

(東女医大誌 第46巻 第2号)
頁 149~154 昭和51年2月)

神経鞘腫の組織培養

—monolayer culture 法および organ culture 法—

東京女子医科大学脳神経センター (所長, 喜多村孝一教授)

脳神経外科

久保 長生・上条 裕朗・氷室 博
クボ オサミ カミジロウ ヤスオ ヒムロ ヒロシ

教授 喜多村 孝一
カ タ ムラ コウ イチ

木村病院 脳神経外科

沖野 光彦
オキ ノ テル ヒコ

(受付 昭和50年12月8日)

Study on the Neurinoma in Tissue Culture

—Monolayer culture and organ culture—

Osami KUBO, M.D.*, Yasuo KAMIJO, M.D.*, Hiroshi HIMURO, M.D.*,

Koichi KITAMURA, M.D.* and Teruhiko OKINO, M.D.**

*Dept. of Neurosurgery, Neurological institute, Tokyo Women's Medical College, Tokyo, Japan

**Dept. of Neurosurgery, Kimura Hospital, Tokyo, Japan

10 acoustic neurinomas and 2 spinal cord neurinomas were elaborately studied by monolayer tissue culture method and gelfoam organ culture method. Four morphological types were found in the acoustic and spinal cord neurinomas:

- 1) Multinucleated cell (Type-I), dividing into bipolar spindle-shaped cells.
- 2) Bipolar spindle-shaped cells (Type-II), forming of palisade fashion in the monolayer tissue culture method.
- 3) Fibroblastic cells (Type-III), tending to predominate in the long term culture.
- 4) Round cells (Type-IV), gathering on the gelfoam mesh in the organ culture method.

緒言

Harrison (1907) による蛭の神経の培養に始まる神経系の培養は、培地等の改良により非常な進歩をみている。脳腫瘍の組織培養は Kredel (1928)¹⁾, Bruckley (1929)²⁾, らによつて本格的に研究が始められ、これ以後、脳腫瘍の分類、細胞構成の解

明, cell kinetics 等の研究に大きく貢献している。われわれも1971年来、脳腫瘍の組織培養を行なっているが、今回はまず、神経鞘腫の組織培養所見について述べる。

神経鞘腫の組織培養は Kredel (1929)²⁾ が7例の acoustic neurinoma を報告して以来、Cox and

Crang (1937)⁴⁾, Murray (1940)⁶⁾, Takeuchi (1973)¹⁸⁾, らによつて報告されている。一般に *neurinoma* は非常に固い組織で培養し難い腫瘍であり、永井らは7例中3例に培養成功をみたのみである。われわれは *acoustic neurinoma* および *spinal cord neurinoma* の組織培養を行ない、全例に培養成功をみた。組織培養は単なる *monolayer culture* 法と *gelfoam* を用いるいわゆる *organ culture* 法を行ない、これらの所見より *neurinoma* の組織成分について若干の知見を得たので報告する。

材料および方法

Acoustic neurinoma 10例, *spinal cord neurinoma* 2例について組織培養を行なつた。それぞれの症例は Fig-1 の如くである。





CASE	DIAGNOSIS	Type-I	Type-II	Type-III	Type-IV
		Multinucleated cell 	Bipolar spindle shaped cell 	Fibroblastic cell 	Round cell 
1	<i>Acoustic neurinoma</i>	+	##	##	+
2	<i>Acoustic neurinoma</i>	+	##	##	+
3	<i>Acoustic neurinoma</i>	+	##	##	+
4	<i>Acoustic neurinoma</i>	+	##	##	+
5	<i>Acoustic neurinoma</i>	+	##	##	+
6	<i>Acoustic neurinoma</i>	+	##	##	+
7	<i>Acoustic neurinoma</i>	+	##	##	+
8	<i>Acoustic neurinoma</i>	+	##	##	+
9	<i>Acoustic neurinoma</i>	+	##	##	+
10	<i>Acoustic neurinoma</i>	+	##	##	+
11	<i>Neurinoma of spinal cord</i>	+	##	+	+
12	<i>Neurinoma of spinal cord</i>	+	##	+	+

