

2 脳腫瘍の疫学

渋井 壮一郎・野村 和弘

はじめに

疫学とは、対象とする疾病の原因とそのリスクファクターを見出すとともに、その集団の中でどの程度その疾患が蔓延しているかを調べ、自然経過と予後を調べる学問であると言える。脳腫瘍の診断・治療を行う際においても、対象とする疾患がその集団の中でどの程度発生し、どのような経過をたどるかということは、きわめて重要な情報であり、その情報をもとに実際の診療が行われているといっても過言ではない。すなわち、ある疾患を診断するためには、各種臨床情報から、それに最も適合する確率の高いものを選択していくという過程をたどっているわけである。そしてそのためには、その疾患の頻度の情報が必要であり、治療にあたっては、疾患の自然経過についての情報が有用である。脳腫瘍の発生原因については各方面からいろいろな研究がなされているが、現在までのところ、いくつかの遺伝性疾患以外では明確な要因が判明しているものはないと言える。

2.1 脳腫瘍の発生要因

2.1.1 遺伝子異常を伴う遺伝性疾患

2.1.1.1 神経線維腫症(neurofibromatosis)

neurofibromatosis type1 (NF1) は、常染色体優生遺伝をする疾患で、3,000～4,000人に1人の発生率とされており、末梢の神経線維腫、虹彩小結節、café-au-lait spot、視神経膠腫などを特徴とする。これに対し、数万人に1人の発生と言われる neurofibromatosis type 2 (NF2) は、両側聴神経鞘腫、髄膜腫、神経膠腫などを発症する。前者の責任遺伝子は17q11、後者は22q11-22q13上にあるとされている。

2. 1. 1. 2 Li-Fraumeni 症候群

乳癌，骨肉腫，白血病，悪性神経膠腫などの各種腫瘍を発生し，責任遺伝子は染色体 17p13 上にある TP53 とされている。TP53 は多くの悪性腫瘍との関係が指摘されており，後述する星細胞腫の発生の原因の 1 つとされている。

2. 1. 1. 3 結節性硬化症 (tuberous sclerosis, TS)

結節性硬化症は，顔面皮疹，subependymal giant cell astrocytoma，知能發育遅延を 3 主徴とし，責任遺伝子は染色体 16p13 および 9q34 にあることが判明している。

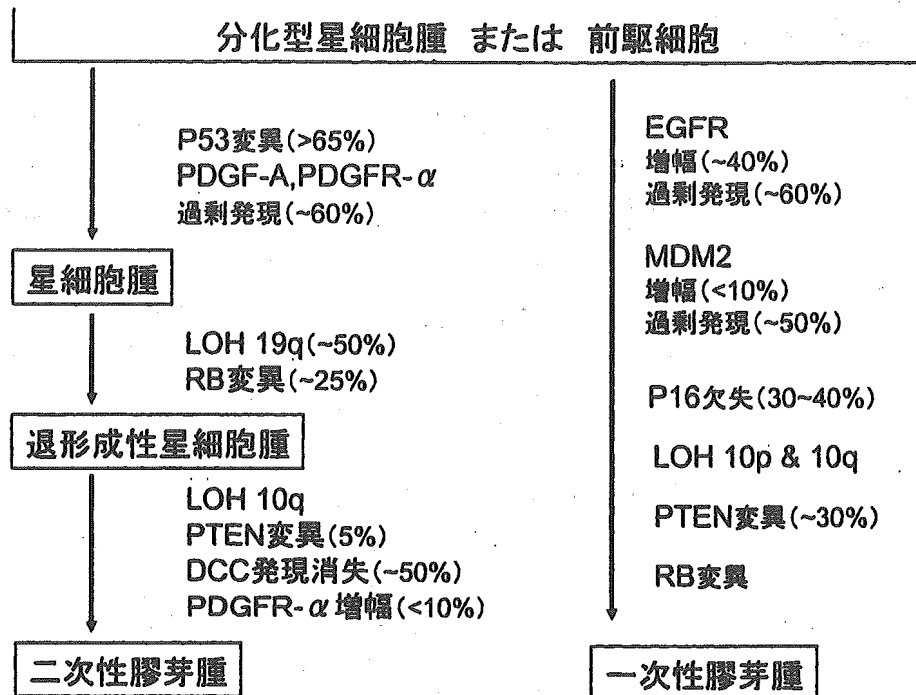
2. 1. 1. 4 von Hippel-Lindau 病

von Hippel-Lindau 病は常染色体性優生遺伝をし，小脳・脳幹・脊髄や網膜などに血管腫を発生し，腎・膵などには嚢胞性腫瘍を形成する他，腎臓癌や副腎の褐色細胞腫などを合併する。責任遺伝子は 3p25 とされている。

2. 1. 2 グリオーマにおける遺伝子異常

星細胞腫の発生においても遺伝子的な変異が指摘されている。まず，前駆細胞から星細胞腫に癌化する時点で TP53 および PDGF などの変異が必要であるとされ，さらに 19 番長腕染色体，RB 遺伝子の変異により退形成性星細胞腫になり，10 番染色体などの異常を経て，膠芽腫 (glioblastoma) へ変化していくものと考えられている。このように星細胞腫が順次悪性化して膠芽腫になっていく一群は secondary glioblastoma と呼ばれるが，これに対し，このような変化を経ない膠芽腫 (primary glioblastoma) も存在し，これらは EGFR, MDM2, PTEN, p16 など全く別の遺伝子異常を伴うとされている (図 1) [1]。星細胞腫において，TP53 の異常は 30 ~ 40% に認められるのみで，TP53 のみでは星細胞腫の発生についての説明は不可能であり，他の要因の関与も考えられる。

グリオーマを含め，脳腫瘍の家族発生の報告は稀でなく，遺伝的素因も否定できないが，むしろ生活上の環境因子の影響が大きいという解釈もある [2,3]。



(Kleihues 2000)

図1 多段階遺伝子異常によるグリオーマの悪性化 (Kleihues 2000 より改変) [1]

