

ヌードマウス可移植性ヒト alpha-fetoprotein 産生食道腺癌株の樹立に関する研究

奈良県立医科大学第1外科

西和田 敬 中谷 勝紀 宮城 信行 澤田 秀智
奥村 徹 渡辺 明彦 山田 行重 志野 佳秀
矢野 友昭 中野 博重

奈良県立医科大学付属がんセンター腫瘍病理

小 西 陽 一

ESTABLISHMENT OF ALPHA-FETOPROTEIN-PRODUCING HUMAN ESOPHAGEAL ADENOCARCINOMA IN NUDE MICE

Takashi NISHIWADA, Katrunori NAKATANI, Nobuyuki MIYAGI,
Hidetomo SAWADA, Tohru OKUMURA, Akihiko WATANABE,
Yukishige YAMADA, Yoshihide SHINO, Tomoaki YANO
and Hiroshige NAKANO

First Department of Surgery, Nara Medical College

Yoichi KONISHI

Department of Oncological Pathology, Cancer Center, Nara Medical College

ヒト alpha-fetoprotein (AFP) 産生食道腺癌のヌードマウス皮下での移植継代に成功し、その生物学的特性を検討した。移植材料は胸部中部食道 (Im) に発生した食道腺癌の転移リンパ節より得た。血清 AFP 値は351.5ng/ml と高値であり、食道原発巣および転移巣内に AFP 染色陽性細胞を確認した。現在14代まで継代し生着率は100%であり腫瘍重量増倍時間は平均14.4日であった。担癌マウス血清 AFP 値は腫瘍重量と有意の相関があった。皮下継代腫瘍からの腫瘍細胞浮遊液のマウス脾臓内注射 (IS) により75%に肝転移が生じた。肝転移マウスの血清 AFP 値は IS 後経時的に増加した。本移植系の樹立は AFP 産生腺癌の生物学的特性を究明するのに有用であると考えられる。

索引用語：ヒト AFP 産生食道腺癌，ヌードマウス，細胞浮遊液脾臓内移植

I. 緒 言

1969年 Rygaard と Povlsen¹⁾が、ヌードマウスを用いたヒト悪性腫瘍の移植実験を報告して以来、さまざまな腫瘍がヌードマウスへ移植され、その移植腫瘍が継代によっても原発腫瘍の形態および機能を維持することが報告されている²⁾。われわれは、これまで胃癌および食道癌の増殖態度や生物学的特性を研究する目的で、1975年より alpha-fetoprotein (AFP) 産生ヒト胃

癌を含む胃癌およびヒト食道癌をヌードマウスへ移植して、その成果を報告してきた^{3)~7)}。

AFP は、1964年に Tatarinov⁸⁾が原発性肝癌患者の血清中にその存在を証明して以来、主に原発性肝癌や卵黄嚢癌の診断に用いられてきた。しかし最近ではその他の悪性疾患や肝炎・肝硬変などの良性疾患においても血清 AFP 値が高値を示すものがあることが報告されるようになってきた^{9)~11)}。その他の悪性疾患の中では AFP 産生胃癌の報告が圧倒的に多いが⁹⁾、AFP 産生食道癌の報告は、本邦においてわれわれが検索した範囲ではまったくみられなかった。

今回われわれは非常にまれと考えられる AFP 産生ヒト食道腺癌を経験し、酵素抗体法を用いて AFP の腫瘍細胞内局在を証明した。さらにヌードマウスへの皮下への継代移植に成功し、腫瘍増殖と AFP 産生との関係や、皮下継代腫瘍から作製した細胞浮遊液のヌードマウス脾臓内移植による肝転移能について検討を加えたので報告する。

II. 実験材料および方法

1. 実験動物

ヌードマウスは、BALB/c AJcl-nu(日本クレア)、5週齡、雄を用いた。動物の飼育は、ヌードマウス飼育装置である CLEARTRON(田葉井製作所)内で行い、飼料は放射線で滅菌した CL-2固形飼料(日本クレア)を、水は滅菌した純水を自由に摂取させた。

