

胃癌腹膜播種形成過程の解明 ノードマウス腹膜播種モデルを用いて

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/2297/9257

胃癌腹膜播種形成過程の解明

—ヌードマウス腹膜播種モデルを用いて—

金沢大学医学部医学科外科学第二講座 (主任:宮崎逸夫教授)

野 島 直 巳

腹膜播種性転移は胃癌における再発・死亡の最も多い原因の一つであるが、その成立に関して今まで十分に明らかにされていなかった。本研究は、ヒト胃癌腹膜播種モデルの確立をもとに腹膜播種形成過程の解明を目的とした。7種の胃癌培養細胞株の皮下腫瘍を腹腔内に接種したところ、MKN-45細胞株では、6代目よりヌードマウスの100%に血性腹水を伴う腹膜播種の形成を認めた。この腹膜高転移細胞株をMKN-45-P細胞と名付け、この細胞の腹腔内移植後の癌細胞および腹膜における分子生物学的、形態学的変化につき検討した。腹腔内移植後、どの腹膜に微小転移が出現するかをみるため、PCR法を用いてヌードマウス腹膜へのヒト癌細胞の転移を検出した。マウス腹膜各部位から採取したDNAのヒト β -グロビン関連配列部位を増幅させ、電気泳動後、そのシグナルをサザンブロット法で検出した。大網においては、1日目からヒト β -グロビンの強いシグナルが認められ、日をおって増強した。また、ダグラス窩、腸間膜、および卵巣では、ヒト β -グロビンのシグナルは1日目に検出されるが、3日目に一時的に減弱し、7日目からは増加を示した。横隔膜と壁側腹膜ではヒト β -グロビンのシグナルは7日目および14日目より増強を示したが、小腸と大腸におけるヒト β -グロビンのシグナルは全くみられなかった。また、形態学的推移は走査型電子顕微鏡および光学顕微鏡により検討した。組織学的には、大網およびダグラス窩において、癌細胞は乳斑(milky spot)に転移し、増殖していた。横隔膜において、MKN-45-P細胞接種3日目より stomata (stomata) の径および数が増加し、拡大した腹膜下リンパ管が認められた。7日目には癌細胞は stomata に接着し、腹膜下リンパ管へ侵入して腹膜播種を形成した。また、癌細胞接種12時間より、腹膜中皮細胞は丸みを帯び、その後互いに解離して中皮細胞の収縮により中皮細胞下の基底膜が露出するようになった。そして、癌細胞はその中皮細胞間の基底膜に接着しているのが観察された。以上より、乳斑、横隔膜 stomata、中皮細胞下の基底膜と癌細胞との接着という3つの腹膜播種形成過程が証明された。

Key words gastric cancer, peritoneal dissemination, milky spot, stomata

腹膜播種性転移は胃癌の非治療切除因子として重要であるだけでなく治療切除後の再発・死亡の原因として高率に認められる。現在、腹膜播種に対する有効な治療法はなく、この転移を制御することは胃癌治療の最も重要な課題の一つである^{1) 3)}。腹膜播種の最初の段階は原発巣から浸潤した癌細胞が漿膜表面に達し、そこから癌細胞が腹腔内へ遊離することから始まる。これらの遊離癌細胞が腹腔内を移動、腹膜表面に接着、腹膜下組織に侵入、増殖することにより腹膜播種が形成される。しかし、腹膜播種形成機構は十分に解明されていないのが現状である。腹膜播種の形成に重要な役割を果たしているものとして大網などが報告されている⁴⁾。しかし、今までにヒト胃癌細胞株を用いて腹膜播種形成過程を研究した報告はなかった。そこで著者は、ヌードマウスでヒト胃癌細胞株の腹膜播種モデルを新しく確立し、腹膜播種形成過程を分子生物学的、形態学的見地より検討した。

対象および方法

I. 動物

実験動物は、4から6週齢の雌 ICR nu/nu ヌードマウス (日

本クレア, 東京) を用いた。

II. 培養細胞株

ヒト胃癌由来培養細胞株 KATO III, KKLS, MKN-45, MKN-28 (Japanese Cancer Research Resources Bank-Cell Bank, 東京), TMK-1 (広島大学病理学, 田原榮一教授より供与), NKPS, NUGC-4 (金沢大学がん研究所外科, 磨伊正義教授より供与) の7株を用いた。いずれの細胞も RPMI 1640 (日本製薬, 東京) にペニシリン 100U/ml, ストレプトマイシン 100 μ g/ml (GibcoBRL, Grand Island, USA), および10%非動化牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (Gibco) を加えた培養液で37°C, 5% CO₂ 気相下で培養した。

III. 腹膜転移の成立

細胞株は 0.02% EDTA 加 0.25% トリプシンに短時間さらし、2度 RPMI 1640 で洗浄した。これらの腫瘍細胞浮遊液の 0.1ml (1 \times 10⁷ 個相当) をヌードマウスの背側肩甲部に皮下注射した。4週後、皮下腫瘍部を無菌下に採取し、ハサミで細片化して細胞浮遊液を作成した。これら細片組織は18ゲージの注射針を何度か通してから 1ml 注射筒に保管した。一匹のマウスに腫瘍細片

平成8年11月29日受付, 平成8年12月26日受理

Abbreviations: bp, base pair; CEA, carcinoembryonic antigen; FBS, fetal bovine serum; SEM, scanning electron microscope

約 100mg を腹腔内注入し、1 から 3 カ月間注意深く観察した。7 細胞株のうち NUGC-4, NKPS, MKN-45 が 6 から 8 週後に腹水の発生をみた (図 1)。腹水を採取、遠心分離した後、RPMI 1640 で 2 度洗浄し、沈殿した細胞で細胞浮遊液を作った。この細胞浮遊液から、癌細胞 1×10^7 個をヌードマウスの腹腔内に 21 ゲージ注射針で注入した。腹水を生じたマウスは犠牲死させ腹水内の癌細胞を継代した。また、腹水を生じないマウスは犠牲死させて、腹腔内をすべて観察した。

IV. PCR 法による MKN-45-P 転移巣の特異的検索

ヌードマウスの腹膜への微小転移を、Endo ら⁹⁾による PCR 法に従い検索した。10 代腹腔内で継代した腹膜転移細胞株 (後述する MKN-45-P) を腹腔内接種し、1, 3, 7, 14, 30 日目に各々 2 匹のヌードマウスを犠牲死させた。各部位の腹膜組織より DNA を抽出し⁸⁾, DNA のヒト β -グロビンに特異的な遺伝子配列の 576 塩基対 (base pair, bp) を特異的プライマーを用いて PCR 法にて増幅させ、サザンブロットハイブリダイゼーション法にて検索した。ヒト β -グロビンに対するセンスプライマー (Hu β -1) アンチセンスプライマー (Hu β -8) および特異的プローブ (Hu β -2) を図 2 に示した。マウス腹膜の各部位の DNA は、Hu β -1 および Hu β -8 をプライマーとして PCR を 25 サイクル行い増幅した。ヒト β -グロビンに特異なシグナルが

