

腫瘍細胞の変性過程の研究：
胸・腹水中のヒト腫瘍細胞の変性過程

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8780

腫瘍細胞の変性過程の研究

— 胸・腹水中のヒト腫瘍細胞の変性過程 —

金沢大学大学院医学研究科内科学第三講座 (主任: 服部絢一教授)

三 田 村 英 一

(昭和54年5月1日受付)

(本論文の要旨は昭和52年第18回日本臨床細胞学会総会および昭和54年第20回日本臨床細胞学会総会において報告した。)

細胞診では、各種臓器からの生検塗抹や内視鏡直視下擦過法等の検体採取法の進歩にともない比較的に新鮮な状態の細胞を採取、観察する機会が多くなり、腔の pool smear や喀痰などの変性した細胞を対象にした Papanicolaou¹⁾ の "criteria of malignancy" のみでは律しきれない細胞の存在が目ざされ、新鮮な細胞の所見を加味した悪性判定基準の再検討が行なわれている²⁾。

一方、主に婦人科領域では集団検診の普及により細胞診の自動化に関する研究も進められている⁴⁾⁵⁾。集団検診では検体の採取、標準作製の過程などから変性をともなった細胞を扱うことが多く細胞の変性過程の検討が必要である。また自動化細胞診では悪性の最も有力な情報を、細胞の DNA 量や核構造に求めており、変性過程での DNA 量の変化と形態学的変化との比較検討も必要である。

細胞の変性過程を形態学的に観察した報告は多いが、DNA 量の変化についての報告は比較的少ない。さらに、形態学的所見と DNA 量を比較検討した報告は Leuchtenberger⁶⁾、Alfert⁷⁾、Berenbom ら⁸⁾⁹⁾、Chang ら¹⁰⁾、Vendrely ら¹¹⁾ および吉田¹²⁾ らのものをみるにすぎない。しかも、これらはいずれも動物材料の一種類の細胞についての検討であり、ヒトの数種類の細胞について比較検討した報告はみられない。

体腔液の細胞診は現在広く行なわれ、診断、治療効果の判定などに役立っているが、胸・腹水中の細胞の変性については谷田¹³⁾の報告をみるにすぎない。

また細胞の生死の判定は、最近の臓器移植やそれともなう臓器や細胞の保存、薬剤の効果や副作用の検討、さらには免疫学的機序の解明など極めて広汎な領域で利用され、判定には色素排泄能、運動機能、代謝活性、成長能ないしは移植能などが用いられている^{14)~16)}。

細胞はその変性過程において、まず細胞分裂、高分子物質合成能、色素排泄能などの機能を失わない、次いで形態学的変化を来とし、その後 DNA 量の減少をみるとされている¹⁷⁾¹⁸⁾。

本実験では、胸・腹水中の漿膜細胞および腫瘍細胞の変性過程での機能あるいは形態の変化を知るために、細胞の生死の判定には色素排泄能および autoradiography 法による細胞分裂能と高分子物質合成能の検討を行ない、以後の変性過程では形態学的変化と DNA 量の変化を対比検討した。

実 験 材 料

本実験に使用した胸・腹水は、昭和51年5月から昭和53年5月までに金沢大学医学部附属病院に入院し、胸・腹水の細胞学的検索および病理組織学的に診断が確定し、採取前に放射線治療や抗腫瘍剤、ホルモン剤などの投与の行なわれていないことを確認できた計7症例を選び採取した。その内訳は、腺がん2例(胃原発分化型腺がんの腹水、2例)、扁平上皮がん2例(子宮原発低分化型扁平上皮がんの腹水、1例、肺原発分化型扁平上皮がんの胸水、1例)、小細胞がん1例(肺がんの胸水)、細網肉腫症1例(系統的リンパ節腫の胸水)および漿膜細胞の観察のための肝硬変症1例(腹水)である。

実 験 方 法

I. 細胞死の観察

1. 色素排泄能

採取直後の胸・腹水および試験管内で 37°C、20°C および 4°C に可及的無菌的に保存し、37°C では、1、3、6、12 時間後および 1、2、4、7、14、21、28 日後、20°C と 4°C では 12 時間後および 1、2、4、7、14、21、28 日後にその一部を試験管より取り出したもの

Studies on Degeneration Process of Human Tumor Cells. Eiichi Mitamura, Department of Internal Medicine (III) (Director: Prof. K. Hattori), School of Medicine, Kanazawa University.

を 800rpm で 5 分間遠心し、その沈渣に 0.5% erythrosin B 液を等量加えて混合し、その一部を Bürker-Türk 血球計算板の計算室に入れ約 10 秒後に 200 個の細胞について erythrosin B により赤染した細胞の百分率 (erythrosin index, 以下 E.I. とする) を求め、viability を (100-E.I.) % で表わした。

2. 細胞の分裂能と高分子物質合成能

上述の実験 I. の 1. に用いた胸・腹水のうち保存 7 日目までのそれぞれ 1 ml に、 ^3H -thymidine $3\mu\text{Ci}$ 、 ^3H -uridine $5\mu\text{Ci}$ を加えて無菌的に 37°C で 1 時間培養し、ハンクス II 液で 3 回洗浄、さらに FCS 0.5 ml で洗浄後塗沫乾燥、メタノールで 15 分間固定後乾燥、SAKURA NR-M₂ 乳剤を用いて dipping 法で autoradiography 標本を作製した。標本は乾燥剤入りの暗箱中で 4°C 、4 日間露出した後 D19 を用いて 18°C で 5 分間現像、9% 酢酸で停止、コニフィクスで 20°C 10 分間定着後流水で 30 分間水洗、乾燥後ギムザ染色を施した。各標本についてそれぞれ 1000 個の細胞を数え、銀粒子 5 個以上を陽性として百分率を求めた。

II. 細胞の変性過程

1. 形態学的変化

実験 I で用いたと同様に、採取直後および試験管に保存した胸・腹水を経時的に取り出し、800rpm で 5 分間遠心し沈渣より薄層標本を作製、位相差顕微鏡下で観察した。位相差顕微鏡は日本光学 KK 製で対物レンズは Dark Medium $\times 100$ を用い緑色フィルターを透して観察し写真撮影にはネオペン F を使用した。同時に塗沫標本を作製し、一つは 95% エタノール・エーテル等量液で湿固定後、Walter-Reed-Army Hospital 変法による Papanicolaou 染色を施すとともに、他の一つはカルノア液で湿固定後、Feulgen 反応を施し、いずれも形態学的観察を行なった。

2. DNA 量の測定

上記の形態学的観察に使用した Feulgen 反応標本について、Nikon-Vickers M-85 scanning microdensitophotometer で波長 560 nm/spot 1μ 、対物レンズ $\times 100$ により、多核白血球を除いて連続的に 200 個の細胞を測定し、縦軸に細胞数、横軸に DNA 量を任意の単位にとりヒストグラムを作製した。

実 験 成 績

I. 漿膜細胞

1. 色素排泄能による viability (Fig.1.a)

1) 採取直後の細胞

E.I. は 4.5% で viability は 95.5% であった。

2) 37°C に保存した細胞

E.I. は時間の経過とともに上昇し、viability は 1 日後 44.0%、14 日後 4.0%、21 日後 0% となった。

3) 20°C に保存した細胞

viability は 7 日後 53.5%、14 日後 11.5% と著減し、28 日後には 0% となった。

4) 4°C に保存した細胞

14 日後に 23.0% と著減、28 日後に 0% となった。

2. autoradiography 法による Labeling Index の測定 (Fig.2.a)

1) 採取直後の細胞

^3H -thymidine および ^3H -uridine の Labeling Index (以下 ^3H -TdR.L.I. および ^3H -UdR.L.I. と略す) は、それぞれ 11.5%、68.4% であった。

2) 37°C に保存した細胞

i) ^3H -TdR.L.I. : 12 時間後に 1.5% と著減、1 日後に 0% となった。

ii) ^3H -UdR.L.I. : 12 時間後に 3.7%、2 日後に 0% となった。

3) 20°C に保存した細胞

i) ^3H -TdR.L.I. : 12 時間後に 3.7% と著減、2 日後に 0% となった。

ii) ^3H -UdR.L.I. : 12 時間後に 18.4% と著減、4 日後に 0% となった。

4) 4°C に保存した細胞

i) ^3H -TdR.L.I. : 1 日後に 2.1% と著減、4 日後に 0% となった。

ii) ^3H -UdR.L.I. : 4 日後に 12.5%、7 日後に 0% となった。

3. 形態学的観察

1) 採取直後の細胞

i) 位相差顕微鏡による観察

細胞質には細顆粒状の糸状体を核周囲に認め、核は類円形、核縁は円滑で薄く、核内には 1~3 個の小形の核小体と少数の凝集塊を認めた。

ii) Papanicolaou 染色による観察

細胞質は広く層状を呈し、核縁は薄く円滑で核内は細顆粒状で類円形の核小体をみた。

iii) Feulgen 反応による観察

核形は円形ないし類円形、核縁は薄く円滑、核の網工は細網状あるいは細顆粒状で均等に分布し、核小体の部分はぬけ、その周囲に凝集塊をみた。

2) 37°C に保存した細胞

i) 位相差顕微鏡による観察

a. 1 時間後 : 細胞質では糸状体が膨化し、光輝性顆粒も出現、核は採取直後と著変をみなかった。

b. 3 時間後 : 細胞質の光輝性顆粒が増多、核径は

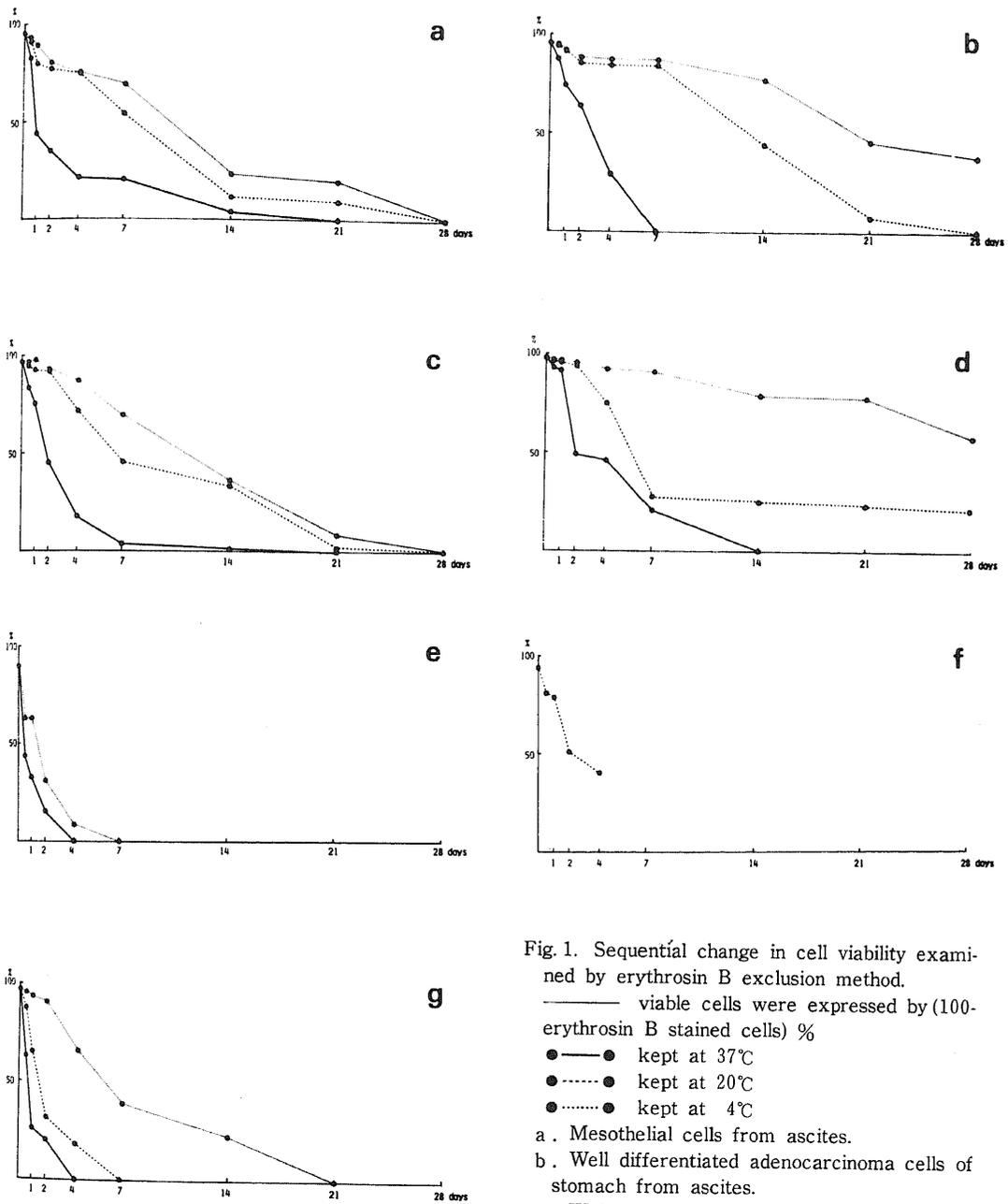


Fig. 1. Sequential change in cell viability examined by erythrosin B exclusion method.

— viable cells were expressed by (100-erythrosin B stained cells) %

●—● kept at 37°C

●- - -● kept at 20°C

●.....● kept at 4°C

- a. Mesothelial cells from ascites.
- b. Well differentiated adenocarcinoma cells of stomach from ascites.
- c. Well differentiated adenocarcinoma cells of stomach from ascites.
- d. Poorly differentiated squamous cell carcinoma cells of uterus from ascites.
- e. Well differentiated squamous cell carcinoma cells of lung from pleural fluid.
- f. Small cell carcinoma cells of lung from pleural fluid.
- g. Reticulum cell sarcoma cells of lymphnode from pleural fluid.

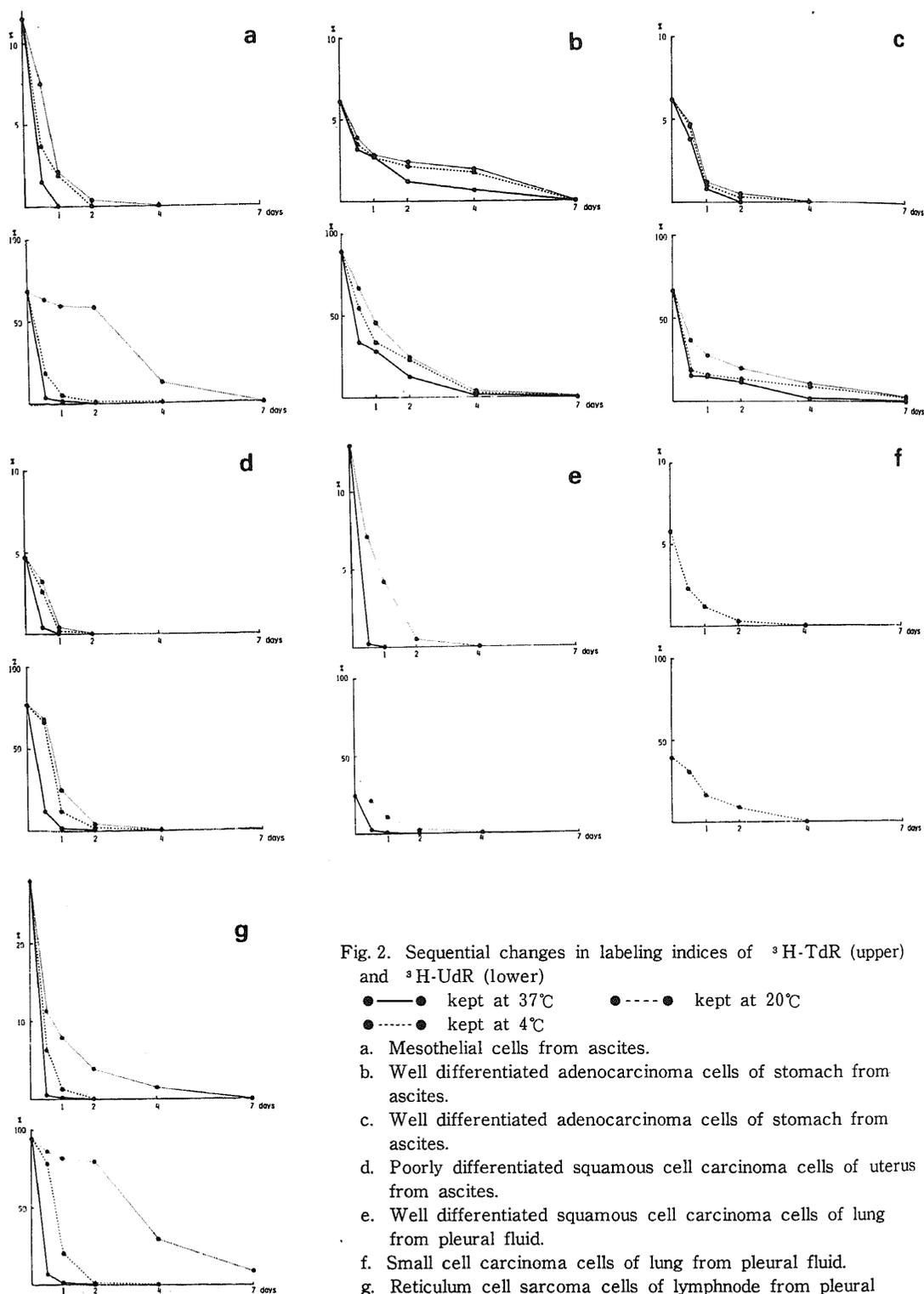


Fig. 2. Sequential changes in labeling indices of $^3\text{H-TdR}$ (upper) and $^3\text{H-UdR}$ (lower)

●—● kept at 37°C ●----● kept at 20°C

●-·-·-● kept at 4°C

a. Mesothelial cells from ascites.

b. Well differentiated adenocarcinoma cells of stomach from ascites.

c. Well differentiated adenocarcinoma cells of stomach from ascites.

d. Poorly differentiated squamous cell carcinoma cells of uterus from ascites.

e. Well differentiated squamous cell carcinoma cells of lung from pleural fluid.

f. Small cell carcinoma cells of lung from pleural fluid.

g. Reticulum cell sarcoma cells of lymphnode from pleural fluid.