2. 移植材料

症例は80歳、男性で、病変は上部消化管透視で胸部中部食道(1m)に約4cmにわたる全周性の狭窄として認められ、内視鏡下の生検にて腺癌と診断された。画像診断にて多発性肝転移と周囲組織への浸潤およびリンパ節転移が認められた。血液検査にて血清 AFP 値が351.5ng/mlと高値であった。手術は、胃管を用いたバイパス手術を行い、その際に転移腫大した右噴門リンパ節を無菌的に採取し移植材料とした。患者は術後124日目に死亡し、病理解剖にて食道癌部および転移巣(肺、肝、脾)を病理組織学的検索と免疫組織化学的検索のために採取した。

3. 移植方法

皮下移植は、採取した腫瘍を Eagle 氏 MEM 溶液に浸透し、クリーンベンチ内で2mm角に細切し、2~3個の細片を移植針を用いてヌードマウス背部両側皮下に移植した。継代移植は皮下に発育した腫瘍を無菌的に摘出し、初代移植と同様の方法で行い、可能なかぎり継代移植を試みた。

脾臓内移植(IS)は、皮下移植腫瘍より細胞浮遊液を作製して行った。腫瘍細胞浮遊液は、摘出腫瘍を50 μ g/mlのアミノグリコシド系抗生剤(BIKLIN)を含有した Eagle 氏 MEM 溶液中でメスにて細切後、0.25%トリプシン溶液内で37℃にて15分間消化し、この溶液を1,000rpmで5分間遠沈後、10%仔牛血清加 Eagle 氏 MEM 溶液にてトリプシンを除去してメッシュ(100mesh/cm²)を通し、Eagle 氏 MEM 溶液で洗浄して作製した。浮遊液中の癌細胞は、トリパンブルー色素排除テストにて90%以上生存していることを確認した。腫瘍細胞数は白血球算定板を用いて算出し

1 \times 10⁶個/0.2mlに調製した。

脾臓内移植は、エーテル麻酔下にヌードマウスの左側腹部に約1cmの小切開を加えて開腹し、脾臓を露出させて0.2mlの腫瘍細胞浮遊液を直視下に脾下極より21ゲージ針でゆっくりと注射して行った。約1分後、脾臓を摘出し、腹壁および皮膚をそれぞれ3号絹糸にて縫合閉鎖した。

4. 腫瘍の成長と倍增時間

皮下移植腫瘍の大きさは、移植後1週目より、週に1度ノギスを用いて長径(mm)と短径(mm)を計測した。腫瘍重量倍增時間(doubling time)は従来の方法、すなわち腫瘍重量を $W=(a \times b^2)/2$ (W:重量, a:長径, b:短径)の式より概算し、腫瘍が指数関数的に増大するものとして、腫瘍重量の推定回帰直線を最小二乗法により求め、 $\ln 2/(\text{傾き})$ の式より算出した。

5. 生着および肝転移の判定

皮下腫瘍の生着の有無の判定は、摘出組織を病理組織学的に検討し、癌細胞を認めるものを生着、認めないものを非生着とした。腫瘍細胞浮遊液の脾臓内移植による肝転移の確認は、脾臓内移植後60~90日後にマウスをエーテル麻酔下に屠殺して全臓器を摘出し、肝を肝表面より肉眼的に転移結節数、および結節の長径と短径を計測した。また全肝湿重量も測定した。さらに病理組織学的に検討し結節内の癌細胞を確認した。

6. 血清 AFP 値の測定

全例屠殺時に採血し遠沈(10,000rpm, 5分間)により血清を分離し、スクロセップ AFP キット(スペシャル・レファレンス・ラボラトリー社製)にてサンドイッチ法¹²⁾で血清 AFP 値を測定した。また皮下継代8代目マウス(3匹)および脾臓内移植マウス(4匹)については、移植後経時的に尾静脈から採血した。すなわちマウスの尾を切断し、尾静脈より流出する血液0.05~0.1mlをヘパリン処理したヘマトクリット管で採取し、遠沈(10,000rpm, 5分間)により血清を分離し同様の方法により血清 AFP 値を測定した。

