症 例

RNA-Virus 様粒子を認めた Glioblastoma の髄液
および組織培養の細胞診

市立豊中病院中検病理

由谷 親夫 徳田 良三 三木田米子 西屋敷保雄

同 脳外科

佐藤 雅春 金井 信博

大阪大学医学部脳外科

中川 秀光 堀 正治

大阪大学医学部癌研究施設

中田 陽造

I. はじめに

Watson ら¹⁾によれば, 原発性の脳腫瘍 273 例中検索しえた髄液(以下 C.S.F. と略す) 154 例中 67 例(44%)に腫瘍細胞を認めたと報告し, これまでの文献¹⁰⁾からみて約 30~40% の出現があると考えられ, その診断的価値は高い. しかも他の検査法に比して, 質的診断も可能であり, 侵襲も少なく有用な検査法と考えられる.

一方, 組織培養法の意義と重要性は, Glioma の診断および研究はもとより, 最近では走査, 透過型の電子顕微鏡(以下電顕と略す)の駆使により⁵⁾, なかんずく virus の研究には不可欠とされ^{8,9)}, 本例のように RNA-virus 様粒子を認めえたことは, 今後の研究に示唆する

ところは大きいと思われる.

最近著者らは, C.S.F. に出現した Glioblastoma 細胞の組織培養の電顕にて, RNA-virus 様粒子を認めた症例を経験したので, その C.S.F. と組織培養の細胞像および電顕所見について, 報告し, 若干の文献的考察を加える.

II. 症 例

患 者: 16 歳, 男性, 右利き.

主 訴: 頭痛, 嘔吐.

既往歴: 家族歴に特記すべきことなし.

現病歴: 昭和 50 年 9 月, 立ちくらみ, 視力低下に気づき, 同年 10 月某病院にて右側頭部から基底核にかけての腫瘍と診断され, 腫瘍の部分摘出術をうけた. その後放射線治療をうけたが翌年 3 月下旬頃より上記開頭外減部の腫脹が著明となり, 頭痛, 嘔吐を伴い, 歩行不能となったので, 昭和 51 年 4 月 19 日, 当院脳外科に入院した.

現症およびおもな検査成績: 身長 168 cm, 体重 45 kg, 栄養は良で貧血黄疸なく, 血圧 128~64 mmHg, 脈拍 56/分整で胸部, 腹部の理学的所見に著変はみられず, 頭部の術創部の腫脹を認め, 神経学的には, 以下の所見が観察された.

- (1) Level of consciousness; I の 1
- (2) Calculation disturbance

Cytology of CSF and its Cell Culture revealed RNA-virus-like Particles of Glioblastoma

Chikao YUTANI, M.D., Ryoza TOKUDA, C.T., Yoneko MIKITA, C.T. and Yasuo NISHIYASHIKI, C.T.
Dept. of Pathology, Toyonaka City Hospital
Masaharu SATOH, M.D. and Nobuhiro KANAI, M.D.
Dept. of Neurosurgery, Toyonaka City Hospital
Hidemitsu NAKAGAWA, M.D. and Masaharu HORI, M.D.

Dept. of Neurosurgery, Osaka University Medical School

Yozo NAKATA, M.D.

Cancer Research Institute, Osaka University Medical School

昭和 53 年 2 月 16 日受付

図1 脳腫瘍の剖面

- (3) Recent memory の障害
- (4) 両側 blindness
- (5) 両側視神経乳頭の萎縮
- (6) Light reflex (—)
- (7) 四肢の weakness
- (8) 右下肢の hyperpathia
- (9) Intention tremor
- (10) PTR, ATR 両側亢進

おもな検査成績：

検血；RBC 415×10^4 , WBC 5,300, Hb 15.8 mg/dl, Ht 38%.

検尿；蛋白 (—), 糖 (—), ウロビリノーゲン (正)

血液化学；K 4.2 mEq/l, Na 141 mEq/l, Cl 101 mEq/l, Ca 4.1 mEq/l.

