

## 肺のリンパ管と肺癌の縦隔リンパ節転移

大谷 修 大谷裕子 済木育夫\*

富山医科薬科大学解剖学 \*同大学和漢薬研究所病態生化学

肺癌の早期診断技術は進歩し、外科的治療法も改良されているが、他の悪性腫瘍に比べて肺癌患者の予後は悪い。その原因の一つとして肺癌は縦隔リンパ節に転移しやすいことが挙げられる。肺癌はリンパ行性に縦隔リンパ節に転移すると考えられているが、その転移機構は十分には理解されていない。本研究は、第一にラットを用いて、肺のリンパ管分布を調べ、第二に Green fluorescent protein (GFP) 遺伝子をトランスフェクトした Lewis 肺癌 (LLC) 細胞を同所性にマウス肺に移植し、肺と縦隔リンパ節を共焦点レーザー顕微鏡で観察し、LLC 細胞の移動とリンパ流路との関係を解析した。

### 材料と方法

**鋳型・走査電顕法**：ラットの気管から鋳型剤 (Mercox<sup>®</sup>, 大日本インキ) を注入して鋳型を作製した。実体顕微鏡下で微解剖した後、金蒸着し、走査電顕 (SEM) で観察した<sup>1)</sup>。

**酵素組織化学**：ラットを右心室から生理食塩水で灌流後、4%パラフォルム・アルデヒドで灌流固定した。肺を摘出し、マイクロ・スライサーで約200  $\mu\text{m}$  厚の切片を作製した。リンパ管を褐色に染色するために5'-スクレオチダーゼに対する酵素組織化学を行った<sup>2,3)</sup>。

**LLC 細胞の同所性移植と縦隔リンパ節転移モデル**：Doki ら (1999) の方法に従って、C57BL/6 マウスの左肺に GFP 遺伝子をトランスフェクトした LLC 細胞の Matrigel<sup>®</sup> 浮遊液を移植した<sup>4)</sup>。移植後14~18 日目にエーテルにより安楽死させ、肺と縦隔リンパ節を摘出し、4%パラフォルム・アルデヒドで固定し

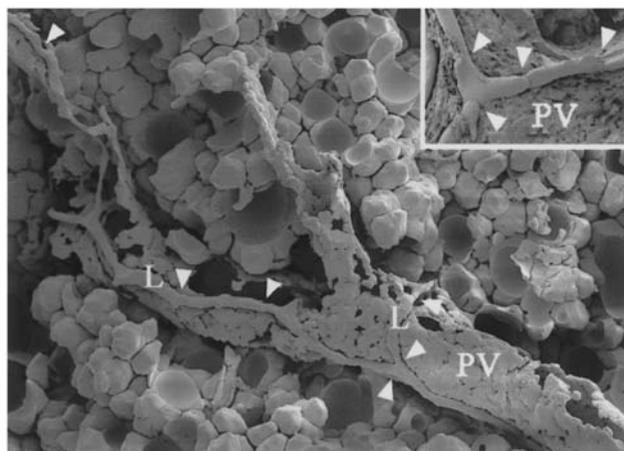


Fig. 1 Scanning electron micrograph of corrosion cast showing lymphatic vessels (L) around the pulmonary vein (PV). Arrowheads indicate constrictions indicative of valve locations of the lymphatic vessels.

た。約20  $\mu\text{m}$  厚のクリオスタット切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

### 結果と考察

SEM と酵素組織化学により、肺のリンパ管は、気管支系および肺動・静脈の周囲にネットワークを形成し、肺門に向かうことが確かめられた (Fig. 1)。臓側胸膜下にも「表層」リンパ管があり、これは「深部」のリンパ管と連絡していた。

共焦点レーザー顕微鏡下で、GFP を持つ LLC 細胞は緑色の蛍光を発し、他の細胞と容易に区別できた。LLC 細胞は移植部位を中心に結節を形成していたが、結節の周囲には孤立して遊走している LLC 細胞が多数みられた。これらの LLC 細胞の多くは気管支系および肺動・静脈周囲に集簇し、リンパ管に入っている像も見られた。

リンパ管を流れてきた LLC 細胞は縦隔リンパ節の被膜下リンパ洞, 中間洞, さらに髄洞に入る. LLC 細胞のあるものは被膜下リンパ洞から直接皮質に遊走し, 結節を形成していた (Fig. 2). また, LLC 細胞がマクロファージに絡まっている像がしばしば見られた.

