日消外会誌　27（4）：994～997，1994年

特集12

同所再建によるヒト大腸癌肝転移モデルの作製と実験的免疫化学療法

慶應義塾大学外科
郭　宗宏　久保田哲朗　渡邊　昌彦
古川　俊治　寺本　龍生　北島　政樹

ヒト大腸癌株の腫瘍組織片をヌードマウスの盲腸壁に縫着する，同所再建による肝転移モデルを作製した．ヒト大腸癌株8株の転移様式を検討したところ，4株において約半数のマウスに肝転移を認め（転移群），他の4株では盲腸での良好な増殖・脈管侵襲を認めるにもかかわらず転移はみられなかった（非転移群）．本モデルを用いた実験的免疫化学療法実験では，5-fluorouracil 90mg/kg投与群では原発巣に抗腫瘍活性が示されたのに対し肝転移は抑制されず，反対にOK-432投与群では原発巣に抗腫瘍活性が示されなかったものの著明な肝転移の抑制がみられ，腫瘍の局在により薬剤感受性が異なることが示唆された．また両者併用群では原発巣，肝転移巣ともに腫瘍の増殖が抑制され，免疫化学療法の有効性が示唆された．同所再建を用いた本モデルは今後の肝転移プロセスの解明，治療実験のモデルとして有用であると考えられた．

Key words: colon cancer, liver metastatic model, immunochemotherapy

はじめに

肝転移は大腸癌における最も重要な問題の1つであるが，その転移プロセスや治療法については十分に明らかにされていない．われわれは，ヒト大腸癌株の腫瘍組織片をヌードマウスの盲腸壁に縫着する，いわゆる同所再建による肝転移モデルを作製し，ヒト大腸癌株8株の転移様式について検討した．また，本モデルを用いて5-fluorouracil（5-FU）とOK-432を用いた実験的免疫化学療法を施行しその有用性を検討した．

材料および方法

1）材料

実験動物には雄性，6週齢，体重20～22gのBALB/cAヌードマウスを使用した．実験に使用したヒト大腸癌株は計8株で，COL-2-JCK（低分化腺癌），COL-3-JCK（低分化腺癌），COL-5-JCK（高分化腺癌）は実験動物中央研究所より，Co-3（高分化腺癌），Co-4（低分化腺癌），COLO-205（低分化腺癌）は国立がんセンター研究所病理部より，WiDr（高分化腺癌）は日本ロッシュ研究所より供与された．Co-6（低分化腺癌）は当学において樹立された．いずれの腫瘍も当学実験動物センターにおいてヌードマウス背部皮下に継代移植されている継代株で，実験に際しては腫瘍の実質部分を無菌的に約4mm角大に切除し盲腸移植に供した．治療実験に使用した薬剤は5-FU（協和発酵工業株式会社市販）とOK-432（和光製薬株式会社市販）で，それぞれ生理的食塩水を用いて各濃度に溶解して使用した．

2）肝転移モデルの作製

マウスを2.5g%Avertin，0.4ml/mouse腹腔内投与により麻酔後，下腹部を開腹し盲腸を腹腔外に脱転した．盲腸漿膜壁を27ゲージ注射針を用いて小損傷を加えた後，4mm角大の腫瘍組織片を6-0 Dexon（Davis-Geck, Inc.）を用いて盲腸壁に縫着した．マウスは各腫瘍株につき5匹ずつ実験し，最低2回実験を繰り返した．マウスは腫瘍移植後4～7週後に屠殺評価し，肉眼的に盲腸，肝臓および他臓器を観察後，標本を病理学的検索に供した．

3）治療実験

5-FU単独投与群はCOL-2-JCKの腫瘍移植後7日目に45，90，または180mg/kgを1回腹腔内投与した．

＊第42回日消外会総会シンポ2・消化器癌の転移の予知とその対策
＜1993年12月8日受理＞
別刷請求先：久保田哲朗
〒160　新宿区信濃町35　慶應義塾大学医学部外科

OK-432単独投与群は腫瘍移植後5，7，9日目に計3回0.5KE/mouseを腹腔内投与した．5-FUとOK-432併用群では腫瘍移植後7日目に5-FU 90mg/kgを，腫瘍移植後5，7，9日目にOK-432 0.5KE/mouseを腹腔内投与した．各投与群ともに10匹ずつマウスを使用し，すべての投与群において腫瘍移植後28日目にマウスを屠殺評価し，盲腸腫瘍の重量，肝転移結節数を測定し，標本の一部を病理学的検索に供した．

