浸潤能からみた脳腫瘍細胞の動態

Spheroids を用いた新しい invasion test の方法について

奥村 禎三・山下 純宏・徳力 康彦・菊池 晴彦・織田 祥史*・半田 肇**

Invasion Test

*A New Technique for Estimating the Invasive Potential of Brain Tumors using Spheroids
—Experimental Study—*

Teizo OKUMURA, Junkoh YAMASHITA, Yasuhiko TOKURIKI, Haruhiko KIKUCHI,
Yoshifumi ODA* and Hajime HANDA**

*Department of Neurosurgery, Kyoto University, Kyoto; *Department of Neurosurgery, Shiga Medical Center for Adult Diseases, Moriyama, Shiga; **Department of Neurosurgery, Hamamatsu Labor Welfare Hospital, Hamamatsu, Shizuoka*

Abstract

In cases of malignant brain tumors, the histological diagnosis may be of prognostic value, but the clinical course is sometimes unpredictable. Malignant brain tumors are destructive mainly through their invasive tendency and the pressure they exert as they grow. It is difficult to evaluate a tumor's invasive capacity in a two-dimensional culture system such as monolayer culture. Although three-dimensional culture systems have been used for testing the invasive patterns of some malignant tumors, little is known about the invasive mechanisms of neurogenic tumors. Using a modified "invasion test," the authors examined the invasive characteristics of four neurogenic cell lines (T₁, 9L, T₁A, and T₁B). Multicellular tumor spheroids (MTS) were produced from tumor cell colonies consisting of 20 to 30 cells by shake culture. With this method, MTS of constant shape and size were obtainable. Pulsating heart tissue obtained from 9-day-old chick embryos was minced and also shake cultured. The MTS and cultured embryonic chick heart (ECH) fragments were placed together in semisolid agar medium for 2 hours, then cultured in a gyratory shaker for 7 days. Tumor invasiveness was examined by hematoxylin-eosin staining and anti-ECH antibody immunostaining. All cell lines examined were able to form MTS and all proved highly invasive.

Key words: experimental brain neoplasms, tumor invasiveness, spheroids

I はじめに

脳腫瘍の組織診断がその予後ともっともよく相関することとは言うまでもないが、往々にして腫瘍の heterogeneity のために予測される臨床経過に合致しない症例に遭遇する¹³⁾。中枢神経系の悪性腫瘍が神経管外へ転移することは

きわめてまれであり、局所的に周囲脳組織を破壊し浸潤進展することが大きな特徴の一つでもある。ゆえに、悪性脳腫瘍の治療に当っては、その浸潤能(invasiveness)を解明していくことが重要な課題の一つであると考えられる⁴⁾。しかし、腫瘍と周囲脳組織の間に生じる浸潤の機序についてはいまだよく知られておらず⁴⁾、単層培養などの2次元

京都大学脳神経外科 *滋賀県立成人病センター脳神経外科 **浜松労災病院脳神経外科

Address reprint requests to: T. Okumura, M.D., Department of Neurosurgery, Kishiwada Municipal Hospital, 4-27-1 Kamori-cho, Kishiwada, Osaka 596.

受稿 1986年3月31日 受理 1987年5月14日

モデルでの解釈は困難であった¹³⁾。

この点に関して、我々は spheroids (multicellular tumor spheroid: MTS) を用いた 3 次元モデルにて脳腫瘍の浸潤能を検討しており、本稿では Mareel らの方法^{10, 12)}をもとに我々が新しく改良工夫した invasion test および spheroids 作製の手技を中心に報告する。

II 材料および方法

1. 腫瘍細胞および培養液

腫瘍細胞として、① T₁, T₁A, T₁B: ethylnitrosourea で誘発されたラット neurogenic tumor (malignant neurinoma)¹⁶⁾、② 9L: methylnitrosourea で誘発されたラット gliosarcoma を用いた。培養液は、Dulbecco's modified Eagle's MEM (日水) に 0.1 g/l streptomycin sulfate および penicillin G potassium 20 万単位を加えたものを用いた。なお、fetal calf serum (FCS) 濃度はいずれも 10% とした。