2.1.3 環境因子

環境因子としても脳腫瘍の発生との明確な関連性が証明されているものはないと言える。母親の喫煙、職業上での各種有機溶媒、潤滑油、ホルマリン、フェノール、殺虫剤、合成ゴム、塩化ポリビニールとの接触も、必ずしも決定的な関連性の証拠はない[4-6]。これに対し、放射線照射は脳腫瘍の発生ときわめて関連性が深い。かつては、頭皮白癬症や血管腫に対して低線量の放射線照射がなされており、数年後あるいは十数年後にグリオーマ、髄膜腫、神経鞘腫などが多発していることが報告されている[7,8]。また、小児期の白血病に対する頭部への照射が、後のグリオーマ発生の誘因になっていると考えられている[9,10]。一方、高圧線の付近に居住する子供に脳腫瘍や白血病が多発するという報告から、電磁波と脳腫瘍の関係が注目されている。これに関連して、近年普及の著しい携帯電話から発生する電磁波が脳腫瘍の発生につながる危険性が危惧されており、国内においても疫学調査が実施されている。これについても決定的な関連性は証明されておらず、現時点では否定的な結論を出している報告もある[11]。しかしながら、今後ますます携帯電話の使用頻度や使用時間が増加する傾向にあり、新たな調査が必要になる可能性もある。

2.2 脳腫瘍の疫学調査

国内における脳腫瘍の発生頻度について、正確な数字は得られておらず、米国の調査報告を代用することが多い。Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS 2004) によれば、米国における原発性脳腫瘍の発生率は人口 10 万人あたり年間 14.1 人（良性腫瘍 6.8 人，悪性腫瘍 7.3 人）であり、男女別では、男性 13.9 人，女性 14.3 人とされており、若干女性に多い [12]。米国では、この他に Surveillance Epidemiology and End Results (SEER), National Cancer Data Base (NCDB), The North American Association of Cancer Registries などの調査報告がある。年次別の発生頻度は上昇傾向にあり、その理由の 1 つとして、1970 年代の CT スキャンや 1980 年代の MRI 等の非侵襲的検査の普及が考えられる [13]。近年特に増加傾向の著しいのは悪性リンパ腫であり、多発性脳腫瘍が指摘された際、転移性脳腫瘍との鑑別が重要になっている。その他、上皮腫、神経鞘腫、下垂体腺腫などの増加が指摘されている。また、小児および高齢者の脳腫瘍が増加しているのも、近年の傾向として見逃せない特徴の 1 つである [14]。

2.3 脳腫瘍全国統計 (Brain Tumor Registry of Japan)

2.3.1 組織別頻度

国内における脳腫瘍統計については、1974 年に設立された脳腫瘍全国統計委員会により実施されている。1977 年の第 1 回の調査報告書以来、現在までに 11 巻の報告書が発行されており、最新のものは 2003 年 9 月に *Nuerologia medico-chirurgica* の supplement として英文にて刊行された。ここには、全国 300 余りの脳神経外科施設より 1969 年以來、年間おおよそ 4,000 ~ 5,000 症例、合計 98,647 例が登録されており、発生頻度、生存率など各種解析がなされている [15]。1984 ~ 1996 年の症例 51,818 例について、最も頻度の高いものはグリオーマの 27.3% で、髄膜腫 26.2%、下垂体腺腫 15.2%、神経鞘腫 10.4% がそれに続いている (表 1)。また、年度ごとに頻度を比較すると、かつてはグリオーマが最も多かったが、1992 年以降では、髄膜腫の頻度が最も高くなっている。年齢別にみると、15 歳未満の小児ではグリオーマが 57.5% と半数以上を占め、続いて胚細胞腫 15.4%、頭蓋咽頭腫 9.0%、髄膜腫 2.0% となっており、成人とはかなり頻度が異なっている。また、70 歳以上の高齢者で最も頻度の高いものは髄膜腫 42.3% で、続いてグリオーマ 26.9%、下垂体腺腫 10.1%、神経鞘腫 7.1% であり、これに悪性リンパ腫 6.7% が続いている。

表1 脳腫瘍全国統計による各種脳腫瘍の頻度 (1991～1996年登録症例) [15]

	全例	年齢 (歳)		
		< 15	15～69	70 ≤
グリオーマ	27.3%	57.7%	24.3%	26.9%
髄膜腫	26.2	2.0	26.2	42.3
下垂体腺腫	15.2	1.9	17.2	10.1
神経鞘腫	10.4	1.1	11.8	7.1
頭蓋咽頭腫	3.5	9.0	3.3	1.6
悪性リンパ腫	2.9	0.4	2.6	6.7
血管芽腫	1.7	0.4	2.0	1.0
類表皮嚢胞・類皮嚢胞	1.6	1.6	1.7	0.5
胚細胞腫	2.8	15.4	2.0	0.0
その他	8.4	10.5	8.9	3.8
合計	100.0 (n=51,818)	100.0 (n=4,070)	100.0 (n=41,653)	100.0 (n=6,095)

これに対しCBTRUSでは、グリオーマが45.3%ときわめて頻度が高く、これに髄膜腫29.2%、神経鞘腫7.9%、下垂体腺腫5.9%が続いている。

グリオーマの中での頻度は、膠芽腫 (glioblastoma) が最も多く32.4%を占め、続いて星細胞腫 (astrocytoma) 27.0%、退形成性星細胞腫17.2%、乏突起膠腫5.5%となっているが、これも年齢によってその頻度は大きく異なり、15歳未満の小児では星細胞腫が29.2%を占めるのに対し膠芽腫は5.4%にすぎず、これに対し70歳以上の高齢者では、59.9%が膠芽腫である。組織診断のみから考えても高齢者のグリオーマの予後はきわめて悪いことが予想される (表2)。

