

浸潤能から見た脳腫瘍細胞の動態 —Invasion Test による浸潤度と悪性度の関連について—

京都大学医学部脳神経外科学教室（指導：菊池晴彦教授）

奥 村 禎 三

〔原稿受付：昭和62年8月31日〕

Invasive Property of Brain Tumor Cells

TEIZO OKUMURA

Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kyoto University
(Director: Prof. Dr. HARUHIKO KIKUCHI)

Histological diagnosis of malignant brain tumors can be predictive for the prognosis, but clinical courses in some cases may be variable due to their heterogeneity of tumors. Malignant brain tumors, which rarely metastasize to distant organs, are deleterious mainly because of their invasive property in addition to the growth pressure. It is difficult to examine the invasive property in the two-dimensional culture system such as monolayer culture. In order to investigate brain tumor invasiveness, "invasion test" was modified and established.

In the first, invasive property of 4 rat neurogenic cell lines (T₁, 9L, T₁A, T₁B) were examined using modified "invasion test". The new procedure were characteristic in the preparation of multicellular tumor spheroid, which were made from colonies consisting of 20-30 cells by shaker culture at 100 rpm. By these modification the spheroid was able to be obtained constantly in shape and size. On the other hand pulsating heart tissues were obtained from 9-day-old chick embryo and minced into small fragment, then cultured in the shaker at 180 rpm. Spheroid and precultured embryonic chick heart (ECH) fragment were confronted and attached on semisolid agar medium for 2 hrs and then cultured on a gyratory shaker at 100 rpm until 7 days. The invasiveness was examined with hematoxylin-eosin staining and immunostaining using anti-ECH antibody. All examined cell lines were able to form spheroid and highly invasive by invasion test.

After establishment of this invasion assay, this was applied to analyze the invasiveness of human brain tumor specimens. Eighty seven cases, consisting of 58 gliomas, 6 metastatic

Key words: Brain tumor, Invasiveness, Spheroid, Malignancy, Invasion test.

索引語：脳腫瘍，浸潤能，スフェロイド，悪性度，インベージョンテスト

Present address: Department of Neurosurgery, Faculty of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan.

brain tumors, 10 meningiomas, 4 neurinomas, 1 melanoma, 2 craniopharyngiomas, 1 chemodectoma and 1 pituitary adenoma, were investigated. Since gliomas were main target to study, they were more extensively studied and focused than other tumors. As it was difficult to get sufficient number of spheroid from human brain tumors in all cases, minced tumor fragments about 300–500 μm in size was used. About astrocytomas, which were characteristic of invasive growth, traditional histological diagnosis and invasiveness in this system were well correlated in almost all low grade astrocytomas and in 75% of high grade astrocytomas. But discrepancy between histology and invasiveness was observed in 25% of high grade astrocytomas.

Although effects of protease inhibitors on the brain tumor growth and invasion were examined, it was very much difficult to explain the mechanism of invasion in simple theory.

In 10 cases proliferating activity indicated by BrdU (bromodeoxyuridine) labeling index (LI) was examined, but no correlation between LI and invasiveness was observed.

The correlation between invasiveness and prognosis is an important subject and must be evaluated by many factors including histological appearance, proliferative activity and invasiveness. The invasion test is thought to be a simple and useful means to predict the degree of malignancy in vitro.

は じ め に

中枢神経系の悪性腫瘍は種々の集学的治療の進歩にも拘わらず、今なお予後不良の疾患である。他臓器の悪性腫瘍は早期発見、早期治療により原発巣からの転移前に治療が行われることにより、その治療成績は著明に向上している。中枢神経系の悪性腫瘍は神経管外への転移が稀であり、局所的に周囲脳組織を破壊し浸潤進展することがその悪性像の大きな特徴の一つである^{9,41,43)}。悪性脳腫瘍が中枢神経系以外に転移しにくい理由としては、従来から①頭蓋内にリンパ系が存在しない②血液脳関門内の環境下で生育したために、その外では生存しにくい③頭蓋内の血管の中膜が未発達なため腫瘍の局所的圧迫により血管が虚脱しており、腫瘍細胞が血管内へ侵入しにくい④原発巣のために宿主が早期に死亡するために遠隔転移が存在しても無症状に終わる⑤gliomaはadherentであるため腫瘍細胞が原発巣から遊離しにくい^{30,55,59)}などといわれている。

悪性脳腫瘍の治療にあたっては、その浸潤能(invasiveness)を解明することが重要な課題の一つであると考えられる^{8,9,57,58,59)}。しかし、腫瘍と周囲脳組織の間に生じる浸潤のメカニズムについてはいまだよく知られておらず、フラスコ内での単層培養などの二次

元モデルでの解釈は困難であった^{9,34,43)}。本研究では脳腫瘍の浸潤能をin vitroで検討するために、spheroid(multicellular tumor spheroid)を用いた三次元モデルでの実験を行った。従来、能率の悪かったspheroidの作成法にも工夫を加え、Marellらの方法^{33,35,36,37,41)}、⁴²⁾にならい腫瘍塊とrecipientをくっつけた後振盪培養(shaker culture)するinvasion testを考察し脳腫瘍のinvasivenessを検討した。invasion testとは、腫瘍組織塊がrecipientとした組織にどの程度浸潤するかを組織学的に検討するものである。

材料および方法

1) 腫瘍細胞

(1) ラット脳腫瘍細胞株

① T₁, T₁A, T₁B: ethylnitrosoureaで誘発されたラットneurogenic tumor(malignant neurinoma)⁵¹⁾ ② 9L: methylnitrosoureaで誘発されたラットgliosarcoma これら4種類の腫瘍細胞にてspheroidを作成し実験に用いた。

(2) ヒト脳腫瘍組織

開頭術時に摘出した新鮮なヒト脳腫瘍87例を対象とした。本実験の目的は、浸潤性発育を特徴とするグリオーマの浸潤能の検討にあるため、グリオーマ以外の

腫瘍は対象として比較した。症例の内訳は、グリオーマ58例、転移性脳腫瘍10例、髄膜腫10例、神経鞘腫4例、メラノーマ1例、血管芽細胞腫1例、頭蓋咽頭腫2例、下垂体腺腫1例、chemodectoma 1例である。

2) 培養液

Dulbecco's modified eagle MEM (minimum essential medium) (日水) に 0.1 g/l streptomycin sulfate (明治製薬) および penicillin G potassium (万有製薬) 20万単位/l を加えたものを用いた。FCS (fetal calf serum) 濃度はラット株化細胞の単層培養には10%とし、spheroid の作成およびヒト脳腫瘍細胞の維持には20%とした。また、軟寒天培地には最終的に20%となるように調製した。

3) 腫瘍塊の準備

(1) ラット脳腫瘍細胞 spheroid の作成

従来、収穫率の悪かった spheroid 作成法を改善す

るために、single cell suspension から一旦 colony を作り、これを振盪培養することにより spheroid を作成する方法を工夫した (Fig. 1). spinner flask 法との優劣についても、作成される spheroid 径および回収率にて比較した。

colony formation は軟寒天重層法 (soft agar overlay method) ^{17,18,19,23)} によった。すなわち単層培養にて対数増殖期にある細胞を 0.1% trypsin + 0.01% EDTA で処理し 2% FCS 加培養液で 2 回洗浄後 1.0×10^6 /ml の single cell suspension とした。Linbro 6 穴プレート (Flow Laboratories) に下層 agar として 20% FCS 加培養液を含む 0.5% agar を入れ予め固めておき、この上に single cell suspension を $30 \mu\text{l}$ /well ずつ散布し、さらに保温しておいた上層 agar を重層させた。上層 agar は 20% FCS 加培養液を含む 0.3% の semi-solid agar を用いた。寒天は BACTO-

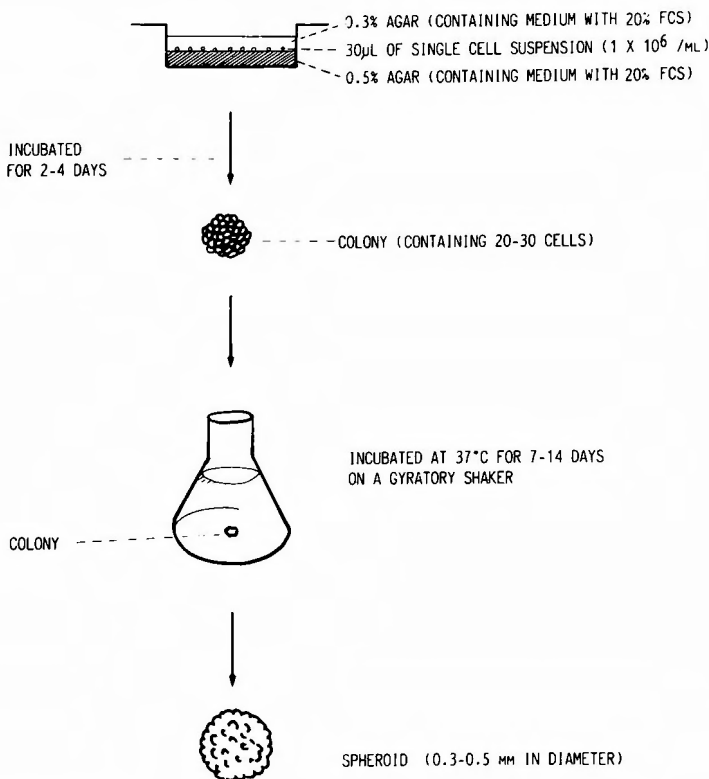


Fig. 1. Spheroid preparation from colony. Colonies are formed by soft-agar overlay method. Thirty microliters of single cell suspension [1×10^6 /ml] is seeded on 0.5% agar layer and overlaid with 0.3% semi-solid agar. After 2-4 days incubation colonies consisting of 20-30 cells are formed. Colonies are incubated at 37°C for 7-14 days on a gyratory shaker at 180 rpm.

