

<特集「光学顕微鏡法 -その歴史と展望-」>

顕微測光法

—京都府立医科大学における顕微測光の展開—

濱 田 新 七*

市立大津市民病院病理診断科

Development of Cytometry in Kyoto Prefectural University of Medicine

Shinshichi Hamada

Department of Pathology, Otsu City Hospital

抄 録

1970年代から1990年代にかけて、顕微測光法、とりわけ顕微蛍光測光法が京都府立医科大学とその同門によって精力的に推進された。対象を腫瘍に限って言えば、京都府立医科大学において、目指す方向の異なる二つの顕微蛍光測光の流れがあった。一つは、腫瘍細胞のDNA量と数値化された核形態の二つのパラメータを同時に測定して癌の診断に役立てようという、診断学としての流れである。もう一つは、腫瘍細胞の核DNA量の変化と組織内分布から、初期癌から末期癌に至るまでの腫瘍のクローン進化と多様性の獲得過程を明らかにし、予後との関連を追究しようという腫瘍生物学としての流れである。これは、多様性の獲得こそが転移と再発の可能性を押し上げている元凶であるから、腫瘍が多様になる前に対処すれば良いという推論にもつながる。これら二つの流れを追うとともに、そこで得られた知見が、病理診断という実地の領域でどのように生かされてきたか、また、現在の最先端の研究とどのように絡み合っているかを概観する。

キーワード：顕微蛍光測光法、DNAプロイディー、腫瘍内多様性、予後、病理診断。

Abstract

Microphotometry, particularly fluorescence microphotometry or cytofluorometry was investigated vigorously and carried out on various cells and tissues in Kyoto Prefectural University of Medicine (KPUM) and its fellow institutions from the 1970s through the 1990s. In the cytofluorometric research of human tumors, there were two directions aiming at different goals in KPUM. One goal was diagnostic pathology, in which DNA content and digitized nuclear shape of tumor cells were simultaneously analyzed to help make cancer diagnosis. Another goal was tumor biology, in which DNA ploidy in conjunction with its regional difference was investigated in tumors of various stages to figure out clonal evolution, acquiring process of intratumor heterogeneity, and its relevance to the prognosis of cancer patients. By looking back at achievement of both directions, it is demonstrated that cytometric findings and knowledges are

平成29年12月12日受付 平成29年12月12日受理

*連絡先 濱田新七 〒520-0804 滋賀県大津市本宮2丁目9-9
shamada@koto.kpu-m.ac.jp

efficiently employed in the current diagnostic pathology, and even involved in the latest research.

Key Words: Cytofluorometry (Image cytometry), DNA ploidy, Intratumor heterogeneity, Prognosis, Pathologic diagnosis.

顕微測光法 (microphotometry, microspectrophotometry) は細胞測光法 (cytophotometry) と呼ばれ、測光法の違いによって顕微吸光測光法 (absorbance cytometry) と顕微蛍光測光法 (fluorescence cytometry, cytofluorometry) に分けられる。近年主流となった大量の細胞を高速に測定するフローサイトメトリー (flow cytometry) に対して、細胞を1個1個確認しながら測定する従来の顕微測光法をイメージサイトメトリー (image cytometry) と呼ぶこともある。

顕微測光の歴史

生物試料から目的とする物質を抽出・精製した後、定量する方法は、生化学や分子生物学で広く行われている。

他方、組織学・細胞生物学分野では、組織内あるいは細胞内に存在している状態を保持しながら、目的物質の定量を行いたいという欲求は古くからあった。その背景のもとに、染色体分染法の発明¹⁾でも知られる Caspersson が創案したのが、紫外線の吸収度に基づいて細胞核 DNA 量を測定するという、紫外線吸光顕微測光法である²⁾。しかし、紫外線は組織細胞内における光散乱が顕著で、特異性にも乏しかった。そのため、可視光域に吸収波長を持ち、DNA と特異的に結合する物質で染色した後、その吸光度を測定するという方法に取って代わった。それが、塩酸加水分解によって脱プリン化した DNA 塩基に、シッフ試薬の主成分であるパラローズアニリン (pararosaniline) 等の色素分子を共有結合で特異的に結合させる Feulgen 染色である^{3,4)}。Feulgen 染色が導入された当初、Feulgen 反応の特異性や定量性の有無について、しばらく議論が続いたが、Feulgen 染色-細胞核DNAに定量性ありとの最終結論に至った^{5,6)}。このあたりの事情については、手越論文に詳しく記載されている⁹⁾。顕微吸光測光法が医学・生物学分野に導入された黎明期は、装置・機器は一部屋を占領するような、かなり大がかりなものであった¹⁰⁾。顕微測光法が出現して以降、測定誤差の問題を解決するための理論的研究と様々な誤差回避・軽減法の考案や開発、装置の改良や小型化が継続的になされてきた³⁾⁴⁾¹⁰⁻¹²⁾。

短期間ではあったが、可視光による顕微吸光測光装置を使用した筆者の経験では、細胞核1個のDNA量

を測定するのに十数分から数十分かかったため、1検体の測定に一日費やしても、せいぜい数100個の細胞しか測定できなかった。筆者が顕微測光を始めた時は、すでに蛍光による顕微測光法の時代になっていたが、それと比べて、たいそう効率の悪い作業という印象を持った。

蛍光による顕微測光法 (顕微蛍光測光法) は、イタリアの Prenna らによって創始され¹³⁾、次いで、落射式励起システム (落射式顕微蛍光測光装置) の開発¹⁴⁻¹⁶⁾、蛍光測光に適した色素の発見¹⁷⁻²²⁾、染色条件の検討・改良¹¹⁾、自家蛍光や非特異蛍光の軽減法の開発¹²⁾²³⁻²⁵⁾、蛍光減衰防止法の発見²¹⁾²⁶⁾ 等が相まって、顕微蛍光測光法が普及して行った (図1A, B)。

中でも、蛍光顕微鏡の価値を一気に高めたのは、ダイクロイックミラーの登場である (図1C)¹⁵⁾¹⁶⁾。それまで、蛍光顕微鏡は透過式照明の蛍光顕微鏡であり、光路上に様々なフィルターを挿入し、目的とする蛍光以外の光をカットしようと試みても、背景はぼんやりと明るく、定量に適した装置ではなかった。ところが、ダイクロイックミラーの登場によって、蛍光顕微鏡は透過式照明から落射式照明に変貌した。現在、当たり前のように見ている蛍光像、すなわち、暗い背景に目的物がくっきりと浮かび上がる像は、落射式蛍光顕微鏡によって可能になったのである。落射式蛍光顕微鏡が一挙に主流となり、透過式照明の蛍光顕微鏡は廃れてしまった。

顕微測光法の歴史は測定精度向上の歴史でもある (図1D, E, F)。測光機器の開発・改良と測光に適した標本作製法の考案ならびに改良が、車の両輪となって発展してきた。顕微測光法を日本に最初に導入し、顕微測光装置の開発・改良とともに、理論の構築や測定精度の向上に取り組んだのは、東京大学をはじめとした物理学、生物学分野の研究者のグループであり、1940年代後半から1960年代前半にかけてのことであった²⁷⁾。その後約20年を経て、顕微測光法の発展を京都府立医科大学とその同門が担うことになった¹⁰⁾²⁸⁻³⁰⁾。国内外の他施設においても夥しい数の研究がなされたが、ここでは、本学とその同門の研究を主に紹介する。

話は少し脇道にそれるが、京都府立医科大学において顕微測光が精力的かつ情熱的に取り組まれるよう

になった契機について、京都府立医科大学元学長の藤田哲也博士が、現在の神経幹細胞の研究にもつながる興味深い逸話を語っている³¹⁾。

藤田博士は神経発生分野においても高名であり、神経管におけるマトリックス細胞（母基細胞＝幹細胞）の細胞周期に同期したエレベーター運動の発見³²⁾や神経発生一元論（マトリックス細胞説）の提唱³³⁾がその嚆矢であろう。マトリックス細胞という種類の未分化前駆細胞から、中枢神経系を構成する主要な細胞のすべてが生まれるという考えである。DNAを合成し増殖しているマトリックス細胞から、終末分化しDNAを合成しない神経細胞がまず生まれ、次いで、残ったマトリックス細胞から膠細胞（グリア細胞）が生まれ、最終的にマトリックス細胞は上衣細胞に分化するという図式である。マトリックス細胞という言葉と概念および神経発生一元論は、最初、世界に好意的に受け入れられ、有名な Bloom and Fawcett の組織学教科書の第9版に掲載された³⁴⁾。しかし、後に、米国の神経発生学を代表する学者たちが神経発生一元論を否定し始め、遂にボルダー委員会の名の下に、マトリックス細胞と神経発生一元論を全否定したのである³⁵⁾。そして、彼らは、新たに造語した脳室細胞（ventricular cell: 神経幹細胞に相当）と脳室下細胞（subventricular cell: グリア幹細胞に相当。実際には血管壁の細胞であった）という言葉を用いて正式用語として採用し、これら二系統の細胞によって脳ができあがるという、神経発生二元論を公式見解として宣言したのである。そのため、マトリックス細胞や神経発生一元論に基づく論文は、アメリカの雑誌には一切受理されなくなってしまう。また、藤田説は、Bloom and Fawcett の組織学教科書の第10版から削除され、ローマ帝国の記録抹殺刑（damnatio memoriae）のごとく、存在しないことになったのである。1970年代～1980年代においては、ハーバード大学（後にイェール大学）の Rakic らの提唱した放射状グリア（radial glia）とそれに基づく神経発生二元論が全盛を極め³⁶⁾³⁷⁾、神経発生一元論は京都府立医科大学第二病理学教室の外では潰えたかに見える不運な時期が続いた。当時、第二病理学教室の大学院生であった筆者は、「藤田先生は、いつまで一元論にこだわるつもりなのか」といったような苦言をあちこちで聞かされた記憶がある。本人には直接言いくわかつたのであろう。また、1960年代以降の顕微測光法を使った研究から、脳の神経細胞は分化した後もDNA合成していると主張する学者たちが続々と現れ、神経発生一元論を否定する根拠の一つにもなっていた。上記ボルダー委員会の宣言の

あと、1968年のラホヤ・シンポジウムでは、神経細胞のDNA合成は神経科学者の常識であり、神経発生一元論は間違っているとして、藤田博士は散々痛罵され、集中攻撃にさらされた。しかし、³H-オートラジオグラフィーを使って自ら出した結果は、分化した神経細胞はDNA合成しないことを明瞭に示していた。果たして彼我のどちらの主張が正しいのか。神経細胞が生後もDNA合成するという主張は、誤った測定から導かれた結論ではないかと藤田博士は疑い、自分自身で神経細胞のDNA量を正しく測定するため、顕微測光を開始したのである。かくして、顕微測光における測定精度の向上は、マトリックス細胞説・神経発生一元論を補強するための至上命題にもなっていた。