2.3.2 年齢分布

1984年から96年までのデータから、代表的な原発性脳腫瘍の年齢分布を示す (図2A-I)。膠芽腫は60歳代をピークとして、高齢者に多い腫瘍であり、男女比は1.4:1と男性に多い (図2A)。これに対し星細胞腫では男女比は1.15:1とほぼ同数となり、30歳代後半から40歳代に多く、10歳前後にもう一つのピークがある (図2B)。退形成性星細胞腫は、この二者の中間的存在であり、男女比は1.27:1と男性優位で、年齢分布でも50歳代から60歳代にピークを有する (図2C)。これらの点からも星細胞腫から退形成性星細胞腫を経て、

表2 脳腫瘍全国統計による各種グリオーマの頻度 (1991～1996年登録症例) [15]

	全例	年齢 (歳)		
		< 15	15～69	70 ≤
膠芽腫	32.4%	5.4%	35.0%	59.9%
星細胞腫	27.0	29.2	28.4	14.1
退形成性星細胞腫	17.2	8.7	18.9	20.4
乏突起膠腫	5.5	12.7	4.3	1.2
退形成性乏突起膠腫	0.6	0.1	0.8	0.5
上衣腫	2.9	6.9	2.3	0.2
退形成性上衣腫	0.9	2.7	0.6	0.2
脈絡叢乳頭腫	1.2	2.9	0.9	0.3
髄芽腫	4.0	18.3	0.9	0.1
その他のグリオーマ	8.3	13.1	7.9	3.1
合計	100.0 (n=14,418)	100.0 (n=2,650)	100.0 (n=10,132)	100.0 (n=1,636)

膠芽腫へと変化してく様子が窺い知れる。乏突起膠腫は、40歳代をピークとして、それより若年では男性に多く、それ以降は女性に多いため、全体では性比はほぼ1:1となっている(図2D)。上衣腫、髄芽腫は小児に多い腫瘍であるが、上衣腫では中年以降にもう一つのピークを有する(図2E, F)。髄膜腫は1:2.8と女性に多い疾患である。好発年齢は50歳代から70歳代まで広く分布する(図2G)。神経鞘腫も1:1.3と女性に若干多く、50歳代から60歳代にピークがある(図2H)。下垂体腺腫は、その種類により好発年齢や性比が異なる。全体では二峰性になっているが、ホルモン非産生下垂体腺腫は50歳代から60歳代に一つのピークを示すのみであり、20歳代から30歳代にかけてのピークは、女性を主体としたプロラクチン産生性下垂体腺腫であることがわかる(図2I-K)。最後に、最近頻度の増加している悪性リンパ腫の年齢分布を示す(図2L)。これも高齢者の男性に多く、男女比は1.3:1である。

2.3.3 生存率に影響を及ぼす因子

脳腫瘍においては他の臓器で用いられているTNM分類は適応されていない。巨大な腫瘍でも髄膜腫であれば、症状は軽微であることも稀ではなく、摘出によって治癒することも多い。それに対し、膠芽腫の場合は、かなり早期に発見されたとしても予後はかなり厳しいと言える。脳腫瘍では、組織診断が決

