

# A Histopathological Study on the Local Extension of Experimental Osteosarcoma to Determine the Most Suitable Surgical Margin

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8070">http://hdl.handle.net/2297/8070</a>

## 至適外科的切除縁からみた実験骨肉腫の局所 進展様式についての病理組織学的研究

金沢大学医学部整形外科学講座 (主任: 野村 進教授)

南 里 泰 弘

(昭和63年10月25日受付)

四肢の骨・軟部悪性腫瘍の治療の一つとして患肢温存手術を行うにあたり、一番の問題点は局所の根治性を得ると同時に最大限の機能を残すための切除縁の設定である。Enneking の Surgical Staging System は、生体には本来腫瘍発育を抑制する natural barrier なるものが存在していると想定されるので、これを理解したうえで切除縁を設定し、より根治性を目指そうとしたものである。しかし、実際にこのことを実験的に証明したものはない。本実験は natural barrier を評価するために、ヒト骨肉腫に極めて類似した実験骨肉腫を用いて腫瘍の局所進展、natural barrier 及びそれを評定するスキップ転移について病理組織学的検討を行った。方法は Dunn 骨肉腫及びハムスター骨肉腫をそれぞれ C3H/He 系マウス、ゴールデンハムスターの大腿骨髄内に移植し、経時的に軟レ線撮影及び組織学的に観察した。その結果、腫瘍は骨髄腔全体に浸潤するとフォルクマン管腔を経て骨膜下へと進展した。この時点まで骨皮質の菲薄化は全くみられなかった。このことから骨髄から骨膜下への進展は機械的圧力に対し抵抗力が弱いフォルクマン管腔を経て浸潤するのが最初であり、その後フォルクマン管腔より骨皮質を浸潤破壊していくものと思われた。骨膜下より筋層への浸潤は、骨膜を貫通する血管周囲腔を介するものと骨膜を直接浸潤するものとがみられた。腫瘍が骨膜下に局限している場合のスキップ転移は Dunn 骨肉腫でわずか1.8%、ハムスター骨肉腫で0%であり、又骨膜は腫瘍の直接浸潤に抵抗を示し、natural barrier として最も有効なものとして判明した。外側の筋膜は腫瘍の直接浸潤には barrier として有効であったが、腫瘍が筋肉内にまで浸潤したものは Dunn 骨肉腫で13%、ハムスター骨肉腫で14%のスキップ転移がみられた。このうち筋膜を越えたスキップ転移は Dunn 骨肉腫で11%、ハムスター骨肉腫で3%にみられ、これらは腫瘍が大腿部筋肉の横軸の2/3以上にまで増大したものであった。即ち腫瘍が大腿部筋肉の横軸2/3以上に増大すると、筋膜はもはや barrier として有効ではなかった。筋層間のスキップ転移は主にリンパ管内に腫瘍が生着したものであり、これが局所再発における問題点の一つではないかと思われた。スキップ転移は腫瘍原発部位より中枢側に多くみられた。以上より外科的切除縁は、画像診断により腫瘍の拡がりを見た上で natural barrier の有効性を考えて決定すべきであり、またスキップ転移を考慮して中枢側の切除を充分に行う必要がある。

---

**Key words** experimental osteosarcoma, natural barrier, skip metastasis, surgical margin, local extension

---

骨・軟部悪性腫瘍の治療の原則は、局所の根治性が得られることと転移巣(特に肺転移)の制圧がなされることにある。近年有効な化学療法<sup>1)~6)</sup>および免疫療法<sup>7)</sup>の開発により、転移は抑制され生存率の向上がみられるようになった。しかし局所治療においては、今なお腫瘍を外科的にできるだけ完全に切除することが治療の中心であることに変わりはない。その方法として従来は切・断術が一般的におこなわれてきたが、

最近症例により機能残存を目的とした患肢温存手術が行われるようになってきた<sup>8)~11)</sup>。患肢温存手術は、1980年 Enneking によって提唱された Surgical Staging System<sup>12)~16)</sup>の導入以来、より一層広く行われるようになってきた。

患肢温存手術を行ううえで一番の問題点は、局所の根治性を得ると同時に最大限の機能を残すための切除縁の設定である。Surgical Staging System は、生体

には本来腫瘍発育を抑制する natural barrier なるものが存在し、これを理解したうえでの切除縁設定により根治性を目指したものである。しかし、この考えを実験的に証明した報告はない。わずかに、墨汁やパテントブルーV液を筋肉内に注入し、生体内における機械的な圧力に対する抵抗力と拡がりを検討した実験<sup>17)18)</sup>はみられるが、真の生体局所における腫瘍浸潤と barrier との関係をみたものはない。腫瘍浸潤と barrier との関係を正確に評価するためには、実験悪性腫瘍を生体内に移植し、その腫瘍の進展様式を病理組織学的に観察し、切除面となりうる各組織をより詳細に、病期に応じて観察することが必要である。

本研究では、この目的のために2種のヒト骨肉腫に極めて類似した実験骨肉腫を用いて、これを動物の大腿骨骨髓内に移植し、その腫瘍の局所進展、生体内 natural barrier 及びそれを評定するスキップ転移 (local metastasis)<sup>19)</sup>について病理組織学的に観察を行った。

#### 材料および方法

##### I. Dunn 骨肉腫移植後の進展様式に関する検討

##### 1. Dunn 骨肉腫

Dunn 骨肉腫は1955年 National Cancer Institute の Thelma Dunn により月令21か月雌の C3H/He マウスの尾椎に自然発生した骨肉腫として報告<sup>20)</sup>され、以後同系マウスの皮下に継代移植されてきた。この肉腫の特徴は20年以上の継代移植にもかかわらず腫瘍細胞による類骨形成能を失わず、しかも散在性の肺転移を生じ死亡するというヒト骨肉腫に極めて類似している点にある。

##### 2. マウス

静岡実験動物研究所より求めた C3H/He マウス 6~7週令の雄を SPF (specific pathogen free) 下で飼育し、環境に慣れた7~9週令時に使用した。実験に使用した C3H/He 雄マウスは140匹・195肢であった。

##### 3. Dunn 骨肉腫の細胞浮遊液の作成

C3H/He 雄マウスの背部皮下に継代移植している Dunn 骨肉腫の腫瘍組織を McCoy's 5A wash 内で、できるだけすみやかに無菌的にハサミで細切した。McCoy's 5A wash は、McCoy's 5A 培養液 (GIBCO Lab., N. Y., U. S. A.) 500ml にペニシリン、ストレプトマイシン溶液 [Penicillin/Streptomycin solution 10,000units (PS, GIBCO Lab., N. Y., U. S. A.)] 5 ml と熱非動化胎児牛血清 [heat inactivated (HI) new born calf serum (GIBCO Lab., N. Y., U. S. A.)] 50ml を加えたものである。その後、細切された腫瘍組織片を酵素カクテル [Hank's balanced salt solution (GIBCO Lab., N. Y., U. S. A.) + コラゲナーゼ I 型 (SIGMA, ST. Louis, U. S. A.) 0.2 mg/ml, DNase (SIGMA, ST. Louis, U. S. A.) 0.2 mg/ml, プロナーゼ (科研化学, 東京) 0.5mg/ml] にて37°C, 30分間処理し、McCoy's 5A wash にて2回洗浄した。次に、ステンレス製メッシュ (50メッシュ) で濾過し、濾液を25ゲージ注射針で注射筒内に吸引して集め、単離細胞浮遊液を作成した。この時、0.5%トリパンブルー染色により、有核生細胞数を算定したのち、 $1 \times 10^6$ 個/ml となるように調整した。

##### 4. Dunn 骨肉腫細胞のマウス骨髓内移植

麻酔薬として塩酸ケタミン (三共, 東京) 4.6mg

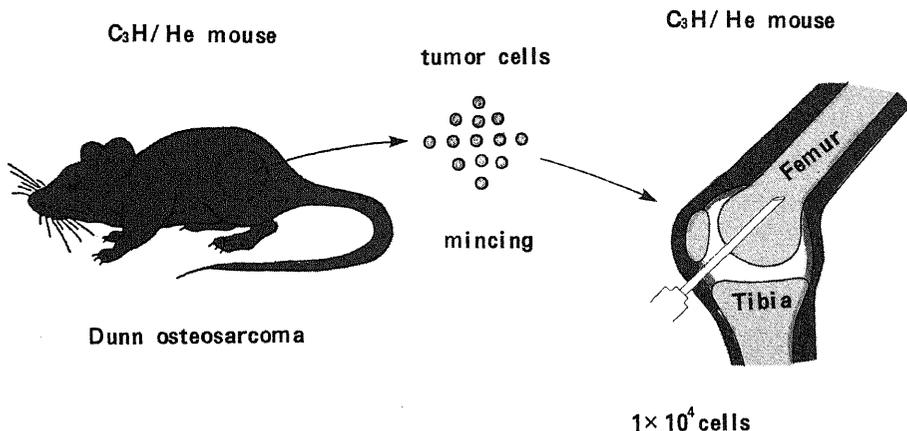


Fig. 1. Technique of injection of Dunn osteosarcoma cells.

