GFP 遺伝子導入ラット舌扁平上皮癌細胞株を用いた 肺微小転移に対する TS-1 の転移抑制効果

関 泰*, **・中西速夫**
阿部 厚*・大野ふみ*, **
木下篤敬*, **・竹内伸一*
田中あづさ*・安井昭夫*
立松正衛**・栗田賢一*

Effects of TS-1 on lung micrometastases as evaluated with a green fluorescent protein (GFP)-tagged rat tongue squamous carcinoma cell line

SEKI Yasushi *, **・NAKANISHI Hayao **・ABE Atsushi *
OHNO Fumi *, **・KINOSHITA Atsutaka *, **
TAKEUCHI Shinichi *・TANAKA Adusa *
YASUI Akio *・TATEMATSU Masae **
KURITA Kenichi *

Abstract: [Purpose] Lung metastases in patients with tongue cancer are resistant to various therapies, resulting in poor outcomes. In the present study, we examined whether such lung metastases are controllable by adjuvant chemotherapy targeting micrometastases in the lung. We used a micrometastasis model using a rat tongue carcinoma cell line (RSC3) tagged with the green fluorescent protein gene (RSC3LM-GFP) in nude mice. [Methods] Lung metastases were formed after intravenous (i.v.) injection of $1 (3) \times 10^5$ tumor cells in a low (high) metastasis model. TS-1 (5-fluorouracil derivative) (20mg/kg) was orally administered from day 1 post-injection (early administration) and from day 7 post-injection (late administration) 5 times per week for 3 weeks. Mice bearing lung metastases underwent autopsy 4 weeks after injection, and the lungs were removed. The numbers of lung metastases were determined by GFP fluorescence. [Results] Lung metastasis including micrometastasis could be clearly visualized under illumination with blue light. In the low metastasis model, GFP-positive metastatic nodules in the lung were more strongly reduced by early TS-1 oral administration than by late administration ($p < 0.003$). Survival was also much longer in mice with early TS-1 treatment than in those with late treatment in the low metastasis model ($p < 0.02$), but not in the high metastasis model. [Conclusion] These results indicate that the sensitivity of lung metastases of tongue carcinoma to TS-1 depends on the timing of drug administration and the number of metastases. Small numbers of micrometastases in the lung at an early stage are most susceptible and can be effectively eliminated by chemotherapy targeting micrometastasis, leading to longer survival of mice.

Key words: lung metastasis (肺転移), micrometastasis model (微小転移モデル), chemotherapy (化学療法), TS-1 (S-1), GFP (緑色蛍光蛋白質)

* 愛知学院大学歯学部口腔外科学第1講座
(主任: 栗田賢一教授)

** 愛知県がんセンター研究所腫瘍病理学部
(主任: 立松正衛部長)

* The First Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
School of Dentistry, Aichi-Gakuin University (Chief: Prof.

KURITA Kenichi)

** Division of Oncological Pathology, Aichi Cancer Center
Research Institute (Chief: TATEMATSU Masae)

受付日: 2005年7月21日

採択日: 2006年1月31日

緒 言

診断や治療技術の進歩により、口腔領域における悪性腫瘍の治療成績は年々向上してきている。最近の報告では、5年生存率が60～80%にまで達しているものの、転移のみられる症例での5年生存率は依然として低く25～50%程とされている^{1～5)}。

口腔領域の代表的な癌である舌癌では術後の血行性転移の頻度は頸部リンパ節転移に比べ低いものの、いったん転移すると治療は極めて困難であり、重要な予後不良因子である。血行性転移を効果的に抑制する治療法を開発するためには術後補助療法の標的である微小転移の抗癌剤感受性などの生物学的特性に関する基礎的理解が必須である。近年、UICCによりいわゆる微小転移は直径0.2mm以下のIsolated tumor cell (ITC, 狭義の微小転移)と0.2～2mmのmicrometastasis (MM, 広義の微小転移)に分けて考えることが推奨されるようになってきた⁶⁾。通常の組織学的染色では検出に困難を伴う、いわゆる微小転移とは前者のITCに相当すると考えられることから、本論文ではこの狭義の“微小転移”を微小転移と定義した。この微小転移の検出は免疫染色を含めた組織学的検討に頼らざるを得ず、したがって微小転移に対する化学療法の抑制効果の検討は、手技が複雑で、定量性も乏しいなどの理由からほとんど行われてこなかった。

