

図5 手術摘出度によるグリオーマの生存率

おわりに

脳腫瘍の標準的治療を確立していくためには、確実なデータ管理のもとで、最もエビデンスレベルの高いランダム化臨床試験を行っていく必要がある。これに対し、疫学や統計は、過去の臨床例のデータの解析から、その疾患の特性を知り、有効な治療法を見つけ出そうというものである。ある環境条件が腫瘍の発生に影響をもつという事実を証明するには、大規模な調査が必要となるが、そこから得られた結果は予防医学へ通じるものであり、きわめて重要な情報を我々に提供してくれると考えられる。

参考文献

1. Kleihues P, Ohgaki H (1999) Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-Oncol* 1: 44-51
2. Malmer B, Iselius L, Holmberg E, Collins A, Henriksson R, Gronberg H (2001) Genetic epidemiology of glioma. *Br J Cancer* 84: 429-434
3. Grossman SA, Osman M, Hruban R, Piantadosi S (1999) Central nervous system cancers in the first-degree relatives and spouses. *Cancer Invest* 17: 299-308
4. Hu J, Mao Y, Ugnat AM (2000) Parental cigarette smoking, hard liquor consumption and the risk of childhood brain tumors- a case control study in northeast China. *Acta Oncol* 39: 979-984
5. Thomas TL, Stolley PD, Stemhagen A, Fontham ET, Bleecker ML, Stewart PA, Hoover RN (1987) Brain tumor mortality risk among men with electrical and electronics jobs: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 79: 233-238
6. Bohnen NI, Kurland LT (1995) Brain tumor and exposure to pesticides in humans: a review of the epidemiologic data. *J Neurol Sci* 132: 110-121
7. Preston-Martin S, Mack W, Henderson BE (1989) Risk factors for gliomas and meningiomas in males in Los Angeles County. *Cancer Res* 49: 6137-6143
8. Karlsson P, Holmberg E, Lundell M, Mattsson A, Holm LE, Wallgren A (1998) Intracranial tumors after exposure to ionizing radiation during infancy: a period analysis of two Swedish cohorts of 28,008 infants with skin hemangioma. *Radiat Res* 150: 357-364
9. Shapiro S, Mealey J Jr, Sartorius C (1989) Radiation-induced intracranial malignant gliomas. *J Neurosurg* 71: 77-82
10. Salvati M, Artico M, Caruso R, Rocchi G, Orlando ER, Nucci F, Salvati M (1991) A report on radiation-induced gliomas. *Cancer* 67: 392-397
11. Muscat JE, Malkin MG, Thompson S, Shore RE, Stellman SD, McRee D, Neugut AI, Wynder EL (2000) Handheld cellular telephone use and risk of brain cancer. *JAMA* 284: 3001-3007
12. Central brain tumor registry of the United States: CBRUS (2004). Statistical report: primary brain tumors in the United States, 1997-2001
13. Jukich PJ, McCarthy BJ, Surawicz TS, Freels S, Davis FG (2001) Trends in incidence of primary brain tumors in the United States, 1985-1994. *Neuro-Oncol* 3: 141-151
14. Legler JM, Ries LA, Smith MA, Warren JL, Heineman EF, Kaplan RS, Linet MS (1999) Brain and other central nervous system cancers: recent trends in incidence and mortality. *J Natl Cancer Inst* 91: 1382-1390
15. The Committee of Brain Tumor Registry of Japan (2003) Report of brain tumor registry of Japan (1969-1996) 11th edition. *Neurol med-chirur* 43 (suppl)
16. Winger MJ, Macdonald DR, Cairncross JG (1989) Supratentorial anaplastic gliomas in adults: the prognostic importance of extent of resection and prior low-grade glioma. *J Neurosurg* 71: 487-493
17. Anderson AP (1978) Postoperative irradiation of glioblastoma. *Acta radiol* 17: 475-484
18. Walker MD, Green SB, Byar DP, Alexander E Jr, Batzdorf U, Brooks WH, Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS Jr, Mealey J Jr, Owens G, Ransohoff J 2nd, Robertson JT, Shapiro WR, Smith KR Jr, Wilson CB, Strike TA (1980) Randomized comparisons of radiotherapy and nitrosoureas for the treatment of malignant glioma after surgery. *N Engl J Med* 303: 1323-1329
19. Chang CH, Horton J, Schoenfeld D, Salazer O, Perez-Tamayo R, Kramer S, Weinstein A, Nelson JS, Tsukada Y (1983) Comparison of postoperative radiotherapy and combined postoperative radiotherapy and chemotherapy in the multidisciplinary management of malignant gliomas. *Cancer* 52: 997-1007
20. Stewart LA, Glioma Meta-analysis Trialists (GMT) (2002) Chemotherapy in adult high-grade glioma:

a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet* 359: 1011-1018

21. Hensley ML, Schuchter LM, Lindley C, Meropol NJ, Cohen GI, Broder G, Gradishar WJ, Green DM, Langdon RJ Jr, Mitchell RB, Negrin R, Szatrowski TP, Thigpen JT, Von Hoff D, Wasserman TH, Winer EP, Pfister DG (1999) American Society of Clinical Oncology clinical practice guidelines for the use of chemotherapy and radiotherapy protectants. *J Clin Oncol* 17: 3333-3355

Analysis of Tumor Cell Invasion in Organotypic Brain Slices Using Confocal Laser-Scanning Microscopy

Takanori Ohnishi and Hironobu Harada

I. INTRODUCTION

Organotypic cultures of nervous tissue, including those of the hippocampal and cortical regions, have been produced successfully with a simple method in which brain slices are maintained in a culture at the interface between air and culture medium (Yamamoto *et al.*, 1989, 1992; Stoppini *et al.*, 1991; Tanaka *et al.*, 1994). In these organotypic brain slice cultures, not only is the normal cytoarchitecture such as cortical lamination and pyramidal cells preserved, but the biochemical and electrophysiological properties of neuronal cells are also maintained for 2 or 3 months. By modifying this organotypic culture of nervous tissues, we established a model for glial tumor cell invasion with conditions analogous to those of normal brains *in situ* (Ohnishi *et al.*, 1998; Matsumura *et al.*, 2000). This model enables not only to quantitatively analyze the tumor cell invasion in brain tissues, but also to investigate molecular events *in vitro* (events actually occur between transplanted cells and brains *in vivo*).

II. MATERIALS

Hanks' balanced salt solution (HBSS) (Cat. No. H9269), Eagle's minimum essential medium (MEM) with HEPES (Cat. No. M7278), D-glucose (Cat. No. G7021), penicillin-streptomycin solution (Cat. No. P0781), amphotericin B (Cat. No. A2942), propidium iodide (PI) (Cat. No. P4170), L-glutamine (Cat. No.

G5763), N-methyl-D-aspartate (NMDA) (Cat. No. M3262), and agar (Cat. No. A5431) are from Sigma. Dulbecco's phosphate-buffered saline, calcium-magnesium free [PBS(-), pH 7.4] (Cat. No. 14190-250), horse serum (Cat. No. 16050-122), and fetal bovine serum (FBS) (Cat. No. 16000-044) are from Invitrogen Corp. Culture plate inserts with a 0.4- μ m-pore membrane, 30 mm (Millicell-CM) (Cat. No. PICM 030 50) are from Millipore Corp. Six-well culture plates (Cat. No. 3506), 60-mm culture dishes (Cat. No. 430166), and 100-mm culture dishes (Cat. No. 430167) are from Corning. The PKH2 fluorescent cell staining kit is from ZYNAXIS Cell Science. C6 rat glioma cells and T98G human glioma cells are from American Type Culture Collection. For these cell cultures, Ham's F10 powder (Cat. No. N6635) and MEM (Cat. No. M4655) are from Sigma.

III. PROCEDURES

A. Preparation of Brain Slice and the Organotypic Culture

This procedure is modified from the method of Stoppini *et al.* (1991).

