

日本財団補助金による

1999 年度日中医学協力事業報告書

－中国人研究者・医療技術者招聘助成－

財団法人 日 中 医 学 協 会
理 事 長 中 島 章 殿

平成12年3月20日

研究室で撮影した本人のスナップ写真、及び発表論文等のコピーを添付

1. 招 へ い 責 任 者 野坂 洋一郎



所属機関 岩手医科大学歯学部口腔解剖学第一講座 職名 教授

所在地 〒020-8505 盛岡市中央通1-3-27 電話 019-651-5111

招へい研究者氏名 謝 雪峻

所属機関 北京医科大学付属人民医院 職名 主治医師

研 究 テ ー マ 口腔周囲組織のリンパ管とその構造

2. 日 本 滞 在 日 程

平成11年6月29日日本国入国 同日研究開始

平成12年3月31日 研究終了

平成12年4月1日から引き続き研究継続

平成13年6月25日研究終了予定

3. 研 究 報 告

別紙書式を参考に、報告本文4000字以上で報告して下さい（枚数自由・ワープロ使用）

タイトル・要旨等は日本語で、KEY WORDS以下は日本語或いは英語で記入して下さい。

研究成果の発表予定がある場合は発表原稿・抄録集等を添付して下さい。

論文発表に当たっては、日中医学協会－日本財団補助金による旨を明記して下さい。

研究テーマ：口腔周囲組織のリンパ管分布とその構造

来日研究者氏名：謝 雪峻

中国での所属・役職：北京医科大学人民医院口腔科・主治医師

招聘者氏名・所属・役職：野坂 洋一郎・岩手医科大学歯学部・教授

要旨：口腔領域の末梢リンパ管構築を研索した結果、舌のリンパ管は舌背上皮の下に結合組織乳頭の中に盲端となったリンパ管が侵入し、固有層の中に網目状のリンパ管網を形成していた。このリンパ管網から舌深動脈伴行集合リンパ管、オトガイ舌筋伴行集合リンパ管、舌中隔内集合リンパ管が顎下リンパ節に流入する。舌上皮下のリンパは舌中隔を越えて交叉する流れが認められ、反対側に流入する量は時間の経過と共に増加した。

KEY WORDS: リンパ管構築、頭頸部領域、腫瘍

目的

近年、その吸収機能に注目が集っているリンパ管は口腔領域のみならず、全身の数カ所を除いてほとんどの臓器における末梢リンパ管構築は不明のままである。特に、血管の微小循環の研究が臓器固有の構築が機能を反映していることを理解した上での進歩であるにも関わらず、リンパ管構築は顧みられていなかった。その理由として、リンパ管は閉鎖系である血管系とは異なり、末梢から中枢への一方通行であり、途中にリンパ節が存在することから、血管系と同じ研究方法では確認できなかったこと、さらに静脈、特に細静脈との鑑別が、通常の組織切片観察では全く不可能で、組織化学、免疫染色等でも困難であったことが挙げられる。特に、口腔領域では末梢のリンパ管構築の検索はほとんどされておらず、頭頸部各部位の所属リンパ節が確認されているのみで、各臓器のリンパ管構築および各末梢組織から所属リンパ節への集合リンパ管経路ですら、詳細は不明である。本研究の目的は口腔領域の中では癌発生率の高い舌に注目して、舌の粘膜上皮下および舌筋内リンパ管構築を観察し、吸収効率、左右の交叉率を明らかにすることにある。

方法

1. マウス胎仔のリンパ管構築

雌雄マウス（2カ月齢）を一晩同居させ、翌日の朝8時に膈プラグ形成を確認後、雌雄を分ける。この時点を目録1日として、18日目の午前8時に子宮より胎齢18日の胎仔を摘出、直ちに中性緩衝10%ホルマリンにて浸漬固定を施した。固定完了後、各試料はエタノール上昇系列にて脱水、通法に従って、GMA レジンに包埋した。電動マイクロトームにて3 μm 連続切片を作成し、トルイジン・ブルー染色を施し、カバーガラスにて封入した。各切片の全体像と口腔領域像を光学顕微鏡 (E800, NIKON) にて観察、冷却3—CCD カメラ (C-5860, Hamamatsu Photonics) にてパーソナルコンピュータ (Macintosh G4, Apple) に二次元画像として入力した。画像処理ソフト (Photoshop ver.5.5, Adobe) にて観察臓器および、リンパ管を抽出、二次元画像の軸合わせを行い、三次元構築ソフト (Voxblast ver.2.2) にて立体再構築を行った。さらに、同ソフトにて三次元画像アニメーションを作成し、あらゆる角度からの観察を可能とした。