近年、*LacZ* 遺伝子 (β galactosidase) 導入により、組織学的検索によらずして微小転移を可視化することが可能になってきたが⁷⁾、この場合でも組織の固定と染色が必要であり、微小転移をリアルタイムに観察することは不可能であった。これに対し緑色蛍光蛋白質 (Green fluorescent protein, 以下 GFP) はオワンクラゲ由来の発光蛋白質であり、近紫外線を照射するだけで蛍光を発するため、この蛋白質をコードする遺伝子を細胞に導入することにより生きたままの細胞を単一細胞レベルで追跡することが可能となってきた⁸⁾。本法は生体内における転移性細胞のダイナミズムの研究や治療効果の簡便なモニターのための極めて有効な研究手法である^{9～11)}。

今回、この GFP 遺伝子を導入したラット舌癌細胞株 RSC3LM-GFP を用いて、肺微小転移モデルを作成し、これを用いて経口 5-FU 誘導剤 (TS-1) の肺微小転移に対する抑制効果の検討を行った。

材料および方法

1. 実験材料

1) 実験動物

実験動物としては、7週齢・雄性の KSN ノードマウス

(体重 25g～28g・静岡実験動物)を用いた。飼育管理は、愛知県がんセンター研究所動物実験施設にて Laminor Flow Iso-Rack 内で行い、固形飼料、飲料水、床敷ならびにケージはすべて滅菌したものを使用し、可及的無菌状態にて行った。

2) 細胞株

当教室の Takeuchi ら¹²⁾により、4NQO (4-nitroquinoline-oxide) にて誘発したラット舌癌から樹立した RSC3LM 株は血行性およびリンパ行性転移能を有する非角化型の低分化扁平上皮癌細胞株である。実験には本株に GFP 遺伝子 (pEGFP-C1 plasmid, Clontech Lab.) を FuGENE 6 (Roche) を用いてトランスフェクションし、リングクロニングにより選択した RSC3LM-GFP 株^{13, 14)} (血行性およびリンパ行性高転移株。以下 LM-GFP 株)を用いた。培養には DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium, Nissui) に 10% FBS (Fetal bovine serum, Gibco) と 100units/ml の penicillin, 100 μ g/ml の streptomycin (Gibco) を加えた培地を用い、プラスチックシャーレ (Falcon) にて、37℃, 100%湿度, 5% CO₂ 条件下のインキュベーター内で培養し、必要に応じて実験に用いた。また腹水由来の低分化型胃癌細胞株 GCIY (低分化型腺癌) とリンパ節転移巣由来の分化型胃癌細胞株 MKN28 (分化型腺癌) の2種類のヒト胃癌細胞株を対照として使用した。

3) 使用薬剤

抗癌剤としてはテガフル、ギメラシル、オテラシルカリウムの3剤 (モル比 1 : 0.4 : 1) 配合剤である TS-1¹⁵⁾ (大鵬薬品) を用いた。20mg/kg になるように用事調整し、胃チューブにてマウスに強制胃内投与した。TS-1 の溶媒としては hydroxy-propyl-methylcellulose (HPMC, 信越化学) を蒸留水で加温溶解し、0.5% (w/v) HPMC 水溶液として使用した。また TS-1 は肝臓で代謝され 5-FU となるプロドラッグであるため in vitro では使用できず、そのため培養実験では 5-FU (協和醗酵) を使用した。

2. 実験方法

1) LM-GFP 株の特性

① LM-GFP 株の形態および蛍光標識率の検討

LM-GFP 株と親株 LM 株の形態を位相差顕微鏡で観察し、GFP 蛍光標識率は蛍光実体顕微鏡下で細胞 1000 個あたりの GFP 陽性細胞数を観察、算定した。

② LM-GFP 株の増殖能の検討

LM-GFP 株と LM 株を 2×10^4 個になるように調整し、24穴プラスチックシャーレにて培養し、1, 2, 3日目にそれぞれ各4穴の細胞数を血球計算盤にて計測した。

③ LM-GFP 株の転移能の検討

LM-GFP 株と LM 株をそれぞれヌードマウス尾静脈より

図1 TS-1による舌癌肺転移抑制効果評価のための実験デザイン

1×10^5 個/0.3ml 接種し、1週間後の肺転移の有無を組織学的に検討した (各5匹). また両株を 1×10^6 個/10 μ l ずつ足蹠皮下に接種 (f.p.) し (各4匹), 3週間後に屠殺, 解剖し, 膝窩リンパ節への転移の有無を同様に検討した.

