ヒト腺様嚢胞癌のヌードマウス舌への移植による頸部転移, 肺転移実験モデルの確立

西松成器・梅田正博・島田桂吉

Establishment of an experimental model of lymph node and pulmonary metastasis from human adenoid cystic carcinoma by transplantation into the tongue of nude mouse

Naruki NISHIMATSU・Masahiro UMEDA・Keikichi SHIMADA

Abstract: Adenoid cystic carcinoma (ACC) is a characteristic malignant tumor that grows very slowly but frequently metastasizes to the lung. To establish a metastasis model of ACC, we transplanted three human orthotopically ACC tissues (KOA-1: solid pattern, KOA-2: cribriform pattern, and KOA-3: solid pattern) into the tongue of nude mice, and performed histologic examinations after 3 months. The results were as following:

- 1) Each type of ACC was transplantable into the tongue of nude mice, with success rates from 38% to 67%.
- 2) Histologic patterns of the transplanted ACC in nude mice were similar to those of specimens obtained from patients during operation.
- 3) Cervical lymph node metastasis was found in the KOA-1 and KOA-2 groups.
- 4) Lung metastasis was found in the KOA-1 and KOA-2 groups.
- 5) This is a new animal model for metastasis from ACC. It is expected to be useful for future studies of metastasis from ACC and its treatment.

Key words: adenoid cystic carcinoma (腺様嚢胞癌), orthotopic transplantation (同所性移植), metastasis (転移), experimental model (実験モデル)

緒 言

転移は癌の最も特徴的な生物学的活性のひとつで、多数のステップを経て成立する複雑な現象である。これまで転移の機序を解明する目的でさまざまな実験モデルの開発が進められてきたが、一般に実験動物は自然転移を起こしにくく、従来は *in vivo* の転移モデルとしては癌細胞を直接脈管内に移植する経脈管移植モデルが中心であった¹⁾。これに対し近年、癌をそれが発生した臓器と同じ臓器に移植する同所性移植を行う

と転移を生じやすいという報告が成され²⁾、以後、いくつかの領域の癌において同所性移植による自然転移モデルが開発されてきた^{3, 4)}。口腔領域においても川越ら^{5, 6)}、川尻ら⁷⁾、Fitch ら⁸⁾、Dinesmen ら⁹⁾により同所性移植実験が報告されているが、これらはいずれも扁平上皮癌 (squamous cell carcinoma: 以下 SCC) が対象であり、腺様嚢胞癌 (adenoid cystic carcinoma: 以下 ACC) の *in vivo* 転移モデルの報告はこれまでなかった。

ACC は唾液腺原発の悪性腫瘍で、口腔領域の癌腫では SCC に次いで頻度が高いが、増殖が緩慢な反面、局所再発や肺転移の頻度が著しく高く、有効な治療法は少ないのが現状である¹⁰⁾。今回われわれは、ACC の転移の機序の解明や治療法開発の基礎となるべく、転移モデルの開発を試みることにし、ヒト ACC 組織を

神戸大学医学部口腔外科学講座

(主任: 島田桂吉教授)

Department of Maxillofacial Surgery, Kobe University School of Medicine (Chief: Prof. Keikichi Shimada)

受付日: 平成10年 2 月16日

写真1 腫瘍の移植方法

写真3 KOA-2 (cribriform pattern 優位) 採取元腫瘍 (HE 染色 ×40)

写真2 KOA-1 (solid pattern 優位) 採取元腫瘍 (HE 染色 ×100)

写真4 KOA-3 (solid pattern & cribriform pattern 混在型) 採取元腫瘍 (HE 染色 ×100)

ヌードマウス舌に移植, 生着や転移について組織学的に観察したのでその結果を報告する。

研究材料と方法

移植材料は口蓋, 口底, および上顎洞の小唾液腺原発の ACC 患者の原発巣切除時に採取した腫瘍組織で, それぞれ KOA-1, KOA-2, KOA-3 と名づけた。採取した組織片をただちに直径 1~3mm に細切, RPMI 1640 に洗浄し, 移植針を用いて日本チャールズリバー社製 BALB/cANCrj-nu/nu ヌードマウス背部皮下に移植した。3 か月後に皮下に生着した腫瘍を摘出し同様に細切, 移植針につめヌードマウス舌中央部に移植した (写真1)。KOA-1 は 26 匹 (以下 KOA-1 群), KOA-2 は 5 匹 (以下 KOA-2 群), KOA-3 は 3 匹 (以下 KOA-3 群) のヌードマウス舌に移植したが, KOA-1 群の個体が多くなったのは KOA-1 は皮下で大きく増殖したため組織量が多量に採取できたためである。舌移植 3 か月後に屠殺し, 舌, 頸部リ