やや縮小し核縁は一様に肥厚しより明瞭、核内には核小体とほぼ同じ位相差量を示す粗大な凝集塊をみた。

c. 6 時間後および 12 時間後：細胞質には空胞、プリスター様突起が出現、核径は明らかに縮小、核縁に凝集塊が付着し核内の粗大凝集塊が増多した。

d. 1 日後：細胞質には水泡状突起が出現、核径の縮小とともに細胞径も縮小、核縁は不均等肥厚、核内は核小体を除きほぼ均質化、僅かに淡い構造をみるにすぎなかった。

e. 2 日後：核径はさらに縮小、核縁の一部に断裂をみた。

f. 4 日後：核内にも空胞が出現、核小体のほかは殆んど無構造になった。

g. 7 日後：細胞質の殆んどを光輝性顆粒が占めた。

h. 14 日後：核径はさらに縮小し、核縁は不明瞭、核内は均質化し核小体も認め難くなり、核周囲の明瞭で細胞質と区別できた。

i. 21 日後および 28 日後：細胞質は不整の凝集塊よりなり、核はさらに縮小、核内は無構造あるいは判別し難くなった。

ii) Papanicolaou 染色による観察

a. 1 時間後：核縁は薄く円滑で所々に小さい凝集塊の付着をみた。

b. 3 時間後、6 時間後および 12 時間後：細胞質に空胞をみるものがあつた。核形はやや不整、核縁は不均等に肥厚、核内は細顆粒のほかにかなり大きい凝集塊をみたが、次第に粗網状に移行した。

c. 1 日後：細胞質は網状で染色性が低下した。核縁はさらに不規則になり、核径は縮小、核内は粗顆粒状と粗網状の混在した構造になった。

d. 2 日後：細胞質の空胞が増多、核縁は明瞭だが一部に断裂をみ、核内は粗顆粒状になった。

e. 4 日後および 7 日後：細胞径は縮小、細胞縁は不規則になった。核径も縮小、核縁の断裂が目立ち核内は粗顆粒状になった。濃縮核を有する細胞もみた。

f. 14 日後および 21 日後：核内は粗顆粒状あるいは濃縮状、核小体が不明瞭なものも多く、なかには淡濁状のものもあつた。

g. 28 日後：細胞質はまったく不整で、核の殆んどは不染、僅かに細胞の存在を認めうるものが多くなった。

iii) Feulgen 反応による観察

a. 1 時間後：核縁は薄く、核縁および核小体の周囲に小さい凝集塊の付着をみた。

b. 3 時間後および 6 時間後：核縁は肥厚し所々に

大きい凝集塊が付着、核内の細顆粒は増多した。

c. 12 時間後および 1 日後：核縁の不均等肥厚が目立ち一部に断裂をみた。核内構造は細網状と細顆粒状が混在し、所々にやや大きい粗顆粒をみた。

d. 2 日後：核径は縮小、核縁はさらに不規則になり、核内は粗網状で所々に大きい凝集塊が付着した。

e. 4 日後、7 日後および 14 日後：核縁は断裂が目立ち顆粒状の凝集塊が連なり数珠状にみえた。核内は網状構造が不明瞭になり粗顆粒が目立った。

f. 21 日後：核径はさらに縮小、核内は粗顆粒状のものが多かつた。核小体が不明瞭で濃縮状の核を有するものもあつた。

g. 28 日後：核縁は薄く不明瞭、核内は淡濁状あるいは濃縮状のものが多かつた。

3) 20°C に保存した細胞

i) 位相差顕微鏡による観察

a. 12 時間後：細胞質に光輝性顆粒、プリスター様突起をみた。核径は縮小、核縁は不均等に肥厚、核内には核小体のほかに大きい凝集塊をみた。

b. 1 日後および 2 日後：細胞質は核の周囲より空胞が出現、細胞縁は不整になった。

c. 4 日後：核縁は不整で一部に断裂をみた。核内は核小体を明瞭にみたがその他は均質無構造になった。

d. 7 日後：核縁は不明瞭、核縁より核内に空胞が出現した。

e. 14 日後：細胞質の変性はさらに進み、光輝性顆粒で満たされたものや、大きい凝集塊が集まったものが多かつた。

f. 21 日後および 28 日後：細胞縁は大きい凝集塊が連なり水泡状突起をみ、細胞質は不均一で小さい顆粒が充満していた。核径はさらに縮小、核内には大きい凝集塊が集まりあるいは不明瞭になるものが多かつた。

ii) Papanicolaou 染色による観察

a. 12 時間後：採取直後の細胞と著変をみなかった。

b. 1 日後：細胞質は染色性が低下、核縁は不均等に肥厚、核内に核縁と核小体縁を連ねる粗網構造およびそれに付着した細顆粒をみた。

c. 2 日後：細胞質に空胞が出現した。

d. 4 日後：核径は縮小、核縁の一部で断裂をみた。核内の網状構造は不明瞭で粗顆粒状のものが多かつた。

e. 7 日後および 14 日後：細胞質は顆粒状、核径は著明に縮小、核縁は薄く、核内は粗顆粒状のものが多かつたが濃縮状のものもみた。

f. 21 日後 : 細胞縁は不規則, 核は淡濁状のものが多く核縁, 核小体はともに不明瞭になった。

g. 28 日後 : 核は不染で判別できなかった。

iii) Feulgen 反応による観察

a. 12 時間後および 1 日後 : 核縁は凝集塊が付着して不均等に肥厚, 核小体はぬけてみえその周囲にも小さい凝集塊が付着していた。核内は細網状と細顆粒状が混在したが, 採取直後に比し顆粒の数を増した。

b. 2 日後 : 核縁はさらに不均等に肥厚し一部で断裂をみた。核内は網状で大きい凝集塊が付着していた。

c. 4 日後および 7 日後 : 核径は縮小, 核縁はさらに断裂が進み核内は粗網状になった。

d. 14 日後および 21 日後 : 核径は著明に縮小, 核縁は顆粒の連なりとして認められ, 核内は粗顆粒状のものが多かったが一部は粗網状または濃縮状になった。

e. 28 日後 : 殆どどの核が濃縮状または淡濁状で, 核縁, 核小体は不明瞭になった。

4) 4°C に保存した細胞

i) 位相差顕微鏡による観察

a. 12 時間後 : 細胞質に核周囲の糸粒体の膨化およびプリスター様突起が出現した。

b. 1 日後 : 細胞質に光輝性顆粒が出現, 核縁は薄いが所々に凝集塊が付着, 核内にかなり大きい凝集塊を数個みた。

c. 2 日後 : 細胞質に空胞が出現, 核縁は不均等に肥厚, 核内の粗大な凝集塊は増多した。

d. 4 日後 : 核径は縮小, 核縁はさらに不規則に, 核内の粗大な凝集塊は減少, 幾らか均質化をみた。

e. 7 日後および 14 日後 : 細胞質に大小の顆粒が出現, 核縁はやや薄く一部で断裂をみた。核内は核小体のはかには均質無構造になった。

f. 21 日後および 28 日後 : 細胞質の変性が進み辺縁は不整になった。核径はさらに縮小, 核内にも空胞が出現, 核小体も不明瞭になった。

ii) Papanicolaou 染色による観察

a. 12 時間後 : 核縁は円滑で, 所々に小さい凝集塊が付着, 核内は細網と細顆粒状構造が混在した。

b. 1 日後 : 核縁は厚く明瞭になった。

c. 2 日後 : 細胞質は網状になり染色性が低下するものもあった。核縁は不均等に肥厚, 核縁と核小体縁を連ねる粗網構造およびそれに付着した大きい凝集塊をみた。

d. 4 日後 : 細胞質に空胞が増多した。

e. 7 日後 : 核縁は不規則で一部に断裂をみた。核内は粗網状および粗顆粒状であった。

f. 14 日後 : 細胞径, 核径ともに縮小した。核縁は断

裂し凝集塊の連なりとして認められ, 核内は粗顆粒状になった。

g. 21 日後 : 濃縮核をみるようになった。

h. 28 日後 : 細胞辺縁が不明瞭のものもあった。細胞質はなお層状の構造を保つものが多かった。核は粗顆粒状または濃縮状, 淡濁状で核小体は不明瞭になった。

iii) Feulgen 反応による観察

a. 12 時間後 : 核縁の一部に小さい凝集塊の付着をみた。

b. 1 日後 : 核縁は凝集塊の付着によりやや不均等に肥厚した。

c. 2 日後 : 核内は細網状構造にそってかなり大きい凝集塊の付着をみた。

d. 4 日後 : 核径は縮小, 核縁の不均等肥厚が一層顕著になった。核縁と核小体縁を連ねる粗網状構造およびこれに付着する凝集塊をみた。

e. 7 日後および 14 日後 : 核縁の一部に断裂をみた。核内は粗網状とともに粗顆粒状のものもみた。

f. 21 日後 : 核径の著明な縮小, 核内は粗顆粒状になった。

g. 28 日後 : 核は粗顆粒状のものが多かったが濃縮状あるいは淡濁状のものもあり, 核小体は不明瞭になった。

4. DNA 量の変化 (Fig.3)

1) 採取直後の細胞

2C に相当する一峰性のピークを認め, 変性で DNA 量が著減した細胞はなかった。

2) 37°C に保存した細胞

a. 1 時間後, 3 時間後, 6 時間後および 12 時間後 : 採取直後と著変はなかった。

b. 1 日後 : 2C に一峰性のピークをみたが, DNA 量が減少した細胞もみた。

c. 2 日後および 4 日後 : 2C に相当するピークをみたが, ヒストグラムは左方へ移動した。

d. 7 日後 : DNA 量が著減した細胞が多く 2C 相当のピークを認め難くなった。

e. 14 日後, 21 日後および 28 日後 : 2C 相当のピークはなく, DNA 量は著明に減少した。

3) 20°C に保存した細胞

a. 12 時間後および 1 日後 : 採取直後のヒストグラムと著変をみなかった。

b. 2 日後 : 2C 相当のピークを認めヒストグラムの左方移動もなかったが, DNA 量が減少した細胞をみた。

c. 4 日後, 7 日後および 14 日後 : 2C 相当のピー

クを認めたが、ヒストグラムは左方へ移動した。

d. 21日後および28日後：DNA量はさらに減少し、ピークを認め難くなった。

4) 4°Cに保存した細胞

a. 12時間後、1日後、2日後および4日後：採取直後のヒストグラムと著変をみなかった。

b. 7日後：2C相当のピークを認めヒストグラムの左方移動もないが、DNA量が僅かに減少した細胞をみた。

c. 14日後および21日後：2C相当のピークを認めたがヒストグラムは左方へ移動した。

d. 28日後：DNA量はさらに減少しヒストグラムでピークを認め難くなった。

II. 2例の腹水中の胃原発分化型腺がん細胞

検討した腺がん2症例の所見は基本的に類似していたので、特にことわらない限り、共通した成績を記載した。

1. 色素排泄能による viability (Fig.1.b,c)

1) 採取直後の細胞

E.I.は検討した2例でそれぞれ4.0%および3.5%で、viabilityはそれぞれ96.0%、96.5%であった。

2) 37°Cに保存した細胞

viabilityは徐々に減少し、1例では2日後に64.0%、4日後に29.0%、7日後に0%になった。他の1例では1日後に75.0%、2日後に45.0%、21日後に0%になった。

3) 20°Cに保存した細胞

1例では7日後に84.0%、14日後に44.5%、28

日後に0%になった。他の1例では4日後に71.0%、7日後に45.0%、28日後に0%になった。

4) 4°Cに保存した細胞

1例では14日後に77.5%、21日後に46.0%、28日後でも38.5%であった。他の1例では7日後に69.0%、14日後に36.0%、28日後に0%になった。

2. autoradiography 法による Labeling Index の測定 (Fig.2.b,c)

1) 採取直後の細胞

³H-TdR.L.I., ³H-UdR.L.I.は1例ではそれぞれ6.1%、89.3%、他の1例ではそれぞれ6.2%、66.6%であった。

2) 37°Cに保存した細胞

i) ³H-TdR.L.I.：1例では12時間後に3.2%、4日後に0.7%に減少、7日後に0%になった。他の1例では12時間後に3.8%、1日後に0.8%、2日後に0%になった。

ii) ³H-UdR.L.I.：1例では12時間後に33.8%、4日後に1.1%に著減、7日後に0%になった。他の1例では2日後に11.3%、4日後に1.3%と減少、7日後に0%になった。

3) 20°Cに保存した細胞

i) ³H-TdR.L.I.：1例では12時間後に3.5%、4日後に1.8%に減少、7日後に0%となった。他の1例では12時間後に4.6%、2日後に0.3%に減少、4日後に0%になった。

ii) ³H-UdR.L.I.：1例では12時間後に54.8%、4日後に2.1%になり、7日後に0%になった。他

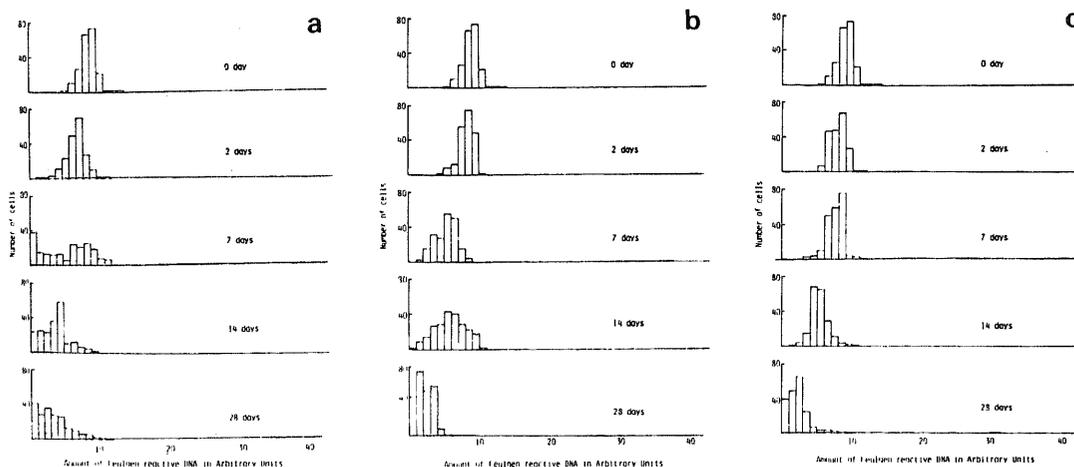


Fig. 3. Sequential change in Feulgen reactive DNA observed by microdensitophotometry of mesothelial cells from ascites.

a: kept at 37°C b: kept at 20°C c: kept at 4°C

の1例では12時間後に17.6%、4日後に8.4%、7日後に2.1%になった。

4) 4°Cに保存した細胞

i) ³H-TdR.L.I. : 1例では12時間後に3.9%、4日後に2.0%に漸減、7日後に0%になった。他の1例では12時間後に4.7%、2日後に0.5%に減少、4日後に0%になった。

ii) ³H-UdR.L.I. : 1例では12時間後に67.4%、4日後に3.4%、7日後に0%になった。他の1例では12時間後に36.4%、4日後に10.9%、7日後に3.2%になった。

3. 形態学的観察

1) 採取直後の細胞

i) 位相差顕微鏡による観察

細胞質には細顆粒状の糸粒体および光輝性顆粒をみた。核縁は薄く円滑、核内に1ないし数個の大きい円形の核小体と少数のクロマチン塊をみる他は特別の構造をみなかった。

ii) Papanicolaou 染色による観察

細胞質は核周囲に明庭部分があり、空胞もみた。核縁は薄く円滑、核内に細網状構造と少数の細顆粒をみた。核小体は大形で円形あるいは類円形をなしていた。

iii) Feulgen 反応による観察

核は円形あるいは類円形、核縁は薄く円滑だが所々に小さい凝集塊をみた。核内は核縁からの細網構造と、ほぼ均一に分布する細顆粒が混在していた。核小体の部分は淡くぬけてみえ、その周囲に小さい凝集塊をみた。

