

## 頬粘膜下リンパ管の薬剤吸収能 — バッカル錠を想定して —

藤村 朗<sup>1)</sup>, 佐藤 大<sup>2)</sup>, 庄司美樹子<sup>3)</sup>, 西村智尚<sup>1)</sup>, 小野寺政雄<sup>1)</sup>,  
伊藤じゅん<sup>4)</sup>, 世良耕一郎<sup>5)</sup>, 野坂洋一郎<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>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

<sup>2)</sup>岩手医科大学歯学部口腔外科学第一講座  
020-8505 岩手県盛岡市中央通 1-3-27

<sup>3)</sup>岩手医科大学歯学部歯科矯正学講座  
020-8505 岩手県盛岡市中央通 1-3-27

<sup>4)</sup> (社) 日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンター  
020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-58

<sup>5)</sup> 岩手医科大学サイクロトロンセンター  
020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-58

### 1 はじめに

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。その結果、微小循環領域におけるリンパ管は腫瘍の転移経路の一つ程度の認識しかない。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。我々は形態学的にリンパ管構築を追及するために、口腔領域の  $3\mu\text{m}$  連続樹脂切片を作成し、リンパ節の輸入リンパ管から目的とする臓器にリンパの流れと逆行する方向でリンパ管を追及する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と、 $10\mu\text{m}$  連続凍結切片を作成して酵素組織化学染色を施し、同様に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<sup>(1-3)</sup>、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<sup>(4-5)</sup>。今回は酵素組織化学染色による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により頬粘膜下リンパ管構築を検索し、経口投与の口腔内粘膜吸収を期待するバッカル錠の頬粘膜下リンパ管吸収を想定し、頬粘膜下に注入した抗癌剤(Cisplatin)の所属リンパ節移行量の測定を PIXE を用いて計測したので報告する。

## 2 材料と方法

### 2.1 リンパ管構築の検索

実験動物には雄性マウス (C57BL/6J) を用い、過麻酔下に動物を屠殺、頬粘膜を採取した(図 1)。試料は直ちに固定 (加塩化カルシウム 4%パラホルムアルデヒド, 10 分間) を施した。洗浄後, 5% CMC にて凍結包埋し, クリオシュタットにて連続 10 $\mu$ m 切片を作成した。切片にはリンパ管同定のために 5'-Nase 染色を施した<sup>(1-5)</sup>。一部の試料は全載標本として全体を染色し, 染色されたリンパ管の二次元画像を生物顕微鏡(NIKON E-800)下に冷却 3CCD カメラにてコンピュータに入力し, モニター上でリンパ管抽出を施し, 画像処理後, 三次元再構築ソフト(Boxblast, Vaytek, ver.2.1.)にてリンパ管の立体構築を作成した。



図 1 マウス頰粘膜摘出部位

### 2.2 Cisplatin の所属リンパ節移行量の測定

実験動物にエーテル吸入麻酔を施し, 右側頰粘膜下 (第一大臼歯部付近) に 0.1  $\mu$ g/ml Cisplatin を 10  $\mu$ l 注入し, 1 時間後, 24 時間後に過麻酔下に頸部皮膚を切開, 所属リンパ節である顎下リンパ節を摘出した。試料は直ちに 100 $^{\circ}$ C にて乾熱乾燥を 48 時間行った。乾燥終了後, 試料の乾燥重量を測定し, 内部標準試料としてインジウムを添加し, 硝酸灰化法にて試料を調整した。調整した試料をバッキン膜に載せ, 乾燥後, PIXE にて Cisplatin に含まれている白金の量を測定した。

## 3 結果

### 3.1 全載標本による集合リンパ管の観察

第一大臼歯部(図 2a)において, 筋層上を下方に向かう集合リンパ管が観察された(図 2b)。この位置でフォーカスを粘膜上皮下に合わせると粗い不完全な網目を構成するリンパ管が認められ(図 2d), この網目からのリンパ管は筋層表面を走行する集合リンパ管に合流していた(図 2c)。



図 2a 全載標本の 5'-Nase 染色全体像



図 2b 第一大臼歯部 (図 2a の矢印部)

図 2c 頰粘膜下のリンパ管

図 2d 図 2c の拡大像

### 3.2 連続切片による毛細リンパ管の観察

全載標本における粘膜上皮下頬粘膜下リンパ管構築は臼歯部においては粘膜固有層のリンパ管の網目から頬粘膜下の固有層乳頭内に盲端を派出していた(Fig3a)。この盲端は糸球体状を呈していた(図 3 b-d)。さらに下顎臼歯部より上顎臼歯部頬粘膜下にリンパ管の盲端が多い傾向が認められた。

