

# An Experimental Study of Biological Variation among Primary and Metastatic Tumors Xenotransplanted into Nude Mice

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8189">http://hdl.handle.net/2297/8189</a>

## 大腸癌における原発巣と転移巣の生物学的差異に 関する実験的研究

金沢大学がん研究所外科学講座 (主任：磨伊正義教授)

太 田 孝 仁

(平成2年2月9日受付)

癌の原発巣と転移巣の不均質性 (heterogeneity) に関しては種々の研究報告がみられるが、ヒトの腫瘍における両者の生物学的差異については十分な検討がなされていないのが現状である。その理由の一つとして原発巣と転移巣を同一条件で比較できる実験モデルがほとんどないことにある。そこで今回著者は転移腫瘍の生物学的性状を研究するため同一患者でリンパ節転移巣と肝転移巣を有する4例の進行大腸癌症例から原発巣、肝転移巣、リンパ節転移巣の3部位を同時に別々のヌードマウスに移植する実験系を考案した。これらの4例 (KHC, YSC, FAC, IMC), 12株を用い組織学的所見の差異、発育速度、腫瘍マーカー産生能、化学療法剤に対する感受性など種々の角度から部位別に比較検討した。組織学的には4例ともに原発巣と転移巣の間に大きな差はみられずヌードマウス移植および継代による変化もほとんど見られなかった。発育速度を指数関数的増殖期から求めた平均倍加時間でみたが4例とも原発巣移植株 (tumor strain transplanted from primary lesion, P株), 肝転移巣移植株 (tumor strain transplanted from hepatic metastasis, H株), リンパ節転移巣移植株 (tumor strain transplanted from lymph node metastasis, N株) の間に有意な差を認めなかった。これに対し、腫瘍マーカー産生能を癌胎児性抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) が測定しえた KHC と糖鎖抗原 19-9 (carbohydrate antigen 19-9, CA 19-9) が測定し得た YSC を用いて検討したところ KHC における CEA/腫瘍重量比は P株: 11.1, H株: 87.4, N株: 2.8と H株において著明に高い傾向を示した。ところが YSC における CA 19-9/腫瘍重量比は H株: 0.60に対し P株: 22.0, さらに N株では 101.5と極めて高い値を示した。また化学療法の感受性の差異をマイトマイシン C (Mitomycin C, MMC) を用い KHC, YSC で腫瘍縮小効果について検討したところ KHC に対する MMC の効果では、P株および N株では有効であったが、H株では効果は認められなかった。また YSC に対する MMC の抗腫瘍効果では N株においては著明に抑制されたものの P株, H株では抗腫瘍効果を得ることはできなかった。以上よりヌードマウス移植腫瘍を用いた大腸癌の原発巣と転移巣の比較では、組織学的所見と発育速度には大きな変化は認められなかったが腫瘍マーカー産生能と化学療法の感受性にはかなりの差を認め、いわゆる原発巣と転移巣の間の不均質性 (heterogeneity) の存在が強く示唆される。

---

**Key words** colonic cancer, nude mouse, primary lesion and metastatic lesion, heterogeneity

---

Abbreviations: CA 19-9, carbohydrate antigen 19-9; CEA, carcinoembryonic antigen; H株, tumor strain transplanted from hepatic metastasis; MMC, Mitomycin C; N株, tumor strain transplanted from lymph node metastasis; P株, tumor strain transplanted from primary lesion.

癌の原発巣と転移巣の生物学的差異に関しては、化学療法感受性の差異<sup>16)~21)</sup>など臨床上重要な問題を含んでいるが、いまだ充分な検討がなされていないのが現状である。その理由の一つとして原発巣と転移巣を同一条件で比較できる実験モデルがほとんどないことにある。そこで今回著者は同一患者でリンパ節転移巣と肝転移巣を有する大腸癌症例において手術時、原発巣、肝転移巣、リンパ節転移巣の3部位よりの腫瘍切片を採取し、別々のヌードマウスへ移植する実験系を考案した。3部位同時に移植、継代に成功した4例、12株を用い組織学的所見、倍加時間による発育速度、癌胎児性抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA), 糖鎖抗原 19-9 (carbohydrate antigen 19-9, CAI 19-9) などの腫瘍マーカー産生能、マイトマイシンC (Mitomycin C, MMC) を用いた化学療法剤に対する感受性などについて種々の角度から原発巣と転移巣の生物学的差異について検討した。

#### 材料および方法

##### I. 実験腫瘍

原発巣、肝転移巣、リンパ節転移巣の3部位を同時に移植、継代に成功したヌードマウスヒト大腸癌株である KHC, FAC, IMC, YSC の4例、12株を用いた。使用した4例の臨床病理学的所見を『大腸癌取扱い規約』<sup>9)</sup>に従ってみると原発巣の発生部位は上行結腸、下行結腸、S状結腸、直腸各1例ずつであった。肉眼型では2型、3型が各2例で、深達度はいずれも漿膜下に露呈していた。癌組織型は4例中3例が中分化型腺癌で間質反応で硬癌の症例はみられなかった。また

全例肝転移は H<sub>2</sub>以上、リンパ節転移は n<sub>2</sub>以上と進行していた (表1)。なお今回の比較検討には KHC は5継代、FAC は2継代、IMC は2継代、YSC は7継代した移植腫瘍を用いた。

##### II. 実験動物

三協ラボサービス (富山) より購入した4~6週令の雌のヌードマウスを使用し、特定の病原体に感染されていない (specific pathogen-free) 状態で飼育した。飼育ゲージはエチレンオキシドガス滅菌を施し床敷及び飼料は放射線滅菌したものをを用いた。

