

Specific Detection of Metastasized Human Tumor Cells in Nude Mice by the Polymerase Chain Reaction

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	http://hdl.handle.net/2297/8292

特異的 DNA 増幅反応法を用いたヌードマウスにおける ヒト転移腫瘍細胞の定量的検出

金沢大学がん研究所化学療法部 (主任: 佐々木琢磨教授)

太田 安彦

(平成3年12月27日受付)

ヌードマウスを用いた転移実験系をヒト腫瘍の転移巣に対する治療実験モデルとして応用するためには、定量性と迅速性を兼ね備えた転移腫瘍の検出法を確立する必要がある。本研究では、転移ヒト腫瘍細胞の特異的且つ定量的な検出方法として、転移腫瘍に含まれるヒトに特異的な β -グロビン遺伝子配列を特異的 DNA 増幅反応 (polymerase chain reaction, PCR) 法により増幅した後、サザンブロット法にて検出および解析する方法を検討した。実験的転移系では、ヒト線維肉腫 HT-1080 細胞 (5×10^6 個) をヌードマウス (ICR nu/nu) の尾静脈内に移植し、自然転移系ではマウスの右鼠径部皮下に移植した。移植後、経時的に肺およびリンパ節を摘出し、抽出した DNA (1 μ g) を鋳型として β -グロビン遺伝子に対する特異的プライマーを用いて PCR 法による増幅反応を行い、サザンブロット法により増幅 DNA 断片の検出・解析を行った。その結果、実験的転移系では1週目よりヒト β -グロビン遺伝子の増幅断片 (576塩基対) が検出され、肺転移を確実にとらえることができた。さらに、臓器あたりの転移腫瘍細胞数は経時的に増加することが明らかとなった。自然転移系では5週目より肺、リンパ節転移を検出できた。ヌードマウスによる転移実験系に PCR 法を応用した転移腫瘍検出法を適用することにより、肉眼的観察では検出不可能な微小転移レベルでの転移の定量的検出が可能となった。本転移腫瘍検出法を用い、肺転移巣に対する抗癌剤の効果判定試験を施行した。HT-1080 細胞を尾静脈内に移植後1週目に cisplatin (CDDP) 2mg/kg または adriamycin (ADM) 8mg/kg を投与し、投与後1, 3週目に肺を摘出し DNA を抽出した。PCR 法による β -グロビン遺伝子の増幅とそれに引き続くサザンブロット法による増幅 DNA 断片の検出・解析を行った結果、抗癌剤投与後1週目において、ADM と CDDP の腫瘍増殖阻止率はそれぞれ38.9%, -60.1%であり、HT-1080 の肺転移巣は ADM に感受性が高く、CDDP に感受性が低いことが明らかとなった。PCR 法を応用した転移腫瘍検出法を適用することにより、ヌードマウス法がヒト腫瘍の転移巣に対する治療実験モデルとして応用可能であることが示された。以上の結果から、本法はヒト癌の転移、浸潤の機構解明および癌転移巣に対する治療法の開発に有用な実験手段となるものと考えられる。

Key words metastasis, nude mouse, human fibrosarcoma HT-1080, polymerase chain reaction

癌治療の成否は癌転移および再発をいかに防ぐかにかかっている。転移の完全抑制こそ、癌治療の最大の課題といえる。転移には癌細胞の全身散布がその背景としてあるので、転移癌の治療は理論的には化学療法が最も有効な治療法となり得る。しかし、転移研究は転移現象の解明が大部分であり、転移癌の化学療法に関する基礎研究は極めて少ない。この原因の一つは、良い転移治療モデルが無いことに起因する。従来、臨床検体のみならず培養細胞系として樹立されたヒト腫瘍株において、ヌードマウスに恒常的に自然転移を生じさせることは難しいとされてきた。最近、可移植性腫瘍株の選択や腫瘍移植経路及び移植方法等の工夫により、ヌードマウスにおいてもヒト腫瘍が再現性をもって転移し、転移モデルとしての応用の可能性を示す報告がなされている^{1)~10)}。転移実験モデルとして1) 確実にまた恒常性をもって転移が形成されること、2) 簡便なモデル系であることが重要であるが、治療実験系として応用する場合には加えて3) 定量性、4) 迅速性が要求される。しかし従来

の転移の検出は、病理組織学的手法および臓器の表面に形成された転移結節数を算定するという肉眼形態学的観察に基づいた定量性に乏しいものであった。その為、肉眼上あきらかに転移結節が認められるまでの時間的制約をうけ、迅速性にも問題があり、より実用的で簡便なヒト癌に対する転移実験系の開発が望まれていた。本研究では、ヌードマウスにヒト線維肉腫 HT-1080 細胞を移植後、特異的 DNA 増幅反応 (polymerase chain reaction, PCR) 法を用いて転移腫瘍細胞のヒト β -グロビン遺伝子 (576塩基対) に対する特異的増幅反応を施行する方法により、従来の肉眼形態学的観察では検出不可能な微小転移レベルでの転移ヒト腫瘍細胞の迅速且つ定量的な検出を試みた。

対象および方法

1. 移植腫瘍細胞と培養

ヒト線維肉腫培養株 HT-1080 は、10% (v/v) 非働化ウシ胎児

Abbreviations: ADM, adriamycin; bp, base pair; CDDP, cisplatin; CPA, cyclophosphamide; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; H. E., hematoxylin and eosin; i. p., intraperitoneal; i. v., intravenously; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NK, natural killer; PCR, polymerase chain

血清 (GIBCO 社, Grand Island, USA) とグルタミンを含んだイーグル MEM 培地 (日本製薬社, 大阪) 中において CO₂ 濃度 5%, 37°C で培養した。トリブシン-エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) 緩衝液を用いて細胞を剥離した後, 生理的食塩水を用いて細胞浮遊液を作製し, 27G の注射針を用いて 5×10^6 個 (0.1ml) を移植した。移植に用いた腫瘍細胞浮遊液は, トリパンプルー色素排除試験法により, 90%以上の生細胞があることを確認した。

II. 実験動物

ヌードマウスは5週齢, 雌の ICR (nu/nu) 系 (日本チャールズリバー社, 厚木) を用いた。マウスは無病原体飼育条件下 (specific pathogen free, SPF) で滅菌飼料および滅菌水道水が自由に摂取できるようにして飼育し実験に用いた。

III. 転移の作製

実験的転移系としてヌードマウスの尾静脈内に HT-1080 細胞を 5×10^6 個移植し, 移植後 1, 2, 3, 4 週目に肺を摘出し DNA を抽出した。別途に摘出した肺の一部を10%ホルマリンにて固定後, ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin and eosin, H. E.) 染色を施した標本を作製し, 肺転移の有無を病理組織学的に追求した。また, 自然転移系として HT-1080 細胞をヌードマウスの右鼠径部皮下に 5×10^6 個移植し, 1~6 週目まで各週毎に肺およびリンパ節を摘出し DNA を抽出した。

IV. Cyclophosphamide (CPA) による前処理

ヌードマウスの免疫担当細胞としてのナチュラルキラー (natural killer, NK) 細胞の抑制を目的として, 腫瘍細胞移植4日前に CPA 200mg/kg を腹腔内 (intraperitoneal, i. p.) 投与したヌードマウスを用いて同様の実験を試みた。即ち, 5×10^6 個の HT-1080 細胞をマウスの尾静脈内または鼠径部皮下に移植し, 実験的転移系では腫瘍細胞移植後 1, 2 週目における転移増殖を CPA 未処置群と比較した。また, 自然転移系では腫瘍細胞移植後 3, 5, 7 週目における転移細胞の増殖を CPA 未処置群と比較検討した。

V. 実験的転移系を用いた肺転移巣に対する治療実験

ヌードマウス尾静脈内に HT-1080 細胞を移植後, 1 週目に cisplatin (CDDP) 2mg/kg または adriamycin (ADM) 8mg/kg を 27G 注射針を用いて尾静脈内投与した。抗癌剤投与後 1 および 3 週目に肺を摘出し, DNA を抽出した。

VI. DNA の抽出方法

摘出した肺およびリンパ節は 4 ml のホモジナイズ緩衝液 (0.1M 塩化ナトリウム, 0.2M ショ糖, 0.01M EDTA, 0.3 M トリスヒドロキシメチルアミノメタン-塩酸 pH 8.0) 中でホモジナイズした。ホモジネートはファルコン 2059 チューブに入れ, 250 μ l の 10%ドデシル硫酸ナトリウム (dodecyl-sodium-sulfate, SDS) を加え攪拌し, 65°C の温浴中にて30分間加温した。さらに, 600 μ l の 8 M 酢酸ナトリウムを加え攪拌後, 60分間水中に静置した。氷冷後, 4°C, 11,000rpm において20分間遠心し, 水層を新たなチューブに回収した。クロロホルム 4 ml を加え攪拌後, 3,000rpm において10分間遠心し, DNA を抽出した。水層を分取し, クロロホルム 4 ml, トリス EDTA (TE) 緩衝液 [10mM トリス-塩酸 pH 7.4, 0.1mM EDTA, pH 8.0] 飽和フェノール 4 ml を加え攪拌後, 3,000rpm におい

て15分間遠心し DNA を抽出した。再度, クロロホルム 4 ml において抽出を行った後, 分取した水層に 8 ml のエタノールを加え, 3,000rpm において15分間遠心し DNA を沈澱として得た。沈澱は 5 ml の 80%エタノールで洗い, 減圧乾燥させた後に 2 ml の TE 緩衝液に溶解した。DNA 溶液にリボスクレアゼ A (Sigma 社, St. Louis, USA) 100 μ g を加え, 37°C, 30分間反応させた後, 3 M 酢酸ナトリウム 200 μ l を加え, TE 緩衝液飽和フェノール-クロロホルム (1:1) 2ml にて 1 回 (3,000 rpm, 15分), クロロホルム 2 ml にて 1 回 (3,000rpm, 10分) 抽出を行った。分取した水層に 5 ml のエタノールを加え 3,000 rpm にて15分間遠心しエタノール沈澱を行った。DNA は, 80%エタノール 2 ml で洗浄し, 減圧乾燥させた後, TE 緩衝液に溶解した。

VII. 鋳型 DNA の調製

TE 緩衝液中に溶解した DNA は, 260nm における吸光度を測定して DNA 濃度を求めた後 (1 O. D.=50 μ g/ml), 同緩衝液を用いて 100 μ g/ml に調製した。さらに, 100 μ g/ml の HT-1080 細胞の DNA を 100 μ g/ml の正常ヌードマウスの肺 DNA により希釈し, HT-1080 細胞の DNA 濃度が 10^2 , 10^1 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} μ g/ml の段階希釈溶液を調製した。

VIII. プライマーおよびプローブ用オリゴヌクレオチドの作製

PCR 法による特異的遺伝子配列の増幅に用いるプライマーおよび PCR 増幅 β -グロビン遺伝子配列を検出するプローブとして, ヒト β -グロビン遺伝子配列¹⁶⁾より Hu β -1~11 までの20塩基からなる11種類のオリゴヌクレオチドを合成した (図 1)。なお, これらのオリゴヌクレオチドは DNA 合成装置 PCR メイト (Applied Biosystem 社, CA, USA) により合成した。

