
CURRENT ENCYCLOPEDIA OF PATHOLOGY

現代病理学大系 9A

◎ 腫瘍 I 〔別刷〕

腫瘍の増殖と生長

藤田哲也



中山書店

1985. 12. 10.

B. 増殖と生長

病理学では、細胞の増殖や、臓器・組織の生長とかかわりの深い病変を対象として取り扱う機会が少なくない。たとえば、臓器の低形成や組織の過形成はしばしば問題になる。これらでは、はじめにあった細胞増殖の異常とそれにつづく形態形成の異常が直接の原因になっていることが多い。しかし、組織が病理学者によって検索される段階では、これらの原因的過程はすでに完了しており組織像の中に記録されているのは、その最終的な反応産物だけというのがふつうである。つまり原因論的に非常に重要な細胞の増殖や組織の生長という現象は、病理学者の目につきにくいところで進行してしまっていることが多いのである。かてて加えて、現在増殖が活発に行われている組織を病理学者が観察した場合でも、得られる情報は、細胞分裂像の多少以外にほとんどない。細胞増殖や組織の生長というような動的な過程の全体像をとらえるためには、発想の転換が必要なのである。増殖や生長という、病理学的にも重要な現象が、病理学者からの注目を十分にうけなできた理由がここにあるように思われる。

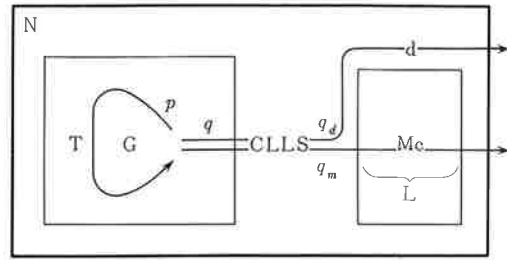
上に述べてきたのと同様なことが、腫瘍の病理学についてもあてはまる。一般に腫瘍が“制御をうけない過剰な生長”と定義されることからわかるように、生長の問題は腫瘍の本質にかかわる腫瘍学の中心的課題である。しかし、ここでも増殖と生長という主題は腫瘍病理学の中で、その重要性にふさわしい取り扱いをされることは少なかった。そこで以下に、この問題をもっとも基本的なところから論じ、それが病理学にどのような意味があるのかを明らかにしていきたい。

1. 増殖と生長の定義

一般的な病理学の教科書に従えば、生長 growth, Wachstum とは“組織の量が増してくること”と定義されている。その中には、細胞数の増加以外に細胞の肥大や細胞間物質の増量も含まれていてよいわけである。しかし、腫瘍においては、細胞の肥大や間質の増量は2次的なものであり、腫瘍細胞の数的増加こそ重要である。というわけで、腫瘍を論じるさいには、構成要素たる細胞の数的増加によってひきおこされる組織の増大を生長という名のもとに取り扱う。一般日常用語として使われている成長という表現でなく、生長としたのは、“構成細胞の数的増加を第1の原因としておこってくる組織の量の増加”として定義づけられた言葉、という意味で使いたいからである。

一方、増殖 proliferation, Wucherung とは、細胞分裂によって新たな細胞が生みだされる現象である。ここで、とくに強調しておかねばならないのは、生長と増殖は、はっきり異なった現象であって同義語ではなく、両者を混同することは許されないということである。増殖は生長の原動力であるが両者は同じではない。この事実は次のような状態をとりあげてみるとただちに理解できる。たとえば、成人の正常消化管粘膜や表皮では活発な増殖が行われている、しかしそれらの組織では生長は完全に停止している。いうならば生長は人口増加であり、増殖は誕生率のようなものである。誕生率がいくら高くても、これは人口増加にそのまま結びつかない。死亡率がこれに見あうだけ高い場合には人口増加は停止しているし、死亡率しだいで人口減少にもなりうるのである。両者の関係を、もう少し明確に表現すれば、

図 23 細胞の増殖・分化と細胞喪失の流れ
増殖コンパートメント G 中の増殖細胞は分裂した直後、母細胞と同様な細胞にとどまるか、それとも定寿命細胞 CLLS として除去される運命をとるか、確率 p , q で定められる。 p と q は細胞ごとにばらつき、一定の分布をもつと考えられるが、現在測定可能なものは細胞集団での平均値 \bar{p} , \bar{q} である。CLLS は Mc として成熟コンパートメントへはいつてから寿命 L のつきるとともに除去されるものと、きわめて短い滞留時間のうちに直接系から除去される死滅流細胞 d がある。



生長とは増殖率から細胞喪失率を引いたものを、細胞集団全体について、一定の時間にわたり積分したものの、ということになる。

生長と増殖の関係を定量的に把握しやすくするため、以下に簡単にこの問題を論じよう。図 23 は、1つの系（組織とみてよい）における細胞動態の一般的な模式図であるが、増殖コンパートメント G 中で行われる細胞産生（増殖）と、このコンパートメントから CLLS (cells of limited life span) となって流出し一定時間後に失われる細胞（細胞喪失 cell loss）との収支の結果が、この図全体を囲む大枠の中の系の生長としてとらえられることを示している。CLLS の中には、① 増殖を停止し、成熟細胞 Mc (maturing cell) となり、一定の寿命 L (life span) を終えたのち失われるものと、② 直接死滅消失したり、壊死に陥ったり、あるいは生きてまま系から流れでて失われてしまう d 細胞 (decaying cell) が含まれている。

一般的に腫瘍の生長と増殖の解析を行うためには、図 23 で示したような細胞の流れの各分岐点における分流率、一定の状態での細胞の滞在時間、あるいは各状態に存在している細胞の分画率 fraction（以下では率という）などを決定する必要があるが、それらは複雑なばらつきや時間的変動を示すのがふつうなので、正確にこれを行うことは一般に困難である。とくに人体腫瘍では測定上に多くの制約がつけ加わるため、その困難性は飛躍的に増大する。したがって、人体腫瘍の細胞動態の解析は、いたずらに精度を追い求めて、その困難性に絶望するのでは意味がない。むしろ明確な概念を十分に理解したうえで、実体に即し、本当に重要な点を押えるというアプローチをとることが必要である。このような工夫がこらされた結果、上述の困難性にもかかわらず、1950年代の後半から最近にいたる約 30年の間に、人体腫瘍の体内における生長と増殖の解析データがしだいに集積されるようになってきた。ここでは人体内で発育する腫瘍に焦点を合わせながら広く実験動物癌も考慮して、生長と増殖の問題を論じていくことにする。

2. 生長の測定とその分析

人体内で発育する腫瘍の生長を定量的に追跡するのに、もっとも理想的なのは腫瘍細胞の総数を経時的に測定していくことであろう。しかし、これは実際的にはもちろん、理論的に考えてさえ不可能なので、人体腫瘍の生長のデータの収集には腫瘍の体積 (V) が尺度として用いられてきた。〔したがって、以下には組織の体積 V と構成細胞の数 N を同義語的に取り扱い、必要に応じてそのどちらかを自由に選んで用いることにする。〕体の表面から触診できるものでは直接ノギスをあてて測られることもある

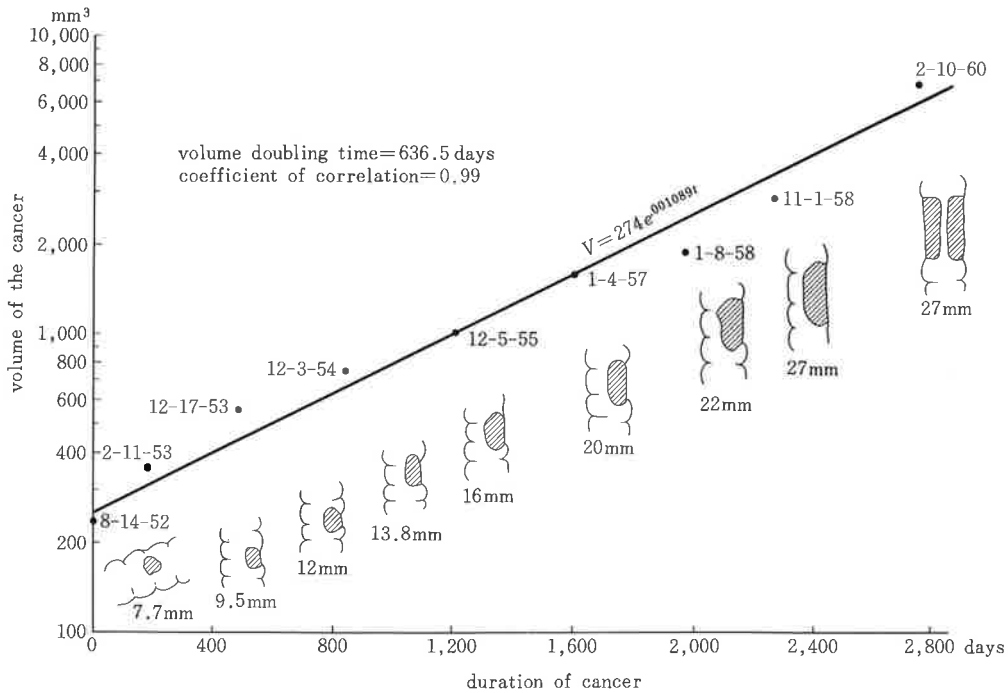


図 24 ヒト横行結腸高分化型腺癌の生長

Spratt と Ackerman¹²⁾ が 7.5 年にわたって観察した大腸癌の生長。半対数プロットで、生長は直線的であり典型的な対数的生長を示している。この期間中 D はほぼコンスタントであったことが読み取れる。

が、そのようなことのできる症例は比較的まれで、ほとんどはレトロスペクティブに集められた X 線フィルムの上での陰影の増大を計測することによってデータの収集が行われてきた(図 24)。1956 年の Collins¹⁾ らの報告を皮切りに欧米のいくつかの研究グループが活発なデータの収集活動を行い、わが国でも 1960 年の中頃からは著者らの教室や、神前、辻本、草間らの報告が現れるようになった(表 2¹⁻⁵²⁾ 参照)。

これらのデータの解析結果を手短かに述べると、ヒトの癌は原則的に(とくに生長の場が変わらないかぎり)、観察の全期間を通じてずっと“対数的”に生長する傾向をもつ、ということである(図 24)。これは Collins¹⁾ らがはじめて指摘したので Collins' principle (コリンズの原則) といわれることもある。

a. 対数的生長 exponential growth

ここでいう“対数的生長”とは、図 25 に示すように、腫瘍細胞数が $1D$ 時間 (doubling time) たつごとに倍加する場合、その D が時間 t の経過のどの時点でも一定 constant であるような生長のことである。図 24 はその一例である。これは細胞数を N 、計測開始時点の細胞数を N_0 として

$$N = N_0 \cdot 2^{t/D} \dots\dots\dots (1)$$

とかける(図 25 参照)。ただこの式では N がとびとびの値 discrete values しかとらないので数式としての取り扱いに不便である。そこで、それらの値をスムーズにつないだ連続関数をうるため、 $2^n = e^{n \ln 2}$ の関係を利用し

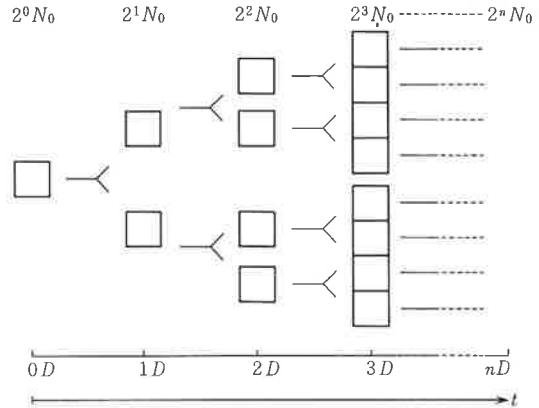


図 25 癌組織あるいは癌細胞数生長の数量モデル
 癌細胞数は $1D$ 時間たつごとに倍になる。したがって、はじめ N_0 個の癌細胞から出発したとすれば n 回倍加したときの量は N_0 の 2^n 倍となるはずである。スタートの時点をも $t=0$ とし、 n 回倍加した時点をも $t=nD$ であり、 $n=t/D$ で表せる。式(1)は、この関係を用いている。

$$N = N_0 \cdot 2^{t/D} = N_0 e^{\frac{\ln 2}{D} t} = N_0 e^{\delta t} \dots\dots\dots(2)$$

と書き直す。ここに $\delta = \frac{\ln 2}{D}$ は生長率 specific growth rate とよばれる生長のパラメータである。

この式はまた、見方を変えて、生長を規定する一般的な方程式から導くこともできる。つまり生長は時間の関数であるから、単位細胞当たり(つまり $1/N$) の細胞数の増加 (dN/dt) を $\psi(t)$ として

$$\frac{1}{N} \frac{dN}{dt} = \psi(t) \dots\dots\dots(3)$$

と書き、生長を記述する一般的な微分方程式と考えることができる。対数的生長では単位細胞当たりの細胞数の増加が時間に関係のない定数になっているから、 c を定数として

$$\frac{1}{N} \frac{dN}{dt} = c \dots\dots\dots(4)$$

であり、その解は $\frac{dN}{N} = c dt$ としたうゑ両辺を積分して

$$N = N_0 e^{ct} \dots\dots\dots(5)$$

となる。細胞数は $t=D$ 時間たてば倍加するはずであるから、 $t=D$ のときの細胞数を、 $t=0$ のときの細胞数 N_0 で割ると

$$N_0 e^{cD} / N_0 = 2$$

$$e^{cD} = 2, \quad cD = \ln 2, \quad c = \frac{\ln 2}{D}$$

となり、 c は上述(2)式の生長率 δ と等しいことがわかる。つまり式(4)は式(2)と同じものを表しているのである。数的生長と時間との関係が式(5)のような対数の形式で表されるので、この型の生長を対数的生長という。生長が対数的であるということは D が時間に関して一定であるということの意味するだけであってそれ以上の意味はない。つまり、生みだされた細胞がすべて生き残り細胞死などによる損失がないとか、すべての腫瘍細胞が同一の分裂サイクル時間で増殖しているとか、細胞集団が間質などを含まない均質なものでなければならない、というような含みはまったくないのである。対数的生長の内容を解釈すれば、“その細胞集団では増殖率と細胞喪失率のバランスが一定であって、時間によっ

表2 人癌 in vivo 増殖と生長のパラメータ

腫瘍の種類(症例数)	測定法	LI ₀ (%)	T(日)	D(日)	文献	
胃	早期胃癌 (15)	X線		555~3,076	2~4)	
	早期胃癌 高分化型 (5)	FLM	14~23	(7)	2,5)	
	びまん型 (1)	FLM	6		2)	
	胃癌転移 (4)	CLM	13~25	5.4~12.3 (5.9~13.1)	15.5~60.2	6)
	進行胃癌 (2)	X線			105~305	2)
	進行胃癌 高分化型 (19)	FLM	13~33			2,7,8)
	びまん型 (5)	FLM	5~10			2,7)
	(PAS陰性細胞)		20~28			9)
	(PAS陽性細胞)		0			9)
	胃癌腹水型 (2)	CLM, LMCM, FLM	27~28	2.5~4.6		10)
	正常胃粘膜	LMCM	30	1~2		11)
腸	大腸癌原発巣 (21)	X線		138~1,155	12,13)	
	大腸癌転移 (26)	X線		34~210	1,14)	
	大腸癌 (4)	FLM	13~22		8,15)	
	直腸癌転移 (2)	直測, CLM	20~30	4.2~7.0 (4.7~7.6)		16,17)
	正常大腸粘膜 (3)	LMCM, FLM	13.9~32			11,15)
	正常直腸粘膜 (1)	FLM	32.1			15)
食道	食道癌転移 (1)	CLM	21	7.1[7.7]	16)	
	食道癌腹水型 (1)	FLM	3.25	(7.7~28)	18)	
	非癌食道粘膜 (2)	FLM	24.1~25	2.9~3.3	19)	
上気道・表皮	上気道癌 (70)	コルキシン		1~10	60~360	20)
	上顎洞癌 (2)	直測, CLM	25~30	5.9~9.4 (6.4~9.9)	14.2	21)
	喉頭癌転移 (1)	直測, CLM	31	6.3[6.9]	8.1	22)
	喉頭癌 (6)	DLM	5.5	9.4		23)
	非癌喉頭粘膜 (6)	FLM	6.3			23)
	舌癌 (2)	CLM	23~33	7.5[8.2]		24)
	皮膚癌 (2)	CLM	23~28	4.6~6.9 (5.0~7.5)		24)
	皮膚癌 (5)	LMCM	5~17	1~4		25)
	悪性黒色腫 (2)	DCM, LMCM		3~9		26)
	口唇口頬粘膜癌 (4)	ビンプラスチン		(6~9)		27)
	正常表皮 (2)	MCM, CLM	3.5~7	4~4.2		28,29)
性器	乳癌 (4)	CLM, FLM	18~25	6.6~11.8 (7.2~12.8)		30)
	乳癌 (291)	直測, X線			20~1,200	31,32)
	子宮癌 (2)	CLM, FLM	17~25	6.4~7.8 (6.9~8.4)		33)
	子宮頸癌 (2)	DCM, MCM	13~40	0.6~0.65		34)
	子宮癌腹水型 (1)	LMCM	24	2.6		35)

表 2 (つづき)

腫瘍の種類(症例数)		測定法	LI_0 (%)	T(日)	D(日)	文 献
性 器	子宮癌腹水型(1)	LMCM	11	4.6		10)
	卵巣癌(1)	FLM	0.7			15)
	卵巣癌腹水型(2)	LMCM	18~20	5		10)
肺	肺原発癌(89)	X線			17~480	14,36~38)
	肺転移癌(184)	X線			7~465	36,39)
非 上 皮 性 腫 瘍	白血病 AML(2)	DCM, LMCM		5		40)
	白血病 CML(1)	DCM, LMCM		6		40)
	白血病 CML,AML(4)	DCM	4~14	2.1~3.3		41)
	白血病 AML(3)	LMCM, FLM	40	(1.7)		42)
	白血病 ALL(1)	LMCM	3.8	3.4		43)
	形質細胞腫(2)	DCM	3	2~6		44)
	悪性リンパ腫(29)	CLM, FLM	3~10	7[7.6]	14~70	17,45)
	Burkitt 腫瘍(38)	コルキシン, CLM, MCM		1~2	1.6~4.9	46,47)
	細網肉腫(1)	CLM, FLM	23	7.9[8.5]		48)
	細網肉腫(1)	LMCM	4	2.2		49)
	骨肉腫(10)	X線			19~366	50)
	骨肉腫(1)	直測, CLM	28	7.0[7.6]	14.1	51)
	唾腺嚢胞癌(1)	CLM, FLM	22	7.6[8.3]		33)
	神経芽腫(5)	コルセミド			5.2	52)
	Wilms 腫瘍(6)	コルセミド			15	52)

CLM: 連続標識法 continuous labeling method, DLM: 二重標識法 double labeling method, DCM: 希釈追跡法 dilution chase method, MCM: 移動追跡法 migration chase method, LMCM: 標識分裂追跡法 labeled mitosis chase method