7. 組織内 AFP の検索

腫瘍組織内 AFP の検索は、原発巣、各転移巣(肝、肺、脾、リンパ節)のパラフィン包埋資料より4 μ mの薄切切片を作製し、1次抗体として抗ヒト AFP ウサギ血清(Ortho Diagnostic Systems Inc., Raritan, New Jersey)を、また酵素抗体法(peroxidase anti-peroxidase technique, PAP法¹³⁾)は ORTHO Universal Immunoperoxidase Staining Kit(Ortho Diagnostic Systems Inc.)を用いて行った。すなわち、脱パラ

フィン後の上述の薄切切片を H₂O₂を加えた無水エタノールにて内因性ペルオキシダーゼをブロックし、トリス緩衝液 (TBS) で十分洗浄したのち、正常ヒツジ血清 (室温, 40分) にて非特異反応を阻止した。前述の1次抗体と室温で120分間反応させ、TBSにて洗浄した。次いで2次抗体 (抗ウサギ・ヒツジ血清) と室温, 60分間反応させ、TBSにて洗浄した。さらに標識抗体 (peroxidase antiperoxidase complex) と室温, 40分間反応させたのち、TBSにて洗浄し0.003%の H₂O₂を含む0.05%DAB溶液 (3,3'-diaminobenzidine・4 HCl) と約1分間反応させ発色させた。流水にて洗浄し、さらに Hematoxylin にて対比染色をし、流水にて洗浄後キシレンにて封入した。

以上の実験結果の検定には、Student's-t test を用いた。

III. 成績

1. 皮下移植成績と倍増時間

初代の移植では2匹中2匹に生着が認められ、以後14代までは2~3匹のマウスに移植し、生着率は100%であった。腫瘍重量倍増時間は5.1日から24.9日であり平均14.4日であった(表1)。継代を重ねても倍増時間が短縮する傾向は認められなかった。

2. 脾臓内移植成績

表1 継代によるヌードマウス皮下腫瘍の重量倍増時間の変化

継代世代	腫瘍重量倍増時間 (日)
1	7.5
2	10.0
3	5.3
4	12.8
5	6.0
6	9.7
7	5.1
8	8.4
9	7.4
10	7.8
11	14.2
12	17.5
13	24.9
14	19.4

表2 腫瘍細胞浮遊液の脾臓内移植の成績

ヌードマウス	観察期間 (日)	肝転移結節数 (個)	肝湿重量 (g)	血清AFP値 (ng/ml)
NN 4567	67	5	8.0	1,800
NN 4568	67	0	1.7	4.8
NN 4569	67	3	8.8	4,100
NN 4570	67	1	1.9	4.0

脾臓内移植は4匹のヌードマウスを用いて行い、3匹に肝臓への転移がみられ、結節数は1~5個、総肝湿重量は1.9~8.8gであった。腹水の貯留や癌性腹膜炎などの所見は認められなかった(表2)。

3. ヌードマウス血清AFP値

各世代の屠殺時の血清AFP値は、いずれも高値を示した。腫瘍重量と血清AFP値の関係を観察するために、3匹の皮下継代8代目マウスについて、移植後経時的に血清AFP値を計測した。血清AFP値は、2週目頃より上昇し、その後移植腫瘍重量の増加とともに漸次上昇した。これら3匹の皮下腫瘍重量と血清AFP値の相関を見ると、両者の関係は $Y=0.099X+155$ (Y : 血清AFP値 ng/ml, X : 腫瘍重量 mg) の推定回帰式で示され、両者間には有意の相関がみられた ($p<0.005$) (図1)。

脾臓内移植を行った4匹中3匹のマウスの血清AFP値は、移植後3週目より上昇し、その後指数関数的に増加した(図2)。転移結節の多かった2例においては最高1,800ng/mlと4,100ng/mlに達した。