2) 37°Cに保存した細胞

i) 位相差顕微鏡による観察

a. 1時間後 : 細胞の辺縁より不規則な突起を出し、細胞質の光輝性顆粒は増多。核は著変をみなかった。

b. 3時間後 : 細胞縁にブリストー様突起をみ、核縁は凝集塊が付着して不均等に肥厚、核内は核小体とほぼ同じ位相差量を示す大きい凝集塊を数個みた。核小体はその周囲がぬけたようにみえ明瞭になった。

c. 6時間後 : 核径が縮小し、核・細胞質比は小になった。核縁の不均等肥厚はさらに進み、一部に断裂をみた。

d. 12時間後および1日後 (Fig.4.a) : 細胞質の変性が進み光輝性顆粒が細胞外にもみえた。核径の縮小が著明で核縁はさらに不規則になり、核内の粗大凝集塊は減少、縮小体も縮小した。

e. 2日後および4日後 (Fig.5.a) : 細胞質は空胞が多く位相の差が減少、細胞質が縮小して見かけ上核・細胞質比が増大した。核縁は不明瞭になり、核内にも

空胞を認め核小体のほかはほぼ均質無構造になった。一部の細胞では核小体を認め難かった。

f. 7日後、14日後および21日後 : 細胞質、核ともに不規則な凝集塊や空胞の集まりとしてみえ、核縁は不明瞭でその部分がぬけてみえた。

g. 28日後 : 細胞質、核ともに粗大凝集塊の集まりとしてみえ、その境界は僅かに空隙で区別できるものもあったが、核を判別できないものが多かった。

ii) Papanicolaou 染色による観察

a. 1時間後 : 細胞質は核の周囲に明庭をみ、核縁はやや肥厚し所々に大きい凝集塊が付着、核内は細顆粒状あるいは細網状で均等に分布、核小体は円形で明瞭に認めた。

b. 3時間後および6時間後 : 細胞縁から不規則な突起を出し、核の周囲の明庭は広くなり、核縁は凝集塊が付着して不均等に肥厚、核内には細顆粒とともにやや大きいクロマチン塊をみた。

c. 12時間後 (Fig.4.b) : 細胞質の変性はさらに進み辺縁の部分は染色性が低下、核径は縮小、核縁の一部に断裂をみた。核内は粗網状と顆粒状構造が混在するものが多かった。

d. 1日後 : 核内は粗網状とともに粗顆粒状のものが多くなり、核小体は縮小したがなお明瞭に認め得た。

e. 2日後および4日後 (Fig.5.b) : 細胞の辺縁から不規則な突起を出し断裂するものも多かった。核は粗顆粒状が多かったが濃縮状のものもあった。

f. 7日後および14日後 : 細胞質は不規則な凝集塊の集まりになり核の多くは濃縮状あるいは淡濁状になった。

g. 21日後 : 核は淡濁状あるいは不染のものが多く、辛うじて細胞質と核を区別しえた。

h. 28日後 : 細胞質が崩壊して不規則な凝集塊になったものが多く、核の多くは不染で判別できなかった。

iii) Feulgen 反応による観察

a. 1時間後および3時間後 : 核縁はやや肥厚、核縁および核小体縁に付着する凝集塊が増多した。

b. 6時間後、12時間後および1日後 (Fig.4.c) : 核縁は不均等肥厚が目立ち、一部で断裂して核形も不規則になった。核内は粗網状で、その網工にそってかなり大小不同の凝集塊をみた。

c. 2日後 (Fig.5.c) : 核径はさらに縮小、核縁は断裂して顆粒の連なりになり、核内は粗網状のもの、あるいはその網工が断裂して粗顆粒状になるものが多かった。

d. 4日後 : なかには濃縮状あるいは淡濁状の核を

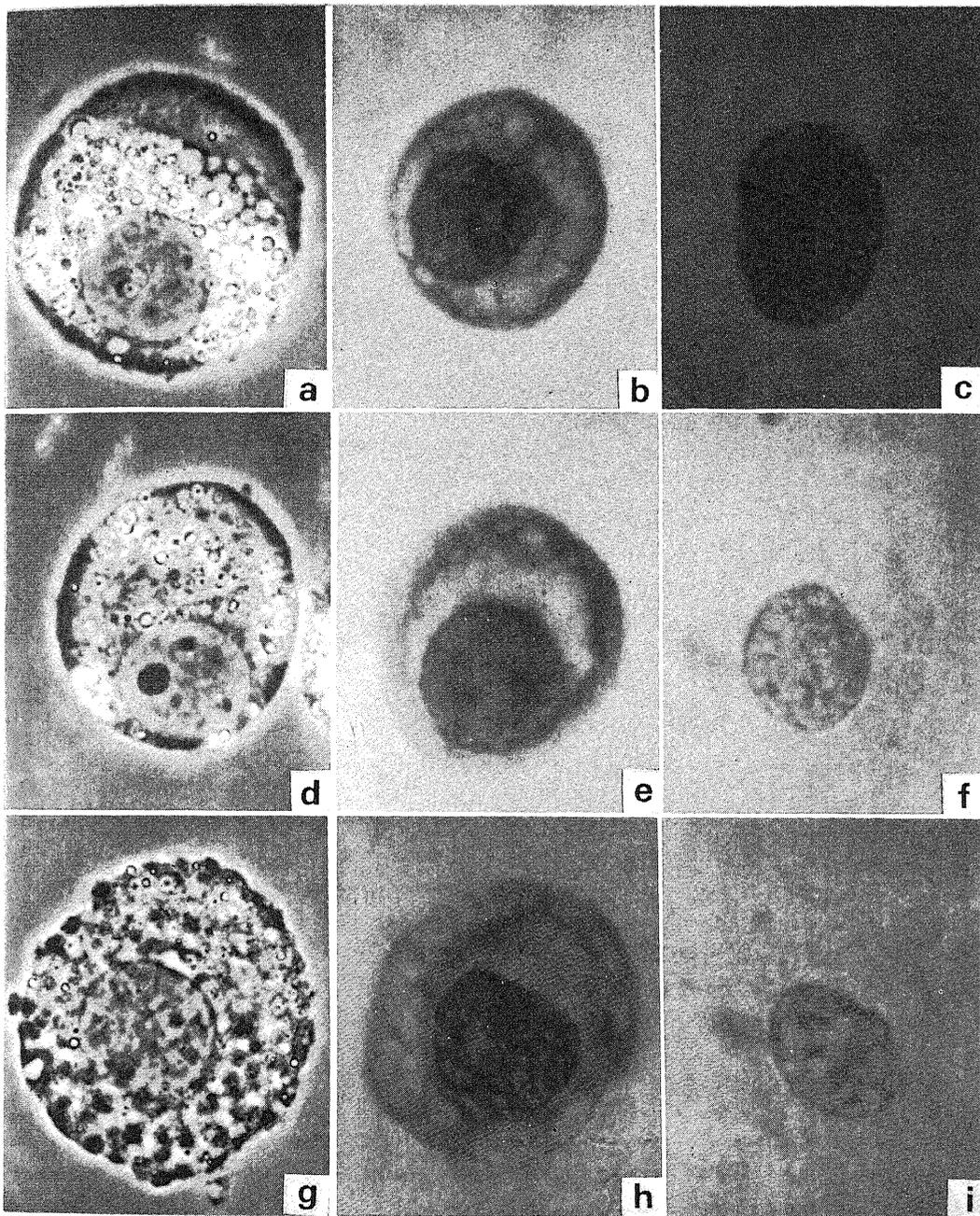


Fig. 4. Morphological change in cell degeneration. — well differentiated adenocarcinoma cells of stomach from ascites. —

a, d, g: Phase contrast microscopic picture

b, e, h: Papanicolaou stained cells

c, f, i: Feulgen stained cells

The cells in upper row were kept at 37°C for 12 hours, those in middle row kept at 20°C for 1 day and those in lower row kept at 4°C for 4 days.

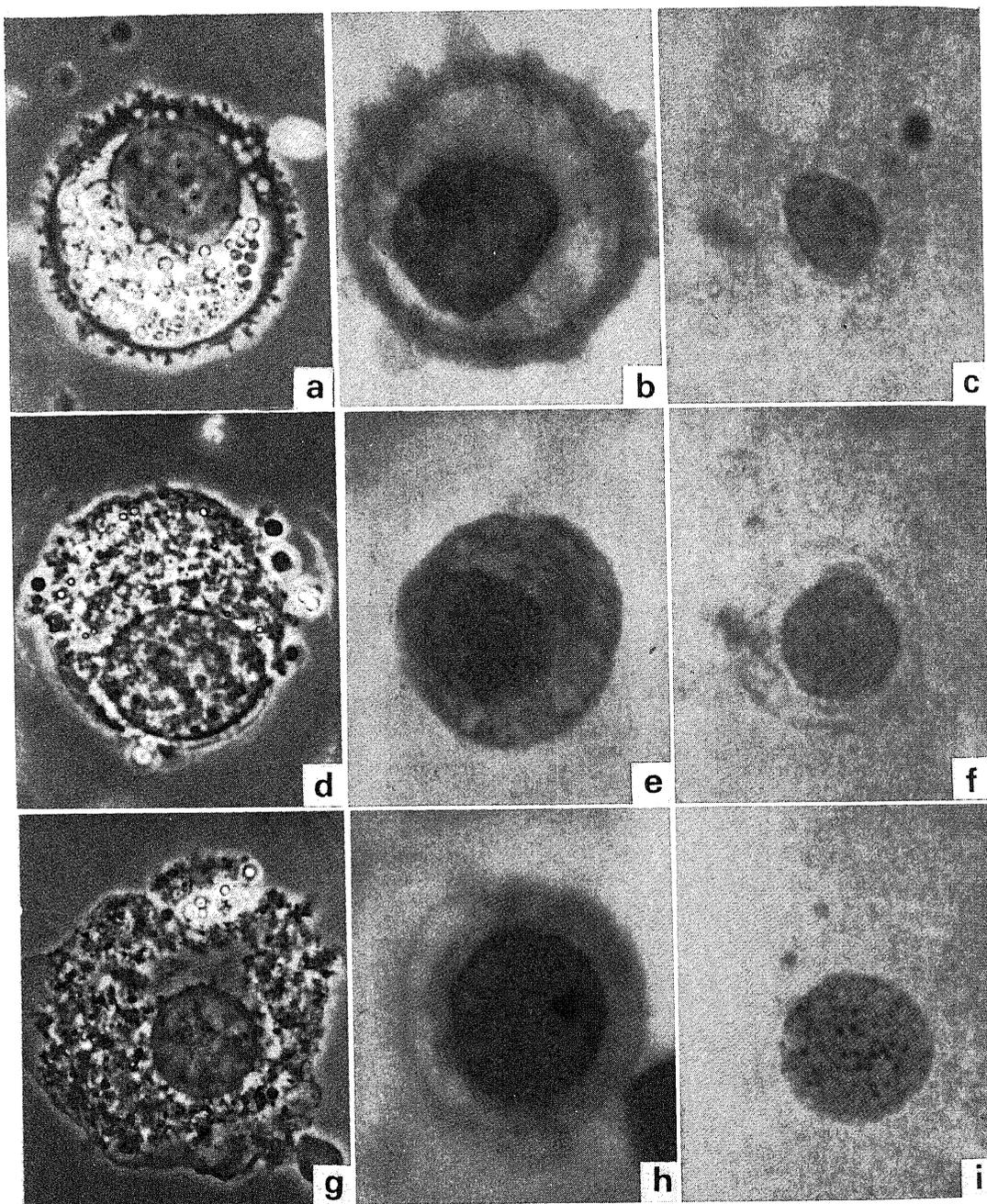


Fig. 5. Morphological change in cell degeneration. — well differentiated adenocarcinoma cells of stomach from ascites. —

a, d, g: Phase contrast microscopic picture

b, e, h: Papanicolaou stained cells

c, f, i: Feulgen stained cells

The cells in upper row were kept at 37°C for 2 days, those in middle row kept at 20°C for 4 days and those in lower row kept at 4°C for 14 days.

みた。

e. 7日後および14日後：核内は粗顆粒状のものもあったが、核縁が不明瞭で濃縮状あるいは破碎状のものも多かった。

f. 21日後および28日後：核は淡濁状あるいは破碎状のものも多かった。

3) 20°C に保存した細胞

i) 位相差顕微鏡による観察

a. 12時間後：細胞質に光輝性顆粒が多く空胞もみた。核径はやや縮小、核縁は不均等に肥厚、核内に核小体およびこれと同じ位相差量の粗大凝集塊をみた。

b. 1日後 (Fig.4.d)：核縁は一部で断裂して不規則になった。

c. 2日後：細胞質の空胞はさらに増多しついに細胞質は空胞で満たされた。核径の縮小とともに細胞質も縮小、核縁は断裂、核内のクロマチン塊は減少して均質化、核小体を明瞭にみた。

d. 4日後および7日後 (Fig.5.d)：細胞質の空胞変性はさらに進み、辺縁より崩壊する像をみた。核縁は不明瞭、核内にも空胞をみ、核小体のほかは無構造になった。

e. 14日後：細胞質は崩壊して不規則な顆粒の集まりになった。核径はさらに縮小、核縁は不明瞭だが、なお核と細胞質の区別ができた。

f. 21日後および28日後：細胞質と核の区別が困難で、核小体も不明瞭になった。

ii) Papanicolaou 染色による観察

a. 12時間後：細胞質は網状で核周明庭が広く大きい空胞をみた。核縁は不均等に肥厚、核内は細顆粒と細網状が混在し、網工にそって大きい凝集塊をみた。

b. 1日後 (Fig.4.e)：核径は縮小、核縁の不均等肥厚が進み一部で断裂をみた。核内は粗網状で網工にそって粗大な凝集塊を多数みた。

c. 2日後：細胞質の変性がさらに進み、辺縁は不規則で染色性が低下した。

d. 4日後 (Fig.5.e)：核縁は断裂して不規則のものが多く、核内の網工は不明瞭で大小の顆粒が不均等に分布した。

e. 7日後および14日後：細胞質の辺縁は崩壊し、核は粗顆粒状が多かったが濃縮状のものもあった。

f. 21日後：核は濃縮状、淡濁状あるいは破碎状が多く、一部は不染になった。

g. 28日後：細胞質は不規則な凝集塊の集まりになり、殆ど核は不染で判別できなかった。

iii) Feulgen 反応による観察

a. 12時間後：核形は不整、核縁は薄く小さい凝集

塊が付着した。

b. 1日後 (Fig.4.f)：核縁は凝集塊の増多により不均等に肥厚、一部で断裂をみた。核内は粗大な凝集塊が増多した。

c. 2日後：核縁はさらに肥厚、核内は粗網状、この網工にそって大きい凝集塊をみた。

d. 4日後および7日後 (Fig.5.f)：核縁は断裂し、顆粒が連なり数珠状あるいは不明瞭になった。核内は粗網が断裂して粗顆粒状になった。

e. 14日後：核内は粗顆粒状で不均等に分布するものも多かったが、濃縮状あるいは破碎状のものもあった。

f. 21日後および28日後：核内は顆粒状もみたが、多くは濃縮状あるいは淡濁状を呈した。

4) 4°C に保存した細胞

i) 位相差顕微鏡による観察

a. 12時間後：採取直後の所見と著変なかった。

b. 1日後：細胞の辺縁よりプリスター様突起を出し、細胞質は核の周囲に空胞をみた。核縁は薄く所々に小さい凝集塊が付着し、核内の凝集塊が増多した。

c. 2日後：細胞質の空胞はさらに増多、核縁は不明瞭あるいは薄く均等、核内の粗大な凝集塊はやや減少した。

d. 4日後 (Fig.4.g)：核径は縮小、核縁は不均等に肥厚し一部で断裂、核内の凝集塊は増多、空胞をみた。

e. 7日後および14日後 (Fig.5.g)：細胞質は空胞と凝集塊よりなり水泡状突起をみた。核径はさらに縮小、核内の凝集塊が減少して均質化した。

f. 21日後および28日後：細胞質は大きい顆粒の集まりにみえ、核径はさらに縮小、核内は均質化して核小体は不明瞭のものも多かった。

ii) Papanicolaou 染色による観察

a. 12時間後：核縁はやや肥厚、所々に小さい凝集塊が付着した。

b. 1日後：核縁に付着した凝集塊が増多して不均等に肥厚し、核内の粗大な凝集塊も増多した。

c. 2日後：細胞縁が明瞭、細胞質は網状で核周明庭が広がった。核縁はさらに不均等に肥厚、核形は不整、核内は細網状、細顆粒状が混在し粗大な凝集塊も認められた。

d. 4日後 (Fig.4.h)：細胞質の辺縁の染色性が低下、核径は縮小、核形は不整、核縁の一部に断裂をみた。

e. 7日後および14日後 (Fig.5.h)：細胞縁は不規則で断裂するものもあった。核内は粗顆粒をみるようになった。

- f. 21 日後：核が濃縮状の細胞をみた。
 g. 28 日後：細胞質は凝集塊の集まりにみえるものが多かった。核は粗顆粒状または破碎状が多かったが、濃縮状ないし淡濁状のものもあり、核小体は不明瞭になった。
- iii) Feulgen 反応による観察
- a. 12 時間後および 1 日後：核縁および核小体縁に小さい凝集塊が付着した。
 b. 2 日後：核縁は不均等に肥厚、核内は粗網状、大小の顆粒が不均等に分布した。
 c. 4 日後 (Fig.4.i)：核縁は不整で一部に断裂をみた。核内は粗網状が多かったが細顆粒状のものもあった。
 d. 7 日後および 14 日後 (Fig.5.i)：核縁は薄く不明瞭、核内の網状構造が断裂して粗顆粒になり、細顆粒と混在した。
 e. 21 日後：核は粗網状で大きい凝集塊もみたが、一部には濃縮状、淡濁状あるいは破碎状のものもあった。
 f. 28 日後：粗顆粒状、濃縮状、淡濁状、破碎状のものが混在し不染のものもあった。

4. DNA 量の変化 (Fig.6)

1) 採取直後の細胞

2C, 4C, 8C に相当するピークがあり、腹腔内で変性し DNA 量が著減した細胞は認めなかった。

2) 37°C に保存した細胞

- a. 1 時間後、3 時間後、6 時間後および 12 時間後：採取直後のヒストグラムと著変をみななかった。
 b. 1 日後、2 日後および 4 日後：2C, 4C, 8C 相当

の各ピークをみたが、DNA 量はやや減少してヒストグラムは全体に左方へ移動した。

c. 7 日後：DNA 量はさらに減少し各ピークを判別し難くなった。

d. 14 日後、21 日後および 28 日後：各ピークがなくなり、殆んどの細胞の DNA 量は 2C 相当以下になった。

3) 20°C に保存した細胞

a. 12 時間後および 1 日後：採取直後と著変はなかった。

b. 2 日後、4 日後および 7 日後：各ピークをみたが、ヒストグラムは全体に左方へ移動した。

d. 14 日後：DNA 量は減少し、各ピークを認め難くなった。

e. 21 日後および 28 日後：各ピークが消失し、殆んどの細胞の DNA 量は 2C 以下になった。

4) 4°C に保存した細胞

a. 12 時間後、1 日後、2 日後および 4 日後：採取直後と著変はなかった。

b. 7 日後、14 日後および 21 日後：各ピークをみたが、ヒストグラムは全体に左方へ移動し、2C 以下の細胞が増加した。

c. 28 日後：各ピークが消失し、殆んどの細胞の DNA 量は 2C 以下になった。

Ⅲ. 腹水中の子宮原発低分化型扁平上皮がん細胞および胸水中の肺原発分化型扁平上皮がん細胞

検討した扁平上皮がん 2 症例の細胞所見は基本的に類似していたので、特にことわらない限り、共通した成績を記載した。

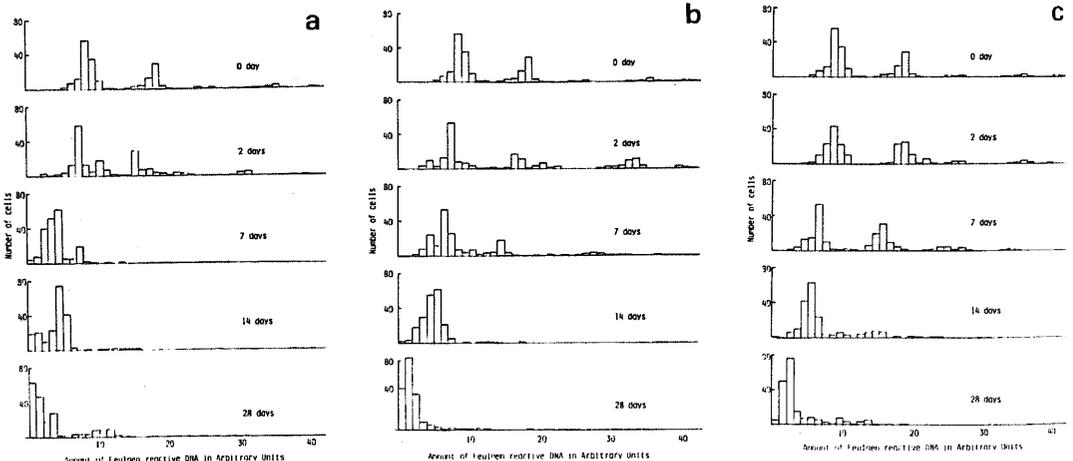


Fig. 6. Sequential change in Feulgen reactive DNA observed by microdensitophotometry of well differentiated adenocarcinoma cells of stomach from ascites.

a: kept at 37°C b: kept at 20°C c: kept at 4°C

1. 色素排泄能による viability (Fig.1.d,e)

1) 採取直後の細胞

E.I. は子宮がんでは 2.0%, 肺がんでは 10.0% で, viability はそれぞれ 98.0%, 90.0% であった.