ンパ節, 肺を摘出, ホルマリン固定パラフィン切片とし, HE 染色を施した。舌は正中を通る矢状面で全割した。なお, すべての動物実験は「神戸大学医学部動物実験に関する指針」にしたがって実施した。

結 果

1. 移植材料の組織学的所見

KOA-1 の患者採取腫瘍は, 大部分が充実性胞巣からなる solid pattern 優位の組織像を示し, 一部に trabecular pattern もみられた。KOA-2 の患者採取腫瘍は, ほとんど全体が篩状の偽嚢胞構造を伴う典型的な cribriform pattern よりなり, solid pattern を示す部位はみられなかった。KOA-3 の患者採取腫瘍は一部 cribriform pattern を含むが大部分は solid pattern を示していた (写真2~4)。

KOA-1・2・3 腫瘍組織片をヌードマウス皮下に移植したところいずれも生着を認めたが, 移植 3 か月後の時点で KOA-1 は大きく増殖していたのに対し,

表1 ACC 移植の生着率と転移率

移植材料	生着率	頸部転移率*	肺転移率*
KOA-1	10/26 (38%)	2/10 (20%)	1/10 (10%)
KOA-2	2/5 (40%)	2/2 (100%)	1/2 (50%)
KOA-3	2/3 (67%)	0	0

* 転移個数/生着個数

写真5 KOA-1 舌生着腫瘍 (HE 染色 ×100)

写真6 KOA-1 舌脈管浸潤 (HE 染色 ×100)

写真7 KOA-2 舌生着腫瘍 (HE 染色 ×40)

写真8 KOA-3 舌生着腫瘍 (HE 染色 ×200)

KOA-2および3の増殖は非常に緩慢であった。いずれの腫瘍も周囲組織との境界は明瞭で圧迫性に増殖していた。皮下移植腫瘍の組織像は患者採取腫瘍と類似しており、KOA-1ではsolid pattern、KOA-2ではcribriform pattern、KOA-3ではsolid patternの組織像を示した。

2. ヌードマウス舌移植腫瘍の組織学的所見 (表1)

KOA-1群では26匹のヌードマウス舌に移植され、そのうち10匹 (38%) で組織学的に生着が確認された。

移植腫瘍の組織像は皮下移植腫瘍と類似した solid pattern よりなる腫瘍細胞の充実性増殖よりなっていた (写真5)。生着腫瘍の周囲組織との境界はおおむね明瞭であったが、皮下移植の場合と異なり線維性被膜は存在せず、腫瘍細胞は直接舌筋組織と接触、浸潤している所見が認められた。また一部に脈管浸潤がみられた (写真6)。

KOA-2群では5匹のヌードマウス舌に移植され、そのうち2匹 (40%) で組織学的に生着が確認された。移植腫瘍の組織像は皮下移植腫瘍と類似した cribriform pattern よりなる腫瘍細胞の胞巣状増殖よりなっていた (写真7)。周囲組織との境界は明らかではなく、舌筋内に腫瘍胞巣が散在性に認められた。

KOA-3群では3匹のヌードマウス舌に移植され、そのうち2匹 (67%) で組織学的に生着が確認された。移植腫瘍の組織像は皮下移植腫瘍と類似した solid pattern よりなる腫瘍の増殖よりなり、一部に多量の細胞外基質の産生が認められた (写真8)。やはり周囲

写真9 頸部リンパ節転移腫瘍肉眼所見

T: tongue 舌

L: lymph node 頸部リンパ節

S: submandibular gland 顎下腺

写真10 KOA-1 頸部リンパ節転移腫瘍
(HE 染色 ×40)

写真11 KOA-2 頸部リンパ節転移腫瘍
(HE 染色 ×40)

写真12 KOA-1 肺転移腫瘍 (HE 染色 ×100)

写真13 KOA-2 肺転移腫瘍 (HE 染色 ×100)

組織との間に被膜は存在せず、直接舌筋内に浸潤していた。

3. 頸部転移および肺転移 (表1)

