

移植果糖肉腫の核酸染色に対する染色性と チミデン取り込みとの関係について

千葉大学大学院医学研究科病理系病理学 (I)

主任 滝沢延次郎教授

岩 崎 勇

Isao IWASAKI

(昭和40年3月30日受付)

目	次
(I) 緒 言	(ii) 移植後のメチルグリーン・ピロニン 染色所見
(II) 実 験 材 料	(iii) ^3H -Thymidine による AR-10 フィ ルムへの銀粒子沈着の所見
(III) 実 験 方 法	(iv) フォイルゲン反応所見
(i) オートラジオグラフィーによる検索 法	(V) 総 括
(ii) メチルグリーン・ピロニン染色法	(VI) 考 按
(iii) フォイルゲン反応による検索法	(VII) 結 論
(iv) その他の染色法	(VIII) 文 献
(IV) 実 験 結 果	附 図
(i) 移植後のヘマトキシリン・エオジン 染色所見	

(I) 緒 言

細胞分裂や細胞内蛋白合成に中枢的役割を果たす核酸の存在は、1896年 Miescher⁽¹⁾により発見された。1924年 Feulgen & Rossenbeck はフォイルゲン反応により DNA が核のみに存在することを発見し、現在では DNA は細胞核にのみ存在し、染色体または染色質と密接な関係があり、且つ安定な物質で、細胞増殖に伴う分裂を前提とする場合にのみ変動があると考えられている。また多くの生物学的研究から核に含まれる遺伝物質には DNA が含まれ、細胞の遺伝情報を担っていることが、ほぼ明らかにされている⁽²⁾。1935年 Unna⁽³⁾はメチルグリーン・ピロニン混合液によりメチルグリーンは DNA を染め、ピロニンは RNA を染めることを知つたが、ピロニン陽性物質が RNA であると断定出来なかつた。1940年に Brachet⁽⁴⁾がリボヌクレアーゼを用いて RNA であることを断定した。1941年には Caspersson や Brachet が RNA は核小体と細胞質の中にあることを証明し、細胞の蛋白合成に或る役割を演じているといつたが、1951年 Gale &

Folks がリボヌクレアーゼで RNA を消化した細胞では、蛋白合成がなくなることを証明して、その説は確認された。

一方、オートラジオグラフィーを使用しての核酸の研究については、Belanger & Leblond⁽⁵⁾が1941年に ^{32}P を使用して、また1958年には Pelc⁽⁶⁾が ^{14}C -化合物を使用して行っているが、Fitzgelard et al⁽⁷⁾が1951年に、 β 線の飛程距離の短い ^3H -化合物を紹介して以来、細胞水準での研究が可能になった。

Thymidine は DNA 特有なヌクオシドで細胞の核内にのみとり込まれる。その性質を利用し、Hughes et al⁽⁸⁾が1958年に紹介した ^3H -Thymidine によるオートラジオグラフィーは、DNA 合成の研究に広く用いられている。

私は、雑系マウス背部皮下に累代移植中の滝沢系果糖肉腫を用い、 ^3H -Thymidine、メチルグリーン・ピロニン染色およびフォイルゲン反応等を用いて、移植後の肉腫組織の DNA および RNA の変動を観察し、形態学の立場より比較検討した。

(II) 実験材料

果代移植中の滝沢系果糖肉腫（使用株番号，No. 374）を移植後，10 日目に剔出し使用した。

此の果糖肉腫は，千葉大学病理学教室において雑系マウス背部皮下に果代移植中のものであり，その特性は，多くの研究により明らかにされており^{(9)~(14)}，移植率は 95%~100% である。

(III) 実験方法

10g 前後の雑系マウスを利用し，滝沢系果糖肉腫をマウス背部皮下に，小豆大の大きさのものを移植し，移植後 1 時間，2 時間，4 時間，8 時間，16 時間，24 時間，3 日，5 日，10 日，14 日の各時期に各 2 匹ずつ検査した。各群共検査 1 時間前に ³H-Thymidine を腹腔内に体重 1g 当り 5 μ C/g を注射した。

剔出した肉腫片は次の如く固定後，切片を作成し，各染色法による組織切片について検索を行つた。

(i) オートラデオグラフィーによる検索法

剔出した肉腫片の一部を冷アルコール固定後，脱水し，パラフィン包埋を行い，ミクロトームにて 6 μ のパラフィン切片を作成した。

使用した載物ガラスは，24 時間クロム硫酸で洗い，ゼラチンコーティングを施した。

ゼラチンコーティングとは，ゼラチン（Difco 社製 Bacto-Gelatin）5g，クロム明ばん（特級品）0.5g に水を加え 1 l にした液に載物ガラスを浸し，室温にて乾燥したものである。

またゼラチン液の保存は，0°C の氷室においた。ゼラチンコーティングをした載物ガラスに切片をのせ，切片に密着するように Kodak AR-10 フィルムによるストリッピング操作⁽¹⁵⁾を行ない，暗所に平均 14 日間，乾燥剤と一諸に入れた。

ストリッピング操作は，暗室内で Kodak 'Wratten' Series 1 のセーフライトで 20 W の白色電球を覆つた光源から 1 m 離れた所で行つた。14 日間，4°C の暗所に放置後，富士レンドールで 20°C，5 分間現象し，フジフイツクスで，6 分間定着し，30 分間水洗しマイヤー氏ヘマトキシリンで 5 分間染色し，30 分間水洗し色出し上昇アルコール脱水系列にて脱水後キシロールで透徹，バルサムにて封入した。

(ii) メチルグリーン・ピロニン染色

剔出した肉腫片の一部を，冷アルコールにて 10 時間固定後，室温で普通アルコール中にて 24 時間

脱水し，パラフィン包埋を行つた。薄切片は，メチルグリーン・ピロニン混合液（メチルグリーン 0.2g，ピロニン 0.2g，95% アルコール 2 cc，これを醋酸緩衝液で pH 4.2 としたもの）にて 10 分間染色し，ブタノールですばやく分別し，透徹封入した。

(iii) フォイルゲン反応による検索法

剔出した肉腫片の一部を，冷アルコールにて 10 時間固定後，室温で普通アルコール中にて 24 時間脱水し，パラフィン包埋を行つた。

薄切片を 1 N の塩酸で 60°C，10 分間加水分解し，シツフ氏液に 1 時間入れ，1 N・塩酸 10 cc と重亜硫酸ソーダ 10 cc に蒸留水を加えて 200 cc とした液にて分別し，水洗 15 分後，ライト・グリーンにて対比染色を行つた。

(iv) その他の染色法

移植肉腫組織が小さく，移植後，短期間の組織片を種々固定で観察することが，實際上困難であるため，固定はアルコールを主とした。染色は，マイヤー氏ヘマトキシリン・エオジン染色，ワンギーソン染色，PAS 染色を行ない，移植後，10 日，14 日の肉腫組織の一部は，各々ホルマリン固定とし，ビルシヨウスキー鍍銀染色を行ない好銀線維を観察した。