図1 皮下腫瘍重量と血清AFP値の関係

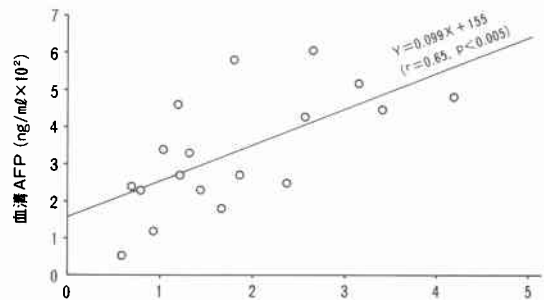


図2 腫瘍細胞浮遊液脾臓内移植後の血清AFP値の変化

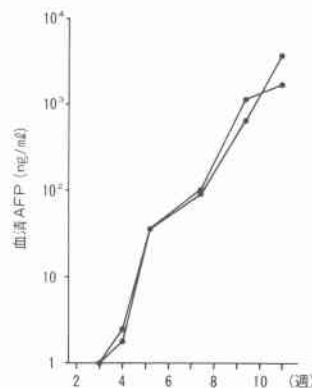


図3 腫瘍の病理組織像 (H.E. 染色, $\times 100$), 腺腔形成傾向を示す腺癌であり, 一部索状構造を認める。

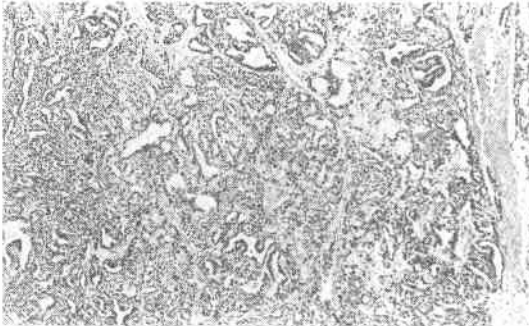
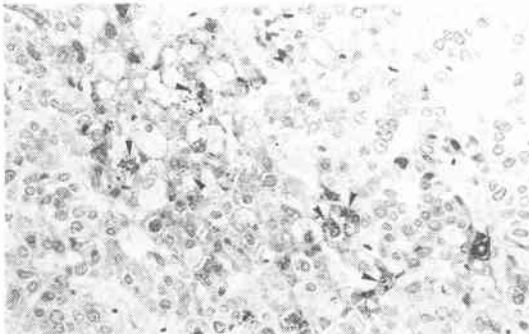


図4 腫瘍の免疫組織染色像 (PAP 法による AFP 染色, $\times 200$), AFP 陽性細胞が癌組織内にモザイク様に認められ, AFP は胞体内に顆粒状に染色されている。



4. 病理学的所見および組織内 AFP 局在

食道原発巣は, 腺腔形成傾向を示す腺癌であったが, 腫瘍細胞は胞巣を形成し増生しており, 浸潤部では異型性を増し, bizzar な巨細胞を混じて腺管を形成し, 一部索状を呈していた (図3)。原発巣の組織形態は, 各転移巣においてはもちろん, ヌードマウス皮下にて継代を重ねても, また実験的肝転移巣においても基本的には変化は認められなかった。

酵素抗体法による AFP 染色では, AFP 陽性細胞が癌組織内にモザイク様に認められ, AFP は胞体内に顆粒状に染色された。この陽性細胞は髄様を示す部に比較的多く認められたが, 腺腔を形成する部でも認められた (図4)。原発巣と各転移巣における染色性を比較すると, 原発巣と肝転移巣に比較的多くの AFP 陽性細胞が認められたが, 転移リンパ節の腫瘍細胞の AFP 染色性は非常に弱かった。

IV. 考 察

原発性肝癌や卵黄嚢癌以外で血清 AFP が高値を示す疾患は, 胃癌に関して多く報告されている⁹⁾。われわれもこれまで AFP 産生胃癌の生物学的特性についてヌードマウスを用いた研究を行い報告してきた⁷⁾。

しかし AFP 産生食道癌についての報告は, 著者が検索したかぎりにおいては本邦では認めなかった。外国文献では, Wahren ら¹⁴⁾が1979年に, 55人の食道癌患者中に33人の血清 AFP 陽性患者 (5ng/ml 以上) を報告している。その血清 AFP 値は最高値が300ng/ml であり, 腺癌は33例中6例で, 扁平上皮癌の患者よりも高い血清 AFP 値を示す傾向が認められたが, いずれも下部食道に存在し胃粘膜由来の可能性を否定できなかったと報告している。1986年に Odaimi ら¹⁵⁾が脳転移を伴った血清 AFP 値が高値である食道扁平上皮癌を報告しているが, 彼らは癌組織内の AFP は検索していない。Burg-Kurland ら¹⁶⁾が1986年に39例の食道癌患者の切除標本を酵素抗体法 (PAP 法) を用いて検討し, 9例の扁平上皮癌と1例の腺癌の計10例 (26%) の癌組織内に AFP 陽性反応を認め, 扁平上皮癌では高分化癌が低分化癌よりも陽性率が高かったと報告している。またかれら¹⁷⁾は2例の AFP 染色陽性食道扁平上皮癌をヌードマウスへ移植し, その染色性について1例は染色性が移植腫瘍においても維持されていたが, 他の1例では陰性化したと述べている。しかし担癌マウスにおける血清 AFP 値の変化については検討していない。