AGAR (DIFCO Laboratories) を用いた。37°C, 5%CO₂ の条件下で約3-4日間培養すると肉眼的にも小さな斑点(直径30-50μm)が見えるようになった。このうち細胞数が20-30個の colony を実体顕微鏡下に数個ずつ取出し, 10 ml 三角フラスコ(培養液は5 ml)に移し密栓をしたのち37°C, 100 rpm で振盪培養した。

(2) ヒト脳腫瘍細胞塊の作成

ラット腫瘍細胞株と同様に, ヒト脳腫瘍でも当初 spheroid の作成を試みたが, 次の理由で spheroid の使用を断念し腫瘍片として細切したブロック状の組織を用いた。①はじめのグリオーマ10例で primary culture の後, 単層培養で継代培養を行ったが, passage 10回を越えたものは2例のみであり, さらにこの2例とも充分な数の spheroid を回収することができなかった。すなわち, この10例で spheroid を用いた invasion test が不可能であった。②平行して行っていたブロック状の腫瘍片を用いた invasion test での評価が可能であったので, その後の症例はブロック状の腫瘍片を用い, spheroid とどのような関係を示すかを検討し

た。③グリオーマは heterogenous であることが多いが, とりわけ mixed tumor などでは primary culture の後増殖し cell line となるような cell population は必ずしもその腫瘍全体を反映しているとはいえない。当然, heterogenous な腫瘍組織をそのまま用いる場合にもこの危険性は伴うが, ラット腫瘍細胞株 spheroid との比較でいかなる差が出るかを検討することも有意義であると考えた。具体的には, 手術時に摘出した腫瘍組織を清潔な状態で直ちに 20%FCS 加培養液に入れ, 鋏で細切し実体顕微鏡下で一辺が300-500 μm のブロックをサンプルとして選んだ。腫瘍の heterogeneity の問題があるため, サンプルとした部分の HE 標本も同時に作成し組織診断の基準とした。

4) recipient tissue の作成

invasiveness を評価する recipient として brain tissue を用いるべきであるが, 考察で述べる理由のために Mareel^[33,34,36,37] に準じて embryonic chick heart (ECH) を用いた。ニワトリの受精9日卵から胎児を摘出し実体顕微鏡下に拍動している心臓を取り出し,

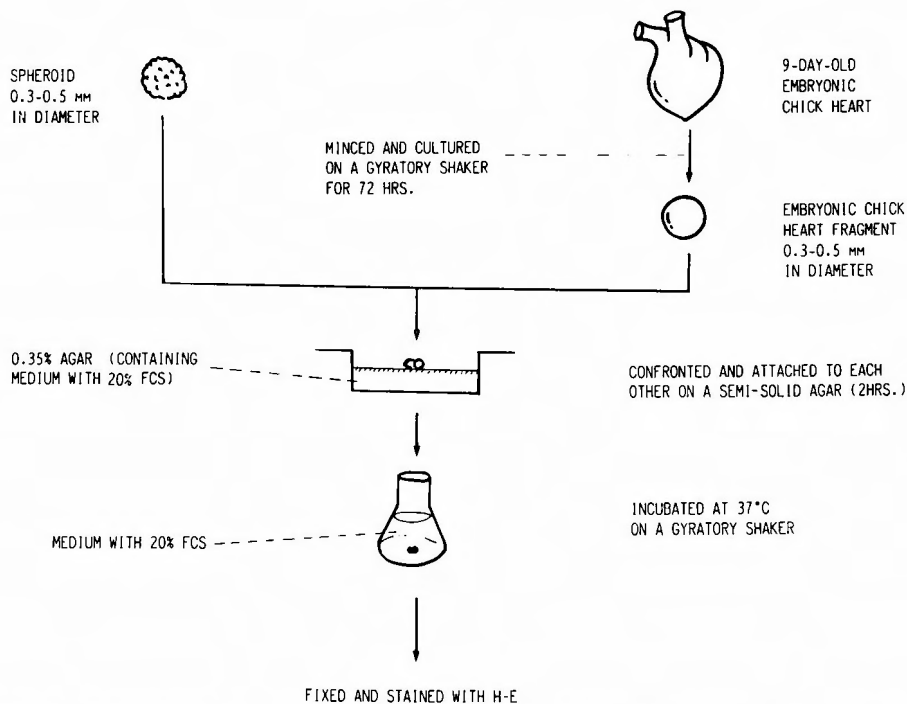


Fig. 2. Invasion test. A tumor fragment (spheroid or minced tumor block) and a fragment of precultured embryonic chick heart (ECH) are confronted and attached on semi-solid (0.35%) agar for 2 hrs. Each fused tissue is incubated at 37°C for 7 days on a gyratory shaker at 100 rpm, and then stained with HE and immunostaining using anti-ECH antibody.

心外膜や大血管を除去した。20% FCS 加培養液中にて 300-500 μ m 程度の大きさに細切した。心臓 1 個あたり 20ml の培養液が適当で、この心筋片浮遊液を 10 ml の三角フラスコに入れ密栓し 37°C, 180rpm で 72 時間振盪培養した。

5) invasion test

腫瘍細胞塊 (spheroid もしくは細切した腫瘍組織) と ECH を 20%FCS 加培養液を含む 0.35% の軟寒天上で接触させ 37°C, 5%CO₂ 下で 2 時間混合培養 (coculture) した。ペアになったワダルマ型の組織を一つずつ 10ml の三角フラスコに移し 100rpm で振盪培養した。フラスコ 1 個あたり約 7ml の培養液 (20% FCS 加) が適当と思われた (Fig. 2)。実験は triplicate 以上にて行い、1 日目、3 日目、5 日目、7 日目に固定し連続切片およびミラー切片法にて HE (hematoxylin eosin) 染色および抗 ECH 抗体を用いた染色^{2,21, 34,36,71}を行い浸潤の程度について検討した。ECH に対する抗体 (ウサギ血清) は Dr. Marell より供与をうけた。同一症例で異なった浸潤度を示したものでは、平行して作成している組織標本から極端にはずれるものは除外し、腫瘍の heterogeneity のために同一腫瘍

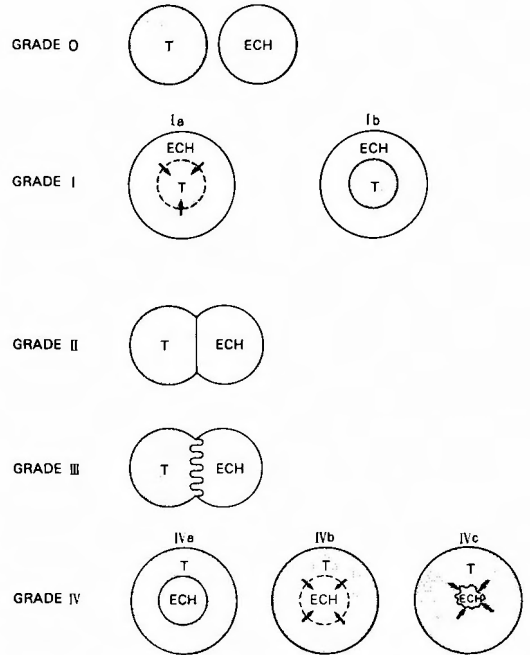


Fig. 3. Schematic presentation of grades of tumor invasiveness. T: Tumor fragment. ECH: precultured embryonic chick heart fragment.

Table 1. Classification of grades of invasiveness.

GRADE	HISTOLOGICAL APPEARANCE
0	No attachment of T to ECH is observed. (including separation of once fused tissue in shaker culture within 24 hrs.)
I	T is invaded (I a) or surrounded (I b) by ECH.
II	T and ECH are fused firmly but their interface is not disturbed. Both of them do not invade into each other.
III	The interface of fused tissue is disturbed and interaction is observed. Both tissues are viable equally, but fibroblastoid outer layer of ECH is going to disappear.
IV	ECH is surrounded or invaded by T. Fibroblastoid outer cell layer of ECH is going to disappear.
IVa:	ECH is surrounded by T without apparent invasion.
IVb:	ECH is invaded by T and is destroyed and replaced. The degree of invasion is below 50% on 7th day.
IVc:	ECH is invaded by T significantly. Its degree is above 50% on 7th day.

T: tumor fragment

ECH: precultured embryonic chick heart fragment

の種々の部分を反映していると考えられたものは平均値をとった。

6) 浸潤度の判定基準

腫瘍細胞の浸潤度を判定するために Table 1 および Fig. 3 のような判定基準を設けた。軟寒天上での 2 時間の混合培養にて両者がくっつかないものを grade 0 とし、明らかな浸潤を示すものを grade IV とし 5 段階に分類した。すなわち grade I は ECH の fibroblastoid cell が逆に腫瘍組織を取り囲む (Ib) か、浸潤を示すもの (Ia)。grade II は両者がくっついていて、境界明瞭で ECH の最外層の fibroblastoid cell layer が保たれているもの。grade III は両者の境界が乱れ、ECH の fibroblastoid cell layer が消失し interdigitation を認めるが、どちらが優勢ともいえないもの。grade IV は腫瘍細胞が ECH を取り囲む (IVa) か、さらに明らかな浸潤を示し ECH の細胞を置換しているもの (IV b-c) とした。

浸潤度の判定は 7 日目の標本にて行い、1-5 日目の経時的変化も考慮した。

7) 浸潤阻止因子の検討

① 軟骨からの浸潤阻止因子の抽出

Kuettner らの方法^{14,27,28}にならい、牛鼻中隔軟骨

から浸潤阻止因子 (cartilage extract, CE) の抽出を行った。新鮮な牛鼻中隔軟骨 (40 g) を採取後直ちに無血清の培養液 (前述) に入れ、短冊状 (約 $10 \times 2 \times 2$ mm) に細切した。細切した組織を 1 M の guanidine hydrochloride を含む 20 mM MES (2-[N-morpholino] ethane sulfonic acid) 1 l に入れ、 4°C で約 18 時間ゆっくり攪拌した (50rpm)。どろどろになった液体を $12000 \times g$ で 20 分間超遠沈し、上清を濾過したのち、3 日間透析 (3500 ratio の透析膜) し -20°C で凍結保存した。以下の実験では、この CE のほかに手軽に入手できる蛋白分解酵素阻害剤として gabexate mesilate (ethyl-4-[6-guadinino hexanoyloxy] benzoate methane sulfonate, 以下 GM) および aprotinin (以下 AP) を用いた。

② cell growth への影響 (in vitro)

腫瘍細胞としてラット脳腫瘍細胞株 T_1 と 9L を用い、これらのプレート上での成長に及ぼす CE, GM, AP の影響について検討した。96 孔プレート (CORNING) に 250 個/well の細胞を移植し、6 時間後に各薬剤を添加した。CE は 10^{-1} および 10^{-2} 希釈、GM は 10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} mg/ml, AP は 10^3 , 10, 10^{-1} U/ml の各濃度を用いた。24 時間毎に cell count と medium change を行った。

③ ラット皮下移植腫瘍での検討 (in vivo)

対数増殖期にある T_1 1×10^6 個を Wistar/Fibiger 系

雄ラット (体重 100g 前後) の右側腹部皮下に移植し、2 週目に腫瘍径が約 10 mm になった時点で治療を開始した。治療は、肉眼的全摘出 (OP), GM 腹腔内投与 (IP) と局所投与 (L) の組み合わせで、GM の濃度は 10, 10^{-1} , 10^{-3} mg/ml の 3 種類である。すなわち、i) control 群 ii) OP のみ iii) IP のみ iv) L のみ v) OP+IP vi) OP+L の 14 グループである。

④ 浸潤におよぼす影響 (invasion test による検討)

T_1 spheroid と ECH を 混合培養する invasion test において CE, GM, AP の影響を検討した。混合培養の後 24 時間振盪培養した組織に CE (10^{-1} , 10^{-2} 希釈), GM (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5} mg/ml), AP (10^3 , 10, 10^{-1} U/ml) を添加し 24 時間毎に medium change を行い、7 日目の組織を HE および ECH に対する抗体による染色を行い組織学的な検討を行った。

8) BrdU labeling index (LI)

thymidine analogue である bromodeoxyuridine (BrdU) は DNA 合成中の S 期の細胞に取り込まれるため BrdU 投与により DNA 合成能を知ることができ、腫瘍の増殖能の一つの目安となる。従来の組織学的悪性度および invasion test による浸潤能との比較検討を行うために、10 症例で LI を算出した。(症例の内訳は、low grade astrocytoma 3 例, glioblastoma 2 例, oligodendroglioma 1 例, 転移性脳腫瘍 1 例, 髄膜腫 1 例, 神経鞘腫 2 例である。)

