

ヒト大腸癌細胞株をヌードマウス継代中に発生したマウス 由来腺癌 XK-4細胞の性状と転移能に関する検討

近畿大学医学部第1外科

足立 俊之 犬房 春彦 森 亘平 原 聡
相良 憲幸 松田 泰次 安富 正幸

新しい腺癌肝転移モデルを樹立した。1985年10月に当院で手術した直腸癌組織をヌードマウスの背部に移植し、ヒト大腸癌細胞株 KUM・RK-4N を樹立し以後継代した。1990年2月にこの腫瘍より初代培養を行い培養細胞株を樹立した。この細胞をヌードマウスに尾静脈注入および前腸間膜静脈より注入したところ、約2~3週間で肺および肝臓に明瞭な結節型の転移巣を生じた。ヒト癌でのヌードマウスにおける転移はまれであり、この培養細胞の染色体分析およびアイソザイム分析ではマウス由来の癌と考えられ、また胸腺正常同系マウスへの移植は拒絶されたため、ヌードマウス由来腺癌と考え XK-4細胞と名づけた。今回、この XK-4細胞の生物学的特性と肺および肝臓への転移能を検討した。

Key words: nude mouse, spontaneous tumor in nude mouse, liver metastatic model, lung metastatic model

はじめに

Rygaard & Povlsen が1969年にヌードマウスへヒト癌組織の移植を行って以来¹⁾、ヌードマウスを用いた可移植性ヒト癌細胞株の継代は *in vivo* 実験系として多くの施設で行われるようになった²⁾。確立したヌードマウス移植ヒト癌細胞株の組織像、増殖速度、抗癌剤感受性、物質産生性などの生物学的特性は数年以上の継代においても安定していると言われている^{3)~5)}。また、ヒト癌細胞の培養系を樹立する場合にも最初ヌードマウスに移植継代した後に初代培養すると細菌混入が少ないばかりでなく、繰り返して初代培養を試みることができる。このようにヒト癌のヌードマウスへの移植はしばしば行われている。ヌードマウス皮下に移植されたヒト癌細胞は膨張性に増殖し、浸潤性に増殖するものは少ない²⁾。このような増殖様式のほかに、ヌードマウスに移植されたヒト癌細胞は転移が少ない⁶⁾。これを Prehn らは immunostimulation の考えで説明しようと試み⁷⁾、またヌードマウスの高いマクロファージ活性や natural killer (NK) 活性と関係づける報告⁸⁾もある。一方、ヌードマウスには自然発生する悪性腫瘍は少なく、とくに癌は極めてまれであ

る⁹⁾。

今回、ヒト大腸癌細胞株を移植継代中、ヌードマウスに自然発生したと考えられるマウス由来腺癌の培養系を樹立したので、本細胞 (XK-4) の生物学的特性と肝臓および肺転移の新しいモデルとして転移能についての検討を加えて報告する。

材料と方法

1. 腫瘍：ヒト大腸癌細胞は1985年10月に当院で手術した57歳男性の直腸癌組織を用いた。手術所見は大腸癌取扱い規約⁹⁾より RK(Rb), 2型, 2/3周, 右前壁, P₀H₀A₂N (-) M (-), stage II, で腹会陰式直腸切断術・リンパ節郭清 (R3) を施行し治療手術であった。病理組織学的所見は中分化型腺癌であった。

2. 動物：マウスは静岡動物実験協同組合より購入した BALB/c, 雌, 約6週齢, ヌードマウスは日本クレアより BALB/cA-jcl-nu/nu の雌を購入後1週間飼育した後約8週齢のものを実験に用いた。また、これらの動物は室温23°C, 湿度50%, Specific Pathogen Free (SPF) の条件下で、マウス用飼料 F-2 (船橋農場, 東京) と滅菌水道水を自由に摂取できる状態で飼育し実験に用いた。

3. ヌードマウス移植継代法：前記ヒト大腸癌の手術標本より少量の癌組織を切除し、200U/ml ペニシリンと200μg/ml ストレプトマイシン (Flow Labora-

<1991年9月4日受理>別刷請求先：足立 俊之
〒589 大阪狭山市大野東377-2 近畿大学医学部第1外科

tories)を加えた RPMI1640溶液(日研生物医研)にて2回洗浄した後、メスにて細切し約 2mm^3 の腫瘍片をトラカール針を用いて2匹のヌードマウス背部皮下に移植した。ヌードマウスの背部皮下に移植した腫瘍が250mg以上に達した時期を腫瘍の増え換え時期として、同様の方法で2匹のヌードマウスに再移植し継代した。腫瘍の推定重量(mg)はノギスを用いて、腫瘍の長径L(mm)と短径W(mm)を週に1回、同一の測定者により行い $L \times W^2/2$ より算出した。腫瘍倍加時間は移植後の間で直線回帰方程式 $y = a + bx$ を算出し $\log 2/b$ の式より計算した。

