日消外会誌　30（11）：2169～2177，1997年

# 大腸癌肝高転移株の作製および生物学的特性の変化について

大阪市立大学第1外科，大阪市立十三市民病院外科*，大阪市立総合医療センター外科**
山田　靖哉　鄭　容錫　高塚　聡　有本　裕一
澤田　鉄二　仲田　文造　西口　幸雄　池原　照幸*
奥野　匡宥**　曽和　融生

ヒト大腸癌細胞株LMを用い，ヌードマウスの脾注，肝転移形成を3回および5回繰り返すことにより，細胞株LM-H3およびLM-H5を樹立した．LM-H3およびLM-H5はLMに比べて有意な肝転移能の増強を認め，電子顕微鏡による観察では，microvilliの増加を認めた．核DNA量および染色体数はLMに比べ，肝高転移株において減少した．培養上澄中のSLA産生量は，LMに比べ，LM-H3，LM-H5で，3倍および4.5倍の産生量を認め，Flow cytometryによる細胞表面のSLAの発現の検討でも，M.F.I.が，102.3±43.5，126.1±28.4，144.8±23.4と有意な増加を認めた．また，血管内皮細胞への接着性もLMに比べ，肝高転移株において有意に増加した．以上の結果から，このように肝転移形成を繰り返すことにより，LM細胞の肝転移能は増強し，また肝高転移株は親株とは異なったさまざまな特性を有すると考えられた．

**Key words：** colon cancer，liver metastasis，microvilli，chromosome number，sialyl Lewis A

## はじめに

癌の転移の過程は，癌細胞の原発巣からの遊離と周囲臓器への浸潤から始まり，標的臓器への生着，増殖といった複雑な過程が必要である．Fidler[1]がB16メラノーマ細胞を用いて肺高転移株を樹立して以来，癌細胞の高転移株と低転移株の間で種々の生物学的特性を比較検討した多くの研究がなされてきた．

我々は以前に大腸癌肝転移症例の肝転移巣より組織を採取し，大腸癌細胞株OCUC-LM1（以下，LM）を樹立しその性状を検討するとともに，LM細胞を用いた肝転移モデルの作製に成功し報告した[2]．そこで今回はその肝転移モデルを用いてヌードマウス肝高転移株の樹立を行い，親株と肝高転移株における生物学的特性の相違について様々な角度から比較検討し，親株と肝高転移株の間にいくつかの相違点があることが明らかになったので報告する．

## 材料および方法

1．肝高転移株の樹立

大腸癌細胞株であるLM細胞を用いてヌードマウス肝高転移株の樹立を試みた．LM細胞を$1.0\times10^7$ cells/mlに調整後，4匹のヌードマウスの脾臓に0.1 mlずつ注入する．4週後に形成された肝転移結節を無菌的に採取し，培養系に移した後，再び同様の方法で脾臓に注入する．この操作を3回および5回繰り返して樹立した細胞株をそれぞれLM-H3，LM-H5とし実験に用いた．

2．親株および肝高転移株における特性の検討

1）形態学的検討

a．位相差顕微鏡像

位相差顕微鏡（Nikon TMD）にて，継代培養中の細胞をそのまま観察した．

b．電子顕微鏡像

検体を1,000rpmで5分間遠沈して得た沈渣をphosphate-buffered saline（PBS）にて洗浄し，沈渣を3％グルタルアルデヒド溶液にて4°C，15分間固定．脱イオン水にて洗浄後，2％オスミウム酸溶液にて4°C，20分間固定．再び，脱イオン水にて洗浄後，アルコール系列で脱水し，酸化プロピレン，Epon包埋液により置換してから重合させ包埋した．包埋後トリミングし，薄切してから酢酸ウラン，クエン酸鉛で二重染色を行い，それを試料として電子顕微鏡（JEOL 1200 X，Tokyo，Japan）にて観察した．

2）倍加時間の測定

株細胞の倍加時間は重複培養法により算出した[3]．すなわち，培養液で$1.0\times10^5$cells/mlに調整した細胞

＜1997年6月11日受理＞別刷請求先：山田　靖哉
〒545　大阪市阿倍野区旭町1－5－7　大阪市立大学医学部第1外科

浮遊液を35mmのdishに2mlずつ分注し，37℃，5％$CO_2$の条件で$CO_2$ incubatorで培養し，6～12時間ごとに細胞数をcoulter counter (Coulter electronics Ltd.)で計測した．その測定値より増殖曲線を求め，その対数増殖期の倍加時間を株細胞の倍加時間とした．

3）染色体分析

培養細胞を最終濃度0.01μg/mlコルセミド添加培地で3時間培養．0.25％トリプシンで細胞を浮遊させ，13分間0.075M KCLで低張処理後，カルノア液で固定．0.25％トリプシン処理後，Giemsa染色によるG-band核型分析を行った[4]．1,000倍にて観察するとともに，20個の細胞の染色体を数え染色体モードとした．