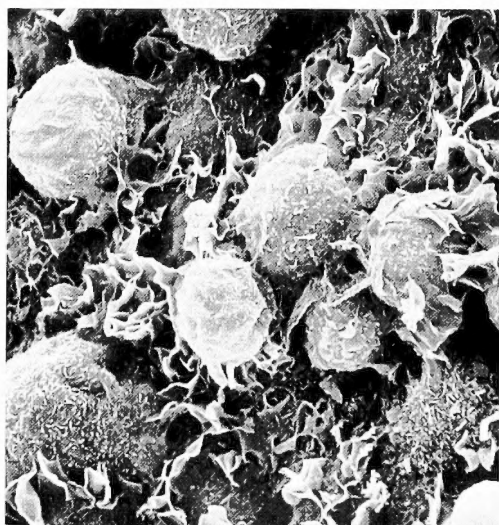
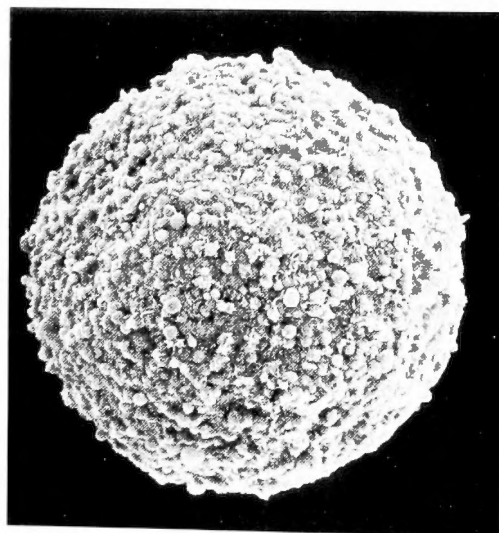


Fig. 4. Spheroid (T_1B). Scanning electron microscopy shows spherical appearance of cell aggregates (a) and ruffling membrane of cytoplasm (b). (bar indicates 50μ (a) and 5μ (b))

手術時に麻酔導入後 BrdU (150-200 mg/m²) を約30分で点滴静注し、摘出された脳腫瘍組織を直ちに70%エタノールに入れ、12-24時間固定した後パラフィン包埋した。切片作成後抗 BrdU 抗体 (Beckton Dickinson) にて染色し、100倍の視野で10視野ずつ算定し LIの平均を求めた。LI(%)=number of labeled cells/number of total cells×100

結 果

1) spheroid の形成

細胞数20-30個の colony を数個ずつ小三角フラスコに入れ 100rpm で振盪培養すると、2-3日目に肉眼的にも明らかに認められる細胞塊 (直径 100μm 前後) が出現し、7-14日目には直径200-500 μm の spheroid が1-3個/flask 形成された (Fig. 4)。これらは光顕的に

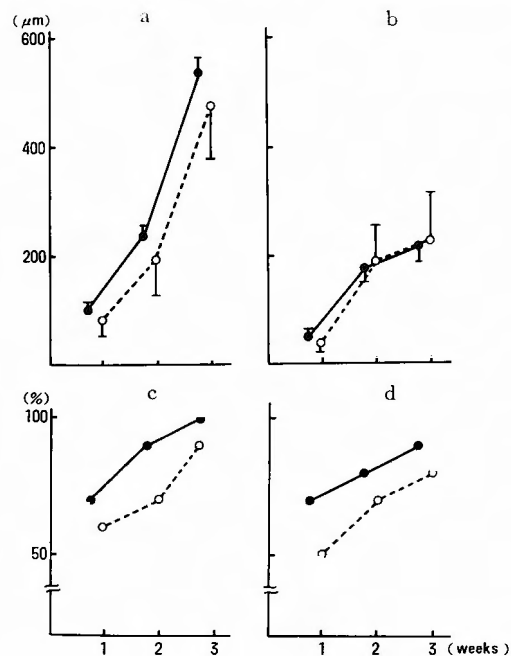


Fig. 5. Comparison of spheroid formation between spinner flask method (open circle) and our method from colonies (closed circle). Diameters of spheroid are plotted by mean±SE (a: T₁, b: 9L). Spheroid growth are not different significantly between two method, but in our method diameter of spheroid is not scattered. Rates of spheroid formation is indicated in c (T₁) and d (9L). Although no significant difference is observed, the harvest rate in our method is usually superior to that in spinner flask method.

は良く似た形態をしており大きくなるにつれ中心部壊死を認めるが、球塊としての脆弱さには差があり単層培養においてプレートによくくっつく細胞ほど spheroid としての形態をよく保っていた。T₁A および 9L に関して我々の方法と spinner flask 法での spheroid 径の変化および spheroid の回収率を Fig. 5 に示す。spheroid の回収率は 5ml の小三角フラスコ内に直径 300μm の spheroid が 1 個以上形成されたものを陽性とした。4 種の細胞とも両方法での有意差は認められなかったが、colony から形成する方が大きさのばらつきが少なく、1-2 週目での回収率は優れていた。この方法での spheroid 形成能は 1, 2, 3 週目で T₁(70, 90, 100%), T₁A(70, 80, 100%), T₁B(80, 100, 100%) 9L(70, 80, 90%) であり、plate 上での doubling time T₁ 16.5 hrs, T₁A 13.7hrs, T₁B 18.5hrs, 9L 20.5hrs と良く相關した。

2) ECH

受精 9 日目のニワトリ胎児心筋塊を細切したのち、72時間振盪培養することにより直径 0.3-0.5 mm のほぼ球形の ECH 組織塊ができた。最外層には平らな線維芽細胞様の細胞がほぼ一層に並んだ (Fig. 6)。この fibroblastoid cell layer は腫瘍細胞の浸潤に際し一種の barrier として働き、組織学的に浸潤度を判定する際の目安となった。ECH は 48 時間以内の培養ではきれいな球形とならず最外層の fibroblastoid cell layer も形成されなかった。また引き続き単独で振盪培養すると 9-10 日目で空胞変性を生じるため recipient として評価できるのは 7 日目までと考えられた。

3) ラット脳腫瘍細胞の浸潤度

0.35%の軟寒天培地上で spheroid と ECH を接触させた場合、4 種類の細胞すべてが ECH とくっついており (adherence (+)), 引き続き 100 rpm で振盪培養しても 24 時間以内にフラスコ内で分離するものはなか

Table 2. Serial invasiveness of 4 rat neurogenic cell lines.

		days			
		1	3	5	7
T ₁	(15) III (3)	IV a (4)	IV b (4)	IV c (4)	
9L	(14) II (3)	III (3)	IV a (4)	IV b (4)	
T ₁ A	(12) II (2)	III (3)	IV b (3)	IV c (4)	
T ₁ B	(12) II (3)	IV a (3)	IV b (3)	IV c (3)	

(n)=number of samples

All of them are highly invasive tumors.

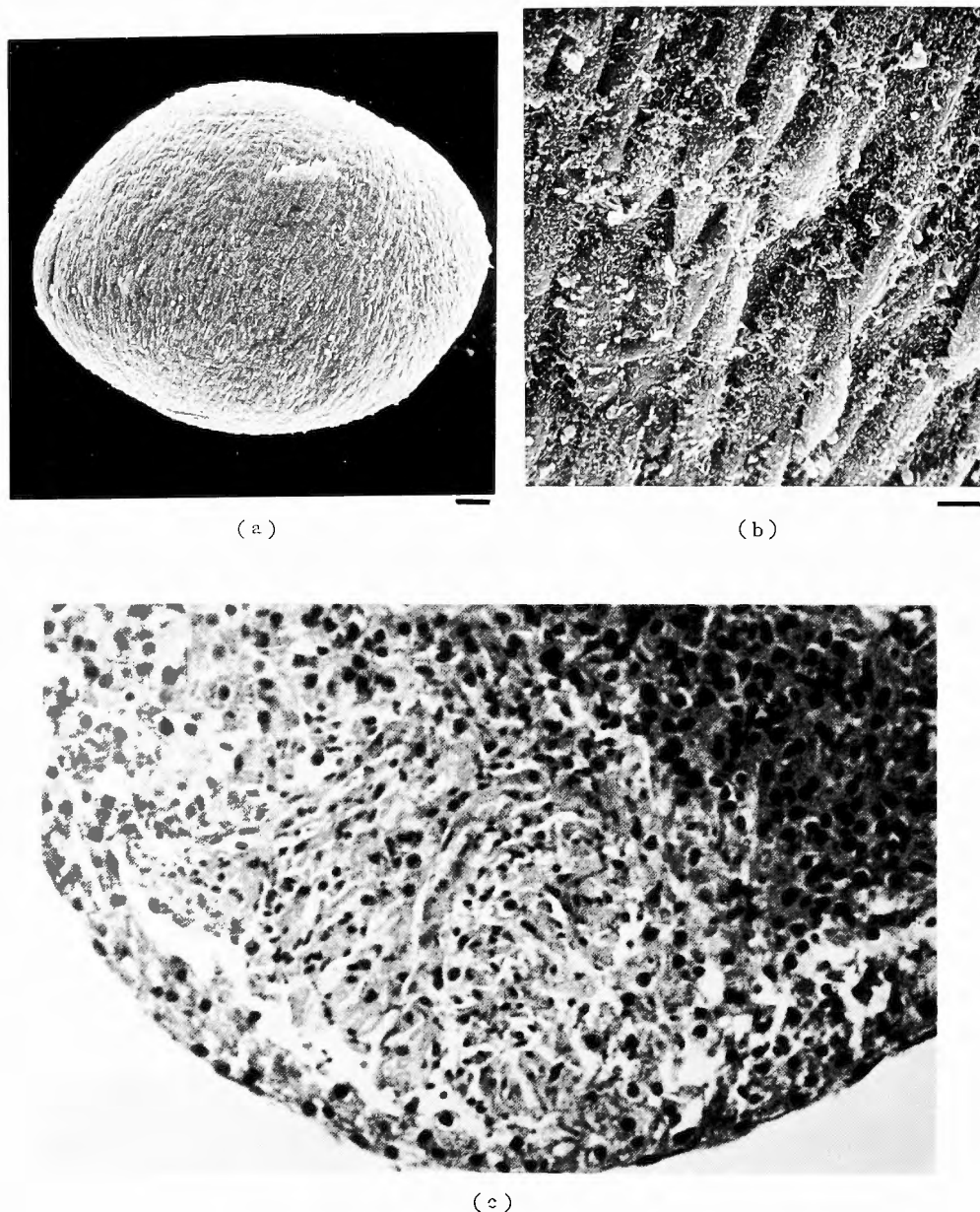
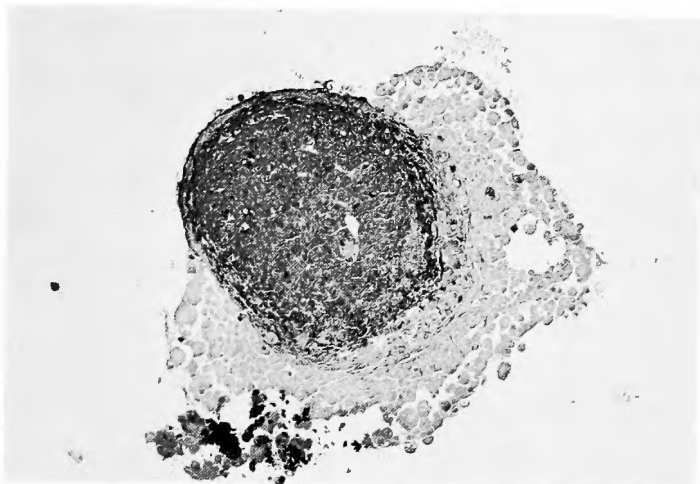
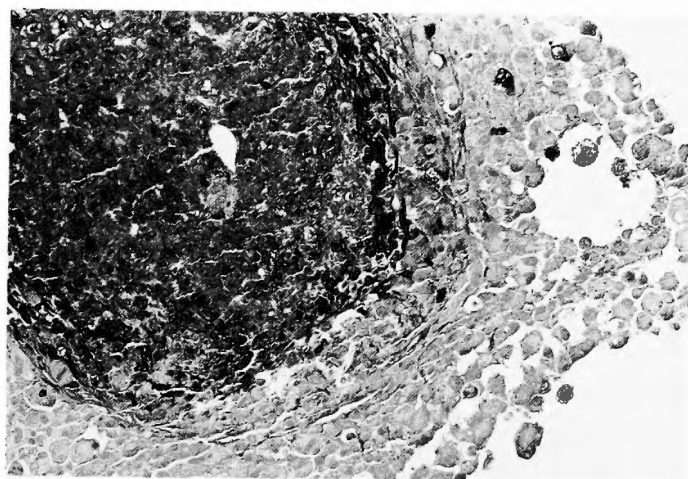


Fig. 6. Precultured embryonic chick heart fragment (ECH). a & b: scanning electron microscopic appearance. (bar indicates 50μ (a) and 5μ (b)). c: light microscopic appearance ($\times 100$). ECH is always covered with fibroblastoid cell layer.