##### III. 移植方法

同一患者の大腸癌原発巣、肝転移巣、リンパ節転移巣を手術時摘出後、ただちにそれぞれの部位から採取した腫瘍を滅菌シャーレ内に入れ、ペントシリン (富山化学工業, 東京) 100 μg/ml を含有する生理的食塩水を約 20ml 分注し3回洗浄した。その後約 5mm 角に細切した腫瘍切片をヌードマウス背部皮下に移植した。移植された腫瘍をそれぞれ原発巣移植株 (tumor strain transplanted from primary lesion, P株)、肝転移巣移植株 (tumor strain transplanted from hepatic metastasis, H株)、リンパ節転移巣移植株 (tumor strain transplanted from lymph node metastasis, N株) とした。

##### IV. 検討項目

###### 1. 組織学的変化の比較

4例、12株において患者の3部位の組織像とヌードマウス移植腫瘍の組織像との形態学的変化の有無を光顕的に観察した。

###### 2. 倍加時間の比較

Table 1. List of human colonic cancer simultaneously xenotransplanted into nude mice with primary tumor, lymph-node-and hepatic foci

Colonic cancer line	Patient		Property of colonic cancer in the patient <sup>a)</sup>					Grade of metastasis <sup>a)</sup>		
	Sex <sup>a)</sup>	Age (years old)	Site <sup>d)</sup>	Gross type	Depth <sup>e)</sup>	Type of tumor cells <sup>f)</sup>	Stroma <sup>g)</sup>	HM	PD	MLM
KHC	F	64	A	3	ss	muc	med	2	0	2
FAC	F	54	D	2	ss	mod	int	2	2	4
IMC	F	45	S	3	ss	mod	int	3	0	2
YSC	M	47	R	2	se	mod	int	2	0	4

a) M, male; F, female.

b) Classified according to General Rules for Clinical and Pathological Studies on Cancer of Colon, Rectum and Anus.

c) A, ascending colon; D, descending colon; S, sigmoid colon; R, rectum.

d) ss, subserosa; se, serosal exposure.

e) muc, mucinous adenocarcinoma; mod, moderately differentiated adenocarcinoma.

f) med, medullary growth; int, intermediate growth.

g) HM, hepatic metastasis; PD, peritoneal dissemination; MLM, microscopic lymph-node metastasis.

ヌードマウス移植腫瘍の大きさを継続的にノギスで測定し、腫瘍の長径×短径<sup>2</sup>/2で推定腫瘍重量を算出した<sup>2)</sup>。それより発育速度を対数増殖期から倍加時間を求めて比較した。

### 3. 腫瘍マーカー産生能の比較

CEA が測定しえた KHC と CA 19-9 が測定し得た YSC を用いて検討した。方法はヌードマウス移植腫瘍の大きさが約1.5cm になった時点で全例屠殺し、血清 CEA と CA 19-9 を測定(両者とも RIA ビーズ固相法)し腫瘍重量との比を求め平均腫瘍重量比を算出した。

### 4. MMC に対する感受性の比較

最後に化学療法感受性の差異を MMC (協和発酵工業, 東京) を用い KHC, YSC で腫瘍縮小効果につ

いて検討した。制癌剤の投与開始時期ならびに効果判定は Battelle Columbus Laboratories Protocol<sup>3)</sup> に従って行った。すなわち腫瘍の大きさを計測し、上述の如く推定腫瘍重量を長径×短径<sup>2</sup>/2で算出し、重量値が 100-200mg に達した時点で治療を施行した。MMC は 3mg/kg を 4 日おきに 2 回、腹腔内投与した。治療開始後は、4 日おきに 24 日まで重量測定を行い、対象群と治療群のそれぞれについて、治療開始日の重量に対する相対平均重量比を算出し、対象群に対する相対平均重量比が 42% 以下に抑制された場合を有効と判定した。

## 成 績

### I. 組織学的変化の比較

患者の原発巣、肝転移巣、リンパ節転移巣の組織像とそれらのヌードマウス移植腫瘍の形態学的変化の有無を 4 症例について比較検討した。図 1 から図 3 は YSC の原発巣、肝転移巣、リンパ節転移巣の組織像およびヌードマウス移植腫瘍の組織像を示したものであ

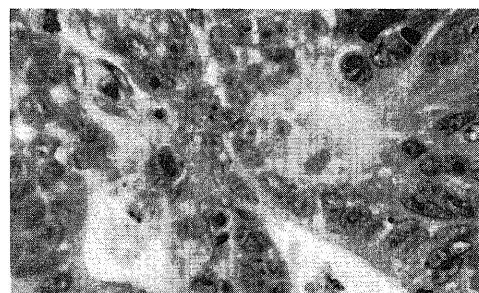
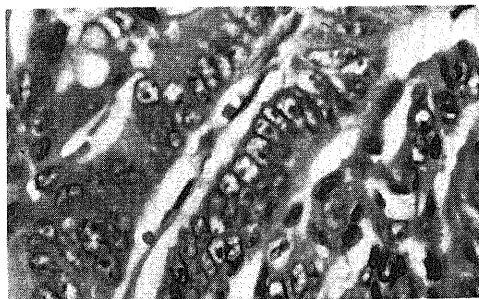


Fig. 1. High power view of microphotograph finding of primary colonic cancer. The upper panel shows primary lesion in patient and the lower shows primary lesion transplanted into nude mice. The transplanted tumors were extracted from the nude mice, fixed in formalin, embedded, thin-sliced and subjected to H-E staining. Although examined by optical microscope and compared with the corresponding tumors of the patient, no significant difference between original tumor and its transplanted tumor was seen. H. E. stain.  $\times 100$