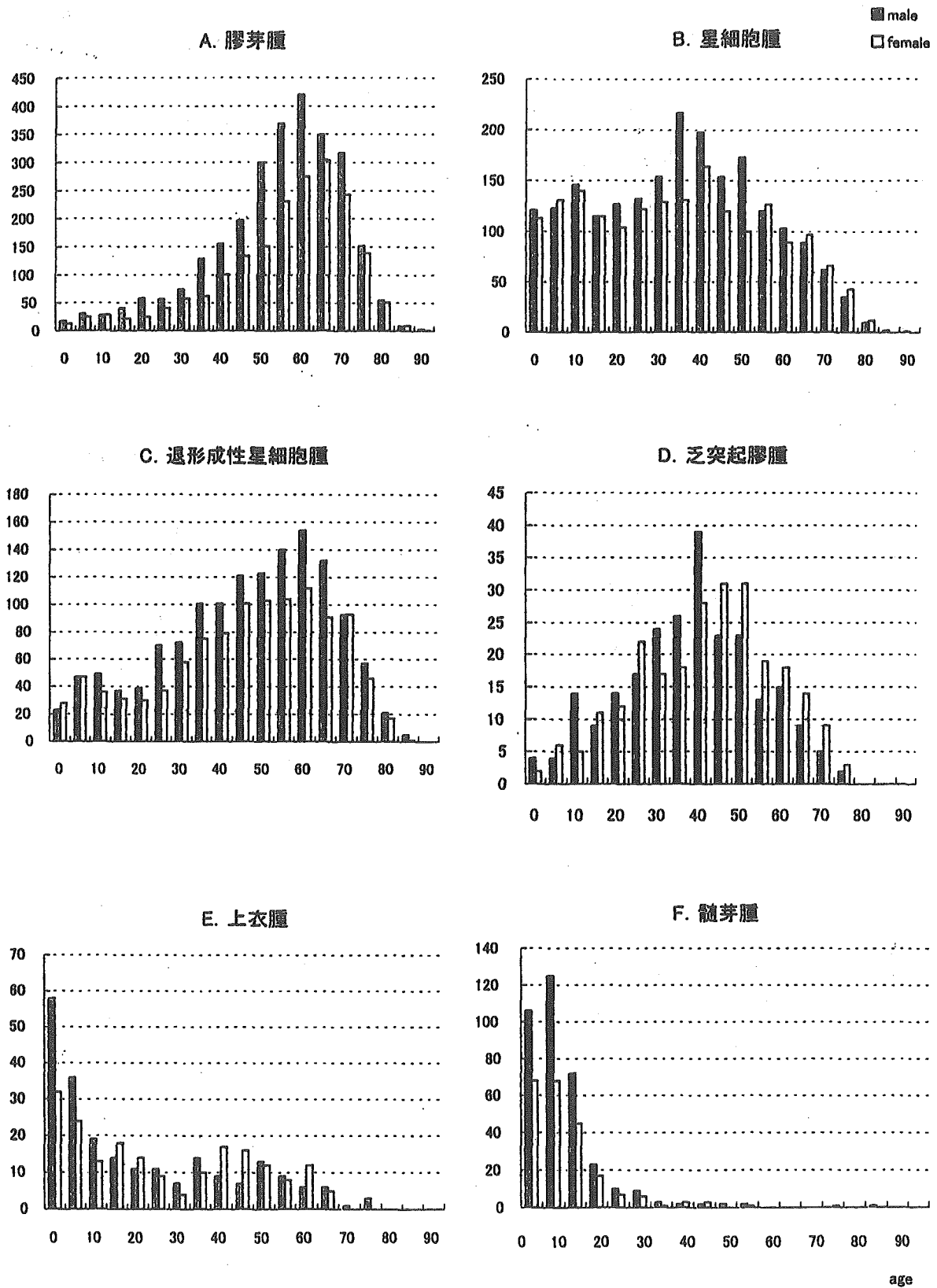


図2 脳腫瘍全国統計による各種脳腫瘍の年齢分布 (1984 ~ 1996年症例) [15]

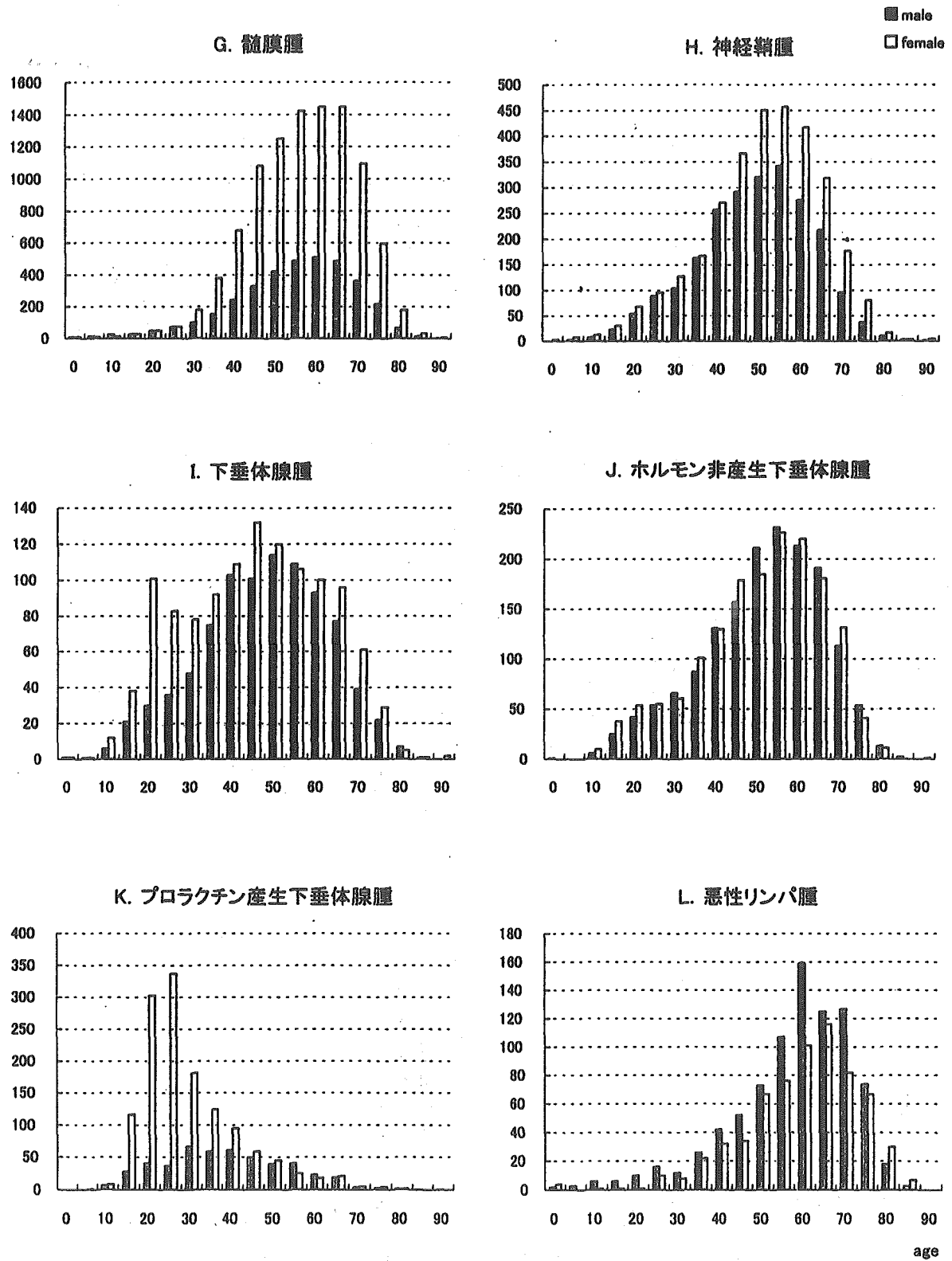


図2 (つづき)

表3 脳腫瘍全国統計による各種脳腫瘍の5年累積生存率(1991～1996年登録症例) [15]

	症例数	1年	2年	3年	4年	5年
星細胞腫	1,573	89.6%	79.7%	73.8%	70.9%	66.5%
退形成性星細胞腫	1,066	67.6	43.0	32.2	26.4	23.4
膠芽腫	2,125	55.2	19.6	11.4	8.8	7.0
乏突起膠腫	152	95.3	91.8	87.1	83.8	82.0
退形成性乏突起膠腫	43	87.5	84.7	75.0	71.7	68.2
髄膜腫	6,367	97.9	96.6	95.7	94.8	93.7
全グリオーマ	5,757	73.3	51.9	44.4	40.9	38.1

定された時点で予後の推察が可能なことが多い。表3に各種脳腫瘍の累積生存率を示す。髄膜腫の5年生存率が93.7%であるのに対し、グリオーマ全体では38.1%であり、このうち、星細胞腫では66.5%、退形成性星細胞腫は23.4%、膠芽腫は7.0%である。

