

現代病理学大系

1

〔総論 I〕

病理学序説

〈責任編集〉

飯島宗一
前名大総長
広大・名大名誉教授

石川栄世
慈大名誉教授

影山圭三
慶大名誉教授

島峰徹郎
東大名誉教授

森亘
前東大総長
東大名誉教授

〈顧問〉

田中健蔵
前九大総長
九大名誉教授

〈編集幹事〉

相沢幹
北大名誉教授

遠城寺宗知
九大名誉教授

北村旦
阪大名誉教授

笹野伸昭
東北大名誉教授

花岡正男
京都医歯技術短大
京大名誉教授

1995年



中山書店

6

人癌発生の病理学的理解と時間・確率の概念

病理学とは、人体の病変や疾病が、何が原因で起こってくるか、また、どのような機序で引き起こされたものであるかを明らかにしようとする学問である。また現実の病変や疾病について下される病理学的判断、すなわち診断は、予後の判定と治療方針の策定に決定的な指針を与えるという実践的な役割を持っている。このいずれの分野においても、時間が重要な意味を持つことは明らかである。原因が結果を引き起こすには、一定の時間が必要であるし、病変や疾病が人体に深刻な影響を与えるまでに進行する機序とは、多くの原因と結果の間のメカニズム的連鎖がたどれることにほかならないから、ここでもまた、病理形態という三次元の事象を結ぶ第四の次元である時間が軸として重要な役割を担っていることは間違いない。しかし、これまでの病理学では、原因と結果の2つの事象を論理的かつ決定論的に解析することを基本方針とし、時間を単に原因と結果の前後関係を規定するだけのもののよう考えることが多かった。病理学的検索に際して得られるデータが一般的には剖検とか組織標本などのように、本質的に（物質的な意味でもまた時間的にみても）“固定された”ものであり、時間はその背後に埋没していたからである。しばしば病理学的検索は2つ以上の時点で行われるが、このような場合でも二点間を結ぶ時間は、原因と結果を結ぶ前後関係以上のものとしては考慮されないことが多かったように思われる。また、この二時点で観察される事象は決定論的な意味で原因・結果の関係にあるか、さもなくば、無関係である、という判断が下されるのが常であった。しかし、それでは、人癌の発生のような重要な現象を十分に理解することができないように思われる。

ここでは、これからの病理学において時間というパラメータがどのような意味を持つか、また原因と結果を結ぶものとして、癌発生を考える場合のように確率論的な不確定性の概念が必要になると考えられる場合のあることを取りあげ、病理学的思考における時間と確率の意義について論じてみたいと思う。

1. 人癌の初発像はどのようなものであろうか

比較的最近まで、人癌では、ある時点で突如として完成した癌細胞が出現するという考えが広く信じられていた。癌発生にイニシエーションとプロモーションの2つのステップがあるとされるようになって、この2つのプロセスが完了する時点までは非癌細胞であり、完了した時点で完成した癌細胞ができる、と考えられていたのである。しかも、多数の癌細胞が集団として一斉に発生する、と考える人が多かった。

これらの考えが長らく当然のものとして受け入れられてきた背景には、理念的なものと経験的なもの

との2つの理由があったと考えられる。理念的なものというのは、発癌の考え方に時間の概念が明瞭 explicit に導入されていなかったことであり、いま1つの、経験的なものというのは、癌診断に携わる病理学者が、熱心に人体材料を検索し癌の芽ないしは発癌直後の（1個ないし1,000個程度の細胞からなるような）微小な癌細胞集団を発見しようとして、長年努力を続けてきたにもかかわらず、いまだ誰も、発癌直後と思われる、このような超微小癌を見つけたものはいないという事実に基づくものである。熱心な人体病理学者ほど、このような癌の初期病変の存在には懐疑的になっていたのも無理はない。したがって、病理学者が時に遭遇する最小サイズの（癌細胞の数にして100万から数千万、病巣にして直径1ないし数mm程度の）癌病巣こそ、癌の本当の初発病変とみるべきだという考えが、明確な根拠なしに、広く信じられる背景が、このようにしてできあがってきたと考えられる。

それにもかかわらず、人癌が、宿主の（つまりその患者の）正常だった1個の細胞が変化して1個の癌性細胞となり、それから、ねずみ算的に増えて時間の経過とともに、数千億ないし数兆の癌細胞が⁷⁾つくり出されることによって発生してきたものであることは、現在では疑う余地のない科学的事実として認められている。^{3,26)}この増加には、癌の生長はその全経過を通じてほぼ一定の倍加時間 doubling time (D) によって規定される対数生長であるとする Collins の法則が^{2,8)}一般に適用できる。しかし、胃の早期癌の生長を、腫瘍サイズの増大を経時的に計測してその倍加時間を算定すると、早期癌の前後の時期の倍加時間より10倍も長く、その生長は表在生長型で著しく遅いのである。⁴⁾この生長曲線を対数生長の間に挿入すると、予想される胃癌の自然史の全経過は16.5年から35年（平均25年）となり、^{4,5)}それまで漠然と想像されていたより非常に長いものであることが推定された。しかし、一方では、上に述べたように、1個の癌細胞から癌が出発すると考えられているから、もし癌生長の自然史がこのように長いものであるなら、当然、癌細胞が2個、4個、8個…と、極めて少数個で生長を始めた状態の癌細胞の集団が、精密に検査されたヒトの臓器から、進行癌の多さに見合うだけの頻度で hiatus なしに発見されてしかるべきである、という推論が成立する。しかし、その連続性が、事実上、証明できないのである。顕微鏡を用いて癌の診断をしている人達にとっても、進行癌の状態のものから、先へ先へとたどっていった、初期癌の時期に近づくと、ぶつりと情報が途絶えてしまう、この状況は一体どういう理由によるものであるか、説明が求められているのである。

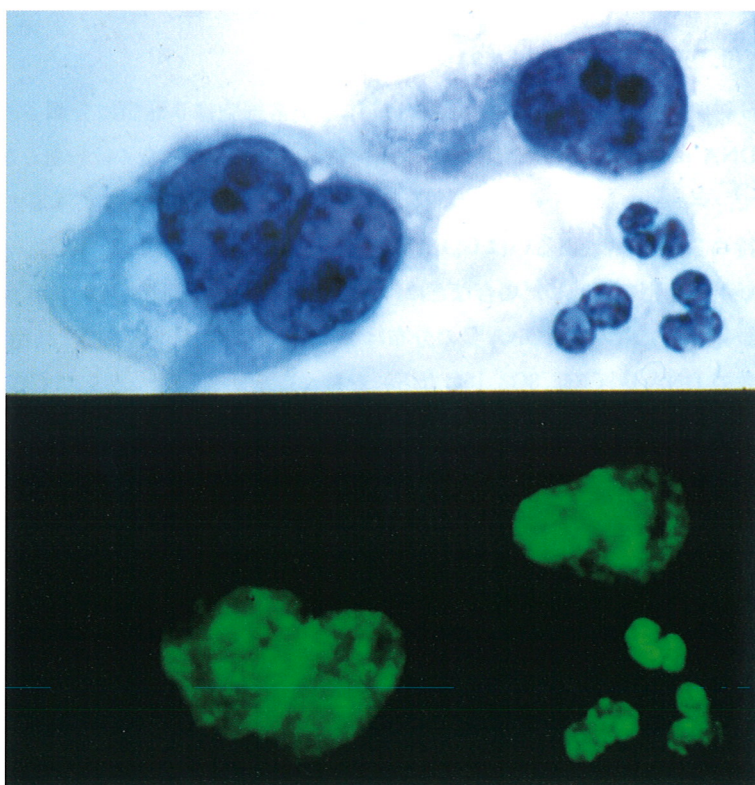
そこで、ここでは、時間の概念を explicit に導入し、細胞の異型性の発現を、DNA量の分布や染色体の変化を手がかりにして、時間軸に沿って逆行してみていくというアプローチで、この問題に挑戦するところから始めてみよう。

2. 癌細胞の核 DNA

一般に、癌細胞を正常細胞から見分けるのに「異型」という特徴が利用される。今日の医学では、すべての癌症例は「異型」によって診断され治療されている。それなくして、癌と診断されることは決してないのである。つまり、すべての癌細胞集団は細胞形態や組織形成能に異常があり、正常とは異なっている。この「異型」の特徴の1つ1つを洗い直してみると、その多くが細胞核の異常に基づくものであることが推定される。そして、さらに追求していくと、その異常は核の中のDNAの異常に基づくものらしいことがわかってくるのである。端的にいうと、癌細胞では核内のDNAに高度の異常があり、

図6 核 DNA 量からみた癌細胞の異型性

核異型は核 DNA の異型を反映している。上は Papanicolaou 染色、下は同じ標本を DNA に特異的な DAPI で蛍光染色したものでその蛍光量は DNA 量に比例している。右下の3つの白血球の核 DNA と比較して癌細胞の DNA が顕著な量的変異を示していることがわかる。この変異は蛍光測光法で客観的な量として検出できる。



