ヒト口腔領域の各種非腫瘍ならびに腫瘍組織 の組織培養学的研究

— 形態学的特徴ならびに増殖能について —

小 浜 源 郁

東京医科歯科大学歯学部第一口腔外科学教室

(昭和42年10月15日受付)

Studies on human oral non-neoplastic and neoplastic tissues in culture
—Morphology and growth characteristics—

Gen-iku Kohama

Dept. of Oral Surgery, School of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

(Chief and Director: Prof. Dr. Tadashi Ueno)

I. 序 論

組織培養法の癌研究への応用は Earle (1943) の L 細胞株¹⁾, Gey ら (1955) の Hela 細胞株²⁾ の樹立以後急速な進歩がみられ, 培養細胞の試験管内癌化, その悪性度, 代謝, 増殖能あるいは染色体など³⁻⁹⁾, 広範囲にわたった研究がある。しかしながら人癌の初代培養細胞については, 均一な細胞集団が得難く, その定量性が不確かなためもあつて詳細な研究は, 株細胞のそれに比すれば乏しい現状である。

株細胞については, それらのほとんどが母組織の性状をはなれ in vitro に馴化して共通の性状をあらわす^{10,11)}のに比し, 初代培養細胞は母組織の性状に近いとされている^{6,12)}。それ故, 初代培養細胞の動態を追求, 把握することが可能になるならば, 臨床においてわれわれが日常経験する腫瘍個々の多様性に対応する所見が得られるであろうと推定され, ひいてはその診断, 正しい治療方針の選択, 確立などに資する面が大であると考え, その端緒を目指すものとして本研究を行なつ

た。

ヒト口腔領域における組織培養の応用は, Eagle¹³⁾ Rose^{14,15)}ほか, Silverman¹⁶⁻¹⁹⁾ほか, 新島²⁰⁾, その他^{21,22)}の報告があるが, 口腔領域における正常ならびに各種腫瘍組織由来の培養細胞について系統的に比較研究した報告はない。本教室においては 1959 年に清水²³⁾により, 臨床材料から得られた各種新鮮細胞の細胞学的研究がなされ, 1965 年には関山²⁴⁾が正常ならびに癌腫新鮮組織の ³H-thymidine の in vitro single labeling 法による microautoradiograph を解析して, 組織所見との比較研究の成績を発表した。今回著者は口腔領域の非腫瘍性組織, 良性腫瘍ならびに悪性腫瘍各組織の培養を行ない, それらの各初代培養細胞についての動態を解明する目的で, 主として倒立位相差顕微鏡を用いて形態学的研究を行ない, さらに増殖能について, 移植片よりの遊出細胞 (out-growth) の増加を面積測定法により, また増殖細胞の世代時間を ³H-thymidine による cumulative labeling 法によつて labeling index (以下 L. I. と略す) を計測し, 各培養細胞の増殖を比較した。

II. 材料および研究方法

1. 培養材料および材料採取法

培養材料は1965年3月より1967年6月までの期間に東京医科歯科大学口腔外科を訪れた外来患者ならびに入院患者117症例より得られた。病理組織診としては悪性腫瘍群45例、良性腫瘍群42例ならびに非腫瘍性組織群30例である(表1)。

表1 Culture materials

Materials taken by	Biopsy	Operation	Total
Non-neoplastic tissue	2	28	30
Benign tumor	12	30	42
Malignant tumor	28	17	45
Total	42	75	117

非腫瘍性組織群30例のうち27例は口蓋裂患者の口蓋形成手術時に切除された組織片で、これは常時1～2歳の一定年齢層より得られるため、培養の対照として役立てたほか培養条件の検定にも使用した。他の非腫瘍性組織3例のうち2例は炎症性歯肉、1例は炎症性上顎洞粘膜であった。腫瘍の試験切除に際しては先ず口内洗滌を十分に行ない、また壊死巣を形成している病巣においては過酸化水素3%水溶液で洗い、さらに生食水を浸した綿球で壊死物質をふきとつた。切除した組織片の約半量は病理組織学的検索に供し、残りの組織片は直ちに1000 u/ml のペニシリン、および1000 γ /ml のストレプトマイシンを含む Hanks 塩類溶液²⁵⁾に浸し、4°C の冷蔵庫に保存して数時間後に培養に移した。手術摘出物の場合には摘出後直ちにその一部分を Hanks 塩類溶液に浸し、その後の操作は試験切除片より得られた材料と同様に行なった。

2. 培養法および培養液

1) 移植片培養 (explant culture)

組織片は Hanks 液で数回洗浄し、附着している凝血塊およびその他の汚物を除去して約1～2 mm 角大に鋭利なカミソリで細切した。ついで6カ月以内の雄鶏の血液より抽出されたプラズマ

に、胎生8日目の鶏胎児の抽出液を等量ずつ混じった液を12×24 mm 大のカバーガラスに一滴ずつ滴下し、ほぼ一層になるようにピンセットで全面に広げて凝固しないうちに細切した組織片を2個宛載せたのち径4.5 cm 大のシャーレに2枚ずつ入れて、約30分後に1.5 ml の培養液を加え、5% CO₂ を通した37°C の培養器で培養を行なった。また少数の培養例についてはプラズマを使用せず、細切した組織片を直ちにカバーガラス上に載せて組織片が浮力ではがれない程度に培養液を加えて、同様に CO₂ 培養器で培養を行ない、2～3日後に組織片からの遊出細胞が観察されるようになってから培養液を追加した。

2) 培養液

培養液は100 u/ml のペニシリンおよび100 γ /ml のストレプトマイシンを含む各20%仔牛血清添加199培養液²⁶⁾あるいは YLE 培養液²⁷⁾を使用した。

3. 観察法

1) 形態学的観察

培養開始24時間後より逐日的に倒立位相差顕微鏡により観察し、その形態学的特徴を記録追求した。また随時パパニコウ染色、ギムザ染色等の固定染色標本の観察も行なった。

2) 増殖能の測定

i) 遊出細胞帯の面積増加測定：遊出細胞帯の拡がりを顕微鏡用スクリーナーを使用して2～3日おきにトレーシングペーパーに投影して、移植片から遊出細胞帯の外縁までの距離を測定し、その長さを自乗して面積の比較値とした。

ii) オートラジオグラフの作製ならびに L. I. の測定：培養細胞が顕微鏡下で安定した形態を示し、かつ遊出細胞帯の面積がある程度の拡がりを示す時期を目安にして、³H-thymidine (specific activity 5 c/mM) を含む培養液で培養した。また正常口蓋粘膜組織移植片においては、その遊出細胞帯の面積増加が静止的になる時期の細胞について、1 μ c/ml の ³H-uridine (specific activity 2.7 c/mM) を24時間作用させ RNA 代謝の有無を観察した。³H-thymidine の濃度は1時間の single

labeling の場合には、 $0.5 \mu\text{C}/\text{ml}$ とし、数日間継続して行なつた cumulative labeling の場合は $0.1 \mu\text{C}/\text{ml}$ とした。ラベルを行なつた標本は Hanks 液で 2～3 回洗い、100 % メチルアルコールで固定した。乾燥後、2 % 過塩素酸で 4°C 40 分間処理による可溶性 ^3H -低分子物質の除去を確実にして、dipping 法²⁸⁻³⁰⁾ によつてオートラジオグラフィの処理を行なつた。すなわち感光乳剤は小西六写真工業株式会社化学研究所から提供を受けた NR-M2 を使用し、カバーガラス上の乳剤を乾燥させた後、穴あき試験管³⁰⁾ に入れて 4°C 冷蔵庫で 16 日間保存し露出した。現像はコニドール X で 18°C 5 分間、定着はコニフィックスで 15 分間行ない、水洗後 1 % グリセリンを通して乾燥させギムザ染色を施した。microautoradiograph による L. I. の算定は、正常粘膜の遊出細胞では、扁平化の傾向の強い辺縁部の細胞を避けて中間層までの細胞を対象とし、良性および悪性腫瘍の遊出細胞の場合は、標識細胞の分布が遊出細胞帯の全域にわたつてほぼ均等であつたので全域の細胞を対象とし、おのおの at random に 400～500 個の細胞を選定して行なつた。

