

ヒト肺癌転移リンパ節に対する研究用動物モデルの作製

水谷栄基¹・井上秀範¹・松原寛知¹・神谷健太郎¹・
喜納五月¹・桜井裕幸¹・奥脇英人¹・松本雅彦¹

要旨 **目的**．肺癌診療における予後予想因子として、リンパ節への転移状況は大きなウエートを占める．リンパ行性転移に対する研究及び転移リンパ節に対する治療の研究に焦点を合わせたより有用な実験動物モデルの開発を試みた．**方法**．雄ヌードラットを使用し、放射線照射後にヒト肺扁平上皮癌細胞 RERF-LC-AI を足背部に皮下注射した．鼠径部に腫瘤が触知出来た時点で転移有りと判断した．その2週間後にラットを屠殺し、膝窩部及び鼠径部リンパ節への転移について組織学的に検討した．**結果**．触診にて転移と判断するまでに要した日数は、 41.1 ± 4.1 日 ($n = 20$) であった．膝窩部リンパ節への転移は 100% ($n = 20$) であった．全例で、膝窩部リンパ節においては腫瘍細胞が皮質・髄質を侵し、リンパ節の 1/2 以上を占めていた．鼠径部リンパ節転移は 95.0% ($n = 20$) に確認出来、早期に採取した 1 例を除いて腫瘍細胞がリンパ節の 1/2 以上を占めていた．**結論**．我々は、ヒト肺癌細胞をヌードラット足背部へ移植し、膝窩部及び鼠径部への転移一次・二次リンパ節モデルを作製した．腫瘍の生着・転移は高率に起こり、その触診による転移の予測も簡便・正確であった．(肺癌．2004;44:767-771)

索引用語 リンパ節転移モデル、ヒト肺癌、RERF-LC-AI、ヌードラット

Refinement of an Animal Model for Research on Metastatic Lymph Nodes of Human Lung Cancer

Eiki Mizutani¹; Hidenori Inoue¹; Hirochika Matsubara¹; Kentaro Kamiya¹;
Satsuki Kina¹; Hiroyuki Sakurai¹; Hideto Okuwaki¹; Masahiko Matsumoto¹

ABSTRACT **Objective.** The staging of lymph node metastasis is an important factor affecting the treatment and prognosis of human lung cancer. As an aid for research on lymph node metastasis and remedy for metastatic lymph nodes, we tried to devise a more useful animal model. **Methods.** RERF-LC-AI (human lung squamous cell carcinoma) cells were injected subcutaneously into the foot pad of male nude rats after the animals had been irradiated. We considered their inguinal lymph nodes to contain metastases when the nodes became palpable through the skin surface. Two weeks later, the rats were sacrificed and their popliteal and inguinal lymph nodes were removed for histological examination. **Results.** The time required for metastatic lymph nodes to become palpable was 41.1 ± 4.1 days ($n = 20$). Metastasis to popliteal lymph nodes was found in 100% of cases ($n = 20$) and histopathological study showed invasion of the tumor cells into the cortex and medulla, occupying over one half of the node. Metastasis to inguinal lymph nodes was confirmed in 95.0% of the cases ($n = 20$). Histopathological study showed that tumor cells occupied over one half of the node in all cases, except in one rat that was sacrificed at an early point. **Conclusions.** We conclude that the present model of primary and secondary lymph node metastasis, involving subcutaneous implantation of human lung cancer cells in the foot pad of nude rats, is useful for producing popliteal and inguinal lymph node metastases. Metastasis of the

¹山梨大学第二外科学教室．

別刷請求先：水谷栄基，山梨大学第二外科学教室，〒409-3898 山梨県中巨摩郡玉穂町下河東 1110 番地 (e-mail: eikim@yamanashi.ac.jp)．

¹Second Department of Surgery, Yamanashi University of Medicine, Japan.

