

癌の浸潤初期とリンパ管侵襲の電顕的研究 —N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) 誘発ラット胃癌における観察—

岡山大学医学部第一外科

荒木 京二郎

(昭和54年2月27日受稿)

Key words: 癌の初期浸潤, リンパ管侵襲, 実験胃癌.

はじめに

浸潤と転移は癌の基本的特性であるとともに、癌研究の重要な課題でもあるが、これらの現象の初期の機序の知見はいまだ十分ではない。癌の浸潤初期像の研究は、扁平上皮腫瘍についての報告がみられるが、腺癌の検索は少ない。また、癌転移の重要な一つの経路であるリンパ行性転移の機序の研究は空白のままである。

1967年杉村ら¹⁾が開発した N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG) による実験的ラット腺胃癌における癌の浸潤初期像と癌のリンパ管侵入像を観察したので、その超微解剖学的所見を報告する。

方 法

発癌実験は Fujimura ら²⁾の方法で行なった。生後6週令のウィスター系雄性ラットに83 μg/mlのMNNG水溶液を8ヶ月間飲料水として自由に飲ませ、9ヶ月以降は水道水を与えた。

電顕資料は0.2M cacodylate buffer(pH. 7.4)に溶解した2.5% glutaraldehydeと2% OsO₄による二重固定後Epon 812に包埋した、厚さ1 μmの切片をパラゴンで染色して光学顕微鏡の鑑察に供し、超薄切片に酢酸ウラニルとクエン酸鉛の二重染色を施した後、RCA EMU4AまたはHITACHI Hu12で観察した。

結 果

腫瘍の発生過程、発生頻度、組織像等は諸家¹⁾²⁾³⁾の報告とほぼ同様である。

観察したのは実験53週目にえられた病巣で組織学的に粘膜下層に浸潤した分化型癌と診断された(図

A)。電顕的検索標本は粘膜下層から採取した。なお、光顕的検索では局所リンパ節転移や遠隔転移は認めなかった。

所見1(図1)

上方の癌巣と下方の間質との間には明瞭なる基底膜の形成がみられるが、所々に基底膜の欠損がみられ、この欠損部から指状の癌細胞の細胞質突起が間質内に突出している。間質内には膠原線維などの線維性構造物はほとんどなく少量のamorphous materialがみられるだけである。

所見2(図2)

左側にみられる癌巣の基底膜が一部消失し、この部から不整形な癌細胞の細胞質突起が間質内に侵入している。細胞質突起には自由リボソーム以外の細胞小器官はみられない。突起周囲の間質は膠原線維などの線維成分は消失し無構造である(△印)。

所見3(図3)

中央から右上方にかけて存在する癌巣の中で左端の癌細胞には基底膜の形成がなく、細胞は不規則な形態を示し、半分は間質内に露出している。間質内に露出した癌細胞周囲の間質には無構造な領域がある(△印)。隣接する癌細胞との間にintercellular digitationの形成を見ず、他の癌細胞同志がかなり良好なintercellular digitationを形成しているのと対照的である。

所見4(図4a, 4b)

右上に一層の円柱状の癌細胞で構成された癌腺管があり、管腔側では微絨毛や粘液顆粒がみられる。この癌腺管の中の1ヶの細胞の基底側で基底膜が断裂し、癌細胞の細胞質がアメーバ様の偽足を出して間質内に浸潤しているが、管腔側では隣接癌細胞と同程度の微絨毛、粘液顆粒、intercellular digitationの発達

をみる。この癌細胞の偽足は下方にみられるリンパ管の内皮細胞に近接している(図4 a)。アメーバ様偽足の周辺間質はある範囲に亘って無構造である(図4 b, Δ印)。偽足が接近した部のリンパ管内皮細胞は腫大し、壁は不規則で細胞質は大小の空胞や変性したミトコンドリアで占められており、これは内皮細胞が変性しつつある状態であると考えられる(図4 b)。

所見5(図5 a, 5 b)

2~3ヶの癌細胞が束になってリンパ管腔に侵入している。侵入しつつある癌細胞は核細胞質比が高く、細胞質には自由リボソームが多く、小胞体、ゴルジ装置、ミトコンドリアその他の細胞小器官の少ない、いわゆる一般的に低分化細胞にみられる所見を示している。侵入癌細胞の先端には不整形な細胞質突起がみられ、リンパ管内皮細胞の1部がこの突起に包み込まれて菲薄となり先端が顆粒状に分離している(図5 b, ↑印)。

所見6(図6 a, 6 b)

上部にみられる癌腺管と下部のリンパ管は互いに接近している。癌腺管の基底膜の1部が欠除し、この部から茸状の癌細胞の細胞質突起が突出し、そのままリンパ管内に侵入している。癌細胞の突出部はリンパ管の侵入部では細いくびれを示すが管腔内で再び広がっている。侵入部のリンパ管壁は内腔に向けてめくれ込んでおり癌の侵入方向を示しているかのようである(→印)。このリンパ管浸潤を示す癌細胞は著明な核の彎入や多量の自由リボソーム、少量の細胞小器官など一般に低分化癌細胞にみられる所見を呈しており、また隣接癌細胞と比べて細胞壁の intercellular digitation の発達は悪く細胞間結合の弱さを示している。侵入部のリンパ管内皮細胞の壁は平滑で変性や破壊像は認められない(図6 b)。

