腫瘍が形成された。20 週後では 12 週と比較し、さらに乳頭腫様の腫瘍は 5.00 ± 0.80 mm と増大していた (図 3, 5)。そして、22 週後、擦過部に直径 11.00 ± 1.55 mm の 1~

図 2 ハムスター口腔内写真 0w.
神経切断直前の所見。

数個の外向性腫瘍の形成が認められ (図 3, 6)、24 週後には、さらに大きい直径 12.00 ± 1.41 mm の径を持つ巨大な有茎性の球状腫瘍の形成へと発達していた (図 3, 7)。

B. 実験群

1, 4, 8 週までは、対照群の所見と比べて、大きな相違は認められなかった。12 週後では、対照群と同様に 3.00 ± 0.63 mm の乳頭腫様の隆起を認めたが、潰瘍形成については、対照群より大きい傾向が認められた (図 3, 4)。20 週後では擦過部を中心にこれらの乳頭腫様所見の発現は対照群と比べて顕著で、より大きな 6.00 ± 1.26 mm の有茎性の腫瘍形成が認められた (図 3, 5)。そして、22 週後、対照群と比べてやや大きい直径 13.00 ± 1.41 mm の径を持つ数個の腫瘍の形成が認められ (図 3, 6)、24 週後には、さらにその腫瘍は直径 15.00 ± 2.00 mm で対照群よりも増大していた (図 3, 7)。顎下部は両群共に異常は認められなかった。

以上より潰瘍形成の時期と乳頭腫発現の時期までは、両群共に、ほとんど差は認められなかったが、対照群と比較し実験群における腫瘍の平均径が大きく、24 週における腫瘍の大きさの左右差には有意差があることも示された (図 3, 8)。

II. 発癌過程における病理組織学的変化

A. 対照群

1, 4 週において、被覆する粘膜上皮層には特に異常は認められなかった。しかし 4 週後から上皮層直下の血管に充血がみられ、Langerhans cell やメルケル細胞と思われる clear cell も認められた。8 週後においては棘細胞層や過形成による粘膜上皮部の肥厚が認められるよう

図3 腫瘍最大径の経時的変化。

図4 ハムスター口腔内写真 12w.

右矢印: 対照側 左矢印: 実験側

両側の歯肉は発赤を示し隆起して一部にびらん、潰瘍形成が認められる。しかし実験側の潰瘍形成による破壊が著しい。

図5 ハムスター口腔内写真 20w.

右矢印: 対照側 左矢印: 実験側

乳頭腫様腫瘍の形成。組織学的に実験側では癌化が認められている。歯肉は易出血性である。

図6 ハムスター口腔内写真 22w.

右矢印: 対照側 左矢印: 実験側

両側に外向性腫瘍の形成がみられる。特に実験側に著しい。対照側も組織学的に癌化が認められている。

図7 ハムスター口腔内写真 24w.

右矢印: 対照側 左矢印: 実験側

巨大な有形成腫瘍形成が認められる。対照側に比較し実験側で著しい。

図8 対照側より増大した実験側外向性腫瘍(矢印部) 24w.

図9 対照側 12 週. (H-E. ×50)

clear cell の増加と共に軽度の上皮異形成を伴う肥厚と上皮脚の著しい伸長が認められる.

H-E: Hematoxylin-Eosin 重染色

図11 対照側 22 週. (H-E. ×33)

外向性の増大した腫瘍も固有層に向かって初期浸潤癌の像を呈する. 大小の癌巣が深状構造を示し浸潤性発育を示す所見が認められる.

図10 対照側 20 週. (H-E. ×33)

外向性かつ内向性に形成された腫瘍は上皮異形成が著しくなり, 棘細胞症, 異角化を示す. 腫瘍の間質部にはリンパ球主体の炎症性細胞の浸潤が認められる.

図12 対照側 24 週. (H-E. ×20)

外向性かつ深部に浸潤発育を示す像を呈する.