頸部転移は KOA-1 群, KOA-2 群の移植 3 か月後の動物のそれぞれ 2 匹ずつにみられた。摘出時肉眼的所見としては、舌とは明らかに離れた右側または左側顎下部に顎下腺と接した形で、単発性のやや腫大したリンパ節様腫瘍としてみられた (写真 9)。組織型はいずれも原発巣腫瘍と非常に類似しており、KOA-1 群では一部に腺管様構造を伴う solid pattern, KOA-2 群では cribriform pattern よりなっていた (写真 10, 11)。

肺転移は KOA-1 群, KOA-2 群の移植 3 か月後の動物のそれぞれ 1 匹ずつにみられた。肺摘出時、肉眼的には異常は認められなかったが、組織学的には KOA-1 群では一部に腺管様構造を伴う solid pattern, KOA-2 群では cribriform pattern を示す腫瘍胞巣の微小転移巣が散見された (写真 12, 13)。

考 察

ACCは唾液腺由来の悪性腫瘍で、発育は緩慢であるが局所再発や遠隔転移の頻度が著しく高く、口腔癌の中でも特徴的な性格を有している。ACCの組織型は、一般にはtubular pattern, cribriform pattern, trabecular pattern, solid patternの4者に分類されるが、一つの腫瘍内にさまざまな組織型がみられたり、それぞれの移行型がみられたりすることも多い。ACCの組織型と臨床経過との関連性については、これまで多くの報告がなされてきた¹¹⁻¹⁹⁾。solid patternを含む症例では予後不良とするものが多く¹¹⁻¹⁷⁾、Szantoらはsolid patternの含まれる割合によりACCの組織型をgrade Iからgrade IIIの3段階に分類することを提唱している¹⁰⁾。これに対し両者の関連性はないとする報告も少なくなく^{18, 19)}、われわれも小唾液腺由来ACC27例において、組織型と予後との関連性は認められなかったことをすでに報告した⁹⁾。このようにACCの組織型の臨床的意義については不明な点も多く、今後さらに検討する必要がある。

ACCの手術では肉眼的に十分な安全域をとって切除しても組織学的に腫瘍細胞の残存を認めることも多く、完全切除を行うためには広範囲切除が必要である。^{11, 20)}。しかし腫瘍の組織学的残存があっても予後は決して悪くはなく、QOLを犠牲にしてまで拡大切除を行うよりも、通常の切除に術後照射を併用すればよいとの報告も多い^{12, 21)}。

ACCは肺への血行性転移が多く、文献的には17~67%の転移率が報告されている⁹⁾。当科の27例では5年で55%, 10年で79%の累積肺転移率であった⁹⁾。一方頸部転移は扁平上皮癌に比べてまれとされており、当科の27例では頸部転移は4例(14.4%)にみられたのみであった。

以上のようにACCは緩慢な発育、高い局所浸潤能、高い血行性転移率という、非常に特徴的な性格を持った悪性腫瘍であるが、その機序については不明な点も多い。そこで今回われわれは、これらACCの生物学的活性の解明に関する基礎的研究や治療法開発の一助となるべく、臨床像に類似したACCの転移モデルの作製を試みた。

癌の転移とは、局所浸潤、脈管内侵入、全身への播種、脈管壁への塞栓と離脱、転移巣での増殖、免疫機構からの逸脱など、多数の複雑な過程を経て成立するものである。近年転移に関する研究が盛んになってきたが、これはさまざまなin vitro, in vivoの転移モデルの開発によるところが大きい。in vivoで高率に転移を生じるモデルを作製するためには、樹立細胞株を実験動物の血管内に移植し、低頻度で生じた転移性の細胞を再度移植これを繰り返すことにより高転移性細胞を得るin vivoセレクション法、あるいはin vitro

で細胞をクローニングしたりさまざまな処理を施して高転移性細胞を得るin vitroセレクション法などがある¹⁾。しかし、これらの転移モデルは転移の微細な機序の解明には有用であるが、転移の最も初期の過程である局所浸潤や脈管内侵入を再現することはできず、臨床腫瘍に類似した転移モデルとしては適当ではない。癌転移に関係するすべての過程を再現するためには、癌細胞を動物の皮下などに移植して転移を生じさせる自然転移モデルが望ましいが、一般にはヌードマウス移植腫瘍は局所浸潤や転移を起こすことはまれとされてきた。しかし最近では、癌をそれが発生した臓器と同じ臓器に移植する、いわゆる同所性移植を行うと、移植癌でも転移を生じやすいことを明らかにし²⁾、以後、いくつかの領域において同所性移植による転移モデルが開発されてきた^{3, 4)}。