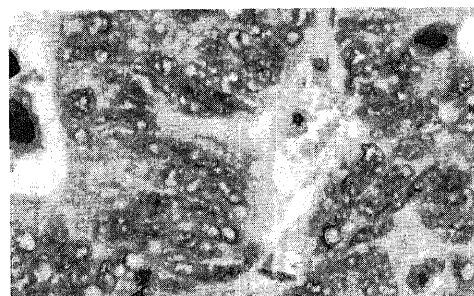
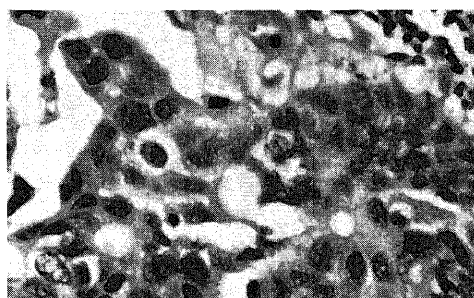


Fig. 2. High power view of microphotograph of lymph node metastasis. The upper panel shows lymph node metastasis in patient and the lower shows lymph node metastasis transplanted into nude mice. No remarkable difference was seen neither. H. E. stain.  $\times 100$

る。図1は原発巣においての患者の組織像とヌードマウス移植腫瘍の組織像であるが、上段は患者の原発巣、下段はヌードマウス移植腫瘍の組織像で原発巣の組織像は中分化型腺癌を示し、ヌードマウス移植腫瘍においても同様の組織学的形態を保持していた。即ち

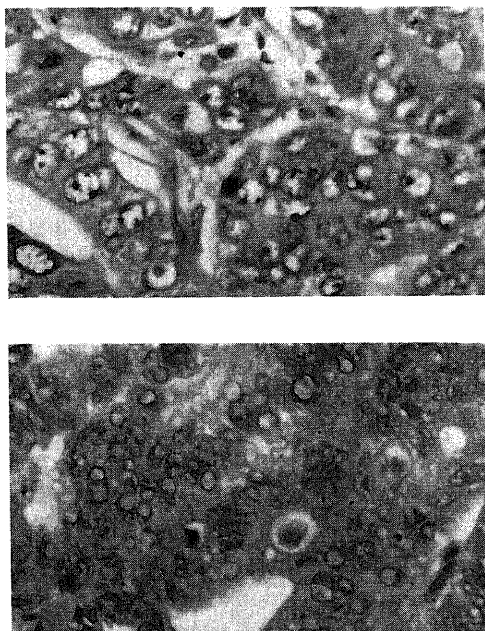


Fig. 3. High power view of microphotograph of hepatic metastasis. The upper panel shows hepatic metastasis in patient and the lower shows hepatic metastasis transplanted into nude mice. Morphological change was not observed. H. E. stain.  $\times 100$

細胞異型度、細胞の配列、核/胞体比 (N/C比) においても両者間には差異はなく、また移植、継代による変化もほとんど認めなかった。更に YSC のリンパ節転移巣においてみてみたが、患者のリンパ節転移巣は原発巣と同じく比較的明瞭な腺管構造を有しており、またヌードマウス移植腫瘍においても細胞異型、構造異型とも乱れておらず、両者間に組織学的な差異はみられなかった (図2)。一方肝転移巣においても同様、患者の組織像とヌードマウス移植腫瘍の組織学的な差の有無を観察したが原発巣、リンパ節転移巣と同様に両者間に大きな差はみられなかった (図3)。また他の3例(KHC, FAC, IMC) においても原発巣、リンパ節転移巣、肝転移巣とそれらのヌードマウス移植株の組織像はほぼ同様な所見であり、各群間に決定的な組織学的所見の差異はみられなかった。

## II. 倍加時間の比較

対数増殖期よりみたヌードマウス移植腫瘍の発育速度を比較すると、P株、H株、N株の平均倍加時間は KHC ではP株:8.2日、H株:10.8日、N株:8.3日、FAC ではP株:6.2日、H株:7.5日、N株:9.7日、IMC はP株:13.3日、H株:15.2日、N株:16.0日、YSC においてはP株:7.9日、H株:9.8日、N株:6.4日であり、個々の大腸癌移植株におけるP株とN株、H株の倍加時間には有意差はみられなかった。

また、P株、H株、N株のあいだの発育速度の順位をみたところ KHC では速い順にP株、N株、H株の順であり、同様に FAC、および IMC ではP株、H株、N株、YSC ではN株、P株、H株と一定の順位は認められず、転移臓器における増殖能においても差異はみられなかった (表2)。

Table 2. Doubling time of 3 strains of 4 colonic cancer lines xenotransplanted into nude mice

Colonic cancer line	Doubling time (Mean $\pm$ S.D., n=5, day)		
	P-strain	H-strain	N-strain
KHC	8.2 $\pm$ 1.7	10.8 $\pm$ 3.8	8.3 $\pm$ 1.9
FAC	6.2 $\pm$ 2.2	7.5 $\pm$ 2.6	9.7 $\pm$ 4.1
IMC	13.3 $\pm$ 3.7	15.2 $\pm$ 2.9	16.0 $\pm$ 3.8
YSC	7.9 $\pm$ 3.1	9.8 $\pm$ 3.9	6.4 $\pm$ 2.2

Measurement of tumor weight was started when tumor transplanted into nude mice grew to 100–200 mg in weight. Length(L) and width (W) of each tumor were measured every four days, and an approximate weight obtained from the formula of  $L \times W^2/2$  was followed.

