

## 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—

金沢大学医学部内科学第3講座（主任：服部絢一教授）

金沢大学医療技術短期大学部（指導：谷本一夫教授）

中 村 忍

（昭和49年7月24日受付）

本論文の要旨は昭和46年第12回日本臨床細胞学会総会シンポジウムにおいて報告した。

細胞採取法の進歩とともに細胞を新鮮な状態で観察する機会が多くなり、従来の悪性判定基準で処理できない細胞の存在が注目され、現在これらの細胞を含めて良、悪性判定基準の再検討が進められている<sup>1)~4)</sup>。この問題の由来するところは Papanicolaou<sup>5)</sup> の "Criteria of malignancy" が、主として組織から剥離した変性がん細胞に基づいて設定されたものでありながら変性による細胞形態の検討が充分に行われなかった点にある。この点に関して田嶋ら<sup>6)</sup>は詳細な実験的観察を行い細胞診の悪性判定基準においても変性を充分に考慮する必要があることを強調している。

細胞は組織から剥離して採取され、染色・鏡検に達するまでには種々の操作により形態的に大きな変化を被っている。細胞形態に影響を与えるおもな因子として

- 1) 細胞採取の対象である個体の生理的条件
- 2) 組織から剥離して採取されるまでに細胞のおかれていた環境
- 3) 採取時および標本作製時の機械的操作
- 4) 採取から固定までの時間および保存温度などの物理的条件
- 5) 固定や染色などの化学的操作

などが挙げられよう。これらの因子により細胞は変性し、顕微鏡下で観察される細胞像は本来の姿とはかなり異なっていると考えられる。このように細胞の被る変性はその原因がきわめて多岐にわたるので、すべての変性を把握するのは不可能であるが、細胞の変性過程の幾らかを形態学的に明らかにすることができれば

実際の細胞診に役立つばかりでなく、飯島<sup>7)8)</sup>や Zollinger<sup>9)</sup> が細胞の変性過程および各種の固定剤や薬物を作用させた時の形態学的変化から核内構成物の動きを推察したように、細胞の構造およびその変化を知る上で重要な情報を得ることができるであろう。

現在用いられている染色法による細胞診の悪性の基準は主として核の形態に求められており、また近年開発が進んでいる細胞診の自動化でも悪性の判定基準はいずれも核の形態学的所見から情報を得ている。このような背景から、核の形態学的研究および生化学的研究はおびただしいが、核の変性過程を形態学的に観察したものは比較的少ないようである。とくに、変性過程の各段階で未固定の生の細胞核と固定・染色した細胞核との対比所見については僅かに片柳<sup>10)</sup>および田村ら<sup>11)</sup>の報告をみるにすぎない。核の変性過程を形態学的に体系づけるには、生の細胞核と固定・染色した核の所見を対比することも必要で、そのための手段として山形<sup>12)</sup>の凍結溶解法はきわめて有用である。

位相差顕微鏡の使用により簡便に未固定の生の細胞の観察が可能となり、とくに細胞の機能や経時的な形態学的変化などのような連続的観察を要する場合は、現在これを越える手段はない<sup>13)~15)</sup>。血液形態学の分野では充分にその効力が発揮されているが<sup>14)16)~22)</sup>、細胞診の分野においても細胞の観察法の一つとしてその有用性が認められてきている<sup>23)~27)</sup>。

本実験では Ehrlich 腹水がん細胞を用いて、核の変性過程を形態学的に明らかにする目的で、主として位相差顕微鏡により観察し、これと固定・染色所見お

Morphological Studies on Nuclear Degeneration Process of Cancer Cell.  
**Shinobu Nakamura**, Department of Internal Medicine (II) (Director : Prof. K. Hattori, Chief of Laboratory : Prof. K. Tanimoto, School of Paramedicine, Kanazawa University.), School of Medicine, Kanazawa University.

よび一部は電子顕微鏡所見と対比した。さらに固定操作による細胞核の形態学的所見に及ぼす影響についても検討を加えたので報告する。

## 実験材料

本実験では、常時ほぼ同一条件の細胞が得られ、採取時の影響も少ないマウス腹腔の Ehrlich 腹水がん細胞を材料として使用した。腹水の採取の方法は、あらかじめ3.8%クエン酸ナトリウム液で注射器および試験管の管壁を湿し、移植後10日前後のマウス腹腔を穿刺し、得た腹水を試験管に移して使用した。

## 観察方法

### I. 核の変性過程の経時的観察

#### 1. 試験管内での核の変性

採取した腹水を37°Cおよび4°Cに可及的無菌的に保存しその一部を採取直後、1、3、6、12、24、48、72および96時間後に取り出し薄層標本を作製し、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 Dark Medium  $\times 40$ 、 $\times 100$ を用い緑色フィルターを透過して観察し、写真撮影にはネオパンFを使用した。同時に各時間毎に塗抹標本を作製し、湿固定の後 Walter-Reed-Army-Hospital 変法による Papanicolaou 染色を施した。37°Cに保存した材料からは各時間毎に塗抹標本を作製しカルノア液で湿固定の後 Feulgen 反応を施した。

#### 2. 位相差像と凍結溶解法による固定・染色像との比較

同一の細胞核について位相差像の所見と染色所見を対比するために、山形<sup>13)</sup>の方法により、位相差顕微鏡下で観察した後、細胞位置を記録し、凍結板上で-25°C~-30°Cで瞬間的に凍結し、あらかじめ冷室に保存しておいたエーテル・95%エタノールで固定し型のごとく Papanicolaou 染色を施して位相差像と対比した。

#### 3. 薄層標本での核の変性

可及的無菌的に位相差観察用の薄層標本を作製し、37°Cの恒温ステージ上で同一の細胞を位相差顕微鏡により経時的に観察した。すなわち、採取直後、1、3、6、12、24、48、72および96時間後に写真撮影を行った。

### II. 固定操作による核の変性

#### 1. 薄層標本の媒液を固定液で置換

薄層標本を作製し、標本的一端でオブジェクトガラスとカバーガラスの間隙から各種の固定液や水を注入し、他端より濾紙で吸引し媒液の置換を行い、同一の

細胞の形態学的変化を位相差顕微鏡下で観察した。固定液は100%、95%、50%、30%および10%エタノール、エーテル・95%エタノール、カルノア液および10%ホルマリンを用いた。

#### 2. 塗抹標本での細胞に対する固定効果

採取直後の腹水および37°Cに24時間保存した腹水からそれぞれ塗抹標本を作製し、固定液としてエーテル・95%エタノール、メタノール、カルノア液、10%ホルマリンおよび1%オスミウム酸に浸した後、型のごとく水洗し、蒸留水を媒液にして位相差顕微鏡下で観察するとともに比較のため Papanicolaou 染色標本を作製した。

#### 3. 固定効果の電子顕微鏡による観察

採取直後と、4°Cあるいは37°Cで72時間保存した腹水の細胞をオスミウム酸単独固定 およびグルタルアルデヒド・オスミウム酸二重固定を施し、エボン・アラルダイト混合液で包埋後、超薄切片を作製し、酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛で染色し、日立HU11-DS型電子顕微鏡で観察し、写真を撮影した。

## 実験成績

### I. 核の変性過程の経時的観察

#### 1. 新鮮な細胞（採取直後）

##### 1) 位相差顕微鏡による観察

核縁はほぼ円滑一線で不均等肥厚はみない。僅かに小さい凝集塊の付着をみるが明瞭ではない。核内は核小体と少数の凝集塊のほかは、特別の構造を認めない (Fig. 1. a.).

##### 2) Papanicolaou 染色標本の観察

核縁は円滑であるが、所々に小凝集塊の付着をみる。核内は細顆粒状の凝集塊をみるが、数は多くない。核小体は明瞭に認め得る (Fig. 1. b.).

##### 3) Feulgen 反応標本の観察

核縁は、顆粒の連なった不連続な線として観察される。核内はほぼ一様に淡く染まり、その中に中等度の濃さに染色された細網状構造が均等に分布する。核小体周辺と思われる部分には濃く染まった比較的大きい凝集塊をみる (Fig. 1. c.).

#### 2. 37°Cで試験管内に保存した細胞 (Table 1.)

##### 1) 位相差顕微鏡による観察

1時間後：核径には変化をみないが、核縁は小さな凝集塊の付着により不均等な肥厚をみ幾分円滑さを欠くようになる。核内には凝集塊の出現をみ、とくに核小体の周辺に著明であり、このため核小体辺縁は不鮮明となり核内は一見して全体に位相量を増したようにみえる。これらの凝集塊の周辺はかえって鮮明にぬ

Table 1 Sequential nuclear degeneration incubated in test tube at 37°C

	Observation method	Incubation time (hours)								
		Fresh (0)	1	3	6	12	24	48	72	96
Reduction of nuclear size	PCM <sup>a</sup>	(-)	(-)	(±)	(++)	(###)	(###)	(###)	(###)	(###)
	Pap <sup>b</sup>	(-)	(-)	(±)	(++)	(###)	(###)	(###)	(###)	(###)
	Feul <sup>c</sup>	(-)	(±)	(±)	(+)	(++)	(###)	(###)	(###)	(###)
Irregular thickness of nuclear margin	PCM	(-)	(+)	(++)	(###)	(###)	unclear			
	Pap	(-)	(±)	(++)	(###)	(###)	(+)	unclear		
	Feul	(±)	(±)	(+) beaded	(++)	(++)	regularly thick (##)	unclear		
Intra-nuclear clumps	PCM	(-)	(+)	(++)	(###)	dissolved	homogeneous	clumped		
	Pap	(-)	(+)	(++)	(###)	(###)	dissolved	(++)	(++)	(++)
	Feul	(-)	(+)	(++)	(###)	(###)	(###)	dark stained	pyknotic	
								pyknotic		

a : Phase contrast microscope  
 b : Papanicolaou stain  
 c : Feulgen reaction

けたようにみえる (Fig. 2. a.).

3時間後：核径はやや小さくなり、核縁および核内はさらに凝集が進み、核縁の内側は鋸歯状となるが、なお幾らか円滑さを残している。核小体はさらに不鮮明となり、核内には核小体とほぼ同等の位相量を示す粗大な凝集塊をみる (Fig. 2. b.).

6時間後：核径は明らかに縮小し、核縁には著明な凝集塊の付着をみ、核辺縁はきわめて不整になる。核内の凝集も進み、大きい凝集塊をみるようになり、その周辺はさらに明瞭に明るくぬけてみえる (Fig. 2. c.).

12時間後：核径はさらに縮小の傾向をみる。核縁は付着した凝集塊がさらに大きくなりより不整になる。核内は全体に位相量を減じ、核小体周辺にあった大きい凝集塊は一部を残し融解したようにみえる (Fig. 2. d.).

24時間後：核径は小さくなるが、この頃より胞体の縮小が顕著となり核・胞体比は大きくなっている。核縁はこれまでの所見と異なり、不明瞭で胞体との境界は僅かに位相量の大きい凝集塊の存在により区別され、核質の一部の核外への脱出と思われる所見をみる。核内はほぼ均質化し所々に淡い構造をみるのみで、核小体は小さく円形化し周囲には明庭様所見をみる (Fig. 2. e.).

