

Establishment of a Liver Metastatic Model of Gastric Carcinoma with Orthotopic Transplantation of Small Clusters of Human Gastric Carcinoma Cells into the Gastric Wall of Nude Mice-Specific Detection of Microscopic Metastatic Lesion of the Liver in Nude Mice by 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/2297/8538

ヌードマウスを用いた胃壁内腫瘍細片注入法による 胃癌肝転移モデルの作成

—特異的 DNA 増幅反応を用いた肝微小転移巣の検出—

金沢大学がん研究所外科部 (主任: 磨伊正義教授)

渡 辺 美 智 夫

癌の転移機構に関する研究が盛んに行われているが、転移モデルを用いた研究は、転移という現象を経時的にとらえるという意味でその確立は非常に重要なことである。中でもヌードマウス移植転移モデルは、移植腫瘍細胞の生物学的性質を保持するというヌードマウスの特性により、極めて優れた実験系といえる。しかし、ヌードマウスは造腫瘍性に優れるが、転移は稀であるため、確立が困難であったが、最近同所移植 (orthotopic transplantation) により高転移モデルが報告されるようになってきた。本研究は、この1つである腫瘍細胞の胃への移植により肝転移を形成するという、胃癌の自然肝転移モデルの作成を試みたものである。またこのモデルを使用し、マウスの組織からヒト腫瘍細胞を特異的に検出するために、ヒトに特異的な DNA 領域である β -グロビン遺伝子配列をポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction, PCR) 法を用い DNA を増幅し、サザンブロット法にて検出・解析し、移植後早期における肝微小転移巣の検出を試みた。本研究に用いた移植腫瘍細胞は、教室で胃癌症例から樹立した KKLS および関口が樹立した KATO-III を使用した。これをヌードマウスの皮下に移植し、固形腫瘍を作成した後これを細切し、細胞数にして 5×10^6 個に相当する腫瘍細片をヌードマウスの胃壁内に、18G 注射針にて注入した。移植後1週毎に胃と肝を摘出し、病理組織学的検討をするとともに、それぞれから DNA を抽出し、ヒトに特異的なヒト β -グロビン遺伝子に対する PCR 法による増幅反応を行い、サザンブロット法による検出解析を行った。なお、使用したマウスは各週4匹で、移植後4週目まで検討した。この結果、全経過にわたりすべてのヌードマウスの胃に肉眼的な腫瘍形成が認められ、胃に移植した腫瘍の生着が確認された。また、これを病理組織学的にも確認した。肉眼的な肝転移は KKLS では、移植後2週目以降に、KATO-III では移植後3週目以降に出現し、最終的な転移率はそれぞれ60% および100% と高率であった。病理組織学的には膨張性の発育を示す肝転移巣であった。一方肝における転移腫瘍細胞の存在を示唆する PCR 産物は、両腫瘍とも移植後1週目よりすでに検出され、週を追うごとに増加しており、肝転移の増殖過程に一致していた。この移植方法は、同所移植であるとともに、腫瘍細片つまり腫瘍塊を移植しており、これが高い肝転移率を示したものと考えられた。また、PCR 法を用いた腫瘍細胞の検出法は、従来にない特異性かつ定量性に優れる方法であり、肉眼的に出現する以前の微小肝転移巣の検出が可能と考えられた。従って、本モデルは、癌化学療法の基礎実験や肝転移の予測などへの応用が期待される。

Key words nude mice, liver metastasis from gastric carcinoma, polymerase chain reaction, human β -globin gene sequence, orthotopic transplantation

転移は、癌の悪性度を規定する重要な因子の1つである。それ故に、臨床家にとって、転移を早期にしかも正確に診断し、治療することは、非常に重要なことである。近年、この解明に向けて様々な研究が行われている。カドヘリンなどの接着因子や細胞外マトリックス分解酵素など転移に関わる化学物質や、p53 や Nm23 遺伝子をはじめとする遺伝子異常の解析は、特に注目を浴びている研究である。しかし、これらの解析を行っても、それは転移という経時的な過程の一部分をとらえているに過ぎない。さらに、これらの転移に関わる化学物質や遺伝子が、実際、転移の促進ないし抑制に働いているかを実証する必要がある。このために、適当な転移モデルの開発が要求されてきた。本研究で用いたヌードマウスはこの意味で移植された

癌細胞の形態ばかりでなく、生物学的性状もよく維持されていることから、転移モデルを作成するには格好の動物といえる¹⁰⁾。これまでにヌードマウスを用いた転移モデルがいくつか報告されてきたが、特に肝転移を目的としたモデルは確立が困難で、脾臓に癌細胞を注入して肝転移を起こす実験的肝転移モデルが中心であった。これは、転移の最初の過程である原発巣からの癌細胞の遊離という段階が省かれており、いわゆる同所移植による自然肝転移モデルこそより実際的な転移モデルといえる⁹⁻¹¹⁾。最近特に、肝転移モデルだけに限らず、この同所移植による自然転移モデルの重要性が強調されるようになってきた。そこで今回、胃癌の肝転移モデルを作成する目的で、ヒト胃癌細胞から作成した腫瘍細片をヌードマウスの胃壁内に注入

平成5年12月16日受付, 平成6年2月1日受理

Abbreviations: EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; PCR, polymerase chain reaction; SDS, sodium-dodecyl-sulfate; SSC, standard saline citrate; TE, Tris EDTA

するという移植方法を考案し、高率に肝転移を起こさせることに成功した。さらに、従来肝転移巣の検索は、肉眼的な転移結節数や病理組織学的検索に限られていたが、最も重要なことは、微小転移を検出する転移の早期診断法の開発である。臨床的にも、これは大変重要な意味を持つのは言うまでもない。これに加え、転移巣を経時的に追跡する際に、定量的な検出・解析が可能であれば、発育速度の算出や治療効果の判定については予後の予測に大変有用である。そこで、このモデルを応用し、癌の早期診断および転移巣の定量化を目指し、ヒトに特異的とされる β -グロビン遺伝子に着目し、これを鋳型とし、ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction, PCR) 法を用いて特異的に DNA を増幅し、胃腫瘍移植ヌードマウスの肝組織内からヒト癌細胞の検出、すなわち肝微小転移巣の検出を試みたので報告する。

対象および方法

I. 実験に使用した動物

ヌードマウスは、5週齢、雌の BALB/C (nu/nu) (日本チャールズリバー、厚木) を使用した。マウスは無病原体飼育条件下 (specific pathogen-free, SPF) で飼育し実験に使用した⁹⁾。

II. 移植腫瘍細胞

使用した腫瘍細胞は、いずれもヒト胃癌細胞である。金沢大学がん研究所外科学教室で胃癌 (組織型は未分化型腺癌) の症例から樹立した KKLS⁹⁾ と、関口が胃癌患者の胸水から樹立し

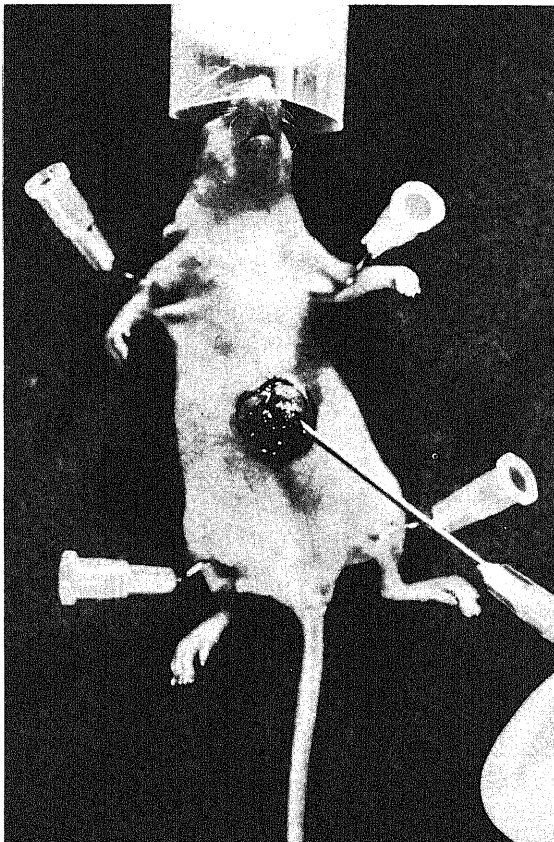


Fig. 1. The procedure of tumor transplantation. Small clusters of the tumor were injected into gastric wall of nude mouse with a 18 gauge needle.