Fig. 1

培養方法は、手術時に無菌的に採取した腫瘍片を 0.5 mm~1.0 mm 角に細切し、Gey's BSS 等で洗浄し、0.25% トリプシン溶液を加えて 37°C に 10~15 分間位静置し、浮遊物をのぞき、新たにトリプシン溶液を加えて、magne-

tic stirrer で 20~30 分間攪拌する。これを 1,000 rpm 5 分間遠沈し、Gey's BSS で洗い培養液を加えて細胞浮遊液を作る。細胞密度は $1 \times 10^6 \sim 10^7$ 個/ml とする。これを *monolayer culture* 法とした。一方、1~2 mm 角に細切した腫瘍片を小孔をもうけた *gelfoam* に包埋し、P-シャーレにて静置培養した。これを *gelfoam organ culture* 法とする。培養液は Eagle MEM 培地「ニッスイ①」に 20% コウン胎児血清 (Difco), L-グルタミンを加えたものを用い、37°C, 5% CO₂ 添加インキュベーター中で培養した。最初の液交換は 3 日目に行ない、以後 1 週間に 2 回の液交換を行なつた。

Monolayer culture 法は、位相差顕微鏡または倒立顕微鏡で観察し、それぞれ 7 日目、14 日目、21 日目、30 日目、120 日目にカバーガラスをとりだして、アルコール固定を行ない、H-E 又は Giemsa 染色を行ない観察した。

Gelfoam organ culture 法では、7 日目、14 日目、21 日目、および長いものでは 30 日目に *gelfoam* を取りだして、*gelfoam* のまま 10% ホルマリン固定を行ない、型の如く包埋し、H-E および PAM 染色を施行して、顕微鏡観察を行なつた。

結 果

10 例の *acoustic neurinoma* と 2 例の *spinal cord neurinoma* の組織培養上の細胞成分をまとめたものが Fig-1 である。

まず *monolayer culture* 法での *acoustic neurinoma* の所見について述べる。培養後 3~4 日目頃よりガラス面に紡錘形細胞と円形細胞が培養され、また、ところどころに多核細胞もみられた。*acoustic neurinoma* では 4 つの型の細胞が培養された (Fig-1)。Fig-2 は 20 日目の培養細胞である。数十個の核を持つ多核巨細胞である。Fig-3 も同様の巨細胞であるが、これは整然と核がならんでいる。これを Type-I 細胞とする。同時期に Fig-4 の如く、双極性紡錘形細胞が *palisade formation* を作っているのがみられた。これらの細胞を Type-II 細胞と呼ぶ。また Type-II 細胞に混つて突起のない円形の核を持つ楕円形から円形の細胞がところどころにみられた。これを Type-IV 細胞とする (Fig-5)。さらに培養をつづけてゆくと Type-I の多核細胞は消失し、Type-II と

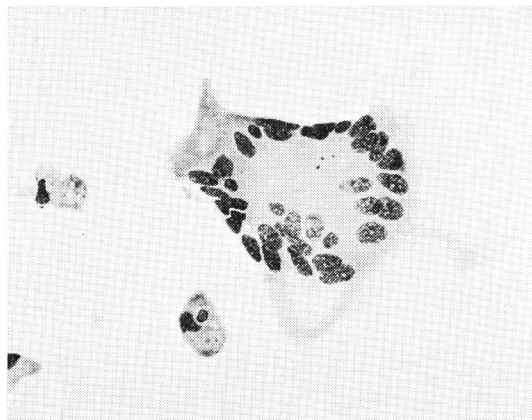


Fig. 2 Multinucleated cells in the acoustic neuroma, 20 days of culture. HE stain $\times 400$.

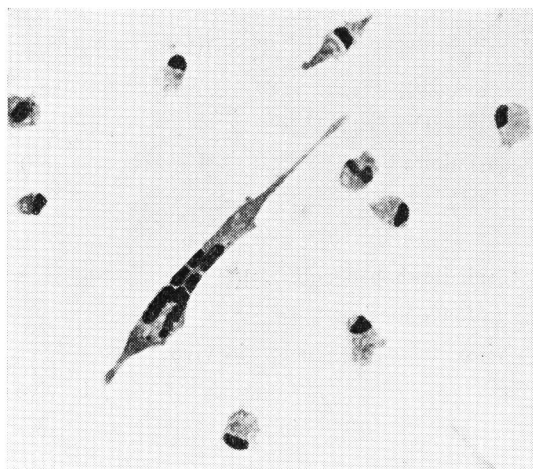


Fig. 3 Multinucleated and round cell in the acoustic neuroma, 20 days of culture. HE stain $\times 400$.

