Balb/cマウスを用いた実験転移腫瘍系の構築と特異的DNA増幅反応を用いた肺自然転移細胞の検出に関する研究

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/2297/9131

金沢大学十全医学会雑誌　第104巻　第2号　270－282（1995）

Balb/c マウスを用いた実験転移腫瘍系の構築と特異的 DNA 増幅反応を用いた肺自然転移細胞の検出に関する研究

金沢大学医学部内科学第三講座（主任：松田　保教授）
又　野　禎　也

r/mHM-SFME-1 細胞は，12番目のアミノ酸がグリシンからバリンに置換された活性型ヒト *c-Ha-ras1* とマウス *c-myc* を SFME 細胞に導入して得た形質転換細胞株 (ras/myc-SFME 細胞) に，さらにネオマイシン耐性遺伝子を含むプラスミド pSV2neo を導入して確立された細胞で，Balb/c マウスで高い自然転移を起こすことが報告されている．本研究では，がんの遠隔転移の実験モデルとして本細胞が有用であるか否かと，微小転移の検出を特異的 DNA 増幅反応 (PCR 法) を用いて行うことができるか否かを明らかにすることを目的とした．そのため，まず本細胞をマウス足蹠に移植し，その後経時的に肺への遠隔転移を調べた．検出の方法としては，病理学的手法と PCR 法を用いた．PCR 法では，プライマーを活性型ヒト *c-Ha-ras1* のエクソン1の両端に設定し，エクソン1の128塩基対 (base pair, bp) を増幅した．その結果，病理学的に転移が証明された肺では，PCR 法でも目的遺伝子の増幅産物を検出することができ，転移細胞の検出は本方法でも可能であることが示された．次に，肺転移腫瘍細胞数を定量するため，液体培養から得た r/mHM-SFME-1 細胞より DNA を抽出し，制限酵素 Hind Ⅲ にて消化後，同制限酵素処理正常マウス肺 DNA と各種濃度にて混合し標準液とした．各検体を PCR 法にて増幅し，DNA ハイブリダイゼーションを行った後に増幅遺伝子産物の量を算定し，検量線を作成した．その結果，マウス1匹肺あたり 10^4 個以上の腫瘍細胞があれば PCR 法にて検出が可能であるという結論を得た．この結果については，制限酵素 EcoR Ⅰ を用いて検量線を作成した場合にも，ほぼ同様の検量結果が得られ，再現性を持つものであった．この検量線より転移腫瘍細胞数は移植14日目は 1.5×10^6 個であり，28日目では 4.0×10^6 個と推測された．以上の結果より，r/mHM-SFME-1 細胞は免疫欠損のないマウスを用いた実験転移モデルとして有用であり，また微小転移腫瘍の検出や未確認転移細胞の定量的な検出に PCR 法が有用であることが示された．

Key words　metastasis, PCR, quantification, r/mHM-SFME-1 cell, lung

現在日本人の死亡原因の第1位は悪性新生物である．しかし，診断技術の向上や，ドックなどの健康診断の普及に伴い，手術可能な早期癌の状態で発見される例が増えている．一方，発癌のメカニズムについては，分子生物学的手法の普及により種々の癌遺伝子や癌抑制遺伝子が発見され，現在その機能解析も進んでいる．また，治療面では，サイトカイン療法などの新しい支持療法の導入や，新種の抗癌剤の開発に加え，最近では遺伝子治療も一部の施設で試みられている．しかし，その反面，発見された時点で既に遠隔転移を伴っている症例や，手術後に再発する例，抗癌剤療法に反応しない例など，悪性腫瘍の克服にはまだ多くの問題が残っている．このような状況の中で，悪性腫瘍の特徴の一つである転移の問題が近年急速に脚光を浴び，多くの研究施設から高転移性細胞株の樹立や，転移の原因，評価，治療などに関する様々な知見が報告されている[1)~17)]．

現在頻用されている転移実験モデルには，癌細胞としてヒト材料[2)3)]を使ったものと，動物材料[4)~11)]を使ったものとがある．また，癌細胞の宿主としてはヌードマウスなどの免疫欠損を持つ動物が用いられている[2)~8)]．この場合は，ヒトを含めた異種の腫瘍を材料として使うことが可能であり，腫瘍の直接的な動態を調べるうえで極めて有用である．しかし，転移は癌細胞自体の持つ特性の他に，宿主の生体反応も関わっていると推測されており，今後転移に関する様々な研究が行われていくうえで考慮しなければならない問題点として残されている．これらを克服する方法は，全ての系を試験管内で行うことであろう．しかし，転移に関係する因子には，免疫能，細胞接着分子[18)19)]，細胞外マトリックス分解酵素[20)21)]，癌遺伝子[22)]，癌抑制遺伝子[23)24)]など多くのものがあり，しかもそれぞれが極めて複雑に絡み合っていると考えられるため，現段階では試験管内で行うことは極めて困難である．一方，従来，転移の評価は主として病理学的方法[6)7)25)26)]により行われてきた．この方法は簡便で，また視覚的説得性にすぐれ，広く普及している反面，ある程度以上の大きさの転移巣がないと同定が困難である点や，転移巣の大小，あるいは転移細胞数などについての評価は困難であり，定量的な面で問題点が残されている．

今回，r/mHM-SFME-1 細胞を用い，宿主動物体内での転移腫瘍細胞数の定量を試みた．本細胞は，SFME 細胞[27)]由来の細胞である．SFME 細胞は，Balb/c マウス由来であるが，造腫瘍

平成6年12月13日受付，平成7年2月21受理

Abbreviations: bp, base pair; DAPI, 4', 6-diamidino-2-phenylindole·2HCl; F/D, HAM 12F/Dulbecco's modified Eagle; PBS, phosphate-buffered saline; TAE, Tris acetate EDTA; TE, Tris EDTA

能を持たない細胞で，通常の細胞と異なり血清を含む培地の中では増殖できない．しかし，癌遺伝子により形質転換させると，血清を含む培地中での増殖が可能となり，分化能の消失とともに，表皮増殖因子に対する依存性が消失するという特徴を持っている[27]．さらに，形質転換細胞の造腫瘍性の有無を同系の Balb/c マウスを用いて検討することができるという特徴もある．このような形質転換細胞の一つの ras/myc-SFME 細胞[28]は，12番目のアミノ酸がグリシンからバリンに置換されたヒト活性型 *c-Ha-ras1* とマウス *c-myc* を SFME 細胞に導入して得られた細胞株である．この細胞に，さらにネオマイシン耐性遺伝子を含むプラスミド pSV2neo を導入して再度形質転換させた細胞を得た．この形質転換細胞を Balb/c マウスに移植したところ，高頻度に遠隔転移を起こす細胞の含まれていることが解った．この細胞をマウス生体内で継代したあと，軟寒天中でクローニングし，r/mHM-SFME-1 細胞を確立した[1)28)]．本細胞は，従来の転移実験系に用いられている細胞株と比較して，転移を解析するうえでより有用な系を提供する可能性が示唆される．

本研究は，まず，癌の遠隔転移のモデルとしての本細胞の有用性について検討した．次に，転移の評価法の一つとして特異的 DNA 増幅反応 (PCR 法)[30)31)]を用いて腫瘍細胞特異的遺伝子の検出が可能か否かについて検討した．さらに，PCR 法で腫瘍細胞に特異的なヒト *c-Ha-ras1* 遺伝子を増幅して検量線を作成することにより，肺に転移した腫瘍細胞量の定量化を試みた．以上を総合して，定量的意味を持たせた新しい転移腫瘍の評価法としての PCR 法の有用性，および問題点について明らかにすることを目的として以下の実験を行った．

対象および方法

Ⅰ．移植腫瘍細胞

ras/myc-SFME 細胞は，SFME 細胞[27]にヒト膀胱癌由来活性型 *c-Ha-ras1* およびマウス *c-myc* を導入して得られた細胞株で[28]，Balb/c マウスに腫瘍原性を示す．Nomura ら[1)]は，オレゴン州立大学 D. Barnes より供与された本細胞に，ネオマイシン耐性遺伝子を含むプラスミド pSV2neo を導入して，新たに r/mHM-SFME-1 細胞を確立した．この細胞は，Balb/c マウスで高い自然転移能を示すため[1)]，本研究で移植腫瘍細胞として使用した．全ての細胞は Loo ら[27]の原法に従った無血清培養により維持し，必要時に一部を 10% (v/v) 非働化ウシ胎児血清 (Flow Laboratories, Mc Lean, VA, USA) を加えたハム 12F/ダルベッコ変法イーグル培地 (HAM 12F/Dulbecco's modified Eagle medium, F/D 培地) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) を用いて，5%CO_2，37℃の条件下で培養し，実験に用いた．

Ⅱ．r/mHM-SFME-1 細胞の造腫瘍能の検定

液体培養より得た 1×10^6 個の r/mHM-SFME-1 細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) に浮遊させ，6週齢の Balb/c マウスの足蹠に移植した．その後，形成された移植腫瘍塊の最大径を，経時的にノギスを用いて計測し，Balb/c マウスに対する r/mHM-SFME-1 細胞の造腫瘍能を調べた．

Ⅲ．SFME 細胞，ras/myc-SFME 細胞，r/mHM-SFME-1 細胞からの DNA 抽出とヒト *c-Ha-ras1* の検出

1．高分子 DNA の抽出

前述の条件下の液体培養中の SFME 細胞，ras/myc-SFME 細胞および r/mHM-SFME-1 細胞を，PBS にて1回洗浄した．その後細胞に，0.1% トリプシン (Sigma Chemical Co.) と 0.2 mM EDTA (和光純薬，大阪) の混合液を 500μl 加えた．室温にて1分間放置して細胞を遊離させた後，大豆由来トリプシンインヒビター (Gibco, Grand Island, NY, USA) [最終濃度 100μg/ml] を作用させた．これに，10% (v/v) 非働化ウシ胎児血清を加えた F/D 培地を混ぜて，15ml ポリプロピレンチューブ (Corning Glass Works, Corning, NY, USA) に移した．4℃，3,000回転/分で5分間の遠心を行い，上清を吸引除去した後，さらに一度 F/D 培地で洗浄し，粒子計測器 (model ZBI, Coulter Electonic Inc., Hialeah, FL, USA) を用いて，細胞数を算定した．

