

VP-16を加えるか、VP-16とL-PAMを加えた治療を行っている。ASCTの限局例でファーストラインでASCTを受けた例の5年DFSは49%、転移例では34%であった。診断時、限局例でその後再発した例の5年DFSは14%と非常に不良であった。この研究ではこれまでの移植を用いない化学療法の成績と大きな違いはない結果であったと報告している。

Rosenthalら⁶⁾は、転移例または再発例に、tandem ASCTを13例に、1回のみのASCTを7例に行った。1回目のASCTの前処置は、BUS+L-PAMが11例、L-PAM+カルボプラチン(CBDCA)が9例、2回目の前処置は、L-PAM+CBDCA+CPAまたはVP-16などであった。治療関連死は2回目ASCT中に1例であった。治療成績は、1年全生存率(OS)は60%、3年OSは45%であった。Burdachら²⁾も報告しているが、集積症例数が少なく評価は難しいが、比較的安全にtandem ASCTを行うことが可能であった。

以上より、ほとんどの報告は2~5年DFSは20~30%程度で、未だに予後は不良であるが、肺のみ、骨のみの転移であれば大量化学療法は有効であるという報告もあるが、まだ十分な症例数の蓄積もなく推奨はできない。

検索式・参考にした二次資料

PubMedで“Ewing sarcoma” AND “high dose therapy”で検索し重要と思われる文献を参考にした。また、NCI-PDQ[®] (<http://www.cancer.gov/cancertopics/types/ewing/>)を参考にした。

参考文献

- 1) Stewart DA, Gyonyor E, Paterson AH, et al. High-dose melphalan +/- total body irradiation and autologous hematopoietic stem cell rescue for adult patients with Ewing's sarcoma or peripheral neuroectodermal tumor. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18: 315-8. (エビデンスレベル IVa)
- 2) Burdach S, Meyer-Bahlburg A, Laws HJ, et al. High dose therapy for patients with primary multifocal and early relapsed Ewing's tumors: results of two consecutive regimens assessing the role of total-body irradiation. *J Clin Oncol* 2003; 21: 3072-8. (エビデンスレベル II)
- 3) Meyers PA, Krailo MD, Ladanyi M, et al. High-dose melphalan, etoposide, total-body irradiation, and autologous stem-cell reconstitution as consolidation therapy for high-risk Ewing's sarcoma does not improve prognosis. *J Clin Oncol* 2001; 19: 2812-20. (エビデンスレベル IVa)
- 4) Oberlin O, Rey A, Desfachelles AS, et al. Impact of high-dose busulfan plus melphalan as consolidation in metastatic Ewing tumors: a study by the Société Française des Cancers de l'Enfant. *J Clin Oncol* 2006; 24: 3997-4002. (エビデンスレベル III)
- 5) Gardner SL, Carreras J, Boudreau C, et al. Myeloablative therapy with autologous stem cell rescue for patients with Ewing sarcoma. *Bone Marrow Transplant* 2008; 41: 867-72. (エビデンスレベル III)
- 6) Rosenthal J, Bolotin E, Shakhnovits M, et al. High-dose therapy with hematopoietic stem cell rescue in patients with poor prognosis Ewing family tumors. *Bone Marrow Transplant* 2008; 42: 311-8. (エビデンスレベル IVa)

肺転移例に対する全肺照射は有効か？

推奨
グレード C

肺転移を併発した患者では、全肺照射による局所制御の有効性が示唆されている。全肺照射を行う場合は 12~14 Gy が照射線量として推奨される。ただし、放射線照射による肺機能異常の出現率が 50 % を超える報告もあり、十分注意する必要がある。

(エビデンスレベル III)

背景・目的

転移性 Ewing 肉腫ファミリー腫瘍の肺転移例に対し、全肺照射による局所制御が期待できるかどうか検討した。

解説

Paulussen ら¹⁾ は、1990~1995 年に EICESS に登録された肺または胸膜に転移を認めた 171 人に対して、14 歳以下は 15 Gy、14 歳以上は 18 Gy の全肺照射の施行例と非施行例との予後の比較を行っている¹⁾。全肺照射を行った患児の 5 年無病生存率は 40 % で、非照射例の患児は 19 % と全肺照射を行ったほうが有意に生存率は高かった ($P < 0.05$)。

Spunt ら²⁾ は、1979~1996 年に St. Jude Children Hospital で治療された肺転移を認めた患者について後方視的に解析した。18 人の患児は初回化学療法で肺転移巣は制御でき、1 人だけ全肺照射 16.5 Gy を行い、さらに病巣部に合計 21.5 Gy 照射した。また、初回化学療法で肺転移巣が制御できなかった 10 人のうち 7 人に対しては全肺照射 16.5 Gy を行い、このうち 2 人は病巣部に 30~35 Gy 追加照射を行っている。全肺照射の 8 人のうち 3 人は 14 週後肺臓炎に罹患したが、ステロイド療法で改善した。検討症例数が少ないため明確な結論は得られないが、初期の化学療法に対する反応が不良の場合は全肺照射は有効と考えられるが、化学療法に対する反応性が良好な例に対する全肺照射の有効性は明らかでない。今後は前方視的ランダム化比較試験が必要であるとしている。

Bölling ら³⁾ は、1990~1999 年に EICESS 92 に登録された肺転移を認めた 99 例について後方視的検討を行った。この研究では、肺転移のある症例は化学療法で病巣が制御されていても両側の全肺照射 (14 歳未満は 14 Gy、14 歳以上は 18 Gy) を推奨している。実際の照射線量は 12~21 Gy である。また、肺機能検査を行っており、検査を行った 12/28 (43 %) の患者は、特に肺機能異常は認めなかった。残りの 16/28 は何らかの肺機能異常を認め、2 例は重症であった。肺機能異常の出現率は照射線量による差は認めなかった。この研究でも、全肺照射した例のほうが照射しない症例より 5 年全生存率の有意差はないが良い傾向 (61 % vs. 49 %, $P = 0.036$) にあった。

以上より、肺転移を併発した患者では化学療法の治療効果にかかわらず、全肺照射を実施したほうが予後は良好な傾向にある。全肺照射を行う場合は 12~14 Gy が照射線

量として推奨される。しかし、放射線照射による肺機能異常の出現率は50%を超える報告もあり十分注意する必要がある。

検索式・参考にした二次資料

PubMedで“Ewing sarcoma” AND “pulmonary metastasis”で検索し重要と思われる文献を参考にした。また、NCI-PDQ[®] (<http://www.cancer.gov/cancertopics/types/ewing/>)を参考にした。

参考文献

- 1) Paulussen M, Ahrens S, Burdach S, et al. Primary metastatic (stage IV) Ewing tumor: survival analysis of 171 patients from the EICESS studies. *Ann Oncol* 1998; 9: 275-81. (エビデンスレベル III)
- 2) Spunt SL, McCarville MB, Kun LE, et al. Selective use of whole-lung irradiation for patients with Ewing sarcoma family tumors and pulmonary metastases at the time of diagnosis. *J Pediatr Hematol Oncol* 2001; 23: 93-8. (エビデンスレベル IVa)
- 3) Bölling T, Schuck A, Paulussen M, et al. Whole lung irradiation in patients with exclusively pulmonary metastases of Ewing tumors. Toxicity analysis and treatment results of the EICESS-92 trial. *Strahlenther Onkol* 2008; 184: 193-7. (エビデンスレベル III)

▶ CQ 14

再発例の治療法は？

推奨
グレード **C**

限局性 Ewing 肉腫ファミリー腫瘍の再発後の治療法は確立していない。症例数も少なく、今後検討する余地があるが、イホスファミド+カルボプラチン+エトポシド (ICE 療法) が選択肢としてある。また、化学療法の効果が良い症例では、化学療法を続行するより自家造血幹細胞移植を施行したほうがよいという報告もある。

(エビデンスレベル IV)

背景・目的

限局性 Ewing 肉腫ファミリー腫瘍の予後は改善してきたが、再発すると予後不良であるといわれている。再発例に対する治療法および自家造血幹細胞移植の有効性について検討した。

解説

再発後の化学療法として様々な治療法が行われている。有効であると考えられるドキソルビシン (DXR)、シクロホスファミド (CPA)、ビンクリスチン (VCR)、イホスファミド (IFM)、エトポシド (VP-16)、アクチノマイシン (ACD) の6剤にカルボプラチン (CBDCA) を加えた治療薬の組み合わせで行われることが多い¹⁻⁴⁾ が、限局例でも再発をきたした症例は予後不良である。再発例に対する確立された治療法は存在せず、これまで行われてきた前述の薬剤を4~6剤組み合わせた治療法が選択されるが、Kung ら⁵⁾ と Winkle ら⁶⁾ は、症例数は少ないが、IFM+CBDCA+VP-16 (ICE 療法) を用いた治療が有効であったと報告している。他の難治性小児固形腫瘍に対しても有効という報告⁶⁾ もあり、再発後治療としては選択肢の一つと考えられる。

自家造血幹細胞移植に関しては、Baker ら¹⁾ は、再発後の化学療法の効果が良い症例には、自家造血幹細胞移植を施行したほうがよいと報告している。化学療法への効果が良好であった27例中13例に造血幹細胞移植が行われている。この27例の分析で、造血幹細胞移植を施行した13例と造血幹細胞移植を施行しなかった14例を比較すると、5年の無増悪生存率は61%と21%、全生存率は77%と21%で、ともに有意差を認めており、この結果から化学療法の治療効果が良い症例では、造血幹細胞移植を施行することにより予後の改善が期待される。

再発例の予後因子について、Baker ら¹⁾、Rodriguez-Glindo ら³⁾、Bacci ら⁴⁾ の報告は、診断時から2年以降の再発例の予後は比較的良好であるのに対して、2年以内の再発の予後は非常に不良であると報告している。再発部位では、局所の単独再発の場合は、放射線治療と化学療法を行えば予後は良好だが、再発が複数部位の場合は不良である。肺の単独再発例は、肺照射を行うほうが化学療法単独より5年無病生存率は有意に高い³⁾ ことより、肺照射は治療法の選択の一つとして考えられる。

新規薬剤に関しては、トポイソメラーゼ I 阻害剤であるイリノテカン (CPT-11) や

topotecan は単独使用の有効性は少ないが、CPT-11+テモゾロミド⁷⁾、topotecan+CPA⁸⁾などの併用での有効性も少数例だが報告されている。

検索式・参考にした二次資料

PubMedで“Ewing sarcoma” AND “relapse”で検索し重要と思われる文献を参考にした。また、NCI-PDQ[®] (<http://www.cancer.gov/cancertopics/types/ewing/>)を参考にした。

