

1 ヒト肺癌細胞同所性移植方法の確立

1.1 はじめに

近年ヌードマウスや SCID マウスなどの免疫不全動物にヒト肺癌細胞を同所性に移植する方法が癌本来の性状や転移能を評価する実験方法として開発されてきた(13-25)。この同所性移植モデルの重要性を支持する基礎概念としては 1889 年に Paget により提唱された 'seed and soil' 仮説がある(26)。この仮説は臓器特異的(同所的)に腫瘍細胞を移植することが生体内での腫瘍細胞の増殖や進展に重要であること示唆している。近年の脳腫瘍(25)、大腸癌(27-29)、膵臓癌(24)、膀胱癌(30)などを用いたヌードマウスや SCID マウスへの同所性移植の実験ではこの仮説と矛盾しない結果が得られている。

ヒト肺癌細胞の同所性移植は 1987 年に McLemore らにより最初に報告され(22)、彼らはヌードマウス気管支内に腫瘍細胞を注入することにより肺への肺癌細胞の移植に成功している。この手技による同所性移植法は平田らによっても確認されている(31)。また Wang らはヒト手術材料を直接ヌードマウスや SCID マウスの肺に縫合することにより腫瘍細胞の移植に成功し遠隔転移も認めたと報告した(20)。Nagamachi らは経皮的に左胸腔内に腫瘍細胞を注入し、胸膜播種、肺内腫瘍形成、縦隔リンパ節転移や対側胸腔内への転移を認めたと報告し(32)、Doki らは Matrigel を用いて細胞浮遊液を作製し、経皮的に移植し、肺内のみの腫瘍形成に成功している(33)。このように様々な方法によりヒト肺癌の同所性移植が試みられている。現在はこのように肺癌細胞の特性(浸潤、転移や薬剤感受性等)の検討を行う目的で、種々の移植方法が考案されてきている。

本研究では肺癌細胞が生体内でどの様に増殖、浸潤、転移

を来たすかを解明することを最終の目標としている。この最終目標に到達するためにまず肺内に肺癌細胞を移植し、肺内に腫瘍を作成すること、つまり肺同所性移植モデルの作成を当初の目標とした。この同所性移植モデルを作成するに当たっては以下の条件を設定した。

1. 生体内で肺癌細胞本来の性質が変化しないように、肺への影響はなるべく小さくする。
2. 移植の方法はできるだけ簡便な手法となり手技に特別な技術を必要としないようにして、なるべく特別な実験機具を使用しないですみ、短時間で終了することのできる手法にすること。
3. 一定の期間で肺内に効率よく腫瘍が形成される方法。

以上の3つの条件を満足する移植モデルの手法を考えたところ、現在までに報告されているヌードマウスや SCID マウスに対する肺癌細胞の同所性移植法の手法には先にあげた3つの代表的な移植モデルがあるが、肺組織に侵襲を加えることの比較的少ない McLemore らや平田らが報告した経気道的移植法(22, 31)が最も上記条件を満たす方法と考えられた。報告によれば、経気道に注入するため McLemore は特性の金属管をまた平田らはポリエチレンチューブを使用して肺内に癌細胞の移植を行っているが、本研究では簡単に入手できる 24G の静脈内留置針を用いることとし、この点で従来の経気道的移植法を改良した。本章ではこの静脈内留置針を用いた経気道的移植法が当初の実験条件を満足するか否かを明らかにすることを目的とした。同時に今までに報告された3つの代表的な経気道的移植法との比較も行い、先の条件において静脈内留置針との相違について検討をした。

1.2 目的

これまでに報告されているヌードマウスや SCID マウスに対

する肺癌細胞の同所性移植法は

1. McLemoreらや平田らが報告した経気道的移植法(22, 31)
2. Wangらが報告した開胸移植法(20)
3. NagamachiらやDokiらが報告した経皮的移植法(32, 33)

がある。本研究では肺組織に侵襲を加えることの少ない経気道的移植法に着目し、McLemoreらや平田らが報告した経気道的移植法(22, 31)を改良した静脈内留置針を用いた経気道的移植法を考案し、今までに報告された肺癌同所性移植法と比較・検討した。

1.3 対象と方法

1.3.1 実験動物

4週齢の雄のSPF BALB/cヌードマウスを日本クレア（浜松、日本）より購入し使用した。これらの実験動物は筑波大学動物実験センター内近交系飼育室微生物制御飼育装置内でオートクレーブ滅菌したケージを用いて飼育した。飼育条件は一定温度および14時間の照明時間、10時間の消灯時間サイクル下に、オートクレーブした飼料および水を自由に与えた。この実験は筑波大学動物実験取扱規定に基づいた実験計画書を動物実験委員会に提出し、審議・承認後に筑波大学動物実験取扱規定に則り施行した。

1.3.2 使用薬物

1. 細胞培養および細胞浮遊液作製に用いた薬物

ウシ胎児血清 (SIGMA CHEMICAL CO, St. Louis, MO, USA)

D-MEM/F12 培地 (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)

0.05%トリプシン EDTA (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)

0.5%トリパンプルー液 (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA)

2. 麻酔に用いた薬物

2.2.2-Tribromoethanol (Aldrich CHEMICAL CO, Milwaukee, WI, USA)

2-Methyl-2-butanol (和光純薬工業株式会社、大阪、日本)

