

## マウス実験肝転移モデルの作成

市立長浜病院外科（指導：戸部隆吉教授）

伴 貞 興

〔原稿受付：平成3年10月7日〕

### Experimental Model of Liver Metastases of the Mouse

SADAOKI BAN

The Department of Surgery, Nagahama City Hospital

3 syngeneic tumor-mouse systems were used to establish experimental model of liver metastasis. Only one system, SC42-DS, was suitable for the purpose.

When  $2 \times 10^5$  SC42 tumor cells was injected into the spleen of DS mouse and splenectomy was done after 24 hours preventing of spleen tumor due to inplantation, multiple nodular liver metastasis were observed in all mice after 14 days. The numbers of nodulus were well correlated with the liver weight.

#### はじめに

癌の臓器転移は、担癌患者の予後を左右する最も重要な因子の一つである。一方で、癌に対する外科療法が臓器転移の誘因となりうる可能性も否定できない。したがって、臓器転移の予防を考慮した方法論を外科療法に組み込むこと、即ち、手術周期療法についての検討は、外科医にとっての義務であろうと思われる。その検討の為には、syngeneic な系での臓器転移モデルが要求される。今回、我々は3つの腫瘍系について、肝転移のモデル作成を試み、DS マウス—SC42 の系で、その作成に成功したので報告する。

#### 材料と方法

##### (1) 腫瘍系

実験動物として、6-8週令の Balb/c 雄マウス（塩

野義油日研究所）を使用した。腫瘍系として、それぞれのマウスに syngeneic な系である MOPC104E, MH-134, SC-42 を用いた。MOPC104E は、Balb/c マウスの腹腔内で継代し、継代後10-14日目に、MH-134 は C3H/He マウスの腹腔内で継代し、継代後7-10日目にそれぞれ回収し、Hanks 液で2回洗浄後 RPMI1640 液に生細胞で、必要な細胞濃度に調整し実験に供した。SC-42 は DS マウスの自然発生乳癌由来であるが、DS マウスの皮下移植により継代し、移植後3週目の皮下腫瘍を切除、ハサミにて約1mm角片とし、0.125%トリブシンで20分間処理後、赤血球や粘液の多い上清液を棄てた後に、0.25%トリブシンにて、37°C で40分間再処理して細胞浮遊液を作成し、#100 メッシュを通過せしめた後に、4°C にて Hanks 液で3回洗浄し、RPMI1640 液に生細胞で必要な細胞濃度に調整実験に供した。

Key words: Mouse, Experimental model, liver metastasis, SC42.

索引語：マウス，実験モデル，肝転移，Shionogi carcinoma 42.

Present address: Department of Surgery Nagahama City Hospital, Yahatahironishi, Nagahama 526.

(2) 肝腫瘍の作成

転移性肝癌の作成方法としては、肝内直接穿刺法及び脾内注入法の2法について検討した。一連の実験において、エーテル麻酔を使用した。肝内直接注入の為には、剣状突起下に1cm位の皮膚切開をおいて、腹膜を開き、両側腹部を用指的にはさんで、肝臓を腹腔外に露出させて腫瘍細胞を注入した。又、脾髄質内投与の為に、マウス左背部斜切開をおき、開胸にならぬように腹腔内に達した。必要な腫瘍細胞はRPMI1640 0.02 ml 浮遊して肝実質内に直接注入あるいは脾髄質内に注入した。摘脾は種々の時期に行なった。又、脾髄質内に注入する時脾実質内に注入しないように注意した。

(3) 肝腫瘍の数量化

肝転移の個数評価は、肝表面の転移結節数及び肝重量の計測で、その数量化を行なった。

結 果

(1) 肝直接穿刺法による肝腫瘍の作成

2×10<sup>5</sup> ケの各腫瘍細胞を、肝内に直接注入したと

ころ100%肝内生着を見たのは、SC-42 のみであり、更に、MH134, MOPC では癌性腹膜炎の出現が高頻度に観察された (Table 1).

(2) 脾内注入法による肝腫瘍の作成法

同様に 2×10<sup>5</sup> の各腫瘍細胞を脾髄質内に注入し、2週間後に再開腹して観察すると、MH134, MOPC の系では、肝直接穿刺注入の場合と同様、高頻度に癌性腹膜炎が出現し、かつ MOPC では脾転移巣も出現した。一方 SC42 の系では、確実に肝転移巣が出現し、又、脾注入部での、巨大な脾腫瘍も形成された (Table 2). そこで、脾髄質内注入後3日目脾摘を追加し14日目に再開腹して観察すると、MH134・MOPC では、Table 2 と同様の結果が得られたのに対し、SC-42 の系では全例に転移性肝癌が出現し、癌性腹膜炎・脾腫瘍は全く観察されなかった。そこで、DS-SC42 の系について、注入細胞数による肝腫瘍の出現頻度を、注入後16日目に観察すると、1×10<sup>4</sup> ケの注入細胞数の場合、肝腫瘍を形成しない場合があり、3.3×10<sup>4</sup> ケ以上の SC-42 細胞の注入によって注入細胞数の増加にしたがって肝転移数も増加した。更に、注