IX. PCR 反応

調製した鋳型 DNA 1 μ g に対し PCR 反応緩衝液 (10mM トリス-塩酸 pH 8.3, 50mM 塩化カリウム, 1.5mM 塩化マグネシウム), デオキシリボヌクレオチド混合液 [deoxyadenosine 5'-Triphosphate (dATP), deoxyguanosine 5'-Triphosphate (dGTP), deoxycytidine 5'-Triphosphate (dCTP), deoxythymidine 5'-Triphosphate (dTTP) 各 200 μ M], *Thermus aquaticus* (Taq) DNA ポリメラーゼ (Perkin-Elmer Cetus 社, Norwalk, CT, USA) 2.5単位, (+) 鎖および (-) 鎖プライマー各 1 μ M を加え, 滅菌蒸留水により全量 100 μ l に調整した。加熱による反応液の蒸発を防ぐため, 100 μ l のミネラルオイル (Sigma 社) を重層した。反応には DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus) を使用し, 熱変性を 94°C, 2分間, アニーリングを 55°C, 2分間, DNA の伸長を 72°C, 2分間とし, これを 1 サイクルとして 25 サイクル繰り返した。反応終了後, 上層のミネラルオイルを除去し, クロロホルム 100 μ l を加え振とうし, 上層に増幅後の DNA 溶液を得た。

X. 増幅された DNA の検出

増幅後の DNA 溶液に 10 μ l の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) および 300 μ l のエタノールを加え, 15,000rpm にて20分間遠心し DNA を沈澱させた。DNA は, 80%エタノール 300 μ l にて洗浄した後, 減圧乾燥し, 0.06%ブROMフェノールブルー, 0.06%キシレンアルコールおよび6.7%グリセロールを含



Fig. 1. Sequences of synthetic oligonucleotide primers and probe for PCR amplification and their locations in the human β -globin gene. (A) Sequences of oligonucleotide primers. The primer Hu β -1, 2, 3, 6, 7, 9 and 10 are complementary to the (+)-strand and Hu β -4, 5, 8 and 11 are complementary to the (-)-strand. Hu β -2 was used as the probe to detect the amplified DNA fragment in this study. (B) Locations of the oligonucleotides in the human β -globin gene.

む TE 緩衝液 9 μ l に溶解した。各試料は 0.5 μ g/ml エチジウムブロマイドを含んだ泳動緩衝液 (4mM トリス, 2 mM 酢酸ナトリウム, 0.1mM EDTA, pH 7.2) を用い, 定電圧 100V において 1.5% アガロースゲル電気泳動を行った。泳動後サザン法¹⁷⁾に準じてトランスファーを行った。即ち, 泳動終了後のゲルをアルカリ変性液 (0.5M 水酸化ナトリウム, 1.5M 塩化ナトリウム) に浸し 30 分間室温にてゆっくり振とうし DNA を変性させた後, 中和液 (3M 塩化ナトリウム, 0.5M トリス-塩酸, pH 7.2) に浸し 15 分間室温にてゆっくり振とうした。中和操作を 2 回繰り返した後, DNA はナイロンメンブレンフィルター Hybond-N (Amersham 社, Greenwich, CT, USA) に 20 \times SSC (3M 塩化ナトリウム, 0.3M クエン酸ナトリウム) を用いてトランスファーした。ナイロンメンブレンフィルターは 10 分間紫外線照射を行い, DNA をフィルターに固定した。フィルターはハイブリダイズ緩衝液 [6 \times saline sodium citrate (SSC) (0.9M 塩化ナトリウム, 0.09M クエン酸ナトリウム), Denhardt's 液¹⁸⁾ (0.1% ポリビニルピロリドン, 0.1% ウシ血清アルブミン, 0.1% フィコール 400), 10% 硫酸デキストラン, 0.1% SDS および 0.1mg/ml サケ精子 DNA] 中 43 $^{\circ}$ C の恒温水層において 1 時間のプリハイブリダイゼーションを行った。PCR 増幅 β -グロビン配列を検出するプローブとして Hu β -2 を使用した。プローブ DNA 13 pmol に対し [γ ³²P] ATP 50 μ Ci (Amersham 社), ポリヌクレオチドキナーゼ緩衝液 (50mM トリス-塩酸 pH 7.6, 10mM 塩化マグネシウム, 5mM ジチオトレイトール, 0.1mM スペルミジンおよび 0.1

mM EDTA pH 8.0), 10 単位 T4 キナーゼ (宝酒造社, 京都) および滅菌蒸留水を加え全量 20 μ l とし 37 $^{\circ}$ C において 45 分間反応させて放射標識を行った。その後, 0.1% (v/v) ³²P 標識プローブを加え, 43 $^{\circ}$ C において 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイズさせたフィルターは 2 \times SSC および 0.1% SDS を含む溶液中で 45 $^{\circ}$ C, 15 分間の洗浄を 2 回行い, 引き続き 0.1 \times SSC および 0.1% SDS を含む溶液中で 45 $^{\circ}$ C, 1 時間の洗浄を行った。洗浄後, X線フィルム (Kodak 社, New York) を用いて室温下 12~18 時間の感光を行ったオートラジオグラフィで解析を行い, さらにバイオイメージアナライザー (富士フィルム社, 東京) により放射活性の測定を行った。臓器あたりの転移腫瘍細胞数の算定は, 以下の如く行った。正常マウス肺 DNA で段階希釈した HT-1080 細胞の DNA を用いて, 各 PCR 反応ごとに検量線を作製し (図 2), 検量線に基づいて $-\log_{10}$ DNA (μ g) から DNA (pg) を求め, 以下の公式に基づき算出した。

組織あたりの転移腫瘍細胞数 = 組織あたりの DNA 総量 (μ g) \times

$$\frac{\text{組織 DNA } 1 \mu\text{g あたりの HT-1080 DNA 量 (pg/\mu g)}}{\text{細胞 1 個あたりの DNA 量 (6 pg/cell)}}$$

成 績

1. マウスにおけるヒト β -グロビン遺伝子の検出
図 1 に示した 11 種類のオリゴヌクレオチドより, プライマーペアとして Hu β 1-4, 1-5, 1-8, 2-4, 3-5, 3-8, 6-8, 9-11 の組み合

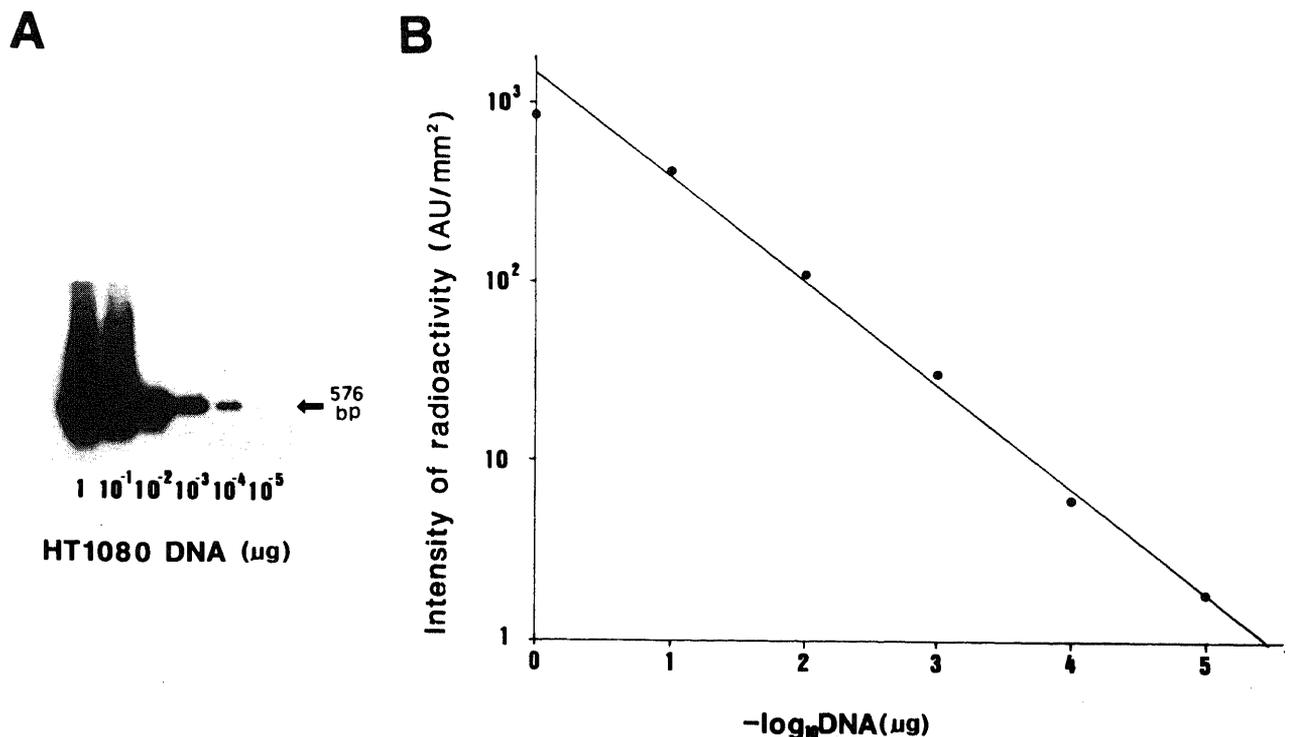


Fig. 2. PCR products from the genomic DNA of HT-1080 cells. (A) Southern analysis of PCR amplification products from serial dilutions of HT-1080 genomic DNA in mouse lung DNA. The PCR products amplified with the primers, Hu β -1 and Hu β -8 could be detected even at the concentration of 10^{-5} μ g of HT-1080 DNA. Abbreviation: bp, base pairs (B) Plot of the radioactivities of the PCR products from the dilutions of HT-1080 DNA against HT-1080 concentration. Radioactivities in the PCR products hybridized with ³²P-labeled probe were analyzed using a Fujix Bioimage analyzer. Radioactivity was described in arbitrary units (AU) per mm².