III. 腫瘍マーカー産生能の比較

KHC における P 株, H 株, N 株のヌードマウス血清 CEA 値/腫瘍重量比の値はそれぞれ P 株:  $11.1 \pm 5.3$  (平均値  $\pm$  S. D.) H 株:  $87.4 \pm 51.6$ , N 株:  $2.8 \pm 1.2$  であった. H 株における値は最も低値を示した N 株に対し 31.2 倍 ( $p < 0.001$ ) と著明に高かった. また, P 株の値も N 株の 4.0 倍 ( $p < 0.01$ ) と有意に高かった. 一方, YSC におけるヌードマウス血清 CA 19-9 値/腫瘍重量比の値は H 株では  $0.6 \pm 0.3$  と低値であったが P 株では  $22.0 \pm 11.5$  と H 株の 36.7 倍 ( $p < 0.001$ ) の値を示していた. さらに N 株においては  $101.5 \pm 68.2$  と H 株の 169 倍 ( $p < 0.001$ ) の極めて高い値を示していた.

IV. MMC に対する感受性の比較

KHC に対する MMC の効果では, P 株および N 株では MMC 初回投与後 16 日目に, 相対平均重量比それぞれ 42.0%, 30.0% ( $p < 0.01$ ) と抗癌剤感受性があるとなされる 42% 以下にまで腫瘍増殖が抑制されさらに 24

日目には P 株では 25.8% ( $p < 0.001$ ), N 株では 31.4% にまで縮小がみられ MMC による抗腫瘍効果が確認された. それに対し, H 株での MMC 投与による相対的縮小率は 24 日目で 63.6% までしか抑制されず効果は認められなかった (図 4).

次に YSC に対する MMC の抗腫瘍効果では, N 株においては MMC 初回投与後 8 日目に既に 37.6% ( $p < 0.01$ ) の縮小率を認め, 有効とされ, さらに 24 日目には 19.7% ( $p < 0.001$ ) と著明に抑制された.

一方 P 株, H 株の抑制率は 24 日目で P 株では 97.0% とほとんど効果がなく, H 株においても 82.2% の縮小率しか得ることはできなかった (図 5). 以上, MMC に対する感受性は, KHC では P 株と N 株, YSC では N 株のみに著明な抗腫瘍効果がみられ, 同一腫瘍にもかかわらず, 原発巣, リンパ節転移巣, 肝転移巣において MMC の感受性が異なることが確認された.

考 察

近年, 大腸癌に対する関心の高まりや診断技術の進歩, 普及も相まって早期癌に遭遇する機会も多くな

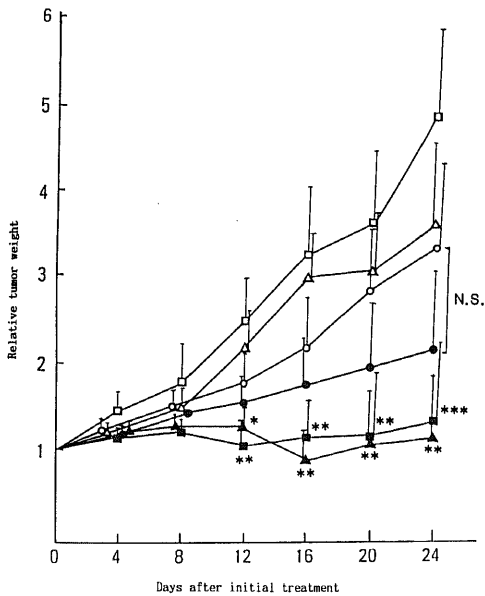


Fig. 4. Comparison of MMC sensitivity among three strains of KHC line. □, KHC-P (control); △, KHC-N (control); ○, KHC-H (control); ■, KHC-P (treated); ▲, KHC-N (treated); ●, KHC-H (treated). On the 24th day, ratios of relative weight for the MMC treated group vis-a-vis non-therapeutic group were 25.8% for KHC-P, 31.4% for KHC-N and 63.6% for KHC-H. Each point and vertical bar represents the mean  $\pm$  S. D. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. control. N. S., not significantly different.

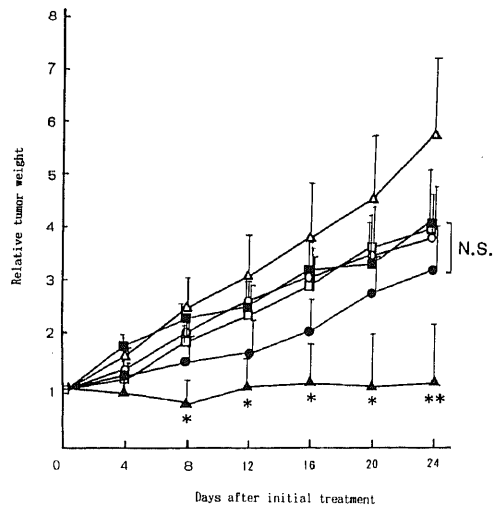


Fig. 5. Comparison of MMC sensitivity among three strains of YSC line. □, YSC-P (control); △, YSC-N (control); ○, YSC-H (control); ■, YSC-P (treated); ▲, YSC-N (treated); ●, YSC-H (treated). On the 24th day, ratios of relative weight for the MMC treated group vis-a-vis non-therapeutic group were 19.7% for YSC-N, 82.2% for YSC-H and 97.0% for YSC-P. Each point and vertical bar represents the mean  $\pm$  S. D. \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$  vs. control. N. S., not significantly different.

