—Note—

Experimental Pulmonary Metastasis of Chinese Hamster Mesenchymal Chondrosarcoma Cell Lines

Nobuyoshi FUJISAWA, Norimitsu L. SATO, and Teiichi MOTOYAMA*

*Institute for Laboratory Animals, and *1st Department of Pathology, Niigata University School of Medicine, 1-757 Asahimachi-dori, Niigata-shi, Niigata 951, Japan*

(Received 5 July 1994/Accepted 7 October 1994)

Pulmonary metastases of chinese hamster mesenchymal chondrosarcoma cell lines, MCS-1 (undifferentiated type) and MCS-8 (differentiated type), were examined by intravenous transplantation into athymic nude mice.

The incidence of pulmonary metastasis of MCS-1 was 100% and that of MCS-8 was 33% at the 23rd day after transfer. Mean number of metastatic nodules in the lung was 41 in the former and only 3 in the latter. Mean survival time of mice with MCS-1 injection (5×10^4 cells) was 27 days and that with MCS-8 (5×10^4 cells) was 48 days after transfer. At the 42nd day after transfer of MCS-8, however, the incidence of pulmonary metastasis was 100%. These data suggest that the tumor growth rate in the metastatic lesion, as well as the affinity to the target organ, is very important for evaluation of experimental metastasis. —KEY WORDS: mesenchymal chondrosarcoma, metastasis, lung

チャイニーズハムスター間葉型軟骨肉腫細胞株による実験的肺転移

藤沢信義・佐藤徳光・本山悌一*

新潟大学医学部附属動物実験施設

* 新潟大学医学部病理学第一講座

間葉型軟骨肉腫は、ヒトでも稀な腫瘍であるが、未分化な間葉細胞が増殖するなか分化した軟骨島が形成されるという特徴的な組織形態を示す [5, 12, 16, 18]。放射線療法や化学療法は著効なく、外科的切除後の局所再発や、肺転移をきたしやすいとされている [10, 13, 15]。

我々は、チャイニーズハムスターの頬袋部に自然発生した間葉型軟骨肉腫から培養細胞株を樹立し、さらに幾つかのクローンを分離し、その特性を調べてきた。今回、既にその諸性格を明らかにしてある2種のクローン株 [8] を用い、ヌードマウスにおける実験的肺転移を試み、その結果、転移の評価に関する重要な事柄を見出したので報告する。

供試動物：CD-1 (ICR) 系ヌードマウスの雄および雌 (6~8週齢)、計37匹を用いた。これらのマウスは床敷 (ホワイトフレーク、日本チャールスリバー) を入れたプラスチックケージ (MT-1, W143 × D293 × H148 mm, 日本チャールスリバー) に3~4匹収容し、ラミナフローラック内で飼育した。市販固型飼料 (CE-2, 日本クレア) と水道水をオートクレーブ滅菌して自由摂取させた。照明は、12時間明 (6:00~18:00), 12時間暗 (18:00~6:00) とした。また室温は $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度は 40~70% に維持した。

細胞の調整と移植：未分化な軟骨肉腫細胞のみよりなる MCS-1 株と、*in vitro* で容易に分化し得る軟骨肉腫細胞からなる MCS-8 株を 10% 牛胎仔血清加 Eagle's

MEMで培養後、同液に浮遊し、各々 5×10^4 個/匹をヌードマウス尾静脈内に注射した。

転移率：直径0.5 mm以上の転移結節を有するものを転移陽性として転移率を調べると、移植23日目では、MCS-1群では100% (9/9)、MCS-8群では33% (3/9)であり、前者が有意に高かった (Table 1)。しかし、後者の移植42日目における転移率は100% (9/9)となり、長期観察をすれば、両者の転移率そのものには差がないことがわかった。

肺転移結節数：実体顕微鏡下に観察されるすべての転移結節を有柄針を用いて単離した後、直径をノギスで計測した。直径0.5 mm以上の平均結節数は、移植23日目の観察でMCS-1腫瘍群が41個/肺、MCS-8腫瘍群が3個/肺とMCS-1腫瘍群が有意に多かった (Fig. 1)。両細胞の肺転移巣における増殖速度の差を

考慮して、MCS-8細胞移植42日目の肺転移結節を数えたところ、直径0.5 mm以上の結節は平均20個/肺と増加していた。

肺転移巣の組織像：MCS-1群の転移巣はすべて未分化な腫瘍細胞から成っていた (Fig. 2)。他方、MCS-8群の転移巣は、顕微鏡的微小転移巣はすべて未分化な腫瘍細胞から成っていたが、大型になり、特に直径1 mmを超えるようなものでは全例腫瘍性軟骨芽細胞ないし軟骨細胞が含まれていた (Fig. 3)。