2) 37°C に保存した細胞

子宮がんでは, 1 日後に 91.5%, 2 日後に 49.0%, 14 日後に 0% になった. 肺がんでは, 12 時間後に 44.0%, 2 日後に 15.5%, 4 日後に 0% になった.

3) 20°C に保存した細胞

子宮がんでは 4 日後に 75.0%, 7 日後に 27.5%, 28 日後に 21.5% になった.

4) 4°C に保存した細胞

子宮がんでは 28 日後でも 58.5% であった. 肺がんでは 12 時間後に 63.0%, 2 日後に 31.0%, 7 日後に 0% になった.

2. autoradiography 法による Labeling Index の測定 (Fig.2.d,e)

1) 採取直後の細胞

$^3\text{H-TdR.L.I.}$ は子宮がんでは 4.7%, 肺がんでは 13.0%. $^3\text{H-UdR.L.I.}$ は子宮がんでは 76.8%, 肺がんでは 25.0% であった.

2) 37°C に保存した細胞

i) $^3\text{H-TdR.L.I.}$: 子宮がんでは 12 時間後に 0.4%, 1 日後に 0% になった. 肺がんでは 12 時間後に 0.2%, 1 日後に 0% になった.

ii) $^3\text{H-UdR.L.I.}$: 子宮がんでは 12 時間後に 11.6%, 1 日後に 1.5% に減少, 2 日後に 0% になった. 肺がんでは 12 時間後に 2.1%, 1 日後に 0.3%, 2 日後に 0% になった.

3) 20°C に保存した細胞

i) $^3\text{H-TdR.L.I.}$: 子宮がんでは 12 時間後に 2.6%, 1 日後に 0.2%, 2 日後に 0% になった.

ii) $^3\text{H-UdR.L.I.}$: 子宮がんでは 1 日後に 11.3%, 2 日後に 1.2%, 4 日後に 0% になった.

4) 4°C に保存した細胞

i) $^3\text{H-TdR.L.I.}$: 子宮がんでは 12 時間後に 3.2%, 1 日後に 0.4%, 2 日後に 0% になった. 肺がんでは 1 日後に 4.2%, 2 日後に 0.5%, 4 日後に 0% になった.

ii) $^3\text{H-UdR.L.I.}$: 子宮がんでは 12 時間後に 67.8%, 2 日後に 4.1%, 4 日後に 0% になった. 肺がんでは 1 日後に 10.2%, 2 日後に 1.8%, 4 日後に 0% になった.

3. 形態学的観察

1) 採取直後の細胞

i) 位相差顕微鏡による観察

細胞質は厚く, 核の周囲に顆粒状の糸粒体やその他の細胞小器官をみた. 核は中心性に位置し, 核形はほぼ類円形を呈したが辺縁には, 小さい凹凸があり不整. 核縁は薄いが明瞭で円滑, 核内には 1 ないし数個の小さい多形性の核小体と不規則なクロマチンの凝集塊をみた.

ii) Papanicolaou 染色による観察

細胞質は層状を呈し, 核の周囲がやや明るくぬけてみえた. 核はほぼ中心性に位置し, 核形は不整で小さい切れ込みをみ, 核縁は薄いが明瞭, 円滑, 核小体は小さく類円形あるいは不整のものを 1~3 個みた. なかには核小体が不明瞭で認め難い細胞もあった. 核内のクロマチンは細顆粒状, 核縁からの細網状構造もみた.

iii) Feulgen 反応による観察

核縁は薄く円滑だが小さい切れ込みが多く核形は不整. 核小体の部分は小さくぬけてみえたが, なかには不明瞭のものもあった. 核内は核縁と核小体縁をつなぐ細網状構造とそれによって少数の凝集塊をみた.

2) 37°C に保存した細胞

i) 位相差顕微鏡による観察

a. 1 時間後: 核縁は薄いが所々に小さい凝集塊の付着をみた.

b. 3 時間後および 6 時間後: 細胞質では糸粒体の膨化, 小胞体の開大によると考えられる小空隙, 細胞縁よりブリストア様突起が出現, 等をみた. 核縁は凝集塊の付着により不均等に肥厚, 核内はクロマチンの粗大凝集塊が増多した.

c. 12 時間後および 1 日後 (Fig.7.a): 細胞質の空隙が増多, 増大, 核径は縮小, 核縁はさらに不均等に肥厚し一部に断裂をみた. 核内は粗大凝集塊とともに一部では位相差量を減じて明るい部分を生じ多様になった. 核小体はその周囲が明るく目立つようになった.

d. 2 日後および 4 日後 (Fig.8.a): 細胞縁より水泡状突起が出現, 核縁は不明瞭, 核内の凝集塊は減少, 小形化した核小体とともにわずかの小さい凝集塊をみるのみになった.

e. 7 日後および 14 日後: 細胞質はなおその形を止めていた. 核径はさらに縮小, 核縁および核小体は不明瞭のものが多く, 核内には不規則な凝集塊をみた. 核はその周囲の空隙により細胞質と区別できた.

f. 21 日後および 28 日後: 細胞質は凝集塊の集まりになったが, 細胞縁は明瞭でその形を止めていた. 核は少数の凝集塊のほかは均質化し, 細胞質との境界は不明瞭のものが多かった.

ii) Papanicolaou 染色による観察

a. 1時間後：核縁に凝集塊が付着したほかは採取直後の細胞の所見と著変をみなかった。

b. 3時間後および6時間後：核縁は凝集塊が付着して不均等に肥厚，核内は細網および細顆粒が混合した構造であったがなかには粗大な顆粒もみた。

c. 12時間後および1日後 (Fig.7.b)：細胞の辺縁部に多数の不規則な凝集塊をみた。核径はやや縮小，核縁はさらに不均等に肥厚し一部で断裂をみた。核内は大小不同の凝集塊が多く粗顆粒状を呈したが一部で粗網状構造をみた。

d. 2日後 (Fig.8.b)：なお細胞質の層状構造をみた。核縁および核小体を見るが核内は均質化するものが多く，濃染あるいは淡染するものもあった。

e. 4日後：細胞径は縮小，細胞質の層状構造は不明瞭になった。

f. 7日後：細胞質は染色性が低下し核の周囲の明瞭部分が広がった。核の多くは濃縮状を呈したが一部は粗顆粒状あるいは淡濁状のものをみた。核小体は判別できなかった。

g. 14日後および21日後：細胞質は多くはその形を保っていたが一部は辺縁が崩壊していた。核は淡濁状のものが多く，一部は粗顆粒状あるいは濃縮状を呈した。

h. 28日後：細胞質の辺縁は不規則で断裂もみた。核は不染で判別できないものが多かったが淡染するものもあった。

iii) Feulgen 反応による観察

a. 1時間後：核縁はやや肥厚，所々に凝集塊の付着をみた。核内の粗大な凝集塊が増多した。

b. 3時間後および6時間後：核縁は凝集塊が付着して不均等に肥厚，核内は細顆粒および核縁と核小体縁をむすぶわずかの網状構造が混在し，この網状構造にそって粗大な凝集塊をみた。

c. 12時間後 (Fig.7.c)：核径はやや縮小，核縁はさらに不均等に肥厚し一部で断裂をみた。

d. 1日後：核縁はさらに断裂し顆粒が連なり数珠状に見えるものもあった。核内は粗網状のものが多かったが，一部にはこの網状構造の断裂をみた。

e. 2日後 (Fig.8.c)：核縁は薄く，核内の網状構造が断裂して細顆粒状に見えるものがあった。

f. 4日後：核径は縮小，核縁および核小体は明瞭，核内は顆粒状のものもあったが，多くは無構造で濃縮状または淡濁状になった。

g. 7日後および14日後：殆んど核は淡濁状または濃縮状になった。

h. 21日後および28日後：核は淡濁状または濃縮

状のものが多く，一部は破碎状を呈した。

3) 20°C に保存した細胞

i) 位相差顕微鏡による観察

a. 12時間後および1日後 (Fig.7.d)：細胞質では糸粒体の膨化をみた。核縁は不均等に肥厚，核内は不規則な粗大凝集塊をみ，核小体の周囲は明るくぬけてみえた。

b. 2日後および4日後 (Fig.8.d)：細胞質には空胞をみ，核縁はさらに肥厚し一部で断裂をみた。核径は縮小，核内の凝集塊はさらに増多した。

c. 7日後：細胞径は縮小，細胞質の核周明瞭が明瞭になった。核および核小体は著明に縮小，核内にも空胞をみ，凝集塊は減少した。

d. 14日後：細胞縁より水泡状突起が出現，核縁は薄く不明瞭になり，核内は核小体と少数の凝集塊のほかは均質無構造になった。

e. 21日後および28日後：細胞質と核の境界が不明瞭になり，多くは核小体も不明瞭になったが，一部には核内に核小体と少数の凝集塊をみるものがあった。

ii) Papanicolaou 染色による観察

a. 12時間後および1日後 (Fig.7.e)：核縁は凝集塊が付着して不均等に肥厚，核内には細顆粒と網状構造にそった少数の粗大顆粒をみた。

b. 2日後：細胞質には層状構造をみたが空胞や不規則な凝集塊をみるようになった。核縁はさらに不均等に肥厚し一部で断裂をみた。核径は縮小，核内は粗網状，粗大顆粒も増多した。

c. 4日後 (Fig.8.e)：細胞質辺縁部の凝集塊が増多，核縁は厚く不整で断裂も多かった。核内は多くは粗顆粒状，網状のものもみた。

d. 7日後および14日後：細胞径は縮小，細胞質の層状構造をみた。核内の粗大顆粒は減少，細顆粒状のものや均質化したものが多く，核縁，核小体ともに不明瞭で濃縮状のものもみた。

e. 21日後および28日後：細胞径はさらに縮小，細胞質はその形態を保つが層状構造は不明瞭になり，核周明瞭が広いものもあった。核は濃縮状あるいは淡濁状のものが多く，不染のものもあった。

iii) Feulgen 反応による観察

a. 12時間後および1日後 (Fig.7.f)：核縁は凝集塊が付着して不均等に肥厚，核内は核縁と核小体縁をむすぶ網状構造が明瞭で，これにそって少数の凝集塊をみた。

b. 2日後および4日後 (Fig.8.f)：核縁は厚く一部に断裂をみた。核内は粗網状で粗大凝集塊も増多した。

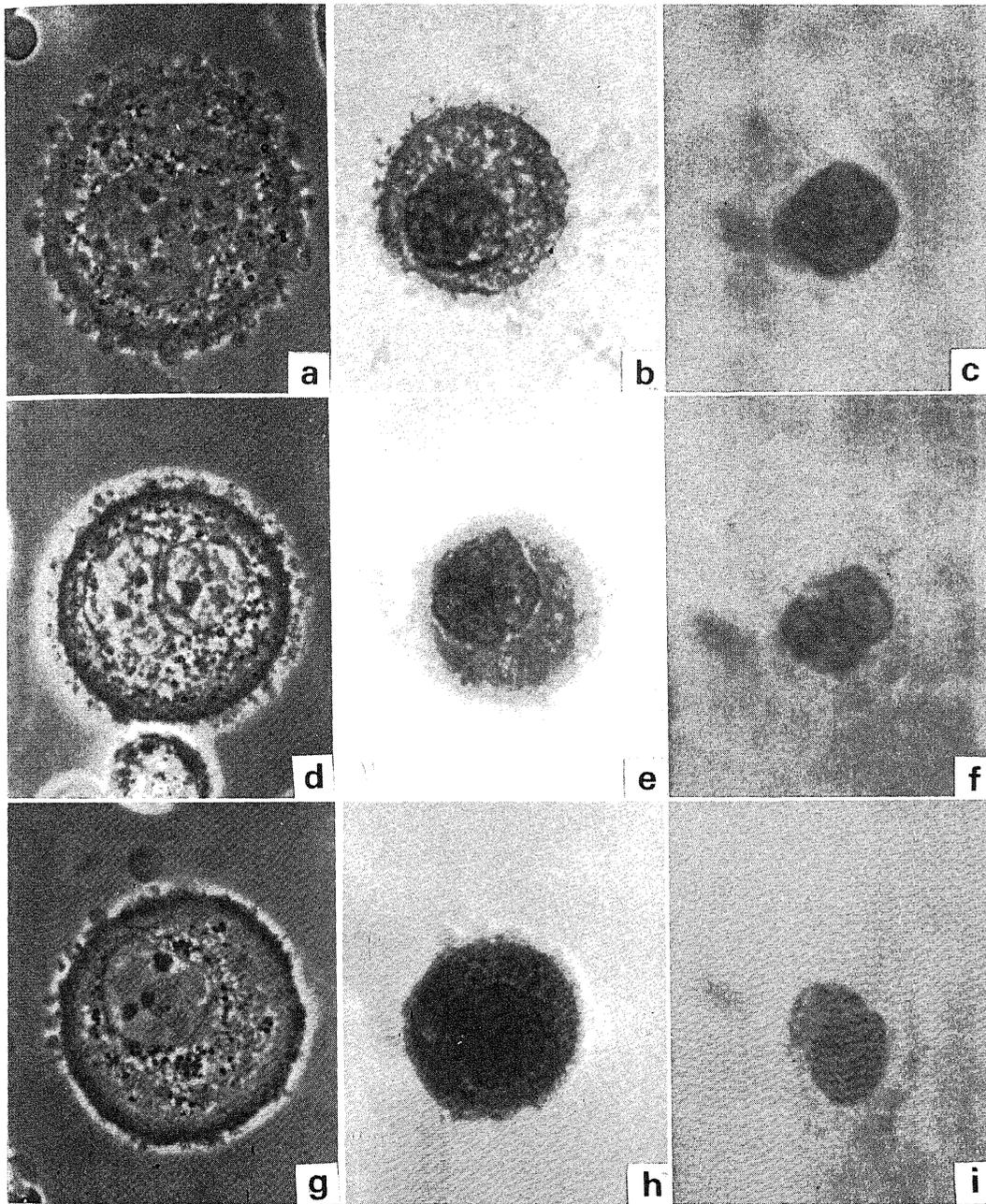


Fig. 7. Morphological change in cell degeneration. —poorly differentiated squamous cell carcinoma cells of uterus from ascites.—

a, d, g: Phase contrast microscopic picture

b, e, h: Papanicolaou stained cells

c, f, i: Feulgen stained cells

The cells in upper row were kept at 37°C for 12 hours, those in middle row kept at 20°C for 1 day and those in lower row kept at 4°C for 4 days.