Reprints: Eiki Mizutani, Second Department of Surgery, Yamanashi University of Medicine, 1110 Shimokato, Tamaho-cho, Nakakoma-gun, Yamanashi 409-3898, Japan (e-mail: eikim@yamanashi.ac.jp)

Received July 8, 2004; accepted November 1, 2004.

© 2004 The Japan Lung Cancer Society

tumor cells occurred at a high rate, and the determination of metastasis was easy and accurate(*JJLC*. 2004;44:767-771)

KEY WORDS Lymphatic metastasis model, Human lung cancer, RERF-LC-AI, Nude rat

はじめに

近年 肺癌の診断・治療が飛躍的に進歩して来ている。特に高性能 CT 検査の発達により早期診断が可能となり、転移のない状態で発見することにより良好な治療成績が得られるようになって来ている。しかしながら、既に肺癌が進行した状態で発見されることも少なからず有り、これらの患者に対する治療はいまだ満足出来る成績とはいえない。肺癌診療において予後予想因子として最も重要視されるのは、病期進行度である。病期のステージ分類ではリンパ節の転移状況が大きなウエートを占める。リンパ節転移の有無や、転移が有る場合に局所リンパ節で留まるか、縦隔リンパ節まで侵されているかにより予後が明らかに異なることが報告されている。今後、肺癌診療において予後を改善するためには、リンパ節転移の機序や治療の研究が不可欠になって来ると考えられる。

癌の転移機構は徐々に解明されつつあるが、今までは動物の癌細胞を移植する同種移植モデルによるものが主流であった。近年、実験動物でのヒト癌細胞の異種移植による生物学的研究が進み、癌転移モデルもいくつか開発されつつある。ヒト肺癌においては、異所性移植では生物学的特性が微細に変化する可能性も考えられ、同所性移植によるモデルの研究が進み、海外でもいくつか発表されている。これらのモデルはラット・マウス共に優れており、今後癌の発育・浸潤の機構の研究が進むものと思われる。しかしながら、ヒト肺癌の同所性移植による実験モデルにはいくつかの大きな問題点がある。その問題点とは、癌細胞の生着や転移を確認するために屠殺しなければならないことや、転移部位が縦隔などの深部であり治療効果の判定が困難なことなどが有る。転移リンパ節への治療効果の判定が容易なモデルを開発する必要が有ると考えた。

今回我々の作製したモデルでは、ヌードラット足背部に培養ヒト肺癌細胞 RERF-LC-AI を移植し、膝窩部及び鼠径部リンパ節への転移を形成させている。このモデルでは、生着が直接確認することが出来る。また、転移も容易・確実に起こすことが可能であり、その確認も容易である。さらに、転移リンパ節が表在に有るため検体採取が簡便であり、必要に応じて採取後もラットを生かしておくことが容易である。今後のヒト癌における転移リンパ節に対する治療の研究に役立つものと考えている。

実験材料及び方法

実験材料

1. 細胞株

ヒト肺扁平上皮癌細胞株である RERF-LC-AI を 10% FBS 添加 MEM 培地 (Gibco) で培養し、全て 10 継代以内の細胞を使用した。

2. 動物種

雄ヌードラット (F344/N Jcl-rnu/rnu), 5 週齢, 体重 80 ~ 130 g を用いた。細胞移植 1 週間前に搬入し、環境への適応を図った。SPF 領域にて飼育し、不断給餌・給水とした。