所見7(図7 a, 7 b)

癌がリンパ管内に侵入し管腔内に腫瘍塊を形成している。癌の侵入部と思われる部は細いが管腔内では数コの細胞塊を形成している。リンパ管内の癌細胞は1部管壁に接し、この部の内皮細胞は消失して多層の基底膜の形成がみられる(図7 b)。また、リンパ管内の癌細胞には微絨毛やゴルジ装置が認められる。

所見8(図8 a, 8 b)

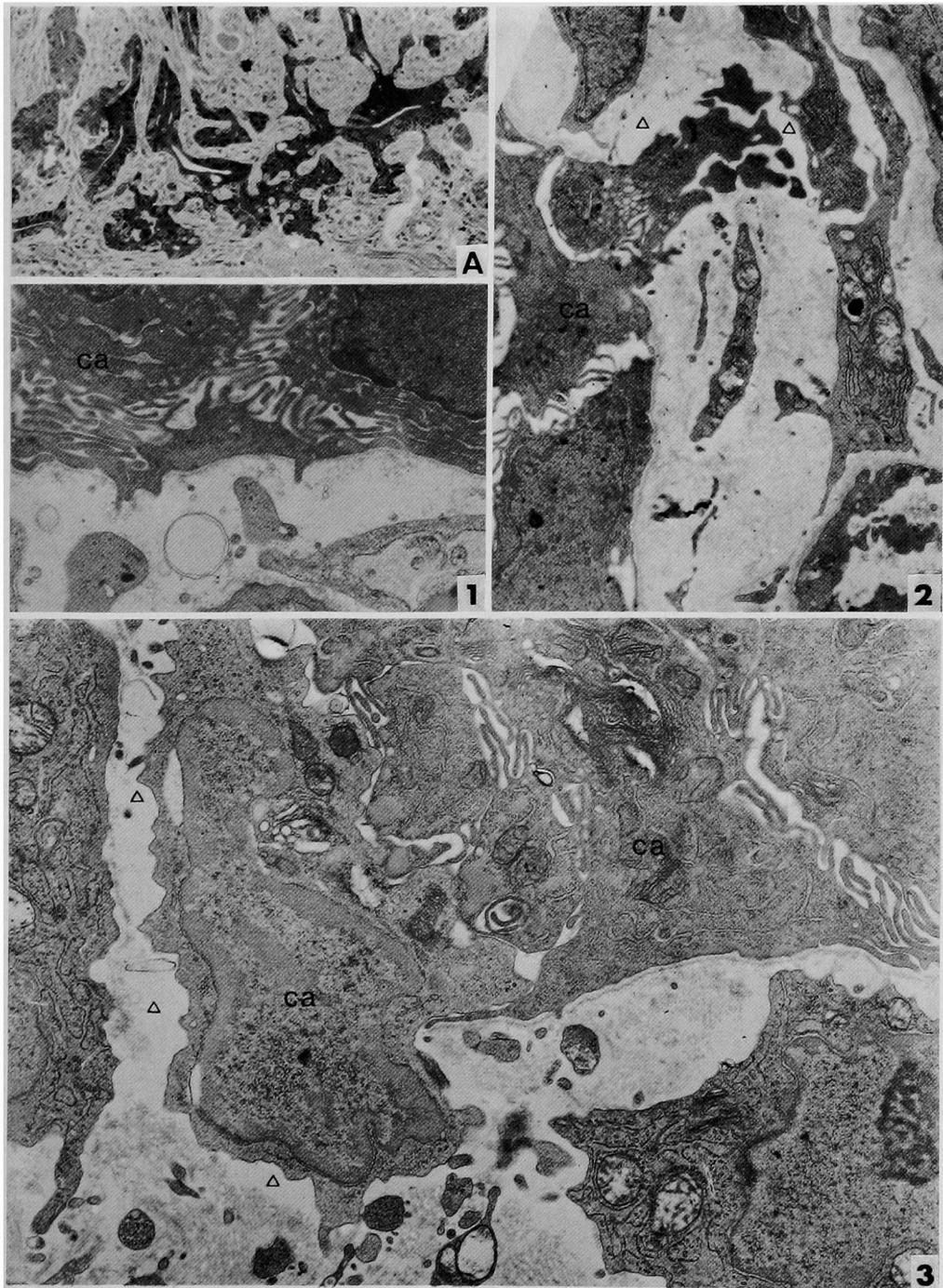
リンパ管内に浮遊した癌細胞塊である。癌細胞の上皮細胞としての分化を示す微絨毛、intercellular di-