2. Spheroids の作製

Single cell suspension からいったん colony を作り、これを shake culture することにより spheroids を作製した (Fig. 1)。Colony formation は軟寒天重層法 (soft agar overlay method)^{6, 7)} によった。すなわち、単層培養中の各細胞を 0.1% trypsin + 0.01% EDTA で処理し、2% FCS 加培養液で 2 回洗滌後、 $1.0 \times 10^6/\text{ml}$ の single cell suspension とした。Linbro® 6 穴プレート (Flow Laboratories Inc.) に下層 agar として 10% FCS 加培養液を含む 0.5% agar を入れてあらかじめ固めておき、この上に single cell suspension を 30 μl /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、10% FCS 加培養液を含む 0.3% の semisolid agar を用いた。なお agar は、BACTO-AGAR® (DIFCO Laboratories Inc.) 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

Fig. 1 Preparation of multicellular spheroids. Colonies produced by the soft agar overlay method are cultured at 37°C in a gyratory shaker at 100 rpm. From 7 to 14 days later, spheroids 0.3 to 0.5 mm in diameter are harvested continuously. FCS indicates fetal calf serum.

な斑点 (直径 30~50 μm) 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り出し、10 ml 三角フラスコ (培養液は 5 ml) に移して密栓をしたのち、37°C, 100 rpm で shake culture を行った。

3. Embryonic chick heart (ECH) fragment の作製

浸潤能を評価する recipient として脳組織を用いるべきであるが、今回は Mareel¹⁰⁾ に準じて 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て心外膜や大血管を除去した。20% FCS 加培養液中にて 300~500 μm 程度の大きさに細切した。心臓 1 個当たり 20 ml の培養液が適当であり、この

Fig. 2 Embryonic chick heart fragment cultured for 72 hours at 180 rpm in a gyratory shaker, surrounded by a few layers of fibroblastoid cells. A and B: Scanning electron micrograms. A: Bar=50 μm , B: Bar=5 μm . C: HE stain, $\times 100$.

心筋片浮遊液を10 mlの三角フラスコに入れて密栓し、37°C、180 rpmで72時間 shake culture した。これにより、直径0.3~0.5 mmのほぼ球形のECH fragmentができた。最外層には平らな線維芽細胞様の細胞がほぼ1層に並んでいた(Fig. 2)。ECHは引き続き単独で shake culture 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。

4. Invasion test

SpheroidsとECHを10%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 coculture した。対になった雪ダルマ型の組織を1対ずつ10 mlの三角フラスコに移し、100 rpmで shake culture した。培養液は20% FCS加Dulbecco's modified Eagle's MEMを用い、フラスコ1個当たり約7 mlが適当と思われた(Fig. 3)。実験は triplicate 以上にて行い、1・3・5・7日目にホルマリン固定し、連続切片にてHE染色および抗ECH抗体による染色を行い、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)¹¹⁾は、Dr. Mareelより供与を受けた。

5. 浸潤能の判定基準

腫瘍細胞の浸潤度を判定するために、Table 1およびFig. 4のような判定基準を設けた。軟寒天上での2時間の coculture にて両者が接着しないものを浸潤度0、明らかな

浸潤を示すものをⅣとし、5段階に分類した。すなわち、浸潤度Ⅰ：ECHのfibroblastoid cellが腫瘍組織を取り囲む(Ib)か、浸潤を示す(Ia)もの、Ⅱ：両者が接着してい

Table 1 Proposed classification of invasiveness

Grade	Histological appearance
0	No attachment of T to ECH is observed. Tissues originally fused separate in shake culture within 24 hours.
I	T is invaded (Ia) or surrounded (Ib) by the ECH.
II	T and ECH fuse firmly but their interface is not disturbed. Neither invades the other.
III	The interface between the fused tissues is disrupted and interaction is observed. Both tissues are viable, but the fibroblastoid outer layer of the ECH begins to disappear.
IV	T surrounds or invades the ECH, whose fibroblastoid outer cell layer has disappeared.
IVa:	ECH is surrounded by T without apparent invasion.
IVb:	T invades the ECH, and ultimately destroys and replaces it. The degree of invasion is below 50% on day 7.
IVc:	T invades the ECH significantly. The degree of invasion is over 50% on day 7.