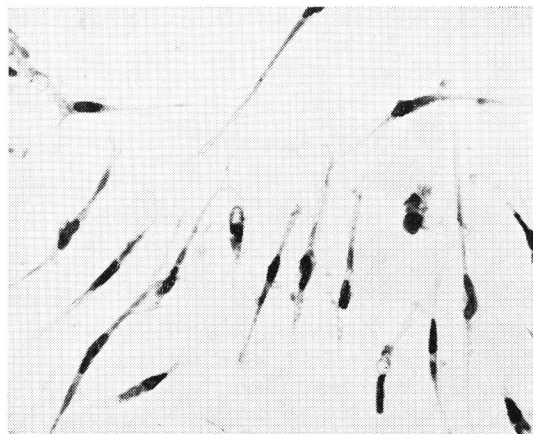


Fig. 4 Bipolar spindle shaped cells are arranged in a palisade, 20 days of culture in acoustic neuroma. HE stain $\times 200$.

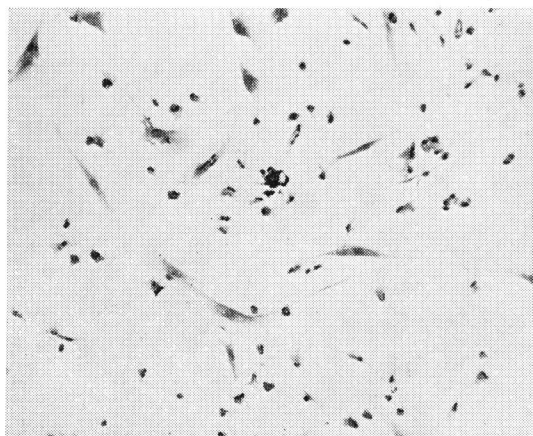


Fig. 5 Fibroblastic cells and spindle-shaped cell are intermingled in acoustic neuroma, 20 days of culture. HE stain, $\times 100$.

Type-IVの細胞に混つて2~3コの突起をもち、円形の核をもつ上皮様細胞が多数出現してくる。これを線維芽細胞、Type-III細胞とよぶ(Fig-5).

次に2例の spinal cord neuroma の monolayer culture 法での培養所見は、acoustic neuroma と全く同様に4つの細胞成分が観察された。しかし、線維芽細胞の増生はあまりみられなかつた。

次に gelfoam organ culture 法での培養所見について述べる。この培養方法は、数年前からわれ

われの行なっている、いわゆる腫瘍の器官培養法である¹³⁾。今回の neuroma の organ culture 法による所見は、紡錘形細胞と円形細胞が主体をなし、紡錘形細胞は一部 palisade formation を形成する傾向にあり、また、円形細胞は gelfoam の mesh に集合する傾向をしめした (Fig-6)。しかも、腫瘍間質には、赤血球を有する血管が極めてよく維持され、赤血球の血管外腔への滲出はみとめられなかつた。PAM染色を行なうと、Fig-7の如く、コラーゲン線維が染色され、血管壁ならび

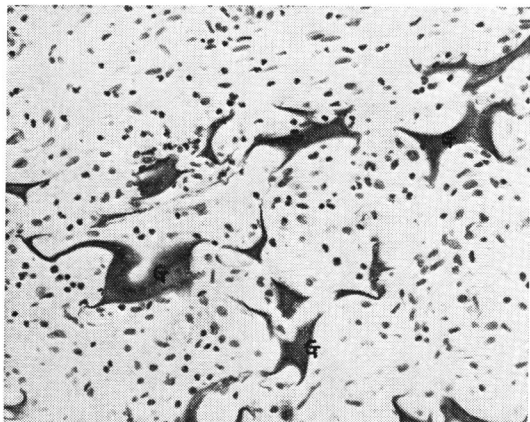


Fig. 6 Gelfoam organ culture of spinal cord neurinoma. Spindle-shaped cells are interweaving and many round cells are gathering to the gelfoam mesh (G), in 14 days culture. HE, stain $\times 100$.

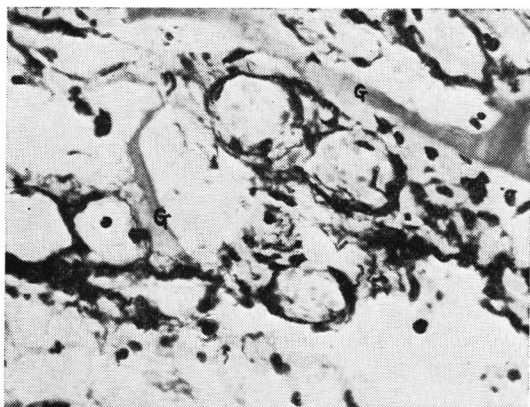


Fig. 7 Gelfoam organ culture of spinal cord neurinoma. normal vascular structure is maintained in 14 days culture. PAM stain $\times 200$.