Solutions and Instruments

Scissors (large one for decapitation and small one for dissection of brains)
Microforceps with fine chips
10% povidone-iodine solution

Phosphate-buffered saline without calcium and magnesium (pH 7.4)

Microslicer with a sliding cut mode (possible to cut nonfrozen fresh brains with a range of 50 to 1000 μm thick)

Culture plate inserts with 0.4 μm -pore membranes (30 mm in diameter) (Millicell-CM)

Six-well culture plates (35 mm in diameter/well)

60-mm culture dishes

CO₂ incubator

Culture medium: 50% Eagle's MEM (Earle salt with L-glutamine, 25 μM HEPES, and NaHCO₃), 25% HBSS, 25% heat-inactivated horse serum, 6.5 mg/ml D-glucose, 100 U/ml penicillin, 100 μg /ml streptomycin, and 2.5 μg /ml amphotericin B. To make 200 ml, add 96 ml of a Eagle's MEM solution, 50 ml of HBSS, 50 ml of horse serum, 1.3 g of D-glucose, 2 ml of a penicillin (10,000 U/ml)-streptomycin (10 mg/ml) solution, and 2 ml of an amphotericin B solution (250 μg /ml). Keep at 4°C.

Steps

1. Anesthetize a 2-day-old neonatal rat with diethyl ether and plunge into a 10% povidone-iodine solution.

2. Cut off the head with large scissors, remove the skin and the skull with a small scissors, and take out the whole brain quickly and place in a 60-mm culture dish with HBSS.

3. Cut the brain vertically to the base, 1 mm inward from both rostral and caudal ends of the cerebrum with a blade, and mount on the stage of a microslicer, which is sterilized with 70% ethyl alcohol.

4. 300- μm -thick cut brain slices and transfer each slice onto a porous (0.4 μm pore size) membrane of a culture plate insert, which is placed in a well of a six-well culture plate filled with PBS.

5. After aspiration of PBS from the outer well of the six-well culture plate, add 1 ml of culture medium to the outer well but without covering the brain slice placed on the membrane.

6. Incubate the brain slice at 37°C under standard conditions of 100% humidity, 95% air, and 5% CO₂.

7. After 3 days of the culture, replace half of the medium with fresh medium twice a week. Reduce the volume of the medium after the second change to 0.8 ml so that the slices remain well exposed to the air. (This is critical for long-term survival of the neuronal cells.) (Fig. 1).

B. Assessment of Viability of Brain Slices

The viability of cultured brain slices can be assessed by morphological observation, neuronal activity, electrophysiological features, and production of bioactive substances such as γ -aminobutyric acid and neuropeptides. Normal cytoarchitecture such as cortical lamination and hippocampal structure is clearly

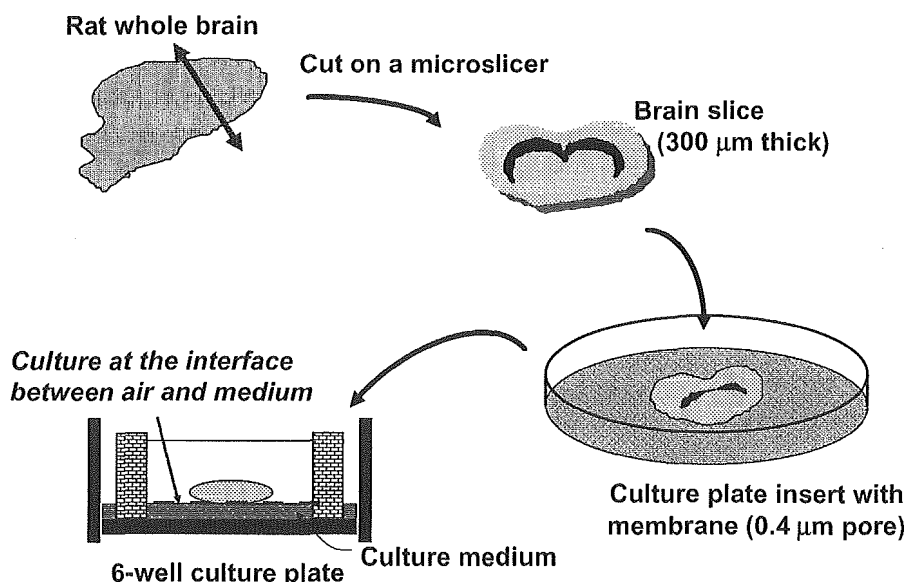


FIGURE 1 Illustrative procedures of brain slice culture. A rat whole brain slice 300 μm thick is placed on a porous membrane affixed to the culture plate insert and cultured at the interface between air and culture medium.

observed for about 2 months after the slice culture if the culture condition is kept properly (Fig. 2). This section describes the method used to assess the neuronal viability of brain slices by NMDA insult that can induce early and delayed neuronal cell death (Sakaguchi *et al.*, 1996).

Solutions and Instruments

100 μ M N-methyl-D-aspartate solution: Dissolve 1.47 mg of NMDA in 100 ml of artificial cerebrospinal fluid (CSF). Prepare artificial CSF from three stock solutions, A, B, and C, before use. Stock solution A consists of 18.12 g of NaCl, 0.488 g of $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.932 g of KCl, and 1.232 g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in 100 ml of H_2O . Stock solution B contains 2.22 g of CaCl_2 in 100 ml of H_2O , and stock solution C contains 4.62 g of NaHCO_3 in 100 ml of H_2O . Store at 4°C. To make 100 ml of artificial CSF, add 4 ml of stock solution A, 4 ml of stock solution C, and 91 ml of H_2O and then place the mixed solution under the current of 95% air and 5% CO_2 to lower the pH of the solution. Then, add 1 ml of solution B and 0.18 g of D-glucose to the mixed solution (the final pH is 7.4).

4.6 μ g/ml propidium iodide solution. Dissolve PI in a serum-free solution containing 75% MEM, 25% HBSS, 2 mM L-glutamine, and 6.5 mg/ml D-glucose to a final concentration of 4.6 μ g/ml.

Fluorescence microscope with a tetramethylrhodamine isothiocyanate (TRITC) filter

Steps

1. Incubate brain slices in 1 ml of the artificial CSF solution containing 100 μ M NMDA, which is placed in

the bathing well of a six-well culture plate for 15 min. Incubate the slices in PI solution for 1 h to measure early neuronal death or for 24 h to measure delayed neuronal cell death.

2. View PI signals under a fluorescence microscope with a TRITC filter.

3. As a control, incubate brain slices in PI solution for 1 h or 24 h following incubation in the CSF solution without NMDA for 15 min. (Fig. 3).

C. Preparation of Tumor Cell Spheroids

Tumor Cells, Solutions, and Instruments

Tumor cells in culture and their culture medium (Ham's F10 medium containing 10% FBS is used for C6 rat glioma cells, and MEM supplemented with 1% nonessential amino acid, 1% sodium pyruvate, and 10% FBS is used for T98G human glioma cells)

PKH2 fluorescent cell-staining kit

1.25% agar-coated culture dish (100 mm in diameter)

Place 5 ml of 1.25% agar solution on a culture dish and dry under air.

Reciprocating shaker (usable in a CO_2 incubator)

CO_2 incubator

Steps

1. Grow tumor cells as a monolayer culture under standard conditions.

2. Harvest the tumor cells by trypsinization, wash twice, and resuspend in labeling diluent "A" (provided with the PKH2 staining kit) at a concentration of 2×10^7 cells/ml (cell/diluent suspension).

