

Autoradiography によるヒト胃癌細胞の 核酸合成能に関する研究

第1編 胃癌細胞の核酸合成能と臨床病理所見との関連

神戸大学医学部外科学第1講座 (指導: 齊藤洋一教授)

井 上 和 則

〔原稿受付: 昭和57年1月11日〕

Autoradiographic Studies on Nucleic Acid Synthesis of Human Gastric Cancer Cells

I. Relationship between Nucleic Acid Synthesis of Cancer Cells and Clinicopathological Findings

KAZUNORI INOUE

First Department of Surgery, Kobe University School of Medicine
(Director: Prof. Dr. YOICHI SAITOH)

The rate of cell proliferation and cell viability of human gastric cancer was studied autoradiographically and was compared with the clinicopathological findings.

Specimens were obtained from the central portion of surgically resected cancerous tissues from 22 cases of gastric cancer patients who did not received chemotherapy prior to operation. The specimens were labeled in vitro with ^3H -thymidine and ^3H -uridine and autoradiograms were prepared. Thymidine labeling index (TLI), uridine labeling index (ULI) and mitotic index (MI) were calculated from the most active parts.

1. TLIs were determined in 21 cases, and the values (average TLI; 22.4%) ranged from 6.2% to 39.5%. MIs (average MI; 19.6%) ranged from 11.8% to 34.8%.
2. Average TLI in the cancerous lesions with serosal invasion was 18.5% (11 cases). This value was lower than that without serosal invasion (26.7%, 10 cases, $P < 0.025$).
3. In microscopical stages III and IV, average TLI was 19.3% (13 cases). This value was significantly lower than that (27.4%) of stages I and II (8 cases, $P < 0.025$).

Key words: Gastric cancer, Autoradiography, ^3H -thymidine labeling index, ^3H -uridine labeling index, Clinicopathological findings.

索引語: 胃癌, オートラジオグラフィ, トリチウムサイミジン標識指数, トリチウムウリジン標識指数, 臨床病理所見.

Present address: First Department of Surgery, Kobe University School of Medicine, 5-2, Kusunoki-cho 7-chome, Chuo-ku, Kobe, 650, Japan.

4. Cancerous lesions with scirrhous type showed average TLI of 17.6% (4 cases). This value was lower than that (26.9%) of medullary type (5 cases, $P < 0.1$).
5. Significant differences in TLIs were not found between the primary lesions and the metastatic lymphnodes, the size of cancerous lesions, macroscopical types, histological types and the types of infiltrative growth, respectively.
6. Cancer cells locating in the pm- and ss-layers showed average TLIs of 15.7% (7 cases) and 14.6% (4 cases). These values were lower than that in the m-layer (26.1%, 14 cases, $P < 0.025$ and $P < 0.05$, respectively).
7. MIs in macroscopical type 4, in scirrhous type and in INF γ were lower than those in macroscopical types 0, 2 and 3, in medullary type and in INF α . However, MIs did not show significant relations to the other findings.
8. ULIs were determined in 11 cases and the values (average ULI; 92.7%) ranged from 75.0% to 99.8%. ULIs showed high values in the lesions with low TLIs and did not have relations to the clinicopathological findings.

結 言

研究 方法

癌細胞は宿主の制御を離れて自律的な増殖を続けるものと一般に考えられている。しかしその増殖、生長速度は必ずしも一定ではなく、実験腫瘍では、腫瘍体積が増大するにつれて腫瘍の体積倍加時間は延長し³⁶⁾、また腫瘍細胞の移植部位²⁾や原発巣と転移巣の相違⁵⁾などの腫瘍細胞の発育環境の相違により腫瘍の増殖、生長速度は影響を受ける。ヒト胃癌においても、末期癌の倍加時間は早期癌より短縮するとする説¹⁶⁾がみられるが、癌細胞の増殖能と癌病巣の生長程度や臨床病理所見との関連については解析方法が困難なため報告も少なく、いまだ一定の見解は得られていない。

今回著者は、ヒト胃癌症例を対象にして、手術的に切除した新鮮標本を用いて、³H-thymidine と ³H-uridine による autoradiography を施行し、癌細胞の核酸合成能と癌病巣の臨床病理所見との関連を検討した。その結果若干の知見を得たのでその概要を報告する。

研究 対象

昭和53年4月以降に当教室で切除した胃癌症例のうち、手術前に化学療法を行っていない22症例を検索の対象とした。その年齢分布は32才から80才にわたり、平均年齢は58才であった。性別では男16例、女6例であった。各症例の癌病巣の占居部位、肉眼的分類、組織分類、組織学的深達度および組織学的進行程度を表1に示した(表1)。

1) 標本の採取方法

手術的に切除した新鮮胃標本から癌細胞の確実に存在すると思われる癌巣の中心寄りを一部切除し、氷冷した Hanks 液で洗浄後、剃刀の刃を用いて胃壁に直角方向に約 1mm 巾の切れ込みを加え組織片を作った。この組織片を以下の方法により *in vitro* で標識し autoradiogram を作製した。一部の症例では所属リンパ節の転移巣にも同様の操作を施し検討した。

2) *in vitro* 標識法¹³⁾

培養液には Eagle の MEM 培養液(日水製薬, 東京)に、胎児牛血清(GIBCO, New York)を20%, HEPES(同仁薬化学, 熊本)を10mMの割合で添加し、これを炭酸水素ナトリウムを用いてpHを7.4に調製した。この培養液にDNA合成細胞の標識には methyl-³H-thymidine (Specific Activity 40-60 Ci/m mole, Radiochemical Centre, Amersham, England) を 2 μ Ci/ml の割合に、また RNA 合成細胞の標識には 5,6-³H-uridine (Specific Activity 40-60 Ci/m mole, Radiochemical Centre, Amersham, England) を 10 μ Ci/ml の割合に添加した。

この培養液に組織片を投入して試験管を密栓し、試験管内の気相の約3倍量の酸素を注入し加圧した²⁵⁾。この状態で³H-thymidineによる標識では30分間、³H-uridineによる標識では60分間、37°C下で振盪培養を行なった。培養終了後、組織片を生理食塩水で洗浄し、

