

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

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8729">http://hdl.handle.net/2297/8729</a>

## 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—

金沢大学医学部内科学第三講座（主任：服部絢一教授）

吉 田 喬

（昭和53年6月7日受付）

本論文の要旨は昭和50年第16回日本臨床細胞学会総会および昭和52年第6回国際臨床細胞会議において報告した。

最近の細胞診の多くの領域では、細胞採取法の進歩にとともに、新鮮な状態の細胞を観察する機会が多くなってきた。従来の Papanicolaou<sup>1)</sup> の “Criteria of malignancy” は、採取法や保存条件により、多少とも変性した腫瘍細胞を対象として決められたものであり、最近、各分野ごとに新鮮な細胞の所見を加味した悪性判定基準の検討が活発に行なわれている<sup>2)3)4)</sup>。これらの研究では、当然のこととして早期の細胞の変性過程を明らかにし、その結果をもとにして判定基準を設定すべきであるとしている。

一方、主に婦人科領域では細胞診による集団検診が普及し<sup>5)6)</sup>、多数の検体を短時間で処理するために、細胞診の自動化<sup>7)8)</sup>が強力に検討されている。その中で、検体を採取し、遠隔地より集め、標本を作製するまでに数日が経過することが予想される。そのような検体では、極度に変性の進んだ細胞を取り扱う機会が増し、検体採取後におこる細胞の変性過程の検討が必要となってきた。

現在、細胞診の領域で適用されている悪性判定基準は主に核の形態学的所見による所が多く、細胞診の自動化装置でも、核染色量あるいは核の形態学的所見を良・悪性判定のための重要な情報源としている。細胞の形態学的観察を目的とする各種の染色法での核染色量と深い関係にあると考えられるDNA量に関しては、生化学的<sup>9)10)11)</sup>、あるいは細胞化学的に<sup>12)~15)</sup>多くの研究成果が報告されている。しかし生化学的測定値と細胞化学的測定値を同次元で比較するのは困難であり、両者の対比はあまり行なわれず、それぞれの方法による研究が別個に進められている。また、核の形態学的所見についてもきわめて多くの報告をみるが、核

の変性過程についての研究は比較的少なく、細胞化学的には Alfert<sup>16)</sup> および Leuchtenberger<sup>17)</sup> などの報告があり、形態学的所見では中村<sup>18)</sup>、片柳<sup>19)</sup>、田村ら<sup>20)</sup> および安藤<sup>21)</sup> などの報告をみるが、これらでは変性過程での細胞化学的DNA量の変化と形態学的所見の比較検討は行なわれていない。

洗浄細胞診で使用する洗浄液の剥離細胞に対する影響については、胃の洗浄細胞診や術中の腹腔内洗浄細胞診などで検討されている<sup>22)23)</sup>。また最近子宮がんの集団検診で自己採取器により、比較的多量の液状検体が集められ<sup>24)</sup>、適当な施設へ送付、自動塗抹器で処理される際、検体採取から固定、標本作製までにかかなりの時間を要し、mediumの影響を受ける機会も多いため、mediumの種類による細胞の変性過程の違いについての検討も必要となった。

本実験ではエールリッヒ腹水がん細胞を用い、細胞の変性過程でのDNA量を経時的に生化学的および細胞化学的方法により測定して対比した。また、細胞の変性過程で経時的に標本作製、細胞化学的にDNA量を測定し、位相差顕微鏡およびPapanicolaou染色所見などとの対比を試みた。さらに比較的容易に入手でき、日常よく用いられる各種のmedium中での細胞の変性についても、細胞化学的にDNA量を測定するとともに形態学的に検討したのでその結果を報告する。

### 実験材料

本実験には、孤立散在性で、核径なども比較的そろっており、採取が容易で多数の細胞が得られるエールリッヒ腹水がん細胞を材料とした。ほぼ20gの

Degeneration Process of Ehrlich Ascites Tumor Cell. **Takashi Yoshida**, (Chief & Professor: Ken-ichi Hattori) Third Department of Internal Medicine, Kanazawa University School of Medicine, Kanazawa City, P. C. 920 Japan

DDK 雄マウス腹腔内にエールリッヒ腹水がん細胞  $10^6$  個を移植し、10 日ないし 14 日後にマウス腹腔を凝固を防ぐため、あらかじめ 3.8% クエン酸ナトリウム液を入れた注射器で穿刺し、抗凝固剤の量と腹水との比を 1 : 9 とした。

## 実験方法

### I. DNA 量の細胞化学的計測値と生化学的計測値の比較

移植 14 日後のエールリッヒ腹水がん細胞を採取し、試験管内で  $37^{\circ}\text{C}$  に可及的無菌的に保存し、採取直後、5、10、15、20 および 30 日後に試験管より取り出し、塗抹標本作製、カルノア液で湿固定後、型のごとく Feulgen 反応を施し、Nikon-Vickers M85 scanning microdensitometer (以下 SMM と略す) で波長  $560\text{m}\mu$ , spot  $1\mu$ , 対物レンズ  $\times 100$  により、それぞれの標本について腫瘍細胞 100 個を測定し、その平均値を算出した。また経時的に取り出した同一試料について Schmidt-Thannhauser-Schneider 法<sup>27)</sup> にもとずき DNA 分画を抽出し、Burton<sup>28)</sup> の diphenylamine 法により生化学的に DNA 量を測定し比較検討した。

### II. 試験管に保存した自家腹水中での核の変性過程

#### 1. 形態学的観察

移植 10 日後のエールリッヒ腹水がん細胞を採取し、 $37^{\circ}\text{C}$  および  $4^{\circ}\text{C}$  で可及的無菌的に保存し、採取直後、1、3、7、14、21 および 28 日後に試験管より取り出し、薄層標本作製し、位相差顕微鏡下で観察した。位相差顕微鏡は日本光学工業 KK 製で対物レンズは  $\text{DM} \times 40$ ,  $\times 100$  を用い緑色フィルターを透して観察し、写真撮影にはネオパン F を使用した。また同一材料から塗抹標本作製し、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 染色を施し、他の一つはカルノア液で湿固定、型の通り Feulgen 反応を施して形態学的観察を行なった。

#### 2. DNA 量の変化

上記の形態学的観察に使用した Feulgen 反応標本を、SMM により実験 I と同様の方法で、各標本について、腫瘍細胞を 100 個、非腫瘍細胞を 30 個測定し、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。

### III. Medium の核の変性過程に及ぼす影響

#### 1. 形態学的観察

移植 10 日後の腹水を採取し、その 15 ml を 800rpm で 10 分間遠心し、上清の大部分を捨て、高度のがん細

胞浮遊液とし、その 0.5 ml あてを、1) ブドウ糖液、2) 生理食塩水、3) リンゲル液および 4) ハンクス II 液の各 8 ml に加え、数回転倒混和した。この操作は無菌的に行ない、 $37^{\circ}\text{C}$  および  $4^{\circ}\text{C}$  に保存し、浮遊の直後、3、6、12 時間後、1、3、7、14、21 および 28 日後に取り出し、実験 II と同様に位相差顕微鏡下で観察し、同時に Papanicolaou 染色標本作製して形態学的観察を行なった。

#### 2. DNA 量の変化

上記と同一の試料から Feulgen 反応標本作製し、SMM により実験 I と同様に測定し、各 medium について経時的にヒストグラムを作製した。

## 実験成績

### I. DNA 量の細胞化学的計測値と生化学的計測値の比較 (Fig.1)

エールリッヒ腹水がん細胞の  $37^{\circ}\text{C}$  での変性過程では、DNA 量は次第に減少し、生化学的及び細胞化学的計測値のいずれも 5 日後には採取直後の約  $2/3$ 、15 日後には約  $1/2$ 、30 日後には約  $1/5$  になり、細胞化学的に定量した Feulgen reactive DNA 量と、生化学的に定量した diphenylamine reactive DNA 量はほぼ対応して減少する。

### II. 試験管に保存した自家腹水中での核の変性過程

#### 1. 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 (Fig.2. a)

核縁はほぼ円滑で不均等肥厚なく、僅かに小さい凝集塊の付着をみるのみで、核内は 2 ないし 3 個の核小体と少数の凝集塊のほかは特別の構造を認めない。

##### ii) Papanicolaou 染色による観察 (Fig.2. b)

核縁は円滑で不均等肥厚なく、少数の小さい凝集塊

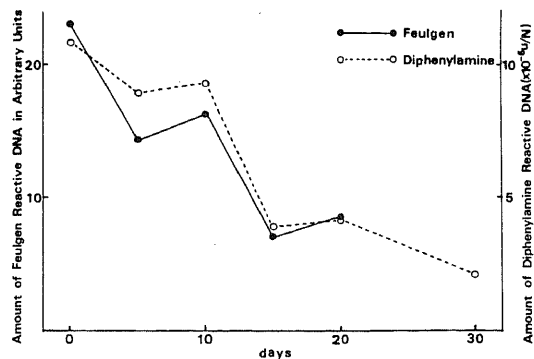


Fig. 1. Sequential changes in Feulgen reactive DNA and diphenylamine reactive DNA.

の付着をみる。核内には鮮明な核小体と少数の凝集塊をみる。

iii) Feulgen 反応による観察 (Fig.2.c)

核縁はやや硬く不整であるが、凝集塊の付着をみない。核内は細網状構造を呈し、核小体と思われる部分は白くぬけてみえ、その周囲に凝集塊をみる。また核内は核小体と思われる部分を除き、淡く一様に染色される。

2) 37°C に保存した細胞

i) 位相差顕微鏡による観察

a. 1日後：核径は著明に縮小するが、細胞径も縮小し、核・胞体比は大となる。核縁に凝集塊が付着し、不均等肥厚を示す。核内はほぼ均質化し、融解状にみえる。核小体は小型円形化し、その周囲は明庭様になる。

b. 3日後：核縁は1日後と同様の所見を呈するが、核内は凝集塊による細顆粒状の構造が著明になる。

c. 7日以後 (Fig.3.a)：核縁には大きい凝集塊が連なり、その所々に断裂をみる。核内構造は3日後と変わりなく、以後も同様の所見が続く。

ii) Papanicolaou 染色による観察

a. 1日後：核径は縮小し、核縁は大小の凝集塊の付着で肥厚し、不整となる。核内には凝集塊をみ、核小体と核縁をつなぐ粗網状の構造をみる。核小体は縮小、円形化し、その周囲に凝集塊の付着をみる。核は全般に濃染する。

b. 3日後：核径は著明に縮小し、核縁に付着した凝集塊の数が減少し、肥厚および不整の程度は軽度になる。核内も同様に凝集塊の小型化や減少とともに、粗網状構造も断裂し、粗顆粒状になる。核小体はより縮小し、その周囲の凝集塊も減少する。核は全般にやや淡染する。

c. 7日後：核縁はやや薄くなるが、他は3日後の所見とほぼ同様で、核内は粗顆粒状になる。また一部には核径の縮小が著明で濃縮状の核を有する細胞をみる。

d. 14日後 (Fig.3.b)：核縁は凝集塊が連なり、一部で断裂をみる。核内の凝集塊は小さく、細顆粒状になる。核小体はより小型円形化し、その周囲はぬけてみえる。濃縮状の核もみる。

e. 21日後：核縁の断裂が著明になり、核内は顆粒状で、核小体との区別が困難で一部は破碎状になる。濃縮状の核は減少する。

iii) Feulgen 反応による観察

a. 1日後：核径は縮小し、核縁は凝集塊の付着により不均等に肥厚、核内は粗網状になる。核小体と思わ

れる空泡の周囲にも凝集塊が増加する。

b. 3日後：核径はさらに縮小し、核縁の凝集塊の付着は減少、核内の凝集塊も減少し粗網状構造が一部では断裂したようにみえる。核小体と思われる空泡は縮小する。核内の構造の間隙部分はほとんど染色されない。

c. 7日後：3日後の所見と著変はないが、核内は粗顆粒状になり、核径は著明に縮小する。濃縮状の核もかなり出現する。

d. 14日後 (Fig.3.c)：核縁は凝集塊の付着が減少し薄くなる。核内は細ないし粗顆粒状になり、核小体と思われる空泡の周囲の凝集塊も減少する。

e. 21日後：核縁は凝集塊が連なったようにみえ、所々に断裂をみる。核内は粗ないし細顆粒状で、核小体と思われる空泡は不明瞭になる。濃縮状の核もみる。

3) 4°C に保存した細胞

i) 位相差顕微鏡による観察

a. 1日後：核径は僅かに縮小し、核縁は凝集塊の付着により、やや不均等に肥厚し不整になる。核内は凝集塊が増加し、一部では網状構造を呈する。核小体には著変をみないが、その周囲に付着した凝集塊のため、大きく不整形にみえる。

b. 3日後：核径は著明に縮小し、核縁は1日後の所見と著変をみないが、核内は凝集塊が増加し顆粒状になる。核小体は縮小してやや円形化、その周囲は明庭様となり、凝集塊の付着は減少する。

c. 7日後：細胞径、核径ともに縮小するが、核・胞体比は大になる。核縁および核内の所見は3日後と著変をみない。

d. 14日後：核縁は凝集塊が連なり、念珠様にみえ、所々に断裂をみる。核内の構造は著変をみないが、核小体はより小型円形化する。37°C に保存した細胞の5日後の所見に相当する。