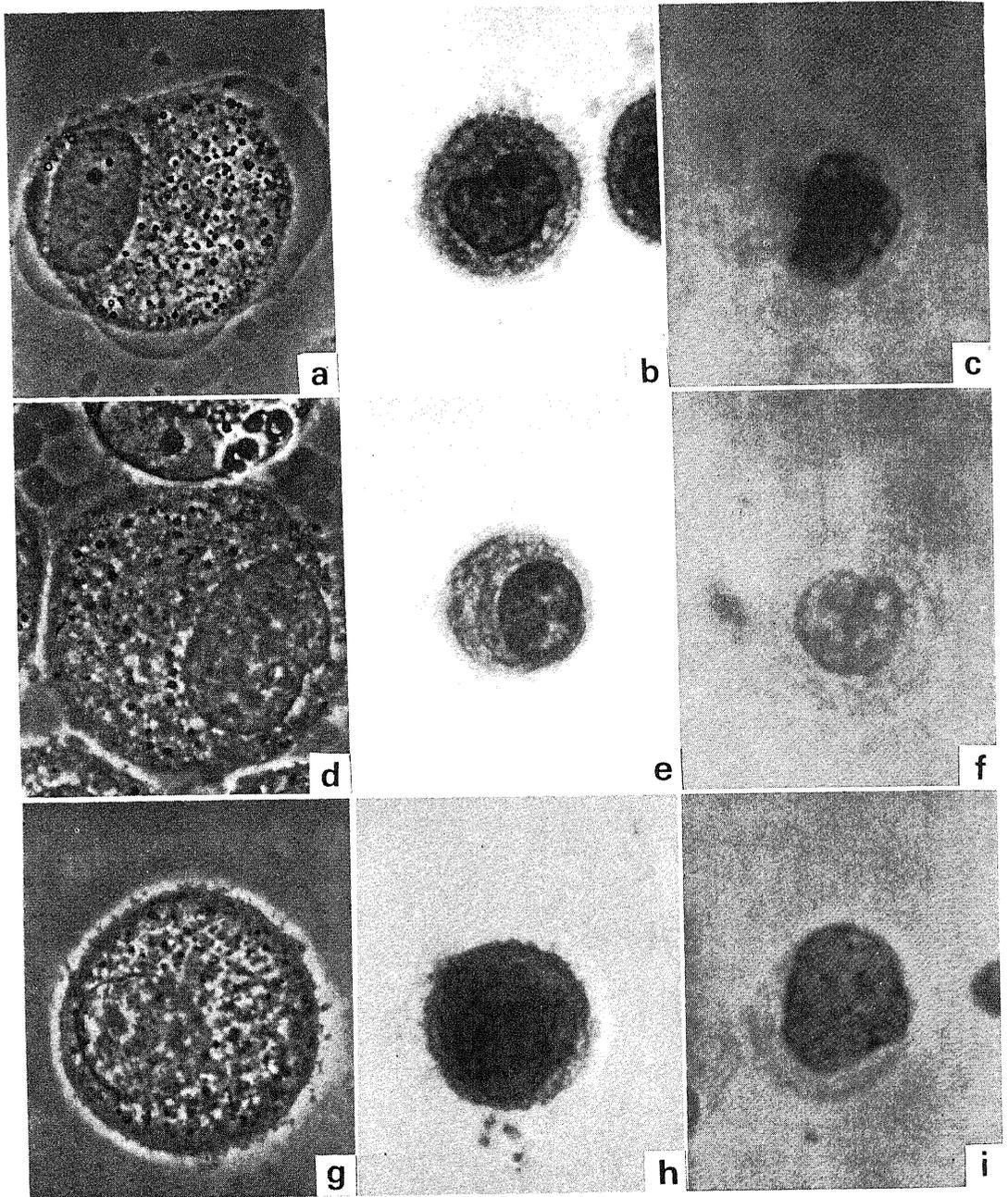


Fig. 8. Morphological change in cell degeneration.—poorly differentiated squamous cell carcinoma cells of uterus from ascites.—

a, d, g: Phase contrast microscopic picture

b, e, h: Papanicolaou stained cells

c, f, i: Feulgen stained cells

The cells in upper row were kept at 37°C for 2 days, those in middle row kept at 20°C for 4 days and those in lower row kept at 4°C for 14 days.

c. 7日後, 14日後および21日後: 核径は著明に縮小, 核縁および核小体は不明瞭, 核内は濃縮状あるいは淡濁状のものが多かった。

d. 28日後: 核内は濃縮状あるいは淡濁状のものが多かったが, 一部の核は核縁, 核小体ともに明瞭で, 核内は粗顆粒状であった。

4) 4°Cに保存した細胞

i) 位相差顕微鏡による観察

a. 12時間後: 採取直後の細胞の所見と著変はなかった。

b. 1日後: 細胞質は糸粒体の膨化, 小胞体の開大によると思われる空胞をみた。核縁は凝集塊の付着により不均等に肥厚, 核内の粗大凝集塊は増多した。

c. 2日後および4日後(Fig.7.g): 細胞質に空胞をみ, 核径は縮小, 核縁はさらに不均等に肥厚, 核内の粗大凝集塊も増多した。

d. 7日後: 細胞縁より舌状の突起をみ, 細胞質の空胞は増多, 核縁は厚く一部に断裂をみた。

e. 14日後および21日後(Fig.8.g): 核径はさらに縮小, 核縁は明瞭だが断裂が多かった。核内にも空胞をみた。

f. 28日後: 細胞質は良く保たれ, 核径は縮小, 核内の凝集塊は減少して均質化, 核縁および核小体は明瞭であった。

ii) Papanicolaou 染色による観察

a. 12時間後: 採取直後の細胞の所見と著変をみなかった。

b. 1日後: 核縁は凝集塊の付着により不均等に肥厚, 核内はわずかの網状構造とともに大小不同の顆粒を密にみた。

c. 2日後: 核縁は不均等肥厚が目立ち, 核内は網状構造にそって大きい凝集塊をみた。

d. 4日後(Fig.7.h): 細胞質の辺縁に不規則な凝集塊をみた。核径は縮小, 核縁は不整で一部に断裂をみた。

e. 7日後および14日後(Fig.8.h): 細胞質の辺縁の不規則な凝集塊が増多, 核縁は厚く明瞭だが断裂が著しかった。核内は粗顆粒状で, わずかに網状構造をみた。

f. 21日後: 細胞質の辺縁は不規則だが, なお層状構造をみた。核縁, 核小体はともに明瞭, 核内は粗顆粒状のものが多かったが, 一部には濃縮状のものもあった。

g. 28日後: 細胞質に層状構造をみた。核内は無構造で濃染あるいは淡染するものが多かった。

iii) Feulgen 反応による観察

a. 12時間後: 採取直後の所見と同様であった。

b. 1日後: 核縁はやや厚く, 所々に小さい凝集塊の付着をみた。核内は細網状と細顆粒状が混在し, やや大きい凝集塊もみた。

c. 2日後: 核縁は不均等に肥厚, 核内の粗大な顆粒が増多した。

d. 4日後および7日後(Fig.7.i): 核径は縮小, 核縁はさらに不均等に肥厚し一部に断裂をみた。核内は粗網状になり粗大な顆粒も増多した。

e. 14日後(Fig.8.i): 核縁は断裂が著しく顆粒の連なりとなり, 核内の粗網状構造は断裂して粗顆粒状のものが多かった。

f. 21日後および28日後: 核内は粗顆粒状のものが多かったが, 濃縮状あるいは淡濁状のものもあった。

4. DNA量の変化(Fig.9)

1) 採取直後の細胞

ヒストグラムで, 2C, 4C, 8Cに相当するピークをみた。

2) 37°Cに保存した細胞

a. 1時間後, 3時間後, 6時間後, 12時間後および1日後: 採取直後の細胞のヒストグラムと著変はなかった。

b. 2日後および4日後: 各ピークをみたが全体にDNA量が減少し, ヒストグラムは左方へ移動した。

c. 7日後: DNA量はさらに減少, 各ピークを認め難くなった。

d. 14日後, 21日後および28日後: 各ピークがなく, 殆どどの細胞のDNA量は2C相当以下になった。

3) 20°Cに保存した細胞

a. 12時間後および1日後: 採取直後の細胞のヒストグラムと著変はなかった。

b. 2日後, 4日後および7日後: 各ピークをみたがヒストグラムは全体に左方へ移動した。

c. 14日後, 21日後および28日後: 各ピークを認め難くなり, 殆どどの細胞のDNA量は2C相当以下になった。

4) 4°Cに保存した細胞

a. 12時間後, 1日後, 2日後および4日後: 採取直後の細胞のヒストグラムと著変はなかった。

b. 7日後, 14日後および21日後: 各ピークをみたが, DNA量が減少しヒストグラムは全体に左方へ移動した。

c. 28日後: 各ピークを認め難く, 殆どどの細胞のDNA量は2C相当以下になった。

IV. 胸水中の肺原発小細胞がん細胞

1. 色素排泄能による viability (Fig.1.f)

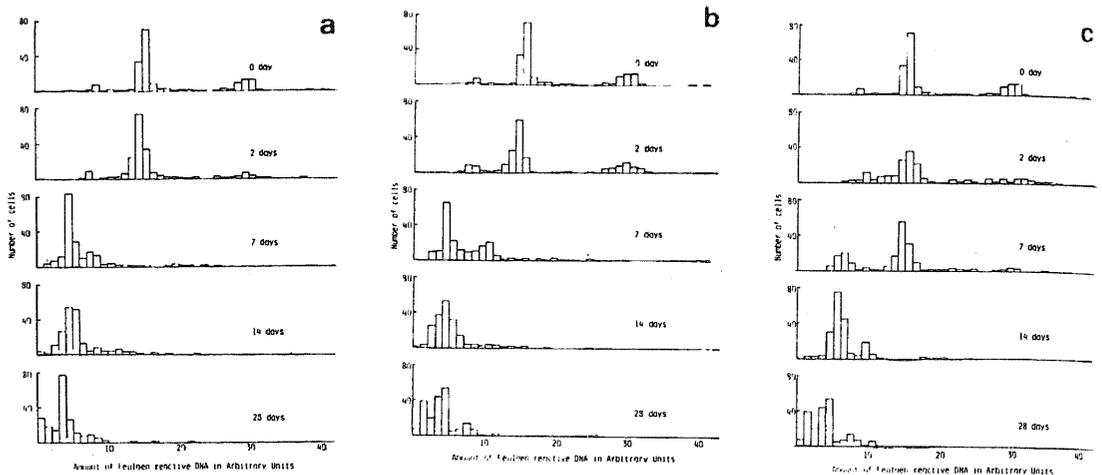


Fig. 9. Sequential change in Feulgen reactive DNA observed by microdensitophotometry of poorly differentiated squamous cell carcinoma cells of uterus from ascites.

a: kept at 37°C b: kept at 20°C c: kept at 4°C

1) 採取直後の細胞

E.I. は 6.0% で, viability は 94.0% であった。

2) 20°C に保存した細胞

12 時間後 81.0%, 1 日後 79.0%, 2 日後 51.0%, 4 日後 40.5% であった。

2. autoradiography 法による Labeling Index の測定 (Fig.2.f)

1) 採取直後の細胞

³H-TdR.L.I. は 5.8%, ³H-UdR.L.I. は 39.2% であった。

2) 20°C に保存した細胞

i) ³H-TdR.L.I.: 12 時間後 2.3%, 1 日後 1.2%, 2 日後 0.3%, 4 日後は 0% であった。

ii) ³H-UdR.L.I.: 12 時間後 30.7%, 1 日後 16.2%, 2 日後 8.0%, 4 日後は 0% であった。

3. 形態学的観察

1) 採取直後の細胞

i) 位相差顕微鏡による観察

核・細胞質比は極めて大で, 細胞質は狭く核はほぼ円形で単核のものが多かった。核縁は薄く円滑, 核内には数個の小さい不整形の核小体と多数の小さい凝集塊をみた。

ii) Papanicolaou 染色による観察

核・細胞質比は極めて大, 細胞質は狭く, 核は類円形, 核縁は不明瞭または極めて薄く, 核小体は小形で不整形のものを数個みた。核内は細顆粒状を呈した。

iii) Feulgen 反応による観察

核形は類円形ないし腎形のものが多く, 核縁は不明

瞭, 核内は細顆粒状であった。

2) 20°C に保存した細胞

i) 位相差顕微鏡による観察

a. 12 時間後: 細胞質の辺縁に多数の突起をみた。核縁は薄く凝集塊の付着をみ, 核内には小さい凝集塊に加え, 粗大な凝集塊をみた。

b. 1 日後: 細胞質は核の周囲に空胞をみた。核縁はさらに凝集塊が付着して不均等に肥厚した。

c. 2 日後: 細胞質の空胞はさらに増多, 核縁は薄く所々に断裂をみた。核内にも空胞をみ, 凝集塊はやや減少した。

d. 4 日後: 細胞質の辺縁は不規則になり, 核縁は不規則, 不明瞭で核内は核小体のほかは均質無構造になった。

ii) Papanicolaou 染色による観察

a. 12 時間後: 細胞質の辺縁は不規則で核の周囲が明るくぬけてみえた。核縁はやや厚く明瞭で所々に凝集塊の付着をみた。核内は細顆粒状のものが多かった。

b. 1 日後: 細胞質の辺縁はさらに不規則になり, 核周明庭が広く, 空胞もみた。核縁は不均等に肥厚し一部に断裂をみ, 核内は細顆粒状のものが多かった。

c. 2 日後: 細胞質の辺縁はさらに不規則になり, 核縁は厚く明瞭, 核内は粗大な凝集塊が不規則に分布するものが多かった。

d. 4 日後: 細胞質の辺縁は不規則, 核縁はやや薄くなり, 核内は粗顆粒状あるいは粗網状で核小体をみた。

iii) Feulgen 反応による観察

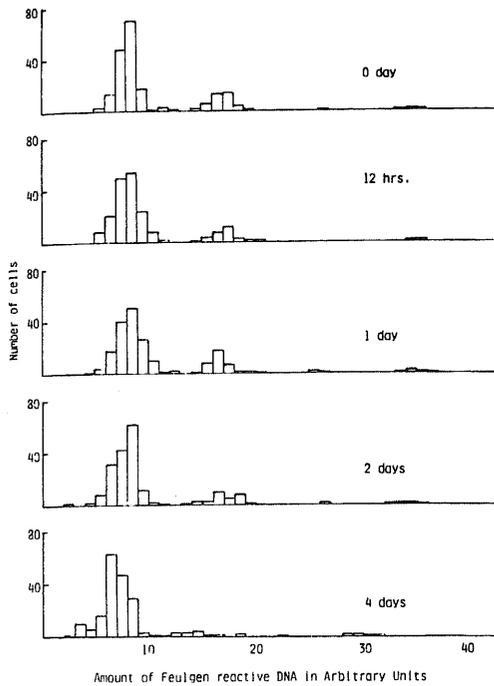


Fig. 10. Sequential change in Feulgen reactive DNA observed by microdensitophotometry of small cell carcinoma cells of lung from pleural fluid kept at 20°C

a. 12時間後：核縁は薄いが明瞭で所々に凝集塊の付着をみた。核内は細顆粒状のものが多かったが細網状のものもあった。

b. 1日後および2日後：核径は縮小、核縁は薄いが凝集塊の付着で不均等になり所々に断裂をみた。核内は細顆粒状のものや、細網状でその網構造にそって粗大な顆粒をみるものがあった。

c. 4日後：核縁の断裂が著しく、核内は粗網状で粗大顆粒が加わったものが多かったが、粗顆粒状あるいは濃縮状のものもあった。

4. DNA量の変化 (Fig.10)

1) 採取直後の細胞

2C, 4C, 8C相当のピークをみた。

2) 20°Cに保存した細胞

a. 12時間後および1日後：採取直後の細胞のヒストグラムと著変はなかった。

b. 2日後：各ピークをみたが、DNA量が減少した細胞をみた。

c. 4日後：各ピークをみたが、DNA量は全体に減少、ヒストグラムの左方への移動をみた。

V. 胸水中の系統的リンパ節腫の細網肉腫細胞

1. 色素排泄能による viability (Fig.1.g)

1) 採取直後の細胞

E.I.は3.0%で、viabilityは97.0%であった。

2) 37°Cに保存した細胞

12時間後73.0%、1日後26.0%、4日後に0%になった。

3) 20°Cに保存した細胞

12時間後87.5%、1日後65.0%、7日後に0%になった。

4) 4°Cに保存した細胞

2日後90.5%、7日後39.0%、21日後に0%になった。

2. autoradiography法による Labeling Index の測定 (Fig.2.g)

1) 採取直後の細胞

$^3\text{H-TdR.L.I.}$ は28.1%、 $^3\text{H-UdR.L.I.}$ は94.4%であった。

2) 37°Cに保存した細胞

i) $^3\text{H-TdR.L.I.}$ ：12時間後0.5%、1日後0.1%、2日後に0%になった。

ii) $^3\text{H-UdR.L.I.}$ ：12時間後7.2%、1日後1.0%、2日後0%になった。

3) 20°Cに保存した細胞

i) $^3\text{H-TdR.L.I.}$ ：12時間後6.3%、1日後1.2%、2日後に0%になった。

ii) $^3\text{H-UdR.L.I.}$ ：12時間後78.3%、1日後20.1%、2日後1.3%、4日後に0%になった。

4) 4°Cに保存した細胞

i) $^3\text{H-TdR.L.I.}$ ：1日後7.9%、4日後1.5%、7日後に0%になった。

ii) $^3\text{H-UdR.L.I.}$ ：1日後81.7%、4日後29.1%、7日後9.1%であった。

3. 形態学的観察

1) 採取直後の細胞

i) 位相差顕微鏡による観察

細胞質は核の周囲に顆粒状、桿状など多彩な糸粒体と光輝性顆粒をみた。核は類円形ないし腎形のものが多いが、切れ込みのため不整形となるものもあった。

核縁は薄く円滑、核内に大形で不整形の核小体をみた。

ii) Papanicolaou染色による観察

細胞質に多数の空胞をみ、核・細胞質比は大、核縁は薄く円滑であるが切れ込みが多く核形は不整であった。核内は粗網状で、それにそって少数の凝集塊をみるものがあったが、網状構造の不明瞭なものもあった。大形で不整形の核小体を数個みた。

iii) Feulgen反応による観察

核は類円形あるいは切れ込みのため不整、核縁は薄く円滑、核内は核縁と核小体縁の間にやや粗な網状構造をみ、それによって粗大な凝集塊をみた。核小体の部分は不整形にぬけてみえた。