になった. 12 週後では, 潰瘍縁から菲薄な上皮の潰瘍中心部への伸展と, 著しい上皮脚の伸長がみられた. 潰瘍部周辺の歯肉上皮層では, いずれも, 基底膜は明瞭であったが, 有棘細胞層での異角化などの上皮異形成を伴って, 角化層と共に著しく肥厚していた (図 9). 潰瘍底部は好中球やリンパ球主体の炎症細胞の浸潤と fibrin の析出および固有層部から線維芽細胞の増生と膠原線維による裏層がみられた. 20 週後では, 先に述べた 12 週の所見に加え, 潰瘍周縁の上皮が著しく肥厚しており, 特に有棘層の肥厚 (棘細胞症) が著明で, また, 異角化も散見された. その部の基底細胞は, 配列不正, 大小不同化, 多形性および極性の乱れを示し, 上皮異形成が進

んでいて (図 10), 潰瘍部は肉芽組織で占拠されて, 固有層から筋層の表面にかけてリンパ球主体の炎症細胞の浸潤が認められた. 実験開始 22 週より癌と診断でき, 腫瘍を被覆する上皮には, 表面部での一部壊死を伴い, 全体的には上皮異形成がさらに重篤化し, 胞巣状に浸潤性発育を示し, 筋層深くかつ頬側歯肉から舌側の口腔底にまで拡大していた. そして, 腫瘍の大部分を占める大小の胞巣には一部角質真珠形成が認められた. また, これら外向性に増殖した胞巣間の間質部には, 線維化を伴った肉芽組織がみられ (図 11), 充血, 拡張した豊富な血管形成, リンパ球主体の炎症細胞の浸潤が広範囲に及んでいた. 24 週後はさらに乳頭状に腫瘍が増大し, かつ, 22 週

図13 実験側 12週. (H-E. ×50)
上皮の過角化, 錯角化, 上皮脚の伸長が認められる. 核細胞質比の異常や有糸分裂の増加が認められる.

図14 実験側 20週. (H-E. ×33)
対照側よりも早く疣贅癌様の間質部へ浸潤発育する上皮部は, 初期浸潤癌の像を呈している.

での所見が増強されていた (図12).

B. 実験群

対照群と比べて1週から8週までは, 粘膜上皮層に肥厚がみられ, 固有層での好中球の軽度の浸潤が対照群より早期に認められた. Langerhans cellやメルケル細胞などの clear cellも1週から認められた. 4, 8週群では, その浸潤の程度はさらに強くなっていた. 12週後では, 粘膜上皮形成の程度は対照群と比べ異形成が強かった. すなわち, 基底細胞部に核細胞質比の異常や核濃染といった異型核の所見が対照群より早期に認められた. また上皮層では, 有棘細胞での異所性角化も対照群より顕著であった (図13). 実験開始20週より癌と診断でき, 上皮異形性もさらに進行し, 基底膜部も不明瞭化し, 深部への浸潤がみられた. またその周辺での炎症所見も

図15 実験側 22週. (H-E. ×33)
外向性かつ深部への浸潤癌としての所見はさらに著しくなる.

図16 実験側 24週. (H-E. ×20)
対照側よりも増大した外向性かつ深部への浸潤癌の像.

強かった (図14). 22週において, 対照群と比べて, 異型核を有する胞巣を伴った上皮細胞の浸潤性発育が著しくなり, 舌下面の筋層深くまで達していた. 腫瘤の範囲も対照群より大きな広がりを示していた (図15). 24週後では, 浸潤像が対照群よりも高度となり, 表層における壊死層の範囲も大きくなっていた (図16).

以上のように DMBA 塗布部位における病理組織学的腫瘍化は, 12週以降で対照群と比べて実験群に早期の癌化と発育の早さの所見がみられた (図2).