4℃，3,000回転/分で5分間遠心して得た細胞に，5ml の溶解緩衝液 [100mM EDTA, 20mM Tris-HCl (Sigma Chemical Co.) pH8.0, 1%SDS (Sigma Chemical Co.)] および，プロテイナーゼ K (Merck, Dermstadt, Germany) 20mg/ml を 50μl を加え，攪拌した．氷上で10分間静置後，50℃の恒温槽に移し，酵素を12時間作用させて分解した．これに，5ml の飽和フェノール (半井，京都)・クロロフォルム (和光純薬)・イソアミルアルコール (和光純薬) (25: 24: 1) 混合液を加え，室温で40分間ゆるやかに攪拌した．15℃，3,000回転/分，20分間の遠心分離後，フェノール層を吸引除去した．同様の操作をさらに2回繰り返して DNA を抽出後，水飽和ジエチルエーテル (和光純薬) を加えて，室温で40分間処理した．遠心後，ジエチルエーテル層を吸引除去し，再度同様のジエチルエーテル処理を追加し，試料を透析用チューブ (三光純薬，東京) に移し，Tris-EDTA (TE) 緩衝液 [10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA] に対して3日間透析を行った．得られた DNA 溶液は，分光光度計 (モデル UV160，島津，京都) を用いて，260nm における吸光度 (OD) を測定し，1 OD を 50μg/ml として DNA 濃度を算出し，以後の検討に用いた．

2．制限酵素処理

各 10μg の DNA を制限酵素 Hind Ⅲ (ニッポンジーン，富山) または制限酵素 EcoR I (ニッポンジーン) を用い，以下の方法で消化した．

制限酵素 Hind Ⅲ 消化では，DNA 溶液とリボヌクレアーゼ A (Sigma Chemical Co.) 10mg/ml を 3μl，反応用緩衝液 [最終濃度 10mM Tris-HCl pH7.5, 7mM $MgCl_2$, 60mM NaCl] を混合し，制限酵素を加えた後37℃で消化した．制限酵素 EcoR I 消化では，DNA 溶液にリボヌクレアーゼ A 10mg/ml を 3μl，および反応用緩衝液 [最終濃度 100mM Tris-HCl pH7.5, 7mM $MgCl_2$, 50mM NaCl, 7mM 2-メルカプトエタノール (半井)，アセチル化ウシアルブミン (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD, USA) 50μg/ml] を加え，制限酵素を加えた後37℃で消化した．いずれも12時間後に，0.5mg/ml のエチジウムブロマイドを含む 1%HGT アガロースゲル (FMC Bioproducts, Rockland, ME, USA) にて 1×TAE 泳動用緩衝液 [最終濃度 40mM Tris-HCl pH8.0, 20mM 酢酸ナトリウム，2mM EDTA, 1.55% 酢酸] を用い反応液の一部を電気泳動した．消化不十分であったものはさらに制限酵素を追加し，完全に消化した．

制限酵素処理後は，反応液の半容量の飽和フェノール・クロロフォルム・イソアミルアルコール (25: 24: 1) を加えて，室温

にて処理した後，数回ジエチルエーテル処理を行った．ジエチルエーテル層を除いた後，第2ブチルアルコール(和光純薬)を用いて最終 100μl まで濃縮した．再度ジエチルエーテル処理を行った後，3M 酢酸ナトリウム pH6.0 (和光純薬) 10μl，氷冷エタノール (和光純薬) 275μl を加え，−80℃で一晩保存した．4℃，14,000回転/分，20分間の遠心を行い，上清を捨て，得られた沈澱を75%エタノールで洗浄し，減圧乾燥後 TE 緩衝液に溶解した．

3．DNA 濃度の算定

DNA 濃度の算定には 4',6-ヂアミヂノ-2-フェニルインドール 2塩酸 (4',6-diamidino-2-phenylindole·2HCl, DAPI)[32] を用い，DNA 溶解液 0.5μl と DAPI 試薬 (1mg/ml，ニッポンジーン) 40μl, TE 緩衝液 1960μl の混合液を作り，全自動蛍光光度計で DNA 濃度を算定した．コントロールとしては，制限酵素 Hae Ⅲ で消化した ΦX174 DNA と Sty Ⅰ で消化した λDNA の混合液 (9ng/μl，ニッポンジーン) 10μl を用いた．

4．プローブの調整

ヒト胎盤由来 *c-Ha-ras1* を含むプラスミド pUC18C[33] は JCRB 遺伝子バンクより供与を受けた．プラスミドを大腸菌 HB101 内で増殖させ，常法に従って精製後，制限酵素 Kpn Ⅰ および Sac Ⅰ によって消化した．その後，1.5%アガロース L (ニッポンジーン) 中で，1×TAE 泳動用緩衝液を用い 70V 1時間電気泳動し，919塩基対 (base pair, bp) のバンドを得て，ヒト *c-Ha-ras1* のエクソン1用のプローブとして用いた．プローブの標識は，ランダムプライマー DNA ラベリングキット (宝酒造，京都) を，用法に従い [α-^{32}P] dCTP (アマシャム・ジャパン，東京) で標識後エタノールで沈澱させ，TE 緩衝液に溶解して実験に使用した．

5．DNA ハイブリダイゼーション法

DAPI 法で算出した DNA 5μg にブロムフェノールブルーを加え，TE 緩衝液で最終的に 30μl に調整した．各試料は 0.5mg/ml のエチジウムブロマイドを含む1.2%アガロース S (ニッポンジーン) 上で，1×TAE 泳動用緩衝液を用い定電圧 80V で3時間電気泳動した．電気泳動の分子量マーカーには制限酵素 Hind Ⅲ で消化した λDNA (宝酒造) を用いた．電気泳動後のアガロースゲルに，トランスイルミネーターを用い 302nm の紫外線を4分間照射し，その後 0.25 N HCl に5分間浸した．蒸留水にて洗浄した後，アルカリ変性液 [0.4 N NaOH (和光純薬), 0.6 M NaCl] に浸して20分間振盪し，再度新しいアルカリ変性液に替え，同様の操作を繰り返した．再び蒸留水にて洗浄した後，20倍濃度の SSC (20×SSC) (1倍濃度の SSC=0.15 M NaCl, 0.015 M クエン酸ナトリウム) を加え，室温にて30分間の中和操作を行った．さらに，新しい中和液に替えて室温にて30分間振盪し，完全に中和させた．次いでペーパータオルを用いたキャピラリー法で，20×SSC を用いてナイロンメンブレンフィルター (Hybond-N, Amersham International plc, Buckinghamshire, UK) に転写した．DNA 転写後のナイロンメンブランフィルターは，5倍濃度の SSC (5×SSC) を用いて洗浄後，37℃で乾燥させた．302nm の紫外線を4分間照射した後，80℃ 3時間の減圧乾燥を行い，DNA をフィルターに固定した．このフィルターをシールドバッグ (コスモバイオ，東京) にいれ；5×SSC で一度浸漬した後，プレハイブリダイゼーション緩衝液 [最終濃度 5×SSC, 25mM NaH_2PO_4 pH7.0, 0.1% SDS, 0.1% フィコール (Sigma Chemical Co.), 0.1% ポリビニルピロリドン (Sigma Chemical Co.), 0.1% ウシ血清アルブミン (Sigma Chemical Co.)，変性サケ精子 DNA (Sigma Chemical CO.) 0.4mg/ml] を加え，42℃で12時間反応させた．その後シールドバッグ内の液を，ハイブリダイゼーション緩衝液 [最終濃度 5×SSC, 25mM NaH_2PO_4 pH7.0, 0.1% SDS, 0.1% フィコール，0.1%ポリビニルピロリドン，0.1%ウシ血清アルブミン，変性サケ精子 DNA 0.4mg/ml, 50% ホルムアミド (和光純薬)，プローブ DNA] に替え，さらに42℃で12時間反応させた．反応後のフィルターは，室温にて 5×SSC で一度洗浄し，その後 0.2×SSC と 0.1% SDS の混合液を用いて，42℃で15分間の浸漬を二回行い，余分なプローブを除去した．最後にX線フィルム (Kodak, NY, USA) を用いてフィルターのオートラジオグラフィーを行った．

Ⅳ．生存曲線

1×10^6 個の ras/myc-SFME 細胞および r/mHM-SFME-1 細胞を Balb/c マウスの背部皮下に移植した．ras/myc-SFME 細胞移植マウスは1群19匹，r/mHM-SFME-1 細胞移植マウスは1群12匹を使用した．腫瘍移植後経時的にマウスを観察し，各細胞移植後の各々のマウスの生存日数を調べ，生存曲線を求めた．

Ⅴ．肺転移腫瘍細胞の検定

1．自然転移

1×10^6 個の r/mHM-SFME-1 細胞を，1群5匹の Balb/c マウスの足蹠に移植した．腫瘍移植7日目，14日目，21日目および28日目に屠殺し，肺を摘出した．3匹からは，下記の方法を用いマウス肺 DNA を抽出し，以下に示す PCR 法を用いて転移腫瘍の有無を検討した．また，2匹から得た肺では，病理学的手法により転移の有無を検討した．また，別に 1×10^6 個の r/mHM-SFME-1 細胞を8匹および7匹の2群のマウス足蹠に移植し，それぞれ14日目および28日目に屠殺して，肺と腎臓を摘出した．両臓器より同様の方法にて高分子 DNA を抽出し，PCR 法を用いてヒト *c-Ha-ras1* エクソン1の増幅を行い，腫瘍細胞の転移の有無を調べた．

2．腫瘍移植肢切断マウスにおける肺転移腫瘍細胞の検出

1×10^6 個の r/mHM-SFME-1 細胞を，20匹の Balb/c マウス足蹠に移植した．腫瘍移植後7日，14日および21日にそれぞれ5匹ずつ腫瘍移植肢を切断した．他の5匹は切断せずに経過をみた．腫瘍移植後112日まで観察し，生存していた8匹 (腫瘍移植7日目腫瘍移植肢切断マウス3匹，14日目移植肢切断マウス2匹，21日目移植肢切断マウス1匹および移植肢非切断マウス1匹) から肺を摘出した．摘出した肺から下記の方法に従い高分子 DNA を抽出し，制限酵素 Hind Ⅲ で消化後，PCR 法でヒト *c-Ha-ras1* エクソン1の増幅を行った．そして，腫瘍移植肢切断状態，すなわち原発腫瘍部が切断され，原発巣からの腫瘍供給がない状態での肺転移腫瘍の有無を調べた．