48時間後：核内に再び凝集塊によると思われる粗な構造をみる以外は24時間後の所見とほぼ同様である (Fig. 2. f.).

72時間後：48時間後の所見とほぼ同様である (Fig. 2. g.).

96時間後：核縁の外側にあたる部分に顆粒状の構造がほぼ均等に並びあたかも核と胞体の境界線のようにみえる。核内には著明な変化はないが、核小体がきわめて小さくみえる (Fig. 2. h.).

小括

核径：時間の経過とともに縮小するが、とくに6時間後以降において顕著となる。しかし、胞体の縮小が先行するので核・胞体比は大となる。

核縁：凝集塊の付着をみ、時間の経過とともに次第に大きさを増し、核縁は円滑さを失い不整となる。核縁は24時間後には不明瞭となり、核質の核外への脱出を思わす所見をみるようになる。

核質：変性の早期には核内や核小体の周辺に凝集塊の出現をみ、その凝集塊の周辺はかえってぬけてみえる。しかし、24時間後には核内は位相の差を失い僅かに淡い構造をみるのみとなり、核小体は円形化し明らかにみ得ようになる。さらに変性が進むと再び凝集塊によると思われる粗な構造をみるようになる。

2) Papanicolaou 染色標本の観察

1時間後：核径には変化なく、核縁は円滑であるが所々に不均等な凝集塊の付着をみる。核内はほぼ一様に染色され、なかに小顆粒状から粗顆粒状までの不揃いな凝集塊をみ、とくに核小体の周辺に多く、そのために核小体の辺縁は不明瞭となる (Fig. 3. a.).

3時間後：核径はやや小さくなり、核形は幾らか丸みを失う。核縁は不均等に肥厚し、一部にはかなり大きい凝集塊をみるようになる。核内はほぼ一様に染色されるが小さい凝集塊は互いに融合し核小体の周辺などで大きい凝集塊を形成し、その間隙部分はやや淡く、濃度の差が明瞭となる。

6時間後：核径は縮小、核縁は不整となり、核縁や核小体の周辺には大きい凝集塊をみる。これらの凝集塊は核小体と核縁をつないだ像としてみられる。間隙部分は一層淡く均等に染色される (Fig. 3. b.).

12時間後：核径は縮小、核縁にはさらに大きい凝集塊を形成して太いひも状に観察され、核小体と核縁をつなぐ構造も太くなり、核小体周辺の凝集塊も大きくなる。間隙部分はさらに淡くぬけたように染色される。

24時間後：核縁に付着した大小の凝集塊は融解し、その数を減じ、核縁は一見均等に肥厚したようにみえる。核内の凝集塊は融解して一様に広がったようにみえる。核小体はほぼ円形で明瞭にみえる (Fig. 3. c.).

48時間後：核径は著明に縮小し、核縁は不明瞭になり、所々に核縁の断裂をみる。核は全体に濃染する (Fig. 3. d.).

72時間後および96時間後：48時間後の所見とほぼ同様であるが、標本上で観察できるほとんどの細胞核は強く濃縮状である。しかし、淡染の核を一部にみる。

#### 小 括

核径：位相差像に比較して核径は全体に小さい。時間の経過とともに次第に小さくなるが、とくに24時間後から48時間後には縮小の傾向が著しい。

核縁：変性の早期には円滑であるが、所々に凝集塊の付着をみるようになり、小さい凝集塊は融合して次第に大きさを増し、このため核縁は不整で肥厚してみえる。24時間後から、凝集塊は減少し、さらに時間が経過すると核縁は不明瞭になり、所々に核縁の断裂をみる。

核質：小顆粒状や粗大顆粒状の不揃いの凝集塊をみ、時間の経過とともに小さい凝集塊は互いに融合して大きくなる。しかし、24時間後以降では凝集塊は融解して一様に淡染し、さらに変性が進むと核内は一樣

に濃染し、構造は全くみられなくなる。

核の染色性：24時間後までは比較的良好な染色性を保つが、48時間後以降は濃縮状に染まる。さらに変性が進むと、核は全く染色されないか、あるいは僅かに染まった核片が散在してみられる。

#### 3) Feulgen 反応標本の観察

1時間後：核径はやや縮小、核縁はほぼ線状にみえるが、所々に大きい凝集塊をみる。核内、とくに核小体周辺には大きい凝集塊をみ、その周辺はやや淡くぬけてみえる。核の網構は細網状から粗網状にかわる (Fig. 4. a.).

3時間後：核径に変化なく、核縁は顆粒状の凝集塊が連なり数珠状にみえる。核内の凝集塊はさらに大きくなる。

6時間後：核径は縮小、核縁や核内の凝集塊は大きくなり、核縁は不整になる。核内構造は粗で濃染し、その間隙部分はほとんど染色されず、濃淡の差が大となる (Fig. 4. b.).

12時間後：核径がさらに小さくなる以外とくに変化はない。

24時間後：核の構造はきわめて粗となり、核縁も太く不均等な肥厚をみる。数は少ないが所々に大きい凝集塊をみ、その染色性は増強する。間隙部分は染色されずぬけてみえる (Fig. 4. c.).

48時間後、72時間後および96時間後：核径は著明に縮小し、核縁は不明瞭になる。核は濃縮、濃染し、このために核内の構造は不明瞭で、僅かに凝集塊をみるのみである (Fig. 4. d.).

#### 小 括

核径：Papanicolaou 染色標本で観察されたと同様、時間の経過とともに核径は減じ、とくに24時間後以降著しく縮小する。

核縁：変性の早期には小顆粒状の凝集塊が連なり線としてみられるが、凝集塊は次第に大きさを増し数珠状からやがて不均等な太い線としてみえるようになる。さらに変性が進むと核縁は不明瞭となり僅かに粗な構造の一部として観察されるようになる。

核質：核内はほぼ一様に淡く染色され、その中に細網状の構造をみ、時間の経過とともにこの構造は次第に粗になり、大きい凝集塊の出現をみる。間隙部分はぬけてみえ、濃淡の差が大となる。さらに時間が経過すると濃縮状になる。

核の染色性：変性の早期は淡いが、3時間後以降は次第に濃染するようになる。48時間後以降は一樣に濃染する。観察の時間内では染色性の脱落をみない。

3. 位相差像と凍結溶解法による固定・染色像との

比較

新鮮な細胞（採取直後）：核縁および核内の凝集塊の位相差像は、Papanicolaou 染色標本上でも位置および濃淡の差の点で完全に一致して認められる (Fig. 5. a.).

8時間後：核小体の位置、大きさなどは一致してみられるが、凝集塊は Papanicolaou 染色標本で明らかに多くなるなど、核内構造に一致しない所見がみられる (Fig. 5. b.).

12時間後以降：一致した所見はみられない。

4. 4°Cで試験管内に保存した細胞 (Table 2.)

1) 位相差顕微鏡による観察

1時間後：核径には変化なく、核縁はほぼ円滑で一線をなすが所々に小さい凝集塊の付着をみる。新鮮な細胞と比べると、核縁の内側は幾らか不規則になる。核内には少数の小凝集塊をみるが、核小体は明瞭で凝集塊の付着は少ない (Fig. 6. a.).

3時間後：核縁および核内の凝集塊の数は増加するが、その他の変化はみられない (Fig. 6. b.).

6時間後：核径には変化をみないが、核縁、核内および核小体周辺には比較的大きい凝集塊をみるようになる (Fig. 6. c.).

12時間後：凝集塊はさらに大きくなり、核小体と核縁をつなぐようにみえる。凝集塊の周辺は位相量が小で、全体にコントラストが強い。このため核縁は不均等に肥厚し円滑さを欠く (Fig. 6. d.).

24時間後：核径は僅かに縮小するが、その他は特別の変化をみない (Fig. 6. e.).

48時間後、72時間後および96時間後：核径は時間の経過とともに僅かに縮小する。核縁、核内および核小体周辺の凝集塊は大きくなり周辺は位相量を減じコントラストはきわめて強くなる (Fig. 6. f. g. h.).

小括

核径：24時間後から徐々に縮小をみ、その後96時間後に至るまできわめて徐々ながら縮小が続く。

核縁：時間の経過とともに核縁に凝集塊の付着をみ、次第にその大きさを増し、核縁は不規則になるが、37°Cに保存した細胞と比較すると明らかに円滑さを保ち、胞体との区分は明瞭、核質の脱出を思わす所見はみられない。

核質：変性の早期には、ほとんど変化がなく僅かに小凝集塊を核内、核小体周辺にみるのみである。時間の経過とともに凝集塊はその大きさを増し、凝集塊周辺は位相量を減ずるが、96時間後でもなお核構造は明らかに保たれている。

2) Papanicolaou 染色標本の観察

1時間後：核径は変化なく、核縁は円滑で僅かに小さい凝集塊の付着をみる。核内には細顆粒状の凝集塊をみるが、均等に淡く染色され、核小体は明瞭である。

3時間後：1時間後の所見とほぼ同様であるが、核縁および核小体周辺の凝集塊はやや大きくなる。

6時間後：核径は幾らか縮小、核縁もやや不整となるが、凝集塊の大きさには著明な変化はなく、核内もほぼ均等に染色されている (Fig. 7. a.).

Table 2 Sequential nuclear degeneration incubated in test tube at 4°C

	Observation method	Incubation time (hours)								
		Fresh (0)	1	3	6	12	24	48	72	96
Reduction of nuclear size	PCM <sup>a</sup>	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(±)	(+)	(++)	(++)
	Pap <sup>b</sup>	(-)	(-)	(-)	(±)	(±)	(±)	(±)	(+)	(###)
Irregular thickness of nuclear margin	PCM	(-)	(±)	(±)	(+)	(++)	(++)	(++)	(###)	(###)
	Pap	(-)	(±)	(+)	(+)	(+)	(++)	(++)	(###)	(###)
Intra-nuclear clumps	PCM	(-)	(±)	(±)	(+)	(++)	(++)	(++)	(###)	(###)
	Pap	(-)	(±)	(+)	(+)	(++)	(++)	(++)	(###)	(###)

a : Phase contrast microscope

b : Papanicolaou stain

12時間後：核径はほとんど変化なく、核縁も6時間後の所見と同様であるが、核小体周辺の凝集塊はやや大きくなる。

24時間後：核縁が僅かに不均等に肥厚するほかは特別の変化はない。

48時間後：核径には変化をみないが、核縁と核小体周辺をつなぐ凝集塊が著明となり、核内は濃度の差がやや大きくなる。染色性に特別の変化はない (Fig. 7. b.).