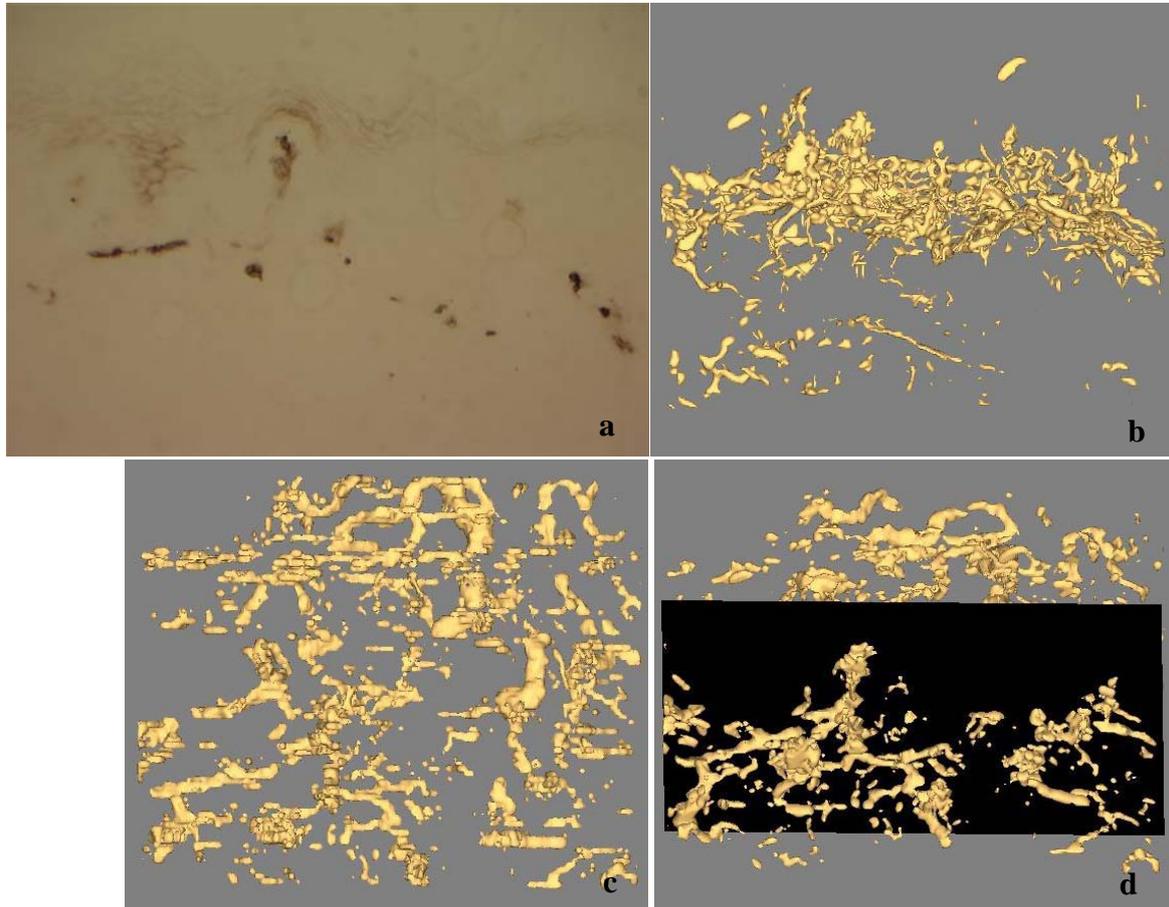


図3 連続切片による頬粘膜下の毛細リンパ管

a: 切片の5'-Nase染色像, b: 上皮に対して水平方向からの観察, c: 上皮側からの観察, d: bとcの間, 45度の角度からの観察。盲端の形態が糸球体状を呈しているのが判る。

### 3.3 PIXEによる白金の計測

Cisplatin 注入後1時間では白金は所属リンパ節である顎下リンパ節には移行していなかった。Cisplatin 注入24時間後では白金は右側顎下リンパ節には明らかに移行していたが, 左側顎下リンパ節では不明確であった(表1)。

表1 PIXEによる顎下リンパ節の元素分析結果

Cisplatin注入1時間後で白金は検出できない。24時間後では右側に明らかな白金の蓄積が見られた。

1時間後 元素名	右側顎下リンパ節		左側顎下リンパ節		24時間後 元素名	右側顎下リンパ節		左側顎下リンパ節	
	$\mu\text{g/g}$	±	$\mu\text{g/g}$	±		$\mu\text{g/g}$	±	$\mu\text{g/g}$	±
K	13827.1429	772.3441	48672.1333	4193.3234	K	13410.7302	657.7590	44669.3580	4388.1906
Ca	179.7379	26.0610	509.6556	80.9402	Ca	302.6234	24.3560	642.7384	98.6516
Fe	253.0462	14.0198	751.3425	64.6314	Fe	253.3301	12.3340	724.8615	71.0610
Zn	94.8995	5.4155	185.2736	16.2608	Zn	105.7321	5.2599	182.0657	18.2381
Pb	2.0144	1.3106	19.3017	4.4065	Pb	1.8336	1.0321	6.8841	3.8936
Pt	—	—	—	—	Pt	<b>3.6587</b>	<b>1.8933</b>	<b>2.3698</b>	<b>6.8133</b>
In	1000.0000	71.2961	1000.0000	117.2993	In	1000.0000	61.1389	1000.0000	134.6050