肝機能検査；チモール 0.5, クンケル 1.6, T.P 6.4 g/dl, GPT 101, GOT 54, Al-P 8.3, 総ビリルビン 0.6 (間接 0.2).

C.S.F.；圧 330—Omm H_2O , Xanthochloria (+), 細胞数 25/3, パンディ (卅), 蛋白 774 mg/dl, トリプトファン (+).

入院後経過：入院時腫瘍の再発と考へて、右 CAG を施行。その結果右基底核部および側頭部に cyst をもった腫瘍を確認し、4月20日腫瘍部分摘出術を行った。開頭するに脳の膨隆が著しく、穿刺により黄色から血性の溶液約 80 ml を吸引し、cyst は易出血性の腫瘍組織よりなり、のう胞壁は不明で、tube を挿入し、代用硬膜にて硬膜形成を行った。

術後手術創部の膨隆があったが、意識レベルも改善し頭痛、嘔吐は軽快し、四肢の weakness も消失した。術後 20 日頃より再び脳圧亢進症状が出現し、右 CAG を施行し、右側頭部は hypovascular で右側脳室拡大がみられた。5月11日脳室ドレナージを設置し、ACNU 5 mg の内頸動脈内注入療法を開始した。脳室ドレナージ

図2 生検の組織像 (H-E 染色 $\times 200$)

よりの排液は血性で、腫瘍細胞も多数認められ、その一部が組織培養に供された。その頃から全身状態も悪化し、食欲もなく、昭和 51 年 8 月 6 日死亡した。

方法：培養細胞は術後のドレナージ排出液 80 ml を用いた。4,000 rpm. 15 分間遠心し、約 10^8 個の腫瘍細胞をペトリディッシュに入れ、培養液として Eagle's MEM を用い、 $37^\circ C$ で 5% 炭酸ガスの培養器で継代培養した。約 5 代目の腫瘍細胞を電顕材料として用いた。

培養細胞は rubber policeman で集め、スピッツに再浮遊し、1,000 rpm. 5 分間遠心し、上清を捨て、2.5% グルタルアルデヒドで固定し、0.1 M カコジレートバッファーで洗浄し、1% オスミウム酸で後固定し、アルコールで脱水、EPON 812 で包埋し、ガラスナイフで薄切し、酢酸ウラン、水酸化鉛で電子染色を行い、電顕で観察した。

病理組織学的所見：病理解剖は頭部に限られ、脳重量は 1,360 g あり、腫瘍は右側頭部から両側脳室および第 III 脳室へ浸潤し、大きさは $10 \times 7 \times 5$ cm であった。脈絡膜も浸潤され、クモ膜下腔に散在性に腫瘍の転移結節を多数認めた。腫瘍の剖面では、褐色を呈した出血性梗塞と壊死が著しく、境界は比較的鮮明で点状出血も認められた (図 1)。

生検および剖検時組織学的所見：腫瘍を構成する細胞は、やや小型の異型性は比較的少ない細胞と、大型で多核でしかも大小不同、異型性ともに著しい巨細胞とからなり、いずれも細胞配列は不規則で、クロマチンに富み、とくに巨細胞の核内には、核小体とは別に大小の空胞がみられ、核内封入体のごとく観察された。核小体も目立ち、位置、大きさも不規則であった。腫瘍細胞は、とくに大型の細胞では、細胞突起が著しく、一部融合している像も認められた。一部ではあるが、血管内皮細胞の増殖、血管周囲の偽ロゼット形成、壊死もみられた。これらの所見は glioblastoma; giant cell type に一致する

図 3 C.S.F. 中の腫瘍細胞 (Pap. 染色 ×400)

図 4 C.S.F. 中の腫瘍細胞 (Pap. 染色 ×1,000)

図 5 C.S.F. 中の腫瘍細胞 (Pap. 染色 ×1,000)