72時間後：核内には顆粒状の凝集塊が多数みられるようになり、核縁も所々で断裂する。一見すると、核内の凝集塊が細断され核内に散布されたようである。

96時間後：核径は著明に縮小、核縁も高度の肥厚をみる。核内には、核小体周辺に大きい凝集塊をみ濃染する。しかし濃縮状ではない。

#### 小 括

核径：長時間にわたって縮小をみないが、6時間後以降は僅かに小さくなる。96時間後には著明な縮小をみる。

核縁：時間の経過とともに徐々に不均等に肥厚するが、左程顕著ではない。72時間後以降は断裂してみえる。しかし、核縁の消失や核質の脱出などの所見はみられない。

核質：時間の経過とともに凝集塊は徐々に大きくなるが、著明な変化はない。72時間後には、凝集塊が顆粒状に細断された所見をみる。全体に位相差所見と比較すると変化は強い。

核の染色性：染色性の変化は明瞭ではないが、96時間後には濃染の傾向をみる。

#### 5. 薄層標本での核の経時的変性

1時間後：核径は縮小の傾向をみ、核縁は不整となり比較的小さい凝集塊の付着をみる。核内、とくに核小体周辺には位相量に富む凝集塊を認めその周辺は明るくぬけてみえる (Fig. 8. b.).

3時間後：核径はさらに小さくなり、核縁の凝集塊はやや大きくなる。このため核縁は不整になり肥厚してみえる。核内は全体に位相量を減じ、境界の不明瞭な大小の凝集塊をみる。核小体はその周辺の凝集塊も含めて幾分位相量を減じ淡くみえる (Fig. 8. c.).

6時間後：核径は大きくなる。核縁は所々で断裂した部分のみ、顆粒状の凝集塊が数珠状に連なっている。核内はさらに位相量を減じ、顆粒状の凝集塊は数を増し、核小体および核小体周辺の凝集塊も位相量を減じている (Fig. 8. d.).

12時間後：核径は6時間後とかわらない。核縁は

一部を残して不明瞭になり、凝集塊も認めがたい。核内も位相量を減じ、核小体およびその周辺も不明瞭になる。核内の凝集塊は数を増すが全体に位相の差を失い均質化してみえる (Fig. 8. e.).

24時間後：核径はやや大きくなる。核縁は凝集塊を含めて位相量大で、暗調にみえた部分が明暗を逆にして明るくみえるようになり、このため核縁は再び明瞭に認め得るようになる。核縁外側の胞体には核質の脱出を思わせる顆粒状物をみる。核内には再び明暗の差が出現するが、核小体を除き、凝集塊のあった部分は明るく、その間隙であった部分は暗く、変性の早期の所見と明暗調が逆になる (Fig. 8. f.).

48時間後、72時間後および96時間後：24時間後の所見と同様であるが、次第に明暗調の差が明らかになる (Fig. 8. g. h.).

#### 小 括

核径：3時間後までは僅かに小さくなるが、以降核内が位相の差を失うのに一致して次第に核径は大きくなる。しかし24時間後以降は大きさをかえない。

核縁：変性の早期には、比較的小さい凝集塊の付着をみるが、時間の経過とともに凝集塊は融合増大し、このため核縁は不整になる。さらに変性が進むと、核縁は不明瞭となり、やがて核縁の部分は明るくぬけてみえるようになる。核縁の外側には核質の脱出と思われる顆粒状物をみる。

核質：変性の早期には、核小体周辺に凝集塊の付着、融合などをみるが、時間の経過とともに、位相の差を減じ、12時間後には核内は均質化し僅かに核小体を判別できるのみとなる。24時間後より再び核内に構造の出現をみるが、均質化する前の状態の明暗調を逆にしたようにみえる。ただし、核小体だけは依然として暗調にみえる。これらの所見は時間の経過とともにさらに明瞭になる。

## II. 固定操作による核の変性

### 1. 薄層標本の媒液を固定液で置換

#### 1) 100%エタノール

置換により瞬時に核径は縮小し、核縁は不整となり凝集塊の付着をみる。核内の構造は全体に不明瞭になる。次いで核は光輝性を帯び位相の差を失い、僅かに核小体を認めるのみとなる。Fig. 9. a. は同じ細胞をできるだけ短い間隔 (3~4秒) で撮ったものを左から右に並べたもので、以下 Fig. 9. b. 以降も同様である。

#### 2) 95%エタノール

100%エタノールによる置換をほぼ同様の所見を呈する。

3) 50%エタノール

核径は縮小し、核縁は不整になるが100%あるいは95%エタノールでみられるほど著明ではない。置換し終わった時の核は光輝性を帯びるが、核内構造は比較的よく観察できる (Fig. 9. b.).

4) 30%エタノール

置換直後、一時的に核縁は僅かに不整になり、核縁および核小体縁に凝集塊の付着をみる。凝集塊の間隙部分はぬけてみえ、コントラストを増す。やがて、核径は大きく膨化し、核内構造は不明瞭となり、ついには核は位相の差を失い、全く無構造となる (Fig. 9. c.).

5) 10%エタノール

30%エタノールとほぼ同様の所見を呈する。

6) 水

置換により、核は膨化し位相の差を失い無構造となる (Fig. 9. d.).

7) エーテル・95%エタノール

置換により、核径の縮小、核縁の不整化をみ、核は光輝性を帯び、核内は位相の差を失い僅かに核小体を認め得るのみとなる (Fig. 9. e.).

8) カルノア液

エーテル・95%エタノールとほぼ同様の所見を呈する (Fig. 9. f.).

9) 10%ホルマリン

一時的に核は縮小し、核縁は不整化、核内構造は不

明瞭となる。次いで核は膨化し位相の差を失うが、水による置換でみるような著明な膨化はみられず、核径は置換の前よりやや大で、それ以上に大きくならない (Fig. 9. g.).

小 括

100%、95%あるいは50%エタノールなどの高濃度アルコールによる置換では、核径の縮小、核縁の不整化、核の光輝性化をみる。エーテル・95%エタノールおよびカルノア液でもほぼ同様の所見を呈する。30%あるいは10%エタノールなどの低濃度アルコールや水による置換では、核の著明な膨化をみる。10%ホルマリンでもほぼ同様の所見をみるが、膨化の程度は僅かである。

2. 塗抹標本での細胞に対する固定効果 (Table 3.)

1) エーテル・95%エタノール

i) 位相差顕微鏡による観察

採取直後の細胞：核は膨化し、位相の差を失い核内構造は不明瞭となり僅かに核小体をみるのみとなる。核径の増大には限度があり、左程大きくはならない (Fig. 10. a.).

37°Cに24時間保存した細胞：核は僅かに膨化し、位相の差を減じるが、核内構造は、採取直後に比べると明瞭で、核小体も明瞭にみる。核縁および核小体縁への大小の凝集塊の付着をみる (Fig. 10. b.).

ii) Papanicolaou 染色による観察

Table 3 Effects of various fixatives on the nucleus

Fixative	Incubation time (hours)	Clumping of chromatin on nuclear margin	Intranuclear clumps of chromatin
Ether-95% ethyl alcohol	Fresh (0)	(+)	(+)
	24	(++)	(++)
Methyl alcohol	Fresh	(++)	(+)
	24	(++)	(###)
Carnoy's fluid	Fresh	(+)	(+)
	24	(++)	(###)
10% formalin	Fresh	(++)	(+)
	24	(-)	(-)
1% osmic acid	Fresh	(-)	(-)
	24	(++)	(++)

採取直後の細胞：核縁はほぼ円滑で、僅かに凝集塊の付着をみる。核内および核小体縁には小さい凝集塊をみる (Fig. 10. a.).

37°Cに24時間保存した細胞：核縁および核小体縁の凝集塊は融合大型化し、その間隙部分はぬけてみえる (Fig. 10. b.).

#### 2) メタノール

##### i) 位相差顕微鏡による観察

採取直後の細胞：僅かに核の膨化をみるが、ほぼ原像に類似し、核縁および核小体縁には小さい凝集塊の付着をみる (Fig. 10. c.).

37°Cに24時間保存した細胞：核の膨化はみられず、僅かに光輝性を帯び、核縁、核内および核小体縁の凝集塊は数および大きさを増す (Fig. 10. d.).

##### ii) Papanicolaou 染色による観察

採取直後の細胞：核縁には小さい凝集塊がほぼ均等に付着するため太い線のように見える。核内および核小体縁には大小の凝集塊を多数みる (Fig. 10. c.).

37°Cに24時間保存した細胞：核縁は採取直後の細胞にほぼ類似する。核内および核小体縁の凝集塊はさらにその数を増す (Fig. 10. d.).

#### 3) カルノア液

##### i) 位相差顕微鏡による観察

採取直後の細胞：核は膨化し、核内には多数の小さい凝集塊をみる。位相の差は僅かに減少し、核の膨化は軽度である (Fig. 10. e.).

37°Cに24時間保存した細胞：核の膨化はみられず、核内は僅かに光輝性を帯び位相の差は減少する。核縁、核内および核小体縁には大きい凝集塊をみる (Fig. 10. f.).

##### ii) Papanicolaou 染色による観察

採取直後の細胞：エーテル・95%エタノールと類似の所見を呈し、核縁および核内に小さい凝集塊の付着をみる (Fig. 10. e.).

37°Cに24時間保存した細胞：核縁には大小の凝集塊が付着するため不整にみえる。核内および核小体縁には多数の大きい凝集塊をみる (Fig. 10. f.).

#### 4) 10%ホルマリン

##### i) 位相差顕微鏡による観察

採取直後の細胞：僅かに膨化をみるが、位相の差の減少はなく、核縁および核内には大小の凝集塊をみる。しかし核小体縁への凝集塊の付着は明らかでなく、核小体周辺は明るくぬけてみえる (Fig. 10. g.).

37°Cに24時間保存した細胞：核の膨化はなく、僅

かに光輝性を帯び、凝集塊が融合して大きくなり数は減少、その間隙部分は明るく見え、このため核内の明暗の差が著明になる (Fig. 10. h.).

##### ii) Papanicolaou 染色による観察

採取直後の細胞：核内は全体に濃染するので、僅かに核縁および核内に大小の凝集塊を識別できるのみで、細部の観察は不能である (Fig. 10. g.).

37°Cに24時間保存した細胞：核は一様に淡く染まり、核小体のほかには僅かに網状構造をみるのみで、核縁は不明瞭、凝集塊はみられない (Fig. 10. h.).

#### 5) 1%オスミウム酸

##### i) 位相差顕微鏡による観察

採取直後の細胞：核は膨化し、位相の差を失い、核内には特定の構造をみない。なお膨化には限度があり一定の大きさととどまる (Fig. 10. i.).

37°Cに24時間保存した細胞：採取直後の細胞と比べ核は僅かに膨化するが、核内構造は明らかになる。すなわち、核縁には大小の凝集塊が付着して不整となり、核内および核小体縁にも凝集塊をみる (Fig. 10. j.).

##### ii) Papanicolaou 染色による観察

採取直後の細胞：核は全体に濃く均等に染まり、核縁は円滑一線で、核内構造は位相差像と同じく不明瞭である (Fig. 10. i.).

