

Nuclepore 膜利用による脳脊髄液中細胞の 収集と培養* **

京都大学医学部脳神経外科教室 (指導: 半田 肇教授)

織田 祥史 武内 重二 西川 方夫

寺野 允将 半田 肇

〔原稿受付: 昭和47年12月5日〕

Collection and Culture of the CSF Cells with NUCLEPORE Filter Membrane

by

YOSHIFUMI ODA JUJI TAKEUCHI MICHIO NISHIKAWA
MITSUMASA TERANO HAJIME HANDA

Department of Neurosurgery Kyoto University Medical School
(Director : Prof. Dr. HAJIME HANDA)

CSF cytological diagnosis of brain tumors was performed with the new filter membrane "NUCLEPORE", on 12 patients. Dr. Rich, J. R. had already used this technique, and stained the collected cells as they were. In the present study, the collected cells were cultured in vitro from 2 to 14 days to obtain the more accurate diagnosis, and compared with the atlas of the cultured tumor cells that were dispersed with trypsin and/or EDTA.

12 patients consist of 3 pinealomas, 3 medulloblastomas, 2 pituitary adenomas, 1 epidermoid, 2 thalamic gliomas and 1 metastatic carcinoma. Out of them, 3 pinealomas, 2 medulloblastomas, 1 epidermoid, 1 pituitary adenoma and 1 metastatic carcinoma had the cellular growth. The peripheral blood cells used as control were never fixed on the membrane. 2 patients with pinealoma could be histologically determined only by this method before surgical operation. The CSF of one patient of medulloblastoma with negative result was received after X-ray irradiation 7100 R to the brain and spinal axis. One pituitary example held the cellular viability but did not show the vivid cellular growth. One metastatic adenocarcinoma had the lung origin.

This membrane is thin, transparent and unaffected with all fixatives and stains. It does not inhibit the cellular activity. Moreover, the cellular fixation is better than on the glass wares.

* 本研究の要旨は日本神経学会近畿地方会 (第17回) にて発表した。

** 本研究は昭47年度厚生省 "がん研究助成金" を受けた。

緒 言

一般に臓器の悪性腫瘍が容易に転移を来すのに比べて、脳腫瘍では血液脳関門の存在や、その他の臓器特異性などにより他の部位に転移することは非常に稀である。しかし、脳脊髄液を介しての転移は glioblastoma などできどき経験され、また medulloblastoma や pinealoma ではよく見られる所見でもある。これらの事実から脳脊髄液中の遊離細胞を調べ診断治療に応用することは有用であると考えられる。とくに松果体部の腫瘍に関しては直接侵襲が非常に危険性をともなう一方、pinealoma, teratoma, glioma, epidermoid など種々の組織像があり、これにより手術法の選択が大きく左右されるところから、この脳脊髄液細胞診が非常に重要になるものと思われる。

一般に体液中の細胞の収集には①単純塗抹法②遠心分離法③重力沈降法④濃縮法⑤chamber sedimentation method ⑥濾過法などが用いられるが①～⑤は細胞の変形、細胞の損失、操作に長時間を要すること、高価、濃縮不良、cleaning problem などの点から脳脊髄液中の細胞を集めるのには不適當であった。濾過法としては今まで種々の filter が用いられたが、いずれも厚さ、透明度、化学反応性などの点で多くの問題があった。近年 MILLIPORE filter* がこの目的で利用されることが多い。しかしこれも①血液や蛋白が膜にくっつき易い、③膜が固定液や染色液に影響される、③細胞が膜と作用して一部に細胞の変形がおきる、④不透明である等々の欠点をもっている¹⁾。

1965年 General Electric 社ではポリカーボネートフィルムに「飛跡エッチング」技法を応用して NUCLEPore とよぶ membrane filter を作るのに成功した。この膜は前述の欠点をほぼ 100%補い、細胞捕捉²⁾のほか無菌濾過³⁾ 血漿分離にも有用であることが実証された。我々はこの NUCLEPore filter を利用し、脳脊髄液細胞診を行なうとともに、細胞の生物学的活性が100%保たれる^{4,5)}点からこの filter を用い脳脊髄液中の細胞の培養にも成功したので報告する。

材料と方法

材料

1. NUCLEPore filter** (13mm. ϕ , pore size 8 μ)
2. Pop-Top type filter holder**
3. 小角培養ビン
4. シャーレ
5. 眼科用無鉤ピンセット
6. 10ml 注射筒
7. Hanks' 液
8. Phosphate Buffer Solution
9. 培養液 Eagle MEM 85%

Glucose 400mg./dl.