e. 21日および28日後 (Fig.4.a)：14日後とほぼ同様の所見を呈する。

ii) Papanicolaou 染色による観察

a. 1日後：核径は僅かに縮小する。核縁、核内および核小体の周囲の凝集塊がやや増加する。

b. 3日後：核径はさらに縮小する。その他の所見は1日後のそれと著変をみない。

c. 7日後：核縁は凝集塊の付着により不均等肥厚、不整になる。核内は核小体の周囲等への凝集塊の付着が増加する。37°C に保存した細胞の1日後の所見に相当する。

d. 14日後：核径は著明に縮小し、濃縮状の核を有する細胞が増加する。

e. 21日後 (Fig.4.b) : 14日後の所見と著変をみない。

f. 28日後 : 濃縮状の核はより小型化し、淡染する。一方、粗顆粒状あるいは破碎状の核を有する細胞もみえる。

iii) Feulgen 反応による観察

a. 1日後 : 僅かに核径の縮小をみる以外、採取直後の細胞の所見との差をみない。

b. 3日後 : 核径は縮小し、核縁は凝集塊の付着により不均等に肥厚する。核内は細網状構造を呈し、核小体と思われる空泡の周囲に凝集塊をみる。

c. 7日後 : 核径はさらに縮小し、核内は粗網状構造が著明になり、その間隙部分はぬけてみえる様になる。37°Cに保存した細胞の1日後の所見に相当する。

d. 14日後 : 核径は著明に縮小し、核内は濃染、核小体と思われる空泡は不明瞭になる。濃縮状の核を多くみる。

e. 21日後 (Fig.4.c) : 14日後の細胞の所見と著変なく、濃縮状の核が増加する。

f. 28日後 : 核内の網状構造は断裂し、顆粒状にみえる。小型の濃縮状の核をみる。

2. DNA 量の変化 (ヒストグラムによる)

採取直後の細胞では、2N, 4N および 8N 相当のピークを認め、非腫瘍細胞と腫瘍細胞を明らかに区別で

きる。

1) 37°C に保存した細胞 (Fig.5)

a. 1日後 : 採取直後の細胞の所見と著明な変化をみない。

b. 3日後 : 各ピークを認めるが、DNA 量は減少し、各ピークは低くなり、全体に左方へ移動する。非腫瘍細胞と腫瘍細胞はなお区別できる。

c. 7日後 : 各ピークは不明瞭になり、DNA 量は減少し、採取直後の細胞の約 2/3 になる。非腫瘍細胞と腫瘍細胞の区別は困難になる。

d. 14日後 : 各ピークはほとんど消失し、DNA 量は採取直後の細胞の約 1/2 になる。

e. 21日後 : 各ピークは完全に消失し、DNA 量は減少、大多数の細胞は採取直後の細胞での 2N 相当以下になる。しかし、なおよく保たれた細胞もみる。

2) 4°C に保存した細胞 (Fig.6)

a. 1日後 : 採取直後の細胞と同様のパターンを示す。

b. 3日後 : DNA 量の減少傾向をみるが、2N, 4N および 8N 相当のピークを認め、非腫瘍細胞と腫瘍細胞は明らかに区別できる。

c. 7日後および 14日後 : 3日後の所見とほぼ同様。

d. 21日後 : 各ピークをみるが、DNA 量は減少

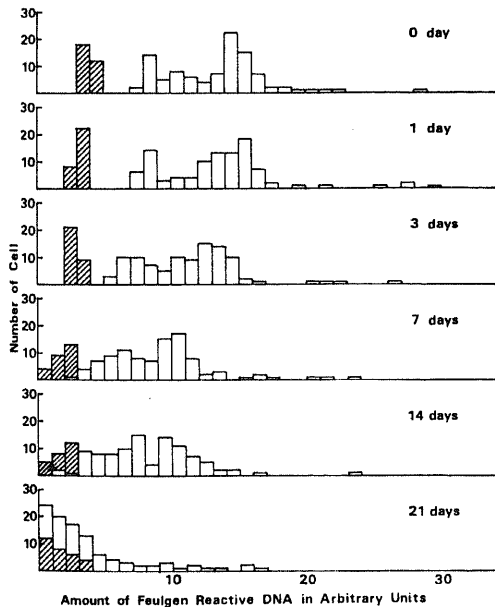


Fig. 5. Sequential change in Feulgen reactive DNA of Ehrlich ascites tumor cells kept at 37°C in the original ascites.

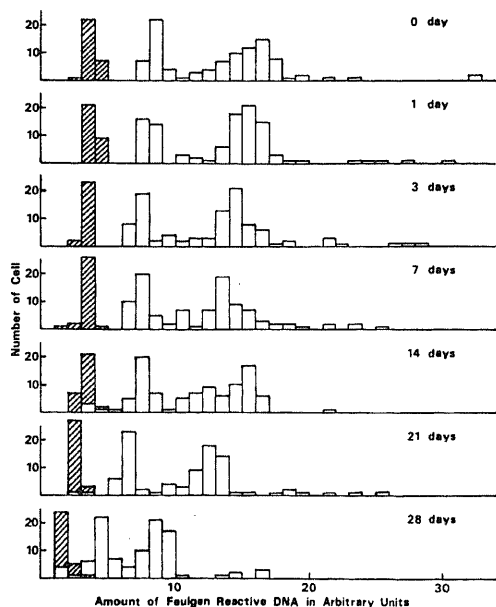


Fig. 6. Sequential change in Feulgen reactive DNA of Ehrlich ascites tumor cells kept at 4°C in the original ascites.

し、採取直後の細胞の約3/4になり、非腫瘍細胞と腫瘍細胞の区別が困難になる。

e. 28日後：各ピークを認めるがDNA量は減少し、採取直後の細胞の約1/2になる。

### Ⅲ. Mediumの核の変性過程に及ぼす影響

#### 1. 形態学的観察

1) 37°Cで保存した細胞

i) 位相差顕微鏡による観察

a. 5%ブドウ糖液

a) 浮遊直後：核径に変化をみないが、核縁に凝集塊の付着をみる。核内にも凝集塊が増加し、核小体はやや小型円形化をみる。

b) 3時間後 (Fig.7.a)：核内全体の位相の差を減じ、僅かに核小体と考えられる構造をみるが、その辺縁は不明瞭である。

c) 6時間後：核内は融解状になり、ほとんど構造をみない。

d) 12時間後：核径は縮小するが、核・胞体比は大になる。核内は融解状、核小体は明瞭で、小型円形化、その周囲は明庭様になる。

e) 1日後：核縁は凝集塊の連なりとして見え、所々に断裂をみる。核内には再び粗大な凝集塊をみるが、その辺縁は不明瞭。

f) 3日後：核縁は不明瞭になり、核内は顆粒状。以後21日後まではほぼ同様の所見をみる。

b. 生理食塩水

a) 浮遊直後：核縁に凝集塊の付着をみる。核内は著明な変化をみないが、核小体は縮小し、その辺縁は円滑になる。

b) 3時間後：核径はやや縮小、核縁は凝集塊の付着で著明に肥厚し、不整になる。核内の凝集塊は増加するが、辺縁が不明瞭になり融解状に見える。核小体はより小型になり、周囲は明庭様になる。

c) 6時間後：核径は縮小するが、核・胞体比は大になる。核縁はより不均等に肥厚し、核内の所見は3時間後とほぼ同様で、核小体は小型円形化をみる。

d) 12時間後：6時間後の所見とほぼ同様。

e) 1日後：核縁は不均等に肥厚し、不整になる。核内には再び粗大な凝集塊をみるが、核小体は小型で周囲は明庭様になる。

f) 3日後 (Fig.8.a)：核縁は凝集塊の連なりとして見え、核内の所見は1日後とほぼ同様で、顆粒状を呈する。

g) 7日以後：核縁の断裂をみ、核内は顆粒状で、以後は同様の所見が続く。

c. リンゲル液

a) 浮遊直後：核縁に凝集塊の付着をみ、核内に凝集塊が増加するが、その他の所見は採取直後の細胞と著変をみない。

b) 3時間後：核径は僅かに縮小、核縁は凝集塊により肥厚する。核内の凝集塊が増加、核小体はやや縮小する。

c) 6時間後：3時間後の所見とほぼ同様だが、核内は融解状になる。

d) 12時間後：核径は著明に縮小、核縁は不均等に肥厚し、核内は融解状になる。核小体は小型円形化する。

e) 1日後：核内に再び粗大な凝集塊をみる。核小体の周囲は明庭様になる。

f) 3日後 (Fig.9.a)：核縁は凝集塊の連なりとして見え、核内は粗顆粒状になる。

g) 7日以後：核縁は断裂のため、不明瞭になり、核内は顆粒状で、以後は同様の所見が21日後まで続く。

d. ハンクスⅡ液

a) 浮遊直後：核縁に凝集塊の付着をみ、核内の凝集塊が増加するが、核小体の所見などは採取直後の細胞と変りない。

b) 3時間後：核径は僅かに縮小、核縁は肥厚し、核内の凝集塊が増加する。

c) 6時間後：核小体が縮小するが、その所見は3時間後と同様。

d) 12時間後：核径は著明に縮小、核縁は凝集塊により肥厚して不整になる。核内は一部融解状になり、核小体は小型化する。

e) 1日後：核縁に著変をみないが、核内は融解状で、小型円形化した核小体をみる。

f) 3日後 (Fig.10.a)：核縁は凝集塊の連なりとして見え、核内には再び粗大な顆粒をみる。核小体の周囲は明庭様になる。

g) 7日以後：核縁の断裂をみ、核内は顆粒状になり、以後は21日後まで同様の所見を呈する。

ii) Papanicolaou 染色による観察

a. 5%ブドウ糖液

a) 浮遊直後：核縁および核小体周囲に凝集塊の付着をみる他は、採取直後の細胞の所見と変りない。

b) 3時間後 (Fig.7.b)：核は融解状でびまん性に染色され、核内構造をみない。

c) 6時間後：3時間後の所見と著変をみない。

d) 12時間後：核径はやや縮小、核内は融解状、核小体と考えられる濃染部分をみるが、その辺縁は不明瞭である。

e) 1日後：核径は明らかに縮小，一部の細胞に核小体と考えられる濃染部分をみるが，大多数の細胞の核は濃縮状で，核内構造をほとんどみない。

f) 3日以後：1日後の所見と著変はないが，核は淡濁状で，次第に染色性の低下をみる。

b. 生理食塩水

a) 浮遊直後：5%ブドウ糖液に浮遊直後と同様の所見を呈する。

b) 3時間後：核径はやや縮小，核縁は凝集塊の付着により不均等に肥厚し不整になる。

c) 6時間後：3時間後の所見とほぼ同様だが，核内は凝集塊の増加により濃染する。

d) 12時間後：核内の凝集塊は増多，増大し，粗網状構造を呈し，濃染する。

e) 1日後：12時間後の所見と著変はないが，核径は縮小，一部に濃縮状の核をみる。

f) 3日後(Fig.8.b)：濃縮状の核を多くみるが，一部の細胞は核縁の凝集塊が減少して顆粒状になり，薄くみえる。核内および核小体周囲の凝集塊も減少し，核小体は小型円形化，核の染色性は全般に低下する。