参考文献

- 1) Barker LM, Pendergrass TW, Sanders JE, et al. Survival after recurrence of Ewing's sarcoma family of tumors. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4354-62. (エビデンスレベル III)
- 2) Shankar AG, Ashley S, Craft AW, et al. Outcome after relapse in an unselected cohort of children and adolescents with Ewing sarcoma. *Med Pediatr Oncol* 2003; 40: 141-7. (エビデンスレベル IVa)
- 3) Rodriguez-Galindo C, Billups CA, Kun LE, et al. Survival after Recurrence of Ewing tumors: the St Jude Children's Research Hospital experience, 1979-1999. *Cancer* 2002; 94: 561-9. (エビデンスレベル III)
- 4) Bacci G, Ferrari S, Longhi A, et al. Therapy and survival after recurrence of Ewing's tumors: the Rizzoli experience in 195 patients treated with adjuvant and neoadjuvant chemotherapy from 1979 to 1997. *Ann Oncol* 2003; 14: 1654-9. (エビデンスレベル IVa)
- 5) Kung FH, Desai SJ, Dickerman JD, et al. Ifosfamide/carboplatin/etoposide (ICE) for recurrent malignant solid tumor of childhood: a Pediatric Oncology Group Phase I / II study. *J pediatr Hematol Oncol* 1995; 17: 265-9. (エビデンスレベル V)
- 6) Van Winkle P, Angiolillo A, Krailo M, et al. Ifosfamide, carboplatin, and etoposide (ICE) re-induction chemotherapy in large cohort of children and adolescents with recurrent/refractory sarcoma: The children's Cancer Group (CCG) experience. *Pediatr Blood Cancer* 2005; 44: 338-47. (エビデンスレベル IVa)
- 7) Wagner LM, McAllister N, Goldsby RE et al. Temozolomide and intravenous irinotecan for treatment of advanced Ewing Sarcoma. *Pediatr Blood Cancer* 2007; 48: 132-9. (エビデンスレベル IVb)
- 8) Hunold A, Weddeling N, Paulussen M et al. Topotecan and cyclophosphamide in patients with refractory or relapsed Ewing tumors. *Pediatr Blood Cancer* 2006; 47: 795-800. (エビデンスレベル IVb)

二次がんの発症率は？

推奨
グレード **C**

Ewing 肉腫ファミリー腫瘍の二次がんの発症には、放射線治療、トポイソメラーゼ II 阻害剤の使用だけではなく、アントラサイクリン系、アルキル化剤などの薬剤の増量などで発症リスクを高くしている。
(エビデンスレベル III)

背景・目的

Ewing 肉腫ファミリー腫瘍 (ESFT) に対する治療は、アルキル化剤やトポイソメラーゼ II 阻害剤を含む多剤併用化学療法に放射線治療を併用することにより予後の改善が図られてきた。一方、これら抗がん剤および放射線治療による治療関連性の二次がんの報告も散見される。実際、これらの影響による二次がん発症率、発症要因に関して検討した。

解説

これまで行われてきたいくつかの臨床研究で、二次がんの発症に関して報告がある。

発症頻度に関しては様々で、6例/690例¹⁾ (0.9%)、8例/674例²⁾ (1.2%)、14例/598例³⁾ (2.3%)、12例/237例⁴⁾ (5.1%)、16例/266例⁵⁾ (6%) などが報告されている。発症するがんの種類は、抗がん剤によると考えられる治療関連性骨髄性白血病 (t-AML) や治療関連性骨髄異形成症候群 (t-MDS) は比較的早期、治療終了後1~6年頃に、放射線照射による肉腫は比較的晩期、10~12年後²⁾ に発症してくる。

抗がん剤に関係した報告では、Paulussen ら¹⁾ は、診断から5年後の累積発症率は、Ewing 肉腫全体で0.0093、エトポシド (VP-16) を併用しない群では0で、VP-16を併用した群では0.0118、イホスファミド (IFM) とドキシソルビシン (DXR) を用いた大量化学療法群では0.0398に上昇すると報告している。

Navid ら⁴⁾ は、237例中8例 (3.4%) に t-AML を認め、MDS/AML 例は、予後不良であった。年代が進むにつれて化学療法の投与量が増量され、抗がん剤の蓄積により t-AML が増加する傾向がみられている。

Le Deley ら⁶⁾ は、アルキル化剤や放射線照射は白血病発症には関与しなかったが、トポイソメラーゼ II 阻害剤 1.2~6 g/m² とアントラサイクリン系薬剤を 170 mg/m² 以上を投与すると、それ以下の症例と比較し白血病発症危険率は7倍上昇し、さらにトポイソメラーゼ II 総投与量が 6 g/m² を超えると白血病発症率が上昇することも報告している。

Bhatia ら⁷⁾ は、1992~1998年にCOGに登録されたESFT患者の578人、フォローアップ期間の中央値は8年間で、11人の患者が t-MDS を発症したと報告している。特に総投与量で IFM 90 g/m² から 140 g/m²、シクロホスファミド (CPA) 9.6 g/m² から 17.6 g/m²、DXR 375 mg/m² から 450 mg/m² に増量した治療レジメンで、t-MDS の発症が他と比較して16倍と有意に高く、5年で11%に発症している。IFM 140 g/m²,

CPA 17.6 g/m², DXR 450 mg/m² の組み合わせが, t-MDS の発症リスクを高くしていると報告している。

以上より, 抗がん剤による t-AML は, トポイソメラーゼ II 阻害剤である VP-16 だけではなく DXR, IFM, CPA などの薬剤の組み合わせでも発症する可能性は高く, 十分注意が必要である。

放射線照射に関係した報告では, Navid ら⁴⁾ の報告では, 237 例中 4 例に二次性固形腫瘍が発症し, 照射野に一致して 2 例の骨肉腫の発症があり, 60 Gy を超えると発症率は有意に高くなる。Kuttesch ら⁵⁾ の報告でも, 局所照射では, 48 Gy 以下の線量では二次性肉腫の発症は認めなかったが, 60 Gy を超えると発症率は有意に高くなる。

Bacci ら³⁾ の報告では, 40~60 Gy を照射した 8 例に放射線関連骨肉腫が発症している。手術で局所制御できれば, 放射線照射を避けられるか, 照射線量を減少させることは可能で, 二次がんの発症リスクを減少できると報告している。

検索式・参考にした二次資料

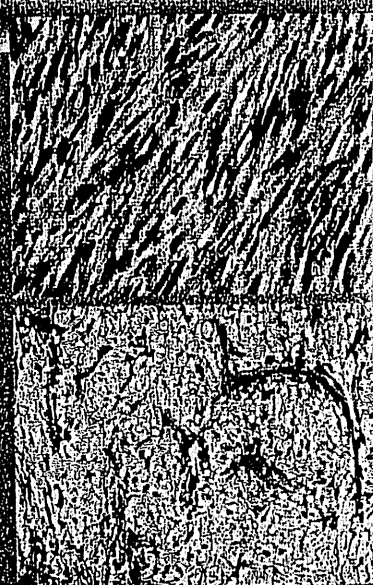
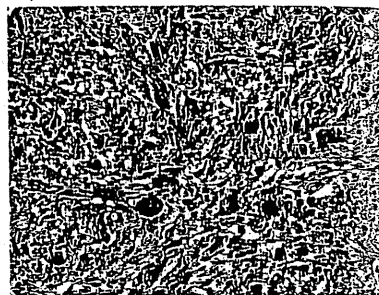
PubMed で “Ewing sarcoma” AND “Second malignancies” で検索し重要と思われる文献を参考にした。また, NCI-PDQ[®] (<http://www.cancer.gov/cancertopics/types/ewing/>) を参考にした。

参考文献

- 1) Paulussen M, Ahrens S, M. Lehnert M, et al. Second malignancies after ewing tumor treatment in 690 patients from a cooperative German/Austrian/Dutch study. *Ann Oncol* 2001; 12: 1619-30. (エビデンスレベル III)
- 2) Dunst J, Ahrens S, Paulussen M, et al. Second malignancies after treatment for Ewing's sarcoma: a report of the CESS-studies. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 42: 379-84. (エビデンスレベル III)
- 3) Bacci G, Longhi A, Barbieri E, et al. Second malignancy in 597 patients with ewing sarcoma of bone treated at a single institution with adjuvant and neoadjuvant chemotherapy between 1972 and 1999. *J Pediatr Hematol Oncol* 2005; 27: 517-20. (エビデンスレベル III)
- 4) Navid F, Billups C, Liu T, et al. Second cancers in patients with the Ewing sarcoma family of tumors. *Eur J Cancer* 2008; 44: 983-91. (エビデンスレベル IVa)
- 5) Kuttesch JF Jr, Wexler LH, Marcus RB, et al. Second malignancies after Ewing's sarcoma: radiation dose-dependency of secondary sarcomas. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2818-25. (エビデンスレベル III)
- 6) Le Deley MC, Leblanc T, Shamsaldin A, et al. Risk of Secondary leukemia after a solid tumor in childhood according to the dose of epipodophyllotoxins and anthracyclines: a case-control study by the Société Française d'Oncologie P diatrique. *J Clin Oncol* 2003; 21: 1074-81. (エビデンスレベル III)
- 7) Bhatia S, Krailo MD, Chen Z, et al. Therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia after Ewing sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone: A report from the Children's Oncology Group. *Blood* 2007; 109: 46-51. (エビデンスレベル III)

軟部腫瘍

腫瘍病理鑑別診断アト



VI. 軟部肉腫の組織学的治療 効果判定と切除縁評価

はじめに

悪性腫瘍において術前治療の効果や手術検体の切除縁の評価を行うことは一般的で、骨・軟部領域においても同様である。術前治療の効果判定は薬剤などの治療法選択や予後の予測に重要で、悪性軟部腫瘍取扱い規約において画像評価法について記載されているものの、組織学的効果判定基準は定められていない。術前治療後の組織変化、固形癌としての効果判定や問題点などについて記載する。

一方、切除縁評価については取扱い規約第2版¹⁾において詳細に記述され、最新の第3版では最小限にとどめられている。他臓器の癌と異なり、解剖学のおよび腫瘍進展の特徴から、単に距離のみでない独特、やや煩雑な切除縁評価基準となっている。発生立²⁾によっては解剖学的構造が複雑で切除縁設定が難しいが、本邦ではこのような評価法や治癒的広範切除法³⁾の概念が普及して、局所再発率および予後の改善、切除縁の縮小がもたらされた。しかし、画像による術前予想や肉眼評価を著しく超える浸潤性発育を示す症例もあり、詳細な切除縁評価は画像との対比により、今後の治療法・切除縁設定や、さらなる予後改善の一助ともなる。日本整形外科学会骨・軟部腫瘍委員会による切除縁評価法²⁾とその実際について述べる。

1. 組織学的治療効果判定

1) 臨床的背景

術前療法には軟部悪性腫瘍においても化学療法と

放射線療法があり、組織型、進展状況により、手術療法と組み合わせて用いられる。それぞれの術前療法に利点・欠点があるが、有効な場合には切除範囲を縮小することが可能である³⁾。取扱い規約では縮小率や壊死領域による画像評価法が定められており、通常、画像評価と切除材料の組織学的評価は一致するが、軟部肉腫では画像効果判定と予後の間に有意な相関を認めないとの報告⁴⁾もあり、組織学的評価と合わせた検討が必要である。一方で、軟部肉腫は組織型・亜型の種類が多く、術前療法の適応となる腫瘍がある程度限られている。骨外性Ewing肉腫/PNET、骨外性骨肉腫や横紋筋肉腫では化学療法の感受性が高く、標準的治療として確立されている。相対的適応となる腫瘍には、悪性線維性組織球腫/粘液線維肉腫、脂肪肉腫(高分化型以外)、滑膜肉腫などがある⁵⁻⁷⁾。組織学的効果判定については、悪性骨腫瘍取扱い規約の基準や他臓器の基準を参考に評価しているのが実状と思われる。