Table 1 Development of liver metastases after intrahepatic injection of 2×10<sup>5</sup> tumor cells.

| tumor | liver dep. | peritonitis | intrahepatic met. |
|-------|------------|-------------|-------------------|
| MH134 | 2/5        | 5/5         | 0/5               |
| MOPC  | 3/5        | 3/5         | 2/5               |
| SC-42 | 4/4        | 0/4         | 3/4               |

Table 2 Variety of tumor growth after intrasplenic injection of 2×10<sup>5</sup> tumor cells.

| tumor | liver met. | peritonitis | panc. tumor | spl. tumor |
|-------|------------|-------------|-------------|------------|
| MH134 | —          | +++         | —           | +          |
| MOPC  | —          | +++         | +++         | ±          |
| SC-42 | +++        | —           | —           | +++        |

Table 3 Development of liver metastases after intrasplenic injection of  $2 \times 10^5$  tumor cells and splenectomy on the 3rd day (Evaluation was done on the 14th day.).

| tumor | liver met. | peritonitis | panc met. |
|-------|------------|-------------|-----------|
| MH134 | 0/10       | 8/10        | 0/10      |
| MOPC  | 0/9        | 9/9         | 9/9       |
| SC-42 | 8/8        | 0/8         | 0/8       |

Table 4 Development of liver metastases after intrasplenic injection of SC-42.

| number             | splenectomy | day of evaluation | mean | liver met. |         |
|--------------------|-------------|-------------------|------|------------|---------|
|                    |             |                   |      | ± SD       | range   |
| $10^4$             | (-)         | 16                | 6.5  | 5.9        | 0 - 16  |
| $3.3 \times 10^4$  | (-)         | 16                | 17.8 | 11.3       | 3 - 34  |
| $10^5$             | (-)         | 16                | 35.6 | 16.2       | 22 - 66 |
| $10^6$             | (-)         | 16                | 51.8 | 14.5       | 28 - 66 |
| each group ; n = 6 |             |                   |      |            |         |
| $2 \times 10^5$    | 1 hour      | 14                | 10   | 6.5        | 0 - 20  |
| $2 \times 10^5$    | 1st day     | 14                | 13.2 | 7.2        | 8 - 27  |
| $2 \times 10^5$    | 3rd day     | 14                | 22.6 | 10.9       | 12 - 41 |
| each group ; n = 5 |             |                   |      |            |         |

入細胞数を、 $2 \times 10^5$  ケに固定し、注入後1時間、1日後あるいは3日後に摘脾を行なって、摘脾の時期についても検討すると、1時間後摘脾の場合、肝転移巣を見ない例が出現した。

(3) 肝表面結節数と肝重量

Table 4 の (2) における肝転移巣と肝重量とは、Fig. 1 に示すようによく相関し、相関係数  $r=0.8409$  であった。1時間後・1日後・3日後の各の相関係数は  $r_1=0.66421$   $r_2=0.81687$   $r_3=0.84932$  であった。

考 案

マウスにおける肝転移モデルは、ラットに比してその作成が困難であるが、同系腫瘍を得られやすいことから、免疫学的検索に有利であり、又、統計処理を in vivo で容易ならしめる事から、肝転移の予防ある

いは治療の実験的研究に必要である。

肝転移モデルは、例えば、癌性腹水症などの介在し得る腫瘍局在を除外した肝単一の転移巣であることがまず要求される。

今回 MOPC, MH134, SC-42 の3つの腫瘍系で肝転移モデルの作成を試みた。

はじめに、肝内直接注入法で、SC-42 が確実に肝内着床を得る腫瘍系であることを確認し、次いで、より臨床に近似したモデルとする目的で経門脈的肝転移の作成を試みた。