1.3.3 細胞培養

ヒト肺腺癌培養細胞株 A549 を用いた。A549 培養細胞株はRIKEN Cell Bank(つくば、日本)より購入した。A549 培養細胞株は高分化型肺腺癌より樹立された接着性増殖を示す培養

細胞株である(34)。A549培養細胞株は組織培養用ディッシュにより、10%非働化ウシ胎児血清を添加したD-MEM/F12培地を用いて、37℃・5%CO₂濃度条件下のCO₂インキュベーター内で培養を行った。

1.3.4 細胞浮遊液作製

A549培養細胞株は10cm培養ディッシュで約80%コンフルエントの状態になるまで培養を行い、0.05%トリプシンEDTAを用いてA549培養細胞を培養ディッシュから分散後回収した。この回収したA549培養細胞を血清無添加培地で2回洗浄した後、血清無添加培地を加え最終濃度が 1×10^7 個/mlとなるように希釈した。細胞数は細胞浮遊液と等量の0.5%トリパンブルー液を加え、死細胞を染色し、血球計算盤を用いて生細胞のみを計数した。

1.3.5 麻酔

2.5%avertin(100%avertin:2,2,2-Tribromoethanolと2-Methyl-2-butanolの1:1混合液)を実験動物の腹腔内に0.4-0.5ml投与した。

1.3.6 ヒト肺癌細胞同所性移植法

同所性移植方法として今回静脈内留置針(図2)を使用する改良を行った経気道的移植法を行うとともに、いままで報告されている以下の3方法による同所性移植も行った。

1. 経皮的移植法:

本研究においてはDokiらが報告した経胸壁移植法(33)を行った。

2. 開胸移植法

3. 経気道的移植法:

本研究においては平田らが報告した内径0.2mm、外径0.5

mmのポリエチレンチューブを使用した経気道的移植法(31)を行った。

1. 開胸移植法

1. 全身麻酔下のマウスを仰臥位に固定する。
2. 左肩甲骨下角の約 5 mm 下に 5 mm 長の皮膚切開をおき、皮下組織を剥離する。
3. 左開胸し、直視下に左肺を確認する。
4. 27 G 注射針を肺実質に穿刺し、 1×10^7 個/1 ml となるように血清無添加培地を加え調整した細胞浮遊液 0.1 ml (細胞数 1×10^6 個) を注入する。
5. 注射針を抜去し、皮膚を 1 針縫合する。

覚醒するまでの約 15 分間マウスを保温し、麻酔覚醒を確認後ケージに戻し、実験終了まで飼育する。

2. 経皮的移植法 (経胸壁移植法)

1. 全身麻酔下のマウスを右下側臥位に固定する。
2. 左肩甲骨下角の約 5 mm 下に 5 mm 長の皮膚切開をおき、皮下組織を剥離する。
3. 胸膜を露出し、胸膜越しに左肺を確認する。
4. 27 G 注射針を胸膜上より穿刺し、約 5 mm 注射針を進め、左肺実質に注射針を穿刺する。
5. 1×10^7 個/1 ml となるように血清無添加培地を加え調整した細胞浮遊液 0.1 ml (細胞数 1×10^6 個) を注入する。
6. 注射針を抜去する。

覚醒するまでの約 15 分間マウスを保温し、麻酔覚醒を確認後ケージに戻し、実験終了まで飼育する。

3. ポリエチレンチューブを使用した経気道的移植法

1. 内径 0.2 mm、外径 0.5 mm のポリエチレンチューブ (夏

目製作所) をコネクターに接続するため一方の端を熱し変形させコネクターと接続する。

2. ポリエチレンチューブはオートクレーブ滅菌できないため、実験施行時まで 70 % アルコールに浸しておく。
3. 全身麻酔下のマウスを仰臥位に固定し、頸部を伸展する。
4. 胸骨切痕の頭側皮膚に約 1 cm の横切開を加え、皮下および気管周囲の組織を剥離し気管前面を露出する。
5. 気管輪間を 26 1/2 G の注射針で切開し、ポリエチレンチューブを挿入し、その後気管支末梢までカテーテルを進める。
6. 1×10^7 個/1 ml となるように血清無添加培地を加え調整した細胞浮遊液 0.1 ml (細胞数 1×10^6 個) を注入する。
7. カテーテルを抜去後、切開した頸部皮膚をポリプロピレン糸で一針縫合する。

覚醒するまでの約 15 分間実験動物を保温し、麻酔覚醒を確認後ケージに戻し、実験終了まで飼育する。

4. 静脈内留置針を使用した経気道的移植法

1. 全身麻酔下(図 3)の実験動物を仰臥位に固定し、頸部を伸展する(図 4)。
2. 胸骨切痕の頭側皮膚に約 1 cm の横切開を加え(図 5)、皮下および気管周囲の組織を剥離し気管前面を露出する(図 6)。
3. 気管輪の間にカテーテル長 19 mm・カテーテル外径 0.67 mm・カテーテル内径 0.47 mm の 24 G 静脈内留置針(テルモ株式会社、サーフロー F&F、(図 2)) を穿刺し内針を抜去、カテーテルのみを気管内に挿入する(図 7)。その後気管支末梢までカテーテルを進める(図 8)。
4. 1×10^7 個/1 ml となるように血清無添加培地を加え調整