L-Glutamine 292 μ g./ml.

Bovine serum 15%

抗生物質

Streptomycin 100 μ g./ml.

Kanamycin 50 μ g./ml.

Penicillin 50i.u./ml.

10. カバーガラス (22mm. $\times$ 22mm.)
11. デッキガラス (26mm. $\times$ 76mm.)
12. 95% Methyl Alcohol
13. Chloroform
14. Xylor
15. May-Grünwald 染色液
16. Giemsa 染色液
17. カナダバルサム

培養方法

1) 腰椎穿刺又は shunt reservoir より脳脊髄液 (CSF) 約 10ml を採取する。

2) 図1の如く注射筒を Pop-Top 型 holder に接続し、採取した CSF を濾過する。この際細胞の変形を防ぐため重力以外の陽陰圧は避ける。濾液は蛋白、糖その他の生化学検査に利用できる。

3) CSF が完全に濾過されない前に Hanks' 液を 3~5ml 追加し細胞を洗滌する。

4) holder を分解し、NUCLEPore filter を取り出し、細胞面を上方にして 1~2ml の培養液の入った小角培養ビンに入れる。

5) filter membrane は比重 0.94~0.97 であり培養液中に浸って存在できる。もし膜が液面に浮いていても pore size が 2 μ 以上の場合には培養液は十分、膜上面の細胞を栄養しうる。

6) 密封し 37°C にて培養する。

* Millipore Filter Corp. Bedford, Massachusetts.

** 野村マイクロサイエンス K. K.

東京都中央区日本橋本石町 4 の 2 三井第 2 別館

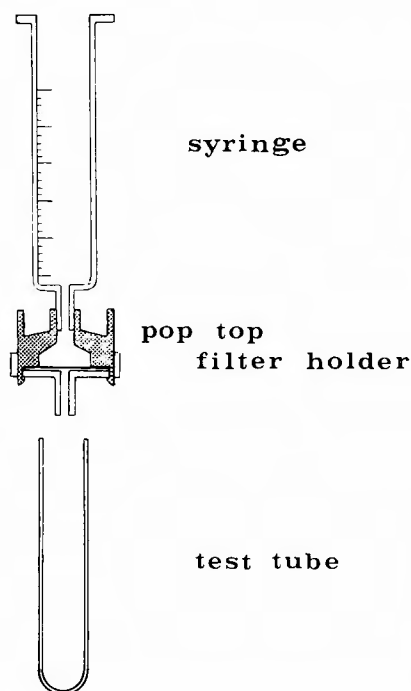


図 1

7) 培養細胞は倒立顕微鏡で容易に観察できる。

細胞の固定と染色法

- 1) 細胞の増殖した NUCLEPORE 膜を小染色ビンに移す。
- 2) P. B. S. で3回洗滌する。
- 3) 95% methanol で2回洗滌する。
- 4) 95% methanol で5～10分固定する。
- 5) May-Grünwald 液原液で5～10分間染色する。
- 6) 10倍稀釈の Giemsa 液で20～30分間染色する。
- 7) 軽く水洗の後、とり出して細胞胞面を内側にし、デッキグラスにのせる。
- 8) 膜の上から paper towel など、軽く圧迫して水分を十分にとる。
- 9) フィルターの細孔の輪郭を消すため膜の中央部にクロロフォルムを2～4滴滴下し、周辺にむかって拡がるのを待つ。シャーレで覆い、クロロフィルムの蒸発はゆっくり行なう。この間、水平位を保ち動揺をさける。
- 10) 標本をキシロールにて処理する。
- 11) カナダバルサムにて封入する。