その細胞の形態や組織の中の配列に至るまでのさまざまなレベルで異常な表現型つまり「異型」が出現する、と考えられる。進行期の癌では、すべての癌にこの異型が著明に認められる。だからこそ、これまで病理学者がこの異型を目印にして癌を判断しても誤りのない診断ができたのである。これを、細胞核 DNA の量の分布から調べる方法が、顕微測光法による DNA の ploidy pattern (核 DNA パターン) の分析である。⁶⁾

細胞1個1個の核 DNA 量を測定していくと、癌、特に進行期の人癌では、DNA の量が2倍、4倍…と増量した多倍体細胞が多かれ少なかれほとんどすべての症例に検出できる(図6)。また症例の7割あるいはそれ以上のケースに DNA 量が奇数倍あるいは3.2倍や3.8倍など半端な倍率で増量したモードを示す異倍体細胞が出現している。^{5,9)}これが癌細胞の示す高度異型性に最も本質的な変化であると考えられる。このとき、1つの癌細胞にみられるゲノムの変化は、後で述べるように、光学顕微鏡で検出できる染色体異常に限定しても5個以上数十個に及ぶものが多い。¹⁷⁾これをヌクレオチドのレベルで厳密に分析すると、その異常の数は予想をはるかに越える大きなものになるのは確実である。これに対して、正常細胞では、このような癌にみられる高度な DNA の異型は決してみられない。⁵⁾そこで、この異型の本質と考えられる核 DNA の異常がどのようにして起こってきたのか、時間軸に沿って考える必要がある。そのために、まず出発点(つまり $t=0$ にあたる時点)での正常の核 DNA パターンとはどんなものか、はっきりさせておこう。

3. 正常細胞の DNA パターン

細胞増殖という観点からして、成体の正常細胞は3種類に分類される。それぞれに対して特有の DNA ploidy pattern が存在する。最初のもは、分裂を全く行わなくなった細胞 (fixed postmitotics) で、ニューロンがその代表であるが、これらは DNA 量を測ってみると 2C のところに単一のピークを持つ 2 倍体 G_1 (あるいは G_0) の細胞であることがわかる。2つ目は、生理的にはまれにしか分裂しないが、障害に反応した場合などにはある程度分裂する細胞 (revertant postmitotics), 例えば肝細胞や線維芽細胞であって、DNA 量の分布は 2C にピークを持つ基本的な細胞集団の中に加齢とともにその倍数の DNA 量 (4C, 8C, 16C など) を持つ細胞が少しずつ増えてくるのが特徴的である。まれに増殖中の細胞が測定されれば、これらピークの間には S 期の細胞が検出される。第3のものは消化管上皮や血球のようにヒトが生きている間、絶え間なく増殖を繰り返し人生 80 年の間に約 3 万回あるいはそれ以上もの細胞分裂を行う細胞 (増殖性幹細胞, vegetative mitotics) であって、これらでは 2C のところに大きな山があり、 G_2, M に対応する 4C の部分の小さな山が現れ、その中間には少量ながら S 期の DNA 量を持つ細胞が出現するのが普通である (図 7)。これらの増殖性幹細胞は非癌状態にあるかぎり⁵⁾ 高齢者においても完璧な diploid (2 倍体) の DNA を保持し続けることが証明されている。この現象が特に明確にみられるのは胃や腸の上皮においてである。ここでは、上皮が癌性になった場合にのみ、多倍体細胞 polyploid cell や異倍体細胞 aneuploid cell が出現する。癌の比較的早期には前者のみが現れ、後者のみられない場合も多い。多倍体細胞の出現は、消化管粘膜上皮では癌性変化を強く示唆する所見である。³⁾

ただ、このような判定は、第2の細胞種、revertant postmitotics では成立しない。これらの細胞種においては多倍体細胞が、ヒトの体のほとんどすべての組織で年齢とともに増加し、なんら癌性の変化と結びついていないからである。ヒトでは比較的早くから心筋の多倍体化が進むことが高松の研究で明らかになっているし、肝でもマウスやラットなどの齧歯類に比べてゆっくりとはしているものの、やはり

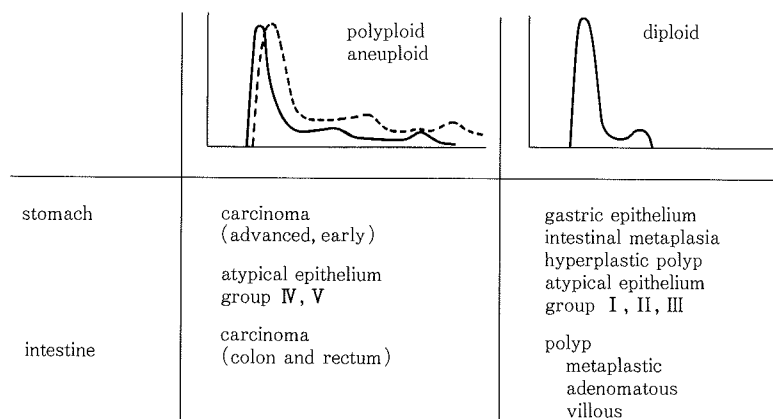
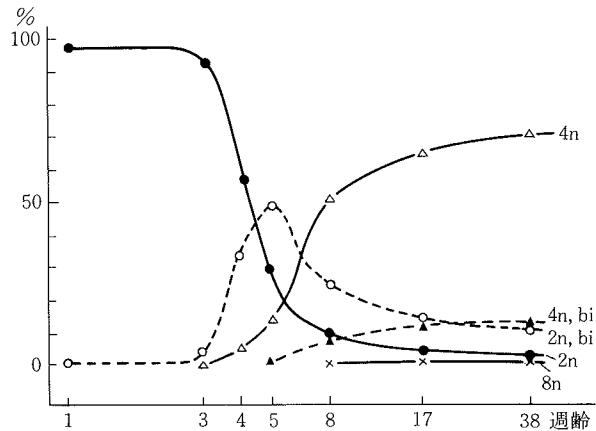


図7 癌細胞と非癌細胞の DNA プロイディパターン⁵⁾

胃や腸の上皮の増殖性幹細胞のように生涯にわたって増殖を続けている細胞系では年齢にかかわらず非癌細胞は完全な 2 倍体であり、癌性細胞では少数の多倍体細胞産生と変異した DNA 量を持つモードの出現で特徴づけられる。

図8 生後のラット肝細胞における多倍体化の進行¹⁸⁾

齧歯類では新生児期の肝細胞はほとんどすべてが1核で2倍体の核(2n)を持つが生後3週ごろから急速に2核2倍体(2n,bi)に移行する。この2核は一点において接触しており、kissing binucleateと呼ばれている。生後4週ごろからは、この2核2倍体が急速に減りはじめ1核4倍体(4n)が増加する。この経過は、化学反応で定量的にA→B, B→Cのような遷移が起こる場合にみられるカーブと同じ様相を示しているから、肝細胞では生後速やかに1核2倍体が2核2倍体に変わり、次いで2核2倍体が1核4倍体になると推定できる。



年齢の増加とともに、かなりの程度が多倍体化の進むことが北村の蛍光 DNA 定量のデータで明らかになっている。¹⁵⁾ 齧歯類の肝における多倍体化の進行は、図8に示すように極めて規則正しく起こるので動物細胞の多倍体化のメカニズムを考える上で重要な鍵を与える現象と考えられている。ただし、これらの臓器では、なにか特別の(例えば肝硬変のような)状況がないかぎりほとんど癌化はみられない。¹⁸⁾

第3の細胞種に属する細胞集団の中でだけ、多倍体細胞が癌性変化の指標の意味を持ってくるのは一体どうしてなのであろうか。この問題に答えるためには、まず多倍体というものがどのようなメカニズムでできてくるものであるか、というところから論じていかなければならない。

4. 多倍体細胞形成のメカニズム

多倍体 polyploidy とは、細胞核の染色体の数あるいは DNA の量が2倍、4倍、8倍、…というふうにハーモニックス的に倍加したものをいう。これが細胞融合によって成立するという憶説は早くに否定された。生理学的条件下では3倍体や5倍体といった多倍体細胞は決して出現しないが、細胞融合で多倍体細胞ができるなら、このような奇数倍体も同じ確率で生じてもよいはずだからである(ウイルスで細胞融合が起こる小児の麻疹性肝炎では、事実このような現象が観察される)。したがって、何らかの分裂異常があって細胞分裂が流産し、その結果として多倍体細胞ができるという考えが支配的である。分裂の異常の原因としてまず考えられるのは、分裂装置(中心小体、紡錘糸など)の欠落や形成不全によるものであるが、これは動物細胞の多倍体化の一般的メカニズムとしては支持できない。というのは、in vivo での肝細胞の多倍体化の観察などで分裂装置の形成が正常に認められているほか、2倍体の正常細胞が分裂を流産して4倍体になった場合、この細胞は4倍体レベルでは完全に分裂を遂行することが明らかになっているからである。また、生体内で多倍体細胞ができる場合、上述(図8)したような肝だけではなく、唾液腺でも、心筋でも常に2核2倍体細胞がまず出現し、それらが次の分裂期を越すと1核4倍体細胞が2つできる事実が観察されている。これら4倍体細胞は、異常分裂をするものもあるが、その多くは正常な分裂を続けることができるのである。提案されるメカニズムは、これらの現象を矛盾なく説明できるようなものでなくてはならない。