した細胞浮遊液 0.1 ml (細胞数 1×10^6 個) を注入する。

5. カテーテルを抜去後 (図 9)、切開した頸部皮膚をポリプロピレン糸で一針縫合する (図 10)。

覚醒するまでの約 15 分間実験動物を保温し、麻酔覚醒を確認後ケージに戻し、実験終了まで飼育する。

1.3.7 肉眼および組織学的検索

移植後 28 日目にヌードマウスを安楽死させ、肺と胸腔内臓器 (気管、心臓、縦隔リンパ節) および腹腔内臓器を摘出し、肉眼的に肺内腫瘍形成および転移の有無の検索を行った。摘出した肺、気管、心臓、縦隔リンパ節、腎臓、ひ臓の各臓器は 10 % 中性緩衝ホルマリン液に 24 時間固定後、パラフィン包埋ブロックを作製した。各臓器のパラフィンブロックを 4 μ m 厚で薄切しヘマトキシリン・エオジン染色を行い光学顕微鏡にて組織学的な検討を行った。

1.3.8 統計学的検討

各移植法の移植時間は平均士標準偏差で示した。移植方法による移植時間の有意差の検定は Kruskal-Wallis 検定で行い、有意水準を 5 % に設定した。肺内腫瘍形成数の有意差の検定は Fisher の直接確率計算法を用い、有意水準を 5 % に設定し行った (35, 36)。

1.4 結果

各移植法の結果の一覧を表 1 に示した。

1. 移植手技時間

本研究で改良した静脈内留置針を用いた経気道的移植法では移植に要する時間は平均 421 秒であった。経皮的移植法（経胸壁移植法）では平均 428 秒であり、静脈内留置針使用経気道的移植法と有意差は認められなかった。開胸移植法では 612 秒、ポリエチレンチューブ使用経気道的移植法では 910 秒と静脈内留置針使用経気道的移植法に比較して移植時間が長く有意差が認められた（図 1）。

2. 移植手技の容易さ

静脈内留置針を用いた経気道的移植法では、静脈内留置針の内筒で直接気管を穿刺でき、そのまま気管、気管支内に外筒を挿入できることと、ポリエチレンチューブに比較して外筒が硬いため気管支末梢まで容易に外筒を挿入することができ、末梢肺の一部に限局して培養細胞株を注入することが容易であった。

経皮的移植法（経胸壁移植法）では壁側胸膜を介して肺を透視して肺内に培養細胞浮遊液を注入するため肺を固定して注射針を刺入できず、肺内に確実に注入できているかの確認が困難であった。

ポリエチレンチューブ使用経気道的移植法では気管から気管支内にポリエチレンチューブを挿入していくにあたりチューブが柔軟すぎて気管支内で曲がってしまい末梢へのチューブの挿入が困難であった。

開胸移植法では開胸することで肺を直視することができ肺内への培養細胞株浮遊液の注入は容易であった。

3. 移植時マウス死亡数

静脈内留置針を用いた経気道的移植法では全数のマウス (n=6) で移植時の死亡はなく、また経皮的移植法 (経胸壁移植法) (n=5) とポリエチレンチューブ使用経気道的移植法 (n=3) でも死亡はなかった。しかし本実験において開胸移植法では全数のマウス (n=10) が移植時に死亡した。

4. 肺内腫瘍形成率

静脈内留置針を用いた経気道的移植法では全数のマウス (n=6) で肺内に腫瘍の形成が認められ (100%)、半数 (3/6) で胸膜播種および縦隔リンパ節転移が認められた。肺内腫瘍は左肺に形成されていることが多く、多数の腫瘍が形成されていた。

経皮的移植法 (経胸壁移植法) では 60% のマウス (3/5) に左胸膜表面に複数の腫瘍形成が認められ胸膜播種様の形態を示したが、肺内腫瘍形成は 0 % であった。

ポリエチレンチューブ使用経気道的移植法では腫瘍形成はマウス全数 (n=3) で認められず、開胸移植法では全数のマウス (n=10) が移植時に死亡したため腫瘍形成は検討できなかった。

静脈内留置針を用いた経気道的移植法と経皮的移植法 (経胸壁移植法) の間で実験母数は少ないが腫瘍形成率に有意差を認めた。

1.5 考察

本研究においては静脈内留置針を用いた経気道的移植法はその移植手技時間が平均 421 秒と経胸壁移植法(平均 428 秒)とほぼ同じ時間を要したが、開胸移植法(平均 612 秒)およびポリエチレンチューブ使用経気道的移植法(平均 910 秒)に比較して短時間であった。開胸移植法では開胸しマウス肺への注射針を刺入する時に肺を固定するのに時間がかかり移植時間が長くなった。またポリエチレンチューブ使用経気道的移植法ではポリエチレンチューブが柔らかく折れ曲がり易いため気管切開孔への挿入と気管支末梢にチューブを進めるのに時間がかかり、またチューブ内径が細いため細胞浮遊液注入に抵抗があり注入にも時間がかかるため手技時間が長くなった。本研究で参考とした経胸壁移植法を行った Doki らの報告(33)によると、経胸壁移植法の移植時間は皮膚切開から皮膚縫合まで平均約 50 秒で行えたとしている。本研究では同方法の手技に約 8 倍以上の時間がかかっており、また平田らのポリエチレンチューブ使用経気道的移植法の報告(31)では移植は 5 分以内で行えるとしており本研究は約 2 倍以上時間がかかっており移植手技時間には手技の熟練の差がかなり大きな因子となることが考えられた。Wang らによる開胸移植法の報告(20)では移植時間についての記載がなく本研究の結果と対比できないが、経胸壁移植法の結果から推測すると移植手技の熟練により各移植方法とも本研究の結果よりも移植時間は短縮できる可能性があると考えられた。