④ LM-GFP 株の 5-FU 感受性の検討

LM-GFP 株と対照として2種類のヒト胃癌細胞 GCIY 株, MKN28 株を 4×10^3 個ずつ 96 穴のプラスチックシャーレにて培養, 翌日から 5-FU を 0.1, 1, 10, 100 μ g/ml となるように調整して添加し, 4日後にトリパンブルー染色により生細胞数を各4穴ずつ計測して増殖抑制曲線を作成した.

2) GFP 導入舌癌肺微小転移マウスモデルの確立

①肺転移の評価

LM-GFP 株を 1×10^5 /0.3ml あるいは 3×10^5 個/0.3ml をマウス尾静脈から静注し, 1, 3, 7 日目に屠殺, 肺を摘出した. 肺転移の有無は励起フィルター (420 ~ 480nm) を装着したハロゲン光源 (LG-PS, オリジナル) からの青色光を摘出した肺に照射し, カットフィルター (530nm) を装着した蛍光実体顕微鏡 (SZ40-GFP, オリジナル) により観察を行った. 摘出した肺組織は 10 % 中性ホルマリンで 24 時間固定後, パラフィン包埋し, 厚さ 3 μ m の切片を作成, H-E 染色を施して組織学的にも転移を確認した.

3) TS-1 による肺転移抑制効果の検討

上記, 微小転移モデルを用いて図1に示す実験デザインに従って以下の動物実験を行った.

①高度転移モデル

LM-GFP 株, 3×10^5 個/0.3ml をマウス尾静脈から静注する群を高度転移モデルとし, 翌日より微小転移を標的とし, TS-1 (20mg/kg/day) の週5日連続経口投与 (強制胃内投与, 2日休業) を1クールとして計3クール行った

(早期投与群). また静注後1週間後の肺転移を進行肺転移と設定し, これに対し早期群と同様に3クルールの TS-1 投与を行った (後期投与群). 対照群には溶媒である 0.5 % (w/v) HPMC 溶液の経口投与を行った. 各群6匹ずつのマウスを使用した. 各群3クール終了後にマウスを屠殺, 肺を摘出し, さらにすべての肺葉を切り離し, 全肺あたりの GFP 陽性の肺転移結節数を GFP フィルターを用いて計測し, TS-1 による転移抑制効果を比較検討した. また癒合などにより正確な判定が困難な場合には蛍光実体顕微鏡下で拡大して観察, 算定した. 一部の肺ではノギスを用いて転移結節のサイズを計測した. また肺転移組織の H-E 染色による組織学的な化学療法の効果判定も行った.

②軽度転移モデル

LM-GFP 細胞株を 1×10^5 個/0.3ml をマウス尾静脈から静注する群を軽度転移モデルとし, ①と同様の方法で転移抑制の検討を行った.

4) TS-1 の生存率に及ぼす影響

①高度転移モデル

高度転移モデルを用いて TS-1 (20mg/kg/day) 週5回投与をマウスが死亡するまで行い, 各群の生存率を比較検討した. マウスは各群6匹ずつ使用した.

②軽度転移モデル

軽度転移モデルを用いて, 高度転移モデルと同様の方法で生存率についても検討した.

5) 統計的解析

増殖能や肺転移結節数の比較は student's t-test を用い $P < 0.05$ をもって統計学的に有意とした. また生存率の解析には Kaplan-Meier 法を用い, 生存率の差は Long-rank test で検定した.