4）DNA ploidy pattern

培養細胞をFlow cytometry (FACScan, Beckton-Dickinson社，USA)により5,000～10,000個の細胞の核DNA量を測定し，DNA ploidy pattern, DNA indexの検討を行った．コントロールとして正常ヒト末梢血リンパ球を用い，そのG1peakを2Cとした．

5）腫瘍関連抗原の測定

a．培養上澄中の腫瘍関連抗原の測定

培養液で$1.0\times10^5$cells/mlに調整した培養細胞を5日間培養し，その上澄を試料として，sialyl Lewis X (SLX)[5]，sialyl Lewis A (SLA)[6]，CEA[7]の濃度をradioimmunoassay法を用いて測定した．抗体はそれぞれ，FH-6 (Otsuka Assay Laboratories, Tokushima)，NS19-9 (Fuji-Rebio)，CEA010 (Mochida Pharmaceutical Co, Ltd., Tokyo)の3種のモノクロナール抗体を用いた．

b．Flow cytometryによる糖鎖抗原の測定

実際の細胞表面でのSLX，SLAの発現の変化を検討するため，Flow cytometryを用いて測定した．$1.0\times10^6$cells/mlに調整したLM, LM-H3, LM-H5細胞に1.0μg/mlの濃度に調整した1次抗体（FH-6, NS19-9）を室温にて30分間反応させた．その後，PBSで2回洗浄．次に，2次抗体として10μg/mlの濃度に調整したFITC標識抗マウスIgMまたはIgG抗体を室温にて30分間反応させた．PBSで2回洗浄後，Flow cytometer (EPICS-C, Coulter electronics Ltd.)にて陽性細胞の割合，Peak ChannelおよびM.F.I. (Mean Fluorescence Intensity，平均蛍光強度）を測定した．

6）血管内皮細胞への接着性

LM, LM-H3, LM-H5細胞の血管内皮細胞への接着性の変化を検討するために，HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, Kurabou, Osaka)を用いて接着実験を行った．96-well microplateにHUVECsを単層培養し，rIL1-β (recombinant Interleukin 1-β, Otsuka Assay Laboratories, Tokushima）にて活性化した後，$1.8\times10^5$cells/180μl/wellの濃度に調整したLM, LM-H3, LM-H5細胞をそれぞれ添加し，30分間振盪培養した．培養後，PBSで各wellを静かに洗浄し，血管内皮細胞に接着した細胞をMTT法を用いて測定した．

7）サイトカインおよび増殖因子の測定

培養液で$1.0\times10^5$cells/mlに調整した培養細胞を5日間培養し，その上澄を試料として，Interleukin 1-β (IL1-β)，Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α)，Interferon-γ (INF-γ)，Hepatocyte Growth Factor (HGF)，basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)の濃度を測定した．それぞれの測定には，メドジェニックスIL-1β IRMAキット（トーレ・フジバイオニクス，東京)，TNF-α測定キット（大塚製薬，東京)，ヒトINF-γ IRMAキット（トーレ・フジバイオニクス，東京)，HGF「オーツカ」ELISAキット（大塚製薬，東京）を用いて行った．

統計学的検討はStudent's t testを用いて行い，$p<0.01$を有意差ありとした．

## 結　果

1．肝高転移株の樹立と肝転移能の比較

LM細胞をヌードマウスの脾臓に注入したところ，4匹中2匹のヌードマウスに肝転移を認めたのに対して，LM-H3, LM-H5では4匹すべてのマウスに肝転移を認めた．また，LMでは肝転移を認めた2匹のマウスの肝転移結節数は，69個，178個であったのに対して，LM-H3, LM-H5では肝転移結節数は無数であり計測できなかった．また，LM, LM-H3, LM-H5の肝重量(g)は，それぞれ1.64±0.30, 4.48±0.47, 5.01±0.68とLMに比べてLM-H3, LM-H5において有意（$p<0.05$）な増加を認めた．

2．親株および肝高転移株における特性の検討

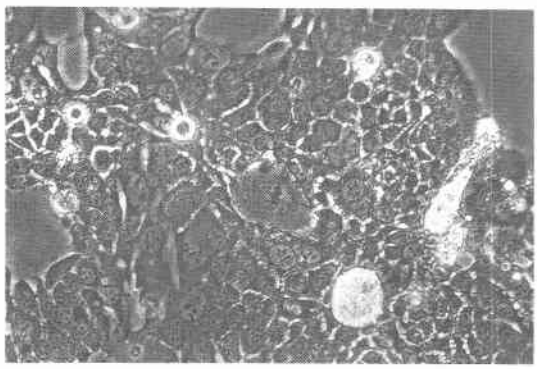
1）形態学的検討

位相差顕微鏡による観察では，LM, LM-H3, LM-H5いずれも単層で敷石状配列を示し，細胞核は大型で異型性が強く，形態学的な差は認めなかった(**Fig. 1**)．電子顕微鏡による観察では，LMに比べてLM-H3, LM-H5においてmicrovlliが増加しており，空胞，ライソゾームの増加も認めた（**Fig. 2**)．