図 6 組織培養の Pap. 染色 (×400)

像⁹⁾と考えられる (図2)。

C.S.F. および組織培養の細胞診像：C.S.F. に出現した腫瘍細胞は図3のごとく、おおむね集団としてみられ、それらの細胞の大きさは約 $10\sim 20\mu$ の間にあり、大きい細胞では $60\sim 80\mu$ の巨細胞も散見された。組織像でもみられたように、小型の腫瘍細胞は、比較的異型性は少ないが、大型の細胞はいずれも、細胞形態は不規則で、細胞突起が認められ、それらの融合もみられた。各腫瘍細胞の N/C 比はそれほど高くなく、むしろ細胞質は広く感じられた。細胞質には、1～数個の空胞がみられ、微細なレース状にみえるものもあった。大部分の腫瘍細胞は、核異型の著しい、微～細顆粒状のクロマチンを有し、時々白く抜けてみえる核小体と、それとは別に空胞状の核内封入体様の所見もあった (図3, 4)。なかには、巨大で核クロマチンに富む細胞も散見された (図5)。

組織培養の細胞診像は、基本的には、C.S.F. のそれとは変わらないが、培養の性格上、腫瘍細胞は壁についた状態で観察され、広い細胞質、多核の、クロマチンに富む腫瘍細胞が、それぞれ細胞突起で融合している像が C.S.F. よりも浮き彫りにされていた (図6)。

組織培養の電顕像：不規則で大小不同の著しい腫瘍細

胞は電顕でも観察され、核は入り込んだ彎入をもち核小体も明瞭であり、光顕でみられた核内封入体様の構造は一部拡張したリボゾームの彎入への入り組み、また一部では小胞体の核への接近としてみられているようにもみられた。細胞質には、不規則に拡張したリボゾーム、ミトコンドリアが目立ち、それを取り囲むように、ポリゾームが多数認められた。細胞間には、不完全な接合斑があり、細胞突起の融合と一致していた (図7)。

細胞間液と小胞体システムの中に、平均直径 100 nm の円形の、3層からなる virus-like 粒子が多数認められ、それらの一部は、細胞質膜から細胞間へ出ているところもあり、これらは「発芽」(Budding)^{8,9)} と呼ばれる現象に一致している。virus 様粒子は、その中心の核が抜けているものと、黒く染まっている2つの群がみられ、前者は未熟型で後者は成熟型といわれるタイプの RNA type C の virus と考えられる (図8)。

外層から約 1.1 nm の spike がみられ、中心の core は約 70 nm の直径であり、murine sarcoma type virus⁸⁾ に近い形態と思われる。

図 7 組織培養の電顕像 ($\times 10,000$)

図 8 組織培養の電顕像 ($\times 40,000$)

III. 考 案

Oehmichen¹⁰⁾によれば、C.S.F.に出現しうる細胞としてその起原から ectodermal と mesodermal に大別し、その構成細胞として表1のような細胞をあげている。本例の場合、鑑別対象となるのは明らかに腫瘍細胞であるが、これらの細胞を常に考えておかなければならないのは当然だが、C.S.F.にみられる転移性腫瘍を除いた原発性の中樞神経系の腫瘍細胞としては、Watson ら¹⁷⁾によれば表2のような腫瘍があげられる。これらのなかでも、他の文献^{1,2,4)}からも考え併せると、頻度の高いものとしては、medulloblastoma, pinealoma, glioblastoma

と続き、脳外腫瘍もいれると、leukemia-lymphoma が最も頻度が高くなり²⁾、転移性の腫瘍としては、乳腺、肺が多いと報告されている²⁾。

一般的には、glioblastoma の細胞診上の特徴は^{1,10,17)}大型で、細胞・核異型が著しく、細胞突起を有している細胞質は塩基好性で、空胞がみられ、核クロマチンは多彩で粗く、核小体、有糸分裂がみられる場合が多く、多核の巨細胞が散在するとされており、これらの点は、本例も備えているように思われる。