一方、口腔癌領域においてもいくつかの転移モデルが報告されている。化学発癌モデルとしては以前からDMBA誘導ハムスター舌癌や頬嚢癌があるが、Takeらはこの発癌モデルにおけるリンパ節転移についてその原発巣の組織学的所見と関連づけて検討し、臨床腫瘍と類似したリンパ節転移モデルであると述べている²²⁾。同所性移植モデルとしては、川尻ら⁷⁾が高転移性のOSC19細胞をヌードマウス口底に移植し、局所浸潤やリンパ節転移を生じたと報告した。川越らは通常の皮下移植では転移を生じないHSC-2, 3, 4細胞、さらには臨床腫瘍組織片をヌードマウス舌に移植し、同様に局所浸潤やリンパ節転移を認めたと報告している^{5, 6)}。しかしこれらはいずれもSCCの転移モデルであり、ACCの実験モデルの報告はこれまでなかった。

今回われわれが行った研究では、個体数は少ないものの、これまでヌードマウス移植や細胞樹立が困難とされてきたACCにおいても、ヌードマウス舌への移植によって舌への生着や頸部転移、肺転移を生じることが明らかにされた。なおKOA-1, KOA-2とも現在ヌードマウス皮下で継代中である。

ACCの舌への生着率はKOA-1群で38%, KOA-2群で40%, KOA-3群で67%であったが、これらは川越ら^{5, 6)}が報告したSCCの生着率と比べて低いものであった。またSCCの場合は移植後1か月で移植癌は舌のほぼ全体を占拠し、それ以上放置すると動物は摂食障害のため死亡することがあるのに対し、ACCの場合は3か月後でも腫瘍の増殖はわずかで、両者の増殖速度の差が本実験モデルでもよく保持されていた。また組織型についてもその採取元患者の組織型とよく一致しており、特に、KOA-1, 3はsolid pattern優位、KOA-2はcribriform pattern優位と互いに異なった組織型よりなるため、両者の生物学的活性を比較検討するのに有用と考えられた。舌筋内での増殖状態は川越ら^{5, 6)}のSCCの場合と同様、周囲組織とは被

膜を介さず、筋組織との直接の接触、浸潤が認められた。

頸部転移については、個体数が少なくその頻度については明らかではないが、KOA-1, KOA-2において確認できた。ACCの頸部転移は臨床では一般に少ないと考えられている¹⁰⁾が、実際には不顕性の転移もあると思われ、実際の転移様相は不明な点も多い。また前述のように、臨床ではsolid patternを含む腫瘍は頸部転移を生じやすいと考えられるが¹⁰⁾、本実験モデルでは個体数が少ないため、組織型別の検討は不可能であった。肺転移についても、川越らのSCCの実験では肺転移は報告されていない^{5, 6)}のに対し、KOA-1, KOA-2の両者で確認され、しかも舌移植腫瘍がそれほど大きく増大していない時点ですでに多発性の肺転移を認めているのが特徴的であった。肺転移を生じた動物は体重減少など肉眼的に特に変化はみられず、摘出肺の組織学的検索にて初めて診断可能な微小転移であったが、これは臨床のACC患者においても、肺転移を生じた後も長期間臨床症状なしに生存する場合が多いことと類似しており、興味深い所見であった。今後はマウスをさらに長期間生存させた上で、転移巣腫瘍の変化などについても検討を行いたい。

以上のように、本実験モデルは前述のACCの臨床像と類似した所見を示すことが明らかになった。今後、細胞外基質産生や接着分子の発現からみた転移機序の解明²³⁾や、転移予防のための治療法の開発など、本実験モデルを用いてACCに関するさまざまな研究に取り組む予定である。

結 語

ACCの転移モデルの確立を目的として3種類のヒトACC組織(KOA-1・3: solid pattern 優位, KOA-2: cribriform pattern 優位)をヌードマウス舌へ移植し、3か月後に組織学的に観察したところ、以下の結果を得た。

1. いずれのACCとも舌への生着がみられ、生着率はKOA-1: 10/26 (38%), KOA-2: 2/5 (40%), KOA-3: 2/3 (67%)であった。