10%中性ホルマリン水溶液中で2日間固定した。

3) autoradiogram 作製方法²²⁾

固定標本をパラフィン包埋後、3 μ に薄切し、脱パラフィンを施した後、下記の操作を暗室内で行なった。原子核乳剤 (Sakura NR-M2, 小西六写真工業株式会社) を蒸留水で約1.5倍に希釈し、40°Cに加熱して、dipping法により切片を乳剤で被覆し、シリカゲルを敷いた暗箱内に静置して4°C下で4~5週間暴露した。現像時間は³H-thymidine 標識切片では4分および6分、³H-uridine 標識切片では2分および4分とし、定着、水洗の後、hematoxylin-eosin 後染色を施し、標識指数を測定した。

4) 標識指数および分裂指数の測定方法

各症例について最も適切に仕上がった autoradiogram を選び、接眼レンズに10等分の目盛盤を装着した顕微鏡を用い400倍に拡大し、細胞核上の銀粒子が5個以上認められる細胞を標識されているものと判定した。

m, sm, pm, ss, se の各胃壁層中で標識細胞の多い部位を選び、200 μ 四方の視野内に存在する癌細胞を数えて暫定的な標識指数を測定した。この標識指数のうち最も高値を示す指数の癌細胞500個の合計から、それぞれの胃壁層の標識指数を算定した。そして各胃壁層の標識指数の平均値をそれぞれの症例の標識指数とした。なお、印環細胞は既に報告¹⁰⁾されているようにほとんど標識されることがないので、低分化腺癌や印環細胞癌の症例では印環細胞を測定から除外し、核が細胞質内の粘液により著明に圧排されていない細胞を選んで測定した。

早期癌では平均3100個の癌細胞を、進行癌では平均3900個の癌細胞を数え、100個の癌細胞に対する標識細胞数を³H-thymidine 標識指数 (以下 TLI と略す) とした。同様の方法により³H-uridine 標識指数 (以下 ULI と略す) を測定した。TLI を測定した切片と同一の切片を用いて癌細胞1000個に対する分裂細胞数を分裂指数 (以下 MI と略す) として標識指数と同一の方法により測定した。なお、癌細胞の肉眼所見や組織学的所見はすべて胃癌取扱い規約¹²⁾に従って記載した。

研究成績

標識した22例の原発病巣のうち1例は癌細胞数が少数のため TLI を測定し得ず、残りの21例について TLI を測定し得た。TLI は6.2%から39.5%に分布

し、22.4 \pm 7.9% (平均値 \pm 標準偏差、以下同様) であり、MI は11.8%から34.8%に分布し、19.6 \pm 5.5%であった (表1)。標識細胞の分布は同一症例でも観察部位により大きく異なっており、密に分布する部位 (写真1) や、癌細胞が全く標識されていない部位が観察された。TLI と MI の相関関係をみると、その相関係数 r は0.275であり有意な相関は認められなかった。

次に各症例を臨床病理所見別に分類し、これらの因子と TLI, MI および ULI との関連の有無を検討した。

1) 原発病巣とリンパ節転移巣の TLI

同一症例で原発病巣とリンパ節転移巣の TLI を測定し得た症例は5例であった。原発病巣での TLI は17.9 \pm 7.9%、転移巣では16.8 \pm 5.7%であり、原発病巣と転移巣の間には差は認められなかった。

2) 癌病巣の平均直径と TLI

癌病巣の最大径と、これに直交する径の平均を癌病巣の平均直径とし、これと TLI との相関係数を算定した。その結果 $r = -0.05$ であり、平均直径と TLI との間には相関関係は認められなかった。

3) 癌型の肉眼的分類と TLI (表2)

0型では TLI は26.3 \pm 7.0% ($n=5$)、2型では24.5 \pm 9.0% ($n=4$)、3型では20.9 \pm 8.0% ($n=7$)、4型では18.9 \pm 4.7% ($n=5$) であった。各型の間には統計的に有意差は認められなかったが、0型のうちIIaの TLI は34.4 \pm 3.7% ($n=3$) であり、IIcの20.9 \pm 1.1% ($n=2$) に比較し高値を示した ($p < 0.025$)。

4) 組織学的深達度と TLI (表3)

早期癌では TLI は26.3 \pm 7.0% ($n=5$)、進行癌では20.9 \pm 7.2% ($n=16$) であり、進行癌症例で TLI は低値をとったが統計的に有意ではなかった。予後的漿膜面因子 (ps) 別にみると、ps (-) 例では26.7 \pm 6.9% ($n=10$)、ps (+) 例では18.5 \pm 6.6% ($n=11$) であり、ps (+) 例は ps (-) 例に比較し有意に低値を示した ($p < 0.025$)。

5) リンパ節転移の有無と TLI

リンパ節転移を有しない原発病巣の TLI は29.4 \pm 7.7% ($n=3$) で、転移を有する例の21.2 \pm 7.3% ($n=18$) に比較し若干高値を示したが有意差は認められなかった。

6) 組織学的進行程度と TLI (図1)

Stage I では TLI は29.4 \pm 7.7% ($n=3$)、stage II では26.3 \pm 6.8% ($n=5$)、stage III では23.1 \pm 3.2% ($n=6$)、stage IV では16.0 \pm 6.9% ($n=7$) であり、進行程度が進むにつれて TLI は低下した。進行程度を便

表1 検 索 症 例

症 例	年齢・性	占 部	居 位	肉眼的分類	組 織 分 類	深達度	進 行 度	原 発 病	原 発 病	巢	転移巢
								TLI (%)	MI (%)	ULI (%)	TLI (%)
1	68♂	C		2	tub 2	ss α	II	39.5	20.2	—	—
2	40♂	CM		3	por	se	IV	19.2	25.1	—	—
3	53♂	MAC		4	por	se	III	25.5	11.8	—	—
4	62♀	M		2	por	ss β	III	19.7	20.4	—	—
5	80♂	AM		2	tub 2	se	IV	16.0	16.4	—	26.4
6	32♂	M		0	por	sm	II	22.0	18.6	—	—
7	58♂	CM		4	por	ss γ	III	18.6	16.8	94.0	—
8	63♂	A		0	tub 1	sm	I	38.0	24.4	—	—
9	50♂	AM		3	tub 2	pm	III	27.8	13.4	90.6	18.7
10	61♂	M		3	tub 2	se	IV	30.3	22.6	99.8	—
11	52♀	AMC		3	por	se	III	24.4	17.2	91.5	—
12	56♀	MC		4	por	ss γ	IV	13.7	15.9	92.7	14.6
13	55♂	M		0	tub 2	sm	II	21.4	23.3	—	—
14	50♂	M		0	tub 1	m	I	19.4	12.6	—	—
15	62♀	AM		4	sig	ss γ	II	22.8	20.3	96.7	—
16	56♀	M		0	pap	sm	I	30.7	23.7	94.2	—
17	66♂	C		3	tub 2	si	IV	6.2	14.7	—	9.1
18	72♂	A		2	pap	pm	III	22.7	27.0	98.4	—
19	70♀	AD		3	por	ss γ	III	—	—	95.8	37.7
20	62♂	MC		3	tub 2	pm	II	25.6	19.8	75.0	15.0
21	45♂	CM		4	por	se	IV	13.8	12.3	—	—
22	68♂	AM		3	tub 2	se	IV	13.1	34.8	90.8	—