門脈直接穿刺による腫瘍細胞注入は技術的な困難を伴うこと、出現する肝転移にバラツキが生じる事から脾内注入法を用いて検討した。

一連の実験結果からすると、MH134, MOPC, の腫瘍系では、用いた注入細胞数では肝転移巣を形成せず。

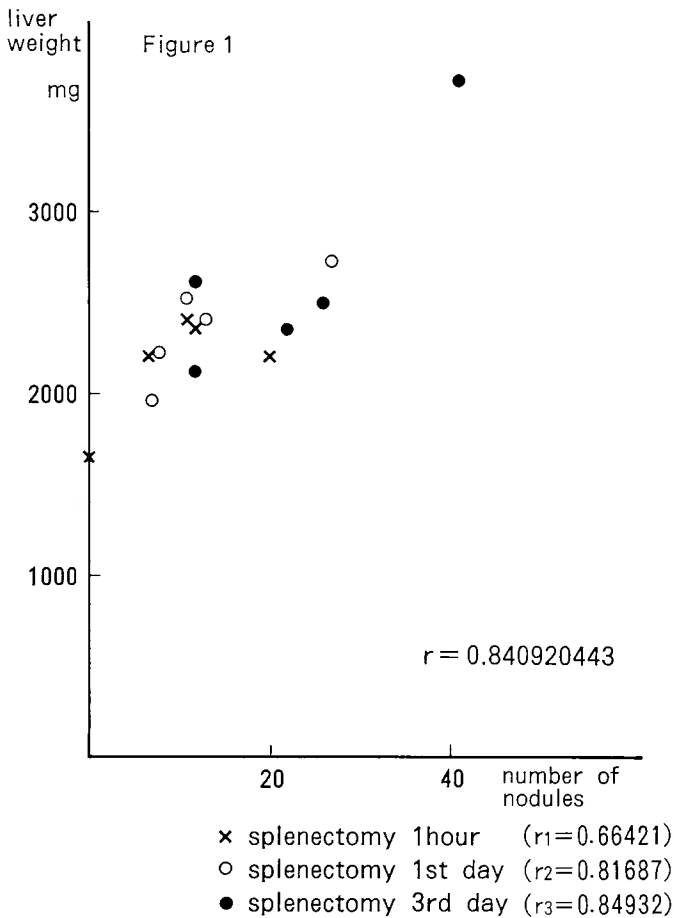


Fig. 1

また、腹水型腫瘍であることから、癌性腹水の出現が高頻度に見られ、肝単一の転移巣作成という本研究の目的には、不適格な腫瘍系である。

興味ある事は MOPC の脾内注入においては脾腫瘍が出現することであり、本腫瘍系は注入技術の工夫、あるいは MOPC のクローニングを行なうことによって癌性腹水の合併を防止できれば、脾腫瘍の実験モデルとして成立する可能性がある。

一方、SC-42 では、肝転移巣の出現は100%に見られるが、注入部である脾での腫瘍形成が高頻度に見られ、その破裂出血死による動物死が観察された。したがって、腫瘍細胞注入後の摘脾の併用は、本研究の目的を達成する為に必須であると判断されたので、L. Kopper 等の方法に準じて摘脾を行なうこととし、又、

その時期についても検討した。

実験結果に示されるように、SC-42 の注入細胞数は  $10^5$ – $10^6$  ケが必要である。又、脾内注入後1時間の脾摘例では肝転移巣の形成の見られない例が出現すること、1日後、3日後の摘脾では、時間依存性に肝転移が増加することから、脾内注入は直接門脈内注入法とは異なって、一端脾内に貯留した腫瘍細胞が徐々に肝に流入し肝転移巣を形成するものとおもわれる。摘脾の時期については、肝転移巣の評価をその結節数で行なう場合の簡便さから、SC-42 の系については1日後の摘脾が妥当と判断される。W. Schulz 等のヒトの肝転移に関する報告にみられるように、肝転移結節数と肝重量とは一般によく相関すると思われ、本研究の結果も同様であるが、1日後、3日後摘脾を比較すると

各々の相関係数はほぼ同じであるが、1日後摘脾の方がバラツキが少ない。

したがって筆者は、DS-SC42 の腫瘍系を用いての肝転移モデルを作成するについて、その脾内注入細胞数を  $2 \times 10^5$  とし、1日後に摘脾を行なうこととしたのである。

当然の事として摘脾は実験モデルとしていくつかの不利を生ずる。例えば、摘脾が腫瘍増殖に及ぼす影響を無視出来ないし、又、この腫瘍モデルを用いての免疫学的検討には、脾細胞を利用することができない。

しかしながら、肝単一病巣であることは、肝転移モデルとしては、最も重要な要素であって、本腫瘍系の薬剤の phase 1 study への利用、あるいは、腫瘍細胞の注入、摘脾を手術侵襲と考えると、この肝転移モデル作成の課程そのものを利用して手術周期治療 (perioperative therapy) のあり方についての実験検討も可能であると思われる。

## Reference

- 1) Kopper L, Van Hanh T, et al: Experimental model for liver metastasis formation using lewis lung tumor. *J Cancer Res Clin Oncol* **103**: 31-38, 1982.
- 2) Hougen HP, Hansen F, et al: Kinetics of small lymphocytes in normal and nude mice after splenectomy. *Scand J Haematol* **18**: 257-266, 1977.
- 3) Norman B. Ackerman, Lien WM, et al: The blood supply of experimental liver metastases. The distribution of hepatic artery and portal vein blood to "small" and "large" tumors. *Surgery* **66** (6): 1067-1072, 1969.
- 4) Schultz W, Hort W: The distribution of metastases in the liver; A quantitative postmortem study. *Virchow Arch [Pathol Anat]* **394**: 89-96, 1981.
- 5) Gabizon A, Goren D, et al: Enhancement of adriamycin delivery to liver metastatic cells with increased tumoricidal effect using liposomes as drug carriers. *Cancer Research* **43**: 4730-4735, 1983.
- 6) 児玉佑壮: 高転移性 MCA 肉腫細胞系の誘導とその転移—肝転移を中心に—, *オンコロジヤ* vol.1 No 3 175-176, 1982.