わせを用い、ヒト β -グロビン遺伝子を特異的に検出する上に適当なプライマーペアを検索した。上記プライマーペアはヒト β -グロビン遺伝子のうちのそれぞれ140, 183, 576, 110, 93, 486, 341, 273塩基対を増幅するものである。テンプレートとしては、HT-1080 細胞の DNA とヌードマウス肺 DNA をそれぞれ 1 μ g 使用した。表 1 に示した如く、HT-1080 DNA をテンプレートとした場合、プライマーペアのすべての組み合わせにおいて目的とする増幅 DNA 断片が検出された。Hu β 1-4, 1-5, 1-8 および 9-11 の組み合わせの場合、PCR 産物は単一のバンドとして検出されたが、2-4, 3-5, 3-8 および 6-8 の組み合わせでは、目的とする増幅 DNA 断片以外の PCR 産物がバンドとして認められた。一方、ヌードマウスの肺 DNA をテンプレートとした場合、Hu β 1-4, 1-5 および 1-8 の組み合わせでは、PCR 産物は認めなかったが、その他の組み合わせではバンドが検出された (図 3)。以上より、ヌードマウスにおいてヒト β -グロビン遺伝子の特異的に検出するのに用いるプライマーペアとしては Hu β 1-4 (140塩基対), 1-5 (183塩基対), 1-8 (576塩基対) が使用可能と判明した。中でも鮮明な単一バンドが検出された Hu β 1-8 の組み合わせを、転移腫瘍細胞の検出のための PCR プライマーとして選定した。

II. PCR 法の感度

正常ヌードマウスの肺 DNA を用いて希釈した HT-1080 細胞 DNA をテンプレートとして25サイクルの PCR 増幅反応を行った結果、576塩基対の増幅 DNA 断片が単一のバンドとして検出でき、PCR 法の感度としては 10^{-5} μ g までその検出が可能であった (図 2)。これは、摘出した肺の重量を 200mg とした場合、約1,120個の転移腫瘍細胞の検出に相当した。なお、ヒト β -グロビン遺伝子に対する特異的増幅反応を正常のヌードマウスの肝臓より抽出した DNA をテンプレートとして施行した

場合、576塩基対の増幅 DNA 断片は検出されなかった。

III. 転移腫瘍の検出

1. 尾静脈内移植による実験的肺転移の検出

実験的転移系では図 4-A に示す如く、移植後 1 週目より肺転移を確実にとらえることができた。 5×10^6 個の HT-1080 細胞の移植により、移植後 1 週目において平均約 8.7×10^6 個の HT-1080 細胞が肺より検出された。各週における肺転移腫瘍細胞数を表 2 に示した。転移腫瘍細胞数は 1~4 週目まで経時的に増加し (表 2, 図 5)、転移細胞の肺での転移成立および増殖が確認できた。肉眼上、肺表面に転移結節が認められたのは、腫瘍細胞移植後 4 週目からであった (図 6)。この時点での HT-1080 細胞の数は臓器あたり平均約 1.1×10^7 個であった。また、病理組織上あきらかな肺転移は腫瘍細胞移植後 3 週目に確

Table 1. Investigation of useful primer pairs for specific PCR amplification for human β -globin-related sequences

Primer pairs	Amplified segments	HT-1080 DNA	Nude mouse DNA (lung)
Hu β 1-4	140 bp	+*(S)**	-*
Hu β 1-5	183 bp	+ (S)	-
Hu β 1-8	576 bp	+ (S)	-
Hu β 2-4	110 bp	+ (M)	+
Hu β 3-5	93 bp	+ (M)	+
Hu β 3-8	486 bp	+ (M)	+
Hu β 6-8	341 bp	+ (M)	+
Hu β 9-11	273 bp	+ (S)	+

*, +: Positive PCR products, -: Negative PCR products.
 **, S: Single band (Expected PCR products were detected as a single band). M: Multiple bands (Contained unexpected extra PCR products).

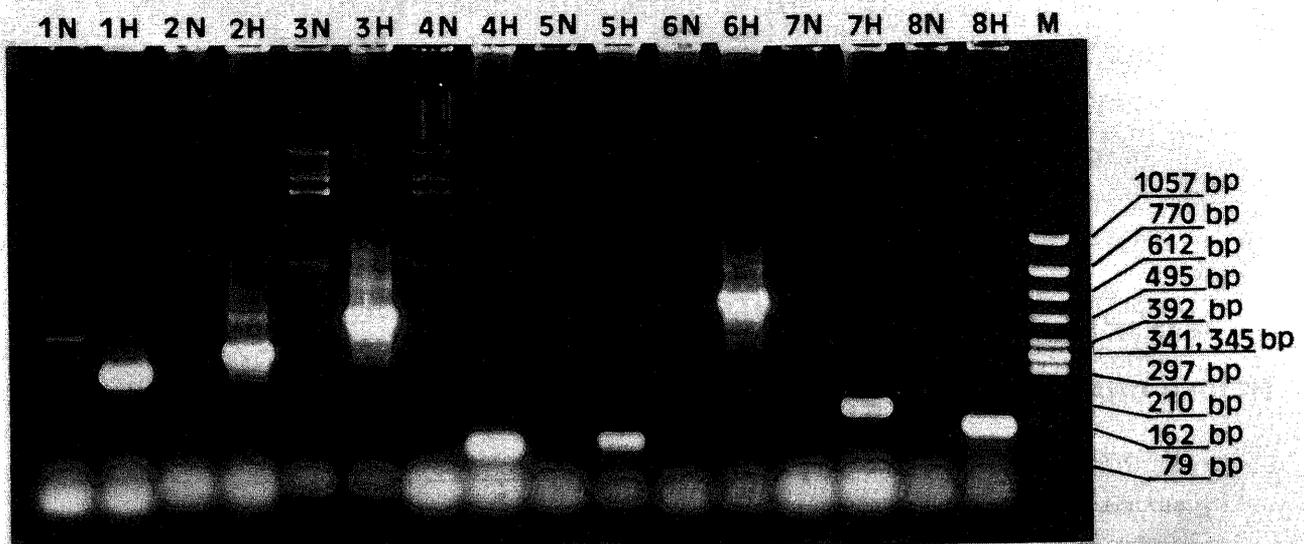


Fig. 3. Analysis of amplified fragments of PCR with various primer pairs by agarose gel electrophoresis. Lane 1: Hu β 9-11 (273 bp), Lane 2: Hu β 6-8 (341 bp), Lane 3: Hu β 3-8 (486 bp), Lane 4: Hu β 3-5 (93 bp), Lane 5: Hu β 2-4 (110 bp), Lane 6: Hu β 1-8 (576 bp), Lane 7: Hu β 1-5 (183 bp), Lane 8: Hu β 1-4 (120 bp), Lane M: molecular weight marker (ϕ 174/Hinc II digest), N: nude mouse liver DNA, H: HT-1080 DNA.

認できた(図7). この時点での HT-1080 細胞の数は臓器あたり平均約 7.8×10^6 個であった.

2. 鼠径部皮下移植による自然肺・リンパ節転移の検出

自然転移系では図4-Bに示した如く, 腫瘍細胞移植後5週目より肺およびリンパ節転移をとらえることができた. 5週目では, 肺4/6(匹), リンパ節6/6(匹), 6週目では, 肺3/6(匹), リンパ節2/6(匹)に転移が検出された. 1臓器あたりの肺およびリンパ節転移腫瘍細胞数は表4に示した. 皮下原発腫瘍の重量が大きくなるに従って, 転移の頻度が増加する傾向が認められたが, 皮下原発腫瘍の重量と転移腫瘍細胞数との間に相関性は認められなかった(図9-A).

IV. CPA を前投与したヌードマウスにおける HT-1080 の転移性

自然転移系における, CPA 前投与群と非投与群の肺転移の検出結果を図8-Aに示した. CPA を i. p. 前投与したマウスでは, 腫瘍細胞の尾静脈内移植後1週目において肺転移腫瘍細胞数の増加傾向が認められたが, 2週目において両群の転移腫瘍細胞数の差は縮小した(表3). 一方, 自然転移系では CPA 前投与群, 非投与群ともに肺・リンパ節転移は腫瘍細胞移植後5週目より検出され(図8-B), CPA の i. p. 前投与による転移検出時期の早期化は認められなかった. 腫瘍細胞移植後5週目で

は, CPA 非投与群において肺4/4(匹), リンパ節3/4(匹), CPA 前投与群において肺3/5(匹), リンパ節3/5(匹)に転移を認め, 7週目では, CPA 非投与群において肺4/4(匹), リンパ節4/4(匹), CPA 前投与群において肺5/5(匹), リンパ節4/5(匹)に転移を認め, 両群の転移頻度に差を認めなかった. さらに, CPA 前投与による転移腫瘍細胞数の増加は認められず(表5), 皮下原発腫瘍の重量が大きくなるに従って転移の頻度が増加する傾向が認められた(図9-B). CPA 投与群と非投与群の皮下原発巣の重量の経時的推移を図10に示した.

Table 2. Kinetics of growth of HT-1080 cells in mouse lungs after i.v. injection*

Mouse No.	Number of experimental lung metastatic cells ($\times 10^5$)			
	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks
1	4.8	0.0	127.5	163.1
2	12.9	34.6	62.6	188.9
3	8.2	29.6	64.7	10.4
4	8.8	9.2	42.5	73.4
mean \pm S.D.	8.7 ± 3.3	18.3 ± 16.4	77.8 ± 33.3	109.0 ± 82.3

* HT-1080 cells were inoculated i.v. at 5×10^6 cells/mouse.

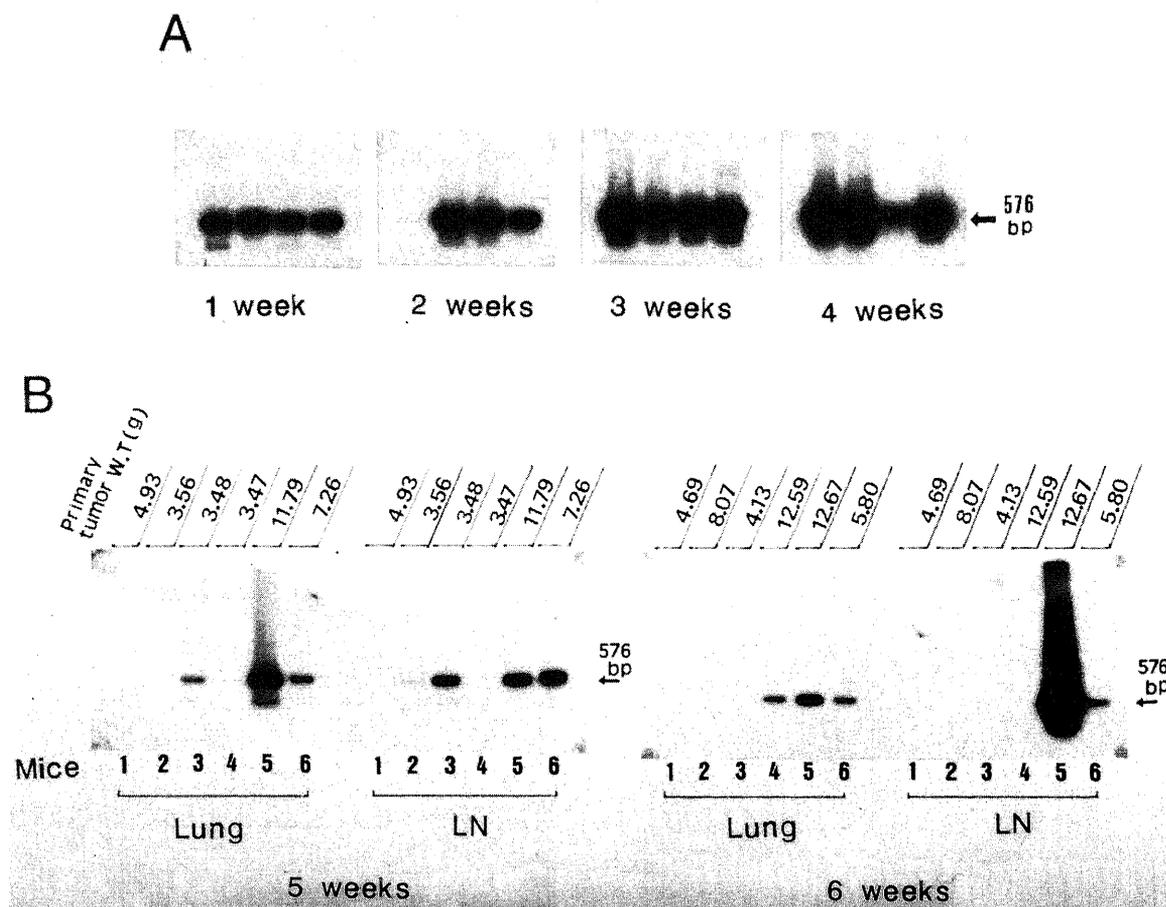


Fig. 4. Detection of experimental or spontaneous lung metastasis following intravenous or subcutaneous inoculation of HT-1080 cells. (A) Detection of experimental lung metastasis. Lung metastasis could be detected from 1 week after tumor inoculation. Metastasized cells gradually increased from 1 week to 4 weeks after tumor i. v. inoculation. (B) Detection of spontaneous metastasis in lungs and lymph nodes. Both lung and lymph node metastases could be detected from 5 weeks after s. c. inoculation of HT-1080 cells.