図 2 RSC3LM-GFP 株と親株 LM 株の in vitro 細胞増殖能 (A) およびマウス尾静脈からの静注による血行性および足蹠接種によるリンパ行性転移能 (B) の比較
GFP 遺伝子を導入した LM-GFP 株において増殖能、転移能に有意な変化は認められなかった。

結 果

1) LM-GFP 株の特性

① LM-GFP 株の GFP 蛍光標識率の検討

LM-GFP 株は親株 LM 株とほぼ同様の紡錘形の形態を示し (写真 1A), GFP 蛍光標識率は 90 % 以上であった (写真 1B)。

② LM-GFP 株の増殖能の検討

細胞増殖能は LM-GFP 株、親株 LM 株ともにほぼ同等であり、GFP 遺伝子の導入による増殖能の低下は認められなかった (図 2A)。

③ LM-GFP 株の転移能の検討

LM-GFP 株、LM 株ともに静注によりすべてのマウス (5/5) において同等の肺転移がみられた。また足蹠皮下接種により、肉眼的にも明らかな膝窩リンパ節転移をすべてのマウス (4/4) で認め、GFP 遺伝子の導入による血行性転移能およびリンパ行性転移能の低下は認められなかった (図 2B)。

④ LM-GFP 株の 5-FU 感受性の検討

LM-GFP 株の IC₅₀ は約 0.2 μg/ml であり、対照とした胃

図 3 LM-GFP 株の 5-FU 感受性の検討
LM-GFP 株は他の細胞株 (ヒト胃癌細胞株) とほぼ同等の 5-FU 感受性を示した。

癌細胞と比較してほぼ同等の感受性を有していた (図 3)。

2) GFP 導入舌癌肺微小転移マウスモデルの確立

① 肺転移の評価

写真 2 に同細胞 3 × 10⁵ 個/0.3ml を尾静脈から静注した後の、肺転移の経時変化を示す。静注後 1 ~ 3 日目の転移は、組織学的には数個の細胞から成る微小転移であり、肉眼的には検出不可能だが GFP 蛍光により明瞭に検出可能であった。静注後 7 日目になると肺転移は肉眼的にも識別可能であった。1 週目以降、2, 3 週と転移巣はシグモイド曲線状に増大し、4 週後に肺はほぼ転移巣に置き換えられ呼吸不全にて死亡した。1 × 10⁵ 個/0.3ml 静注した場合も、転移個数は少ないものの 1 日目より GFP 蛍光により明瞭に微小転移を観察でき、以後の転移の発育経過も転移個数が少ない以外は 3 × 10⁵ 個接種時とほぼ同様であった。

3) TS-1 による肺転移抑制効果の検討

① 高度転移モデル

早期投与群の肺結節数は平均で 33 個 (5 ~ 68 個)、後期投与群では 168 個 (72 ~ 280 個)、対照群は 214 個 (38 ~ 386 個) であった。対照群と早期投与群の間で有意差 (P = 0.015) がみられたが、対照群と後期投与群では有意な減少は認められなかった (P > 0.50) (図 4A, 写真 3)。

② 軽度転移モデル

早期投与群の肺転移結節数は平均で 2.4 個 (0 ~ 5 個) と顕著な転移抑制効果が認められた。後期投与群では 70 個 (18 ~ 132 個)、対照群は 78 個 (10 ~ 135 個) であった。対照群と早期投与群では P = 0.003 で統計的に有意差がみられたが、対照群と後期投与群では P > 0.50 で有意差は認められなかった (図 4B, 写真 4)。また早期投与群では転移巣のサイズも小さく、一部では微小転移のみであった。組織学的にも腫瘍細胞に強い壊死、アポトーシスおよび変性所見がみられ、TS-1 の抗腫瘍効果が確認された。一

写真1 培養した RSC3LM-GFP 株の位相差像 (A) と蛍光像 (B)

写真2 RSC3LM-GFP 株静注後の肺転移の経時的変化 (3×10^5 個/0.3ml)

明視野像 (上), 蛍光像 (中), 組織像 (下) HE 染色 ($\times 20$)

静注後 1～3 日目では転移は組織学的に数個の癌細胞から成る微小転移である。しかしこれらの肉眼的には検出不能な微小転移も蛍光顕微鏡下では明瞭に検出が可能であった (矢印)。静注後 7 日目には転移は肉眼的にも識別が可能な転移に発育する。