髄膜腫などの良性腫瘍では、基本的に手術的に摘出することで治癒させることができる。これに対し、グリオーマの予後に影響を与える因子として、手術、放射線、年齢、術前の performance status などが挙げられている [16-19]。さらにメタアナリシスにより、放射線治療に nitrosourea 系の化学療法剤を併用することで、予後の改善がみられることが確認された [20]。脳腫瘍全国統計による生存率でも同様な傾向がみられる。生存率への影響を考える上で、エビデンスレベルとしては症例研究の域を出ず、Level IV 程度と言えるが、数千例を対象とした調査であるため、比較的信頼度は高いと言える [21]。

2.3.3.1 年齢

グリオーマの生存率は50歳を過ぎると急激に低下する傾向をもっている。若年者では60%程度の平均生存率が、70歳代では40%、80歳代では30%以下に低下する。カイ二乗 (χ^2) 検定では、55歳未満とそれ以上の間に有意差がみられ、以降65歳未満とそれ以上、75歳未満とそれ以上、85歳未満とそれ以上のそれぞれに有意差があり、高齢者では10歳進むごとに有意差をもって生存率の低下がみられる (図3)。これは、星細胞腫、退形成性星細胞腫、膠芽腫のすべてに共通する傾向であり、高齢者のグリオーマは組織診断に関係なく予後不良であると言える。

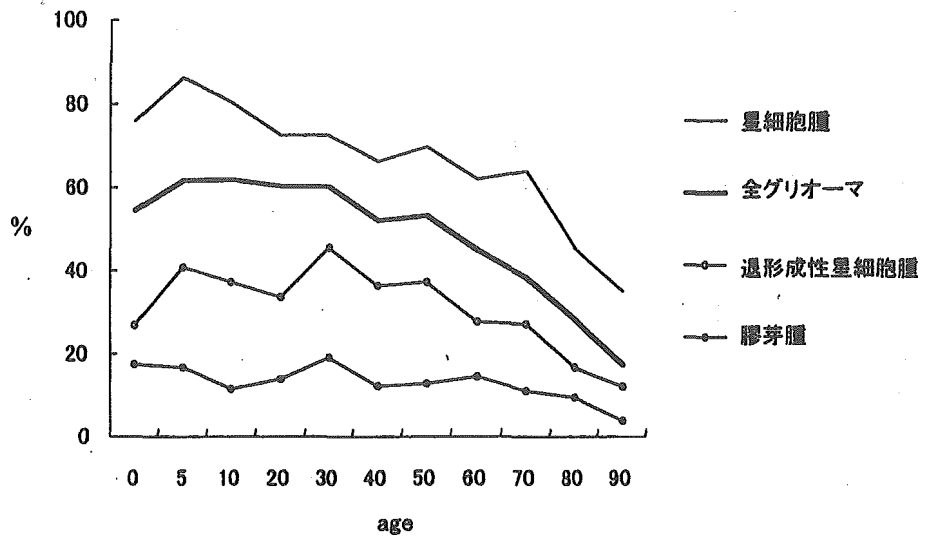


図3 疾患別，年齢別5年生存率

2.3.3.2 術前 performance status

脳腫瘍患者の performance status を現す表現法として、Karnofsky scale と Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) が繁用されているが、脳腫瘍全国統計では臨床悪性度を無症状、自覚症状のみ、巣症状、頭蓋内圧亢進、意識障害、昏睡、呼吸中枢障害の7段階に分けて評価をしている。呼吸障害例および昏睡例はいずれも1%以下の症例であるため、図4にこれらを除いた5段階での生存曲線を示す。星細胞腫では、無症状と自覚症状の間に有意差がみられなかったが、退形成性星細胞腫および膠芽腫ではその差は大きく、悪性腫瘍での早期発見の重要性を示している。また、星細胞腫および退形成性星細胞腫では、自覚症状と巣症状の間に有意差がみられ、巣症状が出現した場合の予後の悪さを示している。

2.3.3.3 手術摘出度

悪性腫瘍でも手術的に全摘できれば治癒可能である。しかしながら、他臓器と異なり脳腫瘍は手術における制限がきわめて大きいため、断端に余裕をもって摘出することは不可能である。膠芽腫などでは、CTやMRIにて造影剤で増強を受ける領域から数cm先まで腫瘍の浸潤がみられ、周辺の脳の機能を温存したまま摘出することは困難である。最近では、各種モニタリングやナビゲーションの発達により、安全にしかも最大限に腫瘍を摘出することができるようになってきたが、運動や言語の機能をもつ領域に浸潤した腫瘍には外科的侵襲