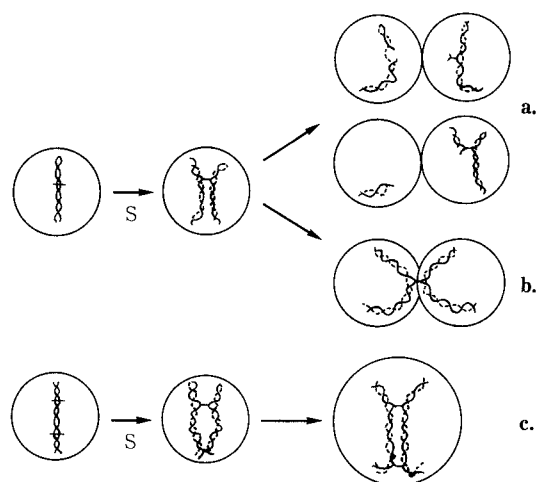


図9 DNA二重鎖間クロスリンケージと核分裂¹⁹⁾

DNA二重鎖間、DNA-蛋白間、あるいは染色体蛋白相互の間にクロスリンケージができれば、それが潜在的要因になり、DNA合成(S)と流産の分裂を介して多倍体細胞(2核細胞を含む)が成立すると考える¹⁹⁾。このクロスリンケージは必ずしも共有結合とは限らない。DNA二重鎖間の分離が阻害されるような条件が作り出されるものでさえあればよいのである。この仮説では、クロスリンケージがちぎれるなどして2細胞に分かれることができれば(a)、まがりなりにも分裂は完了するが、少数のクロスリンケージでも残っていれば2核細胞になり(b)、多数のクロスリンケージが存在すれば多倍体細胞になってしまう(c)ほかはない、と考えられる。aのケースでは、染色体の断裂の結果、不等分配、断裂に引き続く転座・挿入・欠失・クロスリンケージの再生産などが高率に起こると考えられる。

これらの観察事実のすべてを統一的に説明できるものとして“cross linkage 仮説”¹⁹⁾がある。それは(図9参照)、染色体を構成するDNAの二重鎖の間にクロスリンケージを生じ二重鎖の完全な分離が不可能になった細胞が、増殖サイクルを回りS期を経て分裂期へ突入した場合、染色体の不分離を起こし、クロスリンケージが何らかの機転で解消しないかぎり分裂が流産し多倍体細胞になる、というものである。この仮説は、ヒトの組織でみられる多倍体細胞の生成に際してみられるほとんどの状況をよく説明する。例えば、クロスリンケージがたった1つしかないとする図9-bに示すように、ある一点で接触した2核細胞 kissing binucleate が出現すると予想されるが、事実、多倍体化が進行する初期に調べると、肝細胞の多くがこの形の核を持っているのである(図8の2n, bi)。さらに多倍体化がもう一段進行するとそれらは図9-cのような1核4倍体になってしまう(図8の4n)。また、多倍体化が進行する時期の分裂像にはしばしば図10に示すような双染色体 diplochromosome が発見される。2組みのクロマチド(つまり図10-a, bに示すような4本のクロマチド)が縦に接着した形の染色体である。この染色体の形成機転を調べるため、³H-thymidine のパルス標識で細胞をラベルし、そのあとの2回目の分裂で、ラベルされたクロマチドの出現する状態を染色体の拡散伸展標本を用いてオートラジオグラフィで検すると、ラベルは常に双染色体の外側のクロマチドに現れることがわかった。この配列を²¹⁾するメカニズムは図11に示すように中央の2本のクロマチドがクロスリンケージで結び合わされており、分離することができなかったので新たに合成されたDNA鎖が外側へ配列されるようになるという機構

図 10 diplochromosome の種々相とその semiconservative replication のパターン

- a. セントロメア（およびそれ以外の部分）で結合されている染色体。
b. セントロメア以外のところで結合したディプロクロモソーム。いずれのタイプのもも ^3H -thymidine のパルス標識後第 2 回目の分裂像を拡散伸展させて観察すると、標識クロマチドは、図に黒く表されているように、常に最外側にくることが確認される。これは、もともとの二重鎖 DNA（非標識の白い DNA）が離れにくいように、物理的・化学的な力で結合されていたことを示している。ただ、*in vivo* ではこの 4 本のクロマチドも立体的な束になっており、両方の分裂極から伸びてくる紡錘糸が付着する確率はそちらの方を向いているどの 2 本のクロマチドに対しても同じであると考えられる。

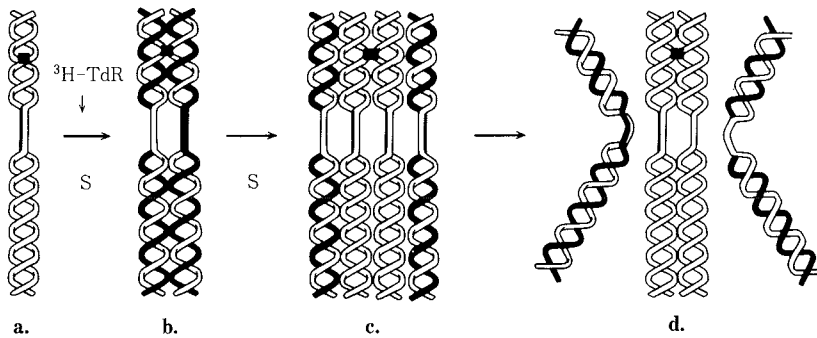
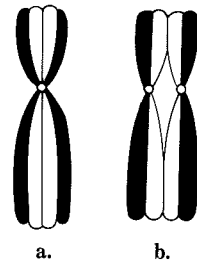


図 11 diplochromosome や多倍体細胞における DNA 合成と染色体の分離

図 9 に示した semiconservative DNA replication のパターンが出現するメカニズムは多倍体化における DNA 二重鎖のクロスリンケージ (■) の存在を考えると容易に理解できる。第 1 回の S 期で新しく合成された標識 DNA 鎖は黒く表されている。a → b は標識後第 1 回の分裂で、この際クロスリンケージのため分裂は流産し多倍体化するところを表している。b → c は第 2 回目の非標識 DNA 合成、c → d はそれに引き続いて起こる多倍体細胞の分裂を示す。

を考えるとうまく説明できる。

図はまた、興味ある事実を示している。つまり、2 倍体の段階では (図 11-a → b)、クロスリンケージのため分離できなかった染色体が、多倍体化すると (図 11 の右端 d)、クロスリンケージで結ばれた中央の 2 本のクロマチド (4 倍体) と、その両端の各 1 本ずつの染色体を合わせた 4 倍体染色体のセットを持つ別の細胞との 2 つの細胞に分離できることを示しているのである。双染色体は図 10 では伸展され、4 本のクロマチドが一平面に並んだ形になっているが、*in vivo* で観察すると 4 本の鉛筆を束ねたような状態になっていることが知られているから、どの動原体のペアが左右に分かれるかは、立体的にみてランダムに選ばれる可能性が高い。したがって、d のような分離も高い確率で起こると考えられる。この (d の) ような分離が起こったとすると、中央の 2 本の染色体を持つ多倍体細胞は、母細胞と同じタイプの障害 (クロスリンケージ) を持っているから、いうならば振り出しに (図 11-b) 戻った、多倍体細胞発生能を持つ潜在的異常細胞の再現であり、一方、両側の完全に正常な染色体の組を受け取った娘細胞は染色体数が倍加した以外は何の DNA 障害も持っていない完全に正常な多倍体細胞となると

考えられる。後者は、DNA 量が倍加した以外は何の異常もないはずなので、もともとの増殖細胞と比べて一段高い ploidy のオーダーで自由に増殖サイクルを回りうる細胞となっていると考えられる。

図 9 と図 11 は、いま 1 つ重要な現象の発生を説明する。すなわち、クロスリンケージのある細胞に分裂が起こりクロスリンケージが切れないとすると、異質接合性を喪失した 2 本のクロマチドが同一の細胞の中に取り込まれる結果 loss of heterozygosity (LOH) になるチャンスが高まる、ということである。この 2 本はリンクされているので、他のいかなる 2 本のクロマチドの組みよりも、同一の細胞の中にとどまり続ける可能性が高い。このため、1 つの細胞に 2 本のクロマチドしかない状態が保たれるとすると、一方の娘細胞では 2 つの対立遺伝子 allele の両方が欠損することにより、もう一方の娘細胞では同一の対立遺伝子だけが取り込まれることにより、両娘細胞とも、そのクロマチドに乗っている遺伝子に関して LOH になると予想される。発癌過程の中で重要と考えられている異質接合性の喪失 (LOH) という現象が、このようなメカニズムを介してクロスリンケージの存在と細胞分裂の過程に付随して起こる可能性は高いと考えられる。

