原著

再発神経膠腫の増殖能の変化

中 洲 敏 中 島 正 之 松 田 昌 之
半 田 讓 二

Changes in Proliferative Activity in Recurrent Gliomas

by

Satoshi Nakasu, M.D., Masayuki Nakajima, M.D., Masayuki Matsuda, M.D., and
Jyoji Handa, M.D.

from

Department of Neurosurgery, Shiga University of Medical Science

Changes in proliferative activity in 12 cases of recurrent glioma were investigated using MIB-1 antibody and the mitotic index (MI). Four astrocytomas showed malignant changes in the recurrence group (group A), along with an increase in both the MIB-1 staining index (SI) and MI. Three malignant gliomas that recurred at an average 9.7 months after the first surgery showed increased proliferative indices (group B). However, 5 glioblastomas exhibited a marked decrease in proliferative index in spite of their earlier recurrence (mean, 6.8 months) (group C). The mean survival time after the second surgery tended to be longer in group C (12.0 months) than in group B patients (6.4 months), although the difference did not reach the level of significance. It appeared that factors other than the proliferation of tumor cells may have contributed to the increase in tumor volume in group C, and we speculate that interstitial edema may play a role in this.

(Received November 25, 1995 ; accepted May 8, 1996)

Key words : glioma, MIB-1, mitotic index, radiology, recurrence

Jpn J Neurosurg (Tokyo) 5 : 425-430, 1996

はじめに

一般に星細胞系の神経膠腫は星細胞腫、未分化星細胞腫、神経膠芽腫に分類され、腫瘍の増殖速度や予後は各群で明確に異なっている。しかし個々の症例での診断は必ずしも常に明確に分かれるものでなく、病理医による診断のくい違いも起こり得る。このような問題点を補うため腫瘍の増殖能を定量的にはかる方法が考案され^{1)4)6)9)11~15)}、最近では、MIB-1 抗体 (Ki-67) を用いる方法が通常のパラフィン切片でも簡便に行える方法として普及しつつある²⁾⁷⁾¹⁰⁾。

神経膠腫の多くは再発あるいは再増大を繰り返し、治

療に難渋することが多い。再発に伴って悪性化や増殖速度の変化をきたすこともあり、一般に再発後の予後は不良である。しかし、中には短期に再発したにもかかわらず再手術後予想以上に生存する症例も存在し、画像上の腫瘍の進展と実際の腫瘍の増殖速度が常に一致してはいないように思われることがある。再発時に腫瘍の増殖能がどのように変化していくかを検討した研究はまだ少なく¹⁶⁾、画像所見と実際の腫瘍の増殖が本当に合致しているのかは検討を要する。われわれは、画像上再発あるいは再増大と診断し、再手術を行った神経膠腫の増殖能の変遷を調べ、腫瘍の組織像、神経放射線学的所見の変化と対比させた。

滋賀医科大学脳神経外科／〒520-21 大津市瀬田月輪町〔連絡先：中洲 敏〕

Address reprint requests to : Satoshi Nakasu, M.D., Department of Neurosurgery, Shiga University of Medical Science, Tsukinowa-cho, Seta, Ohtsu-shi, Shiga 520-21, Japan

対象および方法

1983～1993年までに当施設で初回手術を行った星細胞腫系神経膠腫のうち、再発再増大時に再手術を行った12例（星細胞腫4例、未分化星細胞腫1例および神経膠芽腫7例）を対象とした。初回治療前後の神経放射線所見と再発時のものとを比較し、また各患者の生存期間を調査した。

同一症例で、初回手術時の標本と放射線治療などを行った後に再発し得られた標本とで増殖能の比較を行った。増殖能は MIB-1 抗体を用いた免疫組織化学法で測定した。方法は 5 μ m パラフィン切片を脱パラフィン後親水し、3% H₂O₂ で内因性パーオキシダーゼをブロックした。切片を沸騰させた 10 mM クエン酸緩衝液内に浸し、電子レンジ (800 W) を用いた抗原賦活を行った (5 分×3 回)。MIB-1 抗体 (Immunotech 社、50 倍希釈) と室温で 30 分反応させ、引き続き Dako 社 LSAB kit を用いてストレプトアビジンビオチン法で染色した。顕微鏡 400 倍下に接眼用グリッドを使用し 2,000 個以上の腫瘍細胞を数え、MIB-1 陽性細胞数の割合 (%) を staining index (SI) とした。また細胞密度の比較をするために、一視野あたりの平均腫瘍細胞数をその腫瘍の細胞密度とした。視野は無作為に選んだが、壊死の周辺や手術時に凝固を受けた組織などは避けた。Ki-67 抗原は外的