両群ともに転移が検出され始めた5週目までの皮下原発腫瘍の増殖速度はほぼ同じであった。

V. 転移治療実験

抗癌剤投与後1週目(腫瘍細胞移植後2週目)において、ADM投与群4匹中2匹に、未治療群に比し、PCR増幅DNA断片の明らかな減少が認められ、ADMの肺転移巣に対する治療効果が示された。また、CDDPを投与した4匹のうち3匹のPCR増幅DNA断片の減少はみられず、CDDPの治療効果は認められなかった。ADMとCDDPの肺転移巣に対する転移腫瘍増殖抑制率はそれぞれ、38.9%、-60.1%であり、ADMはHT-1080の肺転移巣に感受性を有するが、CDDPは無効であることが判明した。以上より、腫瘍細胞移植後2週間で肺転移巣に対する治療効果の判定が可能であった。なお、抗癌剤投与後3週目においては、ADM投与による治療効果は消失し、PCR増幅DNA断片の増加が認められた。ADM投与群およびCDDP投与群における肺転移増殖は未治療群に比し、むしろ増大していた(図11)。

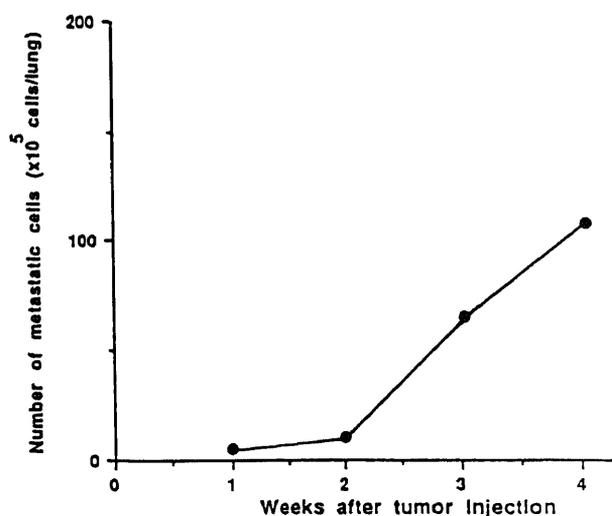


Fig. 5. Kinetics of growth of metastasized HT-1080 cells from 1 to 4 weeks after i. v. inoculation (5×10^6 cells/mouse).

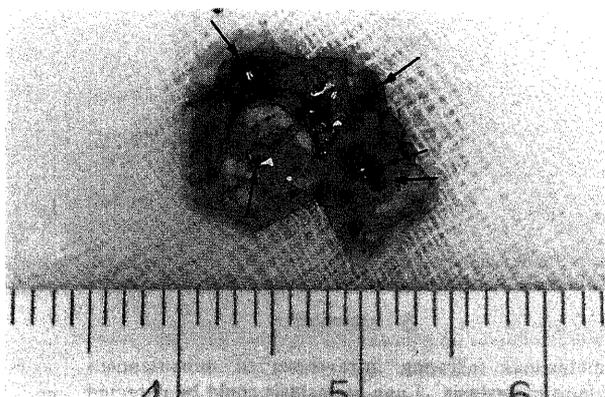


Fig. 6. Macroscopic findings of experimental lung metastasis at 4 weeks after i. v. inoculation of HT-1080 cells. Pointing arrows indicate metastatic nodules.

考 察

Rygaard と Povlsen¹⁹ が初めてヒト腫瘍組織のヌードマウスへの移植に成功して以来、移植腫瘍が原発腫瘍の様々な生物学的特性および形態を保持しつつ増殖することが追認され^{20,21}、実験用哺乳動物として実用性が高い本系を用いて、多くのヒト腫瘍細胞株が樹立された。しかし、可移植性ヒト腫瘍の自然転移率は、用いた癌種によるばらつきはあるものの、おおむね0~1.5%とする報告が多く²²⁻²⁴、ヌードマウスに恒常的に自然転移が形成されることは稀とされてきた。従来、転移様式を決定する要因に関して3つの可能性が提唱されており、確率的要因と選択的要因を操作し、より安定した転移モデルを作製する上での指標となってきた。第1はEwing²⁵が提唱した“解剖学的非無作為転移”(“anatomical-mechanical”)仮説である。これは腫瘍細胞が標的臓器へ到るまでの解剖学的な運搬経路に主眼をおいたものであり、脈管内に浸潤した腫瘍細胞が最初に補捉された場所に転移が形成されるとするものである。第2はPaget²⁶が提唱した“土壌”(“seed and soil”)仮説である。これは、腫瘍細胞が転移形成を営む環境条件に主眼をおいたものであり、‘seed(種)’として標的臓器に塞栓補捉された腫瘍細胞は‘soil(土壌)’としての標的臓器の環境に順応できることが転移形成上必要不可欠とするものである。第3はBrossら²⁷が提唱した“段階的転移”(“Metastatic cascade”)仮説である。これは、腫瘍細胞はごく一般的な場所に初発転移巣を形成した後、その場所より暫時、段階的に転移巣が形成されてゆくとするものである。マウスの皮下へヒト腫瘍組織片ないし腫瘍細胞を移植した場合、皮下に限局した膨張性の腫瘤形成を示すことが多く、周囲組織に浸潤性に増殖することは少ない。そこで、‘seed’としての可移植性腫瘍株の選択に加え‘soil’としての移植部位の選択や“解剖学的非無作為転移”仮説に則った、目的とする臓器に転移を形成させる上で最も有効と考えられる移植方法の検討がなされてきた。その結果、例えば大腸癌由来の腫瘍株においては、回盲部腸管壁内や腹腔内への移植により肝臓やリンパ節への自然転移の増加を認めたり、脾臓内への移植により肝臓への実験的転移が増加する等の知見が得られ、肝臓に関しては安定した実験的転移モデル系が樹立されつつある²⁸⁾⁻⁷¹⁰⁻⁽¹⁴⁾。

この様に、適当な移植部位および移植方法を選定すれば、癌

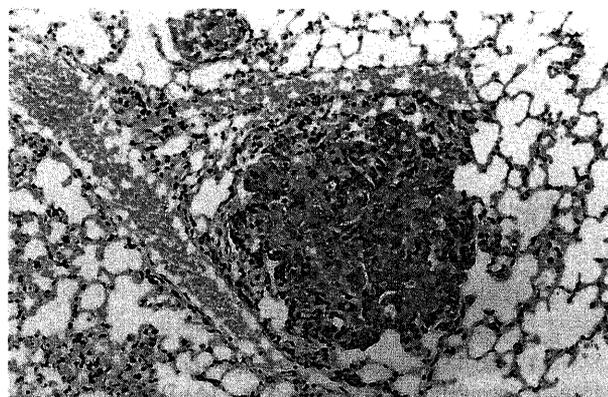


Fig. 7. Histological sections of experimental lung metastasis at 3 weeks after i. v. inoculation of HT-1080 cells. (H. E. $\times 40$)

種によっては転移率の増加を認めるものがあることが判明し、ヌードマウスにおいて転移の形成される頻度は低いという考えに関しては、最近それを疑問視する向きが大きくなってきた。Ueyama らは、ヒト髄腫細胞株をヌードマウスにて継代培養中、腫瘍摘出後に肺転移を認め、摘出という操作により転移が促進されることともに、腫瘍摘出によりマウスの生存日数が伸びたことを転移成立の原因としてあげ、観察期間を長くすれば

転移率が増す可能性があることを指摘している²⁰。従って、臓器表面に形成された転移結節数を肉眼的に算定するという現在の検出方法を改良し、より感度の高い転移検出法を用いることで、早期に転移を検出できる可能性がある。しかし、転移の検出方法からヌードマウスを用いた転移モデル作製を試みた報告例はなく、加えて定量的な検出方法は未だ確立されていない。今回ヌードマウスに用いた転移腫瘍の検出法は、当教室の