た KATO-III[®] を使用した。細胞は、10% 非働化ウシ胎児血清 (GIBCO, Gland Island, USA) グルタミンを含んだ RPMI 培地 (ニプロ、大阪) を培養液とし、炭酸ガス培養器で、37°C、5%CO₂ 存在下において培養した。これらの細胞は、トリパンブルー色素排除法により、90% 以上の生細胞があることを確認してから、実験に使用した。

III. 移植腫瘍切片の作成

腫瘍細胞はグルタミン加 RPMI 培地で細胞浮遊液を作製し、27G 注射針を用いて 5×10^6 個 (0.5ml) をマウスの背部に移植した。移植後 2~3 週で、移植皮下腫瘍の大きさが、最大径で約 1cm になったところで、腫瘍を摘出した。摘出した腫瘍を、滅菌したはさみを用いて細切し、18G 注射針を通過できる大きさの細片を作成した。

IV. 移植方法 (図 1, 2)

エーテル麻酔下で上腹部正中に約 1cm の皮切をくわえ、開腹した。開腹後、胃を腹腔外へ露出し、大彎のはぼ中央部に 5-0 吸収糸 (オベポリックス、日本商事) で 1 針支持糸をかけた。支持糸の近傍から、18G 注射針を用いて、先に作成しておいた腫瘍細片を胃壁内 (固有筋層~漿膜下層にかけて) に注入した。マウス 1 匹当たり 100mg の腫瘍細片を移植した。これは、細胞を単離した状態にすると 5×10^6 個に相当する量であった。腫瘍細片注入後、注射針の刺入部からの腫瘍の漏出を防ぐために、これを 5-0 吸収糸で縫合した。胃を腹腔内へ戻し、腹壁ならびに皮膚を 3-0 絹糸で縫合し、閉腹した。なお、マウスの絶食期間は、手術前後約 1 日とした。

V. 肝転移巣の検討

移植して、1 週間後、2 週間後、3 週間後、4 週間後にマウスを屠殺し、胃ならびに肝を摘出し、移植した腫瘍の胃への生着と肉眼的な肝転移巣を確認した。胃および肝の摘出の際には、後に行う PCR 法による DNA の検出の特異性を保持するために、1 匹ずつ摂子やはさみなどの摘出器具を交換した。摘出した胃ならびに肝は、 -80°C で凍結保存した。なお、検討はそれぞれの腫瘍細胞につき各期間 4~5 匹ずつ行った。また、胃に生着した腫瘍と肝との間に接触があるような例は、肝への直接浸潤の可能性も疑われることから、検討の対象外とした。何故ならば、胃癌の肝転移の成立が、経門脈性 (血行性) である

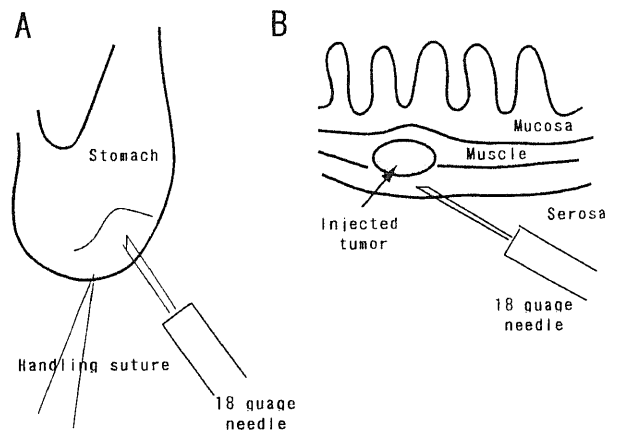


Fig. 2. Schema of the transplantation. (A) Injection into gastric wall (anterior wall) by countertraction with handling suture. (B) Injection into submucosal layer to subserosal layer of the stomach.

という前提のもとに、本モデルを作成しているためである。

VI. 病理組織学的検討

DNA 抽出用とは別のヌードマウスで、病理組織学的検討を行った。DNA 抽出用と同様に、移植して、1週間後、2週間後、3週間後、4週間後の胃および肝組織を摘出し、10%ホルマリン液で浸透固定後、ヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin and eosine, H. E.) 染色を行った。胃では、移植腫瘍の発育様式、発育形態、脈管侵襲などの浸潤の程度を検討した。また、肝では、転移巣の数、発育様式、発育形態、転移部位などを検討した。なお、検討は、それぞれの腫瘍細胞につき各期間2匹ずつ行った。

VI. DNA の抽出方法

摘出した胃および肝はそれぞれ 4ml, 8ml の細砕緩衝液 [0.1M 塩化ナトリウム, 0.2M ショ糖, 0.01M エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA), 0.3M Tris-HCl pH 8.0] を加え、細砕器にて細砕した。細砕物質は、250 μ l の 10% ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, SDS) を加え、攪拌し 65 $^{\circ}$ C の恒温槽で30分間加熱した。次に、600 μ l の 8M 酢酸ナトリウムを加え攪拌後、60分間氷冷後、4 $^{\circ}$ C, 11,000rpm において20分間遠心し、水層を回収した。クロロホルム 4ml を加え攪拌後、3,000rpm において10分間遠心し、DNA を抽出した。水層を分注し、クロロホルム 4ml, Tris EDTA (TE) 緩衝液 (10mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1mM EDTA pH 8.0) 飽和フェノール 4ml を加え攪拌後、3,000rpm にて15分間遠心し、DNA を抽出した。さらに、クロロホルム 4ml で抽出した後、分取した水層に 8ml のエタノールを加え、3,000rpm にて15分間遠心し DNA の沈澱物を得た。この沈澱物を 5ml の 80% エタノールで洗い、減圧乾燥させた後に、2ml の TE 緩衝液に溶解した。DNA 溶液にリボスクレアーゼ A (Sigma, St. Louis, USA) 100 μ g を加え、37 $^{\circ}$ C, 30分間反応させた後、3M 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 (3,000rpm, 15分), クロロホルム 2ml にて1回 (3,000

rpm, 10分) 抽出を行った。分取した水層に 5ml のエタノールを加え、3,000rpm 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 2ml で洗浄し、減圧乾燥させた後、TE 緩衝液に溶解した。

VI. 鋳型 DNA の調製

TE 緩衝液に溶解した DNA は、260nm における吸光度を測定して DNA 濃度を求めた後 (10. 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 KKLS の細胞の DNA を 100 μ g/ml の正常ヌードマウスの肝 DNA に希釈し、KKLS 細胞の濃度が 10², 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成

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索するプローブとして、ヒト β -グロビン遺伝子配列⁹⁾より Hu β -1~11 までの20塩基対からなる11種類のオリゴヌクレオチドを合成した。これら

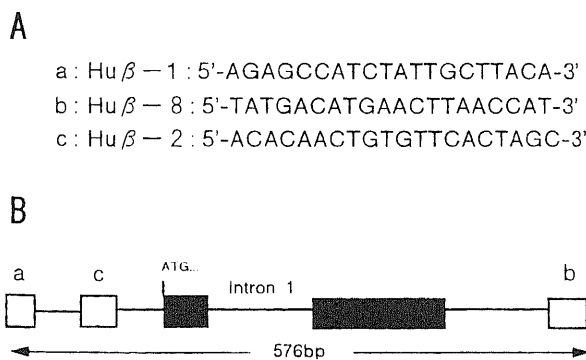


Fig. 3. Oligonucleotide primers and probe for polymerase chain reaction (PCR) amplification and their locations in the human β -globin gene. (A) Sequences of oligonucleotide primers and probe used in PCR. (a) The primer Hu β -1 is complementary to the (-)-strand. (b) The primer Hu β -8 is complementary to the (+)-strand. (c) Hu β -2 was used as the probe to detect the amplified DNA fragment. (B) Location of the oligonucleotides. The amplified segment is 576 bp with Hu β -1 and Hu β -8. The downward-pointing arrow indicates the β -globin initiation codon and filled boxes indicate the β -globin encoding region.