条件で過剰出現が起こり、必ずしも増殖能を反映しないことがあるので、同時に分裂細胞数から mitotic index (MI) を算出した。細胞分裂期 (M 期) の細胞は Ki-67 抗原が陽性なことを利用して、増殖能の低い腫瘍では MIB-1 陽性細胞中の分裂細胞数を数え、次式から MI を計算した。

$$\begin{aligned} \text{MI} &= \frac{\text{population of mitotic cell}}{\text{total cell population}} \times 100 (\%) \\ &= \frac{\text{population of mitotic cell}}{\frac{\text{population of MIB-1 positive cell}}{\text{MIB-1 staining index}/100}} \end{aligned}$$

結 果

初回、および再発時での SI と MI の関係はほぼ一定で、SI は再発時にも増殖能をよく反映していると考えられた (Fig. 1)。各腫瘍の初発時、再発時の増殖能は Table 1 に示す。

星細胞腫 4 例 (いずれも fibrillary astrocytoma) は平均 48.6 カ月で再発し、いずれも悪性化をきたし、SI, MI ともに増加していた (A 群)。悪性神経膠腫では、平均 9.7 カ月で再発し増殖能が増大しているもの (B 群 3 例; Case 5～7) と、平均 6.8 カ月と比較的早期に画像上再発あるいは再増大しているにもかかわらず、SI が 1 %

Table 1 Changes in proliferative indices in each patient

Case	Age	Sex	SI & MI	SI & MI	Duration between the two surgeries (months)	Postoperative after the first surgery		Postoperative survival after the second surgery (months)
			at the first surgery (%)*	at the second surgery (%)*		radiation (Gy)	chemotherapy	
Astrocytoma								
1	41	M	5.70(0.0409)	22.0 (0.252)	60.5	60	none	8.5
2	32	M	1.88(0.0236)	7.50(0.118)	71.5	50	none	alive (16)
3	35	M	1.49(0.00918)	4.70(0.0345)	44.7	50	none	31
4	47	M	1.94(0.0317)	19.1 (0.299)	18.0	54.4	none	17.5
Anaplastic astrocytoma								
5	40	F	6.20(0.0860)	26.9 (0.529)	11.0	59.9	ACNU i.v. 100 mg×2	10.8
Glioblastoma								
6	70	M	7.64(0.166)	12.5 (0.259)	8.8	60.5	none	3.7
7	51	F	8.48(0.363)	15.8 (0.276)	8.7	62.8	none	4.8
8	52	F	39.3 (0.433)	0.59(0.0144)	5.0	59.4	none	16.0
9	52	M	24.2 (0.191)	0.69(0.00901)	8.3	60	ACNU i.a. 200 mg×1, i.v. 100 mg×3	20.7
10	61	M	7.90(0.102)	1.73(0.0067)	3.2	60	none	2.3
11	67	M	15.0 (0.411)	1.24(0.0326)	6	60	none	11.5
12	27	F	14.9 (0.440)	0.53(0.00718)	10.5	65.2	ACNU i.v. 100 mg×2	9.3
M : male F : female SI : MIB-1 staining index MI : mitotic index * : MI shown in parentheses								

前後と著明に低下しているもの(C群5例; Case 8~12) (Fig. 2) とに分かれた。組織学的にはA, B群では細胞密度の増加, 核異型性の増加, 細胞分裂像の増加などの所見がみられた。C群では逆に, 腫瘍細胞密度は平均約60%に低下し (Fig. 3), 巨細胞の増加や嚢胞形成を示した。比較的広汎な腫瘍壊死巣を認めるものもあったが, 周囲脳組織の放射線性壊死を思わせる所見はなかった。B, C群では, 一部に結合織の増生や異物巨細胞の出現をみることはあったが, これらを主成分とすることはなかった。

各症例の生存期間は Table 1 に示した。死亡例のうち Case 9 が白血病で死亡した以外はいずれも腫瘍死である。A, B, C各群ともに初回手術後は 50~65 Gy の放

射線治療を受けており, Case 5, 9, 12 はそれに加えて ACNU の動脈内あるいは静脈内投与を複数回受けている (Table 1)。再発後の治療は Case 8, 11, 12 以外はシスプラチン, ACNU, インターフェロンなどの投与を受けている。第2回手術からの平均生存期間をB, C群で比べると, B群で6.4カ月, C群で12.0カ月であったが, 統計的に有意差はなかった (generalized Wilcoxon test, $p=0.15$)。

神経放射線学的な検査では, 初発時再発時の画像所見の違いはA群(星細胞腫)で最もはっきりしており, 初発時4例とも造影をほとんど受けなかったのが, 再発時には明瞭な造影効果を示すようになった。B, C群では, 特に大きな差異はなかった。

Fig. 1 Correlation between MIB-1 staining index (SI) and mitotic index (MI)

The MIB-1 SI correlated well with MI at the time of both the first (solid line, $y = 1.13x - 1.94$, $R = 0.89$, $p = 0.0001$) and the second (dashed line, $y = 1.03x - 1.87$, $R = 0.95$, $p = 0.0001$) surgeries.