て大幅に変動することはない” というものにすぎない。

それにもかかわらずヒトの癌が体内で発育している場合に終始対数的生長をすると考えることには強い抵抗がある。その理由の第1は、ヒトの腫瘍よりずっと精密に測定されてきた多数の可移植性実験動物癌の生長カーブが、ほとんど例外なく、はじめは対数的に生長し、やがて傾きが変わってきて一定の極限サイズへ漸近線的に近づく、という経過をとることが明らかにされているからである。そこで、両者の違いを論じる前に、次に実験腫瘍の生長の研究にふれてみよう。

b. 実験腫瘍の生長解析

人癌についての計測が行われたころよりずっと以前から、動物の実験腫瘍についてはその大きさを経時的にノギスで測定したり摘出して重さを測り、時間軸に対してプロットする研究が行われてきた^{53~55)}。また X 線フィルム上の計測も行われている⁵⁶⁾。実験動物ではさらに可移植性の腹水腫瘍があり、これを用いると経時的な細胞数増加の算定が、壊死や間質の量的変化の影響をうけないで精密に行うことができるという利点もある^{57,58)} (図 26)。このような方法を使って実験動物の移植性腫瘍で得られた生長曲線は、上に述べたように、ほとんどつねに、はじめは対数的に上昇し、しだいに傾きの角度が変わってついには一定の極限サイズへ頭打ちの形で近づいていくという傾向を示す (図 26 参照)。このような生長を

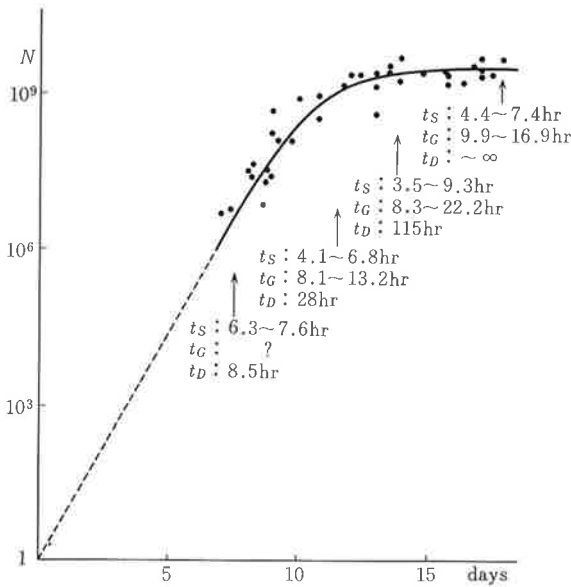


図26 1個の癌細胞から出発した腹水腫瘍の生長(芦原)⁵⁸⁾

1個の吉田肉腫 YS 株の細胞をラット腹腔中に移植し、その後経時的に細胞数の増加と細胞増殖のパラメータを測定したもの。

解析するには、これにうまく適合する解析関数を得れば、大変便利である。そこで、数学的取り扱いが比較的簡単で、しかも実測値にできるだけよく合う関数が選ばだされ、利用されてきた。以下にその数例を示す。

1) 対数的生長関数 exponential growth function

これは式(4)に示したように、生長の時間経過によって生長率が変わらない場合である。式(4)を少し書き直し

$$\frac{dN}{dt} = \delta \cdot N \dots\dots\dots (6)$$

とすると、左辺は生長速度 growth velocity とよばれる量であるが、これは細胞数の増加率であり生長曲線のカーブの傾きでもある(図27)。この式は、生長速度が現存する細胞数に比例して増大していく

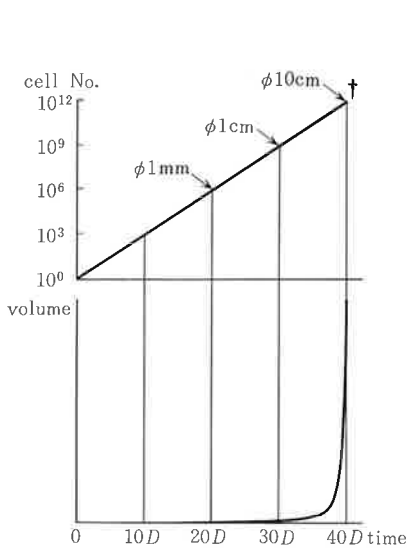


図27 人癌の生長の全経過を半対数目盛りでみた場合(上)と体積増加の絶対値表示でみた場合(下)

はじめ1個の癌細胞が存在し、これが一定のダブリングタイム D で生長しつづける場合を表している。細胞1個とそれをとりまくわずかな間質を合わせたものの直径を $10 \mu\text{m}$ とすると、これが直径 1 mm 、重さ約 1 mg の集塊になるまでに $20D$ の時間を要し、 1 cm 、 1 g (細胞数 10 億個)になるまでに $30D$ を要する。このサイズは臨床経過のはじまりとみてよい。この大きさから、さらに $10D$ 経過すると直径は 10 cm 、重さは 1 kg (細胞数 1 兆個)となる。†で示されているように、これはヒトにとって致命的なサイズである。これ以上ヒトは耐えられない。もう $10D$ たつと腫瘍は直径 1 m 、重さ 1 トンになってしまうからである。癌の生長が上図で直線的なのは半対数で示されているからであって人間の目ではこう見えない。肉眼で観察するものにとっては下図で示されたような経過をたどるようにみえる。このため、つい最近まで、癌というものがあったかも臨床的に発見される時点の直前に発生し、爆発的に生長するかのよう

ことを示している。また、細胞総数（あるいは腫瘍体積）の自然数を時間軸に対してプロットした生長曲線（図 27 の下の曲線）では、その傾きが細胞数の増加とともに急峻になってくる現象としてとらえられる。しかし、式(2)で表される同じカーブを、時間軸に対して細胞数の対数で(半対数)プロットすれば傾きが δ の直線となってしまふ（図 27 の上の図）。人体内の腫瘍は原則的にこの形式にあてはまると考えられている（図 24 参照）が、動物の実験腫瘍では全経過のはじめの 1/3 くらいがこの形式に適合するだけで、それ以後になると実測値と対数的生長曲線との解離がめだつようになる。

2) 立方根関数 root cube function

Mayneord (1932)⁵³⁾ は Jensen sarcoma の生長には対数関数より $V^{1/3} = kt + V_0^{1/3}$ という立方根関数のほうが実測値によく合うことを見いだした。この式は、腫瘍塊の表面の 1 層の細胞だけが増殖し生長に寄与すると考えるモデルに適合している。Mayneord⁵³⁾ は、これを腫瘍塊内部の壊死によるものと考えた。その後、Mendelsohn (1963)⁶¹⁾ は、この式が

$$\frac{dV}{dt} = k \cdot V^{2/3} \dots\dots\dots(7)$$

の微分方程式の解であることを指摘し、(7)式を“腫瘍の生長速度 (dV/dt) は腫瘍の表面積 ($V^{2/3}$) に比例する”と解釈して、“栄養や代謝産物の拡散が腫瘍細胞の増殖に律動的に働く”と想像している。立方根関数はマウスやラットの多くの腫瘍にかなりよく適合するというデータが報告されている^{54, 57, 62-65)}が、それらの中には組織学的に壊死のほとんどないものも多く、またこのようなモデルのまったくあてはまらない腹水腫瘍も含まれている。さらに、その後同じような材料について研究した人々も、生長の前半に関するかぎり立方根関数よりむしろ対数的生長関数のほうがよく合うとし、立方根関数は生長の後半を記載するのに適している^{59, 60)}が、そのいずれも単一では生長の全経過をカバーできないとしている。

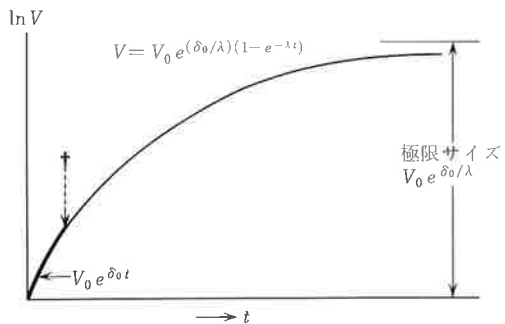
3) ゴンペルツ関数 Gompertz function

数式に対するこのような数理生物学的解釈にとらわれず、実測値にいかにか忠実に合わせうるかという点に問題を限ったうえで Laird⁶⁶⁾ は Gompertz 関数を取りあげ、多くの動物腫瘍の実測値でテストした結果、この関数は腫瘍生長の全経過をかなりよくシミュレートすることを見いだした。図 28 に示したのがこの関数である。これは

$$V = V_0 \cdot e^{(\delta_0/\lambda)(1-e^{-\lambda t})} \dots\dots\dots(8)$$

という形の関数で、 δ_0 は生長の初期における生長率、 λ は生長の減衰係数である。この関数は t がきわめて小さい場合には $(1 - e^{-\lambda t})$ を λt で近似できるから、

図 28 実験動物腫瘍の一般的な生長曲線
ほとんどすべての実験動物腫瘍の生長の経過は図に示すような Gompertz 関数でよく表現できる。この関数では t が 0 に近いとき、つまり生長の初期は $V_0 e^{\delta_0 t}$ で近似できる。これは対数的生長に一致する。また t が大きくなっていくと曲線は $V_0 e^{\delta_0/\lambda}$ に近づくが、これは腫瘍が到達しうる最大のサイズ（極限サイズ）を表している。ヒトの癌は一般に極限サイズまで近づくはるか手前で宿主を死亡させる(†)ので、Gompertz 関数の全経過を表現することはない。人癌の経過が終始対数的 ($V_0 e^{\delta_0 t}$) であるのは、このような理由によると考えられる。



$$V_0 \cdot e^{(\delta_0/\lambda)(1-e^{-\lambda t})} \doteq V_0 \cdot e^{\delta_0 t}$$

となって生長率 δ_0 の対数的生長に一致する。また t がきわめて大きい場合は

$$\lim_{t \rightarrow \infty} V_0 \cdot e^{(\delta_0/\lambda)(1-e^{-\lambda t})} = V_0 \cdot e^{\delta_0/\lambda} \dots\dots\dots(9)$$

という一定値に近づく。これは極限サイズとよばれ、この腫瘍の到達できる最大サイズを表している。

また、(8)式からダブリングタイムを計算すると、それは定数ではなく

$$D(t) = \frac{\ln 2}{\delta_0} \cdot e^{\lambda t} \dots\dots\dots(10)$$

であり、生長の時間経過とともに対数的に延長して行くことがわかる。

実験動物の腫瘍生長には、他のさまざまな生長関数(そのすべては式(3)の特殊解として与えられる)と比べて Gompertz 関数がよりよく適合する、という点について多くの研究者の意見が一致している^{55, 67, 68)}。

この関数とよく合うという事実の意味するもののうち重要な点の1つは、実験腫瘍には生体内で到達しうる極限サイズというものがきまっているというところである。これを事例でみてみよう。たとえば Laird⁶⁶⁾によれば、マウスの腹水腫瘍は死亡時平均細胞数 10^9 個(約 10 ml の腹水)にまで生長し、またマウス骨肉腫の死亡時平均サイズは 4.3 cm³、EQ771 tumor は 31 cm³ である。またラットでは Walker V10a6 tumor が 490 cm³、R39 sarcoma では 276 cm³ であるが、これらは Gompertz 関数で計算された極限サイズにかなり近づいている。また Durbin⁵⁵⁾は、ラットの fibroadenoma が日とともに極限サイズ 149 g に近づいてくるのをみている。これらの実験腫瘍における極限サイズの値をみてまず気づくことは、理論的極限サイズは一般にかなり大きく動物の体重に比べうるほどであり(ときには宿主の体重より大きい)、しかも動物が腫瘍死するころには腫瘍が実際にそのサイズ近くまで生長してくることが多いという現象である。小動物が巨大な腫瘤や腹水をかかえてなお生存しているのを目撃するのは決して珍しいことではない。これに対して、人体では相対的にいって、腫瘍がこのような大きさにまで

達することは決してない。このことは、人体内で発育する腫瘍と実験動物の腫瘍との大きな相違点の第1のものとして特筆されなければならない現象である。ついでに、第2の大きな相違点をあげておくと、それは実験動物腫瘍のダブリングタイム (D_0) が、ヒトのそれと比べて格段に短いという事実である。

表3は動物腫瘍の δ_0 から計算した初期生長のダブリングタイム D_0 をまとめたものである。大まかにいって、 D_0 は 0.5~10 日の範囲に分布し、平均が 2.3 日である。これに対してヒトの癌のダブリングタイム D は表2のものを通覧するとその 90%以上が 7~2,300 日に分布し、その多くは 30 日ないし 120 日の間にあることがわかる(その抜粋が表4に示されている)。図29はこれを

表3 実験動物腫瘍の初期ダブリングタイム(D_0)

腫瘍の種類	D_0 (日)	文献
白血病 L2010 (腹水型)	0.46	69)
白血病 La	0.83	70)
Ehrlich 腹水癌	0.87~1.5	57,70,71)
腺癌 EQ771	1.04	66,72)
メラノーマ B-16	1.08	72)
sarcoma 180	1.12~1.9	73~75)
Walker 腫瘍	1.3~2.5	66,72)
腺癌 755	1.3~4.0	73~75)
sarcoma T241	1.4	72)
Ridgeway 骨肉腫	1.6	72)
carcinoma C1025	2.0	72)
Morris 肝癌 3683F	2.2	76)
Morris 肝癌 3924A	3.4	76)
Morris 肝癌 7777	5.1	76)
Morris 肝癌 7793	7.5	76)
Morris 肝癌 7800	9.25	76)

表4 人癌の体内生長と細胞増殖のパラメータ
— ダブリングタイム(D)と世代時間(T)

癌の種類	症例数	T (日)	D (日)	\hat{D} (日)	
胃	胃癌転移	4	2.5~12	16~60	
	進行期胃癌	4		105~305	
	早期癌	15	7	*555~3,076	
腸	早期癌→進行癌	1	4~7	*636	*426~938
肺	気管支癌	89		17~480	75~181
	転移癌	202		7~465	37~111
骨	肉腫	11	7	14~366	24~38

人癌一般の $D \rightarrow (7日 \sim) 1 \sim 4$ か月 (\sim *数年)

人癌一般の $T \rightarrow 3 \sim 12$ 日

\hat{D} は Steel (1977)⁶⁸⁾ の集めた欧米におけるデータで、平均値の 95% 信頼限界を示している。

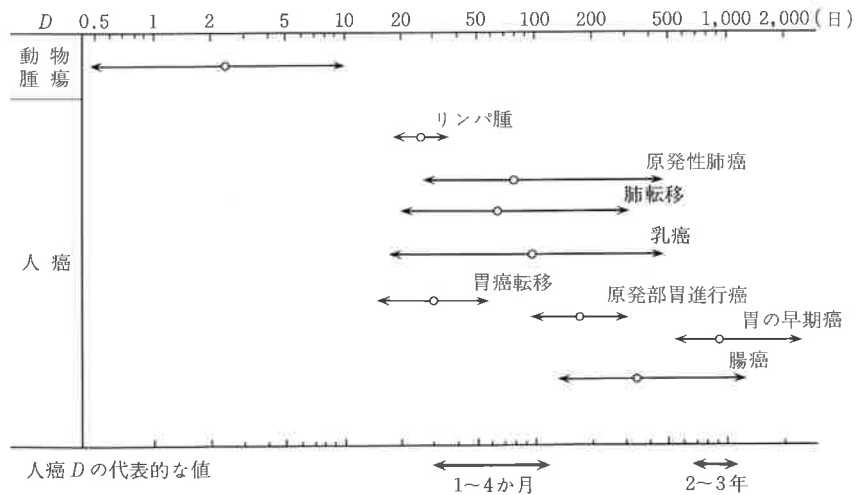


図29 動物腫瘍と人癌のダブリングタイム (D)

表2および表3のデータから、約90%の症例が含まれるような D の幅と平均値を示したものを、人癌では $D=1 \sim 4$ か月の深部生長型の代表値と、 $D=2 \sim 3$ 年の表在生長型の代表値があり、胃の進行癌や腸癌の多くでは、生長がこの2つの型のハイブリッドとなった移行型を示していると解釈できる。なお動物腫瘍では生長とともに D が変わるから、初期生長の δ_0 から計算した D_0 を示してある。

グラフにして示したものである。

c. 人癌の特性としての対数的生長

実験動物の腫瘍生長が精密に測定された結果、それらはほとんど例外なく Gompertz 関数型 (図26参照) の経過をとることが明らかになった。これに対して、人体内で発育する癌の生長は、表2に示すとおり多数の報告例があるが、それらは多少の不規則性はあるものの、観察された期間中ずっと対数

的に生長をするとみなしうるものが多く（たとえば図 24），少なくとも Gompertz 関数的な振舞いはしないことがわかる。

Steel⁶⁸⁾ (1977) は，その時点までに欧米で報告された人癌の生長曲線を批判的立場から再検討し，相当長期にわたり精密に測定された例で見事な対数的生長が記録された事実を認めながら，肺の転移癌のうちの 4 例ではこの原則に従わない生長経過をとったものがあつたと指摘している。しかし，その例を仔細に検討してみると，4 例とも厳密に対数的生長ではないが Gompertz 関数にも従わない形であり，しかもそのうちの 2 例では，不規則な生長経過といわれる部分が直径 5~9 mm の肺陰影の計測データに依存しているのがわかる。Steel⁶⁸⁾ の指摘より前に，対数生長の例外として引用されていた Brennan⁷⁸⁾ のデータも，きわめて小さな陰影に依存したもので，Gompertz 関数とも合わない測定値であつた。

このようにみえてくると，人体内で発育しつつある癌の生長は，少なくとも動物腫瘍のそれとは異なつて Gompertz 関数的なものでなく，数学的厳密性を要求しないならば，むしろ原則として，終始対数的生長をするものが絶対多数を占めると考えてよいようである。そうなると，動物の腫瘍と人癌の生長パターンのこの違いは何に基づくのであるかがただちに問題となる。

ここで重要になるのは，前節で述べたように，実験動物では最終的な腫瘍の生長は宿主の体重と比肩すべき極限サイズまで進行してくるのに対して，ヒトでは，相対的にいってこのようなサイズまで進むことは決してない，という事実である。病理解剖の経験から得られる一般的な致死サイズは直径 10 cm 程度の腫瘍塊である。これは重量にして約 1 kg であり宿主体重の 1/50 程度にしかすぎない。すでに述べたように Gompertz 関数も全経過の 1/3 くらいまでならおよそ対数的生長とみなせるようなものである。体重の 1/50 は，これよりはるかに手前で達成される（図 28 参照）。このことは，人体の悪性腫瘍がその極限サイズに達するよりはるか前にその宿主の生命を断つことによって，自らの生長にも終止符をうつものと解釈できよう。たぶんこの事実は人体というものが動物の体に比べて担癌状態に耐えて生存する能力の低いことを反映しているのであろう。

人体内で生長する悪性腫瘍が終始，原則として，対数的生長をつづけているという観察事実は，このように考えると実験動物腫瘍の生長動態と何ら矛盾なく統一的に理解できるのである。

d. 表在生長と深部生長

表 2 に示した人癌データは，やや総花的であり，人癌の動態についての簡潔な理解には適していないので，これを要約してみたものが表 4 および図 29 である。この表や図にみられるとおり，早期癌を除けば，一般に人癌の D は 30~120 日の範囲にあるものが多い。ただ，この範囲にはいるデータはほとんどすべて肺の陰影と経皮的に触知できる腫瘤の計測から得られたものである。これに対して，表の中に*で示した胃の早期癌と，大腸の早期癌から進行癌へかけての生長を測定したデータは，格別に長いダブリングタイムをもっていることがわかる。しかも，このようなケースではどの症例をとってみても，例外なく長い D をもっているのである。図 30 は，わが国における胃の早期癌の生長データをまとめたものであるが⁴⁾，隆起型(■)，陥凹型(●)を問わず，おしなべてその生長がきわめて緩やかなものであることを示している。図 24 に記録された結腸の癌でも同様な経過であつて，そのダブリングタイムは 636 日と計算されている。このように長い D は，消化管の粘膜表面に拡がって生長する癌に特徴