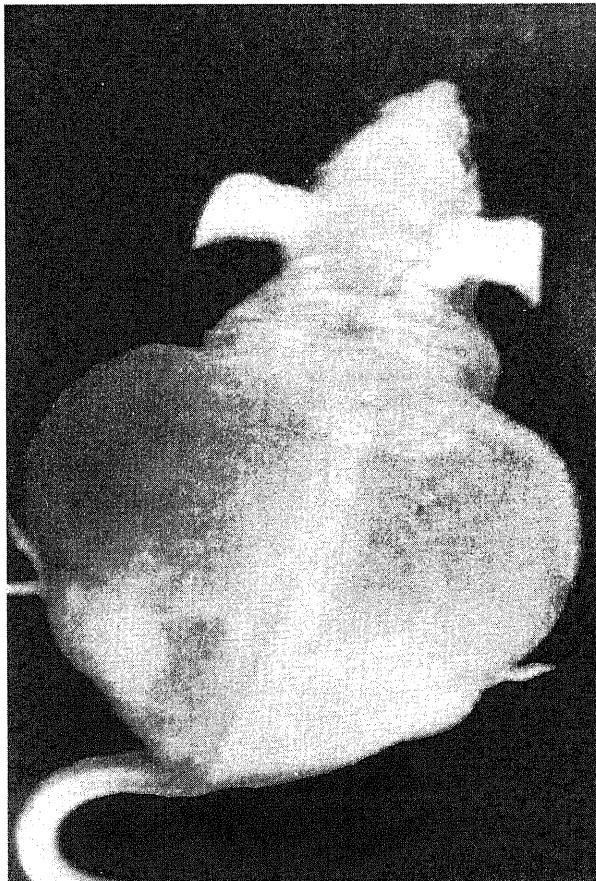


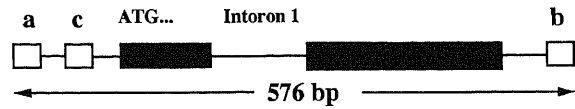
Fig. 1. A nude mouse on day 21 after intraperitoneal inoculation of MKN-45-P. New animal model of peritoneal dissemination is developed. Peritoneal dissemination with bloody ascites is found in 100% of nude mice after 6th generation of intraperitoneal inoculation.

サザンブロット法で認められた場合、その腹膜にはヒト由来の DNA すなわちヒト胃癌細胞が存在したことになり、このことからヒト癌のヌードマウスにおける微小転移を特異的に検出できる。

V. 腹膜転移細胞株における腹膜播種巣の光学および電子顕微鏡学的観察

1. 方法

10 代腹腔内で継代した腹膜転移細胞株 (後述する MKN-45-P) を腹腔内に 1×10^7 個接種の後、マウスをエーテル麻酔下に 4, 12 時間, 1, 2, 3, 5, 7, 14, 30 日目に犠牲死させた。犠牲死後直ちに、2.5% グルタルアルデヒドを 5cc 腹腔内注入し、5 分後にいくつかの腹膜を標本として採取し、2.5% グルタルアルデヒドで 4℃, 2 時間再固定した。1% 四酸化オスミウムで後固定し、50% から 100% の希釈系列のエタノールで脱水処理し、酢酸イソアミル液に浸した。臨界乾燥を行い⁹⁾, 白金蒸着後、腹膜表面を走査型電子顕微鏡 (scanning electron microscope, SEM) JSM-5400 型 (日本電子, 東京) で観察した。また、同部位の標本を 10% ホルマリン液で固定し、パラフィン包埋標本を作成した。



Primer

a; Hu β -1: 5'-AGAGCCATCTATTGCTTACA-3'
 b; Hu β -8: 5'-TATGACATGAACCTAACCAT-3'

Probe

c; Hu β -2: 5'-ACACAACCTGTGTTCACTAGC-3'

Fig. 2. Specific primers and a probe against human β -globin. The sense (Hu β -1) and anti-sense (Hu β -8) primers, and specific probe (Hu β -2) for human β -globin gene are shown. The amplified segment with Hu β -1 and Hu β -8 is 576 base pair. ATG. indicates the β -globin initiation codon and filled boxes indicate the β -globin encoding regions.

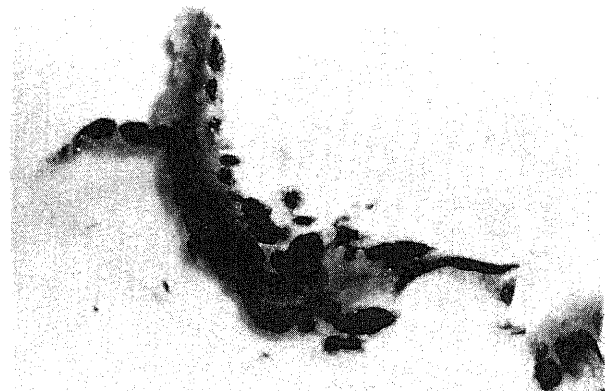


Fig. 3. Milky spots on the great omentum of the nude mouse, stained with activated carbon (CH-40). Milky spot which are aggregates of macrophages and lymphocytes on the peritoneal surface are visualized as black spots, because macrophages take activated carbon (CH-40) into their cytoplasm. $\times 50$.

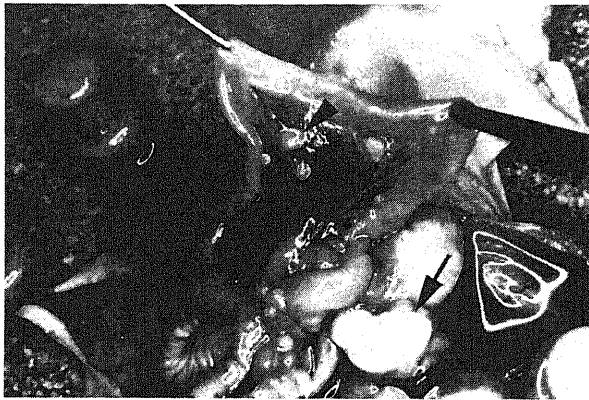


Fig. 4. Macroscopic findings of peritoneal dissemination in a nude mouse on day 14 after intraperitoneal inoculation of MKN-45-P. The cancer nodules are observed in omentum (arrow) and mesentery (arrowhead).

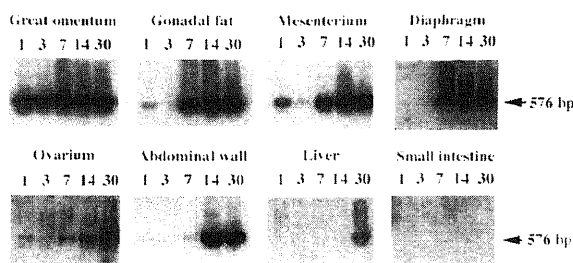


Fig. 5. Kinetics of growth of MKN-45-P in the different parts of the peritoneum. After inoculation of MKN-45-P intraperitoneally, two mice are sacrificed on day 1, 3, 7, 14, and 30. A human β -globin-related sequence (576bp) in the DNAs from each part of the peritoneum is specifically amplified by PCR and detected by Southern blot hybridization.

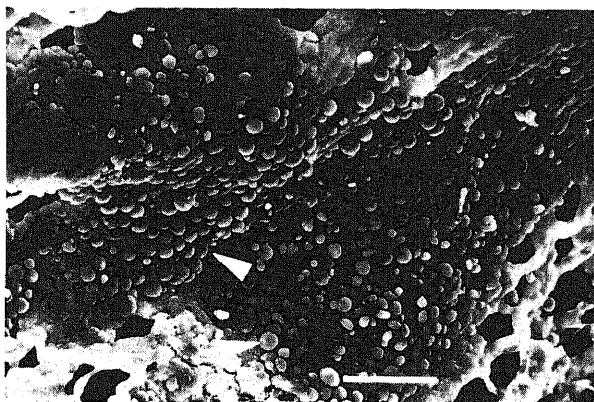
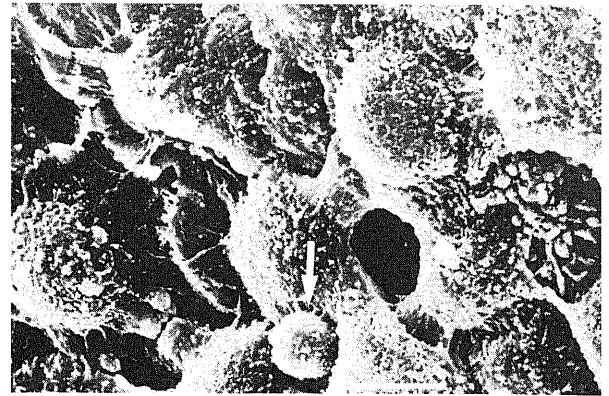