A KKLS DNA (μ g)

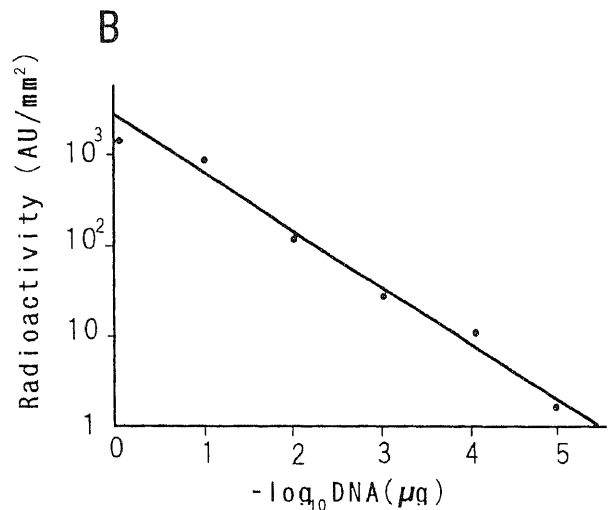
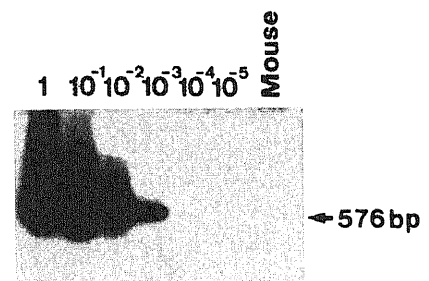


Fig. 4. PCR products from the genomic DNA of KKLS cells. (A) Southern analysis of PCR amplification products from serial dilutions of KKLS genomic DNA in the mouse liver DNA. The amplified segment by PCR is 576bp. The PCR products amplified with a primers, Hu β -1 and Hu β -8 could be detected at the concentration of 1 μ g, 10⁻¹ μ g, 10⁻² μ g, 10⁻³ μ g, 10⁻⁴ μ g and 10⁻⁵ μ g of KKLS DNA. But the PCR product could not be detected at only mouse DNA. (B) Plot of the radioactivities of the PCR products from the dilutions of KKLS against KKLS concentration. Radioactivity was described in arbitrary units (AU) per mm².

11種類のオリゴヌクレオチドより、ヒト β -グロビン遺伝子の特異的に検出するのに適当なプライマーペアーを検索したところ、576塩基対が増幅される Hu β -1 および 8 の組み合わせが、最も適当であることが判明したため、これを腫瘍細胞検出のためのプライマーペアーとして選択した(図3)。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, CA, USA) により合成した。

VIII. PCR 反応

調製した鋳型 DNA 1 μ g に対し PCR 反応緩衝液 (10mM Tris-HCl pH 8.3, 50mM 塩化マグネシウム), デオキシリボヌクレオチド混合液 [デオキシアデノシン三リン酸 (deoxyadenosine 5'-triphosphate, dATP), デオキシグアニン三リン酸 (deoxyguanosine 5'-triphosphate, dGTP), デオキシチジン三リン酸 (deoxycytidine 5'-triphosphate, dCTP), デオキシチミジン三リン酸 (deoxythymidine 5'-triphosphate, dTTP) 各 200 μ M], Taq DNA ポリメラーゼ (Perkin-Elmer Cetus, 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 に調製した。加熱による反応液の蒸発を防ぐために、100 μ l のミネラルオイル (Sigma) を重層した。反応には DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus) を使用し、熱変性を 94 $^{\circ}$ C, 1分間, アニーリングを 55 $^{\circ}$ C, 2分間, DNA の伸長を 72 $^{\circ}$ C, 1分間としこれを1サイクルとし26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 を加え振蕩し、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 3M 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% ブロムフェノールブルー、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 Tris, 2mM 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。泳動後サザンブロット法に準じて転写を行った。すなわち、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と振蕩し DNA を変性させた後、中和液 (3M 塩化ナトリウム, 0.5M Tris-HCl, pH 7.2) に浸し15分間室温にてゆっくり振蕩した。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, Greenwich, CT, USA) に 20 \times SSC (3M 塩化ナトリウム, 0.5M クエン酸ナトリウム) を用いて転写した。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ゼーション緩衝液 [6 \times standard saline citrate, SSC (0.9M 塩化ナトリウム, 0.09M クエン酸ナトリウム), Denhardt 液 (0.1% ポリビニールピロリドン, 0.1% ウシ血清アルブミン, 0.1% フィコー



Fig. 5. Macroscopic findings of transplanted gastric tumor and liver metastasis at three weeks after transplantation of KKLS tumor. A pointing arrow indicates metastatic nodules.



Fig. 6. Macroscopic findings of transplanted gastric tumor and liver metastasis at three weeks after transplantation of KATO-III tumor. Pointing arrows indicate metastatic nodules.

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°C 高温水槽において 1 時間の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 を用いた (図 2). プローブ DNA 13pmol に対し [γ^{32} P] ATP 50 μ Ci (Amersham), ポリヌクレオチドキナーゼ緩衝液 (50mM Tris-HCl 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 0.1mM EDTA pH 8.0), 10単位 T4 キナーゼ (宝酒造, 京都) および滅菌蒸留水を加え全量 20 μ l とし 37°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) 32 P 標識プローブを加え, 43°C において 16 時間ハイブリダイゼーションを行った. ハイブリダイゼーション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°C, 15 分間の洗浄を 2 回行い, 続いて 0.1 \times SSC および 0.1% SDS を含む溶液中で 45°C, 1 分間の洗浄を行った. 洗浄後 X 線フィルム (Kodak, New York, USA) 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, パイオイメージアナライザー (富士フィルム, 東京) により放射活性を測定した. 臓器あたりの腫瘍細胞数の算定は, 以下の如く行った. 正常ヌードマウスの胃ないし肝 DNA で段階希釈した KKLS 細胞の DNA を用いて, 各 PCR 反応ごとに検量線を作成し (図 4), 検量線に基づいて $-\log_{10}$ DNA (μ g) から DNA (pg) を求め, 以下の公式に基づい

て算出した.

$$\text{組織あたりの腫瘍細胞数} = \frac{\text{組織あたりの DNA 総量 } (\mu\text{g}) \times \text{組織 DNA } 1\mu\text{g あたりの各腫瘍の DNA 量 (pg}/\mu\text{g)}}{\text{細胞 1 個あたりの DNA 量 (6pg/cell)}}$$

XI. 臓器あたりの平均腫瘍細胞数の経時的推移の検討

各時期における臓器あたりの平均腫瘍細胞数を算出し, 指数関数グラフにプロットし, 腫瘍の発育曲線を作成した. また, これより求められる発育速度を, 腫瘍倍加時間として算出した.

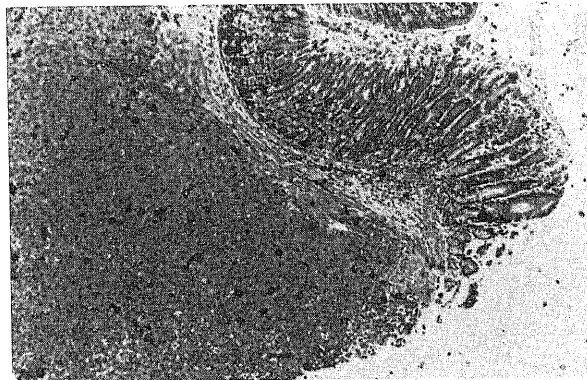
XII. 統計処理法

各時期ごとで, それぞれのマウスにおける臓器あたりの腫瘍細胞数から求められる平均土標準偏差 [n=5 (KKLS), n=4 (KATO-III)] を, その時期における平均腫瘍細胞数とした.

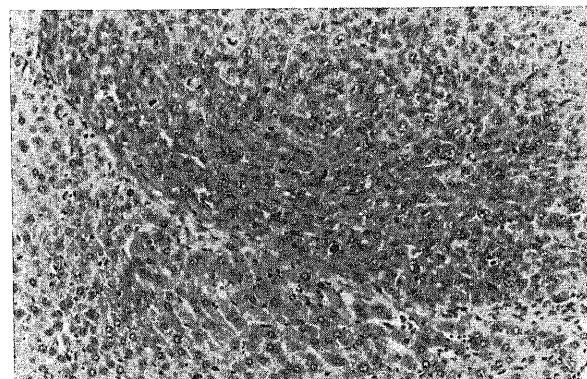
成 績

I. 移植後の経過

KKLS, KATO-III とともに移植した全例のマウスにおいて, 胃への腫瘍の生着がみられ, 移植成功率は 100% であった. いずれの腫瘍も膨張性の発育を示し (図 5, 図 6), いわゆる粘膜下腫瘍様の発育を示していた. 胃移植腫瘍は, 週を追うごとに次第に増大し, 移植後 2~3 週までは, 漿膜面への癌露出は不明