2. 舌のリンパ流交叉

1) RI による検索

2カ月齢雄性マウスの舌右側の舌尖より5mmの筋肉内に ^{14}C ラベリング・ウシ・アルブミンを注入し1分、10分、20分後に舌、左右顎下リンパ節、左右深頸リンパ節を摘出、2N水酸化ナトリウム(70℃、1時間)にて処理後、室温に戻して、2N塩酸にて中和した試料を液体シンチレーション・カウンター(2550TR/LL, Packard, 東京)にて放射活性を計測した。

2) ultrasphere による検索

2カ月齢雄性マウスの舌右側の舌尖より5mmの筋肉内に直径5 μm のultrasphere 100 μl (1,000万個)を注入し、30分、1時間、3時間、6時間後に舌、左右顎下リンパ節を摘出し、10%中性緩衝ホルマリンにて固定、30 μm 連続凍結切片を作成した。光学顕微鏡下で顎下リンパ節のultrasphereの数を計測、舌から顎下リンパ節への移行および左右差を検索した。

3. VX2 癌細胞移植実験

組織型が扁平上皮癌に類似している易転移性のVX2癌細胞を体重約3Kgの日本白色雄性ウサギの舌右側に舌尖より5mmの筋肉内に移植する。VX2癌細胞を移植後後7日、10日、14日目に耳静脈内麻酔を施し、開胸、心尖よりカニューレを挿入して、先端を上行大動脈の位置に固定、カコジル酸緩衝液にて瀉血後、2%パラフォルムアルデヒドにて灌流固定を施す。舌を移植部を含め

て摘出し、直ちに -30°C にて凍結、 $30\ \mu\text{m}$ 切片を作成する。切片を軽く4%パラフォルムアルデヒドにて再固定後、緩衝液にて洗浄、5'-Nucleotidase 酵素組織化学染色をほどこして光学顕微鏡にて腫瘍周囲のリンパ管の変化を観察する。

結果

1) マウス胎仔舌のリンパ管構築

舌では舌背、舌下面、舌に対向する口腔底のリンパ管構築を観察した。

1) 舌背、粘膜には糸状乳頭が認められ、各乳頭の直下には結合組織乳頭が存在する。リンパ管網は粘膜固有層に存在し、この網目から各結合組織乳頭に盲端となったリンパ管が立ち上がり、侵入していた。一方、粘膜固有層に存在するリンパ管網からは舌筋筋束間の内筋周膜内を舌深動脈に向かって下行していた。

2) 舌下面には舌背のような舌乳頭は存在せず、粘膜の分類では保護粘膜となり、上肢は非常に薄かった。リンパ管が粘膜固有層に認められ、舌背と同じく網目を形成しているが、管径は太く、網目が粗かった。粘膜上皮に向かう盲端となったリンパ管は確認された。

3) 一方、舌に対向する口腔底のリンパ管は、口腔底を構成する筋肉の上面に同じく目の粗いリンパ管網を形成しており、このリンパ管網から粘膜上皮に向かう盲端となったリンパ管は認められなかった。

これらの各部位からの集合リンパ管はほとんどが顎下リンパ節へ、一部舌根部付近は深頸リンパ節へと走行していた。

4) マウス胎仔下顎切歯部唇側歯肉のリンパ管構築

観察したマウスが胎生期のものであったことから、切歯は未だ萌出しておらず、歯肉と口唇は上皮の陥入によって境界されていた。歯肉では下顎骨歯槽表面に目の粗いリンパ管網が形成されており、盲端となったリンパ管の立ち上がりは観察されなかった。一方、陥入上皮をはさんだ口唇側では筋層の上皮側に歯肉よりは目の細かなリンパ管網が形成されており、短い盲端となったリンパ管が形成されていた。これらのリンパ管網は下顎骨外側を経過して下顎角の角前切痕の位置で下顎骨内面に方向を変え、顎下リンパ節に流入していた。