方、後期投与群では核の変性像などがみられたものの、転移巣のサイズは対照群との間に差は認められなかった。

4) TS-1 の生存率に及ぼす影響

①高度転移モデル

早期投与群では平均生存日数が 44.2 日 (38～48 日)、後期投与群は 38.3 日 (33～45 日)、対照群では 31.7 日 (28～36 日) で、早期投与群 ($P = 0.0005$)、後期投与群

($P = 0.014$) とともに、対照群に比べ延命効果がみられ、統計的にも有意差が認められた (図 5A)。

②軽度転移モデル

早期投与群では平均生存日数が 62.7 日 (43～90 日)、後期投与群は 44.8 日 (36～58 日) で、対照群では 32.7 日 (29～36 日) と、早期投与群で顕著な延命効果が認められた ($P = 0.0008$)。また後期投与群 ($P = 0.005$) と対照群

写真3 TS-1による高度転移モデルにおける肺転移抑制
 早期投与群では中等度の転移抑制が認められる、転移結節の大きさも対照群と比較して小さい。一方、後期投与群では有意な転移抑制は認められない。

写真4 TS-1による軽度転移モデルにおける肺転移抑制
 早期投与群では肺転移は著明に抑制されており、数個の目に見えない微小転移がみられるだけであった (矢印)。一方、後期投与群では有意な転移抑制は認められなかった。

図4 TS-1によるLM-GFP株の高度転移モデル(A)および軽度転移モデル(B)における肺転移抑制
* $P < 0.05$, ** $P < 0.0001$, NS; 有意差なし

との間に、さらに早期投与群と後期投与群 ($P = 0.017$) の間にも有意差が認められた (図5B)。また早期投与群の一匹において90日以上長期生存が認められた。屠殺、解剖したところ数個の微小転移の残存が認められるのみであった。

考 察

TS-1は2001年4月より頭頸部癌に対して保険適応がなされ¹⁶⁾、単独投与で著効があった症例報告も多くみられるようになってきた^{16, 17)}。口腔癌の予後不良因子には、頸部リンパ節転移や血行性転移があげられるが、特に血行性転移による遠隔転移のみられる症例の予後は極めて不良であり、不幸な転帰を経験することが多い。なかでも肺は最も多くみられる遠隔転移部位の一つである²⁾。そのため今回、過去に当教室で樹立した高転移性を有するラット舌癌細胞株にGFP遺伝子を導入し、静注後1～3日目の肉眼的には勿論見えず、通常の組織学的検索でも見落とす可能性のある肺微小転移の検出が固定、染色なしに可能なGFP遺伝子導入肺微小転移舌癌モデルを確立し、それをを用いて化

図5 TS-1による高度転移モデル(A)および軽度転移モデル(B)における生存率の改善
軽度転移モデルの早期投与群では後期投与群に比べTS-1により顕著な延命効果が認められた ($P < 0.05$)。

学療法に対する感受性の検討を行った。今回の実験では 3×10^5 個の細胞を静注した場合を高度転移モデル、 1×10^5 個を静注した場合を軽度転移モデルとした。肺転移抑制効果を調べた結果どちらのモデルにおいても、静注後1日目からTS-1の投与を始める早期投与群で対照群と比べ有意な結節数の減少を認めた。しかし後期投与群ではどちらのモデルにおいても有意差は認めず、転移の抑制効果はより早い時期すなわち微小転移のステージから治療を開始することが有効であることが示唆された。同じ早期投与群でも、高度転移モデルに比べ軽度転移モデルにおいては著明な転移個数の減少がみられ、その多くは数個程度の癌細胞から成る微小転移であった。これらのことより、肺の微小転移は進行した転移に比べ相対的にTS-1に対して高い感受性を有することが明らかとなった。さらに転移巣のサイズが小さいことに加えて、転移個数も少ないほど有効であることが示唆された。本実験に用いた軽度転移モデルでは対照群でも数十個の肺転移がみられることから、決して低転移性ではなく、実地の臨床を十分良く反映したモデルであるといえる。このことは臨床的にも微小転移を標的とした早期からの補助化学療法により、単なる転移の抑制だけでなく転移の消失、すなわち転移予防が期待できる可能性を示唆している。

