

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463122

研究課題名(和文)既存脈管構築の特徴からみた舌癌深達度とリンパ節転移との関連性についての研究

研究課題名(英文)A study of topographic anatomy in preexisting lymph vessels of oral tongue in conjunction with depth of invasion and metastasis

研究代表者

佐藤 徹 (SATO, Toru)

鶴見大学・歯学部・学内准教授

研究者番号：30170765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：舌のリンパ管分布の特徴を解剖実習用遺体を用いてD2-40の免疫組織化学で検討した。さらにStage 舌癌手術症例で、後発転移の有無によるリンパ管分布の差異を検討した。リンパ管密度(LVD)、リンパ管周長計(LVP)ともに舌の前方、中央、後方いずれの部位でも上皮下結合織浅層が最高値で、上皮下結合織深層がそれに次ぎ、筋層では著しく低下したが、筋層の浅層と深層間には差がなかった。またどの深さにおいても舌の前方がLVD、LVPとも最高値であり、後方に向かうに従って低下傾向を示した。舌癌症例については、後発転移の有無でリンパ管分布に差はみられず、癌辺縁の上皮下結合織内にリンパ管増生はみられなかった。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the topography of lymph vessels in non-cancerous oral tongue, immunohistochemistry of D2-40 was applied to the anterior, middle and posterior part of oral tongue from archival cadavers. Lymphatic vessel density(LVD), lymphatic vessel perimeter(LVP) were measured in upper subepithelial layer(UC), lower subepithelial layer(LC), superficial muscle layer(SM), and deep muscle layer(DM). LVD and LVP were the highest in UC followed by LC, and greatly reduced in SM and DM in any site of anterior, middle, posterior part. There were no differences of LVD and LVP between SM and DM in any site. Anterior part was the highest LVD and LVP, and posterior part was the lowest LVD and LVP in any depth.

Additionally, in resected Stage tongue cancer, there was no remarkable difference of lymph vessel distribution between positive and negative cases with subsequent metastases. Subepithelial lymph vessel proliferation beneath the peritumoral epithelial dysplasia was unremarkable.

研究分野：口腔外科

キーワード：舌癌 TNM分類 深達度 リンパ節転移 リンパ管 解剖実習用遺体

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の TNM 分類における T カテゴリーは腫瘍の最大径を基準に定められているが、口腔と連続する消化管である食道、胃、大腸は比較的単純な層状の解剖学的構造を呈していることから、癌の深達度を基準とした T 分類を採用することで予後との明瞭な相関を示している。口腔領域もこれらと同様の基準の下に診断することで、より予後と結びついた評価ができる可能性がある。口腔は部位により深部構造が異なり、一律に深達度を T カテゴリーの基準にすることは様々な課題があるが、舌は筋の塊からなる比較的均質な構造なので、深達度分類の適用が妥当であるかを検討するにはふさわしい臓器である。しかも舌扁平上皮癌は口腔領域の他部位に比べ、早期に所属リンパ節へ転移するとされている。その理由としては舌が可動部であることや血管やリンパ管が豊富に分布することなどがあげられている¹⁾。血管系に関しては一般に腫瘍の発育増大に関連すると考えられているが²⁾、リンパ節転移との関連が示唆される腫瘍内および腫瘍辺縁のリンパ管については、腫瘍により誘導されたものであるという研究発表が多いが、それが真にリンパ節転移を促進する要素であるのか、また既存のリンパ管とどのような関係にあるのかについては、いまだ一致した見解は得られていない³⁻⁹⁾。そこで予後を左右するリンパ節転移と関係すると思われる舌のリンパ管分布に着目することにした。

2. 研究の目的

食道癌では、浸潤先端が粘膜筋板を超えると急激にリンパ節転移率が上昇することが知られており、これには既存のリンパ管網の構築が関与していると推定されている¹⁰⁾。舌癌でもその深達度が増すにつれ所属リンパ節への転移率が上昇する傾向にあることから¹¹⁻¹³⁾、近年では予後因子として深達度が重要視されている。これは腫瘍自体のリンパ管新生誘導能とは別に、食道癌と同様に表面からの深さと関係した既存リンパ管分布の特徴がリンパ節転移に関わっているのではないかと推測した。そこでリンパ管内皮細胞を特異的に同定することが可能な D2 - 40 抗体を用い、舌に明かな病変を有さない解剖実習用遺体の舌において、部位や深さによりリンパ管分布に特徴があるかを、免疫組織学と形態計測によって検討を行うこととした。