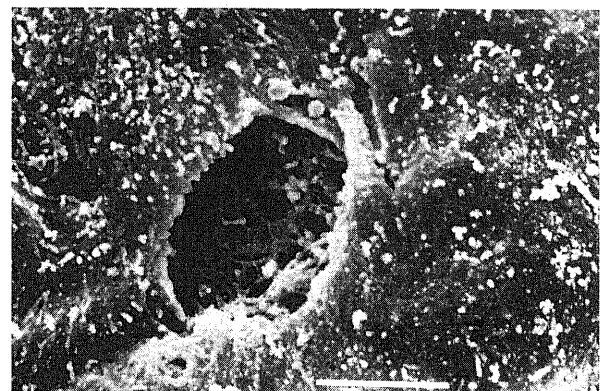
Fig. 6. Scanning electron microscopic (SEM) findings of the milky spot on day 2 after intraperitoneal inoculation of MKN-45-P. The diameter of milky spot is about 200 μ m. Many cancer cells (arrow) and inflammatory cells (arrowhead) aggregate on the surface of milky spot. $\times 350$. Bar, 50 μ m.

2. 抗癌胎児性抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) 抗体を用いた免疫組織化学染色

パラフィン標本より 5 μ m の切片を 2 つ作成し、脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼを不活化するために 0.3% 過酸



A



B

Fig. 7. SEM findings of the milky spot on day 3 after intraperitoneal inoculation of MKN-45-P. (A) On the surface of milky spot, small stomas of 5 to 10 μ m in diameter are found. Cancer cells (arrow) migrate through stomas of milky spot. $\times 3,500$ (B) By higher magnification of the stoma on milky spot, the inside of the stoma is partitioned with a cribriform structure. $\times 5,000$. Bar, 5 μ m.

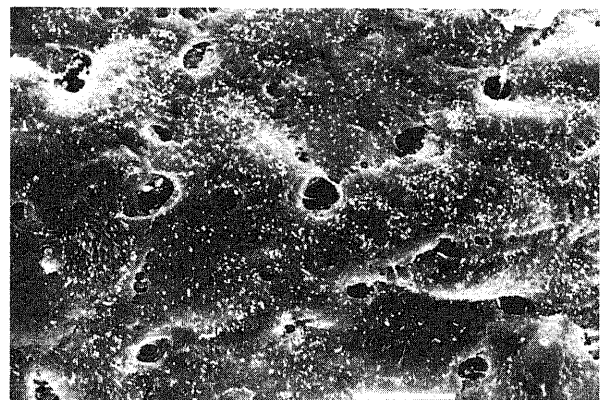


Fig. 8. SEM findings of the diaphragm on day 3 after intraperitoneal inoculation of MKN-45-P. Stomatas increase in number, and their diameter dilate. $\times 2,000$. Bar, 10 μ m.

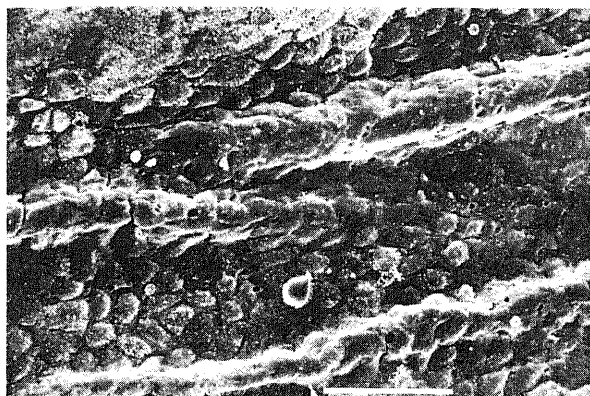


Fig. 9. SEM findings of the diaphragm on day 3 after intraperitoneal inoculation of MKN-45-P. Diaphragmatic stomatas are increased in diameter and number. The raised lineal structures which are arranged parallel are observed. $\times 500$. Bar, $50 \mu\text{m}$.

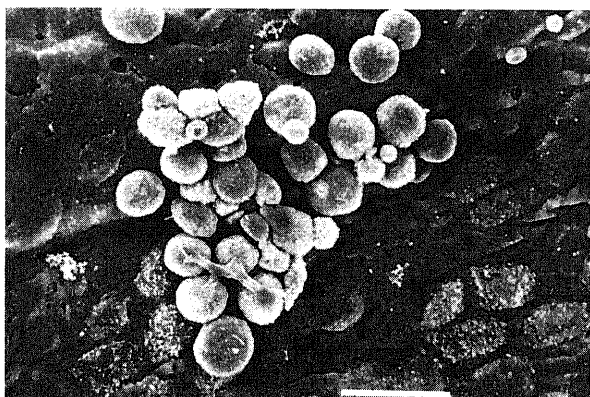


Fig. 10. SEM findings of the diaphragm on day 7 after intraperitoneal inoculation of MKN-45-P. Cancer cells adhere to the stomata and proliferate on the surface of the diaphragm. $\times 2,000$. Bar, $10 \mu\text{m}$.

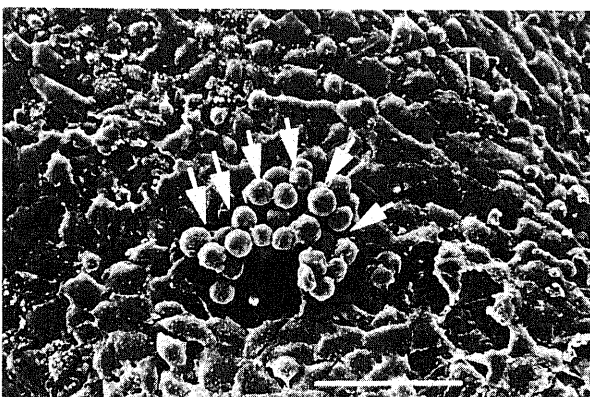


Fig. 11. SEM findings of the diaphragm on day 5 after intraperitoneal inoculation of MKN-45-P. Some stomatas are observed as huge pores of the diameter $30 \mu\text{m}$. Many cancer cells (arrows) are invading into the underlying lymphatic lacunae. $\times 500$. Bar, $50 \mu\text{m}$.

化水素水加メタノールに15分間浸透した。さらに、非特異的抗原抗体反応を防止するため正常ヤギ血清 (DAKOpatts, Copenhagen, Denmark) に20分間反応させた。その後、一次抗体として抗 CEA 抗体 (DAKOpatts) を 4°C で一晩反応させた。次いで、標識ストレプトアビジン ビオチン (labelled streptavidin biotin, LSAB) キット (DAKOpatts) を用いて標識二次抗体を反応させ、3,3' ジアミノベンチジン (Sigma, St. Louis, USA) でペルオキシダーゼ反応による発色を行った。0.3% メチルグリーンにて核染色を行い、脱水封入した。他の切片は HE 染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。

3. 腹膜表面の乳斑 (milky spot) および横隔膜のストマータ (stomata) の染色法

腹膜の乳斑および横隔膜のストマータは腹腔内の液体や異物の吸収のための小孔で、活性炭である CH40TM を腹腔内注入することによってその部位を観察できる。腹腔内の大食細胞およびリンパ球は、その細胞質内に活性炭を取り込み、乳斑に集まるため乳斑は大網上で肉眼的に黒い点として確認できる (図3)。マウスには犠牲死させる2日前に活性炭 10mg を 1ml の生理食塩水に希釈して腹腔内注入した。



Fig. 12. SEM findings of the diaphragm on day 7 after intraperitoneal inoculation of MKN-45-P. Cancer cells (arrowhead) are observed in the lymphatic lacunae (arrows) which is shown in a cross section of the diaphragm. $\times 2,000$. Bar, $10 \mu\text{m}$.