宜上 stage I と II, stage III と IV の 2 群に大別すると, stage I, II では $27.4 \pm 7.3\%$ ($n=8$), stage III, IV では $19.3 \pm 6.5\%$ ($n=13$) であり, stage III, IV では stage I, II に比較し TLI は明らかに低値を示した ($p < 0.025$). 特に stage IV では最も低値であり, stage I 及び stage II との間 ($p < 0.05$) と, stage III との間 ($p < 0.1$) では有意差が認められた.

7) 組織分類と TLI (表 4)

Pap, tub 1, tub 2 を分化型腺癌すると, その TLI は $24.2 \pm 9.4\%$ ($n=12$), 未分化型腺癌 (por, sig) では $20.0 \pm 4.0\%$ ($n=9$) であった. 未分化型腺癌では TLI は若干低値を示したが, 有意差は認められなかった.

8) 間質量および浸潤増殖様式と TLI
 髓様型では TLI は $26.9 \pm 7.3\%$ ($n=5$), 中間型では $22.1 \pm 8.0\%$ ($n=12$), 硬性型では $17.6 \pm 4.4\%$ ($n=4$) であり, 硬性型では髓様型に比べ TLI は低い傾向が

表2 肉眼的分類と TLI

肉眼的分類	症 例 数	TLI (%)
0	5	$26.3 \pm 7.0^a)$
1	0	—
2	4	24.5 ± 9.0
3	7	20.9 ± 8.0
4	5	18.9 ± 4.7
5	0	—

a) 平均値 ± 標準偏差

表3 組織学的深達度と TLI

組織学的深達度	症 例 数	TLI (%)
m	1	19.4
sm	4	$28.0 \pm 6.8^a)$
pm	3	25.4 ± 2.1
ss α, ss β	2	29.6 ± 9.9
ss γ	3	18.6 ± 3.7
se, si	8	18.6 ± 7.4