2) 37°C に保存した細胞

i) 位相差顕微鏡による観察

a. 1時間後：細胞質に少数の光輝性顆粒をみ、核縁は薄く円滑、核内は核小体と小さい凝集塊をみるにすぎなかった。

b. 3時間後：核縁は凝集塊の付着により不均等に肥厚した。

c. 6時間後および12時間後：細胞質はプリスター様突起を出し、多数の小空胞をみた。核縁は不均等肥厚が著しく一部に断裂をみた。核内は凝集塊が多く粗大なものもみた。

d. 1日後：細胞径は縮小、核縁は不明瞭、核内の凝集塊は減少、小形化した核小体のほかはほぼ均質になった。

e. 2日後：細胞質の辺縁は不規則、核縁は不整、不明瞭になり、核内は核小体のほかはほぼ均質化、空胞もみた。

f. 4日後および7日後：細胞質は不規則な凝集塊の集まりとなり、核と細胞質の境界は不明瞭、核は核小体のほかは均質無構造であった。

g. 14日後、21日後および28日後：核は核縁、核小体ともに不明瞭で無構造のものが多かった。

ii) Papanicolaou 染色による観察

a. 1時間後：核縁は薄く所々に凝集塊の付着をみた。核内は粗網状で網状構造にそって凝集塊をみるものが多かったが、細顆粒状のものもあった。

b. 3時間後：細胞質の辺縁は不規則になった。核縁は不均等に肥厚、核内は粗網状構造にそった凝集塊が増多した。

c. 6時間後：細胞質の辺縁はさらに不規則になった。核縁の不均等肥厚が著しく、断裂もみた。

d. 12時間後：核は円形化し、核縁は厚く明瞭、核内は網状構造が不明瞭になり顆粒状のものが多かった。

e. 1日後および2日後：細胞径は縮小、核縁は厚く明瞭、核内は粗顆粒状のものが多かった。

f. 4日後：細胞径はさらに縮小、細胞質の辺縁は一層不規則になった。核縁、核小体ともに明瞭、核内は粗顆粒状のものが多かったが、濃縮状あるいは淡濁状のものもあり、これらでは核小体が不明瞭となった。

g. 7日後：細胞径はさらに縮小、核は濃縮状あるいは淡濁状のものが多かった。

h. 14日後：細胞質の辺縁は不規則だが、なおその形を保つものが多かった。核は濃縮状あるいは淡濁状になった。

i. 21日後および28日後：細胞質はその形を止めるものが多かった。核は淡濁状のものが多かった。

iii) Feulgen 反応による観察

a. 1時間後：核縁は薄く所々に凝集塊の付着をみた。核内は細網状で凝集塊の付着をみた。

b. 3時間後：核縁への凝集塊の付着が増多、不均等に肥厚した。核内の網状構造にそう凝集塊も増多した。

c. 6時間後：核縁はさらに不均等に肥厚し一部に断裂をみた。核内の網状構造にそう凝集塊の増多、増大をみるものもあった。

d. 12時間後：核は円形化、核縁の断裂は著しかった。核内は粗網状で一部に凝集塊をみた。

e. 1日後および2日後：核径は縮小、核縁が不明瞭のものもあった。核内は粗網状のものもあったが、網状構造が不明瞭で顆粒状のものが多かった。

f. 4日後：核は顆粒状のものが多かったが、一部は粗網状あるいは濃縮状であった。

g. 7日後および14日後：核径の縮小が著明、核内は顆粒状のものが多かったが濃縮状のものもあった。

h. 21日後および28日後：核は濃縮状あるいは淡濁状で核小体の不明瞭のものが多かった。

3) 20°C に保存した細胞

i) 位相差顕微鏡による観察

a. 12時間後：細胞質に光輝性顆粒をみ、核縁は凝集塊の付着により不均等に肥厚した。

b. 1日後：細胞質はプリスター様突起を出し空胞をみた。核縁の一部に断裂をみ、核内の粗大な凝集塊が増多した。

c. 2日後：核縁は不明瞭になり、核は小形化、核小体のほかは均質化した。

d. 4日後および7日後：細胞質は崩壊状になり、核内は核小体のほかは均質無構造になった。

e. 14日後：細胞質は不規則な凝集塊の集まりになった。細胞質と核の境界は不明瞭、核小体を認め得た。

f. 21日後および28日後：核は核縁、核小体ともに不明瞭で無構造になった。

ii) Papanicolaou 染色による観察

a. 12時間後：細胞質の辺縁は不規則になり、核縁は凝集塊の付着により不均等に肥厚した。

b. 1日後：細胞質の辺縁は不規則で、核縁は不均等肥厚が著しく断裂もみた。

c. 2日後：細胞径は縮小、核縁は厚く明瞭、核内は

網状構造が不明瞭で顆粒状のものが多かった。

d. 4日後および7日後：核縁は厚く明瞭，核内は粗顆粒状のものが多かった。

e. 14日後：細胞径は縮小，細胞質の辺縁は不規則，核内は粗顆粒状のものが多かったが一部は濃縮状あるいは淡濁状で，核小体も不明瞭のものがあつた。

f. 21日後：核は濃縮状あるいは淡濁状のものが多かった。

g. 28日後：細胞質を認め得た。核は淡濁状のものが多かった。

iii) Feulgen 反応による観察

a. 12時間後：核縁および核内の網状構造にそう凝集塊が増多した。

b. 1日後：核縁の不均等肥厚が著しく一部に断裂をみた。核内の網状構造にそう大きい凝集塊をみた。

c. 2日後：核径は縮小，核縁は不明瞭のものもあつた。核内は粗網状のものが多かった。

d. 4日後：核内は粗網状のほかに，網状構造が不明瞭で顆粒状のものが多くなった。

e. 7日後：核縁は薄く不明瞭になり，核内は顆粒状あるいは粗網状になった。

f. 14日後：核は顆粒状のものが多く，一部に粗網状あるいは濃縮状のものをみた。

g. 21日後：核内は顆粒状のものが多かったが濃縮状のものも増多した。

h. 28日後：核内は濃縮状あるいは淡濁状で核小体も不明瞭のものが多かった。

4) 4°C に保存した細胞

i) 位相差顕微鏡による観察

a. 12時間後：細胞質に光輝性顆粒をみ，核縁は薄く円滑，核内は核小体と少数の小凝集塊をみるにすぎなかった。

b. 1日後：細胞質に小さい空胞をみた。

c. 2日後：細胞質の空胞が増多，核縁は不均等に肥厚，核内の凝集塊も増多し，核小体は明瞭になった。

d. 4日後：細胞径は縮小，核縁の不均等肥厚が著しく一部に断裂をみた。核内にも小空胞をみた。

e. 7日後および14日後：細胞径，核径はさらに縮小，核は円形化，核縁は断裂のため不規則で不明瞭のものもあつた。核内の凝集塊はやや減少した。

f. 21日後：細胞質の辺縁は不規則，核内は不規則な凝集塊が増多，細胞質と核の境界が不明瞭のものもあつた。

g. 28日後：細胞質は崩壊状，核は均質無構造で核小体も不明瞭になった。

ii) Papanicolaou 染色による観察

a. 12時間後：細胞質に空胞をみ，核縁は薄く円滑，核内は粗網状でこれにそつて少数の凝集塊をみた。

b. 1日後および2日後：細胞質の空胞は増多，増大，核の周囲がぬけてみえた。核縁もやや厚く，所々に凝集塊の付着をみた。核内の凝集塊が増多した。

c. 4日後：細胞径は縮小，細胞質の辺縁は不規則，核縁はさらに不均等に肥厚し一部に断裂をみた。核内の網状構造は減少し大小の顆粒が増多した。

d. 7日後：細胞径はさらに縮小，細胞質の辺縁もさらに不規則になった。核は円形化，核縁は厚く明瞭，核内は顆粒状のものが多かった。

e. 14日後および21日後：細胞質は崩壊状，核径は著明に縮小，核内は顆粒状のものが多かったが，核縁，核小体ともに不明瞭で濃縮状あるいは破碎状のものもあつた。

f. 28日後：細胞質は形を保つものが多かった。核は濃縮状あるいは淡濁状のものが多かった。

iii) Feulgen 反応による観察

a. 12時間後：核縁は薄く円滑，核内は網状でごく少数の凝集塊をみた。

b. 1日後：核縁および核内の網状構造にそつて凝集塊の増多をみた。

c. 2日後：核縁および核内の凝集塊はさらに増多し，核縁は不均等に肥厚した。

d. 4日後：核縁が断裂するものもあつた。核内の凝集塊は増多，増大した。

e. 7日後：核は円形化，核縁の断裂が著しかった。核内の粗網状構造が不明瞭になり顆粒状のものが多かった。

f. 14日後：核縁は薄く不明瞭，核内は顆粒状あるいは粗網状のものが多かった。

g. 21日後：核径の縮小が著明，核内は顆粒状あるいは粗網状のものもあつたが，濃縮状のものが多くなった。

h. 28日後：多くは核縁，核小体ともに不明瞭，濃縮状，淡濁状あるいは破碎状になった。

4. DNA 量の変化 (Fig.11)

1) 採取直後の細胞

2C, 4C, 8C に相当するピークをみた。

2) 37°C に保存した細胞

a. 1時間後，3時間後，6時間後および12時間後：採取直後の細胞のヒストグラムと著変はなかった。

b. 1日後：各ピークをみたが，DNA 量の減少する細胞をみた。

c. 2日後および4日後：各ピークをみたが，全体に

DNA 量の減少をみ、ヒストグラムは左方へ移動した。

d. 7日後：ヒストグラムで各ピークを認め難くなった。

e. 14日後、21日後および28日後：各ピークはなく、DNA量はさらに減少し殆んど細胞は2C相当以下になった。

3) 20°Cに保存した細胞

a. 12時間後および1日後：採取直後の細胞のヒストグラムと著変をみなかった。

b. 2日後：各ピークをみたが、DNA量の減少する細胞をみた。

c. 4日後および7日後：各ピークをみたが、DNA量は全体に減少し、ヒストグラムの左方への移動をみた。

d. 14日後：DNA量はさらに減少し、ヒストグラムで各ピークを認め難かった。

e. 21日後および28日後：各ピークを認め難く、殆んど細胞のDNA量は2C相当以下になった。

4) 4°Cに保存した細胞

a. 12時間後、1日後、2日後および4日後：採取直後の細胞のヒストグラムと著変をみなかった。

b. 7日後：各ピークをみたが、DNA量の減少する細胞をみた。

c. 14日後および21日後：DNA量は全体に減少、ヒストグラムの左方への移動をみた。

d. 28日後：DNA量はさらに減少、各ピークを認め難かった。

考 察

1. 細胞死の観察

1) 細胞の変性と erythrosin B による色素排泄能について

従来より、細胞の生死の判定に色素排泄能が用いられ、trypan blue⁴⁾、lissamine green⁶⁾、neutral red¹⁹⁾²⁰⁾、acridine orange²¹⁾、eosin²²⁾、erythrosin B²³⁾²⁴⁾、nigrosin²⁵⁾などの色素による細胞質あるいは核のび漫性染色をもって細胞の死と判定している。今回の実験では erythrosin B を用い、経時的に viability を検討した。今回は形態学的変化と色素排泄試験を同一の細胞について検討していないので両者の厳密な対比は困難であるが、経時的变化の形態学的所見を組み合わせると、位相差顕微鏡像では細胞辺縁より水泡状突起が出現し核内が均質化する時期、Papanicolaou 染色所見では細胞質辺縁が不整になり核内構造は粗顆粒状の細胞が多くなる時期(いずれも 37°C に保存して 1 ないし 2 日後)にほぼ一致して色素排泄能の低下した細胞が急増し、次いで、細胞質が崩壊し核が濃縮状あるいは淡濁状になる時期(37°C に保存で 7 日後)に一致して、殆んど細胞の色素排泄能が消失する。DNA 量の変化と色素排泄能を対比すると、DNA 量がやや減少する時期にほぼ一致して色素排泄能を失った細胞が著増し、ヒストグラムで 2C、4C、8C などの各ピークがなくなる時期には、殆んど細胞は色素排泄能を失っている。

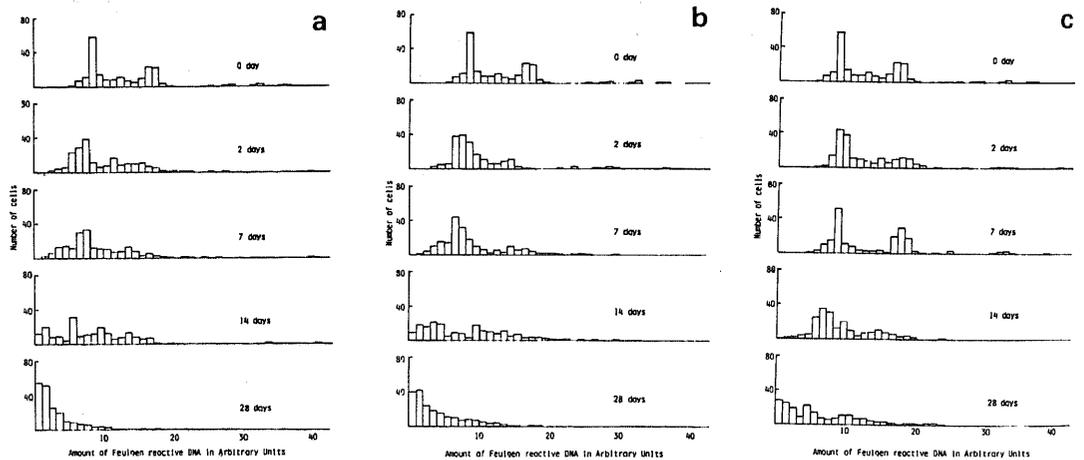


Fig. 11. Sequential change in Feulgen reactive DNA observed by microdensitophotometry of reticulum cell sarcoma cells of lymphnode from pleural fluid.

a: kept at 37°C b: kept at 20°C c: kept at 4°C

色素排泄能の消失の時期は、正常細胞と腫瘍細胞の間で、あるいは組織型の違いによっても差違がなく、むしろ今回検討した扁平上皮がんの2例の間で色素排泄能消失の時期にかなりの相違をみたように (Fig.1.d.e) 同じ組織型に属する細胞でも、体腔での状態 (体腔液の性状など) や、採取時の条件の違いなどによる影響が大きいと考えられる。

温度による影響については、低温に保存すれば viability は長期間にわたり保たれ、Vinegar¹⁵⁾、Lewiss¹⁹⁾、Belkin²⁰⁾、Tullis²⁶⁾、Craven²⁷⁾らの報告と同様の結果を得た。

細胞の生死の判定については、色素排泄能のほか細胞の形態¹⁶⁾²⁰⁾²⁹⁾、運動機能²⁶⁾、代謝¹⁴⁾¹⁶⁾²⁴⁾³⁰⁾、成長能ないし移植能¹⁵⁾²⁷⁾などについての報告があり、これらの所見と色素排泄能の関係についての検討も行なわれている。細胞の色素排泄能と形態学的所見の比較は位相差顕微鏡によるものが多く、Schrek²⁸⁾はX線照射を行なったウサギのリンパ球を37°Cに保存し、20時間後に核のpyknosisおよびsecondary vacuoleの出現とともに eosin や safranin で染色されるとし、Holmberg¹⁶⁾は lissamine green で染色される時期には細胞質の崩壊と顆粒化をみると述べ、中村²⁹⁾はエールリッヒ腹水がん細胞で、細胞質より水泡突起が出現し核が均質化する時期に、erythrosin B により細胞質および核がびまん性に染色されたと報告し、いずれも今回の実験で得た結果とほぼ一致する。

細胞の死に至る過程については、Majno¹⁷⁾、Trump¹⁸⁾、Lewis¹⁹⁾、中村²⁹⁾、King³¹⁾、Bessis³²⁾らの報告をみる。Lewis¹⁹⁾はラットのいろいろの組織の細胞について neutral red により細胞の死を観察し、死の定義として1) 顆粒や空胞からの色素の消失、2) 細胞質および核のびまん性染色、3) 核膜の明瞭化および核、細胞質の性状の変化、をあげている。King³¹⁾は cell death について述べ、酵素の生合成、エネルギーの産生、形態学的変性の修復、イオン環境の維持の4つの機能のうち1つが障害されると直ちに他の3つの機能に影響を及ぼし細胞死に至ると述べている。Majno¹⁷⁾はラットの肝細胞で、細胞の変性を形態、蛋白量、酸素消費量、pH の変化などについて検討し、細胞死の時期には形態学的変化を殆んどみないと報じている。Bessis³²⁾はリンパ球を位相差顕微鏡で観察し、細胞質のゲル化、核膜の空胞化による断裂、核内のクロマチンパターンの不明瞭化を生じる時期に“period-of-no-return”となり、色素に染色され cell death に至ると述べている。Trump¹⁸⁾はラットの腎細胞の変性過程を

Stage 1~7に分け、Stage 4即ち、“period-of-no-return”の時期に細胞膜の破壊で透過性に変化を来とし、次いで色素の取り込みや各種酵素の放出が起こるとし、細胞膜の変化の重要性を述べている。また中村²⁹⁾は細胞死の形態学的所見として、細胞辺縁の水泡状突起の出現を挙げている。以上のように、細胞死の定義は細胞の機能や性状などについて述べられているが、いずれも決定的な基準とはいえない。