この話を知って痛感したのは、研究とは、真理に対する飽くなき渴望を原動力とした、激烈な闘争だということである。顕微測光の改良・発展が、たとえ方法論であったとしても、昼夜を分かたず全身全霊を傾けた取り組みとなっていた。

ちなみに、1990年代になって、岡野栄之らによる神経幹細胞の発見を契機として³⁸⁾、神経発生一元論（＝matrix cell theory）が甦り、二元論は否定された。放射状グリア（radial glia）はグリアではなく、神経とグリアに分化し得る幹細胞、すなわちマトリックス細胞の類いであることが証明された。しかし、今なお、放射状グリアという言葉が残り、大脳皮質において放射状の形態・分布を示す幹細胞を表す学術用語として使用されている。当分（Rakicの存命中）は言い換えをせず、言葉だけは残しておこうというのが、北米神経学会の判断のようだが³⁹⁾、極めてミスリーディングである。そのあたりの事情を知らない研究者は、本当のグリアだと思い込んでしまう危険性が大いにある。

ところで、19世紀中葉、1858年から連綿と続く世界的教科書、GRAY'S Anatomyを知らない人は、医学畑にはいないであろう。そこでは、神経発生における二元論と一元論の興亡史について、比較的公平に記述されている。1995年発行の第38版では、二元論としてHis説（1889）とRakic説（1972, 1981）、一元論としてSchaper説（1897）とFujita説（1963）が模式図（1982年のRakic原図を改変）とともに併記されている⁴⁰⁾。1990年代半ば以降、中枢神経幹細胞から神経細胞も膠細胞も上衣細胞も生まれることが事実として広く認識されてきたこともあって、2008年発行の第40版では、一元論のFujita説がFujitaのエレベーター運動の模式図とともに詳述されている⁴¹⁾。神経発生一元論の完全勝利である。

同じ英語圏の国であっても、米国と英国では、対応

にたいそう違いがある。英国は、さすがにニュートンやダーウィンを生んだ国だと感心した憶えがある。

測光の原理

物質に光を照射すると、それぞれの物質に特有の波長において、光の吸収量が最大となる。そして、その吸収量は物質の量に相関する。物質の分布が均一で、濃度が十分低い時、光の吸収量と物質の量は直線的な比例関係で近似できる。これがランベルト・ベールの法則 (Lambert-Beer's law) である。様々な領域で、分光光度計を用いてタンパク濃度 (280 nm) や核酸濃度 (260 nm) が測定されているが、その背後にあるのが、ランベルト・ベールの法則である。この分光光度計の原理を顕微鏡レベルの微細な構造物に応用したのが、顕微測光法 (顕微分光測光法) である。

また、ある種の物質は、光を吸収して励起状態に遷移すると、次に、長波長側にシフト (ストークスシフト) した光を放出して基底状態に戻る。この光を蛍光といい、このような性質を持つ物質を蛍光物質という。蛍光の場合にも、光吸収係数と量子収率を加味した式となるが、ランベルト・ベールの法則が成立する⁴²⁾。通常、励起光と蛍光それぞれが最大となる波長の光を通過させるフィルターを選び、光路上に適切に配置する。

蛍光による定量

顕微蛍光測光法の長所と短所⁹⁾¹⁰⁾⁴³⁾

顕微蛍光測光法の最大の長所は、吸光測光で見られたような分布誤差や S-V (Schwarzschild-Villiger) 効果、非特異的光損失等を考慮する必要がないことである。そして、第二の長所は、蛍光強度の測定は瞬時に完了するという点である。他方、最大の短所は、蛍光はすみやかに減衰するという点である。観察しながら測定細胞を選んでいる間にも蛍光は減衰するため、もたもたしていると正確な測定値が得られない。第二の短所は、バックグラウンドの非特異蛍光によって測定精度が劣化するという点である。しかし、顕微蛍光測光の短所を回避するために、様々な方法が考案された。

標本作製法と染色法

顕微測光の標本には、一枚の組織切片上で細胞核 DNA 量を測定する方法 (単一切片法)⁹⁾⁴⁴⁾、連続切片を作製して各切片上の細胞核断片の DNA 量を測定し、後で連続する核断片の値を合計する方法 (連続切片法)⁴⁵⁾、組織から単離細胞標本作製し、個々の単離細胞核の

DNA 量を測定する方法 (細胞単離法)⁴⁶⁻⁵⁰⁾ がある。

1. 単一切片法 (特に分裂中期法⁴⁶⁾)

この方法では、一枚の組織切片上の中間期核を測定するのではなく、M 期の中でも分裂中期 (metaphase) の細胞を測定対象とするので、分裂中期法と言った方が良いかもしれない。

未固定の小リンパ球の核の直径は $6\ \mu\text{m}$ から $9\ \mu\text{m}$ ある。細胞や組織がホルマリンやアルコール固定等により収縮するとはいえ、厚さ $4\ \mu\text{m}$ 程度の一枚の組織切片上に上皮細胞の核が収まりきるはずがない。組織切片上で 1 個の細胞核の DNA 量を測定しようとしても無理がある。核の欠損を避けるために組織切片の厚みを増すと、今度は隣接する核と重なり測定できなくなる。そこで考案されたのが、分裂中期法である。この方法では、組織内における G_1/G_0 期や S 期、 G_2 期に存在する細胞の割合を出すことは放棄し、プロイディーの決定のみを目的とする。M 期の DNA 量は G_1/G_0 期 DNA 量の 2 倍であることから、2 で割れば、その細胞のプロイディーが決定できる。M 期の中でも分裂中期 (metaphase) の細胞では、染色体が細胞の赤道面に沿って花環状に並ぶとともに、細胞そのものが周囲からやや遊離し若干の空隙が生じているように見える。組織切片と赤道面が平行な場合、条件が良ければ、染色体セットすべてが一枚の切片に収まり、小さなスポットで測定できることがある。この時、顕微鏡のステージを上下し、染色体セットが組織切片の上面と下面の間に完全に収まっていることを確認する。ただし、組織切片の上面は容易に視認できるが、下面はややぼんやりとしていて視認するには慣れが必要である。

この方法を用いて、ヒト胃の印環細胞癌のプロイディーを決定し、癌巣内における多様性の獲得、癌の進化、生長の速いクローンの出現過程等が組織切片上において *in situ* で明らかにされた⁵¹⁾⁵²⁾。分化型癌では細胞の密集程度が高度なため、分裂中期法を用いても極めて測定に難渋する。この観点から見ると、びまん浸潤する印環細胞癌を対象としたのは良い選択であった。しかし、線維形成性反応を伴いながら境界不明瞭にびまん性に浸潤する印環細胞あるいは未分化癌細胞の分裂中期像は、そう簡単には見つからない。高倍率で目をこらしながら多数の組織切片を検索するため、非常に労力のいる作業であったであろうことは想像に難くない。

2. 連続切片法

上皮細胞の中間期の細胞核 DNA 量を一枚の組織切片上で測定するのは、核の重なりのため不可能であ

る。そこで、連続切片を作製し、それぞれの切片の上で、核断片のDNA量を測定し、連続する核断片のDNA量をあとで合計してヒストグラムを描くという方法である。これは一見良さそうな方法であるが、消化管粘膜の上皮組織は核の密集と重なりが強く、測定したい細胞を測定するのではなく、測定できる細胞のみを測定することになる。しかも、一つの切片では重なりがなくても、次の切片で重なっているといったことが常態である。また、パラフィン包埋標本では、切片を作製する過程で微細な切り屑が生じ、連続切片といえども細胞核の一部が失われる。

連続切片法の唯一にして見事な成功例は、EDTA脱灰後に樹脂包埋した内耳コルチ器の連続切片を作製し、有毛細胞とともに、ダイテルス細胞やヘンゼン細胞などの支持細胞のDNA量を測定した研究である⁴⁵⁾。樹脂包埋では、切片作製の際に切り屑が出ず、核物質の欠損・消失が生じない。この研究によって、有毛細胞のような感覚細胞は二倍体細胞だけから構成され、支持細胞では二倍体細胞のほか、少数の四倍体細胞も存在していることが判明した。ちょうど中枢神経系におけるニューロンとグリアの関係と同じである。

3. 細胞単離法

集団としての基本プロトタイプ、様々なポリプロトタイプの割合、あるいは増殖細胞の割合を知ろうとすれば、多数の細胞を測定しなければならない。多数の細胞を集めるには、組織を消化酵素で処理し、ホモジナイザーや超音波装置を使って単離細胞標本を作製するのがもっとも効率が良い。この場合、細胞どうしの空間的位置関係は不明となる。現在広く行われているマイクロダイセクションのように、可能な限り小領域ごとに分けて組織を分取するのが良策である。筆者が最終的にたどり着いたのはこの方法である⁵⁰⁾。

細胞集団を分取する際、遺伝子解析を目的とする現行のマイクロダイセクションでは、対象の細胞以外が混入しないように切り取る。しかし、顕微測光を目的とする時には、対象とする上皮細胞のみからなる集塊を切り取るのではなく、周囲の間質細胞を少し付けて切り取る必要がある。そうしなければ、2倍体の内部コントロールが取れないからである。

4. DNA染色

初期には、Feulgen染色が行われることが多かったが、Feulgen染色はDNAの塩酸加水分解に依存するためrate assay系であり、その反応時間や反応温度のわずかな差が、同じバッチのスライドであっても微妙に染色態度と蛍光強度に影響を及ぼし、スライド間の比較が困難となることがあった。他方、イオン結合で

DNA二重鎖間に架橋結合する蛍光色素 (intercalating dye) やDNA二重鎖のminor grooveに存在するATにイオン結合する蛍光色素を用いる場合、比較的短時間で染色が飽和状態に達し、染色液に長く浸漬しても過染することのないend point assay系であり、いつ測光しても結果が安定している。

End point assay系として用いられる蛍光染色には、アクリジンオレンジ (acridine orange, AO) 染色⁵³⁾⁵⁴⁾ やヨウ化プロピジウム (propidium iodide, PI) 染色¹⁹⁾²⁰⁾ が良く知られているが、ここでは、DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole)⁵⁵⁾ を用いて筆者が開発した細胞核DNA定量法について述べる²¹⁾⁵⁶⁾。現在、DAPIは定量よりも、蛍光観察する時の核染色に用いられることで良く知られている。