(ケタミンとして4 mg)をC3H/He マウスの腹腔内に投与し、麻酔下に無菌的に膝蓋靭帯及び関節包を切離して大腿骨顆間部を露出した。次に顆間窩より大腿骨骨髓腔を27ゲージ注射針にてまず穿孔し、29ゲージ鈍針にて前述の単離細胞浮遊液を0.01ml (腫瘍細胞数、 $1 \times 10^4$ 個)、顆間窩より約8 mmの位置に注入した。穿孔部位は骨蠟で充填した(図1)。

#### 5. 組織学およびレ線の観察

移植後、7日目より屠殺に至るまで2日間隔で腹臥位にてレ線撮影を行った。レ線撮影はいずれもSoftexにて行い、条件は45Kv, 18mA, 1秒とした。フィルムはKODAK X-OMAT TL Film (KODAK, N. Y., U. S. A.)を使用した。又、移植後10日目より2日間隔で75日目まで6匹ずつ塩酸ケタミンの致死量を投与して屠殺し、骨盤部以下を一塊として摘出後、10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、モース法にて脱灰した後パラフィン包埋を行った。3次元的腫瘍の拡がりを見るために、大腿部の周囲筋群を全部つけたまま骨軸に平行な面で厚さ4~6  $\mu$ mの連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色、elastica van Gieson染色を行い、腫瘍の進展・発育状態を病理組織学的に観察した。

## II. ハムスター骨肉腫移植後の進展様式に関する検討

### 1. ハムスター骨肉腫

ハムスター骨肉腫は1979年 Uchida<sup>23)</sup>によりパポバウイルスであるBK ウィルスを出生直後のハムスターの脳内に接種して発生させたものであり、以後同系ハムスターの背部皮下に継代移植されてきたものである<sup>22)</sup>。この肉腫の特徴は、病理組織所見において腫瘍細胞による活発な類骨形成や骨形成がみられ、また高頻度に肺転移が起り、ヒト骨肉腫に極めて類似している点にある。

### 2. ハムスター

静岡実験動物研究所より求めたゴールデンハムスター4週令の雄を飼育し、環境に慣れた5~6週令時に使用した。実験に使用したハムスターは99匹・99肢であった。

### 3. ハムスター骨肉腫組織片の骨髓内移植

ゴールデンハムスターの背部皮下に継代移植しているハムスター骨肉腫の腫瘍塊を無菌的に摘出し、肉眼的に骨形成を思わせる部位のみを取り出して McCoy's 5A wash 内で細切し約0.5mm角とした。

マウスと同様にエーテル麻酔下で無菌的にハムス

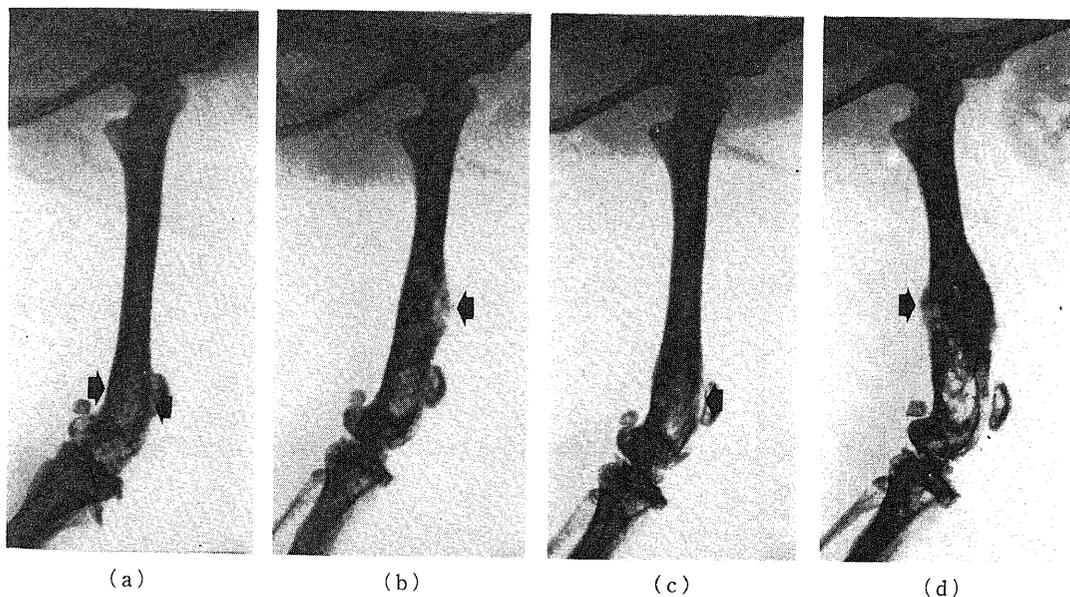


Fig. 2. Roentgenogram of Dunn osteosarcoma in mice. (a) 14 days after transplantation. Small osteolytic areas are seen from the distal diaphysis to the metaphysis of femur (arrows). (b) 17 days after transplantation. Osteolytic lesions are spread and mild periosteal reaction is seen (arrow). (c) 28 days after transplantation. Cortex is destroyed (arrow). (d) 49 days after transplantation. An opposite side cortex is destroyed with "Sun burst" type's periosteal reaction (arrow).

ターの大腿骨頸間部を露出し、頸間窩より大腿骨骨髓腔をまず21ゲージ注射針にて穿孔し、特注の19ゲージトロカール針にて0.5mm角の腫瘍塊3個を頸間窩より約13mmの位置に移植した。穿孔部位は骨蠟で充填した。

#### 4. 組織学的観察

実験Iと同様に、移植後9日目より2日間隔で65日目まで3~4匹づつ屠殺し病理組織学的観察を行った。

### 成 績

#### I. Dunn 骨肉腫移植後の進展様式に関する検討

大腿骨骨髓腔内に腫瘍移植を行った195肢のうち、組織学的に腫瘍が生着増殖し評価可能であった99肢について以下の観察を行った。

##### 1. 軟レ線像による腫瘍発育の経時的観察

移植後7日目ではレ線像上大腿骨に特に変化は認められなかったが、14日目頃より移植した遠位骨幹部か

ら骨幹部にかけて骨髓腔内に軽度の骨溶解像が認められた。骨皮質の侵蝕や骨膜反応は認めなかった。17日目頃より骨溶解像は中枢側および末梢側へ拡がり、一部には骨膜反応もみられた。骨膜反応は solid periosteal reaction, buttress, Codman 三角などであった。21日目頃より骨溶解像は末梢側のみへ拡がりを示し一部には骨硬化もみられた。骨膜反応は明らかとなり buttress に“Sunburst”を伴った Combined reactions がみられるようになった。28日目頃より“Sunburst”の部位で骨皮質の中断が認められた。病巣の増大とともに病的骨折をおこすものが35日目頃よりみられた。その後骨髓腔内の骨溶解像は大腿骨骨幹部を中心に骨幹部の1/3におよび虫喰状骨破壊像を呈し、骨膜の反応性硬化も増大した。50日目頃より腫瘍の骨外浸潤は全周におよんでいると判断された(図2)。

##### 2. 病理組織像の経時的観察

大腿骨骨幹部骨髓腔内に移植した腫瘍細胞は移植後

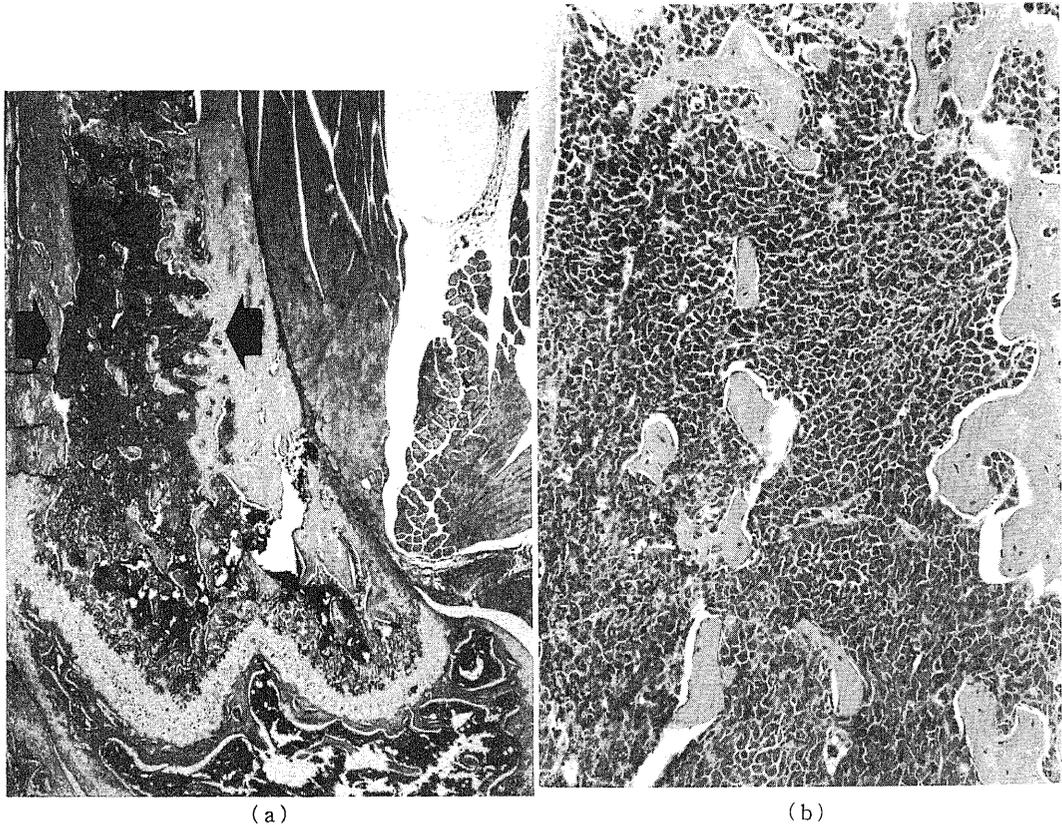


Fig. 3. Dunn osteosarcoma 17 days after transplantation. (a) The tumor is diffusely infiltrated in the femoral medulla (arrows).  $\times 15$  [H-E stain] (b) A high-power photomicrograph shows closely packed cuboid or oval tumor cells.  $\times 100$  [H-E stain]

14日目には骨髓腔内に生着し、骨梁間にびまん性に拡がり一部骨梁を破壊しているものもみられた。個々の腫瘍細胞はシート状に密に配列し、核は円形、多角形でクロマチンに富んでおり、巨細胞もみられた。腫瘍性類骨の形成は乏しかった。移植後17日目には骨髓腔

内は広範囲に腫瘍細胞の増殖で置換され、骨梁はまばらとなった(図3)。この時点では骨皮質の浸潤性破壊は全くみられず、腫瘍は骨髓腔内にもみ発育していた。骨髓腔内にスキップ転移を示したものはなく、腫瘍はすべて連続性を示していた。この段階で骨膜外の

Table 1. Number of skip metastasis in Dunn osteosarcoma and hamster osteosarcoma

Area of tumor invasion	Number(%) of skip metastasis in	
	Dunn osteosarcoma	Hamster osteosarcoma
Intra medulla	0/29* (0)	0/31 (0)
Extension to subperiosteum	1/27 (3.7)	0/12 (0)
Extension to muscle	6/46 (13)	5/35 (14)

\* Number of skip metastasis-positive cases/number of cases tested.