り、その治療成績の向上には目を見張るものがある。その反面、日常臨床において進行癌は跡を絶たず、なかでもその治療を困難にしている最大の要因の一つに転移があげられる。この転移現象が生体内において極めて複雑な過程を経て形成されることは周知の事実であり、この転移形成機序の究明には多くの努力が払われているが、原発巣と転移巣の生物学的差異に関してはいまだ十分な検討がなされていないのが現状である。

その理由の一つとして、原発巣と転移巣を同一条件で比較できる実験系がほとんど見当たらなかったことに起因している。一方、ヌードマウス移植腫瘍は1969年 Rygaard ら<sup>9)</sup>が初めてヒト悪性腫瘍の移植に成功して以来数多くの検討がなされた結果、その機能がよく維持されるばかりでなく、担癌宿主の影響を除いた腫瘍そのものの検討が可能であることが明らかにされ、種々の研究に有用な実験系としてひろく使用されている<sup>9)</sup>。そこで今回著者は同一患者でリンパ節転移巣と肝転移巣を有する大腸癌症例から原発巣、肝転移巣、リンパ節転移巣の3部位を同時に別々のヌードマウスへ移植する実験系を考案した。本研究の意図するところは均一単体であるヌードマウスを用いた同一条件下での比較を可能としており、大腸癌の3部位同時に移植、継代に成功した4例、12株を用いた種々の角度から原発巣と転移巣の差異について検討を行った。

初めに形態学的変化を顕微鏡的に観察し、患者の組織像とヌードマウス移植腫瘍の組織像を比較したが、4症例とも原発巣、転移巣間に大きな差は認めず、移植および継代による変化もほとんどみられなかった。つまり、形態学的には原発巣と転移巣とのあいだに大きな差がないことを示すとともに、ヌードマウス移植、継代による形態学的な変化もみられないことが示された。

次に原発巣と転移巣の発育速度の差を対数増殖期より倍加時間を測定し比較した。その結果ヌードマウス移植P株、H株、N株の倍加時間は4症例とも各部位間で発育速度の順位は一定ではなく、その差も僅かで各部位間に有意差を認めなかった。ところが臨床においては、手術時、原発巣よりも肝転移巣や転移リンパ節巣が大きいことが稀ならず認められ、一般的に転移巣の発育速度は原発巣のそれより速いと推測されている。文献的に大腸癌の発育速度に関する報告をみると、原発巣では Welin ら<sup>8)</sup>は注腸検査より経過観察し得た大腸癌20症例の平均倍加時間は620日であったとしている。また Bolin ら<sup>8)</sup>は27症例、牛尾ら<sup>7)</sup>は11症例と同様の検討を行い、それぞれ倍加時間の平均は195

日、340日であったとしている。これに対し肝転移巣の発育速度は Havelaar ら<sup>8)</sup>はCTより6症例の平均倍加時間を観察し70日であったとしている。また Staab ら<sup>8)</sup>は33例、高橋ら<sup>10)</sup>は13例の大腸癌肝転移の発育速度を血清 CEA 値より算出しており平均倍加時間はそれぞれ47日、58日であったと報告している。すなわち、経過観察例を用いた大腸癌の発育速度は、原発巣に比し転移巣ではかなり速い報告が多く、著者のヌードマウス移植腫瘍の成績と大きく異なっていた。これは、もともと発育速度が異なる癌細胞を各部位から採取してきても、ヌードマウスの背部皮下という同一部位に移植すると速度に差がみられなくなることを示すものと考えられた。換言すれば発育速度は癌細胞自身の差よりはむしろ発育環境の差に大きく影響されることが強く示唆された。つまり、原発巣は腹腔内という限られた空間で増殖し、常に便の通過により侵食される危険にさらされている。一方、リンパ節転移巣、肝転移巣は増殖の上で妨げられる危険因子はほとんどなく特に肝転移巣は豊富な血流を有する肝を増殖母地としているため発育が促進されるものと考えられた。

次に腫瘍マーカー産生能の差異を CEA が測定しえた KHC と CA 19-9 が測定し得た YSC を用いて検討した。CEA は1965年、Gold ら<sup>11)</sup>による発見以来、その臨床的評価は高く広く臨床的に利用されている腫瘍関連抗原の一つであり、また1979年、Koprowski ら<sup>12)</sup>によって開発された CA 19-9 は腫瘍特異性が高い<sup>13)</sup>ことから消化器癌に有用な腫瘍関連抗原として臨床に応用されつつある。これらの腫瘍マーカーを用いてP株、H株、N株の間における抗原性の発現の差異を検討したところ KHC における CEA/腫瘍重量比の平均値はP株：11.1、H株：87.4、N株：2.8とH株において著明に高い傾向を示した。一方、YSC における CA 19-9 腫瘍重量比の平均値はH株：0.60に対しP株：22.0、さらにN株では101.5と極めて高い値を示していた。多淵ら<sup>14)</sup>の胃癌における CEA と CA 19-9 の末梢血中移行機序に関する詳細な研究によると、CEA と CA 19-9 の血中上昇は、CEA は主として還流静脈を介して経門脈経路であるのに対し、CA 19-9 はリンパ行性の胸管経路で末梢血中に移行している。これは著者の KHC の H 株における CEA 値の上昇および YSC の N 株における CA 19-9 値が高値を示した事実と一致し興味深い所見と考えられた。また CEA と CA 19-9 の発現の違いについて高橋ら<sup>15)</sup>は組織学的に転移リンパ節を伴うことが確認されている進行胃癌48例を対象に胃癌原発巣と転移リン