今回, われわれの経験した食道癌症例は80歳男性の胸部中部食道 (I_m) に存在する腺癌で周囲への浸潤や広範な転移を示しており, 術前血清 AFP 値は351.5 ng/ml と高値であった。これより病理解剖および手術的に採取した食道癌の原発巣と各転移巣 (肝, 肺, 脾, リンパ節) における組織内の AFP 局在は酵素抗体法により確認された。手術的に採取した転移リンパ節をヌードマウス皮下に移植し, 現在14代目継代中であるが100%の生着率であり, 担癌ヌードマウス血清中に AFP 値の上昇がみられ AFP 産生能に変化はない。

これまで肝細胞型肝癌¹⁸⁾および AFP 産生胃癌⁷⁾¹⁹⁾をヌードマウスへ移植し, その腫瘍の大きさと血清 AFP 値の関係を検討した報告はみられるが, AFP 産生食道癌ヌードマウスへ移植してこれらを詳細に検討している報告はみられない。われわれが今回移植継代に成功した AFP 産生食道腺癌のヌードマウス皮下での腫瘍倍增時間は5.1日から24.9日, 平均14.4日であっ

た。これはわれわれがこれまで観察した10例のAFP非産生食道扁平上皮癌のヌードマウス皮下での平均腫瘍増殖時間19.2日よりも短かった。各世代の皮下腫瘍は、指数関数的な成長を示し、さらに担癌マウスの血清AFP値は、皮下腫瘍の成長とともに上昇し、 $Y=0.099X+155$ (Y : 血清AFP値 ng/ml, X : 腫瘍重量 mg) の有意な相関 ($p<0.005$) がみられた。また、この皮下移植腫瘍から作製した細胞浮遊液の脾臓内移植により4匹中3匹75%に肝転移がみられ、皮下移植と同様に血清AFP値の経時的上昇がみられ、腫瘍の肝内での生着および成長が示された。

以上皮下移植および脾臓内移植のいずれの移植方法においても血清AFP値は、腫瘍の大きさと相関していることが判明した。これらの事実より、今後このヌードマウス可移植性ヒトAFP産生食道腺癌株は、AFP産生食道腺癌の増殖、転移などの生物学的特性の研究や、治療実験の有用なモデルとなると考えられる。

V. 結 語

血清AFP値が高値を示した食道腺癌患者より採取した腫瘍のヌードマウスへの移植に成功し、現在14代目まで継代を重ねている。この腫瘍のヌードマウスにおける特性を検索し、以下の結果を得た。

1. 14代までの皮下での生着率は、100%であり、移植腫瘍の重量倍加時間は5.1日から24.9日であり、平均14.4日であった。

2. 悪性増殖能については、皮下移植では他臓器への浸潤、転移は認められなかったが、皮下腫瘍から作製した細胞浮遊液による脾臓内移植では、4例中3例に肝転移が認められた。

3. 担癌ヌードマウス血清AFP値は、皮下移植および脾臓内移植において、ともに移植後経時的に上昇し、皮下移植腫瘍については血清AFP値 Y (ng/ml) と腫瘍の大きさ X (mg) の間に $Y=0.099X+155$ の推定回帰直線が得られ、有意な相関が認められた ($p<0.005$)。