a) 平均値 ± 標準偏差

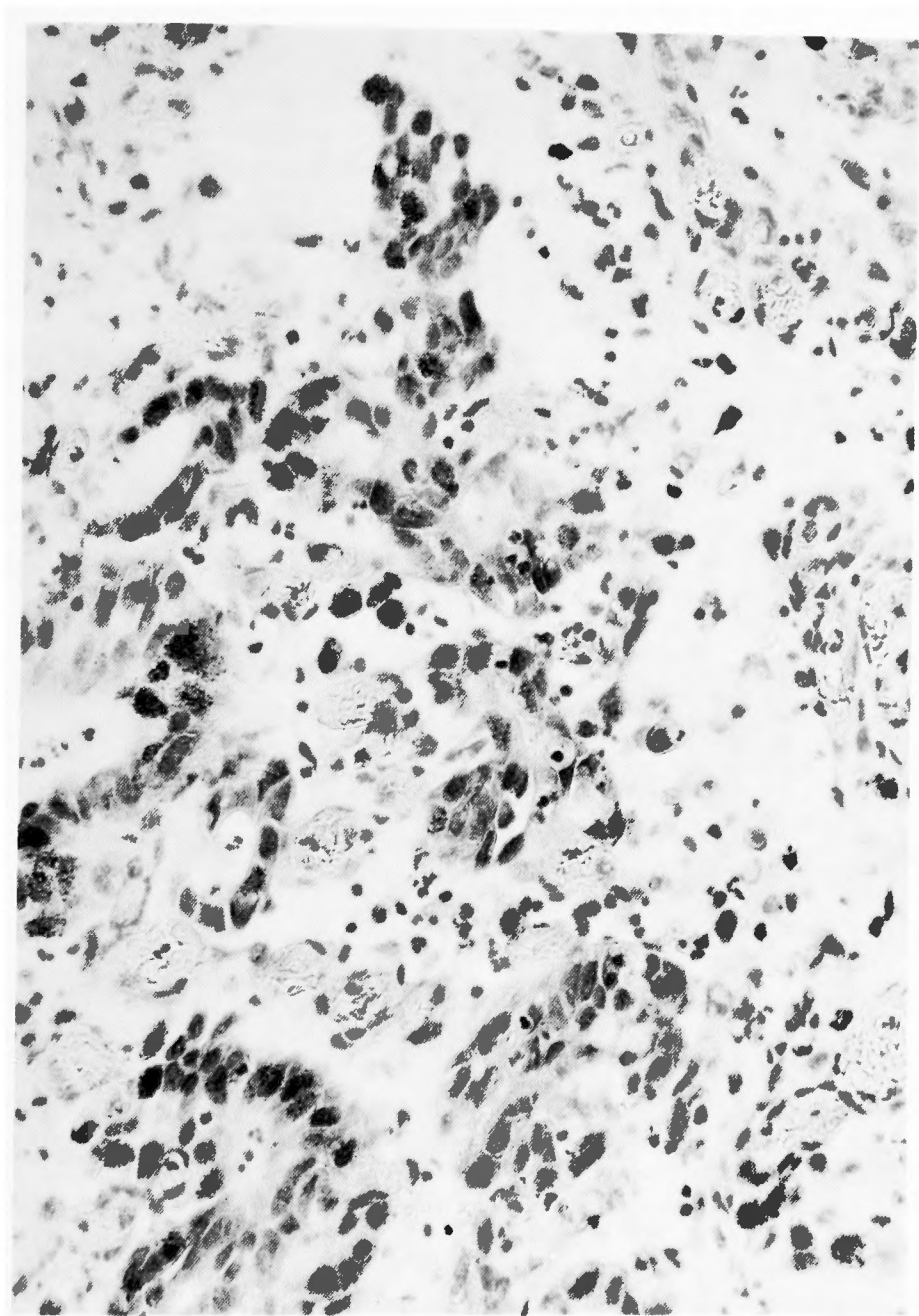


写真1 ^3H -thymidine autoradiogram
症例10のm層. 多数の癌細胞が標識されている. H-E 染色, $\times 240$

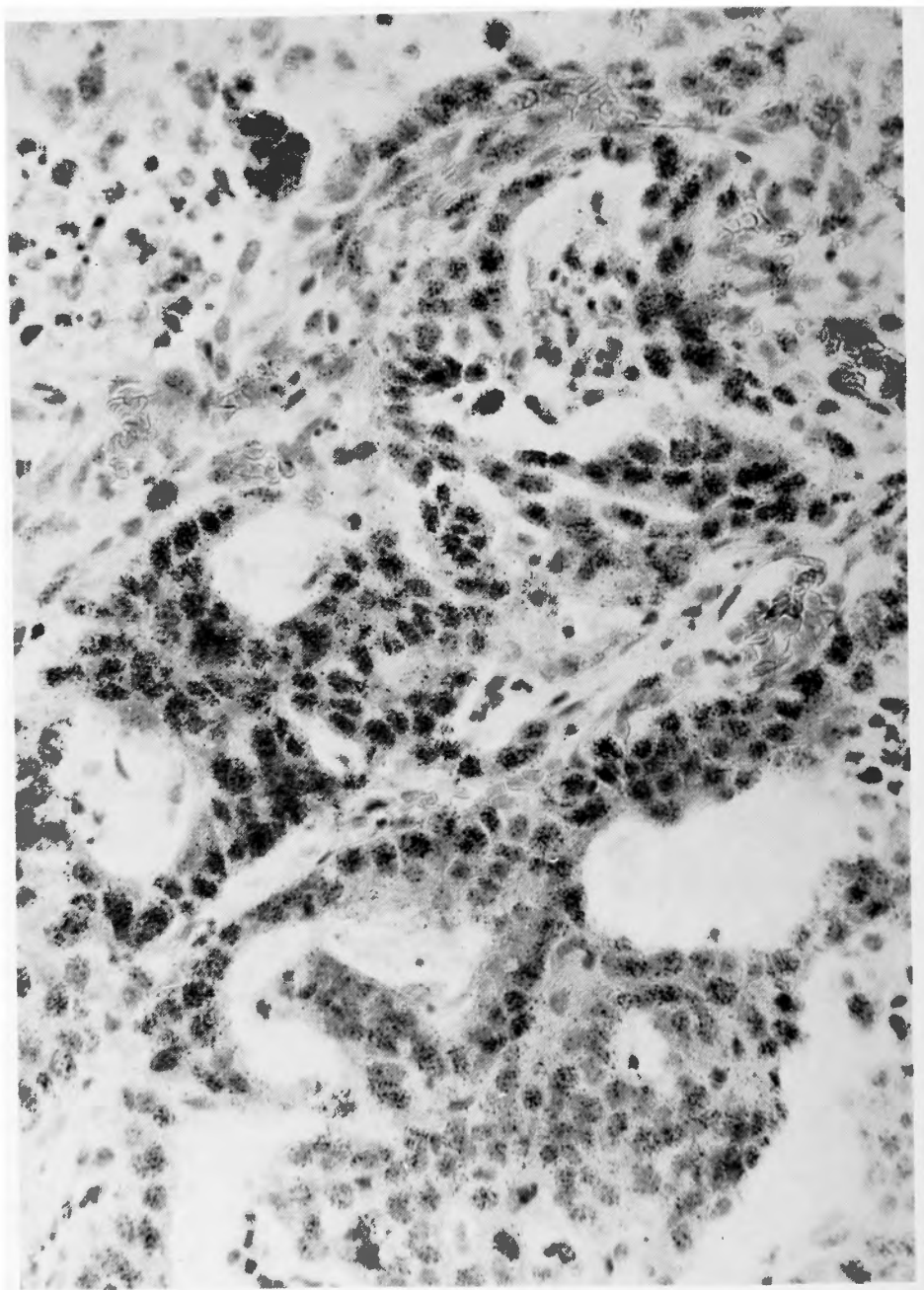


写真2 ^3H -uridine autoradiogram
症例18のsm層. ほとんどすべての癌細胞が標識されている. H-E染色, $\times 240$

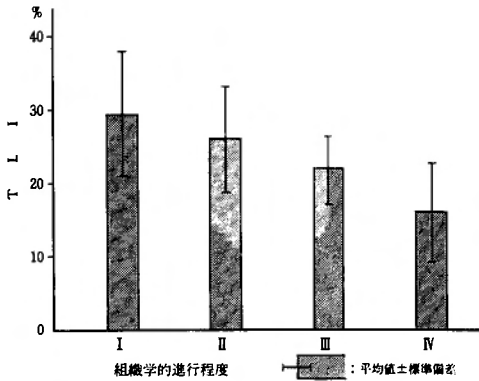


図1 組織学的進行程度と TLI

みられた ($p < 0.1$).

INF α の TLI は $27.3 \pm 8.7\%$ ($n=3$), INF β では $22.8 \pm 7.2\%$ ($n=9$), INF γ では $20.3 \pm 7.4\%$ ($n=9$) であり, 浸潤性に増殖する INF γ で TLI は若干低値を示すように思われたが, 統計的には有意ではなかった.

9) 胃壁浸潤層別での TLI

各症例の m 層, sm 層, pm 層, ss 層, se 層での TLI はそれぞれ $26.1 \pm 8.5\%$ ($n=14$), $21.3 \pm 7.2\%$ ($n=13$), $15.7 \pm 8.1\%$ ($n=7$), $14.6 \pm 5.1\%$ ($n=4$), 25.9% ($n=1$) であった. m 層の TLI は高値を示し, pm 層, ss 層に比較しそれぞれ有意であった ($p < 0.025$ 及び $p < 0.05$).

