

頬粘膜下および口蓋粘膜経由の抗癌剤投与リンパ管の薬剤吸収能

藤村 朗¹、野坂洋一郎¹、世良耕一郎²

¹岩手医科大学歯学部口腔解剖学第一講座
020-8505 岩手県盛岡市中央通 1-3-27

²岩手医科大学サイクロترونセンター
020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-58

1 はじめに

口腔粘膜下には血管に匹敵するリンパ管が認められる。しかしながら、リンパ管の諸臓器における詳細な構築についてはほとんど検索されていない。特に、口腔領域は硬組織を含んでいるため、酵素組織化学、免疫組織化学的染色に頼るリンパ管の検出は非常に困難で、臓器単位の構築はほとんど検索されていない。我々は手始めにマウスの口腔領域の軟組織に注目して 10 μ m 連続凍結切片を作成して酵素組織化学染色を施し、コンピュータグラフィックを応用した連続切片三次元再構築法を用いて、すでに舌粘膜下のリンパ管構築を報告し⁽¹⁻³⁾、舌背粘膜下、舌下粘膜下、そして舌下粘膜と対向する口腔底粘膜下リンパ管構築の違いを形態学的に報告した⁽⁴⁻¹¹⁾。これらのリンパ管構築のデータをもとに、13回 NMCC 共同利用研究成果発表会では粘膜下に抗癌剤を注射し、粘膜下リンパ管網から吸収させ、所属リンパ節である顎下リンパ節への薬剤移行を PIXE にて計測してきた。今回は頬粘膜および口蓋粘膜上に抗癌剤を設置し、粘膜経由で薬剤を粘膜下リンパ管網から吸収させ、所属リンパ節である顎下リンパ節への薬剤移行を PIXE にて計測したので報告する。

2 材料と方法

実験動物には雄性マウス (C57BL/6J) 10 匹を用いた。ネブタール腹腔内麻酔下に開口し、左側頬粘膜上 (5 匹)、または口蓋粘膜 (正中) 上 (5 匹) に、生理食塩水にて 0.1mg/ml に調整した抗癌剤 (Cisplatin) を綿球に浸し、ピンセットにてマッサージを 5 分間施した (Fig. 1)。その後、5 分間放置して直ちに頸部の皮膚を正中切開、左右に観音開きにし、顎下リンパ節を明示、周囲組織をから引き剥がし、摘出した。顎下リンパ節は個体により 1~3 個摘出できた。摘出した顎下リンパ節は乾熱乾燥機 (200 $^{\circ}$ C) にて 2 日間乾燥を施し、バッキン膜に載せ、無調整、無標準法による Particle Induced X-ray Emission (PIXE: The Nishina Memorial Cyclotron Center) 元素分析を施し、Cisplatin の構造式内にある白金の量を計測した。