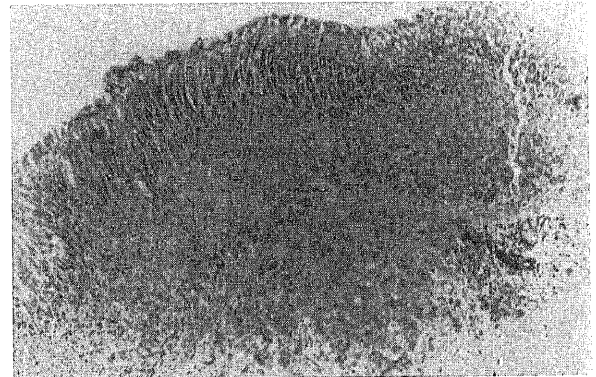


A

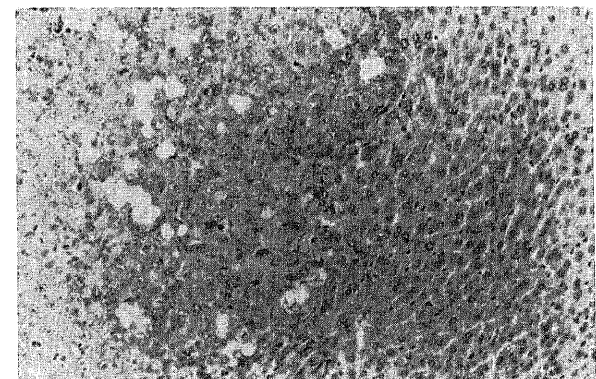


B

Fig. 7. Microphotograph of the stomach and the liver at three weeks after transplantation of KKLS tumor into nude mice. (A) The transplanted tumor grows expansively and tumor cells invaded into submucosal layer of the nude mouse stomach. (B) Liver metastatic nodule grows expansively with capsule. [hematoxylin eosine (H.E.) stain \times 40]



A



B

Fig. 8. Microphotograph of the stomach and the liver at three weeks after transplantation of KATO-III tumor into nude mice. (A) The transplanted tumor grew expansively and tumor cells invaded into submucosal layer of the nude mouse stomach. (B) Liver metastatic nodule grew invasively without foaming capsule. (H.E. stain \times 40)

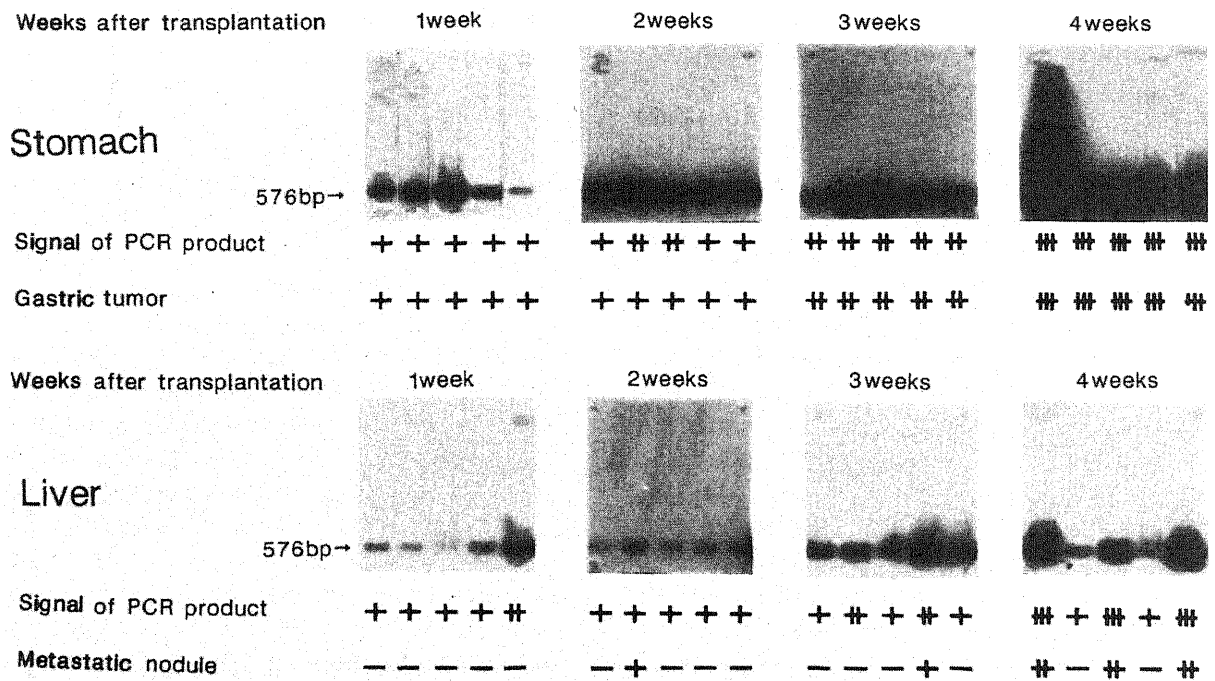


Fig. 9. Detection of gastric tumor and liver metastasis following transplantation of KKLS tumor into gastric wall. Lanes represent human β -globin gene sequence (576bp) obtained from each mouse and the same lane in stomach and liver derives from the same mouse. The transplanted gastric tumor has been growing macroscopically and PCR product has been also increasing week by week. The liver metastasis was observed out from two weeks after transplantation. But PCR products were detected one week after transplantation and have been increased week by week. Signal of PCR product: +, a little amount; -, moderate amount; -, massive amount. Gastric tumor: +, tumor size < 10 mm; -, 10 mm \leq tumor size < 20 mm; -, tumor size \geq 20 mm. Metastatic nodule: -, no nodule; +, < five nodules; -, \geq five nodules.

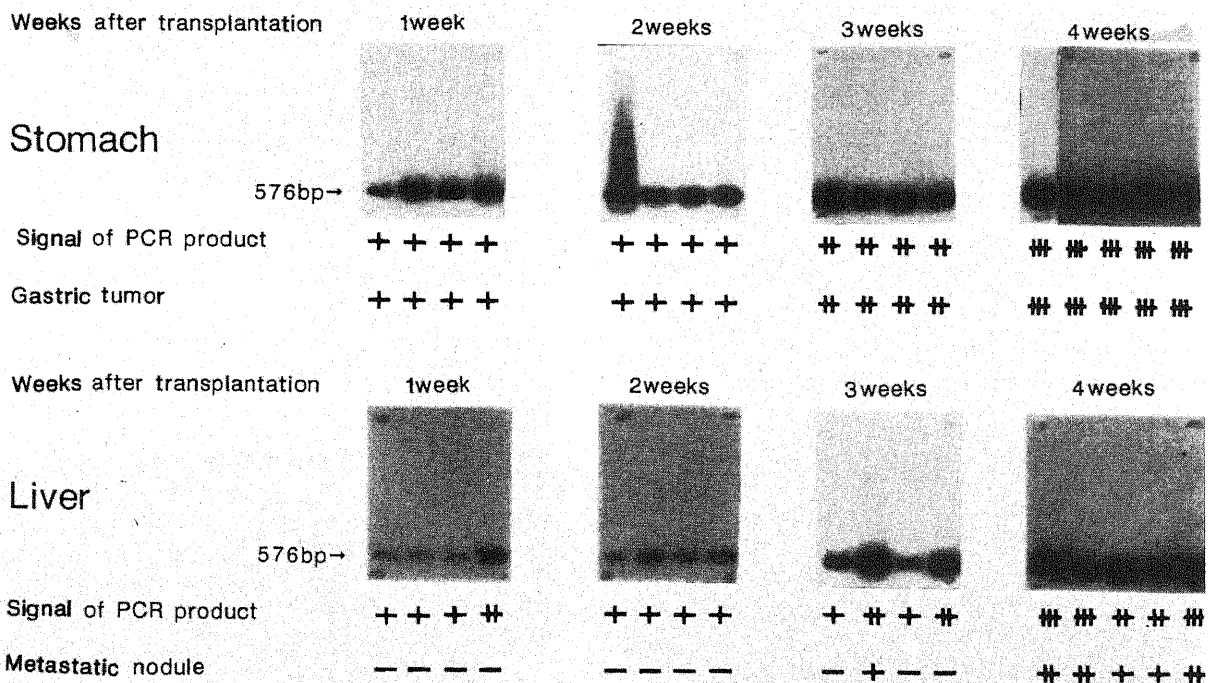


Fig. 10. Detection of gastric tumor and liver metastasis following transplantation of KATO-III tumor into gastric wall. Lanes represent human β -globin gene sequence (576bp) obtained from each mouse and the same line in stomach and liver derives from the same mouse. The transplanted gastric tumor has been growing maroscopically and PCR products have been also increasing week by week. The liver metastasis was found out from three weeks after transplantation. But PCR products was detected one week after transplantation and has been increased week by week. Signal of PCR product: +, a little amount; -, moderate amount; -, massive amount. Gastric tumor: +, tumor size < 10 mm; -, 10 mm \leq tumor size < 20 mm; -, tumor size \geq 20 mm. Metastatic nodule: -, no nodule; +, < five nodules; -, \geq five nodules.