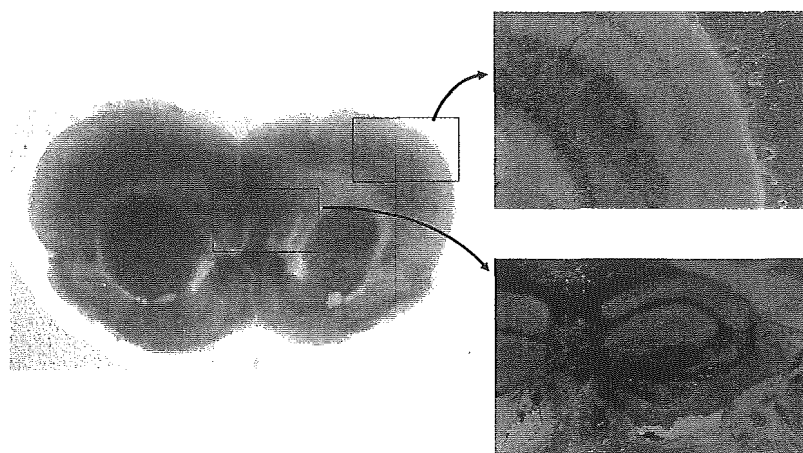


FIGURE 2 Morphological pictures of a rat brain slice after 8 days of culture. Normal cytoarchitecture, including cortical lamination and hippocampal structure, is clearly observed (left: macroscopic picture, $\times 0.5$; right: phase contrast, $\times 40$).

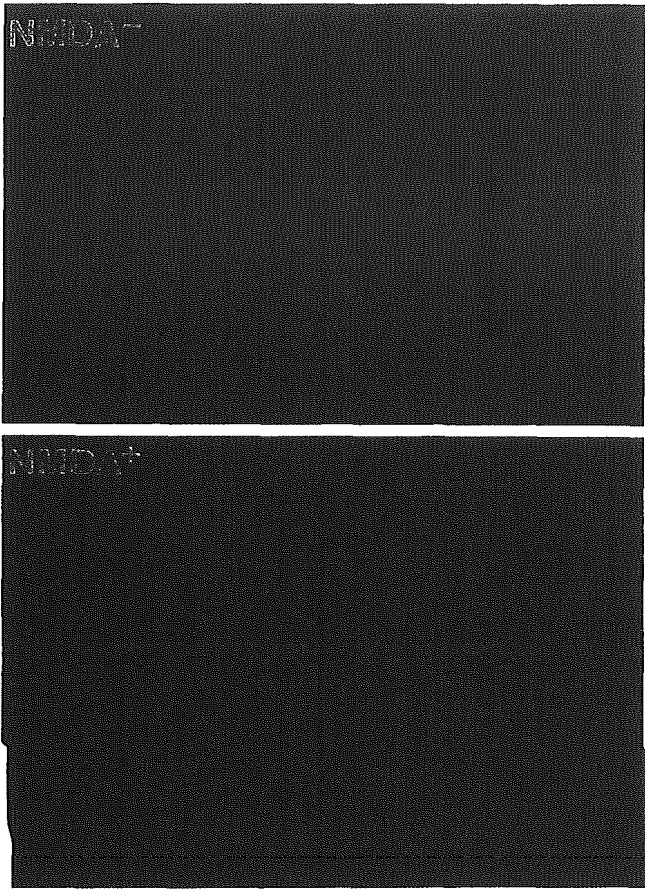


FIGURE 3 Neuronal viability of rat brain slices assessed by cellular uptake of propidium iodide (PI) without (upper) and with (lower) treatment of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA). Normally functioning neurons can exclude PI and show early or delayed neuronal cell death by NMDA insult, thus permitting entry of the PI into the cells.

3. Add PKH2 dye to an equal volume of diluent "A" to make a $4\mu\text{M}$ solution. Add this solution to the cell/diluent suspension and mix by gentle agitation.

4. After incubating the cells at room temperature for 5 min, stop the labeling reaction by adding a double volume of the culture medium containing 10% FBS and four times the volume of FBS into the sample tubes.

5. Wash the cells and resuspend in the culture medium with 10% FBS.

6. Seed the labeled tumor cells (5×10^6) into a 1.25% agar-coated culture dish and incubate under continuous agitation at a speed of 40 rpm on a reciprocating shaker at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 and 95% air for 2 to 3 days.

7. For the experiments, select cell aggregates with a size of 150 to $200\mu\text{m}$.

D. Migration Assay of Tumor Cells on Brain Slices (Fig. 4)

Instruments and Molecules

Brain slices after 7 days culture

Tumor cell spheroids

Micropipette with a volume of $10\mu\text{m}$

Molecules or agents affecting cell migration

Fluorescence microscope with a FITC filter

Color-chilled 3-CCD camera

Personal computer

Steps

1. Using a micropipette, take one spheroid of tumor cells place on the surface of brain slice, and coculture at 37°C under standard conditions.

2. Four hours later, apply $2\mu\text{l}$ of molecules in investigation directly to the tumor spheroid. Carry out the application of the molecule once a day for 3 to 6 days.

3. To estimate the extent of cell migration, calculate the distance between the margin of the initially placed spheroids and the population of the migrating cells showing half of the density (area) of the maximum density of migrating cells from the tumor spheroid by using computer images for which the original fluorescent pictures of the slices are taken with a color-chilled 3-CCD camera.

4. For this calculation, draw concentric circles $10\mu\text{m}$ apart around the margin of the spheroid and measure cell density (area of fluorescence-stained cells) within each ring by an NIH image. Then, do the summation of area of the cells contained in each ring and plot as a function of the distance from the margin of the tumor spheroid. Thus the distribution curve of migrating cells outside the spheroid is constructed for each brain slice (Fig. 5). The migratory strength of the cells on the slice is defined as the distance (μm) that shows half of the value of the maximum density (area) of migrating cells on the distribution curve.

E. Invasion Assay in Brain Slices (Fig. 4)

Instruments

Brain slices after 7 days culture

Tumor cell spheroids

Micropipette with a volume of $10\mu\text{m}$

Inverted confocal laser-scanning microscope with FITC filter optics

Personal computer

Steps

1. With a micropipette, take one spheroid of tumor cells tagged with the PKH2-fluorescent dye, place on

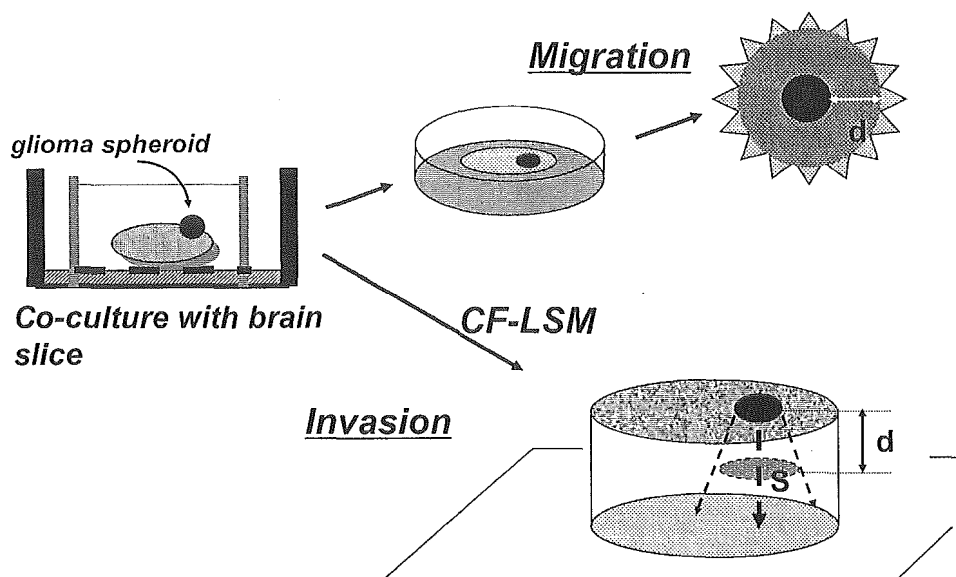


FIGURE 4 Illustrative procedures of tumor cell migration and invasion assay in cocultured brain slices. A tumor (glioma) spheroid is placed on the brain slice and is cocultured at the interface between air and culture medium. For tumor cell migration, the extent of the spread of fluorescent dye-stained tumor cells on the surface of the slice is measured. For tumor cell invasion, the spatial extent of the tumor cell infiltration in the slice is analyzed by confocal laser-scanning microscopy (CF-LSM). d , distance; S , area.