3) 銀粒子数の算定 (grain counting)

Single labeling を行なつた各培養細胞より標識細胞を at random に 50 個選定し、それらの核内銀粒子数を算定して、比較を行なつた。L. I. および銀粒子数の算定には ocular micrometer を使用した。

III. 実験成績

1. 培養成績

移植片からの遊出細胞が観察された培養例を培養成功例とした。成功例のうち、遊出細胞帯の面積が対数的増加を示すか、または安定した形態を示し、分裂像の観察されたものを遊出優良 (good migration) とし、また遊出細胞の拡がりが緩慢で、不安定であり、分裂像のほとんど認められなかつたものを遊出可良 (poor migration) として、培養成功例の判定基準とした。非腫瘍性組織の培養例は表 2 に示す如く口蓋粘膜 27 例中 25 例に遊出細胞がみられ、また歯肉 2 例、上顎洞粘膜 1 例は軽度の炎症性変化をともなつていたが、全例に遊出細胞が観察された。従つてこれらをまとめると、非腫瘍性組織の培養例としては 93.3 % の培養成功率であつた。良性腫瘍の培養は表 3 に示す如くエナメル上皮腫 20 例中 17 例、多形性腺腫 15 例中 14 例、その他の 7 例は全例、それぞれ培養成功を示した。すなわち良性腫瘍の培養成功率は 92.8 % であつた。悪性腫瘍の培養は表 4 に示す如く扁平上皮癌 39 例中 29 例、粘表皮癌 2 例、腺様嚢胞癌 3 例および未分化癌の 1 例では、それぞれ全例の培養成功を示し、従つて悪性腫瘍の培養成功率は 77.8 % であつた。これらをまとめると培養総例数 117 例に対して、102 例の培養成功例、あるいは 87.1 % の培養成功率であつた。

2. 形態学的所見

1) 正常口蓋粘膜由来細胞

移植片からの遊出細胞の出現はほとんどすべて 1～4 日目に開始され、遊出細胞の拡がりは、10 日目頃まではほぼ対数的増加を示すが、その後はほとんどの培養例でその拡がりが緩慢となり、あ

表 2 Non-neoplastic Tissue

Primary site	No. of cases	Nutrient media		Culture success	Migration		Culture morphology	
		YLE	199		good	poor	*E	**EF
Palate	27	4	23	25	23	2	20	5
Giniva (inflammatory)	2	2		2		2		2
Maxillary sinus (inflammatory)	1	1		1	1		1	
Total	30	7	23	28	24	4	21	7

*E=Epithelial like cells. **EF=Mixed cell population of epithelial and fibroblast like cells.

表3 Benign Tumor

Histological classification	Primary site	No. of cases	Nutrient media		Culture success	Migration		Culture morphology		
			YLE	199		good	poor	*E	**EF	***F
Ameloblastoma	Mandible	20	12	8	17	14	3	4	12	1
Pleomorphic adenoma	Parotid gland	5	1	4	5	4	1	4	1	
	Palate	10	2	8	9	7	2	7	2	
Adenomatous tumor	Parotid gland	1		1	1	1			1	
Mucoepidermoid tumor	Parotid gland	1	1		1		1	1		
Leukoplakia	Floor of mouth	1		1	1		1	1		
Fibroma	Palate	1		1	1	1				1
Neurofibroma	Cheek	1		1	1	1				1
Hemangioma	Tongue	1	1		1		1			1
Lymphangioma	Tongue	1	1		1		1			1
Total		42	18	24	38	28	10	17	16	5

*E=Epithelial like cells. **EF=Mixed cell population of epithelial and fibroblast like cells.

***F=Fibroblast like cells.

表4 Malignant Tumor

Histological classification	Primary site	No. of cases	Nutrient media		Culture success	Migration		Culture morphology		
			YLE	199		good	poor	*E	**EF	***F
Squamous cell carcinoma	Mandible	15	7	8	9	7	2	3	3	3
	Maxilla	6	3	3	6	5	1	4	2	
	Maxillary sinus	3	2	1	2	1	1		2	
	Buccal mucosa	4	4		2	1	1	1	1	
	Tongue	6		6	6	5	1	4	2	
	Palate	2	2		2		2		1	1
	Floor of mouth	2		2	1	1		1		
	Lower lip	1		1	1		1		1	
Mucoepidermoid carcinoma	Parotid gland	2	2		2		2			2
Adenoid cystic carcinoma	Floor of mouth	2		2	2	2		2		
	Parotid gland	1	1		1		1	1		
Anaplastic carcinoma	Palate	1		1	1	1		1		
Total		45	21	24	35	23	12	17	12	6

*E=Epithelial like cells. **EF=Mixed cell population of epithelial and fibroblast like cells.

***F=Fibroblast like cells.

るいは静止する傾向にあつた。遊出帯の細胞集団は約10日目頃までは比較的均一な上皮様細胞(epithelial like cell)からなり、配列は細胞間隙を

有し、細胞間橋による接触様式を保ち規則的であつた。個々の細胞の大きさはほぼ均一で、細胞質がよく発達し核は円形または楕円形を呈し、特に

図 1 口蓋粘膜由来細胞。培養 8 日目。ほぼ均一な上皮様細胞の集団で核膜の発達が不鮮明，位相差像。(×100)

図 2 口蓋粘膜由来細胞。培養 8 日目。円柱上皮由来をおもわせる上皮様細胞。位相差像。(×100)

図 3 口蓋粘膜由来細胞。図 1 の中等度拡大。細胞間隙が明瞭で細胞間橋による接触配列を示す。位相差像。(×200)

図 4 口蓋粘膜由来細胞。培養 14 日目。細胞の遊出経過とともに細胞密度が疎になり，染色も悪くなる傾向を示す。パパニコロウ染色。(×50)

核膜の発達が不鮮明であつた。核小体は 1～2 個認められ，核分裂像も散見された(図1, 2, 3)。しかし培養日数が経過するに従い，また遊出細胞帯の外方にいくに従つて，細胞はガラス面上に扁平化し，細胞密度が疎になつていく傾向にあつたほか，細胞間隙も認め難くなり，細胞境界も不鮮明であつた(図 4, 5)。パパニコロウ染色標本では