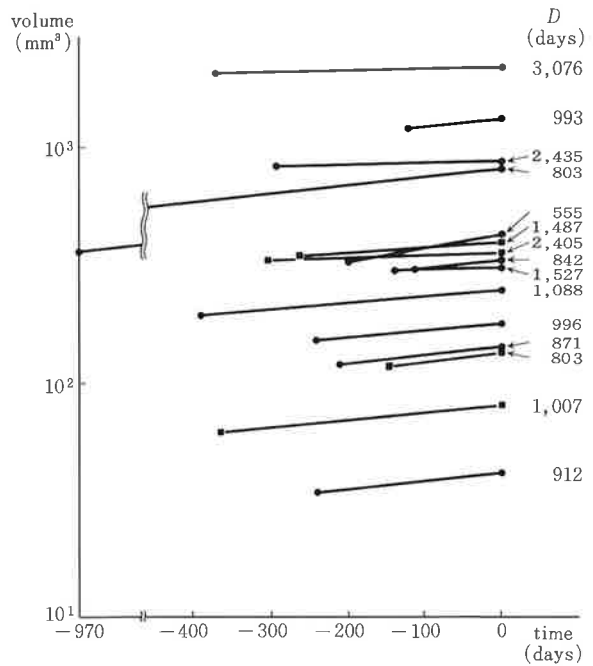
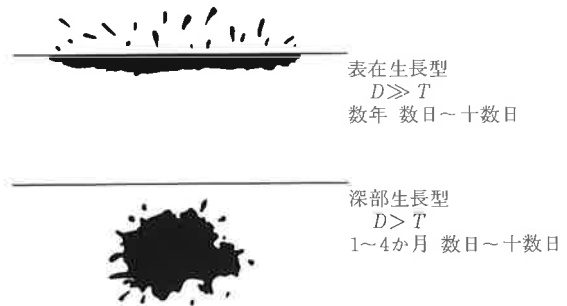


図 30 ヒト胃早期癌の生長

15 例の早期胃癌について手術時の実測 (time=0) からレトロスペクティブに測定された X 線フィルム上のサイズを半対数的にプロットしたもの、■は隆起型、●は陥凹型を示すが、いずれも生長の速さに有意の差はなく、おしなべて $D=555\sim 3,076$ 日という緩やかな生長を示している^{3,4)}。

図 31 癌の表在生長と深部生長

同じ癌細胞の集団でも、臓器の表面で生長する場合と深部で生長する場合には、その生長の速度は非常に異なる。表在生長型では、つねに細胞が剝脱して失われているため D は数年というオーダーにあり、その生長は著しく遅くなっている。一方、深部生長型では D が 1~4 か月程度のもが多い。これは表在生長型のものとは比べて 10 倍以上短い。一般に腫瘍の進展の速さは D に比例するから、癌が表在生長型から深部生長型に転ずれば、その進行のスピードが 10 倍以上加速されることが、ここから理解できる。



的であるとみてよいであろう。後にも論じるように、このようにゆっくりと生長する癌でも、癌細胞の増殖サイクルは決して特別に長いとはいえないから、このような表在生長をするものでは生長のパラメータである D と、増殖のパラメータである細胞世代時間 T との間のずれはきわめて大きく、しばしばその開きは数百倍にも達するのである (図 31)。これに対して、体の深部で生長する人癌の D は、上述のようにほぼ 1~4 か月であり、 T とのずれは約 10 倍程度にとどまっている (図 31)。癌が生長する部位によって、このように進展の速さに著しい差を生じることはまちがいのない事実であるが、この理由は何であろうか。そのもっとも大きな原因は、表在生長型の場合に (図 31 参照)、生みだされた細胞の多くのものが腔内に剝落し、系から失われているという細胞喪失のファクターが大きいためであろうと考えられる。これに対し深部生長型では、このファクターが 0 ではないにせよ、表在生長型のものとは比べて著しく小さいのは明らかである。胃でも腸でも、表在生長型の腫瘍が深部に浸潤したとき、生長速度が 10~30 倍にも加速されることが観察されているのは、このメカニズムを考慮に入れれば、^{2,13)}

当然のことと理解できるのである。

3. 増殖解析の腫瘍病理学への応用

動物腫瘍の生長が図 28 に示した Gompertz 関数で表されるような経過をたどる理由として、次の 4 つの説明が可能なものとして考えられる。

- (1) 細胞増殖の速さと腫瘍生長の速さが完全に同じであって、 D が延びてくるのは細胞増殖の低下、すなわち世代時間 T の延長をそのまま反映している。
- (2) D と T はイコールではないが比例しており、 D が延びてくるのは、生長速度の低下と平行して T が延びてくることを意味している。
- (3) 系の中に増殖をしない細胞（広義の Mc cell）が増し、生長に寄与する増殖細胞の比率⁷⁹⁾（いわゆる growth fraction, 略して GF）が減少してくる結果である。
- (4) 増殖コンパートメントから流出する CLLS（図 23 参照）が増してくる。つまり生長の経過とともに細胞喪失が増加してくる。

人癌の表在生長型と、深部生長型と分類された生長のパターンにも、同じような疑問が生じる。両タイプの差は、それを構成している腫瘍細胞の増殖のスピードの差なのか、細胞喪失の差なのか、それともその両方の差がともに寄与している結果なのか、生長の測定値をみているだけでは、まったくわからない。これらの可能性を明確にするためには、どうしても増殖の解析 cytokinetic analysis を行う必要がある。

a. in vivo における増殖の解析法

増殖を定量的に把握するためにもっとも重要なパラメータは、1つの細胞が1つの分裂から次の分裂までに要する時間 T （世代時間 generation time, cell cycle time などとよばれる）である。培養系ならば T は顕微鏡下で直接実測したり⁸⁰⁾、同調培養後 flow cytometry で細胞集団の DNA パターンの動きから測定することも可能であるが、生体内ではこれは困難である。⁸¹⁾

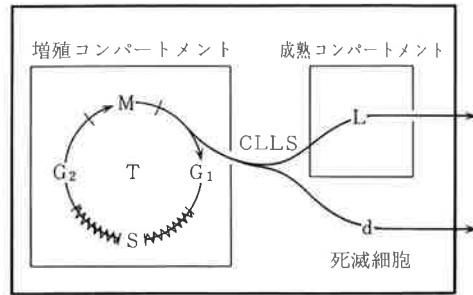
コルキシン colchicine やコルセミド colcemid などを用いて分裂を中期で停止せしめ、その集積の様子から増殖解析を行う stathmokinetic method も用いられたことがあるが、^{20, 27, 47, 52)} そのさいどうしても細胞を非生理的な状態に長時間置かねばならないため、定量的解釈に問題を生じる。このような理由で、現在では標識ヌクレオチドを利用するオートラジオグラフィ autoradiography が in vivo 増殖解析のほとんど唯一の手段とみなされるようになってきた。その中でも、 $^3\text{H-TdR}$ (tritiated thymidine というのが正式の呼称であるが、わが国ではトリチウム-チミジンというよび方が一般的である) が、とくに好んで用いられる。

この方法の原理は、図 32 にみられるような分裂サイクルのうち、DNA 合成相 (S) にある細胞の核 DNA に特異的に取り込まれた $^3\text{H-TdR}$ が、時とともにこのサイクルの中をまわる細胞の標識として役だち、その追跡によって対象とする細胞系の分裂サイクルの解析が可能になるというものである。実際の方法には次のものがある。

- (1) 連続標識法 continuous labeling method（集積標識法 cumulative labeling method ともいう）

図 32 分裂サイクルと細胞動態の模式図

T は世代時間 generation time, M は分裂期, G_1 は前 DNA 合成間期, S は DNA 合成期, G_2 は後 DNA 合成間期を示す。L は成熟細胞の寿命, CLLS は死ぬまでの寿命のきまった細胞である。図全体を囲む大きい黒枠は、このような細胞集団の構成する組織であり、その構成細胞数は増殖コンパートメントで産生される細胞と、CLLS として系から流れ去る細胞の差し引きバランスのうえに決定される。生長とは、このバランスの増減にはかならない。



- (2) 二重標識法 double labeling method
- (3) パルス標識 pulse labeling
 - ① 希釈追跡法 dilution chase method
 - ② 移動追跡法 migration chase method
 - ③ 標識分裂追跡法 labeled mitosis chase method
- (4) 瞬間標識法 flash labeling method

表 2 の測定法の欄に記された略号は、上の略記号である。これらの方法の手法や実際的な説明については、先に詳述されているのでそちらにゆずり、ここではこれらの測定を可能にしている理論的背景と集団を構成する細胞の動態を解析するさいに、どうしても理解しておかねばならない基本的なポイントについて説明する。

b. 増殖解析の理論的基礎

増殖細胞は、組織の中で図 32 の増殖コンパートメントの中に描かれたような周期 (cell cycle, division cycle, mitotic cycle, generation cycle などとよばれる) をくり返しつつ増殖している。分裂期 (M-phase) のあとにくるのが G_1 期、つづいて S 期、 G_2 期をへて再び M 期に突入する。一般の組織では G_1 期で細胞分化が決定され、分化成熟する細胞がここから分岐するが、ここでは増殖細胞群の基本的な性質を知るため、まず CLLS のまったくない場合の増殖モデル (完全増殖系という) について考察するところから始める。

1) 増殖細胞の年齢分布 age distribution

細胞増殖の解析を行う場合、1 つの cell cycle の中で細胞がどのように分布しているか、定量的に知っていることが絶対的に必要となる。これを知っているか、あるいは適当な仮定をおくのでないかぎり増殖解析はできない。

ここで、図 32 左側の増殖コンパートメントの枠の中だけにとじこもって、CLLS をつくることなく増殖をくり返す均質な細胞集団があって、各細胞はランダムな相分布をとっているとする。このような集団で細胞の年齢分布をしらべるには、このコンパートメントの細胞を 1 つ 1 つ指定し、それぞれが最後の分裂を終わってからどれくらいの時間が経ったか (年齢) を調査する。そして、各細胞をその年齢 age (τ) に従って細胞周期の線の上に並べてみる。その結果は図 33-a のようになるだろう。M 期を終わったところで (G_1 のはじめ) 細胞の密度が急に 2 倍になっているのは、分裂して倍加したこと

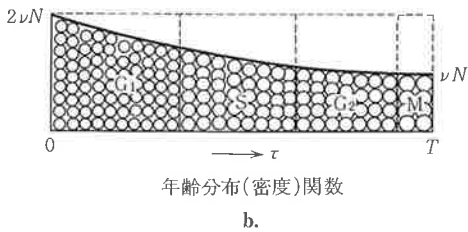
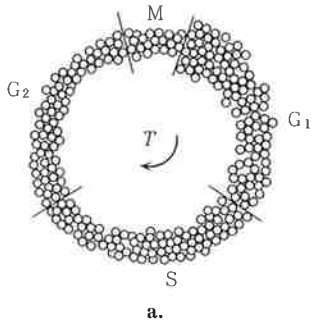


図 33 増殖細胞の相分布と ADF

- a. 増殖コンパートメントの細胞を細胞年齢に従って分裂サイクルの上に整列せしめたものである。年齢 τ は分裂直後を 0 としてかぞえる。
- b. 細胞の分布密度を年齢を横軸として示したもので年齢分布（密度）関数（ADF）とよばれている。

を示している。さて、この花環のようなものを M 期と G_1 期の境で切り開き直線的に伸ばして、図 33-b のようにすると横軸が細胞年齢 τ 、縦軸が細胞密度のグラフができあがる。これが細胞の年齢分布（密度）関数 age distribution (density) function (ADF) である。

数式としての ADF は、細胞が均一でかつランダムな相分布をしている場合、次のようにして導かれる。時刻 t にこの細胞集団は N 個の細胞からなる。この集団の時刻 t における年齢分布を考える。このとき、年齢の区分けを $\Delta \tau$ とし、各区分けの中に分布する細胞数を ΔN としてヒストグラムをつくると図 34-a のようになるだろう。

そこで、時刻 t において年齢が τ である細胞の頻度（密度）を $n(t, \tau)$ とすると、

$$\Delta N = n(t, \tau) \Delta \tau \dots\dots\dots(11)$$

は 1 本のヒストグラムの面積を表す（図 34-a）。この式を書き直すと、

$$\frac{\Delta N}{\Delta \tau} = n(t, \tau) \dots\dots\dots(12)$$

となる。またヒストグラムの総和は N だから

$$N = \sum_{\tau=0}^T \Delta N, \quad N = \sum_{\tau=0}^T n(t, \tau) \Delta \tau \dots\dots\dots(13)$$

となる。ここで $\Delta \tau \rightarrow 0$ として形式的に連続関数に変えてしまうと、ヒストグラムは図 34-b の滑らかな曲線となり、式(12)、(13)はそれぞれ

$$\lim_{\Delta \tau \rightarrow 0} \frac{\Delta N}{\Delta \tau} = \frac{dN}{d\tau} = n(t, \tau) \dots\dots\dots(14)$$

$$\lim_{\Delta \tau \rightarrow 0} \sum_{\tau=0}^T n(t, \tau) \Delta \tau = \int_0^T n(t, \tau) d\tau = N \dots\dots\dots(15)$$

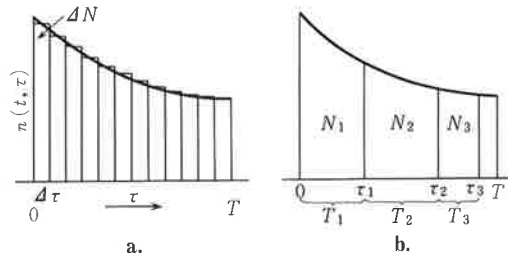


図 34 ADF の離散的表現と連続関数化

となる。この式(14), (15)で規定された $n(t, \tau)$ を年齢分布 (密度) 関数 (ADF) と定義する。これは年齢分布を定量的に表す一般的な式である。みられるように、この関数は時間 t と細胞年齢 τ の関数であり、細胞数を年齢の変数 τ で微分することによって得られる。ここで重要なのは時間の変数 t で微分したものではない、という点である。このことはやがて問題になる。

さて、増殖解析というものは、一般に、ある相に存在している細胞の数をかぞえて、その相の時間的長さを計算する、というプロセスが基本になっている。この計算のために ADF が必要なのである。以下にそれをみよう。

いま $\tau=0$ から $\tau=T$ までの年齢をいくつかの部分 (相 phase) に分け (図 34-b の T_1, T_2, T_3 参照), $0 \leq \tau \leq \tau_1, \tau_1 \leq \tau \leq \tau_2, \dots$, とし、式(15)を分割すると

$$N = \int_0^{\tau_1} n(t, \tau) d\tau + \int_{\tau_1}^{\tau_2} n(t, \tau) d\tau + \int_{\tau_2}^{\tau_3} n(t, \tau) d\tau + \dots$$

$$= N_1 + N_2 + N_3 + \dots, \dots \dots \dots (16)$$

と分けられる。これは図 34-b において、細胞総数 N すなわちグラフの総面積をいくつかの相 T_1, T_2, T_3, \dots , に小分けして加え合わせても元のものになるということを意味している。図からもわかるように、式(16)の両辺の各項はたがいに等しい。したがって一般に

$$N_i = \int_{\tau_{i-1}}^{\tau_i} n(t, \tau) d\tau \dots \dots \dots (17)$$

が成立する。これは、ある相 i に存在する細胞の数 (N_i) とその相の長さ ($T_i = \tau_i - \tau_{i-1}$) の関係を示す一般式である。したがって、 $n(t, \tau)$ が知られているか、あるいは適当に仮定することができれば、測定した細胞の数から相の長さを推定したり、逆に相の長さからこの相に存在すべき細胞の数を推測することができるのである。そこで、この式を用いて定常状態 self-perpetuating state と完全増殖 (対数的増殖 exponential proliferation) 状態にある細胞集団のモデルをしらべてみよう。

a) 定常状態 self-perpetuating モデル

これは分裂した細胞の半数が分裂直後に CLLS として失われ、 N が増えない場合で、 $n(t, \tau) = C$, $C = \text{const}$ である。成体における交替組織の増殖細胞系はこの状態にあると考えられる。このとき

$$N_i = \int_{\tau_{i-1}}^{\tau_i} n(t, \tau) d\tau = C \int_{\tau_{i-1}}^{\tau_i} d\tau = C(\tau_i - \tau_{i-1}) = CT_i \dots \dots \dots (18)$$

$$T_i = \frac{N_i}{C}, \quad T = \sum T_i = \frac{1}{C} \sum N_i$$

すなわち、相の時間的長さとその相に存在する細胞数は比例する。比例定数 C は T_i のうちの 1 つを知ることによって消去することができる。

b) 対数増殖 exponential proliferation モデル

細胞数が、世代時間たつごとに倍加する。細胞数 $N(t)$ は、

$$N(t) = N_0 e^{\frac{\ln 2}{T} t} = N_0 e^{\nu t} \dots\dots\dots(19)$$

で与えられる。 $\nu = \frac{\ln 2}{T}$ は増殖率 proliferation rate であるが、細胞喪失がないと仮定しているの、これは生長率 δ と等しい。式(14)で与えられるように、 $n(t, \tau)$ は $N(t)$ を τ で微分すればよいのであるが、式(19)は t の関数であり τ では直接微分できない。そこで次のようにして式(19)を τ で表すことを試みる。

$n(t, \tau)$ において τ を 0 とおいた $n(t, 0)$ は、時刻 t において分裂直後にある細胞の密度であり、 $n(t, 0) dt$ は分裂直後の細胞の数である。このうちの半数は時刻 t において増加した細胞とみなしうるから、これは $dN(t)$ に等しい。

$$dN(t) = \frac{1}{2} n(t, 0) dt, \quad \frac{dN(t)}{dt} = \frac{1}{2} n(t, 0)$$

式(19)から

$$\frac{dN(t)}{dt} = \nu N_0 e^{\nu t}$$

$$\therefore 2\nu N_0 e^{\nu t} = n(t, 0) \dots\dots\dots(20)$$

となる。ここで時刻 t から τ だけ遅れた時刻 $t' = t + \tau$ を考える。このとき、もとの t では $\tau = 0$ だった細胞 $n(t, 0)$ は数が不変のまま年齢が τ だけ進み、 t' では τ まで動いてきているはずである。したがって

$$n(t, 0) = n(t + \tau, \tau)$$

となる。これを t' で書き替えると

$$n(t' - \tau, 0) = n(t', \tau)$$

式(20)を、この関係を用いて書き直すと、

$$2\nu N_0 e^{\nu(t' - \tau)} = n(t' - \tau, 0) = n(t', \tau) \text{ となり、ダッシュをやめて一般的な } t \text{ で書くと}$$

$$n(t, \tau) = 2\nu N_0 e^{\nu t} e^{-\nu \tau} = 2\nu N(t) e^{-\nu \tau} \dots\dots\dots(21)$$

となる。これが対数増殖系の ADF である (図 35 上の図)。対数増殖系における N_i と T_i との関係を求めるには、これを式(17)に入れればよい。

$$N_i = 2\nu N(t) \int_{\tau_{i-1}}^{\tau_i} e^{-\nu \tau} dt = 2N(t) e^{-\nu \tau_{i-1}} (1 - e^{-\nu T_i}) \dots\dots\dots(22)$$

式(22)の中に τ_{i-1} が含まれていることからわかるように、この場合は、ある特定の相の長さ T_i と、その相に存在する細胞数 N_i との関係を知るためには、その相の始まる年齢 τ_{i-1} が既知でなければならない。たとえば DNA を合成しつつある細胞の率 (すなわち瞬間標識率 LI_0) を知って、S 期の長さ t_s を計算するためには、それに先だつ G₁ 期の長さ t_1 が与えられている必要がある。すなわち

$$LI_0 = \frac{N_s}{N(t)} = 2e^{-\nu t_1} (1 - e^{-\nu t_s}) \dots\dots\dots(23)$$