隙であったが、それ以降では漿膜露出の状態となっていた。但し、これにより腫瘍の腹壁への癒着や癌性腹膜炎の状態となっているものはみられなかった。また、腫瘍が腸管を巻き込み腸閉塞の状態となっている例など、他臓器への浸潤を認めるものも見られなかった。ほとんどのマウスは、移植後5ないし6週目で悪液質の状態となり死亡した。したがって、今回の検討は、移植後4週目までとした。

一方、肝転移は、移植後1週目ではみられなかったが、KKLS では2週目から、KATO-III では3週目から出現した。観察期間4週で最終的な転移率はKKLS で60%、KATO-III で100% と高率に肝転移が認められた(図5, 図6)。

II. 病理組織学的検討

移植後2週目の胃を摘出し病理組織学的に検討したところ、移植した腫瘍塊は、固有筋層から漿膜下層に存在していた。また、移植後3週目では、いずれの腫瘍も膨張性に発育し、漿膜に露出すると共に一部粘膜にも露出していた。また、静脈侵襲もいずれの腫瘍とも陽性であった(図7-A, 図8-A)。

一方肝転移巣は、移植後4週目の例で検討したところ、KKLS では転移巣周囲に被膜を形成せず、腫瘍先進部はむしろ浸潤性に発育しており、移植巣との相違がみられた。また、KATO-III では周囲に被膜を形成し膨張性に発育していた。さらに、肝転移巣の局在性に関しては、いずれの腫瘍とも特徴的

な所見はみられなかった(図7-B, 図8-B)。

III. PCR 法による腫瘍細胞の検出

ヌードマウスの肝 DNA を用いて段階希釈した KKLS 細胞の DNA をテンプレートとして、PCR 法で増幅した結果、576 塩基対の 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 $10^{-5} \mu\text{g}$ までが検出可能であった。また、マウスの肝 DNA のみをテンプレートとした場合、DNA 断片は検出されなかった(図4-A)。したがって、特異性、感度ともに高い検出方法であることが示された。

そこで、腫瘍移植後経時的に摘出した胃および肝から DNA を抽出し、前述の方法でヒト β -グロビン遺伝子配列すなわちヒト腫瘍細胞の検出を行った。この結果、胃では、KKLS, KATO-III とともに移植後1週目から PCR 産物が検出されており、すなわち肉眼的および組織学的に確認した腫瘍の胃への生着が、この検出方法でも示された。また、移植後1週目における腫瘍細胞数の平均は KKLS で 6.8×10^6 個、KATO-III で 6.2×10^6 個で移植時に比べ増加していた。さらに、移植後の各時期における PCR 産物の量すなわち腫瘍細胞数は、それぞれのマウスで近似しており、また、腫瘍細胞数は週を追うごとに増加傾向をたどっていた。これは、移植方法の均一性を示す成績であり、また増加傾向は、肉眼的に見た胃に生着した腫瘍の経時的な発育過程と一致するものであった(図9-上段, 図10-上段)。

一方、肝では、移植後1週目から、両腫瘍とも検討したマウス全例に PCR 産物が検出された。さらに、移植後2週目以降においても、両腫瘍とも PCR 産物が全例に検出された。移植後の各時期における PCR 産物の量すなわち腫瘍細胞数は、胃の場合と異なり、それぞれのマウスで相違が認められた。ただし、肉眼的に肝転移が認められた例に PCR 産物が多く検出され、また、移植後4週目における肉眼的な肝転移結節の数と、PCR 産物の量との間には相関が認められた。しかし、肉眼的に肝転移が認められない時期、すなわち KKLS では移植後1週目、KATO-III では2週目以前でも、転移腫瘍細胞の存在を示す PCR 産物が検出された。このような時期すなわち移植後1週目における転移腫瘍細胞数の平均は、KKLS で 7.2×10^3 個、KATO-III で 4.8×10^3 個であった。さらに、それ以降でも肉眼的には肝転移のない例が認められたが、このような例でも PCR 産物は検出された。また、同程度の PCR 産物の量でも、肉眼的な肝転移が形成される例とされない例が認められた。この様に移植後の各時期における PCR 産物の相違や、肉眼的肝転移の有無と PCR 産物の検出に相違が認められた。経時的な変化を追跡したところ、着実に PCR 産物は週を追うごとに増加傾向を示し、経時的な肝転移巣の発育過程と一致した(図9-下段, 図10-下段)。

IV. 臓器あたりの平均腫瘍細胞数の推移

移植後の各時期における各マウスの胃および肝の腫瘍細胞数を求め、その平均値の推移を検討したところ、指数関数的に増加していた(図11)。これより求められた腫瘍の発育速度を示す腫瘍倍加時間は、胃では KKLS で約12日、KATO-III で約15日、一方肝では、KKLS で約10日、KATO-III で約13日であった。

考 察

1973年に Fidler¹⁰⁾により、マウス B16 メラノーマから細胞生

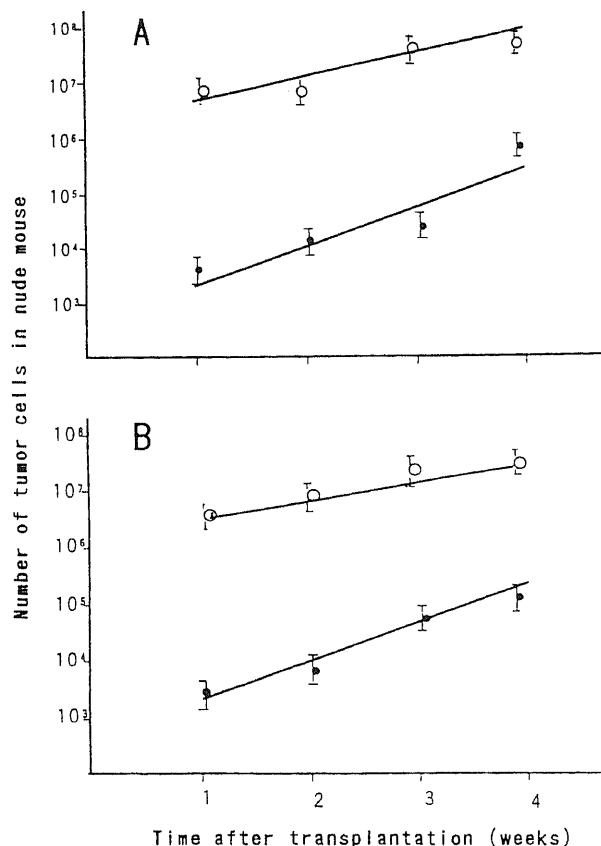


Fig. 11. Growth curve of KKLS cells (A) and KATO-III cells (B) in the stomach and the liver of nude mice from one week to four weeks after transplantation. Both tumor in the stomach and liver grew exponentially. Each point represents the mean \pm standard deviation [n=5 (KKLS), n=4 (KATO-III)]. ○, stomach; ●, liver.