10) MI と臨床病理所見との関連

TLI との関連を検討した上述の臨床病理所見の各因子について, MI との関連の有無を検討した. 原発病巣とリンパ節転移巣, 癌病巣の平均直径, 組織学的深達度, リンパ節転移の有無, 組織学的進行程度, 組織分類, 胃壁浸潤層の各項目については, それぞれ MI との間に有意の関連は認められなかった. しかし癌型の肉眼的分類では 4 型以外の症例は $20.9 \pm 5.5\%$ ($n=16$), 4 型では $15.4 \pm 3.1\%$ ($n=5$) であり, 4 型の MI は 4 型以外の MI より低値を示す傾向が見られた ($p < 0.1$).

間質量では髄様型で $22.0 \pm 3.0\%$ ($n=5$), 中間型で $19.9 \pm 6.4\%$ ($n=12$), 硬性型では $15.6 \pm 1.9\%$ ($n=4$) であり, 硬性型は髄様型に比較し MI は有意に低値を示した ($p < 0.025$).

また浸潤増殖様式では, INF α で $22.5 \pm 3.1\%$ ($n=3$), INF β で $22.1 \pm 6.1\%$ ($n=9$), INF γ で $16.1 \pm 3.4\%$ ($n=9$) であり, INF γ は INF α に比較し有意に

表4 組織分類と TLI

組織分類	症例数	TLI (%)
pap	2	26.7 ± 4.0^a
tub 1	2	28.7 ± 9.3
tub 2	8	22.5 ± 9.9
por	8	19.6 ± 4.1
sig	1	22.8

a) 平均値 ± 標準偏差

低値を示した ($p < 0.05$).

11) ULI と臨床病理所見との関連

11例について ULI を測定した. ULI は 75.0% から 99.8% に分布し, 平均 $92.7 \pm 6.3\%$ であった. 一般に組織の表層の癌細胞は均一に標識され, ^3H -thymidine を用いた autoradiogram にみられた標識細胞の分布の部位的な不均一性は見られなかった(写真 2). しかし腺管を形成する癌巣において管腔内に浮遊する癌細胞, hematoxylin-eosin 染色標本からみて viability を失っていると考えられる細胞および分裂期の細胞は標識されなかった.

臨床病理所見との関連では, 組織学的進行程度別では, stage I, II で ULI は $88.6 \pm 9.7\%$ ($n=3$), stage III, IV では $94.2 \pm 3.3\%$ ($n=8$) であった. 組織分類では分化型腺癌で $91.5 \pm 8.1\%$ ($n=6$), 未分化型腺癌で $94.2 \pm 1.9\%$ ($n=5$) であった. 胃壁浸潤層別にみても, pm 層で $95.8 \pm 2.3\%$ ($n=4$), ss 層では $91.9 \pm 3.9\%$ ($n=2$) であった. 以上のように TLI が低値を示す症例や部位でも ULI は高値を保ち, 癌細胞の RNA 合成能は十分に保持され, 臨床病理所見と ULI との間には一定の関連は認められなかった.

考 察

1) 細胞増殖の解析方法

増殖細胞には DNA を合成する一定の時期があり, ^3H -thymidine を用いた autoradiography により DNA 合成細胞の同定が可能で, TLI は細胞増殖能を示す 1 つの指標として広く用いられている. 一方, 細胞の分裂は細胞が増殖することを示す最も直接的な現象であり, 従って MI も細胞増殖能を示す指標として用いられている. しかし mitotic arrest method (stathmokinetic method^{29,30}) を利用して MI を測定しない限り, 一般に TLI の値は MI の値の 10 倍程度の値を有しており, 限られた数の細胞をもとに増殖能を測定する場合は, MI より TLI の方がより正確である²⁵) と考え

られている。著者の成績でも TLI は平均 22.4% であり、MI の 19.6% の約 10 倍の値を示した。この TLI と MI との間には正の相関関係を認めたとの報告⁷⁾ もみられるが、今回の成績では両者の間の相関係数は 0.275 であり、有意な相関関係は認められなかった。この原因としては摘出した標本の固定が遅れると、細胞分裂期の細胞は分裂を完結するのに分裂直前の細胞は分裂期に移行しないため MI は変動すると考えられており³⁶⁾、組織片の標識操作による MI への影響があろうし、また MI の測定に際し TLI に比較すればある程度の誤差は避けられないことによるものであると考えられる。従って今回の研究では MI は補助的な指標とし、TLI を主として考察するのが適当と考えられた。

臨床例での TLI の測定は *in vitro* 標識法¹³⁾ を用いた報告が多い。これらの報告には標識細胞の分布が観察部位により大巾に異なっていると指摘するもの^{6,21,28)} が多く、著者の観察でも同様の結果であった。従って TLI の測定に際しては、測定法を統一することがもっとも肝要であるが、従来の報告には TLI の測定方法の詳細が記載されているものはさほど多くない。測定部位を明記した報告においても測定部位を無作為に選定する方法^{6,25)} と、標識細胞の密に存在する部位を選んで算定する方法^{8,11,21,44)} とがあり、研究者により一定せず³³⁾、固型腫瘍の平均的な増殖能を表現できる測定方法は現在のところ確立していない。著者は癌細胞の標識には *in vitro* 標識法を用いているため、標識細胞は組織片の表層に局限しており、また無作為に多数の癌細胞を算定することは実施困難であると考えて、研究方法の項に示した様に活発な増殖を営んでいると思われる標識細胞の多い部位を選んで指数を算出した。

胃癌細胞は胃壁の中にあつて胃壁の層構造を破壊、浸潤しながら増殖するが、これら異なった環境下で癌細胞の増殖能が種々の影響を受けていることが十分予想される。しかし現在までに報告された *in vitro* 標識によるヒト胃癌細胞の TLI はこの点を十分に考慮して測定されていないもの^{16,30,43)} が多い。そこで著者は Johnson ら¹³⁾、Bleiberg ら⁴⁾ の方法を参考にして胃壁の層構造を保持したままで標識するため、胃壁に直角に切れ込みを加えて培養して autoradiogram を作製し、胃壁浸潤層別に各々指数を求め、これらの平均値を各症例の指数とした。

また指数の測定に際して、算定する細胞数を可及

的に多くすることが誤差の縮小に関連している²¹⁾、Denekamp ら⁸⁾ は針生検のような小さな試料はこの観点からすれば細胞増殖能の解析には不適當であり、手術的に切除した標本を用いるべきであると述べている。著者の研究でも手術的に切除した標本を用いたため、生検標本に比較すると作製した autoradiogram の面積や算定した総細胞数は増大し、信頼性の高い指数が測定し得たものと考えられる。