g) 7日後：核内構造は3日後の所見と著変はないが，染色性は低下する。

h) 14日後：核縁は凝集塊の連なりとして見え，所々に断裂をみる。核内には凝集塊と，小型円形化した核小体をみる。また一部の細胞では破碎状の核をみる。

i) 21日後：14日後と同様の細胞が多いが，破碎状あるいは不染の核もみる。

c. リンゲル液

a) 浮遊直後：5%ブドウ糖液に浮遊直後と同様の所見を呈する。

b) 3時間後：浮遊直後の所見と著変はないが，核径が僅かに縮小する。

c) 6時間後：核内の凝集塊が増加するが，その間隙部分は淡染し，ぬけてみえる。

d) 12時間後：核縁，核内および核小体の周囲に凝集塊が増加し，網状構造を呈するが，その間隙部分は淡染する。

e) 1日後：核径はさらに縮小するが，その他の所見は12時間後と同様である。

f) 3日後(Fig.9.b)：1日後とほぼ同様の所見を呈する。

g) 7日後：核縁，核内および核小体周囲の凝集塊は減少し，染色性が低下する。

h) 14日後：凝集塊は減少して顆粒状となり，核小体は小型円形化する。核の染色性は全般に低下する。

i) 21日後：核縁は凝集塊の連なりとして見え，所

により断裂をみる。核内が破碎状の細胞が多い。

d. ハンクスII液

a) 浮遊直後：5%ブドウ糖液に浮遊直後と同様の所見を呈する。

b) 3時間後：核縁は凝集塊が付着して，不均等に肥厚，核内および核小体周囲の凝集塊も増加する。

c) 6時間後：核径はやや縮小，凝集塊は増加して粗網状になり，核は全般に濃染する。

d) 12時間後：核内構造は6時間後の所見と同様だがより濃染する。一部に濃縮状の核をみる。

e) 1日後：核径は縮小するが，核・胞体比は大になる。核内は粗網状で，染色性がやや低下する。

f) 3日後(Fig.10.b)：核縁，核内および核小体周囲の凝集塊は減少して顆粒状になり，核小体は小型円形化，核は全般に染色性が低下する。

g) 7日後：凝集塊はより減少し，染色性も低下する。

h) 14日後：核縁は凝集塊の連なりとして見え，所々に断裂をみる。核内は小型円形化した核小体などとともに顆粒状を呈する。

i) 21日後：多くの核は破碎状だが，一部には不染の細胞をみる。

2) 4°Cに保存した細胞

i) 位相差顕微鏡による観察

a. 5%ブドウ糖液

a) 3時間後：核縁は小さい凝集塊の付着で僅かに肥厚をみる。核内は融解状で不明瞭な核小体をみるのみである。

b) 6時間後：核径は僅かに縮小，核内は融解状，核小体はやや小型円形化する。

c) 12時間後：6時間後とほぼ同様の所見を呈する。

d) 1日後：核は融解状で，小型化した核小体と考えられる辺縁不明瞭で位相量の多い部分をみる。

e) 3日後：核径は縮小，核縁には粗大な凝集塊が付着し，核内は凝集塊により顆粒状になる。

f) 7日後：核および胞体が著明に縮小する他は，3日後とほぼ同様の所見を呈する。

g) 14日後：小型円形化した核小体を明瞭にみる。核内は凝集塊により粗顆粒状をみる。

h) 21日後(Fig.11.a) 14日後とほぼ同様の所見を呈する。

i) 28日後：核縁は凝集塊の連なりとして見え，所々に断裂をみる。核内は粗顆粒状になる。

b. 生理食塩水

a) 3時間後：浮遊直後の所見と著変はないが，核

内の凝集塊がやや増加する。

b) 6 時間後：核径は縮小，核縁は凝集塊の付着で僅かに肥厚し，核内の凝集塊は増加する。

c) 12 時間後：核小体は小型円形化し，その周囲の凝集塊が減少するが，その他の所見に著変はない。

d) 1 日後：核径は著明に縮小，核縁はより肥厚し，核内は融解状になる。核小体はより小型円形化する。

e) 3 日後：胞体が縮小し，核・胞体比は大になる。核内には再び大きい凝集塊が出現し，粗顆粒状となる。

f) 7～21 日後 (Fig.12.a)：3 日後とほぼ同様の所見を呈する。

g) 28 日後：核縁は凝集塊の連なりとして見え，所々に断裂をみる。核内には著明な変化をみない。

#### c. リンゲル液

a) 3 時間後：浮遊直後とほぼ同様の所見を呈する。

b) 6 時間後：核縁は凝集塊の付着で不均等に肥厚，核内および核小体周囲にも凝集塊が増加する。

c) 12 時間後：核径の縮小の他は 6 時間後の所見と著明な変化をみない。

d) 1 日後：核縁はさらに不均等に肥厚し，核内の凝集塊も増加，核小体周囲の凝集塊の付着は減少する。

e) 3 日後：1 日後の所見と著変はないが，核内はやや融解状になる。

f) 7 日後：核内は融解状になり，核小体を位相量の多い部分としてみる。

g) 14～28 日後 (Fig.13.a)：核，胞体ともに縮小し，核・胞体比は大になる。核内には再び粗大な凝集塊が出現し顆粒状になる。核小体は小型円形化し，その周囲は明庭様になる。

#### d. ハンクスⅡ液

a) 3 時間後：核内の凝集塊の僅かの増加をみる他は浮遊直後と同様の所見を呈する。

b) 6 時間後：核縁に凝集塊の付着をみ，不均等に肥厚し，核内の凝集塊も増加する。

c) 12 時間後：核径は縮小し，核小体はやや小型化し，周囲の凝集塊は減少する。

d) 1 日後：核縁はさらに不均等に肥厚し，核内の凝集塊は増加，核小体は小型円形化する。

e) 3 日後：核内は顆粒状だが，一部の核は融解状を呈する。

f) 7 日後：核内は融解状になり，小型円形化した核小体をみる。

g) 14 日後：核径は著明に縮小，核内に再び粗大な凝集塊が出現する。

h) 21～28 日後 (Fig.14.a)：核縁は凝集塊の連な

りとして見え，核内は粗顆粒状を呈する。

#### ii) Papanicolaou 染色による観察

a. 5% ブドウ糖液

a) 3 時間後：核全体が濃染し，核小体と考えられる辺縁不明瞭で濃染する部分をみる。

b) 6 時間後：核径はやや縮小，核内はほぼ一様に濃染し，核小体は不明瞭になる。

c) 12 時間後：6 時間後とほぼ同様の所見を呈する。

d) 1 日後：核径がさらに縮小するほかは著変をみないが，一部の核は濃縮状となる。

e) 3 日後：核縁不整で，濃縮状の核が増加する。

f) 7 日後：3 日後の所見と著変をみないが，染色性が全般に低下する。

g) 14 日後：核縁は不明瞭になり辺縁が不明瞭な核小体を除く他の部分は淡染する。

h) 21 日後 (Fig.11.b)：核縁は不明瞭になり核内は粗顆粒状で破砕状のものもある。

i) 28 日後：核内は破砕状または淡濁状になり，核が不染の細胞もみる。

#### b. 生理食塩水

a) 3 時間後：核縁は凝集塊の付着により，不均等に肥厚する。核内の凝集塊は増加し，その一部は核小体の辺縁と核縁をつなぐ網状構造としてみえる。

b) 6 時間後：核径はやや縮小し，核縁はさらに肥厚し，核内は全般に濃染する。

c) 12 時間後：6 時間後の所見とほぼ同様である。

d) 1 日後：核内構造は粗網状を呈し，その間隙部分はぬけて見え，核内は全般に淡染する。

e) 3 日後：核径はさらに縮小，核内の凝集塊は減少し，そのために核縁は薄く，核小体は縮小する。

f) 7 日後：核内は凝集塊とともに，網状構造も断裂して，粗顆粒状となり，核小体は縮小円形化する。なお一部の細胞では濃縮状の核をみる。

g) 14 日後：核小体以外の部分は淡染する。濃縮状の核も増加する。

h) 21 日後 (Fig.12.b)：濃縮状の核が多いが，核縁が不明瞭で破砕状の核もみる。

i) 28 日後：破砕状の核が増加し，全般に淡染するものが多い。

#### c. リンゲル液

a) 3 時間後：核縁は凝集塊の付着によりやや不均等に肥厚し，核内に凝集塊が増加する。

b) 6 時間後：3 時間後の所見と同様である。

c) 12 時間後：核は濃染し，核径はやや縮小，核内の凝集塊は増加して，網状構造を呈する。



- d) 1日後：核がより濃染するほかは、12時間後の所見と著変をみない。
  - e) 3日後：核内の凝集塊が減少し、網状構造の間隙部分がぬけてみえる。
  - f) 7日後：3日後の所見とほぼ同様である。
  - g) 14日後：核縁が薄くなり、核小体は縮小円形化、全般に淡染する。一部に濃縮状の核をみる。
  - h) 21日後 (Fig.13.b)：濃縮状の核が増加する。
  - i) 28日後：核縁は不明瞭になり、核内は縮小円形化した核小体と破碎状の構造を呈し、淡染した核が多い。
- d. ハンクスII液
- a) 3時間後：核縁は凝集塊の付着により肥厚し、核内に凝集塊が増加する。
  - b) 6時間後：核縁はより不均等に肥厚し、核内は凝集塊が網状構造をなし、核小体の辺縁と核縁を連絡している。
  - c) 12時間後：核径はやや縮小し、全般に濃染するほかは著明な変化をみない。
  - d) 1日後：12時間後の所見と同様である。
  - e) 3日後：核内の凝集塊はやや減少し、網状構造の間隙部分がぬけてみえ、核は全般に淡染する。

- f) 7日後：核縁は薄くなり、凝集塊はさらに減少し、核小体も小さくなる。一部には核径が著明に縮小し濃縮状の核をみる。
- g) 14日後：濃縮状の核が増加する。
- h) 21日後 (Fig.14.b)：濃縮状の核を多くみるが、一部には核内が顆粒状で淡染する核をみる。
- i) 28日後：核縁は不明瞭で、凝集塊の連なりとしてみえ、一部には断裂をみる。核小体は小型円形化し、核内は顆粒状あるいは破碎状で淡染する。

2. DNA量の変化 (ヒストグラムによる)

1) 37°Cに保存した細胞

- i) 5%ブドウ糖液 (Fig.15)
  - a. 浮遊直後：採取直後の細胞のヒストグラム (Fig.5)と同様に2N, 4Nおよび8N相当のピークを認め、非腫瘍細胞と腫瘍細胞を明らかに区別できる。
  - b. 3時間後：各ピークは低くなり、2Nおよび4Nのピークは認めるが、8Nのピークは不明瞭になる。
  - c. 6時間後：3時間後と著変をみないが、各ピークは全体に左へ移動し、DNA量の減少を示す。
  - d. 12時間後：DNA量は減少し、浮遊直後の細胞の約2/3になるが、なお2Nおよび4Nのピークを認める。

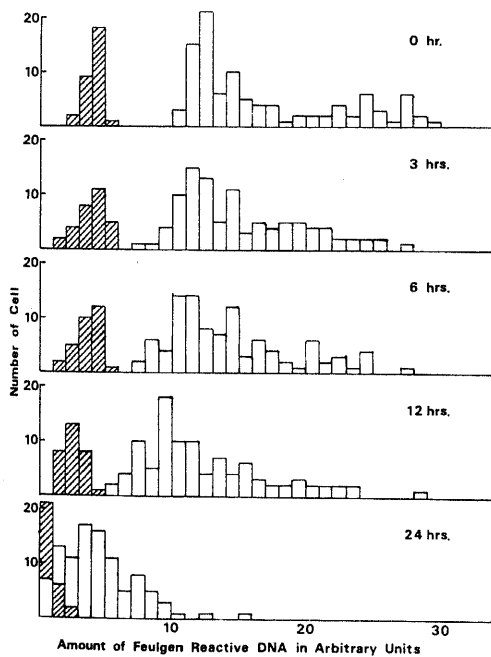


Fig. 15. Sequential change in Feulgen reactive DNA of Ehrlich ascites tumor cells kept at 37°C in 5% glucose solution.

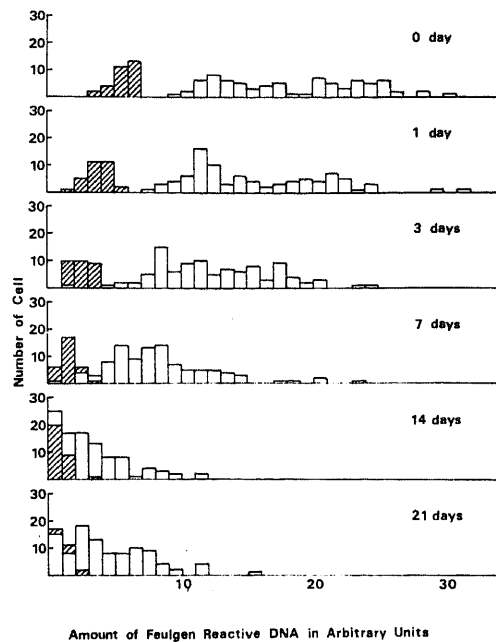


Fig. 16. Sequential change in Feulgen reactive DNA of Ehrlich ascites tumor cells kept at 37°C in physiologic saline solution.

e. 1日後：DNA量は浮遊直後の約1/2以下になり、各ピークを認めず、非腫瘍細胞と腫瘍細胞の区別はできない。

ii) 生理食塩水 (Fig.16)

a. 浮遊直後：採取直後の細胞とほぼ同様のヒストグラムになる。

b. 1日後：各ピークが低くなり、ヒストグラムは僅かに左方に移動してDNA量の減少傾向をみる。2N, 4Nおよび8N相当のピークを認め、非腫瘍細胞と腫瘍細胞を明らかに区別できる。

c. 3日後：2Nのピークをみるが、4Nおよび8Nのピークは不明瞭になる。DNA量は浮遊直後の約2/3になる。

d. 7日後：各ピークはさらに不明瞭になり、DNA量は浮遊直後の約1/2になる。非腫瘍細胞と腫瘍細胞の区別が困難になる。

e. 14日後：各ピークを全く認めず、DNA量は浮遊直後の約1/3になる。

f. 21日後：14日後の所見とほぼ同様である。

iii) リンゲル液 (Fig.17)

a. 浮遊直後：採取直後の所見とほぼ同様。

b. 1日後：各ピークがやや低くなるが、浮遊直後の所見と著明な変化をみない。

c. 3日後：各ピークが不明瞭になり、ヒストグラムは左方へ移動し、DNA量は浮遊直後の約2/3になる。

d. 7日後：3日後の所見とほぼ同様だが、しだいに非腫瘍細胞と腫瘍細胞の区別が困難になる。

e. 14日後：各ピークを認めず、DNA量は浮遊直後の約1/2になる。なかにはDNA量の減少をみない細胞もある。

f. 21日後：DNA量は浮遊直後の約1/3になる。

iv) ハンクスII液 (Fig.18)

a. 浮遊直後：採取直後の所見とほぼ同様。

b. 1日後：各ピークがやや低くなるほかは浮遊直後の所見と同様である。

c. 3日後：各ピークは不明瞭になり、非腫瘍細胞と腫瘍細胞の区別が困難になる。DNA量は浮遊直後の約2/3になる。

d. 7日後：各ピークを認めず、DNA量は浮遊直後の約1/2になるが、一部の細胞ではDNA量の減少をみない。

e. 14日後：DNA量は浮遊直後の約1/3になる。

f. 21日後：DNA量は浮遊直後の約1/4以下になる。

2) 4°Cに保存した細胞

i) 5%ブドウ糖液 (Fig.19)

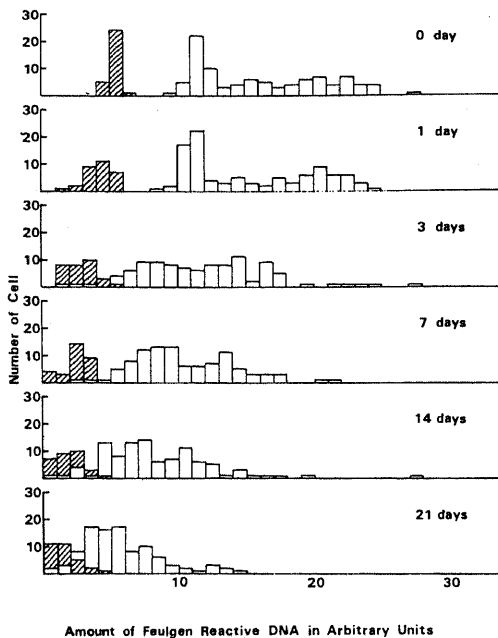


Fig. 17. Sequential change in Feulgen reactive DNA of Ehrlich ascites tumor cells kept at 37°C in Ringer solution.