死亡までの日数：静脈内に移植してから、死亡するまでの平均日数は、MCS-1群で27日、MCS-8群で48日であった (Table 1)。死因はMCS-8群でみられた肝転移による1例を除いて、すべて肺転移によるものと考えられた。

これまで、腫瘍の転移実験には、マウスのメラノー

Table 1. Experimental pulmonary metastases of MCS-1 and MCS-8 cells

	MCS-1	MCS-8
Cell characteristics	Undifferentiated cell	Capable of differentiation to cartilaginous direction
Incidence of pulmonary metastasis ^{a)}		
23 days after i.v. injection	9/9 (100%) ^{b)}	3/9 (33.3%)*
42 days after i.v. injection	—	9/9 (100%)
No. of metastatic nodules in the lung ^{a)}		
23 days after i.v. injection	41 ± 22 (n=6) ^{c)}	3 ± 2 (n=6)**
42 days after i.v. injection	—	20 ± 16 (n=6)
Survival time (Days after i.v. injection)	27 ± 6 (n=6) ^{c)}	48 ± 15 (n=7)**

a) Metastatic nodules ≥ 0.5 mm in diameter. b) No. of mice with metastasis/examined. c) Mean $\pm$ S.D.; Statistically significant differences between MCS-1 and MCS-8 at * $p < 0.05$ by χ^2 -test, ** $p < 0.05$ by t-test.

Fig. 1. Macroscopic findings of metastasized lungs. MCS-1 cells formed far more metastatic nodules in the lung (left side) than did MCS-8 cells (right side).

マ [6, 14], 線維肉腫 [19, 23], リンパ肉腫 [1], 乳癌 [17] などの培養細胞が使われている。間葉型軟骨肉腫細胞を用いた転移実験は、われわれが知るかぎり本報が最初である。

一般に、転移実験の評価のしかたには幾つかの問題がある。連続組織切片の光顕による観察から求めることは、時間もかかり繁雑であるため、これまでは実体顕微鏡により肉眼的に肺表面に認められる結節を数える方法が多くとられてきた [21, 22]。また、不明瞭な小結節を可視化するために、肺実質を色素で染める方法なども試みられている [21]。ほとんどの転移結節は、肺表面あるいは表面に近い部位にあるといわれてきたが [7, 21], 本腫瘍では肺深部にも多数の結節が存在していた。そのため、われわれは実体顕微鏡下にこれらを有柄針で単離し転移結節数としたが、この方法がより正確と考える。転移偽陽性結節の混入を防ぐため、今回は直径0.5 mm以上のもののみを数えたが、直径0.5 mm以下のものであっても単離可能なものはすべて数え、かつ、それらをすべて組織標本化して確認する方が、より正確であろう。

次に、転移能を比較する場合、腫瘍移植後のある時点における転移結節数 [14, 19] や、肺重量の差 [19] で論じられることが多いが、MCS-8細胞のように肺に生着した細胞が結節として視認し得る大きさに達する

までかなりの時間を要するものも存在する。転移率の評価は長期観察によってもなされるべきであろう。

Table 1 に示したように、短期観察ではMCS-8細胞の肺転移率はMCS-1細胞と比べ著しく低いように見えるが、長期にわたって観察すると動物の数からみた転移率には差のないことがわかる。このことは、組織学的検索結果を考慮すると、次のように2段階に分けて説明できる。形態的に分化した軟骨肉腫細胞は転移能を欠いてしまうため、尾静脈に注入されたMCS-8細胞のすべてが転移に関与できるわけではない。つまり、同じ細胞数注入されても、転移に直接関われる細胞数はMCS-1細胞の方が多い。しかし、さらなる分化能が有るか無いかにかかわらず、両細胞株の未分化な形態をした細胞の転移能には著差は無いように思われる。したがってMCS-1細胞に比べれば数は少ないながらもMCS-8細胞も肺に生着する。次に、転移生着後、MCS-1細胞は分化能が無いため増殖が速く、MCS-8細胞は分化傾向を示すため増殖が遅い。以上のことが短期観察における転移率の違いや死亡までの日数の違いとして現れるものと考えられる。

一方、腫瘍細胞の臓器選択性の存在が知られている [9, 14, 19]。MCS-8群の中で1例のみ肝転移がみられたが他はすべて肺転移のみであったので、間葉型軟骨肉腫細胞の主たる標的臓器は肺であると考えられ、ヒ

Fig. 2. Histologic findings of MCS-1 cell tumor in the lung. The tumor was composed of only undifferentiated cells. Hematoxylin-Eosin, $\times 170$.