黄赤色に濃染する角化様の所見もみられた(図 6)。もし遊出細胞中に線維芽様細胞(fibroblast like cell)が混在してくる場合には，上皮様細胞の増殖がおとろえてくる 2 週目頃より，徐々に線維芽様細胞の増殖が優位を示すようになり，上皮様細胞は消失することが多かつた。その線維芽様細胞は継代培養を行わずに培養を継続すると，

図 5 口蓋粘膜由来細胞。培養 30 日目。上皮様細胞。細胞が扁平化した像で細胞間隙は認め難くなる。位相差像。(×200)

図 6 口蓋粘膜由来細胞。培養 20 日目。核濃縮を伴う角化上皮細胞様の像を示す。パニコロウ染色。(×400)

図 7 口蓋粘膜由来細胞。培養 30 日目。線維芽様細胞。線維化様の像を示す。位相差像。(×100)

図 8 エナメル上皮腫由来細胞。培養 10 日目。軽度の異型性があり、核周囲顆粒が著明。位相差像。(×200)

細胞は集積し、線維化をおもわせる所見を示すにいたつた(図 7)。

2) 良性腫瘍由来細胞

良性腫瘍の培養は、その母組織によつて差異はあるが、培養経過中一般に著明な形態学的変化を示すことは希で、培養初期の特徴を長期間維持し増殖する傾向にあつた。

i) エナメル上皮腫由来細胞：エナメル上皮腫に由来した培養細胞 16 例のうち、2 例は上皮様細胞のみの増殖を示したが、12 例は上皮様細胞と線維芽様細胞の混在、他の 2 例は線維芽様細胞のみの増殖を示した。実質性のエナメル上皮腫では一般に上皮様細胞の増殖が優勢であり、また嚢胞性エナメル上皮腫では線維芽様細胞の増殖が優勢で

図 9 エナメル上皮腫由来細胞。培養 90 日目。細胞が変性に陥り液化して嚢胞形成類似の像を示す。位相差像。(×100)

図 10 多形性腺腫由来細胞。培養 20 日目。比較的均一な細胞集団で、母組織に類似した像所見を示す。位相差像。(×100)

図 11 多形性腺腫由来細胞。培養 16 日目。紡錘形細胞の像を示す。位相差像。(×200)

図 12 多形性腺腫由来細胞。培養 130 日目。核異型性、核小体の大型化を示す。位相差像。(×400)

あつた。上皮様に増殖した細胞の形態は、比較的均一であり、核は円形ないし楕円形で、異型性は軽度であつた。また正常上皮細胞の培養例に比して核周囲の顆粒の発達が著明であり、細胞質へ顆粒が広がっている像もみとめられた(図 8)。さらに継代培養を行わずに培養を継続すると単層に増殖していた細胞は重層化し変性に陥り、液化し

て一見嚢胞を形成していくかの如く思われる現象がみられた(図 9)。

ii) 多形性腺腫由来細胞：多形性腺腫の培養は、ほとんどの培養例において上皮様細胞の優勢な増殖を示した。上皮様細胞は比較的均一なシート状に配列し、それらは円形ないし楕円形核をもつ類円形細胞と紡錘形細胞の集団よりなり、母組

図 13 多形性腺腫由来細胞。培養 150 日目。異型性が著明で、核分裂像、クロマチンなどが増加している。位相差像。(×200)

図 14 多形性腺腫由来細胞。培養 217 日目。細胞質内顆粒が著明になり変性傾向を示す。大型核、大型の核小体をもつ細胞も散見される。位相差像。(×200)

図 15 扁平上皮癌由来細胞。培養 10 日目。核異型性に富む細胞集団。大型の核小体および細胞質内顆粒が目立つ。位相差像。(×400)

図 16 扁平上皮癌由来細胞。培養 14 日目。多形性に富む細胞で裸核様像を示す。位相差像。(×100)

織に比較的類似した像を示した(図 10, 11)。一般に培養 2～3 週間は、細胞は比較的均一で、異型性は軽度であつたが、以後 3～5 カ月頃までは、培養の経過とともに、分裂像および細胞異型性が頻繁に観察された(図 12, 13)。さらに培養日数が経過した場合、約 6 カ月頃までは分裂像も散見さ

れ良好な増殖を示す培養例もあつたが、以後は分裂像が希にしか認められず、培養は静止的であり(図 14)、約 1 年間ほとんど同じような状態を維持していた。

iii) その他の良性腫瘍由来細胞：腺系腫瘍、粘表皮性腫瘍、白板症、神経線維腫、線維腫、血管

図 17 扁平上皮癌由来細胞。培養 17 日目。細胞密度の密な集団と扁平化した細胞の混在を示す。位相差像。(×100)

図 18 扁平上皮癌由来細胞。培養 35 日目。図 16 と同一組織よりの培養細胞で、初期像と形態学的類似性を示す。位相差像。(×200)

図 19 腺様嚢胞癌由来細胞。培養 19 日目。多形性腺腫由来細胞と類似した形態を示す類円形細胞集団。位相差像。(×100)

図 20 図 19 と同一組織片由来細胞であるが、紡錘形細胞集団を示す。位相差像。(×100)

腫，リンパ管腫各 1 例ずつの培養を行なった。腺系腫瘍，粘表皮性腫瘍は上皮様遊出細胞帯を形成して増殖し，多形性腺腫由来細胞に類似していた。白板症組織由来細胞も上皮様の増殖を示したが，分裂像はみられず，遊出後約 1 週間で扁平化し，遊出細胞帯の拡がりは静止した。神経線維

腫，線維腫，血管腫およびリンパ管腫組織由来の培養細胞は，おのおの線維芽様細胞のみの増殖を示した。

3) 癌腫由来培養細胞

扁平上皮癌組織由来の培養細胞 29 例のうち上皮様細胞の優勢な増殖を示した例は 13 例，上皮

図 21 未分化癌由来細胞。培養 14 日目。異型性を示す上皮様細胞。ギムザ染色。(×100)

様細胞と線維芽様細胞とが混在していた例が 12 例、そして培養初期より線維芽様細胞だけしか増殖しなかった例が 4 例であった。培養不能であった 10 例のうち 8 例には細菌の混入感染があり、残りの 2 例は放射線の術前照射を受けていた。移植片からの細胞の遊出は、培養成功例のほとんどにおいて、培養 2～3 日目で開始された。遊出帯の上皮様細胞の形態は培養初期より異型性に富み、細胞の大小不同性、多形性、核の異型性および多核細胞など癌細胞の特徴を保持して増殖する例が多かった(図 15, 16)。培養 10 日目頃より扁平化する細胞も出現し、遊出細胞帯の拡がりが緩慢になる傾向を示す培養例もあった。その際異型性のみられる細胞集団と扁平化した細胞集団とが不規則に混在していた(図 17)。また 1 カ月以上も扁平化または著明な変性像がなく、異型細胞の形態を維持し増殖する例も観察された(図 18)。腺様嚢胞癌組織由来の培養細胞は、円形ないし楕円形核をもつ類円形細胞集団と紡錘形細胞集団とからなり、これらには異型性細胞も多数観察されるが、多形性腺腫由来培養細胞と判別困難なほど形態学的類似性を示すことが特徴であった(図 19, 20)。未分化癌の 1 例の培養においては、遊出細胞は上皮様の異型性に富む細胞集団であった(図 21)。