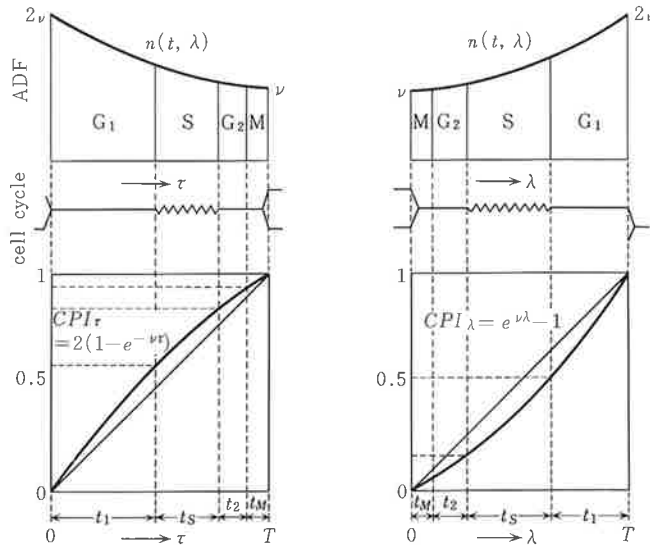


図 35 細胞の分裂サイクルと ADF と CPI

図の上段の ADF を τ に関して積分したものが下段の CPI (cumulative phase index) である。対数的増殖をしている細胞集団において、ある相に存在する細胞数の全増殖細胞数に対する割合(率あるいは%)がわかっている場合、その相の時間的長さを知りたい場合や、その逆を知る必要がある場合に使用できる。左側の図 CPI_τ は年齢を分裂直後からかぞえはじめる場合で、右側 CPI_λ はそれとは逆に分裂直前からさかのぼってかぞえる場合である。たとえば G_1 期の長さ t_1 がわかっている場合なら左側の図で横軸に t_1 をとり、点線に従って上へたどり CPI_τ を切る点を横へ伸ばして縦軸を読むと約 0.6 となるから、この糸で t_1 は T の約 45% しかないが G_1 期の細胞は約 60% を占めていることがわかるわけである。一方、分裂像の%を知って M 期の長さを読む場合は右側の CPI_λ を使うほうが便利である。この場合は縦軸を下から MI 分だけとり、図の点線に従って横へみてゆき CPI_λ との交点を下へとる。MI が約 5% しかなくとも t_M は T の 7% にあたるということがわかる。

となる。この計算を手軽に行うために CPI (cumulative phase index) のカーブを用いることができる。これは $n(t, \tau)$ を $\tau=0$ から τ まで積分した値を全細胞に対する比として描いたもの(図 35 の下の左の図)で、

$$CPI_\tau = \int_0^\tau n(t, \tau) d\tau / \int_0^T n(t, \tau) d\tau = 2(1 - e^{-\nu\tau}) \dots\dots\dots (24)$$

となる。このグラフを使えば特定の相に存在する細胞数の率から相の長さを読み取ることができる。しかし、このとき、どの年齢から読み始めるか前もってわかっているなければならない。というのは上述したようにその相が全分裂サイクルのどこに位置するかによって値は相当違ってくるからである。なお、特別の場合として、この図で τ が T に比べて小さいとき CPI_τ は原点における接線で近似できることがわかる。原点での勾配は、

$$\frac{dCPI_\tau}{d\tau} = 2\nu e^{-\nu\tau}, \quad \tau=0 \text{ のとき } \frac{dCPI_\tau}{d\tau} = 2\nu$$

であるから、近似式は、

$$CPI_\tau \doteq 2\nu\tau = \frac{2\ln 2}{T} \tau, \\ \tau = \frac{T}{2\ln 2} \cdot CPI_\tau = 0.72 T \cdot CPI_\tau \quad \dots\dots\dots(25)$$

これは分裂直後の細胞数の率からその相の長さを算出する式として用いられる。

一方、上述の CPI_τ は分裂直後から次の分裂まで、自然界で年齢の進む方向に積分したが、その逆方向に年齢をかぞえ（これを λ とする）、分裂直前からその前の分裂までの CPI_λ をつくと便利なことがある。それにはまず $\tau = T - \lambda$ とおいて式(21)に代入する。

$$n(t, T - \lambda) = 2\nu N(t) e^{-\nu(T - \lambda)}$$

ここで $e^{-\nu T} = e^{-\ln 2} = 1/2$ であるから

$$n(t, T - \lambda) = \nu N(t) e^{\nu\lambda}$$

となる。 λ を横軸として描くと、この ADF は図 35 の右側上の図のようになる。この場合の CPI_λ は

$$CPI_\lambda = \int_0^\lambda n(t, T - \lambda) d\lambda / \int_0^T n(t, T - \lambda) d\lambda = e^{\nu\lambda} - 1 \quad \dots\dots\dots(26)$$

であり、図 35 右下に示すような曲線となる。この式が式(24)に比べて有用なのは、一般に M 期と G_2 期の長さの和 ($t_M + t_2$) が比較的短く、かつ一定であるため、 T の長い細胞系で瞬間標識率 flash-labeling index (LI_0) から DNA 合成相の長さ t_s を見積る場合に、 $t_M + t_2$ が正確にわかっていなくても、これを適当に見積って原点からとり、その上に LI_0 を積みあげて t_s を読み取るというようなことが可能になること、あるいは、分裂像の数の率 mitotic index (MI) から t_M を見積る場合に、M 相は原点にきわめて近い部分に限局しているので CPI_λ ならこれが直読できるという利点があるためである。とくに後者の目的には、式(24)から(25)を得たのと同じように、 $\lambda \ll T$ だから CPI_λ を原点における接線で近似して、

$$CPI_\lambda \doteq \nu\lambda \\ \therefore \lambda = \frac{1}{\nu} CPI_\lambda = \frac{T}{\ln 2} CPI_\lambda = 1.44 T \cdot CPI_\lambda \quad \dots\dots\dots(27)$$

とすることができる。分裂時間 t_M はこの式を用いると T と MI から

$$t_M = 1.44 T \cdot MI \quad \dots\dots\dots(28)$$

で計算できる。

c. 増殖解析の方法論とその応用

1) 連続標識法 continuous labeling, cumulative labeling の理論と応用

この方法は $^3\text{H-TdR}$ を連続的に（あるいは t_s より狭い間隔で頻回に）細胞に取り込ませ、標識細胞の率（標識率 LI ）の経時的増加の仕方から増殖パラメータを読み取りようとするものである。対数増殖モデルで標識細胞の動きをみてみると図 36 のようになる。

まず $^3\text{H-TdR}$ が与えられると、図 36 の a に示すように S 相の全細胞が瞬間的にラベルされる。 $^3\text{H-}$

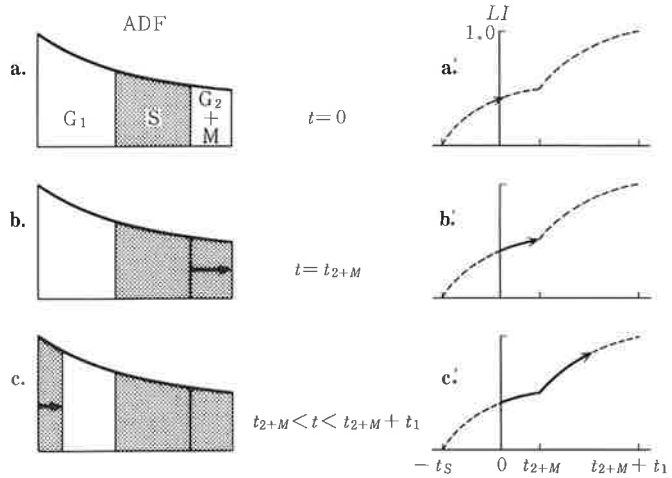
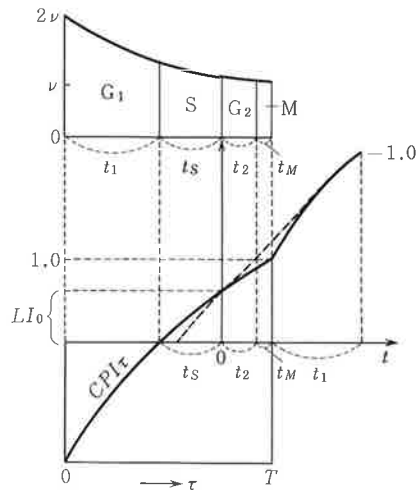


図 36 連続標識法において標識率の増加する様子

完全増殖系にたいし、 $^3\text{H-TdR}$ で連続的に標識を行った場合に標識細胞が各時間でどのように増加してくるかを示す模式図。

図 37 連続標識法における標識率増加曲線

連続標識を行うと標識細胞は CPI_{τ} に従って増加してくる。 $t=0$ では S 期の細胞だけがラベルされるから CPI_{τ} のうち t_0 に相当する部分だけ進んだ高さが LI_0 となり、連続標識曲線はここからスタートすることになる。ここから t_2+t_M 進んだところで変曲点が現れるが、これは分裂によって標識細胞の増加率が 2 倍になることに対応している。曲線は $(t_2+t_M+t_1)$ 時間後には 100% に達する。これは $(T-t_0)$ に相当する。100% に達した点と $t=0$ の LI_0 を結んだ直線 (点線) は系を定常状態と考えた場合の標識率の増加の様子を表している。



TdR が連続的に与えられるので、この時刻から後に S 相に流入する細胞はすべて標識される。一方、S 相をでた標識細胞は G_2 へ、ついで M へと進み (図 36-b)、分裂が終わると G_1 相のはじめにもどる (図 36-c)。 $t_{2+M}+t_1 (= T-t_0)$ 時間後には S 相のはじめに達し、ここで全細胞が標識された状態になる。図 36 をみると、標識細胞の増加していく様子が CPI で表現できることがすぐ理解できる。すなわち、 $t=0$ では標識率は LI_0 (flash labeling index) そのものであり、式 (23) で与えられる値をとる。これは CPI_{τ} を t_1 の終わりから t_0 だけたどったときの縦軸の長さ に等しい (図 37 参照)。 ついで標識率は CPI_{τ} を t_2 、 t_M へ延ばしてゆくと同じ曲線に従って増していき (図 37)、分裂が終わると今度は t_1 期の CPI_{τ} に従って増加をつづけ、 t_1 の終わりにはついに 100% に達する。したがって連続標識における標識率の増加曲線は、 CPI_{τ} を t_1 の終わりで切って、 t_1 の部分を平行移動し、 t_M の後ろへ継ぎ足したような形 (図 37) になる。ただ、この図に描かれているカーブのうち実測できるものは t_2 、 t_M (あるいは t_{2+M}) および t_1 の部分だけであり、 t_0 の部分は外挿によって知りうるにすぎない。実際の標識率の測定値がこの曲線をどのように描いていくかは図 36 の右側 a', b', c' に示されている。この曲線が得

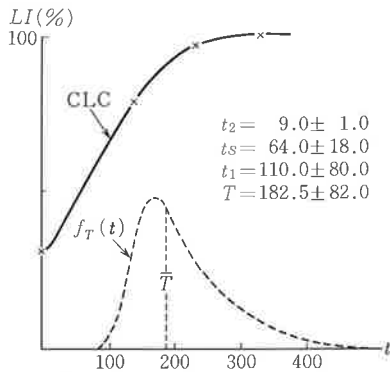


図 38 ヒト扁平上皮癌の連続標識法による増殖解析
 ×印は局所連続標識による癌細胞の標識率の増加データであり、これにフィットさせた曲線 CLC は図中表示したパラメータを使ってコンピュータでシミュレーションを行った結果である。各パラメータの分布は図中点線で $f_T(t)$ について示したのと同じ対数正規分布を採用している。横軸の単位は時間である。

られれば、ADF を決定することができるし、図から t_{2+M} , t_s および T を求めることができる。

細胞系が定常状態にあるなら、式(18)より $CPI_T = C \cdot t$ であるから、連続標識における標識率の増加は図 37 の斜めに走る点線で示したように直線となる。この場合は t_{2+M} の変曲点がどこにあるかわからなくとも、100% 標識に達する点と LI_0 (あるいは任意の 2 点を) 知りさえすれば、 t_s および T を求めることができる。

一般に動物の可移植性腫瘍では、対数増殖モデルに近いものが多いと考えられるが、人体の腫瘍では増殖速度に比べて生長がずっと遅いので、どちらかといえば定常状態に近い年齢分布をしていると想像され、したがって、この場合の母集団のパラメータ値はデータの 2 点を結ぶ直線で推定したもののほうが近いと考えられる。表 2 に含まれる連続標識法によるパラメータの値は、これら 2 つのモデルを用いて計算した 2 通りを示したが、対数増殖モデルの値のほうが [] で囲んである。これは、人癌では定常状態モデルのほうがむしろ真の値に近いと考えたからである。

実際的应用において、連続標識法は好都合な点もっている。それはサンプル数が最低 2 個あればよいという点である。手術を予定されている腫瘍塊に小さなマークをつけ、その部分に 12 時間おき (ヒトの癌細胞の t_s の最小のものはこの程度である) に $^3\text{H-TdR}$ をごく微量ずつ頻回注射を行い、切除直前に別の場所に 1 回だけ瞬間標識を行うことによって人体腫瘍のデータを集めることができる。表 2 の中の [] つきのデータは 1960 年代に、この方法を利用して集められたものである。マークを複数個つけ、それぞれ頻回標識の期間を変えたものでは 1 回の根治手術材料から複数個のデータ点が得られる²²⁾。図 38 は、このようにして得られた実測値と、それにコンピュータで最適にフィットさせた曲線である。図中の数値は、この曲線から計算した対数正規分布の平均値と標準偏差 (時間で表してある) であり、上から t_2 , t_s , t_1 , T の順に表記されている。この症例で 6 日間の連続標識で得られたオートラジオグラフを図 39 に示しておく。

この連続標識法は、対象とする細胞に増殖周期のばらつきが少々あっても、その動態の全体像を把握するのに有効な方法である。というのは、この方法は増殖しているすべての細胞を対象としているので、もし 100% 近い標識が得られた場合、すべての標識細胞がこの時間のうちに少なくとも 1 回は増殖したことを明確に示すからである。人癌の特徴は、それを構成する腫瘍細胞の T が一般に長く、かつばらつきがきわめて大きいことである。連続標識法は、ゆっくり増殖している細胞の T の上限を定量的にとらえる点で優れている。

図 39 ヒト扁平上皮細胞癌の
 $^3\text{H-TdR}$ 連続標識

扁平上皮からなる喉頭癌転移巣に 6 日間 $^3\text{H-TdR}$ の連続標識を行ったのちのオートラジオグラフ²²⁾。この解析データは図 38 に示されているが $T=7.5\pm 3.4$ 日, $t_1=4.6\pm 3.3$, $t_s=2.7\pm 0.75$, $t_{2+M}=0.37\pm 0.04$ (日)と見積られた。GF はほぼ 95% であり、残りの 5% は parakeratotic な細胞であった。ほとんどすべての細胞が、この期間に $^3\text{H-TdR}$ を取り込んでいることに注意されたい。

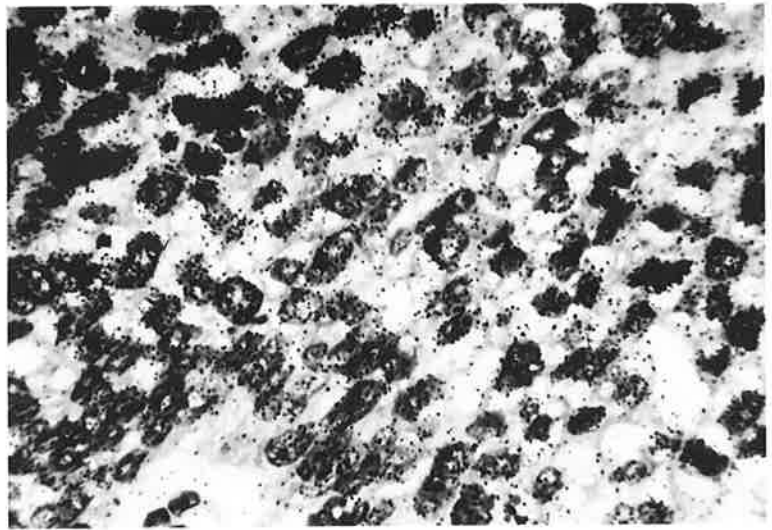
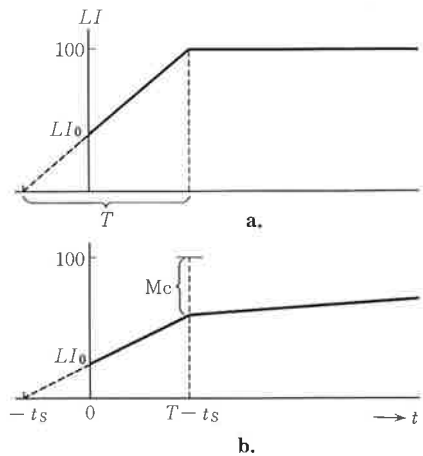


図 40 均質な系と成熟コンパートメントを含む系における連続標識パターン

系が均一な増殖細胞からなっている場合には、連続標識における標識率 LI は (定常状態の場合) 直線的に増加してそのまま 100% に達する。しかし、増殖をしない成熟コンパートメントを含んでいる場合には、そのところで増加率が変わる (b の図)。したがって連続標識曲線から系の動態上の均一性がある程度おしはかることができる。



連続標識法のこの利点は、腫瘍の中に増殖キネティクスの異なった 2 種類 (あるいはそれ以上) の細胞が混じっている場合、これを区別して認識するために利用できる。図 40-b に示すように、系の中に成熟細胞が集積していれば、連続標識増加曲線は増殖細胞コンパートメントの中だけでまず 100% となり頭打ちになる。その後の増加は、増殖コンパートメントから成熟コンパートメントへの細胞移行の比率によって規定される。一般にこの増加率は、癌組織では増殖細胞の分裂周期回転による標識の増加と比べて著しく小さいから、長期の連続標識のデータが得られれば、系の中の非増殖細胞は定量的にとらえられる。一般的にいて、ヒトの癌の中には、非癌組織におけるような非増殖性成熟細胞は少なく、そのように見えるものも T の非常に長い増殖細胞と考えるのが無難である。ただし、胃の印環細胞癌やある種の乳癌など特定の分化を示す腫瘍は例外であり、このようなものでは連続標識法で標識のほとんどない分化した成熟細胞^{9, 79)}の存在が検出できる。

2) 二重標識法 double labeling method

一般に二重標識法といわれるものは、2種類の放射性同位元素(ふつう ^3H と ^{14}C)で標識したチミジンを使って一定の時間(t_a)だけずらした瞬間パルス標識を行い、2回目の ^{14}C -チミジン標識直後に固定したうへ、 ^3H だけで標識された細胞の率(H^*), ^{14}C だけのもの(C^*), ^3H と ^{14}C 両方でラベルされたもの(HC^*)をオートラジオグラフ上で算定し、それらの値からS期の長さ t_s および T を計算しようというものである。⁸⁵⁾ もっともよく用いられる公式は、定常状態モデルを使って

$$t_a/t_s = H^*/(C^* + HC^*), \text{ ただし } t_a < t_s$$

$$t_s = t_a(C^* + HC^*)/H^* \dots\dots\dots(29)$$

$$T = t_s/C^*, \therefore C^* = t_s/T \dots\dots\dots(30)$$

とするものである。これを対数増殖系に応用する場合には式(27)でデータを補正する。ただし実験動物の癌など T の短いものではS期はほぼ T の中央に近く位置するから、図35からわかるように、その値はほとんど補正を要しないだろう。