移植によるマウスの死亡率についてみると本研究では静脈内留置針使用経気道的移植法、経胸壁移植法、ポリエチレンチューブ使用経気道的移植法では死亡率は 0 %であり、胸壁肺内移植法を行った Doki らの報告(33)では死亡率は 5 %以下、ポリエチレンチューブ使用経気道的移植法を行った平田らの

報告(31)では死亡率は9.7%とされており、死亡率について見るとこの三方法には優劣は無いと考えられる。ただし本研究においてWangらの報告(20)に従った開胸移植法を行ったが、気管内挿管・人工呼吸器装着せず開胸したところ全例呼吸状態が悪化し、移植手技中または移植術終了後数分以内に死亡してしまっただ。Wangらはこの手法における死亡率については言及していないが(20)、本手法には高度に熟練した移植手技が要求されることが考えられる。さらには開胸によるマウスの心肺系に与える影響を考えると開胸移植法では気管内挿管等による陽圧換気が必要であると考えられる。

同所性移植の目的である肺内への腫瘍形成について本研究では静脈内留置針使用経気道的移植法で100%肺内に腫瘍形成が認められたが、ポリエチレンチューブ使用経気道的移植法と経胸壁移植法では肺内腫瘍の形成が見られなかった。本研究、特にポリエチレンチューブ使用経気道的移植法では移植したマウス数が少なく統計学的な差異をみることはできなかったが、静脈内留置針使用経気道的移植法が肺内腫瘍形成をしやすい傾向にあるように考えられた。

ポリエチレンチューブ使用経気道的移植法ではポリエチレンチューブが柔らかいため気管支内で折れ曲がり気管支末梢にチューブが入らないまま比較的太い気管支内で肺癌細胞が注入され、肺末梢の広い範囲に肺癌細胞が分散してしまい細胞密度が低くなるために腫瘍形成が低下している可能性が考えられる。この手法を用いた平田らの報告(31)では肺癌培養細胞株および肺癌臨床検体を9例移植し2例で肺内腫瘍の形成が見られたとしている。本研究と異なる細胞株を使用しているので直接の比較は困難であるが本研究ではこの移植手技に熟練していなかったために肺内腫瘍形成が見られなかった可能性も考えられる。

本研究において経胸壁移植法では肺内腫瘍形成は認められ

なかったが、60%のマウスの胸膜面に腫瘍形成が認められ、これは肺内には培養細胞株が注入されずに胸腔内に散布されてしまったためと考えられる。経皮的移植法を用いた同所性移植実験は、Dokiらがマウス Lewis 肺癌培養細胞株を用い C57BL/6 マウスに対し行っている報告(33)と Nagamachiらが穿刺針を皮膚より穿刺してヒト肺癌培養細胞をヌードマウス胸腔内に注入する方法を用いた報告(32)がある。Dokiらはマウスの皮下を剥離し壁側胸膜越しに肺を確認し、穿刺針を壁側胸膜上から穿刺して培養細胞を肺内に移植し肺癌に対する薬剤の効果进行研究している。また Nagamachiらは細胞浮遊液の静脈内投与実験で胸膜上および肺内に腫瘍を形成しない培養細胞株においても経皮的移植法により胸膜上および肺内に腫瘍を形成したと報告している。しかし経皮的移植法は①胸膜を通して肺を確認するか皮膚から盲目的に胸腔内に針を穿刺し細胞浮遊液を注入するために肺実質内への細胞浮遊液の注入を確認できないこと、②肺実質内に細胞浮遊液を注入できた場合でも、穿刺した臓側胸膜表面からの細胞浮遊液の胸腔内への流出の可能性、③胸腔外(胸壁)への腫瘍細胞の移植の可能性が考えられる。そこで Doki らは穿刺した臓側胸膜表面からの細胞浮遊液の胸腔内への流出の予防のためにコラーゲンを主成分とする Matrigel を用いて細胞浮遊液を作製し、肺内のみの腫瘍形成に成功している(33)。しかし、本研究ではできるかぎり肺や培養細胞には修飾を加えずにその生物学的特性を検討することを目的としており、Dokiらが用いた Matrigel にはコラーゲンや細胞増殖因子などが含まれ培養細胞の増殖等に影響を与えることが予想されるので、本研究では Matrigel の使用は行わなかった。また McLemoreらは経皮的移植法と経気道的移植法を比較した実験で、経皮的移植法において約30%の胸壁・皮下への移植があったと報告している(37)。本研究での経皮的移植法では胸壁・皮下におけ

る腫瘍形成は認められなかったが、腫瘍の形成は胸膜播種のみで、肺内における腫瘍形成を認められず、経皮的移植法は熟練を要する手法と考えられる。

Wangらによる開胸移植法(20)では気管内挿管・人工呼吸器を使用することなしに移植を行っているが、本研究ではマウス死亡率は100%で、この移植法を行うには移植時気管内挿管等による陽圧換気が必要であると考えられ、移植手技がやや繁雑になると考えられる。一方DokiらやNagamachiらの経皮的移植法(32, 33)では開胸することなく注射針を肺内に刺入するので手技は容易であるが、肺を直接観察できないので肺内へ確実に培養細胞を注入するには熟練を要すると考えられる。