3．高分子 DNA の抽出

腫瘍移植 Balb/c マウスより摘出した肺は，金属網上で薬サジを用いて細砕した．PBS に懸濁し，15ml のポリプロピレンチューブに移した．4℃，3000回転/分，5分間で遠心洗浄し，沈澱を得た．本沈殿より，前記の方法を用いて高分子 DNA を抽出した．また，別に非担癌マウス肺より，同様の方法にて DNA を抽出し，コントロールとした．

4．鋳型 DNA の調整

担癌 Balb/c マウス肺および非担癌 Balb/c マウス肺 DNA を

前記の条件で制限酵素 EcoR I または Hind III で完全に消化した．エタノールで沈澱させた後 TE 緩衝液に溶解し，DAPI 法を用いて DNA 濃度を算定した．

5．PCR 法

制限酵素 EcoR I，Hind III 消化後の DNA 1μg を鋳型として，PCR 反応用緩衝液［最終濃度 10mM Tris-HCl pH8.3, 1.5mM $MgCl_2$, 50mM KCl］，デオキシリボヌクレオチド混合液［dATP, dGTP, dCTP, dTTP (宝酒造) 最終濃度各 200μM］，(+) 鎖および (−) 鎖プライマー (図 1)[14] 溶液［最終濃度各 1μM］を加え，高圧蒸気滅菌した蒸留水を用い全量を 22.3μl に調整した．反応用チューブとしては高圧蒸気滅菌処理した 0.5ml 用チューブ (サイメディア，東京) を使用した．また，遺伝子増幅装置としては，プログラムコントロールシステム PC-700 (サイメディア) を用いた．遺伝子増幅反応は95℃で5分間加熱後，鋳型 DNA とプライマーを55℃で5分間結合させ，Perfect Match Polymerase Enhancer (Strategene, La Jolla, CA, USA) 2.5μl と Taq DNA ポリメラーゼ (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CA, USA) 1単位を加えた．その後，熱変性94℃，1分間，アニーリング55℃，1分間，DNA 合成72℃，2分間を1サイクルとして合計30サイクルの増幅を行った．反応終了後，72℃で10分間の処理を加え，4℃に保存した．

6．PCR 産物の検定

得られた PCR 産物が目的とする DNA 断片か否かを検討するため，得られた試料を制限酵素 Pvu II (宝酒造) で消化した．すなわち PCR 反応液の一部に，反応用緩衝液［最終濃度 10mM Tris HCl pH7.5, 7mM $MgCl_2$, 60mM NaCl, 7mM 2-メルカプトエタノール］および Pvu II 3単位を加え，37℃で30分間反応させた．その後4％ NuSieveGTG アガロースゲル (FMC Bioproducts) 上で，制限酵素 Hae III で消化した ΦX174 DNA (ニッポンジーン) とともに1×TAE 泳動用緩衝液を用いて定電圧 80V で電気泳動し，得られた DNA 断片の長さを測定した．

7．増幅された DNA の検出

PCR 反応終了後の試料のうち 13.5μl を取り，ブロムフェノールブルーを加え全量 15μl とした．各試料は 0.5mg/ml のエチジウムブロマイドを含む4％ NuSieveGTG アガロースゲルで，1×TAE 泳動用緩衝液を用い，定電圧 80V で電気泳動した．なお，分子量マーカーとしては，制限酵素 Hae III で消化した ΦX174 DNA を用いた．DNA 泳動後は前記の DNA ハイブリダイゼーション法に従い，増幅された DNA の検出を行った．検出はX線フィルムを用いたオートラジオグラフィーのほかに，バイオイメージアナライザー (モデル BA100SF，富士フィルム，東京) を用い，放射活性の測定と数量化による定量化を行った．

VI．検量線の作成

1．検量線用 DNA 試料の作成

2.2×10^7 個の r/mHM-SFME-1 細胞由来 DNA を，前記の方法に従い，制限酵素 EcoR I または Hind III を用い消化した．制限酵素消化後の DNA はエタノールで沈澱させたあと，2.2ml の TE 緩衝液に溶解した．オートクレーブで滅菌した蒸留水を用いて段階希釈し，溶液 100μl 中にそれぞれ 1×10^6, 1×10^5, 1×10^4, 1×10^3, 1×10^2 および 1×10^1 個の腫瘍細胞由来 DNA 量となるように試料を調整した．

同様に非担癌マスウ肺由来 DNA も，制限酵素 EcoR I または Hind III にて消化した．処理後エタノールで沈澱させ，TE 緩衝液 3ml に溶解した．その10分の1量に当たる 300μl を取り，全肺 DNA 量の10分の1量として，前記の希釈系列の腫瘍 DNA を各 10μl ずつ加え，既知量の r/mHM-SFME-1 細胞を含んだマウス肺標準液とし，検量線作成に用いた．

2．検量線の作成

各々の r/mHM-SFME-1 細胞と非担癌マウス肺 DNA の混合液について，前記の条件で PCR 法を行った．得られたサンプルは前記と同様に4％ NuSieveGTG アガロースゲルに電気泳動後，ナイロンメンブレンに転写した．DNA ハイブリダイゼーションを行ったあと，バイオイメージアナライザーを用

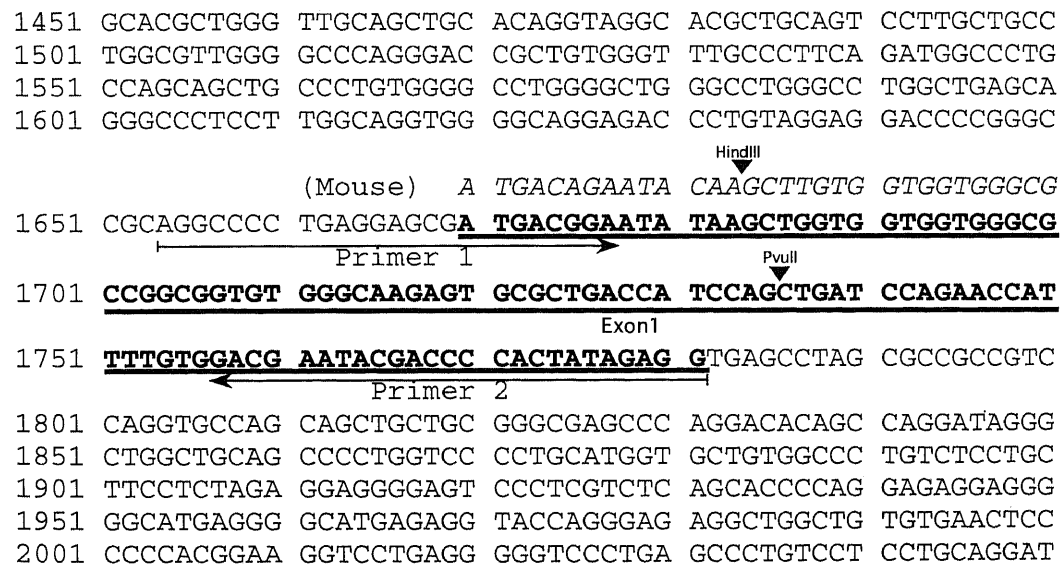


Fig. 1. Oligonucleotide primers for PCR amplification and their location in the human *c-Ha-ras1*[35]. Arrows indicate their locations and directions of DNA synthesis from the 5' to 3' end. The sequence shown above the human *c-Ha-ras1* indicates same part of mouse *c-Ha-ras*[34] gene. Closed triangles show the restriction sites of Hind III and Pvu II.

い，放射活性の測定を行い，数量化したうえで検量線を作成した．

成　　績

Ⅰ．r/mHM-SFME-1 細胞の Balb/c マウスでの腫瘍原性の検討

図2に r/mHM-SFME-1 細胞 1×10^6個を Balb/c マウスの足蹠移植後の腫瘍増殖の経時的変化を示した．時間は腫瘍移植後の日数を示し，腫瘍径は最大径を表した．腫瘍の増殖は移植7日目より肉眼的に観察された．その後，計測した移植21日目まで経時的に腫瘍径の増大を認めた．

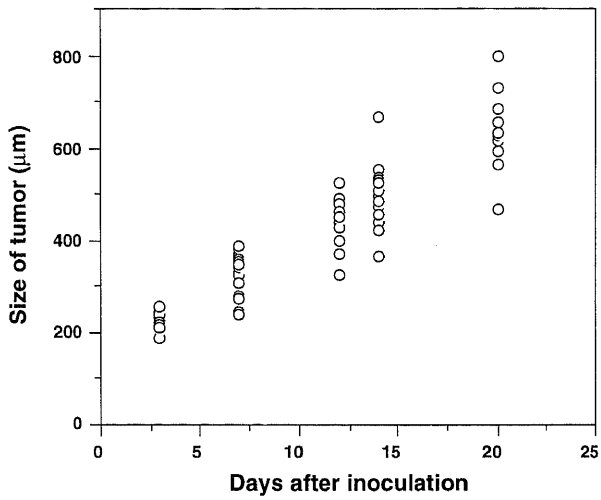


Fig. 2. Tumor growth of r/mHM-SFME-1 cells after inoculation into hind footpad. The maximal dimension of tumor burden was measured at the cited days.

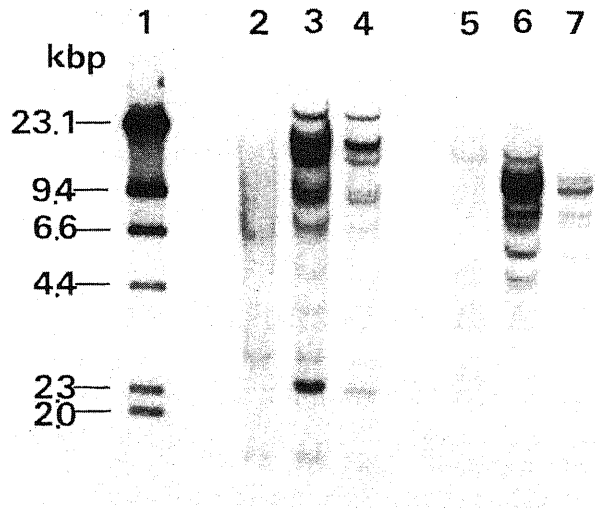


Fig. 3. Southern hybridization analysis with ^{32}P-labeled 919 bp fragment with restriction sites of Kpn I and Sac I from pUC18, which contained activated human *c-Ha-ras1*. Lanes 2, 3 and 4 were DNAs digested with EcoR I. Lanes 5, 6 and 7 were DNAs digested with Hind Ⅲ. DNAs were extracted from SFME cells (lanes 2 and 5), ras/myc-SFME cells (lanes 3 and 6) and r/mHM-SFME-1 cells (lanes 4 and 7). Hind Ⅲ-digested λDNA was loaded as marker (lane 1). kbp, kirobase pair.