組織培養による脳腫瘍の研究は、永井⁵⁾の総説に詳しいが Russel¹²⁾の著書“Pathology of Tumours of the Nervous System” (1971) の中に Lumsden¹²⁾の組織培養の章はあまりにも有名であり、日本でも近年中井⁷⁾、

表 1 C.S.F. に出現しうる諸細胞

1. Immunocompetent Cells :
small lymphocytes
lymphoid cells
plasma cells
2. Mononuclear Phagocytes :
monocytoid cells
activated monocytoid cells
macrophages (lipophages, erythrophages,
siderophages, leukocytophages)
(giant cells)
3. Polymorphonucleated Granulocytes :
neutrophilic granulocytes
eosinophilic granulocytes
basophilic granulocytes
(basophilic tissue mast cells)
4. Erythrocytes
5. Cell Lining the CSF Space :
choroid plexus cells
ependymal cells
arachnoid cover cells
naked nuclei
6. Additional Cell Elements :
cartilage cells
bone marrow cells
(glial cells?)
7. Tumor cells

佐野, 佐藤ら¹³⁾の研究があり, 広く各施設で実用に供されている. 組織培養法による脳腫瘍の診断は, 動的に各腫瘍細胞間の関係および活動性を観察することにより, 土田ら¹⁶⁾の報告によれば 52.2% の診断率があると述べている.

組織培養の電顕で認められる RNA-virus は形態学的に, A, B, C の 3 つのタイプに分類され, それらの特徴は次のようにいわれている. type A は 2 重の層をもつ直径約 70 nm で, 通常細胞質にみられるとされており, type B は, 本例のような type C と近似しており, 核が type C とは異なり, 一定の円形を示さず, しかも明瞭な棘突起を有するとされている. したがってわれわれの virus 様粒子はその形態学的特徴から type C と考えられる.

人の悪性腫瘍における RNA-virus の発見はすでに, 乳癌, 肺癌, 腎癌などに観察され⁶⁾, 脳腫瘍では, 1971 年谷¹⁴⁾の報告があり, 詳細は不明だが, やはり組織培養により検索している点は, きわめて重要な示唆と思われる.

脳腫瘍ことに glioblastoma と RNA-virus との関係は, 1970 年 Temin ら¹⁵⁾の RNA 腫瘍ウイルスに RNA 依存性 DNA-polymerase の存在が発見され, RNA-virus の人癌への関与が考えられ, われわれの症例で RNA-virus がみられたことは意義が深い. また西田⁹⁾の

表 2 C.S.F. にみられる原発性脳腫瘍

- Neoplasms of Meningeal Origin
Meningioma
Meningeal sarcoma
- Neoplasms of Glial Origin
Astrocytoma Grade I-III
Astrocytoma Grade IV (Glioblastoma)
Oligodendroglioma
Ependymoma
Papilloma of choroid plexus
- Neoplasms of Neuronal Origin
Medulloblastoma
Neuroblastoma
Retinoblastoma
- Miscellaneous Neoplasms
Pineoblastoma
Pituitary adenoma
Craniopharyngioma
Schwannoma and neurofibroma
Chordoma

報告では, glioblastoma の中でも Giant cell type に RNA-virus の関与が多いと述べていることはさらに興味深い.

従来脳腫瘍の光顕の所見の中で, いわゆる核内封入体の所見が古くから知られており^{3,11)}, 61% にもみられるとする報告もあり, それらの著者はいずれも virus との関係で推察しており, 組織培養の電顕の所見もみられるが³⁾, 確立したものは考えられておらず, むしろ生化学的な方向から^{8,15)}, RNA-virus が考えられ, 報告の写真からみれば否定的である. しかしながら, type C RNA-virus がどのようにして細胞内で産生されるかが解明されていない現在, これまで報告のあった核内封入体の所見との関係は依然として明白ではなく, 今後の研究にまところが多い.