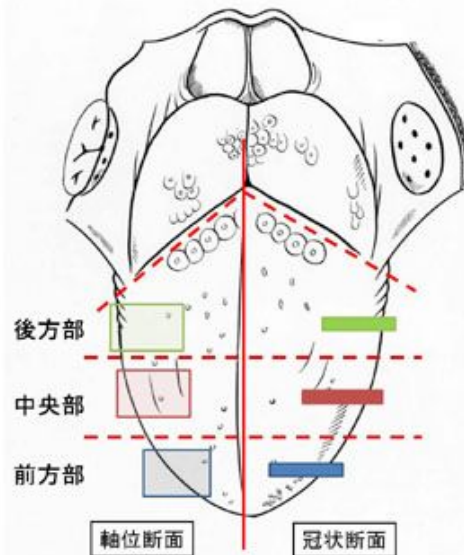
更に Stage の舌扁平上皮癌症例において、後発転移を認めた症例と認めなかった症例でのリンパ管分布に差があるかについても比較検討を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) 解剖実習用遺体での検討

口腔粘膜に明らかな疾患を有さない、鶴見大学歯学部解剖学教室所蔵解剖実習用遺体の舌 11 検体を用いた。年齢分布は 50 歳から 90 歳 (平均 76.3 歳) で、男性 4 検体と女性 7 検体である。遺体より取り出した舌を正中で左右に分割し、左側は舌尖部、中央部および後方部の 3 か所か

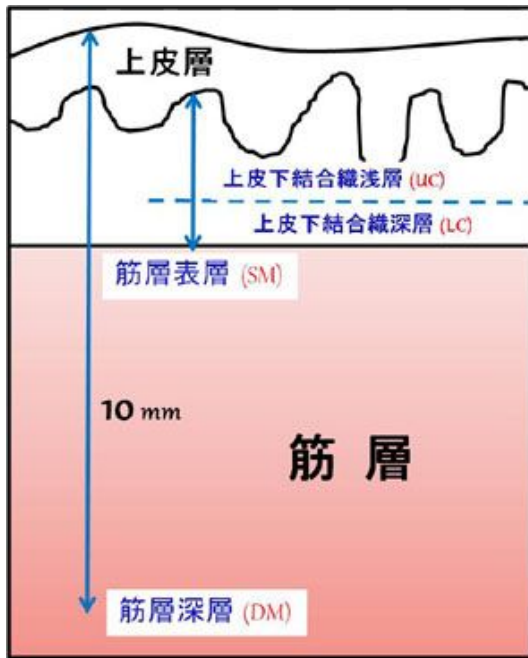
ら冠状断に標本を切り出した。一方右側は側縁部にて軸位で分割してから、更にこれを前方・中央・後方に 3 分割した(図1)。切り出された標本は 10%中性緩衝ホルマリンにて再固定の後、通常法に従ってパラフィン包埋して 4 μ 切片を作成して D2-40 の免疫組織化学染色を行った。一次抗体はマウス抗 D2-40 モノクローナル抗体(ニチレイ)、二次抗体と発色にはヒストファイン SAB-PO(M)キット(ニチレイ)を使用し、ヘマトキシリンにて対比染色を行った。



(図1：解剖実習用遺体の標本作製部位)

作成された標本 1 枚につき 40 倍の視野下での最大面積を上皮下結合織浅層、上皮下結合織深層、筋層浅層、筋層深層でそれぞれ 1 か所設定し、単位面積あたりのリンパ管数(LVD)およびリンパ管周長計(LVP)を光学顕微鏡に接続されたデジタルカメラと画像ファイリングソフトウェア(OLYMPUS FX380)により測定した。LVD はその形や大きさに係わらず、褐色線状反応物による閉曲線 1 か所を 1 個として判定した。計測部位は、上皮脚基部の基底細胞から筋層表面までの距離を二等分し、表層 1/2 を上皮下結合織浅層(UC)、深層 1/2 を上皮下結合織深層(LC)と定め、筋層の最表層から 2 mm までの深さを筋層浅層(SM)、粘膜表面から 10 mm の深さを中心にその上下 1 mm ずつの間を筋層深層(DM)と定めた(図2)。