結　果

1）ヒト大腸癌株肝転移様式の結果

すべてのヒト大腸癌株において，すべてのマウスにおいて盲腸での良好な腫瘍増殖が認められたが，4株（COL-2-JCK，COL-3-JCK，COL-5-JCK，Co-3）においてのみ約半数のマウスに肝転移が認められた（**Table 1**，**Fig. 1a**，**b**）．他の4株（Co-3，Co-4，Co-6，WiDr，COLO205）については盲腸での増殖・脈管侵襲が認められたが肝転移は認められなかった．

Fig. 1a Pathohistlolgical findings of Co-3 growing in cecum

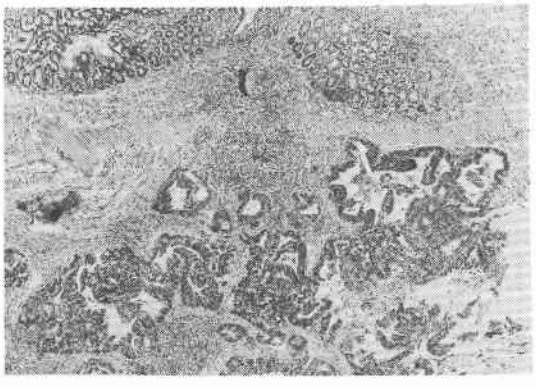


Fig. 1b Liver metastases of Co-3 after orthotopic onplantation

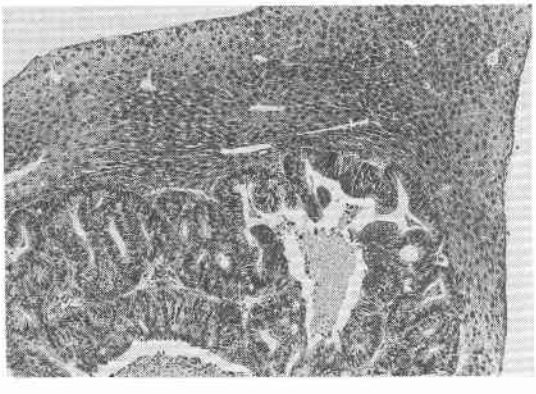


Table 1 Liver metastases after orthotopic onplantation

Strain	Tumor growth in cecum	Liver metastasis
COL-2-JCK	12/12	9/12
COL-3-JCK	12/12	7/12
COL-5-JCK	15/15	8/15
Co-3	14/14	7/14
Co-4	8/8	0/8
Co-6	5/5	0/5
WiDr	8/8	0/8
COLO-205	8/8	0/8

Data are shown as number of mice with local growth or liver metastasis/number of mice evaluated.

2）治療実験の結果

5-FU単独投与群ではマウスの最大耐容量である180mg/kg投与群において原発巣および肝転移巣の両方に抗腫瘍活性が認められたのに対し，90mg/kg投与群では原発巣に対してのみ抗腫瘍活性が認められ肝転移は抑制されなかった（**Fig. 2**）．OK-432単独投与群では逆に原発巣に対して抗腫瘍活性が認められなかったが著明な肝転移抑制効果が認められた（**Fig. 3**）．5-FUとOK-432の併用群では原発巣および肝転移巣の双方に対し著明な抗腫瘍活性が認められた．病理組織学的検索においては5-FU 90, 180mg/kg投与群の原発巣では広範な腫瘍の壊死像が認められた．一方肝転移巣では5-FU 180mg/kg投与群，OK-432投与群において肉眼的な肝転移結節の減少が認められたが治療群の病理組織像所見は対照群とほぼ同一であった．

考　察

肝転移は大腸癌の予後を規定する重要な因子の1つであるが，その転移プロセスについては十分に明らかにされておらず，治療法も確立されていない．これらの研究を妨げる原因の1つとして適切な実験動物モデルが無いことがあげられる．従来より使用されてきた脾注や門脈注入による肝転移モデルは転移の全プロセスを表現しておらず，転移プロセスの解明には不十分であった．また脾注肝転移モデルでは原発巣と転移巣の薬剤感受性を同時に観察することができず臨床への応用も限界があった．