経気道的移植法はMcLemoreらは培養細胞の肺内への注入に27G注射針の先端を鈍に加工した器具を使用しているが(22)、注射針の加工が繁雑と考えられる。一方、平田らのポリエチレンチューブ使用経気道的移植法(31)は本研究でも検討を行ったが①チューブが柔らかく気管切開孔からの挿入および気管支末梢にチューブ先端を留置するための手技に熟練を要する点、②内径が細いため細胞浮遊液注入時に抵抗があることと細胞塊によるチューブ内腔の閉塞の可能性があり正確な量の細胞浮遊液の注入が困難である点が手技上の問題となった。

本研究で考案・改良した静脈内留置針使用経気道的移植法では静脈内留置針は比較的容易に入手可能で、加工することなくそのまま使用でき、穿刺用の針とカテーテルが一体となっているため直接気管を穿刺でき確実にカテーテルを気管支末梢に挿入できるなど肺への侵襲を少なくして肺内への培養細胞注入の手技としては他の方法に比較して困難な点は少ないと考えられた。

以上より本研究において考案した静脈内留置針を用いた経

気道的移植法は肺への侵襲を少なくして比較的簡便に腫瘍細胞を肺内に移植できる方法であると考えられた。

表 1. 各種同所性移植法の比較

	実験 マウス数 (n)	移植手技 時間 (sec. ±S. D.)	移植時 死亡数 (n)	肺内腫瘍 形成マウス数 (n)	胸膜播種 形成マウス数 (n)	リンパ節転移 形成マウス数 (n)	遠隔転移 形成マウス数 (n)
開胸移植法	10	612.0 ±33.9	10	—	—	—	—
経皮的移植法 (経胸壁移植法)	5	428.0 ±51.2	0	0	3	0	0
経気道的移植法							
経気道的移植法 (ポリエチレンチューブ 使用)	3	910.0 ±36.1	0	0	0	0	0
経気道的移植法 (静脈内留置針使用)	6	421.7 ±28.6	0	6*	3	3	0

* : $p < 0.05$ by Fisher' s exact probability test.