Ⅲ. 発癌過程における神経組織学的変化

神経は, 主として固有層に多数分布しているが, 多くは下歯槽神経由来のもので, 一部頬神経からの枝も存在する. それらはほとんどが自由神経終末で, その一部は clear cell 近くや上皮内にまで侵入している. 小血管に

図17 0週. (N. $\times 200$)

上皮直下の神経線維の有皮膜性の特殊終末.

N: 神経染色

図19 対照側 20週. (N. $\times 100$)

固有層の変性を示す神経線維と上皮直下の再生神経線維.

図18 対照側 12週. (N. $\times 100$)

固有層のわずかに膨化した神経線維と既存神経からの再生神経線維.

図20 対照側 22週. (N. $\times 100$)

固有層における変性著明な神経線維と一部に実質の腫瘍細胞内に分布する再生神経線維.

は、単一神経線維や小および中神経束が伴走する像が観察される (図17).

A. 対照群

1, 4, 8 週において、擦過、DMBA 塗布による組織構造にほとんど異常は認められなかったが、神経の分布に一部、変性所見がみられた. 12 週後では、潰瘍形成がみられその底部に形成された肉芽組織から筋層にかけて多数の中・小の神経線維が潰瘍部を囲むようにみられ、おおむね健全な様相を呈するが、一部には顆粒状に崩壊した変性所見も認められた. また、既存神経から伸長する細い単一の再生神経線維がそれらの内部に極めてわずかにみられた (図18). 20 週では、乳頭腫状の腫瘍付近では、上皮乳頭ならびに上皮脚間の広い肉芽組織中から腫瘍表層部分にかけて神経線維は縦横に走行し、それらの

図21 対照側 24週. (N. $\times 200$)

実質における樹枝状や、膨化、蛇行をきたす神経線維. その自由神経終末は腫瘍細胞に分布.

図22 実験側 8週. (N. $\times 200$)
固有層の健全な有皮膜性の神経終末.

図24 実験側 20週. (N. $\times 100$)
固有層の変性を示す神経線維と実質の癌巣に分布する再生神経線維. 一部にみられた棍棒状の終末.

図23 実験側 12週. (N. $\times 100$)
固有層からの再生神経線維の固有層内での終末.

図25 実験側 22週. (N. $\times 200$)
腫瘍間質から実質部にかけて分布する再生神経線維. 自由神経終末が多い.

神経には変性所見が主にみられた. しかし, 既存神経から伸長する細い単一の神経線維がそれらの内部に極めてわずかにみられ, 上皮内の clear cell の近くに終末を下ろしていた (図19). 22週後, 癌化がみられるものの, 上皮性癌巣周囲には変性像が強まっていたが, ここでも単一の神経線維が癌巣内やその周りに走行を示していた (図20). 乳頭上部の表層にはまったく神経成分はみられなかった. 24週後においても, 22週と同様の所見が認められるが, これらの浸潤する腫瘍細胞と接する所の神経線維あるいは神経束は, 腫瘍細胞に近づくに従って軸索の顆粒状化が顕著となり数的にも減少していた (図21). 腫瘍内に分布する神経線維のパターンは22週の所見と同様であるが, 変性所見を伴うものが多かった. 腫

図26 実験側 24週. (N. $\times 200$)
腫瘍細胞間に分布する再生神経線維の終末.