結 果

現在まで12名の患者で検査を行なった。脳脊髄液の採取は、術前腰椎穿刺時、気脳写の際、術中脳室穿刺の際、緊急短絡術後のシャント reservoir よりの採取などと一定していない。組織像は表1に示したが12例中8例に腫瘍細胞の成長をみた。pinealoma は全例で成功し典型的な two-cell pattern (図2 a.b.) のほか大型細胞の cell fusionの像(図2 c.)も観察さ

表 1

	case	positive case
Pinealoma	3	3
Medulloblastoma	3	2
Pituitary adenoma	2	1
Epidermoid	1	1
Thalamic glioma	2	0
Metastatic adeno-carcinoma	1	1
total	12	8 (67%)

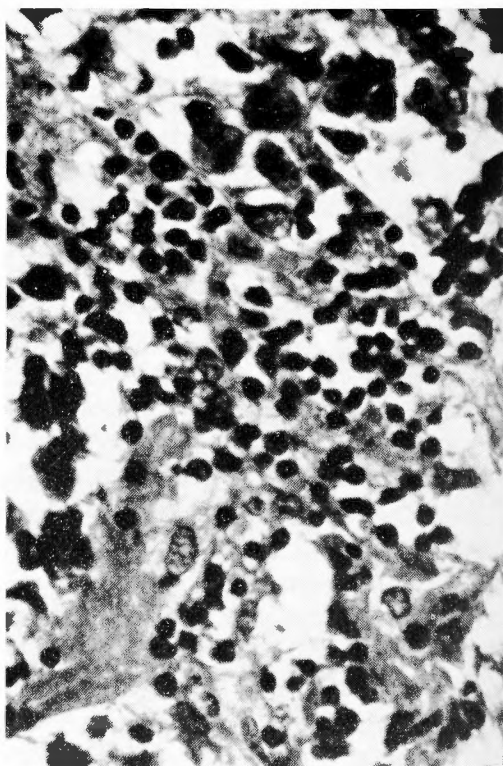


Fig 2. a) pinealoma ; histological specimen, H&E stain, $\times 400$.

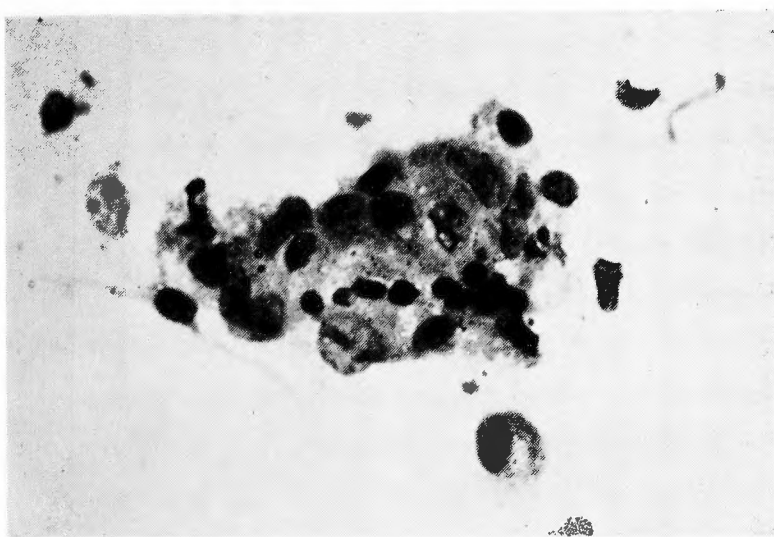


Fig 2. b) the CSF cells of the same patient as 2a, 2 days in vitro ; The typical two-cell pattern constituted by the large bright cells and the small lymphoid cells is noted., Giemsa stain, $\times 400$.