二重標識法はこのように単純明快な理論に裏打ちされており、かつサンプリングが1回ですむので大勢の人々によって使われてきた。しかし、その最大の問題点は C^* や H^* の算定がどの程度正確に行えるかというところにある。少なくとも著者自身の経験からいえば、標識された細胞のうちで ^{14}C がはいっていないことの判定はしばしば困難であった。この原因はおそらく原理的なものであって、 ^3H の β 線スペクトルと ^{14}C の β 線スペクトルは一部で重なること、特徴的であるはずの ^{14}C の β 線のうちの高エネルギー側のものは原子核乳剤をよく感光させない性質をもつためなどの理由によるのであろう。両核種の銀粒子トラックの鑑別に客観性を欠く場合がどうしても生じるのである。これを避けるために原子核乳剤を2層にしたり、⁸⁶⁾ 2回目のラベルを同じ ^3H -TdRを用い、量を10倍程度に増やす改良法もある。しかし峻別のむずかしい点では同じである。

3) パルス標識

a) 希釈追跡法 label dilution method

これは初めに与えた ^3H -TdRがいったん腫瘍細胞に取り込まれたのち、新しく合成される非標識DNAによってだいに希釈されていく過程をオートラジオグラフ上の銀粒子密度の減少としてとらえ、その半減期を細胞の T としようという方法である。⁴⁴⁾ この方法も原理的にはきわめて明快であり、非増殖細胞を含んでいるような細胞集団にも有効に用いられる利点もあり、2,3の応用が^{44, 87~89, 99)} みるられる。しかし、⁸⁷⁾ 標識後非増殖性になってしまった細胞にはいったラベルがいつまでも高い銀粒子数を保有している場合や、はじめから標識密度の低かった細胞でまもなく非標識細胞との区別がつかなくなってしまうものの比率が無視できない場合などでは T が誤って長く算出される誤差が生じることが指摘されている。⁸⁸⁾

b) 移動追跡法 migration chase method, shift method

この方法は顕微測光法による核DNAの測定と ^3H -TdRオートラジオグラフィによる銀粒子の検出を組み合わせて内容豊かな細胞動態のデータを得ようというものである。歴史的に、この方法はまず細胞に ^3H -TdRをパルス標識し、一定時間後(あるいは経時的に)塗抹標本をつくり、オートラジオグラフィを行ってから写真撮影し、ついで乳剤をすっかり取り除いて写真に対応する細胞を1個1個顕微測光するというやり方で行われた。このように労力を要し、かつ失敗率の高い方法にもかかわらず、

1960年代にはいくつかの報告がみられる。^{46, 90, 91)}しかし落射型顕微蛍光測光法が開発され、標本はオートラジオグラフィを行ったままで、銀粒子を確かめながら、しかも銀粒子に妨げられずにDNA定量を正確に行うことができるようになってから、この方法の応用が広がった。⁹²⁾さらに1974年には、きわめて少数個の細胞を対象にして、しかも1回(ないし2回)のサンプリングで細胞周期をきめることのできる“shift法”が案出されたので、その応用範囲はきわめて微量かつ不均一な材料にまで拡大された。⁹³⁾図26に示す吉田肉腫腹水細胞の T (図の中に数値が書き込まれている)はこの方法できめられたものである。⁵⁸⁾その腹水癌は1個細胞の移植から生長してきたもので、初期には多数のマクロファージの中に少数個の腫瘍細胞が存在し、1回のサンプリングで数百個の肉腫細胞を得るのがやっとというような材料であった。以下に実例をあげてその方法を説明しよう。

b') シフト法の理論と応用例

いま、ある増殖細胞集団を $^3\text{H-TdR}$ でパルス標識し、そのパルスの幅すなわち $^3\text{H-TdR}$ が利用可能であった時間(available time)が t_p だったとしよう。パルス直後に標識細胞と非標識細胞のDNA分布を測れば、それは図41-aのようになるはずである。ここで灰色の部分 $^3\text{H-TdR}$ 取り込みを示す細胞のDNA量分布である。このあと適当にきめた t_w 時間待って同様の測定を行ってみたいとする。このとき $t_w - t_p$ が t_{2+M} より短かったとすれば、測定結果は図41-bのようになり、 $t_{2+M} < t_w - t_p < t_{2+M} + t_1$ ならば図41-cのようになると考えられる。このときもっとも速く動いた細胞が $(t_w - t_p)$ 時間に合成したDNA量を d_p 、平均値的な動きを示すものを d_a 、もっとも遅いものを d_s とすれば、図41にみられるように、それぞれの速さで全DNA量 d を合成し終わる時間 t_s は次式で与えられる。

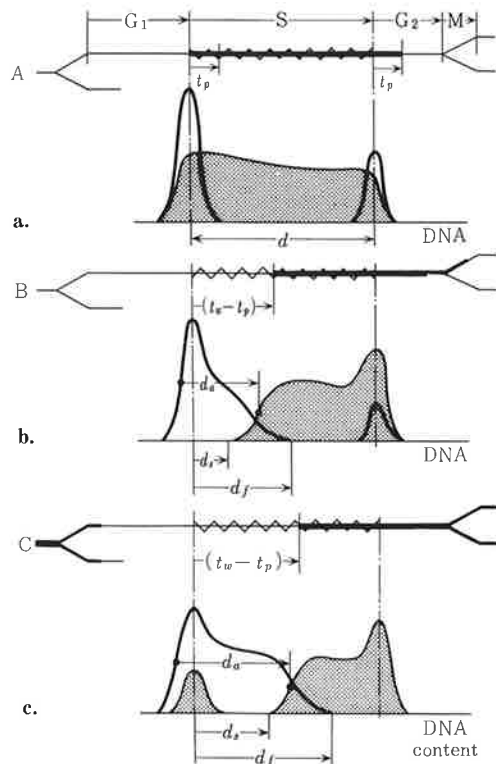


図41 $^3\text{H-TdR}$ オートラジオグラフィとDNA顕微測光から増殖解析を行うシフト法の原理

aは対象とする細胞集団に $^3\text{H-TdR}$ を与え、ラベルが利用可能な時間 t_p だけ待った場合の標識細胞の分布を示している。通常 t_p は $^3\text{H-TdR}$ のavailable timeとよばれるものに一致し、約30分程度である。aは、このとき細胞を採取し、オートラジオグラフィを併用したFeulgen DNA染色を行い、個々の細胞をラベルのあるもの(陰影の山)とないもの(2つのピーク)に区別しながらDNA定量を行った場合の結果を示している。灰色の山はS期の細胞、2つのピークは G_1 と G_2+M の細胞のDNA量を示している。bとcはさらに t_w 時間だけ待ってから細胞を採取した場合であり、bは t_w が G_2+M より短く、cは長い場合である。

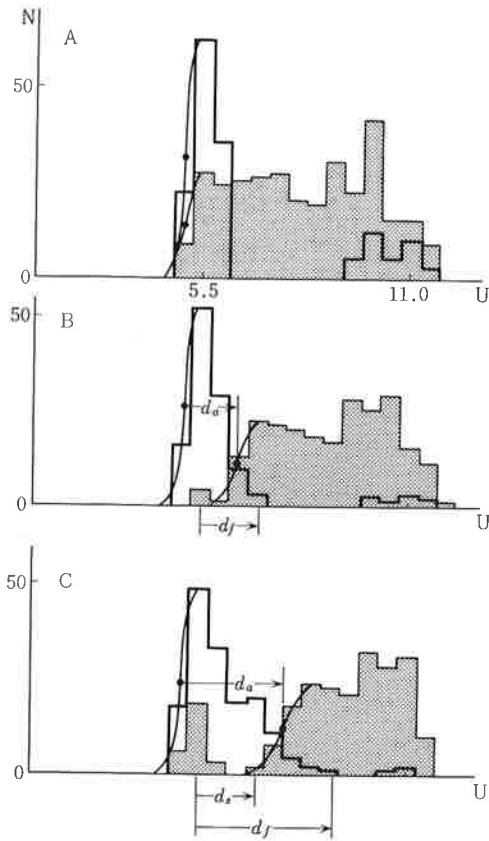


図 42 吉田肉腫腹水型 Y S 株へのシフト法の応用

- もっとも短い $t_s : (t_w - t_p) / t_s = d_j / d$
- 平均的な $t_s : (t_w - t_p) / t_s = d_a / d$
- もっとも長い $t_s : (t_w - t_p) / t_s = d_s / d$

実測値をこの3式に入れると3つの t_s が計算できる⁹³⁾。図 42 は上述の少数個吉田肉腫の実測データである。A は $^3\text{H-TdR}$ 注射後 15 分 ($t_p=0.25$ 時間), B は 2 時間後 ($t_p=2$ 時間), C は 4 時間後 ($t_p=4$ 時間) で, 図は d が 5.5 U になるようそろえて描かれている。図 42-C の実測値を上記の3式に入れ, 3つの t_s は 5.8, 7.5, 13 時間と決定された。このデータと瞬間標識の測定値 (図 42-A) から細胞周期は以下のように決定できる。

図の A から G_1 期の細胞 25.1%, S 65.1%, G_2 が 7.4%, M 2.3% という値が得られている。これに $t_s=7.5$ 時間という上述のデータを加えれば CPI_τ を使って, 対数増殖しつつあるこの系の増殖パラメータは次のように計算される。

$$CPI_\tau = 2(1 - e^{-\frac{\ln 2}{T}\tau}) \dots \dots \dots (24)$$

$$CPI_{t_1} = 0.251 = 2(1 - e^{-\frac{\ln 2}{T}t_1})$$

$$t_1 = 0.194 T$$

$$CPI_{t_1+t_s} = 0.251 + 0.651$$

これを式(24)に入れて解くと,

$$t_1 + t_s = 0.865 T$$

したがって、 $t_s = 0.865T - 0.194T = 0.671T = 7.5$ 時間

$\therefore T = 11.2$ 時間 (平均的世代時間)

$t_1 = 0.194 \times 11.2$ 時間 = 2.2 時間

$CPI_{t_1+t_s+t_2} = 0.251 + 0.651 + 0.074$

$t_1 + t_s + t_2 = 0.966T$

$t_2 = 0.966T - 0.865T = 0.101T = 1.1$ 時間

$t_M = 0.4$ 時間

この方法を応用することによって、1個の癌細胞 (YS 腹水癌) をラット腹腔に移植したのち、きわめて早期から増殖解析を行い、 10^9 個の大集団になるまでの細胞動態の変化が追跡された。その間に生長曲線は図 26 に示すように Gompertz 関数的に経過したが増殖の主体を構成する癌の stem-line の細胞の増殖パラメータは (ごく少し延びてばらつきが大きくなること以外) ほとんど変わらないことが明らかにされた (図 26)⁵⁸⁾。

c) 標識分裂追跡法 labeled mitosis chase method, analysis of labeled mitosis curve

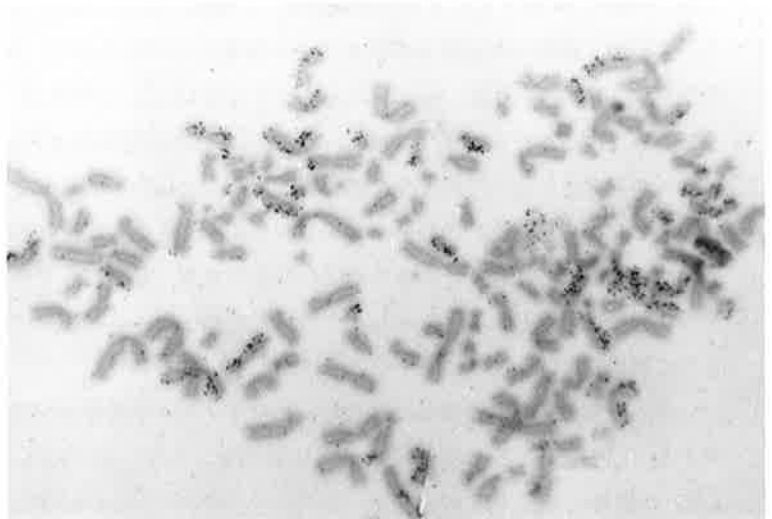
増殖サイクルの解析にもっとも頻繁に使われているのがこの標識分裂追跡法である⁹⁴⁾。それだけに利点もあり欠点もある。この方法を利用するにも、得られたデータを解釈するにも、つっ込んだ方法論的理解が必要である。この分析法の概要は次のようなものである。

増殖しつつある細胞群を $^3\text{H-TdR}$ で瞬間的に標識し、それ以後頻回にサンプルをとり、各時刻において、核分裂像 (図 43) の標識率 (全分裂像中 $^3\text{H-TdR}$ ラベルをもつものの率, fraction of labeled mitosis, FLM あるいは labeled mitosis index, LMI とよばれる) をかぞえ、その値を時間軸に対してプロットすると図 44 にみられるようなパルス波形が得られ、図形の実測から t_2 , t_s , T などのパラメータが得られる。

ここではまずこのような波形のでてくる理由から考察しよう。以下の説明を理解しやすくするため、

図 43 ヒト腹水中で分裂するスキルス性胃癌細胞のオートラジオグラフ

この癌細胞は胃スキルス癌症例の腹水の $^3\text{H-TdR}$ 標識から得られたもので、染色体数 141 の 3 倍体の aneuploidy を示す。この細胞では、染色体のうち一方のクロマチドの標識されているものが 35 個あり、 $^3\text{H-TdR}$ が与えられてから 4 回目の semiconservative replication が行われたことを示す。つまり、この細胞系は、異倍体であるが確実に分裂をくり返している増殖細胞であり、このスキルス性胃癌の増殖クローンの主体をなしている細胞であることがわかるのである。



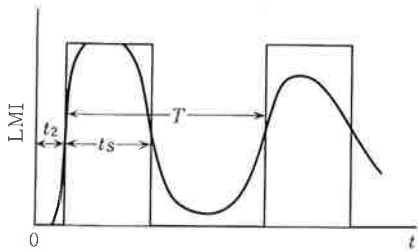


図44 $^3\text{H-TdR}$ のパルス標識後に観察される標識分裂 (FLM) 曲線

細胞系が均一な増殖細胞から構成され、かつそれらがランダムな相分布をしている(asynchronous) なら、LMI(labeled mitosis index) は図中の矩形波として現れてくるはずである。しかし、一般に t_1 , t_s , t_2 などのパラメータにばらつきがあるので、FLM の曲線は図中の滑らかなカーブで示されるような形で現れてくる。

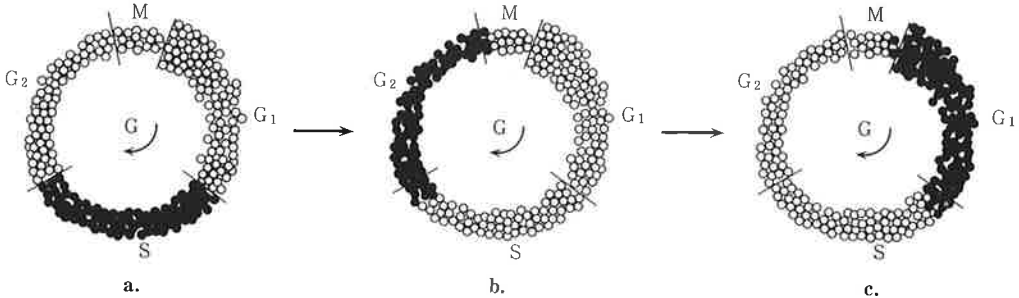


図45 $^3\text{H-TdR}$ のパルス標識後にみられる標識細胞の動き

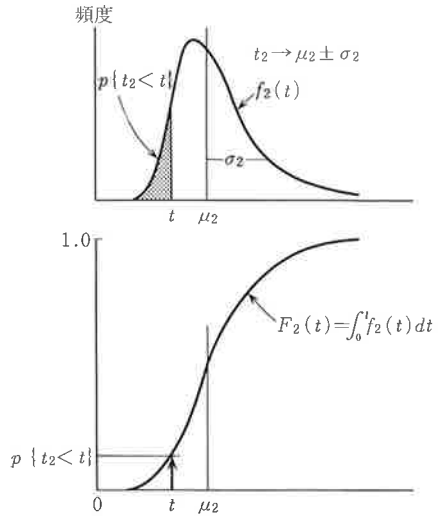
増殖コンパートメントの細胞をすべてよび集め分裂サイクルの環の上に年齢に従って整列させた図45-aの状態から出発する。いま $t=0$ において $^3\text{H-TdR}$ で標識した直後を考えると図45-aのようにS相にある細胞は全部(黒く)ラベルされている。次の瞬間からこれらの細胞は分裂サイクルをまわり始め $t=t_2$ たつと、標識細胞の群の先頭のもものがM相に到着し、ここで分裂を始める(図45-b)。この環の横に立って、分裂像だけを観察している人には、 t_2 時間後急に分裂像に標識が現れ速やかに100%に達するのがみえる(図45)。M期がかなりの時間つづくものなら、最初の標識細胞のフロントが分裂相にはいってからM期の終わりまで進む間 FLM は斜めに直線的増加を示し1.0に達するはずである。しかし一般にM期と認定される分裂中期(と後期)は短いので、この直線はほとんど垂直となるであろう。一方、細胞はその後も分裂サイクルを進みつづけるので、ラベルされた集団はこの時点から t_s 時間たつとM期を通過し終わることになる(図45-c)。このとき FLM は再び直線的に降下し0となるであろう。スタートから T 時間たつた時点で標識細胞集団は完全に元に(図45-a)もどり、分裂サイクルが再開される。このような理論的予想を図にしたのが図44の矩形波である。

しかしながら、細胞の分裂サイクルのパラメータ(つまり細胞が環に沿って動く速度)はすべての細胞について同一ではなく、かなりのばらつきがある。したがってパルス波形は実際の観測では図44の滑らかな曲線で示したような崩れた形で現れてくる。このパラメータのばらつきと波形の崩れは以下の⁹⁵⁾ように定量的に取り扱うことができる。

いま、分裂サイクルのばらつきをもったパラメータを確率密度関数 $f_1(t)$ で表現することができると考える(図46)。ここで図45のように t_2 に例をとろう。 $f_2(t)$ は t_2 の長さの分布を表している。また、 $f_2(t)$ の積分