37°Cに24時間保存した細胞：直後と比べ核内構造は明らかとなり、核縁、核内および核小体縁に大小の凝集塊をみる (Fig. 10. j.).

#### 小 括

位相差顕微鏡による観察：採取直後の細胞では、全ての固定液で核の膨化をみるが、エーテル・95%エタノール、カルノア液および1%オスミウム酸で著明であり、さらにエーテル・95%エタノールおよび1%オスミウム酸では24時間後においても膨化の傾向をみる。24時間後の細胞では全ての固定液により凝集塊の出現が著明となりその大きさも増す。

Papanicolaou 染色による観察：採取直後の細胞においては、エーテル・95%エタノールとカルノア液での所見はよく類似し、核縁、核内および核小体縁に小凝集塊を認める。メタノールでは核縁が太い線状となり、多数の小さい凝集塊をみる。10%ホルマリンおよび1%オスミウム酸ではいずれも核が濃染し、細部の観察は不可能であるが、10%ホルマリンでは大小の凝集塊をみ、1%オスミウム酸ではほとんど凝集塊をみない。37°Cに24時間保存した細胞においては、10%ホルマリンでは核縁は不明瞭となり核は全体に淡染

し、僅かに網状の構造を認めるにすぎない。その他の固定液では、いずれも大小の凝集塊の形成が著明なるなどほぼ類似した所見を呈する。

以上の様に新鮮な細胞の核では、固定液によりそれぞれ異なった像を呈するが、変性の進んだ核では、10%ホルマリンを除く他の全ての固定液によりいずれも核質の著しい凝集傾向を認める。

3. 固定効果の電子顕微鏡による観察

1) 1%オスミウム酸単独固定

採取直後の細胞：核は核膜と核小体を認めるが、核内には明瞭な凝集塊を認め得ない (Fig. 11. a.).

4°Cで72時間保存した細胞：核膜および核小体縁に近接して凝集塊を認め、その間隙部分はぬけてみえる (Fig. 11. c.).

37°Cで72時間保存した細胞：核膜および核小体縁に近接して著しく大きい凝集塊を認め、間隙部分はさらにぬけて見えコントラストを増す (Fig. 11. e.).

2) グルタルアルデヒド・オスミウム酸二重固定

採取直後の細胞：核膜および核小体縁に近接して凝集塊を認める (Fig. 11. b.).

4°Cで72時間保存した細胞：採取直後の細胞と類似した所見を呈する (Fig. 11. d.).

37°Cで72時間保存した細胞：37°Cで72時間保存後の細胞の1%オスミウム酸単独固定による所見と類似し、大きい凝集塊をみる (Fig. 11. f.).

小 括

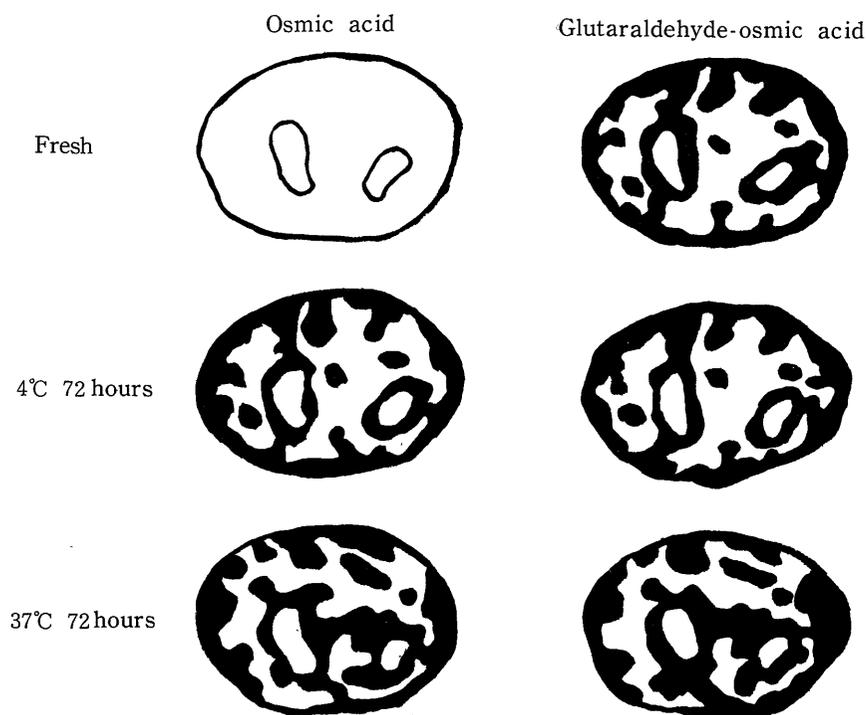
オスミウム酸単独固定では、新鮮な細胞の核には明瞭な凝集塊を認め得ず、変性が進むにつれて凝集塊をみるようになる。グルタルアルデヒド・オスミウム酸二重固定では新鮮な細胞の核にも明らかに凝集塊を認め、変性が進むと凝集塊は大きくなりオスミウム酸単独固定による所見と類似する (Fig. 12.).

考 察

1. 経時的にみた核の変性

既述のように、細胞は採取されてから鏡検に至るまでの間に、種々の要因による変性を受けるが、本実験

Fig. 12 Effects of fixatives upon electron microscopic findings on nuclear degeneration of the Ehrlich ascites tumor cell kept at 4°C and 37°C



ではまず保存温度と保存時間による細胞の変性過程をとくに核に注目して観察した。このような条件下で細胞の変性を形態学的に観察した報告は多くみられる。飯島<sup>78)</sup>、今木<sup>28)</sup>、堤<sup>29)</sup>、Zollinger<sup>30)</sup>は実験動物や実験腫瘍を用い、田嶋ら<sup>6)</sup>、片柳<sup>10)</sup>、田村ら<sup>11)</sup>、安藤<sup>31)</sup>、竹中ら<sup>32)</sup>はヒトがん細胞を用い、それぞれ位相差顕微鏡、塗抹染色標本および電子顕微鏡などにより細胞の変性過程を観察している。本実験では常に可及的同じ条件の細胞が得られるマウスの Ehrlich 腹水がん細胞を材料として使用した。

本実験で用いた Ehrlich 腹水がん細胞の中には、採取直後でもすでに変性の進んだと思われる細胞や、新鮮と思われる細胞が混在しているが、この中でもきわめて新鮮と思われる細胞の核では、核縁は円滑一線をなし凝集塊の付着もほとんどなく、核内は核小体以外特別の構造をみない。飯島<sup>7)</sup>は海狸肝細胞を、田村ら<sup>11)</sup>、片柳<sup>13)</sup>は剥離胃がん細胞を位相差顕微鏡下で観察し新鮮な細胞核は均質無構造であると述べており、本実験での所見に一致する。武田<sup>23)</sup>は正常細胞の休止核では核小体以外ほとんど無構造に近く、一方腫瘍細胞では核構造の出現をみ、腫瘍細胞の指標となると述べているが、変性による影響を考慮して再検討を要するであろう。本実験での電子顕微鏡による観察でも新鮮な Ehrlich 腹水がん細胞のオスミウム酸による単独固定では核内には核小体以外の特別の構造をみず、位相差像での所見と一致している。さらに新鮮な細胞を Papanicolaou 染色標本で観察すると、核縁および核内に細顆粒状の凝集塊をみるのみで、従来より言われている核縁の不均等肥厚、核質の不規則粗大凝集などの悪性細胞の特徴が明らかではない。

37°Cに保存した腹水を経時的に観察すると、時間の経過とともに核縁、核小体縁への凝集塊の付着が著明となる。しかし、24時間後には核内は再び均質化し、さらに時間が経過すると位相差像では再び凝集塊によると思われる構造を認めるようになるのに対し、Papanicolaou 染色では核は濃縮状となり pyknosis を呈する。試験管内での核の変性過程を、位相差像所見と Papanicolaou 染色所見について対比すると、24時間後にみられた核内の均質化までは両者ともほぼ一定した所見を示すが、48時間後以降では観察方法による所見の違いをみるようになる。このような所見の違いを生ずる機序としては次のような可能性が考えられる。すなわち、変性の初期には、まず核構造の基本である DNA-histone 型蛋白複合体が互に付着し合い、また他の非 histone 型蛋白、磷脂質がこれに結合し核構造は次第に粗になる。次に、これらの

構造が液化し、位相差像で均質無構造にみえるようになり、さらに変性が進むと、液化した蛋白が37°Cの温度により再凝集し、このため再び凝集塊によると思われる粗な構造をみるようになる。しかし、染色標本では DNA-histone 型蛋白複合体の構造が破壊されてしまうと色素は付着する部位を失い、核内にびまん性に侵入し一定の構造を示さず、核は濃染すると考えられる<sup>34)</sup>。

田嶋ら<sup>6)</sup>は Feulgen 反応を用いて核の変性過程を観察し、新鮮な細胞と変性した細胞の核形態の比較検討を行っている。本実験でも、細胞核の変性にともなう Feulgen 反応所見を変性の比較的進行した時期に至るまで観察した。Feulgen 反応所見と Papanicolaou 染色所見とはほぼ一致した変化を示し、田嶋らの観察所見を支持する結果を得た。田嶋らは変性が高度に進んだ hematoxylin に濃染する核は、Feulgen 反応ではほとんど不染または淡染のことが多いと述べているが、本実験では hematoxylin に濃染する核は Feulgen 反応においても濃染する結果を得た。しかし本実験よりもさらに長時間の観察を続行すれば、DNA の構造も崩壊し Feulgen 反応による染色性が失われるのではないかと考えられる。このように核の変性過程で Papanicolaou 染色所見と Feulgen 反応所見がほぼ一致した変化を示すことから、核内の DNA-histone 型蛋白複合体は変性時にはほぼ一体となって変化していくと推定される。細胞の変性にともなう核 DNA 量の変化については Alfert<sup>35)</sup> や Leuchtenberger<sup>36)</sup> の Feulgen 反応による詳細な報告をみる。細胞診、とくに最近ようやく実用化へ進みだした自動細胞診断装置での悪性細胞判定基準は主に核からの情報、とくに DNA 量および DNA が関与する核内の構造を取り上げている<sup>37)~39)</sup>。核のみを染色し、しかも核の大きさ、DNA 量や核内構造を適確に表現する染色法として Feulgen 反応が用いられ<sup>40)</sup>、最近では細胞診分野における省力化の一つとして Feulgen 反応の自動染色装置の開発<sup>41)</sup>も行われている。このように核の染色法としての Feulgen 反応は細胞診自動化のためにも重要性をましその濃度、形態についての検討が望まれる。

試験管内での変性過程の観察は観察方法、経過時間別にそれぞれ異なった細胞について行ったものでありその所見をより正確に対比するには、同一細胞についての観察が望ましい。ここでは、位相差像所見と染色所見を同一細胞について対比する目的で凍結溶解法による検討を行った。