DAPIの最大の利点は、何と言っても、非常に低濃度であってもDNAに結合したDAPIの蛍光強度が極めて強いということである。染色液の推奨DAPI濃度は50 ng/mlである。これはPI染色液の1/1000の濃度である。PIの分子量が668.4、DAPIの分子量が277.3であるから、モル濃度に換算すると約1/420の濃度になる。いずれにしてもDAPIの染色液濃度は非常に低いにもかかわらず、強い青色蛍光を発する。ナノグラムレベルの低濃度のDAPIを用いることには、他の実用的な利点もある。DAPIもRNAに結合して黄色蛍光を発するが、このような低濃度だと、ほとんど無視できるようになるので、RNase処理が不要になる。

DAPI染色標本上で細胞核DNA蛍光測光を行う場合の最大の注意点は、対物レンズ絞りを絞ることである(図2A)。この単純操作によって、測光精度が劇的に良くなる。DAPIは紫外線励起すると、青色の蛍光を発する。いずれも短波長の光であり、散乱の強さは波長の4乗に反比例することから、散乱光がかなり多い。落射式蛍光顕微鏡では、励起光と蛍光は一つの対物レンズの中を往復する。この時、絞りを絞っておくと、往路と復路の両方にピンホールを挿入したことと同等であり、散乱光が大幅にカットされる。この操作は、著しく強い蛍光を発するDAPIだからこそ可能な技である。実際には、測光途中で絞り位置が変わらないように最小まで絞りきっておく。そうすることによってS/N比は驚異的に良くなり、しかも、DAPIの蛍光は十二分に明るい(図2B-F)。他方、緑色蛍光を発するアクリフラビン-Feulgen (acriflavine-Feulgen) や赤色蛍光を発するパラローズアニリン-Feulgenあるいはヨウ化プロピジウム (PI) 等では、対物レンズを絞ると蛍光が著しく減弱し、核の視認が困難とさえなる。DAPI染色標本で精度に関する問題を抱えてい

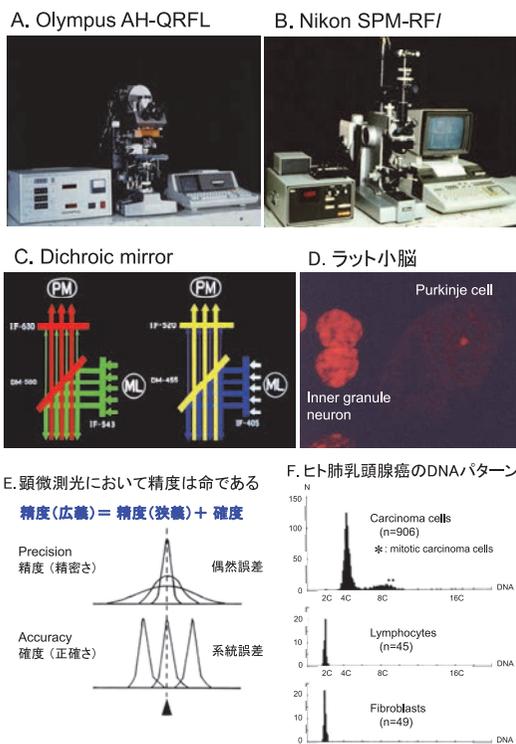


図1 落射式顕微鏡蛍光測光装置による高精度の細胞核DNA定量。旧第二病理学教室で使用されていた試作機、Olympus AH-QRFL (A) と Nikon SPM-RF1 (B)。
C. ダイクロイックミラーによって入射光と蛍光がどのように振り分けられるかを示した光路図。
D. ラット小脳の内顆粒ニューロンとプルキンエ細胞の核DNA 蛍光 (パラロズアニリン-Feulgen 染色)。内顆粒ニューロンのクロマチン密度の高い小さな核とプルキンエ細胞のクロマチン密度の低い大きな核は、いずれも2倍体相当のDNA量 (2C) を有している。ニューロンは常に2倍体である。
E. 顕微測光における精度。単に鋭いピークを示すデータでは不十分であり、クロマチン密度の異なる細胞核の間でもピークが一致するような標本作製を心掛けなければならない。
F. このような条件下で測定した、ヒト肺の乳頭腺癌のDNAパターン。4.3CにG₁ピークがあり、8.6C領域に分裂期細胞が存在する。Aneuploid癌である。クロマチン密度が異なるにもかかわらず、2倍体 (2C) コントロールとして測定したリンパ球と線維芽細胞のDNAパターンのピークは一致している。測光に適した良好な標本である。

る場合、そのほとんどは、対物レンズの絞りを絞っていないか、絞りのない対物レンズを使っているかのどちらかである。

つまり、注意点さえ守れば、例えば、トリパノソーマのような原虫のキネトプラスト (ミトコンドリアの

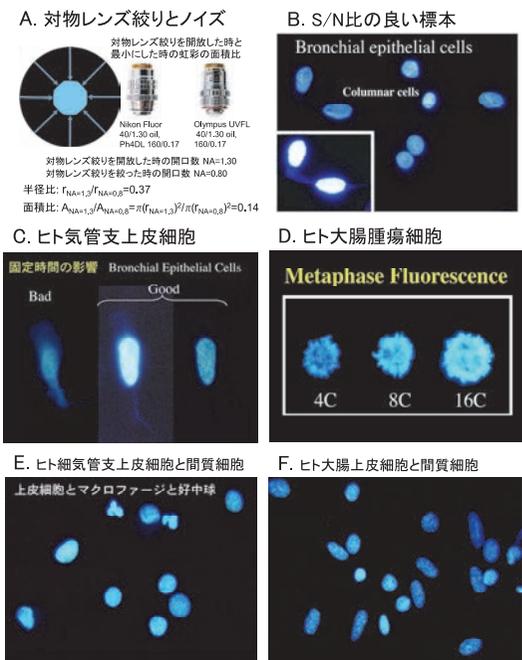


図2 DAPI 染色標本で測光を行うに際しての注意点。

- 対物レンズの絞りを絞ることで、散乱によるノイズが1/50以下に激減する。
- ヒト気管支上皮。DAPI染色標本では、核の蛍光が著しく強いので (inset)、対物レンズの絞りを細小にしても、核蛍光は十分強い。そして、うっすらと見えていた細胞質は見えなくなる。S/N比が非常に良い。
- ヒト大腸上皮細胞。ホルマリン過固定の標本の場合、核/細胞質の蛍光強度比が劣化する。ホルマリン固定が1日以内であれば、核/細胞質の蛍光強度比が極めて良好である。対物レンズの絞りを開放した状態では、細胞質は見えるものの、核蛍光が強すぎて、核内部のクロマチンパターンが読めない。絞りを細小にすると、クロマチンパターンが読め、細胞質が見えなくなる。この状態で測光すると、精度の高いデータが得られる。
- ヒト大腸腫瘍細胞。2倍体細胞、4倍体細胞、8倍体細胞の分裂中期の像である。それぞれのG₁期の2倍に相当する4C、8C、16CのDNA量を有している。
- ヒト肺細気管支上皮細胞と間質細胞の核のDAPI蛍光像。このような細胞密度で、上皮細胞と間質細胞が分散していると、測光しやすく、コントロールも取りやすい。
- ヒト大腸の上皮細胞と間質細胞の核のDAPI蛍光像。このような間隔で細胞が分散していると、精度の高いデータが得られる。

こと) DNA (図3A)⁴² や現在は真菌とされているニューモシスティスのDNA (図3B)⁵⁷ といった極微量のDNAさえも定量して、その生活環を明らかにすることも可能となる。また、キネトプラストと核が密集して存在するプラストシスティスのような原虫 (図3C)、

あるいはミトコンドリアを多量に持つ精母細胞や精子細胞 (図3D) の場合, 定量は無理としても, 定性的な観察は可能である。振り返ってみると, ヨウ化プロピジウム (PI) やパラローズアニリン-Feulgen で染色した場合, そもそもミトコンドリア DNA は見えなかったもので, 測定対象になっていなかった。

蛍光減衰とその対策

DAPIで細胞核DNAを染色する場合, 染色液にあらかじめ2-メルカプトエチルアミン (2-mercaptoethyamine hydrochloride) を10mM~100mM濃度になるように加えておくと, DNA-DAPIの蛍光が減衰しなくなる²¹⁾²⁶⁾⁵⁶⁾。この方法は, 植物葉緑素の電子伝達系を尿素化合物でブロックすると, 電子が逆流して葉緑素の蛍光が増強するという論文をたまたま図書館で読み, また, 当時の藤田教授のヒントがあって思いついた方法である。これはエレクトロドンナー法とも言える方法である。励起状態にある分子が蛍光を発生して基底状態に遷移する時, 電子を失うが, 周囲から絶えず電子を補給するような還元剤をあらかじめ加えておくと, 蛍光が減衰しなくなるという理屈である。様々な還元剤を試して, 2-メルカプトエチルアミンが扱いやすいということで, この試薬に落ち着いた。

対照 (コントロール) の選択

同一種では, 2倍体核のDNA量は, 細胞の種類にかかわらず, 等しいとするのが, DNA constancy theory である⁵⁸⁾。白血球など核クロマチン密度の高い細胞では, DNA constancy theoryは成立しないといった議論が⁵⁹⁾, 10年前後続いた⁶⁰⁾⁶¹⁾。そして, 結局, 細胞核の伸展度合いや染色濃度, Feulgen染色における加水分解時間など, 標本作製上の問題に依存して, このような問題が生じており, DNA constancy theoryは正しいという結論に落ち着いた⁶²⁾⁶³⁾。しかし, 現在でも, 標本作製を不用意に行うと, 細胞の種類の違いによって, 2倍体核DNAの吸光度や蛍光強度が異なってくる。2倍体核DNAの吸光度あるいは蛍光強度が, 細胞の種類にかかわらず等しくなる標本作製する必要があり, 測定に際しても, 常にこれが達成されているかチェックを怠ってはならない (図1F)。

適切に作製された標本上に存在する体細胞核であれば, リンパ球であれ, 好中球であれ, 線維芽細胞であれ, プルキンエ細胞であれ, 2倍体細胞核は同一の蛍光強度を示す (図1D, F)。4倍体細胞核は2倍体細胞核の倍の蛍光強度を示す。唯一の例外があるとすれば, 単数体の精子である。精子の核DNA量は2倍