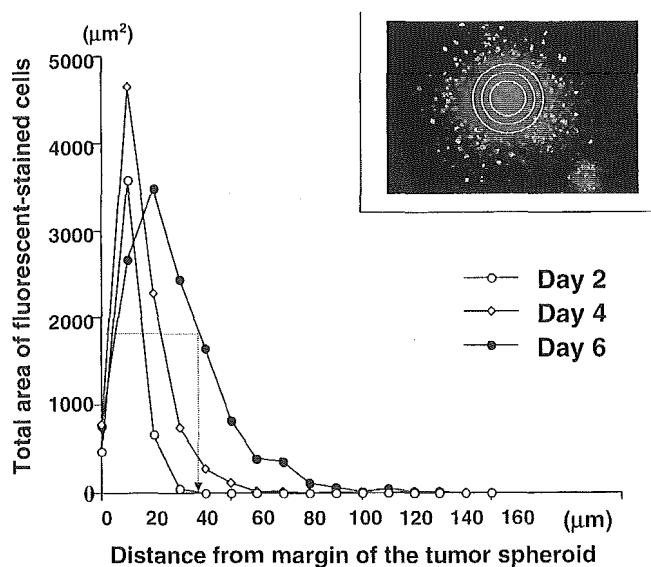


FIGURE 5 Construction of distribution curves of migrating cells for a quantitative analysis of tumor cell migration in brain slices. The total area of the labeled cells contained in each ring is plotted as a function of the distance from the margin of the tumor spheroid. (Inset) Concentric circles $10\mu\text{m}$ apart are drawn around the margin of the tumor spheroid, and cell density (area of fluorescent-stained cells) within each ring is measured by an NIH image. Distribution curves represent L1-stimulated C6 glioma migration at day 2, day 4, and day 6 after the coculture with brain slices. The migratory strength of the cells is determined as the distance (μm) that shows half of the value of the maximum density (area) of migrating cells on the distribution curve (see the distribution curve on day 6).

the surface of brain slice, and coculture at 37°C under standard conditions.

2. To detect PKH2-stained tumor cells in brain slices, use an inverted confocal laser-scanning microscope with FITC (520nm) filter optics.

3. At the first observation, determine the level of the basal plane ($0\mu\text{m}$) in accordance with the upper surface of the brain slice.

4. Obtain serial sections every $20\mu\text{m}$ downward from the basal plane to the bottom of the slice (Fig. 6).

F. Quantitative Analysis of Tumor Invasion

The total area of PKH2-stained cells in each section is calculated with NIH image software. The area is plotted as a function of the distance from the basal plane of the brain slice and the distribution curve is constructed for each experiment. The extent of tumor cell invasion in the slice is defined as the depth (μm) that shows half of the maximum density (area) of invasive cells on the distribution curve.

IV. COMMENTS

1. As a source of brain slices, brain tissues from mice and humans (obtained from epilepsy surgery) are also applicable. In the case of rats, 2- to 5-day-old

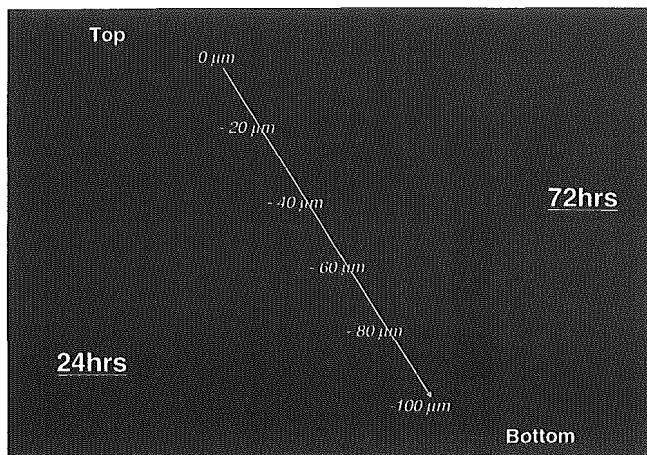


FIGURE 6 Confocal laser-scanning microscopic pictures of invading glioma cells in rat brain slices. At 24 h after coculture of T98G glioma spheroid and the brain slice, most glioma cells remain at the top of the slice (0 μm), while the glioma cells migrate extensively within the brain slice (show the maximum spread at $-40 \mu\text{m}$ from the top of the slice) at 72 h after coculture.

neonatal brains are best. As brains from much younger rats are smaller and more soft, it is difficult to manipulate the whole brain as intact slices. Brains prepared from rats of an older age have a tendency to be resistant to tumor invasion into the slices.

2. For about 4–5 days after initiating the brain slice culture, several neuronal death and glial cell migration to the bottom of the slices occur. After 5 days in culture, the exposure of slices to PI alone without NMDA insult does not elicit a detectable fluorescence signal. Therefore, for tumor invasion experiments, brain slices after 5 days in culture should be used. Usually, brain slices after 7 days in culture are used for any kind of studies. At this time, the thickness of the brain slices is reduced to about 200 μm from the original thickness of 300 μm .

Brain slices maintain their normal structures, such as cortical lamination, and are functionally viable for about 2 months after the culture, but it seems that the best time for experiments is from 7 to 30 days after culture.

3. To detect migrating tumor cells in the brain slice, a tumor-labeling method using green fluorescent protein (GFP) is also applicable. Once tumor cell clones with persistent expression of GFP are established, their use is of great advantage in analyzing the behavior of the tumor cells because the GFP is transmitted to the tumor cells after cell division. An EGFP vector (pEGFP-C1, obtained from Clonetics Corp., San Diego, CA) can be used to transfect and label malignant glioma cells.

References

- Matsumura, H., Ohnishi, T., Kanemura, Y., Maruno, M., and Yoshimine, T. (2000). Quantitative analysis of glioma cell invasion by confocal laser scanning microscopy in a novel brain slice model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269, 513–520.
- Ohnishi, T., Matsumura, H., Izumoto, S., Hiraga, S., and Hayakawa, T. (1998). A novel model of glioma cell invasion using organotypic brain slice culture. *Cancer Res.* 58, 2935–2940.
- Sakaguchi, T., Okada, M., Kuno M., and Kawasaki, K. (1996). Dual mode of N-methyl-D-aspartate-induced neuronal death in hippocampal slice cultures in relation to N-methyl-D-aspartate receptor properties. *Neuroscience* 76, 411–423.
- Stoppini, L., Buchs, P.-A., and Muller, D. (1991). A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Methods* 37, 173–327.
- Tanaka, M., Tomita, A., Yoshida, S., Yano, M., and Shimuzu, H. (1994). Observation of the highly organized development of granule cells in rat cerebellar organotypic cultures. *Brain Res.* 641, 319–327.
- Yamamoto, N., Kurotani, T., and Toyama, K. (1989). Neural connections between the lateral geniculate nucleus and visual cortex *in vitro*. *Science* 245, 192–194.
- Yamamoto, N., Yamada, K., Kurotani, T., and Toyama, K. (1992). Lamina specificity of extrinsic cortical connections studied in coculture preparations. *Neuron* 9, 217–228.