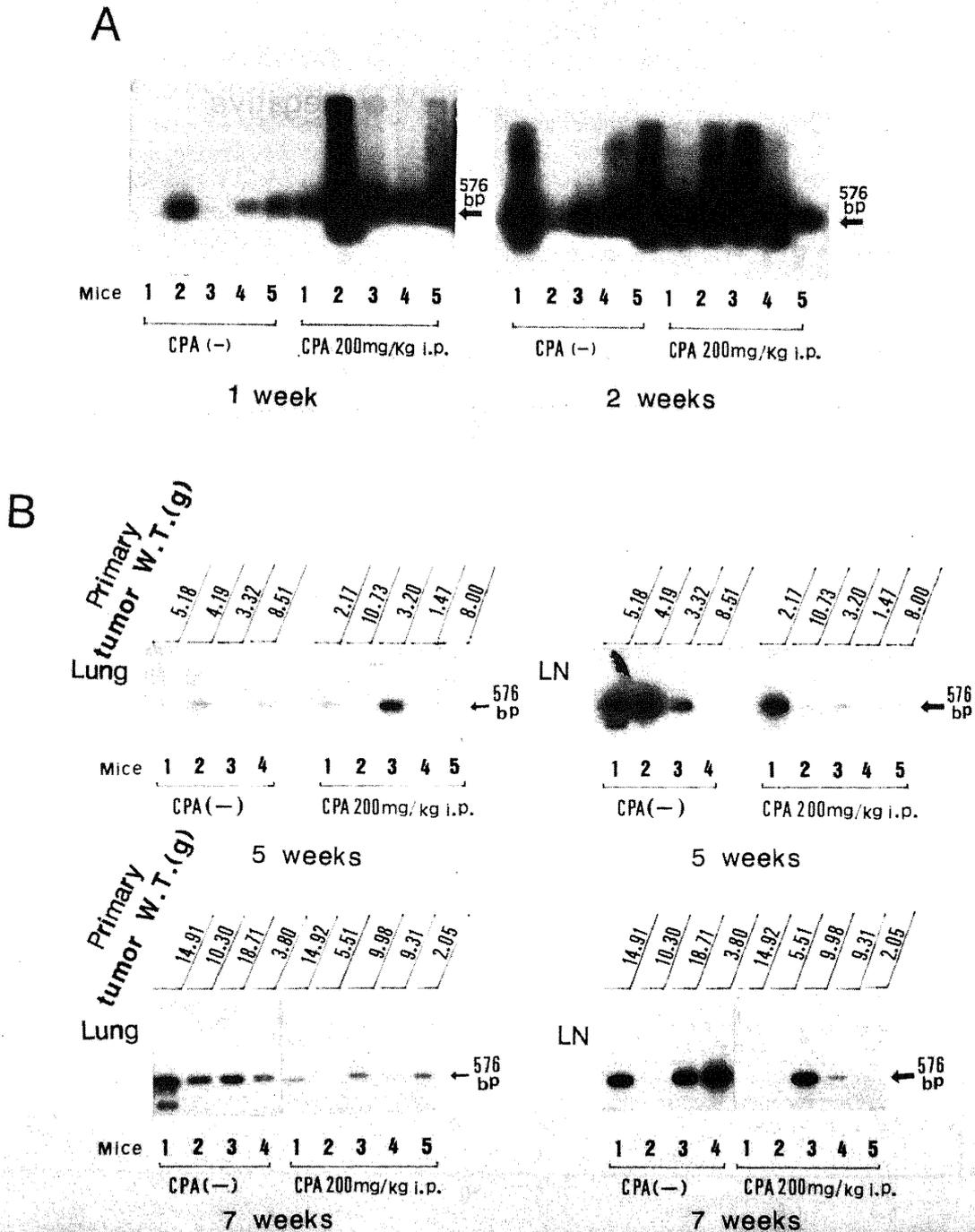


Fig. 8. The effect of CPA-pretreatment (200mg/kg, single i. p., 4 days before tumor inoculation) on experimental or spontaneous metastasis. (A) Comparison of experimental lung metastasis with or without CPA at 1 or 2 weeks after tumor inoculation. Lung metastasis was intense in the CPA-pretreated mice compared with the untreated mice at 1 week. But the difference decreased at 2 weeks. (B) Comparison of spontaneous lung and lymph node metastases between with or without CPA-pretreatment.

Endo らが、受精鶏卵を用いた転移モデル系の確立を目指して開発したものであり²⁹⁾、転移腫瘍検出の鋭敏性と定量性において画期的な手法である。従来、転移の評価は、Wexler の方法³⁰⁾に代表される様に臓器表面に形成された転移結節数を算定するという定量性に乏しいものであった。従って、肉眼的に同

定可能な転移結節が形成されるまでの時間が必要となり、移植腫瘍により多少のばらつきはあるが、転移の評価が可能となるまでには実験的転移系では3~4週間以上、自然転移系では8週間以上を必要とする報告が多い^{1)~18)}。本研究では、Endo ら²⁹⁾の受精鶏卵転移モデルにおいて開発された検出方法をヌードマ

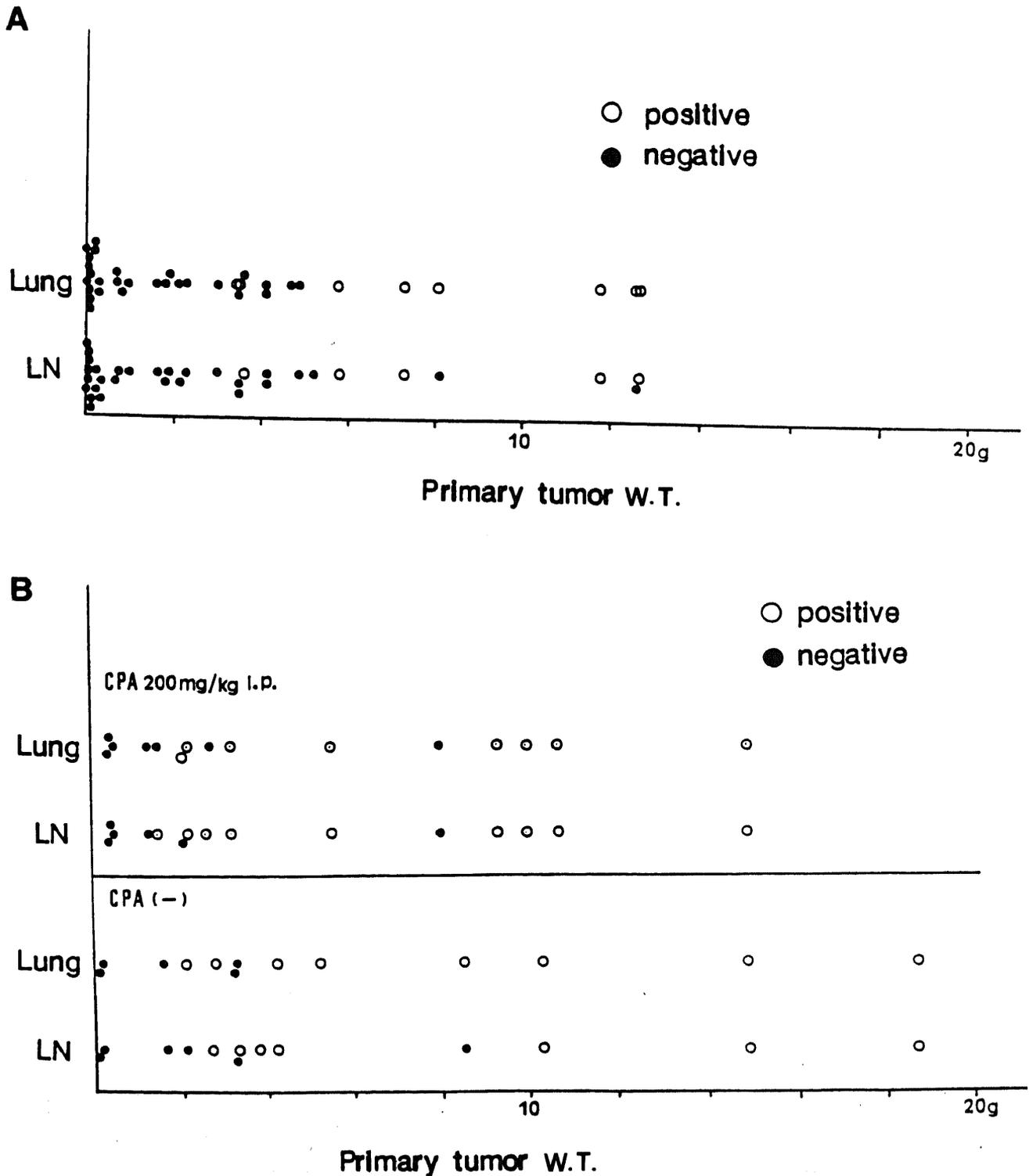


Fig. 9. Correlation between primary tumor weight and frequency of metastasis in lungs and lymph nodes. The frequency of metastasis increased as the weight of subcutaneous primary tumor increased. (A) HT-1080 cells were s. c. inoculated. (B) Comparison of spontaneous lung and lymph node metastasis between CPA pretreated mice and untreated mice. HT-1080 cells were s. c. inoculated.

ウスに応用し、実験的肺転移は1週目で、肺・リンパ節自然転移は5週目で定量的に検出できることを見出した。本検出法により、転移は形成され難いとされてきたヌードマウスにおいて高頻度に転移を検出でき、加えて定量性のみならず迅速性をもヌードマウス転移モデルに加味させることができた。

ヒト腫瘍細胞に含まれる β -グロビン遺伝子の検出に際し、PCR法を用いることにより、本実験ではその検出感度を高めることができた。PCR法は、1985年 Saiki ら³¹によって開発された、微量のテンプレート DNA をもとに試験管内で、染色体 DNA 上のある特定の領域を酵素的に増幅する方法である。即ち、1) DNA の熱変性 (2 本鎖 DNA 断片を 1 本鎖 DNA 断片にする)、2) プライマーのアニーリング、3) DNA ポリメラーゼによる DNA の合成という 3 段階の行程を 1 サイクルとして繰り返すことにより、目的とする領域の増幅を得ようとする

ものである。DNA ポリメラーゼとしては、耐熱菌 *Thermus aquaticus* 由来の *Taq* ポリメラーゼが用いられ、自動 DNA 増幅装置の開発により、全行程が自動化されている。サイクル数を増やすことで、理論的にはより高感度の解析が可能であるが、目的とする DNA 以外の非特異的な増幅産物が合成されたり、増幅産物の塩基配列にエラーが起こる可能性があり、サイクル数の設定には注意を要する。本研究では実験中、目的以外の増幅産物を認めたことは一度もなく、25 サイクルという実験条件の設定に問題はなかったものとする。

実験的転移系では、あきらかな肺転移は病理組織上 3 週目より確認されており、1、2 週目における転移の検出は微小転移レベルでの転移の評価といえる。検出された転移腫瘍細胞数は各週毎に経時的な増加を示しており、検出された腫瘍細胞が単に肺に捕捉された腫瘍細胞ではないことを示している。

Table 3. Number ($\times 10^5$) of experimental lung metastasis* with or without CPA pretreatment (200 mg/kg i.p.)

Mouse No.	1 week		2 weeks	
	CPA (-)	CPA (+)	CPA (-)	CPA (+)
1	0	11.0	173.6	286.4
2	18.1	395.8	2.7	299.1
3	0.1	69.2	75.5	936.1
4	1.5	46.9	48.2	137.0
5	7.9	229.5	538.1	35.8
mean \pm S.D.	5.5 \pm 7.7	122.8 \pm 155.5	167.6 \pm 216.4	338.9 \pm 351.3

* HT-1080 cells were inoculated i.v. at 5×10^6 cells/mouse.

Table 4. Number ($\times 10^3$) of spontaneous metastatic cells* in lung and lymph node

Mouse No.	5 weeks		6 weeks	
	Lung	LN**	Lung	LN
1	0	0.6	0	0
2	0	1.9	0	0
3	20.1	12.4	0	0
4	5.5	0.7	5.0	0
5	94.8	10.1	19.8	1279.4
6	612.0	41.7	3.4	7.7

* HT-1080 cells were inoculated s.c. at 5×10^6 cells/mouse.

** LN: lymph node.

Table 5. Number ($\times 10^4$) of spontaneous metastatic cells* with or without CPA pretreatment (200 mg/kg i.p.)

Mouse No.	5 weeks				7 weeks			
	CPA (-)		CPA (+)		CPA (-)		CPA (+)	
	Lung	LN**	Lung	LN	Lung	LN	Lung	LN
1	0.2	19.2	1.1	6.2	11.7	319.5	3.5	0.1
2	0.9	21.4	0.3	0.1	26.3	49.5	0.2	0.5
3	0.3	2.4	13.3	0.1	15.2	0.9	3.1	6.8
4	0.5	0	0	0	52.7	47.2	0.2	0.2
5	-	-	0	0	-	-	2.5	0
mean \pm S.D.	0.5 \pm 0.3	14.3 \pm 10.4	4.9 \pm 7.3	2.1 \pm 3.5	26.5 \pm 18.6	104.3 \pm 145.2	1.9 \pm 1.6	1.9 \pm 3.3

* HT-1080 cells were inoculated s.c. at 5×10^6 cells/mouse.