物学的アプローチにより、高転移株が分離されて以来、種々の実験痛のみでなくヒト臨床癌から多くの高転移株が分離され、多方面からの解析が行われてきた。これまでは、生物学的あるいは生化学的な解析が主流であったが、最近では分子遺伝学的解析が盛んに行われている。その結果、癌の転移に関する知見、例えば、高転移細胞の生物学的、生化学的あるいは遺伝学的特性や、転移機序などについて数多くの報告がなされている。しかし、これらの事実の多くは、転移という過程のある時期における現象をとらえているに過ぎない。つまり、転移は癌細胞の原発巣からの離脱に始まり転移巣への着床・増殖に至る経時的な過程であるから、連続性のあるものとしてとらえなければならない。この意味で、適当な転移モデルの樹立は、個々の過程における現象をとらえる上でも有用であり、また経時的な観察も可能であることから、非常に意義が大きいと思われる。

現在までに報告されている転移モデルとしては、マウス、家兎¹¹¹²⁾、鶏卵¹³¹⁴⁾などを用いたものがあるが、中でもヌードマウスはその性格上、多用されているものの1つである¹⁵⁾。ヌードマウスは移植腫瘍細胞の生物学的・形態学的特徴をそのまま保持するといわれており¹⁶⁾、この意味からも、実験モデルとしては、腫瘍本来の特性が表現されるものとして、格好の動物であり、臨床材料から樹立したヒト癌細胞を用いることができるという利点がある。著者が転移モデルとして、ヌードマウスを選択した理由の1つはここにある。しかしながら、ヌードマウスは腫瘍移植により造腫瘍性を有するが、転移形成が稀であるという欠点があるため転移モデルとしての確立が困難であった。実際ヒト癌細胞の移植は、これまで皮下への移植が大半で、この方法ではごく限られた細胞にしか転移は認められなかった¹⁸⁻²¹⁾。本研究で使用したの胃癌細胞も、皮下移植で造腫瘍性を有するが、転移形成は認められなかった。これに対し、Fidlerの方法に準じ、転移を生じた細胞株を再度移植することを繰り返し、高転移株を作成することで、高転移モデルの確立が試みられたり¹⁰²²⁾、あるいは細胞に遺伝子導入するなどの処理や²³⁾、薬剤を用いて宿主すなわちヌードマウスの環境を変化させる²⁴⁾などさまざまな試みが行われてきたが、十分な成績すなわち高転移モデルを得るには至らなかった。そこで、ヒト癌細胞もその移植方法を工夫することにより、従来では起こり得なかったような高い転移率を示すモデルが報告されるようになった。特に消化器癌で最も問題となる転移再発形式の1つである肝転移に主眼をおいた、高肝転移モデルが報告され注目された。それは、脾臓に腫瘍細胞を移植し肝転移を起こすという実験的肝転移モデルであった²⁵⁾。しかし、このモデルでは転移形成の最初のスナップである癌細胞の原発巣からの遊離・血管内への侵入といった過程が省かれており、本来の意味での肝転移モデルとはいえない。この実験的転移モデルに代わり登場したのが、本研究の転移モデルである同所移植による自然転移モデルである。これは、Ewing²⁶⁾の解剖学的非無作為転移仮説(anatomical-mechanical theory)およびPaget²⁷⁾の土壌仮説(seed and soil theory)を踏破した同所移植すなわちヒト癌細胞の原発部位と同じ部位に腫瘍を移植する方法(例えば、腎癌細胞を腎被膜下に、胃癌細胞を胃壁に、大腸癌細胞を大腸壁になど)であり、これにより高率に転移を生じさせることに成功した²⁸²⁹⁻³⁰⁾。すなわち種(seed)としての可移植性腫瘍株の選択に加え、土壌(soil)としての移植部位の選択や、解剖学的無作為

転移仮説に従った目的とする臓器に転移を形成させるうえで最も有効と考えられる移植方法を検討してきた結果、今日の同所移植による高転移モデルが開発されたのである。

そこで、今回著者は、これらの方法を参考にし、肝転移のモデルを作成すべく、胃にヒト腫瘍を移植し肝転移を成立させることに成功した。今回の方法は、マウスの胃へ腫瘍細片を移植し、いったん胃に腫瘍を生着させた後、肝転移を起こすものである。胃に移植するという点に関しては、移植する部位すなわち胃そのものの環境が転移にかかわる重要な因子と考えられる。解剖学的な組織構造や、局所の免疫学的作用など胃で腫瘍が発育・浸潤するための基本的環境因子が重要な役割を果たしているということは、以前から言われていることである¹⁹³²⁾。これに加えて、最近注目されている細胞外マトリックス分解酵素およびその阻害因子の発現が、多大な影響を及ぼしていると考えられる。実際、これらの発現が、同所移植と皮下移植で差があると報告されており³³³⁴⁾、これは、移植する環境によって浸潤に関与する酵素の発現が制御され、その結果転移も抑制されることを示している。ただし、これまでに行われた胃への移植は、単離腫瘍細胞を胃壁に注入するという方法が主流であり、この方法ではせいぜい肝転移は20%前後とあまり成績は良くなかった³⁵³⁶⁾。実際この方法を著者も試みたが、胃への生着が悪く、転移率も低いことから、単離細胞ではなく腫瘍細片として、これを胃壁に注入することを試みた。細片といえども18G注射針を通過できる大きさの腫瘍塊であり、肝転移を生じやすいとされる充実性で腫瘍形成性の胃癌に類似した形態をとらしめたことが、好成績をもたらした要因であると考えられる。また、これに関連して、肝転移例で高い発現の見られることの多いカドヘリンなどの細胞接着因子の関与も示唆される³⁷⁾。これらの因子が総括的に働いて、高転移モデルが作成されたものと考えられる。さらにこの移植方法は、胃への腫瘍の生着性に優れるとともに腫瘍の発育も良好かつ速いものであった。これは、従来の単離腫瘍細胞を移植する転移モデルに比べ、より短期間に肝転移が形成され、迅速性にも優れていた。さらに、胃壁に注入するという方法を用いたことは、粘膜から発生し深部に浸潤するという胃癌本来の発育過程に近いものであり、腫瘍を胃壁に縫着する方法³⁸⁾などに比べると、腫瘍の発育過程という点でも優れた移植方法と考えられた。

今回用いた移植腫瘍細胞は、ヒト胃癌細胞であるKKLSおよびKATO-IIIである。KKLSは、教室で樹立した細胞株であるが、患者は、高度のリンパ節転移および肝転移を伴い、しかも発育速度が非常に速く、臨床的にも悪性度の高い症例であった。組織型は、未分化型腺癌であり、ヌードマウス移植により形態学的変化を示さなかった⁹⁾。一方のKATO-IIIは、胃癌胸膜転移症例の胸水中から樹立された細胞で、組織型は印環細胞癌であった⁷⁾。いずれの腫瘍細胞も悪性度が非常に高い細胞と考えられる。また、胃癌の肝転移は、経門脈性(血行性)転移といわれているが、実際、本モデルはこれに矛盾するものではなかった。

今回の検討では、胃移植腫瘍の増大に伴って生じた肝への直接浸潤の疑われる例は除いており、また肝転移結節は表面に露出するものもあったが、肝組織内に存在するものもみられ、これも血行性転移を示唆する証拠と考える。家兎の転移モデルで、肝の転移部位に関する検討が行われているが、本モデルでは、病理組織学的に、転移部位に特徴的な所見は見られなかつ

た。

今回、このモデルを応用して、肝の微小転移巣の検出も同時に試みた。従来転移巣の評価は、肉眼的な転移結節数や病理組織学的検索によるもので行われていたが、肉眼的に認識しえない微小な転移巣に関しては、もちろん不可能であった。しかも、転移を数量として評価するには、あまりにも概算的で、定量性にも優れていなかった。これを克服する方法として、遠藤ら³⁹⁾⁴⁰⁾は、鶏卵法、あるいはヌードマウスを用いた転移モデルで、転移巣の簡便かつ定量的な検出法として分子生物学的手法を応用し、鶏卵胎児臓器におけるヒト転移細胞に含まれる DNA 配列の特定領域を PCR 法⁴¹⁾⁴²⁾を用いて増幅し、それらの増幅断片を検出することにより、ヒトがんの転移巣を定量的に検出する方法を考案した。

今回、著者のヌードマウス胃癌肝転移モデルにおいても、この検出法を用いて肝転移巣の検出を試みた。前述のごとく、ヒト胃癌細胞をヌードマウスの胃に移植し、移植後1週間目、2週間目、3週間目、4週間目にマウスの胃および肝を摘出し、それぞれから DNA を抽出した。抽出した DNA は、ヒトに特異的な DNA 配列として今回用いた β -グロビン遺伝子配列⁴³⁾ (576bp) に対するプライマーおよびプローブを用い、PCR 法による特異的 DNA 増幅とサザンブロット法⁴⁴⁾による増幅ヒト DNA 断片の検出解析を行い、転移腫瘍細胞の定量化を試みた。まず、対照という意味から、胃に関して検討した結果、摘出したすべての胃において、PCR 法により増幅されたヒト由来の β -グロビン遺伝子断片 (576bp) が検出され、この放射活性から求めた臓器あたりの平均腫瘍細胞数は、週を追うごとに指数関数的に増加していた。これは、腫瘍の発育過程に一致するものであり、Collins⁴⁵⁾や Spratt⁴⁶⁾のいう、腫瘍はその発育速度に従い発育するという既知の事実を示す結果であった。通常発育速度を求める場合、腫瘍径や腫瘍マーカーの推移から算出するが、腫瘍細胞数の推移から求めた今回の結果は、実際の数値により近似したものと考えられる。ただし、各時期に異なるマウスで腫瘍の発育過程を検討したという問題点が残るが、最初に移植した腫瘍は同量であり、発育形態もすべてのマウスではほぼ同一であることから、同一のマウスでの腫瘍の発育過程とほぼ同様としても差し支えないと考えられる。実際、各時期で検出される PCR 産物の量は、すべてのマウスで近似しており、これは移植時に用いた腫瘍細胞の性状の均一性や、移植手技の画一性を表すものであり、これらも上記所見を支持するものと考えられた。