図 46 分裂サイクル各相の長さの確率分布関数とその生物学的な意味

上図は、例として、G₂期の長さの分布を対数正規分布と考えた場合の確率密度関数 $f_2(t)$ を示している。平均値は μ_2 、標準偏差は σ_2 である。アミ点の面積は $t_2 < t$ となる場合の確率 $p\{t_2 < t\}$ を示す。これは、顕微鏡下で観察している1個の分裂像が、固定されるより t 時間前に ³H-TdR を与えられていたとすれば、そのときには最後の G₂ にはいておらず、したがって標識されていたかもしれない確率を与える。この確率は、下の図のように $f_2(t)$ の積分 $F_2(t)$ である確率分布関数を考えると端的に $p\{t_2 < t\} = F_2(t)$ で表せることがわかる。



$$F_2(t) = \int_0^t f_2(t) dt \dots \dots \dots (31)$$

は、統計学で一般に分布関数とよばれているが(図 46-下)、これは“ t_2 が t より短い” 確率 $p\{t_2 < t\}$ を表している。

$F_2(t)$ の実際的な意味はこうである。いま、あなたが顕微鏡下に分裂像を1つみているとする。その細胞系の $f_2(t)$ を使って式(31)で $F_2(t)$ を計算した値がわかっているなら、この $F_2(t)$ は、あなたのいまみている細胞が、固定されるより t 時間前にまだ最終的な S 期を終わっていない確率を与えている。というのは $F_2(t)$ は $t_2 < t$ なる確率であり、 t は当然、最後の S 期かあるいはそれより前の相にはいり込んでいるはずだからである。同様に $f_{2+s}(t)$ を $t_2 + t_s$ の長さの分布を表す密度関数とすれば $F_{2+s}(t)$ は、この細胞が t 時間前にまだ最後の S 期にはいていない確率を与えていると解釈できる。したがって

$$F_1(t) = \{F_2(t) - F_{2+s}(t)\} \dots \dots \dots (32)$$

は、この分裂像を示す細胞が固定される t 時間前に、最後の S 期にいた確率を表す。³H-TdR が t 時間前に与えられていたとすれば、式(32)は、この分裂像が最後の S 期で標識された率を与えているのである。実際の分裂サイクルのパラメータには大きなばらつきのあるのは上述したとおりである。したがって、いまみている分裂像の標識が t 時間前に最後の S 期ではなく、それより1つ前の S 期あるいは2つ前の S 期あるいは…… i 回前の S 期にあってラベルされたものである可能性がある。そこで $F_{1+iT}(t)$ を i 回前の S 期によって標識された確率とすれば、それらを5回分加算し、

$$F(t) = \sum_{i=0}^4 F_{1+iT}(t), \dots \dots \dots (33)$$

ただし $F_{1+iT}(t) = \{F_{2+iT}(t) - F_{2+s+iT}(t)\}$

の $F(t)$ を用いれば相当大幅なばらつきをもつ分裂サイクルにおいても正確な標識分裂曲線 labeled mitosis curve を理論的に合成できる(図 47)。

確率密度関数 $f_i(t)$ が正規分布や Γ 関数など特定の関数である場合には、その分布関数 $F_i(t)$ は解析的に求めることができる。しかし一般にこの積分を遂行することは困難なので、数値計算的にコンピュータの中で分裂サイクル各相のパラメータに相当する(ばらつきをもった)乱数を発生させ、これを加

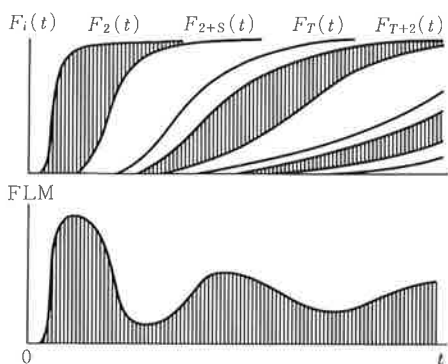


図 47 分裂サイクル各相の確率分布関数から標識分裂曲線は容易に導かれる

$F_2(t)$ は、対象とする分裂像が t 時間前にはまだ最後の G_2 期へはっていない確率である (図 46 参照)。同様にして $F_{2+S}(t)$ が G_2 と S 期の長さを加えたものの確率分布関数であるならば、これは t 時間前にまだ最後の S 期へはっていない確率を与える。したがって $\{F_2(t) - F_{2+S}(t)\}$ が、 t 時間前に最後の S 期にはいていた確率を与えることがわかる。図では、最後から 3 回前までの S 期にはいていたかもしれない可能性を考慮しているが、ばらつきの非常に大きい場合を考えると 5 回程度考慮に入れておくのが好ましい。上の図はこの分布関数の引き算を示すが、その縦線で塗りつぶした部分(差)だけを取りだすと下の図のように FLM 曲線が現れてくる。

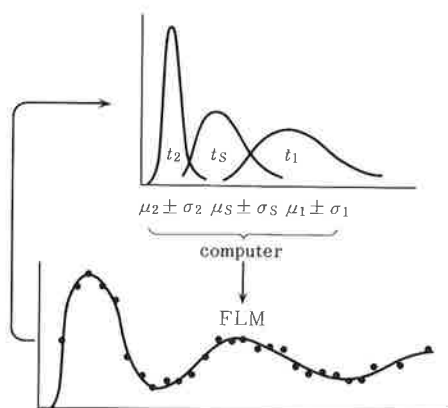


図 48 コンピュータ・シミュレーションによる標識分裂曲線の解析

はじめに、分裂サイクルの各相の長さの分布を対数正規分布で近似する。これは適当な平均値 μ と標準偏差 σ を仮定するだけでよい。これは別に正しい値である必要はない。計算をすると、どのように修正すべきかがわかり、計算をくり返しているうちに正しい値へ近づくから、単にその出発点を与えるだけでよいのである。コンピュータの中でモンテカルロ法で分布関数をつくり、引き算を行って FLM 曲線を得、これと実測データと比較し、もっともよく適合するよう μ と σ を自動的に変えながら計算を反復する。Ashihara の optimization technique⁹⁵⁾はこの計算を高速で行うプログラムである。

算して $F_i(t)$ を算出するモンテカルロ法が用いられる。⁹⁵⁾ 図 48 は、このプロセスを図示したもので、 $f_i(t)$ の確率密度関数としては、もっともよい結果を与えた対数正規分布を使っている。⁹⁶⁾ Ashihara は、この計算の最適化を自動的に行い、つねに実測値によくフィットした曲線を速やかに計算するプログラムを作製した。

図 49 は、この方法によって解析した人癌細胞の FLM 曲線で、対象は腹水化した子宮内膜癌である。⁹⁷⁾ この最適曲線を得たときに使用した各パラメータの値を図 49-a に示す。これらの値は対数正規分布における平均値および標準偏差である。また、図 a 中の点線のカーブは T の長さの、ばらつきをもった確率密度関数を示している。

人癌の T の分布としては、この症例のようにきれいなものはまれである。それにもかかわらず、このような症例においてすら $f_T(t)$ の裾広がり分布からわかるように T に非常なばらつきのあるのが特徴的である。極端なものを比べると T の長さにはこの例でも数倍の開きのあるのがわかる。人癌では一般に、これよりもっとばらつきのあるパラメータをもつのがふつうである。人癌の FLM 曲線で、しばしば第 2 の山も認められない崩れたカーブしか得られないのは、⁶⁸⁾ このような理由によると考えられる。1 つの腫瘍の中の癌細胞でありながら、 T がきわめてばらついており、はなはだしく長い T を

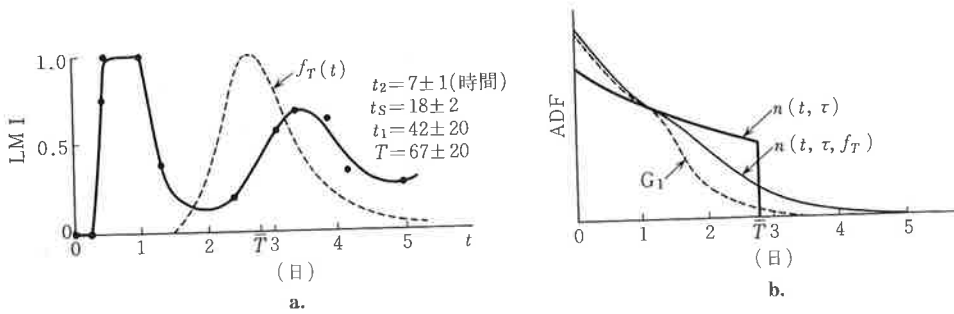


図 49 子宮癌細胞の FLM 解析とその ADF

- a. 55 歳の子宮内膜癌の症例で、腹水化した癌細胞にパルス標識を行い、以後経時的に腹水を採取して標識分裂率 LMI を測定したデータ (黒点) および、そのデータにもっともよく適合するようモンテカルロ法と Ashihara の optimization technique でシミュレートした FLM 曲線を示す。右側の数値は、このシミュレーションで得られた各パラメータの最適対数正規分布の平均値 μ と標準偏差 σ である。なお世代時間 T の分布 $f_T(t)$ のカーブを点線で示す。 \bar{T} は T の平均値である。
- b. T のばらつきを考慮に入れた場合の年齢分布関数 $n(t, \tau, f_T)$ を本症例について示す。ばらつきのない場合は $n(t, \tau)$ で太線で描かれている。点線は G_1 相だけの細胞の分布を示す。

もつものが存在しているということは、増殖細胞を標的とする治療を行おうとする場合、重要な意味もってくるのでとくに注意を払う必要がある。

このような長い T をもつ細胞を、非癌あるいは正常細胞系における細胞分化の結果でくる G_0 細胞と同じような、可逆的に分化した細胞と考える人もあるが、これは、一部の例外を除き正しくない。ヒトの癌の中にはつねにきわめて長い T をもつ細胞がある。それらは、しかし T の分布をみるかぎり、1つの増殖性癌細胞集団の共通のメンバーであり、環境条件の悪化と確率論的なゆらぎの結果、必然的に派生しているものにすぎないと考えられるのである。

4) 瞬間標識法 flash labeling method

この方法では、組織あるいは細胞を短時間 $^3\text{H-TdR}$ でラベルし、ただちに (ふつう 30 分から 2 時間後くらいに) 固定してオートラジオグラフをとる。この方法で可能となるのは、ラベルを取り込んでいる DNA 合成細胞と同じような形態をもつ細胞を 1つのグループとして増殖細胞と同定し、それらが組織中でどのような局在を示すか、標識率 LI_0 はどの程度か、などを決定できるところである。これらの情報は、先に 1)~3) に述べた経時的な解析法において対照や出発点のデータとして重要であるばかりでなく、それ自身でかなりの程度の細胞動態解析を可能とする内容をもっている。オートラジオグラフの中で増殖細胞を形態的に同定できれば、 LI_0 が算定でき、式(18)あるいは式(25)によって、 t_s/T が推定できる。 t_s の長さについて、ある程度の見当がつけられるなら、ここから T が推算できることになる。

この方法が有用であるのは、短時間の標識を固定直前に 1 回行うだけでよいところにある。ヒトの材料についても、手術切除時あるいは手術的切除後に経脈管的に、組織内直接注入により、ラベルすることが行われているし、また組織の小片 (バイオブシーを含む) を超生体的に in vitro で標識することも手軽に実行できる利点がある。図 50 の例はヒトの胃の adenoplastic type の早期癌の瞬間標識法による

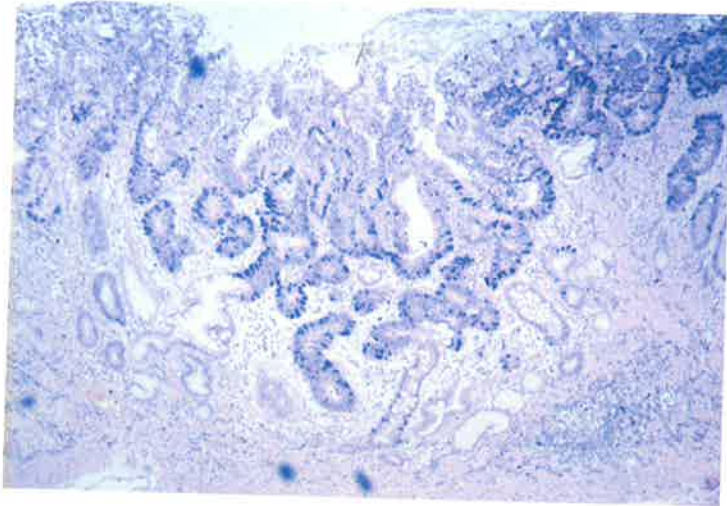


図 50 ヒト胃粘膜内高分化型腺癌の³H-TdR 瞬間標識オートラジオグラフ

このタイプの癌(adenoplastic type)は、粘膜の中にあるときから、粘膜のどの高さでも活発に DNA 合成をする。その標識率は 13~33% の範囲にあり、早期癌でも進行癌でもほとんど変わらない。ただ、この図のような表在生長型のものでは胃内腔への剝脱が高度に起こり、生長はきわめて緩やかである。この図でも表層細胞の DNA 合成能の低下と変性壊死が認められる。

るオートラジオグラフであるが、このようなタイプの癌が初期からすでに粘膜底部と表層の間に広がり、 Lt_0 は 13~33% であって増殖は粘膜の深部でも変わりなく行われていること、表層はしばしば壊死剝脱の傾向を示していること、など有用な所見が読み取れるのである。

d. 増殖パラメータのばらつきを考慮した取り扱い

上に述べたように腫瘍細胞の増殖周期 generation cycle には一般にばらつきがあり、人癌ではとくにそれが大きいことが明らかとなった。したがって、癌細胞の増殖のデータを解釈するさい、ばらつきの影響を正しく考慮に入れる必要がある。これを明確に把握するため、まず ADF (図 33 参照) がどのように変わるかをみよう。

いま T の分布が確率密度関数 $f_T(t)$ で表されるとすると

$$F_T(\tau) = \int_{\tau}^{\infty} f_T(\tau) d\tau \dots\dots\dots (34)$$

はこの細胞が年齢 τ より長い T をもつ確率 $p\{\tau < T\}$ であるから、年齢が τ と $\tau + \Delta\tau$ の間にある細胞数の率 fraction はばらつきのないときの ADF に $F_T(\tau)$ をかけ合わせた形となり、

$$n(t, \tau, f_T) \Delta\tau = \{2uN(t)e^{-\nu\tau} \int_{\tau}^{\infty} f_T(\tau) d\tau\} \Delta\tau \dots\dots\dots (35)$$

となる。これがパラメータにばらつきのある場合の ADF を与える。先に示した子宮内膜癌の $f_T(\tau)$ に例をとって (図 49-a 参照) この ADF を示せば図 49-b のようになる。ここでは $f_T(\tau)$ は対数正規 lognormal 分布をもち平均値 67 時間、 $\sigma = 20$ 時間のばらつきを示している。図 49-b で、 $n(t, \tau, f_T)$ は $n(t, \tau)$ に比べ $\tau = \bar{T}$ の肩が崩れ、 τ の大きいほうへ尾を引いた形となっている。また $\tau = 0$ のところでは $n(t, \tau, f_T)$ が $n(t, \tau)$ よりかなり高くなっているのがわかる。これはばらつきのある場合には \bar{T} (世代時間の平均値) たつと細胞数が 2 倍以上に増えることを意味している。したがって、この場合、CLLS がまったくなくとも \bar{T} と D は等しくなく、つねに $D < \bar{T}$ である (ばらつきのない場合は $\bar{T} = T = D$)。この D と \bar{T} の差は正規分布の場合、近似的に $\sigma^2 (\frac{\log 2}{2\bar{T}})$ と表せる。

一般的にいて、パラメータのばらつきは G_1 期の長さ t_1 で大きく、 t_2, t_M, t_S で小さい。ばらつきの

大きいことが特徴的な人癌でも、現在まで報告されたほとんどすべての *FLM* 曲線で最初の山は明瞭である。⁶⁸⁾ この山は t_2, t_M, t_S によって形づくられるからである。これに対して第2の山は、これらのパラメータに t_1 が加えられることによってつくりだされる。多くの人癌の *FLM* 曲線では、この山が崩れ、しばしばピークのありかも不明であることが報告されている。図 49-b の中で点線で示された G_1 は、⁶⁸⁾ T のばらつきが t_1 のばらつきからだけ由来するものとして計算した t_1 の年齢分布関数である。 G_1 のばらつきがどのくらいあるかが読み取れるであろう。

4. 腫瘍生長における細胞喪失 cell loss

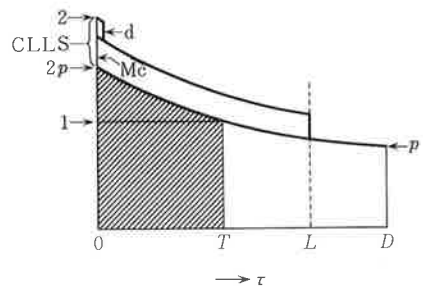
生体内で増殖しつつある細胞系では一般に図 32 のような細胞の流れが存在し、増殖細胞から別れて分化成熟する Mc 細胞 (maturing cell) や、短時間のうちに系から失われる d 細胞 (dying cell) が、たえず増殖コンパートメントから除去されている。このような系は、増殖解析の見地から、不完全増殖系とよばれる。

非癌・正常組織では細胞の分化の決定が分裂直後の G_1 期に、確率的に決定されるという事実が知られているから、一般に増殖細胞から定寿命細胞 CLLS になることの決定も分裂直後の G_1 期に、確率的にきまるものと仮定することが許されよう。このように考えると、系の T と D を知ることで、この不完全増殖系の ADF を描くことができる。この ADF から、系の T と D と CLLS 産生 (すなわち cell loss)^{24, 68)} の関係を定量的に把握することができるようになるのである。²⁴⁾ それを以下に述べよう。

不完全増殖系では図 51 の ADF に示すように細胞数は $\tau = D$ の時点で倍加するのであるから、その仮想的年齢分布は、ちょうど式(21)の $\nu (= \ln 2T)$ の中の T を D で置換したものの形になるはずである。しかし実際は、細胞が $\tau = T$ のとき分裂して $\tau = 0$ のところへ帰るから、増殖細胞の年齢分布は図中に斜線で示す部分のみとなるだろう。しかも、この図にみられるように、 $\tau = T$ で分裂した細胞は 2 個となり、 $\tau = 0$ で ADF に加わるのであるが、増殖細胞にとどまるものは $2p$ 個にすぎず、残りの $2(1-p)$ 個は CLLS として Mc コンパートメントあるいは d コンパートメント (これはきわめて短寿命の通過時間をもつコンパートメントと考える) へ流れていくことになる。ここに p は新生した娘細胞が母と同じ増殖細胞にとどまる確率である。この p は系の D と T が知られているなら次のように簡単に計算できる。²⁴⁾

この系の ADF は式(21)から

図 51 不完全増殖系における年齢分布関数
 斜線の部分が実在する増殖細胞の年齢分布を示す。細胞は $\tau = T$ で分裂し 2 個が増えて $\tau = 0$ へもどる。そのうちの $2p$ 個は増殖細胞に回帰し、残りの $2-2p$ 個は CLLS となる。CLLS の中で成熟細胞になるものは寿命 L の間この系にとどまり、 d は短時間で消滅する。この関係がわかりやすいように、図の ADF は分裂直前の細胞が 1 になるよう正規化されて示されている。



$$n(t, \tau) = 2\delta N(t)e^{-\delta\tau}, \quad \delta = \frac{\ln 2}{D}, \quad 0 \leq \tau < T \dots\dots\dots (36)$$

増殖コンパートメントにおいて分裂した直後 ($0 \leq \tau < \Delta\tau$) の細胞数の率は式(36)で $\tau=0$ とおいて、

$$n(t, 0) \Delta\tau = 2\delta N(t) \Delta\tau \dots\dots\dots (37)$$

となり、同様に分裂突入直前の細胞数の率は式(36)で $\tau=T$ とおいて、

$$n(t, T) \Delta\tau = 2\delta N(t)e^{-\delta T} \Delta\tau = 2\delta N(t)e^{-\frac{T}{D} \ln 2} \Delta\tau = 2\delta N(t)2^{-\frac{T}{D}} \Delta\tau \dots\dots\dots (38)$$

本来なら分裂直後の(増殖細胞の)細胞数は分裂直前の細胞数の2倍でなければならないが、これが $2p$ 倍にしかならないというのであるから、

$$2p = \frac{n(t, 0) \Delta\tau}{n(t, T) \Delta\tau} = \frac{2\delta N(t) \Delta\tau}{2\delta N(t)2^{-\frac{T}{D}} \Delta\tau}, \quad \therefore p = 2^{\frac{T}{D}-1} = \frac{1}{2}e^{\delta T} \dots\dots\dots (39)$$