gitation, tight junction などの発達は比較的良好である(図8 b)。

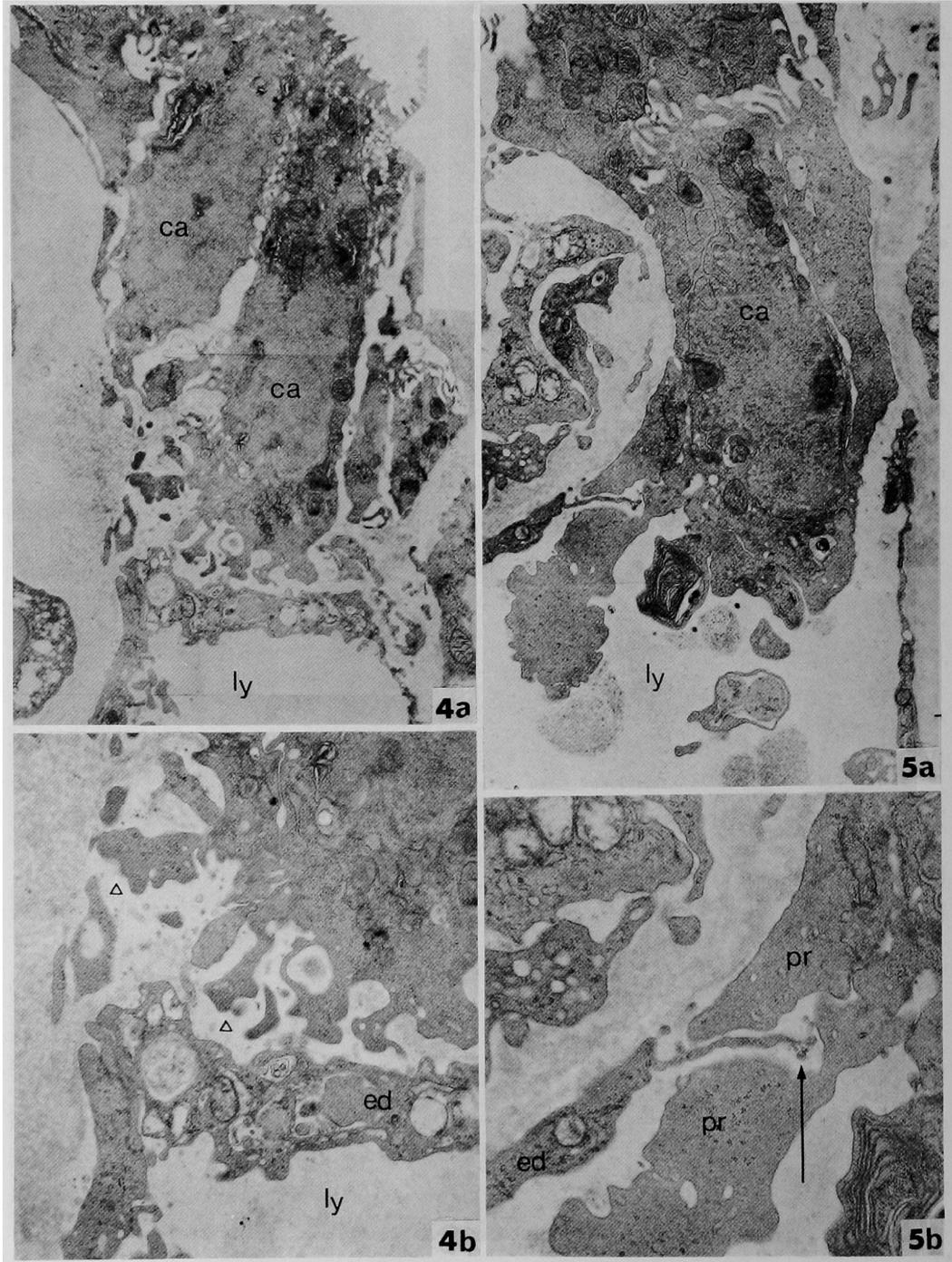
附 図 説 明

- A. 光顕所見, 中分化型管状腺癌, 漿膜下層まで浸潤。
1. 基底膜の欠損と指状の癌細胞の細胞質突起がみられる。
 2. 癌細胞の基底膜の欠損と不整形な細胞質突起がみられる。細胞質突起周囲の間質は無構造である。
 3. 右上方の癌細胞から1コの癌細胞が間質内に浸潤している。浸潤部では基底膜の欠損がみられ、浸潤癌細胞は核細胞質比が高く隣接する細胞との interdigitation の形成は悪い、浸潤癌細胞の周囲の間質はある範囲にわたって無構造である(Δ印)。
 - 4a. 右上に一層の円柱状の癌細胞で構成された癌腺管があり、この中の1コの癌細胞がアメーバ様の偽足を出して間質に浸潤し下方のリンパ管に接している。浸潤癌細胞は管腔側に微絨毛や粘液顆粒を持ち interdigitation の発達もみられる。
 - 4b. 癌細胞のアメーバ様偽足の周囲間質は無構造(Δ印)で、近接したリンパ管内皮細胞は変性像を示す。
 - 5a. 下方にみられるリンパ管内に上方から癌細胞が侵入している。侵入癌細胞は核細胞質比が高く、細胞小器官は少ない。
 - 5b. 癌細胞の細胞質突起に囲まれ菲薄化したリンパ管内皮細胞がみられる(↑印)。先端は顆粒化し脱落している。
 - 6a. 右上方の癌細胞から茸状の細胞質突起が小さなリンパ管腔内に侵入している。
 - 6b. 癌細胞質突起の頸部は細く、リンパ管腔内で再び広がっている。侵入部位のリンパ管内皮細胞には変性や破壊像は認められない。
 - 7a. 右上方の癌細胞から左側中央に斜に走るリンパ管に癌が侵入し細胞塊を形成している。
 - 7b. 7aの拡大図である。リンパ管内の癌細胞には不十分ながら微絨毛やゴルジ装置の発達がみられ tight junction の形成も良好である。破壊消失したリンパ管壁と接する部には重層した基底膜の形成(bm)が認められる。
 - 8a. リンパ管内に浮遊した癌細胞塊である。癌細胞の上皮細胞としての分化を示す微絨毛, interdigitation, tight junction などの発達は良好である。
 - 8b. 8aの拡大図である。