リンパ節の生物学的特性を免疫組織学的な面より検討しており、それによると CEA 染色では両者間に差はみられなかったが、CA 19-9 染色では原発巣の陽性率が 60.4%であるのに対し、リンパ節転移巣では 52.1%と陽性率が下降していたとしている。また、個々の症例で原発巣とリンパ節転移巣の染色程度を比較したところ、CEA ではほとんどの症例が同程度であったのに対し、CA 19-9 では原発巣よりリンパ節転移巣で染色程度が下がる症例が半数にも認められ、CEA 陽性細胞は、リンパ節転移に際してほとんどその細胞集団に変化を示さないのに対し、CA 19-9 陽性細胞はリンパ節転移に際しその細胞集団を減少させると考察している。いずれにせよ原発腫瘍細胞は不均質な多量の形質発現を示すため、原発巣と転移巣ではかなり抗原性の発現に差が生じ、これらの腫瘍関連抗原にもその発現に差が生じたものと推測される。

最後に原発巣と転移巣における化学療法の感受性の差異を検討したが、従来の実験的検討においては、原発巣と転移巣とでは制癌剤感受性が異なる報告が多い。Simpson-Herren ら<sup>16)</sup>は BDF<sub>1</sub>マウス-Lewis 肺癌系における背部皮下移植原発腫瘍とその肺転移巣での細胞動態について検討し、肺転移巣での細胞分裂増殖能が原発巣に比し、明らかに高いことを示し、このことが転移巣における制癌剤感受性が原発巣に比較して高いことに結びつくとしている。この理由として原発巣に比較し、転移巣においては腫瘍の大きさがより小さく、腫瘍細胞の分裂増殖能、そして薬剤感受性がより高くなることを述べている。同様に Selby ら<sup>17)</sup>はヒト腫瘍をヌードマウスに移植する系でやはり転移巣の方がより感受性があったと報告している。その理由として一般に Donelli ら<sup>18)</sup>も説明しているように原発巣に比べて転移巣の方が小さいためより腫瘍の分裂増殖能が高く、そのため制癌剤感受性が高いと推測している。これに対し、原発巣より転移巣の方が制癌剤感受性が低いとする報告も多数みられる<sup>19)-21)</sup>。その理由として原発巣と転移巣との解剖学的な部位による違い<sup>19)</sup>、制癌剤による宿主免疫抑制作用<sup>20)</sup>、あるいは原発巣と転移巣における主な癌細胞型の抗原性の差<sup>21)</sup>などを可能性としてあげられている。今回の著者が考案した同一患者の部位別ヌードマウス移植株作成は、種々の複雑な宿主側の要因を除いた同一条件下での実験モデルを作成し、癌細胞自身の比較を可能にしたものである。その結果、KHC に対する MMC の効果では、P 株および N 株では 16 日目それぞれ 42%、30%と有効とされる 42%以下にまで抑制されたのに対し、H 株では効果は認められなかった。一方 YSC に対する

MMC の抗腫瘍効果では N 株においては 8 日目に 37.6%の縮小率を認め有効とされ更に 24 日目には 19.7%にまで抑制されたものの P 株、H 株では抗腫瘍効果を得ることはできなかった。すなわち、種々の条件を除いた癌細胞自身の比較からも制癌剤に対する感受性の差がみられたことより、原発巣と転移巣のあいだにおける不均質性 (heterogeneity) の存在が強く示唆された。

腫瘍細胞の転移能に関しては親腫瘍細胞集団 (parent tumor cell population) の中から特定の細胞が特定の臓器に転移巣を形成する指向を示すといういわゆる「臓器特異性」を有することが報告されている<sup>22,23)</sup>。Fidler<sup>24,25)</sup>は B16 メラノマをマウスに移植し形成された肺転移結節から得られた培養細胞系を再びマウスに移植する操作をくり返すことによって肺転移能が著明に上昇することを実験的に証明しており、この高肺転移細胞の分離培養に成功している。また著者ら<sup>16)</sup>は MMC に対する腫瘍縮小率と CEA、CA 19-9 減少率の相関を CEA、CA 19-9 同時産生ヌードマウス移植ヒト消化器癌株により検討したところ、4 例中 1 例で CEA と CA 19-9 の減少率に大きな相違がみられたことを報告した。すなわち親腫瘍細胞集団はクローンによって制癌剤感受性<sup>27,28)</sup>のみならず転移能<sup>29)</sup>や増殖能<sup>30)</sup>および腫瘍マーカー産生能<sup>29)</sup>においても様々に異なり不均質な細胞集団からなっていると考えられる。Paget<sup>31)</sup>は特定の細胞が特定の臓器に転移巣を形成するのは、その臓器の栄養環境が転移細胞の増殖に適しているとする、いわゆる『seed and soil 説』を提唱している。このことは転移巣において捕捉された癌細胞の中から増殖のための栄養環境に適した細胞が選択されて転移巣を形成すると推測されるものである。著者の実験でも KHC の H 株では CEA が高値を示し、YSC の N 株においては CA 19-9 が著明に上昇したが、元来不均質な細胞集団である原発巣から血中またはリンパ管内に放出された癌細胞の内、CEA 産生性の細胞が肝、CA 19-9 産生性の細胞がリンパ節というそれらが増殖する上で最も好都合な環境に着床、発育するのではないかと考えられた。また化学療法の感受性の差異は選択された細胞集団の感受性の差であり、今回の検討では KHC では CEA 産生細胞を主体とする H 株の感受性が低く、YSC においては CA 19-9 産生が著しく高い細胞集団を有する N 株の感受性が高かったと示唆された。

今後癌転移の研究自体が多様化しつつある中で、これら不均質な細胞の集団である癌の原発巣と転移巣の課題に注目しつつ高転移性癌細胞を表現している多量



の形質を究明，転移成立機序，ひいては転移抑制への糸口をつかみたい。

### 結 論

大腸癌症例から原発巣，肝転移巣，リンパ節転移巣の3部位を同時にヌードマウスに移植し，種々の角度から部位別に検討したところ下記の知見を得た。

1. 組織学的には4例とも原発巣と転移巣の間に大きな差はみられず，ヌードマウス移植および継代による変化もほとんど見られなかった。

2. ヌードマウス移植P株，H株，N株の平均倍加時間はそれぞれKHC:8.2, 10.8, 8.3日，FAC:6.2, 7.5, 9.7日，IMC:13.3, 15.2, 16.0日，YSC:7.9, 9.8, 6.4日であり，4例とも各部位間の順列は一定ではなく大きな差もみられなかった。