2. ヌードマウス移植腫瘍の組織像は患者採取摘出物組織像と類似していた。

3. KOA-1群とKOA-2群のそれぞれ2匹に頸部リンパ節転移が認められた。

4. KOA-1群とKOA-2群のそれぞれ1匹に肺転移が認められた。

5. 本実験モデルは新しいACCの動物転移モデルであり、今後ACCの転移やその治療に関する研究に有用と考えられた。

本論文の一部は第51回日本口腔科学会総会(1997年4

月, 新潟)において発表した。

文 献

- 1) 矢守隆夫: 世界における転移モデル動物実験の総括. 実験医学 12: 1060-1064 1994.
- 2) Fidler, I.J.: Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. clowes memorial award lecture. Cancer Res 50: 6130-6138 1990.
- 3) Nakajima, M. and Chop, A.M.: Tumor invasion and extracellular matrix degradative enzymes: regulation of activity by organ factors. Semin Cancer Biol 2: 115-127 1991.
- 4) 渡邊昌彦, 久保田哲朗, 他: ヒト癌同所性移植による転移モデルの作製. 実験医学 12: 1065-1069 1994.
- 5) 川越弘就, 梅田正博, 他: ヒト口腔癌組織のヌードマウス舌への同所性移植による浸潤, リンパ節転移モデルの作製. 口科誌 44: 563-568 1995.
- 6) 川越弘就, 梅田正博, 他: ヒト口腔扁平上皮癌細胞および組織片のヌードマウス舌への同所性移植による浸潤・リンパ節転移に関する実験的研究. 神大医紀 58: 1-13 1997.
- 7) 川尻秀一, 熊谷茂宏, 他: 口腔扁平上皮癌の浸潤と転移の機序に関する実験的研究 第3報: ヌードマウス口腔内移植法の口腔癌転移モデルとしての応用. 口科誌 42: 534-540 1993.
- 8) Fitch, K.A., Somers, K.D., et al.: The development of a head and neck tumor model in the nude mouse. Head Neck Oncol Res 187-190 1998.
- 9) Dinensmen, A., Haughey, B., et al.: Development of a new in vivo model for head and neck cancer. Otolaryngol Head Neck Surg 103: 766-774 1990.
- 10) 西松成器, 梅田正博, 他: 小唾液腺原発腺様嚢胞癌27例の臨床病理学的研究 組織像, 治療法と予後との関連性について. 口腔腫瘍 9: 81-92 1998.
- 11) 白砂兼光, 川本真奈美, 他: 腺様嚢胞癌の増殖様式. 日口外誌 36: 2538-2543 1990.
- 12) Kim, K.H., Sung, M.W., et al.: Adenoid cystic carcinoma of the head and neck. Arch Otolaryngol 120: 721-726 1994.
- 13) Dal Maso, M. and Lippi, L.: Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: A clinical study of 37 cases. Arch Otolaryngol Head Neck 120: 721-726 1985.
- 14) Szanto, P.A. and Luna, A.M.: Histologic grading of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. Cancer 54: 1062-1069 1984.

- 15) Perzin, K.H., Gullance, P., et al.: Adenoid cystic carcinoma arising in salivary glands: A correlation of histologic features and clinical course. *Cancer* 42: 265-282 1978.
 - 16) Chomette, G., Auriol, M., et al.: Adenoid cystic carcinomas of minor salivary glands. Analysis of 86 cases. *Virchows Arch Pathol Anat* 395: 289-301 1982.
 - 17) 松田耕策, 手島貞一: 頭頸部腺様嚢胞癌66例の臨床病理学的検討 - 予後因子について -. *日口外誌* 40: 438-453 1994.
 - 18) 浅井昌大, 菅澤 正: 当科における腺様嚢胞癌症例の検討. *頭頸部腫瘍* 17: 12-15 1990.
 - 19) 遠藤壮平, 木田亮紀, 他: 頭頸部腺様嚢胞癌30症例の検討. *頭頸部腫瘍* 16: 48-52 1989.
 - 20) Spiro, R.H., Huvos, A.G., et al.: Adenoid cystic carcinoma of salivary origin. A clinicopathologic study of 242 cases. *Am J Surg* 128: 512-520 1974.
 - 21) 熊埜御堂浩, 大野芳裕, 他: 頭頸部腺様嚢胞癌40症例の臨床的検討. *頭頸部腫瘍* 22: 191-196 1996.
 - 22) Take, Y., Umeda, M., et al.: Lymph node metastases in hamster tongue cancer induced with 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA): association between histological findings and the incidence of neck metastases, and the clinical implications for patients with tongue cancer. *Br J Oral maxillofac Surg* (in press).
 - 23) Shirasuna, K., Sato, M., et al.: A neoplastic epithelial duct cell line of human salivary gland origin. *Cancer Res* 53: 147-152 1993.
-