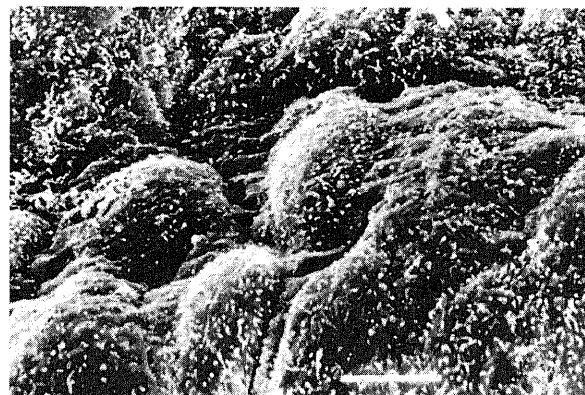


Fig. 13. SEM findings of normal diaphragm. Cell boundaries pack together and the microvilli on the mesothelial cells are small in number and are short in length. $\times 3,500$. Bar, $5 \mu\text{m}$.

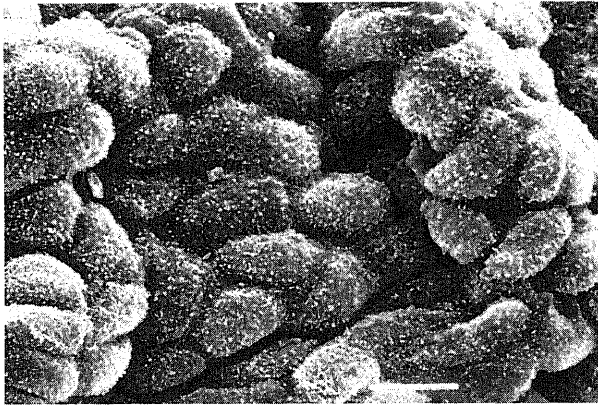
成 績

I. 高転移細胞株の確立

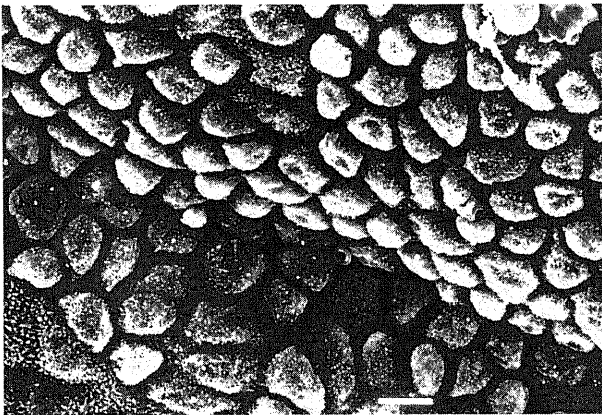
腹膜播種株は、TMK-1, MKN-28, KKLS, KATO-III 細胞接種ではみられなかったが、NKPS, NUGC-4, MKN-45 細胞の腹腔内注入により腹水および腹膜播種の発生をみた。腹膜播種の分布と肉眼形態はヒト胃癌の癌性腹膜炎の所見と極めてよく類似していた。MKN-45 細胞接種においては5世代まで18例中12例 (67%) が腹膜播種形成をみたにすぎなかったが、6世代からは接種した24例すべてのマウスにその発生をみた。MKN-45 腹水内癌細胞は現在まで、22世代に渡り継続されている。以上より、この細胞株を腹膜高転移細胞株 MKN-45-P と名付けた。

II. 腹膜播種の形成過程

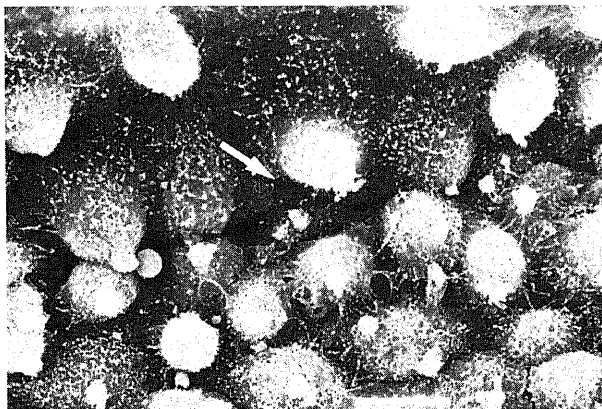
表1に腹膜各部における肉眼的に観察可能な腹膜播種の発生状態を示した。MKN-45-P 細胞接種により肉眼的に最も早期に転移がみられた腹膜は大網であった。大網への肉眼的転移は3



A



B



C

Fig. 14. SEM findings of the peritoneal surface. (A) On the 12 hr after intraperitoneal inoculation of MKN-45-P, the boundaries of mesothelial cells can be discernible. $\times 1,500$ (B) On the 24 hr after intraperitoneal inoculation of MKN-45-P, the boundaries between mesothelial cells gradually begins to separate. $\times 1,000$ (C) On the 48 hr after intraperitoneal inoculation of MKN-45-P, submesothelial basement membrane (arrow) is exposed by the contraction of mesothelial cells. $\times 1,500$. Bar, $10\mu\text{m}$.

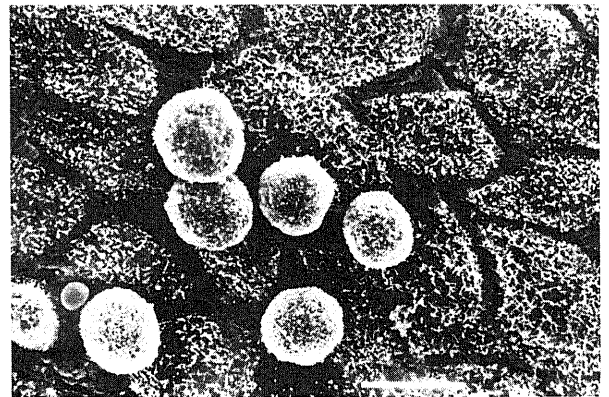


Fig. 15. SEM findings of the peritoneal surface on day 5 after intraperitoneal inoculation of MKN-45-P. Mesothelial cells become round and separate mutually, resulting in the exposure of the underlying connective tissue. Microvilli on the surface of mesothelial cells are increased in number and length. Cancer cells adhere on the exposed connective tissue between mesothelial cells. $\times 2,000$. Bar, $10\mu\text{m}$.



Fig. 16. SEM findings of the peritoneal surface on the liver. Surface on the peritoneum of the liver lacks the structure of milky spots, stomatas, and the naked area of submesothelial connective tissue. $\times 1,000$. Bar, $10\mu\text{m}$.

Table 1. Macroscopical evaluation of peritoneal dissemination after intraperitoneal inoculation of MKN-45-P

Days after inoculation	The number of detectable tumors in							
	Great omentum	Gonadal fat	Mesenterium	Diaphragm	Ovarium	Abdominal wall	Liver	Intestine
1	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-	-	-	-
5	+	-	-	-	-	-	-	-
7	#	+	+	+	-	-	-	-
14	#	#	#	#	-	+	-	-
30	#	#	#	#	+	#	-	-

-, not detected; +, a few tumors detected; #, numerous tumors detected.