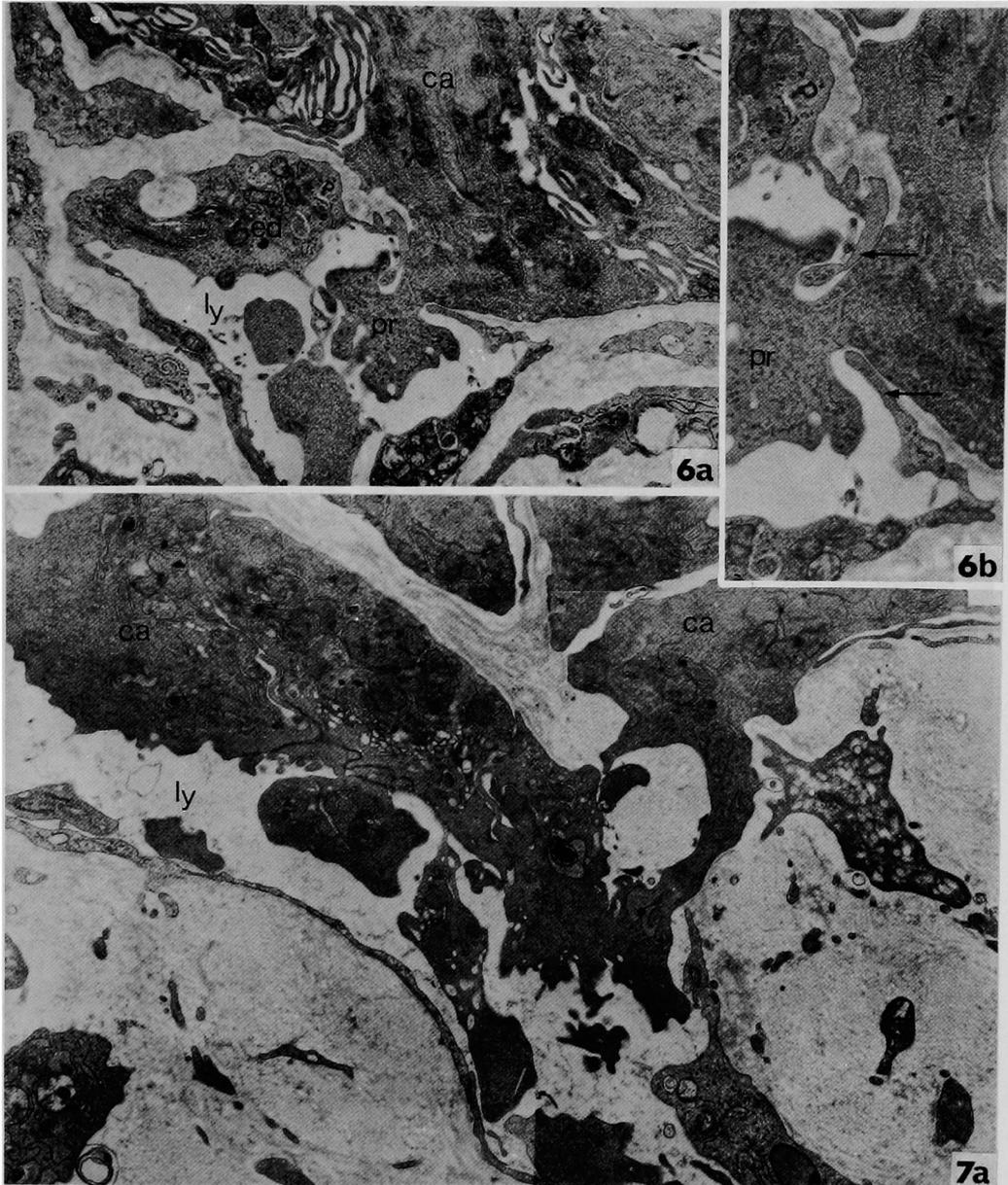
荒木京二郎論文附図



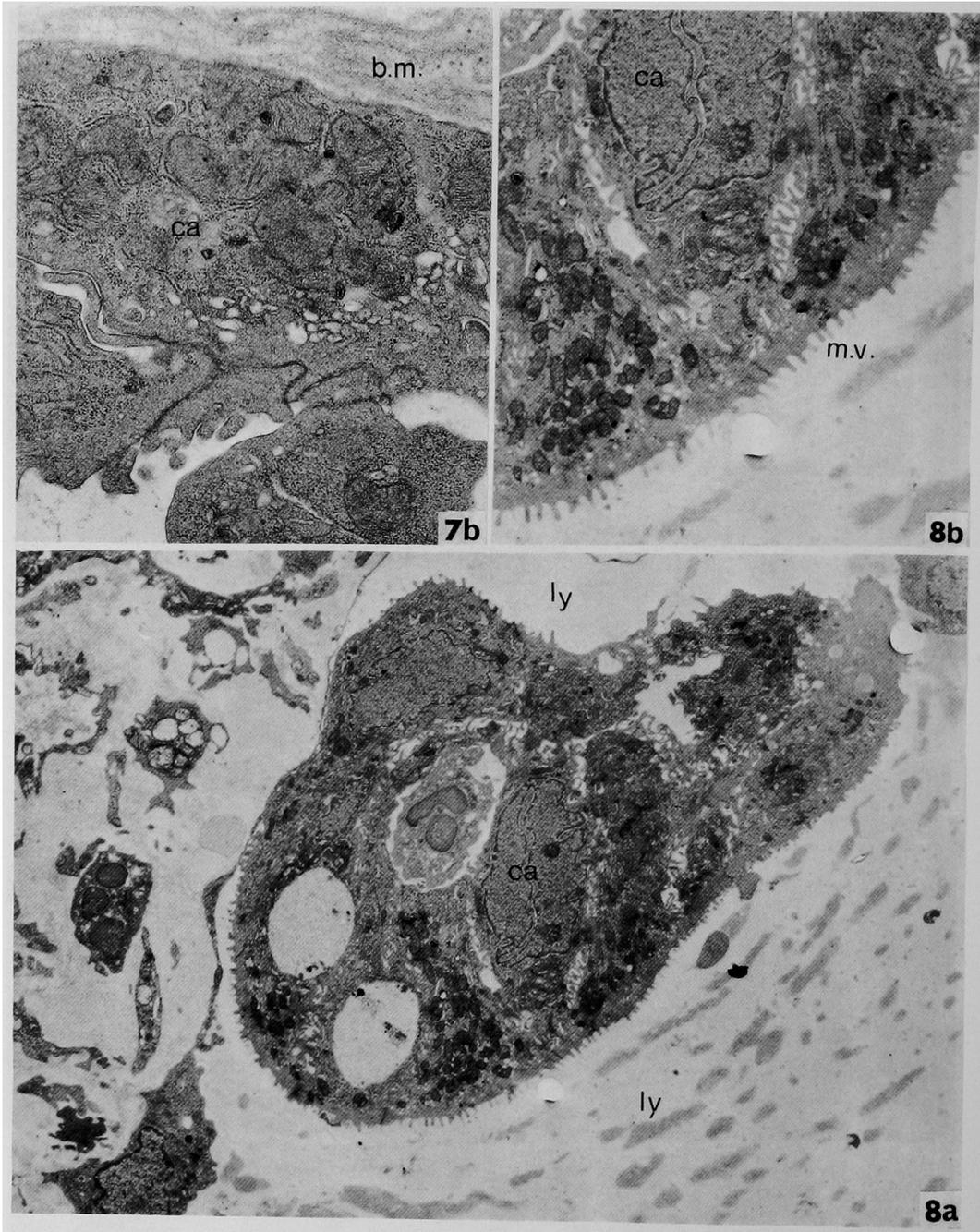
荒木京二郎論文附図



荒木京二郎論文附図



荒木京二郎論文附図



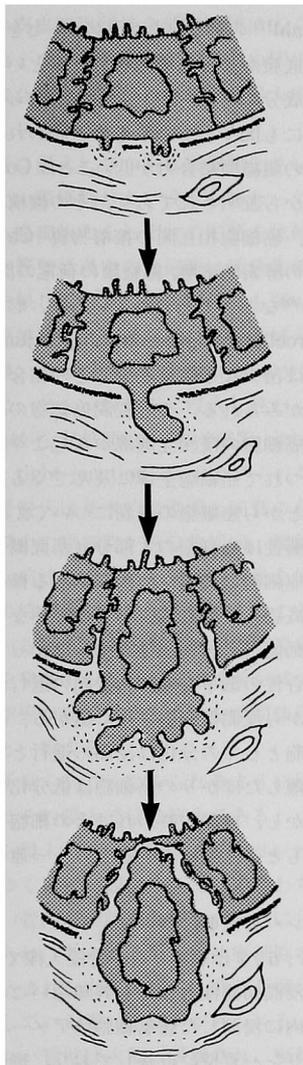


図9. 癌細胞初期浸潤過程の模式図

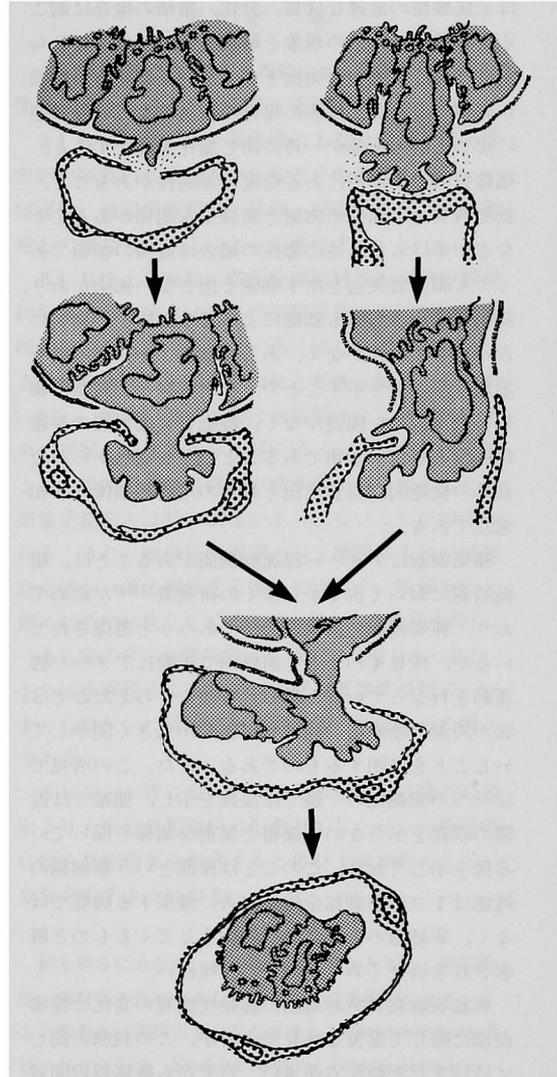


図10. 癌リンパ管侵入過程の模式図

考 案

I. 癌の浸潤初期像について

所見1.2.3.4は癌の浸潤初期像と解される所見である。これらの所見から癌浸潤の経過を推測すると、癌浸潤はまず基底膜の部分的な消失とその部からの細胞質突起の間質内侵入および侵入部間質の破壊(所見1)から始まる。浸潤がもう少し進んだ時期には癌細胞のアメーバ様運動(所見4)や、より広範な基底膜の消失、隣接癌細胞との細胞間結合の脆弱化(所見2, 3)などが現われて浸潤が進行すると思われる。こ

の過程を模式図で示すと図9の如くなる。また、浸潤を示す癌細胞は他の癌細胞に比べて低分化の所見を示す。

癌浸潤における基底膜の消失と細胞質突起の間質内侵入は人子宮の粘膜内癌⁴⁾⁵⁾、人扁平上皮癌⁶⁾⁷⁾、実験皮膚腫瘍⁷⁾⁸⁾などで観察されており、Aschworthら⁴⁾⁵⁾は microinvasion の像は基底膜の消失と細胞質突起の間質内侵入であると述べている。一方、ラット胎児の十二指腸粘膜の成長や⁹⁾ 人創傷治癒過程において基底膜欠損部からの上皮細胞の間質内突出像という同様の所見が出現するといわれ、これらの所見