Fig. 3 Changes in cell density in the 3 groups of patients

Cellularity increased at the time of recurrence in groups A and B, while it decreased in group C.

A/B

Fig. 2 Glioblastoma in a 27-year-old female patient (group C)

A : MIB-1 staining at the time of the first surgery ($\times 200$)

B : Rare positive nuclei at the time of recurrence (arrow), one of which is an endothelial cell (MIB-1, $\times 200$)

考 察

Ki-67 は G₀ 期以外の細胞核に出現する抗原を認識する抗体として腫瘍などの増殖能を知るために用いられてきた⁴⁾が、通常のパラフィン切片でも使用可能な MIB-1 抗体の開発²⁾とともに、簡便に腫瘍増殖能を測定できる方法として普及しつつある。MIB-1 (Ki-67) 陽性細胞率はほぼ腫瘍の growth fraction に等しいと考えられるが、時に over-expression を示すことが知られている。すなわち抗癌剤や放射線治療などの、腫瘍細胞の増殖抑制的な要因が働いている時には、G₁ 期あるいは G₂ 期での細胞周期の停止が起こり、結果的に Ki-67 陽性細胞の増加が起こる³⁾。このような現象はおそらく治療後の時間経過とともに変遷していくものと考えられるが、詳細は明らかではない。そのためわれわれは、SI を MI と比較したが、初回時、再発時の SI と MI の関係はほぼ同じで、Ki-67 抗原の過剰出現は起こっていないと考えた。われわれの症例は放射線治療や抗癌剤使用後 2～3 カ月以上たった後に再手術が行われ、比較的時間がたっているために G₁ 期あるいは G₂ 期での細胞周期の停止はすでに解除され細胞修復が終わったか、あるいはそのような細胞はすでに死滅し、除去されてしまったと考えられる。

星細胞腫はいずれも悪性化をきたしていたが、同時期に手術を行った星細胞腫 (fibrillary astrocytoma) は計 14 例で、うち 8 例が再発再増大を起こしている。再手術を行ったのは上記の 4 例だけであるため、どの程度の症例でこのようなことが起こっているのかは不明である。ほかの報告でも再手術で確認できた例に限れば、Janny ら⁵⁾は 12 例中 8 例で、McCormack ら⁸⁾は 7 例中 6 例と比較的高頻度に悪性化を認めている。どのような症例で悪性化が起こりやすいかは、今後多数の症例で検討していく必要があるだろう。

Tamura ら¹⁶⁾は bromodeoxyuridine を用いて神経膠腫の再発時の labeling index (LI) と初回手術時のものとを比較している。彼らの症例では 6 例の神経膠芽腫中 5 例で 6～20 カ月後の再発時に LI の低下が認められている。われわれの症例でも神経膠芽腫 7 例中 5 例で再発時増殖は低下状態であった。一方、われわれおよび Tamura らの症例でも未分化星細胞腫、星細胞腫ではこのようなことは見出せなかった。再発時の神経膠腫の増殖能の測定を行った報告はまだ少なく、われわれの症例もすべての再発腫瘍で検討を行えたわけでもないで、実際にどの程度の割合で再発時増殖低下が起こっている

のかは不明であるが、神経膠芽腫では比較的多くの症例で同様のことが起こっている可能性がある。

腫瘍増殖能は C 群では腫瘍は放射線あるいは化学療法の効果により再発時増殖低下状態にあったと考えられるが、われわれの症例や Tamura ら¹⁶⁾の症例でも、生存期間に大きな差がないことから、これらの効果は一時的なもので、時間経過とともに増殖速度が増加していくことが推察される。つまり、C 群の腫瘍の大部分は短期間のうちに B 群と同様の高い増殖を示すようになるのかもしれない。しかし、このように増殖能が低下した状態の腫瘍は本来の意味での再発とは区別すべきものとする。われわれの C 群のうち 3 例 (Case 8, 11, 12) は 2 回目の手術後化学療法など補助療法を付け加えることなく退院したが、再発術後 16.0 カ月、11.5 カ月、9.3 カ月と比較的長期にわたって生存できた。また Case 9 も 20.7 カ月後に白血病で死亡するまで再発は認められなかった。B 群の 3 例ともが、ACNU などの抗癌剤を中心とした治療を受けたにもかかわらず、平均生存 6.5 カ月であったことから考えると、本当に予後に差がないのかどうかはさらに症例を蓄積して検討していく必要があるだろう。