脳腫瘍の外科

—Biological behaviorにのっとった新しい治療戦略—

金沢大学脳神経外科 名誉教授 山下 純宏 編

MC メディカ出版

グリオーマ手術の進歩： 手術支援としてのナビゲーションの役割

Progress in glioma surgery: a role of navigation system

大西丘倫, 大上史朗

愛媛大学医学部脳神経外科

Takanori Ohnishi, Shiro Ohue

Department of Neurosurgery, Ehime University School of Medicine

抄録

手術支援としてナビゲーション・システムの導入がグリオーマ治療成績にどのような効果を与えたか検証するため、過去12年間のグリオーマ手術を、A群（ナビゲーション非使用）、B群（Evans型ナビゲーション単独使用）、C群（超音波併用シンクロナイズド・ナビゲーションと5-ALA、機能マッピングの統合支援下手術）の3群に分け、腫瘍摘出率、機能予後、生存率について検討した。平均腫瘍摘出率はA群（68%）、B群（80%）、C群（90%）と、ナビゲーション・システムの使用により、腫瘍摘出率は向上した。一方、術後2ヶ月のKPSのみた機能予後はA群（69%）、B群（70%）、C群（70%）と、3群で差はみられず、術前後のKPSにおいても有意な悪化はみられなかった。評価可能なglioblastomaの生存率では、A群（12M）、B群（14.2M）、C群（15M）と3群間で差は見られなかった。グリオーマ手術において、最新のナビゲーションの導入は、機能を温存しつつ腫瘍摘出率の向上に寄与したが、glioblastomaにおいてはその生命予後には影響を与えず、今後の症例の蓄積による検証が必要であると思われた。

Abstract

A key to glioma surgery is to maximally resect the tumor without compromising neuronal functions. In the present study, we examined effects of three different modes of operation in the patients with glioma on the tumor removal rate, Karnofsky performance status, and the overall survival rate. Three modes consisted of no navigation surgery (A group), surgery assisted with only Evans navigation system (B group), surgery with echo-linked synchronized navigation, photodynamic navigation using 5-ALA and functional mapping with subcortical stimulation (C group). Introduction of image-guided navigation in glioma surgery enhanced tumor removal rate without apparent deterioration of neurological function. Furthermore, echo-linked real time navigation combined with other recent modality of surgical assistance (C group) enabled us to maximally remove the tumor around the eloquent areas without compromising motor or speech function. The present study did not demonstrated a favorite effect of the increased rate of tumor removal on overall survival in the patients with glioblastoma.

Key words: glioma, surgery, navigation, brain mapping, 5-aminolevulinic acid

.....

はじめに

グリオーマは脳実質内の細胞より発生し、浸潤性増殖を特徴とする腫瘍である。その外科的摘出において絶対的治癒切除を達成することは一部の腫瘍でlobectomyが行える場合を除いて、通常、ほぼ不可能である。特にglioblastomaのように腫瘍周囲に広汎に腫瘍細胞が浸潤している場合、どこまで切除すべきか明確な答えはない。これまで、グリオーマ治療における長期生存への独立予後因子として、良性グリオーマでは、年齢、KPS、腫瘍摘出度が挙げられている。悪性グリオーマ、特にglioblastomaにおいては、腫瘍摘出度と予後との関係は肯定する報告から否定するものまで現時点では未解決である。

しかし、今後、グリオーマに対する画期的な治療法が開発されるまでは、神経機能を損なわずに可能な限り腫瘍の亜全摘出以上を目指すことが治療成績の向上につながるものと思われる。その目的のために、これまで種々の手術支援法が開発され、実際の手術に導入されてきた。その中で、画像誘導下ナビゲーションシステムは、多くの施設で取り入れられるようになってきた。最近では、さらに5-aminolevulinic acid (5-ALA)を用いて術中の腫瘍可視化を行うphotodynamic navigationや、腫瘍摘出過程で随時、皮質下神経線維の電気生理学的モニタリングを行い、神経機能を傷害せずに摘出する技術も取り入れられている。このような新しい医療機器や材料・技術の進歩は、グリオーマの治療成績をどのように変えたのであろうか。それに応えるため、今回、我々の施設において、手術支援モダリティーの変遷によるグリオーマ手術の成績をretrospectiveに検討した。

対象・方法

1992年1月～2003年12月の期間で当施設で初回手術を行った大脳半球神経膠腫91例を対象とした。組織学的内訳は、diffuse astrocytoma

18例, anaplastic astrocytoma 18例, oligo-astrocytoma 2例, oligodendroglioma 2例, glioblastoma 51例であった。これらをA群：ナビゲーション非使用群（1992～1995年）（26例）、B群：Evansナビゲーション単独使用群（1996～2000年）（31例）、C群：超音波併用リアルタイムナビゲーションシステムならびに5-ALA、神経機能マッピングを用いた統合下ナビゲーションシステム使用群（2001～2003年）（34例）の3群に分け、①腫瘍摘出率、②機能予後、③生存率の3項目について比較検討を行った。

超音波併用リアルタイムナビゲーションシステムは、StealthStation™ (Medtronic) と超音波診断装置Prosound SSD-5500 (ALOKA) をSonoNav™プローベ (Medtronic) にてリンクさせ、術中のリアルタイム超音波画像とその画像に一致する術前MRIまたはCT画像を同時に並列して表示するナビゲーションシステムであり、これまでシンクロナイズド・ナビゲーションと呼んできた^{7,9)}。5-ALAによるphotodynamic navigationでは、全身麻酔開始1時間前に20mg/kgの5-ALA経口投与を行い、挿管後、胃管チューブより10mg/kgの追加投与を行った。励起光源としてキセノンランプのviolet-blue光を用い、観察にはlow cut filter (cut under 480nm) を用いた。神経機能マッピングとして、運動機能に関してはSEP, MEPの他、皮質下線維に対して500Hzの高頻度単回刺激による身体各部位のEMGモニタリングを行った。言語機能に関しては硬膜下電極留置による機能マッピングの後、覚醒下手術を行い皮質下刺激のもと摘出を行った。

結果

平均腫瘍摘出率はA群：68 ± 22%、B群：80 ± 21%、C群：90 ± 11%と統合下ナビゲーションシステムの導入により有意に摘出率は向上した (Fig. 1)。また、摘出率の割合をみると、A群では、100%摘出は全体の5%、90%未満の

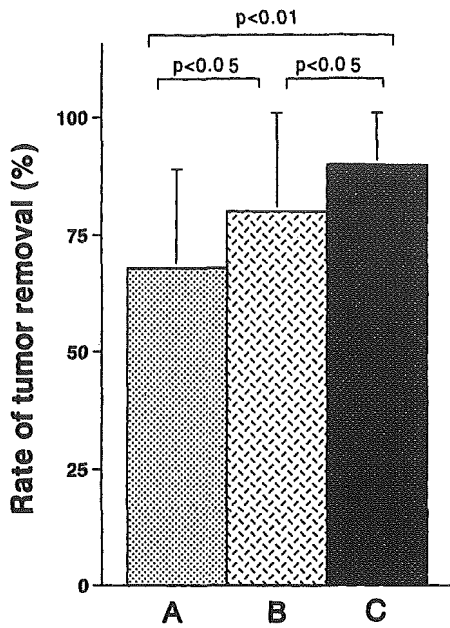


Fig. 1 Tumor removal rate in the three different modality of surgery.

A: no navigation used,
 B: Evans navigation only,
 C: echo-linked synchronized navigation system combined with 5-ALA fluorescence and functional mapping

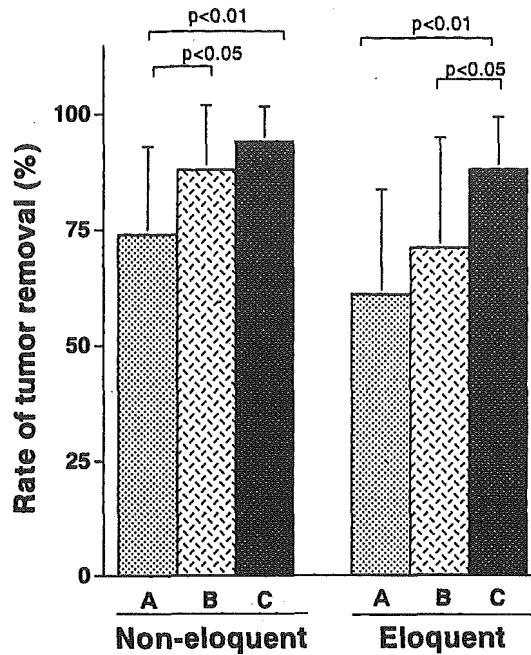


Fig. 3 Tumor removal rate of gliomas in eloquent area or non-eloquent area.