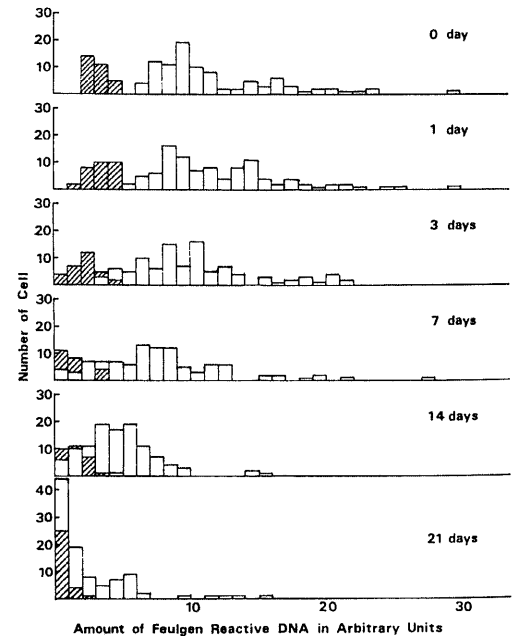


Fig. 18. Sequential change in Feulgen reactive DNA of Ehrlich ascites tumor cells kept at 37°C in Hanks solution II.

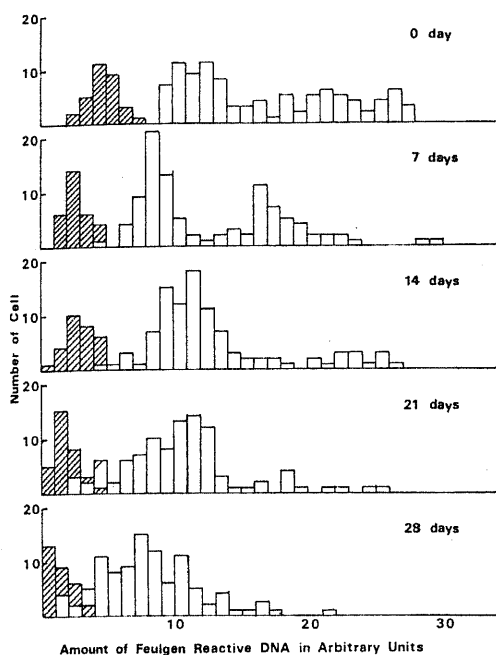


Fig. 19. Sequential change in Feulgen reactive DNA of Ehrlich ascites tumor cells kept at 4°C in 5% glucose solution.

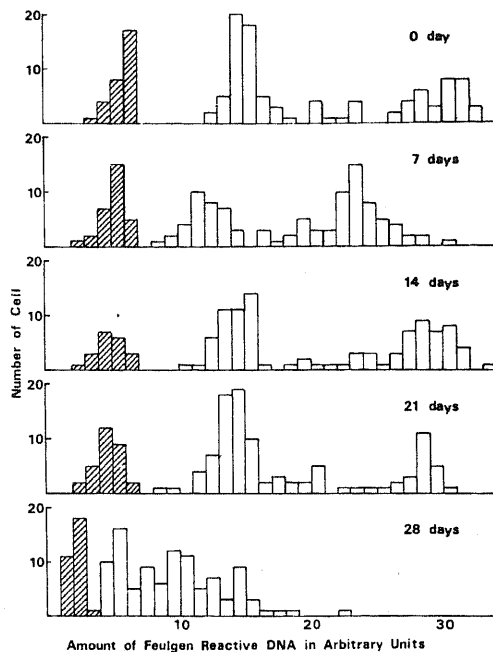


Fig. 21. Sequential change in Feulgen reactive DNA of Ehrlich ascites tumor cells kept at 4°C in Ringer solution.

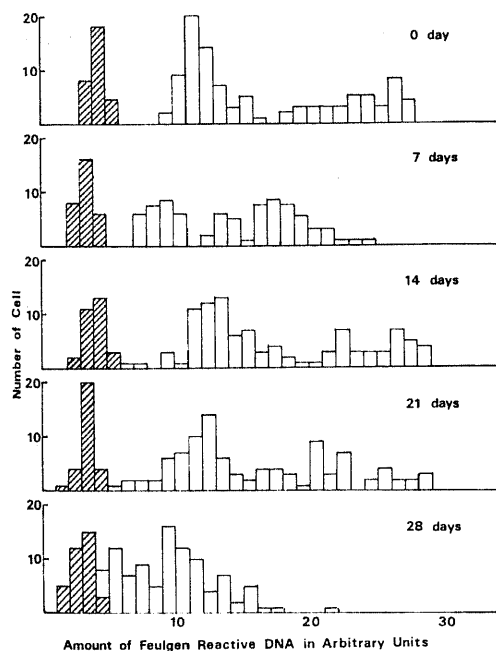


Fig. 20. Sequential change in Feulgen reactive DNA of Ehrlich ascites tumor cells kept at 4°C in physiologic saline solution.

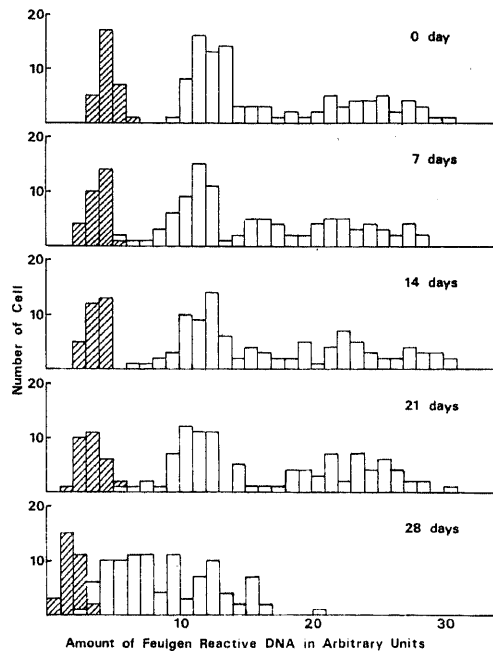


Fig. 22. Sequential change in Feulgen reactive DNA of Ehrlich ascites tumor cells kept at 4°C in Hanks solution II.

a. 浮遊直後：採取直後と同様のヒストグラムを呈する。

b. 7日後：2N, 4N および 8N のピークを認めるが、ヒストグラムは左方へ移動し、DNA 量は浮遊直後の約 2/3 になる。

c. 14日後：2N のピークを認めるが、4N および 8N のピークは一つになる。非腫瘍細胞と腫瘍細胞は一部で重なり合い、区別できなくなる。

d. 21日後：DNA 量は浮遊直後の約 1/2 になる。

e. 28日後：DNA 量は浮遊直後の約 1/3 になる。各ピークをほとんど認めない。

ii) 生理食塩水 (Fig.20)

a. 浮遊直後～14日後：採取直後のヒストグラムとはほぼ同様である。

b. 21日後：各ピークは低くなるが、DNA 量の著明な変化はない。

c. 28日後：各ピークを認めず、DNA 量は浮遊直後の約 1/2 になる。非腫瘍細胞と腫瘍細胞の区別が困難になる。

iii) リンゲル液 (Fig.21)

a. 浮遊直後～21日後：採取直後のヒストグラムと同様である。

b. 28日後：各ピークは消失し、DNA 量は浮遊直後の約 1/2 になる。

iv) ハンクスⅡ液 (Fig.22)

a. 浮遊直後～14日後：採取直後のヒストグラムと同様である。

b. 21日後：各ピークは低くなるが、DNA 量の著明な減少をみない。

c. 28日後：各ピークは消失し、DNA 量は浮遊直後の約 1/2 になる。非腫瘍細胞と腫瘍細胞の区別ができない。

## 考 察

### 1. DNA 量の細胞化学的計測値と生化学的計測値の比較

DNA 量の細胞化学的計測は、Feulgen<sup>29)</sup>の報告以後、各種の染色法を利用して行なわれてきた。そのうちで Feulgen 反応は、DNA の特異的染色性に異論<sup>30)</sup>もあるが、染色機構が明らかで一般に評価が高く、広く用いられている。測定方法も最近の光学および電子工学などの進歩と相まって、精度の向上とともに簡便化され、より多くの細胞を正確に測定できるようになった<sup>31)</sup>。この方法は相対的定量法であり、測定する細胞数も数百個までの比較的少数であるが、DNA 量と細胞数からヒストグラムを作製、検討することができる。

一方、生化学的計測はその原理に異論なく、絶対的定量法であり、 $10^8$ 個ときわめて多数の細胞の平均値がえられ、信頼度が高いが、あえて難をいえば細胞数の測定に問題が残る。またヒストグラムの作製はできず、細胞ごとの DNA 量と形態の対比も困難である。

以上のように両者の測定法には一長一短があり、それぞれ異なった分野で用いられている。両者の測定値を比較検討した報告はきわめて少なく、僅かに Leuchtenberger<sup>ら</sup><sup>32)33)</sup>は腫瘍と正常組織の DNA 量の測定に、紫外線顕微測光法と生化学的方法とを試み、両者の測定値が一致したと報告している。著者の今回の実験では、細胞の変性過程での DNA 量を測定し、ほぼ同様の減少曲線を得た。この結果から、Feulgen 反応でえた DNA 量は、生化学的方法でえた DNA 量と同様に信頼できると考えられよう。

細胞の変性過程での DNA 量の変化についての報告は多く、Leuchtenberger<sup>17)</sup>は動物に移植した腫瘍について、James<sup>34)</sup>は虚血肝、Alfert<sup>16)</sup>はモルモットの卵巣の濃縮核、Kasten<sup>35)</sup>はマウスの腹水がん細胞について DNA 量を測定し、いずれも変性ととも減少すると報告しているが、減少の程度には大きい差異をみる。その原因としては Kasten も述べているように、それぞれの研究で用いた材料が異なり、変性の条件も異なることなどが挙げられよう。Kasten は本実験と同様に遊離細胞を材料とし、ほぼ同じ条件で実験を行ない、60 時間後には DNA 量がほとんど消失するとし、本実験での 15 日後に約 1/2 に減少する成績との間に著しい差異をみる。Kasten の報告では、測定した細胞数が少なく、測定間隔が十分でないことなどのほかに、同じエールリッヒ腹水がん細胞でも移植から採取までの期間の違いにより、細胞の状態が異なっている

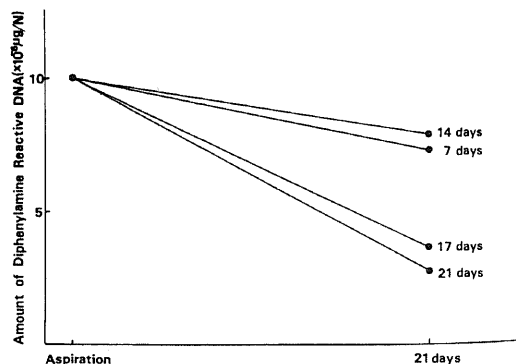


Fig. 23. Diphenylamine reactive DNA of Ehrlich ascites tumor cells taken at different stages after the transplantation.

などが考えられる。

エールリッヒ腹水がん細胞では、採取時の細胞の状態を決める条件の一つに移植後の日数が挙げられる。移植後7, 14, 17 および21日目に採取し、37°Cで無菌的に保存、14日後のDNA量を生化学的方法で測定した(Fig.23)。移植後採取までの期間が長くなるにつれ、14日間保存後のDNA量は順次減少している。この成績は移植後の期間があまり長くなると腹腔での細胞の増殖は緩やかになり、遂には停止し、すでに細胞の変性が始まっていることを示すと考えられる。その他血液混入の程度、細菌感染の有無なども細胞の変性過程に影響を与えると考えられる。

2. 試験管に保存した自家腹水中での核の変性過程

本実験では細胞の変性過程でのDNA量と形態学的所見を対比するため、長期にわたって変性過程を観察した。Fig.24に示すように、37°Cに保存した細胞ではDNA量は1日後までは著明な変化なく、3日後に減少傾向をみる。位相差所見では、1日後の核内は融

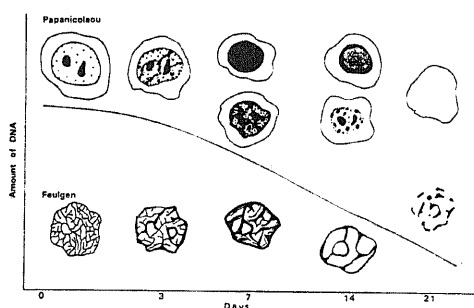


Fig. 24. Sequential degenerative change in morphology of Ehrlich ascites tumor cells kept at 37°C in the original ascites with special reference to Feulgen reactive DNA.