4. 細胞の初代培養：ヌードマウスの背部皮下で腫瘍が約 1cm^3 になった時点で、ヌードマウスを屠殺し腫瘍のみを清潔に摘出した。腫瘍中心部の壊死部分を取り除き前記と同様の抗生剤を含んだ RPMI1640溶液にて2回洗浄した後、メスで腫瘍組織を細切し 25cm^3 の組織培養用カルチャーフラスコに RPMI1640溶液に20%牛胎児血清(FBS, Hyclone Laboratories, Inc)を加えた溶液を約3ml 加え腫瘍組織片が浸る程度にして温度 37°C 、湿度100%、 CO_2 濃度5%の条件下で初代培養を行った。腫瘍細胞が十分に増殖した時点で、カルチャーフラスコに0.02%の EDTA 溶液(阪大微研)を加えて細胞をカルチャーフラスコより剥離し単細胞にしたのち継代培養した。2回目以降の継代には培養液を RPMI1640溶液に10%牛胎児血清を加えた培養液を用いた。培養細胞の増殖速度は10mm、24穴のプレート(Nunc Gibco Iwaki Glass, Japan)に 1×10^4 個の細胞をまき、培養液は毎日全量を交換し Hinegardnerの方法¹⁰⁾に従いフルオロメーター RF-540(島津製作所、京都)により DNA 量を測定し増殖曲線を得た。また、対数増殖期より細胞の倍加時間を計算した。

5. 染色体分析：樹立した培養細胞の染色体分析は指数増加を示す分裂の盛んな培養細胞をコルセミドで処理した後、0.075M KCl 中で25分間培養し、酢酸メタノール混合液で固定を行った。さらにギムザトリピン G バンド法を行い標本作製した。

6. アイソザイム試験：樹立した培養細胞のアイソザイムによる種同定試験はオーセンティキット(岩城硝子株式会社)を用いて2個の酵素基質、NP(Purine nucleoside phosphorylase), G6PD(Glucose-6-phosphate dehydrogenase)を検討した。

7. 転移実験：樹立継代培養中の細胞を、0.02%の EDTA 溶液で単細胞にしたのち RPMI1640溶液にて細胞懸濁液を作成し、トリパンブルー染色にて細胞の

viability が95%以上であることを確認のうえ、これを用いて以下の実験を行った。

① 静脈注入肺転移：ヌードマウスの尾静脈より樹立培養細胞を一匹あたり、 1×10^4 個/0.2ml・ 5×10^4 個/0.2ml・ 1×10^6 個/0.2ml を注入し、注入後14日目と21日目に屠殺して肺転移結節数を計測した。

② 自然肺転移：ヌードマウスの背部皮下に樹立培養細胞を、 1×10^6 個/0.05ml 注入し、注入後42日目と49日目に屠殺して自然肺転移結節数を計測した。

③ 門脈注入肝転移：ヌードマウスをネンブタール麻醉下に開腹し盲腸を持ち上げ前腸間膜静脈より樹立培養細胞を、 5×10^4 個/0.1ml および 1×10^5 個/0.1ml 注入し、注入後21日目および28日目に屠殺して肝転移結節数を計測した。

屠殺後、肺・肝臓などの主臓器およびリンパ節は肉眼的・病理組織学的に転移の有無を検討した。転移数は肺および肝臓の表面の転移結節の数を macroscopy 下に計測した。以上の転移検討は安定性をみるために異なる継代数にて3回以上行った。また、摘出標本はすべて10%中性ホルマリン水溶液固定後、パラフィン包埋を行い、薄切切片($6\mu\text{m}$)を作製し、Hematoxylin-Eosin 染色を施行し、光学顕微鏡による組織学的検索に供した。

8. 樹立培養細胞を胸腺正常同系マウス(BALB/c)の背部に 1×10^6 個/0.05ml 注入しその増殖を検討した。

9. 抗ヌードマウス血清添加による反応：ウサギ抗ヌードマウス血清を培養液中に20%の濃度で添加し樹立培養細胞に対する影響を検討した。ウサギ抗ヌードマウス血清は Okabe らの方法¹¹⁾に従い作製した。