Ⅱ．DNA ハイブリダイゼーション法による SFME 細胞，ras/myc-SFME 細胞，r/mHM-SFME-1 細胞の検討

図3に SFME 細胞，ras/myc-SFME 細胞，r/mHM-SFME-1 細胞より抽出した DNA の解析の結果を示した．プローブとしてヒト *c-Ha-ras1* のエクソン1を含む 919bp の DNA を用いた．レーン2，3および4は制限酵素 EcoR I 処理，レーン5，6および7は制限酵素 Hind Ⅲ 処理後の試料である．SFME 細胞では，制限酵素 EcoR I 消化にて4本のバンドがみられるが，ras/myc-SFME 細胞，r/mHM-SFME-1 細胞では，それ以外に8本のバンドがみられた．また，制限酵素 Hind Ⅲ 消化では，SFME 細胞では2本のバンドが検出できるが，ras/myc-SFME 細胞，r/mHM-SFME-1 細胞ではそれ以外に8本のバンドが検出された．しかし，ras/myc-SFME 細胞，r/mHM-SFME-1 細胞では，両酵素処理試料とも同一の DNA パターンを呈した．この点についてはヒト *c-Ha-ras1* のエクソン2およびエクソン4をプローブとしても，両細胞の DNA ハイブリダイゼーションのパターンは全く同じであり，*c-Ha-ras1* の挿入形式には差がないことが強く示唆された．

Ⅲ．ras/myc-SFME 細胞および r/mHM-SFME-1 細胞の病理学的手法による転移能の検討

図4に，足蹠に ras/myc-SFME 細胞または r/mHM-SFME-1 細胞を移植後21日目の肺組織のヘマトキシリン・エオジン染色所見を示した．r/mHM-SFME-1 細胞移植マウス（図 4A）

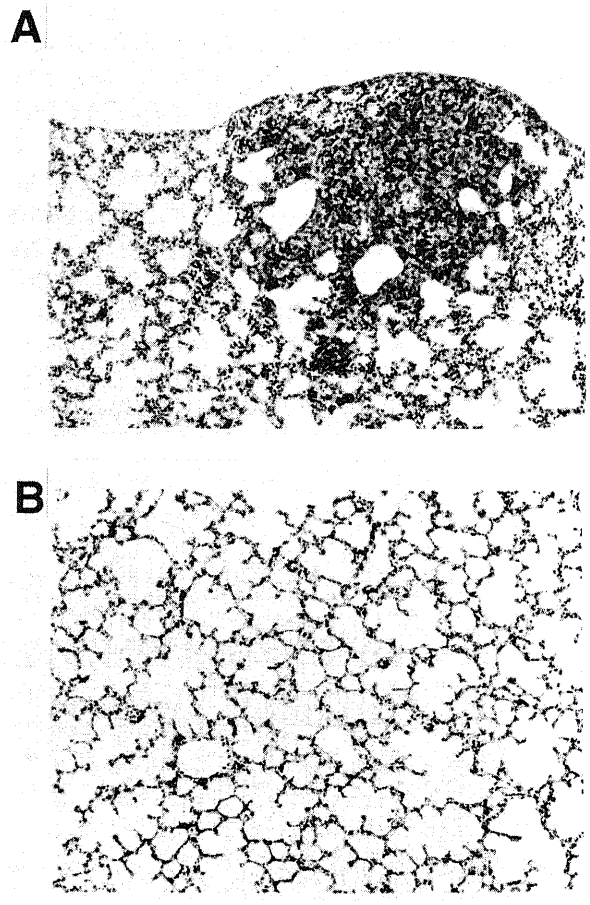


Fig. 4. Histological sections of the lung of tumor bearing mice on Day 21 of r/mHM-SFME-1 cells (A) or ras/myc-SFME cells (B) inoculation (Hematoxylin & Eosin stain, ×100).

においては，転移腫瘍巣が多数認められ，周囲の正常肺組織は圧排されていた．一方，ras/myc-SFME 細胞移植マウス（図4B）においては，腫瘍の浸潤は明らかではなく，正常肺組織像と区別できなかった．なお，腫瘍細胞移植後14日目では，両細胞とも病理学的には明らかな転移は認めなかった．

Ⅳ．生存曲線

図5に，ras/myc-SFME 細胞移植マウスと r/mHM-SFME-1 細胞移植マウスの生存曲線を示した．r/mHM-SFME-1 細胞移植マウスは全例死亡したが，ras/myc-SFME 細胞移植マウスでは1匹が100日目まで生存した．また r/mHM-SFME-1 細胞移植群では，18日目より死亡例がみられ50%生存期間が39日であるのに対し，ras/myc-SFME 細胞移植群ではこれより遅く，41日目より死亡例が出現し50%生存期間は70日目であった．

Ⅴ．マウス肺と r/mHM-SFME-1 細胞の *ras* DNA の PCR 法による増殖パターンの比較

図1にマウス *c-Ha-ras* [34] とヒト *c-Ha-ras1* [35] の塩基配列ならびに今回使用したプライマー[14]を示した．図にみられるように，制限酵素 Hind Ⅲ で消化したヒト DNA を PCR 法の鋳型として用いた場合には 128bp の PCR 産物が得られるが，マウス DNA では制限酵素 Hind Ⅲ 消化にて鋳型 DNA が切断されるため，PCR 産物は得られないと考えられる．図6に制限酵素 Hind Ⅲ 消化後の非担癌マウス肺 DNA および r/mHM-SFME-1 細胞 DNA の PCR での増幅後の電気泳動パターンの結果を示した．非担癌マウス肺では，予測される 128bp の PCR 産物のバンドはみられないが，r/mHM-SFME-1 細胞ではヒト活

Table 1. Estimation of metastatic tumor cells in the lung of r/mHM-SFME-1 cells inoculated mise

Days[a]	Metastatic index[b]	Estimated metastatic cells count (per lung)[c]
7	1.06	1.0×10^5
14	1.89	1.5×10^6
21	1.07	1.0×10^5
28	2.17	4.0×10^6

[a] day after inoculation of r/mHM-SFME-1 cells.
[b] Metastatic index was calculated as cited Fig. 9.
[c] Estimated number of metastatic r/mHM-SFME-1 cells in the lung of mice.

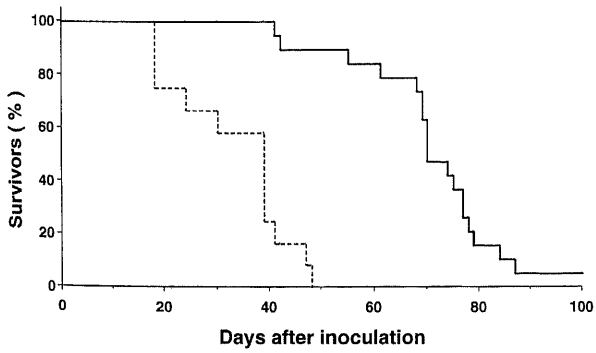


Fig. 5. Survival profiles of Balb/c mice after receiving the tumor cells. 1×10^6 ras/myc-SFME (solid line) or r/mHM-SFME-1 (dotted line) cells were injected subcutaneously per mouse. Survival rates (%) were calculated on days after injecion.

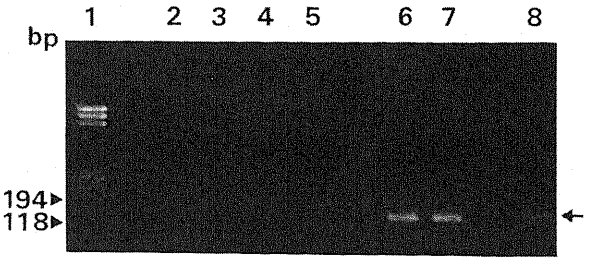


Fig. 6. Gel-electrophoretic analysis of human *c-Ha-ras1* amplified with PCR. Hind Ⅲ-fragmented DNAs from normal Balb/c mouse lung (lanes 2, 3, 4 and 5), r/mHM-SFME-1 cells (lanes 6 and 7) and pUCEJ.6.6 (lane 8) were amplified. Size marker (lane 1) was fragments of ΦX174. Arrow indicates a position of 128 bp. bp, base pair.

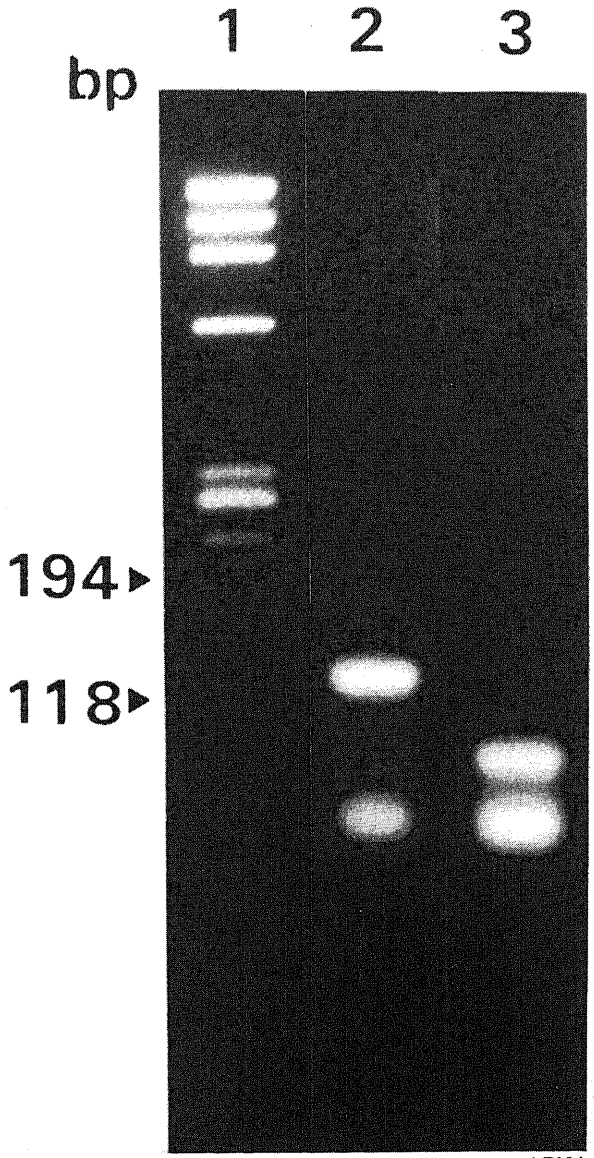


Fig. 7. Gel-electrophoretic analysis of PCR products of DNA from r/m-HM-SFME-1 cells. PCR product amplified with the set of primers cited in Fig 1 (lane 2), Pvu Ⅱ fragments of PCR product (lane 3). Size marker (lane 1) was Hae Ⅲ fragments of ΦX174.