5. 多倍体細胞の出現する状況と染色体障害

上に述べた考えに従えば、逆の方向でみて、増殖する細胞から多倍体細胞が生み出されつつある状況が存在する場合には、その背景に、DNA 二重鎖間にクロスリンケージを持った母細胞が増殖サイクルを回り、分裂期に突入するといった現象があると推察できる。このような状況で、多倍体細胞が生み出される最初の分裂では、染色体が極めて不安定な状態 (chromosomal instability) に置かれることは間違いない。というのは、もし彼らが多倍体化せず、何らかの方法で分裂を完遂するとすれば、図 9 にみられるように、シャム双生児を無理に引き裂くように、一部でつながった 2 本のクロマチドが分裂に際して左右に引かれ、物理的な力で引きちぎられるか (a), non-disjunction 的に 1 本の染色体あるいはその一部だけが、予定されたのとは違う娘細胞の中に取り込まれるなどの異常分裂を起こす可能性が濃厚に生じていたはずだからである。この場合、純粋に物理的な力で断裂することも当然考えられるが、物理的な力で引かれるため、あるいは切断されたために、近傍の DNA が屈曲や異常ねじれあるいは単鎖ループ形成を起こして二次的に切断されやすくなる、という事態も考慮に入れておかねばならないだろう。染色体がちぎれると、その断端における欠失が必然的に起こる。いったんできた断端は他の DNA 断端と非常に結合しやすくなっているから translocation などの染色体異常が当然起こってくるものと考えられる。また、核内に何らかの DNA の断片があれば、それらが容易に挿入される結果となるであろう。このような染色体異常は発癌との関連で、最近特に注目を集めている現象である。

それでは、無理な分裂を遂行せず多倍体化した細胞はどうかというと、これには 2 種類あると考えられる。そのうちの 1 つは、図 11 右端で両側の完全に正常な染色体が 2 つ組みになって分離したものを含むような多倍体細胞で、これは質的にも完全に正常な、染色体数だけが倍になった細胞と考えられる。このようなものは、発癌と何の関係もない細胞に戻ったものといえる。しかし一方、いま 1 つのタイプの多倍体細胞は図 11 で中央の 2 本の染色体の組みを取り込んだような細胞になる。これらでは、クロスリンケージ障害はそのまま保有し、振り出しに戻ったような状態にあると考えられる。このような細胞が再び増殖サイクルを回り、図 9 の右端のような状況を再現すると、ある場合には図 11-d のよ

うな幸運な分離が起こり、1つの正常な娘細胞を生むチャンスもあるが、そうではなく、図9のaやbやcのように無理に分離しようとして、上述したように“chromosomal instability”の状態に陥る可能性も非常に高いと考えられる。それらは、染色体の異常を起こす確率の異常に高いハイリスクの細胞であるといわなければならないだろう。ただ、ここで注意すべきは、多倍体細胞が出現しようとする際に必然的に染色体の不安定性が生じる状況が発生してくるが、これはDNA二重鎖間にクロスリンケージがあるだけでは不十分であって、この細胞がDNAを合成し細胞分裂期に突入するという条件がつけ加わる必要があるというところである。したがって、第2のタイプの細胞集団、つまり多倍体化しても増殖をほとんどしなくなってしまうような細胞には染色体不安定は生じず、したがって癌化のリスクも高まらない。骨髄巨核球や加齢に伴って全身の多くの組織に出現してくる多倍体細胞は、このカテゴリーに属するものである。心筋や生理的状态にある肝細胞や骨や結合組織の細胞は後者の例である。彼らの背景にあり、これら多倍体細胞をつくり出した2倍体細胞も、分裂する回数が限られており、また分裂しても生まれた娘細胞がほとんど分裂能を持たないpostmitoticsに成熟分化してしまうものが主体を占めるので、このような組織では多倍体細胞の出現と癌化のリスクとの相関はほとんどないと考えられる。増殖性幹細胞が多倍体細胞をつくり出しつつある状況が高リスクなのである。胃や腸の粘膜上皮は、ヒトの生涯を通じて増殖細胞を保有し続ける。このような組織に多倍体細胞が出現するのが、癌化の指標として重要な意味を持つ³⁾のはこのような意味があったと理解される。

6. 人癌のDNAレベルにおけるクローナル・エボリューションとそのメカニズム

これまでの多くの報告を通覧すると、どうも、人癌の本当の初発像は正常と区別しにくい、極めておとなしい形態を示している可能性が高い。印環細胞癌の初期像は、この予想を裏書きする^{10,11)}。印環細胞癌が粘膜の中で層構造を示し増殖細胞帯から上下に、分化した印環細胞（正常と同じタイプのムチンを活発に合成する能力を持つ）をつくり出しているものでは、常にploidyパターンは2倍体であるが、この細胞の染色体数を抗セントロメア抗体で染色し共焦点レーザースキャンニング落射蛍光顕微鏡を用い（図12のように）その数を計数すると46本であり、ここでも癌の初発像は正常細胞に近い染色体構成を持っているという推定が支持された。ヒト肝癌の初発像の所見も同様に正常肝細胞に近い性質を持っているようなものであるらしい²⁷⁾。理念的に考えても、はじめ1個の正常な宿主細胞からつくられた直後の、癌起始細胞は、一挙に多数の染色体変異を蓄積してしまっているはずがない。多数の染色体変異は多段階で起こるのでなければ実現できないはずである。また実際の経験に照らしてみても、この推論は支持される。これまで病理組織学的に極めて多数の症例が細心の注意を払って検索されてきたにもかかわらず、細胞数が数百個あるいはそれ以下の初発癌病巣が、ほとんど全く見出されたことがないのは、ここに推定されたように、極初期の癌細胞には末期癌のような高度の細胞異型性が欠けているためである²⁷⁾としか考えられない。スタートは極めて正常に類似した細胞から始まっているに違いない。異型性は長い時間をかけてだんだんに獲得されるのである。このような初発癌性細胞のイメージは、これまでの病理学で、末期の癌からの経験によってつくられあげられた異型細胞の概念から外れてしまっている。

人癌のスタートがこのような細胞からであると考え、平均25年にも及ぶヒト胃癌自然史の長い時間経過の間に、増殖細胞集団の中に多倍体細胞が出現し、これに伴って突然変異が重畳し、染色体異

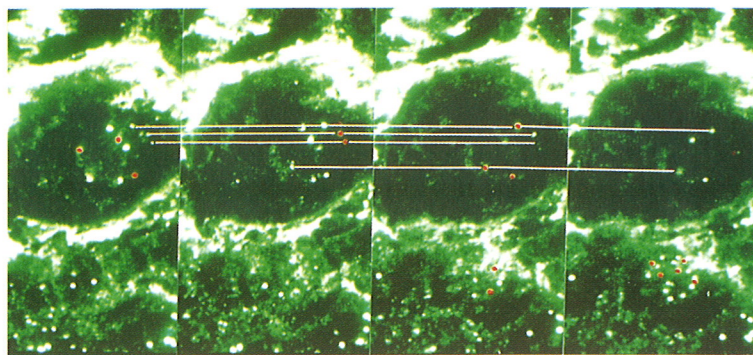


図 12 共焦点レーザースキャンニング落射蛍光顕微鏡による間期細胞核セントロメアの計数（初期の印環細胞癌）

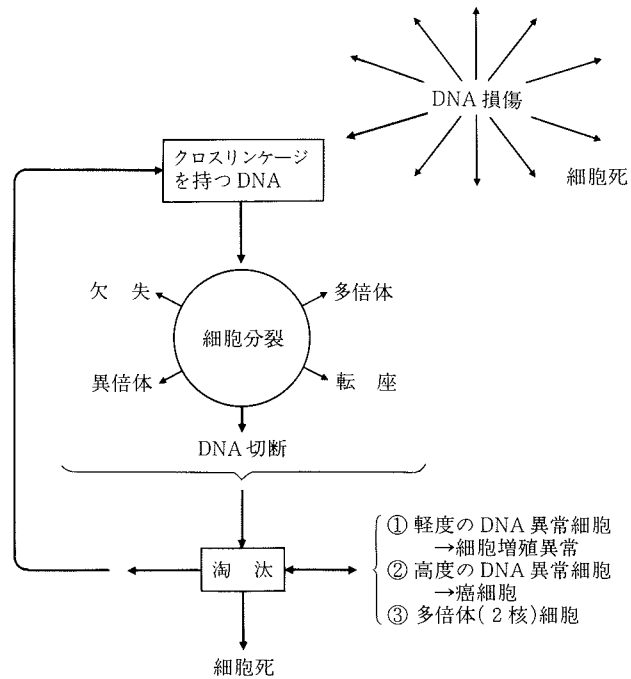
間期の細胞核を抗セントロメア抗体によって免疫蛍光染色し共焦点レーザースキャンニング落射蛍光顕微鏡でマイクロトモグラフィをとる。間隔は $0.5\mu\text{m}$ が適当である。このトモグラフィを左右に並べ同じ x, y 座標上に出現した連続する蛍光シグナルを直線で結ぶ。多くの場合、1つのセントロメアは2,3枚のトモグラフィに連続して切れている。このうち、最も大きく明るいシグナルに（赤で）印をつける。1個の核全体をカバーする連続トモグラフィの中での（赤く印をついた）シグナルの個数を数えると、46個もあるセントロメアの数 が正しく計算できる。この方法は京都府立医大病院病理学部・杉原洋行講師によって開発されたものである。