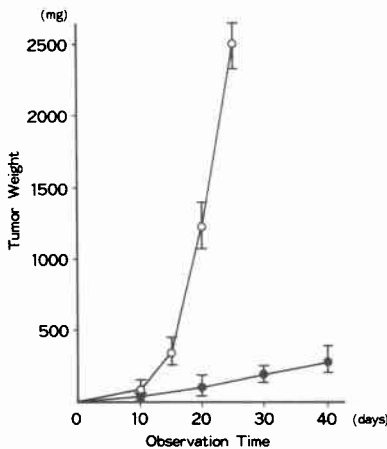
結 果

1. ヒト大腸癌細胞株 KUM・RK-4N の樹立および継代-ヌードマウス背部皮下に移植した直腸癌組織は約1か月で肉眼的にその増殖が確認できた。推定腫瘍重量が250mg以上に達した時点を腫瘍の植え換え時期として、次のヌードマウス背部皮下に移植継代した。継代目的に移植された腫瘍の植え換えの間隔より、正確な腫瘍重量倍加時間(doubling time)を算出することは困難なことであるが、おおよその成長速度を推定した。1988年2月1日に本腫瘍の7代目より8代目への植え換えが行われたが、この前後において植え換えの間隔に変化が見られた(Table 1)。130~160日間あった植え換えの間隔がこれ以降70~100日間に短縮されていた。

Table 1 Passage of KUM・RK-4N in nude mouse.

Passage	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Year	1985	1986	→	1987	→	1988	→	1989	→	→
Day	10/5	4/21	10/3	4/6	10/8	3/25	8/14	2/1	4/25	7/21
Passage	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
Year	→	→	1990	→	→	→	→	→	1991	
Day	9/13	12/12	3/30	5/31	7/31	9/26	10/31	11/13	1/11	

Fig. 1 Growth curve of established cell line (○) and KUM・RK-4N (passage 3) tumor line (●) in nude mouse. Points show means of five mice. Bars show ranges.



2. 樹立培養細胞の倍加時間の検討：KUM・RK-4N (passage 3) の腫瘍増殖曲線より算出した平均倍加時間は、 37.71 ± 1.47 日 (Mean \pm S.D.)であった。樹立培養細胞をヌードマウスの背部に移植した際の腫瘍の増殖は速く腫瘍増殖曲線より算出した平均倍加時間は 3.56 ± 0.63 日と RK-4N と明らかに相違していた (Fig. 1)。樹立培養細胞の DNA 量より算出した増殖曲線の対数増殖期における倍加時間は約9.6時間であった (Fig. 2)。

3. 染色体分析：樹立培養細胞の染色体分析では、50個の細胞を検討したがすべてマウスの細胞でありヒト由来の細胞は認められなかった (Fig. 3)。

4. アイソザイム分析：樹立培養細胞のアイソザイム同定では2個の Enzyme Marker (NP, G6PD) を用いて検討した。NP は24.6, G6PD は18.0でありヒト細胞の値 (NP 12.8, G6PD 12.1) とは大きく相違し

Fig. 2 Growth curve of established cell line. Points show means of three wells. Bars show ranges.

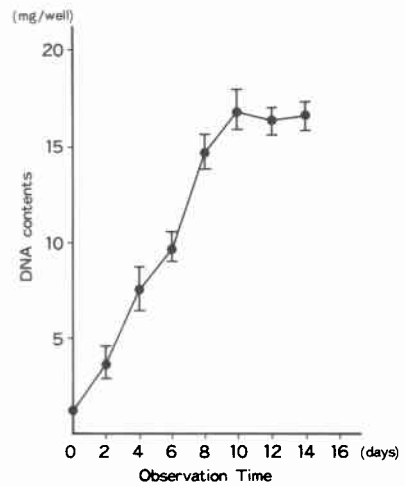
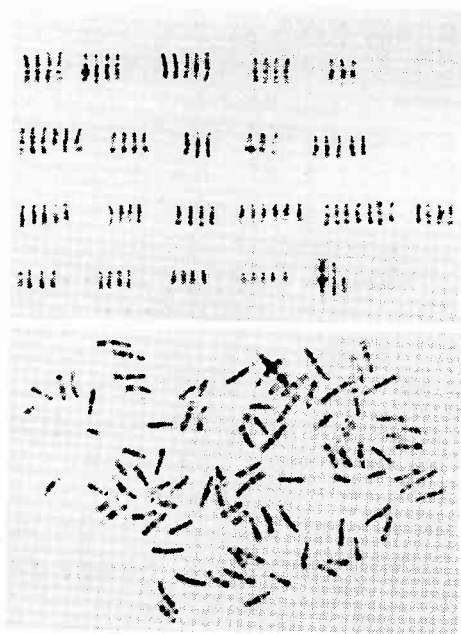


Fig. 3 Chromosome of established cell line.