図 22 遊出細胞の経時的な面積増加曲線
N=正常口蓋粘膜 P=多形性腺腫
S=扁平上皮癌 A=未分化癌

3. 増殖能の測定

1) 遊出細胞帯の面積増加

トレーシングペーパーに投影して測定された各種遊出細胞帯の面積増加曲線を描記してみると図 22 の如くであった。遊出細胞帯の面積の測定は、各種培養細胞のうち上皮様に増殖した遊出細胞についてのみ行なつた。正常口蓋粘膜移植組織片からの遊出細胞帯の面積増加は、ほとんどの培養例において、1～2 週間は対数的増加の経過を示したが、それ以後は増加が緩慢になるか、または静止していた。

多形性腺腫移植組織片由来の遊出細胞帯の面積増加は、正常および癌腫組織由来の遊出細胞帯に比して、培養 1～2 週間はやや緩慢であったが、ほとんどの培養例において、面積の対数的増加が 3 週間以上にわたって続いていた。

癌腫移植組織片からの遊出細胞帯の面積増加は、正常口蓋粘膜組織由来のものとかかなり類似した経過を示した。すなわち約 2 週目頃までは良好な対数的増加を示し、以後は緩慢になる培養例が多かった。しかし 2 週間以上にわたり対数的増加を示すものもあり、正常例に比して、各種癌腫培養例間にはかなりの不均一性がみとめられた。

2) L. I. の比較および L. I. による世代時間

表5 Labeling Index & Generation Time

Histological classification	Culture age (days)	L. I. during cumulative labeling					Generation time (h)
		1 h.	24 h.	48 h.	72 h.	96 h.	
Normal mucosa	6	16.5	34.1	60.0	81.3	90.1	108
	8	15.0	—	—	—	—	—
	8	15.7	—	—	—	—	—
	9	27.0	57.9	73.0	—	—	102
	10	15.9	30.6	54.1	55.0	—	118
	12	13.5	—	—	—	—	—
Pleomorphic adenoma	15	8.4	39.2	76.6	99.3	99.7	75
	16	11.6	49.6	85.5	93.0	—	60
	23	27.8	46.1	65.6	92.3	93.0	88
	28	19.6	—	—	—	—	—
	30	16.2	—	—	—	—	—
Ameloblastoma	12	22.7	—	52.5	—	—	—
	24	29.7	53.6	—	76.3	—	108
Squamous cell carcinoma	14	40.0	—	—	—	—	—
	17	30.0	—	—	—	—	—
	18	12.0	32.0	64.0	91.2	95.0	84
	20	38.8	—	—	—	—	—
	26	33.5	76.5	—	—	—	50
Anaplastic carcinoma	16	32.0	74.0	93.0	—	—	55

図 23 口蓋粘膜由来細胞。培養 12 日目。 ^3H -thymidine 96 時間継続投与後の標識細胞でほとんど全細胞がラベルされている。ギムザ染色。(×600)

図 24 多形性腺腫由来細胞。培養 17 日目。 ^3H -thymidine 24 時間投与後の標識細胞で核内が濃くラベルされ、銀粒子が 2 分された分裂像を示す。ギムザ染色。(×800)

図 25 扁平上皮癌由来細胞。培養 26 日目。 ^3H -thymidine 1 時間投与後の標識された巨核細胞。ギムザ染色。(×600)

図 26 扁平上皮癌由来細胞。培養 27 日目。 ^3H -thymidine 24 時間投与後の標識分裂細胞で銀粒子が 2 分されている。キムザ染色。(×800)

図 27 各種培養細胞の累積的増加直線
○印=正常口蓋粘膜 ▲印=多形性腺腫
●印=扁平上皮癌

(generation time) の算定

^3H -thymidine 投与による 1 時間の single labeling 法および 1 時間以上数日間にわたって継続された cumulative labeling 法によつて測定された L. I. および世代時間の計測値は表 5 に、さらにそれらの標識細胞は図 23, 24, 25, 26 に示す如くであった。

正常口蓋粘膜由来細胞では、 ^3H -thymidine 投与

を培養日数 6~12 日目までの期間にわたつて行なつた。これらの single labeling 時における L. I. 値は 13.5~27.0 % を示し、15~16 % のものが最も多かつた。多形性腺腫由来細胞では、 ^3H -thymidine 投与が培養 15~30 日目にわたつて行なわれ、これらの L. I. 値は 8.4~27.8 % であつた。さらに癌腫由来細胞では、培養日数 10~26 日目の培養細胞を対象とした。これらの L. I. 値は 12~42 % にわたり、30~40 % のものが多かつた。

次に世代時間の計測は、同型培養された培養細胞のうち遊出細胞帯の面積増加率の同程度のものを選び出し、 ^3H -thymidine の継続的投与を行ない、累積的に L. I. を算定して求めた。すなわち図 27 に示す如く L. I. を経時的に記録し、ついでこれらの点から回帰直線を得て、それを点線のように下方に延長し、時間軸と交叉する点を求めた。この時間と理想上の最大値 100 % に達する時間とから世代時間を算定した。その結果計測された世代時間は、正常口蓋粘膜由来上皮様細胞 102~118 時間、多形性腺腫由来細胞 60~88 時間、癌腫由来細胞 50~84 時間であつた。

Cumulative labeling 法によつて世代時間が計測された各種培養細胞のうち、正常粘膜の場合は、

図 28 口蓋粘膜由来細胞。培養 14 日目。 ^3H -uridine 24 時間投与後の標識像、全細胞の核および細胞質に銀粒子が認められる。ギムザ染色。(×150)

図 29 核内銀粒子数の度数分布表

培養 14 日以後は L. I. の増加が認められなかった。L. I. が直線的増加を示した培養 13 日目までの培養細胞を対象とした。これらの結果と遊出細胞帯の面積増加の様相とを比較してみると、面積増加が対数的である時期においては、ほとんど全細胞がラベルされるのに比し、面積増加が静止する時期においては、ラベルされない非分裂細胞の増加を示した。しかしこの時期の正常粘膜由来細胞を $1 \mu\text{C}/\text{ml}$ の ^3H -uridine を含む培養液で 24 時間培養してみると全細胞がラベルされ、

RNA 合成に関与している生細胞であることが明らかとなった(図 28)。

4. 銀粒子数の算定

正常粘膜、多形性腺腫、癌腫各培養細胞の各 3 例ずつについて、 ^3H -thymidine による single labeling を行なった標識細胞を at random に各 50 個ずつ選定し、それらの核内銀粒子数を算定した。正常培養細胞の銀粒子数は 13~140 個にわたってみられたが、これらを他培養細胞群との比較のため度数分布表(図 29)であらわしてみると、50 個以内の銀粒子数をもつ細胞群が最も多く 58%，ついで 51~100 個の細胞群 32%，101~140 個の細胞群 10%となっていた。また多形性腺腫培養細胞では、正常粘膜培養細胞とほぼ同様の銀粒子数の分布を示していたが、しかし 8~289 個の広範囲にわたっていた。さらに癌腫培養細胞では、前 2 者に比して、極めて広範囲に分布し、35~1498 個にわたっていた。しかしながら 101~200 個の銀粒子数をもつ細胞が最も多く 63%を占めていた。