型を獲得した細胞が必発的に出現するような異常な状況が長期にわたって存在すると考えなければならない。しかも、この異型細胞における単位時間当たりの突然変異集積の頻度はヒトの体細胞の突然変異率などと比べると桁はずれに高いものでなければならないのである。上述したように、発癌に関連して¹⁶⁾多倍体細胞が出現するような状況では増殖細胞集団の中に DNA 二重鎖間のクロスリンケージが潜在的に保有されているという背景病変が存在すると推定される。これを、そんなに回りくどく考えずに、直截的に、この背景病変が癌性細胞を生み出す直接の原因であると考えた方が思考の経済になるだろう。つまり、人癌では発癌のはじめに非癌 2 倍体細胞の核 DNA の中にクロスリンケージを生じる変化が出現すると考えるわけである（図 13）。これが癌細胞発生の DNA クロスリンケージ説である。クロスリンケージを持った細胞が分裂すると結果は必ずしも多倍体細胞になるわけではない。多倍体細胞化はいちばん障害を生じることの少ない解決法ではあるが、それはこのような障害を持つ細胞の分裂後の帰結の 1 つにすぎない。それ以外の帰結として考えられるのは（図 13）クロスリンケージを持つ染色体が non-disjunction 的に分配されトリソミーとモノソミーができる場合やクロスリンケージの近傍で染色体がちぎれて不規則な欠失と重複を持つ 1 組みの娘細胞のペアができる場合（顕微鏡的異倍体 aneuploidy の出現）、分裂細胞が死滅してしまう場合（実際にはこのケースが最も多いだろう、人癌では 1 回の分裂当たり、新たに細胞数増加に寄与するのは、新しく増加した娘細胞のうちの 10 ないし 1 % 程度にすぎず、残りはすべて死滅すると推定されている⁸⁾）などなどである。

一方、クロスリンケージを持つ細胞の分裂流産によってできた多倍体細胞や異倍体細胞は、その染色体の中にクロスリンケージを保有したままである可能性が高い。したがって、この細胞が生存の可能性と増殖の可能性の過酷なテストに生き抜き、再び分裂期に突入したときも（図 13、上へ回帰する矢印）、上に述べた幾つかの帰結のうちの 1 つが選ばれる確率は非常に高くなる。クロスリンケージから生じ

図 13 多倍体化と癌性細胞形成の DNA
クロスリンケージモデル

増殖細胞に DNA 障害が発生し、DNA 二重鎖間に (DNA-DNA, DNA-蛋白, 蛋白-蛋白間のいずれでもよい) クロスリンケージができた場合、細胞分裂に際して、さまざまな染色体異常が発生する状況が出現する。最も障害の少ない帰結は多倍体化することであるが染色体の断裂という事態もしばしば生じると考えられる。切断されたクロマチドは多くの二次変化を起こす可能性が高い。このようにして生じた変異細胞は環境への適応性・生長優位性などの厳しいテストをクリアしなければ生き続けることができない。これに失敗した変異細胞はすべて死滅すると考えられる。人癌では増加分の 9 割以上の細胞が死滅するが、かれらはこの中に含まれていると考えられる。この淘汰の結果、次第に悪性度を増す方向に選択された変異細胞のクローンが産生されていくのである。



異常細胞発生のリスクは、クロスリンケージが可逆的に解消されないかぎり、それを持つ増殖細胞が死滅しつくす以外のことで消失することはない。

7. 人癌の中における染色体変異の多段階的進行の実態

1 つの胃癌の中でも、DNA の ploidy pattern がどのように分布しているかを図 14 のような方法でマップすると、図 15 のようなさまざまな様相を示すことがわかった^{22,23)}。図 15 の A は図 B に示す直径 3.3 cm の早期癌類似進行癌の各部 (a, b) における DNA ploidy の分布 (分裂中期像の DNA 量を 2 で割ったもの) である。図 C, D, E, F は比較的小さな進行癌のマッピングで、実線の輪郭は 2 倍体の癌、斜線を引いた部分は異倍体の癌細胞の集団、点線は粘膜より下に浸潤した部分で D とあるのは 2 倍体癌細胞の広がり、A とあるのは異倍体癌細胞の広がりを示している。これらの分布からみて、癌細胞はまず 2 倍体の集団として局所で増え広がり、その進展の中に異倍体細胞がサブクローンとして出現したものであることは明らかである。この間の癌細胞集団の生長の速さは、2 つ以上の時点における二重造影 X 線像から測定された陰影の増大と、測定時点の時間間隔から測定された胃早期癌の生長速度 (ダブリングタイム 2 年から 3 年)⁴⁾ で推定することができる。この動態は、本大系第 9 巻 C の「癌の自然史」に述べたので、ここでは、これをサブクローンの発生という様相からみてみよう。この見地から人癌のプログレッションの状況を模式的に示すと図 16 のようになる。ここでは、2 つだけのサブクローンの出現を示したが、実際の進行癌では、染色体の中に多数の変異が集積している。上述したように、しばしばそれは核型分析で、1 個の癌細胞中に 30 個以上の染色体異常として見出されるほどになる。⁸⁾ したがって、実際の人癌の進展に際しては図 16 のようなサブクローンの形成が、もっと多数 (10 ないし 20 倍程度) 積み重なった状態が出現していると考えなければならない。このようにして、人癌は、

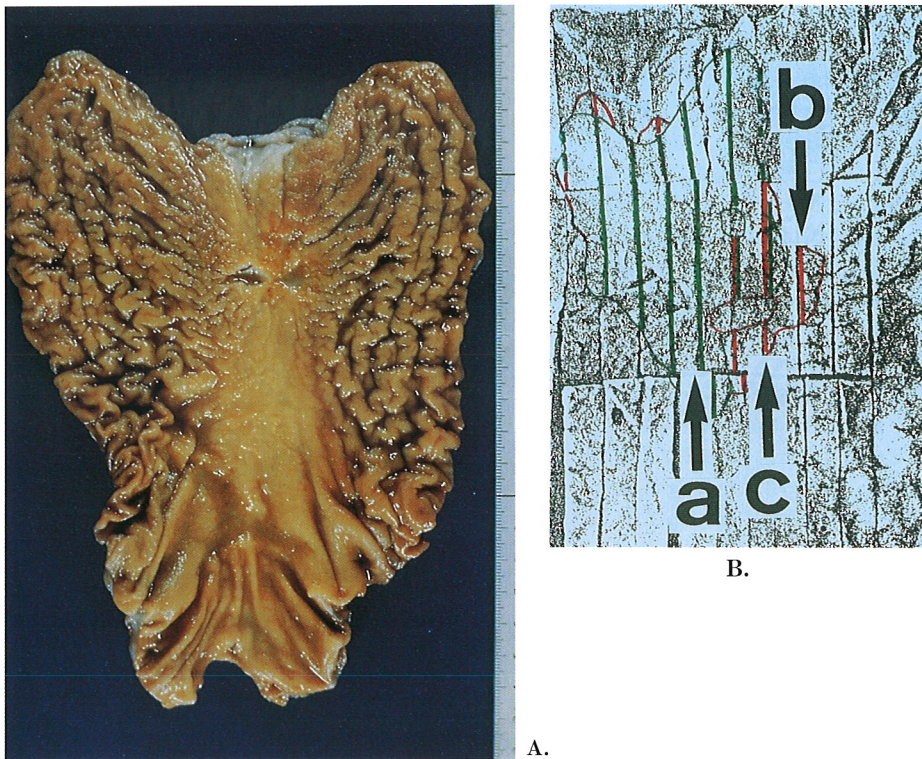


図 14 早期胃癌における核 DNA プロイディ分布のマッピング²²⁾

図 A の胃体部小彎の全割標本に基づいて癌細胞の核 DNA プロイディ分布のマッピングを行った結果を図 B に示す。赤い線は 2 倍体、緑は異倍体の分布である。2 倍体の癌組織が広がっていた部分をほとんど侵食しつつある形で異倍体の癌細胞が広がってきた状況が看取できる。