これら C 群の腫瘍は CT スキャン、MRI では他の群の再発腫瘍と見分けがつかなかった。病理組織像で特徴的な所見としては、腫瘍細胞間隙の増大 (細胞密度の低下) で、増殖能の増大した A、B 群の腫瘍では逆にほとんどで細胞密度は増加していた。また、C 群の腫瘍の組織像は放射線性壊死とは異なり、画像上造影を受けている部分の本態は一部に肉芽腫様組織などを含むものの、大部分が腫瘍そのものであった。

C 群では再発時ほとんどが SI 1%前後で、この程度の増殖能だと、例えば髄膜腫などでは腫瘍倍化時間が 2 年以上であり¹⁰⁾、ほぼ同様のことが神経膠腫でもいえる。すると、平均約半年での腫瘍の増大を説明することは困難である。一方、腫瘍増殖速度には growth fraction 以外に細胞周期時間の長さもかかわってくる。われわれの症例では SI と MI がほぼ一定の関係をとっており (Fig. 1)、細胞周期時間は SI と MI から概算できる¹⁰⁾ことから、再発例で増殖率の低下を補う以上の細胞周期時間の短縮が起こったとは考えにくい。この群での腫瘍の画像上の増大が起こった機序としては、想像の域を超えないが、腫瘍細胞間の浮腫や嚢胞形成が大きな役割を果たしているように思われる。C 群では再発時で初回より面積あたりの細胞数は平均 60%程度と低下しており、これが細胞外浮腫によるとすると、単純に計算してみると、全腫瘍細胞数が一定でも体積は約 2 倍になる。

このような細胞密度の変化が治療上のどの時点でどの

ような経過で起こってくるのかは明らかではない。また C 群と A, B 群との腫瘍の増殖能の差がどのような因子で起こってくるのかも現時点では不明である。おそらく C 群の腫瘍は時間経過とともに増殖能を回復していくと考えられ、その過程で血管の透過性の亢進などが引き起こされ、見かけ上の再発が起こったのであろうと想像している。少なくとも、CT スキャンや MRI などの画像で治療経過を判定していくうえで、腫瘍細胞の増殖と画像上の腫瘍の増大、縮小とが必ずしも並行しないことがあり得ることに留意すべきだろう。単に CT スキャンや MRI だけでなく、PET, MRS, TI-SPECT のような代謝面からの検討がこのような場合有用と思われる。