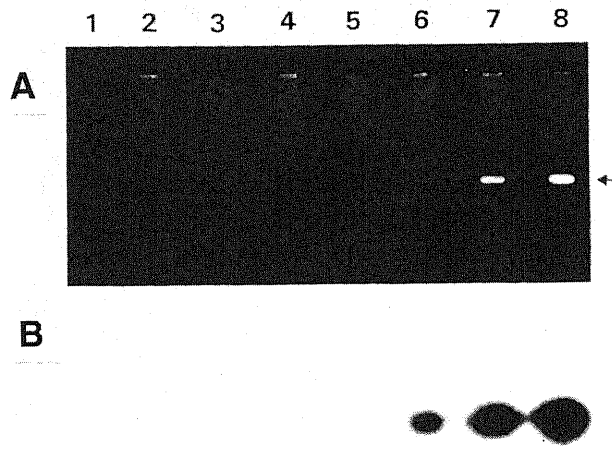
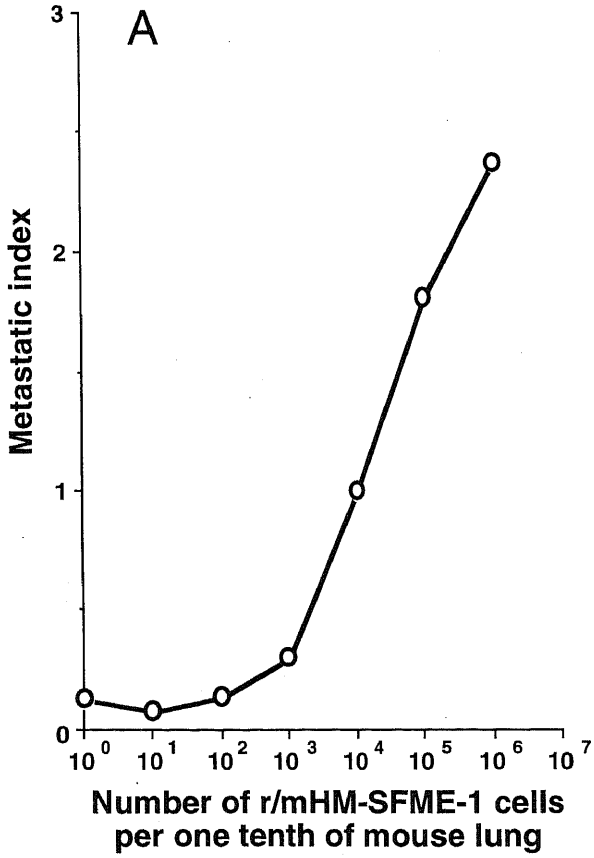


Fig. 8. Detection of human *c-Ha-ras1* sequence by PCR amplification. Various amounts of DNAs from r/mHM-SFME-1 cells were mixed with DNAs from lung of normal Balb/c mouse. Before mixing, both DNAs were digested completely with Hind Ⅲ. For lanes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8, DNAs from r/mHM-SFME-1 cells were mixed at the ratio of 0, 1, 10, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5 and 10^6 cells per one tenth of mouse lung DNA respectively and then these mixtures were used as template for PCR. (A) Etidium bromide stain. (B) DNA hybridization with ^{32}P-labeled 919 bp probe cited at Fig. 3. Arrow indicates a position of 128 bp.

性化 *c-Ha-ras1* が導入されており，128bp の PCR 産物が得られた．この PCR 産物は，制限酵素 Pvu Ⅱ にて消化すると 128bp の長さのバンドは消失し 82bpと 46bp の 2 本に消化される（図 1）．図 7 に PCR 産物を制限酵素処理した結果を示した．レーン 2 に制限酵素消化前の 128bp の PCR 産物を示した．この産物を制限酵素 Pvu Ⅱ で消化すると，レーン 3 のように 128bp のバンドは消失し，新たに 82bp のバンドが出現した．また，46bp のバンドは混在するプライマーのバンドの近傍に移動するため，このバンドの幅が広くなっていた．本結果より，この PCR 産物は，ヒト *c-Ha-ras1* 由来の産物であることが確認できた．従って，制限酵素 Hind Ⅲ 消化を行うことにより，ヒト特異的 *c-Ha-ras1* の検出が可能であった．

Ⅵ. r/mHM-SFME-1 細胞 *ras* DNA の PCR 増幅に及ぼす当該細胞 DNA 量と正常マウス肺 DNA の影響

肺に転移した r/mHM-SFME-1 細胞数を定量するために，正常マウス肺 DNA 内に含まれる腫瘍細胞由来ヒト *c-Ha-ras1* を PCR 法にて増幅し，定量可能か否かを検討した．制限酵素 Hind Ⅲ 消化 r/mHM-SFME-1 細胞 DNA を 1×10^6, 1×10^5, 1×10^4, 1×10^3, 1×10^2 および 1×10^1 個の細胞数に相当する様に希釈した．この試料を，制限酵素 Hind Ⅲ 消化正常マウス肺 DNA（全肺の10分の 1 相当の DNA）と混合して，PCR 法で増幅



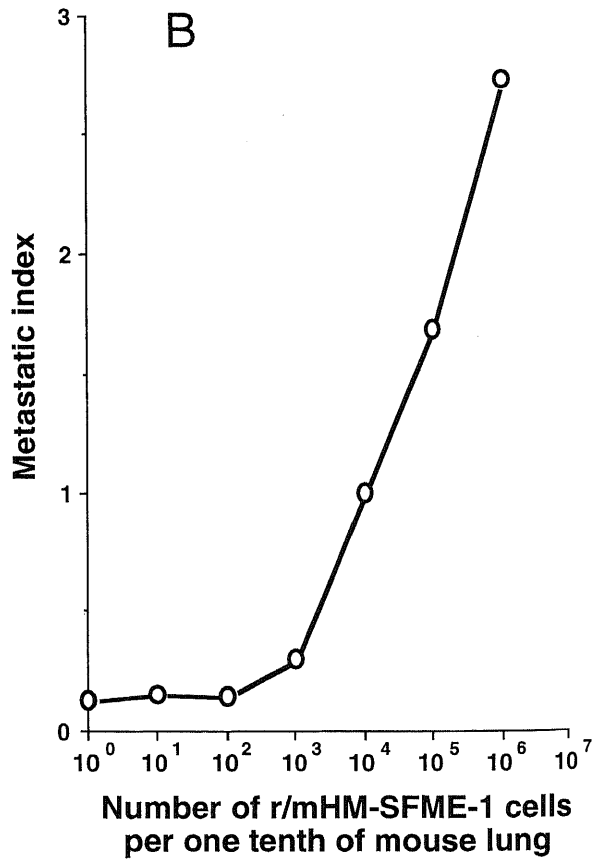


Fig. 9. Relationship of detectable PCR products and tumor cells in mouse lung. PCR amplification was performed after template DNAs were digested with Hind Ⅲ (A) or EcoR Ⅰ (B). Calculation of number of tumor cells was cited as Fig. 8. Metastatic index was calculated as (a value of each samples by bioimage analyzer)/(a value of 10^4 cells sample measured by bioimage analyzer).

した．図8にその反応産物の4％ NuSieveGTG アガロースゲル電気泳動のエチジウムブロマイド染色像（図 8A）と DNA ハイブリダイゼーション（図 8B）の所見を示した．ヒト *c-Ha-ras1* の PCR 産物は，エチジウムブロマイド染色法では 1×10^4個以上の細胞由来 DNA 量で検出できたが，DNA ハイブリダイゼーション法を用いると，1×10^3個以上の細胞由来 DNA 量で検出できた．また，細胞由来 DNA 量が増すに従って，バンドが濃くなることが観察された．一方，正常マウス DNA 単独の場合でも，PCR 法による増幅で，128bp の長さを持つバンドが検出された．本 DNA ハイブリダイゼーションの結果をバイオイメージアナライザーで数量化して，グラフにし，検量線を得た（図9A）．指標として用いた転移指数（metastatic index）は，1×10^4個の細胞由来 DNA 量での値を基準値として，バイオイメージアナライザーから得られた各測定値を基準値で除した比である．

$$\text{転移指数} = \frac{\text{(各サンプルのバイオイメージアナライザーによる測定値)}}{\text{(10^4個の腫瘍細胞 DNA サンプルのバイオイメージアナライザーによる測定値)}}$$

本グラフに示すように，全肺の10分の1相当量の DNA に 1×10^3個の腫瘍細胞を含む検体から PCR 産物は増加しはじめ，1×10^6量の腫瘍細胞を含む検体まで直線的に増加した．制限酵素 EcoR I 処理サンプルにて，制限酵素 Hind III 消化時と同様の操作を行い，得られた検量線を図 9B に示した．制限酵素 Hind III 消化時と同様に，1×10^3個の腫瘍細胞を含む検体から検量線は上昇し，両酵素処理による検量線ではほぼ同様な結果が得られ，再現性を持つことが判明した．したがって，マウス肺に転移した r/mHM-SFME-1 細胞が 1×10^4個以上あれば本方法を用いることにより定量的に検出可能であることが，明らかとなった．

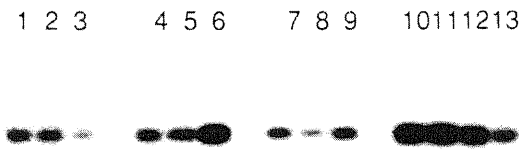


Fig. 10. Southern hybridization analysis of PCR products amplified from samples of tumor bearing mice. DNA samples from lungs at 7 days (lanes 1, 2 and 3), 14 days (lanes 4, 5, and 6), 21 days (lanes 7, 8 and 9) and 28 days (lanes 10, 11 and 12) after tumor inoculation were amplified with PCR. Lane 13 was mixed DNA from 10^4 tumor cells and one tenth of mouse lung (control). Probe was 919 bp fragment from pUC18, which contained activated human *c-Ha-ras1*.