Three groups, A, B and C are the same as described in Fig. 1.

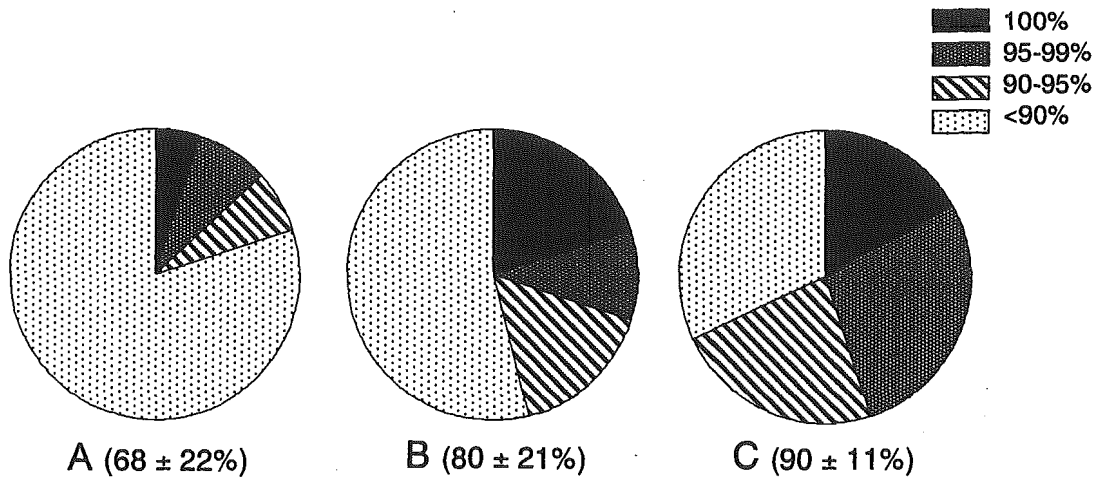


Fig. 2 Percentage of the extent of tumor removal in the three groups as described in Fig. 1.

The extent of tumor removal was divided into 100%, 95~99%, 90~95%, and less than 90%. Value in the parentheses of each group shows a mean removal rate and standard deviation.

摘出が80%であったが、B群では、100%摘出は20%、90%未満の摘出54%と特に100%摘出率の向上がみられ、さらにC群では、100%摘出は17%、90%未満の摘出が32%と90%以上の摘出

が著明に増加した (Fig. 2).

また、腫瘍局在部位を一次運動野や言語野内およびその近傍領域を含む eloquent area とそれ以外の non-eloquent area に分けた場合、non-

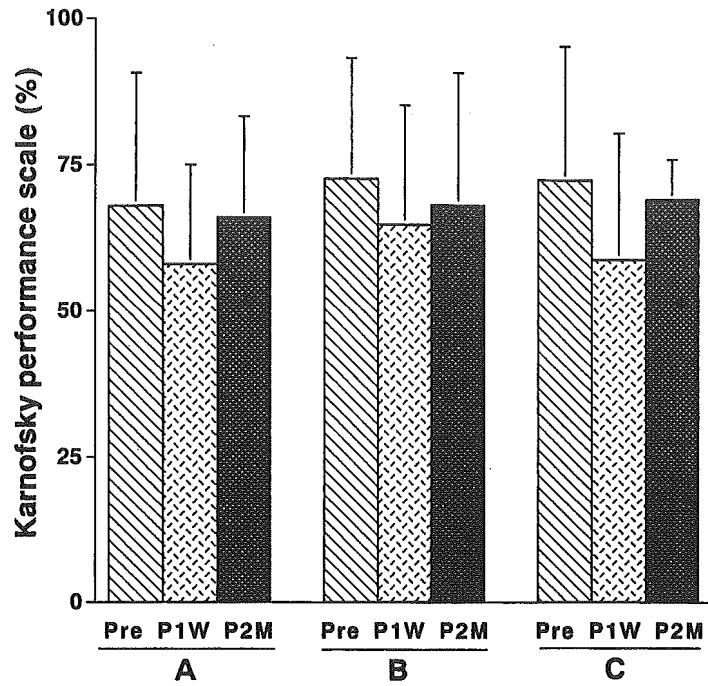


Fig. 4 Functional outcome evaluated by Karnofsky performance scale (KPS) in the three surgical groups. KPS was determined at the preoperative status (Pre), one week after surgery (P1W) and two months after surgery (P2M).

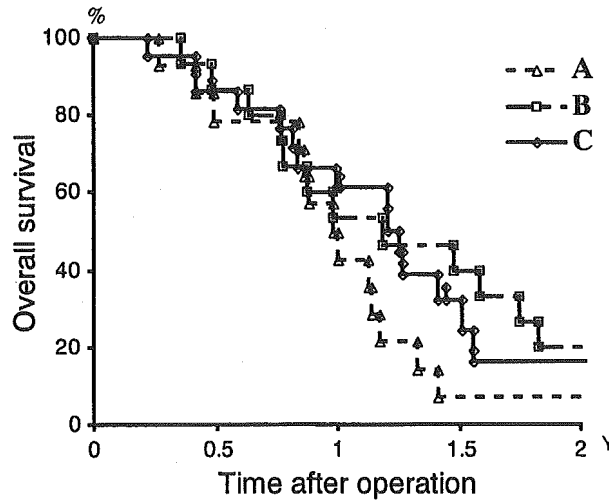


Fig. 5 Overall survival rate of glioblastomas in the three surgical groups, A, B and C.

eloquent areaでは、従来型のナビゲーションシステムでも腫瘍摘出率の向上はみられたが、eloquent areaのグリオーマに関しては、シンクロナイズド・ナビゲーション、機能マッピング、5-ALAを用いた統合下ナビゲーションにより、平均摘出率が88%にまで向上した (Fig. 3).

一方、神経機能を含む障害度について、各群での術前、術後1週、術後2ヶ月のKPSを比較検討すると、いずれの治療群においても術前、術後(2ヶ月)で、ほとんど差はみられなかった (Fig. 4)。またeloquent areaに限って機能予後をみても、全ての群で、術前後でのKPSに

差はみられなかった。

生存率について、各治療群の astrocytoma, anaplastic astrocytoma の症例数が少なかったため、glioblastoma についてのみ解析を行った。各群の生存期間中央値は A 群：12.0 ヶ月，B 群：14.2 ヶ月，C 群：15.0 ヶ月で三者間に有意な差はみられなかった (Fig. 5)。ただし、腫瘍再発までの期間 (TTP) をみると、C 群でやや長い傾向がみられた。

考 察

グリオーマ手術において、画像誘導下ナビゲーションの導入は、明らかに腫瘍摘出率の向上に寄与した。脳内深部の血管が豊富な glioblastoma においても、ナビゲーション誘導下で、比較的完全に全摘出が可能となった。さらに、運動野や言語野近傍の eloquent area に存在する腫瘍では、画像誘導下のナビゲーションに加えて機能マッピングや皮質下電気刺激、さらに必要に応じて覚醒下手術を行うことにより、より安全に神経機能を残しながら摘出術が行えるようになった。

グリオーマ手術にナビゲーションが導入された最大の理由は、脳内深部での腫瘍の位置情報を得ることと、浸潤性で境界不明瞭な intrinsic tumor に対して機能障害を出さずに正確に最大限摘出することであり、これまで種々の画像誘導下ナビゲーションシステムが開発されてきた。しかし、最大の課題は髄液の流出や腫瘍摘出に伴って生じる brain shift であり、特に高度な脳浮腫を伴った悪性グリオーマの手術では、しばしばナビゲーションの機能を活用できないことも起こり得る。その対策の一つとしてオープン MRI などにより、術中画像をアップデートし、リアルタイム・ナビゲーションを行うことが挙げられるが、機器整備の面での問題を含め、一般的に普及するには至っていない。我々はこれまで、超音波診断装置を StealthStation の光学式ナビゲーションとリンクさせ、術中の超音波画像をそれと対応する術前の MRI あるいは