マウス細胞近傍の値を示した (Table 2)。

5. 転移能の検討：樹立培養細胞は尾静脈からの注入、および背部皮下への注入により肺に、前腸間膜静脈からの注入により肝臓に明瞭な結節型の転移巣を生じた。

① 尾静脈からの注入による肺平均転移結節数は、注

Table 2 Isozymes analysis of animals marker and the established cell line.

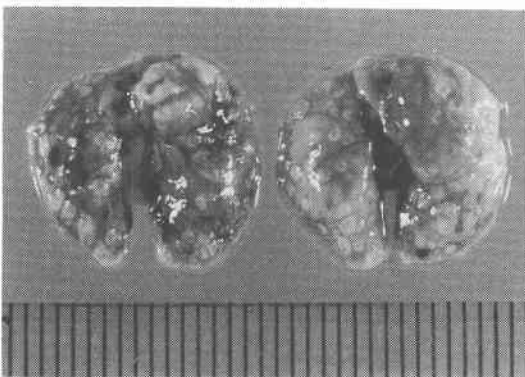
	Enzyme Marker	
	N P	G 6 P D
Rat	11,5	18,7
Human B	12,8	12,1
Human A	12,9	14,5
Rabbit	25,1	12,3
Mouse	25,2	18,1
Established cell line	24,6	18,0

Table 3 Experimental lung metastasis induced by established cell line.

Established cells (number/mouse)	NO. of lung metastasis			
	Mean ± s.d. (range)			
	day 14		day 21	
	Mean ± s.d. (range)	Mean ± s.d. (range)		
1X 10 ⁴	33± 5 (27-39)	77± 9 (65-93)		
5X 10 ⁴	64± 7 (51-72)	102± 10 (87-123)		
1X 10 ⁵	84± 6 (73-93)	136± 5 (129-141)		

Five nude mice per group were inoculated i.v. with established cells. Mice were sacrificed 2 or 3 weeks after tumor inoculation and lung tumor colonies were counted under the macroscopy.

Fig. 4 Experimental lung metastasis by established cell injection i.v.



入後14日目に1×10⁴個/0.2ml では33±5個, 5×10⁴個/0.2ml では64±7個および1×10⁵個/0.2ml では84±6個で, 注入後21日目では1×10⁴個/0.2ml では77±9個, 5×10⁴個/0.2ml では102±10個および1×10⁵個/0.2ml では136±5個であった (Table 3, Fig. 4).

また, 他の臓器およびリンパ節には転移は認めなかった。

Table 4 Spontaneous lung metastasis induced by subcutaneous injection of established cell line.

Established cells (number/mouse)	NO. of lung metastasis			
	Mean ± s.d. (range)			
	day 42		day 49	
	Mean ± s.d. (range)	Mean ± s.d. (range)		
1X 10 ⁴	13± 5 (5-17)	21± 5 (11-32)		
5X 10 ⁴	22± 7 (14-28)	46± 7 (33-59)		

Five nude mice per group were inoculated back side with established cells. Mice were sacrificed 6 or 7 weeks after tumor inoculation and lung tumor colonies were counted under the macroscopy.

Fig. 5 Spontaneous lung metastasis by established cell injection into subcutaneous.

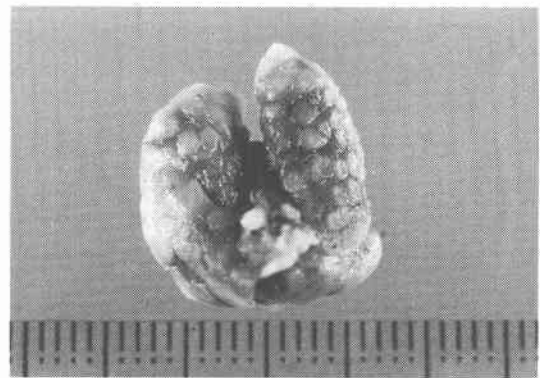


Table 5 Experimental liver metastasis induced by intramesenteric venous injection of established cells.

Established cells (number/mouse)	No. of liver metastasis			
	Mean ± s.d. (range)			
	day 21		day 28	
	Mean ± s.d. (range)	Mean ± s.d. (range)		
5X 10 ⁴	13± 3 (6-20)	32± 6 (22-41)		
1X 10 ⁵	42± 10 (32-60)	65± 8 (43-82)		

Five nude mice per group were inoculated intramesenteric vein with established cells. Mice were sacrificed 3 or 4 weeks after tumor inoculation and liver tumor colonies were counted under the macroscopy.

②背部皮下への注入による自然肺平均転移結節数は, 注入後42日目に1×10⁴個/0.05ml では13±5個および5×10⁴個/0.05ml では22±7個で, 注入後49日目に1×10⁴個/0.05ml では21±5個および5×10⁴個/0.05ml では46±7個であった (Table 4, Fig. 5).