(IV) 実験結果

移植に使用した肉腫組織（図 1，図 2）は，移植後 10 日位になるとマウス背部皮下に示指頭大の腫瘤を形成するが，この担癌マウスを屠殺後，無菌的に腫瘤を取り出し鋏にて小切片に切り，移植針にて背部皮下に移植したもので，組織像は皮下組織，背部筋層内に浸潤せる線維肉腫で，多形性細胞肉腫の像を呈する。核は多形性にとみ一部には核分裂像もみられる。

鍍銀染色（図 3）によると，好銀線維は，細胞に密接な関係があり，細胞周囲に密に存在し，一部は細胞と直接つながっている所見もみとめられる。

(i) 移植後のヘマトキシリン・エオジン染色所見

a) 移植後 1 時間におけるヘマトキシリン・エオジン染色所見（図 4）

移植せる肉腫組織は，一塊となり皮下筋層下にみられ，周囲組織には極く軽度の浮腫をみとめる。そこには，少数の組織球，線維芽細胞をみとめられ，白血球の浸潤は殆んど認められない。

移植肉腫組織辺縁部では，核の濃染する肉腫細胞

の小集団が処々に認められる。

この時期の肉腫組織は一般に多形性がつよく、円形、楕円形、多角形等を呈し、エオジンでよく染まる原形質が、比較的よく保たれている。核は大部分濃染するが、中には、明るい円形の細胞もみられる。核小体も2~3個明瞭に認められる。

肉腫組織の個々の肉腫細胞の基質結合組織はエオジンの染色性がやや落ちている。

b) 移植後2時間におけるヘマトキシリン・エオジン所見

移植せる肉腫組織は、皮下筋層下に一塊としてみられ、周囲組織には移植後1時間よりも浮腫が強くなっており組織球、線維芽細胞も増しているが、白血球の浸潤は殆んど認められない。

肉腫組織では、肉腫細胞は、多形性がつよく、辺縁部では核小体が大い肉腫細胞が認められる。また原形質はよく保たれている。核は移植後1時間のものより濃染しているが、明るい核もみられ、2~3個の核小体が明瞭にみとめられるものもある。

また肉腫組織中には、原形質もよくたもたれ、核も著しく濃染した大型の肉腫細胞が少数ながら出現している。肉腫組織の基質結合組織は移植後1時間のものよりも粗鬆化の傾向がつよい。

c) 移植後4時間におけるヘマトキシリン・エオジン染色所見

総じて此の時期には、個々の肉腫細胞の形が不規則となり、多形性が著明となり、細胞も大小種々のものが現われる。核は一般に濃染し、多形性が強くなり、円形のもの、多角形のもの、楕円形のものが入り混っている。また核が明るく、中に2~3個の核小体の明瞭に認められるものもある。核分裂像も少数ながら認められる。移植肉腫組織は、巣状に一部壊死に陥っている部分もみられる。基質結合組織は、腫瘍塊の中心部では粗鬆化が更にすすむ。周囲組織には軽度の浮腫がみられ、そこには少数の組織球、線維芽細胞の浸潤がみられるが、白血球の浸潤は殆んどみられない。

d) 移植後8時間におけるヘマトキシリン・エオジン所見

肉腫組織は、一塊となり、皮下筋層下にみられる。周囲組織の反応は、4時間目と大差はないが、個々の肉腫細胞の形は、不規則となり、肉腫組織辺縁部では、肉腫細胞の多形性が著しく著明となり、大きい細胞が増加する。核は一般に濃染し、多形性がつよくなってくる。肉腫組織中心部では、一部巣

状に壊死に陥っている部分もみられる。核小体には、移植後4時間のものと比べて明らかな差異は認められない。

e) 移植後16時間におけるヘマトキシリン・エオジン染色所見

肉腫組織の中心部では、巣状に壊死に陥った部分が移植後8時間と比べて増大している。しかし、一般に肉腫細胞の核は濃染しており原形質もよく保たれている。

肉腫組織辺縁部では、核が著しく濃染した細胞が増加し、核分裂像も少数ながら認められる。肉腫細胞の核は大小種々で多形性がつよく、核小体も明瞭にみとめられる。

f) 移植後24時間におけるヘマトキシリン・エオジン染色所見 (図5)

移植肉腫組織の中心部の巣状の壊死巣は移植後16時間より更に増大している。壊死巣には多数の線維芽細胞の増殖があり、白血球の浸潤は殆んど認められない。しかし、肉腫組織辺縁部には、核が円形で、濃染し、原形質のよく保たれた肉腫細胞が多数認められ、核分裂も16時間に比してやや多く認められる。周囲組織との境は、核の濃染した肉腫細胞の層が出現するが、周囲組織への浸潤像はこの時期には未だ認められない。

g) 移植後3日におけるヘマトキシリン・エオジン所見 (図6)

移植肉腫組織は大部分壊死に陥り、壊死巣には多数の紡錘形の線維芽細胞の増殖をみとめる。それより内層部では、多形性の強い肉腫細胞が変性に陥った線維芽細胞に混じて存在している。肉腫組織の最外部では、ヘマトキシリンで濃く染まり、円形、楕円形、多角形の大きな核をもつた肉腫細胞が層状にみられ同部では、核分裂像も多数認められる。その一部では、皮下筋層を破り、皮下組織に浸潤増殖している。

h) 移植後5日におけるヘマトキシリン・エオジン所見

移植肉腫組織は殆んど壊死に陥り、壊死に陥った部分には、多数の線維芽細胞と、少数の白血球がみとめられる。壊死巣の周辺部には、多形性のつよい肉腫細胞層の形成がみられる。肉腫細胞の核はヘマトキシリンに濃染し、円形、楕円形、多角形のものがあ、円形のものは、核が明るく中に大きい核小体が2~3個認められる。核分裂像も著明がある。肉腫細胞は、皮下組織に浸潤増殖している。

i) 移植後 10 日におけるヘマトキシリン・エオジン染色所見 (図 7, 8)

移植肉腫組織は、大部分壊死に陥り、壊死巣周辺部より皮下組織に至るまで、肉腫細胞の浸潤増殖がみられる。肉腫細胞は多形性にとみ、円形、紡錘形、多角形のものがみられ、原形質に対し、核径の優位が著名である。核はヘマトキシリンで濃染し、核内には、大きな核小体が 2~3 個認められる。また原形質および核共に非常に大きな肉腫細胞も多数みとめられ、核分裂像も著明である。肉腫組織の基質結合織は、血管に富み、腫瘍細胞に直接接しているものは、間葉性細胞の変性が明らかであるが、直接に接していない線維芽細胞は変性像が明らかでない。肉腫細胞は、皮下組織を破壊し、増殖し、毛根部に迄浸潤が及んでいる。

j) 移植後 2 週間におけるヘマトキシリン・エオジン染色所見 (図 9, 10)

移植肉腫組織は、壊死に陥り、壊死巣周辺より皮下組織に至るまで肉腫細胞の増殖像がみられる。肉腫細胞は、核は著しく大となり、明るく、大きな核小体が 2~3 個認められる。また変性に陥つた核もみられ、核染色質の分布も著しく不規則になつている。

肉腫細胞の浸潤は、毛根部に及んでいる。

(ii) 移植後のメチルグリーン・ピロニン染色所見

a) 移植後 1 時間におけるメチルグリーン・ピロニン染色所見 (図 11)