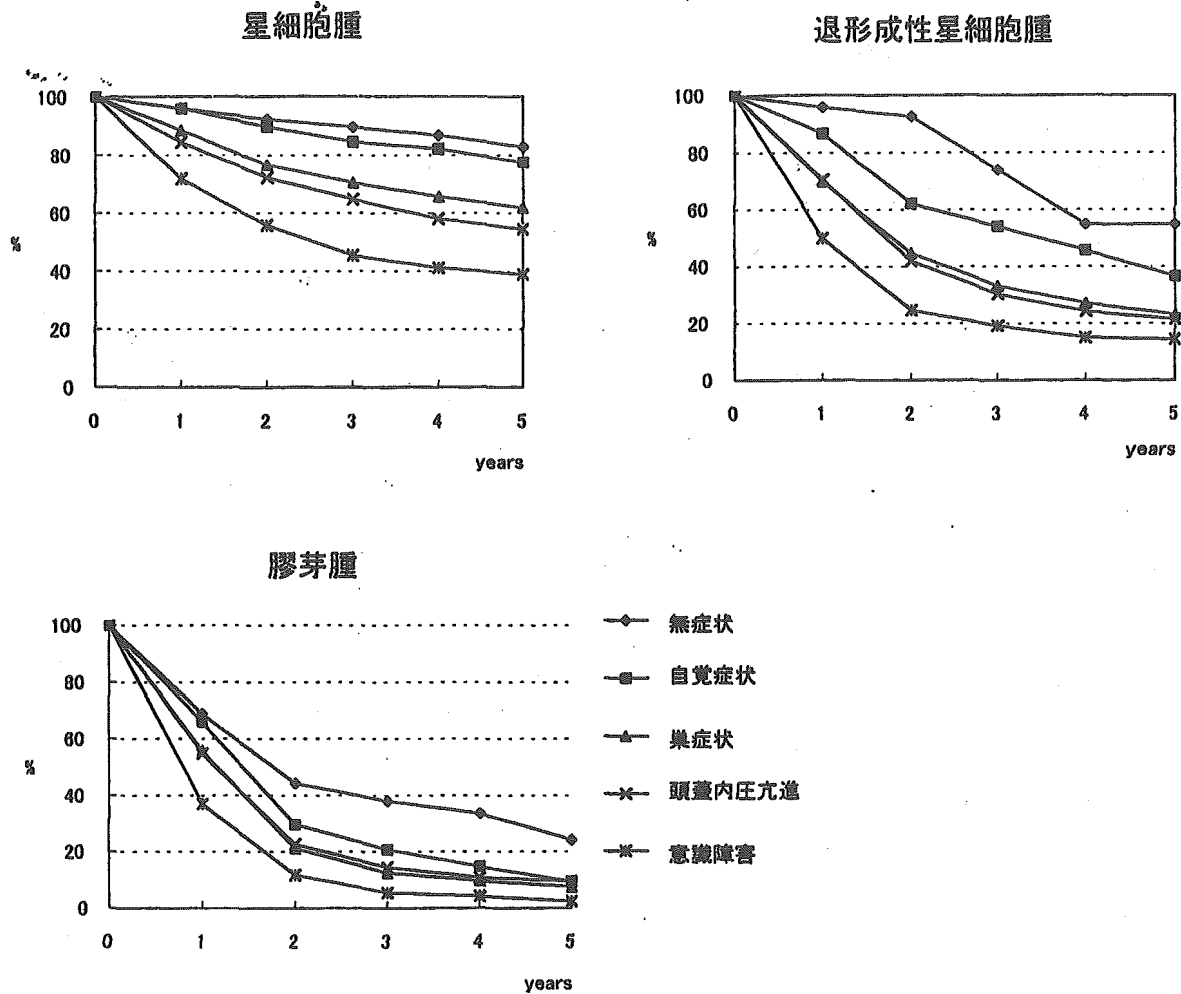


図4 治療前症状によるグリオーマの生存率

を加えることができない。図5にグリオーマの摘出度別の生存曲線を示す。膠芽腫では50%摘出と生検との間に有意差がないが、75%摘出により50%以下の摘出と有意差が出る。さらに摘出度が進むにつれ、それぞれ有意差をもって生存率の上昇がみられる。最も悪性度の高い膠芽腫でも、手術が予後に及ぼす影響の強いことがわかる。退形成性星細胞腫および星細胞腫では、75%までの摘出ではそれ以下と有意差がなく、95%の摘出により75%以下の摘出と有意差をもつようになる。グリオーマは元来、全摘の困難な疾患であるが、可及的最大の摘出を図ることが予後の改善につながるものと言える。