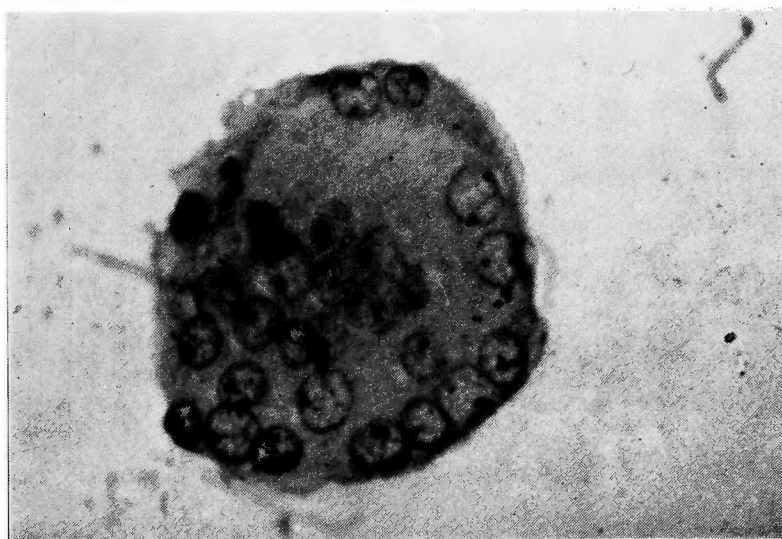


Fig 2. c) same as the above ; The cell-fusion of the large cells looks like the chondromatous appearance., Giemsa stain, $\times 400$.

れた. pinealoma のうち 2 例は本検査だけで術前組織診断が可能であった. medulloblastoma では 3 例中 2 例でリンパ球様細胞を CSF 中に証明した. (図 3 a. b.) medulloblastoma で不成功だった 1 例は Cobalt 7100R を頭部, 脊髄に分割照射した直後の CSF

であり, 破壊された細胞のみしか得られなかった. epidermoid は術中脳室穿刺より得た suprasellar mass の例で多数の細胞増殖をみた. (図 4 a.) 紡錘型細胞の他に多核の細胞も多く見られ, 多くの癒合した細胞集団も認めた, 細胞は fibroblast の混入も多

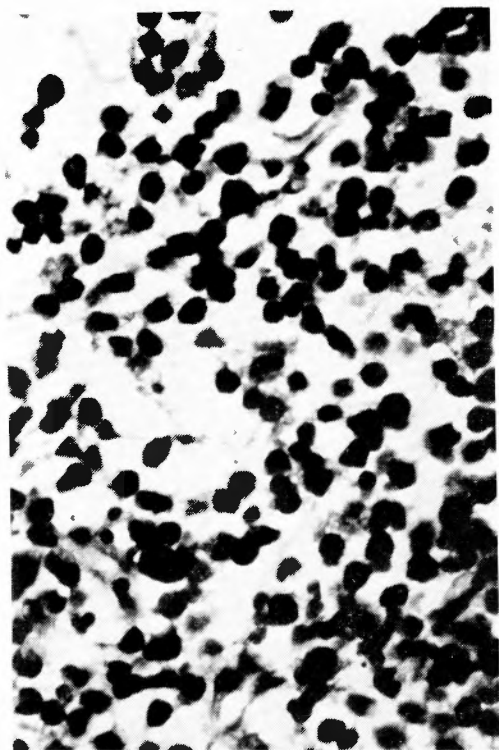


Fig 3. a) medulloblastoma ; histological specimen, H&E stain, $\times 400$.

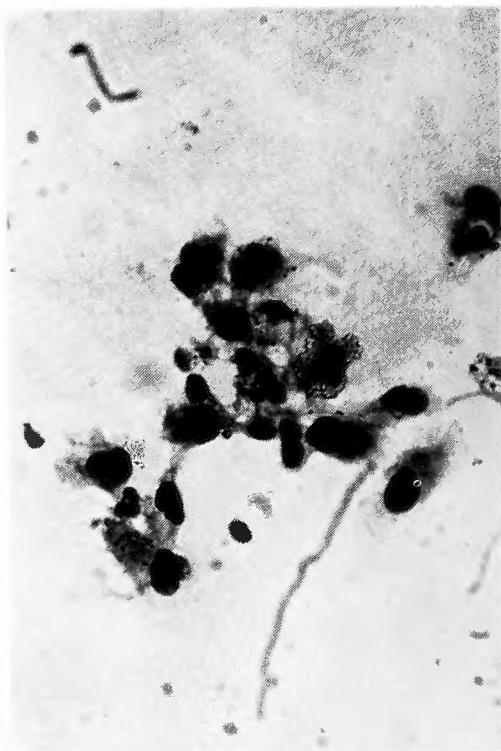


Fig 3. b) the CSF cells of the same patient as 3a, 2DIV; The lymphoid cells with the scanty membranous cytoplasm and the deep stained nucleus are noted, but the nucleolus is masked., Giemsa stain, $\times 400$.