IV. 総括ならびに考察

ヒト腫瘍の培養については多数の報告があるが、臨床面への応用としては、腫瘍の診断学³¹⁾および癌腫の化学療法^{32, 33)}の分野への応用も開拓されつつある。しかしながらヒト腫瘍の臨床材料は、常に均一な培養が容易ではなく、培養成功率についても報告者によつて一定していない³⁴⁻³⁶⁾。

口腔領域の組織培養については、樹立細胞株^{13, 16, 22)}の報告もあり、初代培養細胞の形態学的観察としては、新島のエナメル上皮腫の培養所見²⁰⁾、Rose ほか^{14, 15)}の歯肉由来培養細胞の形態学的多様性、および口腔腫瘍の形態学的特徴ならびに核内封入体についての所見などがある。ところが口腔領域の正常組織、良性腫瘍、悪性腫瘍各組織からの培養細胞の形態学的ならびに増殖能についての比較研究はわずかに Silverman ほかの報告¹⁷⁾にみられるのみである。彼等は、各種培養細胞の形態を上皮様細胞と線維芽様細胞に分類してあるのみで、個々の培養細胞の形態学的特徴についてはほとんど述べていない。同じく増殖能についても

詳細な報告は行なわれていない。著者は口腔領域の各種組織を培養して、特にその初代培養細胞について、個々の形態学的特徴ならびに増殖能の解明を目指し、比較研究を行なったので、以下それらについて検討し考察した。

1. 培養材料、培養法および培養液について

良好な培養結果を得るには、培養材料として比較的均一な細胞集団を培養することが必要であり、壊死物質、凝血塊および他組織の混在を避けなければならないといわれている³⁷⁾。口腔内には無数の雑菌が常在しており、特に変性壊死巣を形成しやすい癌腫においては、種々の細菌が壊死巣内に寄生していることが考えられるので、良好な培養材料を常に得ることは困難であり、著者の培養失敗例のほとんどが細菌混入によるものであった。

正常口腔粘膜および良性腫瘍組織の培養が、癌腫組織に比して容易であったのは、無菌操作が比較的確実で、壊死物質などの混在もほとんどなかったことに基づくものと思われる。それ故、著者は癌腫の培養においても、変性像の少ない新鮮組織の培養を心掛け、できる限り変性壊死巣を避けて試験切除を行なった。さらに培養時には、細切した小組織片の塗抹標本作製して、位相差顕微鏡による細胞学的観察を行ない、新鮮腫瘍細胞の存在を確認してから培養に移すことによつて、培養成績を向上せしめ得た。

培養法は、plasma clot 法³⁸⁾と直接ガラス面へ組織片を附着させて行なう培養法とが採用されたが、培養成功率および増殖能について、両培養法間に有意差は認められなかった。plasma clot 法に比して、組織片を直接ガラス面へ附着させて行なう培養法は一般的に普及していないが³⁹⁾、著者はCO₂培養器を使用し、培養液量を適時加減することにより良好な培養結果を得た。本法によれば血漿凝固がないため、観察が容易で、位相差顕微鏡像、染色像も共に良好であった。

培養液は各20%仔牛血清清添加199培養液²⁶⁾とYLE培養液²⁷⁾(0.1% Yeast extract+0.5% Lactoalbumin+80% Earle's salt solution)を使用し

たが、199培養液による培養結果はYLE培養液に比して良好であった。199培養液が初代培養に適していることはすでに報告されており^{25,40,41)}、著者の実験においても、この培養液により良好な結果が得られたので、普遍的な培養液が確立されていない現状では^{3,17)}、199培養液の使用は一応妥当であったと思う。

2. 培養細胞の形態について

初代培養細胞の形態は、培養初期の1~2週間では、母組織の特性を保持するものが多いといわれる^{6,12,41-43)}。著者の実験観察でも、正常粘膜、良性腫瘍、癌腫の各培養細胞間に少なくとも初期1~2週間内の培養期間内では、形態学的に明確な差異が認められた。ところが一般に培養が長期にわたると、個々の母組織の特性が失われてin vitroの同一条件下に馴化して脱分化(dedifferentiation)または変質(alteration)の傾向をとり、培養細胞は形態学的類似性を示し、従つて正常および腫瘍組織由来の培養細胞の形態学的差異の判別は困難になるといわれる^{3,7,10)}。

本実験において、培養初期より良好な増殖を示した多形性腺腫および癌腫組織の上皮様細胞は、正常粘膜からの上皮様細胞に比して、比較的長期間培養され、特に多形性腺腫においては、培養期間中に変性に陥り難く、その形態学的特徴を保持して増殖する傾向を示した。また多形性腺腫は長期間培養可能例の多いことと共に、培養経過に従い、約5カ月頃までは、核異型性の増大、核小体の大型化、染色質の増大ならびに分裂頻度の増加などいわゆる悪性細胞様の特徴を示す培養例も観察された。それらをsemimalignant tumor⁴⁵⁾ともいわれる多形性腺腫の潜在的悪性の顕在化と考えるのは、なお飛躍にすぎるとしても、興味ある所見であった。扁平上皮癌組織の培養細胞においては、培養の経過とともに正常粘膜からの上皮様細胞と多少類似した経過をたどる培養例もみられ、すなわち異常に扁平化した核濃縮を伴う細胞が出現し、増殖も緩慢になる傾向を示した。このような所見は他の報告にもみられる^{36,42)}。また各種培養細胞において上皮様細胞の増殖中に線維芽

様細胞が混在して増殖している場合には、培養経過にともなつて、上皮様細胞の増殖が抑えられた。しかし線維芽様細胞の混在を示さない培養例においては長期にわたつて上皮様細胞の増殖が維持された。従つて良好な上皮様細胞の培養を可能にするためには、結合組織性の要素は出来る限り除去されるべきであることが本研究結果より推論される。

3. 増殖能について

Silverman(1963)¹⁷⁾によれば、口腔正常組織、良性腫瘍および悪性腫瘍の培養において、それぞれの培養細胞の増殖能にはほとんど異差がなく、わずかに癌腫組織からの細胞の増殖が良好であつたといつており、またMoore(1957)⁴⁶⁾、Mellgrenほか(1962)⁴⁷⁾は子宮頸部の癌腫培養細胞は同部正常組織の培養細胞よりも増殖が大であつたと報告している。しかし彼等の行なつた増殖の測定法は古くから行なわれている遊出細胞帯の面積増加測定法⁴⁸⁾によるものである。Willmerらによれば⁴⁹⁾、遊出細胞帯の面積増加率と分裂指数(mitotic index)とは相関関係にあるといわれるが、しかし一方遊出細胞帯の増加はすべて細胞分裂によるものではなく移植組織片よりの遊出によるものもかなり認められるので、未知の遊出力をもつ種々の培養細胞の増殖能をこの方法のみで比較するのは不適當であるとされている^{48,50)}。それ故、著者はその欠点を補うため、³H-thymidine を使用して、各種培養細胞の世代時間を、microautoradiographにより求めた。³H-thymidine 投与による microautoradiograph は、in vivo において、ヒト正常組織⁵¹⁻⁵³⁾および各種腫瘍組織⁵⁴⁻⁵⁶⁾の増殖能の解明に利用されている反面、人体に対する放射線障害ほかを考慮して、in vitro における各種新鮮組織についても多くの報告がなされている^{24,57-60)}。一方培養細胞では、株細胞の増殖サイクルの解明に広く利用されているが^{61,62)}、ヒト各種組織の初代培養細胞についての応用は著者の渉猟した文献ではみあたらなかつた。