肉腫組織の原形質はピロニン嗜好性もよく核のメチルグリーン染色性は高度で、中に 1~2 個のピロニンで濃染する核小体をもとめる。周辺部では、肉腫細胞の核のメチルグリーン染色性は高度で、核小体も大きくピロニン染色性もたかい。

b) 移植後 2 時間におけるメチルグリーン・ピロニン染色所見

肉腫細胞は、原形質のピロニン嗜好性はよく、核のメチルグリーン染色性は移植後 1 時間と比べて、やや増している。核内には 1~2 個のピロニンにて高度陽性の核小体を認めるが、移植後 1 時間と大きな差異は認めない。

c) 移植後 4 時間におけるメチルグリーン・ピロニン染色所見 (図 12)

肉腫細胞の原形質のピロニン嗜好性は移植後 1 時間、2 時間と比べてやや減弱しているが、核のメチルグリーン染色性は高度で、核内にはピロニン陽性の核小体が 2~3 個明瞭に認められる。また、この

中には、散在性に大型の肉腫細胞がみとめられ、原形質もピロニン嗜好性が強く、核のメチルグリーン染色性も、他の肉腫細胞に比較して高度である。核小体もピロニン陽性で強く染まつている。

d) 移植後 8 時間におけるメチルグリーン・ピロニン染色所見

肉腫細胞は、肉腫組織中心部では 4 時間目では原形質のピロニン嗜好性が、やや落ちてくるが、核のメチルグリーン染色性は 4 時間目よりやや増している。周辺部には、核のメチルグリーン染色性も強く、原形質のピロニン嗜好性もよく、2~3 個の核小体の明瞭に認められる大きい肉腫細胞が多数みとめられる。

e) 移植後 16 時間におけるメチルグリーン・ピロニン染色所見

肉腫細胞の原形質のピロニン嗜好性は 8 時間よりも減弱しているが、核のメチルグリーン染色性は、やや増している。移植肉腫組織辺縁部には、細胞の核のメチルグリーン染色性も強く、原形質のピロニン嗜好性のよく保たれている肉腫細胞が多数認められ、核小体も移植後 8 時間と殆んど差異はなくピロニンで高度陽性に認められる。

f) 移植後 24 時間におけるメチルグリーン・ピロニン染色所見

肉腫細胞の原形質のピロニン嗜好性は著しく低下する。核のメチルグリーン染色性は保たれている。しかし、辺縁部の肉腫細胞は核のメチルグリーン染色性が強く、ピロニンで高度に赤く染まる大きい核小体をもつている。

g) 移植後 3 日目におけるメチルグリーン・ピロニン染色所見 (図 13, 図 14)

肉腫組織中心部は大部分壊死に陥っている所見と相俟つて肉腫細胞の原形質のピロニン嗜好性は殆んど失はれ、核のメチルグリーン染色性は僅かながら認められる。

辺縁部の肉腫細胞は核は円形で大きく、メチルグリーン染色性を保ち、核小体はピロニン陽性で、周辺の肉腫細胞増殖部では、原形質のピロニン嗜好性高度で、核のメチルグリーン染色性高度である。

2~3 個のピロニン陽性の核小体も明瞭に認められる。移植後 24 時間よりも核のメチルグリーン染色性が増加している。

h) 移植後 5 日におけるメチルグリーン・ピロニン染色所見

移植肉腫組織の肉腫細胞のピロニン嗜好性は 3 日

目における所見とはほぼ同じで非常に弱くなるが、核のメチルグリーン染色性は保たれピロニン陽性の核小体もみとめられる。

周辺部における肉腫細胞は、3日目と同じ所見で、皮下組織との間には、原形質のピロニン嗜好性もつよく、核もメチルグリーン高度陽性で、2~3個の核小体も高度にピロニン陽性に染つている。

i) 移植後10日におけるメチルグリーン・ピロニン所見 (図15, 図16)

移植肉腫組織周囲の肉腫細胞増殖部に見られていたピロニン嗜好性の細胞は著しく増加し、核のメチルグリーン染色性も増し、核小体の大きさも大となり、ピロニン嗜好性も増している。核小体の数も、ふえている。核分裂を呈する肉腫細胞に於ては、メチルグリーンは高度陽性となつている。

j) 移植後14日におけるメチルグリーン・ピロニン染色所見 (図17)

肉腫細胞の変性に於てはピロニン陽性物質は、原形質内に不均等に分布し、核はやや肥大し、メチルグリーン染色性も不規則となる。

(iii) ^3H -Thymidine による AR-10 フィルムへの銀粒子沈着の所見

a) 移植後24時間までの所見

移植後24時間までは、移植肉腫組織内の肉腫細胞への ^3H -Thymidine による AR-10 Film への銀粒子の沈着の所見はみられなかつたが、毛根部の細胞への ^3H -Thymidine による AR-10 フィルムへ銀粒子の沈着は認められた。

b) 移植後3日、5日の所見 (図18)

移植後3日、5日では周囲組織に浸潤、増殖した肉腫細胞には ^3H -Thymidine による AR-10 フィルムへの銀粒子の沈着が非常に多く認められた。

c) 移植後10日の所見 (図19)

移植後10日目では肉腫細胞内に ^3H -Thymidine による AR-10 フィルムへの銀粒子の沈着は、3日目、5日程多くはなかつたが、比較的多数認められ、特に周囲組織を接する部分の肉腫細胞に著明であつた。

d) 移植後14日の所見 (図20)

移植後14日では、肉腫細胞内に ^3H -Thymidine による AR-10 フィルムへの銀粒子の沈着は、10日と比べて非常にすくなかつた。

(iv) フォイルゲン反応所見

肉腫組織移植後、1時間ではフォイルゲン反応は比較的強く、核内に顆粒状にみとめられた。2時間

から24時間に至る間のフォイルゲン反応は、やや弱くなるが、殆んど変化しなかつた。

3日、5日 (図21) では、フォイルゲン反応は、非常につよくなり肉腫細胞核内に顆粒状および網状に明瞭にみとめられた。移植後10日目 (図22) では、フォイルゲン反応は移植後5日に比べてやや弱くなり、移植後14日になると10日より更に弱くなつた。

(V) 総括

滝沢系果糖肉腫を用いての移植実験に於いて、移植後の移植腫瘍の核酸の変動を ^3H -Thymidine によるオートラジオグラフィと、メチルグリーン・ピロニン染色およびフォイルゲン反応を用いて時間的に検索した。移植に使用した肉腫組織は果代移植中の果糖肉腫で、移植後10日のものを使用した。

移植後2時間迄は、移植した元の肉腫組織と比べて、肉腫細胞の核の濃染が著明となつている。メチルグリーンによる DNA の染色性は変化ないが、原形質のピロニン嗜好性はやや落ちている。しかし核小体は大きくなり、ピロニンで高度に陽性に染つている。しかし、肉腫細胞の基質結合組織は2時間目に於いて粗鬆化の傾向が現われ始めている。