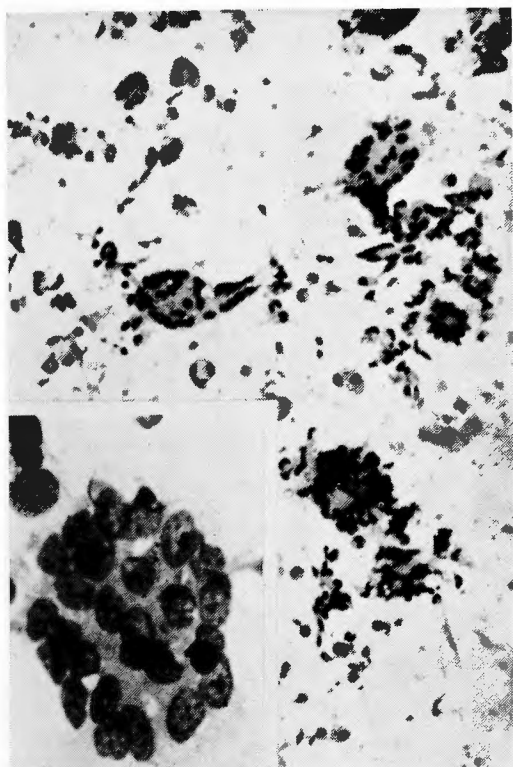


Fig 4. a) the CSF cells of the patient of epidermoid, 2 DIV ; Many spindle shaped, aggregated and multinuclear cells are collected by NUCLEPORE., Giemsa stain. $\times 100$ (in a square bracket ; Giemsa stain, $\times 400$).

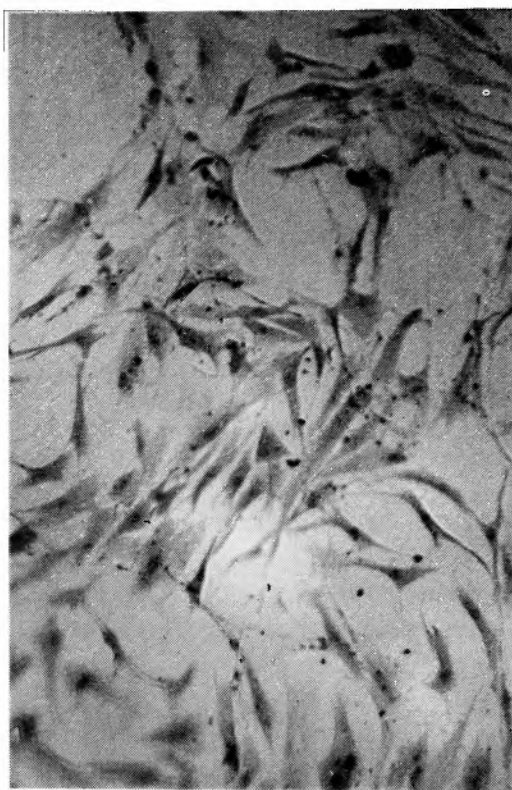


Fig 4. b) same as above, 14 DIV ; The aggregated cells became to show the epitheloid pattern within the long term culture., Giemsa stain, $\times 400$.



Fig 5. a) metastatic adenocarcinoma, histological specimen, H&E stain, $\times 400$.

いが集合した細胞は epithelial origin であることが 14 days in vitro の標本で確認されている。(図 4b) pituitary adenoma では腫瘍細胞の生命力は保たれても群をなして増殖するほどの細胞は得られなかった。metastatic carcinoma の 1 例は lung adenocarcinoma であった。(図 5 a. b.)