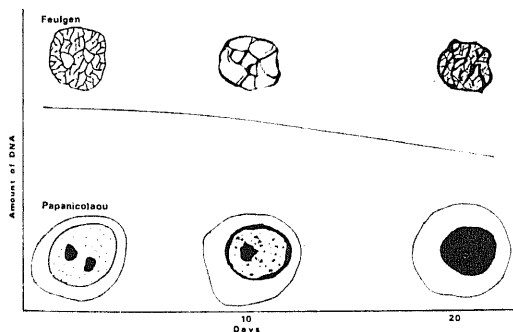


Fig. 25. Sequential degenerative change in morphology of Ehrlich ascites tumor cells kept at 4°C in the original ascites with special reference to Feulgen reactive DNA.

解状を呈するが、3日後には再びやや粗大な凝集塊が出現し、DNA量の初期の減少と対比できる所見と考えられる。Papanicolaou染色では1日後の核内は粗網状を呈し、3日後には凝集塊がやや減少して網状構造に断裂をみる様になるが、著明な変化とはいえない。Feulgen反応標本では、1日後と3日後はともに核内は粗網状構造を呈するが、その間隙部分では1日後は淡く染まるが、3日後には染まらずぬけてみえ、Feulgen reactive DNA量の減少の説明ができる所見といえよう。

保存7日後のDNA量は採取直後の約2/3に減少し、ヒストグラムの各ピークは不明瞭になり、非腫瘍細胞と腫瘍細胞の区別が困難になる。位相差所見では核内は粗顆粒状で、以後著明な変化をみない。Papanicolaou染色では核内は粗顆粒状または濃縮状、Feulgen反応標本では網状あるいは、その断裂のため粗顆粒状にみえる。核径が著明に縮小し、一部には濃縮状の核もみる。

保存14日後のDNA量は採取直後の約1/2に減少し、ヒストグラムの各ピークはほとんど消失する。Papanicolaou染色、Feulgen反応所見ではともに核内は粗顆粒状で、淡染するものが多いが、なかには濃縮状の核もみる。保存21日後のDNA量は採取直後の約1/3以下に減少し、Papanicolaou染色およびFeulgen反応では核破砕状または不染の核が多くなり、明らかにDNA量の減少に一致する所見を呈する。

細胞の変性過程を形態学的に観察した報告は多いが、飯島<sup>36)</sup>、堤<sup>27)</sup>、Lancker<sup>38)</sup>、Baker<sup>39)</sup>、Alfert<sup>16)</sup>、Leuchtenberger<sup>17)</sup>など組織学的に検討したものが多く、遊離細胞を対象とした報告は中村<sup>18)</sup>、片柳<sup>19)</sup>、田嶋<sup>37)</sup>など比較的少ない。また細胞の変性過程でDNA量と形態の対比はLeuchtenberger<sup>17)</sup>、Alfert<sup>16)</sup>、Lancker<sup>38)</sup>らの報告にみるが、いずれも組織学的に検討したもので、遊離細胞を対象としたものではない。

位相差顕微鏡は生の細胞の形態学的観察や機能の観察にすぐれた方法であり<sup>41)42)</sup>、細胞の早期の変性の観察にも有効な観察法と考えられる<sup>18)</sup>。しかし、本実験の結果から、DNA量の減少は位相差所見で核内が融解状となった後に再び凝集して粗顆粒状を呈する時点からと考えられるが、それ以後はDNA量の減少にも拘らず、位相差所見では著明な変化を示さず、変性の進んだ細胞の観察には不適當と考えられる。DNA量の減少と形態学的所見の変化がよく対応するという点では、Papanicolaou染色およびFeulgen反応はともに変性の進んだ細胞の観察に適した方法といえよう。田嶋<sup>46)</sup>らは著しく変性が進みヘマトキシリンで濃染す

る核は、Feulgen 反応では淡染または不染のことが多いとしているが、本実験結果からは、飯島<sup>36)</sup>、中村<sup>18)</sup>などの報告と同様にヘマトキシリン染色と Feulgen 反応の染色所見に差を認めない。エールリッヒ腹水がん細胞の変性過程でのヘマトキシリン染色および Feulgen 反応による核染色量の比較では、むしろヘマトキシリン染色での減少がより急である結果<sup>43)</sup>を得ている。この結果は採取直後の細胞ではヘマトキシリンは DNA の他に多くの細胞成分を染色し、細胞質の共染をみる<sup>15)</sup>。これらの中には RNA の様に細胞の変性の比較的早期に消失するものもあり<sup>43)</sup>、これらが染色量の減少率を大きくしていると考えられ、変性の進んだ両染色法による所見に著しい差異はないと考えられる。

核染色質に対する染色性には、核蛋白と核酸の結合が関係する。クロマチンは DNA と塩基性蛋白質 (histone) がイオン結合しているといわれ、大場<sup>10)</sup>は DNA の磷酸基の半分は結合せずにクロマチンの表面に露出していると考えている。山田<sup>44)</sup>の仮説によれば、変性により DNA と histone が解離し、磷酸基がより多く露出してヘマトキシリンと結合しやすくなるが、クロマチン網が破壊されて一定の配列を示さず、いわゆる濃縮状を呈するとしている。濃縮核では核径が著明に縮小し、単位面積当りの染色量が増加し、濃染してみえるが、DNA は解重合により減少しているので、核全体としてのヘマトキシリン染色量は減少すると考えられる。

新鮮な細胞は、位相差所見や Papanicolaou 染色所見で核内にはわずかに細顆粒をみるのみで、ほとんど均質無構造であり、動物材料での飯島<sup>36)</sup>、中村<sup>18)</sup>など、臨床材料での西谷ら<sup>45)</sup>(子宮)、松田<sup>46)</sup>ら(肺)、片柳<sup>19)</sup>(胃)らの報告と同様の結果をえた。従来より広く悪性細胞の判定に用いてきた Papanicolaou の基準<sup>1)</sup>にある核縁の不均等肥厚、核内の粗大凝集塊などの所見はこれまでの諸家の報告にもみるように、細胞の変性が進むにつれて生じる所見であり、Papanicolaou の基準では細胞の変性による変化が十分に考慮されていなかったと考えられる。37°C に保存 24 時間後までの比較的早期の細胞の変性については、多くの報告があり<sup>18)</sup><sup>19)</sup><sup>36)</sup>、DNA 量は変性の早期には変化をみないので、本論文では詳細な記述を省略した。

本実験成績で示した細胞の変性過程での核クロマチン像の変化を田嶋<sup>40)</sup>らの記載法により要約すると、Fig. 24, 25 に示すように、変性が進むにつれ、1) 均質無構造ないし小顆粒状、2) 細網状から粗網状、3) 粗顆粒状または濃縮状、4) 淡濁状または

は破碎状、5) 不染となる。DNA 量の変化と形態学的所見の関係をみると、核内が粗網状構造の間はほとんど減少なく、その網状構造の断裂をみる時点から減少をみる。次いで粗顆粒状または濃縮状の核では DNA 量は採取直後の約 2/3 ~ 1/2 に減少し、さらに淡濁状または破碎状の核では DNA 量は約 1/3 ~ 1/4 以下になる。

Leuchtenberger<sup>17)</sup>は移植した sarcoma 180 を用いて、Feulgen reactive DNA 量と細胞形態(組織標本)を対比している。彼女は核の pycnosis を三段階に分け、pycnosis I は顆粒状で DNA 量は著明な減少をみない。pycnosis II はいわゆる濃縮状で DNA 量は約 1/2 になる。pycnosis III は濃縮状ないし淡濁状と考えられる形態を呈し、DNA 量は約 1/3 になると報じている。これは in vivo での変性を組織標本で検討したものであり、本実験とは条件を異にするので結果を直ちに比較することはできないが、変性の進行の程度に違いがあっても、DNA 量と形態学的所見の関係は本実験の結果と基本的には同様と考えられる。この他 Alfert<sup>16)</sup>はモルモットの卵巢で、正常の卵細胞と pycnosis の細胞の DNA 量を検討し、James<sup>34)</sup>はラット肝を用い、虚血性変化による DNA 量の変化を検討し、90 分後には対照の 20 ~ 80% に減り、核は大多数が karyolytic な変化を示し、不可逆的な傷害を受けると報告しているが、DNA 量と形態学的所見の詳細な対比はなされていない。

最近、開発が進んでいる自動細胞診装置は細胞診断システムにより、日本や欧州で研究している slide system と<sup>7)</sup><sup>18)</sup><sup>14)</sup><sup>7)</sup><sup>48)</sup>、主に米国で研究している flow-through system<sup>49)</sup><sup>50)</sup><sup>51)</sup>に分けることができる。わが国で研究の進んでいる slide system での悪性細胞の判定には、核染色量、核径、核・胞体比、クロマチン構造などを重要な情報源とし、flow-through system でも核染色量を判定のための情報としているので、変性による核染色量および形態学的所見の変化を十分に考慮しなければならない。本実験の 37°C に保存した細胞では、3 日後までは DNA 量および形態学的所見により非腫瘍細胞と腫瘍細胞を区別できた。しかし、これはモデル実験の結果であり、実際の臨床で取り扱う検体とは、温度、medium、細菌汚染あるいは血球の混入など多くの条件を異にするので、単純には比較できないが、変性に対し十分な配慮が必要であることを示している。

次に、細胞の保存温度の違いが変性の過程に及ぼす影響について考察する。37°C に保存した細胞の変性は、4°C に保存した場合に比べて著しく早く、例えば

位相差像, Papanicolaou 染色および Feulgen 反応のいずれでも 37°C に保存した細胞の 1 日後の所見は 4°C に保存した細胞の 7 日後の所見にほぼ一致する結果をえている。細胞の保存温度の違いによる形態学的所見の差異としては, 4°C に保存した細胞の 14 日後以降では濃縮状の核が著明に多くなり, 37°C に保存した場合顆粒状の核が多いのとはやや異なる結果をえた。低温に保存した細胞の変性の遅れについては, 堤<sup>37)</sup>, 安藤<sup>21)</sup>なども報告しており, 細胞内の酵素活性の低下による自己融解速度の減少<sup>52,53)</sup>, 低温により medium の変化がおこり難いことなどが考えられよう。DNA 量の減少も 4°C に保存した細胞では遅くなり, 37°C に保存した細胞の 3 日後のヒストグラムと 4°C に保存の 21 日後のヒストグラムがほぼ同様である結果をえた。4°C に保存した細胞での DNA 量の変化と形態学的所見の関係は, 前述の 37°C に保存とほぼ同様の結果をえた。4°C に保存した細胞では, 全般に DNA 量が減少するにも拘らず, ヒストグラムで各ピークを認め, 形態学的観察でも, 同一標本でみる細胞はほぼ類似の形態を示すなどより, 4°C に保存した細胞では変性過程のばらつきが少ないと考えられる。一方, 37°C に保存した細胞では, 採取直後の細胞の間にあった僅かな変性の程度の相違が時間の経過とともに増幅され, ばらつきが大きくなると考えられる。

以上のように細胞の変性過程に及ぼす温度の影響はきわめて大きく, DNA は細胞内の分解酵素により解重合後分解されその量を減少すると考えられる。さらに, 解重合の後その一部は細胞から脱落することも DNA 量の減少の一因と考えられよう。Leuchtenberger<sup>17)</sup> および Alfert<sup>16)</sup> は methyl green の DNA に対する染色性 (methyl green は高重合の DNA を染色する<sup>54,55)</sup> とされているが, これには異論<sup>56,15)</sup>がある) を検討し, 細胞内の分解酵素により DNA は核蛋白 (histone など) と離れて解重合され, まず methyl green 染色量が減少し, 次いで Feulgen reactive DNA 量が減少すると述べ, 細胞の変性は細胞内の分解酵素の活性に左右されるので温度による影響が大きいという本実験結果も当然といえよう。

### 3. Medium の核の変性過程に及ぼす影響

細胞診で, より正確な診断を得るための一つに細胞採取法の改良があり, 多くの成果をみている。現在胃や腸, 手術時の胸腔や腹腔, 膀胱, 婦人性器などでは, 洗浄細胞診が行なわれ, 胃の洗浄細胞診を主として洗浄液の検討が行なわれている<sup>22,23)</sup>。一方, 組織培養法の進歩に伴い免疫学などで生きた細胞を取り扱う研究および検査法が普及し, 体液に近い多くの medium が

開発されている。しかし, 臨床の洗浄細胞診では, 十分の検討なしに生理食塩水を用いる場合が多いのである。生理食塩水など各種の medium の細胞形態に及ぼす影響についての検討は武田<sup>57)</sup>などの報告のほか比較的少なく, 特に DNA 量と比較検討した報告は現在までのところみられない。婦人科領域の集団検診で採用している自己採取法<sup>24)</sup>では, 輸送などのため, 比較的長時間の保存を必要とするので, アルコールやホルマリンなどの固定液を含んだ medium の検討が形態と DNA 量から行なわれている<sup>26)</sup>。