一方、生存率においても、早期投与群および後期投与群で対照群と比較して有意な延命を認めたが、高度転移モデルでは延命はわずかであった。それに対して軽度転移モデルにおいては著明な延命効果を認め、早期投与群では90日を経過しても死亡しないマウスも認められた。この長期生存マウスを屠殺し、解剖を行ったところ、数個の微小転移を認めるのみであった。この微小転移は恐らく消滅はしないが、増殖もしない、いわゆるドーマント（休眠）転移と考えられた。Kurebayashi, Nakanishiらは、*LacZ*遺伝子を導入した微小転移モデルを用いて乳癌や肺癌細胞の5-FU系抗癌剤による微小転移抑制効果を報告している^{18, 19)}。彼らの報告によれば、微小転移の段階から化学療法を開始した場合にだけ顕著な転移抑制がみられるとしており、今回のわれわれの*GFP*遺伝子を導入した舌癌モデルの結果とよく一致する。従来の臨床試験では、術後補助化学療法の明瞭な延命効果が示されておらず、上記動物実験との間に結果の不一致がみられていた。しかし、近年TS-1などの奏効率の高い新しい世代の抗癌剤を用いた大規模な無作為化比較試験の結果が肺癌等において報告され、明らかな延命効果が示されるようになってきた²⁰⁾。これらの結果は臨床的にも微小転移が術後補助化学療法の効果的な標的となりうることを示唆しており、動物モデルから予測された結果が臨床的にも裏づけられつつある。

マウスの死亡時にすべてのマウスにおいて解剖を行ったところ、高度転移モデルのすべての群と、軽度転移モデルの対照群における死亡原因は肺転移結節の増大による肺機能の低下による呼吸不全によるものと考えられた。しかし軽度転移モデルで治療した群の肺では肺転移結節の増大はみられるものの健常な肺組織が残っているマウスが多くみられ、それらのマウスの死亡原因は高度の肺転移による呼吸不全ではなく、藤原ら²¹⁾が報告しているように、縦隔リンパ節転移の腫大による気管圧迫による呼吸困難と考えられた。軽度転移モデルでは早期投与群マウスのほとんどがこれに当たった。これらのことより、早期よりTS-1を投与することにより生存期間の著明な延長など強い肺転移抑制効果が認められるが、肺転移から二次的に発生したと考えられるリンパ節転移には効果が低い可能性が示唆された²²⁾。実際、臨床でも初発転移巣が化学療法によりほとんど治癒状態に至っても二次性の多臓器転移で死亡することは少なからず経験される。

以上の実験結果より、進行した肺転移に比べ、肺の微小転移はTS-1に対して高い化学療法感受性を有することが明らかとなった。また転移個数が少ない軽度の転移では、微小転移を標的とする術後補助化学療法により有意な延命効果が得られること、さらには肺転移消失による治癒の可能性も示唆された。しかし一方、延命による長期生存は逆

に、リンパ節転移など二次性の転移を新たに生み出す可能性があり、今後これに対する治療法の開発も必要になってくるものと考えられる。そのための基礎的な検討を行うため現在、縦隔リンパ節転移巣から細胞株の分離を進めており、薬剤耐性の有無など肺転移巣と縦隔リンパ節転移巣との生物学的な差異について今後検討を進めていく予定である。

結 語

1. 今回我々は、RSC3LM株に*GFP*遺伝子を導入、安定して発現する細胞株を作成し、肺微小転移の簡便な検出が可能な舌癌肺微小転移モデルを確立した。

2. 本モデルを用いてTS-1による転移抑制効果および生存改善効果について検討を行い、進行した肺転移に比べ、微小転移はTS-1に対して高い感受性を有することを明らかにした。また転移サイズが小さいことに加えて、転移個数も少ない場合には、微小転移を標的とする術後補助化学療法により肺転移を消失させ、転移を予防することも可能であることを示唆した。