実験方法

朝 5 週齢 雄ヌードラットの全身に 500 rad 照射した。同日午後にはラットをエーテルで麻酔し、調整した培養癌細胞 RERF-LC-AI 1×10^7 個/0.05 ml PBS を足背部 (foot pad) に皮下注射した。週 3 回、肉眼的に移植部位の腫瘍の増大を観察した。腫瘍の大きさは縦 × 横 × 高さの測定により行い、体積は近似的に楕円体の体積と考えて $\pi/6 \times$ 縦 × 横 × 高さとした。腫瘍生着 (tumor take) の判定は、肉眼所見及び検体の病理所見により行った。潜伏期 (latent period) の判定は肉眼所見により比較的容易に捉えられる。潜伏期は足背部の腫瘍の形成が認められるまでの日数とした。また触診にて転移がないかどうか、週 3 回観察した。触診上鼠径部の左右差が明らかな場合転移有り と判断した。確実性を増すために、また、実際の実験においてはリンパ節転移が進行してから使用する場合が多いと考えて、移植側の膝窩部及び鼠径部リンパ節の摘出は転移有り と認識してから 2 週間後に行った。固定後、パラフィンに包埋し、H-E 染色を施し、転移の有無・進行度を組織学的に検討した。森川ら²の報告では、リンパ節転移の進行度を Figure 1 の如く Stage 分類している。これに基づいてリンパ節転移の進行度を評価した。

結果

培養ヒト肺癌細胞株 RERF-LC-AI の皮下注射により、ラットの足背部は一時的に膨隆するが、数時間で吸収される。以降潜伏期を経て、腫瘍細胞は腫瘍を形成していく。移植部位の腫瘍が十分な大きさになってから採取し、病理組織標本 H-E 染色としてその性状が変化していないことを確認した (Figure 2)。

腫瘍の生着は、95.5% (n = 21) と高率であった。潜伏期は平均 7.25 ± 1.47 日間であった (n = 20)。腫瘍を経時

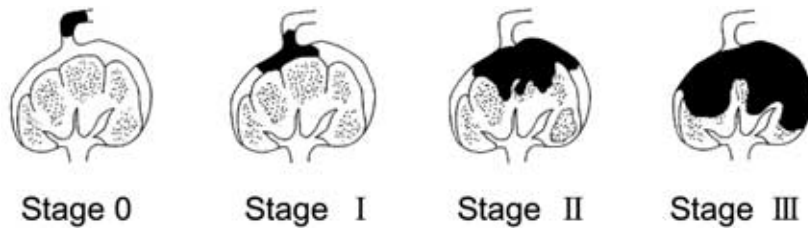


Figure 1. Staging of lymph node metastasis (Morikawa et al²). Stage 0: embolisms of tumor cells in lymphatic duct. Stage I: localization of tumor cells in the verge cavity. Stage II: invasion of tumor cells into the cortex or medulla. Stage III: invasion of tumor cells into the cortex and medulla, occupying over one half of the node.

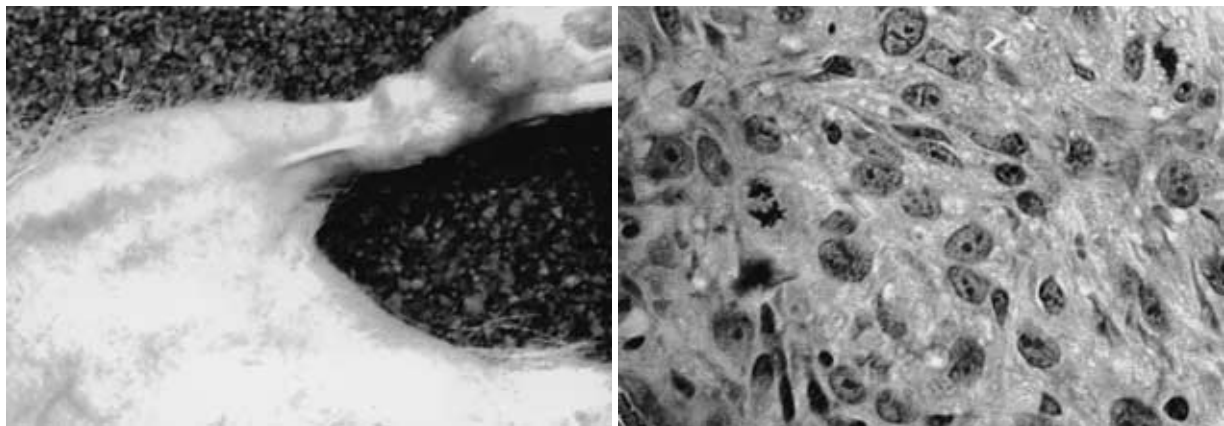


Figure 2. Changes in the foot pad (60 days after injection) and the findings of light micrograph (H&E-stained, × 200)