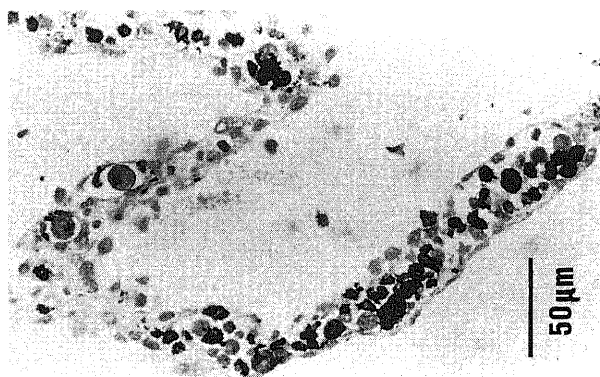


Fig. 17. Immunohistochemical staining for CEA in a mouse great omentum on day 3 after intraperitoneal inoculation of MKN-45-P and 2 days after intraperitoneal inoculation of activated carbon (CH-40). Cancer cells in the milky spot is detected by CEA staining and activated carbon (CH-40). Milky spots are detected as the aggregation of macrophages taking activated carbon in their cytoplasm.

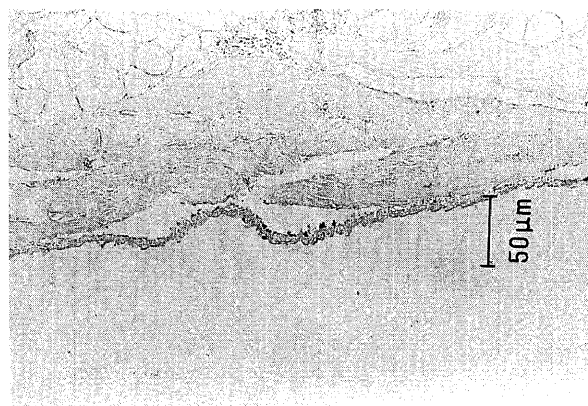


Fig. 19. Immunohistochemical staining for CEA in a mouse diaphragm on day 5 after intraperitoneal inoculation of MKN-45-P. The lymphatic lacunae under the diaphragmatic mesothelial cells is seen.



Fig. 18. Immunohistochemical staining for CEA in a mouse great omentum on day 5 after intraperitoneal inoculation of MKN-45-P and 2 days after intraperitoneal inoculation of activated carbon (CH-40). Cancer cells proliferate in the milky spots.

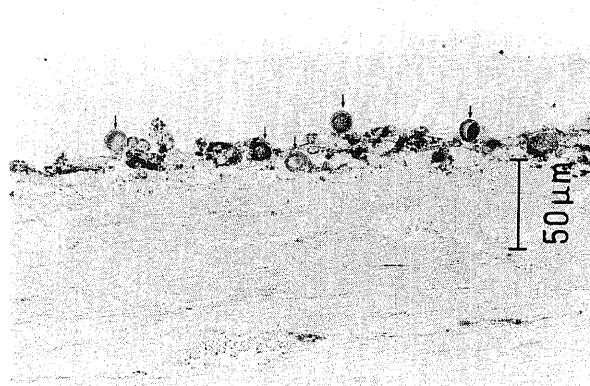


Fig. 20. Immunohistochemical staining for CEA of the diaphragm in a nude mouse on day 7 after intraperitoneal inoculation of MKN-45-P. Cancer cells (arrows) invade into the lymphatic lacunae underlying the diaphragmatic mesothelium. Activated carbon is observed in the lymphatic lacunae.

日目よりみられ、続いて横隔膜、ダグラス窩、および腸間膜に7日目より MKN-45-P 細胞の転移がみられた(図4)。壁側腹膜への転移は14日目からみられたが、腸管および肝表面の腹膜には30日目にも転移はみられなかった。卵巣への転移は30日目の時点で観察された。

Ⅲ. ヒト β -グロビンを用いた PCR 法による微小転移の検索

ヒト β -グロビン遺伝子に対する特異的なプライマーを用いた PCR 法による MKN-45-P 細胞の転移状態を図5に示した。1日目には MKN-45-P 細胞は組織学的にも検出できないが、大網においては1日目からヒト β -グロビンの強いシグナルが認められ、そのシグナルは日をおって増強した。また、ダグラス窩、腸間膜、および卵巣でのヒト β -グロビンのシグナルは1日目に検出されるが、3日目に一時的に減弱し、7日目からは増加を示した。横隔膜と壁側腹膜ではヒト β -グロビンのシグナルは7日目および14日目より明らかに増強を示したが、小腸と大腸の腹膜におけるヒト β -グロビンのシグナルは30日目まで全くみられなかった。

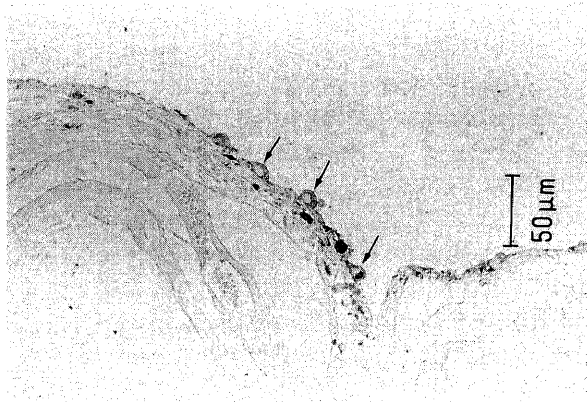


Fig. 21. Immunohistochemical staining for CEA of the diaphragm in a nude mouse on day 7 after intraperitoneal inoculation of MKN-45-P. Cancer cells (arrows) attach to the surface of diaphragm. Mesothelial cells become round in shape, and cancer cells attach to the space between the hemispherical mesothelial cells.

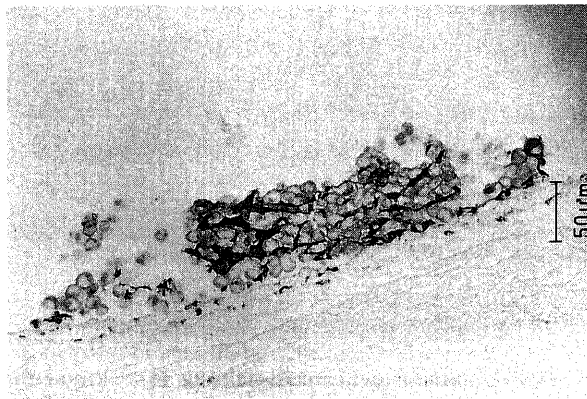


Fig. 22. Immunohistochemical staining for CEA of the diaphragm in a nude mouse on day 7 after intraperitoneal inoculation of MKN-45-P. Cancer cells proliferate on the diaphragm, accompanying with stroma and vasculature.

Ⅳ. 腹膜および MKN-45-P 細胞の SEM 像

大網には、乳斑 (milky spot) とよばれるリンパ装置があり、MKN-45-P 細胞接種2日後より癌細胞が乳斑に転移している像が認められた(図6)。乳斑表面には小孔があり、そこから癌細胞が進入している像が認められ(図7A)、その小孔から見える乳斑内には格子構造が観察された(図7B)。

一方、横隔膜表面には中皮細胞の接合部の間に直径 3-6 μ m の小さな穴が多数観察された(図8)。この細胞間隙の小孔は stomata (stomata) とよばれるもので、これら stomata は横隔膜および壁側腹膜の後上部に認められた。MKN-45-P 細胞接種後、3日目からは stomata の径および数が増し、これら stomata とともにいくつもの線状の隆起が観察された(図9)。7日目には、癌細胞は stomata そのものに吸着し、横隔膜表面上で増殖している像が認められた(図10)。また、横隔膜の中には直径 30 μ m にも達する巨大な stomata も存在し、癌細胞

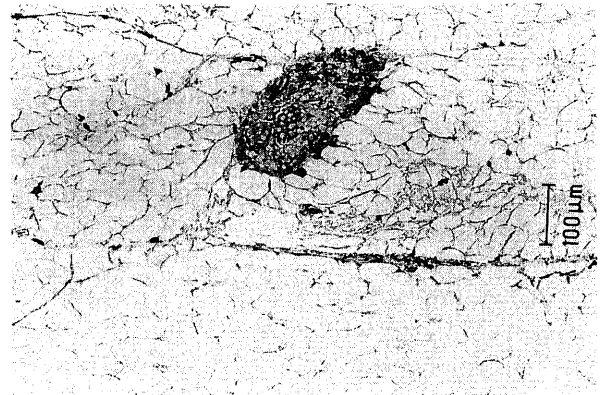


Fig. 23. Immunohistochemical staining for CEA of the gonadal fat in a nude mouse on day 7 after intraperitoneal inoculation of MKN-45-P. Cancer cells are growing in the milky spot of the gonadal fat.