Fig. 3. Histologic findings of MCS-8 cell tumor in the lung. The tumor contained foci showing cartilaginous differentiation. Hematoxylin-Eosin, $\times 170$.

ト臨床例の実際とも合致する。これは、肺が最初のフィルターとなるためかもしれない。チャイニーズハムスターの細胞を用いた肺転移実験としては、他にChadwickらが肺線維芽細胞株CCL39をヌードマウスに移植し、自律増殖能と転移能の関係を調べたものがある[2]。しかし、臨床的に実際に起っている事象を問題にすると、われわれのMCS株細胞による実験系はより有用であると思われる。

要 約

チャイニーズハムスター間葉型軟骨肉腫由来の2種のクローン細胞株を用い、実験的肺転移の病態を比べた。未分化型細胞のみよりなるMCS-1株と、軟骨への分化能を持つMCS-8株において、ヌードマウス静脈内移植23日目の転移率は、それぞれ100%と33%、肉眼的転移結節数は平均41個と3個であった。また、移植後生存日数は、それぞれ平均27日と48日であった。しかし、MCS-8移植42日目には、その転移率も100%となった。以上の結果から、両者の転移像の相違が明らかとなった。また、転移能を論じるときは、転移臓器への腫瘍細胞生着率が問題となるが、その際、転移部位における腫瘍の増殖速度を特に考慮する必要がある。

文 献

- [1] Brunson, K.W. and Nicolson G.L. (1978). *J. Natl. Cancer Inst.*, **61**, 1499-1503.
- [2] Chadwick, D.E. and Lagarde, A.E. (1988). *J. Natl. Cancer Inst.*, **80**, 318-325.
- [3] Chambers, A.F., Hill, R.P., and Ling, V. (1981). *Cancer Res.*, **41**, 1368-1372.
- [4] Cifone, M.A. and Fidler, I.J. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6949-6952.
- [5] Dahlin, D.C. and Unni, K.K. (1986). *In Bone Tumors*, pp.260-268. Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Illinois.
- [6] Fidler, I.J. and Kripke, M.L. (1977). *Science*, **197**, 893-895.
- [7] Fidler, I.J. (1978). *Methods Cancer Res.*, **15**, 399-439.
- [8] Fujisawa, N., Sato, N.L., and Motoyama, T. (1991). *Lab. Anim. Sci.*, **41**, 590-595.
- [9] Hart, I.R., Talmadge, J.E., and Fidler, I.J. (1981). *Cancer Res.*, **41**, 1281-1287.
- [10] Huvos, A.G., Rosen, G., Dabska, M., and Marcove, R.C. (1983). *Cancer*, **51**, 1230-1237.
- [11] Kripke, M.L., Gruys, E., and Fidler, I.J. (1978). *Cancer Res.*, **38**, 2962-2967.
- [12] Lichtenstein, L. and Bernstein, D. (1959). *Cancer*, **12**, 1142-1157.
- [13] Evans, H.L., Ayala, A.G., and Romsdahl, M.M. (1977). *Cancer*, **40**, 818-831.
- [14] Nicolson, G.L., Brunson, K.W., and Fidler, I.J. (1978). *Cancer Res.*, **38**, 4105-4111.
- [15] Salvador, A.H., Beabout, J.W., and Dahlin, D.C. (1971). *Cancer*, **28**, 605-615.
- [16] Shimo-oku, M., Okamoto, N., Ogita, Y., and Sashikata, T. (1980). *Acta, Ophth.*, **58**, 831-840.
- [17] Takeda, K., Hatakeyama, K., Tsuchiya, Y., Rikiishi, H., and Kumagai, K. (1991). *Int. J. Cancer*, **47**, 413-420.
- [18] The JOA Musculo-skeletal Tumor Committee. (1990). *General Rules for Clinical and Pathological Studies on Malignant Bone Tumors*, pp.76-79, Kanehara Publishing Co., Tokyo.
- [19] Tsuruo, T., Yamori, T., Naganuma, K., Tsukagoshi, S., and Sakurai, Y. (1983). *Cancer Res.*, **43**, 5437-5442.
- [20] Wang, N., Yu, S.H., Liener, I.E., Hebbel, R.P., Eaton, J.W., and Mckhann, C.F. (1982). *Cancer Res.*, **42**, 1046-1051.
- [21] Wexler, H. (1966). *J. Natl. Cancer Inst.*, **36**, 641-645.
- [22] Wood, J.S., Jr., Holyoke, E.D., Clason, W.P.C., Sommers, S.C., and Warren, S. (1954). *Cancer*, **7**, 431-433.
- [23] Yamori, T., Iida, H., Tsukagoshi, S., and Tsuruo, T. (1988). *Clin. Expl. Metastasis*, **6**, 131-139.