は上皮細胞の急速な成長、分化、増殖の場合に起こる物質移送のための現象と解釈されている。これら良性的機能的細胞質突起と癌の浸潤初期像との鑑別が問題であるが、良性的場合の特徴として機能状態に応じて細胞全部が一斉に同じ変化を起こすこと、細胞質突起の形態にある程度の規則性があること、細胞質突起と間葉系細胞と密接な関係があることなどが挙げられ、逆に悪性的場合は近隣の細胞であっても細胞質突起を出す細胞と出さない細胞があり、細胞質突起の形態も細胞によってまた同一の細胞においても規則性がなく、あるいはアメーバ様運動を思わせる形態を示すことや、細胞質突起と間葉系細胞との直接的な関連がなく、細胞質突起周囲の線維性間質の変化が著明であることなどが形態からみた良性的機能的細胞質突起と悪性的浸潤初期像との相違点である。

腫瘍細胞にアメーバ様運動機能があることは、組織培養において古くから多くの研究者¹¹⁾¹²⁾が認めており、腫瘍浸潤の重要な因子であろうと想像されているが、所見4のごとく組織内で実際にアメーバ様運動を行なっていると思われる像をとらえたことは、癌の浸潤に癌細胞の能動的な運動が大きく関与していることを証明するものである。また、この所見では一つの癌細胞の一端では浸潤を示し、他端では近隣の浸潤を示さない癌細胞と緊密な関係を保っている像を示しており、このことは浸潤という癌細胞の機能は1コの癌細胞全体が一斉に確保する機能ではなく、癌細胞の1部に局所的に生じてくるものと解釈される所見であり、極めて興味深い。