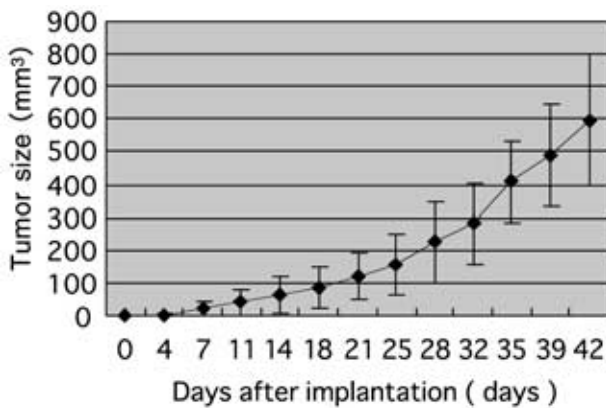


Figure 3. Tumor weight after implantation of RERF-LC-AI cells.

的に計測し，成長曲線を作成した(Figure 3) . 腫瘍は，潜伏後一定した体積増加率を示した .

膝窩部のリンパ節は最大で 6 × 5 × 3 mm であり，一番小さいものでも 3 × 2 × 2 mm であった . 肉眼にて検体採

取は容易であった . 100% (n = 20) において病理組織学的にリンパ節転移を確認し得た (Figure 4) . 鼠径部のリンパ節組織 (+ 脂肪組織) は健側の約 5 ~ 10 倍量になっており，これが触診上左右差として認識可能であったと考えられる . 鼠径部のリンパ節は，膝窩部リンパ節に比べてやや小さい場合が多かった . 大きいリンパ節で 3 × 2 × 1 mm 程度であり，約半数以上で肉眼的に同定可能であった . 検体を数個採取することにより ,95.0% (n = 20) において病理組織学的にリンパ節転移を確認し得た .

膝窩部リンパ節では，組織学的に全てにおいて Stage III であった . 転移認識までに要した日数は，41.1 ± 4.1 日 (n = 20) であった . 屠殺した時点での腫瘍・転移のデータを以下に示す (Table 1) . 腫瘍サイズは ,0.60 ± 0.20 cm³ (n = 20) であった . 鼠径部リンパ節転移は 95.0% であり，Stage II 5% ，Stage III 95% であった .