CT 画像と同時に描出させることにより、brain shift に対処してきた^{6, 8)}。この方法は、硬膜切開後から腫瘍摘出初期過程での brain shift に対しては非常に有用であり、精度の高い腫瘍摘出が可能となった。ただし、摘出が進行するにつれて、超音波画像の描出が不良になることも多く、分解能の高い超音波画像の描出の開発とともに今後の課題である。

一方、浸潤性の腫瘍を画像誘導下のナビゲーションのみで摘出することは不可能で、最近、蛍光物質で標識された腫瘍の可視化が注目されるようになってきた。5-ALA を用いた標識方法では、特に悪性グリオーマでの感度、特異性は共に高く、残存腫瘍の探索に非常に有用である^{3, 10)}。ただ、腫瘍浸潤部位では、肉眼的な蛍光発色の同定では腫瘍の有無の判定は困難で、最近、我々はレーザーダイオードを用いて蛍光スペクトルを取り、自家蛍光とプロトポルフィリン IX の蛍光強度比から定量的に腫瘍の有無を判定している。しかし、微弱な蛍光強度と組織学的な関係はまだ十分解析されていないこと、また low-grade グリオーマでは 5-ALA による明瞭な標識が得られないことなど、今後の検討が必要である。

運動野や言語野などの重要な機能を担っている領域に近接するグリオーマの摘出においては、SEP や MEP などの機能マッピングと共に術中皮質下線維を電気刺激することにより、より安全に機能障害を出さずに摘出を進めることが今や標準となっている⁴⁾。また、言語野近傍の腫瘍については、覚醒下手術を行うことにより、機能障害を最小にする努力がなされている。著者らも 500Hz の高頻度電気刺激による筋電図モニタリングにより、リアルタイムに運動機能の状態を把握し、良好な結果を得た。最近、錐体路や視覚路などの神経線維を描出する fiber tractography が術前の評価に用いられているが¹⁾、今後、皮質下電気刺激とともに、術中の functional navigation としての応用が期待される。

手術支援機器の進歩により、確かに機能を温存した最大腫瘍摘出が可能になってきた。腫瘍

摘出率の向上は、グリオーマ患者の生命予後を改善したとの報告がみられる一方、否定的な意見もある^{2,5)}。特に、悪性グリオーマとして最も多いglioblastomaでは、現在、腫瘍の摘出度と生命予後との明らかな相関は報告されていない。今回の我々の結果でも、glioblastomaにおいて最新の手術支援モダリティをもって摘出率を向上しても、生命予後には大きな貢献をしなかった。ただ、症例の中には比較的長期生存例もみられるようになり、今後、さらに症例を蓄積することにより、摘出度と生存率の関係を検証する必要があるだろう。

結 語

グリオーマ手術においてナビゲーション・システムの導入は、神経機能を損なうことなく腫瘍摘出率を向上させた。特に、運動野や言語野などの機能領域の腫瘍摘出には、超音波診断装置をリンクさせたシンクロナイズド・ナビゲーションシステムに、皮質下機能マッピングを付加することにより、安全に機能を温存しつつ腫瘍摘出が可能となった。また、浸潤部位の腫瘍摘出には、5-ALAによるphotodynamic navigationが有用であった。Glioblastomaにおいて、腫瘍摘出度と生命予後に正の相関はみられなかったが、全摘出が行えた症例では腫瘍再発までの期間が延長する傾向がみられた。

参考文献

- 1) Berman JI, Berger MS, Mukherjee P, et al.: Diffusion-tensor imaging-guided tracking of fibers of the pyramidal tract combined with intraoperative cortical stimulation mapping in patients with gliomas. *J Neurosurg* 101: 66-72, 2004.
- 2) Hess KR: Extent of resection as a prognostic variable in the treatment of gliomas. *Neuro-Oncol* 42: 227-231, 1999.
- 3) 金子貞男: 脳腫瘍に対する光モニタリング - ALA induced Pp IX による術中脳腫瘍蛍光診断. *脳神経外科* 29: 1019-1031, 2001.
- 4) Keles GE, Lundin DA, Lamborn KR, et al.: Intraoperative subcortical stimulation mapping for hemispherical perirolandic gliomas located within or adjacent to the descending motor pathways: evaluation of morbidity and assessment of functional outcome in 294 patients. *J Neurosurg* 100: 369-375, 2004.
- 5) Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, et al.: A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 95: 190-198, 2001.
- 6) 大西丘倫, 大上史朗, 久門良明: ナビゲーション手術の進歩: リアルタイム・ナビゲーション. 吉田 純, 橋本信夫, 榊 寿右, 片山容一編, *脳神経外科の最新医療. 先端医療技術研究所*, 東京, 2004, pp189-194.
- 7) 大上史朗, 大西丘倫: 神経機能温存をめざして - 最近の脳神経外科手術について. *愛媛医学* 20: 342-352, 2001.
- 8) 大上史朗, 長戸重幸, 中川 晃ほか: 超音波診断装置を併用したシンクロナイズド・ナビゲーション・システム. 坂井 昇編, *脳腫瘍の外科: 手術による根治性と神経機能*. メディカ出版, 大阪, pp264-269, 2003.
- 9) 大上史朗, 大西丘倫: 超音波装置つきナビゲーションによる手術. *Clin Neurosci* 22: 114-115, 2004.
- 10) Stummer W, Novotny A, Stepp H, et al.: Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme by using 5-ALA induced porphyrins: a prospective study in 52 consecutive patients. *J Neurosurg* 93: 1003-1013, 2000.

連絡先：大西丘倫
愛媛大学医学部脳神経外科
〒791-0295 愛媛県東温市志津川
Phone: 089-960-5338
Fax : 089-960-5340
E-mail: tohnishi@m.ehime-u.ac.jp

Annual Review 神經 2005

2005 年 1 月 25 日 発行

中外医学社

3. 中枢神経系悪性リンパ腫

埼玉医科大学脳神経外科助教授 西川 亮

key words malignant lymphoma, high-dose methotrexate, chemotherapy, radiation therapy, radiation injury

動 向

現時点における中枢神経系悪性リンパ腫に対する標準治療はhigh-dose methotrexate (MTX)を含んだ化学療法と化学療法後の全脳照射であると考えられるが¹⁾, 近年の討論の大きな焦点は, 化学療法後の放射線照射の必要性についてである²⁾. National Comprehensive Cancer NetworkのClinical Practice Guidelineには, 60歳を越えた患者の場合, 照射は避けるべきであると明記されている¹⁾が(図1), National Cancer InstituteのPDQ (Physician Data Query) では, この点に関して, 今後高次機能検査を含んだ比較試験が

必要であるという記載にとどまっている³⁾.