また, 他の臓器およびリンパ節には転移は認めなかった。

③前腸間膜静脈からの注入による肝平均転移結節数は, 注入後21日目では5×10⁴個/0.1ml では13±3個お

Fig. 6 Experimental liver metastasis by established cell injection into mesenteric vein.

A: 1×10^6 /0.1ml injection per mouse. B: 5×10^4 /0.1ml injection per mouse.

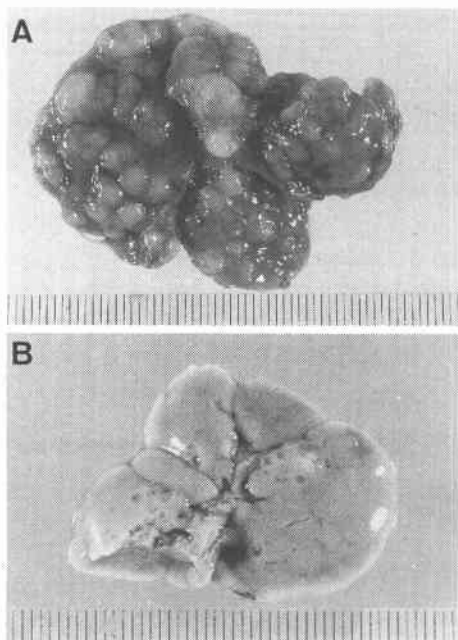
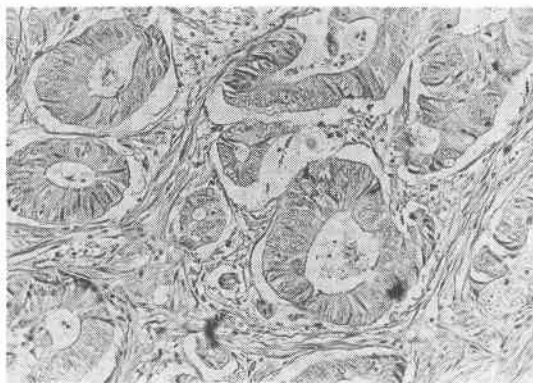


Fig. 7 Histological finding of the original human colon cancer from surgical specimen (H.E. $\times 100$).



よび 1×10^5 個/0.1ml では 42 ± 10 個で、注入後28日目では 5×10^4 個/0.1ml では 32 ± 6 個および 1×10^5 個/0.1 ml では 65 ± 8 個であった (Table 5, Fig. 6).

また、他の臓器およびリンパ節には転移を認めなかった。

6. 病理組織学的所見：手術時原発巣の組織像と

Fig. 8 Histological finding of the lung metastasis, which produced the established cell line (H.E. $\times 100$).

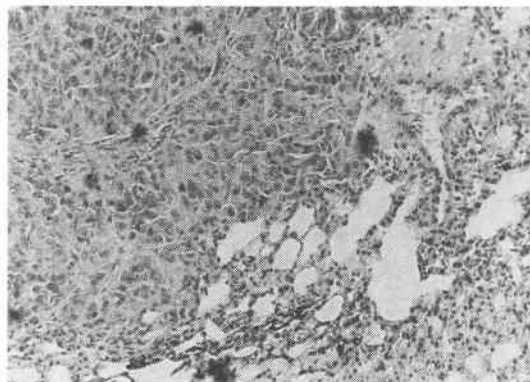
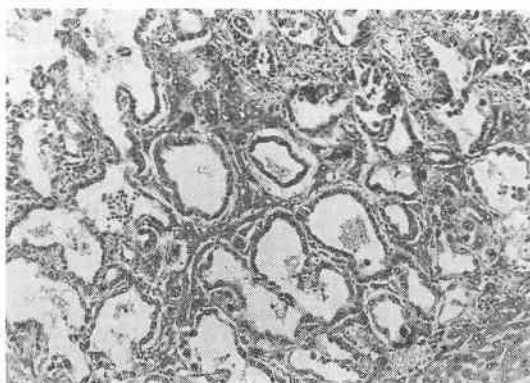


Fig. 9 Histological finding of the liver metastasis, which produced the established cell line (H.E. $\times 100$).



ヌードマウスの背部で継代している際の組織像、および樹立した培養細胞の肺・肝臓への転移巣の組織像は原発巣と似た中分化型腺癌であった (Fig. 7, 8, 9).