凍結は-25°Cないし-30°Cで瞬間的に行うが、凍結

およびその後の溶解の操作が細胞の形態に与える変化も検討した。現在までに、凍結溶解法について形態学的あるいは生化学的に多くの検討がなされているが<sup>12)42)~46)</sup>、本実験でも、8時間後までの比較的早期の変性過程では、凍結溶解法による同一細胞の位相差像所見と染色所見との対比ではほぼ一致した結果を得た。すなわち、細胞は凍結溶解法により基本的構造を破壊されず、凍結溶解の後、固定染色された細胞像はほぼ生の細胞像に一致するとみなしてよいと考えられる。

変性の早期では前述のように位相差像は Papanicolaou 染色像とほぼ一致し、位相差像で optical densityの高い部分はPapanicolaou染色で濃く染まり、optical densityの低い部分は淡く染まるかあるいは不染部分となる。核について、Papanicolaou染色は、DNAとhistone型蛋白の複合体に関連ある部分を染色していると推定されているので<sup>34)</sup>、位相差像でoptical densityの高い部分はDNA-histone型蛋白複合体の集合した部分を示すのであらうと推察される。

変性の進んだ細胞では、凍結溶解法による位相差像所見と染色所見との間に一致をみなくなる。すなわち8時間後以降より核内構造で不一致をみ始め、12時間後では明らかに一致しなくなる。これは、試験管内での変性でみたと同様にDNA-histone型蛋白複合体の崩壊が起り、さらに凍結、溶解および固定液の作用によって崩壊前の構造と全く異なる核質の凝集による核構造が出現し、この構造を染色し、観察しているためと考えられる。すなわち、採取後長時間を経過した核の染色像は生の核の構造とは全く異なった像をみていると考えられる。

次に、同一細胞について核の変性過程を検討するために位相差用薄層標本を作製し、経時的に観察した。

薄層標本の経時的観察では、時間の経過とともに核縁の不均等肥厚、核内の凝集塊の出現ならびにその増大、核小体周辺には明庭をみ、さらに変性が進むと核内は構造を失って均質化し、続いて再び凝集塊の出現をみる。これらの変化は試験管内での変性過程とはほぼ一致するが、核径は試験管内では縮小するのに対し、薄層標本では逆に増大する。この核径の増大は細胞本来の変性によるものではなく、薄層標本の作製に際して、さらに時間の経過による物理的圧迫によるものと考えられる。まず標本作製時の圧迫により細胞は薄く押し潰され、次いで時間の経過とともに標本内でのゾルのゲル化が起こり標本内の圧が低下し、標本内容積も減少、カバーガラスとオブジェクトガラスの間隙は狭くなる。本来、細胞の核径は変性により縮小するが、

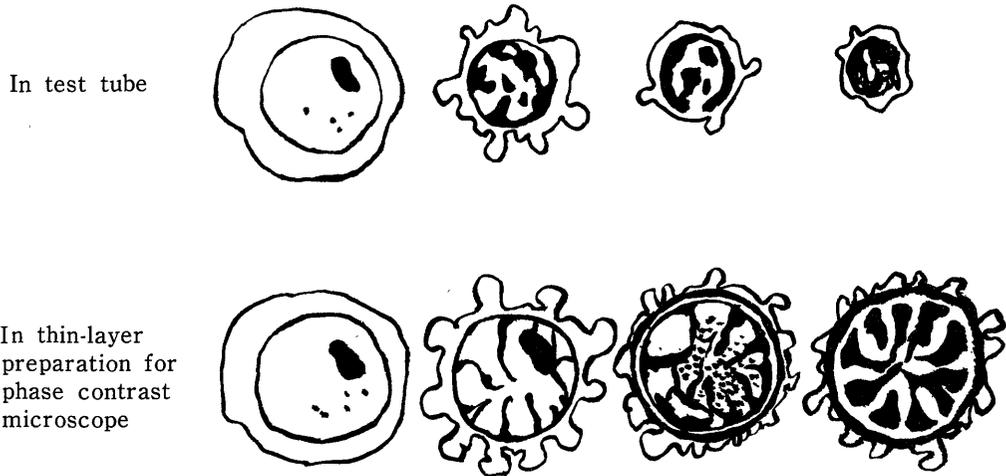
物理的圧迫が強くなるため、核はさらに押し潰され核径は増大すると考えられる。このような物理的圧迫および内腔の狭小化などの環境の変化は核径のみならず核構造にも影響をおよぼしている。ここで注目されるのは24時間後よりみられる核縁および核内構造の明暗調の逆転である。試験管内での変性過程では再凝集の所見をみるが、これが薄層標本内で見られる明暗調の逆転の所見に一致するかどうかは明らかでない。このような薄層標本内での明暗調の逆転は次のようにして生ずると考えられる。圧迫操作により、細胞の核内構造の大部分はもはや移動不可能な状態になり、試験管内でのように位置をかえることはできなくなる。このため核内構造の構成成分は、時間の経過とともにさらに圧迫の強化もあって、そのままの位置でその性質をかえ位相差像での明暗調の逆転を生ずると考えられる。その性質の変化は今のところ明らかではないが凍結溶解の項で述べたようにDNA-histone型蛋白複合体の変化などが大きく関与しているものと考えられる。

薄層標本での変性過程が試験管内でのそれともっとも異なる点は、37°Cで長時間の観察にもかかわらずpyknosisの所見をみないことである。試験管内では、染色標本で48時間後以降pyknosisの所見が著明になり、この時点の位相差像では再凝集の像をみ、薄層標本での明暗調の逆転像とは異なる。しかし試験管内で生ずるDNA-histone型蛋白複合体の変化が薄層標本内でも同様に起こるとすれば、薄層標本内では圧迫操作のためpyknosisの像を示し得ないと考えられる。

これらの所見を図示するとFig. 13のようになり、試験管内での変性過程と薄層標本内での変性過程は基本的には一致し、前述の薄層標本でみる3つの差異、すなわち1)核径の増大、2)明暗調の逆転をみること、3)pyknosisの所見をみないこと、は薄層標本下で細胞を圧迫する条件のもとで出現してくるものと考えられる。

次に細胞の保存温度による変性過程の差を検討する。4°Cで保存した細胞の変性は37°Cに比較して明らかに遅れ、位相差像所見、Papanicolaou染色所見ともに4°Cで96時間後の所見が37°Cで6時間後の所見にほぼ一致する。低温下での変性の遅延は、細胞内酵素活性の低下による自己融解速度の減少<sup>47)48)</sup>や長時間の保存でもmediumの変化の少ないことなどによるものであらう。低温保存により細胞の変性がかなり遅れることについては、堤<sup>29)</sup>、安藤<sup>31)</sup>、西亀<sup>49)50)</sup>もこれを報告しており、実際の細胞診においても検体保

Fig. 13 Scheme of difference in sequential nuclear degeneration between in test tube and in thin-layer preparation for phase contrast microscope



存上きわめて有用と考えられる。4°Cでの変性過程としては、37°Cでのそれと同様に時間の経過とともに核縁および核小体縁への凝集塊の付着をみるが、今回の観察時間内では、37°C12時間後以降にみられる核内の均質化や再凝集の所見は認められない。しかし4°Cでの変性過程と37°Cでの変性過程は、経過時間の差を除けば基本的にはほぼ一致すると考えられる。

片柳<sup>10)</sup>、田村ら<sup>11)</sup>は薄層標本を作製、位相差顕微鏡下で37°Cでの剥離胃癌細胞の変性過程を観察し、変性ととも核内に凝集塊が出現してくると述べている。今回の実験では、Ehrlich 腹水がんでもほぼ同様の変性過程を観察し得た。しかし時間的には Ehrlich 腹水がん細胞の変性は剥離胃癌細胞に比較してかなり遅れる。これは、Ehrlich 腹水がん細胞は本来腹水中に孤立性に浮遊しており、標本の作製に際しては medium をかえる必要がなく、細胞の強制剥離も要しないなどのためと考えられる。胃、子宮などの固形腫瘍の細胞の観察には 1) 血流遮断、2) 細胞を剥離するための強い機械的操作、3) 血清、生理食塩水その他の人工的 medium への浮遊などの処置が必要で、このため細胞は大きい影響を被り、さらに組織よりの剥離により細胞本来の環境から逸脱するため変性が早く進行すると考えられる。

細胞の変性と悪性細胞診断基準の関係については、変性にともない核縁は凝集塊の付着による不均等肥厚を、核内には粗大な凝集塊の出現をみ、これらの所見は従来より細胞の悪性所見の一つとして重要視され

ており、がん細胞では変性により、よりがん細胞らしきが増強し、実際の細胞診にきわめて都合のよい所見を得るようになるものと考えられる<sup>3)51)</sup>。

## 2. 固定による核の変性

細胞の変性過程を染色像により観察するには、固定操作による核の変性を知らねばならない。浜崎<sup>52)</sup>は固定標本については、同一の固定によって普遍的な像が得られればその像を準基本的な構造として扱ってもよいと述べているが、いつも同一条件の細胞を固定染色するなら異論はないが、飯島<sup>7)</sup>が指摘するように新鮮細胞と変性の進んだ細胞の間には、固定法は同一でもこれによって受ける変性は異なると考えられる。本実験では、固定による細胞の核の変性および細胞の変性の程度による固定効果の違いを検討した。細胞に各種固定液を作用させ、その形態学的変化を連続的に観察したものと飯島<sup>7)</sup>、Zollinger<sup>9)</sup> および Strangeways<sup>53)</sup>の報告をみる。Zollinger は固定効果を位相差顕微鏡下で観察し光輝性 (brilliant)、中間型 (intermediate) および膨化状 (hazy) の3つの型に分類している。本実験では薄層標本下で各種固定液により媒液を置換して観察したが、高濃度アルコール、カルノア液およびエーテル・95%エタノールでは、核は収縮し光輝性を帯び brilliant type の所見を呈し、十分な固定効果を認める。一方、低濃度アルコールによる置換では水による場合と同様、核は完全に膨化して位相の差を失い hazy type の所見を呈しアルコールによる固定効果をみない。天神<sup>44)</sup>は婦人科領

域の自己採取細胞診で55%アルコール(採取材料との混合で平均40%前後の濃度)を用い、良好な染色像を得ている。また小林ら<sup>55)</sup>は50%エタノールの細胞保存は良好であるが、10%や20%の低濃度エタノールでは細胞の変性、崩壊が起こると述べている。本実験でも30%エタノールと50%エタノールの間で固定像に差をみており、50%以上の濃度のアルコールでは充分な固定効果を得ると考えられる。

次に10%ホルマリンで置換すると、飯島<sup>7)</sup>や Zollinger<sup>9)</sup>の所見と異なり核は膨化し核内構造は不明瞭となり hazy type に一致する所見を得た。10%ホルマリンで組織片を固定すると最初約5%の膨化をみるとされているが<sup>56)</sup>、細胞でも組織片と同様にホルマリンで一旦固定された後、ホルマリン液に含まれている水のため膨化すると考えられる。しかし、核は一旦ホルマリンにより一定の大きさに固定されているため、膨化しても無制限に大きくはならず、低濃度アルコールや水による膨化とは基本的に異なると考えられる。