2) 術前療法で生じる病理組織学的変化

術前療法は多くの悪性腫瘍において有効で、各臓器で組織学的効果判定基準が設定されているが、組織学的変化のとらえ方にも多様性が窺われ、必ずしも十分な評価結果が得られているとは限らない。骨・軟部腫瘍領域においても同様であるが、骨腫瘍の場合、軟部や他臓器とは異なり、術前治療後も腫瘍の存在していた領域がより明確である。その点で組織学的変化をとらえやすく、軟部腫瘍の評価にも十分に参考となる。

未治療例でも、種々の程度に出血・壊死・嚢胞化

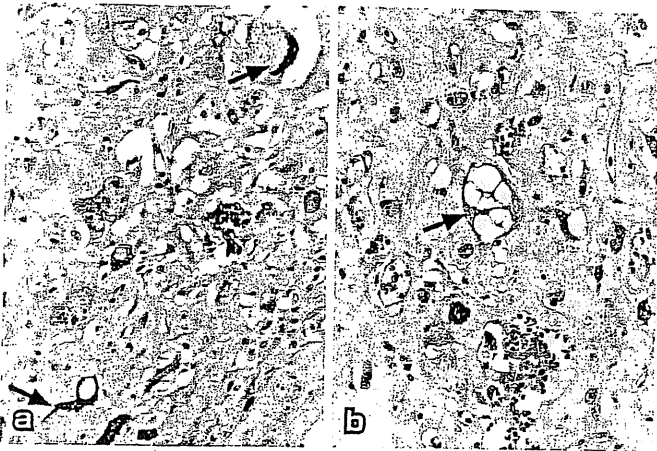


図1 | 術前治療後の組織学的変化(再発性粘液線維肉腫)
化学療法および放射線療法を施行。細胞密度が減少し、大型・多形性の著しい細胞が出現し、核濃縮や核に空胞変性の目立つ non-viable とみなされる細胞(矢印)も混在している。

や線維黄色腫性変化をみるが、化学療法による腫瘍細胞死は主に融解壊死とされ、アポトーシスやネクローシスなどの細胞死で説明されている。術前治療による組織変化は肺癌や乳癌などとも概ね類似しており、遺残する腫瘍細胞の変化と、腫瘍消失に伴う間質の変化としてとらえられる。腫瘍細胞には細胞密度の減少・消失や、遺残細胞に様々な変化を示す。核の濃縮・空胞化・膨化・崩壊・巨核化・多形化、細胞質の膨化・空胞化・好酸性化・顆粒状～滴状変化・融解のほか、粗造なクロマチンと腫大した核を有する奇怪な大型異型細胞・多核多形細胞の出現も認められる(図1)。腫瘍細胞の消失による背景の間質の変化としては、融解壊死巣周囲の線維黄色腫性変化、リンパ球・組織球浸潤を伴う線維・血管性組織の増生などを示す(図2a)。また、粘液を産生する脂肪肉腫や悪性線維性組織球腫/粘液線維肉腫では線維粘液状の基質を残したまま、腫瘍細胞の減少・消失をみる(図2b)。基質の多い腫瘍では、腫瘍細胞が消失してもサイズの縮小が乏しくなる。

評価にあたっては、細胞密度減少の程度や変性の程度、変性細胞が“viable”か、“non-viable”であるかが問題となる。一般的に、核の著しい膨化・濃縮、崩壊・断片化、融解、不染などが non-viable cell とされ、核所見が重視されている(図1)。一方、核・細胞質の膨化・空胞変性、多核化、巨核化といった所見は不可逆性である証明のないことから、viable cell とみなされている⁸⁾。全くの壊死でなくとも、上記のような細胞・間質や基質の変化を伴って種々の程度に細胞密度の減少する像、viable かど

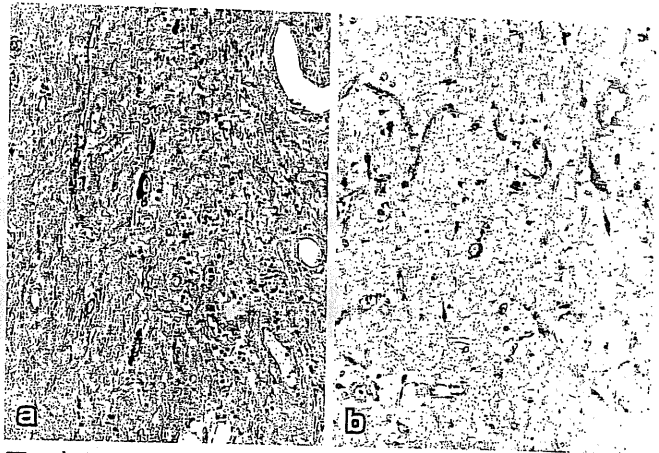


図2 | 術前治療後の組織学的変化(粘液線維肉腫, 図1と同症例)

細胞密度が著しく減少し、疎な線維・血管性組織に置換されたり(a)、fibromyxoid な背景をそのままに細胞が消失している(b)。

うかの判断の困難な少数の腫瘍細胞が散在性に広く残存している像も目立ち、判断に苦慮することも少なくない⁹⁾。

小円形細胞肉腫の場合、腫瘍細胞が融解・消失して線維性組織に置換されるか、比較的生き生きとした腫瘍細胞が残っているかで、細胞密度が低くなくても、前述のような核の変性・変化には乏しい傾向がある(図3, 4)。

3) 組織学的効果判定基準

本邦では悪性軟部腫瘍取扱い規約に基準が定められていないので、参考となる基準について述べる。

悪性骨腫瘍取扱い規約には組織学的効果判定基準(JOA基準)が設定されている。判定は最大断面全体を標本にして評価するのを基本として、壊死範囲ではなく、viable な腫瘍細胞の残存量を評価し、その範囲によって4段階に分類されている。腫瘍細胞の変性の有無や壊死の程度について記載することになってはいるが、細胞密度の減少に対する評価の目安や、変性した腫瘍細胞の生死の判断基準がなく、判定医によって大きな較差が見受けられる⁹⁾。

また、現在進められている日本臨床腫瘍研究グループ(Japan Clinical Oncology Group: JCOG)の骨軟部腫瘍グループによる骨肉腫補助化学療法の臨床試験では組織学的効果判定が問題となり、新たな基準(JCOG基準, 表1)が提案されている⁸⁾。基本的にはJOA基準に準じているが、変性細胞の判定や細胞密度の減少の評価についても十分考慮されており、判定医による較差が少ないものと考えられる^{8,9)}。

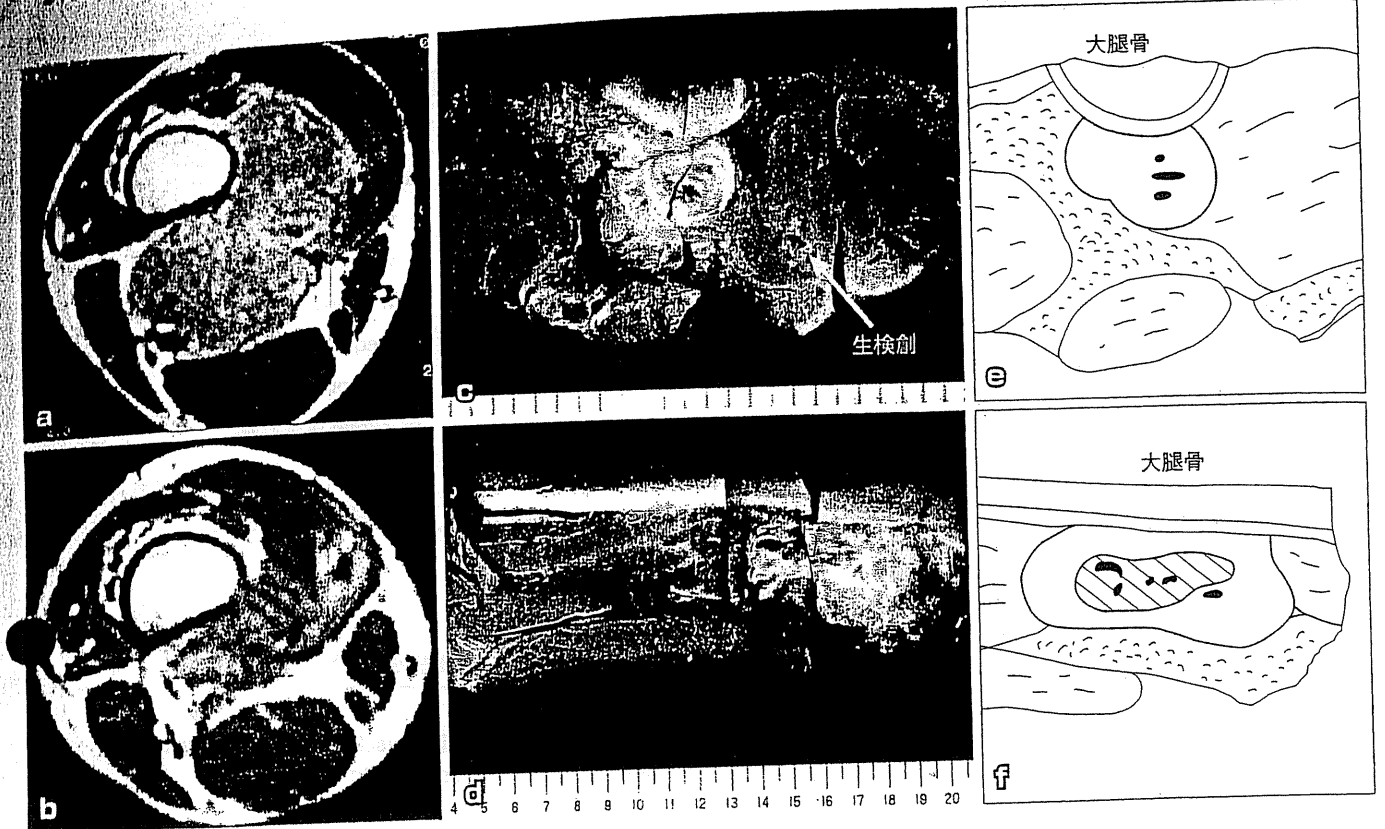


図3 | 術前化学療法が行われた Ewing 肉腫/PNET

MRI (T1-Gd) では治療前 (a) に比べ、治療後 (b) は著しく縮小し、残存腫瘍の造影効果も減少している。大腿骨後方部分を含め広範切除されている (c: 水平断, d: 矢状断)。組織学的には、巣状に密な腫瘍組織が残存 (赤点) するほか、密度が著しく減少して散在性に残る領域 (赤斜線) も認められた。元のサイズと比較すると、ほとんど大部分が消失したものと考えられるが、サイズの縮小は組織学的効果判定で評価に加えられていない。JCOG 基準では Grade 3、肺癌取扱い規約の基準に当てはめると Ef 2 に相当するが、ごく小範囲の残存と付記されるべき変化と考えられる。