Microautoradiographによる世代時間の求め方は数種類報告されているが^{56,63)}、一般に増殖が遅い

口腔領域各組織の初代培養細胞においては、継続してラベルを行なう cumulative labeling 法⁶³⁾が他の方法よりも資料が得やすく、合理的であると考えられたので、同法が本研究では採用された。

³H-thymidine の濃度については山田(1964)⁶⁴⁾によれば Hela 細胞の増殖が $0.1 \mu\text{C}/\text{ml}$ では 70~100 時間頃から抑制される。今回の実験ではその点を考慮して、³H-thymidine の継続投与を行なう場合にはその濃度を $0.1 \mu\text{C}/\text{ml}$ とし、かつ培養時間を 100 時間以内に限定した。

遊出細胞帯の面積測定結果では、正常粘膜からの上皮様細胞と癌腫からの上皮様細胞間に、培養 10 日目頃までは著明な差異は認められなかつた。しかしそれ以後も癌腫の遊出細胞の増加はみられたが、正常組織のそれは増加を示さないことが多かつた。多形性腺腫の遊出細胞では、ごく初期における面積増加率は、前 2 者に比し、緩慢であることが多かつたが、反面相当長期にわたつて対数的増殖を示した。このことは形態学的所見と同様に興味ある所見と思われる。以上のような遊出細胞帯の増加を示した各種培養細胞において、その面積増加曲線の適度な時期に ³H-thymidine による cumulative labeling 法を適用した。その結果、遊出細胞帯の面積が対数的増加を示す初期増殖期の細胞では、L. I. が経時的に直線的増加を示し、ほとんどの細胞がラベルされることがわかつた。従つてこの時期においては、ほとんど全細胞が分裂細胞であると推定される。ところが遊出細胞帯の面積が対数的増加を示さない時期になると L. I. は直線の上昇を示さず、非分裂細胞と考えられる細胞の増加が目立つた。しかしこの時期の正常粘膜由来細胞に対して $1 \mu\text{C}/\text{ml}$ の ³H-uridine を含む培養液で 24 時間培養してみると、全細胞の核および細胞質がラベルされた。このことより遊出細胞の面積が対数的増加を示さなくなる時期に急に増える非標識細胞は、いまだ RNA 合成能を有する生細胞と判定された。

これらの実験結果にもとづいて、本研究における培養細胞の世代時間は、均等な増殖をしていると考えられる遊出細胞の対数的増加を示す時期

を対象として算定された。このようにして求めた世代時間は、遊出細胞帯の面積増加率と必ずしも相関関係を示さなかった。すなわち各種組織の遊出細胞帯の面積増加率には著明な有意差は認められなかったにもかかわらず、それらの世代時間には明らかに有意差が認められた。それ故、本実験結果より考察すると、移植片よりの細胞の遊出とその細胞分裂の両者に基づく遊出細胞帯の面積増加測定値は、増殖サイクル中の DNA 合成期の細胞を累積的にラベルして求めた世代時間値に比して精度の低い増殖値といえよう。しかし本研究における世代時間値の算定は、一世代の細胞群だけしか対象にしえず、従って変化しやすい初代培養細胞の増殖の全経過を追求する場合は、面積測定法かまたは静置単層培養法による核数計算法⁽⁴⁸⁾によらねばならない。それ故、本研究では両者を適時組合わせることによつて、それらの欠点を相補い、より正確な増殖能を把握することにつとめた。

4. 銀粒子数の算定について

³H-thymidine の細胞核内取り込みの標識である銀粒子数を算定することによつて、一定時間内に合成される DNA 量が検討された。その結果、各種培養細胞の銀粒子数に明らかな差異が認められた。銀粒子数は合成される DNA 量に比例するので、従つて前述の図 29 に示した如く、銀粒子数の最も多い癌腫組織由来細胞が、一定時間内における DNA 合成量は最も多く、ついで多形性腺腫由来細胞および正常粘膜由来細胞は、大体同程度であることが推定された。このことは、染色体が 2 倍体である正常細胞の DNA 量が一定であるのに比し、一般に癌細胞は変位に富み、異数性を示し、かつ DNA 量が多いといわれることと対応するものように考えられる。しかし細胞の全 DNA 量は DNA 合成期の長さ(S 期)により決まるので、一定時間内に取り込まれた銀粒子数によつては、単位時間に合成される DNA 量を比較することはできるが、S 期を求めてないので、各培養細胞の全 DNA 量を推定することはできない。

以上のように、本実験では autoradiography を

利用して増殖能の解析および一定時間内の DNA 合成能について検討したのであるが、autoradiography については本教室の道(1964)⁽⁶⁵⁾もすでに検討している如く、多くの問題がある。一方比較値としての半定量的な利用はすでに十分認められている。また本実験へ応用することについては、autoradiography 独自の問題よりむしろ、不安定な増殖を示しやすい初代培養細胞を対象としたこと、および十分な同型培養が得にくかったことなどの方が問題であろう。しかしながら従来の遊出細胞の面積増加測定法に比較すると、本法による増殖能の解析は、増殖サイクル中の細胞だけを対象にし得る利点がある。従つて半定量的な比較値として利用するならば、十分に使用できると考える。

V. 結 論

1965 年 3 月より 1967 年 6 月までの 2 年 4 カ月間に東京医科歯科大学口腔外科を訪れた 117 症例から臨床的に得られた組織片を培養して、その培養細胞の形態ならびに増殖能について研究を行なつた。

1. 非腫瘍組織群 30 例、良性腫瘍群 42 例、悪性腫瘍群 45 例が培養に供され、おのおのの培養成功率は 93.3 %, 92.8 %, 77.8 % であり、また総培養例数 117 例に対する培養成功率は 87.1 % であつた。

2. 培養は plasma clot 法と本研究で改良した移植片を直接カバーガラス面へ附着させて行なう方法の両者を採用して CO₂ 培養器で行なつた。両者間の培養成績には有意差は認められなかったが、後者の直接カバーガラス法では血漿凝固がないため、位相差顕微鏡像および染色像が良好であつた。

3. 培養液は 20 % 仔牛血清添加 199 培養液と YLE 培養液が使用されたが、前者の方が良好な結果を示した。

4. 各種培養細胞は、培養 1 ~ 2 週間の間は、かなりの程度にそれらの母組織に特徴的な形態を示した。特に良性腫瘍および癌腫では 2 週間目以

降も特徴的な形態を保持して増殖する傾向が強かった。

5. 培養細胞の増殖能の測定は、遊出細胞帯の面積増加測定法と ^3H -thymidineによるcumulative labeling法によつて行なわれた。遊出細胞帯の面積増加曲線では、正常粘膜由来細胞と癌腫由来細胞間に培養10日目頃までは著明な差異が認められず、両者とも対数的増加を示したが、多形性腺腫は前2者よりも劣っていた。反面、多形性腺腫は前2者に比し、長期にわたつて対数的増加を示し、形態学的には癌細胞様の異型像を示すに至った培養例も観察された。