本論文の要旨は、第23回日本口腔腫瘍学会総会（平成17年2月、東京）において発表した。

引 用 文 献

- 1) 松浦一登, 林 隆一, 他: 舌扁平上皮癌一次治療症例 (274例) の手術治療成績. 頭頸部癌 30: 550-557 2004.
- 2) 川上美夕喜, 池村邦男: 口腔扁平上皮癌患者における多重癌—5年生存率への影響—. 口科誌 53: 9-13 2004.
- 3) 黒川英雄, 山下善弘, 他: 舌扁平上皮癌の浸潤様式からみた治療効果. 癌の臨床 45: 209-213 1999.
- 4) 川崎五郎, 高野美貴子, 他: 舌扁平上皮癌症例の臨床病理学的検討. 口科誌 46: 171-176 1997.
- 5) 佐藤 徹, 成瀬裕久, 他: 口腔領域扁平上皮癌の所属リンパ節転移に関する臨床的, 病理組織学的研究. 日口外誌 42: 662-671 1996.
- 6) Sobin, L.H.: TNM, sixth edition: new developments in general concepts and rules. Semin Surg Oncol 21: 19-22 2003.
- 7) Lin, W.C., Pretlow, T.P., et al.: Development of micrometastases: earliest events detected with bacterial *LacZ* gene-tagged tumor cells. J Natl Cancer Inst 82: 1497-1503 1990.
- 8) Misteli, T. and Spector, D.L.: Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. Nat Biotechnol 15: 961-964 1997.
- 9) Hoffman, R.M.: Orthotopic transplant mouse models with green fluorescent protein-expressing cancer

- cells to visualize metastasis and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 17: 271-277 1999.
- 10) Nakanishi, H., Mochizuki, Y., et al.: Chemosensitivity of peritoneal micrometastases as evaluated using a green fluorescence protein (GFP)-tagged human gastric cancer cell line. *Cancer Sci* 94: 112-118 2003.
 - 11) Nakanishi, H., Ito, S., et al.: Evaluation of chemosensitivity of micrometastases with green fluorescent protein gene-tagged tumor models in mice. *Methods Mol Med* 111: 351-362 2004.
 - 12) Takeuchi, S., Nakanishi, H., et al.: Isolation of differentiated squamous and undifferentiated spindle carcinoma cell lines with differing metastatic potential from a 4-nitroquinoline n-oxide-induced tongue carcinoma in a F344 rat. *Jap J Cancer Res* 91: 1211-1221 2000.
 - 13) 阿部 厚, 中西速夫, 他: GFP 遺伝子導入ラット舌癌細胞株を用いたリンパ行性転移過程の解析 (抄). *口腔腫瘍* 15: 160 2003.
 - 14) 安井昭夫, 阿部 厚, 他: GFP 標識ラット舌癌細胞株の基底膜浸潤能と血管内皮細胞開裂の相違. *愛院大歯誌* 42: 517-523 2004.
 - 15) 白坂哲彦, 佃 守, 他: 新規経口抗癌剤 TS-1 (S-1) -発想から臨床まで-. *癌と化学療法* 28: 855-864 2001.
 - 16) 池田久住, 武部祥宗, 他: TS-1 の投与で消失をみた舌扁平上皮癌の 1 例. *癌と化学療法* 30: 677-679 2003.
 - 17) 山本和美, 尾原清司, 他: 頬粘膜から上顎歯肉, 上顎洞へと進展した口腔扁平上皮癌に対し TS-1 単独投与により CR が得られた 1 例. *癌と化学療法* 31: 635-637 2004.
 - 18) Nakanishi, H., Kobayashi, K., et al.: Chemosensitivity of micrometastases and circulating tumor cells to uracil and tegafur as evaluated using *LacZ* gene-tagged Lewis lung carcinoma cell. *Cancer Lett* 142: 31-41 1999.
 - 19) Kurebayashi, J., Nukatsuka, M., et al.: Postsurgical oral administration of uracil and tegafur inhibits progression of micrometastasis of human breast cancer cells in nude mice. *Clin Cancer Res* 3: 653-659 1997.
 - 20) Kato, H., Ichinose, Y., et al.: A randomized trial of adjuvant chemotherapy with uracil-tegafur for adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med* 35: 1713-1721 2004.
 - 21) 藤原清宏, 安光 勉, 他: 縦隔リンパ節転移を伴う睾丸原発複合組織型胚細胞腫瘍の肺転移 1 切除例. *胸部臨床* 61: 651-655 2002.
 - 22) Akhter, Khaleda.: 口腔扁平上皮癌における 5-FU に関する酵素の発現及び 5-FU に対する耐性獲得に関する研究. *広歯学誌* 35: 81-97 2003.