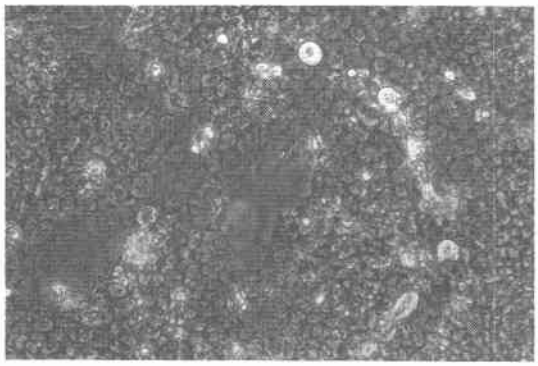
2）倍加時間の測定

**Fig. 1** Phase-contrast photomicrograph of LM (A), LM-H3 (B) and LM-H5 (C).

(A)



(B)



(C)

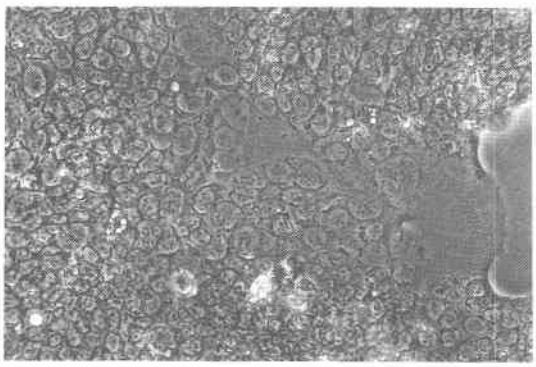
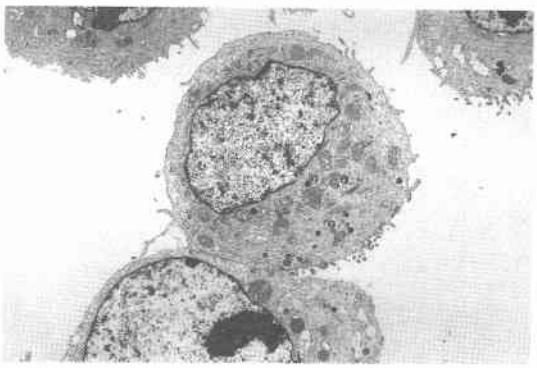
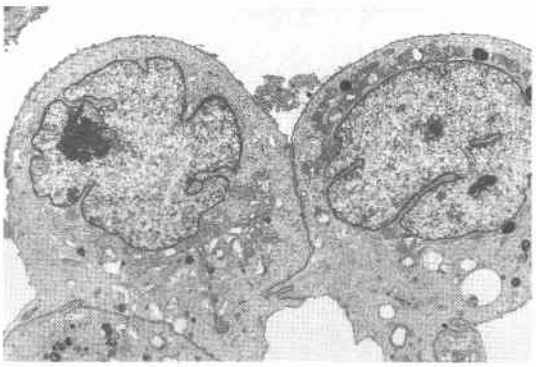


**Fig. 2** Electron micrograph of LM (A), LM-H3 (B) and LM-H5 (C).

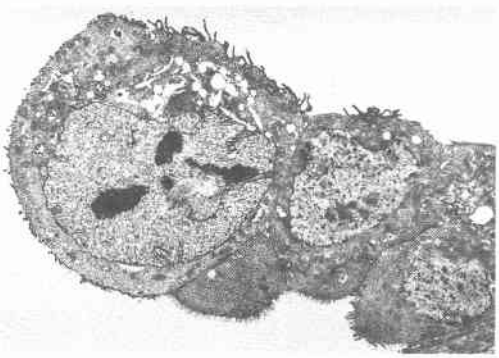
(A)



(B)



(C)



LM, LM-H3, LM-H5の倍加時間はそれぞれ29.4, 23.8, 23.9時間とLMに比べてLM-H3, LM-H5において倍加時間の短縮を認めた（**Fig. 3**）.

3) 染色体分析およびDNA ploidy pattern

LM, LM-H3, LM-H5細胞の染色体数はそれぞれ, 68.7±2.8 (62〜76), 61.1±0.9 (59〜63), 61.6±0.8 (60〜63) であり, LMに比べてLM-H3, LM-H5において有意 ($p<0.001$) な減少を示した（**Fig. 4, 5**）. Flow cytometryにより核DNA量を測定した結果, DNA indexはLM, LM-H3, LM-H5において1.55, 1.47, 1.47であり, LMに比べてLM-H3, LM-H5

**Fig. 3** Growth curve for LM, LM-H3 and LM-H5. The population doubling time of LM was 29.4h; for LM-H3, 23.8h; for LM-H5, 23.9h.