体細胞の半分と考えられるが, 実際に顕微蛍光測光法で測定すると, 期待される値よりもかなり小さい。低張液や遠心塗抹で細胞核を伸展しても, また, 染色濃度を薄くしても, 測定値はやはり期待値よりも小さい⁶⁴⁾。これは, 体細胞と異なり, 精子の核ではヒストンがほとんど除去され, DNAが高度に凝縮し, ランベルト・ベールの法則から著しく外れているからだと推察している。

適切に作製された標本の場合, 同一の倍体であれば, 細胞の種類や核クロマチンの凝集状態を問わず蛍光強度が等しくなり, また, 2倍体や4倍体, 8倍体, 16倍体等の倍数性に応じた蛍光強度の線形性が達成される。細胞の種類によらず, 同一倍体であれば同一の蛍光強度を示し, 多倍体になっても蛍光強度の線形性が維持され, さらに, 細胞や組織の破砕片等のゴミが少なく, バックグラウンドの蛍光 (つまりノイズ) が無視できる程度に弱い標本が良い標本である。測定データの精度は, ひとえに標本作製にかかっている (図2E, F)⁵⁰⁾。

広義の精度には, 狭義の精度 (precision) と確度 (accuracy) が含まれる。確度を上げるためには, 複数種のコントロールを取り, それらがすべて一致する条件で測定する必要がある。これはaneuploidを判定する際には必須の前提である (図1E, F)。

顕微測光で何が分かったか

1. DNA 顕微測光で分かるパラメータ

細胞核DNA量の測定によって, 問題とする細胞が細胞周期のどのphaseにいるのか, S期細胞の比率はどの程度か, 問題とする細胞集団はaneuploidなのか否か, polyploid細胞はどの程度存在しているのか等が判明する。すなわち, 細胞周期パラメータの一部とプロイディーがわかる。

2. DNA 顕微測光で使われる用語

ここで, DNA 顕微測光で用いられる用語や単位について, 簡単に説明しておく。

通常, プロイド ploid あるいは倍体という言葉は, 生物種に特有の染色体数を念頭に置いて使用される。Ploidizationは倍体化, ploidyは倍数性を表す。染色体セットが二つある場合を2倍体といい, 2Nと表す。Nは数 number の頭文字に由来する。ヒトでは (常染色体22本×2+性染色体XXまたはXY) が2倍体 diploid である。一方, 顕微測光では, 染色体を数えるのではなく, 核のDNA量 (DNA content) を測定しているため, 2N相当の核DNA量を2Cと表す。Cは量 content の頭文字からきている。染色体数の ploidy と区別して,

しばしば DNA ploidy という言葉が使用されるが、その時は、染色体数を数えたのではなく、顕微測光（あるいはフローサイトメトリー）で細胞核 DNA 量を測定した結果であることを示している。また、時として、論文等で DNA index という言葉に出くわすことがある。これは、2 倍体相当の DNA 量 (2C) を 1 とした場合の比を表している。たとえば、4 倍体相当の DNA 量を DNA index で表すと、2 となる。DNA index は、対象とする細胞集団の G_1/G_0 期の平均 DNA 量の比を表すこともあれば、細胞集団全体の DNA 量の平均値の比を表している場合もある。

倍体/プロイド ploidy に関して、正常細胞で見られるものを正倍数体 euploid という。それには、様々な細胞で見られる 2 倍体 (diploid, 2N) の他に、精子や卵子に見られる単数体 (半数体) (haploid, 1N) や肝細胞、心筋細胞等で頻度の高い 4 倍体 (tetraploid, 4N)、8 倍体 (octaploid, 8N)、16 倍体 (hexadecaploid, 16N) などが含まれる。また、骨髄の巨核球や胎盤の栄養膜細胞では、時として、32 倍体 (dotriacontaploid, 32N)、64 倍体 (tetrahexacontaploid, 64N)、128 倍体 (octosahectaploid, 128N)、256 倍体 (hexapentacontadictaploid, 256N) の巨大な核を持った細胞が現れることがある。2 倍体よりも大きく、整数倍で増える系列を総称して多倍体 polyploid と呼ぶ。3 倍体、5 倍体、6 倍体、7 倍体、9 倍体等も多倍体であるが、哺乳類の多倍体は、通常、2 倍、4 倍、8 倍、16 倍と 2^n で増えていく。

一方、単数体 (1N) の整数倍系列から外れている場合を、異数体 aneuploid あるいは異数性 aneuploidy と呼ぶ。たとえば、ダウン症候群で見られる 21 番染色体のトリソミーを呈する細胞は aneuploid である。2 倍体よりもわずかに小さい場合を hypodiploid、わずかに大きい場合を hyperdiploid と呼ぶことがあるが、aneuploid であることに変わりはない。そして、程度の大小を問わず、癌は一般に aneuploid である。ドライバー遺伝子変異がなくとも、大きな aneuploid 化が起これば発癌につながり、これは、生殖細胞系列で起これば、生物進化における種の形成に相当する現象であるという説を唱える学者もいる⁶⁵⁾。

肝臓では、多倍体細胞の他に、二核細胞がしばしば見られる。一核の多倍体細胞を nuclear polyploidy、二核の多倍体細胞を cellular polyploidy と区別して呼ぶ研究者もいる。

3. DNA 顕微測光により判明した、正常組織や良性病変、悪性腫瘍の DNA パターン

顕微測光で細胞核 DNA 量を測定することによって、様々な臓器・組織において、生理学的変化や加齢

あるいは非腫瘍性疾患に伴う状態を知ることができ。例えば、加齢に伴う肝細胞の多倍体化⁶⁶⁾、慢性肝炎や肝硬変における肝細胞の多倍体化の亢進⁶⁷⁾、加齢に伴う心筋細胞の多倍体化⁶⁸⁾、胃⁶⁹⁾や大腸⁷⁰⁾では加齢や非腫瘍性病変あるいは良性腫瘍に多倍体化が伴わないこと、房室結節細胞は加齢にかかわらず常に 2 倍体であること⁷¹⁾、加齢⁷²⁾や傷害⁷³⁾に伴う角膜上皮細胞の多倍体化、加齢や病変に伴う甲状腺、副腎皮質、脾臓、腎臓、膀胱、食道の上皮細胞の多倍体化の有無⁷⁴⁾、加齢や病変と肺上皮細胞の多倍体化の有無⁷⁵⁾、胎盤栄養膜細胞の増殖能と多倍体化の関係⁷⁶⁾等について明らかにされた。一方で、癌は遺伝子の病気と言われているが、癌細胞の核 DNA 量分布パターンが、胃癌⁷⁷⁻⁸⁶⁾や大腸癌⁷⁰⁾⁸⁷⁾⁸⁸⁾、食道癌⁸⁹⁾、子宮頸癌⁹⁰⁾、あるいは神経芽細胞腫⁹¹⁾や脳腫瘍⁹²⁾、甲状腺⁹³⁾等で次々と明らかにされて行った。その DNA パターンは、正常組織や良性病変と著しく異なっていることが多く、通常、一目で癌と認識できるが、甲状腺のように過形成と腺腫、癌で似通ったパターンを示し悩ましい場合もある。

核 DNA パターンは、腫瘍の悪性度の指標として用いられる核グレードそのものをしばしば反映している。一例として、消化管カルチノイド腫瘍（現在、神経内分泌腫瘍 neuroendocrine tumor, NET と呼ぶ人が多い）を提示する（図 4）⁹⁴⁾。核 DNA 量の分布パターン（増殖能を示す S 期細胞の比率、高倍体細胞の出現頻度や異倍体クローンの出現等のプロイディー性状）が、NET G1, G2, G3, NEC (neuroendocrine carcinoma) に見事に対応しているのがお分かりであろう。分裂像の数や Ki-67 の陽性率に基づいた NET のグレード分類が現れる 30 年以上も前に、このような事実は、おおよそ判明していたのである。他臓器の腫瘍についても、概ね同様の傾向がかなり早くから知られていた。

遺伝子は細胞の核に存在している。したがって、遺伝子の変異を有する癌細胞の変化は、通常、まず核に現れる。癌細胞の形態学的判定基準として、核の異型や多形、大小不同、極性の乱れ、核形不整といった言葉が用いられるが、その定量表現の一つが細胞核 DNA 量パターンである。顕微測光に携わったことのある病理医は、実地の診療現場で、この知識を大いに活用している。最近、aneuploid という言葉や概念すら知らない病理医が増えていることが残念でならない。

4. DNA パターンと腫瘍内多様性、腫瘍の進展様式、予後との関連

腫瘍細胞の核 DNA パターンを調べることによって、腫瘍の悪性度のみならず、腫瘍のクローン進化や

腫瘍内多様性の進展様式が判明する(図5A-E, 図6A-C)⁵¹⁾⁵²⁾⁸¹⁻⁸⁷⁾。ひいては予後推定や再発可能性を考える上で役立つ情報が得られる(図5F, 図6D)⁸⁹⁾⁹⁵⁾。これは、筆者が顕微測光という手段を用いて癌研究を遂行して得た結論である。

最近では、様々な手法を用いて腫瘍のクローン進化や腫瘍内多様性について精緻な研究がなされ、筆者が行っていた頃と比べて格段と知見が増している⁹⁶⁻¹⁰¹⁾。しかし、顕微測光で得られた結論⁸⁷⁾¹⁰²⁾、「腫瘍はクローン進化を遂げ、原発巣でも転移巣でも多様化し、それぞれのニッチを形成する。いわゆる棲み分けである。そして進化様式は概ね中立である。中立であるからこそ、ガラパゴス化するとも言えよう。何が有利な変異かは選択圧が加わるまで分からない。環境が異なれば選択圧も変わるため、主役に躍り出るクローンも異なってくる。集団が小さい場合、ほんのわずかな違いから思わぬ方向に進み、バタフライ効果のような大きな違いをもたらすこともあるかもしれない」という基本原則はほとんど変わっていない。また、進化生物学で用いられる収斂や適応放散という用語が、近年、ためらいもなく腫瘍生物学で使われるようになってきた¹⁰³⁾¹⁰⁴⁾。まさに、腫瘍は進化のミニ実験場の様相を呈していることの反映であろう¹⁰²⁾。