考 察

ヌードマウスにおけるヒト肺癌細胞の同所性移植による縦隔リンパ節転移モデルの報告がいくつかなされてい

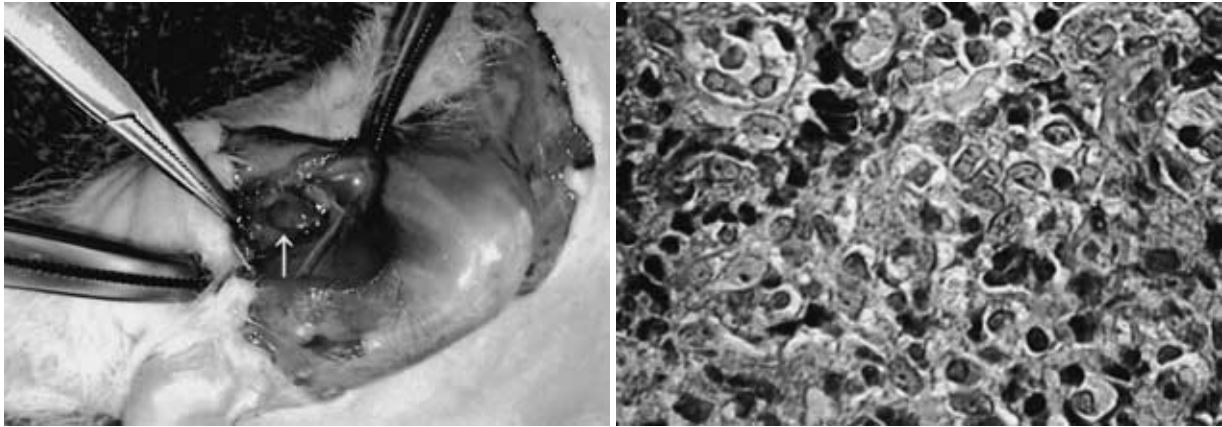


Figure 4. Lymphatic metastasis on the popliteal lymph node, and the light micrograph finding (H&E-stained, $\times 200$) showing Stage III metastasis.

Table 1. Characterization of Implanted Tumor Cells and Lymph Node Metastasis

Take-rate	95.5% (n=21)
Latent time	7.25 \pm 1.47 days (n=20)
Days of metastasis	41.1 \pm 4.10 days (n=20)
Tumor size	3.39 \pm 0.90 cm ³ (n=20)
Rate of metastasis in popliteal lymph nodes	100% (n=20, Stage III 100%)
Size of popliteal lymph nodes	Max 6 mm, Min 3 mm
Rate of metastasis in inguinal lymph nodes	95.0% (n=20, Stage II 5%, Stage III 90%)
Size of inguinal lymph nodes	Max 3 mm, Min < 1 mm

る。³⁻⁵ 今後のリンパ節転移に対する研究において臓器特性という面で優れ、非常に有用なモデルであると思われる。しかし、腫瘍及びその転移部位が深部に有り、その周囲を肺や骨が囲んでいるために、肉眼・触診・エコーなどによる転移の確認が困難である。同じ理由で、転移リンパ節に対する治療効果の一時点での評価は可能であっても、経時的な判定は非常に困難である。また、リンパ節を採取するためには動物を sacrifice するか、もしくは生存させることが可能であったとしても多大なる侵襲を加える必要がある。また、森川ら²によるヌードマウスの足背部への移植モデルでは、リンパ節自体の検体量が少ないため、治療効果を判定するには使用困難と考えた。

ヌードラットにおける肺内への同所移植では、放射線照射後に NCI-H460 腫瘍片を気管支内投与するモデルがいくつか考案されている。⁶⁻¹⁰ これらによれば、高率に縦隔リンパ節へ転移することが報告されている。Systemic な研究を行う場合に非常に有効なモデルであろう。しかし、ヌードマウスのモデルと同様に、転移リンパ節への治療効果を経時的に判定するには適しているとは言えない。ヒト肺癌においてリンパ行性転移の機序の解明や転

移リンパ節への治療の研究が進んで来るにあたり、新たなリンパ節転移に焦点を合わせたモデルを開発する必要がある。

ヌードラットにおいては、ヌードマウスと異なりヒト培養癌細胞株からの異種移植が困難であることが言われており、Howard ら⁶は移植前の放射線照射によりその生着率が格段に上昇することを報告している。今回の我々の実験でも、ヌードラットにおける足背部へのヒト肺癌細胞株 RERF-LC-AI の移植前に放射線照射を行うことにより高率に腫瘍を生着させることが可能であった。腫瘍生着後、腫瘍は一定の速度で増大した。腫瘍生着後 40 日程度で、鼠径部が触知出来るようになった。実際に実験に使用する場合には、ある程度リンパ節への転移が進行した状態が必要なことが多いと考えて、鼠径部が触知可能となった日より 2 週間後に検体を採取し組織学的に検討した。検体採取時に確認したところ、鼠径部において触知し得た腫瘍はリンパ節だけではなく、その周囲の脂肪組織も腫脹していた。腫脹したリンパ節と脂肪組織は健側の約 5 倍量に相当した。鼠径部リンパ節は膝窩部リンパ節より小さく、肉眼的にリンパ節を同定することが約半数において困難であった。検体を数個採取するこ