移植後8時間より24時間までは、ヘマトキシリンによる核の濃染の傾向がつよくなる。メチルグリーンによる肉腫細胞の核の DNA の染色性は、高まる傾向にあるが、原形質内のピロニン陽性物質の染色性は、やや減少の傾向がみられ、この時期には、移植肉腫組織の中心部には、巣状に壊死巣が見られはじめ、肉腫細胞の基質結合組織の粗鬆化が目立つてくる。しかし、移植肉腫組織辺縁部には、大きな肉腫細胞が多数出現しており、それらの細胞の核は濃染しメチルグリーン・ピロニン染色で高度に陽性であり、核小体も明瞭に認められる。24時間では核分像もやや目立つてきて、移植肉腫組織の辺縁部にては、肉腫細胞の増殖が、はじまつていることが、示唆されるが、この時間では周囲組織への肉腫細胞の浸潤は認められず、移植肉腫組織内への ^3H -Thymidine の取り込みも認められなかつた。

移植後、3日、5日になると、移植肉腫組織の中心部では移植肉腫組織は、巣状に壊死に陥る部が多くなつてくるが、辺縁部にみられた細胞群が層を形成している。

そこには核分裂像を示す多数の肉腫細胞が認められる。

この部の肉腫細胞は、メチルグリーン・ピロニン染色では、核のメチルグリーン染色性も増し、また原形質のピロニン嗜好性も増加し、核小体も大きく高度にピロニン陽性となり、数も増す。フォイルゲン反応も此の時期には、強くなる。また増殖した肉腫細胞内への ^3H -Thymidine の取り込みも著明である。移植後10日になると、移植肉腫細胞には多形性が著しくなり、核分裂を認める肉腫細胞も増し、2~3個の核小体が目立つてくる。

メチルグリーン・ピロニン染色では、核のメチルグリーン染色性も高度になり、特に肉腫細胞の原形質のピロニン嗜好性が高度に増しているのが特有の所見であり、核小体も、2~3個、ピロニンで高度陽性にみとめられる。フォイルゲン反応による所見は移植後3日、5日に比べてやや弱くなっている。此の時期には、 ^3H -Thymidine の取り込みは、かなりみられたが、移植後5日に比してやや減少していた。

移植後、14日になると、肉腫細胞の核は肥大し、核染色質は不均等に分布し、メチルグリーン・ピロニン染色性も不規則となり、核小体も肥大し、肉腫細胞の変性を思わせる所見である。此の時期には、 ^3H -Thymidine の取り込みは非常にすくなくなり、DNA合成のすくなくなつたことを思わせ、フォイルゲン反応による所見も移植後10日頃より減弱している。

(VI) 考 按

^3H -Thymine およびメチルグリーン・ピロニン染色により肉腫細胞のDNAの変動をみた。1896年 Miescher⁽¹⁾により核酸の存在が発見されて以来、種々の検索がなされてきたが、1955年 Chargaff, E. & Davidson, J. N. らの生物学的研究によりDNAは核のみに存在し、染色体または染色質と密接な関係があり、かつ安定な物質で、細胞増殖に伴う分裂を前提とする場合にのみ変動があるとされている。また遺伝物質にはDNAが含まれ遺伝情報を担っていることが殆んど確定的なものとなつている。

また Caspersson は顕微分光測光法⁽¹⁶⁾により、フォイルゲン反応を用いて、DNAの含量を測定した。フォイルゲン反応のDNAに対する特異性およびDNA含有測定に対するフォイルゲン顕微分光測光法の有効性については、いろいろの議論があつたが、現在では、完全に確立されたものと考えられて

いる⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾。

本実験の肉腫細胞の核のメチルグリーン染色性を見るに、移植後、特に移植肉腫組織の辺縁部における肉腫細胞では、24時間までは核のDNAは徐々に増して居ると思われる。この時期には ^3H -Thymidine の取り込みは移植肉腫組織内にはみられなかつた。

またフォイルゲン反応については、本実験では、組織片を使用したため、固定の具合、切片の厚さなどにより厳密にその量を増減を比較することは出来なかつたが、フォイルゲン反応の強さから見て、反応の強弱を比較した。一方肉腫細胞のピロニン嗜好性物質に対してはリボヌクレアーゼ処理して、ピロニン嗜好性が消失したので、RNAと断定した。現在細胞のRNAは Brchet⁽³⁾, Landstörn, Caspersson や Wohlfart らにより細胞質および核小体にあるとされて以来、Davidson や Waymouth⁽²¹⁾, Opie や Lavin⁽²²⁾により紫外線顕微鏡、リボヌクレアーゼ消化法で確認されている。

本実験においては、移植後、軽度であるが、細胞質のRNA嗜好性が減弱した。これは移植肉腫組織の栄養状態が悪くなるためと考えたい。事実、Harris, Busch, Paul, Byroet, and Karel Smetanaにより、栄養障害下における腫瘍細胞のRNAは減少する事が報告されている。

しかし、移植後3日になると、移植肉腫組織の辺縁部に増殖した肉腫細胞内には、ピロニン陽性物質があらわれ以後、急激に増してくる。核小体は、移植後、細胞質のピロニン嗜好性が減弱した場合にも、核内に大きく明瞭にみだされ、ピロニンで高度に陽性に染つている。移植後3日、5日には、ますますピロニン嗜好性を増し、移植後10日にはピロニン嗜好性の著しく高度な3~4個の大きい核小体をもつた肉腫細胞がみとめられる。

移植後14日になると、核は肥大し、核染色体の染色性の不均等な事が目立ち、メチルグリーン・ピロニン染色性も不平等になつてくるが、浜崎⁽²³⁾は細胞核病理の立場から、核の進行性変化として核小体の肥大を、退行性変化として核小体の腫大をあげており、核小体の水腫様変化は細胞の慢性栄養障害に関連するといっているが、これは、本実験における上記の所見と一致する。また Caspersson は、腫瘍中心部で変性の傾向のある腫瘍細胞は、栄養障害により大きな核小体を有するといっているが、本実験においては、むしろ、辺縁部において増殖し、分裂し

つつある細胞に、大きなピロニン嗜好性の高度な核小体を認め、移植後14日では、むしろメチルグリーン・ピロニン染色性は不平等になつていた。

即ち、本実験では、分裂を繰り返す、盛んに増殖する肉腫細胞において、核小体の大きさ増大、RNAの増加、大きな核小体の出現がみられた。

近年生化学の進歩に伴つて核内のRNAが、DNAからの伝達をうけ、細胞質の蛋白合成に関与するといわれているが、移植後原形質のRNAがやや減少する場合にも、核内には、ピロニン嗜好性を保つた核小体が目立つという事実と、移植後5日、10日になると、核小体のピロニン嗜好性が増すと同時に、原形質のピロニン嗜好性も高度になつてくるという事実は、Casperssonが一般に腫瘍細胞で、細胞質RNAが多い細胞では、核小体も大きいといつてゐることと一致する。

^3H -Thymidineは動物に投与後40分⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾以内に細胞内に入つてDNA合成に関与したり、分解したりするが、DNA合成期にある細胞に充分とりこませるために検査前1時間に ^3H -Thymidineを投与した。

本実験では、移植後24時間までは移植肉腫組織内への ^3H -Thymidineのとり込みはみられなかつた。

移植後3日、5日には、移植肉腫組織周囲に増殖した細胞層の肉腫細胞内に、 ^3H -thymidineの取り込みがみられた。これは、増殖を始めた肉腫細胞のDNA合成能力が盛んなことを示している。移植後10日になると、周囲組織と接する部の肉腫組織内の細胞にのみ、比較的多数の ^3H -Thymidineの取り込みがみられたが、移植後3日、5日の同部分とくらべてすくなかつた。