實際上、染色標本の細胞の観察は塗抹標本で行われるので塗抹後の細胞について固定効果を知ることは染色像を理解する上で重要である。本実験では塗抹標本を位相差顕微鏡で観察するために、固定後、水を媒液として薄層標本を作製した。このため採取直後の核でも、程度の差はあっても全ての固定液で膨化をみる。しかし、10%ホルマリンによる媒液置換においてみられたと同様に、膨化の程度には限度があり、固定後の膨化であることがうかがえる。新鮮な核では、エーテル・95%エタノール、1%オスミウム酸以外の固定液ではいずれも大小の凝集塊が出現し、変性の進んだ核では、全ての固定液で凝集塊が著明となり、これは37°Cに保存した細胞を経時的に染色観察した Papanicolaou 所見にほぼ一致する。

塗抹標本を、それぞれの固定液で固定した後に Papanicolaou 染色を施すと、新鮮な核ではそれぞれの固定液により異なった像を得るが、変性の進んだ核では10%ホルマリンを除くと、固定液による差はなくなる。これらの結果は飯島<sup>7)</sup>が組織について述べた所見に一致する。

従来、多くの固定液中、オスミウム酸は最も生活細胞に近い核の形態をつたえたとされているが<sup>56)</sup>、本実験においてもオスミウム酸の固定の効果は新鮮な核では核内にほとんど凝集塊をみないが、24時間後の変性した核では凝集塊の出現をみ、位相差顕微鏡で観察した経時変化に一致し、固定による核の構造に対する影響がきわめて少ないことを確認し得た。しかし、オ

スミウム酸はその酸化力によって細胞を黒褐色に変色させるために、染色性が悪く実際の塗抹染色標本での細胞の観察には不適当である。

電子顕微鏡により核に対する固定液の影響を観察すると、オスミウム酸単独固定では新鮮な核は核小体以外には凝集塊などの特別な構造を示さず、変性ととも凝集塊の出現をみ、位相差像やオスミウム酸で固定・染色した像と類似の所見を呈する。一方、グルタルアルデヒド・オスミウム酸二重固定では、新鮮な核にも凝集塊の出現をみる。変性の進んだ核に対する固定の効果では、オスミウム酸単独固定とグルタルアルデヒド・オスミウム酸二重固定の間に差をみず、電子顕微鏡による観察でも、塗抹標本での固定効果にほぼ一致した所見を得、新鮮な核では固定液の種類により異なった像を得ることを確認した。鶴沼<sup>57)</sup>はオスミウム酸単独固定はクロマチンを部分的に除去するためクロマチンの観察には不適当であると述べ、Yasuzumi ら<sup>58)</sup>は Ehrlich 腹水がん細胞を用いてオスミウム酸単独固定とホルマリン・オスミウム酸二重固定の電子顕微鏡像を比較検討し、二重固定では単独固定でみられない構造が出現してくることから、核の形態学的観察には二重固定がすぐれていると述べている。固定の目的は原像をできるだけ忠実に表現することにあるとの立場から二重固定を吟味すると、核内にもともと存在する構造が二重固定により、そのままの形態を保って出現するのか、または二重固定によってもともと存在する構造が凝集し形をかえて出現するものなのかは疑問であるが、本実験で得られた成績は後者を支持するようである。飯島<sup>7)</sup>は、核の固定像を規制する因子は核内に存在する塩基性物質であるとし、変性ととも塩基性物質は減少脱失するため固定操作に対する鋭敏性が減弱すると述べているが、本実験でも変性の進んだ核の固定像には固定液による差がみられなくなり、前述の Papanicolaou 染色での変性過程の観察において得た所見と考え合わせると、固定像を決定する因子は DNA-histone 型蛋白複合体であると想像され、変性が進むにつれてこの複合体が崩壊して固定液に対する特異性を失い、一様の固定像を呈するようになると考えられる。

これまでに観察した位相差像所見、Papanicolaou 染色所見および Feulgen 反応所見による変性過程はいずれも基本的にはほぼ一致しているが、これらの変性過程や固定操作による変性がいかなる機序により生ずるかは興味がある。吉松<sup>59)</sup>は脱水剤を用い人工的に核退化像を形成し、脱水を核退化の主要素とし、飯島<sup>7)</sup>は等電点の移動に、また浜崎<sup>52)</sup>は親水性膠質が障

害により嫌水性にかわり、さらに粗大分散系に変化する、つまり染色質分離に手がかりを求めている。細胞に酸、アルカリなどの化学物質を作用させたり<sup>60)</sup>、培養時に圧や温度を変化させることにより<sup>61)</sup>細胞はゾルの状態からゲルの状態へ変化し、あるいは位相差顕微鏡下で細胞を長時間放置するとゲル化し、細胞を動かすと全く形をかえることなく移動するのはよくみられるところである。新鮮な状態の Ehrlich 腹水がん細胞の核は、位相差像で核小体のほかは均質無構造であり、これは核内が完全にゾルの状態であることを示している。変性および固定操作により、核内では DNA-histone 型蛋白複合体の集合を主としたゾルからゲルへの変化が起こり、このため核内の構造を認め得るようになると考えられ、このような変化を引き起こす機序として脱水や等電点の移動などが主要な役割をなすものと推定される。

Heitz<sup>62)</sup>が heterochromatin を染色体の中で異常凝集 (heteropyknosis) を示す部分であると形態学的に定義づけて以来とくに生化学的な面からの研究が行われ、また形態学的には電子顕微鏡を中心としてその構造の研究がなされている。本実験で用いた Ehrlich 腹水がん細胞では前述のように位相差像、染色像および電子顕微鏡像ともに新鮮な状態では heterochromatin に一致する構造はみられず、変性により、あるいは固定操作によって heterochromatin 様物質の出現をみる。このようにして出現する heterochromatin 様物質は人工的に生じたものと考えられ<sup>63)</sup>、一般の細胞観察、とくに radioautography などによる観察に際しては十分な注意を要する問題であろう。

以上述べたように細胞の核の変性にはきわめて多くの要素が関与し、単一の要素のみを取り上げて変性過程を追求することは不可能である。本実験では、保存温度、保存時間および固定液の三つの条件下で起こる細胞核の変性の模様を種々の観察方法により対比検討し、すでに飯島<sup>7)</sup>が組織について報告した所見とほぼ一致した細胞核の変性過程の像を得ることができた。

## 結 論

Ehrlich 腹水がん細胞の核について、その変性過程を形態学的に検討するために経時的ならびに固定操作による変性を位相差像、染色像および電子顕微鏡像により観察し、以下の結果を得た。

1. きわめて新鮮な核の位相差像は、核小体をみる以外ほとんど均質無構造であり、変性ととともに構造の出現をみる。これは、新鮮細胞の核は光学顕微鏡的に

は無構造のゾル状態で、変性が進むとゲル化することを示すと推定される。

2. 位相差像、Papanicolaou 染色像および Feulgen 反応所見の比較観察では、三者の変性過程はほぼ一致し、核の変性は DNA およびこれを取りまく蛋白と密接な関係があるものと推察される。

3. 凍結溶解法による同一細胞についての位相差像と染色像との対比観察では、8時間後までは両者の所見は一致するが、12時間後以降の変性の進んだ核では一致をみなくなる。これは、一定時間を境に核内構造の融解が起こり、さらに再凝集により全く異なった構造が出現してくるためと考えられる。

4. 試験管内での変性過程と、薄層標本内での変性過程の観察では、試験管内では変性が進むと pyknosis を呈するが、薄層標本内ではそのような所見はなく、12時間後に核内構造の均質化、24時間後以降には明暗調の逆転をみる。この所見の違いは薄層標本での圧迫操作が関係すると考えられる。

5. 変性過程に及ぼす温度の影響としては、4°C に保存した細胞の核は、37°C に保存したものに比較して変性が遅く、96時間後においても核はなお十分に核内構造を保持し、位相差像では、37°C 6時間後の所見にほぼ一致する。

6. 新鮮な細胞の核に対する固定効果はそれぞれの固定液による差をみるが、変性の進んだ核では、10%ホルマリンを除けば固定液による差はみない。以上より固定像を決定する因子は、変性により容易に崩壊するもの、すなわち DNA-histone 型蛋白複合体であろうと想像される。

7. 本実験での観察結果より、新鮮な Ehrlich 腹水がん細胞の核には、heterochromatin に一致する構造を認め得ず、核の変性とともな heterochromatin 様物質が凝集塊として出現すると考えられる。

稿を終るに臨み、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谷本一夫教授に深謝いたします。また電子顕微鏡の研究の御指導をいただいた前金沢大学第3内科講師藤永逸博士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)によりなされた。記して感謝の意を表する。

## 文 献

- 1) Hattori, S., Matsuda, M., Nishihara, H. & Horai, T. : Acta Cytol., 15, 460 (1971).
- 2) 西川良平 : 日臨細胞誌, 9, 135 (1970).
- 3) 田嶋基男・山岸紀美江・藤間弘行・稻村雅夫・片