3. 腫瘍マーカー産生能をCEAが測定しえたKHCとCA 19-9が測定し得たYSCを用いて検討したところ，KHCにおけるCEA/腫瘍重量比の平均値はP株:11.1, H株:87.4, N株:2.8とH株において著明に高い傾向を示した。これに対しYSCにおけるCA 19-9/腫瘍重量比の平均値はH株:0.60に対しP株:22.0, 更にN株では101.5と極めて高い値を示した。

4. 化学療法の感受性の差異をMMCを用いKHC, YSCで腫瘍縮小効果について検討したところKHCに対するMMCの効果はP株およびN株ではそれぞれ25.8%, 31.4%と有効とされる42%以下にまで抑制されたのに対し，H株では63.6%と効果は認められなかった。またYSCに対するMMCの抗腫瘍効果は，N株においては8日目に37.6%の縮小率を認め有効とされ，さらに24日目には19.7%にまで抑制されたもののP株，H株ではそれぞれ97.0%, 82.2%と抗腫瘍効果を得ることはできなかった。

以上より腫瘍マーカー産生能と化学療法の感受性には原発巣と転移巣の間かなりの差を認め，いわゆる癌細胞の不均質性(heterogeneity)の存在が強く示唆される。

### 謝 辞

稿を終えるに臨み，御懇切なる御指導ならびに御校閲を賜りました恩師磨伊正義教授に深甚なる謝意を捧げます。また直接御指導，御助言を頂いた高橋 豊講師に深謝致します。さらに本研究に際し御協力を頂きました当教室諸兄各位に感謝の意を表します。

本論文の要旨は第89回日本外科学会総会および，第34回日本消化器外科学会総会 Young Researchers Awardにて報告した。

### 文 献

- 1) 大腸癌研究会: 臨床・病理大腸癌取扱規程，改訂第3版，1-33頁，金原出版，東京，1983。
- 2) Ovejera A.: Chemotherapy of human tumor xenografts in genetically athymic mice. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 8, 50 (1978).
- 3) Rygaard, J. & Povlsen, C. O.: Heterotransplantation of a human malignant tumor to "nude" mice. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 77, 758-760 (1969).
- 4) 高橋 豊: ヒト AFP 産生胃癌のヌードマウス可移植株の特性および抗 AFP 抗体-MMC 複合体の効果. *日消誌*, 82, 18-27 (1985).
- 5) Welin, S., Youker, J. & Spratt, J. S. Jr.: The rates and patterns of growth of 375 tumors of large intestine and rectum observed serially by double contrast enema study. *Am. J. Roentgenol.*, 90, 673 (1963).
- 6) Bolin, S., Nilson, E. & Sjodal, R.: Carcinoma of the colon and rectum-growth rate. *Ann. Surg.*, 198, 151 (1983).
- 7) 牛尾恭輔，志真泰夫，後藤祐夫，後藤裕夫，村松幸男，高安賢一，森山紀之，松江寛人，笹川道三，山田達哉，市川平三郎: Retrospective にみた大腸癌の発育・進展-X線像による遡及的検討-I. *胃と腸*, 20, 843-858 (1985).
- 8) Havelaar, I. J., Sugarbaker, P. H., Vermess, M. & Miller, D. L.: Rate of growth of intraabdominal metastases from colorectal cancer. *Cancer*, 54, 163-171 (1984).
- 9) Staab, H. J., Anderer, F. A., Hornung, A., Stumpf, E. & Fischer, R.: Doubling time of circulating CEA and its relation to survival of patients with recurrent colorectal cancer. *Br. J. Cancer*, 46, 773 (1982).
- 10) 高橋 豊，草間 悟，磨伊正義，上野雅資，荻野知己，上田 博，沢口 潔: 大腸癌転移の CEA グリリングタイムからみた発育速度に関する研究. *日外会誌*, 87, 1422-1425 (1986).
- 11) Gold, P. & Freedman, S. O.: Specific carcinoembryonic antigens of human digestive system. *J. Exp. Med.*, 122, 467 (1965).
- 12) Koprowski, H., Stepleski, Z. & Michell, K.: Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Mol. Genet.*

5, 957 (1979).

13) 有吉 寛: CA 19-9 腫瘍マーカー. 生化学的・免疫学的研究と臨床応用 (漆崎一郎, 服部 信), 第1版, 146-151頁, 医学書院, 東京, 1985.

14) 多淵芳樹, 山口浩之, 斉藤洋一: 胃癌における腫瘍関連抗原 CEA と CA 19-9 の末梢血中移行機序に関する臨床病理学的・免疫組織化学的研究. 日外会誌, 89, 1181-1191 (1988).

15) 高橋 豊, 南 修二, 磨伊正義: 胃癌の原発巣と転移リンパ節巣の生物学的態度の差異について—CEA, CA 19-9 の免疫組織学的検討より—. 癌と化学療法, 13, 2233-2234 (1986).

16) Simpson-Herren, L., Sanford, A. H. & Holmquist, J. P.: Cell population kinetics of transplanted and metastatic Lewis lung carcinoma. *Cell Tissue Kinet.*, 7, 349-361 (1974).