また移植後10日の肉腫組織の中心部の肉腫細胞内への ^3H -Thymidineの取り込みは、極く僅かであつた。移植後14日では、10日に比べ ^3H -Thymidineの取り込みは著しく減少していた。

(VII) 結 論

果糖肉腫移植後の肉腫細胞の核酸の変動を ^3H -Thymidineとメチルグリーン・ピロニン、およびフォイルゲン反応を用い、またヘマトキシリン・エオジン染色およびPAS染色を用いて比較し、検討した結果、次の知見を得た。

1) 移植肉腫組織は、移植後、周囲組織に浸潤し始めるのは、3日頃からであり、5日には、移植肉

腫組織周囲に、新しく増殖を始めた肉腫組織が層状となり、以後10日までには肉腫組織は分裂、増殖を繰り返す、示指頭大の腫瘤を形成する。

2) ^3H -thymidineの取り込みは本実験において、24時間までは移植肉腫組織内の肉腫細胞への取り込みはみられなかつたが、移植後3日、5日には移植肉腫組織の周囲に新たに増殖し始めた肉腫細胞に多量に ^3H -Thymidineの取り込みがみられた。移植後10日でも、肉腫細胞内に残りの取り込みはみられたが、周囲の正常組織接した部分の方が、肉腫組織中心部より多かつた。しかし、移植後10日の取り込みの方がすくなかつた。移植後14日では ^3H -Thymidineの取り込みは移植後10日に比べて減少していた。これは、移植後5日を最盛として肉腫細胞の核内のDNAの合成能力が減じてることを示している。

3) これに反し、Methylgreen-Pyronin染色では移植後、24時間迄は、Methylgreenによる核のDNA染色性は変化なかつたが、原形質のピロニン嗜好性はやや落ちる傾向がみられた。しかし移植後3日、5日では、移植肉腫組織の周囲に新たに増殖した肉腫細胞層に於いて核のメチルグリーンの染色性も増し、ピロニンの嗜好性も増していた。移植後10日には、肉腫組織全体に多形性の強い肉腫細胞がみとめられ、メチルグリーン・ピロニン染色性も増加し、特に原形質のピロニン嗜好性が著明であつた。

4) 核小体についてみると、移植後24時間までは移植肉腫組織の辺縁部にある肉腫細胞の核内に、比較的大きなピロニン嗜好性の強い核小体を明瞭にみとめたが、移植後3日、5日、10日、になるに従い大きくなつて、ピロニン嗜好性が増している。

5) 果糖肉腫のDNA合成は、移植後、3日から5日頃に最も盛んであり、以後10日、14日になるとDNA合成が減弱してくる。一方原形質のRNAは、移植後3日、5日より10日になるに従つて漸次増加する。

6) 果糖肉腫の移植最適な時期は、核のDNA合成も比較的に盛んに行はれ、且つ原形質内のRNAも多い、10日頃であると考えられる。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜つた恩師滝沢延次郎教授に深甚なる謝意を捧げます。又、常に御協力いただいた病理学教室林豊講師、肺癌研究施設小形岳三郎

博士、岡本達也博士、産婦人科教室永田一郎学士
並びに千葉大学病理学教室員各位に感謝します。

尚、本論文の要旨は、第23回癌学会総会にお
いて発表した。

(VIII) 文 献

- 1) Miescher, F.: Histochem. & Physiolog. Arbeiten volgel, Leipzig 1897.
- 2) Chargaff, E., and Davidson, J. N.: "The nucleic acid" vol I, II, Academic Press 1955.
- 3) Unna, P. G.: Mhefte. Prakt. Dermat. 35, 76~ 1902.
- 4) Brachet, J.: Symp. soc. Exp. Biol. 133, 88~ 1940.
- 5) Belanger, L. F. and Leblond, C. P.: Endocrinology; 39, 8~ 1946.
- 6) Pelc, S. R.: In general Cytochemical Methods, Ed, J. F. Danielli, Acad. Press. New York: 1, 279, 1958.
- 7) Fitzgelard, P. J., Endinoff, M. L., Knoll, J. E. and Simmel, E. B.: Science: 114, 494.
- 8) Hughes, W. L. Bond, V. P. Brechet, G. Cronkite, E. P., Painter, R. B., Ouastler, H. and Sherman, F. G.: Proc. Natl. Acad. Sc: 44, 476, 1958.
- 9) 滝沢延次郎：濃厚葡萄糖，果糖液，galactose 液の皮下注射に依る廿日鼠肉腫の生成実験，殊に線維形成肉腫の発生について，癌，34，1-5，1940.
- 10) 滝沢延次郎・杉下正孝：濃厚果糖溶液注射による廿日鼠肉腫発生実験補遺，殊に類澱粉の発生について，癌，39，53-55，1948.
- 11) 杉下正孝・篠崎忠吉：濃厚果糖溶液注射により発生せる廿日鼠移植実験，癌，39，51-53，1948.
- 12) 篠崎忠吉・滝沢延次郎：廿日鼠の果糖肉腫の白鼠における異移移植について（第II報），癌，40，156-158，1949.
- 13) 前板元昭：マウス癌及び肉腫の同時合併移植に基いた実験的悪性腫瘍の組織像の吟味，癌，41，132-134，1950.
- 14) 杉下正孝：高張果糖溶液皮下注射による廿日鼠肉腫の発生実験，千葉医会誌，28，102-107，1954.
- 15) Doniach, I. and Pelc, S. R.: Brit. J. Radiol.; 23, 184, 1954.
- 16) Caspersson, T.: "Cell Growth and Cell Function" Norton N. Y. 1950.
- 17) Pollister, A. W. and Ornstein, L.: In "Analytical Cytology" Capt. I MC grow-Hill N. Y. 1955.
- 18) Leuchtenberger, C.: In "General Cytochemical Method" vol, I, 219~ 1958.
- 19) Swift, H.: Inter. Rer. Cytol.; 20, 45~ 1953.
- 20) Sandritter, W., Cramer, H. and Monadorf, W.: Archiv. f. Gynak; 192, 873~ 1958.
- 21) Davidson, J. N., Waymouth, C.: Biochem. J.; 38, 375~ 1944.
- 22) Opie, E. L.: Lavin, Biochem. J., 39, 395~ 1944.
- 23) 浜崎幸雄：細胞核の生理と病理，214~ 1954.
- 24) Koburg, E. and Schultze, B.: Verh. Dtsch, Gest, Path, 45, 103, 1961.
- 25) Mauer, W. and Kourg, E.: Verh. Deutsch, Ges. Dath.; 45, 108, 1961.