## 4 考察

### 4.1 全載標本による集合リンパ管の観察

今回の実験では頬粘膜を口腔から剥離して検索したため、一部頬粘膜下に筋層がついていた。すなわち、粘膜固有層および粘膜下層のリンパ管構築を観察したことになる。しかし、この層より下のリンパ管の走行の観察は行っていない。臼歯部のリンパ管の網目は舌背粘膜下および舌下粘膜下リンパ管網<sup>(1-5)</sup>のようにどちらにでも流れることができる形態ではなく、一方向に流れるように筋層上を走行する集合リンパ管に向かって走行していた。すなわち、舌背、舌下粘膜下の毛細リンパ管網では吸収したリンパは網目に一度貯留し、筋ポンプ等による外力により集合リンパ管へと流れると考えられる。一方、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を意味しているものと推測できる。

### 4.2 連続切片による毛細リンパ管の観察

頬粘膜上皮下の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いると推測できる。すなわち、舌背、舌下粘膜下の毛細リンパ管<sup>(1-5)</sup>より吸収効率の高い形態をしていることになる。

これらの結果は、頬粘膜下におけるリンパ管の吸収効率が舌より高く、リンパの流れがスムーズであることを示しており、薬剤投与経路としては有効であることを意味している。現在、臨牀で使用されている舌下錠、バッ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。

今後、粘膜吸収の観点から、リンパ管に特異的に吸収される薬剤の開発、または形状の開発がなされることにより、感染、腫瘍の転移等に対するリンパ節への超選択的薬剤投与経路<sup>(6-8)</sup>として期待できるものと考えられる。

### 4.3 PIXEによる白金の計測

エーテル吸入麻酔下に頬粘膜下に注入されたCisplatinの成分である白金は1時間後では顎下リンパ節に検出されなかった。これは、リンパ管が比較的他動的な脈管で、リンパ管周囲の筋肉等の動きによっ

てリンパ流が発生することを意味しており、注入後 1 時間ではいわゆる筋ポンプが作用しなかったと考えられた。一方、注入後 24 時間では筋ポンプが充分作用して、頬粘膜下に注入された白金は所属リンパ節である顎下リンパ節に移行していた。頬粘膜は同じ口腔内の臓器である舌とは異なり、正中に存在する臓器ではないため、リンパ流の左右の交叉は考えなくてよいことになるはずであった。しかしながら、左側顎下リンパ節にも不明確ながら白金の検出を見た。過去に発表した同様の実験で、舌を用いたものでも、白金の検出は比較的不安定で、個体による差、同一個体でも検索結果に差が出ていた。今回の結果からも、白金以外の元素の検出には個体が異なっても大きな違いは認められなかった。このような不安定な元素の分析結果は白金に特有のものなのか、または硝酸灰化による試料調整が白金のみ、うまくいかないものなのかは不明であった。

今後、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注目して検索し、計測しなおす予定である。

### 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

## **Lymphatic architecture of the oral region –beneath the buccal mucosa–**

Akira Fujimura<sup>1)</sup>, Yutaka Sato<sup>2)</sup>, Mikiko Shoji<sup>3)</sup>, Tomonao Nishimura<sup>1)</sup>, Masao Onodera<sup>1)</sup>  
Jun Itoh<sup>4)</sup>, Koichiro Sera<sup>5)</sup> and Yohichiro Nozaka<sup>1)</sup>

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

<sup>2)</sup> First Department of Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Iwate Medical University  
1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

<sup>3)</sup> Orthodontics, School of Dentistry, Iwate Medical University  
1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

<sup>4)</sup> Takizawa Institute, Japan Radioisotope Association  
348-1 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

<sup>5)</sup> Cyclotron Research Center, Iwate Medical University  
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

### **Abstract**

It is hardly searched about detailed lymphatic architecture in various organs. As a result, the lymphatic vessel in microcirculation field is only recognized as a metastasis route of tumor. Especially, the detection of lymphatic vessel to depend on enzyme histochemistry and immunohistochemistry is very difficult in the oral region, because the oral cavity is enclosed by hard tissues. We have already reported the lymphatic architectures beneath the mucosal epithelium of the tongue dorsum and the inferior surface of tongue using the serial section 3D reconstruction method by computer graphic. From our reports, we have recognized the differences in lymphatic architecture between specialized oral mucosa and lining mucosa of the tongue. In this paper, we report the lymphatic architecture beneath the buccal mucosa which is classified the lining mucosa like as the inferior surface of tongue using enzyme histochemical staining serial section 3D reconstruction method by computer graphic. We suggested in this paper that the lymphatic architecture beneath the buccal mucosa is useful for the drug delivery route. The buccal and sublingual tablet is thought only the absorption from the blood vessels. We really believe that the buccal tablet is very useful drug delivery system from a viewpoint of the absorption of the lymphatic vessels. The platinum was very difficult to detect by PIXE, because the measurement data was not stabilized. In future, we will try to develop the sample treatment method and then to measure again the platinum.