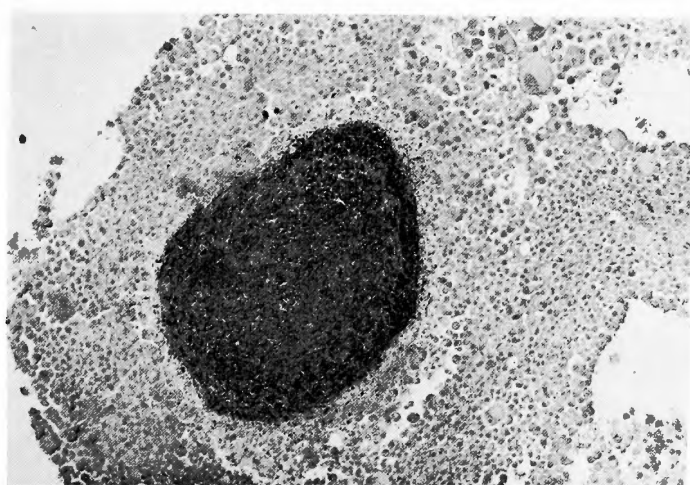
Fig. 7. Serial photographs of T₁B spheroid invasion. (ECH fragment is stained dark by anti-ECH antibody. a & b: on 1st day, c & d: on 3rd day, e & f: on 7th day, a, c, e: $\times 10$, b, d, f: $\times 25$). On the 1st day tumor spheroid begins to surround ECH but fibroblastoid cell layer is still preserved. On the 3rd day ECH is surrounded completely by tumor cells and fibroblastoid cell layer has disappeared. On the 7th day tumor cells significantly invade into ECH, which is destroyed and degenerated (IVc).



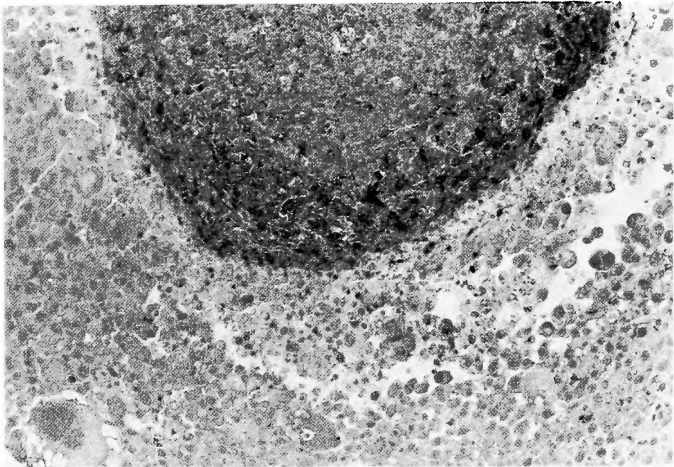
(a)



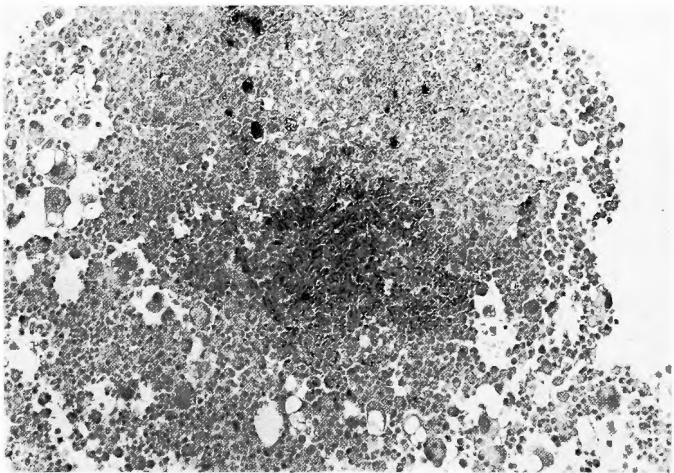
(b)



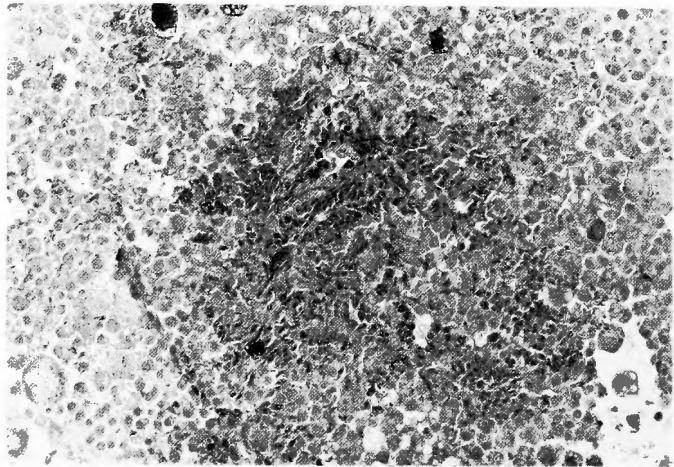
(c)



(d)



(e)



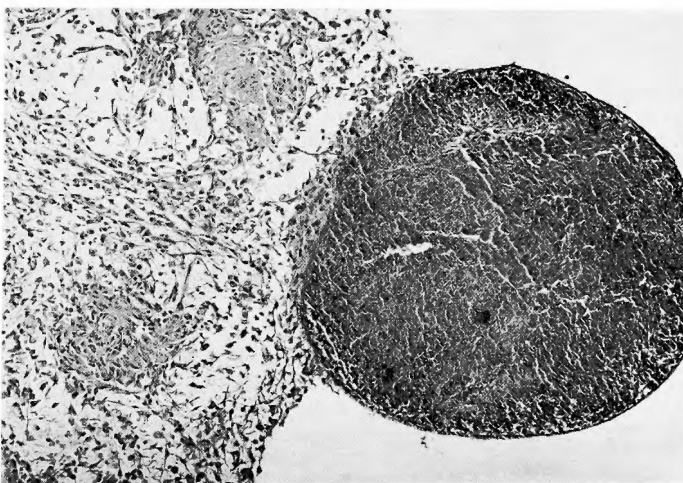
(f)



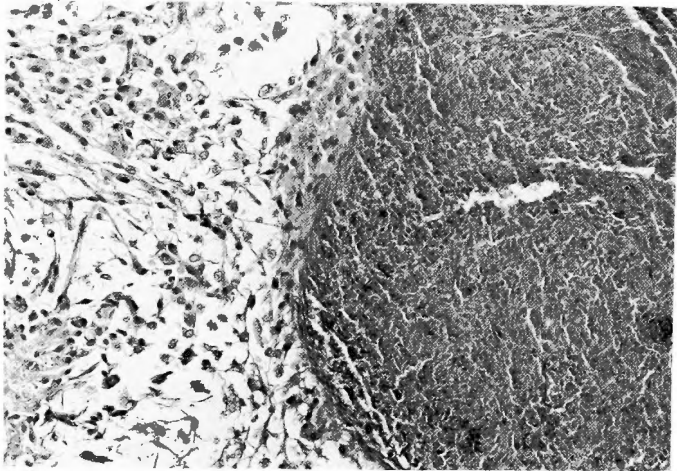
(a)



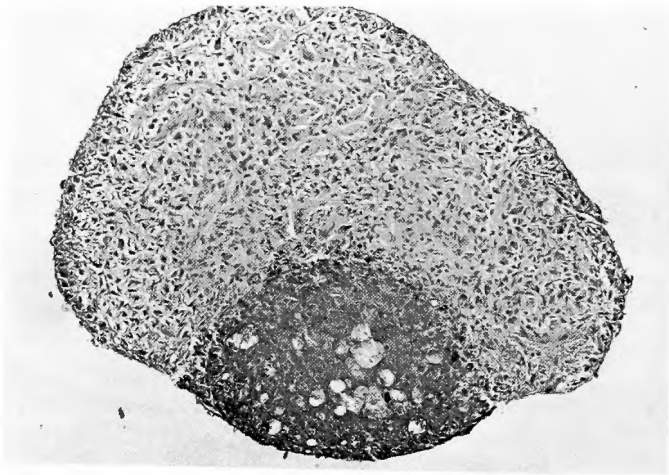
(b)



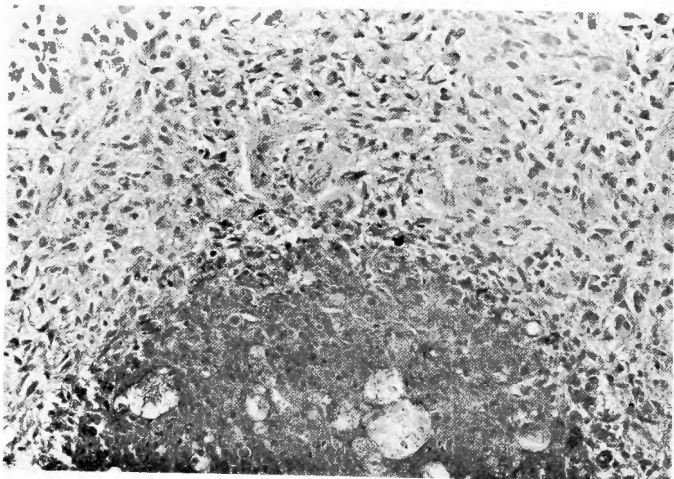
(c)



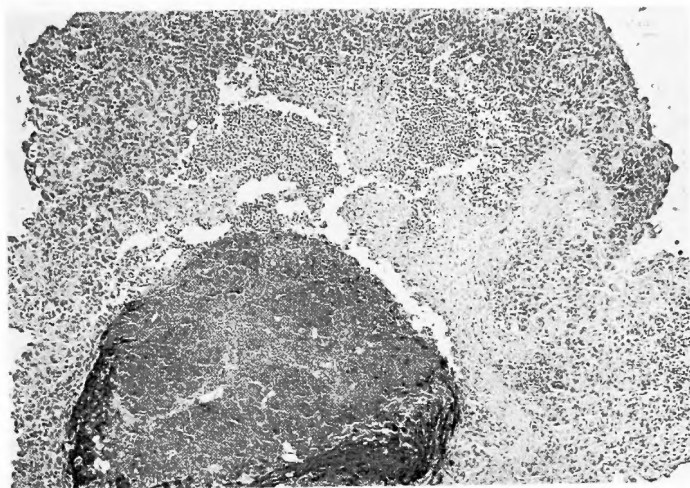
(d)