本研究は同所性に移植された LLC 細胞がリンパ管を通過して縦隔リンパ節に転移する過程を形態学的に明らかにした. また, 本方法は, 癌細胞を明瞭に可視化でき, 癌のリンパ節転移機構の解明および転移抑制法の開発に有用であることを示している.

#### 文献

- 1) Ohtani O, Murakami T: Routine methods for vascular casting and SEM. In: Scanning Electron Microscopy of Vascular Casts: Methods and Applications, PM Motta, T Murakami, H Fujita (eds), Kluwer Academic Publ, Boston, Dordrecht, London, pp 13-25, 1992
- 2) Wachstein M, Meisel E: Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiologic pH. *Am J Clin Pathol* **130**: 153-176, 1957
- 3) Ohtani Y, Ohtani O, Nakatani T: Microanatomy of the rat di-

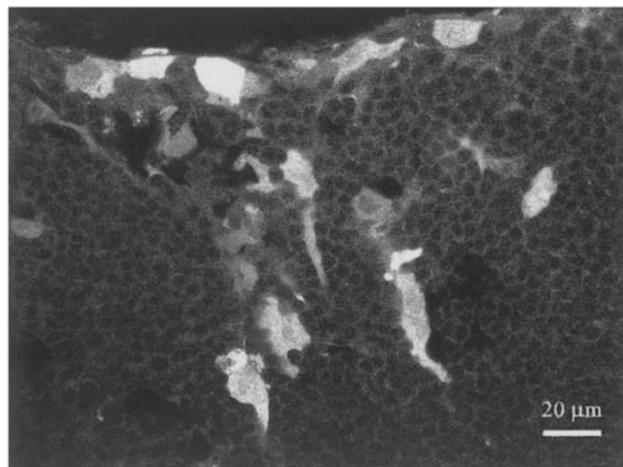


Fig. 2 Confocal micrograph showing LLC cells expressing GFP (white) in the subcapsular sinus and cortex of the mediastinal lymph node of a mouse.

- aphragm: A scanning and confocal laser scanning microscopic study. *Arch Histol Cytol* **56**: 317-328, 1993
- 4) Doki Y, Murakami K, Yamaura T, Sugiyama S, Misaki T, Saiki I: Mediastinal lymph node metastasis model by orthotopic intrapulmonary implantation of Lewis lung carcinoma cells in mice. *Br J Cancer* **79**: 1121-1126, 1999

### Organization of pulmonary lymphatic vessels and metastatic process of lung cancer to mediastinal lymph nodes

Osamu OHTANI, Yuko OHTANI, Ikuo SAIKI\*

*Departments of Anatomy and \*Pathogenic Biochemistry, Toyama Medical and Pharmaceutical University*

Inhibition of lymph node metastasis of lung cancer cells is crucially important for improved prognoses for patients with lung cancer. The organization of lymphatic vessels in rat lung was studied by scanning electron microscopy (SEM) of corrosion casts, and by light microscopy in conjunction with enzyme-histochemistry for 5'-nucleotidase. The metastatic processes of orthotopically implanted Lewis lung carcinoma (LLC) cells transfected with green fluorescent protein gene were studied by confocal microscopy. Networks of lymphatic vessels developed along bronchial trees, pulmonary arteries, and pulmonary veins. In visceral pleura, "superficial" lymphatic vessels continuous with "deep" lymphatic vessels were seen. LLC cells implanted in C57BL/6 mice formed a nodule at the implantation site, but there were also many migrating cells apart from the nodule. LLC cells frequently gathered around the bronchial trees, pulmonary veins, and pulmonary arteries, and some appeared in lymphatic vessels. LLC cells first appeared in the subcapsular sinus of the mediastinal lymph node and then proceeded to the intermediate and medullary sinuses, while some entered the cortex where they formed metastatic nodules. Our study provides a useful model of lung cancer for studying metastatic processes to the mediastinal lymph nodes.

**Key words:** lung, cancer, metastasis, lymphatic vessel, mediastinal lymph node