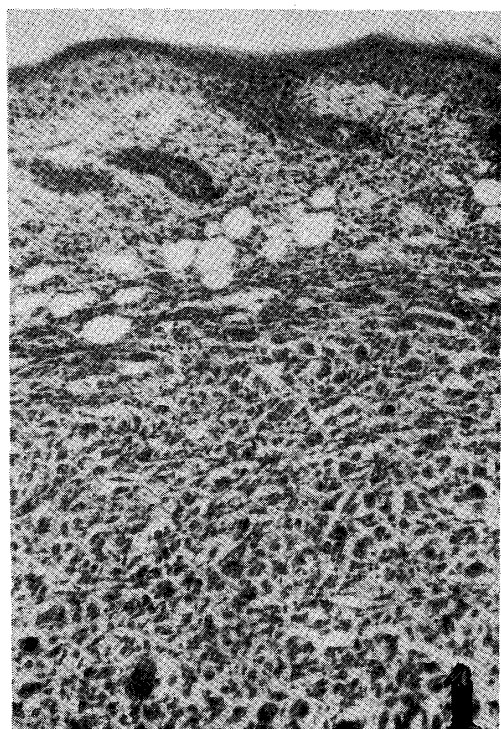


図1. 移植に使用した肉腫組織像。皮下組織にまで浸潤・増殖し，多形性細胞肉腫の像を呈する。ヘマトキシリン・エオジン染色 (×100)



図2. 肉腫細胞は多形性にとみ，核分裂像もみられる。同左拡大 (×2000)

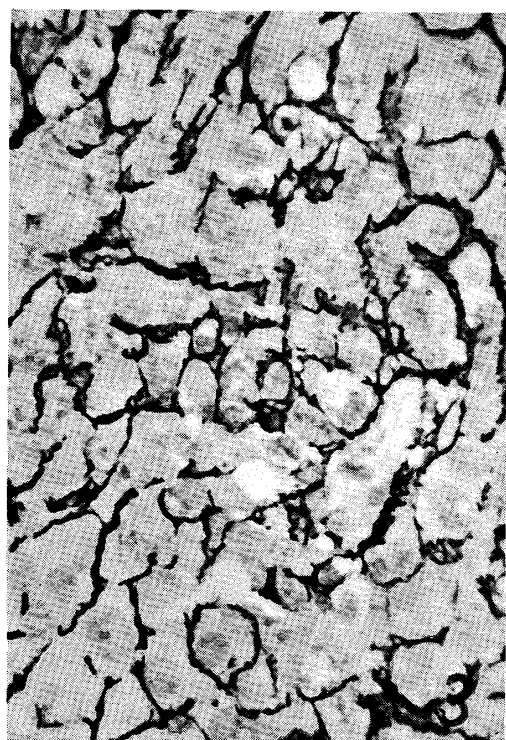


図3. 好銀線維は肉腫細胞と密接な関係がみられる。図1の 銀染色 (×400)

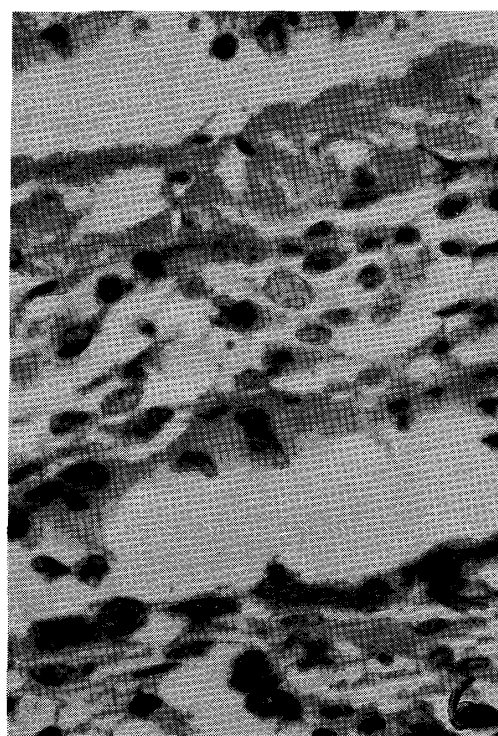


図6. 移植後3日の肉腫組織辺縁部拡大。辺縁部肉腫細胞の増殖像と皮下組織への浸潤像。ヘマトキシリン・エオジン染色 (×400)

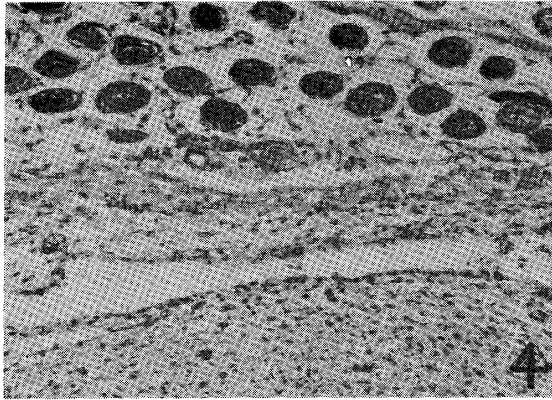


図 4. 移植後 1 時間, 肉腫組織と正常皮下組織との境界部, 肉腫組織の辺縁部に濃染する肉腫細胞の集団が散在する。ヘマトキシリン・エオジン染色 (×100)

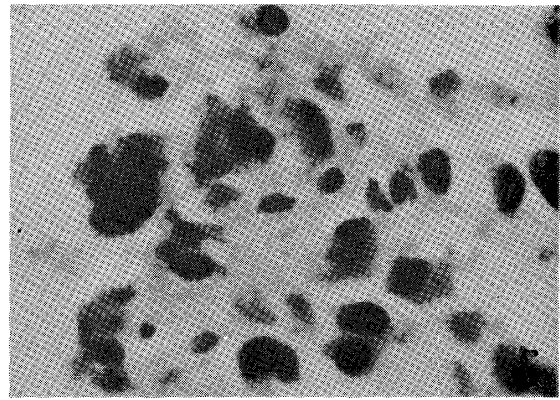


図 5. 移植後 24 時間, 肉腫組織辺縁部の拡大。核は濃染するが原形質の良く保たれた肉腫細胞がみられる。ヘマトキシリン・エオジン染色 (×400)

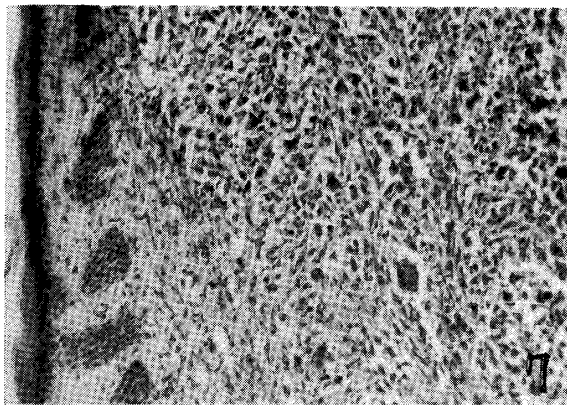


図 7. 移植後 10 日目, 肉腫組織の増殖及び浸潤は著しい。ヘマトキシリン・エオジン染色 (×100)

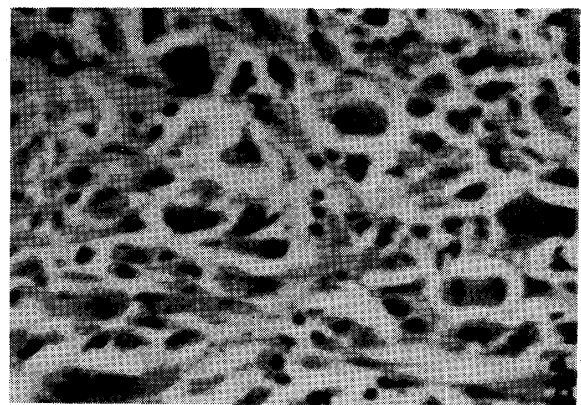


図 8. 移植後 10 日目, 肉腫組織は多形性にとみ、原形質も豊富で、エオジン嗜好性が強く、核分裂も多数認められる。同上 (×400)