統計処理にあたっては、冠状断舌尖部と軸位断前方を合わせて前方部(Anterior)、冠状断中央部と軸位断中央を合わせて中央部(Middle)、冠状断後方部と軸位断後方を合わせて後方部(Posterior)として計算した。有意差の検定には Tukey test を用いて、 $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。



(図2 : LVD と LVP の測定部位)

さらに各部位と深度によるリンパ管の走行と局在部位の解剖学的特徴についても検討を行った。

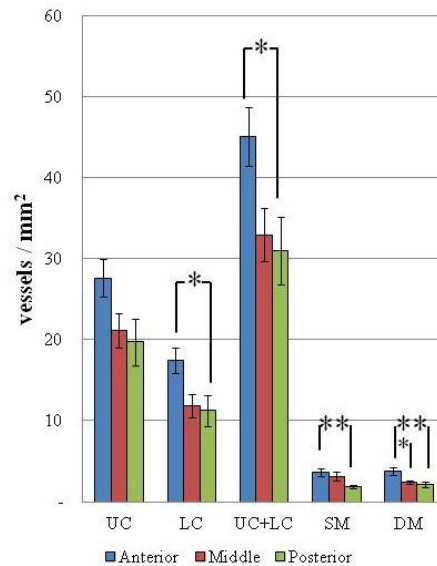
(2) 舌扁平上皮癌 Stage 症例での検討
筋層にまで浸潤が及んでいる舌癌 Stage 手術単独症例 19 例の病巣中心部を通る冠状断標本において、解剖実習用遺体と同様にリンパ管同定のための D2-40 の免疫組織化学を行い、後発転移を認めた 6 例と後発転移を認めなかった 13 例を比較検討した。

4. 研究成果

(1) 解剖実習用遺体における形態計測

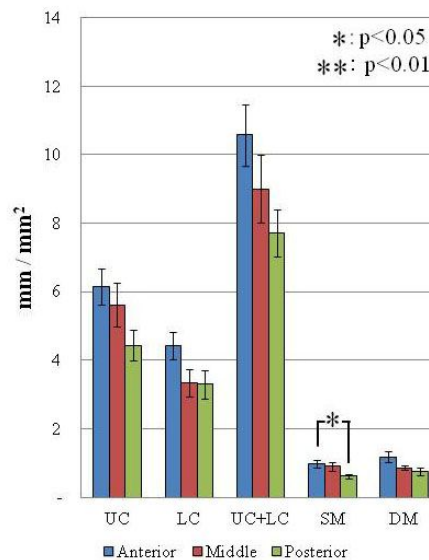
LVD と LVP とともに、UC、LC、SM、DM のどの深さにおいても舌前方が最も大きく、後方に行くに従って小さくなる傾向を示した(図3、図4)。深さによる LVD の差に関しては、舌前方、中央、後方とも UC が最高値(前方 27.6、中央 21.1、後方 19.7 個/mm²)で、LC がそれに次ぎ(前方 17.5、中央 11.9、後方 11.3 個/mm²)、筋層内では著明に低下した(SM では前方 3.6、中央 3.1、後方 1.9 個/mm²、DM では前方 3.8、中央 2.4、後方 2.1 個/mm²)。また LVP についても同様の傾向を示した。上皮下結合織領域を二分せずにひとまとめにして再計算してみても、これらの傾向に違いは見られなかった(図4、図5の横軸 UC+LC)。筋層内では舌のどの部位においても SM と DM との間には LVD、LVP とともに差がなかったが、舌前方では LVD が SM、DM とともに舌後方より有意に高値を示し、SM においては LVP も有意に高値であった。これは前舌腺周囲の筋層内にはリンパ管の密な領域が存在することと関連していた(後述)。

LVD



(図3 : 部位と深さ別の LVD)

LVP



(図4 : 部位と深さ別の LVP)

(2) 解剖実習用遺体におけるリンパ管走行
上皮下結合織浅層には密なリンパ管網が存在し(図5) 特に結合織乳頭が粘膜表面直下まで伸長している部分ではそれに沿って長い立ち上がりを示していた。
上皮下結合織深層では、筋層最表層との境界周囲にリンパ管を認め、ここから内筋周膜(perimysium)に被われた筋束間の血管や神経束に沿って深部へ向かって走行していた(図5)。