に腫瘍細胞性コラーゲン線維が充分観察され、血管の維持されていることが確認された。Spinal cord neurinoma も acoustic neurinoma も organ culture では同じ所見を呈した。

すなわち、neurinoma の *in vitro* における形態学的性状は、まず紡錘形細胞、多核細胞があらわれ、あたかも、多核細胞が双極性紡錘細胞に移行し、palisade formation を作るような様相を呈した。一方、円形細胞も多数出現して来た。次いで

palisade formation がみられた後に線維芽細胞が多数出現して、他の細胞より優位を占めてくる。一方、gelfoam organ culture 法による所見で見ると、本法は手術材料の組織構造をよく保ちながら培養され、紡錘形細胞と円形細胞がみられた。しかも円形細胞は gelfoam mesh 付近に多数集っていた (Fig-6)。

まとめ

Acoustic neurinoma 10例, spinal cord neurinoma 2例の組織培養を行なった結果、われわれは Fig-1 に示した如く、4つの型の腫瘍細胞を観察した。すなわち、Type-Iは multinucleated cell である。Type-IIは bipolar spindle-shaped cell で、核は細胞質からいまにもはみだしそうな形をしている。Type-IIIは細胞質の豊富な広く扁平な線維芽細胞である。Type-IVは円形で細胞質の少ない細胞である。なお、培養日数がたつ程、線維芽細胞の増生が目立つてくる。一方、gelfoam organ culture 法では、もとの組織構造をかなり長く維持できることがわかった。すなわち、約30日間は維持可能であった。Fig-6 に示したごとく、spindle-shaped cell が主体となし、円形細胞が gelfoam mesh に集合している像がみられた。In vitro で維持した細胞が in vivo の特性をすべて維持しているかどうかは不明であるが、in vivo にみられる円形細胞が in vitro に維持された場合、その生物学的特性を発揮して、異物である gelfoam mesh 付近に集つたということは大変興味ある事実である。以上より、neurinoma の腫瘍細胞の主体は従来からいわれているように、bipolar spindle-shaped cell であり、これにいわゆる間質反応としての round cell の増殖または浸潤がみられると考える。

考 察

1929年 Kredel²⁾ は7例の acoustic neurinoma を培養し、5例で培養が成功している。これによれば培養細胞は“tadpole cell”といえるような形態をしていると述べている。一方、Cox and Orange (1937)⁴⁾ は acoustic neurinoma の組織培養で3型の細胞の遊出をみている。すなわち、

(1) 多数の突起を有する大型細胞, (2) ミクログリアに似た星芒状細胞, (3) 細長い紡錘形細胞である. Murray (1939)⁶⁾ は neurinoma は Antoni A type の組織からは正常の Schwann 細胞に類似した細胞が培養され, Antoni B type からは Antoni A type とは全く異なる性状の細胞が培養されたという. Murray and Stout (1940)⁶⁾ は 2 例の神経鞘腫を培養した. その培養所見から神経鞘腫は Schwann cell と形態学および生理学的に類似し, さらに, Antoni A type 細胞は Remark 線維からのものに類似し, B type 細胞は有髄神経線維からの Schwann 細胞に似ていると述べ, また, 線維芽球の関与なくコラーゲンを作ると述べている. 更に 1942 年 Murray⁷⁾ は acoustic neurinoma の培養を行ない, A 型細胞は最初は単一の線維形をなし, しばしば多核で, 細胞のまわりに parallel filament をもち, また B 型細胞は semiamoeboid または食細胞であり, これらの両者にはしばしば多数の移行形がみられると述べている. Lane, Murray and Fracer (1953)⁸⁾ らは胸部の neurinoma において A 型および B 型に特有な細胞を観察している. 油川 (1956)⁹⁾ が 3 例の acoustic neurinoma を培養し, 紡錘形細胞と円形細胞を観察している. また Cravioto and Lockwood (1969)¹¹⁾ は 50 例の acoustic neurinoma の組織培養を行ない, (1) amoeboid microglia-like cells, (2) spindle-shaped cells, (3) racket-shaped cells, (4) large-kite-shaped cells の 4 型に分け, spindle-shaped は cell contractile activity を有し, palisade formation を作る傾向にあり, amoeboid cell は Antoni B type の細胞にあたりと述べている. 以上のように, neurinoma の組織培養においては 3 から 4 種類の細胞が培養, 観察されている. しかし, これらは, いずれも monolayer 法で行なわれ, われわれのように gelfoam を用いた organ culture 法は行なっていない. 今回, われわれは monolayer culture 法と gelfoam を用いた, いわゆる organ culture 法による組織培養を行ない, Cravioto らの細胞分類を参照し, neurinoma の構成細胞を Fig-1 の如く