** LN: lymph node

Fidler³²⁾は ¹²⁵I-5-iodo-2'-deoxyuridine で放射ラベルした B16 メラノーマ細胞をマウスの静脈内に投与し血流中および各臓器における腫瘍細胞数の経時的変化を検討している。それによると、移植後24時間後には1%の腫瘍細胞しか血流中に生き残ることができず、 2×10^5 個の生細胞を移植した場合、肺に認められる腫瘍細胞数は減少し続け、1, 2週目にはそれぞれ 4.5×10^2 , 4×10^2 個に減少している。同数の死細胞を移植した場合、8時間後には肺における腫瘍細胞は消失しており、転移が成立しない場合の臓器に補捉された腫瘍細胞の停留時間は極めて短いことが予想された。本研究では、HT-1080 細胞を 5×10^6 個移植し1週目で平均約 8.7×10^5 個、2週目で平均約 18.3×10^5 個と多数の腫瘍細胞を肺より検出できた。本法の検出限界は、200mgの肺において約 1.1×10^3 個の転移腫瘍細胞数であることから、より早い時点での転移の評価も可能と思われた。

ヌードマウスにおける移植腫瘍の転移能を左右する因子として、マウス自体の免疫系を考慮する必要がある。T細胞の免疫能が欠如したヌードマウスにおいてNK細胞が転移抑制に少なからぬ影響を及ぼしていることは、NK細胞の細胞障害活性(NK活性)が選択的に抑制されたベージュマウスとNK活性が正常なマウスを用いた転移実験との比較から既に実証されている³³⁾。NK活性の高いヌードマウスでは肺における腫瘍細胞の排除能が高いとの報告がみられ³⁴⁾、NK活性は、とりわけ肺転移の抑制に極めて重要な役割を果たしているものと考えられ

る。CPAを前投与したマウスを用いた場合、実験的転移系における肺転移腫瘍細胞数は、腫瘍細胞移植後1週目において明らかな増加を認めた。しかし、自然転移系では転移腫瘍細胞数、転移頻度に差を認めなかった。CPAの投与は腫瘍移植4日前に行ったが、自然転移系ではこの投与時期に問題があったものと考えられる。今回の結果より、NK活性の肺転移抑制に及ぼす作用点は腫瘍細胞が脈管内に浸潤してから以後にあることが推測される。従って自然転移系の肺転移を増大させるには、皮下に移植された腫瘍細胞が血管内に浸潤してから後にCPAを投与する必要がある。しかし、治療効果への影響を考慮すると、治療実験に腫瘍細胞移植後のCPAの投与を行うことは不適切といえる。NK活性を抑える方法として、CPA^{24)34)~35)37)}の他にNK細胞の膜表面に存在する糖脂質であるAsialo-GM1に対する抗体^{32)38)~42)}や17β-エストラジオール⁴³⁾⁴⁴⁾、インターフェロン^{45)~47)}、プロスタグランジンE⁴⁸⁾等が知られており、転移増殖や転移頻度を増大させる手段として用いられている。しかし、PCR法を転移細胞の検出法として応用することにより、ヌードマウスの免疫担当細胞としてのNK細胞を上記手法を駆使して抑制せずとも、HT-1080細胞の転移の検出ならびにその定量的評価は十分可能であった。

用いたヒト線維肉腫HT-1080細胞はエラスチン分解能やコラーゲン分解能を有し、ラミニンやタイプIVコラーゲン等の基底膜を構成する成分に接着し細胞外マトリクスを破壊浸潤することが知られている高転移性の可移植性腫瘍株である^{49)~51)}。本稿には記載しなかったがHT-1080細胞を用いた本実験系では、実験的転移系、自然転移系ともに肝転移の頻度は極めて低かつ

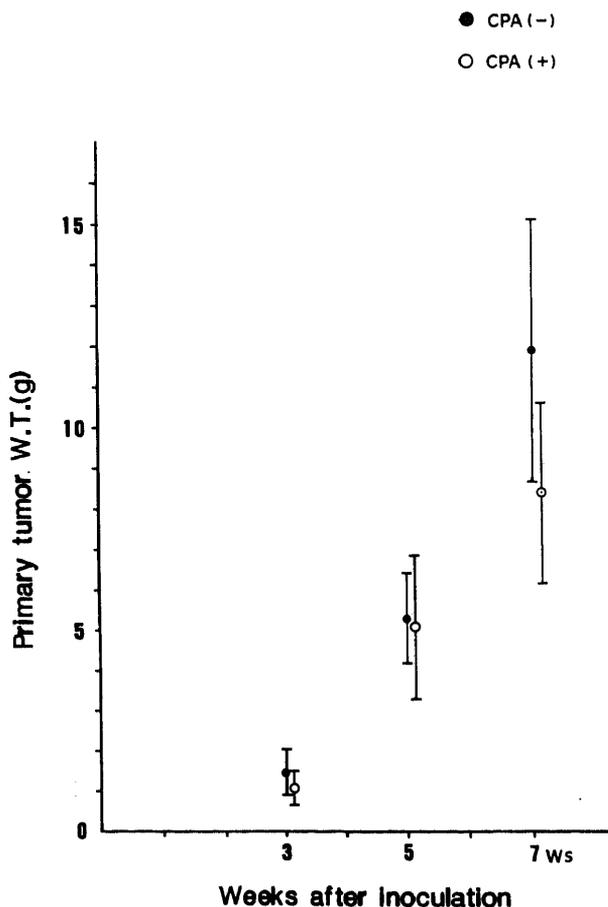
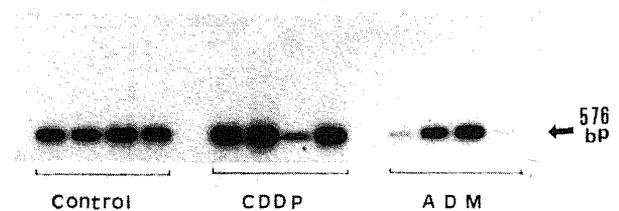


Fig.10. Correlation between primary tumor weight and weeks after tumor inoculation on mice with or without CPA pretreatment.

1 week after chemotherapy



3 weeks after chemotherapy

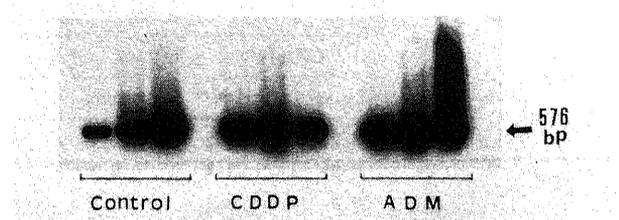


Fig.11. Effects of anti-cancer drugs on lung metastasis of HT-1080 cells in lung. Anti-cancer drugs were intravenously injected at 1 week after tumor inoculation. Mouse lungs were then dissected at 1 or 3 weeks after chemotherapy.

た。また、脾臓内や回盲部腸管壁内への移植も試みたが肝転移の頻度はやはり低かった。従って移植経路からの検討では、ヌードマウスにおける HT-1080 細胞は、肝臓よりはむしろ肺に強い臓器親和性を持つものと考えられた。一方、鶏卵法を用いた HT-1080 の転移モデル⁵⁸⁾では、肺のみならず肝臓にも同時に実験的転移が恒常的に形成されることが確かめられており、臓器親和性に関しては宿主側の条件も十分に考慮する必要のあるものと考えられた。癌転移において臓器特異性が形成される機序は不明であるが、熊谷ら⁵⁹⁾は、肺に転移性を示す多数のマウス可移植性腫瘍に顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (granulocyte-macrophage-colony stimulating factor, GM-CSF) が、また肝に転移性を示す腫瘍にインターロイキン (interleukin, IL)-1 または IL-6 遺伝子が発現していることから、これらのサイトカイン遺伝子の発現が臓器特異的な癌転移の形成に関与している可能性を指摘している。ヌードマウスにおいて HT-1080 細胞の肝転移の頻度が低いことには、臓器の血管内皮細胞への特異的接着性以外に宿主側の条件の一つとして、増殖因子の関与も考慮せねばならない。

悪性腫瘍は様々の異なった表現型 (phenotype) を有する細胞の亜集団より構成され、この中でより浸潤傾向が強く易転移性の、また、転移臓器により親和性の強い細胞ないし細胞集団が選択的に転移を形成すると考えられている^{59)~59)}。原発巣、転移巣間、原発巣と転移巣間に存在する数々の不均一性 (heterogeneity) はこれら亜集団の違いを反映するものであり、クローンの違いに基いた多様性と考えられる。即ち、転移とは原発巣からより悪性度の高い腫瘍細胞のふるい分けといえ、実際に原発巣に比し転移巣の方が癌細胞の増殖活性が亢進しているとする報告がある⁶⁰⁾。今回、自然転移系において転移の頻度は皮下原発腫瘍の重量と正の相関を有していた。しかし、転移腫瘍細胞数は必ずしも皮下原発腫瘍の重量とは相関せず、皮下原発腫瘍の重量が大きくても転移腫瘍細胞数が少ないものや、逆に重量が小さくても転移腫瘍細胞数が多いものが少なからず存在した。移植した HT-1080 細胞が転移能の異なる亜集団から構成されていることに基づいた不均一性と考えられた。

ヌードマウスに移植したヒト癌は、例えば分化度が同じであっても、株ごとに異なる抗癌剤感受性スペクトラムを示すことが知られている⁶¹⁾。不均一性の一環として、原発巣と転移巣の間にも抗癌剤感受性における不均一性が存在し^{59)~59)}、転移巣に対する化学療法に際しては原発巣と同様、感受性試験に基づいたレジメンを選択することが望ましい。加えて、抗癌剤の投与量が不十分な場合や感受性の低い抗癌剤を使用した場合、むしろ癌の増殖は刺激され癌の増大や転移の増加を来すとされる⁶⁰⁾。従って、転移巣に対する治療は原発巣に対する治療と同様に慎重に対処する必要があり、初回レジメンの設定および投与量には慎重でなければならない。

MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 法⁶¹⁾を用いた HT-1080 細胞に対する試験管内での感受性試験では ADM と CDDP の細胞増殖阻止率は臨床投与量での最大血中濃度 (peak plasma concentration, PPC) [ADM: 0.6 $\mu\text{g/ml}$, CDDP: 2.49 $\mu\text{g/ml}$] の薬剤量で、それぞれ 94.4%, 36.4%であった。鶏卵法を用いた実験的肝転移に対する感受性試験では、ADM 40 $\mu\text{g/egg}$ (8mg/kg に相当)、CDDP 5 $\mu\text{g/egg}$ (2mg/kg に相当) の投与量にて腫瘍増殖阻止率はそれぞれ 89.5%, 5.3%という結果を得ている。従って、原

発巣と転移巣および転移巣間 (肺転移巣と肝転移巣) における抗癌剤感受性の不均一性は、今回の実験の範囲内では認めず、転移巣に対する薬剤感受性はヌードマウスと受精鶏卵ともに ADM に感受性が強く CDDP に感受性が弱い点においてよく相関していた。鳥類と哺乳類という違いは今回の治療実験の結果には反映されず、実験動物を用いた転移実験モデルとして両系を独立して用いることが可能と考えられた。