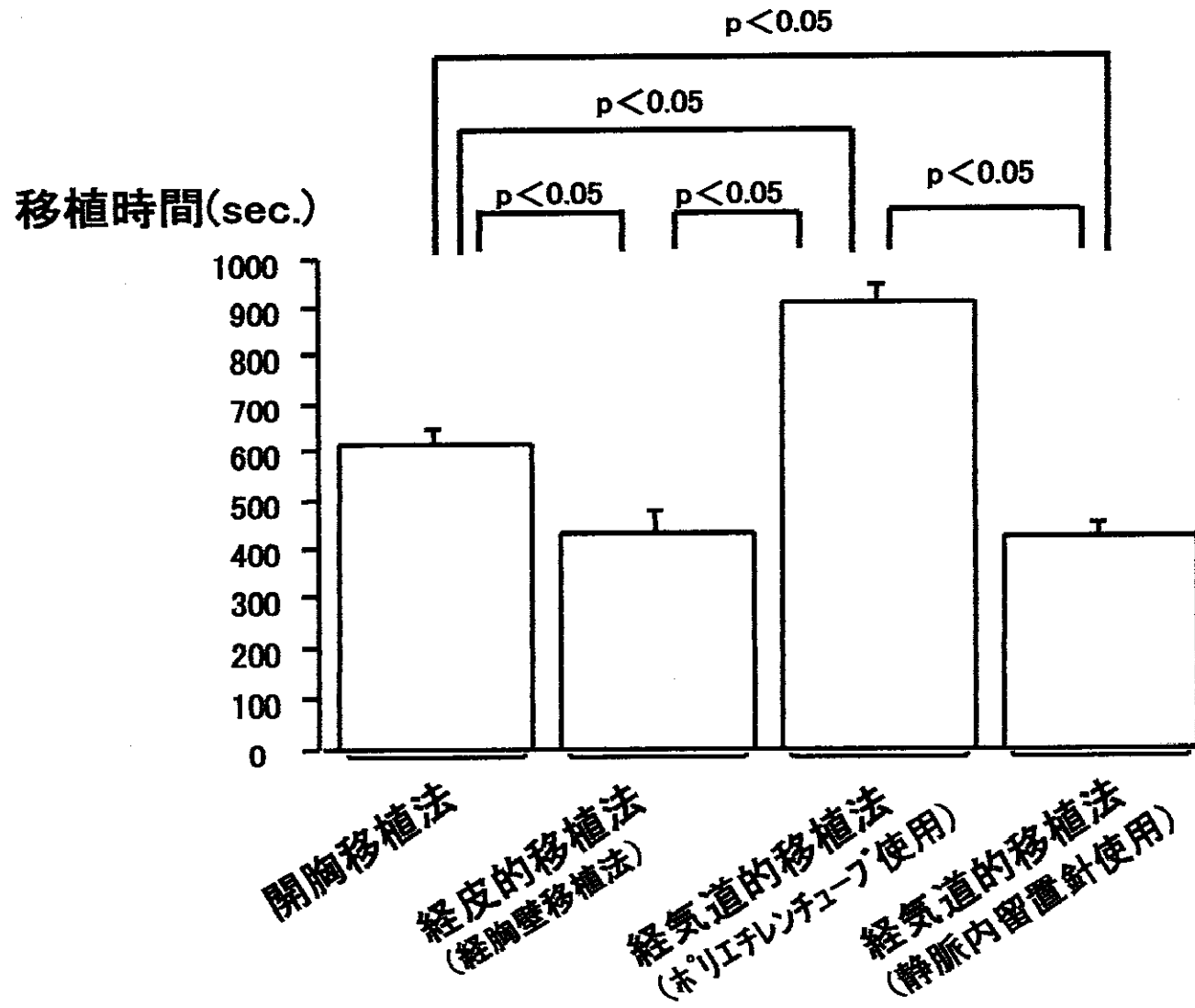


図1. 各種移植方法移植時間の検討



图 2. 24G 静脈内留置針



图 3. 經氣道的移植法
(麻醉法：2.5 %avertin 腹腔内投与)

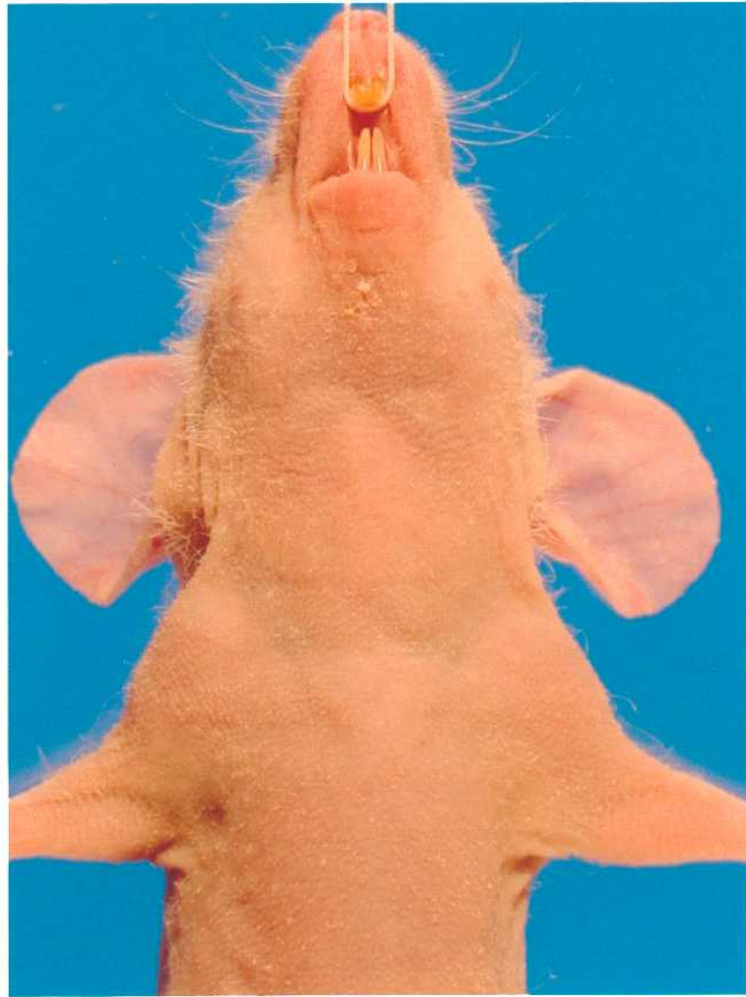


図4. 経気道的移植法
(体位を仰臥位とし頸部を伸展させる)