考 按

脳脊髄液細胞診は 1903 年 Ravaut⁶⁾ らが記載して以来わずかに 200 例程度の報告をみるにすぎない。これは一つには細胞を集めるのに適当な手段を欠いていたこと、そしてまた剥脱遊離した個々の細胞のみから組織像全体を推定することのむづかしさに原因するものと思われる。我々はこの欠点を補う目的で NUCL-EPORE filter を利用して細胞診を試みた。この膜は 10~13 μ 厚のポリカーボネートの超薄皮膜にウランの中性子を照射して創り出した飛跡を、或る種の化学薬品槽に漬けてエッチングし、均一な口径をもったシ

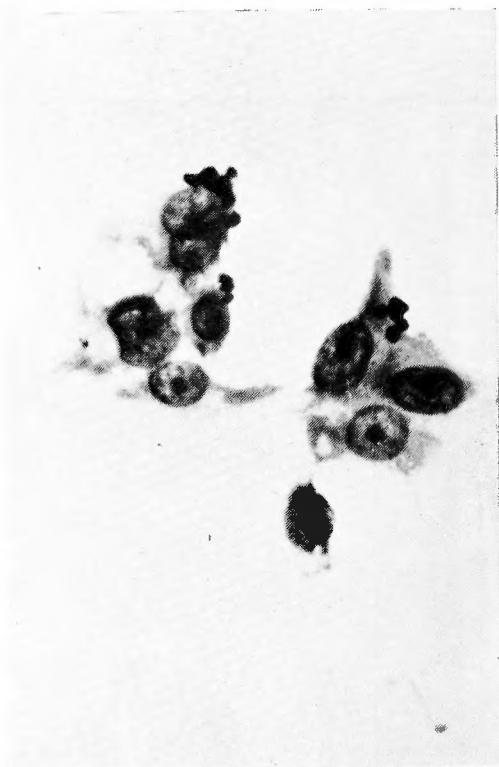


Fig 5. b) the CSF cells from the same patient as 5a; The cells which have the large membranous cytoplasm are noted. The clear, round and phase bright nucleus and one definit nucleolus is respectively noted, so they have the "fish-eye" like appearance., Giemsa stain, $\times 400$.

リンダー状の孔を 1cm² 当り 100~10 億個任意に穿孔したものである。孔口径は 0.2~12 μ まで任意のものが選べるが 8 μ のものを用いることによって赤血球を濾過しうするため^{7,8)}、血液細胞の僅かの部分と CSF 中の腫瘍細胞を選択的に集めることが可能である。また孔面積は膜全表面積の 2% をしめる程度で、腫瘍細胞を 100% 回収することができる⁹⁾。この膜は透明で、今までのセルロース膜のような積層濾材でなく、平面濾過濾材で(図 6, 7)、表面が完全に平滑であるため細胞の変形を来たさず、培地に入れたまま倒立顕微鏡で経時的観察が可能である。また微生物学的に不活性で細胞の fixation がガラス面よりはるかに良好であり、化学的にも安定で、細胞を膜上に載せたまま固定や染色に応用できるといった数々の特長をもっている。要

約すれば、

- 1) 低廉である
- 2) 迅速にできる
- 3) 複雑でない

横断面比較

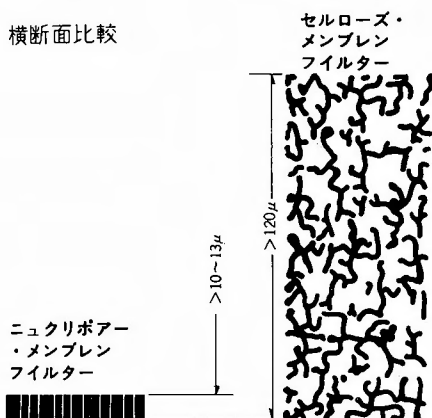
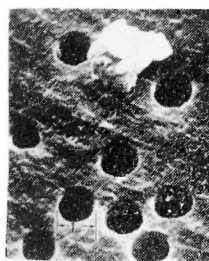
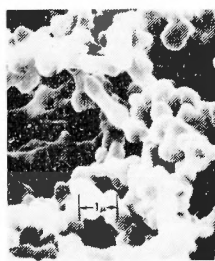


Fig 6 schmatic cross section of the two different filter membrane, NUCLEPORE and other cellulose membrane filter ; NUCLEPORE is more thinner than the latter. The pores of NUCLEPORE are the straight cylinders.

by Scanning electron microscope



Nuclepore



Other

Fig 7 the microscopic surface appearance of the two differennr membrane by the scanning electronmicroscope ; NUCLEPORE has complete flat and smooth surface but other cellulose membrane has spongy construction. Therefore collected cells on the membrane are never deformed by NUCLEPORE.