その進展とともに、より生長優位の変異クローンが選ばれ、悪性の度を強めていく、と考えられる。²⁰⁾

人癌、特に胃癌や大腸癌や膀胱癌などを対象として、核 DNA 量を手がかりに、発生後の時間のより短いと考えられる、サイズのより小さい癌の方へたどっていくと早期癌、初期癌では ploidy pattern が、予想通り正常の 2 倍体に近いものが多くなる。

一方、進行癌、特に、転移性となったものやスキルスのようなものでは核 DNA に異常が高度に発現しており、その頻度も高い。²³⁾ 上述したように、染色体分析からみても、その全例で多数の染色体が高度の異常を呈しているとみてよい状態となっている。¹⁷⁾ このような突然変異は発癌以来時間とともに増加・集積してきたものであることに疑いはない。

癌細胞ないし癌性細胞における DNA のこの高頻度の変異は「癌化のはじめに DNA の二重鎖間に cross linkage ができる」という仮説によってかなりの程度までうまく説明できる。本論中に述べた clonal evolution theory²⁰⁾ (ないしは多段階変異説) からいうと、形態学的には、ある程度の異型性が証明されるような (いわゆる異形成性) 病変の中には、核 DNA 量からみるとステムラインは一見正常な 2 倍体の細胞のようにみえながらクロスリンケージの存在によって異常分裂をする細胞を出発点とし、DNA に高度の異常を持つクローンを段階的に確立しつつある途中の状態が含まれていると考えられる。

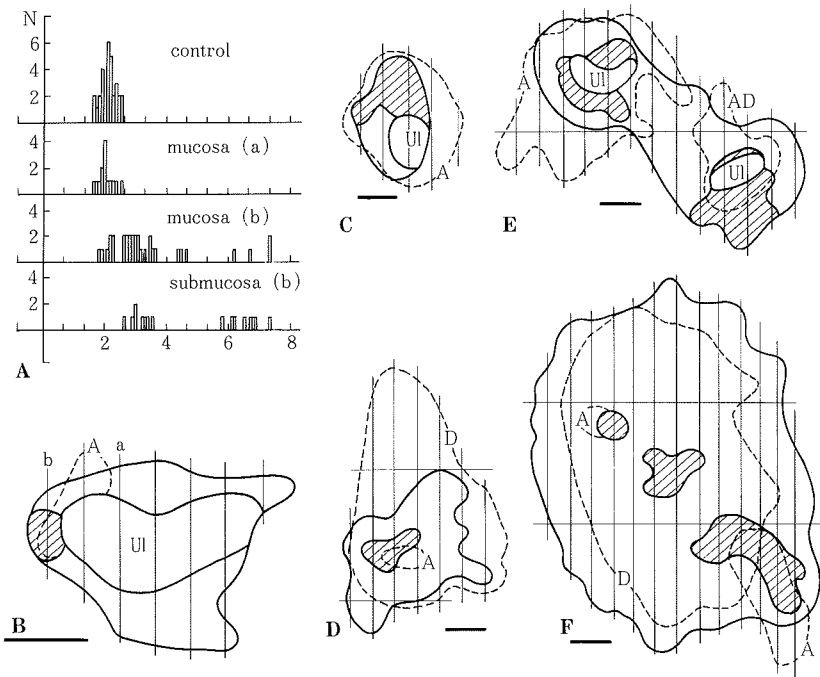


図 15 胃癌における 2 倍体と異倍体癌細胞の分布²²⁾

図 14 に示すような方法でマップした 5 例の結果。A は図 B の早期類似進行期胃癌の中で分裂中期像の DNA 定量から決定した癌細胞の ploidy の分布を示す。中期分裂像の赤道面が切片に並行になっているようなものの DNA 量を測定すると、その 1/2 がプロイディを表すことになる。ヒストグラムの x 軸はこの値である。a は切片 a の粘膜内で測定した値。b は切片 b の粘膜内および粘膜下での測定値を示す。B-F はそれぞれ別の早期癌類似進行期胃癌における ploidy pattern のマッピングである。点線は粘膜下に浸潤した部分、太い実線は粘膜内の癌分布で、それらの線に書き添えてある細字の A, D, AD はそれぞれ 2 倍体、異倍体、両者の混じり合ったものであることを示している。斜線は異倍体細胞。図中の横棒は 1 cm の長さを示す。

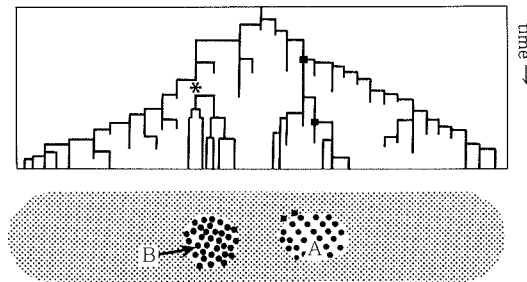


図 16 癌細胞の clonal evolution とサブクロンの出現

人癌が進行期に達するまでには、この 10 倍以上の枝岐れが起こり、極めて多数のサブクロンが、1 つの癌の中に住み分けている状態が出現すると考えられる。

このプログレッションは、染色体の変異を積み重ねるという“確率論的なプロセスで”進行する。この過程は基本的にはランダム性の高いものだと考えられる。一方、異常細胞の淘汰は局所の環境における生存可能性や生長優位性などの局所特異的な条件がテストされる結果であるから、非ランダム性の高い条件が課せられていることになる。その総合的な結果としてできあがってくる癌細胞集団のゲノムは、多数のサブクローンからなる異質性 heterogeneity の強いものとなり、一方、淘汰の非ランダム性のゆえに染色体変化は一定の傾向を示すようになると考えられる。このプログレッション途上の“癌性細胞 cancerous cell”は、まだ決定論的には癌といえないが、正常細胞集団と比べると、極めて高い確率で将来悪性細胞を生み出し進行癌へと進展していく可能性の高い細胞集団である。これこそが理念的にいても癌に向かう病変の初期という意味で前癌病変といえるものであろう。

8. 前癌の概念

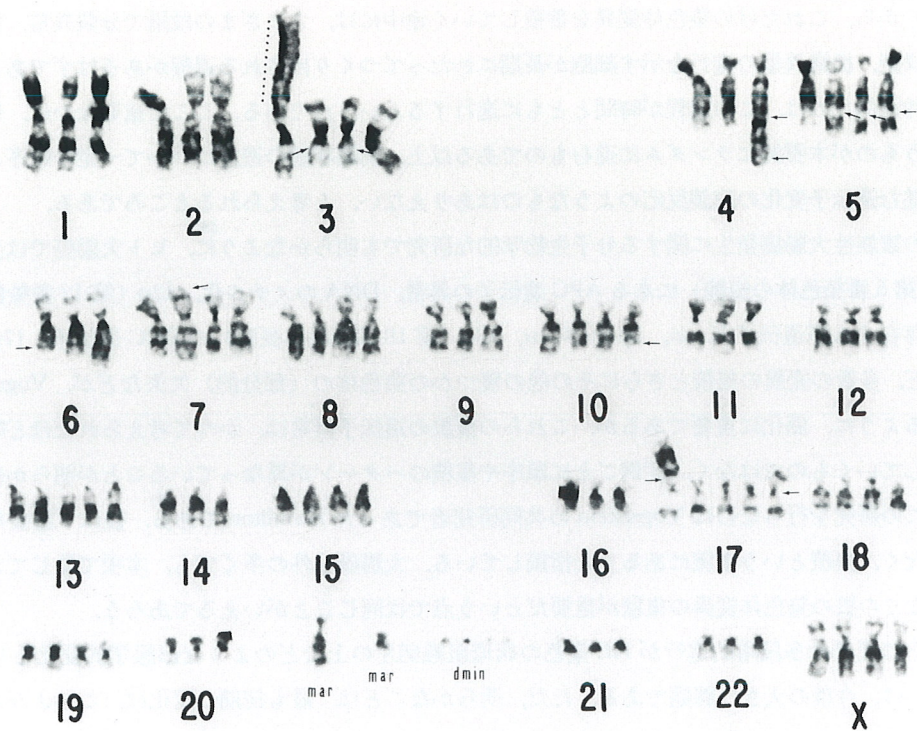
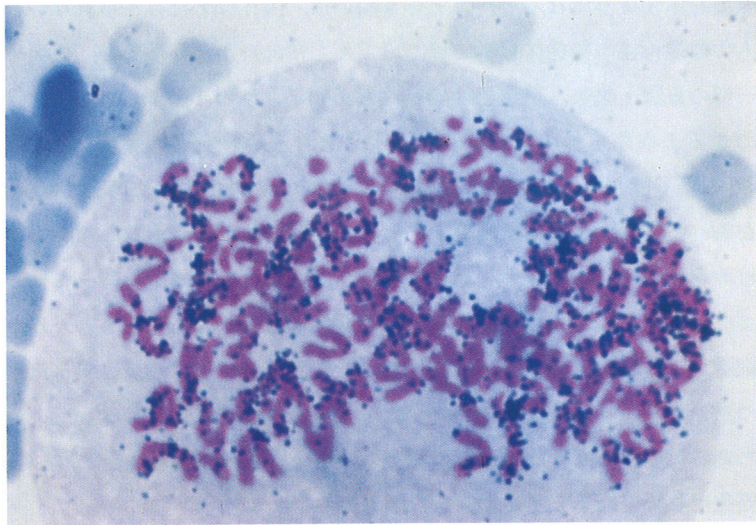
これまで、前癌性病変は「時間の経過とともに癌が高頻度に発生するような病変」(北川¹⁴⁾)というプロスペクティブな定義が与えられたり、「正常の細胞が癌に移行する段階で、正常と癌との中間段階にある病変」(伊東¹³⁾)というような包括的定義が与えられていた。この意味がどのような内容を持つものであるかを考えてみよう。