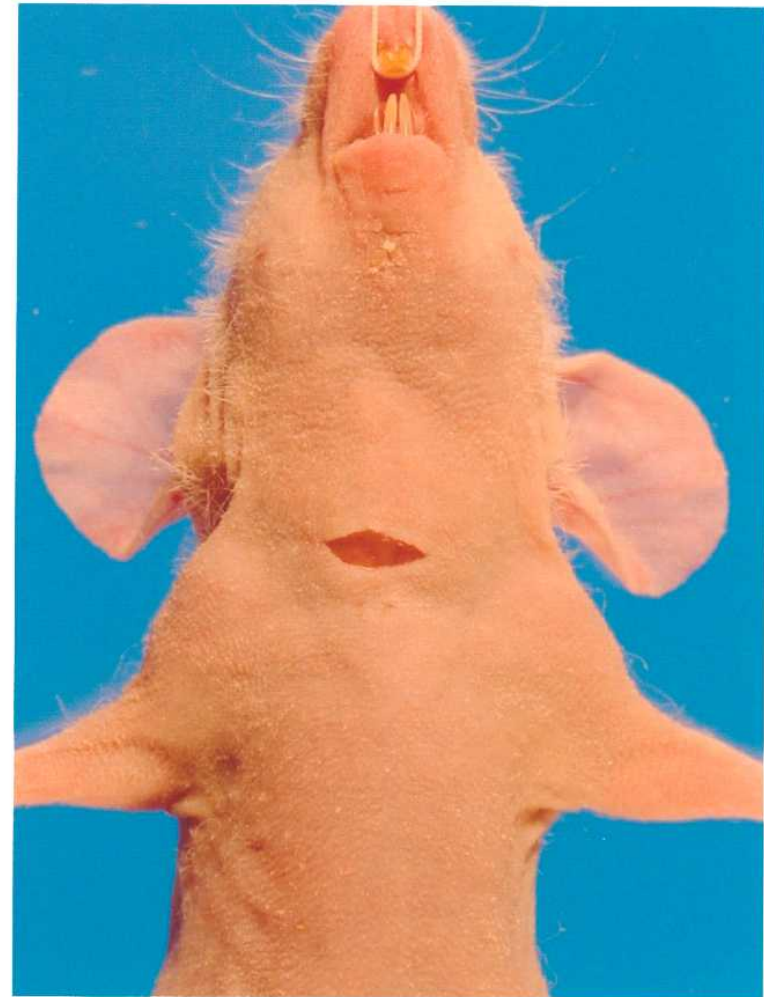


図5. 経気道的移植法
(頸部切開)

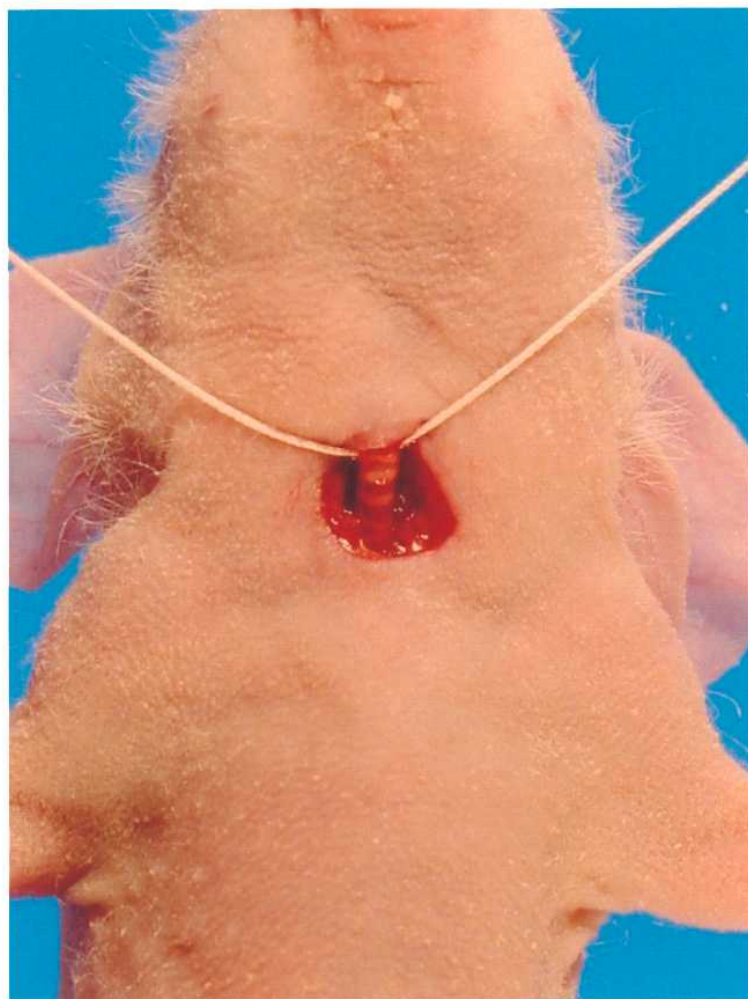


图 6. 经气道的移植法
(气管露出)

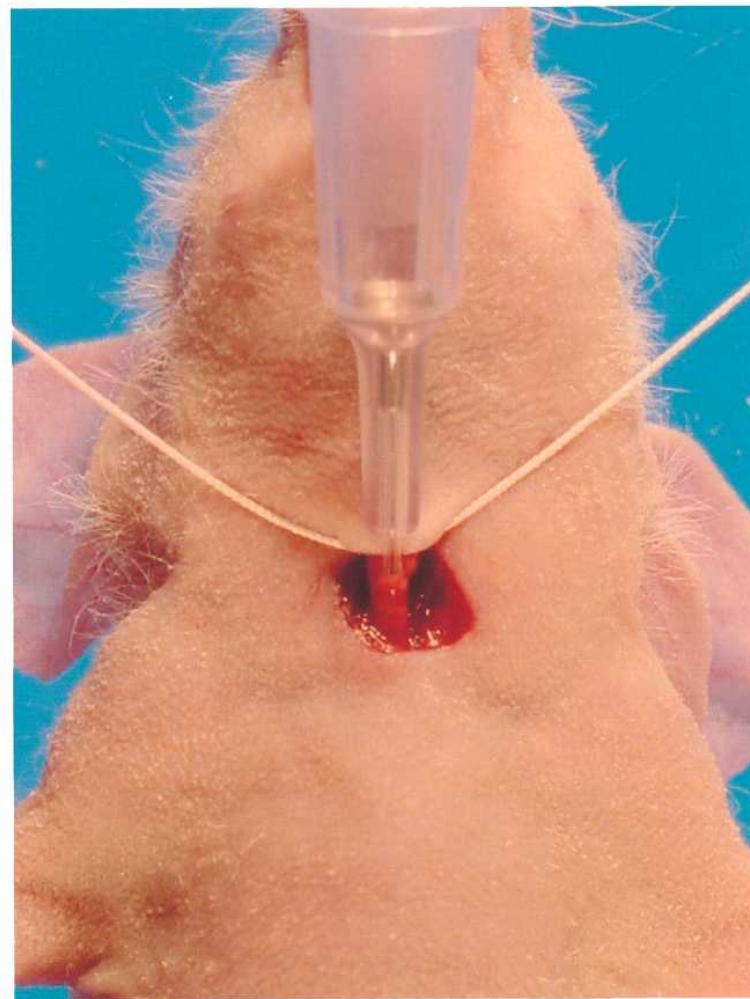


图 7. 经气道的移植法
(24G 静脉内留置针插入)