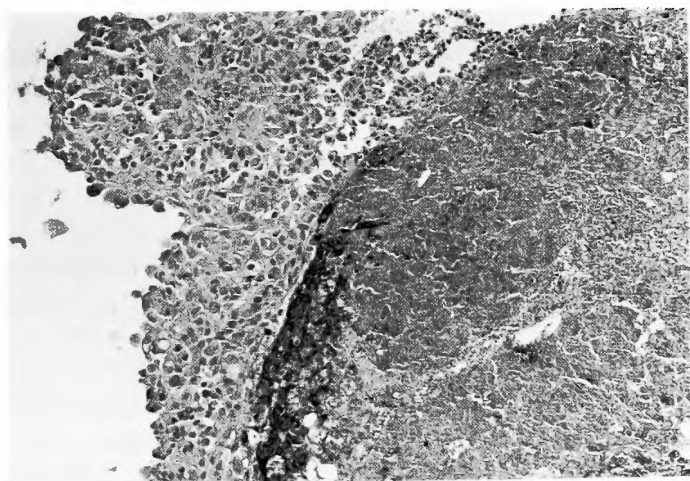
(e)



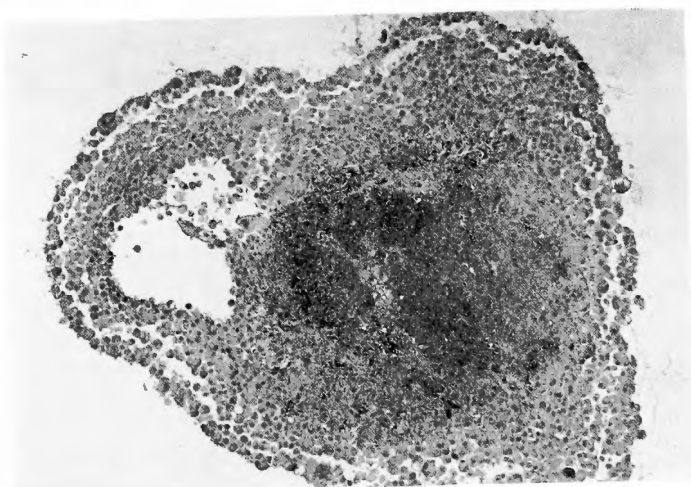
(f)



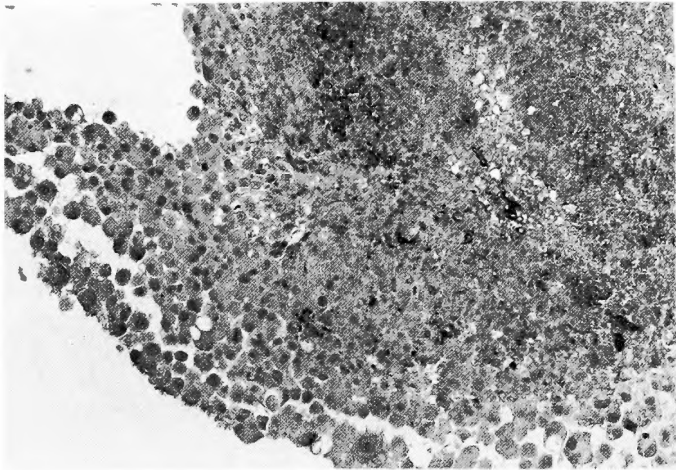
(g)



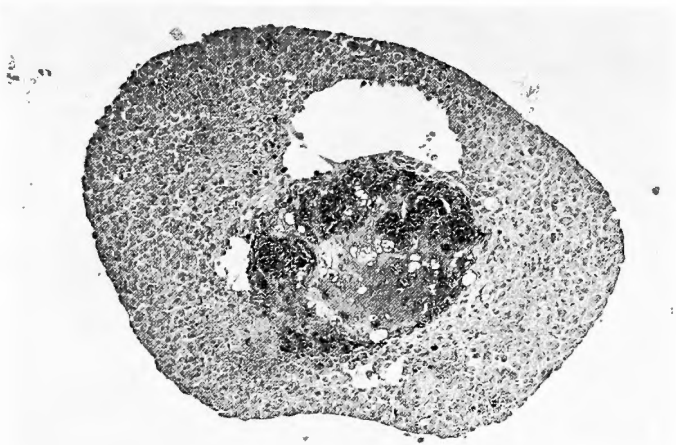
(h)



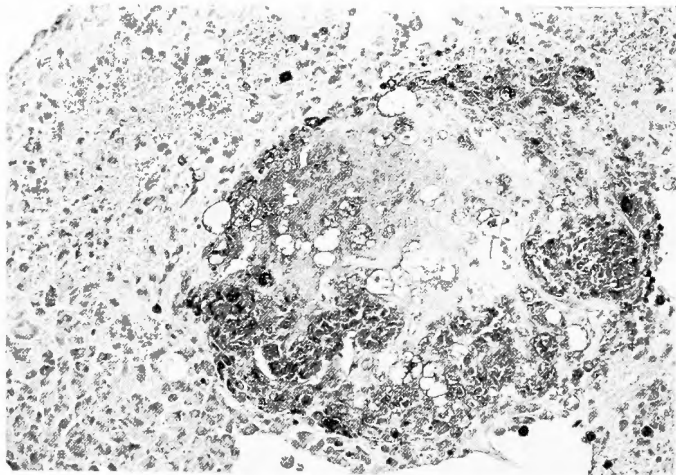
(i)



(j)



(k)



(l)

INVASIVENESS HISTOLOGY		0	I		II	III	IV		
			Ia	Ib			IVa	IVb	IVc
ASTROCYTOMA	I ~ II	●	●●●	●	●●	●			
	III ~ IV	●●	●	●●	●●●	●●●●●	●●●●●	●●●	●●●
OLIGODENDROGLIOMA			●●		●				
EPENDYMOMA							●●●	●	●
MEDULLOBLASTOMA					●	●●	●		
RADIATION NECROSIS			●						

Fig. 9. Correlation between histology and invasiveness in 57 human gliomas. Almost all low grade astrocytomas show low invasiveness. In high grade astrocytomas correlation between histology and invasiveness is observed in 75% of them, but discrepancy is seen in 25% of them. Three cases of oligodendrogliomas show low invasiveness. Four ependymomas, all of which have malignant histological features, are highly invasive. Four cases of medulloblastomas have moderately invasive property.

った。4種類のラット脳腫瘍株での経時的な浸潤度を Table 2 に示す。T₁ は1日目既に ECH の最外層を破壊し interaction を認め (invasiveness grade III), 3日目以降で著明な浸潤傾向を示し、7日目では心筋組織は大部分破壊され腫瘍細胞に置換されていた。T₁A, T₁B, 9L と表のような浸潤傾向を示し、程度の差はあるが7日目ではいずれも highly invasive tumor と考えられた。この傾向は前述の doubling time ならびに tumorigenicity (T₁, T₁A, T₁B は Wistar/Fibiger ラット, 9L は Fisher 344 ラットの脳内移植率がすべて100%) と良く相関した。Fig. 7 に代表例 (T₁B) を示す。

4) ヒト脳腫瘍の浸潤度

本実験の目的は浸潤性発育を特徴とするグリオーマの浸潤能の検討にあるため、グリオーマを中心に評価を行い他の組織型の腫瘍はあくまで参考とした。

(1) glioma (Fig. 8 および 9)

invasion test を行ったグリオーマは astrocytoma 48 例, oligodendroglioma 3 例, espendymoma 5 例,

medulloblastoma 4 例の計61例である。astrocytoma は Kernohan の分類²⁴⁾ に基づき low grade astrocytoma (I - II) と high grade astrocytoma (III - IV) に分けて検討した。

① astrocytoma

low grade astrocytoma 8 例中 invasiveness III が1例のみで他の7例は低い浸潤能しか示さなかった。grade の高い astrocytoma 40 例中 75% の症例では invasiveness III 以上 (III 10例, IVa 12例, IVb 4例, IVc 4例) であったが、残りの25%では低い浸潤能しか示さなかった。これらの浸潤能の低い症例でも、HE 標本での腫瘍の viability は良く本来の組織像を良く反映していた。invasiveness の強弱に拘わらず、いずれも年齢や腫瘍の局在あるいは初発例か否かなどの特徴に一定の傾向は認められなかった。

② oligodendroglioma

3 例の oligodendroglioma のうち1例が invasiveness II, 2 例が Ia であり、いずれも低い浸潤度しか示さなかった。

Fig. 8. Typical invasive patterns in human gliomas. (Six cases on 7th day are presented.). a & b: Tumor tissue is surrounded by precultured embryonic chick heart (ECH). (I b). c & d: Tumor fragment and ECH fuse tightly but interface between tumor tissue and ECH is not disturbed. (II). e & f: Interdigitation between tumor tissue and ECH is observed. (III). g & h: Although ECH is surrounded completely by tumor tissue, the interface is not disturbed. (IVa). i & j: The interface is disturbed and tumor cell invade into ECH. (IVb). k & l: Invasion of tumor cell into ECH is significant and ECH is degenerated. (IVc).

③ ependymoma

5例の ependymoma はすべて悪性所見を認めたためか、明らかな浸潤を示した。(Ⅳ a 3例, Ⅳ b および Ⅳ c がそれぞれ1例であった.)

④ medulloblastoma

局所浸潤に加え播種を一つの特徴とする medulloblastoma は invasiveness Ⅱが1例, Ⅲが2例, Ⅳが1例であり, 中等度の浸潤能を示した.

⑤ その他

術後 radiation necrosis と判明した1例では, ECH の fibroblastoid cell が摘出組織に樹枝状に浸潤していた。(Ⅰ a)

(2) 転移性脳腫瘍

6例の転移性脳腫瘍のうち5例は原発巣が肺癌 (いずれも adenocarcinoma) で, 1例は hepatoblastoma であった. 後者は ECH とほとんどくっつかず invasiveness 0 であった. 肺癌由来の癌細胞の ECH への浸潤性は一定しないが, Ⅲ以上の浸潤能を示すものが多かった.

(3) 髄膜腫

10例の髄膜腫では, invasiveness Ⅰ-Ⅱ に属する6例はどちらかということ whorl formation が著明で psammomatous body を認めるものが多かった. 一方, Ⅳ c の4例は meningotheliomatous type にしろ fibroblastic type にしろ cellularity が高い傾向を示した. 腫瘍の局在部位と invasiveness の相関は認められなかった.

(4) 神経鞘腫

3例の神経鞘腫のうち2例は強い浸潤傾向を示した.

(5) その他

眼窩 (網膜色素上皮) 原発のメラノーマは極めて強い invasiveness (Ⅳ c) を示し, 7日目には90%以上 ECH を置換していた. 下垂体腺腫はほとんど ECH にくっつかず, chemodectoma (jugular foramen) も浸潤性を示さなかった. 2例の頭蓋咽喉腫は強い浸潤傾向を示した. 良性腫瘍であるが, 本システムでの検討では ameloblast 様の細胞が ECH に浸潤する傾向を示していた.