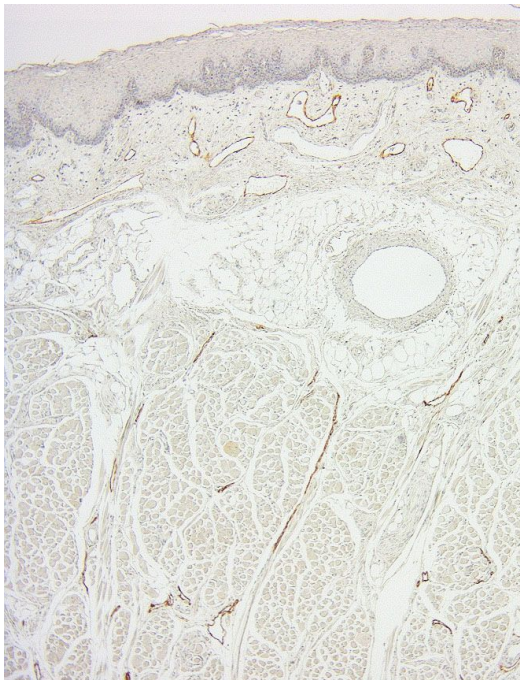
筋層深部では舌動脈とその太い分枝の外膜に絡みつくように走行していた(図6)。

個々の筋線維を囲む筋内膜(endomysium)にはCD34陽性の毛細血管が極めて密に存在するのに対し、リンパ管は認めなかった。

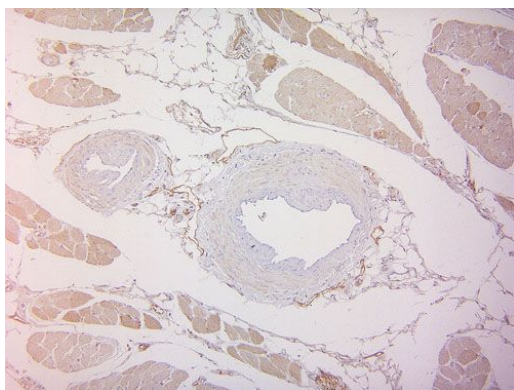
舌中隔と舌背後方に存在する舌腱膜内にはリンパ管が乏しかったが、舌中隔には左右を横切るリンパ管を散見した(図7)。

前舌腺と後舌腺では小葉の被膜や小葉間導管沿いにリンパ管を認めるが、小葉内には認めなかった。

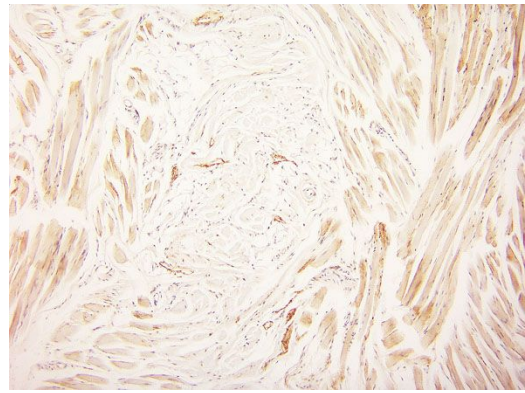
舌前方下面の筋層内にはリンパ管の密な領域が存在した(図8)。



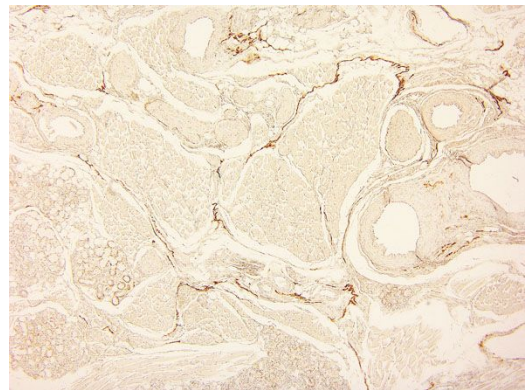
(図5：舌表層から深部のリンパ管走行)



(図6：舌動脈外膜周囲のリンパ管)



(図7：舌中隔を横切るリンパ管)