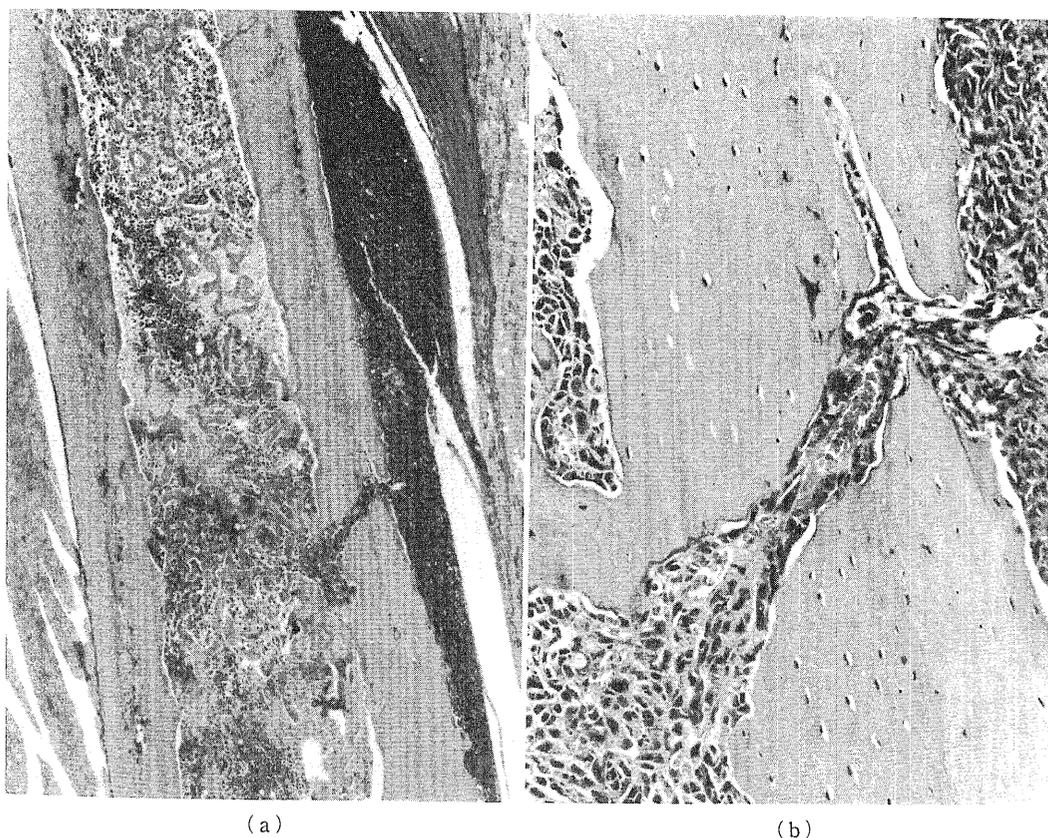


Fig. 4. Dunn osteosarcoma 21 days after transplantation. The tumor cells infiltrate from the medulla to the subperiosteum via the Volkman's canal. (a) A low-power photomicrograph.  $\times 20$  [H-E stain] (b) A high-power photomicrograph.  $\times 160$  [H-E stain]

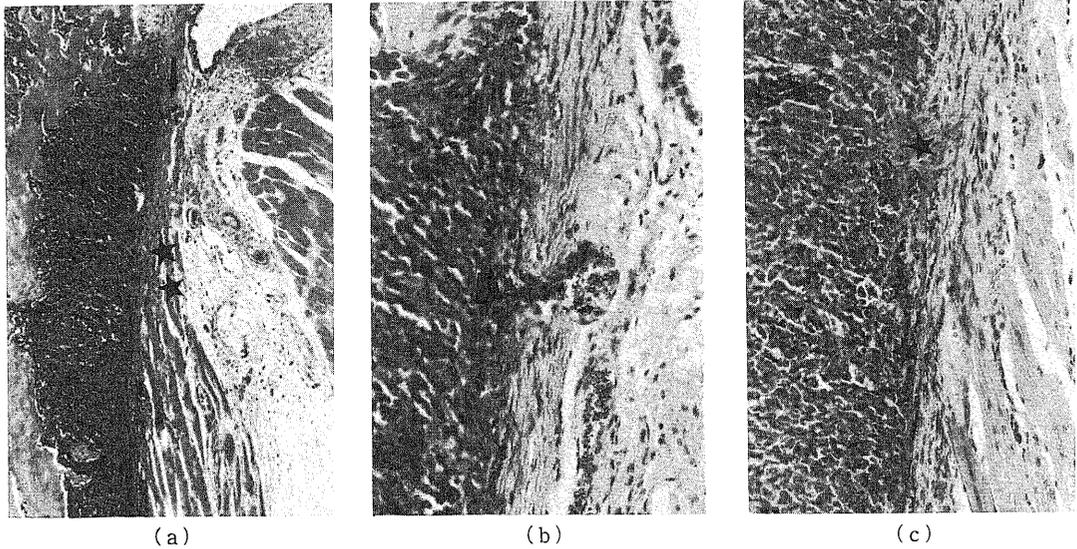


Fig. 5. Dunn osteosarcoma 24 days after transplantation. (a) A photomicrograph shows tumor cell infiltrations from subperiost to muscle by two routes: firstly along the blood vessel which penetrates the periost (arrow), and secondarily by direct infiltration of periost (★).  $\times 20$  (H-E stain) (b) (c) A high-power photomicrograph.  $\times 160$  (H-E stain)

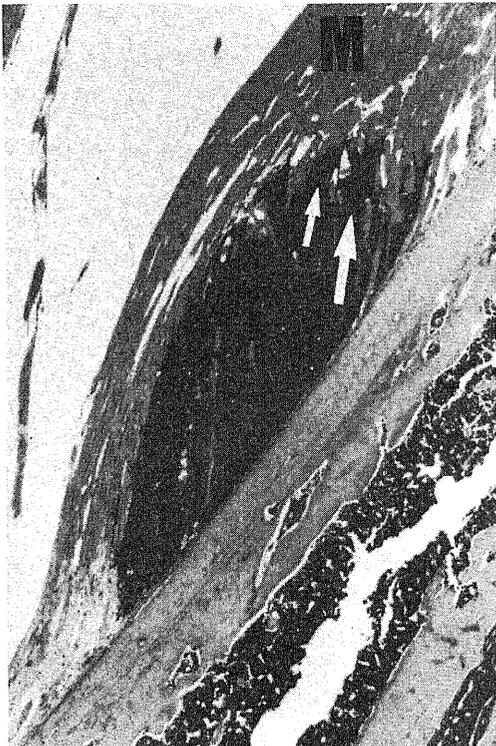


Fig. 6. Dunn osteosarcoma 28 days after transplantation. The tumor (T) within the muscle extends longitudinally between muscle fibers or bundles (M) (arrows).  $\times 15$  (H-E stain)

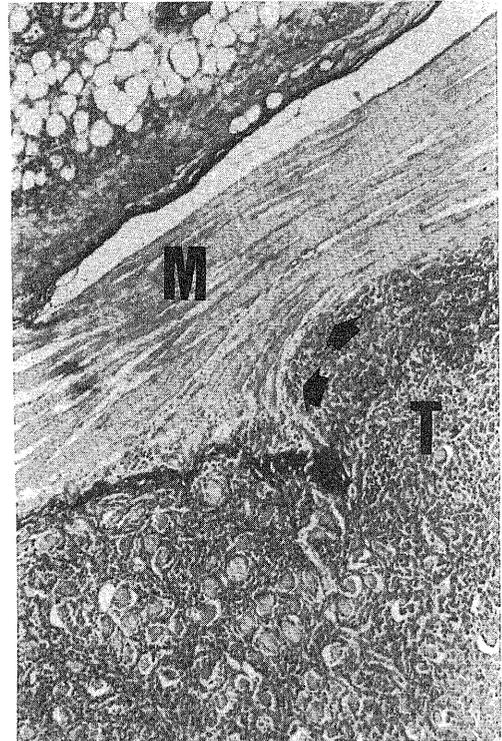


Fig. 7. Dunn osteosarcoma 30 days after transplantation. A photomicrograph shows that muscle fibers (M) are pressed and compactly layered by the tumor extension (arrows). T; tumor.  $\times 20$  (Elastica van Gieson stain)