17) Selby, P. J., Thomas, J. M. & Peckman, M. J.: A comparison of the chemosensitivity of a primary tumor and its metastases using a human tumor xenograft. *Eur. J. Cancer*, 15, 1425-1429 (1979).

18) Donelli, M. G., Colombo, T., Broggin, M. & Garattini, S.: Differential distribution of antitumor agents in primary and secondary tumors. *Cancer Treat. Rep.*, 61, 1319-1324 (1977).

19) Conzelman, G. M. Jr. & Springer, K.: The influence of the anatomic location of a tumor on its susceptibility to chemotherapy. *Cancer Chemother. Rep.*, 53, 105-113 (1969).

20) Sugarbaker, E. V., M.D., Cohen, A. M., M. D. & Ketcham, A. S., M. D.: Facilitated metastatic distribution of the walker 256 tumor in Spargue-Dawley rats with hydrocortisone and cyclophosphamide. *J. Surg., Oncol.*, 2, 277-289 (1970).

21) Fugman, R. A., Anderson, J. G., Stolfi, R. L. & Martin, D. S.: Comparison of adjuvant chemotherapeutic activity against primary and

metastatic spontaneous murine tumors. *Cancer Res.*, 37, 496-500 (1977).

22) Parks, R. C.: Brief communication: Organ specific metastasis of a transplantable reticulum cell sarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 52, 971-973 (1974).

23) Nicolson, G. L., Brunson, K. W. & Fidler, I. J.: Specificity of arrest, survival, and growth of selected metastatic variant cell lines. *Cancer Res.*, 38, 4105-4111 (1978).

24) Fidler, I. J.: Selection of successive tumor lines for metastases. *Nature*, 242, 148-149 (1973).

25) Fidler, I. J.: Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res.*, 35, 218-224 (1975).

26) 高橋 豊, 太田孝仁, 磨伊正義: MMC に対する腫瘍縮小率と CEA, CA 19-9 減少率の相関—CEA, CA 19-9 同時産生ヌードマウス移植ヒト癌株による検討—. 日外会誌, 88, 502 (1987).

27) Tsuruo, T. & Fidler, I. J.: Differences in drug sensitivity among tumor cells from parent tumors, selected variants, and spontaneous metastases. *Cancer Res.*, 41, 3058-3064 (1981).

28) Heppner, G. H., Dexter, D. L., Denucci, T., Miller, F. R. & Calabresi, P.: Heterogeneity in drug sensitivity among tumor cell population of a single mammary tumor. *Cancer Res.*, 38, 3758-3763 (1978).

29) Fidler, I. J. & Kripke, M. L.: Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science*, 197, 893-895 (1977).

30) Kripke, M. L., Gruys, E. & Fidler, I. J.: Metastatic heterogeneity of cells from an ultraviolet light-induced murine fibrosarcoma of recent origin. *Cancer Res.*, 38, 2962-2967 (1978).

31) Paget, S.: The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Lancet*, 1, 571-573 (1883).

**An Experimental Study of Biological Variation among Primary and Metastatic Tumors Xenotransplanted into Nude Mice** Takahito Ohta, Department of Surgery, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa 921—J. Juzen Med. Soc., 99, 385—394 (1990)

**Key words** colonic cancer, nude mouse, primary lesion, metastatic lesion, heterogeneity

### Abstract

Although many investigations on heterogeneity among primary tumors and metastatic foci have been reported from various experimental aspects, there is little literature dealing with the biological variations of human tumors. This is presumably because there has been no good experimental model with which to research this problem. In order to investigate the biological characteristics of metastatic tumors, the author devised a new experimental model in which primary tumors, lymph node and hepatic metastatic tumors of advanced colonic cancer patients were transplanted simultaneously into different nude mice. The present study was designed to examine the differences in the histological features, tumor growth rates, tumor marker production and sensitivity to Mitomycin C (MMC), among the primary tumors, lymph node and hepatic metastatic tumors which had been transplanted into nude mice, using 4 colonic cancer lines named KHC, FAC, IMC and YSC. Each transplanted tumor was histologically demonstrated to have basically similar features of cellular and structural atypism, to their original tumors. When the growth rate was measured by doubling time, the doubling time of the tumor transplanted into the nude mice showed no significant differences among the tumor strains transplanted, from the primary tumor (P-strain), from the lymph node metastatic tumor (N-strain), or from the tumor strain transplanted from the hepatic metastatic tumor (H-strain) in any of the colonic cancer lines. Amounts of tumor marker, carcinoembryonic antigen (CEA) or carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9), were measured in the nude mice transplanted with the P-, N- and H-strains of the KHC line or YSC line, respectively. The ratios of CEA to tumor weight in the KHC line were high in the H-strain but low in the N-strain; the values were 87.4 in the H-strain, 11.1 in the P-strain and 2.8 in the N-strain. The ratios of CA19-9 to tumor weight in the YSC line had an extremely high value of 101.5 in the N-strain compared with values of 22.0 in the P-strain and 0.6 in the H-strain. The sensitivity of each strain to MMC was examined by injecting a dose of 3mg/kg into each nude mouse transplanted with tumor, twice at 4-day intervals, intraperitoneally. The tumor weight was measured every four days until 24 days after the first injection of the drug and the antitumor effect of the drug was estimated. In the KHC line, both the P- and N-strain were sensitive to MMC but the H-strain was resistant. In the YSC line, the N-strain was sensitive to the drug but both the P- and N-strain were resistant. These findings revealed that chemosensitivity to the anti-cancer drug and the ability of tumor marker production were different among primary tumors, lymph node and hepatic metastatic tumors of the same patient, when they were transplanted into nude mice, and it is strongly suggested that the human tumor shows heterogeneity among primary tumors and its metastatic tumors.