瘤先端の壊死を来した部位では、神経組織は全く認められなかった。

B. 実験群

対照群と比べて、神経切断処置 1 週後の下歯槽神経由来の神経線維は、ほとんど変性消失した。同様に終末もほとんど変性を受ける。切断後 4 週後では、下歯槽神経は既に連続しているが、歯肉において、細く単一再生神経線維となり、神経束としてはほとんど認められない。8 週後においては、先に述べた 4 週の所見より、さらに、多数の細い単一ないしは小束の神経線維を DMBA 塗布部位へと伸展させており、これらの神経線維の一部に、好銀性を増したものがみられた。しかし、その分布量は対照群に比べ、非常に少なかった (図 22)。12 週後では、8 週のものとは比べ好銀性にほとんど差異が見られなくなり、その終末は、上皮層直下の固有層に自由神経終末様にみられ、上皮層には進入していなかった。固有層における神経線維には膨化断裂などの強い変性像が認められた (図 23)。そして、20 週後、神経線維はその固有層中に多数走行し、歯槽骨の表面、あるいは、上皮側に向けて乳頭状増殖を示すところで特に異型を示す細胞や clear cell の近くにまで達していた。そして、神経線維の数は、実験群において対照群に比べて明らかに多く、また対照群と比べ、神経変性所見も少なかった (図 24)。22 週後では、20 週に比べて、さらに対照群よりも多くの再生神経像と思われる細い単一の神経線維が自由神経終末として、癌胞巣や、基底細胞中に伸びていた。間質部や固有層には特殊な終末の再生はみられなかった (図 25)。24 週は、22 週と同様の所見であった (図 26)。

以上のように、対照群において 22、24 週には神経線維の分布の差異はほとんど見られなかったのと同様、実験群においても 22 週後と 24 週後に差異は認められなかった。

考 察

口腔粘膜癌の大部分は扁平上皮細胞に由来する悪性腫瘍で、その病態像についてはこれまでに種々に研究されてきた。とくに顎・口腔領域は解剖学的な複雑さに加え、組織学的にもその構成を異にしているため、悪性腫瘍の浸潤、増殖様式も多種多様である。そのため現在、様々な方向から研究が進められており、腫瘍組織内に神経組織が存在するか否かについても、人癌ならびに実験癌を材料として、臨床、基礎の両面から検討されてきた。

癌性疼痛という観点からも、これまで腫瘍組織およびその周囲における神経分布について神経組織学的に検索

されているものの、腫瘍組織内での神経線維の存在の有無及びその機能については未だ不明な点が多い。Young (1897)¹⁰⁾, Sekiya (1958)¹¹⁾, 小山 (1978)¹²⁾ らは発癌後に健全な神経組織が、腫瘍実質及び間質内に存在すると述べている。一方で、その見解に否定的な立場の Goldman (1910)¹³⁾, 二村 (1988)¹⁴⁾, 内田 (1992)¹⁵⁾ らは腫瘍の間質部に神経組織が残存しているものの、終局的には腫瘍実質の浸潤とともに、それらは消失の運命にあるとしている。つまり神経存在の有無を述べている両者の説は、形態学的に腫瘍内に神経は存在していたが、一方は健全で、他方は消失するという捉え方の相違がみられた。そして、それらの神経要素がどのような働きをしているのか、あるいは、どのような働きをしたのかについては、十分に検討されていないようである。そこで著者はハムスターの発癌実験モデルの中で悪性腫瘍と神経との関係を組織学的に詳細に検索した。

腫瘍に与える神経の影響について、下歯槽神経を切断すると支配神経が変性するという性質を利用して、発癌剤の塗布前に下歯槽神経を切断し、Waller 変性を末梢部に生じさせ、分布量を制御した。町田 (1977)²⁰⁾ 加藤 (1989)²⁵⁾ らの変性のピークは 5 から 7 日であるという報告から、人為的に神経が少ない状態に保たれるのは神経切断後 1 週目と判断して、実験の観察期間を設定した。実際下歯槽神経の病理組織学的所見では実験群の切断後 1 週に強い変性が示されたが、4 週以降では微細な再生神経線維の増加がみられた。これらによって、神経が元来存在する部位と変性させほとんど存在しない部位とでの癌化への過程を比較し、腫瘍化やその発育における神経の役割を考察した。