次に肝において検討した結果、KKLS では移植後2週目で、KATO-III では3週目で初めて肉眼的に肝転移が出現したが、両腫瘍とも、それ以前の1週目からすでに微小転移巣の存在を意味する PCR 産物が検出された。これは、今回の検出法を用いれば、肝転移巣が肉眼的に確認できる以前に、微小肝転移巣の存在を確認することが可能であることを意味するものとして注目された。さらに、転移腫瘍細胞数の算定も可能であることから、肝転移巣をより正確に定量的に検出することも可能であった。また、先の胃のごとく、各時期における平均転移腫瘍細胞数を算定したところ、各マウス間でばらつきがあるものの、週を追うごとに細胞数は、指数関数的な増加を示し、これもまた腫瘍の発育過程に一致する結果であった。但し、胃にみられたように、各時期における PCR 産物の量に近似性が認められず、ばらつきが認められたが、これは転移部位すなわち肝

における腫瘍細胞の生着や造腫瘍性に各マウス間で相違があるためと考えられた。また、前述のごとく、胃移植腫瘍と肝に直接の接触のあるような例は除いていることや、臓器摘出の際に器具を交換していることから、移植後1週目という非常に早期にもかかわらず、検出された PCR 産物は、胃から血行性に転移し肝に生着した腫瘍細胞に由来するものと考えられた。微小転移巣の検出には、病理組織学的方法ではおのずと限界があり、PCR 法を用いたこの方法は感度にも特異性にも優れ、しかも定量が可能であり従来にない有用な検出法であると思われた。

今後のこのモデルの応用としては、早期治療を対象とした化学療法の基本実験が挙げられる。临床上、化学療法が行われる時期と対応させ、移植後のさまざまな時期で化学療法を施行し、その効果判定を行うものである。また、臨床材料を用いた癌の悪性度の予測を行うことも大変興味深いと考えられる。手術材料を、ヌードマウスに移植し造腫瘍性、浸潤性、発育能、転移能などの評価を行う試みがなされ¹⁶⁾²⁰⁾⁴⁹⁾⁵⁰⁾、実際の症例ともある程度相関が認められている。本モデルを応用すれば、移植後早期に PCR 法を用い、転移巣の検出を行うことによって、将来的におこりうるであろう肝転移を予測できるのではないかと考えられた。いずれも臨床へのフィードバックが期待できるものと考えている。

結 論

ヌードマウスの胃壁内に、ヒト胃癌細胞である KKLS および KATO-III で作成した腫瘍断片を注入・移植し、胃癌の自然肝転移モデルを作成した。また、このモデルを応用し、微小肝転移巣を検出するために、マウスの組織からヒト腫瘍細胞を検出する方法としてヒトに特異的な遺伝子配列である β -グロビン遺伝子配列 (576bp) を PCR 法で増幅し、サザンブロット法で検出・解析した。

1. KKLS では移植後2週目に、KATO-III では移植後3週目から肉眼的な肝転移が出現した。

2. 肝転移率は、KKLS では60%、KATO-III では100%であった。

3. 病理組織学的には、胃移植腫瘍は両腫瘍とも、膨張性の発育を示し、全層を貫いていた。また、脈管侵襲は陽性であった。一方、肝転移巣は、両腫瘍とも被膜を有し、膨張性に発育していた。また、転移部位に特徴的な所見は認められなかった。

4. ヒト腫瘍細胞を PCR 法およびサザンブロット法で検出した結果、肝転移巣が肉眼的に認められる以前に、微小転移を示唆する PCR 産物が検出された。これは移植後1週目という非常に早期の時期から検出され、しかも肝転移巣の発育過程に一致するごとく週を追うごとに指数関数的に増加していた。

以上の結果から、今回作成したモデルは高率に肝転移を起こす優れた胃癌自然肝転移モデルになりうると思われた。また、従来とは異なる今回の転移巣の検出法は、微小転移を検出することが可能であり、今後転移にかかわる基礎実験に応用されることが期待される。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師齋伊正義教授に深甚なる謝意を表します。また、終始直接の御指導を戴きました金沢

大学がん研究所化学療法部佐々木琢磨教授、田中基裕助教授、遠藤良夫先生ならびに外科部高橋豊助教授に深謝致します。最後に多大なるご協力を賜りました金沢大学がん研究所外科部ならびに化学療法部の皆様に厚く御礼申し上げます。

なお、本論文の要旨の一部は、第93回日本外科学会総会(1993年、仙台)、第41回日本消化器外科学会総会(1993年、神戸)、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) 野村達次: ヒト癌の生物学を研究する手段としてのヒト癌/ヌードマウス系. ヌードマウスと抗癌剤評価(野村達次, 桜井欽夫, 稲葉 貫編), 第1版, 187-199頁, 蟹書房, 東京, 1991.
- 2) 秦 順一, 上山義人, 玉置憲一: ヌードマウスにおける人癌増殖. 人癌とヌードマウス, 第1版, 53-75頁, 医歯薬出版, 東京, 1982.
- 3) Fidler, I. J.: Rationale and methods for use of nude mice to study the biology and therapy of human cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, 5, 29-42 (1986).
- 4) Fidler, I. J.: Orthotopic implantation of human colon carcinomas into nude mice provides a valuable model for the biology and therapy of metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, 10, 229-243 (1991).
- 5) Fidler, I. J., Natio, S. & Pathak, S.: Orthotopic implantation is essential for the selection, growth and metastasis of human renal cell cancer in nude mice. *Cancer Metastasis Rev.*, 9, 149-165 (1990).
- 6) 斉藤宗雄: ヌードマウス・ヌードラットの飼育管理と取扱い. 人癌とヌードマウス, 第1版, 309-315頁, 医歯薬出版, 東京, 1982.
- 7) 沢口 潔, 浅井 透: ヒト胃癌株(KKLS)の樹立とその性状. *Human Cell*, 2, 87-88 (1989).
- 8) Sekiguchi, M., Sakakibara, K. & Fujii, G.: Establishment of cultured cell lines derived from a human gastric carcinoma. *Jap. J. Exp. Med.*, 48, 61-71 (1978).
- 9) Lown, R. M., Efstratiadis, A., O'Connell, C. & Maniatis, T.: The nucleotide sequence of the human β -globin gene. *Cell*, 21, 647-651 (1980).
- 10) Fidler, I. J.: Selection of successive tumor lines for metastasis. *Nature*, 242, 148-149 (1973).
- 11) Tabuchi, Y., Nakamura, T. & Saitoh, Y.: Liver metastasis induced by implantation of VX2 cancer into the gastrointestinal. *J. Surg. Res.*, 50, 216-222 (1991).
- 12) 多田康之, 多淵芳樹, 斉藤洋一: VX2 癌による高頻度肝転移・肝再発家兎胃癌モデルの確立とその発育進展・過程の組織学的解析, 日外会誌. 8, 818-825 (1992).
- 13) Karnofsky, D. A., Ridgway, L. P. & Patterson, P. A.: Tumor transplantation to the chick embryo. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 55, 313-329 (1952).
- 14) Nishikawa, K., Sasaki, T., Endo, Y. & Nitta, K.: Experimental model for predicting metastatic ability of tumor using chick embryo. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 17, 319-325 (1987).
- 15) 森川清志: ヌードマウスにおける転移モデル. 図説臨床『癌』シリーズ, 癌転移の診断と治療, 第1版, 118-122頁, メジカルビュー社, 東京, 1990.
- 16) Li, H., Zhang, Y. C. & Tsuchihashi, T.: Invasion and metastasis of SY86B human gastric carcinoma cells in nude mice. *Jpn. J. Cancer Res.*, 79, 750-756 (1988).
- 17) Nakanishi, H., Yasui, K., Yamagata, S., Shimizu, S., Ando, S. & Hosoda, S.: Establishment and characterization of a new spontaneous metastasis model of human gastric carcinoma in nude mice. *Jpn. J. Cancer Res.*, 82, 927-933 (1991).
- 18) Takao, S., Shimazu, H., Maenohara, S., Hokita, S. & Aikou, T.: Tumorigenicity, invasion and metastasis of human gastric cancer in nude mice. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 117, 533-538 (1991).
- 19) Rodolfo, M., Balsari, A., Clemente, C. & Fossati, G.: Tumorigenicity and dissemination of primary and metastatic human melanomas implanted into different sites athymic nude mice. *Invasion & Metastasis*, 8, 317-331 (1988).
- 20) Wilson, E. L., Gartner, M. F., Campbell, J. & Doedle, E. B.: Metastasis of human melanoma cell line in the nude mouse. *Int. J. Cancer*, 41, 83-86 (1988).
- 21) Kyriazis, A. A. & Kyriazis, A. P.: Preferential sites of growth of human tumors in nude mice following subcutaneous transplantation. *Cancer Res.*, 40, 4509-4511 (1980).
- 22) 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).
- 23) Kerbel, R. S., Cornil, I. & Theodorescu, D.: Importance of orthotopic transplantation procedures in assessing the effects of transfected genes on human tumor growth and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, 10, 201-215 (1991).
- 24) Sawada, H., Nakano, H., Miyagi, N., Nishiwada, T., Watanabe, A., Okumura, T., Yamada, Y., Tsutsumi, M., Nakae, D., Nakano, H. & Konishi, Y.: Enhanced liver metastasis potential of alpha-fetoprotein-producing human gastric carcinoma after carbon tetrachloride-induced liver damage in nude mice. *Jpn. J. Cancer Res.*, 80, 341-347 (1989).
- 25) Raffaella, G., Dobera, 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).
- 26) Ewing, J.: *Neoplastic Diseases: A Treatise on Tumors*, 3rd Ed., Chap. 4, p87-100, Saunders Inc., Philadelphia, 1982.
- 27) Paget, S.: The distribution of secondary grown in cancer of the breast. *Lancet*, 1, 571-573 (1889).
- 28) Fidler, I. J.: New developments in vivo models of neoplasia. *Cancer Metastasis Rev.*, 10, 191-192 (1991).
- 29) Naito, S., Eschenbach, A. C., Giavazzi, R. & Fidler, I. J.: Growth and metastasis of tumor cells isolated from a