顕微測光が日常診療にもたらす意義

組織のHE標本や細胞のパパニコロー染色標本を通常の光学顕微鏡で観察している場合でも、顕微測光法から得た知識は大いに役立っている。すでに述べたように、加齢や様々の非腫瘍性疾患に付随して生じる多倍体化(ポリプロイド細胞の出現)が多くの臓器で明らかにされた。各臓器・組織を構成する細胞の種類によって、また、抗癌剤投与や放射線照射等の条件が加わったか否かによって、どの程度までが非腫瘍性のプロイディー変化なのか、だいたい見当が付く。ただし、その際に基礎知識として重要なのは、19世紀末にBizzozeroにより提案された、「不安定細胞、安定細胞、永久細胞」という分類概念である。これは増殖能・再生能から見た細胞の分類であり、増殖細胞の出現頻度やポリプロイド細胞の出現率、各種病態下での増殖様態の変化と密接に関連している。顕微測光によって得た結果が正常範囲なのか、異常だが反応性変化であり腫瘍ではないのか、あるいは腫瘍なのか、腫瘍とすれば良性なのか悪性なのか、ということに関して、細胞の種類によって異なる判定基準の土台を提供しているのが、この分類概念である。

ところが、1990年代後半の神経幹細胞の発見³⁸⁾を

契機としてBizzozeroの分類は終わった概念とみなす研究者も現れはじめた¹⁰⁵⁾。また、たとえば、世界的な病理学の教科書RobbinsのPathologic Basis of Diseaseの第7版まではTissue Repairの項においてBizzozeroの分類に基づいた記載があったが¹⁰⁶⁾、2010年発行の第8版では隅に追いやられ、幹細胞とリプログラミングによる説明でほとんど置き換えられた¹⁰⁷⁾。これはあまりにも浅慮であり、残念に思っていたところ、2015年発行の第9版ではBizzozeroの分類に基づいた記載が完全復活した¹⁰⁸⁾。確かに幹細胞は存在し、その概念は有効であるが、現実のin vivoの系を考えると、細胞の種類によって再生能には厳然とした違いがある。Bizzozeroの分類概念は、今なお極めて有用であり、この世に多細胞生物が存する限り有用であり続けるのではなかろうか。

最近の話題

肝臓における二核細胞と多倍体細胞の出現機構の解明

筆者が細胞の多倍体化という現象について知ったのは、1978年、医学部4年の3学期である。第二病理学の早朝特別講義で、当時、滋賀医科大学病理学第一講座の助教授であった芦原司先生が、顕微蛍光測光法と³H-オートラジオグラフィを用いた肝細胞の多倍体化の研究について話された。この時に示された、肝細胞の多倍体化に関する模式図(図7A)を見て、心躍ったのを覚えている。

その後、筆者は藤田哲也教授の第二病理学教室に入門し、顕微測光法を用いた細胞動態研究や癌研究に携わるようになった。そこで知ったのが、DNAのクロスリンクによる多倍体化仮説であった(図7B)¹⁰⁹⁾¹¹⁰⁾。その約40年後、サーカディアンリズムを制御する時計遺伝子*Per*の一群をノックアウトすることにより、肝小葉の中心静脈近傍から中間部(またはzone 3からzone 2)において、肝細胞の多倍体化と二核細胞化が著しく増強することが判明した。2012年2月中旬のことである。これがその時に撮影した*Per1/2*ノックアウトマウスの肝臓の組織写真である(図8A)。その後、すべての*Per*遺伝子をノックアウトした*Per1/2/3*ノックアウトマウス(*Per-null*)を作製し、この現象の背後にある分子メカニズムの一端を解明することにも成功した¹¹¹⁾。*Per-null*マウスでは、逆相関関係にあるMkp1発現とErk1/2リン酸化のサーカディアンリズムが消失している。*Per*はMkp1の発現を抑制し、一方、Mkp1はErk1/2を脱リン酸化して不活化する。*Per-null*ではMkp1の抑制が取れ、常時Mkp1の発現が増強しているため、Erk1/2が不活性の状態にある。

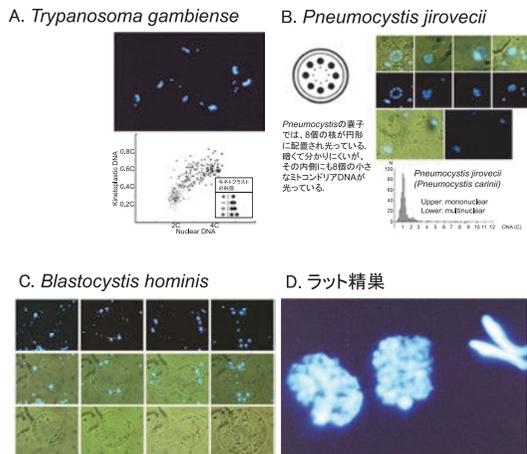


図3 DAPI染色でどこまで微量なDNAを測光できるか。
 A. トリパノソーマの核とキネトプラスト(原虫のミトコンドリア)のDNAを個別に定量した。トリパノソーマでは、核とキネトプラストの複製が同期していることが判明した⁴²⁾。
 B. 生活環の様々な位置にいるニューモシスティスのDNAの測光も可能である⁴⁷⁾。
 C. プラストシスティス・ホミニスのDAPI染色。核とキネトプラストのDNAが明瞭である。それぞれ近接し過ぎているため、測光不能であったが、生活環の推定は可能である。
 D. ラット精巣の精母細胞や精子細胞は細胞質内に大量のミトコンドリアを有している。対物レンズを絞ると、核蛍光が弱まり、点状のトコンドリアDNAが夜空の星のごとく多数見えてくる。

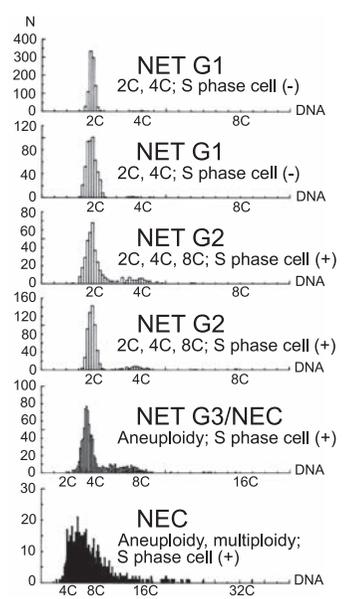


図4 ヒト消化管カルチノイド腫瘍におけるDNAパターンと現行のNET分類の対応。

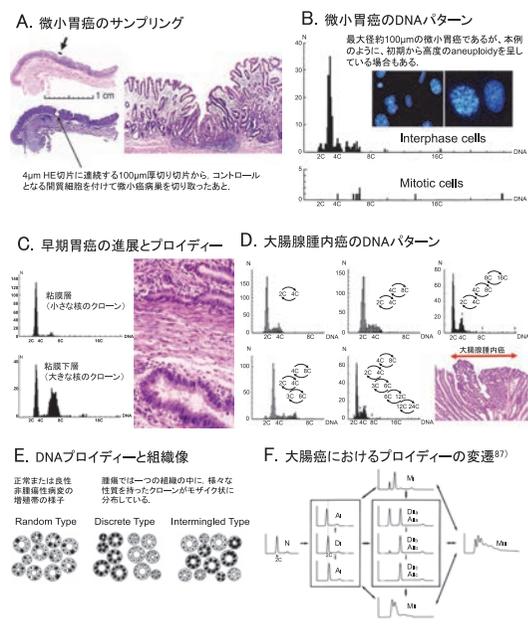
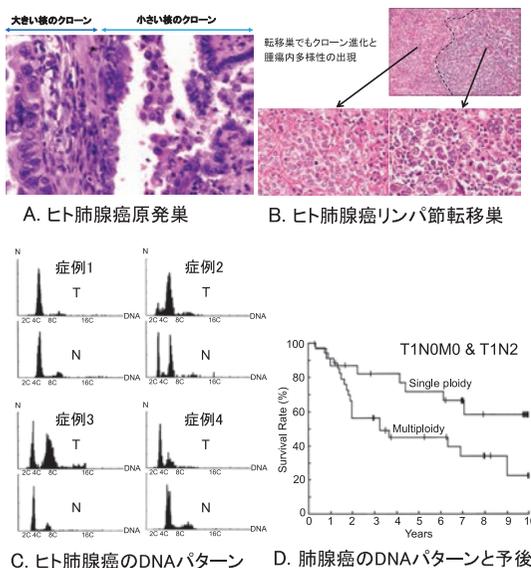


図5 ヒト消化管癌の発生と進展, クローン進化と多様性の獲得。
 A. ヒト微小胃癌の組織像(高分化管状腺癌)。切除胃の全割標本で偶然見つかった最大径約100 μ mの癌病巣。初期病変のDNAパターンを調べるため、癌病巣を切り取った。
 B. 微小胃癌であるにもかかわらず、aneuploidyと multiploidy が明らかであった。このまま胃に存在してし続けたら、進行が早いタイプの癌になったであろうと推測する。
 C. ヒト早期胃癌とそのDNAパターン。高分化管状腺癌。粘膜層の癌は3.5Cにピークを有している。粘膜下層浸潤部では、3.5Cの他に7Cにピークを有する集団が出現し、勢力を増している。
 D. 大腸腺腫内癌においても、ごく早期から aneuploidy や polyploidy が出現し、多様化が進んでいる。
 E. その目で腫瘍組織を観察すると、核の大きさの異なる様々な集団がモザイク状に接しあっているのが見えてくる。
 F. 大腸癌の顕微測光から推察した、癌の ploidy の変遷と多様化の模式図⁴⁷⁾。
 DNAパターンは原発巣と転移巣で適応放散に似た変化を遂げる。

そのため、細胞分裂時に中央体 (midbody) が形成されず、細胞質分裂障害が引き起こされる。これが二核細胞や一核多倍体細胞の形成につながっているのである。学生時代に胸をときめかせた細胞の多倍体化という現象、その仕組みの解明の一助になれたことに、たいへん因縁めいたものを感じている。
 ここに示したのは、Chao らのこの研究に基づいて、現在、筆者が推定している肝細胞多倍体化の模式図である(図8B)。核分裂した後に細胞質分裂ができずに二核細胞が生じるが、面白いことに二核細胞の生じ方



C. ヒト肺腺癌のDNAパターン D. 肺腺癌のDNAパターンと予後

図6 ヒト肺腺癌のDNAパターンと予後 (現国立がん研究センターとの共同研究)⁹⁵⁾

- A. ヒト肺腺癌の組織像 (原発巣). 肉眼的に分かる大きさに達した癌巣では、核の大きさの異なる種々の病巣が互いに接しながらモザイク状に分布している。クローン進化と多様化を示している。
- B. ヒト肺腺癌。リンパ節転移巣。リンパ節転移巣においても、クローン進化と多様化が生じている。
- C. ヒト肺腺癌のDNAパターン。原発巣 (T)、リンパ節転移巣 (N)。原発巣でも転移巣でも、癌は aneuploid であり、多くはクローン進化と多様性の獲得を反映して、DNAパターン上で複数のピークを有する。すなわち、multiploidy を示している。
- D. Multiploid の癌が予後不良であることを示している。腺癌の組織型や分化度、aneuploidy の程度、分裂像の頻度等と予後の関係についても解析したが、予後と有意に関連したのは multiploidy のみであった。つまり、DNAパターンから見て多様性の増大した腺癌の予後が有意に悪いという結果であった。