Tullis²⁶⁾は、白血球を保存すると eosin での色素排泄能は保たれていながら、貪食能やアメーバ運動がみられなくなると報じ、Scaife²⁴⁾やBoeryd³⁰⁾は、細胞が色素排泄能を有している時期にも、radioisotope を label した物質の取り込みがみられなくなったと報告している。さらに、Vinegar¹⁵⁾、Craven²⁷⁾らは、細胞の色素排泄能が保たれていても増殖能あるいは移植能を失っていることがあるので、色素排泄能は viability を示す指標にならないと述べている。しかし、cell death は多くの現象が相互に関連しながら起こる一つの連続した過程であり、観察所見あるいは検査結果はその過程の一時期の現象をとらえていると考えれば、所見や結果に若干のずれをみるのはむしろ当然といえよう。色素排泄能も生きている細胞がもっている一つの機能であり、色素排泄試験は細胞の障害の程度を知る一つの有力な方法であるが、上述のように色素排泄能のみで細胞の生死を判定するには問題があろう。

2) 細胞の変性と細胞の分裂能および高分子物質合成能について

³Hを用いる autoradiography 法、特に³H-thymidine による核 DNA の標識は腫瘍の細胞回転の研究に使用されている。Clarkson³³⁾や小川³⁴⁾はヒトの胸腔あるいは腹腔に³H-thymidine を投与し、胸・腹水中の腫瘍細胞の L.I. を測定し、胃がん細胞 27~38%、子宮がん細胞 11~40%、肺がん細胞 31~33%と報じている。Nordenskjöld³⁵⁾は、ヒトの腫瘍組織から針生検で得た腫瘍細胞について in vitro で autoradiography 法により L.I. を測定し、乳がん 0.03~14.8%、甲状腺がん 0.7%、悪性黒色腫 1.7~4.1%、前立腺がん 0.9~2.7%と報じている。今回の実験に使用したヒトの体腔液の細胞では、採取直後の³H-TdR.L.I. は漿膜細胞 11.5%、2例の腺がん細胞では 6.1%と 6.2%、2例の扁平上皮がん細胞では 13.0%と 4.7%、小細胞がん細胞 5.8%、細網肉腫細胞 28.1%であった。

³H-uridine は RNA の標識物質で、細胞に取り込まれることは蛋白合成の行なわれていることを示す³⁶⁾。

今回の実験で、採取直後の細胞の $^3\text{H-UdR.L.I.}$ は漿膜細胞68.4%、2例の腺がん細胞では89.3%と66.6%、2例の扁平上皮がん細胞では76.8%と25.0%、小細胞がん細胞39.2%、細網肉腫細胞94.4%であり、前述の色素排泄能を有する細胞の百分率と比べてかなりの低値を示した。

細胞のviabilityの判定に $^3\text{H-thymidine}$ や $^3\text{H-uridine}$ の取り込みの有無を利用した報告はみられなかった²⁴⁾³⁰⁾³⁷⁾、細胞の変性過程で経時的に測定した報告はみだし得なかった。今回の実験で得た結果では、経時的にみた $^3\text{H-TdR.L.I.}$ および $^3\text{H-UdR.L.I.}$ は組織型の違いによる差違はなく、 $^3\text{H-TdR.L.I.}$ が0%になるのは、37°Cの保存で1~2日後、20°Cで2~4日後、4°Cでは2~7日後であった。 $^3\text{H-UdR.L.I.}$ が0%になるのは、37°Cの保存で2日後、20°Cで2~4日後、4°Cでは4~7日後であった。いずれも色素排泄能の消失する時期に比べて、より早期に細胞分裂能や蛋白など高分子物質合成能の低下を来たすことを示した。

2. 細胞の変性過程

1) 形態学的変化について

細胞の変性過程を形態学的に観察した報告は多く、動物材料ではMajnoら¹⁷⁾、飯島³⁸⁾、堤³⁹⁾、Gondos⁴⁰⁾らが組織切片について、吉田¹²⁾、金島⁴¹⁾、中村⁴²⁾らは遊離細胞について検討している。ヒトの材料では遊離細胞について検討したものが多く、辻谷⁴³⁾、田村ら⁴⁴⁾らは変性過程を詳細に検討しているがいずれも一種類の細胞についての報告である。ヒトの正常細胞と腫瘍細胞の間および腫瘍細胞の組織型の違いによる変性過程の差違については、田嶋ら²⁾、竹中ら³⁾、谷田¹³⁾、西亀⁴⁵⁾、片柳⁴⁶⁾、武田ら⁴⁷⁾、安藤⁴⁸⁾、宮本⁴⁹⁾らの報告をみる。

今回検討したヒトの体腔から採取した直後の比較的新鮮な細胞では、漿膜細胞、腫瘍細胞ともに、核の所見で核縁は菲薄円滑、核内には核小体と少数の細顆粒状の凝集塊をみるほかは特別の構造をみなかった。吉田¹²⁾、飯島³⁸⁾、中村⁴²⁾、片柳⁴⁶⁾らは新鮮な細胞の核はほぼ均質無構造であると報告しているが、ヒト体腔液の細胞でも同様の結果を得た。腫瘍細胞、特に扁平上皮がん細胞や細網肉腫細胞では核形の不整が目立ち、細胞質は腺がん細胞では採取直後でも既に光輝性顆粒の出現や空胞形成などの変性所見をみた。

ヒト体腔液の細胞を経時的に観察し、細胞質の変性過程では良性、悪性による差違を認め難く、組織型にもとずく差違を認めた。即ち、腺がん細胞では細胞質の空胞は採取直後より認められ、37°C保存では12時間後に細胞縁が不規則になり、7日後に細胞質の崩壊

をみた。小細胞がん細胞もほぼ同様の変化を呈した。これに対し扁平上皮がん細胞の位相差顕微鏡所見では37°Cで12時間後より細胞質に空胞をみたが、Papanicolaou染色標本では空胞を認め得ず、14日後に細胞縁が不整になったが28日後でもなお細胞質は良く保たれた。漿膜細胞では扁平上皮がん細胞とほぼ同様の変化をみた。細網肉腫細胞の細胞質の変性は扁平上皮がん細胞よりも早い、腺がん細胞よりは遅かった。

一方、核では組織型による変性過程の差違を殆んど認めなかった。腺がんの37°C保存では3時間後より核縁、核小体縁へのクロマチンの凝集が目立ち核縁は不均等に肥厚、核内の粗大凝集塊が増多し不均等に分布した。12時間後には核径の縮小、核縁の断裂をみた。1~2日後に位相差顕微鏡所見では核内の均質化をみたが、Papanicolaou染色およびFeulgen反応標本では粗顆粒状を呈していた。4日後には核縁および核小体が不明瞭になり、なかには濃縮状の核もみられた。7~14日後に位相差顕微鏡所見では核は大小不同の凝集塊が集まったように見え、Papanicolaou染色およびFeulgen反応標本では濃縮状、淡濁状あるいは破碎状のものが多くなった。21~28日後に核は淡濁状または不染のものが多くなった。核の所見は症例により多少の差はあるも変性過程に本質的な差違はなく、組織型のいかにかわらず経時的にはほぼ類似の変性所見を呈した。

核小体は時間の経過とともに同形のまま縮小した。即ち、腺がん細胞では円形のまま、扁平上皮がん細胞では不整形のまま小形化し、やがて核内が濃縮状または淡濁状になるに伴い核小体は不明瞭になった。

以上のように、腺がん細胞、小細胞がん細胞および細網肉腫細胞では細胞質と核の変性がほぼ併行して認められるのに対し、扁平上皮がん細胞および漿膜細胞では核の変性が細胞質の変性に先行して認められた。安藤⁴⁸⁾は口腔領域の種々の細胞を干涉位相差顕微鏡で観察し、腺がん細胞では核小体消失、核膜消失などの核の変性と細胞質の崩壊が併行しておこなうが、扁平上皮がん細胞では核の崩壊が先行するとし、今回の実験ではこの報告と同様の結果を得た。変性に要する時間は、扁平上皮がん細胞では本実験の結果とほぼ一致する成績を報じているが、腺がん細胞は室温で核の崩壊が1.5~6時間後に、細胞質の崩壊が3~6時間後に起こるとし、本実験で得た20°C保存で7日後に崩壊した結果と比べかなりの相違をみる。片柳⁴⁶⁾は胃の剥離細胞で核と細胞質の変性について検討し、核の崩壊ないし融解の後に核小体が崩壊あるいは消失し最後に細

胞質が崩壊すると報告している。

良性細胞と悪性細胞の変性の相違について、安藤⁴⁸⁾は悪性細胞の変性が遅いとし、西亀⁴⁵⁾は胸・腹水中の細胞で、谷田¹³⁾は腹水中の細胞でいずれもがん細胞は漿膜細胞より変性が遅れると報告し、がん細胞では細胞質の変性が核のそれに先行するものが多かったと述べ、片柳⁴⁶⁾は胃の剥離細胞で良性細胞の変性が悪性細胞の変性より早くおこるとしている。これに対し武田⁴⁷⁾は子宮頸部より採取した細胞で悪性細胞は良性細胞より変性が大きく早かったと報じており必ずしも意見の一致をみていない。本実験結果では、細胞の変性の遅速は良性、悪性に関係なく、組織型の違いにより細胞質の変性の過程や速さに差をみたが、核では差がないとの結果を得た。観察の対象とした細胞の採取時での寿命もまちまちであり、採取時や採取後の条件もまた複雑であり、にわか結論を得ることは困難であろう。

細胞の変性を検討するには環境の一部を一定にして変性過程を比較するのも一方法であり、本実験では細胞の保存温度を一定に保ち、それぞれの温度の変性への影響を検討した。その結果は細胞を低温に保てば変性は遅く、例えば 37°C に保存した細胞の 1 日後の所見は、20°C に保存した 2～4 日後あるいは 4°C に保存した 7 日後の所見にほぼ一致した。低温に保存した細胞の変性が遅くなるとの報告は吉田¹²⁾、谷田¹³⁾、堤³⁹⁾、中村⁴²⁾、西亀⁴⁵⁾、安藤⁴⁸⁾、Cruickshank⁵⁰⁾ など多くをみる。細胞の変性は autolysis 即ち "process of cellular self digestion"⁵¹⁾ を基本にするので、低温では細胞内の酵素活性が低下し autolysis が抑制されることが考えられる。今回の成績からヒトの胸・腹水中の細胞の細胞質、核縁、核内構造、核小体等を十分に観察できる検体保存の許容時間は、37°C では 12 時間、20°C では 2 日間、4°C では 4 日間程度であり、西亀⁴⁵⁾ の胸・腹水についての報告とほぼ一致する。

田嶋²⁾、竹中³⁾ の報告にみる様に、Papanicolaou が malignancy の所見とした核膜の変性・肥厚・厚薄不整、クロマチンの凝集化・粗大化・分布の不均等などは悪性細胞に特有のものではなく、良性細胞でも変性過程の所見としてみられ、悪性細胞ではこれらの変化のうち特にクロマチンの分布の不均等などの所見がより顕著になり、37°C の保存で 3 時間の所見が最も悪性細胞らしくなった。

2) DNA 量の変化について

DNA 量の測定には、生化学的測定法と細胞化学的測定法があり、Leuchtenberger^ら^{52)~54)} 吉田¹²⁾ らは両者の測定値がほぼ一致することを報じている。DNA 量

の細胞化学的計測での Feulgen 反応はその染色機構が明らかであり、固定、染色等の条件に問題がなければ特異的との評価も定まり⁵⁵⁾⁵⁶⁾ 広く用いられている。測定法は、Caspersson⁵⁷⁾ の紫外顕微分光法の原理を応用した顕微分光測光法が開発され核内 DNA 量を正確に測定できるようになった⁵⁸⁾。本法は相対的定量法で DNA 量と細胞数からヒストグラムを作製でき、多くの研究者により正常細胞や腫瘍細胞のヒストグラムが作製され⁵⁹⁾⁶⁰⁾、これらの結果をがんの判定に応用する研究も行なわれている⁶¹⁾⁶²⁾。

細胞の変性過程での DNA 量の変化についての報告は多く、生化学的に測定したものとしては、Berenbom^ら⁶³⁾、Vendrey^ら¹¹⁾、Klein^ら⁶³⁾、Taft⁶⁴⁾、Lancker^ら⁶⁵⁾ の報告があり、Feulgen reactive DNA 量を顕微分光測光したものである。Leuchtenberger⁶⁾、Alfert⁷⁾、吉田¹²⁾、James⁶⁶⁾、光野^ら⁶⁷⁾ の報告がある。

今回の実験成績で、変性過程での DNA 量の減少は、細胞の良性、悪性あるいは組織型の違いによる差を認めず、形態学的観察で変性による核の形態の変化に細胞の種類の違いによる差をみなかった結果に一致している。

細胞を 37°C に保存した場合、12 時間後は採取直後の DNA 量と著変なく、1 日後に一部の細胞の DNA 量が減少、2 日後に殆んど細胞の DNA 量が減少、7 日後には殆んど細胞の DNA 量が 2C 以下に減少しヒストグラムで各ピークを認め難くなった。細胞の保存温度を 20°C、4°C と低温にするにつれ、細胞の変性による DNA 量の減少は遅くなり、4°C 保存では 7 日後に DNA 量の減少が始まり、28 日後にヒストグラムの各ピークが消失した。この結果を核の形態学的所見と対比すると、核内構造が粗顆粒状、細網状あるいは粗網状で、クロマチンの凝集塊が増多しその分布が不均等になる時期までは DNA 量は減少せず、核縁および核内の網状構造が断裂する時期に一致して DNA 量の減少が始まる。細胞の種類を異にするが、吉田¹²⁾ はマウスのエールリッヒ腹水がん細胞でほぼ同様の結果を報じている。次いで核内が粗顆粒状になる時期にほぼ一致して DNA 量の減少が明らかになり、核が濃縮状、破碎状あるいは淡濁状になると DNA 量はさらに減少した。

細胞の変性過程での DNA 量の減少の程度は報告者による差が大きく、Leuchtenberger⁶⁾ は移植した Sarcoma 180 で pycnosis I (核内が顆粒状) では DNA 量に著変なく、pycnosis II (濃縮状) では DNA 量は約 1/2 に減少、pycnosis III (淡濁状) では

約 1/3 に減少するとしているが変性過程での形態学的所見と DNA 量の関係については本実験での結果とほぼ一致する成績を報じている。また Alfert⁷¹ はモルモットの卵細胞について検討し pycnosis の状態で DNA 量の減少をみるとし、James⁶⁶¹ は虚血肝では結紮後 60 ~ 90 分で不可逆的の傷害におちいり、核は融解状態で DNA 量は 20 ~ 80 % に減少すると報告している。しかし、Berenbom ら⁸¹ はマウス肝細胞で、Vendrely ら¹¹¹ は仔牛の腎細胞で検討し、いずれも pycnosis の状態でも DNA 量は減少しないと報じている。

変性過程での DNA 量の減少に及ぼす温度の影響について、Lancker ら⁶⁵¹ はマウス肝細胞を 37°C に保存、DNA 量はその後より減少し 1 日後に 50 %、2 日後には 20 % に減少すると報じている。これに対し Kasten⁶⁸¹ はエールリッヒ腹水がん細胞で 37°C 保存では 36 時間後までは DNA 量に著変をみないが、48 時間後には殆んど細胞の DNA 量が消失、60 時間後に全ての細胞の DNA 量が 0 になり DNA 量の減少が極めて急速に起こるとしている。Taft⁶⁴¹ はラット肝細胞を 25°C に保存し 6 時間後までは DNA 量の減少をみないと報じている。細胞を低温に保存した実験結果について、Klein ら⁶³¹ はエールリッヒ腹水がん細胞を 4°C に保存し 9 日後でも DNA 量の減少はないと報じ、吉田¹²¹ もエールリッヒ腹水がん細胞の 4°C 保存では、37°C 保存に比べて DNA 量の減少が遅れると報じている。今回の実験ではヒトの細胞についてもほぼ同様の結果を得た。なお吉田¹²¹ はエールリッヒ腹水がん細胞で 4°C 保存は各細胞の間での変性程度の差が少なく長期間で DNA 量の減少をみるにも拘らず、なおヒストグラムで 2C、4C、8C などの各ピークを認め、37°C 保存で DNA 量の減少とともに各ピークを認めなくなる変性過程との違いを指摘している。しかし、今回のヒト細胞での実験結果からは、低温に保存した場合は 37°C 保存に比べて変性が遅れるだけで、保存温度による各細胞間の変性の程度の差は見出し得なかった。

ヒトの細胞の変性過程での DNA 量の検討は光野⁶⁷¹ が胃癌の剥離細胞と正常リンパ球について DNA 量を 6 時間後まで測定し、両者とも時間の経過とともに漸減し、減少の程度に差を認めなかったと報じている。今回の体腔液の細胞での実験結果では、37°C 保存で 6 時間後までは DNA 量の減少を認めず光野らの成績と一致をみないが、腫瘍細胞と正常細胞の間で DNA 量の減少の程度には差がないという点に関しては一致をみた。

細胞診はがんの早期発見に不可欠の検査方法であり特に子宮がんの集団検診では第一次スクリーニング法として重要視されている。その目的のためには多数の検体を短時間で処理する必要があり、細胞診の自動化に関する研究が進められている⁴¹⁵¹。現在わが国の自動化装置はいずれも核の染色量あるいは核の構造を指標として開発されており⁴¹⁶⁹¹⁷⁰¹、検体採取法⁷¹¹、検体保存法⁵¹⁷²¹、標本作製法⁷³¹の確立も重要で、これらに関連して変性による核の DNA 量を含む染色量や形態学的所見の変化についての検討も必要となっている。本実験の結果から、検体保存の許容時間として、形態学的観察には、37°C 保存で 12 時間、20°C で 2 日間、4°C では 4 日間程度と考えられ、DNA 量の測定には、37°C 保存で 2 日間、20°C で 4 日間、4°C では 7 日間程度と考えられる。しかし、本実験は多数の腫瘍細胞を含む胸・腹水を選び無菌的に保存して行なったものであり、実際の細胞診に供する臨床材料では、検体の採取時にすでに変性の程度の異なる細胞が混在し、細胞の保存に大きい障害となる細菌や粘液などが含まれており、本実験結果とはかなりの相違をみることは否めない。