2) 胃癌細胞の TLI と臨床病理所見との関連

Auerbach ら²⁾ はマウスの皮内あるいは皮下に乳腺腫瘍を移植する際、胸部への移植では頭側や尾側への移植に比較して腫瘍の生長が速く、移植部位により腫瘍の生長速度が異なると報告し、この原因として臓器の発生や、血管系、神経系の関与が考えられると推察している。ヒトを対象にして原発病巣と転移巣の増殖能を比較した報告では、肺癌¹⁰⁾、大腸癌²⁰⁾ では TLI に差を見なかったとする報告、胃癌³⁹⁾、乳癌³²⁾ では転移巣で MI および TLI は高値を示したとの報告がみられ、一致した結論は得られていない。この点を検索するには、同一症例の原発病巣と転移巣とを比較することが望ましいが、異なった症例間で比較している報告^{10,20,32)} が多い。著者は同一症例間で両者を比較したところ、両者間に差は認められなかったが、結論を下すには症例数が充分でなく、更に詳細な検討が必要であると考えられる。

病巣の生長程度と癌細胞の増殖能との関連については、動物実験によると、一般に腹水腫瘍細胞では移植後、時間の経過と共に腫瘍細胞の世代時間は著明に延長する¹⁸⁾ とされている。一方固型腫瘍においては、腫瘍細胞の世代時間は全経過を通じてさほど変化しないが、全腫瘍細胞中で増殖細胞の占める割合を示す growth fraction は腫瘍が生長するにつれて低下すると考えられ¹⁸⁾、従って腹水腫瘍であれ、固型腫瘍であれ、腫瘍全体の平均的な増殖能は腫瘍の生長に伴って低下するものと考えられる。この点に関する胃癌を対象とした臨床的研究では、新畑³⁰⁾ は腫瘍の極端に大きいものは低い TLI を示すことが多く、早期の癌と思われる 1 例の TLI は比較的高値を示したと報告し、また korman ら¹⁷⁾ は予後不良の例の TLI は低い傾向があると報告している。また安川⁴³⁾ は漿膜浸潤程度が強い例や、腹膜転移程度の強い例で TLI は高値を示したと述べ、多淵³⁹⁾ は癌細胞の分裂能は癌巣の平均直径、進行程度、壁深達度に比例して上昇したと報告している。以上のように胃癌の生長と癌細胞の増

殖能との間には現在のところ必ずしも統一された結論は得られていない。これは研究者によって指数の測定部位や算定方法がさまざまであることが原因であろうと思われる。著者は癌細胞の確実に存在すると思われる癌病巣の中心寄りの部位を用い、最も標識指数の高い部位を選んで測定した。その結果、深達度、進行程度の進んだ症例で TLI は低値を示した。癌細胞への酸素や代謝物の供給運搬に重要な役割を担っている腫瘍血管について胃癌病巣内の分布を検討した報告では、早期胃癌では一般に hypervascular であり、進行した癌巣では hypovascular であるとする報告^{14,41)}が見られる。また Tannock⁴⁰⁾ はマウス乳腺腫瘍を用いた実験で TLI, MI は共に血管より離れた部位に位置する腫瘍細胞程低下したと報告している。従って今回の成績は癌細胞が生長するに従い腫瘍血管の密度は減少し、さらに TLI が低下することによると解釈される。

前述のように多淵ら³⁹⁾は胃癌病巣の先進部の癌細胞の MI を測定し、癌巣の生長に伴い MI は高値を示すことを報告した。この成績と今回の著者の成績とは一見矛盾すると思われるが、Borrmann II 型や III 型の胃癌では癌巣の中心部は辺縁部より hypovascular であるとの報告^{1,23)}や、胃癌、大腸癌の TLI は中心部より辺縁部で高値を示したとする報告^{21,36)}から推測すると、これらの違いは癌病巣の先進部と中心部で腫瘍細胞の増殖動能が異なっていることを示唆するものと言える。

肉眼的分類と TLI との間の関連は、0 型、2 型、3 型、4 型間では見られなかったが、0 型のうち IIa の例は IIc の例より TLI は有意に高値を示した。早期胃癌の生長を臨床的に観察すると、隆起型は陥凹型より比較的急速に生長するとの報告^{15,27)}がある。癌病巣の生長には癌細胞の増殖能の外に cell loss 等の因子も関与しているが、著者の成績はこれらの報告に 1 つの論拠を与えるものと考えられる。

組織分類と増殖能の関連について、肺癌¹⁰⁾、子宮癌³¹⁾、膀胱癌⁹⁾、脳腫瘍⁷⁾等では低分化な組織型を示す例で増殖能は高いと報告されており、また胎児性悪性腫瘍、悪性リンパ腫、肉腫、扁平上皮癌、腺癌のうちでは、腺癌の TLI が最も低値を示したとする報告²¹⁾も見られる。消化管の癌においても低分化腺癌で増殖能が高いとする報告^{16,39)}は見られるが、胃腺癌は単純癌や硬癌に比較して高い TLI を示したとする報告¹⁷⁾、Lauren 分類では intestinal type では分裂細胞はしば

しば認められるが、diffuse type には少ないとの報告¹⁹⁾も見られる。また dimethylhydrazine で誘発したラット大腸癌の TLI は低分化型の腺癌ほど低値を示したと報告³⁸⁾されている。著者の成績では統計的に有意ではないが、分化型腺癌の TLI は未分化型腺癌より高値を示した。Malaise ら²⁴⁾は癌細胞の増殖能はその発生母地となった細胞の増殖動態を反映しているように思われると述べており、活発な細胞回転が営まれている胃粘膜上皮から発生する胃癌細胞の TLI は、他臓器に発生した癌細胞の TLI とは異なった傾向を有していることも考えられるので、この点についてさらに症例を重ねて検討する必要がある。

間質量と TLI の関連については、間質量の多い例で TLI は低値を示すとの報告^{17,30)}が見られる。著者の成績でも硬性型の TLI は髓様型に比較し低い傾向が見られた。

浸潤増殖様式と TLI との関連については、境界の明瞭な乳癌では浸潤性に増殖する例より TLI は高値を示すとの報告²⁶⁾が見られる。著者の成績では INF α の TLI は INF γ より高値であったが有意の差は見られなかった。