CLLS のつくられる確率は $1-p$ であるからこれを q とすれば

$$q = 1 - \frac{1}{2}e^{\delta T} \dots\dots\dots (40)$$

ここで、 p は新生娘細胞が次にも分裂しうる確率と解釈できるから、分裂確率 division probability とよび、 q は喪失確率 cell loss probability とよんでおくのが適当だろう (図 23 参照)。

表 5 人体内における腫瘍細胞の分裂確率 \bar{p} と喪失確率 \bar{q} の計算値

癌の種類	T (日)	D (日)	\bar{p}	\bar{q}	
喉頭癌	6.3	8.1	0.90	0.10	完全増殖
骨肉腫	7.0	14.1	0.71	0.29	
胃癌転移	6.0	15.5	0.65	0.35	
直腸癌	4.2	31.5	0.55	0.45	
深部生長癌(代表値)	3~12	30~90	0.55~0.505	0.45~0.495	
早期胃癌(表在生長癌)	7.0	2,309	0.501	0.499	定常状態
		∞	0.5	0.5	

$\bar{p}=1$ では理想的な対数増殖であり (完全増殖系), CLLS はつくられず、増殖と生長のパラメータは等しくなる。 $\bar{p}=\bar{q}=0.5$ の場合は定常状態で増殖の速さとまったく無関係に生長は停止している。 $\bar{p}<0.5$ はマイナスの生長であり、組織は退縮していく。実際にこれらの値がどの程度のものであるか、表 5 に著者らの経験した人体症例 (表 2 参照) での \bar{p} , \bar{q} 値を示す。ただし、この表の上列 4 つの例は、主として D の短かった症例を中心に計算したものであり、表 4 に示したような人癌の代表的なダブリングタイムの分布 (1~4 か月) を示すものでは、表 5 の 5 列目に示すように、 \bar{p} が $0.55\sim 0.505$ までの狭い範囲に含まれるのである (表 5 参照)。

5. 増殖速度と生長速度のずれとその機序

以上第 4 節に述べたような方法を使って腫瘍の増殖がくわしく分析されていくと、腫瘍の生長と増殖の間には一般的にかなりのずれがあることが明らかになった。すなわち前節 3. のはじめ (p. 82) に

提起された実験動物腫瘍における増殖に関しても、Gompertz 関数的な生長の全経過を通じて、分裂サイクルのパラメータが、ばらつきは増大するものの、平均値としてはほんのわずかしき変わらないことが見いだされている。^{70, 98, 99)}

たとえば図 26 に示した YS のデータでは、はじめ 8.1~13.2 時間だった T が最後には 9.9~16.9 時間に延びてくるが、この間に D は 8.5 時間から無限大(∞)にまで変わってくるのであるから、 T と D のずれはきわめて大きいのである。実験動物癌のデータを渉猟しても、生長率のこの低下と平行するような増殖率の低下をきたしている例は現在まで 1 つとして見いだされていない。つまり p. 82 に列記した仮説のうち 1) と 2) は、まず成立しないことが明らかとなった。また、生長の速度低下が、かつていわれたように仮説 3) の GF (growth fraction) の低下によるとすれば、生長がプラトーに達した最後の相では増殖コンパートメントが消失しているはずであるが、そのような現象は現実にはおこっていない。さきにも指摘したように GF の概念は生物学的には不明確なものであって、^{24, 100)} 乳腺腫瘍など分化傾向を示す一部の例外を除けば、腫瘍生長末期の GF の低下とされるものは、 T の高度のばらつきの結果生じる長い T をもつ細胞の fraction の増大と考えるべき現象である。⁸³⁾ したがって、生長速度と増殖速度のこの大きなずれは、CLLS がつくられる現象 (図 32 参照) によってその大部分が説明されると結論することができる。^{24, 83)} この現象はまた増殖コンパートメントからの細胞喪失 cell loss ともいえることができるし、また、増殖細胞の ineffective cell production (非能率細胞生産) ともいうことができる。

増殖と生長のこの大きなずれは動物の可移植癌ではその末期にのみ顕著になるにすぎないが、ヒトの体内で生長する腫瘍についてはつねに、しかもきわめて著明に認められる現象で、人癌の特徴ともみなすことのできるようなものである。表 4 (表 2) から読み取れるように、人癌細胞の T のほとんどは 3~12 日というところに分布しているが、これに対して深部生長型の人癌のダブリングタイム D は 1~4 か月というオーダーに集中している (表 4, 図 29 参照)。この場合、ずれは約 10 倍である。

このずれが、さらに顕著なのは早期癌や原発部における腸癌である。表 4 に示したように、前者における D は 555~3,076 日までの間に分布している。しかるにこれらの癌細胞の T は、瞬間標識法のデータからみると (表 2 のほか図 50 も参照) 進行癌や転移巣の中のそれと同じオーダーにあると考えられる。すなわち $T=3\sim 12$ 日と推定されるのである。したがって、このずれは 100 倍以上と考えられねばならない。上に述べたように、このずれは CLLS 産生の率が高いことで説明されねばならないが、これは具体的には粘膜内の早期癌において多数の細胞がエスカレーター運動により、胃や腸の内腔に剝落し除去されつづけるという cell loss 現象に対応すると考えられる。一方、深部生長型の腫瘍ではこのような剝落現象はないから細胞喪失は 0 であるかのように思いがちであるが、それは誤っている。増殖速度と生長速度のずれはこの場合でも約 10 倍もあり (表 4)、 D と T から計算した細胞喪失確率は 0.45~0.495 に及んでいる (表 5)。これは、深部で生長している人癌の中でも、各分裂によって新たに増加した細胞のうちで 90~99% のものが死滅して失われてしまっていることを明確に示しているのである。この結論に従えば、図 52 に示すように、癌細胞の数 N が N_0 から数倍に増す間に分裂サイクルはその 10 倍以上の速さで回転し ($T=3\sim 12$ 日)、生長に寄与する量の 10 倍ないし 100 倍もの娘細胞が新生されているが、そのほとんどが定寿命細胞 CLLS となって系から失われ、この目減りの結果

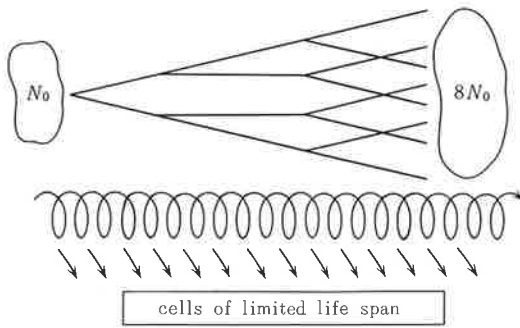


図 52 人癌の生長と癌細胞の増殖との関係
癌細胞の数が数倍に増す間に、何十回もの分裂サイクルがくり返されており、多数の CLLS が系から失われていると考えられる。一般の深部生長型の癌では、この細胞喪失率は 90 % 以上であり、胃の早期癌のような表在生長型では 99 % 以上であると推定される。

として生長がゆっくりとしかおこらない ($D=1\sim 4$ か月)、という人癌生長の細胞動態の特性が把握できる。深部生長型の腫瘍でも T と D が大幅にずれている理由がこのようにして理解できるのである。表在生長型の腫瘍では粘膜表面での剝脱がこれに加わるので、 T と D はさらにずれ、その差が数百倍にも達するわけである。

6. 腫瘍間質の生長と腫瘍学におけるその意義

ところで、人体内ではどのようなメカニズムによって、このように多数の癌細胞が失われつづけるのであろうか。考えてみると、人癌の進行の速さは生長の速さによって規定されている。臨床的な問題は、すべて過剰な“生長”を契機として惹起される。これに対して、癌細胞に内在的な 1 次的な病因は増殖(分化)に制御がきかないところにある。この増殖の異常が過剰な生長として表現されてくるさいに、⁸²⁾ 両者の間を定量的な関係でつないでいるのが細胞喪失の量である。この量の大小が直接に癌という病気の進行の速さを支配していることは明らかである。とすると、癌が人体中で発育している間に、かなり大量の細胞喪失が自然にもおこっており、その最も高度な(たとえば D が数年というような)場合には癌の進行がほとんど止まっているといつてよいくらいになるのを考えると、この細胞喪失がどのようなメカニズムでおこり、その量は何によって規定されているのかを知ることが、癌の進展の制御を考えるうえで非常に重要な意味をもってくるのがわかる。

¹⁰¹⁾ Folkman は可移植性動物腫瘍を用いた一連の研究によって、腫瘍の生長には間質血管の役割が決定的な意味をもつことを明らかにし、腫瘍からだされる TAF (tumor angiogenesis factor) が血管新生をおこさせ腫瘍の進展を可能ならしめる有効物質であるという仮説を提出した。TAF 仮説は決定的な証拠が得られないためにしだいに忘れ去られようとしているが、腫瘍の生長に間質・血管が重要であるという事実はこの仮説に関係なく支持される。

考えてみると、いかに自律性をうたい文句にする癌細胞でも、それ自身だけで発育をつづけることはできないので、間質・血管によって物理的、化学的にサポートされて初めて生きていけるのである。腫瘍をつくっている癌では、1本の毛細血管とこれをとりまく結合組織が1つの間質基本単位をなしていると考えられる。もしこのような間質基本単位が一定量しか存在していないならば、サポートされる癌細胞の量も、ある一定の最大値におさえられてしまうであろう。生体内で発育しつつある腫瘍癌においては、すでに癌細胞は間質の各基本単位のまわりに許容最大量まで寄生していると考えられるから、癌細胞の数が倍加するためには基本単位の量、したがって間質・血管の量もまた倍加しなければならない

表 6 癌の増殖・生長と間質の potential growth の関係

癌の種類		T (日)	D (日)	t_a (日)	LI_s (%)	T_{100} (日)
人 癌	上顎洞扁平上皮癌	11	14.2	6	42	14.2
	直腸腺癌	4	31.5	4	13	30.7
	乳癌	11	175	8	3	266
実験癌	DMBA 乳癌	1.5	10	1.5	13	11.5
	吉田肉腫皮下移植	0.7	3	3	98	3

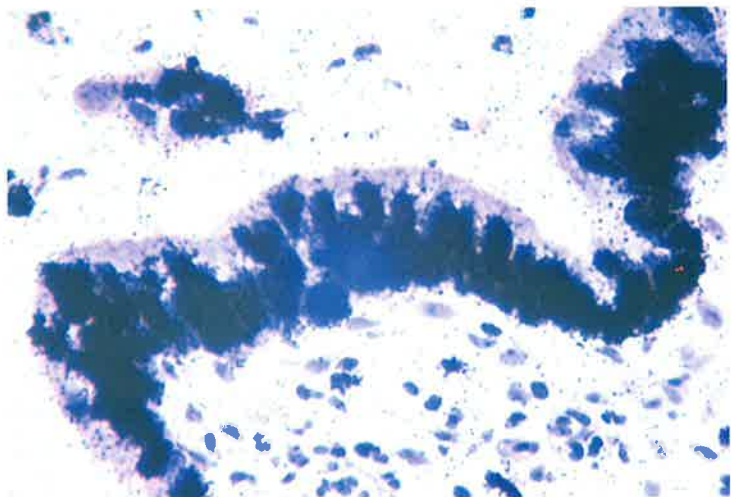
いであろうと推論される。

この推論は、癌腫瘍の生長とその中間質の生長を定量的にしらべたうえで、両者の間に相関があるかどうかを検討することによってのみ検証される。そこで人癌データの中で癌の生長の D が計られており、かつ癌細胞と間質細胞の増殖の速さについて $^3\text{H-TdR}$ オートラジオグラフィの測定値の得られているものを抽出して表 6 のようにこれを検討した。ヒトの癌では、 $D=31.5$ 日の平均値的な直腸癌の 1 例をはさんで、 D の著しく短かった 14.2 日の扁平上皮癌、および D が 175 日の乳癌、それぞれ 1 例を得ることができた。これと比較するためラットの DMBA 乳癌と皮下に移植した YS の例もしらべた。3 例の人癌はそれぞれ t_a で示した日数だけ局所の連続標識が行われており、そのオートラジオグラフでは癌細胞が 100% 近くラベルされている (図 53 は表 6 の直腸腺癌の連続標識 4 日後のものである)。このような標本で間質細胞の標識率 LI_s をしらべると (表 6 右から 2 つめの欄)、これは実質の癌細胞のそれ (このすべてのケースでほとんど 100% に近い) に比べて顕著に低いことが明らかとなった (図 53 も参照)。

実はここに 3 例だけを提示したが、他の人癌の連続標識オートラジオグラフの検索でも、この現象 (癌の実質細胞の標識率と比べて間質のそれが著しく低いという現象) には 1 例の例外もなかったから、この関係は人癌一般にみられる基本的な現象とみてさしつかえない。さてこれら 3 例とも瞬間標識オートラジオグラフでは、間質の標識は LI_s に比べて大変低かったので計算上一応これを 0 に近いと

図 53 人癌における実質細胞と間質細胞の増殖

$^3\text{H-TdR}$ を 4 日間連続に投与されたヒト直腸癌のオートラジオグラフ。実質である癌細胞は 99% 以上の標識率を示しているが、間質細胞の標識率はリンパ球や形質細胞などを除くときわめて低い。つまり血管やそれをとりまく線維芽細胞などの potential doubling time は癌実質細胞と比べて著しく長いのである。これは人癌のすべてに例外なくみられる現象である。このようなオートラジオグラフィの研究は、癌細胞の増殖と、実質の生長可能な速度の間に大きな開きのあることを示している。



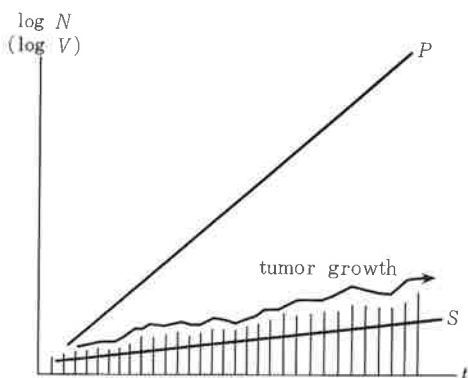


図 54 腫瘍の生長と間質の生長の関係

この模式図では癌組織の生長の速さが間質の生長によってきまってくる様子を示している。もし癌細胞の細胞喪失がないとすると、図の P (potential growth) で示されたように癌細胞は対数増殖的に増えてくるはずである。しかし、実際は間質の伸び (potential growth) が S で示すように遅く押えられているため、これによってサポートされる癌細胞の総数は、この伸びに沿ってしか増していけないと考えられる。これが図中の tumor growth で示された現実の生長である。直線 P とこの実際の生長曲線とのギャップが CLLS にほかならないと考えられる。

考えると、この LI_s は標識期間 (t_a) 中に間質細胞の何%が S 期に流入したかを示すものと解釈できる。すると、 LI_s/t_a は 1 日当たり何%の間質細胞が S 期に流入するかを示すことになり、 $100/(LI_s/t_a)$ はこの割合で LI_s が増えつづけると何日で 100%になるかという日数 T_{100} を与える。これは、間質細胞に細胞喪失がないとした場合に間質細胞が倍加する時間すなわち間質細胞の potential doubling time を与えていると解釈できる。こうして算出された T_{100} (表 6 右端) をみると、癌細胞の T とはまったく相関がないが D とは驚くほどよく一致しているのがわかるであろう。この一致は人癌のみでなく比較のために掲げたラットの DMBA 乳癌や吉田肉腫 YS のようにまったく性質の違う腫瘍でも基本的に成立している。

このような知見から得られる結論¹⁰³⁾を模式的な図を用いて説明すると次のようになる。図 54 で縦軸は細胞数 N (あるいは癌の体積 V でもよい) の対数、横軸は時間である。もし癌細胞の増殖が完全で新生娘細胞のうち失われるものがないとすれば図中の P で示したような工合に癌生長がおこると考えられる。この勾配は v で与えられる。しかし、間質の生長 (あるいは伸びとか potential growth といってもよい) が S で示すように遅いため、これによってサポートされる癌細胞の総数は、この伸びに沿ってしか増していけない。これが、図に示したように、現実の tumor growth として観察されるようになる、というわけである。この勾配が δ にほかならない。現実の tumor growth と P との 2 つの線の間を開き (Y 軸に平行に測った距離) が、産生される CLLS の量を示している。

この図から、腫瘍の生長に対する間質の役割が明瞭になる。腫瘍組織の中で、間質は癌細胞を化学的、物理的にサポートする働きをもつ反面、その伸びが十分でないため癌の生長に律速的に働き、きびしく (90~95%に及ぶ) ブレーキをかけている存在として現れているのである。こう考えると、間質の役割は、古くから腫瘍病理学で争われてきた 2 つの相反する解釈、つまり腫瘍生長に対して den Weg bahnd (レールを敷くもの) であるか das Wachstum blemsend (生長にブレーキをかけるもの) であるかの、実は両方の性質を兼ね備えたものであることが明らかになるのである。

つまり、癌細胞の増殖は癌の生産発展の原動力ではあっても癌生長のスピードとは直接的に関係しない。癌の実際的な生長に律速的な影響力をもっているのはむしろ間質であり、その生長がつねに癌細胞のそれを大きく下まわっているのです。その結果として、間質は一面では癌細胞を栄養し支持する機能を発揮しながら、同時に、一方ではその生長に強いブレーキをかけ、多数の癌細胞を“殺しつづける”役

割を演じている。

癌の制圧や進展の予防があくまで癌の臨床的な表現である“生長”に対して向けられるべきものであることを考えると、癌の間質のこのような機能についてのより深い理解を得て、その機能の制御に役だてるといふ研究が、今後の腫瘍学の中で大きな意義をもってくることは疑いのないところであろう。

(藤田 哲也)

文 献

- 1) Collins, V. P., Loeffler, R. K. & Tivey, H. : Observations in growth rates of human tumors. *Am. J. Roentgenol.* **76** : 988, 1956.
- 2) 郡 大裕, 角谷 仁, 川井啓市, 藤田哲也ほか : 人の体内における胃癌の増殖と生長について. *最新医学* **24** : 471, 1969.
- 3) Kawai, K., Miyaoka, T. & Kohli, Y. : Evaluation of early gastric cancer from the clinical point of view. In ; *Early Gastric Cancer. Current Status of Diagnosis* (ed. by Grundmann, E., Grunze, H. & Witte, S.), p. 63, Springer, Berlin, 1974.
- 4) Fujita, S. : Biology of early gastric carcinoma. *Pathol. Res. Pract.* **163** : 297, 1978.
- 5) 郡 大裕 : 胃の腫瘍性変化, ことに胃癌, 胃—その形態と機能 (川井啓市編), p. 203, 医学書院, 東京, 1975.
- 6) Yamashita, S., Kawai, K., Kohli, Y., Ashihara, T., Fujita, S. et al. : Autoradiographic studies on human stomach epithelium by local labeling method. *The 8th Conf. Radioisotopes, Abstr. Papers*, p. 226, 1967.
- 7) 松本 甫 : 胃粘膜および胃癌細胞の増殖に関する経動脈的標識法オートラジオグラフィによる研究. *京府医大誌* **80** : 399, 1976.
- 8) Baserga, R., Heneger, G. C., Kisielecki, W. E. & Lisco, H. : Uptake of tritiated thymidine by human tumors in vivo. *Lab. Invest.* **11** : 360, 1962.
- 9) 藤田哲也 : 細胞動態からみた胃癌の発生と進展. *日病会誌* **70** : 23, 1981.
- 10) Clarkson, B., Ota, K., Ohkita, T. & O'Connor, A. : Kinetics of proliferation of cancer cells in neoplastic effusions in man. *Cancer* **18** : 1189, 1965.
- 11) Lipkin, M., Sherlock, P. & Bell, B. : Cell proliferation kinetics in the gastrointestinal tract of man. II. Cell renewal in stomach, ileum, colon and rectum. *Gastroenterology* **45** : 721, 1963.
- 12) Spratt, J. S. & Ackerman, L. V. : The growth of a colonic adenocarcinoma. *Am. Surg.* **27** : 23, 1961.
- 13) Welin, S., Youker, J. & Spratt, J. S. : The rates and patterns of growth of 375 tumors of the large intestine and rectum observed serially by double contrast. *Am. J. Roentgenol., Radium Therapy and Nuclear Medicine* **90** : 673, 1963.
- 14) Spratt, J. S., Spjut, H. J. & Roper, C. L. : The frequency distribution on the rates of growth and estimated duration of primary pulmonary carcinoma. *Cancer* **16** : 687, 1963.
- 15) Hoffman, J. & Post, J. : In vivo studies of DNA synthesis in human normal and tumor cells. *Cancer Res.* **27** (Part 1) : 898, 1967.
- 16) 芦原 司, 小玉正智, 竹岡 成, 藤田哲也 : ヒト悪性腫瘍の in vivo における細胞回転の研究. *日病会誌* **58** : 115, 1969.
- 17) 芦原 司, 篠田正昭, 藤田哲也ほか : ^3H -thymidine 局所頻回標識法オートラジオグラフィによる各種人癌の細胞増殖の解析. 第8回日本アイソトープ会議論文抄録, p. 150, 1969.
- 18) Choné, B. & Fischbier, H. J. : In-vivo-Studie mit ^3H -Thymidin beim Peritoneal-Karzinose. *Nuclearmedizin* **2** : 240, 1962.
- 19) 久保雄治, 芦原 司, 藤田哲也ほか : ヒト食道粘膜と食道癌の細胞増殖の解析. *癌の臨床* **17** : 599,