表1 | JCOG 骨軟部腫瘍グループ組織学的効果判定基準案 (抜粋)⁸⁾

組織学的効果判定基準: 対象の標本について viable cell の残存割合で判定する。

Grade 1 と Grade 2 を standard responder, Grade 3 と Grade 4 を good responder とする。

- Grade 1: viable tumor cell が 50% を超えるもの
- Grade 2: viable tumor cell が 10% を超え 50% 以下
- Grade 3: viable tumor cell が 10% 以下
- Grade 4: viable tumor cell を全く認めない

注1: 核に核濃縮 (pyknosis), 核崩壊 (karyorrhexis), 核融解 (karyolysis) のうちいずれかの所見を認める場合, non-viable cell と判定する。細胞質が好酸性, 空胞変性, 核の膨化は, viable とみなす。

注2: 化学療法により cellularity が極端に減少した病巣で, patchy に viable cell がある場合は, 病理医の判断によって 1/10, 1/20 などに適宜換算する。

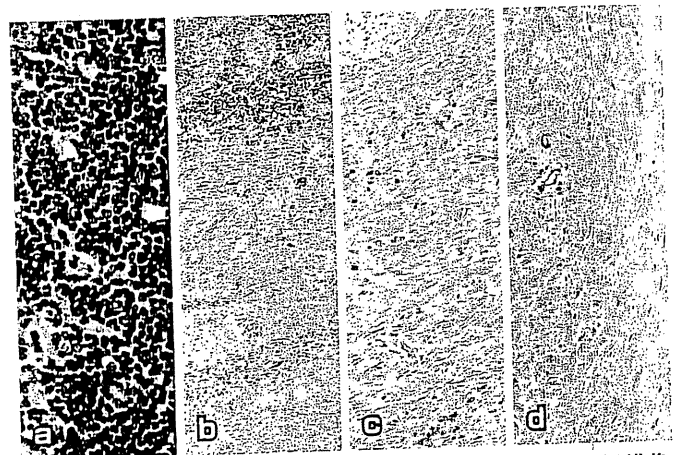


図4 | 術前化学療法が行われた Ewing 肉腫/PNET の組織像生検 (a) と同様の像はごく一部にみられるのみで, 大部分は癒痕様の線維性組織に置換 (b~d) され, 種々の密度で残存 (b, c) するか, 全く消失 (d) している。

日本癌治療学会が奨める組織学的治療効果判定は、腫瘍の変性・消失と遺残の量的割合により5段階に区分されており、肺癌や胃癌など幾つかの取扱い規約で用いられている。骨腫瘍とは異なり元のサ

イズからの評価ではなく、縮小したサイズでの割合を判定することになるので、 $1/3 \cdot 2/3$ の Grade 分類が妥当かもしれない。画像評価と合わせ、軟部悪性腫瘍でも基準の検討、設定が必要である。

表 2 | 切除縁評価分類^{2,10)}

Margin	Definition	Procedure
Curative	>5cm or equivalent	named by the least margin curative procedure
Adequate wide	4-2cm or equivalent	adequate procedure
wide-4	4cm or equivalent	w-4 procedure
wide-3	3cm or equivalent	w-3 procedure
wide-2	2cm or equivalent	w-2 procedure
Inadequate wide	1cm or equivalent	inadequate wide procedure
wide-1		w-1 procedure
Marginal	peri-lesional discolored are op. scar, hemorrhage	marginal procedure
Intralesional	through lesion	intralesional procedure

4) 術前療法の病理学的検索のポイントと問題点

未治療例でも線維・血管性組織の増生を伴う場合があるが、骨腫瘍の組織学的変化と比較すると軟部も同様で、術前治療後はかなりの領域が、腫瘍消失後に線維性組織に置換されたとみなされる。

腫瘍の縮小率について、組織判定の上で評価の対象とするのは困難であり、他臓器の判定基準も同様に術前治療後のサイズで評価を行っている。したがって、治療効果のあった症例が過少評価されてしまう場合も見受けられる。逆に、粘液基質や線維性間質の豊富な腫瘍では腫瘍細胞が消失しても縮小が目立たず、画像評価と相関の乏しい症例も存在する。

表 3 | バリアの種類と換算距離^{2,10)}

# Thin barrier : 2cm	thin membranes (thin muscle fascia, perineurium, vessel sheath, mature periosteum etc) child epiphysis etc.
# Thick barrier : 3cm	thick membranes (tensor fascia, joint capsule, pleura, infant periosteum etc)
# Joint cartilage : 5cm	
# The margin outside the barrier : 5cm	When some normal tissue lies between the barrier and tumor
# When the barrier is adherent to the lesion, subtract 1cm from original score of the barrier	

2. 切除縁評価

1) 臨床的背景と評価法

悪性腫瘍の広範囲切除は、一般に腫瘍を周囲の健全組織とともに一塊として切除することを意味するが、切除範囲が様々であり、必ずしも局所根治性と一致するものではない。根治性の高い切除術として、骨・軟部肉腫切除縁評価法²⁾に基づいた curative wide resection や、身体を幾つかのコンパートメントに分けて、腫瘍の存在するコンパートメントの外で切除する radical local resection などがある。後者は実際の切除縁と定義の間に補足や矛盾点があり、本邦では主に前者の概念が普及している。

切除の範囲・距離・介在組織をどのように判断し、根治性を確認するのが切除縁評価法(表 2, 3)であり、その概念は切除法、切除範囲の決定に不可欠である³⁾。腫瘍辺縁の反応層から切除縁までの距

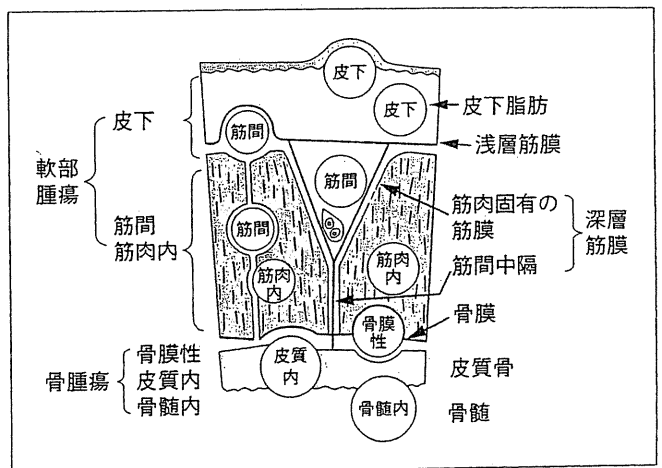


図 5 | 筋膜、骨膜と腫瘍との関係
腫瘍局在により種々のバリアが切除縁評価に関係してくる²⁾。

離により、その手術の根治性を評価するもので、腫瘍と切除縁との間に腫瘍伸展に抵抗性を示す筋膜などの組織(バリア, 表 3, 図 5)が介在する場合は、一

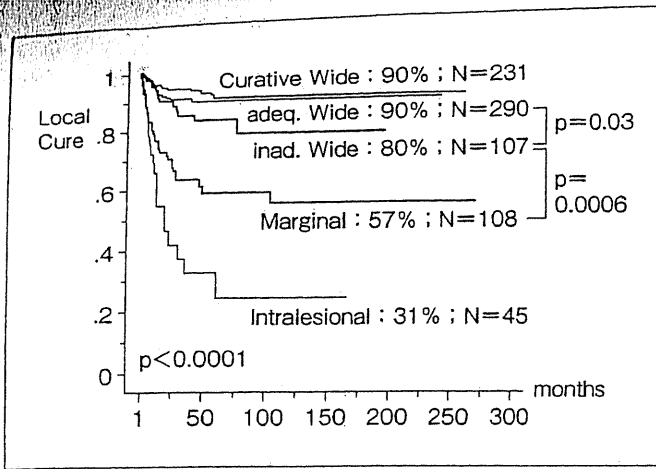


図6 | 高悪性肉腫における切除縁と局所再発率
wide-2~4のadequate wideはcurative wideと再発率に違いはなく、wide-1を境に有意差が認められる。

● 定の距離にあてはめて、切除縁との距離を算定している。切除縁は、治癒的切除縁 curative margin, 広範囲切除縁 wide margin, 腫瘍辺縁部切除縁 marginal margin および腫瘍内切除縁 intralesional margin の4段階に分類されている。手術の根治性は、実際に達成された切除縁のうち最も根治性の低い切除縁で評価される。すなわち、ほとんど大部分が curative margin で切除されていても、1カ所が marginal margin であれば、その手術の根治性は marginal procedure と判断される。切除縁評価と局所再発率は有意に相関している(図6)。高悪性肉腫の切除縁(距離)と再発率の検討により、wide marginのうち、wide-1 procedure と wide-2 以上の間で有意な差があることより、wide-1 を inadequate wide procedure, wide-2 以上を adequate wide procedure と表している(表2)。

また、軟部肉腫の組織学的悪性度と局所侵襲性は異なっており、転移性と浸潤性は別の問題であり、局所浸潤性の強い腫瘍ほど切除縁評価が重要である。現在の切除縁の設定は、滑膜肉腫や脂肪肉腫など比較的境界の明瞭な発育を示す肉腫では adequate wide の切除法で局所コントロールが可能とされている。しかし、局所浸潤性を示す腫瘍の再発を防ぐためには、切除範囲が広いほどよいが、少なくとも curative procedure を目指した切除法が望ましいとされている^{10,11)}。

2) 切除検体切り出しの注意点

他臓器の腫瘍と同様、切除縁を十分に評価できる方向での切り出しが必要である。基本的には切除縁

の最も短いと思われる部分を含め、長軸・短軸方向の最大断面で切り出しを行うが、切除検体の解剖学的位置関係・方向性、臨床的問題となる断端・浸潤性発育の有無、画像(CT・MRI)との関連づけ(図7)や実際の手術所見など、臨床医と十分に連携をとった上で行わないと評価を誤ってしまうことがある。

3) 評価法とその実際

切除材料を肉眼的に観察し、腫瘍および辺縁の反応層からどの程度離れているか、距離によりその手術の根治性を評価する(表2, 図7, 8)。その際、腫瘍の進展に対して抵抗性を示す組織をバリアとしてとらえ、距離に換算して計測する(表3)。腫瘍の局在により、様々な筋膜がバリアとなりうる(図5)ので、解剖学的ないし肉眼的に正確に換算できなくても記録に残しておく必要がある¹²⁾。組織学的に確認し、浸潤性発育やバリアの有無などにより肉眼評価と異なった場合には、組織学的評価にて訂正する(図9)。なお、反応層とは全ての腫瘍に存在するわけではなく、腫瘍の膜様組織とその周囲の出血巣、変性した筋肉、灰白色の瘢痕状あるいは浮腫状組織などの肉眼的変色部などが相当する²⁾。

a) 切除縁の名称と定義^{1,2)}(表2)

①治癒的切除縁 curative margin: 腫瘍の反応層からの距離が5cm以上もしくはそれ以上に相当する厚さの組織外を通過する切除縁である。ほとんど局所再発が認められない。