文 献

- 1) Burger PC, Shibata T, Kleihues P : The use of the monoclonal antibody Ki-67 in the identification of proliferating cells. *Am J Surg Pathol* **10** : 611-617, 1986.
- 2) Cattoretti G, Becker MHG, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, Gerdes J : Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB-1 and MIB-3) detect proliferating cells in microwave processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol* **168** : 357-363, 1992.
- 3) Couldwell WT, Weiss MH, Law RE, Hinton DR : Paradoxical elevation of Ki-67 labeling index with protein kinase inhibition in malignant gliomas. *J Neurosurg* **82** : 461-468, 1995.
- 4) Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker H-H, Schwab U, Stein H : Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* **133** : 1710-1715, 1984.
- 5) Janny P, Cure H, Mohr M, Heldt N, Kwiatkowski F, Lemaire J-J, Plagne R, Rozan R : Low grade supratentorial astrocytomas : Management and prognostic factors. *Cancer* **73** : 1937-1945, 1994.
- 6) Hoshino T, Wilson CB : Cell kinetic analysis of human malignant brain tumors (glioma). *Cancer* **44** : 956-962, 1979.
- 7) Karamitopoulou E, Perentes E, Diamantis I, Maraziotis T : Ki-67 immunoreactivity in human central nervous system tumors : A study with MIB 1 monoclonal antibody on archival material. *Acta Neuropathol* **87** : 47-54, 1994.
- 8) McCormack BM, Miller DC, Budzilovich GN, Voorhees GJ, Ransohoff J : Treatment and survival of low-grade astrocytoma in adults : 1977-1988. *Neurosurgery* **31** : 636-642, 1992.
- 9) Morimura T, Kitz K, Budka H : In situ analysis of cell kinetics in human brain tumors : A comparative immunocytochemical study of S phase cells by a new in vitro bromodeoxyuridine-labeling technique, and of proliferating pool cells by monoclonal antibody Ki-67. *Acta Neuropathol* **77** : 276-282, 1989.
- 10) Nakasu S, Nakasu Y, Nakajima M, Yokoyama M, Matsuda M, Handa J : Potential doubling time and tumour doubling time in meningiomas and neurinomas. *Acta Neurochir* **138** : 763-770, 1996.
- 11) Parkins CS, Darling JL, Gills SS, Revesz T, Thomas DG : Cell proliferation in serial biopsies through human malignant brain tumors : Measurement using Ki-67 antibody labelling. *Br J Neurosurg* **5** : 289-298, 1991.
- 12) Raghavan R, Steart PV, Weller RO : Cell proliferation patterns in the diagnosis of astrocytomas, anaplastic astrocytomas and glioblastoma multiforme : A Ki-67 study. *Neuropathol Appl Neurobiol* **16** : 123-133, 1990.
- 13) Sallinen PK, Haapasalo HK, Visakorpi T, Helen PT, Rantala IS, Isola JJ, Helin HJ : Prognostication of astrocytoma patient survival by Ki-67 (MIB-1), PCNA, and S-phase fraction using archival paraffin-embedded samples. *J Pathol* **174** : 275-282, 1994.
- 14) 柴田太一郎, Burger PC, Kleihues P : モノクローナル抗体 Ki-67 による成人神経系腫瘍 100 例における増殖細胞の同定. *Neurol Med Chir (Tokyo)* **27** : 1147-1151, 1987.
- 15) Shibuya M, Ito S, Miwa T, Davis R, Wilson CB, Hoshino T : Proliferative potential of brain tumors : Analyses with Ki-67 and anti-DNA polymerase alpha monoclonal antibodies, bromodeoxyuridine labeling, and nucleolar organizer region counts. *Cancer* **71** : 199-206, 1993.
- 16) Tamura M, Ono N, Zama A, Kurihara H : Changes of the bromodeoxyuridine labeling index of astrocytic tumors between primary and recurrent lesions. *Brain Tumor Pathol* **11** : 173-176, 1994.

要 旨

再発神経膠腫の増殖能の変化

中洲 敏 中島 正之 松田 昌之 半田 譲二

再発神経膠腫 12 例で MIB-1 抗体を用いて増殖能を検討し、初回手術時と比較した。星細胞腫 4 例は平均 48.6 カ月後に再発し、いずれも悪性化をきたし増殖能は増大していた。悪性神経膠腫では平均 6.8 カ月と比較的に画像上再発しているにもかかわらず、増殖能が著明に低下しているものと(5 例)、平均 9.7 カ月で再発し増殖能が増加しているもの(3 例)とに分かれた。後者の方が生存期間が短い傾向はあったが、有意ではなかった。増殖低下状態にあった腫瘍では、放射線療法などにより増殖抑制状態が続いていると考えられ、腫瘍細胞の増殖以外の因子が画像上の腫瘍の増大に大きく関与しているものと考えられる。

脳外誌 5: 425-430, 1996

脳神経外科ジャーナル 次号予告 第 6 巻 第 1 号 1997 年 1 月

原 著

- 内頸動脈硬膜輪周辺部動脈瘤—血管撮影所見と手術適応—……………大阪市立総合医療センター 安井 敏裕, 他
 剖検例からの頭蓋底中央部の en bloc 標本の有用性
 —頭蓋底外科の training として—……………山梨医科大学 永関 慶重, 他
 脳室拡大を伴わない髄液短絡管機能不全の診断上の問題点 ……………神戸大学 倉田 浩充, 他
 悪性グリオーマに対する遺伝子治療の基礎的研究
 —Bystander effect におけるギャップ結合の役割—……………琉球大学 宮城 航一, 他
 脊髄悪性グリオーマ—臨床像とその治療—……………九州大学 西尾 俊嗣, 他
 Liquid coil を用いた脳・脊髄血管内閉塞術 ……………神戸大学 中村 貢, 他

症例報告

- Lateral cerebellomedullary cistern を占拠する症候性くも膜囊腫の 1 例……………奈良県立医科大学 青木 秀夫, 他
 急速な再発を呈した視床下部・視床神経膠腫の 1 例 ……………奈良県立医科大学 枅井 勝也, 他
 上眼窩裂内より発生した海綿状血管腫の 1 例 ……………神戸大学 相原 英夫, 他

編集の都合上内容が若干異なる場合がありますのでご了承ください。