7. 胸腺正常同系マウスへの移植：樹立培養細胞を胸腺正常同系マウス (BALB/c) の背部皮下に 1×10^6 個注入したが増殖は認められず拒絶された。

8. 抗ヌードマウス血清添加による反応：培養液中に作成した抗ヌードマウス血清を約20%濃度で加えたところ、約24時間で樹立培養細胞はすべて死滅した。

これより今回樹立された培養細胞は、当初ヌードマウスを用い継代していた RK-4N とは異なっていたので、ヌードマウス由来細胞株 XK-4 と名付けた。

考 察

ヌードマウスは Grist, N.R. がスコットランドの

Ruchill Hospital, Virus Laboratoryにおいて、非近交系のアルビノマウスから毛のない突然変異を発見し、Issacsonら¹²⁾によって報告された。1966年Flanagan¹³⁾は、無毛のほか、短寿命、発育の不良、繁殖力の低下および肝疾患などについて詳細な検討を行い、これらの形質は1個の劣性遺伝子により、多面的に発現されることを明らかにした。1968年、Pantelouris¹⁴⁾は、ヌードマウスに先天的に胸腺が欠損していることを発見し、さらにSPF化することにより寿命延長し肝疾患も認めなかった。すなわちヌードマウスは、無毛と胸腺欠損の2つの形質を持つことになる。ヌードマウスには当初予想されたような発癌の促進が見られないことはRygaardら⁶⁾により、BALB/c由来の6,900匹のヌードマウスに自然発生腫瘍がないと報告されたが、1975年にOutzenら¹⁵⁾はBALB/cヌードマウスに2%のリンパ腫と少数の乳癌を確認している。ヌードマウスに自然発生腫瘍が少ないのはSPF環境下に飼育され、発癌因子に暴露されないためではないかとの議論があるが、BALB/cマウスの通常環境と無菌環境における腫瘍発生率を比較しても差がないという報告¹⁶⁾があるところを見ると、飼育環境の差が発癌率に影響しているとは考え難い。われわれの教室では約10年間、十数種のヒト癌細胞をヌードマウスに移植継代しているが自然発生腫瘍は認めなかった。

一方、ヒト癌移植下におけるヌードマウスの自然発生腫瘍も少数ではあるが報告^{17)~19)}されている。玉置はヒトT細胞リンパ腫LM-1株のBALB/cヌードマウスでの継代中に、腫瘍が移植された局所に肉腫の発生を1例経験している。この腫瘍はBALB/cの正常マウスに移植可能であり、マウス起源であった¹⁷⁾。久保田ら¹⁸⁾はホルモン依存性のヌードマウス可移植性ヒト乳癌株Br-10を継代中に、自然発生したと考えられるマウス由来の腺癌BX-1を報告している。この腫瘍のエストロゲン・レセプターは陰性であり、その増殖にホルモン依存性を示さず、胸腺正常同系マウスへの移植は拒絶されたが、染色体分析ではマウスの染色体以外見いだされなかった。これらの腫瘍はヌードマウスにおける転移について述べていないが、ヌードマウスでは増殖および広範な転移を来すが、胸腺正常同系マウスでは増殖しないヌードマウス由来と考えられる腫瘍の報告¹⁹⁾も見られる。

最初XK-4細胞はヒト大腸癌細胞と考え継代培養しており、各種転移実験を行ったところヒト癌細胞に比

較して早期に多くの転移を形成し、肺および肝臓に明瞭な結節型の転移巣を生じた。染色体分析を行ったところ、検索した50個の細胞すべてがマウス由来の染色体であった。またアイソザイムによる種同定試験でもマウス由来の細胞と考えられた。当初は同時期に継代培養されていた既存の細胞株による汚染が疑われたが、他のマウス細胞株とは培養時の細胞形態やヌードマウスに移植した腫瘍組織像が明らかに違っていた。樹立培養細胞を胸腺正常同系マウスへの移植を行ったが、胸腺正常同系マウスでの増殖は認められなかった。これより樹立培養細胞はヌードマウスに自然発生した癌細胞と考えられた。ヌードマウス樹立継代腫瘍であるKUM・RK-4Nは1991年3月1日現在25代を数える。われわれは推定腫瘍重量が250mg以上に達した時期に腫瘍の植え換えを行ってきた。腫瘍の植え換えの間隔から正確な腫瘍重量の倍加時間(doubling time)を算出することは困難であるが、おおよその成長速度を推定することは可能である。一般に樹立継代された腫瘍は、一定間隔に継代していくのが普通であるが本腫瘍は7代目より8代目への植え換えが行われた前後に増殖速度に変化が見られている。130~160日間あった植え換えの間隔がこれ以降70~100日間に短縮されている。つまり、この継代時に移植腫瘍自体の性格に変化が起こったか、あるいは腫瘍の入れ代わりがあったことが推定された。