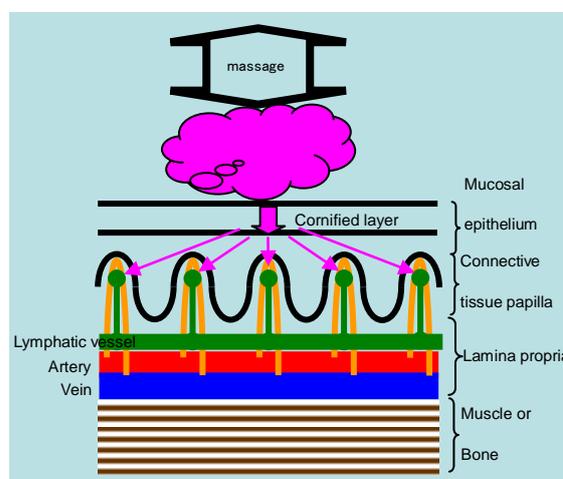


Fig. 1

3 結果

マウス左側頬粘膜上にシスプラチンを浸した綿球を設置し、5分間マッサージ、5分間放置した群では、左側顎下リンパ節には平均 $9.9 \mu\text{g/g}$ が、右側顎下リンパ節には平均 $6.5 \mu\text{g/g}$ の白金が蓄積していた。マウス口蓋粘膜正中にシスプラチンを浸した綿球を設置し、5分間マッサージ、5分間放置した群では、左側顎下リンパ節には平均 $4.5 \mu\text{g/g}$ が、右側顎下リンパ節には平均 $4.2 \mu\text{g/g}$ の白金が蓄積していた。この計測した白金量をシスプラチンに換算すると左側頬粘膜上に綿球を設置した群では左側顎下リンパ節には平均 $15.2 \mu\text{g/g}$ が、右側顎下リンパ節には平均 $10.0 \mu\text{g/g}$ の白金が蓄積していたことになる。一方、口蓋粘膜正中に綿球を設置した群では左側顎下リンパ節には平均 $6.9 \mu\text{g/g}$ が、右側顎下リンパ節には平均 $6.5 \mu\text{g/g}$ の白金が蓄積していた (Fig. 2)。