周囲軟部組織へスキップ転移を示したものは29例中1例も認めなかった(表1)。

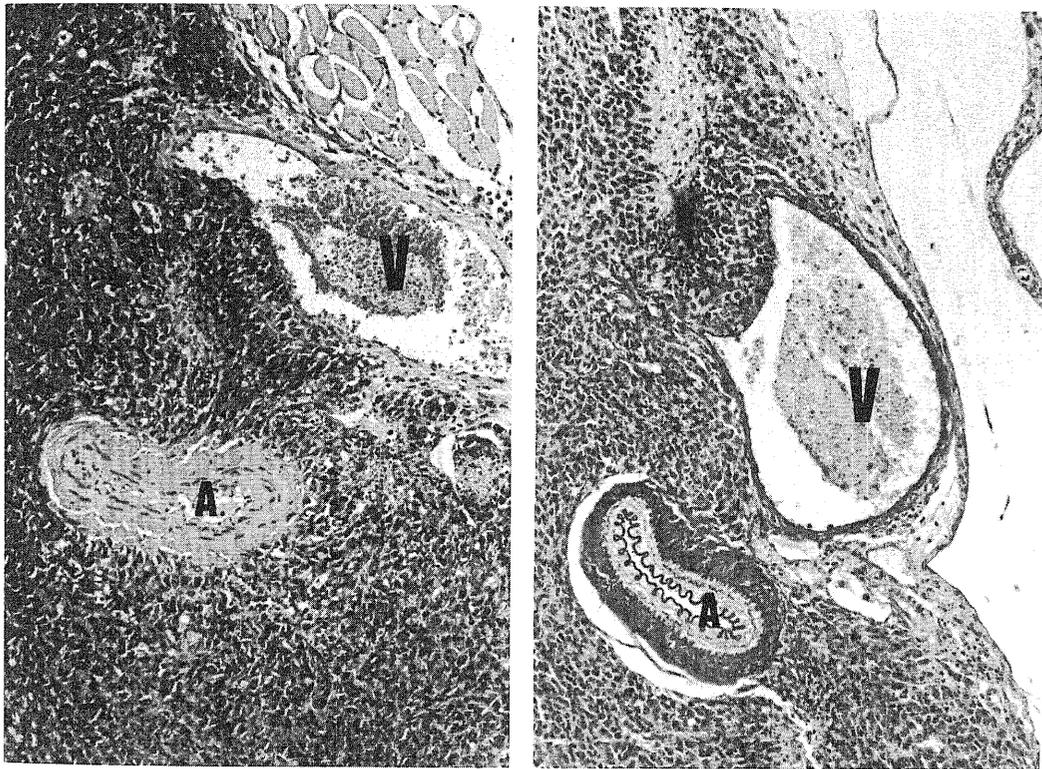
移植後21日目になると腫瘍は骨髓腔全体に浸潤し、さらに骨皮質のフォルクマン管腔を経て骨膜下へと容易に進展、増殖した(図4)。この時点まで骨皮質の菲薄化は殆ど見られなかった。腫瘍はすべて骨膜を挙上するように増殖した。骨膜下での腫瘍増殖を示した27例のうち、骨膜外へのスキップ転移を認めたものは1例(3.7%)であった(表1)。この1例は腫瘍原発部位より中枢部の筋肉内に見られたが、血行性にスキップ転移を起こし血管壁に付着し、そこで増殖したものと考えられた。腫瘍が骨髓腔のみの浸潤例及び骨膜下浸潤例あわせて56例のうちスキップ転移は1例(1.8%)であった(表1)。

移植後24日目より骨膜内より筋層への浸潤がみられた。標本では骨膜と内側の筋膜とは重なり一つの膜として観察された。骨膜の貫通には、機械的圧力に脆弱と思われる貫通血管周囲腔からの浸潤と、骨膜の直接浸潤破壊とが観察された(図5)。

腫瘍は筋肉内では筋線維間や筋束間を長軸方向に増殖し(図6)、さらに一部筋線維を直接浸潤して横軸方向に進展し、そこで又筋線維間を長軸方向に拡がるというパターンを繰り返しつつさらに周辺へと進展していた。腫瘍の増殖により筋線維は圧迫され、萎縮変性した筋線維は緻密な層状構造となった。この変性した筋線維束は腫瘍の横軸方向の拡がりに対して軽度の抑制効果(minor barrier)の役割しか果たしていなかった(図7)。

血管壁に注目すると、動脈では腫瘍が動脈周囲をとり囲んでいても中・内膜へ浸潤している像は見られなかった。一方、静脈では外膜・中膜までの浸潤がみられ、一部は内膜にまで浸潤していた(図8)。

移植後35日目以降になると、腫瘍に広範囲な中心壊死を認めるようになった。外側の筋膜について観察すると、腫瘍が筋膜近くまで増大しても、筋膜の線維性組織により周囲組織と隔離されていた(図9)。この時点で腫瘍が筋膜を破壊し周囲に発育浸潤している像はみられなかった。しかしながら、腫瘍が筋肉内にま



(a)

(b)

Fig. 8. Dunn osteosarcoma 34 days after transplantation. The tumor invades vein (V), but not invade artery (A). (a)  $\times 160$  [H-E stain] (b)  $\times 160$  [Elastica van Gieson stain]

で浸潤した46例のうちスキップ転移が6例(13%)に認められた(表1)。このうち5例は腫瘍が大腿部筋肉の横軸に対し約2/3程度にまで増大したものや外側の筋膜に接する程度にまで拡がりを示したものであった(図10)。これら5例のスキップ転移は腫瘍が発育している筋肉の筋膜外に見られた(表2)。1例

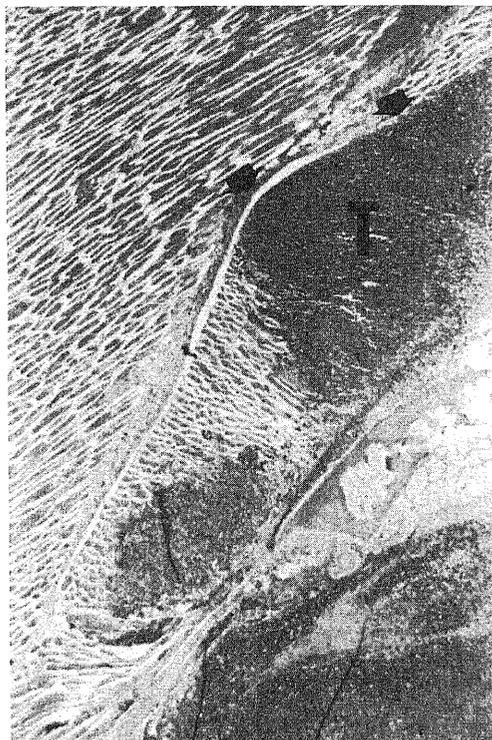


Fig.9. A photomicrograph of fascia (arrows) defending against tumor invasion (T).  $\times 15$  [H-E stain]

は同じ筋肉内で血行性にスキップ転移を示したものであった。Elastica van Gieson 染色によると、これらスキップ転移は筋肉内では静脈腔に、筋層間では主に血管周囲リンパ管腔に腫瘍塞栓を起こしたものが生着し増大したものと考えられた。

## II. ハムスター骨肉腫移植後の進展様式に関する検討

大腿骨髄腔内に腫瘍移植を行った99肢のうち、組織学的に腫瘍が生着増殖し評価可能であった78肢について以下の観察を行った。

### 1. 病理組織像の経時的観察

大腿骨骨幹部骨髄腔内に移植した腫瘍細胞は移植後14日目には骨髄腔内に生着し、骨梁間にびまん性に拡がっていた。前述のDunn骨肉腫との相違点は、本腫瘍では腫瘍性類骨の形成が強く、石灰化も散見されたことであった。又、腫瘍周辺には一部リンパ球浸潤が見られた。移植後21日目には骨幹部から骨幹部端にかけて骨髄腔内は腫瘍細胞の増殖により広範囲に置換されていた(図11)。Dunn骨肉腫と同様に骨髄腔内でのスキップ転移は1例も見られなかった。この段階で骨膜外の周囲軟部組織へスキップ転移を示したものは31例中1例も見られなかった(表1)。

移植後24日目になると腫瘍は骨髄腔内より骨膜下へと進展した。骨膜下への進展は、骨皮質を貫通しているフォルクマン管腔を経たもののみ認められており、それまで骨皮質の菲薄化は殆ど見られなかった(図12)。骨膜下で腫瘍はDunn骨肉腫と同様に骨膜を挙上するように増殖した。骨膜下に腫瘍増殖を示した12例のうち骨膜外へスキップ転移を認めたものは1例もなかった。即ち腫瘍が骨膜内にまで浸潤した43例のうち骨膜外周囲軟部組織へスキップ転移したものは1例も認めなかった(表1)。

Table 2. Site of skip metastasis in Dunn osteosarcoma

Area of tumor invasion	Case no.	Number of skip metastasis to		
		Distal area	Tumor area	Proximal area
Extension to subperiosteum	1	0*	0 (0)**	1 (0)
Extension to muscle	2	0 (0)	0 (0)	2 (1)
	3	0 (0)	3 (2)	1 (0)
	4	1 (0)	0 (0)	0 (0)
	5	0 (0)	0 (0)	1 (0)
	6	0 (0)	0 (0)	1 (0)
	7	0 (0)	0 (0)	0 (1)

\* Extrafascia.

\*\* Intrafascia.