②広範囲切除縁 wide margin: ①に満たないが、腫瘍の反応層外側にある切除縁である。局所根治性は腫瘍との距離・腫瘍の悪性度により様々である。

③腫瘍辺縁部切除縁 marginal margin: 腫瘍周囲の反応層を通過する切除縁。反応層が存在しない場合は腫瘍境界部のすぐ外側を通過する切除縁をいう。局所再発が高率に生じるが、境界の明瞭な低悪性度肉腫では再発しないこともある。

④腫瘍内切除縁 intralesional margin: 切除縁が肉眼的に知りうる腫瘍実質内を通過する切除縁である。局所再発は避けられない。

b) 評価基準^{1,2)}(表3, 図10)

①筋膜、関節包、腱、腱鞘、retinaculum、血管外膜、神経上膜など緻密結合織性膜様組織や軟骨組織を腫瘍伸展に抵抗性を有するバリアとみなす。さらにこれらを薄いバリアと厚いバリアに分け、バリアが介在する切除縁評価はそれぞれを2cmおよび3cmの距離に換算して取扱う。バリアの腫瘍抵抗

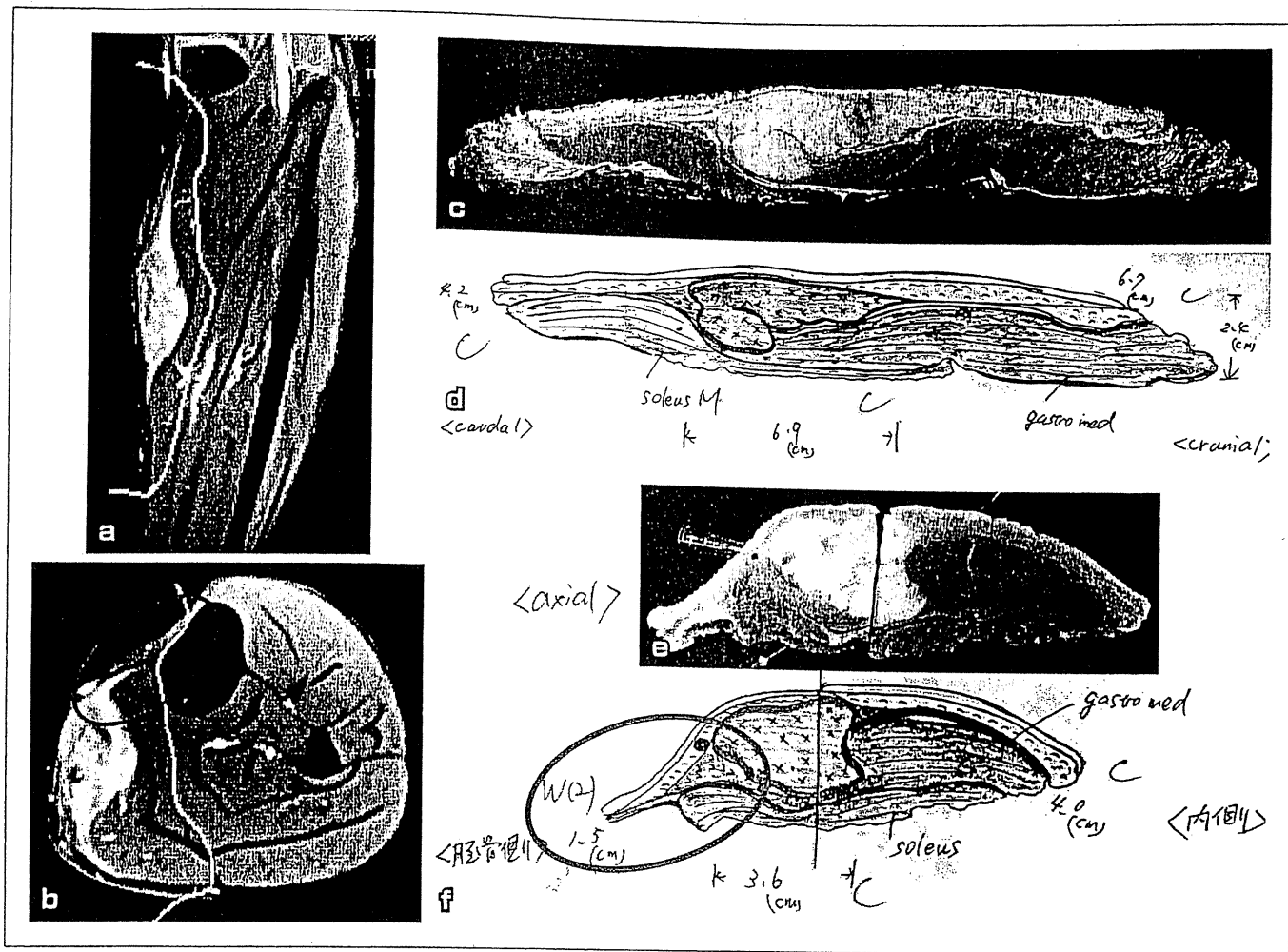


図7 | 下腿の筋肉内から皮下に及ぶ粘液線維肉腫のMRI像と肉眼評価の実際

MRIでは前額断(a), 水平断(b)で筋膜に沿った浸潤が疑われるため, 通常の高悪性肉腫よりも広い切除縁(黄色線)を設定した。画像との対比ができるように切り出しを行い, 肉眼所見を詳細に記載。肉眼評価では前額断(c, d), 水平断(e, f, MRI像とは鏡面)ともに大部分が curative margin (手書きのC)と判断された。ピンク円部の脛骨前方部分のみは反応層が広く, wide-2 (手書きのW(2))と評価されたが, 問題の残る所見であった。

性の値は実証的なものではないが, 相当する厚さの組織と等価の抵抗性を有するとみなして換算すると, ②の例外を除き, バリアがない場合の評価と合わせて理解しやすく, 局所再発率との相関性が妥当性を裏付けている。

②評価の例外として, 反応層との間に正常の組織を介してバリアがあるとき, その外側は正常組織の厚さにかかわらず curative とみなされる(図 10b-1)。

③バリアに一定の腫瘍抵抗性があると評価できるのは腫瘍との間に可動性が保持されている場合で, 腫瘍と可動性なく癒着するバリアについては, ④の例外を除き, 原則としてその厚さに関係なくバリアと評価せず, 反応層最外側部として扱う。

④腫瘍と可動性なく癒着していても, バリアを腫瘍の反対側から観察できる場合, バリア表面が正常であれば腫瘍抵抗性が残っているとみなし, 適宜

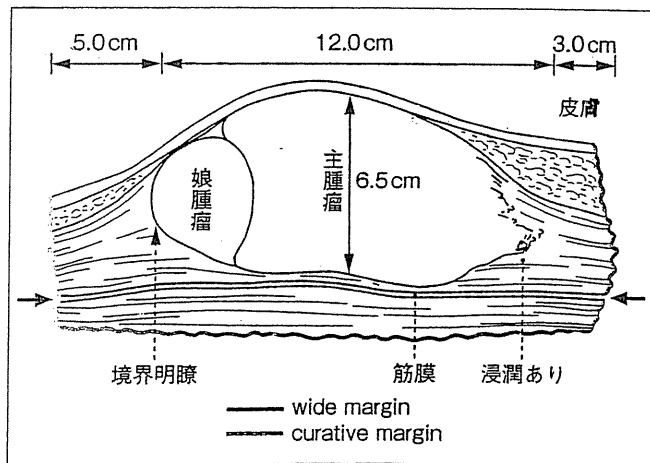
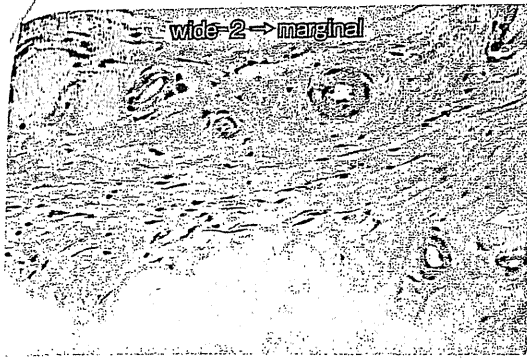
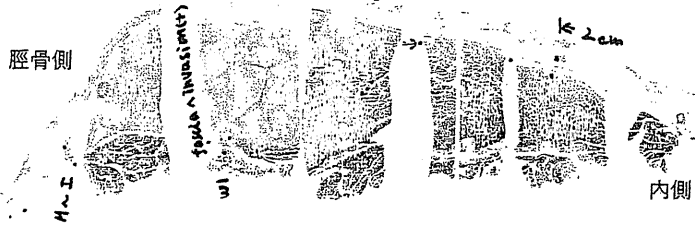


図8 | 手術検体の肉眼的切除縁評価¹⁾

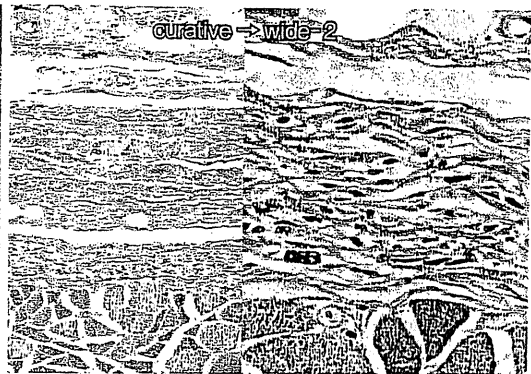
腫瘍と切除線間にバリアの介在しない縦方向の切除縁は, 腫瘍との境界部もしくは反応層外側からの距離を計測し, curative margin および wide margin (wide-3) と評価される。深部側はバリア(2枚の筋膜)が介在しており, 筋層と合わせ十分に curative である。反応層がバリアに達していなければ, 筋間(赤矢印)で切離されたとしても curative と評価される。



a. 浅層筋膜に沿った浸潤



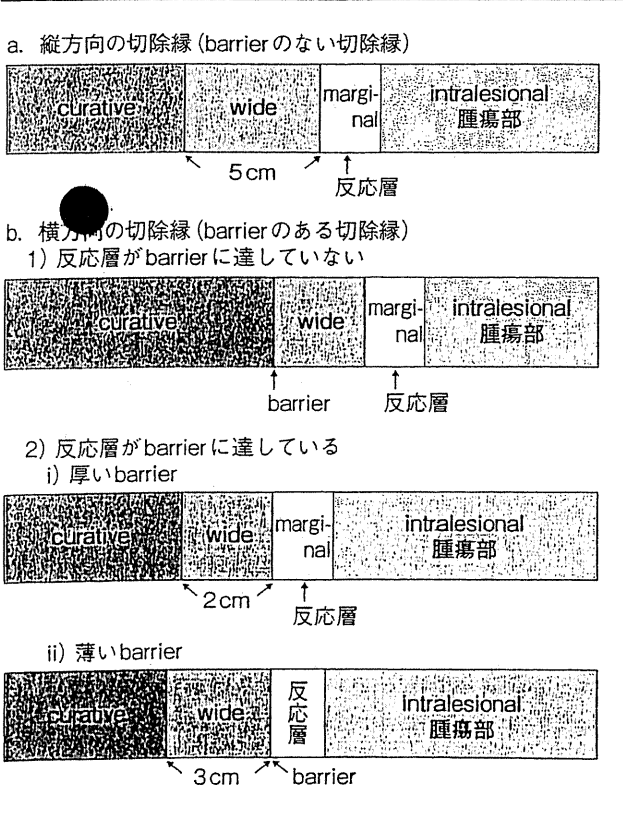
b. 固有筋膜を越える浸潤



c. 固有筋膜に沿った浸潤

9 | 粘液線維肉腫水平断の肉眼評価 (図 11e, f) と組織像の対比

方の脛骨部分はバリアと考えられた浅層筋膜に浸潤が伸びており, marginal の評価となった (a). 基底側は隣接筋の一部をめて切除されているが, 筋膜~筋間への浸潤があり, 評価は wide-1~2 に修正 (b). 内側後方は筋線維束間や固有筋膜にたつ腫瘍浸潤があり, wide-2 と評価が訂正された (c).