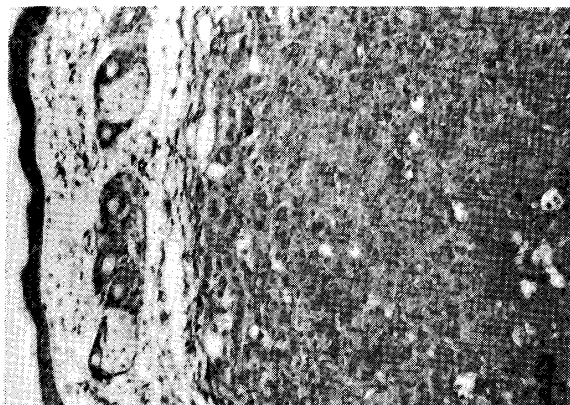


図 9. 移植後 14 日, 肉腫組織は充実に増殖している。ヘマトキシリン・エオジン染色 (×100)

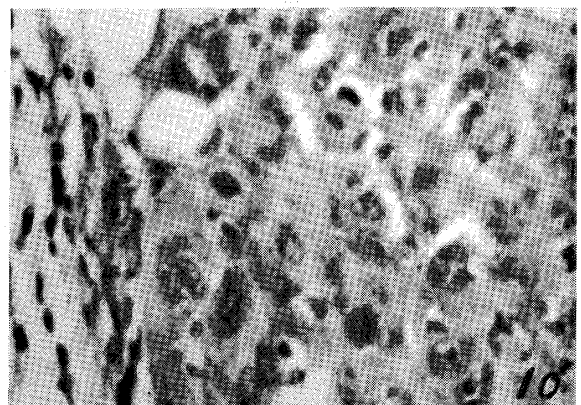


図 10. 移植後 14 日, 図 9 の拡大, 肉腫細胞は胞体に富み、核は大きく明るい。ヘマトキシリン・エオジン染色 (×400)

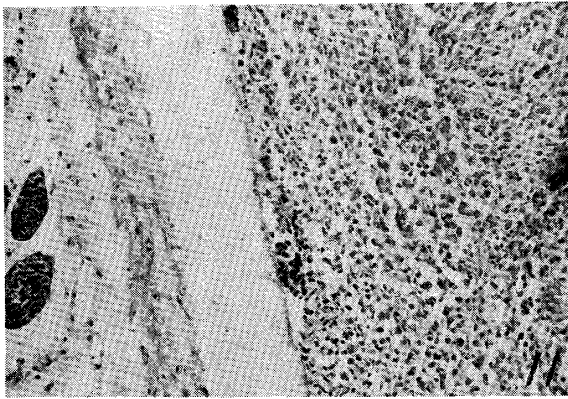


図11. 移植後1時間。肉腫組織の辺縁部には、メチル・グリーンで濃染する核を有する細胞の集団をみる。メチルグリーン・ピロニン染色 (×100)

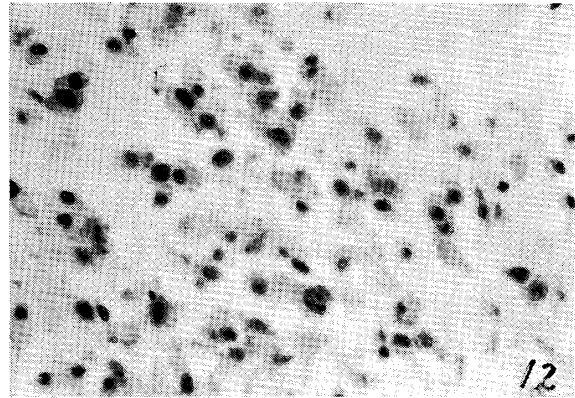


図12. 移植後4時間、肉腫細胞内の核のメチルグリーン染色性は強い。メチルグリーン・ピロニン染色 (×400)

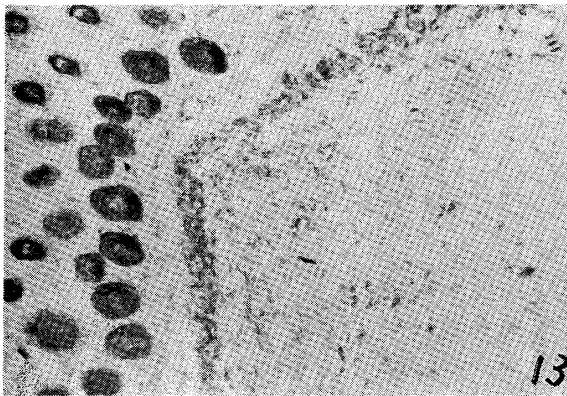


図13. 移植後3日、肉腫組織辺縁部に常状にピロニン陽性の細胞層をみる。メチルグリーン・ピロニン染色 (×100)

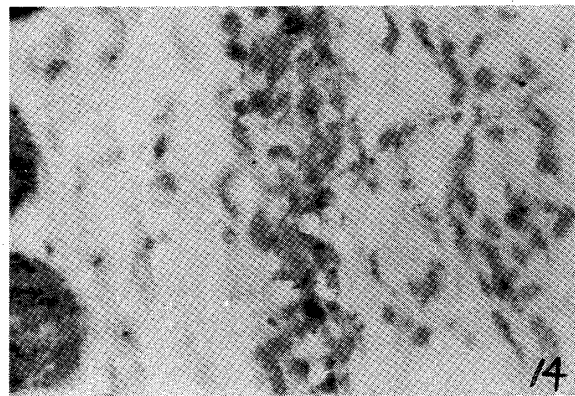


図14. 移植後3日、図13の拡大。メチルグリーン・ピロニン染色 (×400)



図15. 移植後10日。肉腫細胞の原形質のピロニン嗜好性は強く、核のメチルグリーン染色性は強い。メチルグリーン・ピロニン染色 (×400)



図16. 移植後10日。図15の拡大、核小体は大きく、ピロニン高度陽性で且つ多数認められる。メチルグリーン・ピロニン染色 (×2000)

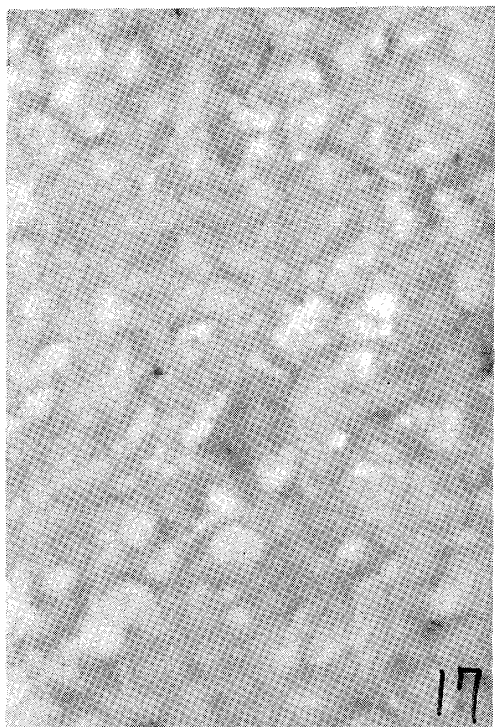


図17. 移植後14日。ピロニン陽性物質は、原形質内に不均等に分布する。メチルグリーン・ピロニン染色 (×400)