5) マウス胎仔顎下リンパ節のリンパ管構築

口腔、顔面のほとんどの部位からリンパをうける顎下リンパ節は、胎齢18

日胎仔ではリンパ球の集合として存在しており、小節等の形成は未だ行われていない。しかしながら、リンパ洞（辺縁洞、中間洞、髄洞）の形成は終了していた。輸入リンパ管が辺縁洞に合流する部位には弁様構造が形成されていた。辺縁洞には二種類の隔壁が存在し、液成分は通過させるが、細胞成分の通過は抑制するものと、すべての内容物の流通を妨げるものが形態学的に確認できた。

6) 舌のリンパ流交叉 (RI ならびに ultrasphere による検索)

マウス右側舌筋内に¹⁴C ラベリング・ウシ・アルブミンを1%エバンス、ブルーとともに注入した。注入後、1分、10分、20分後に舌、左右顎下リンパ節、左右深顎リンパ節を摘出し、2N水酸化ナトリウムにて溶解し、中和後、液体シンチレーションカウンターにて放射活性を計測した。

色素は注入直後から舌中隔を越えて反対側に経時的に拡散し、1分後には左右ほぼ同じ状態になった。また、1分後には同側顎下リンパ節に10分後には左右顎下リンパ節に、20分後には同側深顎リンパ節に色素が流入していた。

放射活性計測の結果、注入した RI の 0.5~1%が右側（同側）顎下リンパ節に流入していた。10分後にはほぼ1%、20分後には約2%が流入していた。一方、反対側顎下リンパ節には1分後では流入を確認できず、10分後、20分後ではそれぞれ同側顎下リンパ節の約1/3が流入していたに留まった。深顎リンパ節への流入は左右ともに本実験時間内には確認できなかった。ultrasphere を注入した結果では30分、1時間経過後は同側の顎下リンパ節流入するが3時間後には反対側にも流入が認められた。流入量は3時間までは経時的に増加したが6時間では減少した。

3. VX2 癌細胞移植実験

舌内のリンパ管は大きく3つの経過をとって舌から流れ出していた。(1) 舌深動脈伴行集合リンパ管。(2) オトガイ舌筋伴行集合リンパ管。(3) 舌中隔内集合リンパ管である。VX2 癌細胞移植後、10日例で、腫瘍周囲のリンパ管は太くなっていた。リンパ管網は常に腫瘍周囲の血管網の外側に位置しており、腫瘍の増殖に伴い外側へと移動していた。

考察

1) マウス胎仔舌のリンパ管構築

舌背および舌下面には、リンパ管網が粘膜固有層に存在していた。舌背ではこの網目から各結合組織乳頭に盲端となったリンパ管が立ち上がって侵入していた。一方、舌下面には舌背のような舌乳頭は存在せず、粘膜上皮に向かう盲

端形成は認められなかった。さらに舌下面ではリンパ管の管径が太く、網目の目が粗かった。舌下面に対向する口腔底のリンパ管は、口腔底を構成する筋肉の上面に同じく目の粗いリンパ管網が形成されており、そこから粘膜上皮に向かう盲端となったリンパ管が確認された。これらのことから、舌背、舌下面、対向する口腔底のリンパ管を比較すると、舌下面より対向する口腔底のリンパ管に吸収能の高い盲端となったリンパ管が存在することから、口腔底のほうが形態学的には吸収効率が高いと推測された。一方、舌背にも盲端形成が認められたが、舌背粘膜上皮の厚さ、特に角化層の厚さから考えてもこれら盲端となったリンパ管が上皮を経由した吸収能と関係があるとは考えづらい。この舌背結合組織乳頭内の盲端形成は吸収能とは異なった意味がある可能性があるが、本研究ではその詳細を明らかにできなかった。

2) マウス胎仔下顎切歯部唇側歯肉のリンパ管構築

胎生期のマウスでは、切歯は未だ萌出しておらず、表面的には歯肉と口唇は一連続で境界不明瞭であったが、組織切片的では歯肉と口唇は上皮の陥入によって界されていた。この陥入上皮の歯肉側では下顎骨歯槽表面に目の粗いリンパ管網が形成されており、盲端となったリンパ管は認められなかった。一方、陥入上皮の口唇側では歯肉側よりは目の細かなリンパ管網が形成されており、短い盲端となったリンパ管が認められた。すなわち、形態学的には歯肉は口唇よりリンパ管吸収能が低いことが推測された。