4. 移植に用いた腫瘍は、腺管構造を持つ食道腺癌であり一部に索状構造を示した。継代移植腫瘍および実験的肝転移結節においても基本的にはその組織型に変化はなかった。

5. 酵素抗体法によって食道原発巣および転移巣の腫瘍細胞内にAFPの局在を認めた。

以上、ヌードマウス可移植性ヒトAFP産生食道腺癌株の樹立は、AFP産生腺癌の特性を研究する実験系として有用であるのみならず、AFPをマーカーとした

転移実験や治療実験にも有用であると考えられる。

文 献

- 1) Rygaard J, Povlsen CO: Heterotransplantation of human malignant tumor to "nude" mice. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 77: 758-760, 1969
- 2) Stoner GD, Autrup H, Trump BF et al: Long-term survival of normal adult human tissues as xenografts in congenitally athymic nude mice. *J Natl Cancer Inst* 66: 849-858, 1981
- 3) 高橋精一, 中谷勝紀, 白鳥常男ほか: ヒト胃癌組織のヌードマウスへの移植. 1. 生着率と発育態度および組織像. *日消病会誌* 74: 421-431, 1977
- 4) Nakatani K, Takahashi S, Shiratori T et al: Heterotransplantation of human gastric carcinomas into nude mice. *World J Surg* 3: 641-650, 1979
- 5) 宮城信行, 中谷勝紀, 江崎友通ほか: ヒト胃癌のヌードマウスへの移植—ヌードマウス皮下移植100症例の移植成績および腫瘍重量倍加時間の検討一. *日消病会誌* 80: 2512-2519, 1983
- 6) 江崎友通, 小西陽一, 中谷勝紀ほか: ヒト胃癌のヌードマウスへの移植. 5. AFP産生ヒト低分化腺癌のヌードマウスへの移植継代について. *日消病会誌* 79: 2199-2206, 1982
- 7) 江崎友通: ヌードマウス可移植性AFPおよびCEA産生ヒト胃癌についての研究. *奈良医誌* 35: 385-402, 1984
- 8) Tatarinov YS: Detection of embryospecific alpha-globulin in the blood serum of a patient with primary liver tumor. *Vopr Med Khim* 10: 90-91, 1964
- 9) 加藤 清, 赤井貞彦, 飛田祐吉ほか: ヘパトマ・悪性奇形腫以外の α -Fetoprotein陽性癌についての考察—全国調査結果を中心として—. *癌の臨* 20: 376-382, 1974
- 10) 北岡久三, 向島 達, 大倉久直ほか: Alpha-Fetoprotein陽性胃癌. *最新医* 29: 2298-2301, 1974
- 11) 佐藤幹雄, 三戸康郎, 荒木貞夫ほか: α -フェトプロテイン産生胃癌. *癌の臨* 28: 799-803, 1982
- 12) Hünter WM, Bennie JG, Brock DJH et al: Monoclonal antibodies for use in an immunoradiometric assay for α -fetoprotein. *J Immunol Methods* 50: 133-144, 1982
- 13) 新沢陽英, 笠島 武, 平野雄一郎ほか: 消化器癌における α -fetoproteinのPeroxidase antiperoxidase (PAP) 法による検討. *日消病会誌* 77: 1250-1256, 1980
- 14) Wahren B, Harmenberg J, Edsmyr F et al: Possible tumour markers in patients with oe-

- sophagus cancer. *Scand J Gastroenterol* 14 : 361-365, 1979
- 15) Odaimi M, Ajani JA: Brain metastases and elevated α -fetoprotein level in a patient with esophageal carcinoma. *South Med* 79 : 1304-1306, 1986
- 16) Burg-Kurland CL, Purnell DM, Combs JW et al: Immunocytochemical evaluation of human esophageal neoplasms and preneoplastic lesion for β -chorionic gonadotropin, placental lactogen, α -fetoprotein, carcinoembryonic antigen, and nonspecific crossreacting antigen. *Cancer Res* 46 : 2936-2943, 1986
- 17) Burg-Kurland CL, Purnell DM, Combs JW et al: Immunocytochemical evaluation of primary human esophageal carcinomas and their xenografts for keratin, β -chorionic gonadotropin, placental lactogen, α -fetoprotein, carcinoembryonic antigen, and nonspecific cross-reacting antigen. *Cancer Res* 46 : 5730-5737, 1986
- 18) Hirohashi S, Shimosato Y, Kameya T et al: Production of α -fetoprotein and normal serum proteins by xenotransplanted human hepatomas in relation to their growth and morphology. *Cancer Res* 39 : 1819-1828, 1979
- 19) 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複合体の効果一. *日消病会誌* 82 : 18-27, 1985
-