- 4) 細胞をありのままに分離観察できる
- 5) 細胞の形態と生育力を保持できる
- 5) 細胞回復を100%効果的にできる
- 7) 観察用の細胞を小区域に濃縮できる
- 8) すべての固定剤, 染色剤に耐性がある
- 9) 膜上で細胞増殖ができる

といった特長を備えている。

我々の症例はまだ少数ではあるが腫瘍細胞の証明率は高く, また2~14日の培養期間をおくことによって細胞または細胞相互の生物学的特徴を詳細に検討し, またこれをトリプシン処理した腫瘍細胞の培養像^{10,11,12)}と比較して検討することによって従来に比して診断適中率が飛躍的に向上した。

今後, 他の体液中細胞診断への応用とともに細胞成分, 液性成分の分離研究などに広い応用域をもつものと考えられる。

綜 括

NUCLEPORE filter membrane を応用し, 脳脊髄液中の細胞診を行なった。細胞を濾過収集し, 2~14日 in vitro で組織培養した後, 固定染色した。この方法により患者12例中 pinealoma 3例, medulloblastoma 2例, epidermoid 1例, pituitary adenoma 1例, metastatic carcinoma 1例でCSF中の腫瘍細胞を分離証明した。なかでも pinealoma 2例は, この方法のみで術前組織診断が可能であった。NUCLEPORE filter は透明の平面濾過濾材であり, 耐薬品性が大であるため今後多方面での応用が期待される。

引 用 文 献

- 1) Rich, J.R. : A membrane filter technique for cerebrospinal fluid cytology. J. Neurosurg., 36 : 661-666, 1972.
- 2) Jansson, S.E., kock B. and Wegelius, O. : Separation of mast cells from the peritoneal fluid of the rat with a GE Nucleopore filter. Separatum Experientia, 23 : 407-410, 1967.
- 3) Hahn, R.G., Hatlen, J.B. and Kenny, G. E. : Comparative poliovirus permeability of silver, polycarbonate and cellulose membrane filters. Microbiol., 19 : 317-320, 1970.
- 4) Reynaud, A. J. and King, E.B. : A new filter for diagnostic cytology. Acta Cytol., 11 : 289-294, 1967.

- 5) Batzdorf, U., Knox, R. S., Pokress, S. M. and Kennedy, J.C.: Membrane partitioning of the Rose-type chamber for the study of metabolic interaction between different cultures. *Stain Tech.*, **44** : 71-74, 1969.
- 6) Ravaut, G.J., Widal, I. and Sicard, L.: A propos du cytodagnostic du tabes. *Rev. Neurol.*, **6** : 289-292, 1903.
- 7) Melamed, M. R., Gliffton, E. E., Mercer, C. and Koss, L.G. : The megakaryocyte blood count. *Amer. J. Med. Sci.*, **252** : 81-89, 1966.
- 8) Gregersen, M. I., Bryant, C. A., Hammerle, W. E., Usami, S., et al. : Flow characteristics of human erythrocytes through polycarbonate sieves. : *Science*, **157** : 825-827, 1967.
- 9) Seal, S. H. : A sieve for the isolation of cancer cells and other large cells from the blood. *Cancer*, **17** : 637-642, 1964.
- 10) 多田寛 : 組織培養法による頭蓋内腫瘍の考察. *日. 外. 宝*, **34** : 338-360, 1965.
- 11) 永井政勝, 星野孝夫, 土田富穂, 佐藤文明他 : 脳腫瘍の組織培養アトラス. *脳と神経***19** : 954-961, 1055-1062, 1175-1184, 1967.
- 12) Wilson, C. B. Barker, M. and Slagel, D. E. : Tumor of the central nervous system in monolayer culture. *Arch. Neurol.*, **15** : 275-282, 1966.