T indicates tumor fragment; ECH, embryonic chick heart fragment.

Fig. 3 Invasion test procedure. A multicellular tumor spheroids and precultured embryonic chick heart (ECH) fragments are placed together in semisolid agar for 2 hours. The tissues are then cultured at 37°C in a gyratory shaker at 100 rpm for 7 days. Invasiveness is sequentially examined by HE staining and immunostaining.

Fig. 4 Schematic illustration of invasiveness classification. T indicates tumor fragment; ECH, embryonic chick heart fragment.

るが境界明瞭で ECH の最外層の fibroblastoid cell layer が保たれているもの、Ⅲ：両者の境界が乱れ、ECH の fibroblastoid cell layer が消失し interdigitation を認めるが、どちらが優勢とも言えないもの、Ⅳ：腫瘍細胞が ECH を取り囲む (Va) か、さらに明らかな浸潤を示し ECH の細胞を置換している (Mb, Nc) ものである。

Ⅲ 結 果

1. Spheroids 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100 rpm で shake culture 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100 μm 前後)が出現し、7~14 日目には直径300~500 μm の spheroids が1~3 個/flask 形成された (Fig. 5)。これらは光顕的にはよく似た形態をしており、大きくなるに従って中心部の壊死を認めるが、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接着する細胞ほど spheroids としての形態をよく保っていた。

T₁ および 9L に関して、我々の方法と spinner flask 法での spheroids 径の変化および spheroids の回収率を検討した (Fig. 6)。Spheroids の回収率は、5 ml の小三角フラスコ内に直径300 μm の spheroids 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、我々の方法のほう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。我々の方法での spheroids 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 上の doubling time T₁ 16.5時間、T₁A 13.7時間、T₁B 18.5時間、9L 20.5時間とよく相関した。

2. Coculture

0.35%の軟寒天培地上で spheroids と ECH を接触させた場合、4種類の細胞すべてが ECH と接着しており(粘着

Fig. 5 Multicellular tumor spheroids. A and B: Scanning electron micrograms of T₁B malignant neurinoma. A: Bar=50 μm , B: Bar=5 μm . C: HE stain of T₁ malignant neurinoma, $\times 100$. D: HE stain of 9L gliosarcoma, $\times 100$.

Fig. 6 Comparison of spheroid production by the spin flask method (open circles) and the modified shake culture method (closed circles). upper: Median diameters of spheroids (bar indicates standard error). lower: Harvest rate of spheroids. The sample numbers of the cell lines were T₁, 8 and 9L, 5. Spheroid growth did not differ significantly with the two methods, but sufficient numbers of spheroids for our experiment were more consistently obtained with our method than with the spin flask method.

性あり), 引き続き100 rpm で shake culture しても24時間以内にフラスコ内で分離するものはなかった。

3. 浸潤能

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では1日目すでにECHの最外層を破壊しinteractionを認め(浸潤度Ⅲ), 3日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していた。T₁A, T₁B, 9LともTable 2のような浸潤傾向を示し, 程度の差はあるものの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Fischer 344ラットの脳内移植率がすべて100%)とよく相関した。Fig. 7に, 代表例(T₁B)を示す。

Table 2 Sequential change of invasiveness of 4 neurogenic cell lines according to the proposed classification

Cell line	Days after culture			
	1	3	5	7
T ₁ (15)	III (3)	IVa (4)	IVb (4)	IVc (4)
T ₁ A (12)	II (2)	III (3)	IVb (3)	IVc (4)
T ₁ B (12)	II (3)	IVa (3)	IVb (3)	IVc (3)
9L (14)	II (3)	III (3)	IVa (4)	IVb (4)

Numerals in parentheses indicate number of specimens. The rapidity of invasion differed among the four cell lines, but each gradually invaded and replaced the ECH. Each of the rat neurogenic cell lines used in this study was highly invasive according to this invasion assay.