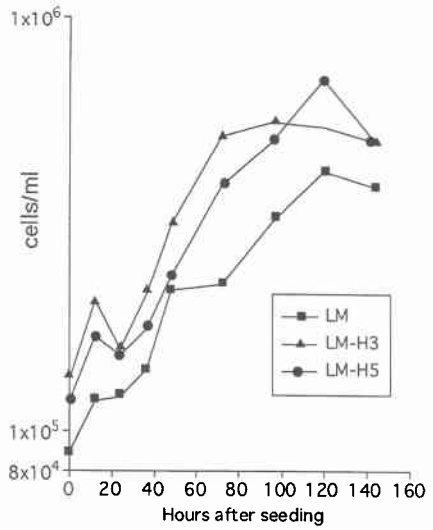



**Fig. 4** Comparison of chromosome number among LM, LM-H3 and LM-H5

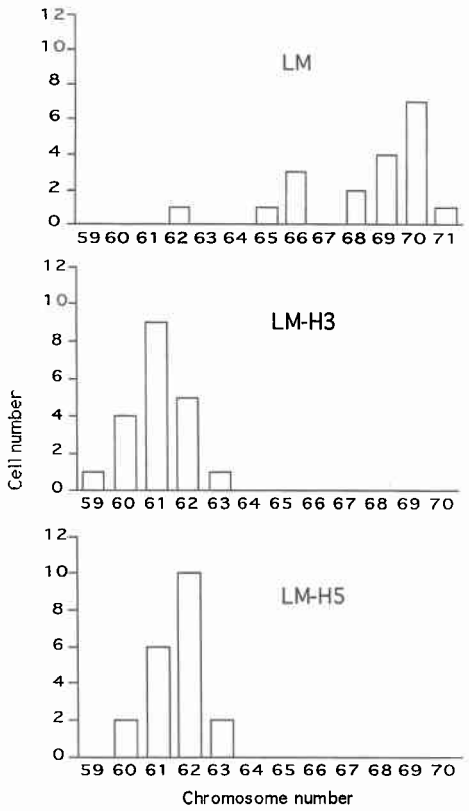
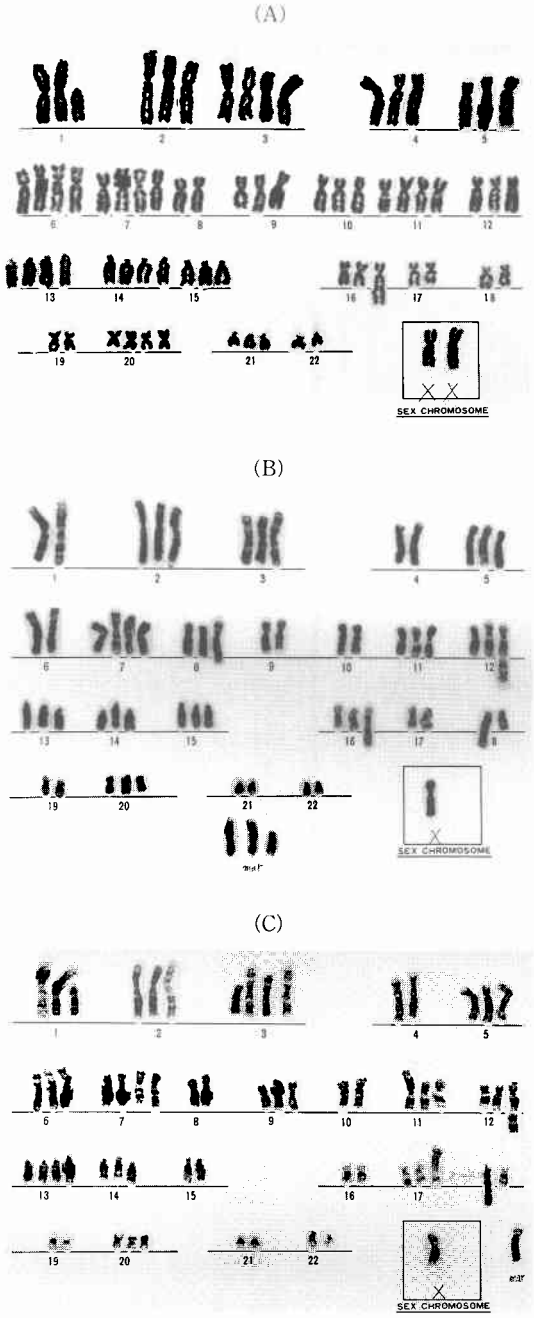



**Fig. 5** Karyotypes of LM (A), LM-H3 (B) and LM-H5 (C).



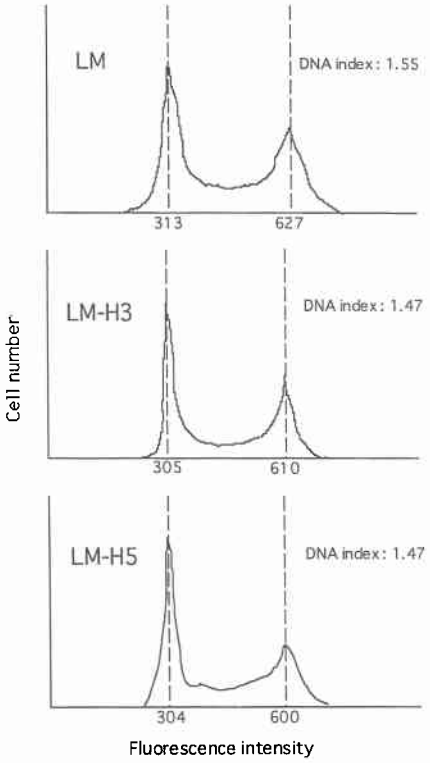

において核DNA量の減少を認めた（**Fig. 6**）.