6. ^3H -thymidine投与を継続して行なうと、面積増加が対数的である期間内の培養細胞では、ほとんど全細胞に銀粒子が認められ、L. I.の増加は経時的に直線的上昇を示した。ところが面積増加を示さなくなる時期の細胞はほとんどL. I.の上昇を示さなかつた。しかしこの時期に増加する非標識細胞は、全細胞がなお ^3H -uridineではラベルされた。すなわちDNA合成を行なわない非分裂細胞でも、なおRNA合成能を有していた。

7. 各種培養細胞の世代時間は、遊出細胞が対数的増加を示す時期にcumulative labeling法により経時的にL. I.を算定することによつて求められた。その結果、癌腫由来細胞の世代時間が最も短く、ついで多形性腺腫由来細胞、正常粘膜由来細胞の順であり、面積増加曲線とは必ずしも相関関係を示さなかつた。

8. 各種培養細胞において、 ^3H -thymidine投与を一定時間行なつたときの標識細胞の銀粒子数を算定し、その比較を行なつた。癌腫由来細胞の銀粒子数は正常粘膜および多形性腺腫由来細胞のそれよりも多く、従つて一定時間内に合成されるDNA量が大であることが推定された。

本研究を進めるにあたり、上野教授および清水助教授の直接の御指導と御教示を受けるとともに、稿を進めるにあたっては御懇篤な御指導と御校閲を賜つた上野教授、ならびに御校閲を賜つた伊藤教授、および本学病理学教室石川教授に深甚の感謝を捧げ、種々御助力、御鞭撻下さつた本教室、清水助教授、道博士、関山博士に衷

心より感謝するとともに、各教室の皆様の御理解と御協力に對し謝意を表します。

尚、本論文の要旨の一部は第21回口腔科学会総会および第32回口腔病学会総会に於て発表した。

参考文献

- 1) Earle, W. R.: Production of malignancy in vitro, IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. J. Nat. Cancer Inst., 4: 165, 1943.
- 2) Gey, G. O., Coffman, W. D., and Kubicek, M. T.: Tissue culture studies on proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. Cancer Res., 12: 264, 1952.
- 3) 江頭靖之: 組織培養における「癌細胞」. 癌研究の進歩, 第2版, 東京. 大阪, 1960年. 医学書院, 393頁.
- 4) Leighton, J.: Contributions of tissue culture studies to understanding of the biology of cancer. Cancer Res., 17: 929, 1957.
- 5) Murray, M. R.: Recent advances of tissue culture in cancer research. Experimentia, 15: 289, 1959.
- 6) Paul, J.: The cancer cell in vitro: A review. Cancer Res., 22: 431, 1962.
- 7) 山田正篤: 癌研究における応用. 組織培養—基礎と応用—, 東京, 1964年, 朝倉書店, 541頁.
- 8) Norrby, K., Eriksson, O., and Mellgren, J.: Growth, morphology, and karyotype in two pairs of human cell strains of malignant and benign origin from the same individuals. Cancer Res., 22: 147, 1962.
- 9) Charles, G. S., William, L. L., and Joseph, E. G.: Studies on the growth of human carcinoma cells in tissue culture. Cancer Res., 20: 212, 1960.
- 10) Perman, L., Stulberg, C. S., and Ruddle, F. H.: Human cell culture morphology of the Detroit strains. Cancer Res., 17: 668, 1957.
- 11) Hsu, T. C. and Moorhead, P. S.: Mammalian chromosomes in vitro. VII. Heteroploidy in human cell strains. J. Nat. Cancer Inst., 18: 463, 1957.
- 12) 三宅清雄: 培養細胞における生物学の展望(2), Primary culture された細胞のわくづけ, その形態学的特徴. 医学のあゆみ, 56: 743, 1966.
- 13) Eagle, M.: Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma strain KB. (21811). Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 89: 362, 1955.
- 14) Rose, G. G., Cattoni, M., and Pomerat, C. M.: Tissue culture study of human gingiva.

- I. The morphological diversity of cells when using the cellophane membrane techniques. *J. Dent. Res.*, 41 : 997, 1962.
- 15) Rose, G. G. : Observations on oral tumors in vitro. III. Morphologic properties and longevity of non-viral intranuclear inclusions. *J. Nat. Cancer Inst.*, 36 : 747, 1966.
- 16) Silverman, S. JR., and Donoghue, J. : A continuous culture (WiSh) derived from human gingival carcinoma. *J. Dent. Res.*, 39 : 572, 1960.
- 17) Silverman, S. JR., and Vaeth, J. : Tissue culture studies of human oral carcinoma. I. Proliferative capacities of non-malignant and malignant oral explants. *J. Dent. Res.*, 42 : 1439, 1963.
- 18) Silverman, S. JR., and Vaeth, J. : Tissue culture studies of human oral carcinoma. II. Radiation response and in vitro growth curves. *J. Dent. Res.*, 44 : 554, 1965.
- 19) Silverman, S. JR. : Tissue culture studies of human oral carcinoma. III. Ultrastructure comparisons of epithelial-like and fibroblast-like cells derived from malignant and non-malignant oral explants. *J. Dent. Res.*, 45 : 1804, 1966.
- 20) Niizima, M. : Tissue culture of an ameloblastoma. *Zschr. F. Zellforsch.*, 46 : 127, 1957.
- 21) Smulow, J. F., Rustigian, R., and Tye, M. : Cultivation in vitro of adult human skin and oral mucosa on gelatin film. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, 106 : 757, 1961.
- 22) Syverton, J. T., and McLaren, L. C. : Human cells in continuous culture. I. Derivation of cell strains from esophagus, palate, liver, and lung. *Cancer Res.*, 17 : 923, 1957.
- 23) 清水正嗣 : 口腔癌の位相差顕微鏡による細胞学的研究. *口外誌*, 5 : 19, 1959.
- 24) 関山三郎 : 人口腔正常上皮および悪性腫瘍組織の in vitro の autoradiography による研究. *口病誌*, 32 : 420, 1965.
- 25) 遠藤浩良, 山田正篤, 奥村秀夫 : 塩類溶液と培養液. *組織培養—基礎と応用—*, 東京, 1964 年, 朝倉書店, 23 頁.
- 26) Morgan, J. F., Morton, H. J., and Parker, R. C. : Nutrition of animal cells in tissue culture. I. Initial studies on a synthetic medium. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, 73 : 1, 1950.
- 27) Cooper, P. D. : A method for producing plaques in agar suspensions of animal cells. *Virology*, 1 : 397, 1955.
- 28) Messier, B., and Leblond, C. P. : Preparation of coated radioautographs by dipping sections in fluid emulsion. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, 96 : 7, 1957.
- 29) Kopriwa, B. M., and Leblond, C. P. : Improvements in the coating technique of radioautography. *J. Histochem. & Cytochem.*, 10 : 269, 1962.
- 30) 加藤四郎 : オートラジオグラフィー. *組織培養—基礎と応用—*, 東京, 1964 年, 朝倉書店, 189 頁.
- 31) Murray, M. R., and Stout, A. P. : The classification and diagnosis of human tumors by tissue culture methods. *Texas Rep. Biol. & Med.*, 12 : 898, 1954.
- 32) Cobb, J. P., Walker, D. G., and Wright, J. C. : Comparative chemotherapy studies on primary short-term cultures of human normal, benign, and malignant tumor tissues—a five-year study. *Cancer Res.*, 21 : 583, 1961.
- 33) Wright, J. C., Cobb, J. P., Gumpert, S. L., Golomb, F. M., and Safadi, D. : Investigation of the relation between clinical and tissue culture response to chemotherapeutic agents on human cancer. *New Engl. J. of Med.*, 257 : 1207, 1957.
- 34) 山根績, 松谷豊 : 人癌細胞の分類培養 (1). *癌の臨床*, 8 : 488, 1962.
- 35) Cobb, J. P., and Walker, D. G. : Studies on human melanoma cells in tissue culture. I. Growth characteristics and cytology. *Cancer Res.*, 20 : 858, 1960.
- 36) Marcuse, P. M. : Cytology of short-term tissue cultures. *Lab. Invest.*, 4 : 293, 1955.
- 37) Parker, R. : VIII. Preparation of cells and tissues for cultivation. In “Methods of tissue culture”, New York, 1961 (3rd ed.), Paul B. Hoeber, p. 115.
- 38) Parker, R. : X. Flask and tube cultures with plasma. In “Methods of tissue culture”, New York, 1961 (3rd ed.), Paul B. Hoeber, p. 153.
- 39) Parker, R. : XI. Stationary cultures with fluid medium. In “Methods of tissue culture”, New York, 1961 (3rd ed.), Paul B. Hoeber, p. 174.
- 40) Hsu, T. C., and Kellogg, D. D. JR. : Primary cultivation and continuous propagation in vitro of tissues from small biopsy specimens. *J. Nat. Cancer Inst.*, 25 : 221, 1960.
- 41) Dunnebacke, T. H., and Zitcer, E. M. : Preparation and cultivation of primary human amnion cells. *Cancer Res.*, 17 : 1043, 1957.
- 42) Auersperg, N., and Worth, A. : Growth patterns in vitro of invasive squamous carcinomas