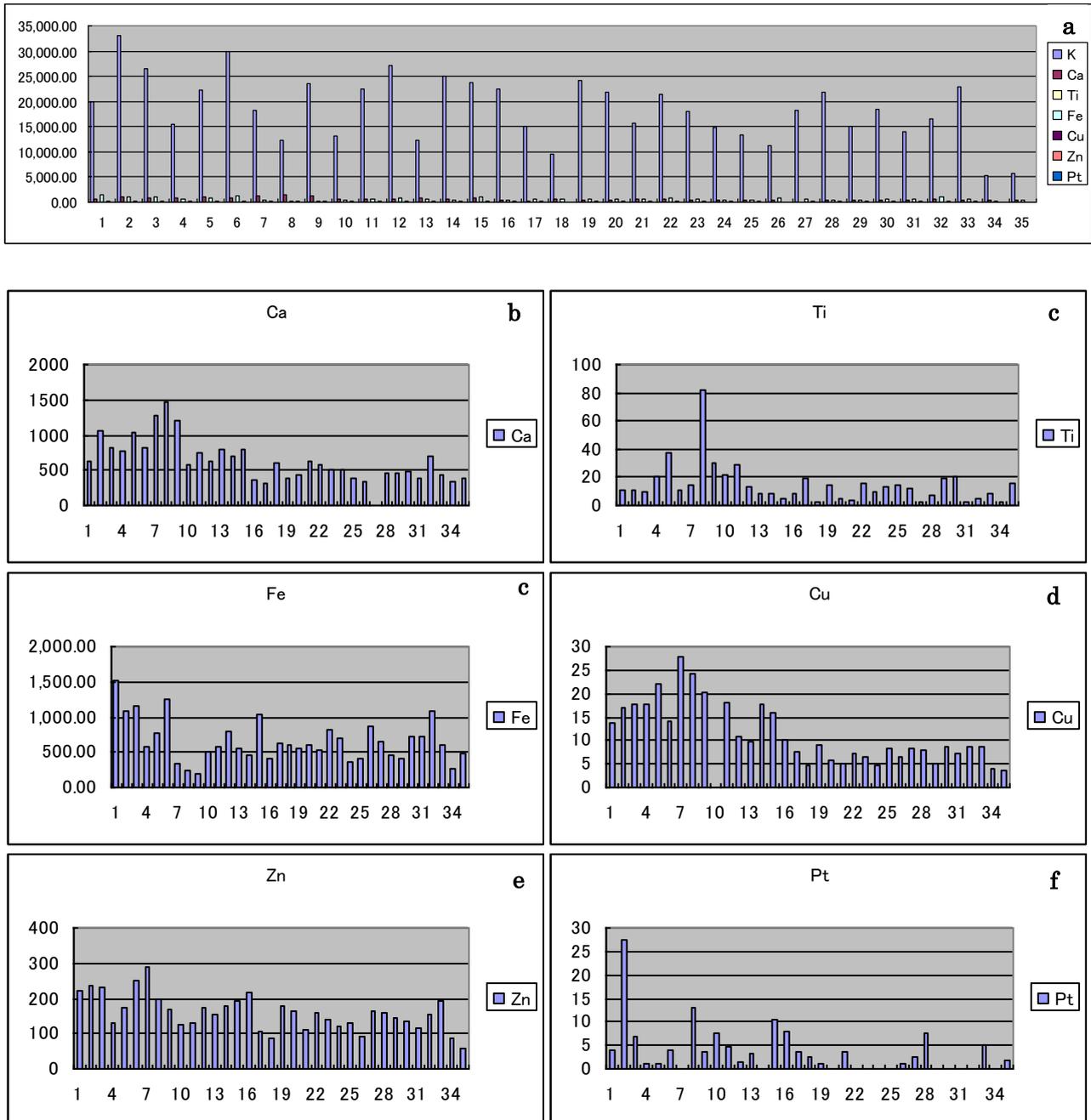


Fig.2 横軸 1-9: 頬粘膜右側顎下リンパ節

横軸 10-15: 頬粘膜左側顎下リンパ節

横軸 16-26: 口蓋粘膜左側顎下リンパ節

横軸 27-35: 口蓋粘膜右側顎下リンパ節

縦軸: 白金量 $\mu\text{g/g}$

1 個体に顎下リンパ節は 1-3 個存在するため、4 群のリンパ節の個数に差がでた。

個体ごとに、またはリンパ節ごとに測定量にばらつきがでた。

4 考察

頬粘膜下リンパ管網は集合リンパ管に向かう樹枝状を呈しており、河川のように順次太いリンパ管へと移行しており、リンパ流には定常流が形成されている可能性がある。このことはリンパの流れが滞ることなく流れやすいことが報告されている。さらに、マウス頬粘膜下リンパ管構築については、リンパ管網から派出する盲端の形態が糸球体状を呈していることは形態学的に盲端の吸収効率が単純なループ状を呈しているリンパ管より高いことを意味しており、過去の報告の舌背、舌下粘膜下の毛細リンパ管⁽¹⁻¹¹⁾より吸収効率の高い形態をしていることが報告されている。その結果、粘膜吸収を想定した舌下錠、バツカル錠は基本的に血管による吸収を想定して使用されているが、実際にはリンパ管による吸収という観点からも有効な部位であることが証明されたと考えられる。また、口蓋では粘膜下の毛細リンパ管網が密で、網目から立ち上がっている盲端が非常に多く、吸収効率が高いことが推測されている。しかしながら、口蓋は咀嚼粘膜に分類される粘膜で、厚い角化層を有しており、実際にどの程度薬剤が吸収されるかは不明であった。そこで、今回、我々は経粘膜的投与を想定した薬剤投与経路として、頬粘膜および口蓋粘膜を経由させて抗癌剤 (Cisplatin) を投与し、所属リンパ節である顎下リンパ節での薬剤蓄積量を元素分析 (PIXE) を用いて計測した。その結果、マウス左側頬粘膜上にシスプラチンを浸した綿球を設置し、5 分間マッサージ、5 分間放置した群では、左側顎下リンパ節には平均 $9.9 \mu\text{g/g}$ が、右側顎下リンパ節には平均 $6.5 \mu\text{g/g}$ の白金が蓄積していた。マウス口蓋粘膜正中にシスプラチンを浸した綿球を設置し、5 分間マッサージ、5 分間放置した群では、左側顎下リンパ節には平均 $4.5 \mu\text{g/g}$ が、右側顎下リンパ節には平均 $4.2 \mu\text{g/g}$ の白金が蓄積していた。ヒトの場合、体表面積あたり (mg/m^2)、または体重あたり (mg/Kg) で表示しているため、体重あたりで換算すると左側頬粘膜上にシスプラチンを浸した綿球を設置した場合、左側顎下リンパ節には平均 $15.2 \text{mg}/\text{Kg}$ が、右側顎下リンパ節には平均 $10.0 \text{mg}/\text{Kg}$ の白金が、マウス口蓋粘膜正中にシスプラチンを浸した綿球を設置した場合では、左側顎下リンパ節には平均 $6.9 \text{mg}/\text{Kg}$ が、右側顎下リンパ節には平均 $6.5 \text{mg}/\text{Kg}$ の白金が蓄積していたことになる。この値は、ウサギでの移植舌癌実験での腫瘍増殖抑制効果を検索した報告で、静脈内投与で、 $3.5-4.0 \text{mg}/\text{Kg}$ が有効濃度であったことから、動物種は異なるが、高濃度の抗癌剤が所属リンパ節に流れ込むことを意味しているものと考えた。さらに、口蓋粘膜では正中に綿球を設置したが、頬粘膜では左側に綿球を設置しており、にも関わらず、左右の顎下リンパ節に白金が流入していたことはリンパ流の交叉を考える必要も有ると考えられた。さらに、口蓋では、厚い角化層の存在する口蓋正中付近より、上顎舌側歯肉の歯肉溝上皮および、付着上皮部の上皮細胞間隙を経由して薬剤が粘膜固有層に到達し、歯肉のリンパ管から薬剤を吸収させることを期待することも今後の課題となるかもしれない。