ヌードマウスの自然発生腫瘍の発生率は2%で、その組織型は肺腺腫、リンパ腫、乳癌、胆管癌などが報告²⁰⁾されている。今回、ヌードマウスにヒト癌細胞を移植継代中に自然発生した腫瘍は腺癌である。その発生原因としてはヒト癌細胞を移植することにより癌細胞より何らかの刺激物質(carcinogen)が放出され、ヌードマウスに癌細胞を形成したものと考えられた。しかし、Sharkeyらはヒト癌細胞の発育しなかったヌードマウスに自然発生腫瘍は出現しやすいと報告²¹⁾している。このXK-4細胞のヌードマウス皮下腫瘍は、最初ヌードマウスの背部に移植したヒト大腸癌細胞と類似の組織像を示したが偶然の一致と考えられた。

癌の転移に関する研究は、Fidlerら²²⁾がマウスメラノーマ細胞株を用いた癌転移モデルを確立して以来、多くの施設で行われるようになった。Fidlerらはマウスメラノーマ細胞をマウスの尾静脈より注入してできた肺転移巣を初代培養し、この培養細胞を再度尾静脈より注入し肺転移を作りこの操作を繰り返して肺に高頻度に転移をする細胞を確立した²³⁾。この細胞は現在

でも多くの施設で転移モデルとして使用されている²⁴⁾。ヒト癌細胞においては犬房はヌードマウス皮下移植で自然肺転移を生じるヒト肺腺癌培養細胞 KUM・LK-2を樹立した²⁵⁾。これら癌転移モデルはそのほとんどが肺転移モデルで、門脈経由の肝転移モデルはまれである。マウスやヌードマウスの脾臓に癌細胞を注入し肝転移を形成するモデルは多く認められる²⁶⁾²⁷⁾が、転移経路が一般に胃癌、大腸癌などで肝転移を生じる経路である門脈経由でないことや脾臓内に注入された癌細胞がすべて確実に肝臓に流入するかどうかなどの点より臨床的肝転移とは異なる。門脈経由の肝転移モデルとして報告がみられる BALB/c マウス由来 colon26細胞²⁸⁾は、N-methyl-N-nitrosourethaneにて誘発された可移植性大腸癌細胞株であるが、低分化型腺癌であり肝転移巣が明瞭な結節を示しにくく浸潤・癒合するため、通常臨床で遭遇する大腸癌の肝転移が高分化型に多く転移巣が結節型であることを考えると良いモデルとはいえない。

今回、ヒト大腸癌細胞 KUM・RK-4N をヌードマウス継代中に発生し樹立したヌードマウス由来と考えられる腺癌 XK-4細胞は、中分化型腺癌を示し明瞭な肝臓および肺転移巣を形成し、肝転移モデルとして有用である。今後は、XK-4細胞を用いて肝転移機構の解析や癌の肝転移治療の検討を行ってゆきたい。

文 献

- 1) Rygaard J, Povlsen CO: Heterotransplantation of a human malignant tumors to "Nude" mice. *Acta Pathol Microbiol Scand* 77: 758-760, 1969
- 2) 玉置憲一, 上山義人: ヌードマウス移植ヒト腫瘍の発育形式と宿主反応. *癌の臨* 22: 694-698, 1976
- 3) Shimosato Y, Kameya T, Nagai K et al: Transplantation of human tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 56: 1251-1260, 1976
- 4) Hirohashi S, Shimosato Y, Kameya T et al: Hormone dependency of a serially transplantable human breast cancer (Br-10) in nude mice. *Cancer Res* 37: 3184-3189, 1977
- 5) Kubota T, Nagata M, Tsuyuki K et al: Cell kinetics and chemosensitivity of human carcinomas serially transplanted into nude mice. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 77: 502-507, 1986
- 6) Rygaard J, Povlsen CO: The mouse mutant nude dose not develop spontaneous tumors. *Acta Pathol Microbiol Scand (B)* 82: 99-106, 1974
- 7) Prehn RT: Immunostimulation of the lymphodependent phase of neoplastic growth. *J Natl Cancer Inst* 59: 1043-1049, 1977
- 8) Habu S, Fukui H, Shimamura K et al: In vivo effects of antiasialo GM1. Reduction of NK activity and enhancement of transplanted tumor growth in nude mice. *J Immunol* 127: 34-40, 1981
- 9) 大腸癌研究会: 臨床・病理. 大腸癌取扱い規約. 第4版. 金原出版, 東京, 1985
- 10) Hinegardner T: An improved fluorometric assay for DNA. *Anal Biochem* 39: 197-201, 1971
- 11) Okabe T, Suzuki A, Ohsawa N et al: Immune elimination of host fibroblast for the cultivation of human tumors transplanted into nude mice. *Cancer Res* 39: 4189-4194, 1979
- 12) Issacson JH, Cattanauch BM: Mouse mutant gene symbol. *Mouse News Letter* 27: 2-8, 1962
- 13) Flanagan SP: Nude a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse: *Genetic Res* 8: 295-309, 1966
- 14) Pantelouris EM: Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature* 217: 370-371, 1968
- 15) Outzen HC, Custer RP, Eaton GH et al: Spontaneous and induced tumor incidence in germ-free "nude" mice. *J Reticuloendothel Soc* 17: 1-9, 1975
- 16) Smith CS, Pilgrim HI: Spontaneous neoplasms in germfree BALB/c mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 138: 542-544, 1971
- 17) 玉置憲一: ヌードマウスにおける発癌. 下里幸雄, 玉置憲一編. 人癌とヌードマウス. 東京, 医歯薬出版, 1982, p28-31
- 18) 久保田哲朗, 岡 昭一, 内海俊明ほか: ホルモン依存性ヒト乳癌株 Br-10 を継代中に発生したホルモン非依存腺癌 BX-1 の性状と両腫瘍株の分離. *癌と化療* 15: 2081-2086, 1988
- 19) 天野良平: ヌードマウスに自然発生した高頻度転移株の樹立に関する研究. *慈恵医大誌* 99: 1121-1130, 1984
- 20) Stutman O: Spontaneous, viral chemically induced tumors in the nude mouse. Edited by Fogh J, Givanel BC. *The nude mouse in experimental and clinical research*. Academic Press, New York, 1978, p411-435
- 21) Shrkey FE, Fogh J: Incidence and pathological feature of spontaneous tumor in athymic nude mice. *Cancer Res* 39: 333-339, 1979
- 22) Fidler IJ: Selection of successive tumor lines for metastasis. *Nature (New Biol)* 242: 148-149, 1973