まず腫瘍形態について、著者の実験では、腫瘍化までの肉眼的変化は、対照、実験群の間に大きな相違は認められなかった。しかし、潰瘍の範囲と深さにおいて、実験群における早期の進展がみられた。また、潰瘍形成以降、対照群より実験群においてわずかに早い悪性化の所見が認められた。そして、潰瘍形成から癌化所見にいたるまで、いずれも、8 週程度必要であり、その間の腫瘍形態は、潰瘍型と外向性腫瘤型および一部の上皮内癌へと進展していった。本実験においては発癌が実験群で 20 週、対照群で 22 週までにほぼ 100 % 起こっていた。このように、神経切断は 2 週程度の早期の発癌と、早い発育をうながすことを示唆した。

次に、神経終末は、12 週以降は上皮異型性が示される部位近くで変性を受け、消失している所見も認められるようになった。しかし、再生神経の終末は、上皮乳頭内

や癌細胞中に自由神経終末として分布していた。これに対し実験群は、12週以降、悪性化に伴い、一部に固有層から単一の細い再生神経線維が伸張していた。その数は、実験群において対照群と比較明らかに多く、神経の発芽様所見と思われた。潰瘍型と外向性腫瘤型および一部の上皮内癌の状態までの神経線維は変性像からBüngner索を示す再生像まで様々であった。そして、腫瘤外層の壊死および炎症像の強い部分や、腫瘤中央から先端部にかけての狭い間質に神経成分は全く認められず、実験側の固有筋層からの神経には変性像が顕著であった。このことはこれらの神経束の変性が腫瘍実質の浸潤性発育、つまり、増殖速度が速いための周囲組織の物理的圧迫による破壊や、動脈などの脈管を侵食破壊して、酵素などの放出による間質の破壊によって神経へもそれらの影響が及んでいる可能性を示唆するものであった。同様に、腫瘤の基底部、すなわち広く固有層と連絡する部分において、中小の神経束が固有層側から腫瘤内に進入していたが、乳頭様腫瘤先端へ移行するに従って間質が狭小化を来たして、神経線維の分布も減少していた。これは、二村¹⁴⁾、内田ら¹⁵⁾の報告と合致していた。

神経終末においても、最終的な標本採取時では特殊な終末は認められず^{14,15)}、対照群と比して、術後0～1週より固有層におけるほとんどの自由神経終末に変性が強く観察でき、その分布は著明に減少していた。そして、術後1週以降には、その終末のほとんどは、自由神経終末で、上皮層内や固有層に認められた。12週以降、再生神経の発芽により、腫瘍の基底膜に終末が認められたが、その数は、実験群のほうが対照群に比べて多かった。これは、腫瘍部に向かって神経が伸展するものであることを示しており、腫瘍と神経に何らかの関係が存在していることを示唆している。

腫瘍化に伴って両群間に共通した所見は、神経に変性および再生像がくりかえされていることであった。変性を受ける部位は、腫瘍内とその直下の領域であり、再生は、上皮内及び腫瘍から外れた固有層、又は、筋層寄りの神経束で認められた。

上皮性癌化の過程においては、刺激依存性に上皮異形性が示され、細胞の異常な増殖と核異型が強くなり、浸潤癌または上皮内癌から浸潤癌へと、上皮細胞が変化を示す。小山(1978)¹²⁾によると、神経変性の成因には上皮異形性が何らかの鍵を持っていると述べており、擦過やDMBAなどにより誘発された炎症も、腫瘍細胞のもつ傷害作用に加算されることが考えられる。これらの刺激から、神経は障害を受け変性をおこすだけでなく、腫

瘍細胞内に再生神経が再分布している。しかしながら、分布量については、癌化の進展に伴い、実験群においては次第に神経発芽で増加を示したものの、いずれ減少していくことが示された。このことはGoldmanら¹³⁻¹⁵⁾も言及している。