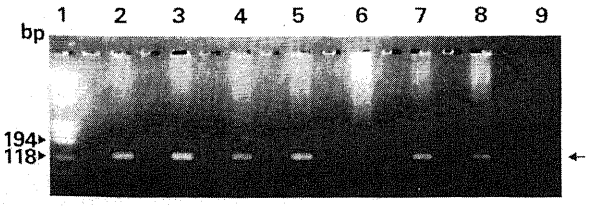


Fig. 11. Detection of etidium bromide-stained *c-Ha-ras1* DNAs amplified with PCR. Template DNA samples (lanes 2, 3, 4, 5, 6, 7 and 8) were extracted from lungs of Balb/c mice after amputation of tumor inoculated legs. Size marker (lane 1) was Hae III fragments of ΦX174. The right lane (lane 9) showed the DNAs from pUCE.J.6.6 amplified with PCR (control). Arrow indicates a position of 128 bp.

Ⅶ．PCR 法による肺の転移腫瘍細胞の同定

図10に腫瘍移植7日目，14日目，21日目および28日目の担癌マウス肺 DNA の PCR の結果を示した．特に移植28日目に，腫瘍由来の 128bp のバンドが濃く検出できた．表1に移植7日目，14日目，21日目および28日目の腫瘍移植マウス肺 DNA の PCR 産物を，バイオイメージアナライザーを用いて数量化した結果を示した．数値は検量線と同様に，実際に得られた検体の測定値を，検量線の基準値で除して得られた転移指数を用いて表した．各数値は平均値で示した．個体差はあるが全体として経時的に腫瘍細胞由来と考えられる PCR 産物は増加する傾向にあった．また，組織標本では腫瘍移植14日目では明らかな転移は認められなかったが，PCR 法では移植14日目には明らかな腫瘍由来の PCR 産物が得られた．

図11に腫瘍移植肢切断後の生存マウス肺 DNA の PCR 所見を示した．腫瘍移植肢の切断後91日から105日の検体であるが，いずれの肺 DNA 検体でも PCR 後のエチジウムブロマイド染色所見では，コントロールと同じ 128bp の PCR 産物が得られた．この実験においては，腫瘍細胞を供給する可能性のある原発巣は切断されているため，実験結果は転移を起こした腫瘍の存在を表すものと考えられた．なお，腫瘍移植肢を切断しなかった1匹では，最終的に肉眼的には腫瘍移植部位に明らかな腫瘤形成はみられなかった．

また，移植14日目および28日目のマウス肺の PCR 法のエチジウムブロマイド染色所見を図 12A に示した．移植14日目で

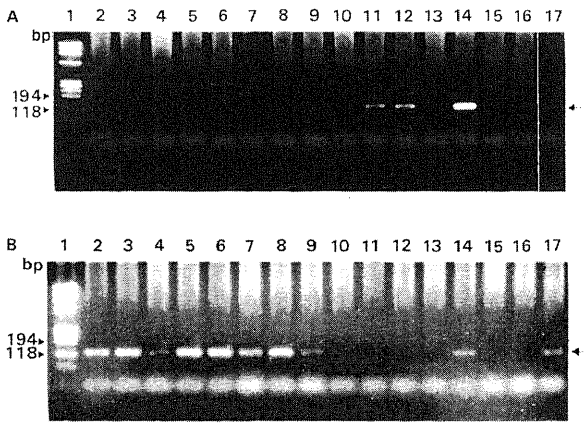


Fig. 12. Analysis of etidium bromide-stained PCR products from lung (A) and kidney (B) of tumor bearing mice. DNAs from each organs at 14 days (lanes 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9) and 28 days (lanes 10, 11, 12, 13, 14, 15 and 16) after inoculation were used as templates for PCR. Size marker (lane 1) was Hae III fragments of ΦX174. The right lane (lane 17) showed the DNAs from pUCE.J.6.6 amplified with PCR (control). Arrow indicates a position of 128 bp.

は PCR 産物は1検体で同定されたが，移植28日目では5検体でみられた．さらに，その強度は，移植28日目で明らかに増加していた．同時に行った腫瘍移植マウス腎臓 DNA の PCR 法のエチジウムブロマイド染色所見を図12Bに示した．移植14日目の腎臓では8検体で PCR 産物が得られたが，28日目では1検体とむしろ減少し，その強度も減弱していた．この結果は肺とは異なっていた．

考　　察

悪性腫瘍の特徴の一つに転移がある．転移は原発巣からの逸脱，流血中への出現，臓器への定着，転移部位での増殖など，極めて多くの過程を経て成立するものである．従来より，転移について様々な研究がなされているが，近年特に関心が高まる傾向にある．その結果，転移に関連した遺伝子が発見され[15)16)]，細胞接着分子[18)19)]や細胞外マトリックス分解酵素[20)21)]の関与が明らかになりつつある．また，既知の癌遺伝子の幾つかで，転移との関連が考えられている[13)22)]

本研究で使用した r/mHM-SFME-1 細胞には，活性化ヒト *c-Ha-ras1* が導入されている．*ras* 遺伝子と転移との関係については，本遺伝子の導入により転移能が高まるという報告[4)8)~11)]と，細胞によっては転移には関連がない[5)12)]という報告があり一定していない．SFME 細胞は，Balb/c マウスの胚芽細胞より確立された細胞で，腫瘍原性はなく，血清添加により増殖が阻害されるとともに終末分化形質を発現する[27)]．本細胞に，ヒト膀胱癌由来活性化 *c-Ha-ras1* およびマウス *c-myc* を導入して確立された ras/myc-SFME 細胞[28)]では，形質転換のため Balb/c マウスに対して腫瘍原性を示すが，転移能は低い．しかし，ネオマイシン耐性遺伝子保持プラスミド pSV2neo 導入後の本細胞をマウスに移植し，肺転移部から確立された r/mHM-SFME-1 細胞[1)]では，明らかに ras/myc-SFME 細胞より肺への転移能の高いことが示された．DNA ハイブリダイゼーションによる両細胞の DNA 解析では，両者の *ras* の挿入様式には明らかな差はなく，また，RNA 解析でも，両細胞での *ras* の発現には大差はなかった[29)]．また，液体培養では，血清の有無に関わらず r/mHM-SFME-1 細胞に比べて ras/myc-SFME 細胞の方が早く増殖する[29)]が，Balb/c マウスに移植した場合の生存日数では，r/mHM-SFME-1 細胞を移植されたマウスの方が，明らかに早期に死亡した．生体内での細胞増殖を培養条件下のものと比較することに問題はあるが，生存日数に差の生ずる原因の一つとして，細胞の持つ転移能の違いが考えられる．両細胞の転移能の違いがどのような点にあるのかは現在まだ明らかではなく，今後の検討課題である．

ところで，癌転移に関する報告の多くは，ヌードマウスを用いた実験結果である[4)~7)]．したがって，T細胞系の欠損による免疫能の低下があり，同系の腫瘍でなくともヒト癌等の移植により腫瘍を形成させることができるという点で，きわめてすぐれた実験系である．しかし，この系では，T細胞系の完全欠損という通常の生体では起こりえない異常があり，このために生体内での転移状態を正確に把握することは不可能である．一方，r/mHM-SFME-1 細胞は，免疫欠損のない同系マウスである Balb/c に移植することによって，腫瘍形成が起こるという点で，ヌードマウスなど，免疫系に異常を持つ動物を用いた実験系よりも，癌細胞の動態におよぼす生体反応細胞および因子の解析には有用と考えられる．

今回，本細胞の持つ転移能について，病理学的および分子生物学的に比較検討した．分子生物学的手法が普及するまでは，転移細胞数の定量化は，主に病理学的方法[6)7)]や，臓器表面の転移結節数の算定[25)26)]で評価されていた．すなわち，転移巣の数として評価され，細胞数についての検討は行えなかった．今回用いた実験系では，腫瘍移植21日目で病理学的に明らかな肺転移腫瘍の存在を確認することができたが，14日目の摘出肺では転移所見は明らかではなかった．

近年，微小転移の同定に PCR 法が有用であることが報告されている[2)17)]．本研究でも，本系での転移の評価に PCR 法を試み，転移検出における有用性に加え，転移腫瘍細胞数の数量化の可能性を検討した．PCR 法は Saiki ら[30)31)]により開発された方法であり，目的とする遺伝子を，プライマーと呼ばれる2種類のオリゴヌクレオチドと耐熱性 DNA ポリメラーゼを用いて，増幅させる方法である．本方法を用いて特異的 DNA を増幅することにより目的遺伝子が微量であっても検出可能となった．現在，各種ウイルス[36)37)]，結核菌[38)]などの微生物の検出，腫瘍遺伝子[39)]・腫瘍抑制遺伝子[40)41)]の有無の検索，微小残存病変の検出[42)]など，多方面にわたって応用されている．この方法は，高温で DNA を1本鎖化した後，低温で標的遺伝子に特異性の高いプライマーを結合させて，DNA ポリメラーゼを用い，鋳型 DNA と相補的な DNA を合成させる方法であり[30)31)]，サイクル数を増やすことにより目的遺伝子を100万倍以上に増幅することが可能である．また，耐熱性 DNA ポリメラーゼの採用[43)]や自動化システムの開発により，一般実験施設においても容易に行うことができるようになってきている．しかし，逆にその鋭敏性により，異物や対象外の類似遺伝子の混入などがあると，誤った結果が得られる危険性も指摘されている[44)]．本実験では，この点を考慮し，PCR および前処理の一連の操作はすべてクリーンベンチ内で行い，また極力ディスポーザブルの器具を使用し，PCR 前後のサンプルの扱いは別々のマイクロピペットを使用するなどして，異物の混入をできる限り予防した．その結果，鋳型 DNA を加えずに行った PCR 検査では，増幅産物は全く検出できず，得られた実験結果は純粋に対象試料に依存した反応結果であると考えられた．また，サイクル数の増加により，非特異的増幅産物が得られる場合もあると指摘されているが，今回の実験においては，目的とする *c-Ha-ras1* エクソン1内の 128bp 由来の増幅産物のみが得られ，他の非特異的産物は得られなかった．さらに，アニーリングの温度が不適切である場合には，目的とするバンドの検出ができない場合や，非特異的産物が得られることもあるが，図に示したように，得られた結果は全て単一のバンドであり，アニーリングの温度も問題ないものと考えられた．以上より，本実験の条件はヒト *c-Ha-ras1* のエクソン1の PCR 法での検討に適していると考えられた．