- 23) Fidler IJ, Talmadge JE: Evidence that intravenously derived murine pulmonary melanoma metastasis can originate from the expansion of a single tumor cell. *Cancer Res* 46 : 5167—5171, 1986
- 24) Kramer RH, Gonzalez R, Nicolson GL: Metastatic tumor cells adhere preferentially to the extracellular matrix underlying vascular endothelial cells. *Int J Cancer* 26 : 639—645, 1980
- 25) 犬房春彦: ノードマウス皮下移植で自然肺転移を生じるヒト肺腺癌培養細胞 KUM・LK-2 の樹立とその生物学的特徴の検討. *日外会誌* 89 : 1075—1082, 1988
- 26) Giavazzi R, Jessup JM, Campbell DE et al: Experimental nude mouse model of human colorectal cancer liver metastasis. *JNCL* 77 : 1303—1307, 1986
- 27) Lafreniere R, Rosenberg SA: A novel approach to the generation and identification of experimental hepatic metastasis in a murine model. *JNCL* 76 : 309—322, 1986
- 28) Tominaga T, Yoshida Y, Kosaki G et al: Liver metastasis of colon 26 cells implanted into the superior mesenteric vein in mice. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 78 : 846—850, 1987

**Characterization and Metastatic Potential of a Mouse Adenocarcinoma Cell Line
XK-4 which arose in Nude Mouse during the Transplantation
of Human Colon Cancer Cell Line KUM·RK-4N**

Toshiyuki Adachi, Haruhiko Inufusa, Nabuhira Mori, Satoshi Hara,
Noriyuki Sagara and Masayuki Yasutomi
First Department of Surgery, Kinki University School of Medicine

A mouse adenocarcinoma cell line that arose spontaneously in a nude mouse was established during the transplantation of a human colon cancer tumor line into the subcutaneous tissue of the nude mouse. Human colon cancer tumor line KUM·RK-4N was established in a nude mouse serially transplanted with human colon adenocarcinoma in October 1985. The cell line which we established was primary cultured from the KUM·RK-4N tumor in February 1990. Metastatic nodules were clearly produced in lung and liver after 3~4 weeks when the cells were injected into the tail vein and anterior mesenteric vein. The histological pattern of the subcutaneous tumor produced from the established cell line was a moderately differentiated adenocarcinoma similar to the KUM·RK-4N cell line. Chromosomal analysis of this cell line revealed only murine chromosomes and isozymes analysis showed a murine pattern. Based on these results this cell line was named mouse adenocarcinoma cell line XK-4. Transplantation of XK-4 cells into thymus-intact littermates was rejected, suggesting that XK-4 cancer grew spontaneously in the nude mouse. In this study, a new adenocarcinoma cell line XK-4 was established and the metastatic potential to lung and liver was characterized.

Reprint requests: Toshiyuki Adachi First Department of Surgery, Kinki University School of Medicine
377-2 Ohno-Higashi, Osaka-Sayama, 589 JAPAN