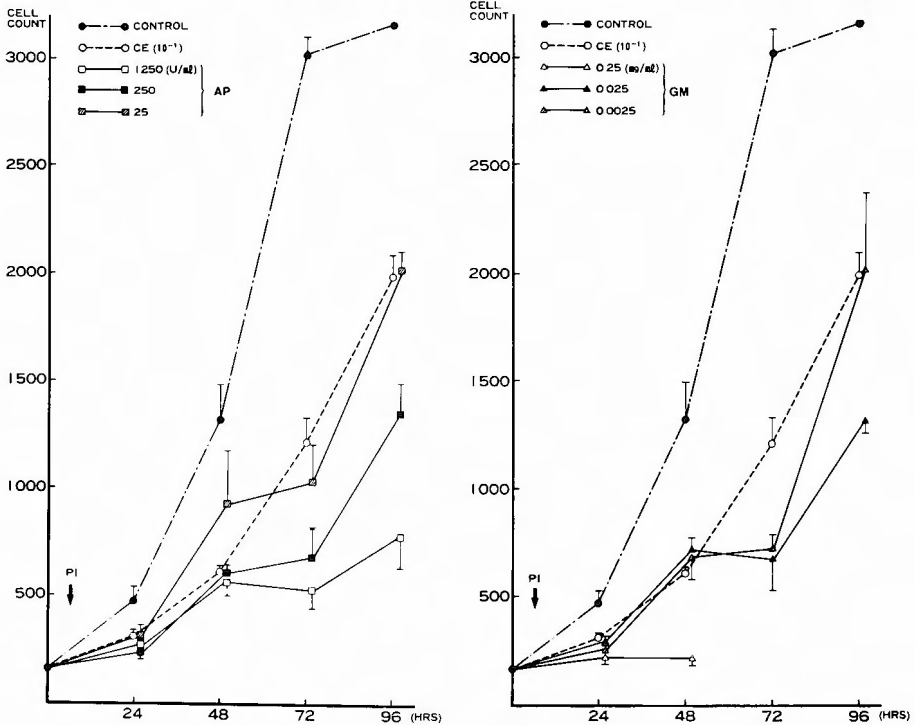


Fig. 10. Effects of protease inhibitors (PI) on T₁ cell growth. (CE: cartilage extract, GM: gabexate mesilate, AP: aprotinin) All of them inhibit cell growth on monolayer culture dose-dependently. The Cell number is significantly different at 96 hrs.

Table 3. Effects of protease inhibitors on cell growth.

	CE		GM (mg/ml)			AP (U/ml)			(%)
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻³	10 ⁻⁵	10 ³	10	10 ⁻¹	
T ₁	10.38	25.08	12.76	32.29	14.08	14.83	29.66	38.29	
9L	36.03	52.79	36.03	45.08	57.35	40.60	56.44	87.79	

(indicated by T/C %: treatment group/control group×100, CE: cartilage extract, GM: gabexate mesillate, AP: aprotinin) All protease inhibitors suppress the cell growth of T₁ and 9L.

5) 脳腫瘍細胞の成長，浸潤におよぼす蛋白分解酵素阻害剤の影響

(1) in vitro での成長への影響

T₁ の成長曲線を Fig. 10 に，T₁ および 9L の成長率（コントロール群との比）を Table 3 に示す。T₁ では CE，AP の添加により濃度依存性に増殖が抑制され，GM は 10⁻³ と 10⁻⁵ mg/ml において逆転していたものの有意にプレート上での増殖抑制効果を認めた。また 9L では，T₁ ほど著明ではないが濃度依存性に増殖は抑制された。

(2) in vivo での抗腫瘍効果

Fig. 11 に腫瘍体積の経時的変化を示す。腫瘍体積

の変化では OP 単独群ではコントロールとの有意差を認めず，GM 投与群では濃度依存性に腫瘍増殖を抑制したが IP，L ともコントロールとの有意差を認めたのは 10 mg/ml であった。OP+GM 投与群では IP で 10 mg/ml，L で 10⁻¹ mg/ml 以上で有意差を認めた。in vivo で腫瘍増殖抑制効果をあげるには，手術と GM 投与の併用が良いという結果であった。また生存日数では，いずれも GM 10 mg/ml 投与で有意な生存日数の延長を認めた。

(3) 浸潤におよぼす影響

T₁ は invasiveness IVc で浸潤能の強い腫瘍であるが，GM 投与では腫瘍そのものの viability が低下する

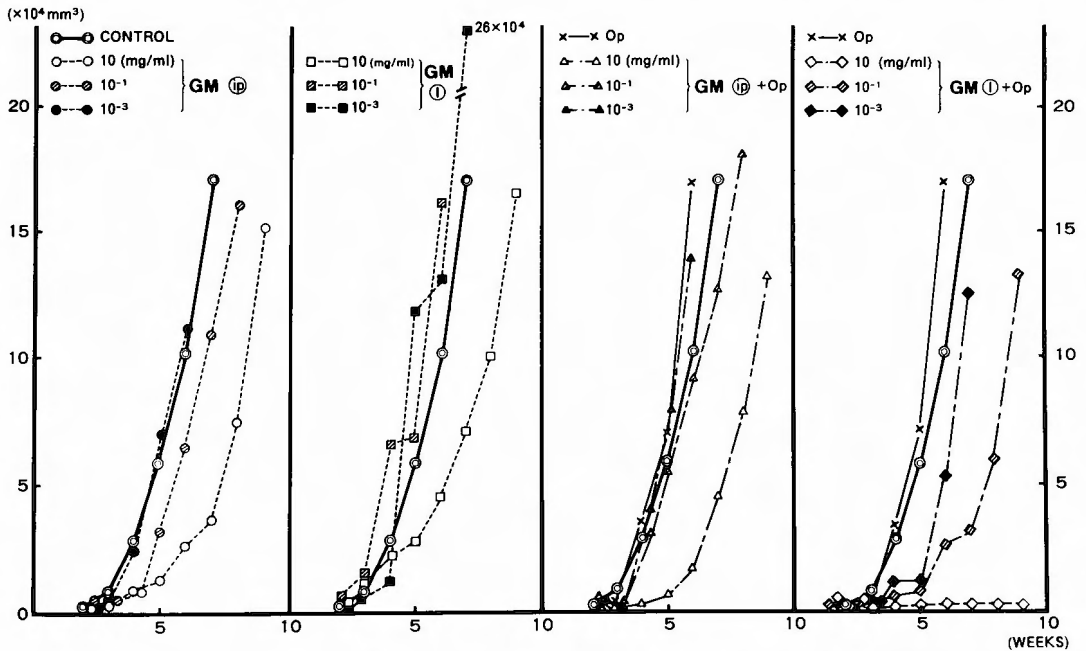


Fig. 11. Effects of protease inhibitors on tumor growth of subcutaneously inoculated brain tumors in rats. Macroscopic total removal (Op) group is not significantly excellent compared with control group. In GM administration with or without Op, only a high dose (10mg/ml) administration significantly suppressed tumor growth. (ip: intraperitoneal administration, l: local administration)

とともに浸潤を抑制していた。(10⁻¹と10⁻³mg/ml でⅡ, 10⁻⁵mg/ml でⅢ) CE および AP 投与ではいずれの濃度でも腫瘍組織は ECH を取り囲んでいるが、浸潤は抑制されていた。(Ⅳa) 薬剤および濃度にもよるが、蛋白分解酵素阻害剤は invasion test での腫瘍細胞の浸潤を抑制した。

6) LI と invasiveness の比較

10症例の結果を [LI (mean, σ), invasiveness] のように表示する。low grade astrocytoma 3例 [5.2・Ⅱ, 7.2・Ⅱ, <1・Ⅱ], glioblastoma 2例 [15.3・Ⅲ, 7.7・Ⅳb], oligodendroglioma [<1・Ⅰb], 転移性脳腫瘍 [4.4・Ⅲ], 髄膜腫 [3.2・Ⅳc], 神経鞘腫 2例 [<1・Ⅳa, <1・Ⅳb]であった。10症例ではあるが、LI と浸潤能の相関は認められなかった。

考 察

悪性腫瘍が“悪性”といわれる諸性質のうち転移が大きな因子の一つである⁶²⁾ことはいうまでもないが、中枢神経系の悪性腫瘍が神経管外へ転移することは稀であり、周囲脳組織に浸潤性に発育することが悪性像の大きな特徴の一つとなっている^{9,41,43,57,58,59)}。したがって、悪性脳腫瘍の治療に際して、この浸潤能の検討は重要である。

三次元の培養系 (three dimensional culture system) で悪性腫瘍の浸潤能を調べたのは1958年の Leighton らがはじめてであり、以後多くの報告がみられる^{4,10,11,12,20,29,31,32,40,63,64,70)}。これらのモデルも近年改良が加えられ、そのひとつとして腫瘍塊と心筋塊を混合培養したのち振盪培養する invasion test も確立されてきた^{8,9,13,25,33,34,35,41,42,43)}。腫瘍細胞が周囲組織に浸潤し転移していく過程については、①腫瘍細胞の遊離(separation) ②遊離した腫瘍細胞の組織内移動 (locomotion) ③腫瘍細胞の脈管内移行④以下、遠隔臓器への定着、増殖というように分けられる^{30,62)}。local spreading を中心とする①から②までが浸潤 (invasion) という過程に相当し中枢神経系の悪性腫瘍においては特に重要である。浸潤の過程を in vitro で“再現”しようとするのが invasion test である。

腫瘍塊として用いられる spheroid は単層培養時の腫瘍よりも in vivo の腫瘍に近いモデルとして1971年に Sutherland らが確立したものである^{65,67)}。spheroid の作成方法としては、single cell suspension から spinner flask 内にて作る方法^{7,49)} や microtitration plate を用いる方法⁸⁾ などが一般的である。我々も初

期にはこれらの方法を行ったが労力の割には効率が悪く充分な spheroid を回収することができなかった。このため軟寒天重層法による colony から spheroid を作成したところ満足すべき spheroid 形成をみることもできた。すなわち増殖の旺盛な colony を核にして振盪培養してやると 10 ml のフラスコの中に 1-3個の spheroid を確実に作成することができる。目的とする実験に必要な数に合わせて準備ができ、さほど煩雑な操作も必要としない。樹立細胞株で colony 形成能をもつ腫瘍なら、100%の確率で本法による spheroid の作成が可能であった。

invasion test の種々の至適条件を検討したのは Mareel である^{33,34,35)}。1980年の綜説³⁴⁾の中で彼は recipient としてどのような組織が至適であるかについて検討した結果、ECH (embryonic chick heart) が適切であると述べている。我々も recipient の組織としてラット、ニワトリの胎児の脳、心筋、肝臓などについて検討したが、脳および肝臓は脆弱すぎて振盪培養に耐えられず、かつ ECH のような barrier としての fibroblastoid cell layer は形成されなかった。さらに最もコンスタントに入手できるものとしてニワトリ胎児の心筋組織を選んだが、これは Mareel の結果と同じであった。recipient としての ECH 組織塊については、Kieler²⁵⁾、Mørk⁴¹⁾らも報告しており、あらかじめ培養した心筋塊の最外層には平らな線維芽細胞様の細胞が被膜のように存在し、これが浸潤に際し一種の barrier になっていると考えられている。

invasion test の方法として我々は、recipient の形態、培養液の条件、回転速度について検討を加え、本報のような条件としたが結果的にこれらは Mareel の綜説³³⁾と同様であったので、その詳細は省略する。また腫瘍モデルとしての spheroid の良さ^{6,7,47,49,65,66,67)}は論を持たないが、その作成操作の煩雑さと標本のばらつきからあまり用いられていないが、我々の方法によればこれらの問題点は解決できるものと思われる。

すでに述べたように、腫瘍の局所浸潤のメカニズムについては古くから多くの研究がなされており、その主なものとして①growth pressure (細胞増殖に伴う機械的圧迫) ②separation (本来の組織にとどまらず遊離していくこと) ③locomotion (細胞の組織内移行) ④destruction of host tissue (蛋白分解酵素などの関与) ⑤phagocytosis などがある^{30,34)}。しかし、浸潤のメカニズムについて説得力ある一元的な説明は未だなされていない。腫瘍細胞の浸潤の仕組みの解明は極め