本実験では, 安価で容易に入手できる medium を選んで検討の対象とした。浸透圧のみを体液と等しくした 5%ブドウ糖液および生理食塩水, 電解質の種類を多くして体液の性状に類似させたリンゲル液, 培養液の素材であるハンクス II 液を選び細胞を浮遊して, 37°C および 4°C に保存し, 経時的に細胞を取り出し変性過程での DNA 量と形態学的所見を比較検討した。5%ブドウ糖液は, 前述の自家腹水に比較して, DNA 量および細胞の形態に及ぼす影響は著しく大きく, 吉井<sup>23)</sup>とほぼ同様の結果をえて, ただ浸透圧を一致させるだけでは良好な細胞保存液になりえないことを知った。また 5%ブドウ糖液では細胞変性の進行が早いだけでなく, 形態学的にも核内がかなり早期より融解状で無構造になり, 自家腹水との間に著しい差異をみる。これは武田<sup>57)</sup>も述べているように, Ca<sup>++</sup>などのイオンの有無がクロマチン構造の出現に関与しているためと考えられる。

生理食塩水, リンゲル液およびハンクス II 液に 37°C で保存した細胞の変性過程は, 自家腹水に保存した場合と基本的な差異はなく, 変性の進行の程度に差があるのみと考えられる。生理食塩水では浮遊の直後より核内の凝集塊の増加をみるなど, 比較的早期より変性が進み, 濃縮状の核を多数みるようになり, 保存 17 日後より自家腹水中に保存した細胞の変性過程との差が明らかになる。DNA 量も保存 14 日後には採取直後の約 1/3 に減少し, 各ピークは認められなくなり, 自家腹水中に保存の 21 日後の所見とほぼ同様になる。リンゲル液では, 形態学的所見および DNA 量の変化は自家腹水中に保存した場合とほぼ同様で最もよい結果を得た。ハンクス II 液でも保存 3 日後までの変性は, 自家腹水中に保存した場合とほとんど変わらないが, 保存が長時間になると, 自家腹水中に保存した場合に比べ変性が僅かに早くなる。しかし生理食塩水に保存した程著明ではない。DNA 量はハンクス II 液に保存の 14 日後は採取直後の約 1/3 になり, 自家腹水中に保存の 21 日後の結果に類似する。吉井<sup>23)</sup>はハンクス液, 生

理食塩水, 0.1M 酢酸緩衝液  $\alpha$ -chymotrypsin 加 0.1M 酢酸緩衝液および 5% ブドウ糖液について, 37°C に保存し 2 時間後までの細胞の形態学的変化を検討し, ハンクス液が最もよい成績を得たとしている。本実験でもほぼ同様の結果を得ており, 保存 21 日後の結果でも, リンゲル液が最もよく, 次いでハンクス II 液, 生理食塩水がよく, 5% ブドウ糖液が劣る結果をえた。ハンクス II 液は組織培養液の素材であり, リンゲル液よりも好成績を予想したが, 本実験の目的は死んだ細胞の保存性にあり, 生きている細胞を対象とする組織培養液としての優劣の検討でないための相違と考えられる。ハンクス II 液とリンゲル液の組成の大きな違いはブドウ糖の有無と考えられる。保存液としての 5% ブドウ糖液の検討結果からも, ハンクス II 液中に含まれるブドウ糖が細胞保存液としての成績を悪くしたことも考えられる。

各種の medium の保存温度の違いによる影響を検討し, 自家腹水中に保存したと同様, 4°C に保存した場合は著明に変性の進行が遅くなる結果をえた。5% ブドウ糖では保存 21 日後に DNA 量は採取直後の約 1/2 に減少し, 核は濃縮状で淡染の傾向を示し, 37°C で保存 1 日後の所見に相当する。生理食塩水, リンゲル液およびハンクス II 液では保存 28 日後の DNA 量は採取直後の約 1/2 となり, 自家腹水中で 37°C に保存 14 日後の所見に相当する。また 4°C に保存した場合は, 37°C に保存した場合にみられた生理食塩水, リンゲル液およびハンクス II 液の間の変性過程の差異をほとんど認めない。これは各種の medium 中においても自家腹水中と同様に各種の細胞内酵素が変性に関与していることを考えさせ, 4°C に保存した場合でもさらに長時間の保存では各 medium による変性過程の相違が出現すると考えられる。実際の集団検診などでの, 検体の輸送, 保存に際しては, 適当な保存液を選ぶのはもちろん, それにもまして温度による影響への配慮が肝要で, できれば 4°C での保存が望ましい。

## 結 論

エールリッヒ腹水がん細胞について, その変性過程での, Feulgen 反応による細胞化学的 DNA 量および生化学的 DNA 量を測定するとともに, 位相差顕微鏡, Papanicolaou 染色および Feulgen 反応による細胞形態学的観察を行ない以下の結果を得た。

1. 変性過程での DNA 量の変化を Feulgen 反応による細胞化学的定量と Barton 法による生化学的定量を行ない, ほぼ同様の減少曲線を得て, 細胞化学的 DNA 定量も生化学的定量と同様信頼できる方法であ

ることを示した。

2. 変性過程での細胞形態学的観察で, 位相差顕微鏡は変性の比較的早期観察に適しているが, 変性の進んだ細胞には適していない。Papanicolaou 染色および Feulgen 反応は変性がかかなり進んだ細胞でも観察できる。

3. 細胞変性過程での形態学的所見と DNA 量を対比すると, クロマチン構造が, 均質無構造, 小顆粒状, 細かいし粗網状を呈する時点では DNA 量は著明な減少を示さない。粗顆粒状あるいは濃縮状を呈すると, DNA 量は約 2/3 ~ 1/2 に減少する。さらに淡濁状あるいは破碎状を呈すると, DNA 量は 1/2 ~ 1/4 に減少する。

4. 細胞の保存温度の変性に及ぼす影響はきわめて大きく, 4°C での保存は 37°C での保存に比較して変性の進行が著しく遅れ, 4°C で保存 7 日後の細胞所見は 37°C で保存 1 日後に相当する。

5. 各種の medium が細胞変性過程で形態と DNA 量に及ぼす影響を比較検討し, リンゲル液, ハンクス II 液および生理食塩水はいずれも自家腹水に保存した細胞の変性過程とほぼ同様で, なかでもリンゲル液が最もすぐれた保存液である結果をえた。5% ブドウ糖液では浮遊の直後より核は融解状になるなど, 他の medium と異なる変性過程を示し, 保存液としては不適當の結果をえた。

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および金沢大学第 3 内科中村忍講師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(班長: 服部正次, 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, Cambridge, Harvard Univ. Press. (1963).
- 2) Hattori, S., Matsuda, M., Nishihara, H. & Horai, T. : Acta Cytol., 15, 460 (1971).
- 3) 西川良平: 日臨細胞誌, 9, 135 (1970).
- 4) 田嶋基男・山岸紀美江・藤間弘行・稲村雅夫・片柳照雄: 日臨細胞誌, 10, 9 (1971).
- 5) 富田 健・吉田脩三・伊藤敬子: 日臨細胞誌, 13, 74 (1974).
- 6) 野田起一郎・古屋恒雄・斉 佳男・伊藤圭子: 日臨細胞誌, 11, 22 (1972).
- 7) Tanaka, N., Ikeda, H., Ueno, T., Takahashi, M., Imasato, Y., Watanabe, S. & Kashida, R. :



- Acta Cytol., 21, 72 (1977).
- 8) 岸上義彦・横山 泰・服部正次・橋本良夫：癌の臨床, 21, 1005 (1975).
  - 9) 倉科喜一：細胞, 7, 386 (1975).
  - 10) 大場義樹：臨床免疫, 7, 515 (1975).
  - 11) Berenbom, M., Chang, P. I., Betz, H. & Stowell, R. E. : Cancer Res., 15, 1 (1955).
  - 12) 小島吉雄：日本臨床, 19, 2295 (1961).
  - 13) Freni, S. C., James, J., & Prop, F. J. A. : Acta Cytol., 15, 154 (1971).
  - 14) Leemann, U., Ruch, F. & Strauli, P. : Acta Cytol., 12, 381 (1968).
  - 15) 吉田 喬・中村 忍・五嶋亜男・大重 力・三田村英一・服部絢一・谷本一夫：日臨細胞誌, 17, 64 (1978).
  - 16) Alfert, M. : Biol. Bull., 109, 1 (1955).
  - 17) Leuchtenberger, C. : Chromosoma, 3, 449 (1950).
  - 18) 中村 忍：十全医会誌, 83, 749 (1974).
  - 19) 片柳照雄：日消会誌, 66, 1457 (1969).
  - 20) 田村 宏・中野俊一・中村義文・渡辺善正：日本臨床, 26, 204 (1968).
  - 21) 安藤和雄：日臨細胞誌, 8, 1 (1969).
  - 22) 山田 喬：日消会誌, 56, 101 (1959).
  - 23) 吉井由利：日臨細胞誌, 9, 1 (1970).
  - 24) 天神美夫：産と婦, 38, 368 (1971).
  - 25) 小林康夫・近藤明人・矢吹光子：日臨細胞誌, 9, 170 (1970).
  - 26) 三田村英一・中村 忍・吉田 喬・小林三郎・服部絢一・谷本一夫：日臨細胞誌印刷中。
  - 27) Schneider, W. C. : J. Biol. Chem., 164, 747 (1946).
  - 28) Burton, K. : Biochem. J., 62, 315 (1956).
  - 29) Feulgen, R., & Rossenbeck, H. : Z. Physiol. Chem., 135, 203 (1924).
  - 30) Stedman, E., & Stedman, E. : Biochem. J., 47, 508 (1950).
  - 31) Grove, G. L. : Exp. Cell Res., 87, 386 (1974).
  - 32) Leuchtenberger, C., Klein, G., & Klein, E. : Cancer Res., 12, 482 (1952).
  - 33) Leuchtenberger, C., Vendrely, R. & Vendrely, C. : Proc. Natl. Acad. Sci., 37, 33 (1951).
  - 34) James, J. : Histochemic, 13, 312 (1968).
  - 35) Kasten, F. H. : Exp. Cell Res., 19, 93 (1960).
  - 36) 飯島宗一：名古屋医学, 69, 294 (1955).
  - 37) 堤 鎮男：札幌医誌, 18, 109 (1960).
  - 38) Van Lancker, J. L. & Holtzer, R. L. : Lab. Invest., 12, 102 (1963).
  - 39) Baker, H. C. : J. Path. Bact., 71, 135 (1956).
  - 40) 田嶋基男・山岸紀美江・渡辺庸一・多賀須幸男：診断と治療, 43, 305 (1968).
  - 41) 三宅健夫：日本血液学全書6-1術式, 101頁, 東京, 丸善, 1964.
  - 42) 辻谷賢三：米子医誌, 10, 150 (1959).
  - 43) 服部絢一：昭和48, 49, 50年度厚生省癌研究助成金による自動細胞診システムの実用化に関する研究班報告書, 125 (1975).
  - 44) 山田 喬：日臨細胞誌, 10, 116 (1971).
  - 45) 西谷 巖・松田正二・一戸喜兵衛：日臨細胞誌, 5, 23 (1966).
  - 46) 松田 実・建石龍平・加藤みよ・服部正次：日臨細胞誌, 6, 1 (1967).
  - 47) 西谷 巖・菊地徳博・山崎知文：産と婦, 27, 517 (1973).
  - 48) Wied, G. L., Bartel, P. H., Bahr, G. F. & Oldfield, O. G. : Acta Cytol., 12, 177 (1968).
  - 49) Sprenger, E., Sandritter, W., Bohm, N., Wagner, D., Hilgarth, M. & Schaden, M. : Acta Cytol., 16, 297 (1972).
  - 50) Mullaney, P. F., Van Dilla, V. A., Coulter, J. R. & Dean, P. N. : Rev. Sci. Instr., 40, 1029 (1969).
  - 51) Kamentsky, L. A., Melamed, M. R. & Derman, H. : Science, 150, 630 (1965).
  - 52) Gossner, W. : Virchow Arch. Pathol. Anat., 327, 304 (1955).
  - 53) Bessis, M. : Living Blood Cells and their Ultrastructure, New York, Springer-Verlag, 1973.
  - 54) Alfert, M. : Biol. Bull., 103, 145 (1952).
  - 55) Kurnick, N. B. : J. Gen. Physiol., 33, 243 (1950).
  - 56) Rosenkranz, H. S. & Bendich, A. : J. Ciophysic and Biochem. Cytol., 4, 663 (1958).
  - 57) 武田 進：腫瘍細胞, 22頁, 大阪, 永井書店, 1956.

## A b s t r a c t

The degenerative change of cancer cells has become one of the most important problems to develop automatic cytology, since widely collected materials could be left for several (7 at most) days until they were stained.

In this study, the sequential degenerative process of the Ehrlich ascites tumor cell kept in different conditions was investigated from the view-points of both morphology and DNA amount by cytophotometer.

1. In the degenerative process, the changes in Feulgen reactive DNA and diphenylamine reactive DNA were found to progress in parallel.

2. To morphologically observe the degenerative process, both Papanicolaou stain and Feulgen reaction were more proper tools than phase contrast microscope.