今回の白金分析には PIXE による無調整、無標準測定法を用いたが、過去の我々の報告で用いていた硝酸灰化法での計測と同様、計測値にばらつきが出ていた。この点については、

1. 個体差：週齢による差と純粋な個体差
2. 実験手技の問題：実験者間の差、同一実験者の実験ごとの差、試料採取法
3. 元素分析の問題：試料作成時の問題、計測者間の差

が考えられる。週齢および個体による差は今回は同一親からの同じ日出産のマウスを用いていることから

ネグレクトできるものとする。実験手技の問題としては、実験者間および同一実験者であっても毎回マッサージの程度は異なる可能性はあるが、マッサージの間隔は一定にした。しかしながら、可能性は否定できないため、次回の実験ではできる限り器械化したマッサージを考える予定である。試料採取法については、これがもっとも大きな因子となると考えている。抗癌剤はリンパ管やリンパ節に結合しているわけではなく、管の中およびリンパ洞の中を流れているわけで、試料採取の際に圧迫力を与えた場合、流れ出る可能性を否定できない。この点に関しては今後の課題であると認識している。元素分析の問題としては硝酸灰化法では試料が完全に溶解しない、過熱時に硝酸蒸気が出る等の問題から、今回、無調整、無標準法を採用したことで回避できているものと信じている。計測者は常に一人の研究者（世良）が行っていることで、経験も含めて最も信頼できる場所であるため、問題ないと考える。今後は、例数を増やすとともに、実験手技の規格化をはかり、リンパ管構築とリンパ管吸収の観点から、口腔領域の諸粘膜の特徴を検索するとともに、PIXEによる元素分析の白金における特異性にも注目して検索する予定である。