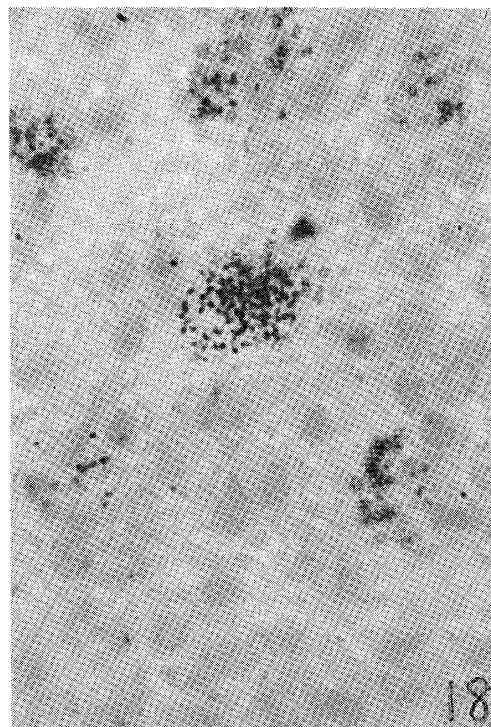


図18. 移植後5日。 ^3H -Thymidine による AR-10 フィルムの銀粒子の沈着、核に相当する部分の銀粒子沈着が多数みとめられる。 (×400)

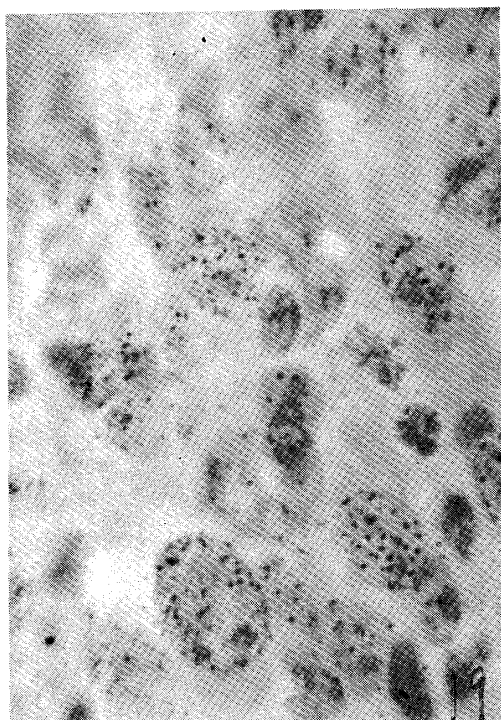


図19. 移植後10日。 ^3H -Thymidine による AR-10 フィルムへの銀粒子の沈着。核に相当する部分の銀粒子沈着の密度は減少する。
($\times 400$)

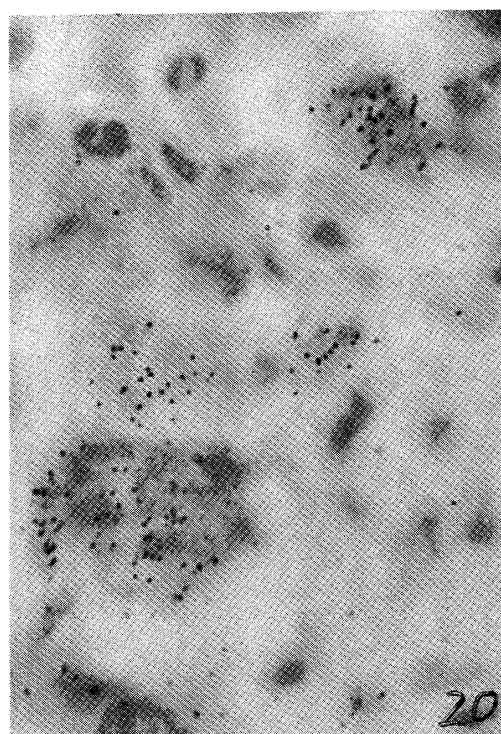


図20. 移植後14日。 ^3H -Thymidine による AR-10 フィルムへの銀粒子の沈着，核に相当する部分の銀粒子の沈着は著しく少ない。
($\times 400$)

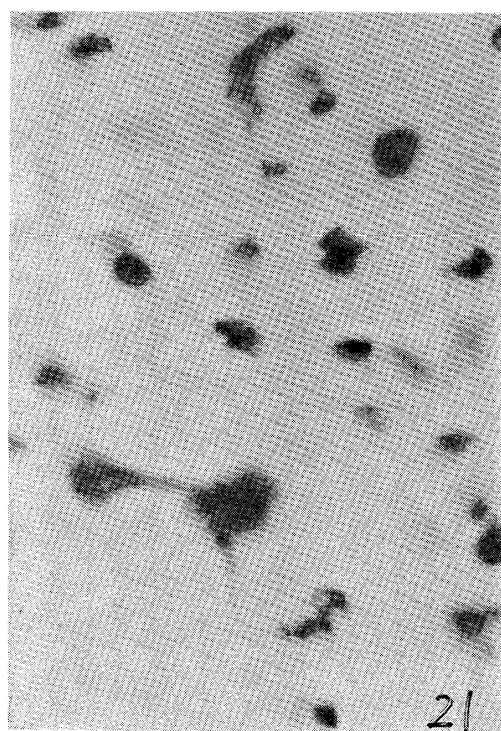


図21. 移植後5日。核のフォイルゲン反応は強い。フォイルゲン反応 ($\times 400$)

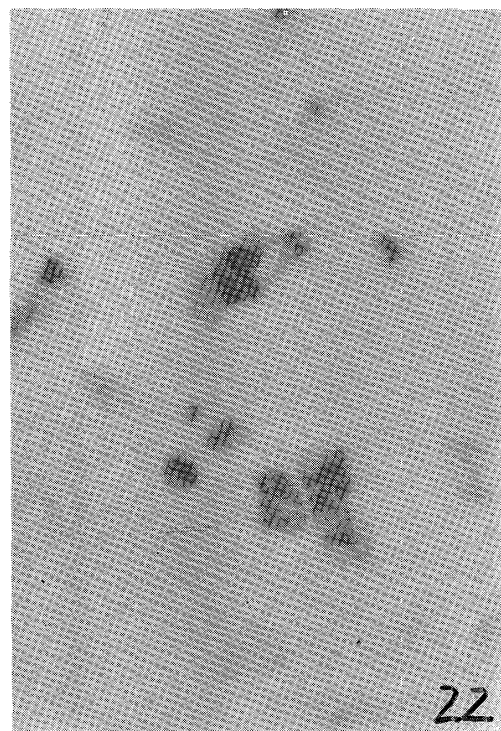


図22. 移植後10日。核フォイルゲン反応は少々減少している。フォイルゲン反応
($\times 400$)