4）腫瘍関連抗原の測定

a．培養上澄中の腫瘍関連抗原の測定

LMの培養上澄には，SLX，SLA，CEAのいずれの

**Fig. 6** Comparison of nuclear DNA contents between low metastatic cell lines and high metastatic cell lines.




産生も認めたが，SLX の産生量は軽度であり，SLA，CEA の産生量は高度であった．SLX の産生量は，LM，LM-H3，LM-H5においてそれぞれ，40，65，82（U/ml）と産生量は少ないが転移能を増すにつれ増加した．SLA の産生能は著明な増強を示し，SLA 産生量は，LM，LM-H3，LM-H5においてそれぞれ1,669，4,800，7,300（U/ml）と，LM-H3，LM-H5の産生量はそれぞれ LM の約2.9倍および約4.4倍の産生能を示した．一方，CEA の産生能には変化は認めず，CEA 産生量は，LM，LM-H3，LM-H5においてそれぞれ463，300，500（ng/ml）であった．

b．Flow cytometry による糖鎖抗原の測定

Flow cytometry によって SLX の発現を検討したところ，いずれの細胞においても明らかな発現は認めなかった．次に，SLA の発現を検討したところ，LM，LM-H3，LM-H5と passage を繰り返すことにより，Peak Channel はそれぞれ，113，126，146と右シフトした．また，M.F.I. もそれぞれ，102.3±43.5，126.1±28.4，144.8±23.4と有意（$p<0.001$）な増加を認めた（**Table 1**）．一方，SLA を発現している陽性細胞の割合は LM，LM-H3，LM-H5において97.5%，99.8%，99.7%と著明な差は認めなかった．

**Table 1** Flow cytometric analysis of SLA on the surface of LM, LM-H3 and LM-H5 cells

| | LM | LM-H3 | LM-H5 |
|---|---|---|---|
| Positive Rate(%) | 97.5 | 99.8 | 99.7 |
| Peak Channel | 113 | 126 | 146 |
| M.F.I. | 102.3±43.5 | 126.1±28.4 | 144.8±23.4 |

**Table 2** Cytokines and Growth factors in the spent media of LM, LM-H3 and LM-H5

| | LM | LM-H3 | LM-H5 |
|---|---|---|---|
| IL1$\beta$(pg/ml) | 67 | 47 | 50 |
| TNF$\alpha$(pg/ml) | <5 | <5 | <5 |
| INF$\gamma$(U/ml) | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| HGF(ng/ml) | <0.3 | <0.3 | <0.3 |
| bFGF(pg/ml) | 0 | 0 | 0 |

5）血管内皮細胞への接着性

活性化 HUVECs に対する LM，LM-H3，LM-H5細胞の接着性を検討したところ，それぞれの接着率(%)は21.8±1.3，42.9±2.8，39.8±2.3であった．LM に比較して LM-H3，LM-H5において有意（$p<0.001$）に接着率の増加を認めたが，LM-H3と LM-H5の間では接着率の差は認めなかった．

6）サイトカインおよび増殖因子の測定

LM，LM-H3，LM-H5の培養上澄には，いずれも IL1-$\beta$ の産生を認めたが，LM，LM-H3，LM-H5における IL1-$\beta$ の産生に差は認めなかった．一方，その他のサイトカインおよび増殖因子の産生は認めなかった（**Table 2**）．

## 考　察

今回，我々は当教室で樹立した大腸癌細胞株 OCUC-LM1を用いてヌードマウス肝高転移株の樹立を行い，親株と肝高転移株における生物学的特性の相違についてさまざまな角度から比較検討した．

まず形態学的な変化であるが，位相差顕微鏡による観察では，形態学的な差は認めなかったが，電子顕微鏡による観察では，肝高転移株において microvlli の増加を認めた．microvlli の役割については，肝転移巣における，血管内皮細胞との接着，浸潤に関与していると報告されており[8)~10)]，今回作製した肝高転移株に