- of the cervix—A correlation of cultural, histologic, cytogenetic and clinical features. *Int. J. Cancer*, 1 : 219, 1966.
- 43) Grand, C. G. : Cytologic tissue culture studies on cervical epithelium. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 63 : 1436, 1956.
 - 44) Richart, R. M. : The growth characteristics in vitro of normal epithelium, dysplasia, and carcinoma-in situ of the uterine cervix. *Cancer Res.*, 24 : 662, 1964.
 - 45) Rauch, S. : Pleomorphe Sialoadenome. In “Die Speicheldrüsen des Menschen”. Stuttgart, 1959, Georg Thieme Verlag, p. 374.
 - 46) Moore, J. G., and Brandkamp, W. W. : The proliferative capacity in vitro of tissue explanted from histologically benign and malignant areas of the same uterine cervix. *Surg. Forum*, 7 : 507, 1957.
 - 47) Mellgren, J., Boeryd, B., and Hagman, M. : Growth potentials of precancer of the cervix uteri in vitro and in cortisone-treated hamsters. *Cancer Res.*, 22 : 139, 1962.
 - 48) 堀川正克 : 「細胞の成長度測定法と生死の判別」. 組織培養—基礎と応用—, 東京, 1964 年, 朝倉書店, 180 頁.
 - 49) Jacoby, F., Trowell, O. A. and Willmer, E. N. : Further observations on the manner in which cell division of chick fibroblasts is affected by embryo tissue juice. *J. Exper. Biol.*, 14 : 255, 1937.
 - 50) 勝田甫, 高岡聡子 : 正常および腫瘍細胞の高分子要求—組織培養による検討—. 細胞化学シンポジウム, 10 : 91, 1960.
 - 51) Cole, J. W., and McKalen, A. : Observations of cell renewal in human rectal mucosa in vivo with thymidine-³H. *Gastroenterology*, 41 : 122, 1961.
 - 52) Lipkin, M., Sherlock, P. and Bell, B. M. : Generation time of epithelial cells in the human colon. *Nature*, 195 : 175, 1962.
 - 53) Lipkin, M., Bell, B. M. and Sherlock, P. : Cell population kinetics in the gastrointestinal tract of man. Cell renewal in colon and rectum. *J. Clin. Invest.*, 42 : 767, 1963.
 - 54) Johnson, H. A., Haymaker, W. E., Rubini, J. R., Fiedner, T. M., Bond, V. P., Cronkite, E. P., and Hughes, W. L. : A radioautographic study of a human brain and glioblastoma multiforme after the in vivo uptake of tritiated thymidine. *Cancer*, 13 : 636, 1960.
 - 55) Johnson, H. A., Rubini, J. R., Cronkite, E. P., and Bond, V. P. : Labeling of human tumor cells in vivo by tritiated thymidine. *Lab. Invest.*, 9 : 460, 1960.
 - 56) Clarkson, B., Ota, K., Ohkita, T., and O' Connor, A. : Kinetics of proliferation of cancer cells in neoplastic effusions in man. *Cancer*, 18 : 1189, 1965.
 - 57) Johnson, H. A. and Bond, V. P. : 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, 1961.
 - 58) Wolberg, W. H. and Brown, R. R. : Autoradiographic studies of in vitro incorporation of uridine and thymidine by human tumor tissue. *Cancer Res.*, 22 : 1113, 1962.
 - 59) Oehlert, W., Dörmer, P. und Lesch, R. : Autoradiographische Untersuchungen über die DNS-Synthese im überlebende Tumorgewebe des Menschen. *Beitr. pathol. Anat.*, 128 : 468, 1963.
 - 60) Richart, R. M. : A radioautographic analysis of cellular proliferation in dysplasia and carcinoma in-situ of the uterine cervix. *Am. J. Obst. Gynecol.*, 86 : 925, 1963.
 - 61) Stanners, C. P. and Till, J. E. : DNA synthesis in individual L-strain mouse cells. *Biochem. Biophys. Acta*, 37 : 406, 1960.
 - 62) Siskin, J. E. : Analyses of variations in intermitotic time. In “Cinemicrography in cell biology”. New York and London, 1963 (Rose, G. G., ed.), Academic press, p. 143.
 - 63) 藤田哲也 : オートラジオグラフィーによる細胞の増殖と分化の分析. 新細胞学, 東京, 1965 年, 朝倉書店, 605 頁.
 - 64) 山田正篤 : ガン細胞の増殖サイクル. 蛋白質核酸 酵素, 9 : 1153, 1964.
 - 65) 道健一 : 培養細胞に対するクロモマイシン A₃ の作用, 第 2 報, Hela-S₃ 細胞の核酸代謝に対する影響. 口病誌, 31 : 65, 1964.