検量線の作成にあたっては，まず3匹の非担癌マウス肺より高分子 DNA を抽出し，それぞれの DNA 量を検討した．抽出操作や，個体差によると思われる DNA 量の差がみられ，その差をできるだけ少なくするために，3匹のマウスより得た DNA 溶液を全て混合し，その30分の1量を便宜上1匹のマウス肺 DNA の10分の1量を代用するものと考えた．また，腫瘍細胞については細胞数を算定した後 DNA を抽出し，制限酵素 Hind Ⅲ 処理後に10倍ずつ段階希釈し，各腫瘍細胞数由来の DNA と考えた．以上の方法で得たサンプルを種々の割合で混

合し，これを標準液として検量線を作成した．*Ha-ras* は動物種を越えてよく保存されている遺伝子で，マウスとヒトとの間でも相同性が高い．r/mHM-SFME-1 細胞に導入されているヒト *c-Ha-ras1* 遺伝子はヒト膀胱癌由来であり，コドン12の点突然変異により活性型となっている[35]．一方マウス *Ha-ras* 遺伝子は，コドン5とコドン6の塩基配列がヒトと異なり，制限酵素 Hind Ⅲ の認識部位を持っている．そのために本酵素で消化すると，マウス *Ha-ras* DNA は切断され，PCR 産物は得られないが，制限酵素 Hind Ⅲ 認識部位を持たないヒト活性型 *c-Ha-ras1* では PCR 産物が得られる．したがって，この前後にプライマーを設定し，制限酵素 Hind Ⅲ 処理 DNA を鋳型として PCR 反応を行えば，ヒト活性型 *c-Ha-ras1* のみが増幅され，その結果，特異性の高い結果を得ることができると考えた．実際，腫瘍細胞由来 DNA を含まない正常マウス肺由来 DNA については，エチジウムブロマイド染色法で PCR 産物は検出できなかった．しかし，ヒト *c-Ha-ras1* のエクソン1をプローブとして行った DNA ハイブリダイゼーション検査では，128bp の部位にバンドが認められた．また，制限酵素 EcoR Ⅰ で処理して作成した検量線においても，DNA ハイブリダイゼーション法では正常マウス肺 DNA で，腫瘍と同様の箇所に薄いながらも 128bp のバンドがみられた．この原因としては，異物の混入は前述の理由より考えにくく，非特異的な産物である可能性についても，ヒト *c-Ha-ras1* エクソン1とハイブリダイズすることより考えられず，マウス肺 DNA 中のマウス由来の *Ha-ras* の一部がメチル化などのため制限酵素で完全に消化されていない可能性が考えられた．

作成した検量線より，10^3個の細胞由来 DNA の段階で明らかに PCR 産物の増加がみられはじめた．この結果は，制限酵素 EcoR Ⅰ を使用した検量線でも，制限酵素 Hind Ⅲ を使用した検量線でも同様の結果であり，再現性を有していた．従って，混在させた正常マウス肺 DNA の量との比から，1匹のマウスの肺に腫瘍細胞が 10^4 個あれば本方法で検出が可能であるということが明らかとなった．この検出限界は，ヌードマウスを用いた太田の報告[3]にほぼ一致したものであった．

本法の問題点として，PCR 法により検出された腫瘍細胞が転移細胞か否かという点があげられる．Endo ら[2]は，非腫瘍性細胞の移植により，一過性に肝臓に同細胞の PCR 産物が検出されるが経時的に消失していくため，結論として，流血中に出現した移植細胞が肝組織に捕獲されたためであると報告している．このように，臓器摘出時に流血中の腫瘍細胞を同時に採取している可能性もある．本実験では，腫瘍移植後一定期間毎に，腫瘍移植肢の切断を行ったマウスにおいて，肺転移の有無を PCR 法を用いて検討した．この条件では，原発巣からの流血中への腫瘍細胞の流出はなく，結果は純粋に肺転移腫瘍によるものを反映すると考えられ，実際に PCR 法にて腫瘍由来の PCR 産物を得ることができた．このことは，本実験系により肺転移腫瘍細胞の検出が可能であることを示している．また，流血の影響については，取り扱いが比較的容易で，血流量の豊富な腎臓を用い検討した．その結果，腫瘍移植後14日目には明らかな PCR 産物の検出ができた．しかし，組織学的検索を行った別の2検体ではこの時点では転移は明らかではなく，血流中への腫瘍細胞の流出の可能性も疑われた．極めて興味深いことに，移植28日目においては，PCR 産物は著明な肺転移を伴う1検体のみでしか検出されなかった．これは，移植14日目に腎臓において腫瘍細胞の存在が認められながら，転移腫瘍として成立していないことを表していると考えられるが，なぜ PCR 産物の減少を認めたのかという原因については今後検討を要する問題点として挙げられる．

肺転移の経時的変化についての検討では，移植7日目のマウス肺より PCR 産物が得られた．またこの PCR 産物は経時的に増加し，このことは転移が成立し，その後腫瘍細胞が次第に増殖していくことを表していると考えられる．別に行った移植14日目と28日目のマウス肺の PCR 法でも同様な経時的増加を認めた．検量線を用いて推測されるマウス1匹当たりの肺転移腫瘍細胞量は，14日目は 1.5×10^6 個以下であり，28日目 4.0×10^6 個であった．

以上より，r/mHM-SFME-1 細胞と正常 Balb/c マウスを用いた転移実験系での肺転移腫瘍細胞数の推定が，PCR 法を用いることにより可能であり，本実験系は，今後生体内での転移現象を詳細に解析するのに極めて有用であると考えられる．

結　　論

肺転移能の高い r/mHM-SFME-1 細胞を用いて，マウス肺への遠隔転移を病理学的検討および PCR 法を用いて検討した．また，従来 PCR 法において問題とされている定量性について，本法による検量線の作成を試み，以下の結論を得た．

1．親株である ras/myc-SFME 細胞と比較して，r/mHM-SFME-1 細胞は，肺への高い転移能を持つことが病理学的検討および分子生物学的検討により明らかとなった．

2．制限酵素 Hind Ⅲ 処理 DNA を用いて PCR 法により作成した検量線では，マウス1匹の肺に腫瘍細胞が 10^4 個以上あれば検出可能であった．これは制限酵素 EcoR Ⅰ 処理した DNA を用いた場合でも同様な結果であった．また，各々の制限酵素処理 DNA で作成した検量線は，ほぼ同一の曲線を示し，再現性が確認された．

3．本法を用いて腫瘍移植マウス肺への遠隔転移を経時的に調べた．その結果，腫瘍移植7日目より腫瘍由来の PCR 産物の検出が可能であった．また，1群のマウス匹数を増やして行った実験でも，経時的に肺での腫瘍由来 PCR 産物が増加することが確認できた．

4．本法を用いて，腎臓での腫瘍由来 PCR 産物の検出を経時的に行った．その結果，腫瘍由来 PCR 産物の検出が可能であった．しかし，肺とは異なり腫瘍由来 PCR 産物は28日目には減少していた．なお，組織学的に検討したところ，14日目，28日目ともに腎臓には明らかな腫瘍の転移の所見はみられなかった．

以上の結果より，本細胞の肺への遠隔転移の検出ならびに転移腫瘍細胞数の推定に PCR 法は有用であることが証明された．また，PCR 法を組み込んだ本実験系は，転移腫瘍細胞数の評価を行ううえで極めて有用であると考えられた．

謝　　辞

稿を終えるに臨み，御指導と御校閲を賜りました恩師松田　保教授に深甚なる謝意を捧げます．また，終始直接の御指導を戴きました金沢大学第3内科中村　忍助教授と金沢大学がん研究所分子生物部亀山忠典名誉教授，同部野村孝弘博士，化学療法部猟山一雄博士に深謝致します．さらに本研究に御協力を戴いた金沢大学がん研究所分子生物部の皆様と岡田源作博士に厚く御礼申しあげます．最後に多大なる御協力を賜りました金沢大学第3内科血液学研究グループをはじめ教室諸先生方と教室

員各位に厚く御礼申し上げます.
なお，本論文の要旨の一部は，第51回日本癌学会総会 (1992 年，大阪) および第52回日本癌学会総会 (1993 年，仙台) において発表した.

文　献

1) **Nomura, T., Matano, S., Okada, G., Tokuyama, H., Hori, I., Nakamura, S., Kameyama, T. & Ryoyama, K.:** Establishment of a metastatic murine cell line carrying the human c-Ha-rasl. In Vitro Cell. Dev. Biol., **29A**, 614-616 (1993).

2) **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).

3) 太田安彦：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．十全医会誌，**101**, 10-25 (1992).

4) **Ananthaswamy, H. N., Price, J. E., Tainsky, M. A., Goldberg, L. H. & Bales, E. S.:** Correlation between Ha-ras gene amplification and spontaneous metastasis in NIH 3T3 cells transfected with genomic DNA from human skin cancers. Clin. Expl. Metastasis, **7**, 301-313 (1989).

5) **Tuck, A. B., Wilson, S. M. & Chambers, A. F.:** ras transfection and expression dose not induce progression from tumorigenicity to metastatic ability in mouse LTA cells. Clin. Expl. Metastasis, **8**, 417-431 (1990).

6) **Greig, R. G., Koestler, T. P., Trainer, D. L., Corwin, S. P., Miles, L., Kline, T., Sweet, R., Yokoyama, S. & Poste G.:** Tumorigenic and metastatic properties of "normal" and ras-transfected NIH/3T3 cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**, 3698-3701 (1985).

7) **Wallace, J. S., Hayle, A. J., Syms, A. J., Cairney, M., Tutty, B., Gazzard, A., Evans, M. F., Fleming, K. A. & Tarin, D.:** The ras oncogene and tumour metastasis: observations on murine cells transfected with activated human c-Ha-rasl. Differentiation, **41**, 208-215 (1989).

8) **Hill, S. A., Wilson, S. & Chambers, A. F.:** Clonal heterogeneity, experimental metastatic ability, and p21 expression in H-ras-transformed NIH 3T3 cells. J. Natl. Cancer Inst., **80**, 484-490 (1988).

9) **Kyprianou, N. & Isaacs, J. T.:** Relationship between metastatic ability and H-ras oncogene expression in rat mammary cancer cells transfected with the v-H-ras oncogene. Cancer Res., **50**, 1449-1454 (1990).