移植後30日目以降になると腫瘍は骨膜全体を挙上するように膨張性に発育し筋層内へと浸潤していった。筋層内において Dunn 骨肉腫との違いは、ハムスター骨肉腫は腫瘍周囲を膠原線維や線維芽細胞の偽性被膜

で覆われ、その周囲に多数のリンパ球浸潤が見られ反応層を形成していた点であった。そのため腫瘍全体としては、筋肉内でびまん性に浸潤するよりも膨張性に進展していた (図13)。筋層内で腫瘍は偽性被膜を直

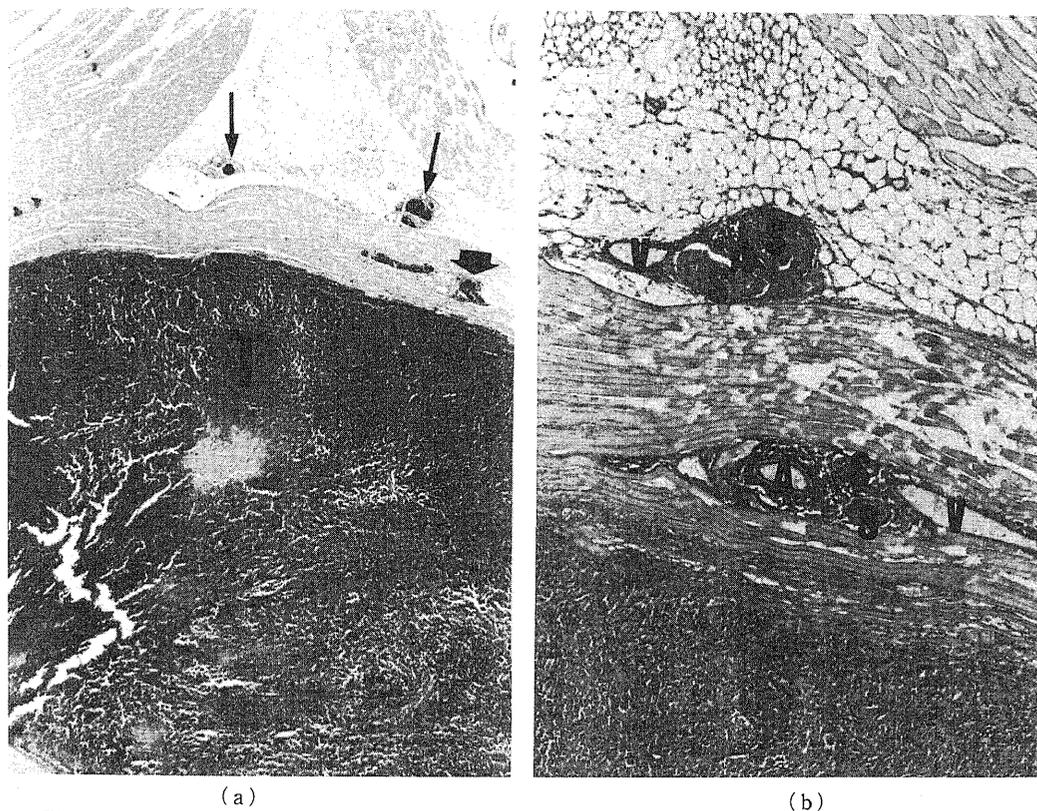


Fig.10. Dunn osteosarcoma 44 days after transplantation. (a) A low-power photomicrograph shows skip metastases seen at intra-muscular (thick arrow) and extra-fascial region (thin arrows). T; tumor.  $\times 15$  [H-E stain] (b) A high-power photomicrograph shows skip metastasis (S) in lymphatics, not in vein (V). A; artery.  $\times 100$  [Elastica van Gieson stain]

Table 3. Site of skip metastasis in hamster osteosarcoma

Area of tumor invasion	Case no.	Number of skip metastasis to		
		Distal area	Tumor area	Proximal area
Extension to muscle	1	0* (0)**	0 (1)	0 (0)
	2	0 (0)	0 (1)	0 (0)
	3	0 (0)	0 (0)	0 (1)
	4	0 (0)	0 (0)	1 (0)
	5	0 (0)	0 (1)	0 (0)

\* Extrafascia.

\*\* Intrafascia.

接浸潤し筋線維や筋束間に沿って、それと平行な方向に浸潤していた。腫瘍はすべて偽性被膜で覆われ、その偽性被膜の中に微小な腫瘍巣 (satellite) が散見された (図14)。

移植後50日目以降になると外側の筋膜近くまで腫瘍浸潤を認めるようになった。しかし、筋膜の線維性組織を越えて直接腫瘍浸潤を示したものはなかった。筋肉内まで浸潤した35例のうちスキップ転移が5例 (14%) に認められた (図15)。これらはすべて腫瘍が大腿部筋肉の横軸に対し約2/3以上にまで浸潤したものであったが、4例は同じ筋肉内に見られ、1例のみ筋膜を越えて存在していた (表3)。スキップ転移は殆どがリンパ管腔に生着しているものと考えられた。

### III. スキップ転移についての検討

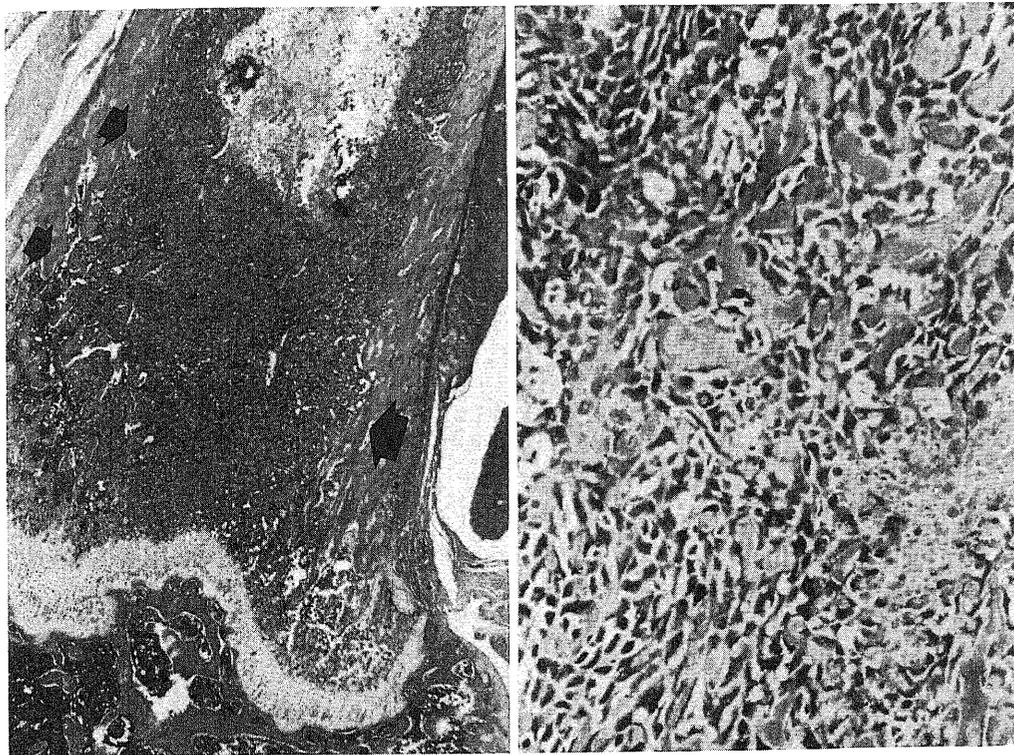
スキップ転移を示した Dunn 骨肉腫の7例、ハムスター骨肉腫の5例に関してスキップ転移と移植腫瘍との位置関係について検討した。

スキップ転移の部位は、Dunn 骨肉腫では7例のうち6例にハムスター骨肉腫では5例のうち1例に筋膜外に存在していた (表2, 3)。

スキップ転移の部位を腫瘍の位置から図16の如く3群 (近位部, 腫瘍部, 末梢部) に分けてみた。Dunn 骨肉腫では近位部8箇所 (54%), 腫瘍部5箇所 (38%), 末梢部1箇所 (8%) であり、ほとんどが腫瘍部を含めてそれより中枢側に存在した。ハムスター骨肉腫でも同様に近位部2箇所 (40%), 腫瘍部3箇所 (60%) であり、すべて腫瘍部を含めて中枢側に存在した (表2, 3)。

### 考 察

骨・軟部悪性腫瘍の治療は、制癌剤の多剤併用療法の開発により、患肢温存を目指した広範囲切除術 (limb salvage operation)<sup>8)-11)</sup> が考慮されるようになってきた。患肢温存手術を行ううえで一番問題となるのは、局所の根治性を得ると同時に最大限の機能を



(a)

(b)

Fig.11. Hamster osteosarcoma 21 days after transplantation. (a) A low-power photomicrograph shows tumor transplanted in medulla (arrows).  $\times 15$  [H-E stain] (b) A high-power photomicrograph shows sarcoma with tumor osteoid formation.  $\times 120$  [H-E stain]

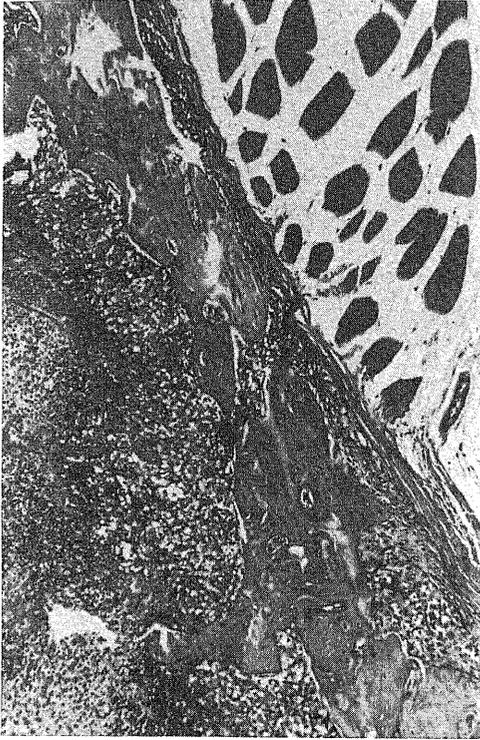


Fig.12. Hamster osteosarcoma 24 days after transplantation. The tumor cells infiltrate from the medulla to the subperiost via the Volkmann's canal.  $\times 20$  [H-E stain]