には二通りある。一つは contractile ring が形成されないため細胞質がくびれず、細胞質分裂過程に入ることなく二核細胞にとどまる場合、もう一つは contractile ring が形成され細胞質分裂過程に入り細胞質がくびれるが、2 個の娘細胞に分かれる直前に細胞質分裂が停止 (abscission failure) し、くびれが消えて元の二核細胞にとどまる場合である。そして、後者の二核細胞からのみ変則的な M 期 (図中、四角で囲み M' と付記した状態) を経て高位の一核多倍体細胞が生じる。この繰り返しであると推定することから、暫定的に交互説 (alternating theory) と呼んでいる。従来の交互説と似ているが¹¹²⁾、細胞質分裂に失敗して変則的な M 期を経た細胞のみが高位の一核多倍体細胞になるという点が

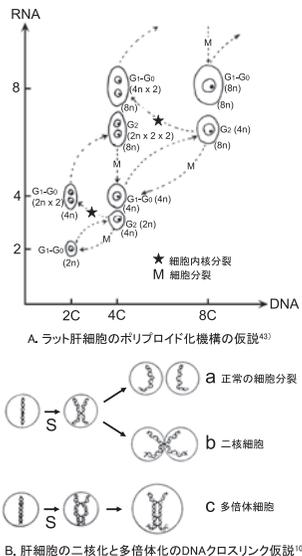


図7 肝細胞の多倍体化に関する仮説。

- A. ラット肝細胞のポリプロイド化機構の仮説⁴³⁾。
- B. 肝細胞の二核化と多倍体化の DNA クロスリンク仮説^{109) 110)}。

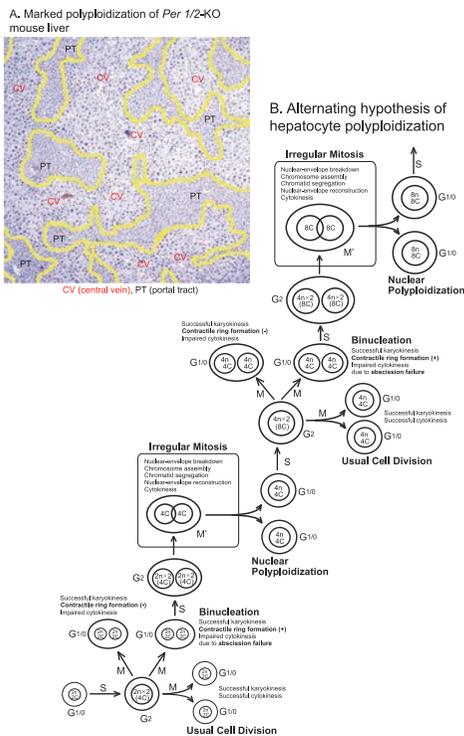


図8 *Per*-KO マウスにおける肝細胞の多倍体化。

- A. *Per1/2*-KO マウスの肝臓。肝小葉の中心静脈近傍から中間部にかけて多倍体化と二核化が著しく増強している。ヘマトキシリン染色、40x (original magnification)。
- B. 肝細胞の二核化と一核多倍体化に関する、交互仮説を下敷きにした模式図。

異なる。なお、現在、一核多倍体細胞と二核多倍体細胞は、授乳期以降には別個に生じるという二元説 (diphyletic theory) を主張する声も聞こえるが¹¹³⁾、どちらが優勢な経路なのか、また、マウス、ラット、ヒト等の種差による違いはどの程度か、今後の研究が待たれる。

診療現場で思うこと

病理医の醍醐味あるいは楽しさは、組織や細胞が読めるという形態学の知識を前提として、無意識のうちに病理医としての自分と生物学者としての自分の間を行きつ戻りつしながら顕微鏡を覗いていることである。たとえば、顕微鏡で病理組織標本や細胞診標本を見ている時、「この細胞はきっと aneuploid である。この細胞の DNA 量が知りたい。それさえ分かれば、癌細胞か癌細胞でないか判明するのに」と思うことがしばしばある。この要望そのものにかなる機器は現存しないが、方向性として一致している機器が Sysmex から発売されており (LC-1000)、今後の動向を期待している。また、順序が逆で、蛍光強度を計測した後に細胞形態を観察することになるが、single cell sorting が

可能なコンパクトな機器も、いくつかのメーカーから市販されている。今後の展開が楽しみである。

終わりに

科学は、観察、仮説と反証、事実と反復再現性、論理的整合性を土台として成り立っている。しかし、それを突き動かしているのは、紛れもなく、熱情に溢れ、限りなき情念を持った人間である。そのような世界に胸を打ち振るわせながら没入することができ、たいへん幸運であった。

旧第二病理学教室に丸9年在籍したが、世間話や噂話の類は一切なく、顔を合わせば、学問・研究の話しかした記憶がない。まるで修道院のようであった。これが、とても懐かしい思い出である。また、万卷の書に囲まれた師をいつか議論で言い負かしたいと思いつつ、日々、学問・研究に明け暮れることができたことも、楽しい思い出である。

藤田先生を始め、筆者の目を啓き、励まし、支えてくださった人々への感謝の念は、尽きることがない。

開示すべき潜在的利益相反状態はない。

文 献

- 1) Caspersson T, Farber S, Foley GE, Kudynowski J, Simonsson E, Wagh U, Zech L. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp. Cell Res* 1968; 49: 219-222.
- 2) Caspersson T. Die quantitative Bestimmung von Thyminucleinsäure mittels fuchsin-schwefeliger Säure. *Biochem. Z* 1932; 253: 97-111.
- 3) Fujita S, Yoshida S, Fukuda M. Improvement of technique to minimize non-specific absorption in microspectrophotometric measurements of nuclear DNA. *Acta Histochem. Cytochem* 1971; 4: 126-136.
- 4) Fukuda M, Fujita S. Non-specific cytoplasmic absorption (NCA) in microspectrophotometric measurement of nuclear DNA on histological sections. *J. Kyoto Pref. Univ. Med* 1971; 80: 391-398.
- 5) Leuchtenberger C, Vendrely R, Vendrely C. A comparison of the content of desoxyribonucleic acid (DNA) in isolated nuclei by cytochemical and chemical methods. *Proc. Nat. Acad. Sci* 1951; 37: 33-38.
- 6) Leuchtenberger C. Critical evaluation of Feulgen microspectrophotometry for estimating the amount of DNA in cell nuclei. *Science* 1954; 120: 1022-1023.
- 7) Leuchtenberger C. Quantitative determination of DNA in cells by Feulgen microspectrophotometry. In: Danielli JF editor. *General Cytochemical Methods*. New York: Academic Press 1958; 220-278.
- 8) Sandritter W, Jobst K, Rakow L, Bosselmann K. zur Kinetik der Feulgenreaktion bei verlängerter Hydrolysezeit. *Histochemie* 1965; 4: 420-437.
- 9) 手越敬二. 吸光顕微測光法 (二波長走査法) による in situ DNA 定量. *京府医大誌* 1980; 89: 471-490.
- 10) 藤田哲也. 顕微測光法—その理論と実践のポイント—. In: 濱島義博, 藤田哲也編. *組織細胞化学の最新技術*. 京都: 日本組織細胞化学会 1977; 27-54.
- 11) Fujita S. DNA cytofluorometry on large and small nuclei stained with pararosaniline Feulgen. *Histochemistry* 1973; 36: 193-199.
- 12) Fujita S, Fukuda M. Irradiation of specimens by excitation light before and after staining with pararosaniline Feulgen: A new method to reduce non-specific fluorescence in cytofluorometry. *Histochemistry* 1974; 40: 59-67.
- 13) Prenna G, Piva N, Zanotti L. Reazioni di Feulgen fluorescenti e loro possibilità citofluorometriche quantitative 1) Studio istochimico di alcuni reagenti tipo Schiff fluorescent nella reazione di Feulgen. *Rivista di Istochimica* 1962; 8: 427-446.
- 14) Barenboim GM, Barskii II, Brumberg EM, R. I. P. A device for the measurement of the intensity of fluorescence of microstructures of biological objects (in Russian). *Biofizika* 1962; 7: 351-356.
- 15) Ploem JS. The use of a vertical illuminator with interchangeable dichroic mirrors for fluorescent microscopy