癌細胞細胞質突起周囲の線維性間質の変化は腫瘍浸潤に際して重要な所見であるが、この機構に関してはいまだ不明な点が多い。古くから腫瘍周辺間質の変化に対する仮説として物理的圧迫説、乳酸加水分解説、Cathepsin説、mucolytic enzyme説、mesenchymolysis説などがあるが、Sylvén¹³⁾は腫瘍の近接部位の間質基質液をmicrocapillaryで集め蛋白分解酵素(dipeptidaseなど)の著明な増加を証明している。馬場¹⁴⁾は癌から出る液性因子はある種の蛋白分解酵素を含有し細線維融解作用を営むと述べている。近年、伊藤¹⁵⁾や花房¹⁶⁾は人胃癌のコラゲナーゼ様活性が著明に上昇していることを認め、コラゲナーゼ様活性と間質との関係を論じているが、浸潤癌細胞周囲の間質変化の主な所見はコラゲン線維の消失、無構造化ないしamorphous materialの出現である所からみてコラゲナーゼ様の化学物質の作用

が十分考えられる。また、このコラゲナーゼ様物質の作用はKahl¹⁷⁾の行なったコラゲナーゼを皮下に注射すると基底膜がまっ先に破壊されるという実験や、基底膜の主成分がコラゲンである所からみても基底膜の破壊にも関与しているものと思われる。

腫瘍組織の組織間結合力が低いことはComan¹⁸⁾¹⁹⁾の実験などから証明されており、その機構として機械的な力や、癌細胞相互間の接着物質(Ca)の減少、細胞間物質の酵素的溶解、細胞膜の荷電の問題、carnogresin²⁰⁾などが考えられているが、形態学的にみてもintercellular digitationやtight junctionの減少ないしは消失など隣接癌細胞との結合力の低下を示す所見がみられる。この浸潤癌細胞の結合力低下の所見は癌細胞の浸潤先進部から起こり始め、浸潤が進むにつれて癌細胞全体に及んでくる。