て困難⁷⁰⁾であるが、浸潤の過程を限られた条件下ではあるが *invitro* で再現しようとしたものが *invasion test* である。

ラット脳腫瘍細胞を用いて *invasion test* を確立した後、グリオーマを中心とするヒト脳腫瘍組織87例の浸潤能の検討を行った。臨床例の検討において、*primary culture* の後に *spheroid* を作成し *invasion test* を行うのが理想であったが、前述したように新鮮なヒト脳腫瘍組織からコンスタントに *spheroid* を作り *invasion test* を行うことは不可能であった。そのかわりに、腫瘍塊として細切したブロック状の組織を用いたが、この方が術後早期に確実な評価が可能であった。即ち、当初この方法で果たして腫瘍細胞が ECH に浸潤していくかどうかという懸念もあったが、予備実験にて振盪培養により適度な栄養、温度、回転を与えてやれば浸潤傾向の評価が可能であると判明したからである^{57,59)}。欠点としては、① *in vitro* system 共通の欠点であるが、血液供給（血管構築）が無いこと、② 腫瘍組織の *heterogeneity* のために最も代表的な部分がサンプルされない可能性があるという二点である。

ヒト脳腫瘍の検討では、浸潤性発育を特徴とする *astrocytoma* では *low grade astrocytoma* で従来の組織診断と本システムでの *invasiveness* は良く相関したが、*grade* の高い *astrocytoma* 40例ではその75%で両者の相関をみたが残りの25%では一致しなかった。このような不一致のみられた症例では今後の臨床経過に注目する必要がある。例えば、悪性度の高い組織像でありながら *invasion test* での浸潤能がさほど強くなかった症例の5年生存率が高いかどうかである。最近、*BrdU labeling index (LI)* を増殖能の目安とし悪性度の評価を試みる報告が散見されるが^{5,15,45,46)}、これは従来の ³H-thymidine による *LI*²²⁾ と相関するものである。我々のシリーズで *LI* を検討できた *astrocytoma* 系のグリオーマ6例では従来の組織診断と *LI* および *invasion test* での浸潤能は一定の相関を示さなかった。増殖能および浸潤能のみから悪性度が決定されるものではないことは言うまでもない^{3,68)} が、多方面からの評価が必要であると思われる。

浸潤能に関して *astrocytoma* 系以外のグリオーマでは症例が少ないこともあり、まだ一定の傾向を論じられなかった。

グリオーマ以外では、メラノーマの一例が極めて強い浸潤能を示し、肺原発の転移性脳腫瘍も概して強い浸潤能を示した。

髄膜腫10例中4例および神経腫3例中2例は強い浸潤能を示したが、これら組織の *cellularity* は概して高く退行性変化を認めるものはなかった。髄膜腫は中胚葉起源であり ECH と親和性が良いことおよび、フラスコ内での *primary culture* でその *fibroblastic cell* が良く増殖することが本システムでの強い浸潤能と相関している可能性があると思われる。神経鞘腫もフラスコ内では良く増殖する傾向がある。*in vitro* での増殖能と浸潤能は必ずしも平行するとは断定できないが、本法のように ECH を *recipient* とした限られた条件下ではこの増殖能が強い浸潤能を惹起した可能性も考えられる。しかし、両者とも生体内では脳組織に浸潤することなく *expanding* に増殖し脳組織を機械的に圧迫するが、その増殖は緩慢である。よって浸潤のメカニズムとしては、グリオーマのように脳組織に浸潤性に増殖するものと髄膜腫のような *in vitro* での易増殖性によるものの二つを考慮しなければならないと思われたが、本システムでは両者を同一レベルで評価することは不可能であった^{57,59)}。

in vitro での *invasion test* を考案するとともに、浸潤阻止因子の検討も行った。従来から、軟骨組織は腫瘍細胞の浸潤をうけず⁶⁰⁾、軟骨組織の抽出成分が腫瘍細胞の浸潤を抑制するといわれている^{14,28)}。これらは蛋白分解酵素阻害剤の作用による^{1,27,37,44,69)}が、脳腫瘍細胞におよぼす影響についての検討はみあたらない。本研究では確立した *invasion test* を用いて脳腫瘍細胞の成長と浸潤におよぼす影響について検討した。薬剤としては、軟骨抽出物質 (CE), *gabexate mesilate* (GM) および *aprotinin* (AP) を用いた。CE は三種の異なった分画、すなわち *collagenase* に対する分画 (分子量22000), *cathepsin B* や *papain* などの *thiol protease* に対する分画 (分子量13000), *trypsin* などの *serine protease* に対する分画 (分子量7000) から成っている⁶¹⁾。GM および AP は市販されている蛋白分解酵素阻害剤であるが、いずれも *trypsin*, *kallikrein*, *plasmin* などに対する阻害効果を持っている⁵⁶⁾。蛋白分解酵素阻害剤の作用機序は、①腫瘍細胞の浸潤、転移に際しその *proteolysis* を阻害し、②細胞分裂を抑制し腫瘍の増殖を阻害する^{52,53,54)}といわれている。今回の実験ではいずれの蛋白分解酵素阻害剤も *in vitro* での細胞増殖は著明に抑制したが、*in vivo* の腫瘍増殖抑制には高濃度の薬剤が必要であった。一方、*invasion test* を用いた浸潤抑制能の検討では通常の使用量で浸潤は抑制されていった。従って、蛋白分解酵素阻

害剤は脳腫瘍の増殖よりも浸潤に効果があると思われた。しかし、当然のことながら腫瘍の浸潤のメカニズムは複雑であり^{16,26,38,39,48,72}、preliminary に行ったヒト脳腫瘍への浸潤抑制効果は一定しなかった。例えば、組織学的には同じ astrocytoma grade III でも薬剤の有効濃度は異なり、通常の使用量での浸潤抑制は困難であった。浸潤阻止因子の検討は、とりもなおさず浸潤のメカニズムの解明につながるものであり、もう少し基礎的に掘り下げた研究が必要であると思われる。すなわち、ヒト脳腫瘍組織においても再度 primary culture の後、継代可能な腫瘍細胞において spheroid を作成し invasion test における浸潤動態の検討を電顕レベルも含めて行い、同時に抗癌剤および蛋白分解酵素阻害剤の効果について詳細に検討する必要がある。しかし、すでに述べたように spheroid の作成が可能な症例は少なく、さらに労力の必要な作業であるが、今後の腫瘍細胞の浸潤のメカニズムの研究には是非とも必要なことと思われる。

また、脳腫瘍の悪性度を検討するには浸潤能のみならず BrdU labeling index で代表される増殖能の検討も必要であるので、今後さらに浸潤能および増殖能両面からの評価を続ける予定である。従来の組織学的診断がその悪性度と良く相関することはいうまでもないが、たとえば同じ astrocytoma grade III という診断でも画一的な組織像を示すわけではなく、その組織像にはある程度の広がりが見られる。本研究で検討した臨床例でも同じ astrocytoma grade III の中に、急激な経過で悪化したものや再発までに比較的長い時間を要した症例が存在した。そして、全例ではないが組織学的に悪性所見を示しながら緩慢な経過を示す症例の中に invasion test での浸潤度が低かったり、低い LI を示すものが確かに存在した。このような症例においては、従来の組織学的診断に加えて浸潤能や増殖能の検討が有用であると思われる。

脳腫瘍細胞の浸潤のメカニズムは複雑で、その解明は困難であるが、in vitro で簡便に腫瘍の浸潤能を評価する invasion test を考案した。浸潤能という観点から脳腫瘍の悪性度を評価するために invasion test は有用であると思われた。

結 語

1) 局所浸潤を一つの大きな特徴とする悪性脳腫瘍の浸潤能を検討するために、invasion test を考案した。invasion test とは、spheroid もしくは細切した腫瘍塊

とあらかじめ振盪培養 (shaker culture) し球形としたニワトリ胎児心筋塊を軟寒天培地上でくっつけた後、振盪培養し経時的な腫瘍細胞の浸潤を組織学的に検討するものである。

2) sphenoid 形成に際し、軟寒天重層法で colony を形成したのち振盪培養する工夫を加えることによりコンスタントに細胞塊が回収できた。

3) 4種類のラット脳腫瘍細胞 sphenoid を用い、invasion test を確立した後、グリオーマ58例をはじめとするヒト脳腫瘍87例において invasion test による浸潤能の検討を行った。この際、spheroid のかわりに細切したブロック状の腫瘍組織を用いる点を工夫した。

4) 浸潤性発育を特徴するグリオーマ (特に astrocytoma) では、大勢において従来の組織診断と invasion test による浸潤能は良く相関したが、一部に両者の不一致を認める症例が存在した。この点の詳細な検討にはヒト脳腫瘍組織由来の spheroid を用いたより基礎的な研究が必要と思われた。

5) 一部の症例で BrdU labeling index (LI) と invasion test での浸潤能を比較したが、両者は相関しなかった。しかし、脳腫瘍の悪性度を評価するには浸潤能と増殖能の両面からの検討が必要である。

6) 蛋白分解酵素阻害剤が、脳腫瘍細胞の成長および浸潤に及ぼす影響について検討したが、臨床例への応用にはなお基礎的な検討が必要であると思われた。

7) 脳腫瘍の悪性度を検討する際には多因子の検討が必要であるが、浸潤能という観点から悪性度を評価するために、invasion test は簡便で有用な方法と思われる。

稿を終えるにあたり懇篤な御指導、御校閲を賜りました京都大学脳神経外科教授菊池晴彦先生に深甚なる感謝の意を表します。

また終始御示唆、御指導を戴きました京都大学脳神経外科助教授山下純宏博士に深謝の意を表します。そして実験理論および結果の解析に御指導戴きました京都大学脳神経外科助手徳力康彦博士、滋賀県立成人病センター 部長織田祥史博士、京都大学脳神経外科 宮武伸一 学兄に感謝の意を表します。

参 考 文 献

- 1) 青柳高明: プロテアーゼ・インヒビターの生物活性。蛋白質核酸酵素 25: 597-608, 1980.
- 2) Bonnin JM, Rubinstein LJ: Immunohistochemistry of central nervous system tumors. J Neurosurg 60: 1121-1133, 1984.
- 3) Bookwalter JW III, Selker RG, Schiffer L, et al: Brain-tumor cell kinetics correlated with survival.