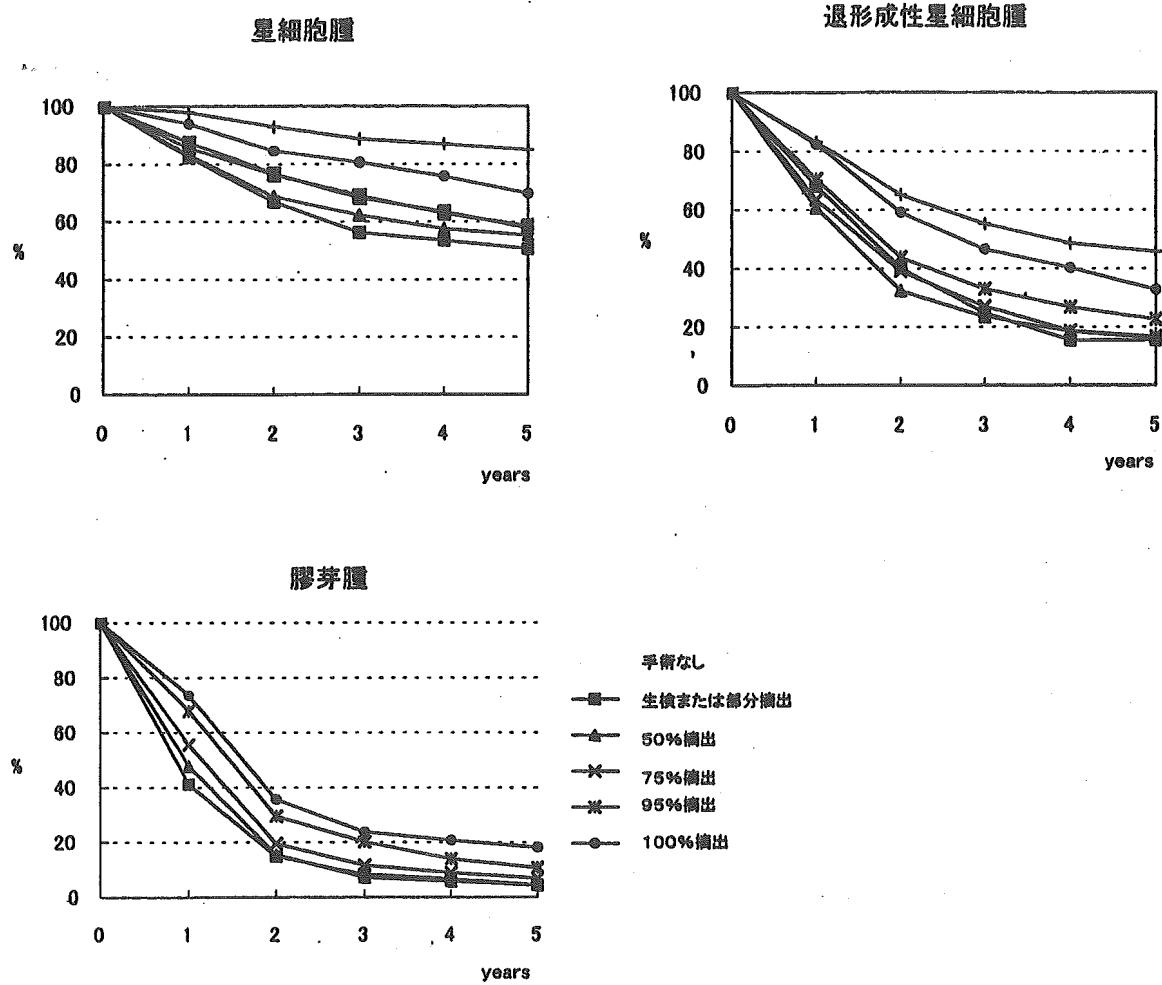


図5 手術摘出度によるグリオーマの生存率

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-chir* 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 Eng J Med* 303: 1323-1329
19. Chang CH, Horton J, Schoenfeld D, Salazar 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

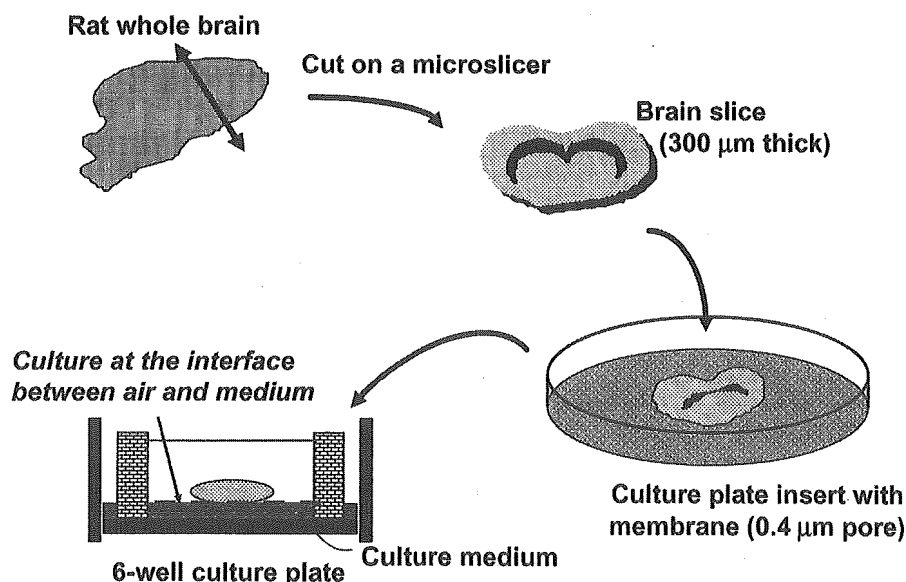


FIGURE 1 Illustrative procedures of brain slice culture. A rat whole brain slice 300 μm thick is placed on a porous membrane affixed to the culture plate insert and cultured at the interface between air and culture medium.

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).

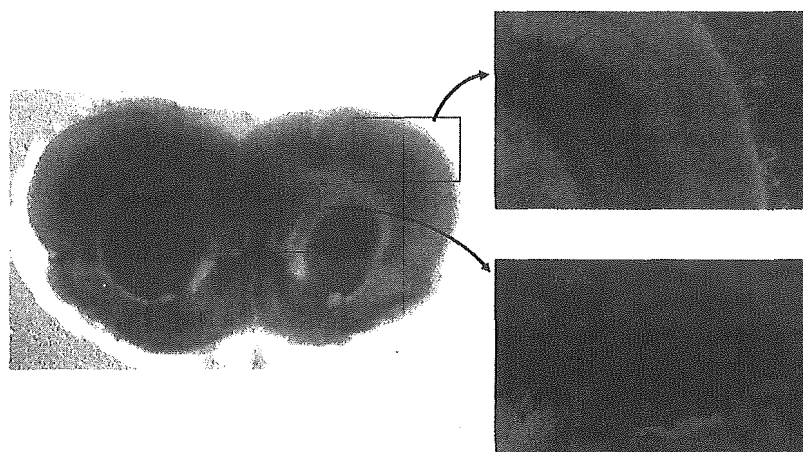


FIGURE 2 Morphological pictures of a rat brain slice after 8 days of culture. Normal cytoarchitecture, including cortical lamination and hippocampal structure, is clearly observed (left: macroscopic picture, $\times 0.5$; right: phase contrast, $\times 40$).

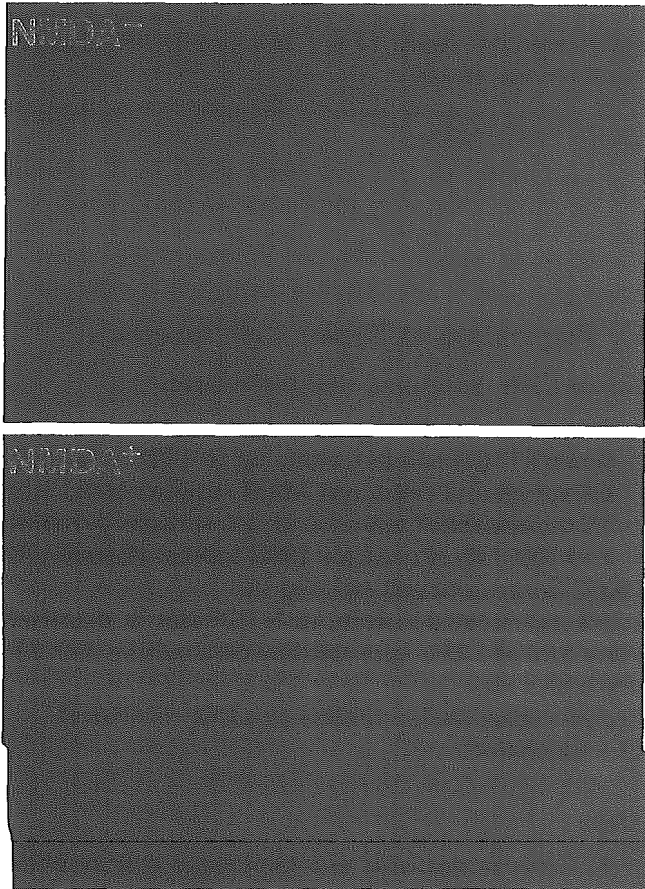


FIGURE 3 Neuronal viability of rat brain slices assessed by cellular uptake of propidium iodide (PI) without (upper) and with (lower) treatment of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA). Normally functioning neurons can exclude PI and show early or delayed neuronal cell death by NMDA insult, thus permitting entry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