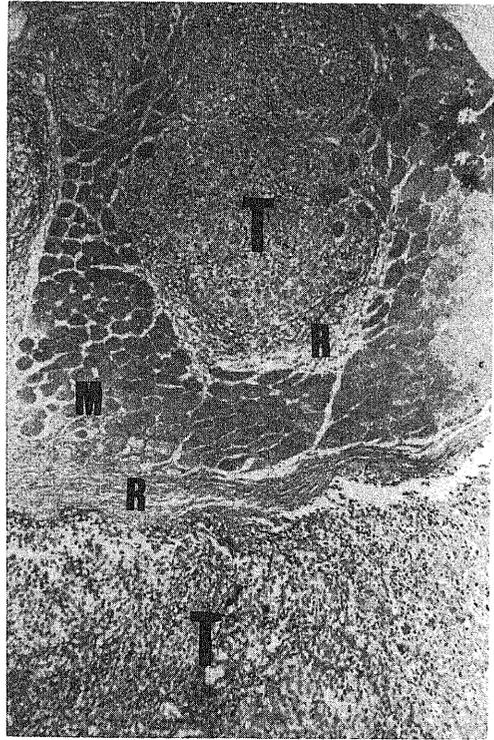


Fig.13. Hamster osteosarcoma 40 days after transplantation. A photomicrograph shows reactive zone (R) against tumor (T) within the muscle (M).  $\times 15$  [H-E stain]

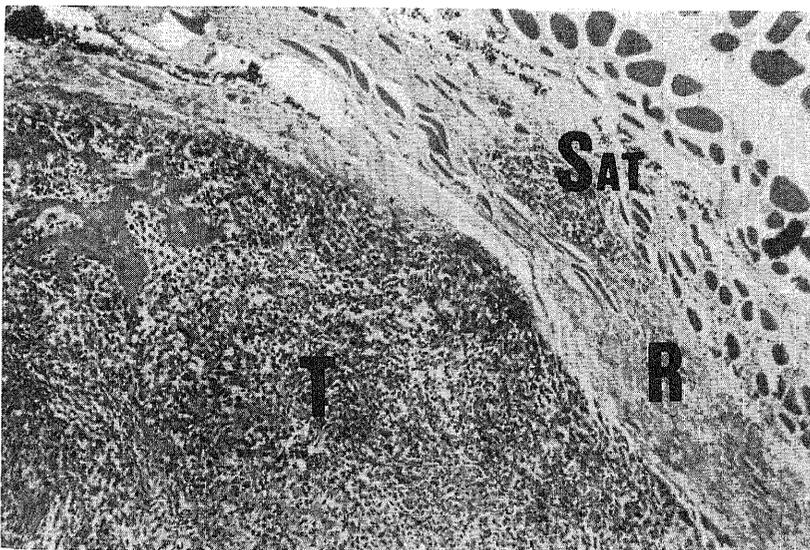
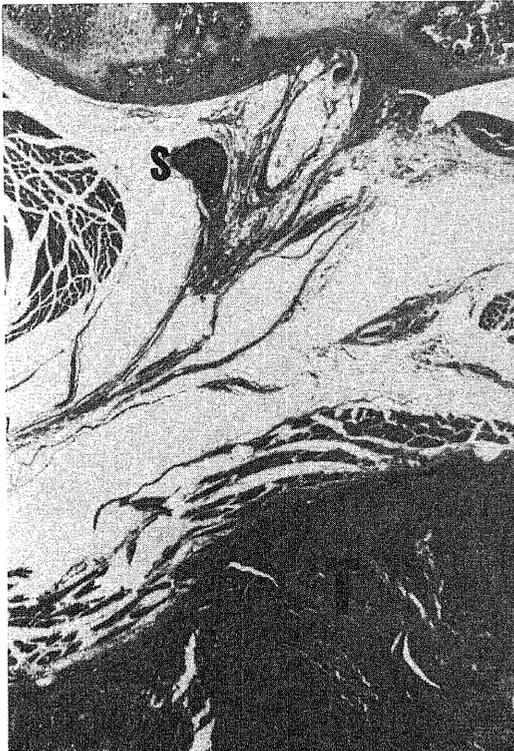


Fig.14. A photomicrograph of satellite (Sat) in reactive zone (R) against the tumor (T).  $\times 20$  [H-E stain]

残すための腫瘍の外科的切除縁の設定である。1980年 Enneking ら<sup>13)</sup>は過去の臨床例から、腫瘍周囲の生体の natural barrier を考慮したコンパートメントを想定し、それと腫瘍の悪性度とをかね合わせて至適な外科的切除レベルを設定し、これを Surgical Staging System として発表した。しかし、Surgical Staging System は腫瘍がコンパートメントのどの位置に属していてもコンパートメントを全部切除してしまうため、機能温存を目的とした患肢温存手術を行う上では犠牲になる組織が多く、実用的にはいまだ十分なものではない。このことから、川口らは解剖学的コンパートメントよりも筋膜、骨膜等の結合組織を中心とした natural barrier に重点をおいた curative wide resection なる考え方を提唱した<sup>24)25)</sup>。これは我が国においては受け入れられつつあるが、この切除術を正当化するにあたっては個々の組織の natural barrier についての評価が必要となってくる。

一方、局所再発を起こす原因として Eilber<sup>14)</sup>、荻

原<sup>26)</sup>は、再発が切除縁に生じることから手術時のコンタミネーションが主であると述べている。しかし Enneking は腫瘍の被膜を越えた daughter lesion におけるサテライトとスキップ転移 (local metastasis) が再発の原因であると述べ、サテライトやスキップ転移は腫瘍の浸潤に抵抗性を有する barrier で制限されると定義した。そこで natural barrier を評価するにあたっては、これらのサテライトやスキップ転移に対する検討が重要となってくる。Natural barrier を評価するうえで、古味<sup>17)</sup>はゼラチン加墨汁を筋肉内へ注入し、山田<sup>18)</sup>はパテントブルーV液を筋肉内へ注入し、機械的圧力に対する natural barrier の抵抗性や組織液の流れによる腫瘍細胞の migration を実験的に確認したとしている。しかし、これらは非生物学的観察であり、また Pauli ら<sup>27)</sup>が述べている腫瘍細胞浸潤の機序である 1) pressure theory 2) enzymatic theory 3) migration theory すべてを満足しているものではない。従って悪性腫瘍の浸潤様式に類似して



(a)



(b)

Fig.15. Photomicrographs of skip metastasis beyond the fascia. (a) A low-power photomicrograph. Tumor (T) and skip metastasis (S).  $\times 15$  [H-E stain] (b) A high-power photomicrograph of skip metastasis.  $\times 160$  [H-E stain]

いるとは言い難く、しかもサテライトやスキップ転移の評価もなく barrier を評価するには乏しいものである。即ち、スキップ転移を無視しての barrier の評価は意味がなく、これを実験的に証明するには悪性腫瘍を動物内に移植し、その局所進展様式を経時的に観察するとともに、腫瘍の進展度とスキップ転移との関連を検討する必要がある。このために本実験では、最もヒト骨肉腫に類似しており移植可能な2種類の実験骨肉腫を用い、骨、骨膜、大腿部筋、筋膜等のコンパートメントを破壊することなく関節節面より大腿骨髄腔内に移植し、局所増殖およびスキップ転移について経時的に観察した。

Dunn 骨肉腫は骨髄腔内に生着しても一般に言われているような類骨の形成はみられず、低分化な骨肉腫の形態を示した。腫瘍周辺には被膜形成や間葉性反応は認められず、腫瘍の増殖や浸潤の早さをものごとっていると考えられた。

それに対しハムスター骨肉腫は、腫瘍性類骨の形成が豊富であり、一部に石灰化も見られ分化型骨肉腫の形態を示した。Dunn 骨肉腫と比べて腫瘍の増殖及び浸潤が遅く、筋層まで浸潤した腫瘍周囲には線維性偽性被膜がみられ、リンパ球浸潤も豊富に見られた。こ

れらは宿主側の局所生体反応であり、局所浸潤における悪性度はハムスター骨肉腫がDunn 骨肉腫より低いものと考えられた。

骨髄腔から骨膜下への進展については、Dunn 骨肉腫、ハムスター骨肉腫ともに腫瘍は骨髄腔全体に浸潤し、フォルクマン管腔を経て骨髄腔内より骨膜下へと進展を示した。又この時点までは骨皮質の菲薄化は殆どみられなかった。このことから骨膜下への進展形式は、腫瘍細胞が骨髄腔内から直接骨皮質を破壊していくのではなく、機械的な圧力に対し抵抗力が弱いフォルクマン管腔とそこを通る血管との間隙を直接浸潤するものと考えられた。軟レ線像では骨皮質の中断が28日目頃にみられ、この時点で腫瘍の骨外への浸潤を疑ったが、以上の組織学的所見により、骨皮質の破壊のおこらない早期に既に腫瘍は骨膜下へ浸潤していることが判った。その後フォルクマン管腔から骨皮質を浸潤、破壊していくものと推察された。これらより骨皮質は腫瘍の進展に対して barrier としての役割はないと思われた。