4 型に分けた. そして I 型の multinucleated cell が II 型の spindle-shaped cell に移行し, それが palisade formation を作る傾向にあると考える.

1 例の培養ではあるが, Takeuchi (1973) らも同様の所見を得ている. IV 型の円形細胞は gelfoam organ culture 法にて異物である gelfoam mesh に集中して浸潤していることより, いわゆる大食球的役割を持つ細胞と考えたい. また手術時の標本の組織像でも, 円形細胞浸潤が血管周囲に著明であり, organ culture 法の所見とよく一致する. これらのことより, この円形細胞はいわゆる間質反応に何らか関与しており, III 型の細胞は長期培養後に出現するため, 線維芽球ではないかと考える.

以上述べたことより, neurinoma の主細胞は Type-II すなわち bipolar spindle-shaped cell であり, Antoni A type, Antoni B type にそれぞれ固有の細胞はなく, 他の円形細胞や広い扁平な細胞はいわゆる腫瘍間質細胞と考える.

結 語

(1) acoustic neurinoma 10 例, spinal cord neurinoma 2 例について, monolayer culture 法および gelfoam organ culture 法にて組織培養を行なった.

(2) neurinoma は次の 4 型の細胞に分けることができた. (I) multinucleated cell, (II) bipolar spindle shaped cell, (III) fibroblastic cell (IV) round cell. そして培養腫瘍細胞の主体は bipolar spindle-shaped cell である.

(3) gelfoam による organ culture 法は, in vitro においても, もとの腫瘍組織構造をよく維持しうる.

本研究の一部は厚生省がん研究助成金 および 武田科学振興財団研究奨励金の援助をうけた.

文 献

- 1) Kredel, F.F.: Tissue culture of intracranial tumors with a note on the meningiomas. Amer J path 4 377 (1928)
- 2) Kredel, F.F.: Intracranial tumor in tissue culture. Arch Surg 18 2008~2018 (1929)
- 3) Bruckley, R.C.: Tissue cultures studies of glioblastoma multiforme. Amer J Path 5

- 467~472 (1929)
- 4) **Cox, L.B. and M.L. Crange:** Studies on the tissue culture of intracranial tumors. *J Path Bact* **45** 477~499 (1937)
 - 5) **Murray, M.R.:** Demonstration of schwannian origin of tumors of the nerve sheaths. *Arch Neurol Psychiat* **42** 1175 (1939)
 - 6) **Murray, V.R. and A.P. Stout:** Schwann cell versus fibroblasts as the origin of the specific nerve sheath tumors, observations of normal nerve sheath and neurilemmomas in vitro. *Amer J Path* **16** 41~60 (1940)
 - 7) **Murray, M.R.:** Comparative data on tissue culture of acoustic neurilemmomas and meningiomas. *J Neuropath Exp Neuro* **1** 123~124 (1942)
 - 8) **Lane, N., M.R. Murray and G.C. Fraser:** Neurilemmomas of lung comfermed by tissue culture. *Cancer* **6** 780~785 (1953)
 - 9) 油川健吾: 頭蓋内腫瘍の組織培養成績. *新潟医学会誌* **71** 49~62 (1956)
 - 10) 永井政勝・他: 脳腫瘍の組織培養アトラス, 第3回. *脳と神経* **19** 1175~1184 (1967)
 - 11) **Cravioto, H. and R. Lockwood:** The behavior of acoustic neurinoma in tissue culture. *Acta Neuropath* **12** 141~157 (1969)
 - 12) **Takeuch, T., Y. Uchida and H. Handa:** Palisade formation of human neurinoma cell cultured in vitro. *Arch Jap Chir* **42** 3~15 (1973)
 - 13) 久保長生・他: 脳腫瘍器官培養における gel-foam 内浸潤増殖と血管増生. *neurologica medico-chirurgica* **14**. Suppl. 71~72 (1974)
-