以上のことから癌細胞の浸潤についてまとめると、癌細胞の侵襲性は癌細胞の1部分(基底側)から起こり始め、癌細胞の間質への浸潤はある種の化学物質による基底膜と侵襲部間質の破壊を伴いながら癌細胞の自動能(アメーバ様運動)によって進行し、癌細胞間結合性の低下も癌細胞浸潤の進行に伴って浸潤先進部から浸潤癌細胞全体に広がる。逆に癌細胞の上皮細胞としての分化は浸潤の進行と共に減少し、浸潤遊離したばかりの癌細胞は低分化な所見を呈する。しかし、浸潤が終わればその細胞としての分化は再びもとの状態に復するという一連の変化がみられる。

II. 癌のリンパ管侵襲について

所見4, 5, 6, 7は癌のリンパ管侵入像である。所見4は癌の浸潤初期像としても興味深いことは前述した。間質内に浸潤した腫瘍細胞はアメーバ様の偽足を出してリンパ管壁に近接しており、癌細胞と近接した部のリンパ管内皮細胞は変性に陥りつつある。この内皮細胞が変性脱落すれば所見5のごとく癌細胞のリンパ管内侵入が完了するものと思われ、このリンパ管侵入様式は、癌細胞による内皮細胞の破壊性浸潤によるものである。

一方、所見6では細胞質突起は狭い部分でリンパ管内に侵入しリンパ管内で再び広がっており、癌細胞の侵入部のリンパ管内皮細胞は滑らかに変性像や破壊像が認められない所からリンパ管内皮細胞間接合部の間隙からの侵入と考えられる。腫瘍細胞によるリンパ管の破壊性浸潤は高沢²¹⁾もドンリウラットのpenile skinに移植した腹水肝癌によるリンパ管の変化の中で捕えているが、リンパ管内皮細胞間接合

部の間隙からの侵入はいまだ確認されていない。リンパ管壁の内皮細胞間接合部の間隙は広く開いている(時に数ミクロン)場合があるため²²⁾リンパ管内皮細胞間接合部の間隙から癌細胞が侵入することは容易に起こり得ることと思われる。

リンパ管に侵入しつつある癌細胞とリンパ管に浸潤していない癌細胞および侵入し終わってリンパ管腔内にある癌細胞のそれぞれの形態を比較してみると、リンパ管壁通過中の癌細胞は低分化細胞にみられる所見を呈しており、細胞間結合も弱い浸潤していない癌細胞には、かなり良好な微絨毛や粘液顆粒、基底膜、intercellular digitationの分化がみられる。さらに、リンパ管腔内に侵入し終わった癌細胞には再び微絨毛、粘液顆粒、ゴルジ装置、intercellular digitation, tight junctionの分化がみられた。癌細胞のリンパ管侵入は基本的に浸潤と同質のものと考えられ、浸潤中の癌細胞が低分化傾向、細胞遊離性に富むという前述した事実と同様の所見を呈した。癌は母細胞の持つ機能的分化を膜做することは従来認められている事実であるが、癌細胞が浸潤という一つの機能を発揮するとき、分化傾向が減少することは低分化型癌が高分化型癌よりも浸潤傾向が強いという事実と一致する。

また、所見(6, 7)にみられるように侵入の初期においてはその侵入部位は狭少である。このように狭い所から侵入した癌細胞により、リンパ管壁が浸蝕されてゆく過程が観察された。すなわち、所見6ではリンパ管内皮細胞が癌細胞の突起に包み込まれた像がみられ、さらに所見5では癌細胞の細胞質突起に包み込まれた内皮細胞の一部が菲薄化して顆粒状に脱落している像(↑印)がみられる。このようにしてリンパ管壁は次第に破壊され、癌細胞のリンパ管浸潤が進行するものと思われる。

ま と め

1) MNNG 誘発ラット胃癌における癌の浸潤初期像とリンパ管侵入の初期像を電顕的に観察した。

2) 癌の初期浸潤は基底膜の1部の欠損と細胞質突起の間質内への侵入から始まり癌細胞のアメーバ様運動、浸潤周囲間質の破壊、浸潤癌細胞の隣接細胞との結合力の低下によって進行する。

3) 良性上皮細胞の機能性細胞質突出と癌の浸潤初期像との鑑別点は良性の細胞質突出が形態的に規則性を持ち、細胞全部が一斉に同じ変化を来とし、また細胞質突起と間葉系細胞と密接な関係があるのに対し、癌の浸潤初期像は細胞個々により細胞質突出の時期、形態が異なり特にアメーバ様偽足を出すこと、周囲の線維性間質の破壊像がみられること、間葉系細胞とは特に関連がみられないことが挙げられる。また、癌細胞の浸潤という機能は1コの癌細胞全体が一斉に確保する機能ではなく、癌細胞の1部に局所的に生じてくるものと思われる所見を得た。