3. Comparative study showed that DNA amount measured by photometer did not change in the cells with homogenous small and reticular patterns of the nucleus on the Pap stained smear, but it decreased to about 2/3 to 1/2 in those with large granular and pyknotic nuclear patterns and to about 1/2 to 1/4 in the cell with karyoclastic pattern.

4. Study on the conditions of tumor cell preservation revealed that preservation at 4°C remarkably prolonged the nuclear degeneration compared with that at 37°C, and the Ringer solution was the best medium, Haks II and physiologic saline solutions were the second in availability, but 5% glucose solution was not available for a medium.

---

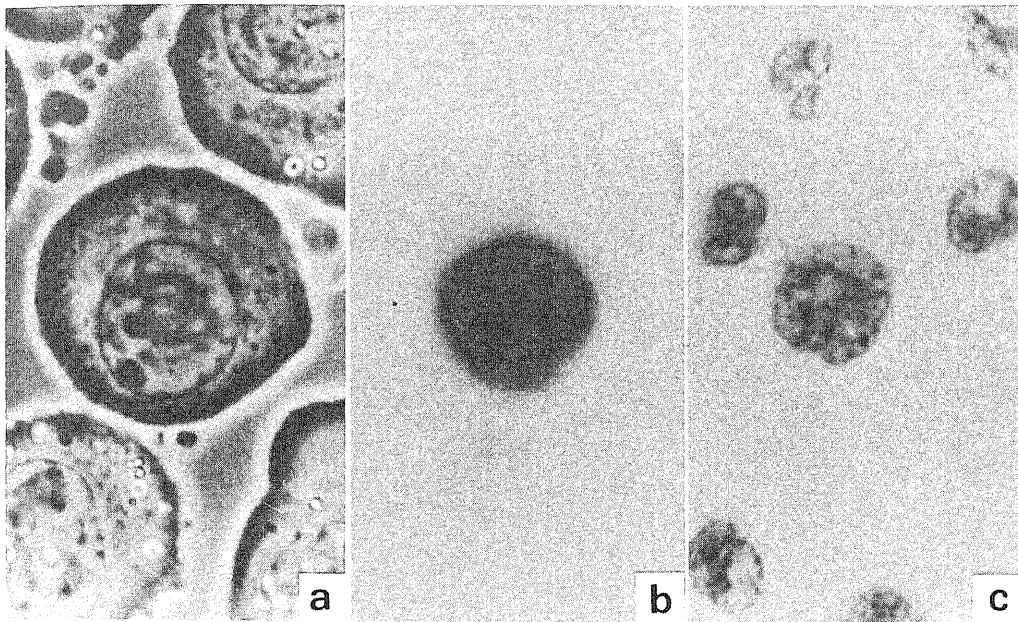


Fig. 2. Ehrlich ascites tumor cell in a fresh state.

- a: Phase contrast microscope (PCM) picture.  
Note the homogenous nuclear structure.
- b: Papanicolaou stain (Pap stain).  
Note the smooth nuclear margin and scanty, small intranuclear clumps.
- c: Feulgen reaction.  
Note the diffusely stained nucleus.

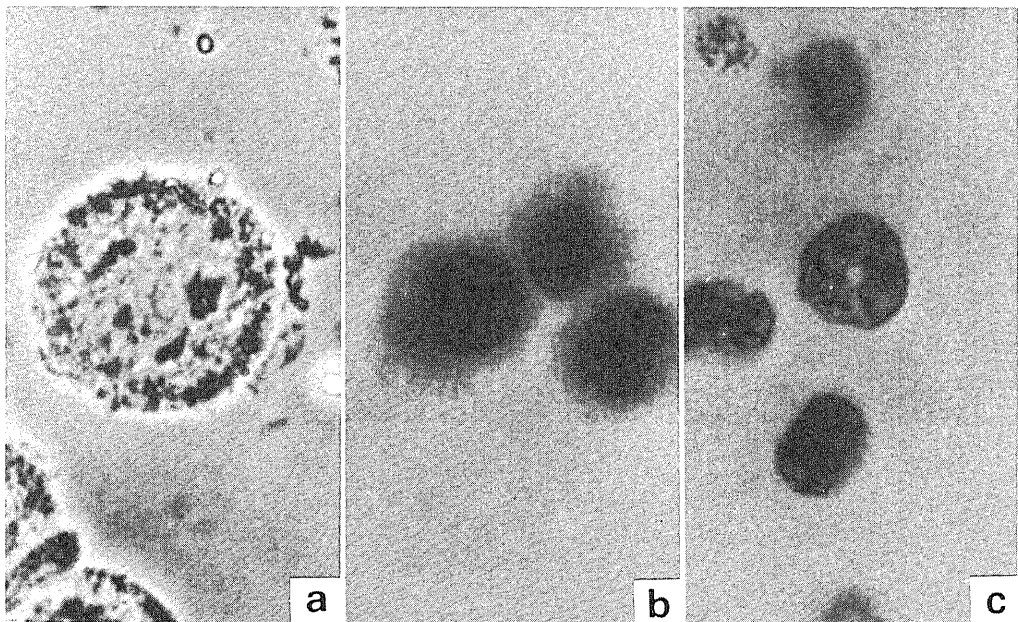


Fig. 3. The nuclear change of the cell kept at 37°C in the original ascites for 7 days.

- a: Note the nuclear clumps-like structure. PCM.
- b: Note the irregular nuclear margin and large intranuclear clumps. Pap stain.
- c: Note large Feulgen reactive clumps. Feulgen reaction.

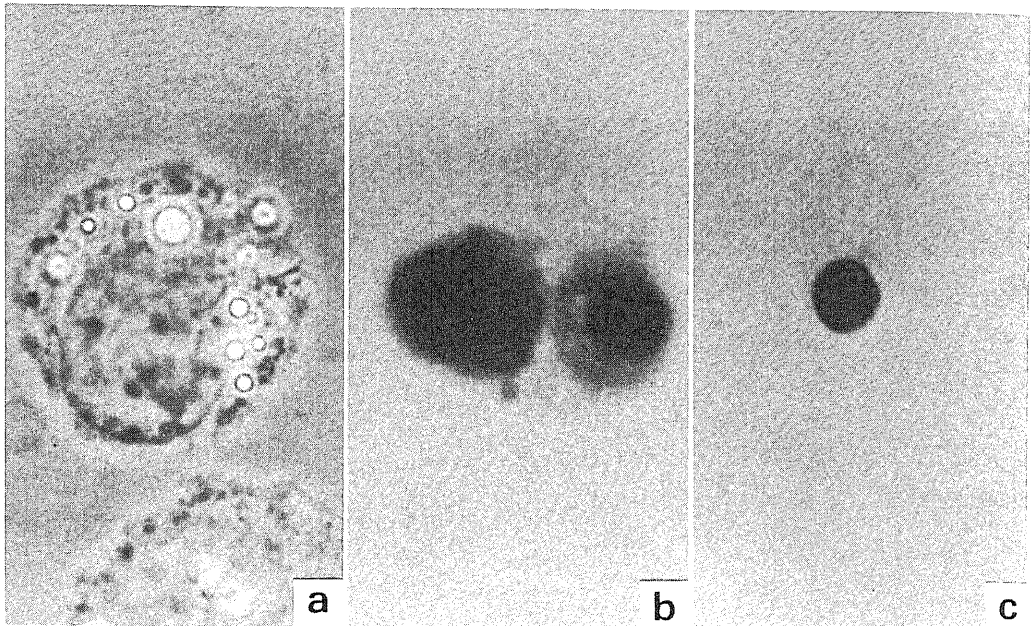


Fig. 4. The nuclear change of the cell kept at 4°C in the original ascites for 21 days.  
 a: Note the homogenous nuclear structure. PCM.  
 b: Note the pyknotic nuclear structure. Pap stain.  
 c: Note the pyknotic nuclear structure. Feulgen reaction.

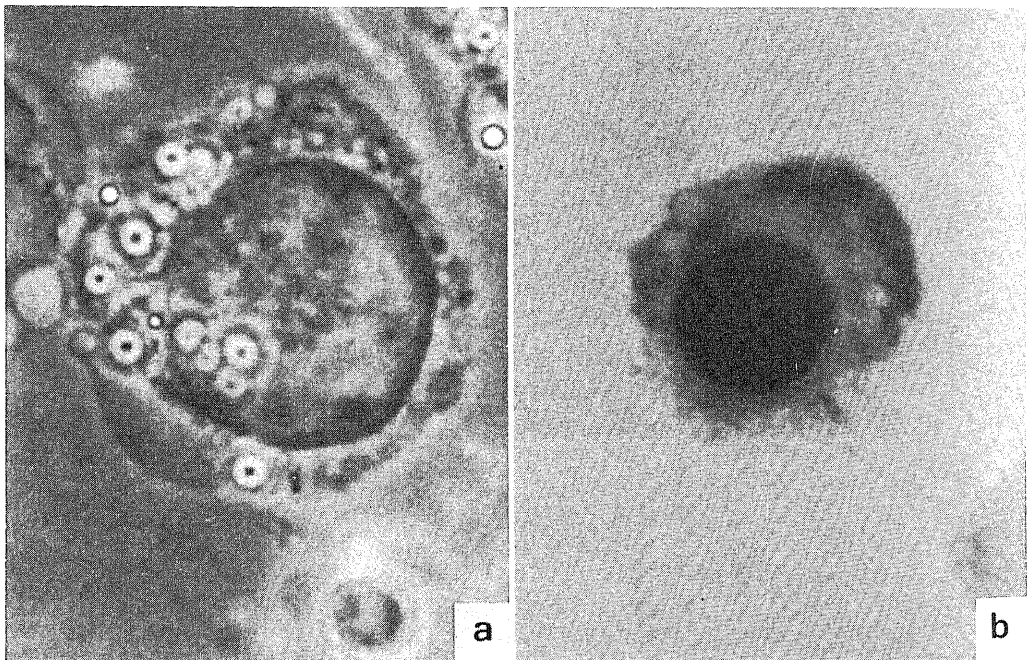


Fig. 7. The nuclear change of the cell kept at 37°C in 5% glucose solution for 3 hrs.  
 a: Note the homogenous nuclear structure. PCM.  
 b: Note the homogenous nuclear structure. Pap stain.

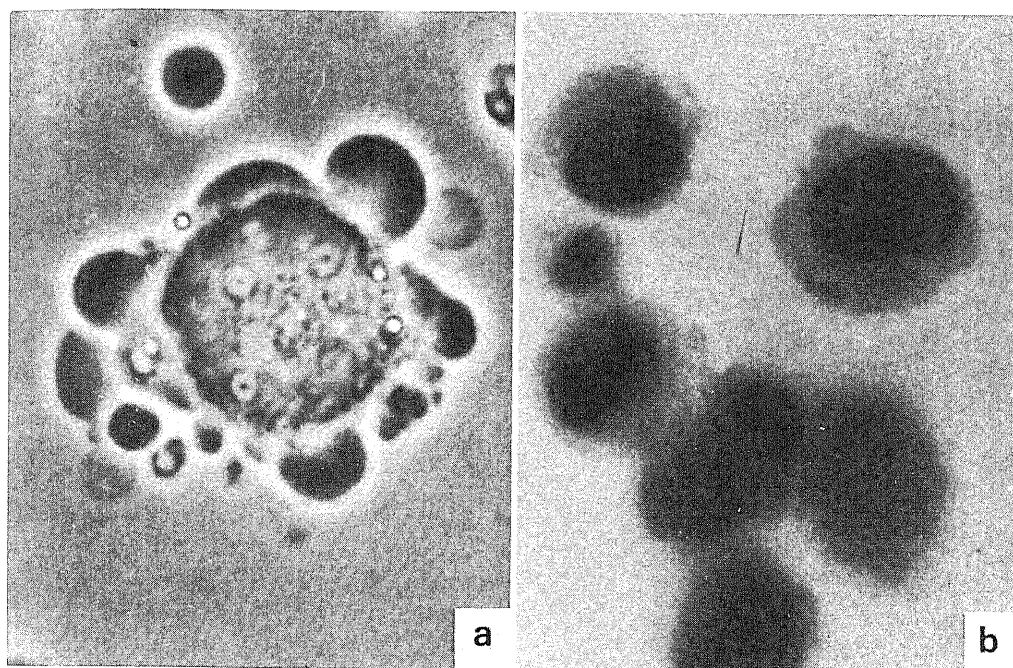


Fig. 8. The nuclear change of the cell kept at 37°C in physiologic saline solution for 3 days.  
a: Note the nuclear clumps-like structure. PCM.  
b: Note the irregular and thick nuclear margin and large intranuclear clumps. Pap stain.