腫瘍化に伴う神経線維の上皮内終末の局在と構造については、実験部位にも特殊な終末をみておらず、また再生能においてもほとんど特殊な終末がみられなかった。対照群でも同様であったことから、実験の障害が神経に影響を与えるのかを検討することは出来なかった。しかし、24週では、実験群の腫瘍化が顕著であるにもかかわらず、神経の病理組織学的検索により形態学的かつ機能的役割は正常組織と差異はないとみなされた。その理由については、今日も不明であるが、腫瘍内においてもkeratinocyteの分化に神経は何らかの調節を示している可能性が考えられている。²⁴⁻³³⁾そのため、本研究において神経の存在をコントロールすると腫瘍化が早まり、より増大化すると考えられる。

神経切断が、何故腫瘍化を早めるかについて文献的に考察したところ、下歯槽神経の歯肉枝は、細胞増殖や分化を支配する神経ペプチドcalcitonin gene-related peptide (CGRP)^{26-27,31)}を放出することが知られている。そして、このCGRPはMacrophage (Mφ)の機能調節をし、Mφの一種であるLangerhans cell (LC)の抗原提示を不活化させ、免疫学的防御作用を低下させている。²⁶⁻²⁸⁾つまり、CGRPによるLCの抑制が発癌と関係があるのかもしれない。本研究では腫瘍とLCとの関連やCGRPの発現を検索してはいないが、神経終末にCGRPを放出する可能性を有することや、癌化の過程を考慮すると神経の癌化に対する防御機構の可能性が浮上してくる。

以上の点から本実験の結果は、神経が知覚神経の機能のみではなく、腫瘍化への過程やその拡大化に対し防御的に作用する可能性を示唆した。この研究をさらに発展させるために、支配神経からの種々の神経ペプチドの放出や、LCあるいはメルケル細胞などを含めた発癌とその防御に関わる細胞群について総合的な検索が必要であろう。

結 論

化学誘発腫瘍と神経組織の関わりを研究するために、2.0%DMBAアセトン溶液を発癌剤として、ハムスター歯肉頬粘膜に発癌実験を行い、誘発病変と神経組織との関連性について下歯槽神経切断を施し、検索し、以下の

結果と結論を得た。

1. 支配神経を切断しても, DMBA 塗布部位に一致して歯肉が隆起し, 以後潰瘍形成, 乳頭腫様増生を経て, 外向性かつ有茎性腫瘤へと癌化の過程を示した。

2. 支配神経を切断したところ腫瘍化が早まり, その発育も大であった。

3. 粘膜上皮が腫瘍化して発育したとき, 対照群, 実験群共に腫瘍化につれて, 腫瘍周辺部の神経は傷害を受け, 変性ととともに分布量の低下が認められた。しかし, 両群共に神経再生による再分布もみられた。

4. 対照群, 実験群における再生神経は, 腫瘍組織内に分布していた。

5. 対照群, 実験群の腫瘍内における神経終末は一部に特殊な終末がみられたが, ほとんど自由神経終末であった。

これらの結果は, 知覚神経として知られた下歯槽神経の歯肉枝は, 粘膜上皮細胞の癌化の過程にも何らかの影響を与えている可能性があることを示唆した。

稿を終えるに臨み, 始終, 御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師九州歯科大学口腔病理学教室福山 宏教授に深甚の謝意を捧げます。また, あわせて本研究に種々の御協力戴きました教室員と動物実験施設の皆様に深く感謝いたします。

本論文の内容の一部は, 第 60, 61 回九州歯科学会総会 (平成 12 年 5 月 20 日北九州市, 13 年 5 月 26 日北九州市) において発表した。