1~2cm を減じて換算する。

⑤バリアを含まない組織において, 反応層からの組織の厚さを評価するにあたっては, 厳密に数量的厚さでいう必要はなく, 数 mm~1cm くらいの厚さを 1cm 単位で切り上げてよい。

c) 初回手術検体における肉眼的切除縁評価の実際 (図 8)

腫瘍と切除縁の間にバリアの介在しない場合の切除縁は, 腫瘍との境界部もしくは反応層外側からの距離を計測する (図 10a)。

腫瘍の最先端部と切除縁間にバリアが介在して反応層がバリアに達していない場合 (図 10b-1), 腫瘍反応層の最外側とバリア間に肉眼的にそれとわかる健全な組織が存在すれば, その健全組織の厚さにかかわらず, たとえ数 mm であってもバリア外で切除された切除縁は, 全ての curative と評価される。一方, 反応層がバリアに達している場合 (図 10b-2), 腫瘍とバリア間に可動性があれば, 腫瘍は反応層を介しバリアに接すると考え, 厚いバリアがあるときにはその 2cm 以上外側に切除縁があるもの,

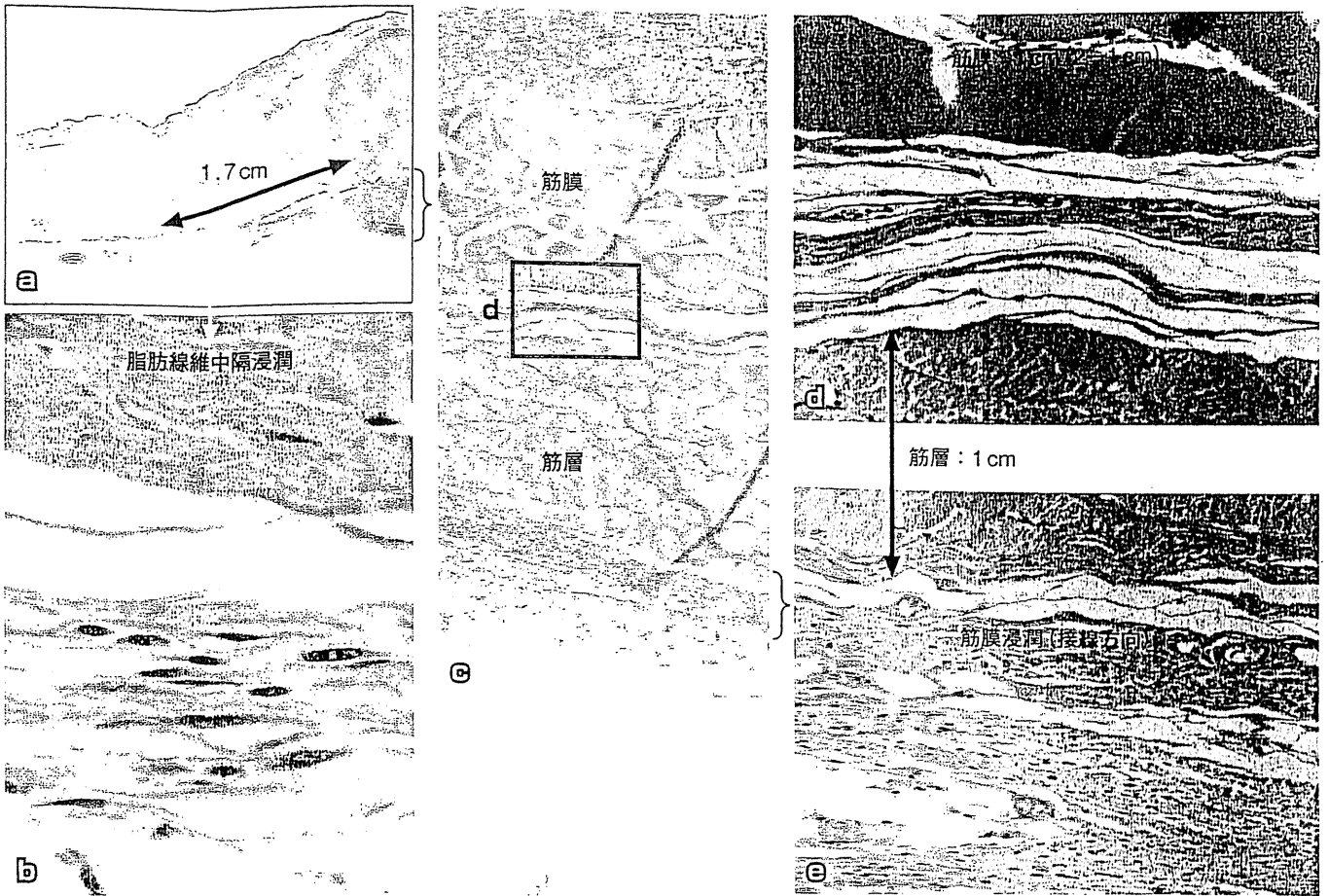


図 11 | 皮下に発生した粘液線維肉腫

肉眼的に確認できる腫瘍 (a) から、皮下脂肪の線維中隔に沿った浸潤 (b) が認められる。腫瘍直下は筋膜 1cm (腫瘍と接しているのも -1cm) と筋肉で wide-2 以上の切除縁確保を計画したが、筋膜に沿ってバリアを越える浸潤が認められる。異型は目立たないが、結節部分の腫瘍細胞との連続性から浸潤と判断される。

薄いバリアの場合は 3cm 以上外側の切除縁が curative とみなされる。

d) その他

上記を基本として、二次性出血を伴う腫瘍の切除縁評価、追加広範切除例の切除縁評価、再発腫瘍やスキップ転移・静脈浸潤のいずれかを認める例の切除縁評価、誤って切除線が腫瘍側に切りこんだ場合の切除縁評価などが詳細に取り決められている。

4) 浸潤型軟部肉腫について

大部分の軟部腫瘍は膨張性、比較的境界明瞭な発育を示すが、いわゆる悪性線維性組織球腫/粘液線維肉腫の一部には悪性度にかかわらず、著しく浸潤性の発育を示す症例がある。

高悪性軟部肉腫の切除縁設定に問題となる距離を考慮して、肉眼や画像で明らかな腫瘍境界から組織学的な腫瘍浸潤が 1.5cm 以上に及ぶものを浸潤型肉腫とすると、悪性線維性組織球腫/粘液線維肉腫において約 35% 程度認められる。腫瘍浸潤は、皮

下では脂肪の線維性中隔や浅層筋膜に沿って、筋肉内や筋間では固有筋膜や筋線維束間の線維性組織に沿った発育を示す傾向が認められる (図 11, 12)。浸潤細胞は、紡錘形で概ね多形性に乏しく、しばしば反応性の線維芽細胞との区別が問題となり、腫瘍との連続性を丹念にみる必要がある。腫瘍伸展は、筋線維やバリアに沿う縦方向・水平方向への発育が多いが、バリアを貫通したり、筋線維間を横方向への発育なども認められ、両者において最大 4cm 以上 (バリアは距離に換算) の浸潤を示すことがある¹³⁾。

通常、肉眼的切除縁評価と組織学的評価は一致することが多いが、腫瘍によって異なることもしばしば経験され (図 7, 9)、追加治療の要否や、再発・予後の改善のために、組織学的に腫瘍の発育態度、切除縁を正確に確認・評価することが重要である。

おわりに

骨・軟部腫瘍は上皮性腫瘍に比べ著しく数が少な

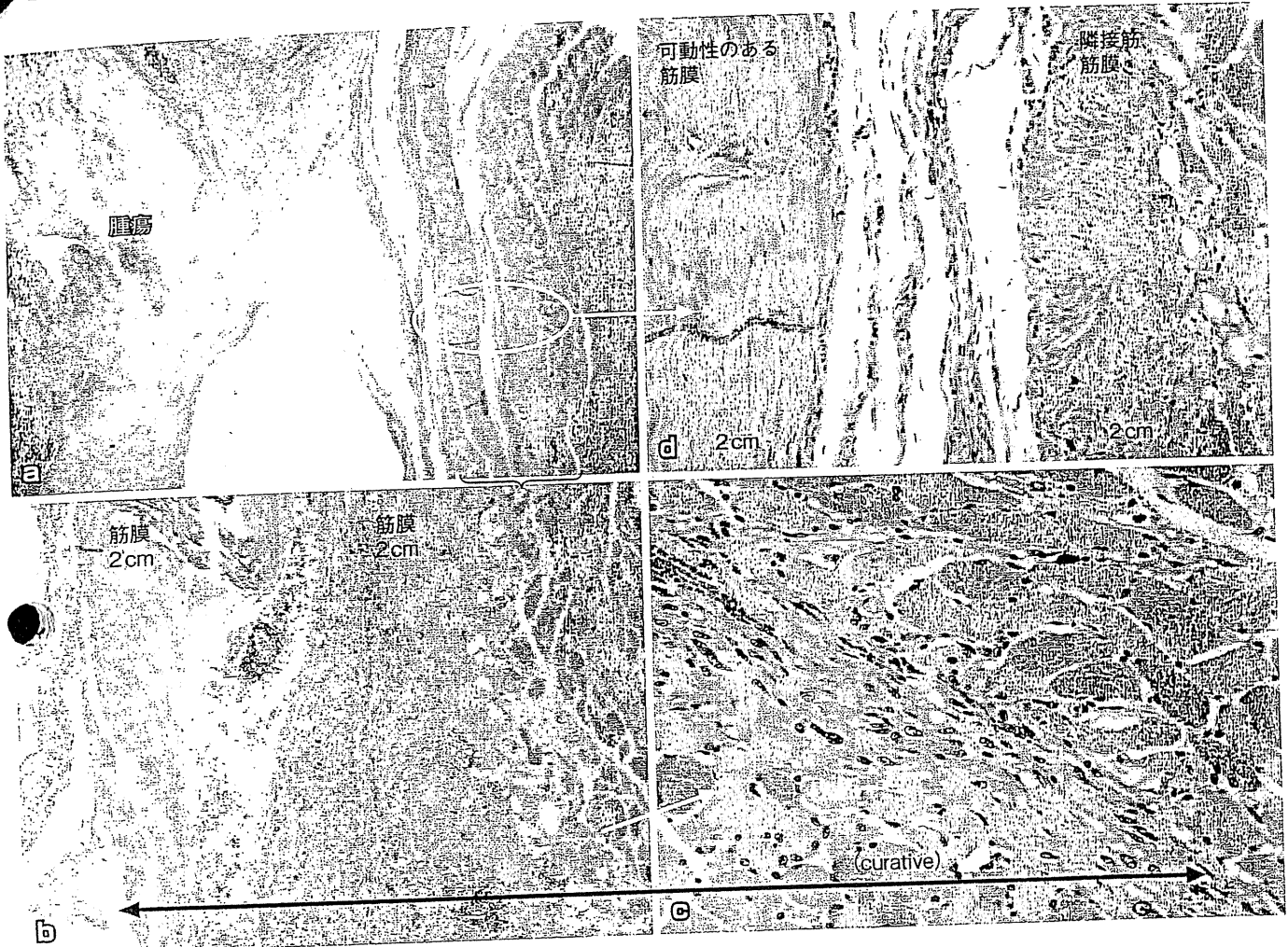


図12 筋肉内に発生した悪性線維性組織球腫

腫瘍の発生した筋肉の筋膜には可動性があり、隣接筋の筋膜と筋層が切除(a)されており、肉眼的には curative margin と判断されたが、筋膜を貫通(b)して、筋間(d)から隣接筋内(c)までの浸潤を示している。浸潤型肉腫の場合、バリアとしての機能を十分に果たしていない。