転移巣治療実験においては、HT-1080 細胞の移植後 1 週目に抗癌剤の投与を試みた。これは、HT-1080 細胞の場合、1 週目に検出された腫瘍細胞が単に捕捉されたものではなく転移と考えられ、また腫瘍への薬剤到達のためには血行の成立が必要だが、約 1 週間で腫瘍血管が形成されること⁶²⁾などからその妥当性を考慮した。腫瘍細胞を移植してから 2 週間という短期間の間に転移巣に対する治療効果の判定を下すことが可能であったことより、新規抗癌剤の開発を目的とするスクリーニングを含めた癌転移巣に対する実験化学療法が可能になったといえる。なお、抗癌剤投与後 3 週目において治療効果の消失と転移増殖の増大を認め、単回の投与ではあったが、薬剤の投与量が不十分であったことが判明した。本法を用いて、転移巣に対する薬剤の作用機序のより詳細な検討をおこなうことにより、転移巣を抑制する上に有効な抗癌剤の選定、投与量、投与方法および投与回数を追求することが可能である。

転移は原発腫瘍から悪性の腫瘍細胞が離脱し、脈管に侵入し、標的臓器へと移動し、脈管壁間隙から脈管外へ侵出し、そこで増殖する一連の現象を総称している。これまでは、ヒト癌の実用的な転移動物実験モデルが確立されていなかったために、試験管内実験での断片的な形でしか転移を捕らえることができなかった。微小転移の定量的検出を可能ならしめた本法の開発により、ヌードマウスをより有用な転移実験モデルへと応用させる上での道が開かれた。本法は、ヒト癌の転移を一連の生体現象として捕らえ、そこで行われている癌細胞と宿主との相互作用を明らかにすると共に、転移、浸潤の機序解明および癌転移巣に対する治療法の開発に有用な手段となるものと考えられる。

結 論

ヒト線維肉腫 HT-1080 細胞をヌードマウスに移植後、PCR法を用いてヒト β -グロビン遺伝子 (576塩基対) に対する特異的増幅反応を施行し、肺およびリンパ節転移腫瘍細胞の特異的且つ定量的な検出を試み以下の結果を得た。

1. ヒト β -グロビン遺伝子を特異的に検出するプライマーペアとしては、Hu β 1-4, 1-5, 1-8 が使用可能と判明し、とりわけ鮮明なバンドとして検出された Hu β 1-8 (576塩基対) の組み合わせを転移ヒト腫瘍の検出に使用した。

2. 転移腫瘍細胞検出における PCR 法 (特異的増幅反応を 25 サイクル施行) の感度としては、DNA $10^{-5} \mu\text{g}$ までその検出が可能であった。これは、200mg の肺に対して約 1,120 個の転移腫瘍細胞があれば検出が可能であることを示している。

3. 実験的転移系では 1 週目より全マウスに肺転移が検出され、転移腫瘍細胞数は 1~4 週目まで経時的に増加した。一方、自然転移系では 5 週目より肺・リンパ節に転移腫瘍細胞が検出された。転移の頻度は、皮下原発腫瘍の重量と正の相関を示したが、転移腫瘍細胞数と皮下原発腫瘍の重量との間には相関性は認めず、HT-1080 細胞の不均一性と考えられた。

4. CPA の腫瘍移植 4 日前投与 (200mg/kg, single i. p.) にて実験的肺転移腫瘍細胞数は腫瘍細胞移植後 1 週目において増加傾向を示したが, 2 週目ではその差は縮小した. 自然転移系では, CPA の単回 i. p. 前投与による転移腫瘍細胞数の増加および転移の検出可能時期の早期化は認めなかった. NK 細胞の転移抑制の作用点が, HT-1080 細胞が血管内に浸潤してから増殖するまでの間にあることを示唆する結果と考えられた. 本実験では, NK 細胞を抑制せずとも HT-1080 細胞の転移の定量的検出は十分可能であった.

5. 実験的転移系を用いた肺転移巣に対する治療実験の結果は, 腫瘍細胞を移植してから 2 週間で得られ, 抗癌剤投与後 1 週目において ADM に感受性を示し, CDDP には感受性を示さなかった. これは, 鶏卵法における肝転移巣に対する治療実験の結果および MTT 法を用いた試験管内での HT-1080 細胞に対する感受性と一致していた. 抗癌剤の投与量は鶏卵法との比較のために, CDDP 2mg/kg, ADM 8mg/kg としたが, 抗癌剤投与後 3 週目においては治療効果は消失し, 薬剤の投与量が不十分であったことが結論づけられた. また, HT-1080 細胞に感受性を有さない CDDP 治療群は未治療群に比しより強い転移増殖を認め, 投与量とともに初回レジメンの選定の重要性が示唆された.

6. ノードマウスを用いた転移実験系として本法が適用可能であり, 肉眼による形態学的観察では同定不可能な微小転移レベルでの定量的な転移の評価が可能であった.

謝 辞

稿を終えるに臨み, 懇篤な御指導と御校閲を賜りました恩師佐々木琢磨教授に深甚なる謝意を表します. また, 本教室での研究の志しに多大なる御協力と御鞭撻を賜りました金沢大学医学部第一外科学講座渡辺洋宇教授に深く感謝いたします. さらに, 本研究の遂行に際し, 終始御協力と御援助を戴いた遠藤良夫先生, 田中基裕先生, 野口美香先生をはじめ金沢大学がん研究所化学療法部教室員各位に深謝いたします.

なお, 本論文の要旨は第50回日本癌学会総会 (1991, 東京) および第32回日本肺癌学会総会 (1991, 滋賀) において発表した.

文 献

- 1) Joshi, S. S., Jackson, J. D. & Sharp, J. G.: Comparison of the growth and metastasis of four human intestinal tumor cell line xenografts. *Tumor Biol.*, **10**, 117-125 (1989).
- 2) Sekikawa, K., Arends, J. W., Verstijnen, C. P. H. J., Linden, E. V. D., Dinjens, W., Schutte, B. & Bosman, F. T.: Influence of implantation site on growth, antigen expression and metastatic potential of human colonic cancer HT29 and 5583 xenografts in nude mice. *Invasion & Metastasis*, **8**, 238-252 (1988).
- 3) Alterman, A. L., Fornabaio, D. M., Kim, Y. S. & Stackpole, C. W.: The role of intratumor environment in determining spontaneous metastatic activity of a B16 melanoma clone. *Invasion & Metastasis*, **9**, 242-253 (1989).
- 4) Ohizumi, Y., Maezawa, H. & Mori, T.: Relationship between primary Tumor volume and lung metastasis in Lewis lung metastasis. *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, **12**, 229-235 (1987).
- 5) Price, J. E., Daniels, L. M., Campbell, D. E. & Giavazzi, R.: Organ distribution of experimental metastasis of a human colorectal carcinoma injected in nude mice. *Clin. & Exp. Metastasis*, **7**, 55-68 (1989).
- 6) Giavazzi, R. & Garofalo, A.: The nude mouse for the study of human colorectal carcinoma. *Adv. Exp. Med. Biol. (United States)*, **233**, 39-47 (1988).
- 7) Morikawa, K., Walker, S. M., Nakajima, M., Pathak, S., Jessup, J. M. & Fidler, I. S.: Influence of organ environment on the growth, selection and metastasis of human colon carcinoma cells in nude mice. *Cancer Res.*, **48**, 6863-6871 (1988).
- 8) Teicher, B. A., Jacobs, J. L. & Kelly, M. J.: The influence of fluosol-DA on the occurrence of lung metastasis in Lewis lung carcinoma and B16 melanoma. *Invasion & Metastasis*, **8**, 45-56 (1988).
- 9) Zimmerman, R. J., Gaillard, E. T. & Goldin, A.: Metastatic potential of four human melanoma xenografts in young athymic mice following tail vein inoculation. *Cancer Res.*, **47**, 2305-2310 (1987).
- 10) Kyriazis, A. P., Dipersio, L., Michael, G. J., Pesce, A. J. & Stinnett, J. D.: Growth patterns and metastatic behavior of human tumors growing in athymic mice. *Cancer Res.*, **38**, 3186-3190 (1978).
- 11) Giavazzi, R., Campbell, D. E., Jessup, J. M., Cleary, K. & Fidler, I. J.: Metastatic behavior of tumor cells isolated from primary and metastatic human colorectal carcinomas implanted into different sites in nude mice. *Cancer Res.*, **46**, 1928-1933 (1986).
- 12) Morikawa, K., Walker, S. M., Jessup, J. M. & Fidler, I. J.: *In vivo* selection of highly metastatic cells from surgical specimens of different primary human colon carcinomas implanted into nude mice. *Cancer Res.*, **48**, 1943-1948 (1988).
- 13) Rodolfo, M., Balsari, A., Clemente, C., Parmiani, G. & Fossati, G.: Tumorigenicity and dissemination of primary and metastatic human melanomas implanted into different sites in nude mice. *Invasion & Metastasis*, **8**, 317-331 (1988).
- 14) Akimaru, K., Stuhlmiller, G. M. & Seigler, H. F.: Human melanoma growth in the peritoneal cavity of the athymic mouse. A model for *in vivo* study of cell-mediated immunity. *J. Surg. Oncol.*, **17**, 309-320 (1981).
- 15) 犬房春彦: ノードマウス皮下移植で自然肺転移を生じるヒト肺腺癌培養細胞 KUM-LK-2 の樹立とその生物学的特性の検討. *日外会誌*, **89**, 1075-1082 (1988).
- 16) Lawn, R. M., Efstratiadis, A., O'Connell, C. & Maniatis, T.: The nucleotide sequence of the human β -globin gene. *Cell*, **21**, 647-651 (1980).
- 17) Southern, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517 (1975).
- 18) Denhardt, D. T., Efstratiadis, A., O'Connell, C. & Maniatis, T.: Biochemical and biophysical research communications. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **23**, 641-646 (1966).