- 柳照雄：日臨細胞誌，10，9（1971）。
- 4) 山岸紀美江：日臨細胞誌，6，211（1967）。
- 5) Papanicolaou, G. N. : Atlas of Exfoliative Cytology, 4th ed., p. 13, Cambridge, Harvard Univ. Press, 1963.
- 6) 田嶋基男・山岸紀美江・渡部庸一・多賀須幸男：診断と治療，56，305（1968）。
- 7) 飯島宗一：名古屋医学，69，294（1955）。
- 8) 飯島宗一：名古屋医学，69，413（1955）。
- 9) Zollinger, H. U. : Am. J. Pathol., 24, 797（1948）。
- 10) 片柳照雄：日消会誌，66，1457（1969）。
- 11) 田村宏・中野俊一・中村義文・渡辺善正：日臨，26，1234（1968）。
- 12) 山形健三：細胞化学シンボ，14，89（1964）。
- 13) 片柳照雄：日消会誌，66，1293（1969）。
- 14) 三宅健夫：日本血液学全書6-1術式，101頁，東京，丸善，1964。
- 15) 辻谷賢三：米子医誌，10，150（1959）。
- 16) Ackerman, G. A. & Bellios, N. C. : Blood, 10, 3（1955）。
- 17) Ackerman, G. A. & Bellios, N. C. : Blood, 10, 1183（1955）。
- 18) Bessis, M. : Living Blood Cells and their Ultrastructure, New York, Springer-Verlag, 1973.
- 19) 花岡正男：日血会誌，19，341（1956）。
- 20) 千田信行：日網会誌，1，15（1961）。
- 21) 恒松徳五郎：内科宝，7，553（1960）。
- 22) 恒松徳五郎：日血会誌，23，585（1960）。
- 23) 綾部正大：胃癌の細胞学的診断，第1版，42頁，東京，医学書院，1957。
- 24) Henning, N. & Witte, S. 田嶋基男訳：図説消化器の細胞診，第2版，12頁，東京，医学書院，1968。
- 25) 稲垣克彦：位相差顕微鏡の臨床的応用，36頁，東京，医学書院，1951。
- 26) 田嶋基男：臨産産，19，393（1965）。
- 27) Wied, G. L. : Acta Cytol., 2, 306（1958）。
- 28) 今木重雄・竹岡 成：位相差顕研会誌，8・9，1（1954）。
- 29) 堤 鏡男：札幌医誌，18，109（1960）。
- 30) Zollinger, H. U. : Am. J. Pathol., 24, 569（1948）。
- 31) 安藤和雄：日臨細胞誌，8，1（1969）。
- 32) 竹中正治・谷田 秀・宗像雅文・佐々木義夫：日臨細胞誌，8，56（1969）。
- 33) 武田 進：腫瘍細胞，22頁，大阪，永井書店，1956。
- 34) 山田 喬：日臨細胞誌，10，116（1971）。
- 35) Alfert, M. : Biol. Bull., 109, 1（1955）。
- 36) Leuchtenberger, C. : Chromosoma, 3, 449（1950）。
- 37) Kamentsky, L. A., Melamed, M. R. & Derman, H. : Science, 150, 630（1965）。
- 38) 岸上義彦・野田 定・桜宮正子・服部正次・橋本良夫・宮脇一男：日臨，27，2944（1969）。
- 39) Sprenger, E., Sandritter, W., Böhm, N., Wagner, D., Hilgarth, M. & Schaden, M. : Acta Cytol., 16, 297（1972）。
- 40) 岸上義彦・野村 裕・中村義文・高橋 隆・服部正次・橋本良夫・横内 峻・宮脇一男：日臨細胞誌，6，233（1967）。
- 41) 松本謙二・岸上義彦・野田 定・上田義博・橋本良夫：日臨細胞誌，10，148（1971）。
- 42) Feder, N. & Sidman, R. L. : J. Biophys. Biochem. Cytol., 4, 593（1958）。
- 43) Gersh, I. : The Cell, 1, 21（1959）。
- 44) Hancox, N. M. : Exp. Cell Res., 13, 263（1957）。
- 45) Lison, L. : C. R. Soc. Biol., 143, 115（1949）。
- 46) Simpson, W. L. : Anat. Rec., 80, 173（1941）。
- 47) Gössner, W. : Virchow Arch. Pathol. Anat., 327, 304（1955）。
- 48) Kent, S. P. : A. M. A. Arch. Path., 64, 17（1957）。
- 49) 西亀元視：広島医学，別刊号16，1（1963）。
- 50) 西亀元視：広島医学，別刊号16，15（1963）。
- 51) 高橋正宜：癌の臨，13，792（1967）。
- 52) 浜崎幸雄：細胞核の生理と病理，210頁，大阪，永井書店，1952。
- 53) Strangeways, T. S. P. & Canti, R. G. : Quart. J. Micr. Sci., 71, 1（1928）。
- 54) 天神美夫：産と婦，38，368（1971）。
- 55) 小林康夫・近藤明人・矢吹光子：日臨細胞誌，9，170（1970）。
- 56) 佐野 豊：組織学研究法—理論と術式—，第3版，55頁，東京，南山堂，1970。
- 57) 鶴沼直雄：細胞，2，2（1970）。
- 58) Yasuzumi, G. & Sugihara, R. : Exp. Cell

Res., 33, 578 (1963).

59) 吉松広延 : 動物誌, 53, 193 (1941).

60) Lewis, M. R. : Bull. Johns Hopkins Hosp., 34, 373 (1923).

61) Landau, J. V. : Exp. Cell Res., 21, 78 (1960).

62) Heitz, E. : Jb. wiss. Bot., 69, 762 (1928).

63) 中野俊一 : 日臨細胞誌, 10, 326 (1971).

#### Explanation of plates

##### Fig. 1.

Ehrlich ascites tumor cell in a fresh state.

a : Phase contrast microscope (PCM) picture

Note the homogenous nuclear structure.

b : Papanicolaou stain.

Note the smooth nuclear margin and scanty, small intranuclear clumps.

c : Feulgen reaction.

Note the diffusely stained nucleus.

##### Fig. 2.

PCM picture of nuclear change in the cell incubated at 37°C in a test tube for :

a : 1 Hr, b : 3 Hrs, c : 6 Hrs, d : 12Hrs,

e : 24Hrs, f : 48Hrs, g : 72Hrs and h : 96Hrs.

Intranuclear clumps have gradually appeared and enlarged as the nuclear degeneration progressed. At 12 hours, these clumps dissolved and thus the nuclear structure became homogenous, but at 48 hours, the nuclear clumps-like structure reappeared.

##### Fig. 3.

Light-microscopic (LM) picture of the Papanicolaou stained-cell incubated in the same fashion as described in Fig. 2.

Incubation time of :

a : 1 Hr, b : 6 Hrs, c : 24Hrs and d : 48Hrs

The nuclear change is almost to that observed under PCM (Fig. 2).

##### Fig. 4.

The same picture of the cell treated with the same fashion as described in Fig. 2 and with Feulgen reaction.

Incubation time of :

a : 1 Hr, b : 6 Hrs, c : 24Hrs and d : 48Hrs.

In a fresh state the nucleus is stained di-

ffusely. With the progression of degeneration, Feulgen reactive clumps have appeared and enlarged. After 48 hours on, the nucleus has become almost pyknotic.

##### Fig. 5.

PCM picture of the tumor cell (left) and LM picture of the same cell fixed by freeze-substitution method and stained with Papanicolaou procedure (right) at incubation time of :

a : 0 (fresh state) Hr and b : 8 Hrs.

The finding well coincides to each other until 8 hours, but does not after 12 hours on.

##### Fig. 6.

PCM picture of the tumor cell incubated at 4°C in a test tube at incubation time of :

a : 1 Hr, b : 3 Hrs, c : 6 Hrs, d : 12Hrs,

e : 24Hrs, f : 48Hrs, g : 72Hrs and h : 96Hrs.

The nuclear degeneration of the cell kept at 4°C is delayed evidently compared with that kept at 37°C. The nuclear pattern of the cell kept at 4°C even after 96 hours, as shown in h, is still preserved.

##### Fig. 7.

LM picture of the Papanicolaou-stained tumor cell similarly treated in Fig. 6 at incubation time of :

a : 6 Hrs and b : 48Hrs.

The intranuclear clumps has enlarged slowly with the time progression.

##### Fig. 8.

The sequential nuclear degeneration of the cell kept at 37°C in a thin-layer smear for PCM at incubation time of :

a : 0 (fresh state) Hr, b : 1 Hr, c : 3 Hrs, d : 6 Hrs, e : 12Hrs, f : 24Hrs, g : 48Hrs and h : 96Hrs.

The nuclear degeneration process in this system is mostly consistent until 6 hours with that kept in a test tube. Thereafter, pyknotic figure has not appeared in this system, but reversed picture except for nucleoli is seen after 24 hours on.

##### Fig. 9.

Effects of fixatives on the nuclear degeneration of the tumor cell. Three or four ph-

otographs from left to right were taken consecutively at 3~4 seconds interval immediately after mixing a fixative.

Fixed by :

a : 100% ethanol, b : 50% ethanol,

c : 30% ethanol, d : water,

e : ether • 95% ethanol.

f : Carnoy's fluid and g : 10% formalin.

The nucleus has become brilliant in photos a, b, e and f, bulged in photos c and d, but did not so in photo g as in photos c and d.

**Fig. 10.**

Effects of fixatives on the degenerated nucleus. Each photograph shows PCM picture on the left and Papanicolaou-stained nucleus on the right.

Fixed by :

a : ether • 95% ethanol at time 0 (fresh state)

b : the same at time 24 hours

c : methanol at time 0

d : the same at time 24 hours

e : Carnoy's fluid at time 0

f : the same at time 24 hours

g : 10% formalin at time 0

h : the same at time 24 hours

i : 1% osmic acid at time 0

j : the same at time 24 hours

In the fresh state, the specific nuclear structure is visualized by each fixative respectively, but in the degenerated state no such difference in nuclear pattern among fixatives is seen.

**Fig. 11.**

Degenerative change in chromatin pattern as seen under electron microscope.

a, b : a fresh tumor cell

c, d : 24 hours preservation at 4°C

e, f : 24 hours incubation at 37°C

a, c, e : Fixed by osmic acid

b, d, f : Fixed by glutaraldehyde-osmic acid

The nucleus fixed at a fresh state by osmic acid alone shows euchromatic pattern (Fig. 11. a) and with the progression of degeneration heterochromatin-like structure has appeared (Fig. 11. c and e). When fixed by glutaraldehyde-osmic acid, however, the nucleus shows heterochromatin-like structure already at a fresh state (Fig. 11. b) — a most remarkable difference in the nuclear pattern between Fig. a, c & e and Fig. b, d & f.

### Abstract

Improvement of biopsy technique has made it possible to obtain the specimen in a very fresh state and thus prompted us to re-evaluate the classical criteria of cancer cells which were originally established mainly based upon the morphology of the degenerated cells.

In this study, in an attempt to clarify the degenerative process of the nucleus, using phase contrast—, light— and electron microscopes, morphological study on the Ehrlich ascites tumor cells kept at different temperatures, and unstained and or stained with Papanicolaou stain, and Feulgen reaction, respectively was performed. Furthermore, effects of various fixatives on the nuclear pattern were observed.

1. In the fresh state, the nuclear structure observed under the phase contrast microscope was homogenous except for nucleolus, but with the progression of the nuclear degeneration, intranuclear clumps gradually appeared. The similar finding was observed in smears stained with Papanicolaou or Feulgen procedure, thus suggesting that nuclear degeneration might be closely related to that of DNA and nuclear proteins.

2. To confirm the reliability of such phase microscopic pictures the same

cell once observed under the phase contrast microscope was fixed in a freeze-substitution method, stained according to the Papanicolaou procedure and observed under the light microscope. The finding well coincided to each other until 8 hours later, but did not after 12 hours.

3. Comparative study on the nuclear degeneration of the cell kept at 37°C between in a test tube and in a thin-layer smear for the phase contrast microscope revealed that pyknosis had appeared after incubation of 48 hours or more in the test tube, but none in the thin-layer smear. In the latter case, a hazy nuclear pattern 12 hours later and a reversed picture of freshly observed nuclear pattern 24 hours later were seen. Such differences in the findings were presumed to be due to a pressuring procedure for making a thin-layer preparation.

4. Study on effects of preservation temperature revealed that cold preservation (4°C) had prolonged the nuclear degeneration until 96 hours later.

5. Study on effects of fixatives revealed that there were considerably marked differences in the nuclear pattern among the *fresh* cells treated with fixatives, but none among the *degenerated* cells similarly treated except for with 10% formalin.

6. Electron microscopic study disclosed that there was no discernible heterochromatin pattern in the *fresh* cell, but, with the progression of degeneration, heterochromatin-like structure had appeared.