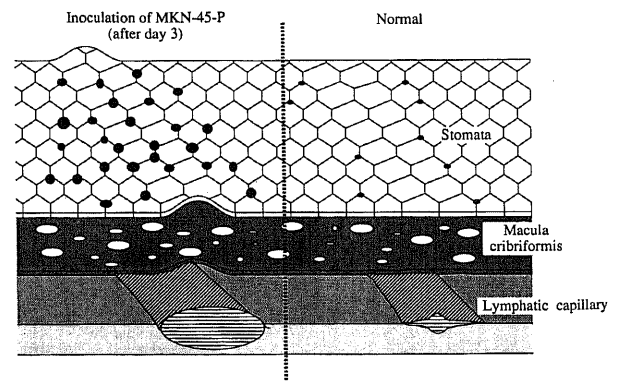


Fig. 24. Schema of the diaphragmatic lymphatic system. Pores called stomatas are found between the mesothelial cells, and can hardly be recognized in the normal condition. From day 3 after intraperitoneal inoculation of MKN-45-P, diaphragmatic stomatas and submesothelial lymphatic capillary become to dilate in diameter. Beneath the diaphragmatic mesothelium, there is a cribriform structure named macula cribriformis with many pores, which connect the stomata and underlying lymphatic capillaries.

が集塊をなして中皮下リンパ管へ侵入する像が認められた(図11)。図12には横隔膜の剖面像を示すが、中皮細胞の下にはリンパ管間隙があり、同部位に癌細胞が認められる。

つぎに、図13に示すように、正常横隔膜表面の腹膜中皮細胞は表面が平滑で、細胞間の境界も明らかではない。しかし、MKN-45-P細胞接種後12時間より中皮細胞は丸みを帯びて、各々が分離するようになり、48時間後には、中皮下の基底膜の露出がみられた(図14 A, B, C)。しかも、中皮細胞表面の微小突起は数と長さが増加していた。この早期の段階では癌細胞は腹膜面に認められなかったが、3日目以降の大網、横隔膜、壁側腹膜において、癌細胞は中皮細胞間隙の基底膜の露出した部分に接着していた(図15)。一方、小腸および肝表面の腹膜は、観察した範囲では転移を認めず、構造上も他の腹膜と全く異なっていた(図16)。すなわち、乳斑、ストマータを認めず、中皮細胞の開裂も明らかでなかった。

V. 腹膜での移植 MKN-45-P 細胞の組織学的所見

最も早期より転移の見られた大網では、3日目の時点で、細胞質内に活性炭を取り込み黒く染色されたマクロファージとともに CEA 染色陽性の MKN-45-P 細胞が乳斑の中皮下リンパ管内に認められた(図17)。そして、5日目には癌細胞は乳斑内で増殖し、その径は3-5mmに達した(図18)。次に、横隔膜では5日目より、SEM でみられた拡大した横隔膜中皮下にあるリンパ管(腹膜下リンパ管)が認められた(図19)。7日目に癌細胞は、横隔膜中皮下リンパ腔内に侵入し、腹腔内注入された活性炭を貪食したマクロファージと活性炭そのものが腹膜下リンパ管内に観察された(図20)。正常マウスにおいてこれらリンパ管の径は光学顕微鏡では全く鑑別できない程小さいが、癌細胞の接種5日目より、その径を増すため光学顕微鏡像においても明らかとなった。14日目には癌細胞は中皮細胞下へ侵入し、宿主由来の線維芽細胞、血管、炎症細胞とともに大きな腹膜播種を形成して増殖していた。また、乳斑、横隔膜ストマータを介する転移とは別に、7日目の横隔膜表面では癌細胞が接着して観察され(図21)、あるいは横隔膜上で増殖し結節を形成した(図22)。壁側腹膜および腸間膜においては、7日目に図10と同様に表面に結節を形成して増殖していた。ダグラス窩において、癌細胞は活性炭で染色されたマクロファージとともに乳斑内に観察された(図23)。

考 察

今回の研究で、腹膜各部位の転移形式における部位特異性を明確にできた。そして腹膜播種形成において少なくとも3つの過程が観察された。第1の腹膜播種形成過程は乳斑に関連するもので、第2は横隔膜と壁側腹膜でのストマータを介するもの、第3には腹膜中皮細胞の収縮により露出した基底膜への癌細胞の接着という過程であった。

腹膜のなかで、大網は移植腫瘍を吸着する最初の部位として働いていると考えられる。動物モデルによる検討で、腹膜播種形式は使われた細胞株によって異なっているが、大網は最初に転移する部位として報告されている⁴⁾⁹⁾¹¹⁾。

今回の PCR 法を用いた感度の高い検索⁹⁾⁷⁾においても、MKN-45-P 細胞のシグナルは、すでに腹腔内注入後24時間で大網内で検出された。それに対して横隔膜、ダグラス窩、壁側腹膜ではヒト由来の DNA シグナルは3日目や7日目と遅れて検出された。卵巣癌の微小転移が病期の早い時期から大網にみられるこ

ともよく知られている¹²⁾。また、漿膜表面に浸潤した胃癌ではしばしば大網への転移がみられ、大網切除術は胃癌根治術の主要な手技とされている¹³⁾。

大網は、腹腔から乳斑を介して異物、腹水や腹腔内に出現したリンパ球を吸収する機能を持っている¹⁴⁾。したがって、乳斑は癌細胞が腹腔から腹膜下に侵入する最初の通路になると考えられている⁹⁾¹⁰⁾。Hagiwara らは乳斑は、部位特異的に分布し、なかでも大網は多くの乳斑を持つと報告している⁹⁾。ヌードマウスにおいて乳斑はダグラス窩、壁側腹膜、腸間膜にも存在するがその数は大網のそれに比べて非常に少ない⁹⁾。Hagiwara らはまた、腹腔内に接種された P388 白血病細胞は特異的に乳斑に転移し、P388 白血病細胞の部位特異的浸潤が乳斑の分布と一致したと報告している⁹⁾。本研究でも、ダグラス窩において、活性炭を取り込んだマクロファージが集めた乳斑内に MKN-45-P の初期転移巣をみた。乳斑内に浸潤した癌細胞は乳斑内の格子構造のため、移動することなく、乳斑内で大きな転移巣を形成する。