引用文献

- 1) Lumsden, A. G. S.: Pattern formation in the molar dentition of the mouse. *J. Biol. Buccale* 7: 77-103, 1979.
- 2) Chiego, D. J. Jr: The early distribution and possible role of nerves during odontogenesis. *J. Dev. Biol.* 39: 191-194, 1995.
- 3) Halstead-Tarlo, L. B.: Bone versus cartilage- a study in evolution. *Calcif. Tissue Res.* 2: 78, 1968.
- 4) Northcutt, R. G. and Gans, C.: The genesis of neural crest and epidermal placodes: A reinterpretation of vertebrate origins. *Q. Rev. Biol.* 58: 1-28, 1983.
- 5) Rehak, J. R.: Course and resection of the inferior alveolar nerve in the albino rat. *J. Dent. Res.* 1159-1168, 1963.
- 6) 藤田浄秀, 賀来 亨, 佐々木元賢, 小野江為則: 舌癌の実験的形成に関する研究. 第 1 編 9, 10-dimethyl-1, 2-benz-anthracene の塗布による舌癌の実験的形成. *口科誌* 21: 999-1012, 1972.
- 7) Ungewitter, L. H.: A urea silver nitrate method for nerve fibers and nerve endings. *Stain Techn.* 26: 73-76, 1951.
- 8) Powers, M. M.: The staining of nerve fibers in teeth. *J. Dent. Res.* 31: 383-392, 1952.
- 9) 上野正康, 北村勝也, 伊高三千男, 別府正敏: 各種動物の口腔組織神経分布に関する研究 (その III) 家兎, モルモット, 白鼠, 二十日鼠の歯牙内神経について. *九州歯会誌* 12: 362-369, 1966.
- 10) Young, H. H.: On the presence of nerves in tumors and of other structures in them as revealed by modification of Ehrlich's method of vital staining with methylene blue. *J. Exp. Med.* 2: 1-12, 1897.
- 11) Sekiya, S.: A neuropathological study of cancer grown in the tongue and the rectum. *Arch. Jap. Chir.* 27: 880-886, 1958.
- 12) 小山 巖: 悪性腫瘍組織内の末梢神経線維に関する形態学的研究. *九州歯会誌* 31: 554-573, 1978.
- 13) Goldman, E. E.: Studien zur biologie der bosartigen Neubildungen. *Brunns. Beitr. Klin. Chir.* 72: 1-90, 1910.
- 14) 二村 光: 実験的ハムスター舌腫瘍における神経組織像について. *九州歯会誌* 42: 705-732, 1988.
- 15) 内田豊世: 実験癌における神経分布に関する研究. *九州歯会誌* 46: 122-139, 1992.
- 16) Chen, Y. K. and Lin, L. M.: Sequential expression of placental glutathione S-transferase (GST-P) during DMBA-induced hamster buccal pouch squamous cell carcinogenesis. *J. Oral Pathol. Med.* 25: 388-394, 1996.
- 17) 和田重人: ハムスター舌におけるデキストラン・マグネイト複合体 (DM) 昇温効果. *日口外誌* 45: 33-44, 1999.
- 18) Balasenthil, S., Arivazhagan, S., Ramachandran, C. R. and Nagini, S.: Effects of garlic on 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *Cancer Detect. Prev.* 23: 534-538, 1999.
- 19) Balasenthil, S. and Nagini, S.: Inhibition of 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis by S-allylcysteine. *Oral Oncol.* 36: 382-386, 2000.
- 20) Balasenthil, S., Saroja, M., Ramachandran, C. R. and Nagini, S.: Of humans and hamsters: comparative analysis of lipid peroxidation, glutathione, and glutathione-dependent enzymes during oral carcinogenesis. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 38: 267-270, 2000.
- 21) Totsuka, Y., and Amemiya, A.: Histopathologic study of bone invasion by DMBA-induced carcinoma of the mouth in the hamster. *Oral surg.* 62: 683-692, 1986.
- 22) Lin, L. M., Chen, Y. K., Lai, D. R. and Huang, Y. L.: Minimal arecaidine concentrations showing a promotion effect during DMBA-induced hamster cheek pouch carcinogenesis. *J. Oral Pathol. Med.* 25: 65-68,