いうえに、組織型が多く、いまだに分類の変遷があるため、診断や治療に難渋する症例が少なくない。したがって、1例1例を大切に、正確に評価した症例を集めることにより、組織診断のみならず、画像診断、術前治療や切除縁設定など治療法の確立ひいては予後の改善につながるものと考えられる。

(蛭田啓之, 松本誠一, 土谷一晃)

文献

- 1) 日本整形外科学会骨・軟部腫瘍委員会編：悪性軟部腫瘍取扱い規約。第2版。金原出版。1989
- 2) 日本整形外科学会骨・軟部腫瘍委員会編：骨・軟部肉腫切除縁評価法。金原出版。1989
- 3) 松本誠一, 川口智義, 真鍋 淳 他：骨軟部肉腫の手術療法。癌と化学療法 31 : 1314-1318, 2004
- 4) Ueda T, Naka N, Araki N et al : Validation of radiographic response evaluation criteria of preoperative chemotherapy for bone and soft tissue sarcomas : Japanese Orthopaedic Association Committee on Musculoskeletal Tumors Cooperative Study. J Orthop Sci 13 : 304-312, 2008
- 5) Spurrell EL, Fisher C, Thomas JM et al : Prognostic factors in advanced synovial sarcoma : an analysis of 104 patients treated at the Royal Marsden Hospital. Ann Oncol 16 : 437-444, 2005
- 6) 五嶋孝博, 大隈和威, 小倉浩一 他：骨軟部肉腫における組織型からみた化学療法の適応。癌と化学療法 36 : 199-203, 2009
- 7) 遠藤 誠：骨・軟部腫瘍, Ⅲ. 脂肪肉腫に対する薬物療法。癌と化学療法 37 : 434-438, 2010
- 8) 平賀博明, 小田義直, 長谷川匡 他(日本臨床腫瘍研究グループ骨軟部腫瘍グループ)：私信
- 9) 蛭田啓之, 町並陸生, 神田浩明 他：骨肉腫の術前化学療法組織学的効果判定と問題点。日整会誌 84. 1220-1125, 2010
- 10) The 22th forum of the surgical society for musculoskeletal sarcoma, 抄録 : 3-4, 2010
- 11) Kawaguchi N, Ahmed AR, Matsumoto S et al : The concept of curative margin in surgery for bone and soft tissue sarcoma. Clin Orthop 419 : 165-172, 2004
- 12) 三橋智子, 長谷川匡：外科病理マニュアル, 22 軟部組織。病理と臨床(臨増) 26 : 255-260, 2008
- 13) 蛭田啓之, 町並陸生, 岡本純佳 他：浸潤性発育を示す低悪性軟部肉腫の組織学的検討。高悪性例との対比および切除縁との関連について。日整会誌 81 : S722, 2007

Flow Cytometric Sorting of Neuronal and Glial Nuclei From Central Nervous System Tissue

SEIJI OKADA,^{1,2*} HIROKAZU SAIWAI,^{1,2} HIROMI KUMAMARU,^{1,2} KENSUKE KUBOTA,^{1,2} AKIHITO HARADA,¹ MASAHIRO YAMAGUCHI,³ YUKIHIRO IWAMOTO,² AND YASUYUKI OHKAWA^{1*}

¹Superstar Program Stem Cell Unit, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka, Japan

²Department of Orthopedic Surgery, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka, Japan

³Department of Physiology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

Due to the complex cellular heterogeneity of the central nervous system (CNS), it is relatively difficult to reliably obtain molecular descriptions with cell-type specificity. In particular, comparative analysis of epigenetic regulation or molecular profiles is hampered by the lack of adequate methodology for selective purification of defined cell populations from CNS tissue. Here, we developed a direct purification strategy of neural nuclei from CNS tissue based on fluorescence-activated cell sorting (FACS). We successfully fractionated nuclei from complex tissues such as brain, spinal cord, liver, kidney, and skeletal muscle extruded mechanically or chemically, and fractionated nuclei were structurally maintained and contained nucleoproteins and nuclear DNA/RNA. We collected sufficient numbers of nuclei from neurons and oligodendrocytes using FACS with immunolabeling for nucleoproteins or from genetically labeled transgenic mice. In addition, the use of Fab fragments isolated from papain antibody digests, which effectively enriched the specialized cell populations, significantly enhanced the immunolabeling efficacy. This methodology can be applied to a wide variety of heterogeneous tissues and is crucial for understanding the cell-specific information about chromatin dynamics, nucleoproteins, protein–DNA/RNA interactions, and transcriptomes retained in the nucleus, such as non-coding RNAs.

J. Cell. Physiol. 226: 552–558, 2011. © 2010 Wiley-Liss, Inc.

The central nervous system (CNS), that is, brain and spinal cord, comprises complex cellular aggregates whose functional properties are dictated by the integration of multiple specialized neurons, astrocytes, and oligodendrocytes. Due to their complex cellular heterogeneity, a molecular description of each neural subtype is relatively difficult. Comparative analysis of gene expression or molecular profiles has relied upon conventional histopathologic examinations, including *in situ* hybridization, which provides only a small set of data with limited detection sensitivity and is not applicable to high throughput analysis. Thus, there have been numerous attempts to develop a method of selective analysis of defined cell populations in CNS tissue (Kamme et al., 2003; Tietjen et al., 2003; Lobo et al., 2006; Doyle et al., 2008; Heiman et al., 2008; Sanz et al., 2009). Currently, fluorescence-activated cell sorting (FACS) is the most commonly used method of isolating specific cell populations from a heterogeneous mixture and is indispensable for hematology and immunology research. In the field of neurobiology, however, this method has not been widely adopted for several reasons. First, the intertwined nature and tight cell–cell adhesions of neural cells make it difficult to separate cells without causing cellular damage. Second, even if the cells are successfully isolated, the chances of the neuronal cells surviving is quite low, which is a major obstacle for the FACS procedure. Third, conventional immunohistochemistry can be used to identify neural phenotypes with a large variety of cytoskeletal markers, such as neurofilaments, whereas there is a very limited number of adequate “cell surface antigens” that are useful for neural sorting.

Here, we developed a direct FACS purification strategy for isolating neural nuclei from CNS tissues. The advantages of this technique focus on analyzing the active state of transcription; therefore, this technique provides cell-specific information about chromatin dynamics, nucleoproteins, protein–DNA/

RNA interactions, and transcriptomes retained in the nucleus, such as non-coding RNAs. The goal of this research was to establish a convenient protocol for extracting, immunolabeling, and fluorescence-activated sorting of nuclei. We successfully extracted neural nuclei from CNS tissue by mechanical stress and enzymatic digestion with the inhibition of actin polymerization using cytochalasin B, which induces nuclear extrusion, and collected a sufficient number of nuclei from neurons and oligodendrocytes that still contained nucleoproteins. This protocol does not require ultracentrifugation, which is typically required for nuclear

Seiji Okada and Hirokazu Saiwai contributed equally to this work.

Contract grant sponsor: Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan (Special Coordination Funds for Promoting Science and Technology for Kyushu University).

Contract grant sponsor: General Insurance Association of Japan (Research Foundations).

Contract grant sponsor: Brain Science Foundation.

Contract grant sponsor: Kaibara Morikazu Medical Science Promotion Foundation.

Contract grant sponsor: Japan Orthopaedic and Traumatology Foundation.

*Correspondence to: Seiji Okada and Yasuyuki Ohkawa, Department of Research Superstar Program Stem Cell Unit, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan.

E-mail: seokada@ortho.med.kyushu-u.ac.jp,
yohkawa@ssp.med.kyushu-u.ac.jp

Received 9 June 2010; Accepted 27 July 2010

Published online in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com), 17 August 2010.
DOI: 10.1002/jcp.22365

isolation (Lovtrup-Rein and McEwen, 1966; Thompson, 1973; Pearson et al., 1984; Spalding et al., 2005; Jiang et al., 2008; Matevosian and Akbarian, 2008). The morphology and chromatin structures remained intact in the isolated nuclei: both euchromatin and heterochromatin were clearly visualized. We confirmed that immunolabeling nucleoproteins was effective for cell sorting by flow cytometry. In addition, fragment antigen-binding (Fab fragments) isolated from papain antibody digests significantly enriched the specialized cell populations, suggested that the nuclear pore complex remained intact and antibody size is important for nucleolabeling.

This methodology is broadly applicable to the analysis of various heterogeneous tissues such as kidney, liver, and skeletal muscle, and will be crucial toward understanding cellular function in health and disease conditions in several organs.

Materials and Methods

Nuclear extraction from adult mouse tissues

Adult 8- to 10-week-old female C57BL/6J mice were used in this study. The Nestin-enhanced green fluorescent protein (EGFP) transgenic mice were described previously (Yamaguchi et al., 2000). All surgical procedures and experimental manipulations were approved by the Ethics Committee for Animal Experiments in the Faculty of Medicine, Kyushu University. Experiments were conducted under the control of the Guidelines for Animal Experimentation. All procedures were performed at 0–4°C. Mice were anesthetized with pentobarbital (75 mg/kg i.p.) and killed by decapitation. The brain, spinal cord, liver, kidney, and lower hindlimb skeletal muscles were immediately removed, rinsed in ice-cold 0.9% NaCl, the meninges removed, and the tissue minced to approximately 1 mm³ pieces. Each minced tissue was homogenized with a Polytron homogenizer PT 10–35 GT (Kinematica, Lucerne, Switzerland) for 10 sec at 15,000 rpm in 500 ml of cold nuclear extraction buffer (5 mM PIPES, 85 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 5% sucrose, 0.5% NP-40, 40 μM cytochalasin B, and protease inhibitor cocktail; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan). For skeletal muscle, the tissue was homogenized for 20 sec to extract enough nuclei from the muscle fibers. The extracted nucleus solution was filtered with a 40-μm cell strainer (BD Bioscience) and centrifuged at 3,000 rpm for 5 min at 4°C. The pellet was resuspended in nuclear buffer (5 mM PIPES, 85 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 5% sucrose, and protease inhibitor cocktail; Nacalai Tesque).