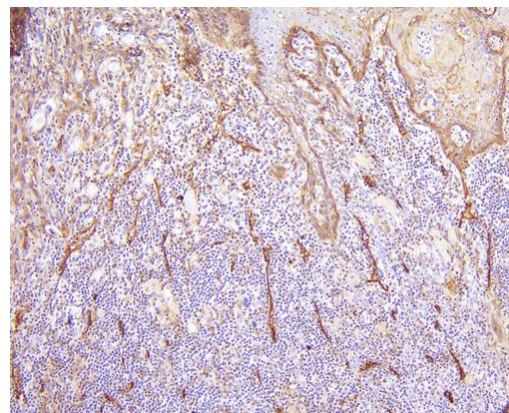


(図8：舌前方下面筋層内のリンパ管)

(3) 舌癌 Stage 症例での検討

いわゆる hot spot といわれる癌の辺縁や胞巣内部のリンパ管増生領域と思われる部位は、少数例の限られた領域に認めたが(図9)、後発転移の有無との関連性は認めなかった。

癌辺縁部の上皮性異形成を示す領域と、切除断端付近の正常粘膜領域の上皮下結合織において、リンパ管の走行や密度に差は認めなかった。



(図9：癌辺縁部の hot spot)

<引用文献>

Castenholz, A. et al. Morphological characteristics of initial lymphatics in the tongue as shown by scanning electron microscopy. *Scan Electron Microsc* 3: 1343-1352, 1984.

Folkman, J. et al. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1(1): 27-31, 1995.

Matsumoto, N, et al. Evaluation of lymphatic vessel in oral squamous cell carcinoma with LYVE-1 antibody. *Acta Histochemica et Cytochemica* 38(6): 28, 2005.

大野ふみ 他：舌・口腔領域扁平上皮癌のリンパ管新生に関する免疫組織学的検討 *日口外誌* 51 巻 suppl. : 87, 2005.

松本直行 他：舌扁平上皮癌におけるリンパ管の検出 *日口外誌* 51 巻 suppl. : 57, 2005.

関 泰 他：リンパ管内皮特異抗体を用いた舌癌のリンパ管新生に関する免疫学的検討 *日癌学会* 63 回総会記事 : 275, 2004.

大野ふみ 他：リンパ管内皮特異抗体を用いた舌扁平上皮癌のリンパ管新生に関する免疫組織化学的検討 *愛院大歯誌* 44(4) : 557-563, 2006.

Franchi, A. et al. : Tumor lymphangiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma: a morphometric study with clinical correlations. *Cancer* 101(5): 973-978, 2004.

Rakesh, K. et al. : Intratumoral lymphatic vessels: A case of mistaken identity or malfunction? *Journal of National Cancer Institute* 94(6): 417-421, 2002.

筑後孝章 他：食道扁平上皮癌周辺におけるリンパ管増生の病理学的解析と転移予測因子の検索 *近畿大医誌* 35(2): 91-98, 2010.

黒川英雄 他：舌扁平上皮癌における頸部リンパ節への転移予測因子について *口腔腫瘍* 13(4 補) : 307-311, 2001.

砂川好光 他： - 期舌癌の後発頸部リンパ節転移に影響を及ぼす因子の検討 *慈恵医大誌* 117(2) : 103-111, 2003.

黒川英雄 他：舌扁平上皮癌における原発巣の深さと病理組織学的な予後因子との関連 *日口診誌* 14(2) : 292-296, 2001.

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 1 件)

C. Terada, T. Sato, S. Kataoka, Y. Kamiya, S. Tatehara, K. Satomura
Histomorphometric study of lymph vessel distributions in oral tongue
22nd International Conference on Oral & Maxillofacial Surgery
2015 年 10 月 27 日 ~ 10 月 30 日
Melbourne (Australia)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 徹 (SATO, Toru)

鶴見大学・歯学部・学内准教授

研究者番号 : 3 0 1 7 0 7 6 5

(2) 研究分担者

神谷 洋子 (KAMIYA, Yoko)

鶴見大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号 : 1 0 4 6 0 2 1 3

寺田 知加 (TERADA, Chika)

鶴見大学・歯学部・学部助手

研究者番号 : 4 0 4 6 0 2 1 6

里村 一人 (SATOMURA, Kazuhito)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号 : 8 0 2 4 3 7 1 5