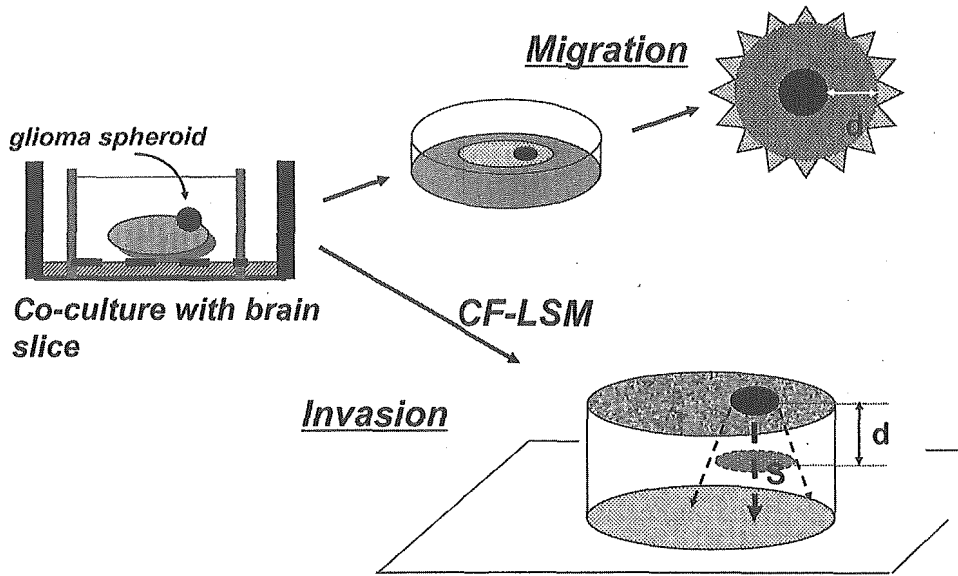


FIGURE 4 Illustrative procedures of tumor cell migration and invasion assay in cocultured brain slices. A tumor (glioma) spheroid is placed on the brain slice and is cocultured at the interface between air and culture medium. For tumor cell migration, the extent of the spread of fluorescent dye-stained 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.

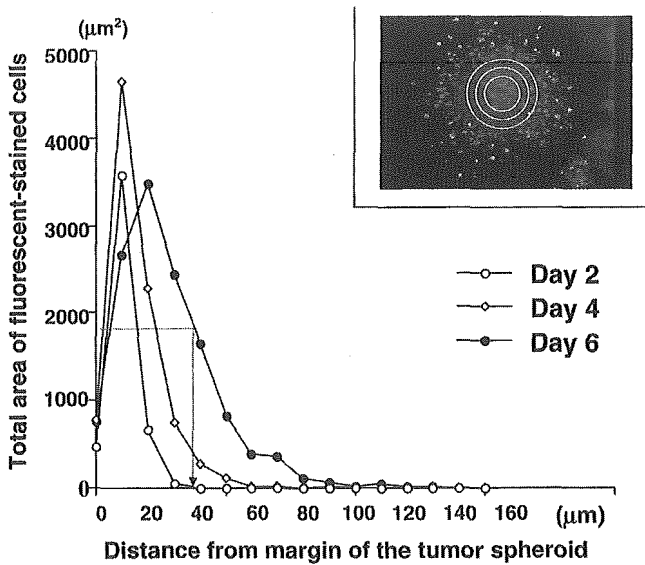


FIGURE 5 Construction of distribution curves of migrating cells for a quantitative analysis of tumor cell migration in brain slices. The total area of the labeled cells contained in each ring is plotted as a function of the distance from the margin of the tumor spheroid. (Inset) Concentric circles 10µm 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 (520 nm) filter optics.

3. At the first observation, determine the level of the basal plane (0µm) in accordance with the upper surface of the brain slice.

4. Obtain serial sections every 20µm 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

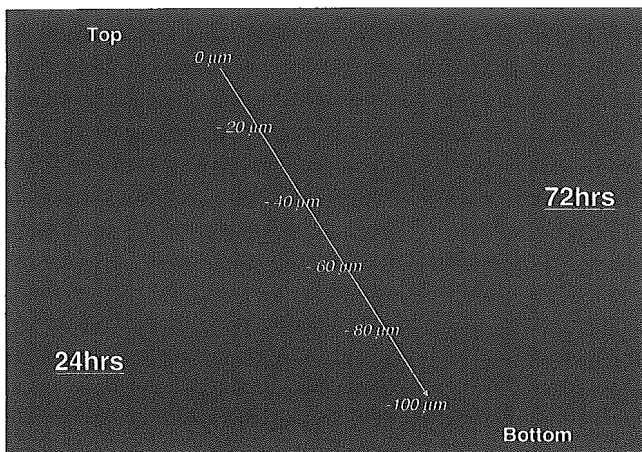


FIGURE 6 Confocal laser-scanning microscopic pictures of invading glioma cells in rat brain slices. At 24 h after coculture of T98G glioma spheroid and the brain slice, most glioma cells remain at the top of the slice (0 μm), while the glioma cells migrate extensively within the brain slice (show the maximum spread at -40 μm 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 Clontech 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 Shimizu, 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). Laminar specificity of extrinsic cortical connections studied in coculture preparations. *Neuron* **9**, 217–228.