- J Neurosurg **65**: 795-798, 1986.
- 4) Carr I, McGinty F, Norris P: The fine structure of neoplastic invasion; invasion of liver, skeletal muscle and lymphatic vessels by the Rd/3 tumor. J Path **118**: 91-99, 1975.
- 5) Cho KG, Hoshino T, Nagashima T, et al: Prediction of tumor doubling time in recurrent meningiomas. J Neurosurg **65**: 790-794, 1986.
- 6) Darhling JL, Oktar N, Thomas GT: Multicellular tumor spheroids derived from human brain tumors. Cell Biology International Reports **7**: 23-30, 1983.
- 7) Deen DF, Hoshino T, Williams ME: Development of a 9L rat brain tumor cell multicellular spheroid system and its response to 1, 3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea and radiation. JNCI **64**: 1373-1382, 1980.
- 8) De Ridder L, Laerum O: Malignancy of neurogenic cells characterized by their invasiveness in vitro. Arch Geschwulst-forsch **51**: 28-33, 1981.
- 9) De Ridder L, Laerum O: Invasion of rat neurogenic cell lines in embryonic chick heart fragment in vitro. JNCI **66**: 723-728, 1981.
- 10) Distelmans W, Ginckel RV, Vanherick W: The kidney invasion test; An assay allowing macroscopic quantification of malignant invasion in vivo. Invasion Metastasis **5**: 170-184, 1985.
- 11) Don P, Kieler J: Cultivation of human bladder epithelial cells and studies of their invasiveness in vitro as a criterion of malignant alteration. Biology of the Cancer Cell; Proceedings of the fifth Meetings of the European Association for Cancer Research: 327-346, 1980.
- 12) Easty DM, Easty GC: Measurement of the ability of cells to infiltrate normal tissues in vitro. Br J Cancer **29**: 36-49, 1974.
- 13) Easty GC, Easty DM: In vivo and in vitro models of invasion. In Invasion-experimental and clinical implications-edited by Mareel MC, Calman KC, London, Oxford University Press, 1984, p24-62.
- 14) Eisenstein R, Kuettner KE, Neapolitan C, et al: The resistance of certain tissues to invasion. Am J Pathol **81**: 337-348, 1975.
- 15) Fukui M, Iwaki T, Sawa H, et al: Proliferative activity of meningiomas as evaluated by bromodeoxyuridine uptake examination. Acta Neurochir **81**: 135-141, 1986.
- 16) Genadry R, Olson J, Parmley T: The morphology of the earliest invasive cell in low genital tract epidermoid neoplasia. Obstetrics and Gynecology **51**: 718-722, 1977.
- 17) 魏 秀復, 山下純宏, 半田 肇: Hyperthermia と Hematoporphyrin derivative (HPD) 相乗効果について. 癌と化学療法 **11**: 835-839, 1984.
- 18) 魏 秀復: Hyperthermia における free radicals の細胞障害に関する研究, 日外宝, **53**: 742-755, 1984.
- 19) Hamburger AW, Salmon SE: Primary bioassay of human tumor stem cells. Science **197**: 461-463, 1977.
- 20) Hart IR, Fidler IJ: An in vitro quantitative assay for tumor cell invasion. Cancer Res **38**: 3218-3224, 1978.
- 21) Herpers MJHM, Budka H: Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in oligodendroglial tumors. Acta Neuropathol (Berl) **64**: 265-272, 1984.
- 22) Hoshino T, Wilson CB: Cell kinetic analysis of human malignant brain tumors (gliomas). Cancer **44**: 956-962, 1979.
- 23) 井上雄弘, 荒川昌亨, 小川一誠: Human tumor stem assay, 癌と化学療法 **9**: 599-605, 1982.
- 24) Kernohan JW, Mabon RF, Svien HJ, et al: A simplified classification of the gliomas. Staff Meetings of the Mayo Clinic **24**: 71-75, 1949.
- 25) Kieler JP, Vilien M: In vitro studies of the invasiveness of cultured malignant "spontaneously" transformed and normal human bladder cells, In vitro studies **2**: 121-130, 1979.
- 26) Kieler L, Briand P, Van Peteghem MC, et al: Comparative studies of two types of "spontaneous" malignant alteration of ST/A mouse lung fibroblasts propagated in vitro. In Vitro **15**: 758-771, 1979.
- 27) Kuettner KE, Croxon RL, Eisenstein R, et al: Protease inhibitor activity in connective tissue. Experimentia **30**: 595-597, 1974.
- 28) Kuettner KE, Lawrence S, Croxon RL, et al: Tumor cell collagenase and its inhibition by a cartilage-derived protease inhibitor. Science **196**: 653-654, 1977.
- 29) Leighton J, Abaza N, Tchao R, et al: Development of tissue culture procedure for predicting the individual risk of recurrence in bladder cancer. Cancer Res **37**: 2854-2859, 1977.
- 30) Liotta LA: Tumor invasion and metastase -role of the extracellular matrix-, Cancer Res **46**: 1-7, 1986.
- 31) Maguire H, Outzen HC, Custer RP, et al: Invasion and metastasis of a xenogeneic tumor in nude mice. JNCI **57**: 439-442, 1976.
- 32) Mareel M, De Bruyne G, De Ridder L: Invasion of malignant cells into ⁵¹Cr-labeled host tissues in organotypical culture. Oncology **34**: 6-9, 1977.
- 33) Mareel M, Kint J, Meyvisch C: Methods of study of the invasion of malignant C3H-mouse fibroblasts into embryonic chick heart in vivo. Virchows Arch B **30**: 95-111, 1979.
- 34) Mareel MM: Recent aspects of tumor in vasive-

- ness. *International Review of Experimental Pathology* **22**: 65-129, 1980.
- 35) Mareel MM, Bruyneel E, Storme G: Attachment of mouse fibrosarcoma cells to precultured fragments of embryonic chick heart. *Virchows Arch B* **34**: 85-97, 1980.
 - 36) Mareel MM, De Bruyne GK, Vandesande F: Immunohistochemical study of embryonic chick heart invaded by malignant cells in three-dimensional culture. *Invasion and Metastasis* **1**: 195-204, 1981.
 - 37) Mareel MM: Invasion in vitro (Methods of analysis). *Cancer Metastasis reviews* **2**: 201-218, 1983.
 - 38) Mareel MM, De Mets M: Effects of microtubule inhibitors on invasion and on related activities of tumor cells. *International Review of Cytology* **90**: 125-168, 1984.
 - 39) Mareel MM, Dragonetti CH, Hooghe RJ, et al: Effect of inhibitors of glycosylation and carbohydrate processing on invasion of malignant mouse MO₄ cells in organ culture. *Clin Exp metastasis* **3**: 197-207, 1985.
 - 40) McCutcheon M, Coman DR, Moore FB: Studies on invasiveness of cancer. *Cancer* **1**: 460-467, 1948.
 - 41) Mørk S, De Ridder L, Laerum OD: Invasive pattern and phenotypic properties of malignant neurogenic rat cells in vivo and in vitro. *Anticancer Res* **2**: 1-10, 1982.
 - 42) Mørk SJ, Laerum OD, De Ridder L: Transmission electron microscopy of malignant neurogenic rat cells during invasion into embryonic chick heart fragments in vitro. *Anticancer Res* **3**: 373-384, 1983.
 - 43) Mørk S, Laerum OD, De Ridder: Invasiveness of tumors of the central nervous system, In *vasion-experimental and clinical implications*- edited by Mareel MC, Calman KC, London, Oxford university Press, 1984, p 79-125.
 - 44) Mullins DE, Rohrich ST: The role of proteinase cellular invasiveness. *Biochim Biophys Acta* **695**: 177-214, 1983.
 - 45) Murovic JA, Nagashima T, Hoshino T, et al: Pediatric central nervous system tumors; a cell kinetic study with bromodeoxyuridine. *Neurosurgery* **19**: 900-904, 1986.
 - 46) Nagashima T, Murovic DJ, Hoshino T: Immunocytochemical demonstration of S-phase cells by anti-bromodeoxyuridine monoclonal antibody in human brain tumor tissues. *Acta Neuropathol (Berl)* **67**: 155-159, 1985.
 - 47) Nederman T, Norling B, Glimelius B, et al: Demonstration of an extracellular matrix in multicellular tumor spheroids. *Cancer Res* **44**: 3090-3097, 1984.
 - 48) Nelles LP, Schnebli HP: Are protease inhibitors potentially useful in tumor therapy? *Invasion and Metastasis* **2**: 113-124, 1982.
 - 49) 野村和弘: Spheroid. *脳外* **7**: 33-36, 1979.
 - 50) 野村和弘, 渡井壯一郎, 松岡浩司, 他: 脳腫瘍の悪性度と DNA パターン. *Oncologia* **20**: 42-54, 1987.
 - 51) Oda Y, Handa H, Kieler J: Induction and transplantability of rat neurogenic tumor. *Arch Jpn Chir* **46**: 513-520, 1977.
 - 52) Ohkoshi M: Inhibition of growth of 3-methylcholanthrene-induced mouse skin tumor by protease inhibitor [N, N-dimethyl carbamoylmethyl 4- (4-guanidinobenzoyloxy)-phenylacetate] methanesulfate. *Gann* **72**: 959-964, 1981.
 - 53) Ohkoshi M, Fujii S: Effect of oral administration of protease inhibitor [N, N-dimethylcarbamoylmethyl 4- (4-guanidinobenzoyloxy)-phenylacetate] methanesulfate on the growth of 3-methylcholanthrene-induced carcinoma in mice. *Gann* **73**: 108-110, 1982.
 - 54) Ohkoshi M, Oka T: Clinical experience with a protease inhibitor [N, N-dimethylcarbamoylmethyl 4- (4-guanidinobenzoyloxy)-phenylacetate for prevention of recurrence of carcinoma of the mouth and in treatment of terminal carcinoma. *J max-fac Surg* **12**: 148-152, 1984.
 - 55) 太田富雄, 西村周郎: 脳神経外科学 改訂第4版, 京都, 金芳堂, 1986.
 - 56) 桶川忠夫, 愛下秀毅, 穂本 晃, 他: [ethyl p-(6-guanidinohehexanoyloxy) benzoate] methanesulfonate (FOY) の一般薬理作用. *日薬理誌* **71**: 61-77, 1975.
 - 57) 奥村禎三, 山下純宏, 徳力康彦, 他: Invasion Test を用いた脳腫瘍悪性度の動的解析. *日外宝* **55**: 270-281, 1986.
 - 58) 奥村禎三, 山下純宏, 徳力康彦, 他: 浸潤能から見た脳腫瘍細胞の動態 (spheroid を用いた新しい invasion test の方法について). *神経外科 (in press)*.
 - 59) 奥村禎三, 山下純宏, 徳力康彦, 他: 浸潤能から見た脳腫瘍細胞の動態 (Invasion test によるヒト脳腫瘍87例の検討), *神経外科 (in press)*.
 - 60) Pauli BU, Mwmoll VA, Kuettner KE: Regulation of tumor invasion by cartilage-derived anti-invasion factor in vitro. *JNCI* **67**: 65-73, 1981.
 - 61) Roughley PJ, Murphy G, Barrett AJ: Proteinase inhibitors of bovine nasal cartilage. *Biochem J* **169**: 721-724, 1978.
 - 62) 佐藤春郎: 癌の生物学 (癌の科学1巻), 東京, 南江堂, 1980.
 - 63) Scher CD, Haudenschils C, Klagsbrun M: The chick chorioallantoic membrane as a model system for the study of tissue invasion by viral transformed cells. *Cell* **8**: 373-382, 1976.

- 64) Schleich AB, Frick M, Mayer A: Patterns of invasive growth in vitro. human decidua graviditatis confronted with established human cell lines and primary human explants. *JNCI* **56**: 221-237, 1976.
- 65) Sutherland RM, McCredie JA, Inch WR: Growth of multicell spheroid in tissue culture as a model of nodular carcinoma, *JNCI* **46**:113-120, 1971.
- 66) Sutherland RM, Durand RE: Hypoxic cells in an in vitro tumor model. *Int J Radiat Biol* **23**: 235-246, 1973.
- 67) Sutherland RM, Sordat B, Bamat J, et al: Oxygenation and defferentiation in multicellular spheroids of human colon carcinoma. *Cancer Res* **46**: 5320-5329, 1986.
- 68) Tabuchi K, Honda C, Nakane PK: Demonstration of proliferating cell nuclear antigen (PCNA/ cyclin) in glioma cells. *神経外科* **27**: 1-5, 1987.
- 69) Thorgeirsson UP, Liotta LA, Kalebic T, et al: Effect of natural protease inhibitors and a chemoattraction on tumor cell invasion in vitro. *JNCI* **69**: 1049-1054, 1982.
- 70) Walsh JW, Zimmer SG, Oeltgen J, et al: Invasiveness in primary intracranial tumors (part I). *Neurosurgery* **19**: 185-200, 1986.
- 71) 渡辺慶一, 中根一穂: 酵素抗体法 (改訂版). 東京, 学際企画, 1985.
- 72) Zucker S, Beck G, DiStefano JF, et al: Role for different cell proteinase in cancer invasion and cytolysis. *Br J Cancer* **52**: 223-232, 1985.