- 19) Povlsen, C. O. & Rygaard, J.: Heterotransplantation of human adenocarcinoma of the colon and rectum to the mouse mutant nude. A study of nine consecutive transplantations. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **79**, 159-169 (1971).
- 20) Shimosato, Y., Kameya, T., Nagai, K., Hirohashi, S., Koide, T., Hayashi, H. & Nomura, T.: Transplantation of human tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **56**, 1251-1260 (1976).
- 21) Rygaard, J. & Povlsen, C. O.: Heterotransplantation of a human malignant tumors to "Nude" mice. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **77**, 758-760 (1969).
- 22) 藤田昌英: ヒト癌-ヌードマウス系による抗癌剤感受性試験-前臨床2次スクリーニングとしての有用性. *KARKINO-S*, **3**, 33-42 (1990).
- 23) Sharkey, F. E. & Fogh, J.: Metastasis of human tumors in athymic nude mice. *Int. J. Cancer*, **24**, 733-738 (1979).
- 24) Riccardi, C., Barlozzari, T., Santoni, A., Herberman, R. B. & Cesarini, C.: Transfer to cyclophosphamide-treated mice of natural killer (NK) cells and *in vivo* natural reactivity against tumors. *J. Immunol.*, **126**, 1284-1289 (1981).
- 25) Ewing, J.: *Neoplastic Diseases: A Treatise on Tumors*. 3rd Ed., Chap. 4. p87-100 Saunders Inc., Philadelphia, 1928.
- 26) Paget, S.: The distribution of secondary growth in cancer of the breast. *Lancet*, **1**, 571-573 (1889).
- 27) Bross, I. D. J. & Blumenson, L. E.: Metastatic sites that produce generalized cancer: Identification and kinetics of generalizing sites. *In* L. Weiss (ed.), *Fundamental Aspects of Metastasis*. 1st ed. p121-150, North-Holland publ. Co., Amsterdam, 1976.
- 28) Ueyama, Y., Morita, K., Ochiai, C., Ohsawa, N., Hata, J. & Tamaoki, N.: Xenotransplantation of a human meningioma and its lung metastasis in nude mice. *Br. J. Cancer*, **37**, 644-647 (1978).
- 29) Endo, Y., Sasaki, T., Harada, F. & Noguchi, M.: Specific detection of metastasized human tumor cells in embryonic chicks by the polymerase chain reaction. *Jpn. J. Cancer Res.*, **81**, 723-726 (1990).
- 30) Wexler, H.: Accurate indication of experimental pulmonary metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.*, **36**, 641-645 (1966).
- 31) Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N.: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354 (1985).
- 32) Fidler, I. J.: Metastasis: Quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with ^{125}I -5-Iodo-2'-deoxyuridine. *J. Natl. Cancer Inst.*, **45**, 773-782 (1970).
- 33) Talmadge, J. E., Meyers, K. M., Priour, D. J. & Starkey, J. R.: Role of NK cells in tumor growth and metastasis in beige mice. *Nature*, **284**, 622-624 (1980).
- 34) Gorelik, E., Wiltrout, R. H., Okumura, K., Habu, S. & Herberman, R. B.: Role of NK cells in the control of metastatic spread and growth of tumor cells in mice. *Int. J. Cancer*, **30**, 107-112 (1982).
- 35) Nanni, P., Giovanni, C. D., Nicoletti, G., Re, B. D., Scotlandi, K. & Lollini, P.-L.: Human rhabdomyosarcoma cells in nude mice as a model for metastasis and differentiation. *Invasion & Metastasis*, **9**, 231-241 (1989).
- 36) Vollmer, T. L. & Conley, F. K.: Effect of cyclophosphamide on survival of mice and incidence of metastatic tumor following intravenous and intracardial inoculation of tumor cells. *Cancer Res.*, **44**, 3902-3906 (1984).
- 37) Hanna, N. & Burton, R. C.: Definitive evidence that natural killer (NK) cells inhibit experimental tumor metastasis *in vivo*. *J. Immunol.*, **127**, 1754-1758 (1981).
- 38) Caretto, P., Forni, M., D'orazi, G., Scarpa, S., Feraioni, P., Jemma, C., Modesti, A., Ferrarini, M., Roncella, S., Foa, R. & Forni, G.: Xenotransplantation in immunosuppressed nude mice of human solid tumors and acute leukemias directly from patients or *in vitro* cells lines. *Res. Clin. Lab.*, **19**, 231-243 (1989).
- 39) Habu, S., Fukui, H., Shimamura, K., Kasai, M., Nagai, Y., Okumura, K. & Tamaoki, N.: *In vivo* effects of anti-asialo GM1. I. Reduction of NK activity and enhancement of transplanted tumor growth in nude mice. *J. Immunol.*, **127**, 34-38 (1981).
- 40) Barlozzari, T., Reynolds, C. W. & Herberman, R. B.: *In vivo* role of natural killer cells: Involvement of large granular lymphocytes in the clearance of tumor cells in anti-asialo GM1-treated rats. *J. Immunol.*, **131**, 1024-1027 (1983).
- 41) Barlozzari, T., Leonhardt, J., Wiltrout, R. H., Herberman, R. B. & Reynolds, C. W.: Direct evidence for the role of LAK in the inhibition of experimental tumor metastasis. *J. Immunol.*, **134**, 2783-2789 (1985).
- 42) Saijo, N., Ozaki, A., Beppu, Y., Takahashi, K., Fujita, J., Sasaki, Y., Nomori, H., Kimata, N., Shimizu, E. & Hoshi, A.: Analysis of metastatic spread and growth of tumor cells in mice with depressed natural killer activity by anti-asialo GM1 antibody or anticancer agents. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **107**, 157-163 (1984).
- 43) Seaman, W. E., Blackman, M. A., Gindhart, T. D., Roubinian, J. R., Loeb, J. M. & Talal, N.: β -Estradiol reduces natural killer cells in mice. *J. Immunol.*, **121**, 2193-2198 (1978).
- 44) Hanna, N. & Schneider, M.: Enhancement of tumor metastasis and suppression of natural killer cell activity by β -estradiol treatment. *J. Immunol.*, **130**, 974-980 (1983).
- 45) Hanna, N.: Expression of metastatic potential of tumor cells in young nude mice is correlated with low levels of natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Int. J. Cancer.*, **26**, 675-680 (1980).
- 46) Gorelik, E., Bere, W. W. & Herberman, R. B.: Role of NK cells in the antimetastatic effect of anticoagulant drugs. *Int. J. Cancer*, **33**, 87-94 (1984).

- 47) **Nolibe, D., Aumatire, E. & Thang, M. N.**: *In vivo* augmentation of rat lung natural killer cell activity and inhibition of experimental metastases by double-stranded polynucleotides. *Cancer Res.*, **45**, 4774-4778 (1985).
- 48) **Fulton, A. M. & Hepner, G. H.**: Relationships of prostaglandin E and natural killer sensitivity to metastatic potential in murine mammary adenocarcinomas. *Cancer Res.*, **45**, 4779-4784 (1985).
- 49) **Jones, P. A. & DeClerck, Y. A.**: Destruction of extracellular matrices containing glycoproteins, elastin and collagen by metastatic human tumor cells. *Cancer Res.*, **40**, 3222-3227 (1980).
- 50) **Kramer, R. H., Bensch, K. G. & Wong, J.**: Invasion of reconstituted basement membrane matrix by metastatic human tumor cells. *Cancer Res.*, **46**, 1980-1989 (1986).
- 51) **Moll, U., Yungleib, G. L., Rosinbki, K. B. & Quigley, J. P.**: Tumor promoter-stimulated Mr. 92,000 gelatinase secreted by normal and malignant human cells: isolation and characterization of the enzyme from HT-1080 tumor cells. *Cancer Res.*, **50**, 6162-6170 (1990).
- 52) 熊谷勝男, 力石秀実, 竹田和由: 癌細胞におけるサイトカイン遺伝子の発現は癌転移の主要な促進因子ではないか? . 最新医学, **46**, 112-122 (1991).
- 53) **Fidler, I. J.**: Origin of cancer metastases and its implications for therapy. *Isr. J. Med. Sci.*, **24**, 456-463 (1988).
- 54) **Talmadge, J. E., Benedict, K., Madsen, J. & Fidler, I. J.**: Development of biological diversity and susceptibility to chemotherapy in murine cancer metastases. *Cancer Res.*, **44**, 3801-3805 (1984).
- 55) **Fidler, I. J. & Hart, I. R.**: Biological diversity in metastatic neoplasmas: Origin and implications. *Science*, **217**, 998-1003 (1982).
- 56) 山岡憲夫, 田川 泰, 綾部公懿, 川原克信, 木田春海, 内山貴堯, 富田正雄: Flow cytometry を用いた肺癌の原発巣と転移巣の細胞内 DNA 量 RNA 量の検討. 日外会誌, **91**, 901-906 (1990).
- 57) 藤田史子, 藤田昌英, 木本安彦, 下妻晃二郎, 田口鉄男: スードマウス移植ヒト消化器癌および乳癌の各種抗癌剤に対する感受性. 癌と化学療法, **12**, 353-361 (1985).
- 58) **Spremulli, E. N., Scott, C., Campbell, D. E., Libbey, N. P., Shochat, D., Gold, D. V. & Dexter, D. L.**: Characterization of two metastatic subpopulations originating from a single human colon carcinoma. *Cancer Res.*, **43**, 3828-3835 (1983).
- 59) 中谷勝紀, 宮城信行, 渡辺明彦, 西和田敬, 沢田秀智, 奥村 徹, 山田行重, 矢野友昭, 志野佳秀, 中野博重: スードマウスでのヒト胃癌の悪性増殖能. 日癌治, **26**, 579-585 (1991).
- 60) 近藤達平, 市橋秀仁, 山田久義, 桃井能正, 志津有一: 抗癌剤の Adverse effect の発生機転. 癌の臨床, **9**, 241-247 (1963).
- 61) **Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D. & Boyd, M. R.**: Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.*, **48**, 4827-4833 (1988).
- 62) 川口隆憲, 五十嵐誠治, 中村久也: 血行性転移の成立機序. 福島医学雑誌, **36**, 1-10 (1986).

Specific Detection of Metastasized Human Tumor Cells in Nude Mice by the Polymerase Chain Reaction
Yasuhiko Ohta, Department of Experimental Therapeutics, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa 920
—J. Juzen Med Soc., **101**, 10–25 (1992)

Key words metastasis, nude mouse, human fibrosarcoma HT-1080, polymerase chain reaction

Abstract

A metastatic model system with both quantity and rapidity must be developed for therapeutic experiments using nude mice. In order to develop an assay which is both highly sensitive and quantitative, specific detection of human β -globin-related sequence in metastasized human tumor cells in nude mice was performed by the polymerase chain reaction (PCR) technique and analyzed by Southern blotting. As an experimental metastatic model system, human fibrosarcoma HT-1080 cells (5×10^6 cells/mouse) were inoculated into the tail vein of nude mice (ICR nu/nu). As a spontaneous metastatic model system, HT-1080 cells were subcutaneously inoculated into the right groin of nude mice. The mice were sacrificed at weekly intervals after tumor inoculation and DNA was extracted from lungs and lymph nodes using a rapid DNA preparation method. The DNA ($1 \mu\text{g}$) was amplified by PCR with the specific primers, and the reaction products were analyzed by Southern blotting. The results showed that lung metastasis could be detected as a positive amplified PCR fragments (576 bp) from 1 week after tumor inoculation in the experimental metastatic model system. The amplified fragments from the lung DNA samples increased gradually from 1 week to 4 weeks after tumor inoculation. On the other hand, both lung and lymph node metastases could be detected from 5 weeks after tumor inoculation in the spontaneous metastatic model system. Thus the quantitative and specific detection of micrometastases which could not be detected by macroscopical detection methods proved to be possible using the PCR DNA-amplification technique. By using this method, therapeutic experiments were done as follows. Cisplatin (CDDP) 2 mg/kg or adriamycin (ADM) 8 mg/kg were intravenously injected at 1 week after tumor inoculation. The lungs were then dissected at 2 or 4 weeks after tumor inoculation and DNA was extracted. PCR amplification of human β -globin-related sequence and its analysis by Southern blotting revealed that ADM had anti-tumor activity on metastasized HT-1080 cells but that CDDP did not. The inhibition ratios of ADM and CDDP were 38.9% and 60.1% respectively, at 1 week after drug injection. By using the PCR DNA-amplification technique in the detection of metastasis, the therapeutic effect on lung metastasis of human tumor in nude mice could be examined. This method should be useful for elucidation of the mechanism of metastasis or invasion of human tumor cells and should contribute to the development of new chemotherapy for metastasis.