- with incident light. *Z. Wiss. Mikr* 1967; 68: 129-142.
- 16) Ploem JS. Ein neuer Illuminator-Typ für die Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie. *Leitz-Mitt. Wiss. Tech* 1969; 4: 225-238.
- 17) Kasten FH. Schiff-type reagents in cytochemistry. I. Theoretical and practical considerations. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. Histochem* 1959; 1: 466-509.
- 18) Böhm N, Sprenger E, Sandritter W. The Feulgen reaction with acriflavine-SO₂. A comparison between absorption and fluorescence cytophotometry on the basis of hydrolysis curve. *Acta Histochem* 1970; 35: 324-329.
- 19) Crissman HA, Steinkamp JA. Rapid, simultaneous measurement of DNA, protein, and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. *J. Cell Biol* 1973; 59: 766-771.
- 20) Krishan A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J. Cell Biol* 1975; 66: 188-193.
- 21) Hamada S, Fujita S. DAPI staining improved for quantitative cytofluorometry. *Histochemistry* 1983; 79: 219-226.
- 22) Levinson JW, Retzel S, McCormick JJ. An improve acriflavine-Feulgen method. *J. Histochem. Cytochem* 1977; 25: 355-358.
- 23) Fukuda M, Nakanishi K, Sawamura I, Fujita S. Standardization of the post-irradiation method to eliminate primary fluorescence in cytofluorometry. *Histochemistry* 1977; 52: 119-127.
- 24) Fukuda M, Tsuchihashi Y, Takamatsu T, Nakanishi K, Fujita S. Fluorescence fading and stabilization in cytofluorometry. *Histochemistry* 1980; 65: 269-276.
- 25) Takamatsu T, Nakanishi K, Onouchi Z, Fukuda M, Fujita S. Nonspecific ("pseudo-plasmal") dye-binding in the Feulgen nuclear stain and its blocking by azocarmin G. *Histochemistry* 1980; 66: 169-180.
- 26) Hamada S, Fujita S. Fluorescence enhancement in DNA-DAPI complexes. *Acta Histochem. Cytochem* 1983; 16: 606-609.
- 27) 小穴 純. "顕微測光"事始めの記. *生物理化学* 1956; 3: 1-9.
- 28) 芦原 司, 藤田哲也. 定量的組織細胞化学. In: 日本組織細胞化学会編. *組織細胞化学* 1982. 東京: 学際企画, 1982; 229-247.
- 29) 中西和夫, 藤田哲也. 顕微測光法(microphotometry). In: 日本組織細胞化学会編. *組織細胞化学* 1984. 東京: 学際企画, 1984; 155-174.
- 30) 福田 優, 三好憲雄, 白根浩朗. Flow cytometry. In: 日本組織細胞化学会編. *組織細胞化学* 1984. 東京: 学際企画, 1984; 137-154.
- 31) 藤田哲也. 脳の履歴書 幹細胞と私. 東京: 岩波書店, 2002.
- 32) Fujita S. Mitotic pattern and histogenesis of the central nervous system. *Nature* 1960; 185: 702-703.
- 33) Fujita S. The matrix cell and cytogenesis in the developing central nervous system. *J. Comp. Neurol* 1963; 120: 37-42.
- 34) Bloom W, Fawcett DW. *A Textbook of Histology*, 9th Edition. Philadelphia: Saunders 1968.
- 35) Boulder Committee. Embryonic vertebrate central nervous system: Revised terminology. *Anat. Rec.* 1970; 166: 257-261.
- 36) Rakic P. Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. *Brain Research* 1971; 33: 471-476.
- 37) Rakic P. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol* 1972; 145: 61-83.
- 38) Nakamura M, Okano H, Blendy JA, Montell C, Musashi, a neural RNA-binding protein required for Drosophila adult external sensory organ development. *Neuron* 1994; 13: 67-81.
- 39) 大隅典子. カタチと機能: 神経幹細胞の形態から考察する哺乳類大脳新皮質の進化. In: 日本組織細胞化学会編. 京都: 日本組織細胞化学 2016, 2016; 145-153.
- 40) GRAY'S Anatomy. Embryology and development. Nervous system and special sense organs. In: Williams PL editor. *GRAY'S Anatomy*. London: Churchill Livingstone 1995; 228-231.
- 41) GRAY'S Anatomy. Development of the nervous system. In: Standring S editor. *GRAY'S Anatomy*. London: Churchill Livingstone, 2008; 361-394.
- 42) Hamada S, Fujita S. Problem of size dependence in fluorescence DNA cytometry. *Cytometry* 1989; 10: 394-401.
- 43) 芦原 司. 落射型顕微蛍光測光法と細胞病理学. *京府医大誌* 1984; 93: 763-780.
- 44) Hattori T, Sugihara H, Fukuda M, Hamada S, Fujita S. DNA ploidy pattern of minute carcinomas in the stomach. *Jpn. J. Cancer Res* 1985; 77: 276-281.
- 45) Yasuda N, Tachibana M, Mizukoshi O, Hamada S, Takamatsu T, Nakanishi K, Fujita S. Serial section method for cytofluorometric determinations of the DNA content of component cells of the human cochlea. *Histochemistry* 1987; 87: 115-122.
- 46) Takamatsu T, Nakanishi K, Fukuda M, Fujita S. Cytofluorometry on cells isolated from paraffin sections after blocking of the background fluorescence by azocarmin G. *Histochemistry* 1981; 71: 161-170.
- 47) 香川恵造. 顕微蛍光DNA定量法によるLiver Cell Dysplasiaおよび肝癌の解析. *京府医大誌* 1981; 90: 13-31.
- 48) 竹下秀之, 楠崎克之, 伴真二郎, 山下文治, 榎田喜三郎, 蒲池正浩, 諸富直文, 芦原 司. パラフィン包埋組織を用いた各種骨・軟骨腫瘍のDNA顕微蛍光測光法の試み. *整外基礎科学* 1984; 11: 250-255.
- 49) 諸富直文, 蒲池正浩, 香川恵造, 楠崎克之, 出口武司, 芦原 司. パラフィン組織を用いた細胞核DNA顕微蛍光測光法—新しい方法の試み. *医学のあゆみ* 1985; 133: 191-193.
- 50) 浜田新七. 細胞単離法によるDNA蛍光測光法. In: 日本組織細胞化学会編. *組織細胞化学* 1988. 東京: 学際企画, 1988; 25-37.
- 51) Sugihara H, Hattori T, Fujita S, Hirose K, Fukuda M. Regional-ploidy variation in signet ring cell carcinoma of the stomach. *Cancer* 1990; 65: 122-129.
- 52) Sugihara H, Hattori T, Fukuda M, Katsura K, Fujita S. Progression of signet ring cell carcinomas in the human stomach. *Cancer* 1993; 71: 1938-1947.

- 53) Adams LR, Kamentsky LA. Machine characterization of human leukocytes by acridine orange fluorescence. *Acta Cytol* 1971; 15: 289-291.
- 54) 蒲池正浩, 富増寛夫, 楠崎克之, 藤本高久, 藤宮龍也, 日高 硬, 竹岡 成, 芦原 司. DNA-RNA 顕微蛍光多重測光法のためのアクリジン・オレンジ染色法. *医学のあゆみ* 1983; 127: 1146-1149.
- 55) Dann O, Bergen G, Demant E, Volz G. Trypanocide Diamidine des 2-Phenyl-benzofurans, 2-Phenyl-indens and 2-Phenyl-indols. *Liebigs Ann. Chem* 1971; 749: 68-89.
- 56) 浜田新七. DAPI 蛍光測定法. *生体の科学* 1988; 39: 400-402.
- 57) Yamada M, Matsumoto Y, Hamada S, Fujita S, Yoshida Y. Demonstration and Determination of DNA in pneumocystis carinii by fluorescence microscopy with 4',6-diamidino-2-phenyl-indole (DAPI). *Zbl. Bakt. Hyg. A* 1986; 262: 240-246.
- 58) Vendrely R, Vendrely C. La teneur du noyau cellulaire en acide désoxyribonucléique à travers les orgânes, les individus et les espèces animales. *Experientia* 1948; 4: 434-436.
- 59) Hale AJ. The leucocyte as a possible exception to the theory of deoxyribonucleic acid constancy. *J. Pathol. Bacteriol* 1963; 85: 311-325.
- 60) Garcia AM. Studies on DNA in leucocytes and related cells of mammals. III. The Feulgen-DNA content of human leucocytes. *Acta Histochem* 1964; 17: 230-245.
- 61) Garcia AM. Studies on DNA in leucocytes and related cells of mammals. IV. The Feulgen-DNA content of peripheral leucocytes, megakaryocytes and other bone marrow cell types of the rabbit. *Acta Histochem* 1964; 17: 246-258.
- 62) James J. Constancy of nuclear DNA and accuracy of cytophotometric measurement. *Cytogenetics* 1965; 4: 19-27.
- 63) Garcia AM. Studies on deoxyribonucleic acid in leucocytes and related cells of mammals. VI. The Feulgen-deoxyribonucleic acid content of rabbit leucocytes after hypotonic treatment. *J. Histochem. Cytochem* 1969; 17: 47-55.
- 64) Hamada S, Yasuda N, Takamatsu T, Nakanishi K, Fujita S. A study on the DNA constancy theory by means of cytofluorometry. *Acta Histochem. Cytochem.* 1982; 15: 482.
- 65) Duesberg P, Mandrioli D, McCormack A, Nicholson JM. Is carcinogenesis a form of speciation? *Cell Cycle* 2011; 10: 2100-2114.
- 66) 北村 収, 日高 硬, 芦原 司, 竹岡 成, 香川恵造, 奥田健治, 高橋示人, 瀧野辰郎. ヒトおよびラットの肝細胞におけるプロイディの加齢による変化—Feulgen—DNA 顕微蛍光測光法による解析—. *日消誌* 1979; 76: 223-230.
- 67) 瀧野辰郎, 北村 収, 香川恵造, 奥田健治, 高橋示人, 増田正典, 芦原 司. 慢性肝炎における肝細胞のポリプロイド化—Feulgen—DNA 顕微蛍光測光法による解析—. *肝臓* 1979; 20: 377-387.
- 68) Takamatsu T, Nakanishi K, Fukuda M, Fujita S. Cytofluorometric nuclear DNA-determinations in infant, adolescent, adult and aging human hearts. *Histochemistry* 1983; 77: 485-494.
- 69) 藤田哲也. 細胞動態からみた胃癌の発生と進展. *日病理学会誌* 1981; 70: 23-54.
- 70) Hamada S, Itoh R, Fujita S. DNA distribution pattern of the so-called severe dysplasias and small carcinomas of the colon and rectum and its possible significance in the tumor progression. *Cancer* 1988; 61: 1555-1562.
- 71) Hayashi S, Takamatsu T, Fujita S. Cytofluorometric nuclear DNA determinations on the atrioventricular nodal cells in human hearts. *Histochemistry* 1986; 85: 111-115.
- 72) Ikebe H, Takamatsu T, Itoi M, Fujita S. Age-dependent changes in nuclear DNA content and cell size of presumably normal human corneal endothelium. *Exp. Eye Res* 1986; 43: 251-258.
- 73) Ikebe H, Takamatsu T, Itoi M, Fujita S. Changes in nuclear DNA content and cell size of injured human corneal endothelium. *Exp. Eye Res* 1988; 47: 205-215.
- 74) 藤本高久. 加齢及び病変に伴う人体主要臓器細胞の核 DNA 量変動の解析. *京府医大誌* 1985; 94: 403-421.
- 75) Hamada S, Namura K, Kushima R, Hattori T. DNA ploidy and proliferative activity of human pulmonary epithelium. *Virchows Arch. B [Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol]* 1990; 58: 405-410.
- 76) Wakuda K, Yoshida Y. DNA ploidy and proliferative characteristics of human trophoblasts. *Acta Obstet. Gynecol. Scand* 1992; 71: 12-16.
- 77) Hattori T, Hosokawa Y, Fukuda M, Sugihara H, Hamada S, Takamatsu T, Nakanishi K, Tsuchihashi Y, Kitamura T, Fujita S. Analysis of DNA ploidy pattern of gastric carcinomas of Japanese. *Cancer* 1984; 54: 129-148.
- 78) 蒲池正浩, 諸富直文, 藤宮龍也, 楠崎克之, 藤本高久, 香川恵造, 岡部英俊, 土橋康成, 竹岡 成, 芦原司. DNA-RNA 顕微蛍光多重測光法を用いた進行胃癌の解析. *癌と治療* 1984; 11: 340-341.
- 79) Hattori T, Hosokawa Y, Sugihara H, Fukuda M, Hamada S, Fujita S. DNA content of diffusely infiltrative carcinomas in the stomach. *Path. Res. Pract* 1985; 180: 615-618.
- 80) 苗村健治, 細井信吾, 八重樫和宏, 矢田善弘, 山形 昇, 山田浩之, 浜田新七, 藤田哲也. 胃粘膜内分化型早期癌の生長様式と DNA aneuploidy. *医学のあゆみ* 1988; 145: 525-526.
- 81) 伊藤良治. 顕微蛍光測光法を用いたヒト胃印環細胞癌の研究. *京府医大誌* 1988; 97: 641-650.
- 82) 糸井啓純, 芦原 司. 癌細胞の機能・形態の同時定量解析 蛍光画像解析を結合した顕微測光法. *医学のあゆみ* 1988; 147: 583-586.
- 83) 苗村健治. 胃粘膜内分化型腺癌の生長進展様式と DNA ploidy pattern 顕微測光法による検討. *京府医大誌* 1990; 99: 87-107.
- 84) 九嶋亮治, 浜田新七, 真崎 武, 服部隆則, 小笠原宏行, 児玉正智. 胃の表層拡大型分化型腺癌の DNA ploidy pattern と上皮成長因子の発現. *医学のあゆみ* 1989; 150: 693-694.
- 85) 桂 奏. 分化型早期胃癌における DNA プロイディの病変内多様性. *京府医大誌* 1991; 100: 1067-1078.
- 86) Katsura K, Sugihara H. Regional ploidy heterogeneity in early gastric carcinoma of differentiated type-A cytofluorometric study of ten cases-. *Cytometry Research* 1992; 2: 30-36.
- 87) 浜田新七. 顕微蛍光 DNA 測光法によるヒト大腸腫瘍の解析.