おける microvlli の増加は，転移の接着，浸潤過程において重要な役割を果たしているものと推測された．

次に，転移能，増殖能，核DNA量および染色体数の変化について検討を行ったところ，親株に比べて，肝高転移株において，転移能および増殖能は増強されたが，逆に核DNA量および染色体数は減少した．1983年に Hedley ら[11]がパラフィン包埋標本からの核DNA量の解析法を報告して以来，癌の悪性度と核DNA量の関係について多くの報告がなされているが，癌の転移能と核DNA量の関係についての報告は少ない．Sandberg[12]は一般に転移巣の染色体数は原発巣に比べて増加していると報告しており，また Wake ら[13]は，肺，リンパ節への転移能を有するラット前立腺癌では，染色体数の増加や構造異常が多くみられたとしている．山口ら[14]は，大腸癌肝転移症例の原発巣と肝転移巣の核DNA ploidy pattern を比較したところ，80%の症例は原発巣と肝転移巣のDNA ploidy pattern は一致していたが，20%の症例は heterogeneity がみられ肝転移巣で aneuploidy が多い傾向にあったと報告している．実験的肝転移モデルを用いて親株と高転移株の核DNA量および染色体数の変化を検討した報告は少ないが，若杉[15]は KATO III 細胞を用いて肝高転移株を作成し親株と比較したところ，核DNA量が肝高転移株において有意に減少していたと報告している．また小松[16]は，Colon 26細胞を用いて肝高転移株を作成し親株と比較したところ，染色体数が肝高転移株において有意に減少していたと報告している．一般に癌の悪性度と核DNA量は正の相関関係を示すと考えられているが，今回の我々の検討では高転移株において核DNA量および染色体数が減少し，転移能と核DNA量および染色体数が負の相関関係を示した．今回の実験だけでは十分な説明はできないが，癌細胞が増殖するためには，あまりにも核DNA量が増加しすぎることは逆に不安定な状態となることが推測される．そして，それぞれの癌細胞の増殖，転移にとって，至適な核DNA量が存在し，癌細胞が高転移能を獲得する過程において，転移に適した核DNA量を保持する細胞が選択された結果，このような負の相関を示したのではないかと推測された．

次に，糖鎖抗原発現の変化であるが，親株である LM に比べて肝高転移株である LM-H3，LM-H5において SLA の発現の増強を認めた．癌化に伴い，癌細胞表面に種々の糖蛋白が発現，変化する[17][18]ことが知られている．とくに糖鎖構造の変化は近年のモノクローナル抗体による検討によって詳細に解明されており，これらの多くは癌の血中診断における腫瘍マーカーとして臨床的に応用されている．腫瘍マーカーとして用いられてきた糖鎖抗原のうち，癌細胞膜表面のある種の糖鎖抗原は癌の転移における接着分子として作用していることが判明してきた．SLX[19]~[22]および SLA[23]~[25]は，血管内皮細胞の ELAM-1の ligand として標的臓器における，癌細胞と血管内皮細胞の接着に関与していることが明らかとなった．SLX と SLA は同じラクトシリーズの糖鎖で，SLX はII型糖鎖，SLA はI型糖鎖に属し，いずれも末端のガラクトースにシアル酸が結合した構造をもつ構造異性体である．大腸癌組織における SLX，SLA の陽性率はそれぞれ 59～88.8%[26]~[28]，76～96.2%[28][29]と報告されている．

我々は以前に大腸癌肝転移症例において，同一患者により採取した原発巣および肝転移巣における SLA の発現を免疫組織化学的に比較検討したところ，肝転移巣において有意に SLA の発現の増加を認めた[30]．この結果より，原発巣において SLA を発現している細胞集団が選択され転移形成に関与した可能性が示唆された．今回の実験における flow cytometry による検討からは，肝高転移株における SLA 発現の増強は SLA を発現している細胞の割合が増加したのではなく，1つ1つの細胞における SLA の発現量が増加した結果と考えられた．これらのことから，原発巣において SLA を発現している細胞が選択されるのみならず，転移の過程において個々の細胞の SLA 産生能も増強していくものと考えられた．さらに，血管内皮細胞への接着実験において高転移株の接着性が増強しており，この高転移株における SLA の産生量の増加が，接着性の増強の1つの因子と推測された．一方，高転移株である LM-H3と LM-H5を比較すると SLA の発現は LM-H5において有意に増加していたが，血管内皮細胞への接着性に差は認めなかった．この理由として，1つには SLA の発現量は LM，LM-H3，LM-H5と段階的増加しているのだが，血管内皮細胞との接着性は LM-H3における SLA の発現量でプラトーとなり，LM-H3と LM-H5における接着性に差を認めなかった可能性が推測された．また，この接着において糖鎖抗原とセレクチン以外の接着分子が関与している可能性も考えられた．

最後に，血管内皮細胞の活性化あるいは増殖に関与しているサイトカインおよび増殖因子を測定したところ，血管内皮細胞の活性化作用を有する IL1-$\beta$ の産生