われわれはマウスを用いた同所再建によるヒト胃癌[1]，膵臓癌，肺小細胞癌[2]らの転移モデルを作製しその重要性を明らかにしてきた．今回われわれはヒト大腸癌腫瘍組織片をヌードマウスの盲腸壁に縫着するこ

Fig. 2　Experimental chemotherapy using 5-FU

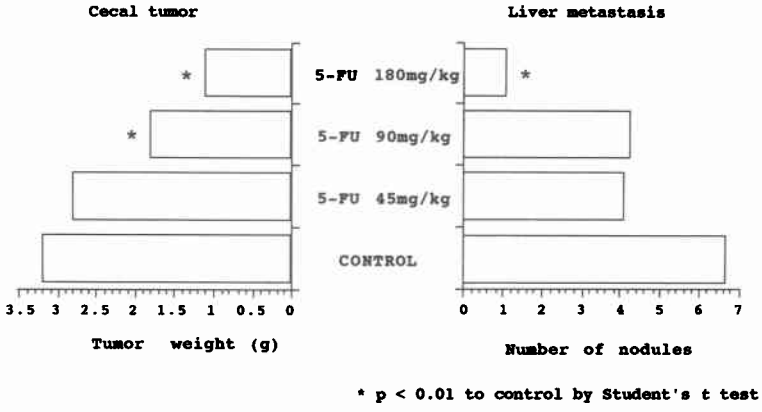
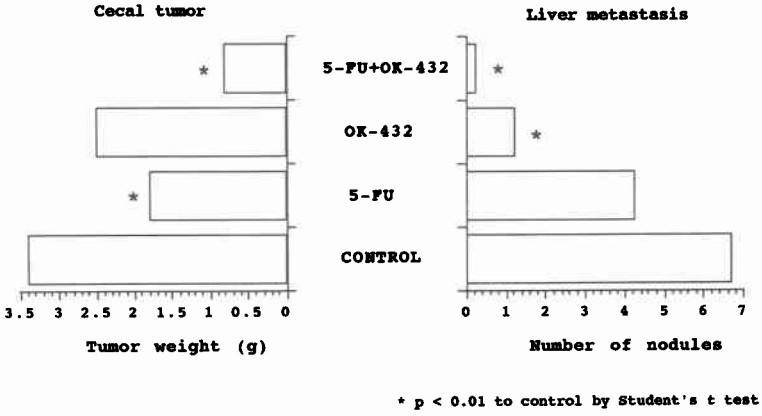


Fig. 3　Experimental immunochemotherpy using 5-FU and OK-432



とにより肝転移モデルを作製した．以前にわれわれは盲腸壁に縫着した腫瘍を早期に切除することにより肝転移を抑制できることを確認し，同モデルにおいて臨床ときわめて類似した環境が再現され，転移が血行性に生じることを報告した[3]．

今回はヒト大腸癌株8株を用いて転移様式を検討したところ，4株において肝転移が認められた．他の非転移性の4株においても転移株と同様に良好な盲腸での増殖が認められ，さらに興味深いことには非転移株においても原発巣における著明なリンパ管および静脈侵襲が認められた．われわれは同一の8株を用いてその単離腫瘍細胞を脾臓内および直接肝実質内に注入したところ，盲腸同所再建において転移をきたした4株においてのみ肝転移または肝臓内での腫瘍増殖がみられたことから，ヒト大腸癌株の転移の成立の可否を決定する因子には肝臓内における腫瘍細胞の増殖能が大きく関わっていることを明らかにした．今後は転移株と非転移株との間にどのような浸潤・転移に関わる因子の差があるか，肝内における腫瘍の増殖においてどのプロセスが重要であるかを究明することが急務と考えられる．

臨床において大腸癌肝転移に対する治療法は化学療法を含め数多く報告され施行されているが，進行癌に対する治療のみならず，肝転移予防の治療法も含めて，治療体系はまだ十分に確立されていない．今回われわれは原発巣および転移巣に対する薬剤感受性を同時に観察が可能であるとの利点を有する同所再建による肝転移モデルを用いて実験的免疫化学療法実験を施行した．