とにより、19匹(95%)のラットにおいて組織学的に転移を確認し得た。膝窩部リンパ節は大腿筋の内側にあり、触知はできなかった。膝窩部リンパ節は全例において腫脹しており、転移していることが肉眼的に判断可能であった。このため確実に検体を採取することが可能であった。今回のリンパ節転移モデルの優れた点として、高率に生着・転移すること、生着・転移の判定が容易であること、検体採取が容易であること、検体量が多いことなどが挙げられる。また、検体採取が容易であるため、検体採取後もラットを生存させておくことが可能であった。

また、今回のリンパ節転移モデルでは、原発巣からリンパ行性転移の経路が明確であり、一次・二次リンパ節への転移の研究を区別して行うことが可能である。これは、リンパ節転移の機序面での研究のみならず、その転移状況に合わせた治療の研究を行い得る可能性を示している。その治療効果の判定においても、転移部位が表在にあるため容易である。Howardら⁶の同所性移植による動物モデルとは違った面で、今後のヒト肺癌のリンパ行性転移の研究及び転移リンパ節に対する治療の研究に役立てれば幸いである。

結 語

我々は、ヒト肺癌細胞株 RERF-LC-AI をヌードラット足背部へ異種・異所移植し、膝窩部及び鼠径部への転移リンパ節モデルを作製した。腫瘍の生着・転移は高率に起こり、その触診による転移の予測も簡便・正確であった。転移リンパ節が体表面にあり治療効果の判定が可能であることや検体量が多いことも、転移リンパ節モデルとして有利な点であると思われる。今後、ヒト癌の転移

リンパ節への治療効果の研究に有用な実験モデルと思われるので報告した。

REFERENCES

1. Goya T. Analysis of lung cancer registry for resected cases in 1994. *Jpn J Lung Cancer*. 2002;42:555-556.
2. 森川 茂. ヌードマウス可移植性ヒト癌細胞のリンパ節転移モデル. がん転移研究会. 編集. 続・がんの浸潤・転移研究マニュアル. 京都: 金芳堂; 1997:28-34.
3. Onn A, Isobe T, Itasaka S, et al. Development of an orthotopic model to study the biology and therapy of primary human lung cancer in nude mice. *Clin Cancer Res*. 2003; 9:5532-5539.
4. Ishikura H, Kondo K, Miyoshi T, et al. Artificial lymphogenous metastatic model using orthotopic implantation of human lung cancer. *Ann Thorac Surg*. 2000;69:1691-1695.
5. Yamaura T, Doki Y, Murakami K, et al. Model for mediastinal lymph node metastasis produced by orthotopic intrapulmonary implantation of lung cancer cells in mice. *Hum Cell*. 1999;12:197-204.
6. Howard RB, Chu H, Zeligman BE, et al. Irradiated nude rat model for orthotopic human lung cancers. *Cancer Res*. 1991;51:3274-3280.
7. Mulvin DW, Howard RB, Mitchell DH, et al. Secondary screening system for preclinical testing of human lung cancer therapies. *J Natl Cancer Inst*. 1992;84:31-37.
8. Johnston MR, Mullen JB, Pagura ME, et al. Validation of an orthotopic model of human lung cancer with regional and systemic metastases. *Ann Thorac Surg*. 2001;71: 1120-1125.
9. Howard RB, Mullen JB, Pagura ME, et al. Characterization of a highly metastatic, orthotopic lung cancer model in the nude rat. *Clin Exp Metastasis*. 1999;17:157-162.
10. March TH, Marron-Terada PG, Belinsky SA. Refinement of an orthotopic lung cancer model in the nude rat. *Vet Pathol*. 2001;38:483-490.