- 1996.
- 23) Hong, S. X., Cha, I. H., Lee, E. W. and Kim, J.: Mandibular invasion of lower gingival carcinoma in the molar region: its clinical implications on the surgical management. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 30: 130-138, 2001.
- 24) 町田和之: 下歯槽神経切断後における変性と再生に関する実験的研究. *歯科学報* 77: 11-32, 1977.
- 25) 加藤明彦: 下歯槽神経再生に関する実験的研究. *九州歯会誌* 43: 17-41, 1989.
- 26) Asahina, A., Hosoi, J., Grabbe, S. and Granstein, R. D.: Modulation of Langerhans cell function by epidermal nerves. *J. Allergy Clin. Immunol.* 96: 1178-1182, 1995.
- 27) Asahina, A., Hosoi, J., Murphy, G. F. and Granstein, R. D.: Calcitonin gene-related peptide modulates Langerhans cell antigen-presenting function. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 107: 242-244, 1995.
- 28) Torii, H., Hosoi, J., Beissert, S., Xu, S., Fox, F. E., Asahina, A., Takashima, A., Rook, A. H. and Granstein, R. D.: Regulation of cytokine expression in macrophages and the Langerhans cell-like line XS52 by calcitonin gene-related peptide. *J. Leukoc. Biol.* 61: 216-223, 1997.
- 29) Gillardon, F., Moll, I., Michel, S., Benrath, J., Weihe, E. and Zimmermann, M.: Calcitonin gene-related peptide and nitric oxide are involved in ultraviolet radiation-induced immunosuppression. *Eur. J. Pharmacol.* 293: 395-400, 1995.
- 30) Torneck, C. D.: Changes in the fine structure of the dental pulp in human caries pulpitis 1. Nerve and blood vessels. *J. Oral Pathol. Med.* 3: 71-82, 1974.
- 31) Hosoi, J., Murphy, G. F., Egan, C. L., Lerner, E. A., Grabbe, S., Asahina, A. and Granstein, R. D.: Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide. *Nature* 363: 159-163, 1993.
- 32) Zhang, M. and Fukuyama, H.: CGRP immunohistochemistry in wound healing and dentin bridge formation following rat molar pulpotomy. *Histochem. Cell Biol.* 112: 325-333 1999.
- 33) Afonso, F., Pinho, M., Fernandes, P., Mata, L. R. and Gulbenkian, S.: Distribution of vasoactive intestinal peptide and calcitonin gene-related peptide immunoreactive nerve fibers and binding sites in the hamster seminal vesicle during post-natal development. *Histol. Histopathol.* 14: 761-770, 1999.
- 34) Chen, J-K, and Liang, J-C.: Nerve distribution on the capillary network of molar gingiva in golden hamster by the silver impregnation method. *Jpn. J. Oral Biol.* 40: 36-41, 1998.
- 35) Fujimura, A. and Segawa, K.: A morphological study of the capillary structures underlying the lingual dorsal mucosa of the golden hamster. *Jpn. J. Oral Biol.* 30: 75-82, 1988.
- 36) Chen, H. D., Zhao, Y. M., Sun, G. and Yang, C. Y.: Occurrence of Langerhans cells and expression of class II antigens on keratinocytes in malignant and benign epithelial tumors of the skin: an immunohistopathologic study with monoclonal antibodies. *J. Am. Acad. Dermatol.* 20: 1007-14, 1989.
- 37) Fink-Puches, R. and Smolle, J.: Langerhans cells in epithelial skin tumors. A quantitative immunohistological and morphometric investigation. *In Vivo* 7: 213-216, 1993.
- 38) Lucas, A. D. and Halliday, G. M.: Progressor but not regressor skin tumours inhibit Langerhans' cell migration from epidermis to local lymph nodes. *Immunology* 97: 130-137, 1999.
- 39) Tay, S. K. and Jenkins, D.: Langerhans cell population in early invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Aust. N. Z. J. Obstet Gynaecol.* 29: 38-40, 1989.
- 40) Halliday, G. M. and Le, S.: Transforming growth factor-beta produced by progressor tumors inhibits, while IL-10 produced by regressor tumors enhances, Langerhans cell migration from skin. *Int. Immunol.* 13: 1147-54, 2001.