結 論

ヒトの胸・腹水中の漿膜細胞および腫瘍細胞の細胞死および経時的変性過程を erythrosin B による色素排泄能、³H-thymidine および³H-uridine による高分子物質合成能により検討するとともに、形態学的変化を位相差顕微鏡、Papanicolaou 染色および Feulgen 反応標本により観察し、さらに Feulgen 反応標本により DNA 量を測定し、以下の結果を得た。

1. 色素排泄能、分裂能および高分子物質合成能の消失は、細胞の変性のごく初期、即ち細胞死に関係ある時期の変化と考えられた。

2. 採取直後の比較的新鮮な腺がん細胞および小細胞がん細胞では、細胞質に光輝性顆粒のほか小空胞形成などの変性所見を認めたが、核は漿膜細胞および腫瘍細胞のいずれも核縁は菲薄円滑、核内には核小体および少数の凝集塊をみるにすぎなかった。

3. 変性過程での各種の所見は正常細胞と腫瘍細胞との間で、あるいは細胞の属する組織型の間で本質的差違を認め得なかった。特に核では、いずれの種類の細胞でもほぼ同様の変性過程を示した。細胞質の変性は、腺がん細胞および小細胞がん細胞では比較的に早く、核の変性とほぼ併行してみられたのに対して、扁平上皮がん細胞および漿膜細胞では遅く、核の変性が細胞質のそれに先行してみられた。

4. 細胞の変性過程での DNA 量の変化は上記の形態学的観察結果でも述べたように、細胞の種類の違いによる核の変化の差違のないのに一致して、良性と悪性あるいは組織型の違いによる差違をみなかった。

5. 核の形態学的所見と DNA 量の変化の対比では、核内のクロマチン構造が均質無構造あるいは細顆粒状、細ないし粗網状の時期では DNA 量の減少がなく、粗顆粒状を呈する時期に DNA 量が減少、さらに核が濃縮状、破碎状あるいは淡濁状の時期には DNA 量はさらに減少した。

6. 保存温度が細胞の変性に及ぼす影響は極めて大きく、低温では変性過程の明らかな遅延を認めた。

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜った服部絢一教授、ならびに本研究に対し直接の御指導を賜った金沢大学医療技術短期大学部谷本一夫教授と御助言をいただいた研究室の各位に深く感謝いたします。

本研究の一部は厚生省がん研究助成金、(研究課題番号51-2班長：天神美夫)によりなされた。記して感謝の意を表します。

文 献

- 1) Papanicolaou, G. N. : Atlas of Exfoliative Cytology, 4th ed., p.13-21, Cambridge, Harvard Univ. Press, 1963.
- 2) 田嶋基男・山岸紀美江・渡部庸一・多賀須幸男 : クロマチン形態から見た癌細胞の変性-細胞診断学との関連を中心に-. 診断と治療, 56, 305 - 321 (1968).
- 3) 竹中正治・谷田 秀・宗像雅文・佐々木義夫 : 剥離胃癌細胞の変性について. 日臨細胞誌, 8, 56 - 65 (1969).
- 4) 岸上義彦・野田 定・桜宮正子・服部正次・橋本良夫・宮脇一男 : 細胞診の自動化. 日臨, 12, 2944 - 2952 (1969).
- 5) 田中 昇・池田栄雄・上野哲夫・高橋正宜・浦部幹雄・川又国土・今里悠一・渡辺貞一・米山恒雄・須田昌夫・玄地 宏・的崎 健・榎田良精 : 細胞診断自動化のための基礎的データ収集. 解析と自動化装置の試作. 臨病理, 21, 757 - 768 (1973).
- 6) Leuchtenberger, C. : A cytochemical study of pycnotic nuclear degeneration, Chromosoma, 3, 449 - 473 (1950).
- 7) Alfert, M. : Changes in the staining capacity of nuclear components during cell degeneration. Biol. Bull., 109, 1 - 12 (1955).
- 8) Berenbom, M., Chang, P. I., Betz, H. E. & Stowell, R. E. : Chemical and enzymatic changes associated with mouse liver necrosis in vitro. Cancer Res., 15, 1 - 5 (1955).
- 9) Berenbom, M., Chang, P. I. & Stowell, R. E. : Changes in mouse liver undergoing necrosis in vitro. Lab. Invest., 4, 315 - 323 (1955).
- 10) Chang, J. P., Stowell, R. E., Betz, H. E. & Berenbom, M. : Histochemical studies of necrosis of mouse liver in vitro. Arch. Path., 65, 479 - 487 (1958).
- 11) Vendrely, R., Alfert, M., Matsudaira, H. & Knobloch, A. : The composition of nucleohistone from pycnotic nuclei. Exp. Cell Res., 14, 295 - 300 (1958).
- 12) 吉田 喬 : がん細胞の変性過程の研究-エールリッヒ腹水がん細胞の DNA 量と形態との対比-. 十全医会誌, 87, 458 - 480 (1978).
- 13) 谷田 秀 : 癌性腹水中に出現する各種細胞の変性に関する研究. 米子医誌, 20, 486 - 504 (1969).
- 14) Hoskins, J. M., Meynell, G. G. & Sanders, F. K. : A comparison of methods for estimating the viable count of a suspension of tumor cells. Exp. Cell Res., 11, 297 - 305 (1956).
- 15) Vinegar, R. : Metachromatic differential fluorochroming of living and dead ascites tumor cells with acridine orange. Cancer Res., 16, 900 - 906 (1956).
- 16) Holmberg, B. : On the permeability to Lissamine green and other dyes in the course of cell injury and cell death. Exp. Cell Res., 22, 406 - 414 (1961).
- 17) Majno, G., La Gattuta, M. & Thompson, T. E. : Cellular death and necrosis : chemical, physical and morphologic changes in rat liver. Virchows Arch. Pathol. Anat., 333, 421 - 465 (1960).
- 18) Trump, B. F., Laiho, K. A., Mergner, W. J. & Arstila, A. U. : Studies on the subcellular pathophysiology of acute lethal cell injury. Beitr. Pathol., 152, 243 - 271 (1974).
- 19) Lewis, W. H. & McCoy, C. C. : The survival of cells after the death of the organism. Bull. Johns Hopkins Hosp., 33, 284 - 293 (1922).
- 20) Belkin, M. & Shear, M. J. : Chemical studies on tumor tissue IV. The staining with neutral

- red of fresh preparations of mouse tumor cells. *Am. J. Cancer*, **29**, 483-498 (1937).
- 21) **Strugger, S.** : Die Vitalfluorochromierung des Protoplasmas. *Naturwissenschaften*, **34**, 267-273 (1947).
- 22) **Hanks, J. H. & Wallace, J. H.** : Determination of cell viability. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **98**, 188-192 (1958).
- 23) **Phillips, H. J. & Terryberry, J. E.** : Counting actively metabolizing tissue cultured cells. *Exp. Cell Res.*, **13**, 341-347 (1957).
- 24) **Scaife, J. F. & Vittorio, P. V.** : The use of chromium-51 as a sensitive quantitative criterion of early radiation damage to rat thymocytes. *Can. J. Biochem.*, **42**, 503-512 (1964).
- 25) **Kaltenbach, J. P., Kaltenbach, M. H. & Lyons, W. B.** : Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells. *Exp. Cell Res.*, **15**, 112-117 (1958).
- 26) **Tullis, J. L.** : Preservation of leukocytes. *Blood*, **8**, 563-575 (1953).
- 27) **Craven, C.** : The survival of stocks of Hela cells maintained at -70°C . *Exp. Cell Res.*, **19**, 164-174 (1960).
- 28) **Schrek, R. & Otto J. N. Jr.** : Study of the death of irradiated and nonirradiated cells by time-lapse cinemicrography. *Arch. Pathol.*, **53**, 363-378 (1952).
- 29) 中村 忍・吉田 喬・服部 絢一・谷本 一夫 : 細胞の死に至る過程の形態学的研究. *最新医学*, **32**, 165-169 (1977).
- 30) **Boeryd, B., Eriksson, O., Knutson, F., Landin, P. M. & Norrby, K.** : On the viability of tumour cells in artificially produced suspensions. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **65**, 514-520 (1965).
- 31) **King, D. W., Paulson, S. R., Puckett, N. L. & Krebs, A. T.** : Cell death IV. The effect of injury on the entrance of vital dye in Ehrlich tumor cells. *Am. J. Pathol.*, **35**, 1067-1079 (1959).
- 32) **Bessis, M.** : Cell death. *Triangle*, **9**, 191-199 (1970).
- 33) **Clarkson, B., Ota, K., Ohkita, T. & O'Connor, A.** : Kinetics of proliferation of cancer cells in neoplastic effusions in man. *Cancer*, **18**, 1189-1213 (1965).
- 34) 小川一誠 : 癌細胞の細胞回転. *現代医学*, **20**, 359-365 (1973).
- 35) **Nordenskjöld, B., Zetterberg, A. & Löwhagen, T.** : Measurement of DNA synthesis by ^3H -Thymidine incorporation into needle aspirates from human tumors. *Acta Cytol.*, **18**, 215-221 (1974).
- 36) **Fitzgerald, P. J. & Vinijchaikul, K.** : Nucleic acid metabolism of pancreatic cells as revealed by Cytidine- H^3 and Thymidine- H^3 . *Lab. Invest.*, **8**, 319-329 (1959).
- 37) 飯塚保夫・佐々木義夫・金島新一・阿部重郎・谷田 理・竹内 隆・岸本宏之・古賀成昌 : 胃漿膜癌浸潤と腹腔内遊離癌細胞. *日臨細胞誌*, **16**, 218-223 (1977).
- 38) 飯島宗一 : 海嶺肝細胞核の自己融解並びにその知見を中心とする細胞核の形態学的構造に関する知見補遺. *名古屋医学*, **69**, 294-323 (1955).
- 39) 堤 鎮男 : 細胞変性ならびに再生に関する電子顕微鏡的研究 1. 正常マウス肝細胞の微細構造ならびにその自家融解的变化. *札幌医誌*, **18**, 109-116 (1960).
- 40) **Gondos, B.** : Cell degeneration : Light and electron microscopic study of ovarian germ cells. *Acta Cytol.*, **18**, 504-509 (1974).
- 41) 金島新一 : Ehrlich 腹水癌細胞の変性に関する走査電子顕微鏡的研究. *米子医誌*, **25**, 433-447 (1974).
- 42) 中村 忍 : がん細胞の変性過程における形態学的研究-エールリッヒ腹水がん細胞の核の変性過程について-. *十全医会誌*, **83**, 749-774 (1974).
- 43) 辻谷賢三 : 位相差顕微鏡による遊離胃癌細胞の形態に関する実験的研究. *米子医誌*, **10**, 150-172 (1959).
- 44) 田村 宏・中野俊一・中村義文・渡辺善正 : 剥離胃癌細胞の位相差顕微鏡所見と染色所見との比較検討. *日臨*, **26**, 1234-1239 (1968).
- 45) 西亀元視 : 諸種細胞診被検材料の処理について. 第1報, 被検材料採取後塗沫実施までの時間の検討. *広島医学*, 別刊号, **16**, 1-14 (1963).
- 46) 片柳照雄 : 位相差顕微鏡による胃剥離細胞の形態学的研究. 第2報, 胃剥離細胞の経時的変化, 変性過程について. *日消会誌*, **66**, 1457-1467 (1969).
- 47) 武田 敏・貝田豊郷 : 剥離細胞の変化, 変性お

- よびその診断に関する諸問題(会). 日臨細胞誌, 7, 54-55 (1968).
- 48) 安藤和雄: 干渉位相差顕微鏡による口腔領域各種新鮮細胞の細胞学的研究. 日臨細胞誌, 8, 1-23 (1969).
- 49) 宮本 宏: 肺癌の直接採取細胞と喀痰中癌細胞の形態学的差異について. 日臨細胞誌, 12, 90-103 (1973).
- 50) Cruickshank, J.: The histological appearances occurring in organs undergoing autolysis. *J. Path. Bact.*, 16, 167-184 (1912).
- 51) Jacoby, M.: Ueber die fermentative Eiweisspaltung und Ammoniakbildung in der Leber. *Z. physiol. Chem.*, 30, 149-173 (1900).
- 52) Leuchtenberger, C., Vendrely, R. & Vendrely, C.: A comparison of the content of desoxyribonucleic acid (DNA) in isolated animal nuclei by cytochemical and chemical methods. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 37, 33-38 (1951).
- 53) Leuchtenberger, C., Klein, G. & Klein, E.: The estimation of nucleic acids in individual isolated nuclei of ascites tumors by ultraviolet microspectrophotometry and its comparison with the chemical analysis. *Cancer Res.*, 12, 480-483 (1952).
- 54) Leuchtenberger, C., Leuchtenberger, R. & Davis, A. M.: A microspectrophotometric study of the desoxyribose nucleic acid (DNA) content in cells of normal and malignant human tissues. *Am. J. Pathol.*, 30, 65-85 (1954).
- 55) Ris, H. & Mirsky, A. E.: Quantitative cytochemical determination of desoxyribonucleic acid with the Feulgen nuclear reaction. *J. Gen. Physiol.*, 33, 125-146 (1949).
- 56) Di Stefano, H. S.: A cytochemical study of the Feulgen nuclear reaction. *Chromosoma*, 3, 281-301 (1950).
- 57) Caspersson, T.: Uber den chemischen Aufbau des Strukturen des Zellkernes. *Skandinav. Arch. f. Physiol.* 73. Suppl. 8, 3-151 (1936).
- 58) James, J.: Constancy of nuclear DNA and accuracy of cytophotometric measurement. *Cytogenetics*, 4, 19-27 (1965).
- 59) Caspersson, O.: Quantitative cytochemical studies on normal, malignant, premalignant and atypical cell populations from the human uterine cervix. *Acta Cytol.*, 8, 45-60 (1964).
- 60) Pfitzer, P. & Pape, H. D.: Characterization of tumor cell populations by DNA-measurements. *Acta Cytol.*, 17, 19-26 (1973).
- 61) Freni, S. C., James, J. & Prop, F. J. A.: Tumor diagnosis in pleural and ascitic effusions based on DNA cytophotometry. *Acta Cytol.*, 15, 154-162 (1971).
- 62) Boquoi, E., Krebs, S. & Kreuzer, G.: Feulgen-DNA-Cytophotometry on mammary tumor cells from aspiration biopsy smears. *Acta Cytol.*, 19, 326-329 (1975).
- 63) Klein, E., Kurnick, N. B. & Klein, G.: The effect of storage on the nucleic acid content and virulence of mouse ascites tumor. *Exp. Cell Res.*, 1, 127-134 (1950).
- 64) Taft, E. B.: Quantitative histochemical observations of postmortem autolysis in rat liver. *Lab. Invest.*, 9, 169-173 (1960).
- 65) Van Lancker, J. L. & Holtzer, R. L.: The fate of nuclei, deoxyribonucleic acid, and deoxyribonuclease in the course of autolysis. *Lab. Invest.*, 12, 102-105 (1963).
- 66) James, J.: Feulgen-DNA changes in rat liver cell nuclei during early phase of ischaemic necrosis. *Histochemie*, 13, 312-322 (1968).
- 67) 光野孝雄・今津和也・石川羊男・関本健一・藤田忠雄・伊藤 悟: 胃剥離細胞の変性過程における核DNA量の推移(会). 日臨細胞誌, 7, 44-45 (1968).
- 68) Kasten, F. H.: Feulgen-DNA changes during autolysis of mouse ascites cells. *Exp. Cell Res.*, 19, 93-98 (1960).
- 69) 橋本良夫・横内 峻・杉山 暁・宮脇一男・岸上義彦・高橋 隆・野村 裕・服部正次: 細胞診の自動化-婦人科領域について-. 医用電子と生体工学, 7, 35-42 (1969).
- 70) 西谷 巖・沢村一郎: 本邦における子宮癌の自動細胞診システム. 産婦治療, 33, 561-571 (1976).
- 71) 岸上義彦・野田 定・森下哲雄・服部正次・橋本良夫: オートサイトスクリーナーによる自動スクリーニングに適した膣スミアの採取について. 日臨細胞誌

胞誌, 17, 12 - 18 (1978).

72) 小林康夫・近藤明人・矢吹光子: 液状検体処理法の検討. 日臨細胞誌, 9, 170 - 177 (1970).

73) 菊地徳博・西谷 巖・赤間正義・清野邦義・古

場峰明: 細胞診自動化のための細胞前処理標本作成法について, -スライドシステムにおける均等分散法-, 日臨細胞誌, 16, 205 - 210 (1977).

Studies on degeneration process of human tumor cells. Eiichi Mitamura, Department (III) School of Medicine, Kanazawa University. Kanazawa, 920, Japan. J. Juzen Med. Soc., 88, 421—451 (1979).

Abstract Improvement of biopsy technique has made it possible to obtain the specimen in a very fresh state. On the other hand, with the development of automatic cytology one must observe both fresh and degenerated cells at the same time. Thus, study on the degenerative change of tumor cells has become one of the most important problems.

In this study, using pleural fluids and ascites from 7 patients the cell death was evaluated by both dye exclusion test and autoradiography technique on one hand, and sequential changes in both morphology and DNA amount were pursued on the other.

1. The loss of dye exclusion capability and decrease in ^3H -thymidine or ^3H -uridine uptake were counted for a very initial sign of cell degeneration.
2. In so far as observed by routine morphological techniques (phase contrast microscope, Papanicolaou, and Feulgen's staining), no essential difference in the nuclear degeneration was seen between the normal (mesothelial) cell and tumor cells and also among tumor cells of various types, although cytoplasmic degeneration occurred much earlier in adenomatous and small cell carcinoma than in squamous cell carcinoma and in mesothelial cells.
3. Study on the effects of temperature revealed that the lower the temperature was, the slower was the cell degeneration,