最近腫瘍の局在により抗癌剤感受性が異なる可能性があることが報告されている．われわれも従来より使用されてきたヌードマウス背部皮下移植系における

in vivo 抗癌剤感受性試験に加えて，同所再建・転移モデルを用いて腫瘍の薬剤感受性を評価することの重要性を報告してきた[4)5)]．今回の成績においても5-FU 90 mg/kg 単独投与群では原発巣のみに，OK-432単独投与群では肝転移の抑制のみがみられ，腫瘍の局在により各種薬剤の感受性が異なる可能性が示唆された．

今回の実験では腫瘍移植後7日目前後に薬剤を投与したが，この時期は盲腸に移植した腫瘍が生着し，局所における脈管侵襲が開始する時期である[3)]．したがって今回の実験結果より，5-FU は増殖した原発巣の腫瘍に対し抗腫瘍活性を示すのに対し，腫瘍細胞の肝への着床は抑制できず，一方，OK-432は原発巣の腫瘍に対し抗腫瘍活性を示さないものの，肝への着床を著明に抑制することが示唆された．すなわち転移過程の違いにより腫瘍細胞に対する薬剤の感受性が異なることが示唆された．病理組織学的検索において原発巣では治療群において治療効果を示す腫瘍の壊死像がみられたのに対し，肝転移巣では病理組織学的な相違がないことは上記の考察を支持する結果と考えられる．

また，5-FU と OK-432の併用群では原発巣と肝転移巣の両方に対し抗腫瘍活性が認められたため，腫瘍の局在による薬剤の感受性および転移プロセスの過程を考慮に入れることにより，併用療法の有効性が示唆された．

大腸癌肝転移に対する治療を確立するためには，転移プロセスの解明が必要不可欠である．臨床での環境にきわめて類似した盲腸同所再建による肝転移モデルは，今後の肝転移プロセスの解明，治療実験のモデルとして有用であると考えられた．

文　献

1) Furukawa T, Fu X, Kubota T et al: Nude mouse metastatic models of human stomach cancer constructed using orthotopic implantation of histologically intact tissue. Cancer Res 53 : 1204—1208, 1993
2) Kuo T, Kubota T, Watanabe M et al: Orthotopic reconstitution of human small-cell lung carcinoma after intravenous transplantation in SCID mice. Anticancer Res 12 : 1407—1410, 1992
3) Kuo T, Kubota T, Watanabe M et al: Early resection of primary orthotopically-growing human colon tumor in nude mouse prevents liver metastasis: Further evidence for patient-like hematogenous metastatic route. Anticancer Res 13 : 293—298, 1993
4) Kuo T, Kubota T, Nishibori H et al: Experimental cancer chemotherapy using a liver metastatic model of human colon cancer transplanted into the spleen of severe combined immunodeficient mice. J Surg Oncol 52 : 92—96, 1993
5) Kuo T, Kubota T, Watanabe M et al: Site-specific chemosensitivity of human small-cell lung carcinoma growing orthotopically compared to subcutaneously in SCID mice : The importance of orthotopic models to obtain relevant drug evaluation data. Anticancer Res 13 : 627—630, 1993

Liver Metastatic Model of Human Colon Cancer Constructed by Orthotopic Onplantation —A Suitable Model for Experimental Immunochemotherapy—

Tsong-Hong Kuo, Tetsuro Kubota, Masahiko Watanabe, Toshiharu Furukawa, Tatsuo Teramoto and Masaki Kitajima
Department of Surgrey, School of Medicine, Keio University

We have developed a liver metastatic model of human colon cancer constructed by orthotopic onplantation in nude mice. In this model, four human colon cancer strains developed liver metastases, whereas the other four did not, although extensive local growth and vessel invasion were observed in both groups. We also used this model for experimental immunochemotherapy with 5-fluorouracil (5-FU) and OK-432. 5-FU showed significant antitumor activity against the primary tumor, whereas OK-432 significantly prevented liver metastases, suggesting different chemosensitivity according to the locality of the growing tumors. Immunochemotherapy with both drugs was effective against both the primary tumor and liver metastases. This model would be useful for further study of the metastatic process and immunochemotherapy of colon cancer.

Reprint requests: Tetsuro Kubota Department of Surgery, School of Medicine, Keio University
35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 JAPAN