を認めた．癌細胞と血管内皮細胞の接着相互作用は，白血球と血管内皮細胞間にみられる接着分子群と類似していると考えられている．この接着は，セレクチンファミリー，免疫グロブリンスーパーファミリー，インテグリンファミリーなどによって，媒介される．例えば，炎症の局所では，IL-1，TNF，INF$\gamma$などのサイトカイン刺激により血管内皮細胞上にELAM-1，GMP-140，VCAM-1，ICAM-1などの接着分子が発現誘導される[31)32)]．次に，白血球はその表面に発現しているSLXと血管内皮細胞上に発現されたELAM-1やGMP-140と弱く接着することにより，内皮細胞上をローリングし，引き続き$\beta_2$インテグリン(LFA-1など)とICAM-1との強い接着に変わり，ローリングから血管内皮細胞の間隙を通り抜けると考えられている．このことから，癌細胞と血管内皮細胞の接着にも同様の機序が関与していると推測され，癌細胞と血管内皮細胞の接着の初期の段階の接着に癌細胞表面の糖鎖抗原と血管内皮細胞上のELAM-1の接着が重要であると考えられる[33)34)]．今回用いた細胞株の培養上澄にはいずれもIL1-$\beta$の産生を認め，癌細胞自身がサイトカインを分泌し，局所で血管内皮細胞を活性化させ，ELAM-1などの接着分子を発現させることにより，糖鎖抗原と血管内皮細胞の接着を誘導している可能性が示唆された．しかし，親株と肝高転移株との間でIL1-$\beta$の産生能に差はなく，今回の実験系における癌細胞と血管内皮細胞の接着性の増強には，おもにSLAの発現の増加が関与しているのではないかと考えられた．

今回，ヌードマウス肝転移モデルを用いて肝転移形成を繰り返すことにより，LM細胞の肝転移能は増強するとともに親株とは異なったさまざまな特性を有することが判明した．今後，差の認められた特性を中心にさらに詳細な検討を行っていきたい．

## 文　献


1) Fidler IJ: Selection of successive tumor lines for metastasis. Nature (New Biol) **242**: 148—149, 1973
2) 山田靖哉，鄭　容錫，小野田尚佳ほか：大腸癌肝転移巣に由来するヒト大腸癌細胞株OCUC-LM1の樹立と肝転移モデルの作製．日本大腸肛門病会誌 **47**: 40—47, 1994
3) Sanford KK, Earle WR, Evans VJ et al: The measurement of proliferation in tissue cultures by enumeration of cell nuclei. J Natl Cancer Inst **II**: 773—775, 1951
4) Seabright M: A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet **2**: 971—972, 1971
5) Fukushi Y, Kannagi R, Hakomori S et al: Location and distribution of difucoganglioside in normal and tumor tissues defined by its monoclonal antibody FH6. Cancer Res **45**: 3711—3717, 1985
6) Koprowski H, Steplewski Z, Mitchell L: Colorectal carcinoma antigens detected by hydridoma antibodies. Soma Cell Genet **5**: 957—972, 1979
7) Gold P, Freedman SO: Demonstration of tumor-specific antigens in human colon carcinoma by immunological tolerance and absorption techniques. J Exp Med **121**: 439—471, 1965
8) Dingemans KP, Roos E, Bergh WM et al: Invasion of liver tissue by tumor cells and leukocytes: Comparative ultrastructure. J Natl Cancer Inst **60**: 583—598, 1978
9) Roos E, Dingemans KP, Pavert I et al: Mammary-carcinoma cells in mouse liver: Infiltration of liver tissue and interaction with Kupper cells. Br J Cancer **38**: 88—99, 1978
10) Kawaguchi T, Endo M, Tobai S et al: Behavior pattern of rat ascites tumor cells arrested in liver sinusoids: An electron microscopic study. Gann **70**: 277—290, 1979
11) Hedley DW, Fliedlander ML, Tailor IW et al: Method for analysis of cellar DNA content of paraffin-embedded pathological material using flow cytometry. J Histochem Cytochem **31**: 1333, 1983
12) Sandberg AA: Chromosomes and cancers Edited by Sandberg AA. The Chromosomes in human cancer and leukemia. Amsterdam, Elesevier, Holland, 1980, p426—457
13) Wake N, Isaacs J, Sandberg AA: Chromosomal changes associated with progression of the Dunning R-3327 rat prostatic adenocarcinoma system. Cancer Res **42**: 4131—4142, 1982
14) 山口明夫，石田哲也，西村元一ほか：核DNAよりみた大腸癌肝転移例(FCMを用いた検討)．日外会誌 **91**: 1591—1595, 1990
15) 若杉純一：ヒト胃癌培養細胞株とこれを用いた実験的肝高転移株の生物学的特性．日外会誌 **91**: 959—966, 1990
16) 小松孝義：マウス大腸癌細胞株(Colon 26)の肝高転移細胞株とその生物学的特性．横浜医 **42**: 257—263, 1991
17) Hakomori S: Glycosphingolipids in cellular interaction, differentiation and oncogenesis. Annu Rev Biochem **50**: 733—764, 1981