A. Memorial Sloan-Kettering Cancer Centerからの報告

2000年に米国のMemorial Sloan-Kettering Cancer Centerから, high-dose MTXを含む化学療法+全脳照射45Gyによる生存期間中央値60カ月という成績が報告された⁴⁾. MTXは3.5mg/m²の静脈内投与を2週間毎に5回, MTX12mgの髄腔内投与も2週間毎に5回, vincristine 1.4mg/m²をMTX静脈内投与と同日に5回, procar-

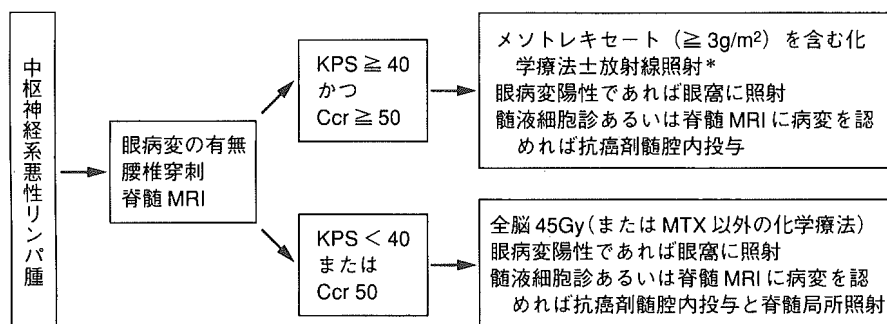


図1 中枢神経系悪性リンパ腫治療ガイドライン

* 60歳を越える患者の場合は可能な限り放射線照射は避ける。

(National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology-v. 1.2003. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#siteを改変)

bazine 100mg/m²の7日間内服を1, 3, 5回目のMTX 静脈内投与と同時に施行し, その後45Gyの全脳照射, 照射終了後3g/m²のcytarabineを2日間というスケジュールで治療が行われた. その優れた治療成績もさることながら, 注目されたのは照射を行わなかった高齢者症例の解析である. 何らかの理由で照射を行わなかった症例が22例あり, 年齢中央値は70歳(範囲54~89歳)と高齢者がほとんどであったことから, 60歳以上で照射を行った12例(年齢中央値67歳, 範囲60~72歳)との比較を行った. 化学療法のみで照射を行わなかった症例群の10/22(45%)に腫瘍再発がみられ生存期間中央値は33カ月であったが, 一方化学療法後に照射を施行した症例群では, 腫瘍再発は1/12(8%)のみであったにもかかわらず, 10/12例(83%)に遅発性中枢神経障害が出現し, 多くの症例は合併症で死亡し, 生存期間中央値は32カ月と非照射症例と同等であった. すなわち高齢者においては照射の意味がないことが示唆された. なおこの成績はsingle instituteからのものであるが, 後にMTXを2.5mg/m²にdose-downしたレジメンでRadiation Therapy Oncology Groupによるmulti-institutional phase II studyとして施行され, 無増悪生存期間中央値24.0カ月, 生存期間中央値36.9カ月, 60歳未満の生存期間中央値50.4カ月, 60歳以上では21.8カ月, 重度の遅発性白質脳症を15%に認めたと報告された⁵⁾.

B. 化学療法後の放射線照射の必要性について

放射線照射による遅発性神経毒性の発生は否定できない大きな問題である. では, いっそのこと照射しないとどうなるか.

Massachusetts General HospitalのグループはMTX 8g/m²を2週間毎にCRになるまで, ある

いは8回になるまで繰り返し, CRが達成されたらさらに2回追加した後, あとは4週毎に11回維持療法として投与するという方法で治療した成績を報告した⁶⁾. 無増悪生存期間中央値は12.8カ月, 生存期間中央値は22.8+カ月, CR+PRの奏効率は74%で, 化学療法後に全脳照射を行った報告に匹敵する成績であった. 副作用は耐えられる範囲内で, 痴呆の出現は1例も認めていない. また多剤併用によるstudyとしてはMTX 5g/m²を16週間に4回投与し, vincristine, ifosfamide, cytarabine, cyclophosphamide, vindesineの静脈内投与と, さらにMTXとcytarabineの髄腔内投与を併用したレジメンの結果が報告されているが, CR+PRの奏効率71%, 無増悪生存期間中央値21カ月, 生存期間中央値50カ月という優れた結果であった⁷⁾. 60歳以上の症例に限ってみても無増悪生存期間中央値15カ月, 生存期間中央値34カ月である. またこのレジメンによる詳細な高次機能の評価も報告されているが, 治療後に高次機能が低下した症例は1例もなかった⁸⁾. ただ治療死を9%に認めている. さらにまた別の報告によれば, 60歳以上の症例を対象として, MTX 1g/m²の3回の静脈内投与に, lomustine (CCNU), procarbazine, MTX 髄腔内投与を合わせたサイクルを6回繰り返す方法によって治療した結果, CR+PRの奏効率48%, 無増悪生存期間中央値は10.6カ月, 生存期間中央値は14.3カ月であったと報告されている⁹⁾. 症例の年齢中央値は72歳と真に高齢者を対象としているにもかかわらず, 痴呆の出現あるいは進行(mini-mental state examination: MMSEで4点以上の低下)を認めた症例は8%のみであったとのことである.

これらに対して, 化学療法のみではやはり治療効果が不十分であることを示唆する報告も存在する. German Cancer Society Neuro-Oncology Working Groupのstudyは, やはりMTX 8g/m²

を2週毎に6回投与する方法で治療した結果を報告しているが、CR + PRの奏効率は35.1%でしかなかった¹⁰⁾。これは先に紹介したMassachusetts General Hospitalのグループによる奏効率74%と比べて著しく劣る成績であるが、おそらくMTXの投与を6回までに制限したことによるものであろうと考えられている。別のstudyではMTX 1.5 g/m²を2週毎に6回施行し、cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, cytarabineを併用する化学療法の後、45Gyを全脳に照射する群と30.6Gyを全脳に照射する群との比較が行われている¹¹⁾。60歳未満の症例では、3年再発率が全脳45Gy群で25%であったのに対して全脳30.6Gy群では83% (p = 0.01)であったが、60歳以上の症例ではこの差を認めなかった、また、全体としての生存率には照射線量による差は認めなかったが、これをCRを達成した症例に限ってみると、やはり60歳未満の症例において全脳45Gy照射群の3年生存率は92%であったのに対し、30.6Gy群では60%で、すなわち60歳未満の症例においては照射線量を落とすと治療成績が低下するという結論となった。逆に60歳以上の症例群では照射線量による治療成績の違いは検出されていない。

さて、どうも高齢者においては可能であれば照射は避けるべきという方向にエビデンスが蓄積しつつあるようである。しかしすべての中枢神経系悪性リンパ腫において化学療法単独での治療が適切であるかどうかについては論争がある¹²⁾。特に、今後無作為化比較試験を行うべきかどうかについて異論がある。それぞれの立場の論拠を表1にまとめた。

C. 新しい試み

1. blood brain barrier disruption

Neuweltらによるblood brain barrier disruption (BBBD)を併用した中枢神経系悪性リ

ンパ腫治療の試み自体は新しいものではないが、最近多施設で治療した結果が発表された^{13,14)}。全麻下にmannitol (25%)を4~10ml/secondの速度で30秒間(120~300ml)動脈内投与した後、MTX 2,500mgを動脈内投与、cyclophosphamide 500mg/m²とetoposide 150mg/m²を静脈内投与し、これを2日間行うレジメンを4週間毎に1年間行った。CR + PRの奏効率は48/56 (86%)¹³⁾、5年生存率は42%¹⁴⁾とのことである。しかし、きちんとしたデータ管理が行われたphase studyは行われていない。

2. hematopoietic stem-cell rescueを併用した high-dose chemotherapy

High-dose MTXが導入され中枢神経系悪性リンパ腫の治療成績は進歩したが、しかしおよそ生存期間中央値は3年のレベルで頭打ちでもある。そこで、生存期間のさらなる延長を目的として、また前述のように放射線照射を回避するためにも、hematopoietic stem-cell rescueを用いた high-dose chemotherapyの可能性が模索されている。

フランスのグループは、high-dose MTXとcytarabineによって治療したにもかかわらず再発した症例あるいは治療が無効であった症例22例を対象として、peripheral-blood stem cellによるrescueと併用したintensified chemotherapyを行った成績を発表した。患者はまずcytarabine (初日は50mg/m²を12時間かけて投与、2日目から5日目は2g/m²の3時間かけての投与と50mg/m²を12時間かけての投与の両方)と、etoposide (200mg/m²を4日間)による治療(CYVE regimen)を行い、その後peripheral-blood stem cellを採取、さらにもう1回同じ化学療法を行って反応があった場合にintensified chemotherapyを施行した。そのレジメンは、thiotepa (day-9から-7まで250mg/m²を3日間)、busulfan (day-6から