IV. む す び

17 歳男子で臨床的に脳腫瘍が疑われ, 諸検査 (生検, 電顕も含む) の結果, glioblastoma と診断され, 経過中 C.S.F. に腫瘍細胞が出現し, その組織培養の電顕で type C RNA-virus 様粒子を認めた症例の C.S.F. および組織培養の細胞診像ならびに電顕像について報告した.

なお本論文の要旨は第 15 回日本臨床細胞学会秋季大会および第 6 回国際細胞学会議で発表した.

Summary

A 17-year-old boy, who had a diagnosis of glioblastoma diagnosed by surgical specimen and postmortem examination, was investigated cytologically. CSF and cell culture of CSF revealed RNA-virus-like particles electron microscopically, showed characteristically a variable number of large, bizarre, mononucleated and multinucleated giant cells with pleomorphic nuclei exhibiting varying degrees of hyperchromasia, coarse clumping of chromatin, and significant cell protrusions.

文 献

- 1) Bots, G.T.A.M., Went, L.N. and Schaberg, A.: Results of a sedimentation technique for cytology of cerebrospinal fluid, *Acta Cytol.*, 8: 234~241, 1964.
- 2) Gondos, B. and King, E.B.: Cerebrospinal fluid cytology; Diagnostic accuracy and comparison of different techniques, *Acta Cytol.*, 20: 542~547, 1976.
- 3) Froelich, J.S. and Lapham, L.W.: Tissue culture studies of gliomas, *Amer. J. Pathol.*, 47: 147~158, 1965.
- 4) Kline, T.S.: Cytological examination of the cerebrospinal fluid, *Cancer*, 15: 591~597, 1962.
- 5) 永井政勝: 組織培養法によるグリオーマの研究, *神経進歩*, 20: 124~136, 1976.
- 6) Marquart, K.H. and Cunderlik, V.N.: Oncornavirus-like particles in biopsy material form a glandular erosion of the human uterine cervix, *Acta Cytol.*, 20: 335~339, 1976.
- 7) Nakai, J.: *Morphology of Neuroglia*, Igaku-Shoin, Tokyo, 1963.
- 8) 中田陽造: 脳腫瘍とウイルス, *日外宝*, 45: 184~191, 1976.
- 9) 西田和男: Rous Sarcoma Virus, Schmidt-Ruppin 株による実験的サル脳腫瘍, *神経進歩*, 20: 332~343, 1976.
- 10) Oehmichen, M.: *Cerebrospinal Fluid Cytology*, pp. 16~84, Igaku-Shoin, Tokyo, 1976.
- 11) Robertson, D.M. and MacLean, J.D.: Nuclear inclusions in malignant gliomas, *Arch Neurol*, 13: 287~296, 1965.
- 12) Russel, D.S., Rubinstein, L.J. and Lumsden, C.E.: *Pathology of Tumours of the Nervous System*, 3rd ed. Edward Arnold, London, 1971.
- 13) Sano, K., Sato, F. and Chigasaki, H.: Tissue Culture of glioma, in *Morphology of Neuroglia*, Nakai ed., Igaku-Shoin, Tokyo, 1963.
- 14) 谷 栄一: ヒト Glioblastoma multiforme 培養細胞中の C 型ウイルス様粒子, *脳と神経*, 23: 595~596, 1971.
- 15) Temin, H.M.: RNA virus and cancer, *Cancer*, 39: 422~428, 1977.
- 16) 土田富穂, 永井政勝, 星野孝夫, 新井紀元, 佐野圭司: 脳脊髄液の細胞培養による脳腫瘍の診断法, *日臨細胞誌*, 7: 18, 1968.
- 17) Watson, C.W. and Hajdu, S.I.: Cytology of primary neoplasms of the central nervous system, *Acta Cytol.*, 21: 40~47, 1977.