4) 癌のリンパ管内侵入の様式に2通りみられた。1つは癌細胞によるリンパ管壁の破壊性浸潤で、いま一つはリンパ管内皮細胞接合部の間隙からの侵入である。

5) リンパ管に侵入しつつある癌細胞は他の癌細胞よりも低分化型細胞の形態を示し、リンパ管腔内に侵入後癌胞巣を形成すると再び上皮細胞としての分化を示すようになる。

稿を終るにあたり、直接御指導を賜りました岡島教授、御校閲を賜りました折田教授に感謝致します。さらに御教示、御協力をいただきました Stemmermann 教授、林卓二先生 (Kuakini Medical Center, Honolulu) に謝意を表します。

文 献

1. Sugimura, T. and Fujimura, S.: Tumor production in glandular stomach of rat by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Nature*, 216, 943—944, 1967.
2. Fujimura, S., Kogure, K., Sugimura, T. and Takayama, S.: The effect of limited administration of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine on the induction of stomach cancer in rats. *Cancer Res.* 30, 842—848, 1970.
3. Saito, T. and Sugimura, T.: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine carcinogenesis on the glandular stomach of rats. *Stomach Intestine* 9, 1297—1305, 1974.
4. Luibel, F.J., Sanders, E. and Aschworth C.T.: An electron microscopic study of carcinoma *in situ* and invasive carcinoma of the cervix uteri. *Cancer Res.* 20, 357—361, 1960.

5. Aschworth, C.T., Stembridge, V.A., Luibel, F.J.: A study of basement membrane of normal epithelium, carcinoma *in situ* and invasive carcinoma of uterine cervix utilizing electron microscopy and histochemical methods. *Acta Cytol.* **5**, 369—384, 1961.
6. Sugár, J. and Faragó, L.: Ultrastructure of laryngeal precanceroses. *Acta Oto-Laryny.* **62**, 319—332, 1966.
7. Frei, J.V.: The fine structure of the basement membrane in epthelial tumors. *J. Cell. Biol.* **15**, 335—342, 1962.
8. Tarin, D.: Sequential electron microscopical study of experimental mouse skin carcinogenesis. *Int. J. Cancer* **2**, 195—211, 1967.
9. Mathan, M., Hermos, J.A. and Trier, J.S.: Structural features of the epithelio-mesenchymal interface of rat duodenal mucosa during development. *J. Cell Biol.* **52**, 577—588, 1972.
10. Ross, R., and Odland, G.: Human wound repair, II Inflammatory cells, epitheliomesenchymal interactions and fibrosis. *J. Cell. Biol.* **39**, 152—168, 1968.
11. Enterline, H.M. and Coman, D.R.: The ameboid motility of human and animal neoplastic cells. *Cancer* **3**, 1033—1038, 1950.
12. Hirono, H.: Ameboid motility of the ascites hepatoma cells and its significans for their intravenous and metastatic spread. *Cancer Res.* **18**, 1345—1349, 1958.
13. Sylven, B., Bois-Svensson I.: On the chemical pathology of interstitial fluid. I Proteolytic activities in transplanted mouse tumors. *Cancer Res.* **25**, 458—468, 1965.
14. 馬場恒男：腫瘍の浸潤機転における実質と間質の相関について。癌の臨床, **12**, 438—442, 1966.
15. 伊藤国昭：人胃癌の胃壁内進展と collagenase 活性について。岡山医学会雑誌 **89**, 1101—1117, 1977.
16. 花房 伸：間質結合織の動態からみた胃癌の進展。第一編, 胃癌と線維性間質反応。岡山医学会雑誌 **89**, 1049—1067, 1977.
17. Kahl, F.R., and Pearson, R.W.: Ultrastructural studies of experimental vesiculation. II collagenase. *J. Invest. Derm.* **49**, 616, 1967.
18. Coman, D.R.: Decreased mutual adhesiveness, a property of cells from squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* **4**, 625—629, 1944.
19. McCutcheon, M., Coman D.R., Moore, F.B.: Studies on invasiveness of cancer, adhesiveness of malignant cells in various human adenocarcinoma. *Cancer* **1**, 460—467, 1948.
20. Ozaki, T., Yoshida, K., Ushijima, K. and Hayashj, H.: Studies on the mechanisms of invasion in cancer. II. *In vivo* effects of a factor chemotactic for cancer cells. *Intern. J. Cancer* **7**, 93—100, 1971.
21. 高沢 博：実験的リンパ行性転移形成：ラットにおける移植部リンパ管の電顕的研究。日癌会記事, 31回名古屋 p. 296, 1972.
22. 森 堅志：リンパ管の構造。日本臨床, **28**, 2—12, 1970.

**Electron microscopic study of the initial stage
of cellular and lymphatic invasion in carcinoma**

Keijiro ARAKI

Department of Surgery, Okayama University Medical School,
Okayama 700, Japan

(Director : Prof. K. Orita)

The initial stages of cellular and lymphatic invasion were studied in experimental carcinomas of rat-stomach induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. In initial invasion, lack of the basement membrane and cytoplasmic projections into the adjacent connective tissues was observed. The mode of penetration of cytoplasmic protrusion into the stroma was also studied in cases of benign cells. As a result, invasion by carcinoma cells was thought to occur with its ameboid and proteolytic enzymic action against the surrounding tissues. The invasive mode into the lymphatic vessels was divided into the following 2 types; a destructive invasion type, and an endothelium type. It was interesting that differentiation and cellular adhesiveness of carcinoma cells was less in the course of invading into the lymphatic wall, but rose after that.