ここで、人癌の発生を上述してきたように染色体の多段階変異による一連の変化とみる立場から前癌を見直してみると、「正常の細胞が癌に移行する段階で、正常と癌との中間段階にある病変¹³⁾」という意味がはっきりしてくる。前癌の最初の段階は増殖性細胞が潜在的に DNA の二重鎖間にクロスリンケージ(あるいはこれに類する DNA の分離阻害をきたしうる異常)を保有するようになり、分裂をするたびに非常に高い確率で DNA に変異を獲得するようになった状態と理解される。このような、ごくごく初期の状態は DNA レベルでみても形態学的にみても非常に正常細胞に似ているはずである。また、この状態の細胞は、その時点でみて、本質的に癌ではない。遺伝子レベルでみても表現型でみても悪性細胞ではないからである。しかし、本質的に、正常(非癌)細胞と同じではない。正常細胞と決定的に違うのは、プロスペクティブにみた確率論的な差である。まさに「時間の経過とともに癌が高頻度に発生するような病変¹⁴⁾」なのである。これは明らかに確率論的にのみ定義できる状態であって、癌に発展しないこともあり、発展するとしても比較的速やかな場合も比較的長時間かかってやっと癌といえるだけの染色体変化を蓄積するようになる場合も含まれる。

したがって、これまで、病理学者が捉われがちであった「癌というものは1個の細胞が癌化した最初から癌である」という考え方や、「前癌の中には癌細胞が混じっているものとそうでないものがある、したがって、これを正確に見分け、必ず癌に移行する非可逆性の病変のみを前癌変化と呼ぶべきだ」などというような決定論的な観念は、前癌病変の理解には本質的になじまないと考えるべきである。このような固定的かつ決定論的な観念で、癌の初期像を見出そうとして微小癌を追跡しても、その最初の段階にたどりつけないのは、当然のことであったと考えられる。癌の起源細胞は遺伝子レベルでも表現型レベルでも、癌としての特徴をその時点で備えているわけではない。それに至るまでには、時間をかけて、多くの DNA 変異を染色体の中に蓄積せねばならないのである(図 17)。

それでは最初の1個の癌性細胞 cancerous cell が何個の染色体変異を獲得すれば進行癌にみられる悪

a. 異型性を示す胃癌細胞の腹水中での分裂像。この細胞には ^3H -thymidineが3世代前に投与されており、染色体への取り込みは3回目の分裂を示すsemiconservative patternを呈している。異倍体細胞も人体内で活発に増殖を続けている証拠である。



b. 顕微測光法で異倍体を示した胃癌細胞の染色体分析である。染色体数は84本でプロイディでいえば3.6倍体、その上に多くの染色体では構造異常があり、同定可能な染色体以外にも幾つかのDM (double minute) が存在している。進行期癌では、この程度の染色体異常があることは珍しくない。

図 17 進行癌における染色体異常¹⁷⁾

性度を示すようになるのか、という問いに、現在はまだ答えられない。しかし、冒頭にも述べたように、人体の進行癌の染色体分析では、ほとんど常に、かなり多数の、欠失や転座、クロマチド全体あるいは一部の重複・欠失、遺伝子の増幅などが発見される（図 17-b）。数え方にもよるが、光学顕微鏡で同定できるようなレベルの異変でも 5~30 個くらいの変異の蓄積が多い。分子生物学的な方法を用いて（その多くはさまざまな molecular hybridization の変法に依存しているが）ヌクレオチドレベルの変異を調べると短い DNA 断片でもかなりの突然変異が見つかることが多いから、癌細胞 1 個の全ゲノムではおそらく何万ヌクレオチドという天文学的な数の変異が起こっていることが多いと推定される。このようなもののうち、癌化に関係しない変異ももちろんあるだろう。しかし、それも、観測にかかる癌性細胞というものは局所適応性と生長優位性の淘汰をくり抜けてきたものに限られるから、癌化に「何の意味もない」中立変異であったということ自身で意味があるし、いわんやわずかでも適応性や優位性のある可能性を考えると、この程度の染色体変化は必要最小限とはいえないまでも、ヒトの増殖細胞の癌化に必要となると考えて大きな誤りはないであろう。

たった 1 つのクロスリンケージ（あるいは non-disjunction をきたすような、これに類する潜在的分子変化）から、これだけの染色体変異を蓄積していく途中には、さまざまな段階で分裂異常、核異型、細胞質異型、組織異型の進行を示す細胞が長期にわたってつくり出される過程があるはずである。癌性細胞に特徴的なのは、この過程が時間とともに進行するという点である。ここで重要なのは、染色体変異というものが本質的にランダムに進むものである以上、前癌状態の進行について一定の順序と時間的経過で進む遺伝子変化の連鎖反応のようなものはありえない、と考えられるところである。

最近の家族性大腸癌発生に関する分子生物学的な研究でも明らかのように、ヒト大腸癌では少なくとも 5p（第 5 番染色体の短腕）にある APC 遺伝子の異常、DNA のメチル化、12p（第 12 番染色体の短腕）に存在する癌遺伝子 K-ras、1p の N-ras、18q（第 18 番染色体長腕）の DCC 遺伝子、17p にある P53 など、多数の変異の集積とさらにその他の幾つかの染色体の（部分的）欠失などが、Vogelstein の指摘する²⁸⁾ように、癌化に重要であるが、これらの複数の遺伝子異常は、かつて考えられたほど順序正しく進行していくものではなく、症例ごとに順序や集積のパターンが異なっていることが明らかになっている。この研究を行ったのは Vogelstein の共同研究者であった Hamilton である。¹⁰⁾彼は「重要なのは順序ではなく、集積という事実にある」と指摘している。大腸癌以外の多くでも、本項で論じてきたように、かなりの数の染色体変異の集積が重要だという点では同じことがいえるであろう。

これらの変異の多段階的進行が HE 染色の病理組織切片の上でどのような形態学的変化として捉えられるかは、今後の大きな課題である。ただ、明らかなことは、最も初期の変化は、このような単純な鏡検では認識することの難しいものに違いないということである。これから、このような多段階の確率論的な進行という学説の導きに沿って、前癌性病変、異形成 dysplasia、良性悪性境界病変、carcinoma in situ などと呼ばれてきた腫瘍性病変を注意深く検索し、異常分裂を検出したり、分子生物学的手法で DNA の異常をマップしたり、in situ hybridization 法による間期細胞の染色体分析（図 18 に示されているような fluorescent in situ hybridization, FISH と呼ばれる方法を用いる）を行ったりしてデータを集め、それらを、経時的に採取した病理組織の所見や臨床経過と注意深く比べる研究が必要になるであろう。これらの癌性病変を定常状態にある腺腫などの良性腫瘍や反応性病変から明確に区別するためには、