- 1971.
- 20) Refsum, S., Berdal, P. & Evensen, A. : Cell proliferation in human malignant and normal tissue. Abstr. IX. Intern. Cancer Congress 1966, p. 88, 1966.
 - 21) 芦原 司, 西村武重, 藤田哲也ほか : ^3H -thymidine 局所頻回標識法を用いたオートラジオグラフィに依る人癌増殖解析について, 第8回日本アイソトープ会議論文抄録集, p. 475, 1967.
 - 22) 小玉正智, 芦原 司, 藤田哲也ほか : 人癌における細胞世代時間の解析—扁平上皮癌の1例. 外科診療 **10** : 626, 1968.
 - 23) Fabrikant, J. I. : The kinetics of cellular proliferation in normal and malignant tissues ; A review of methodology and the analysis of cell proliferation kinetics in human tissues. Am. J. Roentgenol. **111** : 700, 1971.
 - 24) 藤田哲也, 芦原 司 : 生長と増殖. 腫瘍病理学 (菅野晴夫, 小林 博編), p. 39, 朝倉書店, 東京, 1970.
 - 25) Frindel, E., Malaise, E. & Tubiana, M. : Cell proliferation kinetics of five solid human tumors. Cancer **22** : 611, 1968.
 - 26) Shirakawa, S., Luce, J. K., Tannock, I. & Frei, E. : Cell proliferation in human melanoma. J. Clin. Invest. **49** : 1188, 1970.
 - 27) Meyer, J. S. & Donaldson, R. C. : Growth kinetics of squamous cell carcinoma in man. Arch. Pathol. **87** : 479, 1969.
 - 28) Ashihara, T., Fujita, S. et al. : Autoradiographic studies on cell proliferation and differentiation in the human epidermis in vivo. Arch. Histol. Jpn. **28** : 399, 1967.
 - 29) 加来 博, 五十嵐靖雄, 藤田哲也 : ^3H -thymidine オートラジオグラフィによる人の表皮, 汗腺, 皮脂腺の細胞増殖と分化の分析. 日組織記録 **24** : 457, 1964.
 - 30) 永根隆治, 篠田正昭, 弘中 武ほか : オートラジオグラフィによる乳癌の増殖解析について, 第21回胸部外科学会総会記事, p. 18, 1968.
 - 31) 草間 悟 : 第32回乳癌研究会アンケート集計. (主題1) 乳癌の natural history. p. 1, 1980.
 - 32) Philippe, E. & Le Gal, Y. : Growth of seventy-eight recurrent mammary cancers. Cancer **21** : 461, 1968.
 - 33) 芦原 司, 藤田哲也 : 人癌の in vivo cell kinetics の解析. 日病会誌 **58** : 115, 1969.
 - 34) Bennington, J. L. : Cellular kinetics of invasive squamous carcinoma of human cervix. Cancer Res. **29** : 1082, 1969.
 - 35) 芦原 司, 山下滋夫, 藤田哲也ほか : 人子宮癌 (腹水型及び腫瘤型) の in vivo ^3H -サイミジンオートラジオグラフィによる細胞増殖の解析. 第27回癌学会総会記事, p. 208, 1968.
 - 36) Schwartz, M. : A biomathematical approach to clinical tumor growth. Cancer **14** : 1272, 1961.
 - 37) Garland, L. H., Coulson, W. & Wollin, E. : The rates of growth and apparent duration of untreated primary bronchial carcinoma. Cancer **16** : 694, 1963.
 - 38) 辻本兵博 : 肺癌の集団検診と早期発見. 臨床科学 **3** : 1148, 1967.
 - 39) Nathan, M. H., Collins, V. P. & Adams, R. A. : Differentiation of benign and malignant pulmonary nodules by growth rate. Radiology **79** : 221, 1962.
 - 40) 太田和雄, 小川一誠, 村上 巖 : ^3H -thymidine 使用による白血病細胞増殖に関する研究. 第24回日本癌学会総会記事, p. 222, 1965.
 - 41) Killmann, S. A., Cronkite, E. P., Robertson, J. S., Flidner, T. M. & Bond, V. P. : Estimation of phases of the life cycle of leukemic cells from labeling in human beings in vivo with tritiated thymidine. Lab. Invest. **12** : 671, 1963.
 - 42) Gavosto, F., Pileri, A., Gabutti, V. & Masera, P. : Cell population kinetics in human acute leukemia. Eur. J. Cancer **3** : 301, 1967.
 - 43) Karle, H., Ernst, P. & Killmann, S. A. : Changing cytokinetic patterns of human leukaemic lymphoblasts during the course of the disease, studied in vivo. Br. J. Haematol. **24** : 231, 1973.
 - 44) Killmann, S. A., Cronkite, E. P., Flidner, T. M. & Bond, V. P. : Cell proliferation in multiple myeloma

- studied with tritiated thymidine in vivo. *Lab. Invest.* **11** : 845, 1962.
- 45) Cooper, E. H., Peckham, M. J., Milard, R. E., Hamlin, I. M. E. & Gérard-Marchant, R. : Cell proliferation in human malignant lymphomas. *Eur. J. Cancer* **4** : 287, 1968.
- 46) Cooper, E. H., Frank, G. L. & Wright, D. H. : Cell proliferation in Burkitt tumours. *Eur. J. Cancer* **2** : 377, 1966.
- 47) Iversen, O. H., Iversen, U., Ziegler, J. L. & Bluming, A. Z. : Cell kinetics in Burkitt lymphoma. *Eur. J. Cancer* **10** : 155, 1974.
- 48) 柳川哲二, 井上四郎, 藤田哲也ほか : 人悪性骨腫瘍の in vivo における増殖と生長の解析と抗癌剤の影響について, 第42回日本整形外科学会総会, 1969.
- 49) Peckham, M. J. & Steel, G. G. : Cell kinetics in reticulum cell sarcoma. *Cancer* **29** : 1724, 1972.
- 50) Spratt, J. S. : The rates of growth of skeletal sarcomas. *Cancer* **18** : 14, 1965.
- 51) 諸富武文, 井上四郎, 柳川哲二ほか : 人悪性骨腫瘍 in vivo における増殖と生長の解析について, 中部日整災外会誌 **12** : 432, 1969.
- 52) Aherne, W. & Buck, P. : The potential cell population doubling time in neuroblastoma and nephroblastoma. *Br. J. Cancer* **25** : 691, 1971.
- 53) Mayneord, W. V. : On a law of Jensen's rat sarcoma. *Am. J. Cancer* **16** : 841, 1932.
- 54) Haddow, A. : Biological characters of spontaneous tumours of the mouse, with special reference to rate of growth. *J. Pathol. Bacteriol.* **47** : 553, 1938.
- 55) Durbin, P. W., Jeung, N., Williams, M. H. & Arnold, J. S. : Construction of growth curve for mammary tumors of the rat. *Cancer Res.* **27** (Part 1) : 1341, 1967.
- 56) Finkel, M. P., Bergstrand, P. J. & Bsikis, B. O. : The latent period incidence and growth of Sr⁹⁰-induced osteosarcomas in CF 1 and CBA mice. *Radiology* **77** : 269, 1961.
- 57) Klein, G. & Revesz, L. : Quantitative studies on multiplication of neoplastic cells in vivo. I. Growth curves of the Ehrlich and MC₁M ascites tumor. *J. Natl. Cancer Inst.* **14** : 229, 1953.
- 58) 芦原 司 : がん発育の自然史とその生長制御因子—吉田肉腫の1個細胞腹水内移植による研究, 第19回日医総会誌, p. 431, 1975.
- 59) Patt, H. M. & Blackford, M. E. : Quantitative studies of the growth response of the Krebs ascites tumor. *Cancer Res.* **14** : 391, 1954.
- 60) Lucké, B. & Berwick, M. : Quantitative relation between growth of Ehrlich ascites tumor and reduction of liver catalase activity. *J. Natl. Cancer Inst.* **15** : 99, 1954.
- 61) Mendelsohn, M. L. : Cell proliferation and tumor growth. In ; *Cell Proliferation* (ed. by Lammerton, L. F. & Fry, R. J. M.), p. 190, Blackwell, Oxford, 1963.
- 62) Schrek, R. : A quantitative study of the growth of Walker rat tumor and Flexner Jobling rat carcinoma. *Am. J. Cancer* **24** : 807, 1935.
- 63) Schrek, R. : Further quantitative methods for the study of transplantable tumors. The growth of R. 39 sarcoma and Brown-Pearce carcinoma. *Am. J. Cancer* **28** : 354, 1936.
- 64) Foulds, L. : Mammary tumours in hybrid mice ; Growth of spontaneous tumours. *Br. J. Cancer* **3** : 345, 1949.
- 65) Squartini, F. : Strain differences in growth of mouse mammary tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **26** : 813, 1961.
- 66) Laird, A. K. : Dynamics of tumor growth ; Comparison of growth rates and extrapolation of growth curve to one cell. *Br. J. Cancer* **18** : 278, 1965.
- 67) McCredie, J. A., Inch, W. R., Kruuv, J. & Watson, T. A. : The rate of tumor growth in animals. *Growth* **29** : 331, 1965.
- 68) Steel, G. G. : *Growth Kinetics of Tumours*. Clarendon, Oxford, 1977.
- 69) Johnson, R. E., Zellen, M. & Kemp, N. H. : Chemotherapeutic effects on mammalian tumor cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **34** : 277, 1965.

- 70) Baserga, R. : Mitotic cycle of ascites tumor cells. *Arch. Pathol.* **75** : 156, 1963.
- 71) Tannock, I. F., Steel, G. G. : Tumor growth and cell kinetics in chronically hypoxic animals. *J. Natl. Cancer Inst.* **45** : 123 (1970)
- 72) Schmid, F. A., Cappuccino, J. G., Merker, P. C., Tarnowski, G. S. & Stock, C. C. : Chemotherapy studies in an animal tumor spectrum. I. Biologic characteristics of the tumors. *Cancer Res. Suppl.* **26** : 173, 1966.
- 73) Wilcox, W. S., Griswold, D. P., Laster, W., Schabel, F. M. & Skipper, H. E. : Experimental evaluation of Potential anticancer agents. *Cancer Chemother. Rep.* **47** : 27, 1965.
- 74) Adams, D. H. & Bowman, B. M. : The chemotherapy of established sarcoma 180 and adenocarcinoma 755 tumors with 6-thioguanine. *Cancer Res.* **23** : 883, 1963.
- 75) Laster, W. R., Mayo, J. G., Simpson-Herren, L., Griswold, D. P., Lloyd, H. H., Schabel, F. M. & Skipper, H. E. : Success and failure in the treatment of solid tumors. *Cancer Chemother. Rep.* **53** : 169, 1969.
- 76) Harding, H. R., Rosen, F. & Nichol, C. A. : Depression of alanine transaminase activity in the liver of rats bearing Walker carcinoma 256. *Cancer Res.* **24** : 1318, 1964.
- 77) Looney, W. B., Mayo, A. A., Alle, P. M., Morrow, J. & Morris, H. P. : A mathematical evaluation of tumour growth curves in rapid, intermediate, and slow growing rat hepatomata. *Br. J. Cancer* **27** : 341, 1973.
- 78) Brennan, M. J., Prychodko, W. & Horeglad, S. : Quantitative studies on the growth of spontaneous tumors. In ; *Biological Interactions in Normal and Neoplastic Growth* (ed. by Brennan, M. J. & Simpson, W. L.), p. 739, Little Brown, Boston, 1962.
- 79) Mendelsohn, M. L. : Autoradiographic analysis of cell proliferation in spontaneous breast cancer of C3H mouse. III. The growth fraction. *J. Natl. Cancer Inst.* **28** : 1015, 1962.
- 80) Siskin, J. E. & Kinoshita, R. : Variations in the mitotic cycle in vitro. *Exp. Cell Res.* **22** : 521, 1961.
- 81) Van Dilla, M. A., Trujillo, T. T., Mullaney, P. F. & Coulter, J. R. : Cell microfluorometry ; A method for rapid fluorescence measurement. *Science* **163** : 1213 (1969)
- 82) 藤田哲也 : オートラジオグラフィによる細胞の増殖と分化の分析, 新細胞学 (妹尾, 高木編), p. 605, 朝倉書店, 東京, 1965.
- 83) 藤田哲也 : 腫瘍のポピュレーション・カイネティックス, 癌の臨床 **21** : 654, 1975.
- 84) Fujita, S. : Kinetics of cellular proliferation. *Exp. Cell Res.* **28** : 52, 1962.
- 85) Hilscher, W. & Maurer, W. : Autoradiographische Bestimmung der Dauer der DNS-verdoppelung und ihres zeitlichen Verlaufs bei Spermatogonien der Ratte durch Doppelmarkierung mit ^{14}C und ^3H -thymidin. *Naturwissenschaften* **49** : 352, 1962.
- 86) Schultze, B., Maurer, W. & Hagenbusch, H. : A two-emulsion autoradiographic technique and the discrimination of the three different types of labelling after double labelling with ^3H - and ^{14}C -thymidine. *Cell Tissue Kinet.* **9** : 245, 1976.
- 87) Baserga, R. & Kisielecki, S. : Comparative study of the kinetics of cellular proliferation in normal and tumorous tissues with the use of tritiated thymidine. *J. Natl. Cancer Inst.* **28** : 331, 1962.
- 88) Fried, J. : Estimating the mean generation time of proliferating cell systems in steady state. *Biophys. J.* **8** : 710, 1968.
- 89) Clarkson, B., Ohkita, T., Ota, K. & Fried, J. : Studies of cellular proliferation in human leukemia. *J. Clin. Invest.* **46** : 506, 1967.
- 90) Mak, S. : Mammalian cell cycle analysis using microspectrophotometry combined with autoradiography. *Exp. Cell Res.* **39** : 286, 1965.
- 91) Cooper, E. H. & Wickramasinghe, S. N. : Quantitative cytochemistry in the study of erythropoiesis. *Ser. Hematol.* **4** : 65, 1969.
- 92) Fujita, S., Ashihara, T. & Fukuda, M. : Simultaneous measurement of DNA content and grain count on an autoradiograph of Feulgen stained cells. *Histochemistry* **40** : 155, 1974.
- 93) Fujita, S. : Analysis of cell kinetics by means of Feulgen cytofluorometry combined with ^3H -thymidine

- autoradiography. *Exp. Cell Res.* **88**: 395, 1974.
- 94) Quastler, H. & Sherman, F. G. : Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Exp. Cell Res.* **17**: 420, 1959.
- 95) Barrett, J. C. : A mathematical model of the mitotic cycle and its application to the interpretation of percentage labeled mitoses data. *J. Natl. Cancer Inst.* **37**: 443, 1966.
- 96) Ashihara, T. : Computer optimization of the fraction of labeled mitoses analysis using the fast Fourier transform. *Cell Tissue Kinet.* **6**: 447, 1973.
- 97) 藤田哲也 : 人癌の体内における生長と増殖. *日本臨牀* **29** (増刊) : 111, 1971.
- 98) Edwards, J. L., Koch, A. L., Youcis, P., Freese, H. L., Laite, M. B. & Donaldson, J. T. : Some characteristics of DNA synthesis and the mitotic cycle in Ehrlich ascites tumor cells. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **7**: 273, 1960.
- 99) Maruyama, Y. : An isotopic method for determination of cell generation time. *Nature* **198**: 1181, 1963.
- 100) Lamerton, L. F. : Tumor cell kinetics. *British Med. Bull.* **29**: 23, 1973.
- 101) Folkman, J. : Tumor angiogenesis factor. *Cancer Res.* **34**: 2109, 1974.
- 102) 藤田哲也 : 癌の生長制御因子としての間質. *癌の臨床* **18**: 596, 1972.
- 103) Fujita, S. : Stroma as a rate limiting factor for growth of tumors in vivo. In ; Gann Monograph, Cancer Cell Biology (ed. by Nagayo, T. & Mori, M.), p. 57, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1980.
- 104) Nakamura, S., Kino, I. & Baba, S. : Ex vivo autoradiography of the human gastrointestinal tract ; A new approach to cell kinetics studies of surgically removed tumor-bearing organs. *Gann* **74**: 116, 1983.

the first two cases, the first two terms of the series are the same, but the third term is different.

In the third case, the first two terms are the same, but the third term is different.

In the fourth case, the first two terms are the same, but the third term is different.

In the fifth case, the first two terms are the same, but the third term is different.

In the sixth case, the first two terms are the same, but the third term is different.

In the seventh case, the first two terms are the same, but the third term is different.

In the eighth case, the first two terms are the same, but the third term is different.

In the ninth case, the first two terms are the same, but the third term is different.

In the tenth case, the first two terms are the same, but the third term is different.

In the eleventh case, the first two terms are the same, but the third term is different.

In the twelfth case, the first two terms are the same, but the third term is different.

In the thirteenth case, the first two terms are the same, but the third term is different.

In the fourteenth case, the first two terms are the same, but the third term is different.

In the fifteenth case, the first two terms are the same, but the third term is different.

In the sixteenth case, the first two terms are the same, but the third term is different.

In the seventeenth case, the first two terms are the same, but the third term is different.

In the eighteenth case, the first two terms are the same, but the third term is different.

In the nineteenth case, the first two terms are the same, but the third term is different.

In the twentieth case, the first two terms are the same, but the third term is different.

In the twenty-first case, the first two terms are the same, but the third term is different.

In the twenty-second case, the first two terms are the same, but the third term is different.

In the twenty-third case, the first two terms are the same, but the third term is different.

In the twenty-fourth case, the first two terms are the same, but the third term is different.

In the twenty-fifth case, the first two terms are the same, but the third term is different.

In the twenty-sixth case, the first two terms are the same, but the third term is different.

In the twenty-seventh case, the first two terms are the same, but the third term is different.

In the twenty-eighth case, the first two terms are the same, but the third term is different.

In the twenty-ninth case, the first two terms are the same, but the third term is different.

In the thirtieth case, the first two terms are the same, but the third term is different.