今回の研究で、横隔膜のストマータが腹膜播種形成に密接に関連していることも明確となった。横隔膜および上部壁側腹膜に分布するストマータは、呼吸の吸気時の陰圧によって物質、リンパ球系細胞や腹腔内液を吸収するのに重要な役割を果たしている¹⁵⁾。ストマータは腹膜下リンパ管¹⁶⁾に連絡し、ストマータの中皮細胞とリンパ管内皮細胞で作られた一方向弁(one way valves)と吸気の陰圧の存在が液体の横隔膜中皮下リンパ腔への求心性の吸収を導くと考えられる¹⁷⁾¹⁸⁾。今回の観察でも、MKN-45-P 細胞は、まずストマータに吸着し、その後癌細胞は腹膜下リンパ管に侵入した。MKN-45-P 細胞のストマータへの最初の接着は、呼吸運動により生ずる陰圧により、ストマータを介して吸収されることにより引き起こされる可能性がある。ストマータの直径は癌細胞が中皮下リンパ腔へと侵入していくには決して大きいものではないが、中皮細胞の変形と癌細胞の自己運動能により容易に癌細胞は腹膜下リンパ管へ侵入すると推察できる。また、鳥田¹⁹⁾は中皮下結合組織内に篩状斑(Macula cribriformis)なる構造があり、脈管外通路として腹腔内からリンパ管までの吸水路として機能するとしている。今回の観察で、ストマータは MKN-45-P 細胞接種による腹腔内の炎症と炎症による水分吸収の増加のため、その数および径を増し、結果として中皮下リンパ管も拡張して腹膜面に隆起として確認できるようになった(図24)。ストマータには直径 30 μm にも達する巨大なものもあり、ストマータの直径は 1-30 μm と報告されている¹⁹⁾ことから、このようなストマータは癌細胞の格好の侵入経路となるうる。実際に7日目には癌細胞は、ストマータを通じて中皮細胞下リンパ管毛細管に侵入し、腹膜表面で増殖するものもみられた。ヒトにおいて、ストマータは横隔膜の筋性部および腱性部のみ認められ、骨盤内や壁側腹膜にはみられない²⁰⁾。この観点から、ストマータは、ヒトにおいて横隔膜上で腹膜播種形成に大きな役割を果たしている可能性がある。

第3の腹膜播種形成過程は中皮細胞下の基底膜露出面に癌細胞が接着するものであり、この現象は MKN-45-P 細胞接種5日前後より認められた。まず、癌細胞接種後12時間より中皮細胞は丸みを帯び、48時間後には、中皮細胞の間隙より基底膜の露出がみられる。Kiyasu らは、胃癌患者の腹膜においても、腹膜播種動物モデルにおいても、腹膜への癌細胞の接着の前に中皮細胞の収縮、剥落が常に観察されると報告している²¹⁾。大網

乳斑やストマータが癌細胞の転移により腹膜の水分吸収という本来の機能が失われる移植5日目頃には、腹水が出現し始める。この腹水中にはサイトカインをはじめとする炎症起因为物質を多く含み、腹膜中皮の収縮に関与していることも考えられる。これら腹膜中皮障害は細菌性腹膜炎やアキストランの注入でも観察されている²²⁾。Kimuraら²³⁾は蛋白分解酵素が腹膜中皮細胞間の強い結合を破壊していると推察しているが、現在まで中皮細胞を収縮させる物質については知られていない。中皮細胞が収縮した後、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニン、IV型コラーゲン等で構成される基底膜および、細胞外基質 (extracellular matrix) が露出する。これらの細胞外基質構成蛋白はインテグリンファミリーのリガンドとして知られている²⁴⁾²⁵⁾。インテグリンは、細胞と細胞間、細胞と細胞外基質との反応に関与するヘテロダイマーレセプターのスーパーファミリーを形成している。また、細胞極性や細胞運動の調節におけるインテグリンの主な役割についても明らかになってきている²⁶⁾²⁸⁾。インテグリンの発現は癌細胞の浸潤、転移能を増強するものと推察されている。Nataliらはラミニンレセプターの1つである $\alpha 6/\beta 4$ インテグリンは乳癌の血行性転移に重要な役割を果たしていると報告している²⁷⁾。ところで、我々はすでに低転移細胞株に比べて MKN-45-P 細胞では $\alpha 2$, $\alpha 3$ インテグリンの高発現がみられたことを確認している²⁹⁾。これらの結果から、インテグリンファミリーは、収縮した中皮細胞間の基底膜露出面への癌細胞の接着に大きな役割を果たしていると推察される。一方、最後まで転移のみられなかった小腸・肝表面の腹膜は、SEM像で他の腹膜と構造が全く異なっていた。すなわち、乳斑やストマータ等の構造はなく、基底膜が露出する部位もみられなかった。このことが小腸・肝表面の転移頻度の低さを物語っていると考えられた。腹膜播種を起し易い腹膜を腹膜全摘術 (peritonectomy) などで予防的選択的に切除することにより腹膜播種に対する外科的治療ができる可能性がある³⁰⁾。さらなる研究にて腹膜播種の形成機構を明確にするべきである。

結 論

ヌードマウスにヒト胃癌細胞株 MKN-45 細胞を皮下移植し形成した腫瘍を細切、腹腔内移植し、それによりできた腹水中癌細胞の継代を続けることにより、腹膜高度転移株 MKN-45-P を樹立した。この腹膜播種転移モデルを用いて腹膜各部位におけるヒト β -グロブリンの DNA 検出と SEM および光学顕微鏡による転移形態の観察を行い、以下の結論を得た。

1. 第1の転移経路として最も早期に出現する大網に多数存在した乳斑を介するものが認められた。大網においては1日目からヒト β -グロブリンの強いシグナルが認められ、そのシグナルは日をおって増強した。活性炭の腹腔内投与にて大網の乳斑は肉眼的に黒い点として認められ、その内部に組織学的にも MKN-45-P 細胞を認めた。乳斑は移植腫瘍を吸着する最初の部位として働いていると考えられた。

2. 第2の転移経路として、横隔膜および壁側腹膜の後上部に存在するストマータを介するものが認められた。横隔膜ではヒト β -グロブリンのシグナルは7日目より増強を示した。ストマータは中皮細胞の接合部にみられる $3\mu\text{m}$ から $30\mu\text{m}$ の小さな穴で、これらは横隔膜中皮下にあるリンパ管 (腹膜下リンパ管) と連結していた。腹膜下リンパ管は MKN-45-P 細胞接種により拡張して腹膜面に隆起として観察された。7日目には癌細胞

はストマータに接着し、腹膜下リンパ管へ侵入し、その後転移巣を形成した。

3. 第3の転移経路として腹膜中皮細胞の収縮後に露出した基底膜に癌細胞が接着するものが認められた。正常の腹膜中皮細胞は表面が平滑で、細胞間の境界も明らかではないが、MKN-45-P 細胞接種12時間後より中皮細胞は丸みを帯び、各々が分離するようになり、結果として中皮下基底膜の露出がみられ、3日目には癌細胞はその基底膜の露出した部分に接着していた。この転移形式は接着分子とそのリガンドの相互作用によるものと推察された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師宮崎逸夫教授に深甚なる謝意を表します。また、終始直接御指導を賜りました金沢大学第二外科米村 豊講師、御助言と御指導を賜りました金沢大学がん研究所化学療法部佐々木琢磨教授、遠藤良夫助手、金沢大学第二外科藤村 隆助手、ならびに金沢大学医学部電子顕微鏡部山口綾技官に深く感謝の意を表します。さらに、御協力を頂きました金沢大学第二外科教室の諸先生方に厚くお礼を申し上げます。