3) マウス胎仔顎下リンパ節のリンパ管構築

口腔、顔面のほとんどの部位からリンパをうける顎下リンパ節実質では、胎齢18日胎仔ではリンパ球の集合として存在しており、未完成であった。しかしながら、リンパ洞（辺縁洞、中間洞、髓洞）の形成はすでに終了していた。輸入リンパ管が辺縁洞に合流する部位には弁様構造が形成されていた。このことはリンパ節が未だ機能していない時期にすでにリンパ流は存在し、辺縁洞に流入したリンパは逆流しないことを意味している。さらに、辺縁洞には二種類の隔壁が存在し、液成分は通過させるが細胞成分の通過は妨げるものと、すべての通過を妨げるものが形態学的に確認できた。これらの結果は、墨汁を末梢組織に注入した際、その直後には所属リンパ節の表面に墨汁が網目上に確認され、時間の経過とともにその網目がすべて墨汁色で埋められることや、蛍光ラベリングしたリンパ球を末梢部に注入した後、所属リンパ節表面を蛍光観察すると、リンパ球が網目状に辺縁洞を走行することを説明できる。すなわち、液

成分（分子量の少ないもの）が辺縁洞に流入すると、最初は流れやすい経路、すなわち、隔壁を避けながら移動する。時間の経過とともにこの液成分は拡散により、辺縁洞内で均一な濃度になるが、液成分をも通過することを妨げる隔壁を越えることはできないため、ある一定範囲を越えて拡散することはない。一方、細胞成分は液成分の流入直後の流れ、すなわち、流れやすい経路をとるのみで、拡散がないため、蛍光ラベリングのリンパ球の動きはリンパ節を表面から観察すると辺縁洞に流路があるように見えることになる。

4) 舌のリンパ流交叉

同時に注入した色素は注入直後から舌中隔を越えて反対側に経時的に拡散し、1分後には左右ほぼ同じ状態になった。色素のような分子量の小さい物質は拡散によって容易に舌中隔を越えることを示している。また、1分後には同側顎下リンパ節に10分後には左右顎下リンパ節に、20分後には同側深頸リンパ節に色素が流入していた。すなわち、注入後、舌内では拡散は明らかにおこっているが、量的に均一ではないため、時間的に多少の差が認められた。長時間の観察で、徐々に均等な流入量になると推測された。¹⁴C ラベリング・ウシ・アルブミンは分子量が大きく、舌中隔を拡散によっては越えることがない。すなわち、アルブミンが反対側の顎下リンパ節に流入することは舌内におけるリンパ流の交叉が存在することを示すことになる。その結果、アルブミンにおいては1分後で0.5~1%が右側（同側）顎下リンパ節に流入していた。10分後にはほぼ1%、20分後には約2%が流入していた。一方、反対側顎下リンパ節には1分後では流入を確認できず、10分後、20分後ではそれぞれ同側顎下リンパ節の約1/3が流入していたに留まった。深頸リンパ節への流入は左右ともに本実験時間内には確認できなかった。一方、5 μ m 径 (ultrasphere) の微粒子を1時間、2時間後には反対側顎下リンパ節に流入した。本実験における舌から顎下リンパ節への流入量は時間の経過が徐々に増加を示すことが分かった。また、左右の交叉は約1/3であることが判明した。

5) VX2 癌細胞移植実験

VX2 癌細胞移植後、10日例で腫瘍周囲のリンパ管が拡大していることから、腫瘍による影響は血管より遅れていることが明らかである。腫瘍蜂巢形成後もリンパ管網は常に血管網より外側に存在することは、栄養を司る血管網が腫瘍の近くに存在し呼吸専門のリンパ管が外側に存在することは機能的な位置関係を制御する機構が残っていることを示していると考えられた。

参考文献

1. ゴールデンハムスターの舌におけるリンパ管の走行
陳 寛宏、藤村 朗
岩手医科大学歯学雑誌 Vol.19(2): 91-102, 1994
2. 口腔領域における毛細リンパ管構築
藤村 朗
リンパ学 Vol.22(1): 21-26, 1999
3. Lymphatic architecture of the mouse head and neck region by computer graphic 3-D imaging. – Submandibular lymph node –
Akira Fujimura, Masao Onodera, Wang Yaoguang and Yohichiro Nozaka
Dentistry in Japan Vol. 36: 3-8, 2000
4. Architecture of lymphatic vessels of the esophagus in the mouse fetus by 3D-reconstruction images.
Akira Fujimura, Masao Onodera, Xie Xuejun and Yohichiro Nozaka
Microcirculation annual, Vol. 16: in press, 2000