骨膜下層から筋層への進展様式については1) 骨膜を貫通している血管周囲腔を介して筋層へ進展するものと、2) 骨膜を直接浸潤して筋層内へ進展するもの

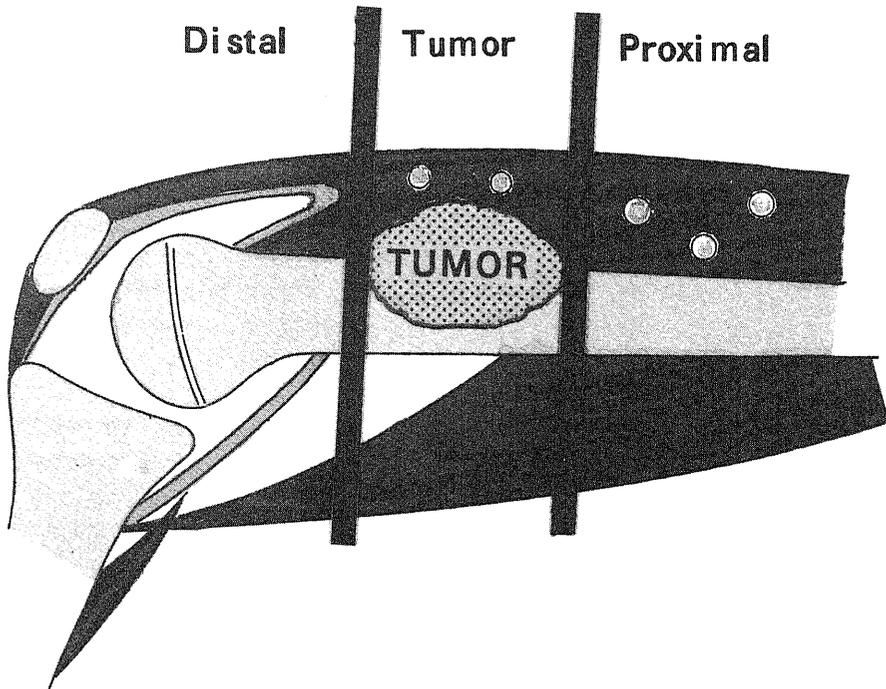


Fig.16. Site of skip metastasis.

がみられた。前者は骨膜を貫通する血管周囲腔が腫瘍の増大による機械的圧力に脆弱なためと思われ、Pauli ら<sup>29)</sup>の腫瘍の浸潤メカニズムのうちの pressure and migration theory の要素が強く関与していると推察された。それに対し骨膜への直接浸潤は enzymatic and migration theory の要素が強く関与していると思われた。

骨膜とスキップ転移との関係については、Dunn 骨肉腫では腫瘍が骨髓腔内に局限している時の骨膜外組織へのスキップ転移は29例中1例もなく、骨膜下層まで浸潤したものは27例中1例(3.7%)に認められ、両者を合わせて骨膜内に局限している時の骨膜外へのスキップ転移は1.8%であった。同様にハムスター骨肉腫では、腫瘍が骨髓腔および骨膜下層内に局限している時の骨膜外へのスキップ転移は1例も認めなかった。このことから腫瘍が骨膜内に局限している時には骨膜はスキップ転移に対して非常に有効であり、又骨膜は腫瘍の直接浸潤にも抵抗するので、natural barrier としては最も有効なものと判断された。

筋肉内では腫瘍の増大により圧迫された筋線維が萎縮変性し緻密な層状構造となるので、腫瘍の横軸方向への直接浸潤に対して筋線維束は抵抗性を示した。これは腫瘍の pressure and migration による浸潤に抵抗するものであり、筋膜と同様に minor barrier 的な役割を果たしていた。しかし、腫瘍は縦軸方向には筋線維間や筋束間の走行に沿って容易に直接浸潤し、筋線維束は barrier とは認められなかった。

腫瘍が外側の筋膜近くまで進展しても筋膜の線維組織により腫瘍は隔離されており、筋膜を越えて発育浸潤している像はみられず、腫瘍の直接浸潤を抑制する natural barrier として十分有効と判断された。しかしスキップ転移に関しては、Dunn 骨肉腫では腫瘍が筋肉内にまで達した46例中6例(13%)にみられ、そのうち筋膜を越えて周囲筋群へスキップ転移したものが5例(11%)にみられた。これら5例は腫瘍が大腿部筋肉の横軸の2/3以上に増大したものであった。ハムスター骨肉腫では、35例のうち5例(14%)にスキップ転移がみられ、これらはすべて大腿部筋肉の横軸2/3以上に腫瘍が増大したものであった。しかし、Dunn 骨肉腫と比べてハムスター骨肉腫では、スキップ転移が筋膜外に見られた例は5例のうち1例(3%)のみであり、他はすべて腫瘍が浸潤した筋肉内にとどまっていた。これは宿主側の局所生体反応がみられたハムスター骨肉腫の局所浸潤の悪性度の低いことが影響しているためと推察された。

スキップ転移は筋肉内では静脈腔に生着していた

が、筋層間においては主にリンパ管腔に生着していた。これは Caceres ら<sup>28)</sup>のいうヒトの骨肉腫でも領域リンパ節までの転移が11%にみられると述べているのを裏付けるものであり、これが局所再発における問題点の一つではないかと思われた。

血管系の浸潤の有無は患肢温存をおこなう上で最も重要な因子となるのであり、四肢の主栄養動脈が腫瘍浸潤されていけば切・離断を余儀なくされる場合がほとんどである。Dunn 骨肉腫では動脈外膜は腫瘍の直接浸潤に対し非常に強く抵抗性を示し natural barrier として十分に有効と推察された。しかし、静脈は外膜・中膜まで容易に浸潤し、一部内膜にまで浸潤しており、natural barrier とはなっていない。

腫瘍切除における横軸の至適切除レベルについて考察すると、骨膜は natural barrier として最も有効なものであるために、腫瘍が骨膜内に局限している場合、即ちレ線像で Codman 三角や骨膜反応はみとめるが、CT-スキャン、MR-CT 等画像診断で骨外病変が見当たらない場合は、骨膜を含め周囲筋組織を一部含めて en bloc resection すれば局所再発はおこらないものと推察された。

腫瘍が筋肉内にまで浸潤している場合は、腫瘍が大腿部筋肉の横軸2/3以下であれば、筋膜は直接浸潤やスキップ転移に対し barrier として十分に有効であり、筋膜とともに周囲筋群を一部含めて en bloc resection することで局所コントロールは十分可能であろうと推察された。このことは Enneking らの解剖学的コンパートメントを全切除する radical wide resection を必ずしも必要とせず、川口らの curative wide resection でも十分に根治手術が可能であることを裏付けるものである。しかし、腫瘍が外側の筋膜近くまで増大したもののうち、生検材料から判断して腫瘍に対する局所の防御反応が少ないものは、局所浸潤に対する悪性度が高く、筋膜を越えたスキップ転移の存在が予想される。これらには curative wide resection では再発を起こすことも十分に考えられ、radical wide resection や切・離断術も必要かと思われた。一方、生検材料で局所浸潤の悪性度が低いものであれば筋膜は十分に natural barrier として有効と思われ、curative wide resection で根治手術が十分に可能であると判断された。

腫瘍切除における縦軸の至適切除レベルについて、Enneking は radical wide resection として筋の起始から停止までの全切除を挙げている<sup>12-10)</sup>が、これに対しての異論は多く、本邦では腫瘍の辺縁より近位端、遠位端ともに約5cmをつけて切除しているものが多

い<sup>20,30)</sup>。本実験では局所再発の原因となるスキップ転移が、ほとんど腫瘍部を含めてそれより中枢側(92%以上)に見られた。このことからスキップ転移は、腫瘍細胞が脈管(リンパ管や静脈)内に侵入し、そこからリンパ液や血液の流れに沿って中枢へと流れその一部が脈管壁に生着し増殖するものと考えられた。以上より縦軸方向の腫瘍切除に関しては、末梢側と中枢側を同様に扱うよりも、中枢側の切除部位をより高くすべきであると思われた。

### 結 論

骨・軟部悪性腫瘍において患肢温存手術をするための至適外科的切除縁を決定するうえで、生体内の個々の natural barrier の評価は重要である。著者は natural barrier を評価するために、Dunn 骨肉腫およびハムスター骨肉腫を用いて腫瘍をそれぞれマウス、ハムスターの大腿骨髄腔に移植し、経時的に腫瘍の進展を病理組織学的に観察し、natural barrier について直接浸潤のみならずスキップ転移の面からも検討し以下の結論を得た。

1. 骨皮質は、破壊される以前に骨髄腔の腫瘍がフォルクマン管腔を通過し容易に骨膜下に浸潤するので、barrier としての役割がみられなかった。

2. 骨膜は、腫瘍の直接浸潤のみならず、スキップ転移に対しても、非常に有効な barrier であることが判明した。

3. 外側の筋膜は腫瘍の大きさにより barrier としての効果が異なり、腫瘍が大腿部筋の横軸で2/3以下であれば非常に有効な barrier となるが、2/3以上に増大した場合でかつ局所浸潤に対して生体反応の弱いものは、スキップ転移が筋膜外組織にみられる(11%)ことより barrier としての価値は減少する。