18) Hakomori S, Kannagi R: Glycosphingolipids as tumor-associated and differentiation markers. J Natl Cancer Inst 71: 231—251, 1983
19) Lowe JB, Stoolman LM, Nair RP et al: ELAM-1-dependent cell adhesion to vascular endothelium determined by a transfected human fucosyltransferase cDNA. Cell 63: 475—484, 1990
20) Phillips ML, Nudelman E, Gaeta FCA et al: ELAM-1 mediates cell adhesion by recognitioin of a carbohydrate ligand, sialyl-Lex. Science 250: 1130—1132, 1990
21) Waiz G, Aruffo A, Kolanus W et al: Recognition by ELAM-1 of the sialyl-Le X determinant on myeloid and tumor cells. Science 2501132—1135, 1990
22) Tiemeyer M, Swiedler SJ, Ishihara M et al: Carbohydrate ligands for endothelial-leukocyte adhesion molecule 1. Proc Natl Acad Sci USA 88: 1138—1142, 1991
23) Takada A, Ohmori K, Takahashi N et al: Adhesion of human cancer cells to vascular endothelium mediated by a carbohydrate antigen, sialyl Lewis A. Biochem Biophys Res Commun 179: 713—719, 1991
24) Berg EL, Robinson MK, Mansson O et al: A carbohydrate domain common to both sialyl Lewis$^a$ and sialyl Lewis$^x$ is recognaized by the endothelial cell leukocyte adhesion molecule ELAM-1. J Biol Chem 266: 14869—14872, 1991
25) Tyrrell D, James P, Rao N et al: Structual requirement for the carbohydrate ligand of E-selectin. Proc Natl Acad Sci USA 88: 10372—10376, 1991
26) Atkinson BF, Ernst CS, Herly M et al: Gastrointestinalcancer-associated antigen in immunoperoxidase assay. Cancer Res 42: 4820—4823, 1982
27) Gong E, Hiroshima S, Shimano Y et al: Expression of carbohydrate antigen 19-9 and stage-specific embryonic antigen 1 in nontumorous and tumorous epithelia of the human colon and rectum. J Natl Cancer Inst 75: 447—454, 1985
28) 五十嵐潔：大腸癌における糖鎖抗原SLXおよびSLAの血清学的，免疫組織化学的検討．日本大腸肛門病会誌　38：625—632，1985
29) Itzkowtz SH, Yuan M, Fukushi Y et al: Lewis X and sialylated Lewis X related antigen expression in human malignant and nonmalignant colonic tissues. Cancer Res 46: 2627—2632, 1986
30) Yamada N, Chung YS, Maeda K et al: Increased expression Sialyl Lewis A and Sialyl Lewis X in liver metastases of human colorectal carcinomas. Invasion Metastasis 15: 95—102, 1995
31) Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL et al: Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. Proc Natl Acad Sci USA 84: 9238—9242, 1987
32) Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA et al: Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. Science 243: 1160—1165, 1989
33) Dejana E, Bertocchi F, Bortolami MC et al: Interleukin 1 promotes tumor cell adhesion to cultured human endothelial cells. J Clin Invest 82: 1466—1470, 1988
34) Dejana E, Martin-Padure I, Lauri D et al: Endothelial leukocyte adhesion molecule-1-dependent adhesion of colon carcinoma cells to vascular endothelium is inhibited by an antibody to Lewis fucosylated type I carbohydrate chain. Lab Invest 66: 324—330, 1992

## Establishment and Characterization of Highly Liver Metastatic Cell Lines Derived from a Human Colon Cancer Cell Line

Nobuya Yamada, Yong-Suk Chung, Satoshi Takatsuka, Yuichi Arimoto, Tetsuji Sawada, Bunzou Nakata, Yukio Nishiguchi, Teruyuki Ikehara*, Masahiro Okuno** and Michio Sowa
First Department of Surgery, Osaka City University Medical School
*Department of Surgery, Juso Municipal Hospital
**Department of Surgery, Osaka City General Medical Center

OCUC-LM1 (LM) was injected into the spleen of nude mice was repeated three and five times, and the daughter cell lines were designated as LM-H3 and LM-H5, respectively. LM-H3 and LM-H5 showed

a greater potential for liver metastasis than LM. Electron microscopically, the numbers of microvilli on the surface of LM-H3 and LM-H5 were greater than LM. Nuclear DNA content and chromosome numbers of LM-H3 and LM-H5 were less than those of LM. The levels of sialyl Lewis A (SLA) in the supernatant of LM-H3 and LM-H5 were 3 and 4.5 times higher, respectively than that of LM. Flow cytometric analysis of SLA expression revealed that the peak channel for LM was 113; for LM-H3, 126; and for LM-H5, 146. The mean fluorescence intensity of LM was 102.3 ± 43.5; of LM-H3, 126.2 ± 28.4; and of LM-H5, 144.8 ± 23.4. In endothelial cell adhesion assays, the percentages of adherent LM-H3 and LM-H5 cells were significantly higher than for LM. In conclusion, through repeated hepatic metastasis, LM cells became more easily metastasized to the liver and showed some different characteristics from those of the original cells.

**Reprint requests:** Nobuya Yamada The First Department of Surgery, Osaka City University Medical School
1-5-7 Asahi-machi, Abeno-ku, Osaka, 545 JAPAN