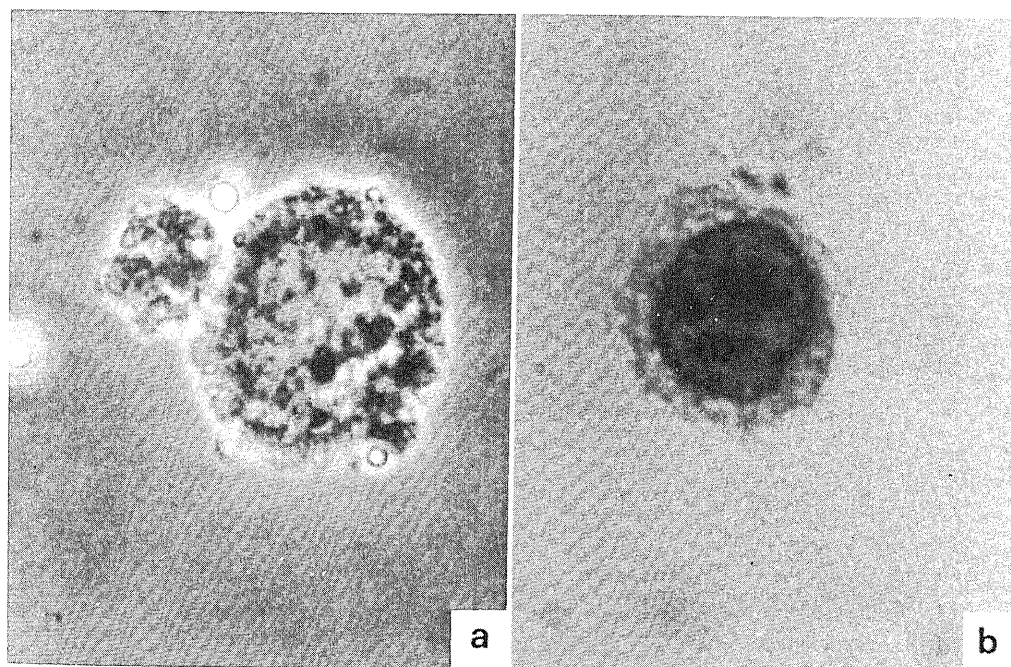


Fig. 9. The nuclear change of the cell kept at 37°C in Ringer solution for 3 days.  
a, b: Note the same changes as seen in Fig. 8.

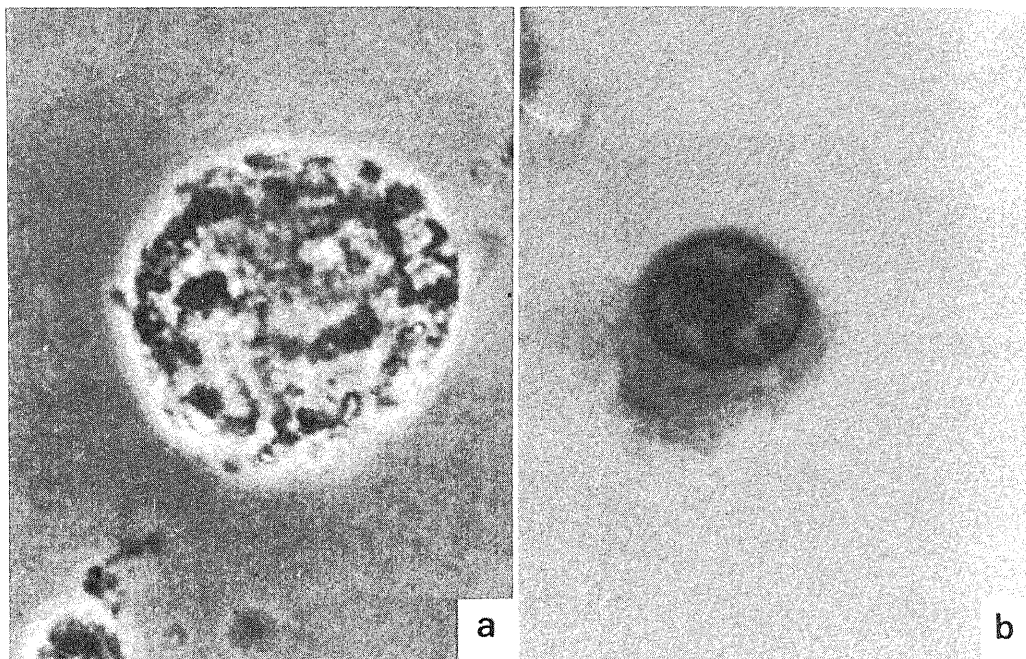


Fig. 10. The nuclear change of the cell kept at 37°C in Hanks solution II for 3 days.  
a, b: Note the same changes as seen in Fig. 8.

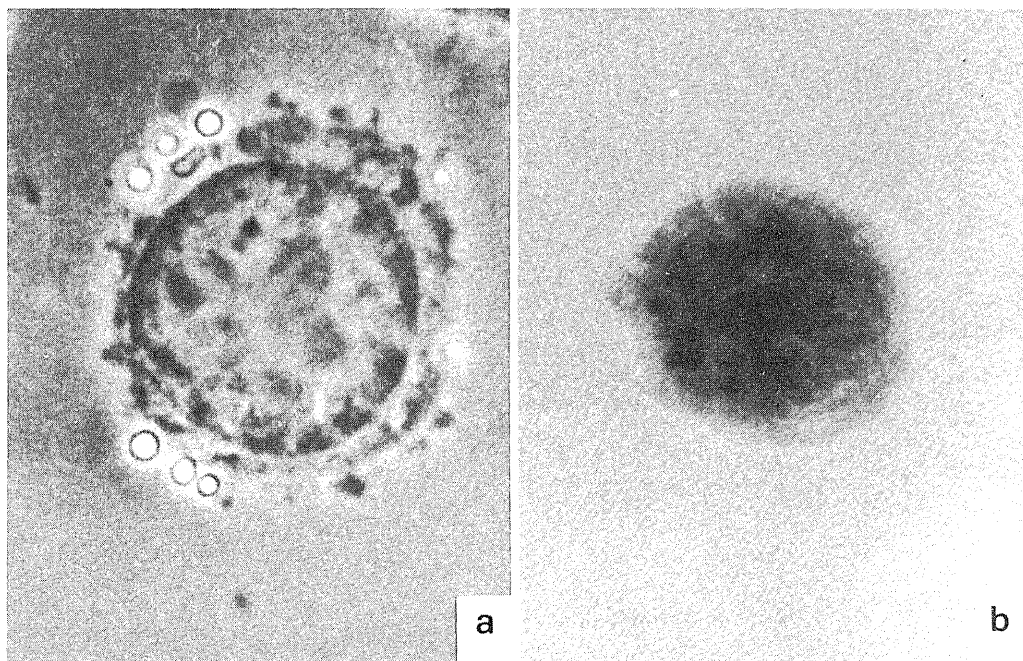


Fig. 11. The nuclear change of the cell kept at 4°C in 5% glucose solution for 21 days.  
a: Note the nuclear clumps-like structure. PCM.  
b: Note karyoklastic nuclear structure. Pap stain.

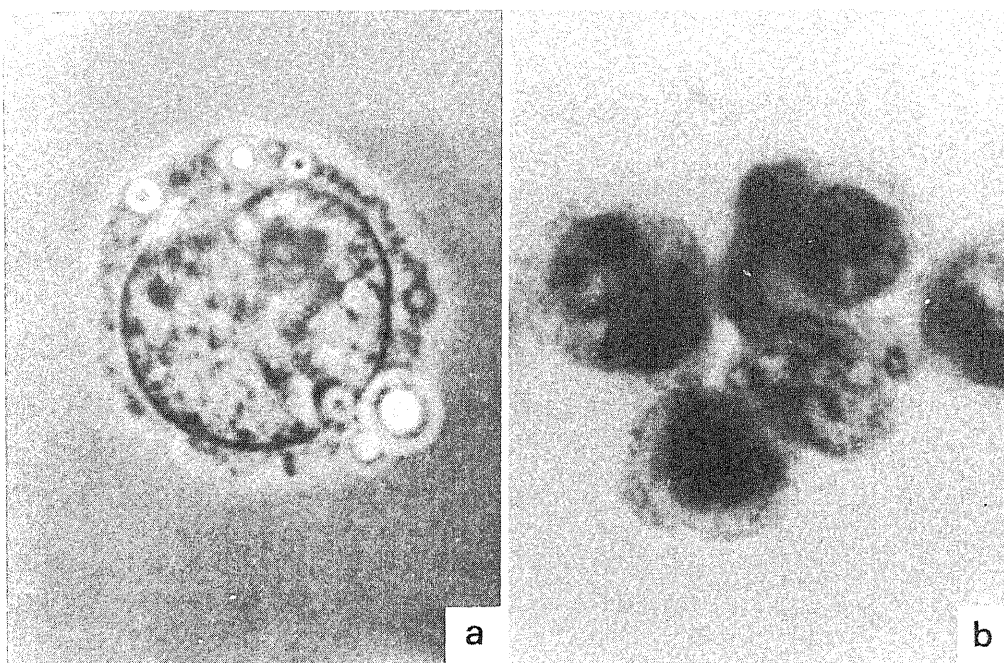


Fig. 12. The nuclear change of the cell kept at 4°C in physiologic saline solution for 21 days.  
 a: Note the same change as seen in Fig. 11 a. PCM.  
 b: Note karyoklastic or pyknotic nuclear structure. Pap stain.

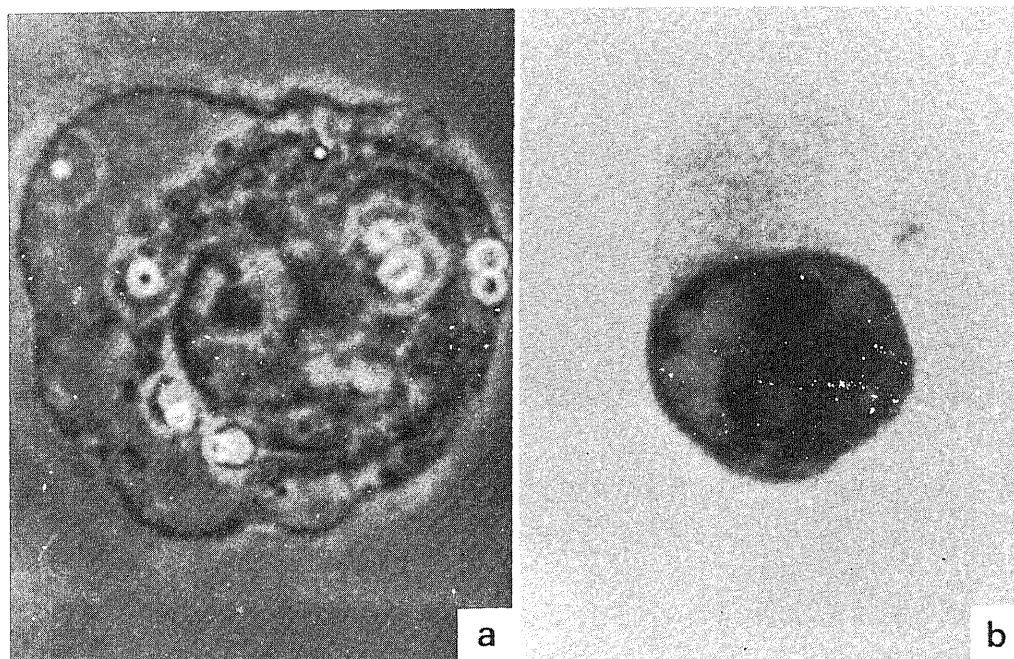


Fig. 13. The nuclear change of the cell kept at 4°C in Ringer solution for 21 days.  
 a: Note the same change as seen in Fig. 11 a. PCM.  
 b: Note large intranuclear clumps. Pap stain.

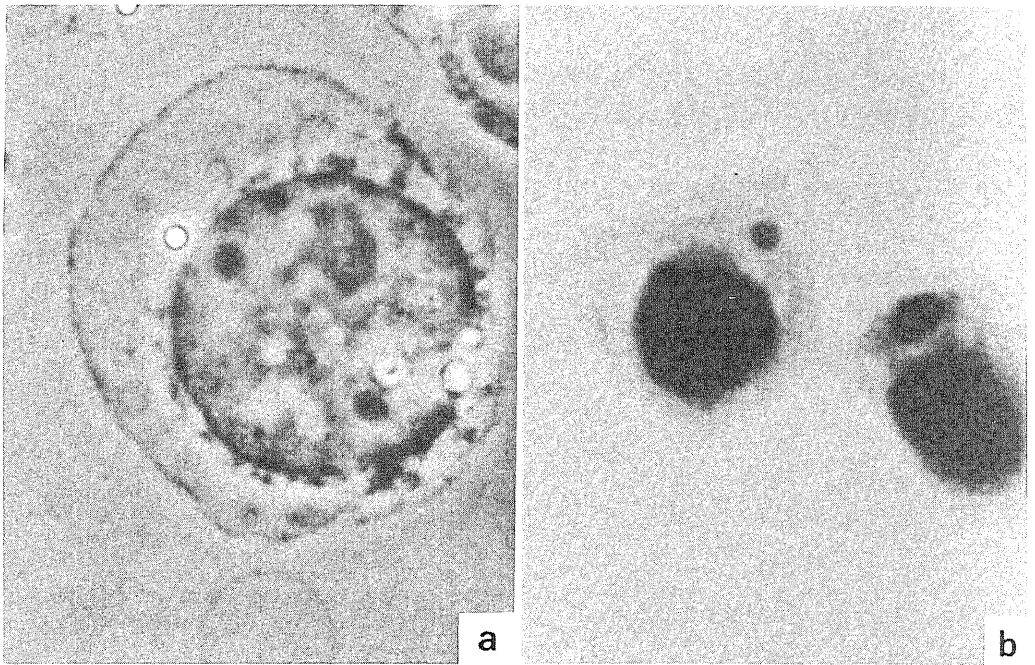


Fig. 14. The nuclear change of the cell kept at 4°C in Hanks solution II for 21 days.

a: Note the same change as seen in Fig. 11 a. PCM.

b: Note pyknotic nuclear structure. Pap stain.