10) **Ichikawa, T., Kyprianou, N. & Isaacs, J. T.:** Genetic instability and the acquisition of metastatic ability by rat mammary cancer cells following v-H-ras oncogene transfection. Cancer Res., **50**, 6349-6357 (1990).

11) **Vousden, K. H., Eccles, S. A., Purvies, H. & Marshall, C. J.:** Enhanced spontaneous metastasis of mouse carcinoma cells transfected with an activated c-Ha-rasl-1 gene. Int. J. Cancer, **37**, 425-433 (1986).

12) **Baisch, H., Collard, J., Zywietz, F. & Jung, H.:** No acquisition of metastatic capacity of R1H rhabdomyosarcoma upon transfection with c-Ha-ras oncogene. Invasion Metastasis, **10**, 193-207 (1990).

13) **Taniguchi, S., Kawano, T., Mitsudomi, T., Kimura, G. & Baba, T.:** fos oncogene transfer to a transformed rat fibroblast cell line enhances spontaneous lung metastasis in rat. Jpn. J. Cancer Res., **77**, 1193-1197 (1986).

14) **Deng, G., Liu, X. & Wang, J.:** Correlation of mutations of oncogene c-Ha-ras at codon 12 with metastasis and survival of gastric cancer patients. Oncogene Res., **6**, 33-38 (1991).

15) **Steeg, P. S., Bevilacqua, G., Kopper, L., Thorgeirsson, U. P., Talmadge, J. E., Liotta, L. A. & Sobel, M. E.:** Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. J. Natl. Cancer Inst., **80**, 200-204 (1988).

16) **Stahl, J. A., Leone, A., Rosengard, A. M., Porter, L., King, C. R. & Steeg, P. S.:** Identification of a second human nm23 gene, nm23-H2. Cancer Res., **51**, 445-449 (1991).

17) **Deguchi, T., Doi, T., Ehara, H., Ito, S., Takahashi, Y., Nishino, Y., Fujihiro, S., Kawamura, T., Komeda, H., Horie, M., Kaji, H., Shimokawa, K., Tanaka, T. & Kawada,Y:** Detection of micrometastatic prostatic cancer cells on lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Cancer Res., **53**, 5350-5354 (1993).

18) **Springer, T. A.:** Adhesion receptors of the immune system. Nature, **346**, 425-434 (1990).

19) **Takeichi, M.:** Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. Science, **251**, 1451-1455 (1991).

20) **Liotta, L. A.:** Tumor invasion and metastases-Role of the extracellular matrix: Rhoads memorial award lecture. Cancer Res., **46**, 1-7 (1986).

21) **Nakajima, M., Welch, D. R., Balloni, P. N. & Nicolson, G. L.:** Degradation of basement membrane type IV collagen and lung subendothelial matrix by rat mammary adenocarcinoma cell clones of differing metastatic potentials. Cancer Res., **47**, 4869-4876 (1987).

22) 谷口俊一郎：癌転移と関連癌遺伝子．癌と化学療法，**16**, 3332-3340 (1989).

23) **Davidoff, A. M., Kerns, B-J. M., Iglehart, J. D. & Marks, J. R.:** Maintenance of p53 alterations throughout breast cancer progression. Cancer Res., **51**, 2605-2610 (1991).

24) **Tsuda, H., Zhang, W., Shimosato, Y., Yokota, J., Terada, M., Sugimura, T., Miyamura, T. & Hirohashi, S.:** Allele loss on chromosome 16 associated with progression of human hepatocellular carcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **87**, 6791-6794 (1990).

25) **Wexler, H.:** Accurate identification of experimental pulmonary metastases. J. Natl. Cancer Inst., **36**, 641-645 (1966).

26) **Cifone, M. A. & Fidler, I. J.:** Increasing metastatic potential is associated with increasing genetic instability of clones isolated from murine neoplasms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 6949-6952 (1981).

27) **Loo, D. T., Fuquay, J. I., Rawson, C. L. & Barnes,**

D. W.: Extended culture of mouse embryo cells without senescence: Inhibition by serum. Science, **236**, 200-202 (1987).

28) **Shirahata, S., Rawson, C., Loo, D., Chang, Y-J. & Barnes, D.**: Ras and neu oncogenes reverse serum inhibition and epidermal growth factor dependence of serum-free mouse embryo cells. J. Cell. Physiol., **144**, 69-76 (1990).

29) **Nomura, T., Ryoyama, K., Okada, G., Matano, S., Tokuyama, H., Hori, I., Nakamura, S. & Kameyama, T.**: Characterization of newly established cells which provide an animal model for spontaneous metastasis. Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects, **5**, 19-24 (1992).

30) **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 of sickle cell anemia. Science, **230**, 1350-1354 (1985).

31) **Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A.**: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, **239**, 487-491 (1988).

32) **Kapuscinski, J. & Skoczylas, B.**: Simple and rapid fluorimetric method for DNA microassay. Anal. Biochem., **83**, 252-257 (1977).

33) **Chang, E. H., Gonda, M. A., Ellis, R. W., Scolnick, E. M. & Lowy, D. R.**: Human genome contains four genes homologous to transforming genes of Harvey and Kirsten murine sarcoma viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 4848-4852 (1982).

34) **Brown, k., Bailleul, B., Ramsden, M., Fee, F., Krumlauf, R. & Balmain, A.**: Isolation and characterization of the 5' flanking region of the mouse c-Harvey-ras gene. Mol. Carcinog., **1**, 161-170 (1988).

35) **Capon, D. J., Chen, E. Y., Levinson, A. D., Seeburg, P. H. & Goeddel, D. V.**: Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. Nature, **302**, 33-37 (1983).

36) **Weiner, A. J., Kuo, G., Brandley, D. W., Bonino, F., Saracco, G., Lee, C., Rosenblatt, J., Choo, Q-L. & Houghton, M.**: Detection of hepatitis C viral sequences in non-A, non-B hepatitis. Lancet, **335**, 1-3 (1990).

37) **Reddy, E. P., Sandberg-Wollheim, M., Mettus, R. V., Ray, P. E., DeFreitas, E. & Koprowski, H.**: Amplification and molecular cloning of HTLV-I sequences from DNA of multiple sclerosis patients. Science, **243**, 529-533 (1989).

38) **Pao, C. C., Yen, T. S. B., You, J-B., Maa, J-S., Fiss, E. H. & Chang, C-H.**: Detection and identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA amplification. J. Clin. Microbiol., **28**, 1877-1880 (1990).

39) **Neubauer, A., Dodge, R. K., George, S. L., Davey, F. R., Silver, R. T., Schiffer, C. A., Mayer, R. J., Bail, E. D., Wurster-Hill, D., Bloomfield, C. D. & Liu, E. T.**: Prognostic importance of mutations in the ras proto-oncogenes in de novo acute myeloid leukemia. Blood, **83**, 1603-1611 (1994).

40) **Yandell, D. W., Campbell, T. A., Dayton, S. H., Petersen, R. Walton, D., Little, J. B., McConkie-Rosell, A., Buckley, E. G. & Dryja, T. P.**: Oncogenic point mutations in the human retinoblastoma gene: Their application to genetic counseling. N. Engl. J. Med., **321**, 1689-1695 (1989).

41) **Nigro, J. M., Baker, S. J., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., Hostetter, R., Cleary, K., Bigner, S. H., Davidson. N., Baylin, S., Devilee, P., Glover, T., Collins, F.S., Weston, A., Modali, R., Harris, C. C. & Vogelstein, B.**: Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. Nature, **342**, 705-708 (1989).

42) **Lee, M., Khouri, I., Kantarjian, C. H., Tarpaz, M., Freireich, T. E., Deisseroth, A. & Stass, S.**: Detection of minimal residual disease by polymerase chain reaction of bcr/abl transcripts in chronic myelogenous leukaemia following allogenic bone marrow transplantation. Brit. J. Haematol, **82**, 708-714 (1992).

43) **Brock, T. D. & Freeze, H.**: Thermus aquaticus gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. J. Bacteriol, **98**, 289-297 (1969).

44) **Kwok, S. & Higuchi, R.**: Avoiding false positives with PCR. Nature, **339**, 237-238 (1989).

Establishment of Cell Lines Having Metastatic Potential on Balb/c Mouse and Detection of Metastasizing Tumor Cells in Balb/c Mouse Lung by Polymerase Chain Reaction

Sadaya Matano, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920

－J. Juzen Med Soc., **104,** 270－282 (1995)

Key words metastasis, PCR, quantification, r/mHM-SFME-1 cell, lung

Abstract

The r/mHM-SFME-1 cell line has been established from pSV2neo-introduced ras/myc-SFME cells which had been transformed from SFME cells by activated human *c-Ha-ras1* and mouse *c-myc* genes. It has been known that the r/mHM-SFME-1 cell line has an ability to spontaneously metastasize to the lungs of syngeneic Balb/c mice. In the present study, in order to know the availability of the r/mHM-SFME-1 cell line as an experimental model of metastasis of cancer cells and the usefulness of PCR for detecting micrometastasis of cancer cells, r/mHM-SFME-1 cells were injected into the hind footpad of Balb/c mice, and a distant metastasis of the tumor cells was detected by using PCR and a conventional pathological method. Primers for PCR were set to amplify exon 1 sequence of human-activated *c-Ha-ras1* gene which associated with the tumorigenicity of this cell line. By this method, the 128 bp DNA fragment of exon 1 was amplified. When metastasis of the tumor cells was confirmed histologically, the exon 1 fragment was also detected in the lungs of mice. For quantification of the metastasized tumor cells in the lungs, Hind III-digested DNA extracted from the cells was mixed with that from cells of the lungs of normal mice at different ratios. After amplification by PCR and DNA hybridization, the amount of PCR product in each mixture was measured, and then a standard curve was completed. From this standard curve, it is possible to detect the tumor cells by PCR, if the number of metastasized tumor cells is 1×10^4 or more per both lungs of mouse. Furthermore, the standard curve was very similar to that completed from the EcoR I-digested DNA samples. Using the standard curve, it was demonstrated that the number of metastasizing tumor cells in the lungs of a mouse was 1.5×10^6 at 14 days, and 4.0×10^6 at 28 days after the inoculation of the tumor cells, respectively. These results indicate that the r/mHM-SFME-1 cell line is available as an experimental model of metastasis to the lungs of mice, and that PCR is also useful for detection of micrometastasis of tumor cells and for estimation of the number of cells metastasized.