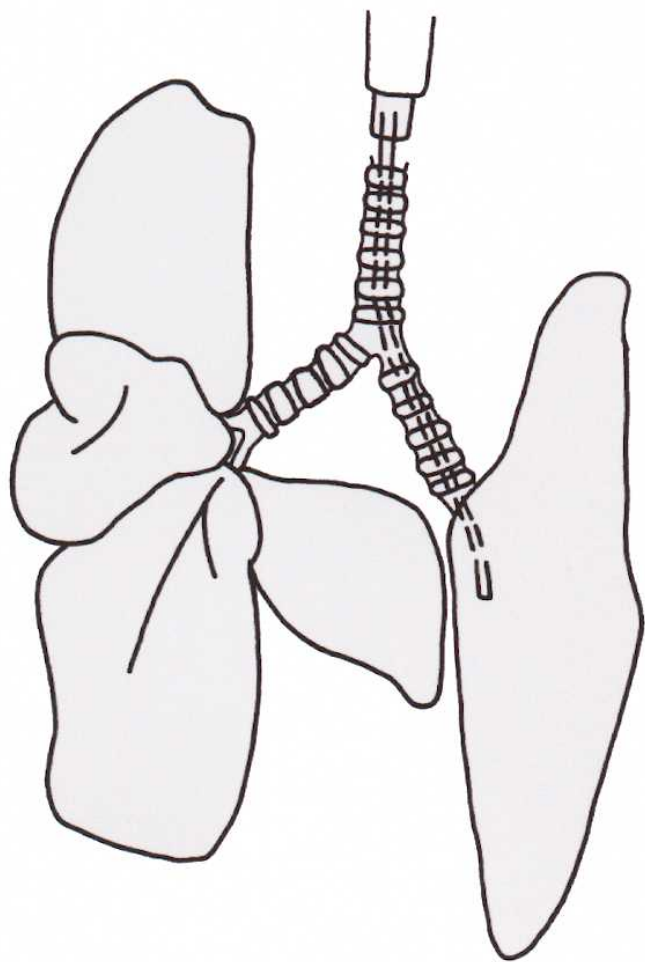


図 8. 経気道の移植法
(カテーテル挿入模式図)



図 9. 経気道の移植法
(カテーテル抜去)

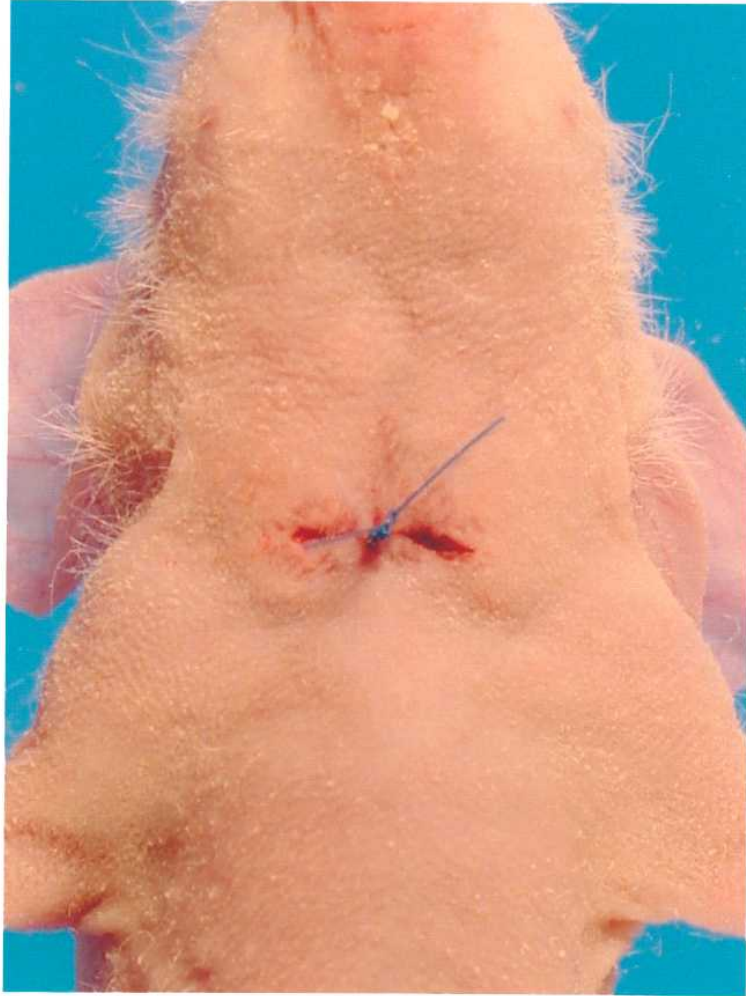


图 10. 经气道的移植法
(皮肤缝合)