なお、本論文の要旨の一部は第47回日本消化器外科学会総会 (1996, 大阪)、第34回日本癌治療学会総会 (1996, 東京) において発表した。

文 献

- 1) Yonemura Y, Sawa T, Kinoshita K, Matsuki N, Fushida S, Tanaka S, Ohoyama S, Takashima T, Kimura T, Fujimura T, Shima K, Miyazaki I. Neoadjuvant chemotherapy for high-grade advanced gastric cancer. *World J Surg* 17: 256-262, 1993
- 2) Yonemura Y, Fujimura T, Fushida S, Takegawa S, Kamata T, Katayama K, Kosaka T, Yamaguchi A, Miwa K, Miyazaki I. Hyperthermo-chemotherapy combined with cytoreductive surgery for the treatment of gastric cancer with peritoneal dissemination. *World J Surg* 15: 530-536, 1991
- 3) Shiu MH, Fortner JG. Intraperitoneal hyperthermic treatment of implanted peritoneal cancer in rats. *Cancer Res* 40: 4081-4084, 1980
- 4) Lawrance RJ, Loizidou M, Cooper AJ, Alexander P, Taylor I. Importance of the omentum in the development of intra-abdominal metastasis. *Br J Surg* 78: 117-119, 1991
- 5) Hagiwara A, Takahashi T, Sawai K, Taniguchi H, Shimotsuma M, Okano S, Sakakura C, Tsujimoto H, Osaki K, Sasaki S, Shirasu M. Milky spot as the implantation site for malignant cells in peritoneal dissemination in mice. *Cancer Res* 53: 687-692, 1993
- 6) 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
- 7) Endo Y, Saiki M, Uchida H, Noguchi M, Kida Y, Sato H, Mai M, Sasaki T. Experimental metastasis of oncogene-transformed NIH 3T3 cells in chick embryo. *Jpn J Cancer Res* 83: 274-280, 1992
- 8) Davis LG, Dibner MD, Battley JF. *Basic Methods in Molecular Biology*, 1st ed, p4-43, Elsevier Science Publishing Co. Inc., New York, 1986
- 9) Tanaka K, Iino A. Clinical point drying method using dry ice. *Stain Technol* 49: 203-206, 1974

- 10) Shimotsuma M, Kawata M, Hagiwara A, Takahashi T. Milky spots in the human greater omentum. *Acta Anat* 136: 211-216, 1989
- 11) Buck RC. Welker 256 tumor implantation in normal and injured peritoneum studied by electron microscopy, and autoradiography. *Cancer Res* 33: 3181-3188, 1973
- 12) Piver MS. Ovarian carcinoma—A decade of progress. *Cancer* 54: 2706-2715, 1984
- 13) Rubesin SE, Levine MS. Omental cakes: clonic involvement by omental metastasis. *Radiology* 154: 593-596, 1985
- 14) Walker FC. The prospective function of the greater omentum. *Ann R Coll Surg Engl* 33: 282-306, 1963
- 15) Tsilibary EC, Wissing SL. Lymphatic absorption from the peritoneal cavity: Regulation of patency of mesothelial stomata. *Microvasc Res* 25: 22-39, 1983
- 16) Allen L. The peritoneal stomata. *Anat Rec* 67: 89-103, 1936
- 17) Mironov VA, Gusev SA, Bradi AF. Mesothelial stomata overlying omental milky spot: Scanning electron microscopic study. *Cell Tissue Res* 201: 327-330, 1979
- 18) 島田達生. 脈管外液路の構造と機能. *リンパ学* 18: 1-13, 1995
- 19) Negrin D, Mukenge S, Fabbro MD, Gonano CG, Niserocchi G. Distribution of diaphragmatic lymphatic stomata. *J Appl Physiol* 70: 1544-1549, 1991
- 20) Chang LJ, Mun YS. Study on the ultrastructure of the peritoneal stomata in humans. *Acta Anat* 141: 26-31, 1991
- 21) Kiyasu Y, Kaneshima S, Koga S. Morphogenesis of peritoneal mesothelial in human gastric cancer. *Cancer Res* 41: 1236-1239, 1981
- 22) Kaufman OY, Rostovshchikov AS, Kranchev AK, Paukov VS. Response of peritoneal mesothelial cells in rats with aseptic and bacterial peritonitis. *Bull Exp Biol Med* 94: 100-104, 1982
- 23) Kimura A, Koga S, Kudoh H, Iitsuka Y. Peritoneal mesothelial cell injury factors in rat cancerous ascites. *Cancer Res* 45: 4330-4333, 1985
- 24) Albelda SM, Buck CA. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* 4: 2868-2876, 1990
- 25) Elices MJ, Urry LA, Hemler ME. Receptor for the integrin VLA-3: fibronectin, collagen, and laminin binding are differentially influenced by ARG-GLY-ASP peptide and by divalent cations. *J Cell Biol* 112: 169-181, 1991
- 26) Helmer ME. VLA proteins in the integrin family: Structure, functions and their role on leukocytes. *Ann Res Immunol* 365-400, 1990
- 27) Natali PG, Nicotra MR, Botti C, Mottolese M, Bigotti A, Segatto O. Changes in expression of $\alpha 6 / \beta 4$ integrin heterodimer in primary and metastatic breast cancer. *Br J Cancer* 66: 318-322, 1992
- 28) Yonemura Y, Endou Y, Yamaguchi T, Nojima N, Kawamura T, Fujimura T, Obata T, Kim BS, Miyazaki I, Sasaki T. Roles of VLA-2 and VLA-3 on the formation of peritoneal dissemination in gastric cancer. *Int J Oncol* 8: 925-931, 1996
- 29) Yonemura Y. Contemporary Approaches Toward Cure Of Gastric Cancer. *Surgical Techniques for Radical Gastrectomy and Procedures for Intraoperative Hyperthermo-chemotherapy*, 1st ed, p139-184, Maeda Shoten Co., Ltd., Kanazawa, 1996

Clarification of the Mechanisms of the Formation of Peritoneal Dissemination in Gastric Cancer Naomi Nojima, Department of Surgery II, School of Medicine, Kanazawa University, 920—J. Juzen Med. Soc., **105**, 834—844 (1996)

Key words gastric cancer, peritoneal dissemination, milky spot, stomata

Abstract

Peritoneal dissemination is one of the most common causes of recurrence and death in gastric cancer, but the mechanism of this metastasis has not been fully understood. The present study was performed to clarify the mechanisms of the formation of peritoneal dissemination through the establishment of an animal model for peritoneal dissemination. The subcutaneous tumors of seven gastric cancer cell lines were injected in to the peritoneal cavity of nude mice. In MKN-45, peritoneal dissemination with bloody ascites was found in 100% of nude mice up to the 6th generation. Therefore, this highly metastatic cell line to the peritoneum was called MKN-45-P. The molecular biological and morphological findings of the cancer cells and the mesothelial cells after intraperitoneal inoculation of MKN-45-P were examined. To examine where the micrometastasis was formed, PCR analysis was performed. A human β -globin-related sequence in the DNAs from various parts of the peritoneum in nude mouse was specifically amplified by PCR and detected by Southern blot hybridization analysis. Great omentum showed a strong signal of the amplified fragments of human β -globin gene from the 1st day and the signals gradually increased. The signals in the gonadal fat, mesentery, and ovarium could be weakly detected on the 1st day, transiently decreased on the 3rd day, and then increased after the 7th day. In the diaphragm and abdominal wall, each signal could be detected after the 7th day and 14th day. In contrast, small intestine or colon did not show any human β -globin signal up to the 30th day. The morphological changes were observed by the scanning electron microscope and light microscope. In the great omentum and the gonadal fat, cancer cells adhered to the milky spots and proliferated in the milky spots. In the diaphragm, stomata increased in number and diameter on the 3rd day. The lymphatic lacunae underlying the diaphragmatic mesothelium was dilated. Cancer cells adhered to stomatas, and invaded the lymphatic lacunae after the 7th day. Then, the mesothelial cells of the abdominal cavity became round and separated mutually after 12 hours. And the submesothelial connective tissue was exposed after the shrinkage of the mesothelial cells. Cancer cells were found to adhere to the connective tissue between mesothelial cells. These results indicate that the milky spot, the diaphragmatic stomata, and the adhesion between cancer cells and submesothelial connective tissue, contribute to the formation of peritoneal dissemination.