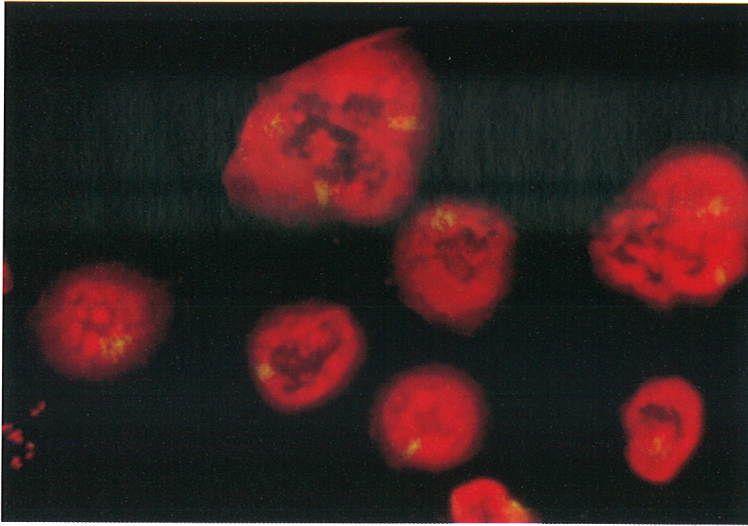


図 18 FISH による間期細胞核における染色体変異の検出

X 染色体に特異的な DNA プローブを fluorescein で蛍光化し、in situ hybridization で進行期癌細胞を染め蛍光顕微鏡で観察したもの。このような FISH 法で検索すると各細胞核の中に X 染色体が何個あるか、どのような空間配置をとっているかが可視化される。ここでは、図の下端にみられるように 1 個のもの、右端にあるような 2 個のもの、上端にあるような 3 個のものが共存しているのがわかる。今日では、すべての染色体の多くの部位に特異的な各種 DNA プローブが入手可能になっているから、このように FISH 法で間期細胞の染色体異常を、どのような染色体についても、in situ で検出することが可能となってきた。さらに、この結果を病理組織切片の中で、共焦点レーザースキャンニング落射蛍光顕微鏡のトモグラフィによって観察すると、蛍光シグナルの分布が三次元的に把握でき、シグナルの個数のカウントも非常に正確になる。このような方法を用いて行われてきたこれまでの観察から、進行期の癌組織の中では染色体変異の上からみて無数のサブクローンが存在していることが明らかになりつつある。

染色体レベルのプロGRESSIONを検出することが決定的な手がかりを与えることになる。重要なのは、前癌細胞（ここでは cancerous cell、癌性細胞と呼ぶ）では、染色体の変異が進行性であることである。この点が、染色体変化の進行しない良性病変との本質的な鑑別点であろうと考えられる。しかし、現在の病理学的診断において、異型性の少ないことから良性と考えられている腺腫や異形成病巣がこの本質的定義で検索された場合に、どれだけが本当に良性といえるか、は予想できない。そのかなりのものが、ゆっくりと進行する癌性病変の初期像である可能性は十分考えられることである。

9. 癌発生の確率論的概念の持つ実践的意義

このような、癌発生の時間的経過と確率論的なプロGRESSIONの原理が明らかになると、病理学的診断の実践的な意味も変わってくる。まず、外科病理診断学では、初期・早期の癌性病変を、予後の確率的重みをつけて正確に診断することがなにより重要になる。癌性変化といえども初期・早期には、その生物学的性状に応じた治療を指示することが大切になるであろう。初期には癌性変化だからといって常に大ナタをふるって患者の quality of life を痛めつける必要はない。初発後の時間的経過からいって早ければ早いだけ、染色体 DNA に、まだ十分悪性といえるだけの変化が積み重なっていないことが期

待されるからである。これらは手軽な方法で治療しても 100 % の効果が期待できる。そのような時期が、癌の自然史の初期・中期にはかなりの期間存在しているから、多くの癌性病変がこの時期に診断可能となる時代がくる、と考えられる。レーザーで焼いたりポリペクトミーで切除したりする局所的治療で十分完治可能な、癌の初期というものが存在することを認識する必要がある。そしてすべての癌性病変を、この時期の間に、正確に診断できるような方法を確立する必要がある。問題は、このような初期に、どうして正しく診断するか、であるが、それは診断学の進歩によってきっと可能になる、と考えられる。

しかしそのためには、このような前癌や初期癌を、いかにして客観的に正確に捉え、その予後を正しく評価するかの基礎的研究が必要になる。現在の癌の診断学はまだ未熟である。前癌状態や dysplasia と呼ばれる病変の本態に迫るための、その実態に関する基本的研究は、これからである。初期の癌性変化が確率論的に進行する病変であることを正しく理解し、その進行を時間軸の上に把握するというこの研究こそ、21 世紀の根本的な対癌戦略を立てるために、現在最も重要な病理学的課題であると著者は考えている。

(藤田 哲也)

文 献

- 1) Brodsky, V. Y. & Uryvaeva, I. V. : Genome Multiplication in Growth and Development. Cambridge Univ. Press, 1985.
- 2) Collins, V. P., Loeffler, R. K. et al. : Observation on growth rates of human tumors. Am. J. Roentgenol. **76** : 988~1001, 1956.
- 3) Fialkow, P. J. : Clonal origin of human tumors. Biochim. Biophys. Acta **458** : 283~321, 1976.
- 4) Fujita, S. : Biology of early gastric carcinoma. Pathol. Res. Pract. **163** : 297~306, 1978.
- 5) 藤田哲也 : 細胞動態からみた胃癌の発生と進展 (日本病理学会宿題報告). 日病会誌 **70** : 23~54, 1981.
- 6) 藤田哲也 : 顕微測光による定量的組織化学. 病理学マニュアル 4, p. 325~354, 医歯薬出版, 東京, 1987.
- 7) 藤田哲也 : 癌の自然史. 現代病理学大系, 第 9 巻 C <腫瘍 III>, p. 255~243, 中山書店, 東京, 1984.
- 8) 藤田哲也 : 腫瘍の増殖と生長. 現代病理学大系, 第 9 巻 A <腫瘍 I>, p. 70~111, 中山書店, 東京, 1985.
- 9) 浜田新七 : 顕微蛍光 DNA 定量法によるヒト大腸腫瘍の解析. 京府医大誌 **94** : 129~148, 1985.
- 10) Hamilton, S. R. : Molecular genetics of colorectal carcinoma. Cancer **70** : 1216~1221, 1992.
- 11) Hopman, A. H. N., Olesker, O. et al. : Numerical chromosome 1, 7, 9, and 11 aberrations in bladder cancer detected by in situ hybridization. Cancer Res. **51** : 644~651, 1991.
- 12) Hopman, A. H. N., Ramackers, F. C. S. et al. : Interphase cytogenetics on solid tumors. In : In situ Hybridization : Principles and Practice (ed. by Polak, J. M. & McGee, J.), Oxford Univ. Press, 1989.
- 13) 伊東信行, 広瀬雅雄 : 前癌病変. がんの辞典, からだの科学別冊, p. 245~259, 日本評論社, 東京, 1990.
- 14) 北川知行 : 前癌病変. 現代病理学大系, 第 9 巻 A <腫瘍 I>, p. 133~142, 中山書店, 東京, 1985.
- 15) 北村 収 : 加齢及び慢性肝疾患における肝細胞 Ploidy 変化に関する研究. 京府医大誌 **87** : 1037~1048, 1987.
- 16) 近藤宗平 : 昭和 61 年度日本遺伝学会木原賞受賞講演. 突然変異の機構—遺伝子・進化放射線. Jpn.

- J. Genet. **64** : 137~163, 1989.
- 17) Misawa, S. : Chromosome abnormalities of gastric cancer detected in cancerous effusions. Jpn. J. Cancer Res. **81** : 148~152, 1990.
- 18) Nadal, C. & Zajdela, F. : Polyploïdie somatique dans la foie du rat. I. Le rôle des cellules binuclées dans la génèse des cellules polyploïdes. Exp. Cell Res. **42** : 99~116, 1966.
- 19) Nakanishi, K. & Fujita, S. : Molecular mechanism of binucleate formation and polyploidization of the hepatocyte. Cell Struct. Funct. **2** : 1~5, 1980.
- 20) Nowell, P. C. : Clonal evolution of tumor cell populations. Science **94** : 23~28, 1976.
- 21) Schwarzscher, H. G. & Schnedl, W. : Position of labeled chromatids in diplochromosomes of endoreduplicated cells after uptake of tritiated thymidine. Nature **209** : 107~108, 1966.
- 22) Sugihara, H., Hattori, T. et al. : Regional ploidy variations in signet ring cell carcinomas of the stomach. Cancer **65** : 122~129, 1990.
- 23) 杉原洋行, 服部隆則 : 人胃癌のプログレッション. オンコロジア **23** : 20~25, 1990.
- 24) 高松哲郎 : ヒトの成長期心臓と肥大心における心筋細胞核 DNA の顕微蛍光定量. 京府医大誌 **91** : 173~183, 1982.
- 25) Takanari, H. : Studies on endoreduplication. V. A three-dimensional scheme for diplo- and quadruple chromosomes and a model for DNA replication. Cytogenet. Cell Genet. **39** : 188~193, 1985.
- 26) 田ノ岡宏 : 多重癌の単クローン性増殖. 多重癌の基礎と臨床 (末舛ほか編), p. 19~38, ライフ・サイエンス・センター, 東京, 1982.
- 27) 津田 均, 広橋節雄ほか : ヒト肝癌発生とプログレッションの自然史. オンコロジア **23** : 35~39, 1989.
- 28) Vogelstein, B., Fearon, E. R. et al. : Genetic alterations accumulate during colorectal tumorigenesis. In ; Recessive Oncogenes and Tumor Suppression (ed. by Cavenes, W., Hastle, H. & Stanbridge, E.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989.