胃壁浸潤層別の増殖能に関しては、m 層で癌細胞の TLI は 50%、間質中に浸潤した部位では 3% であったとする報告³⁷⁾、m 層に近い部では s 層に近い浸潤層より TLI はやや高いとする報告⁷⁾、分化型腺癌では m 層から ss 層へ深達が進むにしたがって MI は高値を示し、低分化型腺癌では m 層と ss 層で高値を示したとの報告³⁹⁾が見られる。著者の成績では m 層では pm 層、ss 層よりも有意に TLI は高く、先に示した間質量の多寡の他に胃壁の層という環境の相違によっても癌細胞の増殖能は変動することが示唆された。

3) 胃癌細胞の MI と臨床病理所見との関連

癌型の肉眼分類では 4 型の MI は 4 型以外の MI より低値を示した。また間質量では硬性型は髓様型より、浸潤増殖様式では INF γ は INF α よりそれぞれ MI は低値を示した。これらの成績は山村らの報告⁴²⁾と一致する。しかし他の因子との相関については TLI 程の相関は見られていない。

4) 胃癌細胞の ULI

増殖細胞のうち分裂期以外の細胞は RNA 合成能を有し³⁾、³H-uridine を用いて細胞を標識することにより RNA 合成細胞の同定が可能である。子宮円錐切除標本を ³H-uridine で標識すると大部分の上皮細胞は均一に標識されたとの報告²⁹⁾や、乳腺組織を細切

し、24時間培養しても乳癌細胞の ULI は90%以上の高値を保っていたとする報告³⁵⁾が見られる。ヒト胃癌細胞の ULI を測定した報告はこれまで見られないが、著者の成績では ULI は平均92.7%と高値であり、Rubio ら²⁹⁾の指摘するように、組織片の標識操作中にも細胞の核酸代謝能は維持されていることを示している。またこのことから、³H-thymidine で標識された細胞の分布が不均一であった原因は *in vitro* の標識法の欠陥と考えるよりも、癌細胞の本来の増殖の姿を現わしていると考えの方が妥当と言える。

ULI と種々の臨床病理所見との間の関連の有無を検討したが一定の関連性は見られず、TLI の低下している症例や部位でも ULI は高値を保ち、癌細胞の RNA 合成能は十分に保持されていることが示唆された。

以上、ヒト胃癌細胞の増殖能は2, 3の臨床病理所見と関連を有し、また RNA 合成能は癌細胞の増殖能の程度にかかわらず高値を保っていることが判明した。

一般に化学療法の効果の発現は腫瘍細胞の細胞動態に依存すると考えられている³⁶⁾。Skipper³⁴⁾ は生長が緩徐で TLI の低い腫瘍では化学療法剤の効果が少なく、生長が急速で TLI の高い腫瘍ではしばしば著明な効果が得られると述べている。従っていまだ不明な点の多いヒト悪性腫瘍の *in vivo* での増殖能を解明することは重要な課題であり、著者の臨床材料を用いた研究成績は、今後胃癌化学療法の治療成績を向上させるための基礎的な資料となるであろうと考える。

結 語

22例の胃癌症例の手術新鮮標本を用いて、*in vitro* 標識法により autoradiography を施行し、胃癌細胞の DNA ならびに RNA 合成能を測定し、臨床病理所見との関連について検討した結果、次の様な成績を得た。

- 1) 胃癌細胞の TLI は $22.4 \pm 7.9\%$ ($n=21$)、MI は $19.6 \pm 5.5\%$ であった。
- 2) TLI は組織学的深達度の進んだ症例、組織学的進行程度の高度な症例で低値を示した。
- 3) TLI は原発病巣とリンパ節転移巣、癌病巣の平均直径、肉眼的分類、リンパ節転移の有無、組織分類および浸潤増殖様式との間には有意な関連性は見られなかった。
- 4) 間質量では髄様型より硬性型、胃壁浸潤層別では m 層より pm 層、ss 層でそれぞれ TLI は低値を示

した。

5) MI は肉眼的分類では4型、間質量では硬性型、浸潤増殖様式では INF γ の症例で低値を示したが、他の因子との関連性は見られなかった。

6) ULI は $92.7 \pm 6.3\%$ ($n=11$) であった。

7) ULI と臨床病理所見との間には一定の関連は見られず、DNA 合成能の低い癌細胞でも RNA 合成能は十分保持されていることが判明した。

本論文を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜った神戸大学医学部外科学第1講座齊藤洋一教授に深甚なる謝意を表します。また終始直接に御指導御協力をいただいた当教室の多淵芳樹博士ならびに川口勝徳先生をはじめ、病理研究室の諸兄各位に感謝の意を表します。

本論文の要旨の一部は第39回日本癌学会総会(1980年、東京)において発表した。

参 考 文 献

- 1) 秋里和夫: 胃癌の微細血管構築に関する研究. 慶応医学 50: 21-36, 1973.
- 2) Auerbach R, Morrissey LM, et al: Gradients in tumor growth. Nature (Lond.) 274: 697-699, 1978.
- 3) Baserga R: A study of nucleic acid synthesis in ascites tumor cells by two emulsion autoradiography. J Cell Biol 12: 633-637, 1962.
- 4) Bleiberg H and Galand P: In vitro autoradiographic determination of cell kinetic parameters in adenocarcinomas and adjacent healthy mucosa of the human colon and rectum. Cancer Res 36: 325-328, 1976.
- 5) Charbit A, Malaise EP, et al: Relation between the pathological nature and the growth rate of human tumors. Eur J Cancer 7: 307-315, 1971.
- 6) Denekamp J and Kallman RF: In vitro and in vivo labeling of animal tumors with tritiated thymidine. Cell Tissue Kinet 6: 217-227, 1973.
- 7) 藤田佳宏: ³H-Thymidine による *in vitro* 標識法での人体腫瘍細胞増殖動態に関する研究. 京府医大誌 78: 615-631, 1969.
- 8) Friendland AN and Weinstein GD: Cell proliferation in human cutaneous squamous cell carcinoma. J Natl Cancer Inst 59: 3-6, 1977.
- 9) Fulker MJ, Cooper EH, et al: Proliferation and ultrastructure of papillary transitional cell carcinoma of the bladder. Cancer 27: 71-82, 1971.
- 10) Hainau B, Dombernowsky P, et al: Cell proliferation and histologic classification of bronchogenic carcinoma. J Natl Cancer Inst 59: 1113-1118, 1977.
- 11) Hainau B and Dombernowsky P: Histology and cell proliferation in human bladder tumors.