4. 筋膜を越えたスキップ転移はそのほとんどが静脈ではなくリンパ管内に生着したものであり、これが局所再発における問題点の一つではないかと思われた。

5. 至適外科的切除縁は、以上の barrier と画像診断で確かめた腫瘍の拡がりとの関係より決定されるべきである。

6. 縦軸方向での切除部位は、スキップ転移がほとんど原発腫瘍部位より中枢側に存在していたので、末梢側よりも中枢側をより高位とすべきである。

### 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師野村進教授に深甚なる謝意を表します。また、御校閲を賜りま

した金沢大学医学部臨床検査医学教室松原藤継教授に厚く御礼申し上げます。また、終始、御指導、御教示を頂きました富田勝郎助教授に心から感謝いたします。

併せて本研究遂行に際し御協力をいただいた整形外科腫瘍班の先生方並びに教室員の各位、検査部病理寺畑信太郎博士に感謝いたします。

なお、本論文の要旨は第68回中部日本整形外科災害外科学会において発表した。

### 文 献

- 1) Jaffe, N.: Recent advances in the chemotherapy of metastatic osteogenic sarcoma. *Cancer*, **30**, 1627-1631 (1972).
- 2) Jaffe, N., Frei, E., Traggis, D. & Bishop, Y.: Adjuvant chemotherapy and citovorun-factor-treatment of osteosarcoma. *N. Eng. J. Med.*, **291**, 994-997 (1974).
- 3) Sutow, W. W., Miale, T., Gehan, E. A., Dymont, P. G. & Vietti, T.: Multidrug adjuvant chemotherapy for osteosarcoma; interim report of the Southwest Oncology Group Studies. *Cancer Treat. Rep.*, **62**, 265-269 (1978).
- 4) Ettinger, L. J., Douglass H. O. jr., Higby, D. J., Mindell, E. R., Nime, F., Ghoorah, J. & Freeman, A. I.: Adjuvant Adriamycin and Cis-Diaminedichloroplatinum (Cis-Platinum) in primary osteosarcoma. *Cancer*, **47**, 248-254 (1981).
- 5) Rosen, G., Caparros, B., Huvos, A. G., Kosloff, C., Nirenberg, A., Cacavio, A., Marcove, R. C., Lane, J. M., Mehta, B. & Urvan, C.: Preoperative chemotherapy for osteogenic sarcoma; selection of postoperative adjuvant chemotherapy based on the response of the primary tumor to preoperative chemotherapy. *Cancer*, **49**, 1221-1230 (1982).
- 6) Rosen, G.: Preoperative (neoadjuvant) chemotherapy for osteogenic sarcoma; a ten year experience. *Orthopedics*, **8**, 659-664 (1985).
- 7) 福間久俊, 別府保男, 芝啓一郎, 増田祥男: インターフェロンの悪性腫瘍に対する臨床応用. 災災害, **25**, 13-21 (1982).
- 8) Mankin, H. J., Fogelson, F. S., Thrasher, A. Z. & Jaffer, F.: Massive resection and allograft transplantation in the treatment of malignant bone tumors. *New Engl. J. Med.*, **294**, 1247-1255 (1976).
- 9) Enneking, W. F. & Shirely, P. D.: Resecti-

on-arthrodesis for malignant and potentially malignant lesions about the knee using an intramedullary rod and local bone grafts. *J. Bone Joint Surg.*, **59-A**, 223-236 (1977).

- 10) **Jaffe, N., Watts, H., Fellows, K. E. & Vawter, G.**: Local En Block Resection for Limb Preservation. *Cancer Treat. Rep.*, **62**, 217-223 (1978).
- 11) **Eilber, F. R., Mirra, J. J., Grant, T. T., Weisenburger, M. D. & Morton, D. L.**: Is amputation Necessary for Sarcoma? *Ann. Surg.*, **192**, 431-438 (1980).
- 12) **Enneking, W. F., Spanier, S. S. & Goodman, M. A.**: A system for the Surgical Staging of Musculoskeletal Sarcoma. *Clin. Orthop.*, **153**, 106-120 (1980).
- 13) **Enneking, W. F., Spanier, S. S. & Goodman, M. A.**: Current Concepts Review, The Surgical Staging of Musculoskeletal Sarcoma. *J. Bone Joint Surg.*, **62-A**, 1027-1030 (1980).
- 14) **Enneking, W. F.**: *Musculoskeletal Tumor Surgery*. 1st ed., p3-122, Churchill Livingstone, New York, 1983.
- 15) **浜田良機**: 骨・軟部悪性腫瘍の手術療法, -Surgical Staging System (Enneking) について. *整形外科*, **34**, 871-883 (1983).
- 16) **Enneking, W. F.**: A System of Staging Musculoskeletal Neoplasms. *Clin. Orthop.*, **204**, 9-24 (1986).
- 17) **古味 潔**: 骨・軟部悪性腫瘍の局所進展に関する臨床病理学的研究. *愛媛医学*, **4**, 34-58 (1985).
- 18) **山田忠尚**: 四肢に原発する軟部悪性腫瘍に対する外科的療法について臨床的検討ならびに実験的研究. *中部整災誌*, **19**, 285-299 (1976).
- 19) **Enneking, W. F. & Kagan, A.**: "Skip" Metastasis in Osteosarcoma. *Cancer*, **36**, 2192-2205 (1975).
- 20) **Dunn, T. B. & Andervont, H. B.**: Histology

of some neoplasms and non-neoplastic lesions in wild mice maintained under laboratory conditions. *J. Natl. Cancer Inst.*, **31**, 873-901 (1963).

- 21) **Uchida, S., Watanabe, S., Aizawa, T., Furuno, A. & Muto, T.**: Polyoncogenecity and insulinoma-inducing ability of BK virus, a human papovavirus, in syrian golden hamsters. *JNCI*, **63**, 119-126 (1979).
- 22) **福島 博, 横山 巖, 赤松功也, 関口守正**: 腫瘍切除によるハムスター骨肉腫のアルカリホスファターゼ値の変動. *医学のあゆみ*, **134**, 347-348 (1985).
- 23) **福島 博, 赤松功也**: ヒト骨肉腫の実験モデルとしてのベリリウム骨肉腫とハムスター骨肉腫について. *山梨医大誌*, **3**, 39-46 (1988).
- 24) **川口智義, 和田成仁, 真鍋 淳, 磯辺 靖, 古屋光太郎, 網野勝久, 松本誠一**: 悪性軟部腫瘍の根治的広切法についての検討. *臨整外*, **17**, 1192-1206 (1982).
- 25) **川口智義, 網野勝久, 磯辺 靖, 松本誠一, 古屋光太郎, 和田成仁**: 予後因子からみた骨肉腫診療システムへの考察. *整災害*, **26**, 831-846 (1983).
- 26) **荻原義郎**: 悪性骨腫瘍に対する広範切除術と機能再建術について - 特に extracompartmental surgery の意義. *臨整外*, **16**, 791-799 (1981).
- 27) **Pauli, B. U., Schwarg, D. E., Thonar, E. M. & Kuettner, K. E.**: Tumor Invasion and Host Extracellular Matrix. *Cancer Meta. Rev.*, **2**, 129-152 (1983).
- 28) **Caceres, E., Zaharia, M. & Tantealan, E.**: Lymph node metastases in osteogenic sarcoma. *Surgery*, **65**, 421-422 (1969).
- 29) **大野藤吾**: 四肢の骨肉腫に対する患肢温存治療. *整災害*, **25**, 23-27 (1982).
- 30) **武内章二, 赤星義彦, 兼松秋生, 長沢博正**: 骨肉腫手術療法 - 患肢温存を含む. *整形外科 MOOK*, **26**, 126-136 (1983).

**A Histopathological Study on the Local Extension of Experimental Osteosarcoma to Determine the Most Suitable Surgical Margin** Yasuhiro Nanri, Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 97, 1003-1019 (1988)

**Key words:** experimental osteosarcoma, natural barrier, skip metastasis, surgical margin, local extension.

#### Abstract

Limb salvage surgery has recently been performed to treat malignant musculoskeletal tumors in some cases. The most difficult problem is to determine the most suitable surgical margin so as to preserve maximum function and treat the lesion radically. Enneking's Surgical Staging System, based on the assumption that there are some natural barriers to tumor spread, allows the surgeon to decide the surgical margin. However no experiments have been conducted to confirm the validity of this method. In the present study I conducted a histopathological study on the local extension of the tumor, natural barrier and skip metastasis. I transplanted Dunn osteosarcoma and hamster osteosarcoma into the femoral medulla of C3H/He mice and Golden hamsters, respectively. Subsequently, follow-up radiography was conducted and the growth of the tumor was histopathologically observed. The tumor was found to have infiltrated from the medulla to the subperiosteum, via Volkmann's canals. Cortex destruction was only recognized at this stage. Thus, the extension of the tumor from the medulla to the subperiosteum was considered to have occurred by infiltration, firstly through Volkmann's canals, which have low resistance to mechanical pressure, and then by destruction of the cortex. Invasion from the subperiosteum to the muscle was thought to have occurred by two routes: firstly along the blood vessels, which penetrate the periosteum, and secondly by direct invasion of the periosteum. When the tumor was localized in the subperiosteum, skip metastasis was recognized in 1.8% of cases with Dunn osteosarcoma and 0% with hamster osteosarcoma. The periosteum demonstrated resistance to direct invasion by the tumor and was shown to be the most effective natural barrier. The fascia was also recognized to offer resistance to the direct infiltration of the tumor. Skip metastasis, however, was recognized in 13% of subjects with Dunn osteosarcoma and 14% with hamster osteosarcoma. Furthermore, skip metastasis had progressed beyond the fascia in 11% of subjects with Dunn osteosarcoma and 3% with hamster osteosarcoma. In these cases the tumor was seen to extend along more than 2/3 of the horizontal axis of the femoral muscle, indicating that the fascia was not an effective barrier. Skip metastasis was mainly found at the sites of the lymphatics. Skip metastasis is more likely to occur in regions proximal to the tumor than in distal regions. Based on the present understanding of the natural barrier and skip metastasis, it is suggested that the regions proximal to the tumor should be resected more thoroughly than distal regions.