参考文献

- 1) Three dimensional architecture of lymphatic vessels in the tongue. A. Fujimura, S. Seki, M-Y. Liao, X. Hu, M. Onodera, Y. Nozaka, *Lymphology* 36(3) : 120-127, 2003.
- 2) Architecture of the lymphatic capillary on the oral region. A. Fujimura, *Jpn. J. Lymphology* 22(1): 21-26, 1999.
- 3) Analysis of the three-dimensional lymphatic architecture of the periodontal tissue using a new 3D reconstruction method. A. Fujimura and Y. Nozaka, *Microscopy Research and Technique* 56(1): 60-65, 2002.
- 4) Distribution of the lymphatic vessels in golden hamster tongue. K-H. Chen and A. Fujimura *Dent. J. Iwate Med. Univ.* 19(2) : 91-102, 1994.
- 5) Lymphatic architecture beneath the mucosal membrane of the tongue. Jung-Chou Liang and A. Fujimura, *Dent. J. Iwate Med. Univ.* 25(3): 283-291, 2000.
- 6) Three-dimensional changes in Lymphatic architecture around VX2 tongue cancer. -Dynamics in growth of cancer - S. Seki and A. Fujimura, *Lymphology* 36(3): 128-139, 2003.
- 7) Three-dimensional changes in Lymphatic architecture around VX2 tongue cancer -Dynamics by administering of antiangiogenic agent - S. Seki and A. Fujimura, *Lymphology* 36(4): 199-208, 2003.
- 8) The anti-angiogenic agent, E7820, induces changes in the architecture of lymphatic vessels around tumors. T. Ohta and A. Fujimura, *Dent. J. Iwate Medical University* 29(1): 79-92, 2004
- 9) Akira Fujimura, Yutaka Sato, Mikiko Shoji, Masao Onodera and Yohichiro Nozaka (2007) Lymphatic architecture of the oral region. - Palatum - *Dentistry in Japan*, 43: 7-11.
- 10) Akira Fujimura, Yutaka Sato, Mikiko Shoji, Masao Onodera and Yohichiro Nozaka (2007) Lymphatic architecture of the oral region. - beneath the buccal mucosa - *Microvascular Reviews and Communications*, 1(1): 9-11.
- 11) The distribution of lymphatic vessels in gingiva. Min-Ying Liao and Akira Fujimura *Microvascular Reviews and Communications*, 2(1): 1-6, 2008

Absorption of lymphatics beneath the buccal mucosa and the palatal mucosa

-Drug administration via the oral mucosa-

Akira Fujimura¹, Yohichiro Nozaka¹ and Koichiro Sera²

¹First Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Iwate Medical University
1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

²Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

Abstract

We have reported that the lymphatic architecture beneath the buccal mucosa and palatal mucosa which had the high absorption shape by morphological analysis. These lymphatic vessels absorbed the antitumor agent, and it was accumulated in the regional lymph nodes (submandibular lymph nodes), when it was injected around the tumor. The quantity of this agent became very little against the whole body and we thought that this quantity did not raise the side effects of antitumor agent in this method. We present whether it could reach to the regional and /or the metastatic lymph node or not when it is administered via the oral mucosa. Cisplatin which has the platinum in chemical structure is used in this study. The platinum was detected using the element analyze with Particle Induced X-ray Emission (PIXE) in Cyclotron Research Center (Iwate Medical University).

Ten μ l of Cisplatin (0.1 mg/ml) drown in stype and sets on the left buccal mucosa and the center of the palatal mucosa of the mouse which were already reported the lymphatic architecture. After 5 minutes massage and 5 minutes neglect, the right and left submandibular lymph nodes were extracted and dried at 100 degree centigrade for two days. The platinum was analyzed by PIXE.

The accumulation of the platinum in the submandibular lymph nodes from the buccal mucosa: 4.5 μ g/g in the left submandibular lymph node; 4.2 μ g/g in the right submandibular lymph node. The accumulation of the platinum in the submandibular lymph nodes from the palatal mucosa: 9.9 μ g/g in the left submandibular lymph node; 6.5 μ g/g in the right submandibular lymph node.

The oral mucosa is formed by the stratified squamous epithelium. The buccal mucosa classified in the lining mucosa and the palatal mucosa classified in the masticatory mucosa. The former has thin and the latter has thick cornified layer.

This result showed that Cisplatin was absorbed more at the buccal than at the palatal mucosa. We have thought that the palatum is very useful part for administration because the deep cervical lymph node, which is the final lymph node of head and neck region is the regional lymph node of the palatum in human. And the palatum can use for application to the drug administration using denture. We think that the buccal and the palatal mucosa are very useful for drug administration via the mucosa.