Flow cytometry

The extracted nucleus solution was incubated with 10% normal goat serum for 30 min at 4°C to decrease non-specific antibody binding, then incubated with primary antibody at 4°C for 20 min. The secondary antibody and Hoechst 33342 or propidium iodide (PI) was added to the samples and incubated for 20 min. The samples were then centrifuged at 3,000 rpm for 10 min. The pellets were washed twice in nuclear buffer. All of the samples were suspended in 500 μl of nuclear buffer and analyzed using FACSAria II flow cytometer with FACSDiva software or FACScalibur flow cytometer with CellQuest software. For the primary antibody, human anti-Hu antibody (1:200, a gift from H.Okano, Keio University) was used. For the secondary antibody, Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-human IgG (1:100; Invitrogen, Carlsbad, CA) was used.

Quantitative real-time reverse transcription-PCR

We extracted nuclei from spinal cord at the lower thoracic level (4 mm long) and stained them with Hoechst 33342. Using FACSAria II, we selectively isolated Hoechst-positive nuclei and total RNA was extracted from the sorted nuclei using an RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany). RNA extraction was also performed from the same volume of spinal cord tissue. The total number of the extracted nuclei from the 4-mm long thoracic spinal

cord was $41.6 \pm 8.9 \times 10^4$ (N = 3). RNA quality was checked on a Bioanalyzer Nanochip (Agilent). RNA was primed with oligo dT primer and reverse transcribed using PrimeScript reverse transcriptase (TaKaRa, Shiga, Japan). Quantitative real-time reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR) was performed using Mx3005P Real-Time QPCR System (Stratagene, La Jolla, CA). We used primers specific to the housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): forward primer, 5'-GACTTCAACAGCAACTCCCACTCT-3'; reverse primer, 5'-GGTTTCTTACTCCTTGGAGGCCAT-3', and SYBR Premix Ex TaqII (TaKaRa) in 20 μl of reactions. The cycling conditions consisted of initial denaturation at 95°C for 2 min, 45 amplification cycles of denaturation at 95°C for 5 sec, annealing at 58°C for 30 sec, and extension at 72°C for 20 sec.

Immunohistochemistry

Animals were anesthetized and transcardially perfused with normal saline, followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 mol/L PBS. The spinal cord was removed and immersed in the same fixative at 4°C for 24 h. Spinal segments were transferred into 10% sucrose in PBS for 24 h and 30% sucrose in PBS for 24 h and embedded in OCT compound. The embedded tissue was immediately frozen in liquid nitrogen and cut on a cryostat in the axial plane at 14 μm, and mounted onto glass slides. Spinal cord sections were permeabilized with 0.01% Triton X-100 and 10% normal goat serum in PBS, pH 7.4, for 60 min. As primary antibodies, rabbit anti-GFP (1:400, MBL), mouse anti-NeuN (1:500, Chemicon, Temecula, CA), and rabbit anti-olig 2 (1:100 Abcam, Cambridge, UK) were applied to the sections at 4°C overnight. The sections were then incubated with secondary antibodies; Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:200; Invitrogen) or Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-mouse IgG (1:200; Invitrogen). Nuclei were counterstained with Hoechst 33342 (Molecular Probes).

Purification of Fab fragments from a monoclonal antibody

The Fab fragment generation and purification from IgG was performed according to the manufacturer's protocol for the Pierce Fab Micro Preparation Kit (Pierce, Rockford, IL). Briefly, rabbit anti-acetyl histone H3 monoclonal antibody and Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG were digested with papain, a non-specific thiol-endopeptidase, and then the generated Fab fragments were purified using Protein A that binds Fc fragments and undigested IgG. The protein concentration was determined by measuring the absorbance at 280 nm.

Result

Nuclear extraction from the complex tissues

We first used a polytron homogenizer to extract nuclei from adult mouse brain. Using a 7.5-mmØ generator, a sufficient number of nuclei was obtained with 10 sec of homogenization with 15,000 rpm (Fig. 1A). Nuclear release was checked by PI and Hoechst staining, and the debris were removed by filtering with a 40-μm cell strainer and centrifugation. The extracted brain nuclear configuration was morphologically retained and we could clearly distinguish between euchromatin and heterochromatin assemblies with Hoechst staining (Fig. 1B). A longer duration or higher centrifugation speed destroyed the nuclear components, leading to the observation of thready chromatin. This procedure was applicable to other complex tissues, such as spinal cord, skeletal muscle, liver, and kidney (Fig. 1C). The nuclear configuration varied greatly according to the organ: large or small in spinal cord, spindly in skeletal muscle, and round in kidney.

Nuclear sorting and RNA extraction

We next used FACS to further purify the nuclear population. To identify both the cell and nuclear fractions, we

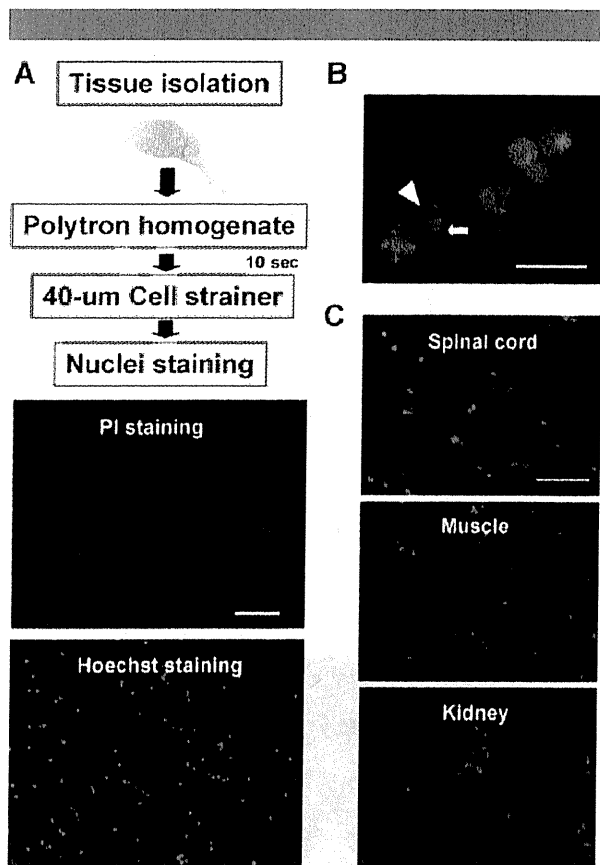


Fig. 1. Extracted nuclei from complex tissues. **A:** Schematic protocol of nucleus extraction and PI/Hoechst staining of images of the extracted nuclei from adult mouse brain. Scale bar, 100 μm . **B:** Magnified view of the extracted nuclei from the brain. Bright spot indicates heterochromatin (arrow) and dark-staining indicates euchromatin assembly (arrowhead). Scale bar, 20 μm . **C:** Extracted nuclei from spinal cord, skeletal muscle, and kidney of adult mice. Scale bar, 50 μm .

simultaneously applied FACS to both the whole cells from the skeletal muscle cell line C2C12 and to their nuclei, which were extracted by our method. C2C12 cells are a very good control because they have a larger cytoplasmic region that facilitates nuclear fractionation. A dot plot of the data showed two distinct populations upon specific light scattering by flow cytometric analysis. In addition, these two populations could be sharply divided into DAPI highly positive (DAPI^{high}) and DAPI negative (DAPI^{neg}) staining populations (Fig. 2A). The DAPI^{high} populations were confirmed to be the extracted nuclei based on immunocytochemistry (Fig. 2B). These sorted nuclei were reanalyzed with flow cytometry and the same fractions were obtained and confirmed. Without Hoechst staining, the DAPI^{high} population was not detected. Next, to count the number of nuclei, we extracted nuclei from the spinal cord tissue (4-mm long from the thoracic level) and counted the DAPI^{high} population with FACS. Flow cytometric analysis revealed that this procedure typically yielded more than 5.0×10^7 nuclei per gram tissue. To further examine whether the sorted nuclei contained transcripts, we measured GAPDH expression in the extracted nuclei from the spinal cord tissue (4-mm long) and compared an amount equivalent to that in whole tissue by real-time PCR. Although the quantity of mRNA was less than 25% that of the equivalent whole tissue, the

amplification efficiency was identical with the equivalently diluted tissue GAPDH, suggesting that the quality of the transcripts remained intact.

Nuclear sorting from Nestin-EGFP transgenic mice

To examine whether our procedure was applicable to nuclei genetically labeled with fluorescent reporter proteins, we evaluated transgenic mice carrying EGFP under the control of the Nestin promoter (Yamaguchi et al., 2000). In Nestin-EGFP transgenic mice, GFP-positive cells are localized in the regions of neurogenesis, such as in the subventricular zone (Fig. 3A). Because the extracted nuclei from the striatum of this mouse contained a small number of GFP-positive nuclei (Fig. 3B), we tried to isolate them using flow cytometry. In the nuclei extracted from the striatum of neonatal wild-type mice, no cells that were double positive for PI and FITC were obtained (PI square in the right part), whereas in nuclei obtained from the Nestin-EGFP mice, a bimodal peak of FITC and PI/FITC double-positive cells was observed (Fig. 3C). These results suggested that our method could be applied to purify genetically labeled nuclei from specific brain areas. The number of EGFP-positive nuclei decreased over time, but the retention of GFP (27 kDa) in the purified nuclei was unstable because molecules smaller than 60 kDa are able to pass through the nuclear pore by passive diffusion, suggesting that the strategy for GFP-positive nuclei isolation is compatible for use in mice in which GFP is targeted to a nuclear component, such as H2B, as previously reported (Jiang et al., 2008).

Immunotagging of the extracted nuclei and flow cytometric analysis

We then attempted to isolate neuronal and glial nuclei using an immunotagging method. In spinal cord sections, distinct expression patterns of NeuN-positive neurons and Olig2-positive oligodendrocytes were observed by immunohistochemistry (Fig. 4A). We then extracted nuclei from the spinal cord and performed immunostaining using these antibodies and found two distinct populations: NeuN-positive and Olig2-positive nuclei (Fig. 4B). In addition, an immunopositive area for transcriptional factor Olig2 was localized in the euchromatin, but negative in the heterochromatin, which consists of mostly inactive DNA (Fig. 4C). These results suggest that the nucleoproteins in the extracted nuclei remained intact and that immunostaining is useful for nuclear sorting. These two markers were also applicable for flow cytometric analysis (Fig. 4D).

Fab fragment significantly enriched the immunopositive nuclei populations

Because the molecular size is large for the nuclear transport, we extracted nuclei from the brain tissue and examined sorting efficiency using Fab fragments and normal antibody for acetyl histone H3. Purification of Fab fragments from the normal antibody was performed using a commercially available kit. The background staining was not changed, even with the digested secondary antibody Alexa Fluor 488 (Fig. 5A), but the sorting efficiency was significantly increased only when both the digested primary and secondary antibody were used (Fig. 5B). These results clearly indicate that the molecular size of the antibody is crucial for immunolabeling nuclei and high-yield purification.

Discussion

In CNS tissue, characterization of the molecular profiles of specific cell populations is a considerable challenge. There have been many attempts to develop a selective analysis. For example, laser capture microdissection (LCM) was developed