- 京府医大誌 1985; 94: 129-148.
- 88) Hamada S, Namura K, Fujita S. The possibility of nonpolyploid carcinogenesis in the large intestine as inferred from frequencies of DNA aneuploidy of polyploid and crater-shaped carcinomas. *Cancer* 1988; 62: 1503-1510.
- 89) 川口 晃, 柴田純祐, 児玉正智, 浜田新七, 服部隆則. DNA ploidy pattern と腫瘍内リンパ球浸潤度からみた食道癌の進展と予後. 日外会誌 1990; 91: 1659-1666.
- 90) Harada K, Kitamura J, Kato Y, Fukuda M, Nakanishi K, Fujita S, Okada H. Combined DNA and protein cytofluorometry of gynecological smears? Quantitative identification of tumor cells and discrimination of intraepithelial neoplasia from invasive cancer. *Acta Histochem. Cytochem* 1981; 14: 24-34.
- 91) 田中輝房. 神経芽細胞腫の核 DNA 量に関する研究 (2) ヒト神経芽細胞腫における検討. 京府医大誌 1985; 94: 1371-1379.
- 92) Hosokawa Y, Tsuchihashi Y, Okabe H, Toyama M, Namura K, Kuga M, Yonezawa T, Fujita S, Ashihara T. Pleomorphic xanthoastrocytoma. Ultrastructural, immunohistochemical, and DNA cytofluorometric study of a case. *Cancer* 1991; 68: 853-859.
- 93) 村田晋一. 甲状腺の腺腫様過形成と腫瘍の細胞学的特性: DNA 顕微蛍光測光法とイメージサイトメトリーを用いて 京府医大誌 1991; 100: 311-331.
- 94) 浜田新七, 藤田哲也. 消化管カルチノイド腫瘍の DNA パターン. 第 25 回日本組織細胞化学会抄録集 (京都) 1984; 56.
- 95) 浜田新七. 予後因子としての肺癌細胞核 DNA の分析. 肺癌 1988; 29: 448.
- 96) Williams MJ, Werner B, Barnes CP, Graham TA, Sottoriva A. Identification of neutral tumor evolution across cancer types. *Nat. Genet* 2016; 48: 238-244.
- 97) Bakhoun SF, Landau DA. Cancer Evolution: No Room for Negative Selection. *Cell* 2017; 171: 987-989.
- 98) Jamal-Hanjani M, Wilson GA, Mc Granahan N, et al. Tracking the evolution of non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med* 2017; 376: 2109-2121.
- 99) Johnson DC, Lenive O, Mitchell J, et al. Neutral tumor evolution in myeloma is associated with poor prognosis. *Blood* 2017; 48: 238-244.
- 100) Mroz EA, Tward AD, Pickering CR, Myers JN, Ferris RL, Rocco JW. High intratumor genetic heterogeneity is related to worse outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 2013; 119: 3034-3042.
- 101) Yang F, Wang Y, Li Q, Cao L, Sun Z, Jin J, Fang H, Zhu A, Li Y, Zhang W, Wang Y, Xie H, Gustafsson J-Å, Wang S, Guan X. Intratumor heterogeneity predicts metastasis of triple-negative breast cancer. *Carcinogenesis* 2017; 38: 900-909.
- 102) 浜田新七. 細胞動態と「がんもどき」. 日病理医協会報 1997; 96: 87-90.
- 103) Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N. Engl. J. Med* 2012; 366: 883-892.
- 104) Garraway LA, Lander ES. Lessons from the Cancer Genome. *Cell* 2013; 153: 17-37.
- 105) Mazzeo P, Calligaro AL, Calligaro A. Giulio Bizzozero: a pioneer of cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 2001; 2: 776-781.
- 106) Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Tissue renewal and repair: regeneration, healing, and fibrosis. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N editors. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, 7th edition. Philadelphia: Elsevier Saunders 2005; 87-118.
- 107) Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Tissue renewal, regeneration, and repair. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC editors. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, 8th edition. Philadelphia: Elsevier Saunders 2010; 79-110.
- 108) Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Inflammation and repair. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC editors. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, 9th edition. Philadelphia: Elsevier Saunders 2015; 69-111.
- 109) Nakanishi K, Fujita S. Molecular mechanism of polyploidization and binucleate formation of the hepatocyte. *Cell Struct. Funct* 1977; 2: 261-265.
- 110) 中西和夫. 2核細胞及び多倍体細胞出現のメカニズム. 京府医大誌 1978; 87: 521-536.
- 111) Chao H-W, Doi M, Fustin J-M, Chen H, Murase K, Maeda Y, Hayashi H, Tanaka R, Sugawa M, Mizukuchi N, Yamaguchi Y, Yasunaga J, Matsuoka M, Sakai M, Matsumoto M, Hamada S, Okamura H. Circadian clock regulates hepatic polyploidy by modulating Mkp1-ERK1/2 signaling pathway. *Nat. Commun* (in press).
- 112) Nadal C, Zajdela F. Polyploidie somatique dans le foie de rat. I. Le rôle des cellules binucléées dans genèse des cellules polyploïdes. *Exp. Cell Res* 1966; 42: 99-116.
- 113) Hsu S, Delgado ER, Otero PA, Teng K, Kutay H, Meehan KM, Moroney JB, Monga JK, Hand NJ, Friedman JR, Ghoshal K, Duncan AW. MicroRNA-122 regulates polyploidization in the murine liver. *Hepatology* 2016; 64: 599-615.

著者プロフィール



濱田 新七 Shinshichi Hamada

所属・職：市立大津市民病院病理診断科・部長

略歴：1980年3月 京都府立医科大学医学部 卒業
 1980年4月 京都府立医科大学大学院医学研究科入学（病理学専攻）
 1984年3月 京都府立医科大学大学院医学研究科修了
 1984年4月 京都府立医科大学第二病理学教室助手
 1989年4月 滋賀医科大学病理学第一講座助手
 1990年12月 米国 Texas 大学 MD Anderson Cancer Center 研究員
 1995年11月 京都府立医科大学第一病理学教室講師
 2003年4月 京都府立医科大学病理学教室講師
 2009年5月 大津市民病院病理科部長

専門分野：腫瘍病理学，消化管病理学

最近興味のあること：消化管上皮幹細胞の増殖動態

- 主な業績：1. Chao H-W, Doi M, Fustin J-M, Chen H, Murase K, Maeda Y, Hayashi H, Tanaka R, Sugawa M, Mizukuchi N, Yamaguchi Y, Yasunaga J, Matsuoka M, Sakai M, Matsumoto M, Hamada S, Okamura H. Circadian clock regulates hepatic polyploidy by modulating Mkp1-ERK1/2 signaling pathway. *Nat. Commun* (in press).
2. Mitsuyoshi A, Hamada S, Tachibana T, Momono T, Aoyama H, Kondo Y, Inoguchi K, Yokoyama D, Nakau M, Suzuki S, Okabe H, Yanagibashi K. Pathogenic mechanisms of intestinal pneumatosis and portal venous gas: should patients with these conditions be operated immediately? *Surgical Case Reports* 2015; 1: 104-107.
3. Takahashi Y, Sasaki H, Mogami H, Hamada S, Konishi I. Adjuvant combined paclitaxel and carboplatin chemotherapy for glassy cell carcinoma of the uterine cervix: Report of three cases with clinicopathological analysis. *J. Obstet. Gyn. Res* 2011; 37: 1860-1863.
4. Tanaka R, Tainaka M, Ota T, Mizuguchi N, Kato H, Urabe S, Chen, Y., Fustin JM, Yamaguchi Y, Doi M, Hamada S, Okamura, H. Accurate determination of S-phase fraction in proliferative cells by dual fluorescence and peroxidase immunohistochemistry with 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) and Ki67 antibodies. *J. Histochem. Cytochem* 2011; 59: 791-798.
5. Yoshikawa T, Hamada S, Otsuji E, Tsujimoto H, Hagiwara A. Endocrine differentiation of rat enterocytes in long-term three-dimensional co-culture with intestinal myofibroblasts. *In Vitro Cell. Dev. Biol-Animal* 2011; 47: 707-715.
6. Xu B, Hamada S, Kusuki I, Itoh R, Kitawaki J. Possible involvement of loss of heterozygosity in malignant transformation of ovarian endometriosis. *Gyn. Oncol* 2011; 120: 239-246.
7. Taii A, Hamada S, Kataoka K, Yasukawa S, Sonoyama T, Okanoue T, Yanagisawa A. Correlations between p53 gene mutations and histologic characteristics of pancreatic ductal carcinoma. *Pancreas*. 2009; 38: e60-67.