IV 考 察

3次元の培養系(three-dimensional culture system)で悪性腫瘍の浸潤度を調べたのは1958年のLeightonらが初めてであり, 以後多くの報告がみられる^{11,12)}。これらのモデルも近年改良が加えられ, その一つとして腫瘍塊と心筋塊をcocultureしたのちshake cultureするinvasion testも確立されてきた^{3-5,8,10-13)}。Invasion testの目的は, ①cell lineのcharacterization, ②浸潤機序の研究, ③薬剤ないし酵素のanti-invasive effectの検討などである^{5,7,8,12)}。

腫瘍塊として用いられるspheroids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¹⁹⁾が確立したものである。Spheroidsの作製方法としては, single cell suspensionからspinner flask内にて作る方法^{2,15)}やmicrotitration plateを用いる方法¹⁾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, 十分なspheroids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spheroidsを作製したところ, 満足すべきspheroids形成をみることができた。すなわち, 増殖の旺盛なcolonyを核にしてshake cultureすると, 10 mlのフラスコの中に1~3個のspheroidsを確実に作製することができる。目的とする実験の必要数に合せて準備ができ, さほど煩雑な操作も必要としない。樹立細胞株でcolony形成能を有する腫瘍であれば, 100%の確率で本法によるspheroidsの作製が可能であった。

Invasion testの種々の至適条件を検討したのはMareelらである^{10,12)}。1980年の報告¹⁰⁾のなかで, 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あるいはニワトリの胎児の脳・心筋・肝

Fig 7 Invasion of T,B spheroids into a cultured ECH fragment stained by anti-ECH antibody. A Day 1 Spheroids (T) begin to surround the ECH fragment, but the ECH fibroblastoid outer layer (arrows) is almost entirely preserved B. Day 3. The spheroids have gradually enlarged and completely surround the ECH. Although the ECH cells are still viable, fibroblastoid cells (arrows) have disappeared and the peripheral ECH portions are partially destroyed or degenerated C. Day 7. The tumor cells have extensively invaded the ECH (arrows) and immunopositive ECH cells have degenerated and decreased in number These serial specimens illustrate the typical invasive pattern of malignant rat neurogenic cells Immunostaining, left $\times 25$, right $\times 100$

臓などについて検討したが、脳および肝臓は脆弱すぎて shake culture に耐えられず ECH のような barrier としての fibroblastoid cell layer が存在しないためニワトリ胎児の心筋組織を選択したが、これは Mareel の結果と同じであった。Recipient としての ECH fragment については、Kieler ら⁸⁾、Mørk ら^{13,14)} も報告しており、preculture 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今回のような条件としたが、結果的にこれらは Mareel ら¹²⁾ と同様であったためその詳細は省略する。また、腫瘍モデルと

しての spheroids の良さ^{3,15)}は論を待たないが、その作製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。しかし、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。

腫瘍の浸潤機序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① growth pressure (細胞増殖に伴う機械的圧迫)、② separation (本来の組織に留まらず遊離していくこと)、③ locomotion (細胞そのものの運動)、④ destruction of host tissue (蛋白分解酵素などの関与)、⑤ phagocytosis などがある^{9,10)}。しかし、浸潤の機序について説得力のある一元的な説明はいまだなされていない。脳腫瘍の浸潤と他臓器の悪性腫瘍の間に差があるのかどうかは我々の興味のあるところである。今後の研究目的は、脳腫瘍細胞を用いてその浸潤機序を解明するとともに、臨床への応用として①臨床例での浸潤能と組織診断および臨床経過との比較検討、②浸潤を阻止する因子の選択および精製に関する検討である。臨床例での検討では、グリオーマを中心とする87例での preliminary な結果を得ており、BUdR による DNA 合成能との関連性も検討し、別報にて報告する^{17,18)}。

易転移性の他の臓器癌と異なり、局所浸潤を悪性像の最大の要因としている悪性脳腫瘍において、この浸潤能の解明とこれを阻止する因子の解析は脳神経外科領域において特に重要と考えられる。本法を発展させるとともに、軟骨を中心とした各種抽出物の影響について漸次報告する予定である。