- An autoradiographic study. *Cancer* **33**: 115-126, 1974.
- 12) 胃癌研究会編：外科・病理 胃癌取扱い規約（改訂10版）。東京，金原出版，1979.
- 13) Johnson HA and Bond VP: A method of labeling tissues with tritiated thymidine in vitro and its use in comparing rates of cell proliferation in duct epithelium, fibroadenoma and carcinoma of human breast. *Cancer* **14**: 639-643, 1961.
- 14) 金沢利定：癌化学療法の基礎的臨床的研究(1) Microangiography による各種消化器疾患と悪性腫瘍の血管像変化の比較検討. *Arch Jpn Chir* **47**: 446-458, 1978.
- 15) 春日井達三，吉井由利，他：早期胃癌の変貌一胃癌の自然史解明の立場から. *胃と腸* **16**: 57-69, 1981.
- 16) 郡大裕，山下滋夫，他：人の体内における胃癌の増殖と生長. *最新医学* **24**: 471-481, 1969.
- 17) KORMAN DB, KRUTOVA TV, et al: Index labeling and prognosis in patients with stomach cancer. *СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ* **3**: 342-350, 1977.
- 18) Lala PK: Growth kinetics of malignant cells in ascites and solid forms. In *Growth kinetics and biochemical regulation of normal and malignant cells* edited by Drewinko B and Humphrey RM, Baltimore, The Williams & Wilkins Co., 1977, p509-527.
- 19) Laurén P: The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal type carcinoma. *Acta Path et Microbiol Scand* **64**: 31-49, 1965.
- 20) Leshner S, Schiffer LM, et al: Human colonic tumor cell kinetics. Potential for therapy. *Cancer* **40**: 2706-2709, 1977.
- 21) Lieb LM and Lisco H: In vitro uptake of tritiated thymidine by carcinoma of human colon. *Cancer Res* **26**: 733-740, 1966.
- 22) 水平敏知編：オートラジオグラフィ。東京，医歯薬出版，1979.
- 23) 村瀬一矩：病態胃に於ける微細血管のX線学的考察. *日本医放会誌* **26**: 1-21, 1966.
- 24) Malaise EP, Chavaudra N, et al: The relationship between growth rate, labelling index and histological type of solid human tumours. *Eur J Cancer* **9**: 305-321, 1973.
- 25) Meyer JS and Bauer WC: In vitro determination of tritiated thymidine labeling index (L.I.) Evaluation of a method utilizing hyperbaric oxygen and observation on the L.I. of human mammary carcinoma. *Cancer* **36**: 1374-1380, 1975.
- 26) Meyer JS and Hixon B: Advanced stage and early relapse of breast carcinoma associated with high thymidine labeling indices. *Cancer Res* **39**: 4042-4047, 1979.
- 27) 岡部治弥：陥凹性早期胃癌の経過. *内科シリーズ 早期胃癌のすべて一常岡健二編*，東京，南江堂，1972, p389-399.
- 28) Rajewsky MF: In vitro studies of cell proliferation in tumours-II. Characteristics of a standardized in vitro system for the measurement of ^3H -thymidine incorporation into tissue explants. *Eur J Cancer* **1**: 281-287, 1965.
- 29) Rubio CA, Lagerlöf, et al: Viability of the human cervical epithelium with dysplasia and carcinoma in situ. *J Natl Cancer Inst* **60**: 523-526, 1978.
- 30) 新畑幸：胃癌細胞の ^3H -thymidine in vitro 標識法による Autoradiography からみた増殖動態の研究. *京府医大誌* **76**: 117-140, 1969.
- 31) Sasaki K: Measurement of tritium thymidine labeling index by incubation in vitro of surgically removed cervical cancer. *Gann* **68**: 307-313, 1977.
- 32) Schiffer LM, Braunschweiger PG, et al: Studies on the cell kinetics of human solid tumors. In *Growth kinetics and biochemical regulation of normal and malignant cells* edited by Drewinko B and Humphrey RM, Baltimore, The Williams & Wilkins Co., 1977, p663-673.
- 33) Simpson-Herren L, Sanford AH, et al: Ambiguity of the thymidine index. *Cancer Res* **36**: 4705-4709, 1976.
- 34) Skipper HE: Kinetic behavior versus response to chemotherapy. In *Prediction of response to chemotherapy* Natl Cancer Inst Monograph **34**: 2-14, 1971.
- 35) Sklarew RJ, Hoffman J, et al: A rapid in vitro method for measuring cell proliferation in human breast cancer. *Cancer* **40**: 2299-2302, 1977.
- 36) Steel GG: *Growth kinetics of tumours*, Oxford, Clarendon Press, 1977.
- 37) Steel GG and Bensted JPM: In vitro studies of proliferation in tumour-I. Critical appraisal of methods and theoretical considerations. *Eur J Cancer* **1**: 275-279, 1965.
- 38) Sunter JP, Hull DL, et al: Cell proliferation of colonic neoplasms in dimethylhydrazine-treated rats. *Brit J Cancer* **42**: 95-102, 1980.
- 39) Tabuchi Y, Inoue K. et al: Mitotic activity of human gastric cancer cells under stathmokinetic effect of vincristine sulfate. *Gann* **71**: 84-93, 1980.
- 40) Tannock IF: The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumour. *Brit J Cancer* **22**: 258-273, 1968.

- 41) Thiessen NW: The vascularity of benign and malignant lesions of the stomach. A comparative study with clinical correlations. *Surg Genec Obst* **63**: 149-156, 1936.
- 42) 山村義孝, 寺部啓介, 他: スキルス癌における細胞増殖動態. 日本癌学会総会記事第39回総会 p. 266, 1980.
- 43) 安川林良: ^3H -Thymidine 局所標識法 (in vivo) による胃癌細胞増殖動態の研究. 京府医大誌 **76**: 83-103, 1967.
- 44) Wolberg WH and Brown RR: Autoradiographic studies of in vitro incorporation of uridine and thymidine by human tumor tissue. *Cancer Res* **22**: 1113-1119, 1962.