human renal cell carcinoma implanted into different organs of nude mice. *Cancer Res.*, **46**, 4109-4115 (1986).

30) Price, J. E., Polyzos, A., Zhang, R. D. & Daniels, L. M.: Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice. *Cancer Res.*, **50**, 717-721 (1990).

31) Morikawa, K., Walker, S. M., Nakajima, M., Pathak, S., Jessup, M. & Fidler, I. J.: Influence of organ environment on the growth, selection and metastasis of human colon carcinoma cells in nude mice. *Cancer Res.*, **48**, 6863-6871 (1988).

32) Hokita, S., Takao, S., Muramatsu, T. & Shimazu, H.: Monoclonal antibodies against a human gastric cancer cell line with lung metastatic potential in nude mice define antigen with different expression between the primary and metastatic liver lesions. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **118**, 228-234 (1992).

33) Nakajima, M., Morikawa, K., Fabra, A., Bucana, C. D. & Fidler, I. J.: Influence of organ environment on extracellular matrix degradative activity and metastasis of human colonic carcinoma cell. *J. Natl. Cancer Inst.*, **82**, 1890-1898 (1990).

34) 清水元治, 土屋百合, 佐藤 博: マトリックスメタロプロテアーゼと転移能. *細胞工学*, **11**, 25-35 (1992).

35) 地主和人, 平林直樹, 高山真一, 松木 啓, 峠 哲哉: ノードマウスを用いた胃腫瘍転移モデルの作製. *日外会誌*, **1**, 105 (1991).

36) Takumi, Y.: Manifestation of metastatic potential in human gastric cancer implanted into the stomach wall of nude mice. *Jpn. J. Cancer Res.*, **79**, 945-941 (1988).

37) 塩崎 均, 土岐祐一郎, 森 武貞: 癌転移とカドヘリン. *HUMAN CELL*, **6**, 94-99 (1993).

38) 古川俊治, 久保田哲朗, 北島政樹: 腫瘍胃壁縫着法によるヒト胃癌株転移モデルの作製. *日外会誌*, **93**, 561 (1992).

39) Endo, Y., Sasaki, T., Fumio, H. & 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).

40) 太田安彦, 遠藤良夫, 野口美香, 田中基裕, 小田 誠, 林義信, 清水淳三, 渡辺洋宇, 佐々木琢磨: PCR法を用いたノードマウスにおけるヒト転移腫瘍細胞の定量的検出. *肺癌*, **33**, 51-59 (1993).

41) Kwok, S., Higuchi, R.: Avoiding false positive with PCR. *Nature*, **239**, 237-238 (1989).

42) Mullis, K. B. & Fallona, F. A.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *In* R. Wu (ed.), *Methods in Enzymology*, 1st ed., p335-350, Academic Press, San Diego, 1987.

43) Erlich, H. A.: PCR Technology, 1st ed., p28-52, Stockon Press, New York, 1989.

44) 榊 佳之: PCR法の原理と基本テクニック, *実験医学*, **8**, 1107-1111 (1990).

45) Saiki, R. K., Scharf, S., 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).

46) Southern, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517 (1975).

47) Collins, V. P., Loeffler, R. K. & Tivey, H.: Observations on growth rates of human tumors. *Am. J. Roentognol.*, **76**, 988-1000 (1956).

48) Spratt, J. S. & Jr. Spratt, T. L.: The rate of growth of skeletal sarcomas. *Cancer*, **18**, 14-24 (1965).

49) Jessup, J. M.: Metastatic potential of human colorectal carcinomas implanted into nude mice: Prediction of clinical outcome in patients operated upon for cure. *Cancer Res.*, **49**, 6906-6910 (1989).

50) Koziowski, J. M., Fidler, I. J. & Hart, I. R.: Metastatic Behavior of human tumor cell lines grown in the nude mouse. *Cancer Res.*, **44**, 3522-3529 (1984).

Establishment of a Liver Metastatic Model of Gastric Carcinoma with Orthotopic Transplantation of Small Clusters of Human Gastric Carcinoma Cells into the Gastric Wall of Nude Mice-Specific Detection of Microscopic Metastatic Lesion of the Liver in Nude Mice by Polymerase Chain Reaction Michio Watanabe, Department of Surgery, Cancer Research Institute, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., **103**, 357—368 (1994)

Key words nude mice, liver metastasis of gastric carcinoma, orthotopic transplantation, human β -globin gene, polymerase chain reaction

Abstract

In many studies of cancer metastasis, development of a metastatic model might prove more significant in furthering knowledge of a multistep process of the metastasis. The metastatic model using nude mice is better than other metastatic models because the biological behavior of the tumor is maintained after transplantation. Although in spite of the observed fact that the development of a metastatic model using nude mice was difficult because of its good tumorigenicity but poor metastatic potential, it has been recently reported that a highly metastatic model had been established by orthotopic transplantation. In this study, a liver metastatic model was established by the orthotopic transplantation of human gastric carcinomas, KKLS or KATO-III, into nude mice. And a human specific β -globin-related sequence (576bp) in the DNA extracted from the nude mice's liver was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and detected by Southern blot method to detect metastasized human carcinoma cells. The small clusters of gastric carcinomas produced from these tumors grew in subcutis, transplanted into the gastric wall with an 18 gauge needle. The small clusters were equivalent to 5×10^6 cells in single cells. The stomach and the liver were dissected every week, and the DNA was extracted from each organ using the rapid DNA preparation method and a human β -globin-related sequence in the DNA was detected. In each group, four to five mice a week were studied up to four weeks after transplantation.

In another study dissected organs were investigated histopathologically. The transplanted tumor was macro- and microscopically tumorigenic in the stomach of all mice. Liver metastasis was observed from two weeks after transplantation in KKLS and from three weeks in KATO-III. The rate of liver metastasis was finally 60% in KKLS and 100% in KATO-III. Histopathologically, the focus of liver metastasis was extensively grown with a capsule. The PCR-amplified fragments in the liver were already detected in the first week, increasing week by week, and there was a correlation between the increasing process of PCR products and the growth of liver metastasis. It was suggested that this orthotopic transplantation using small clusters resulted in producing a highly metastatic model. This tumor detection technique, which is specific and quantitative, can contribute significantly to precise detection of microscopic metastasis. This model and detection technique may be useful for early therapeutic experiments, prediction of liver metastasis and analysis of the metastasis mechanism.