V ま と め

1. Spheroids 形成に際し、軟寒天重層法で colony を形成したのち shake culture することにより、均一な形および大きさの細胞塊が回収できた。
2. Spheroids と ECH を coculture する invasion test により、*in vitro* での浸潤能を評価する方法を考案した。
3. 悪性脳腫瘍における浸潤能の検討の意義について考察した。

本研究の一部は、昭和61年度厚生省がん助成金(61-17)によった。

文 献

- 1) Darhling JL, Oktar N, Thomas DGT: Multicellular tumor spheroids derived from human brain tumors. *Cell Biol Int Rep* 7: 23-30, 1983
- 2) Deen DF, Hoshino T, Williams ME, Muraoka I, Knebel KD, Barker M: Development of a 9L rat brain tumor cell multicellular spheroid system and its response to 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-*Neurol Med Chir (Tokyo)* 28, May 1988

- nitrosourea and radiation. *JNCI* 64: 1373-1382, 1980
- 3) De Ridder LI, Laerum OD: Malignancy of neurogenic cells characterized by their invasiveness in vitro. *Arch Geschwulstforsch* 51: 28-33, 1981
- 4) De Ridder LI, Laerum OD: Invasion of rat neurogenic cell lines in embryonic chick heart fragment in vitro. *JNCI* 66: 723-728, 1981
- 5) Easty GC, Easty DM: In vivo and in vitro models of invasion, in Marcel MC, Calman KC (eds): *Invasion —Experimental and Clinical Implications—*. London, Oxford University, 1984, pp 24-62
- 6) 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
- 7) 井上雄弘, 荒川昌亨, 小川一誠: Human tumor stem cell assay. 癌と治療 9: 599-605, 1982
- 8) 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
- 9) Liotta LA: Tumor invasion and metastases. Role of the extracellular matrix. *Cancer Res* 46: 1-7, 1986
- 10) Marcel MM: Recent aspects of tumor invasiveness. *Int Rev Exp Pathol* 22: 65-129, 1980
- 11) Marcel MM, Bruyne GK, Vandesande F, Dragonetti C: Immunohistochemical study of embryonic chick heart invaded by malignant cells in three dimensional culture. *Invasion and Metastasis* 1: 195-204, 1981
- 12) Marcel MM, Kint J, Meyvisch C: Methods of study of the invasion of malignant C3H-mouse fibroblasts into embryonic chick heart in vitro. *Virchows Arch [Cell Pathol]* 30: 95-111, 1979
- 13) Mørk S, De Ridder LI, Laerum OD: Invasive pattern and phenotypic properties of malignant neurogenic rat cells in vivo and in vitro. *Anticancer Research* 2: 1-10, 1982
- 14) Mørk S, Laerum OD, De Ridder LI: Invasiveness of tumours of the central nervous system, in Marcel MC, Calman KC (eds): *Invasion —Experimental and Clinical Implications—*. London, Oxford University, 1984, pp 79-125
- 15) 野村和弘: Spheroids. 脳神経外科 7: 33-36, 1979
- 16) Oda Y, Handa H, Kieler J: Induction and transplantability of rat neurogenic tumor. 日外宝 46: 513-520, 1977
- 17) 奥村禎三, 山下純宏, 徳力康彦, 半田 肇, 上条純成, 織田祥史, 寺浦哲明, 弓取克弘: Invasion test を用いた脳腫瘍悪性度の動的解析(第1報). 日外宝 55: 276, 1986 (抄録)
- 18) 奥村禎三, 山下純宏, 徳力康彦, 菊池晴彦, 織田祥史, 半田 肇: 浸潤能からみた脳腫瘍細胞の動態 —Invasion test によるヒト脳腫瘍87例の検討—. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 28: 436-441, 1988
- 19) Sutherland RM, McCredie JA, Inch WR: Growth of multicell spheroid in tissue culture as a model of nodular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 46: 113-120, 1971

[別刷請求先: 〒596 大阪府岸和田市加守町4-27-1, 市立岸和田市民病院脳神経外科, 奥村禎三]