---

Fig. 1

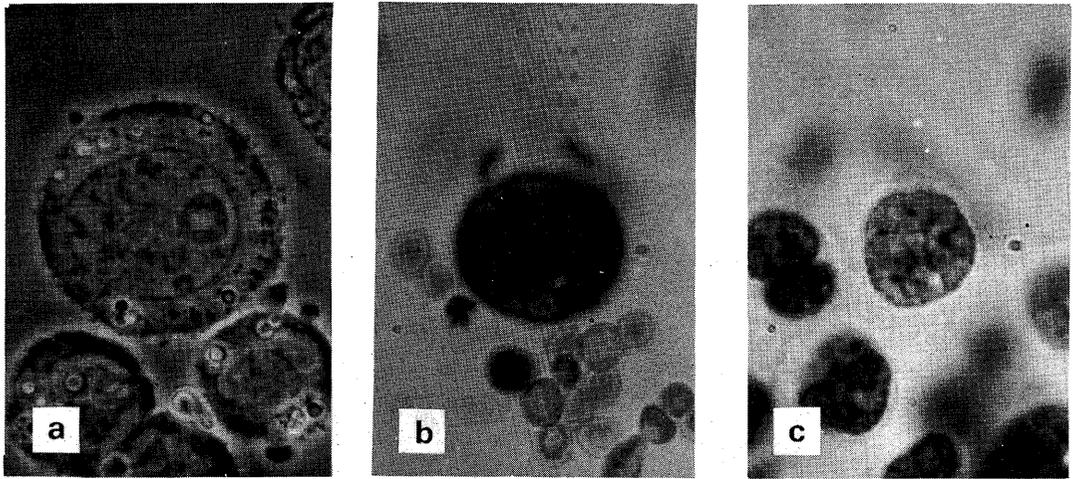


Fig. 2

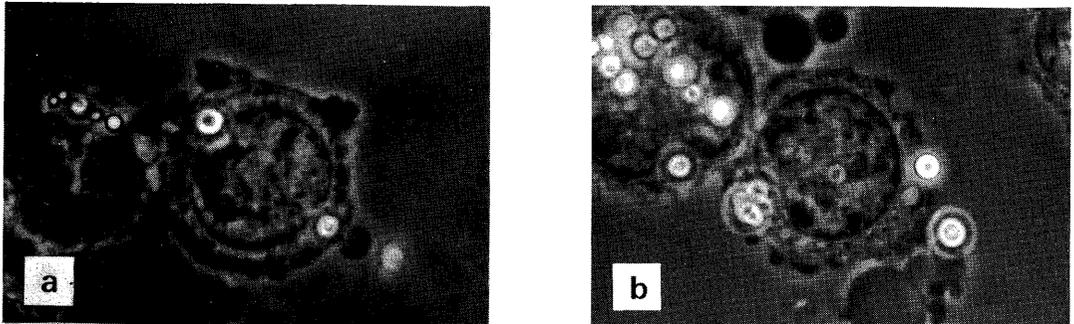


Fig. 2

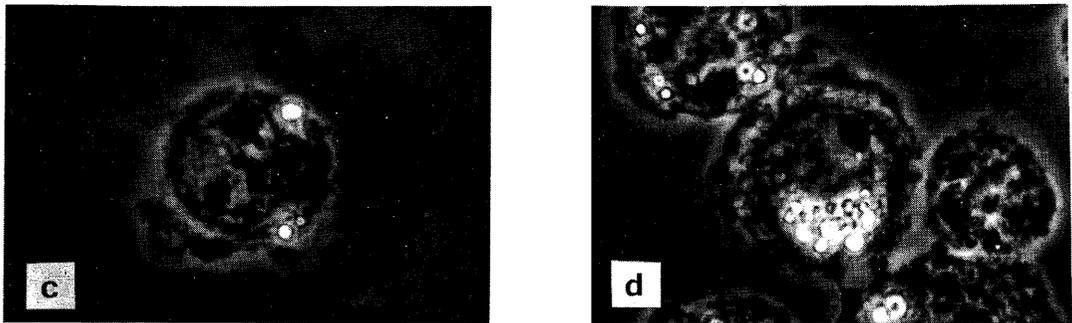


Fig. 2

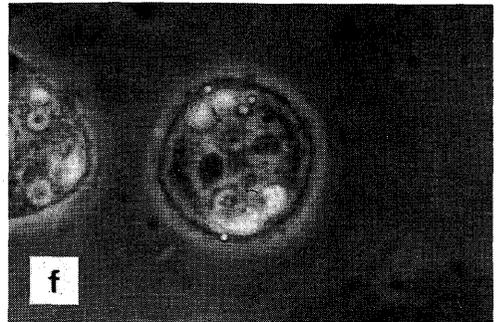
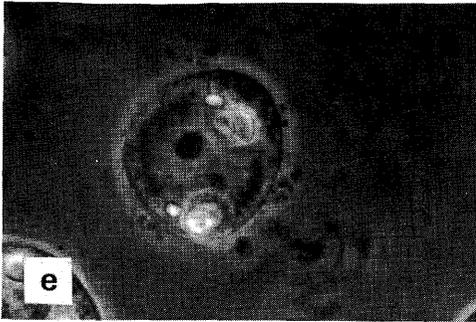


Fig. 2

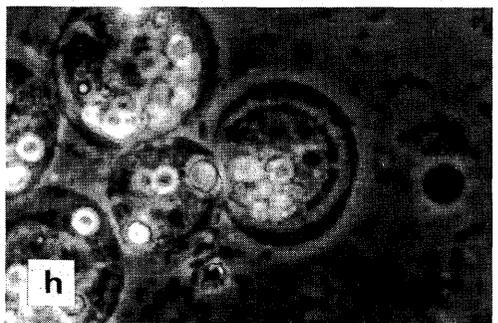


Fig. 3

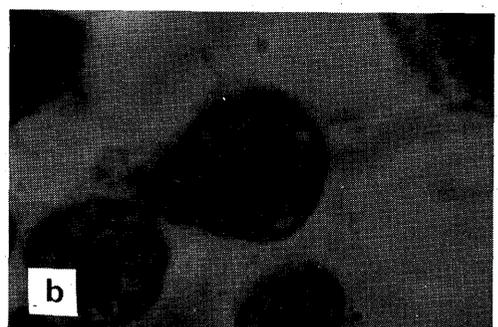
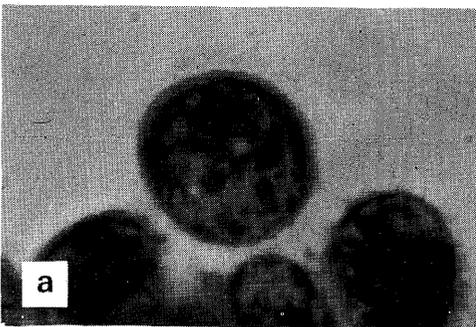


Fig. 3

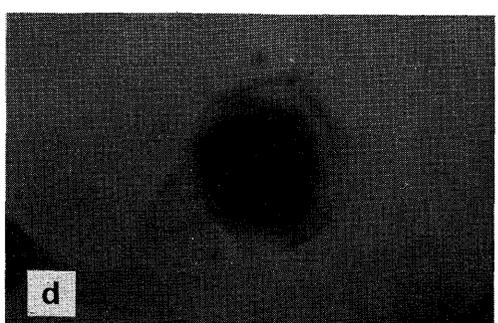
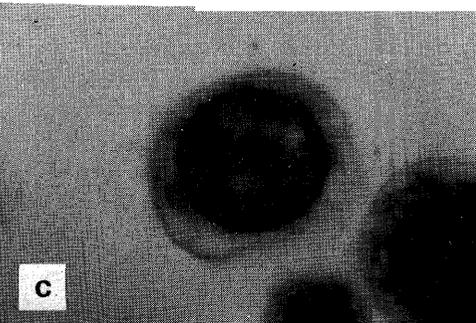


Fig. 4

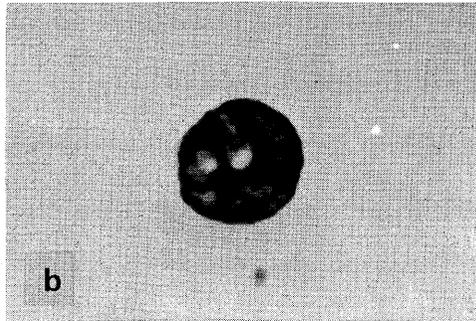


Fig. 4

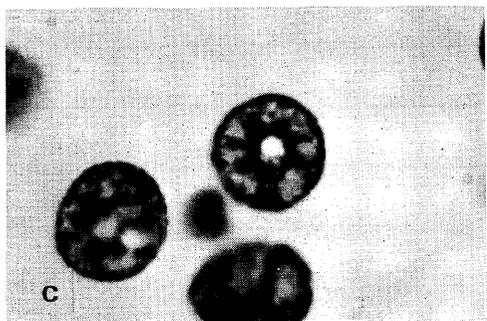


Fig. 5

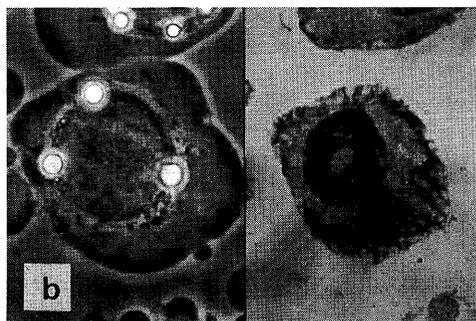
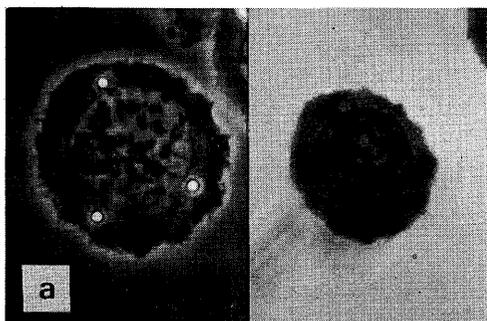


Fig. 6

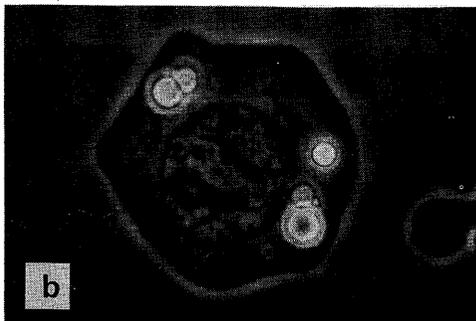
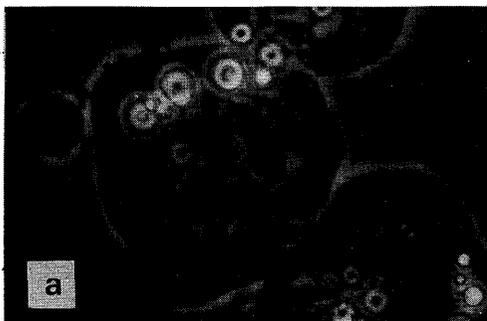


Fig. 6

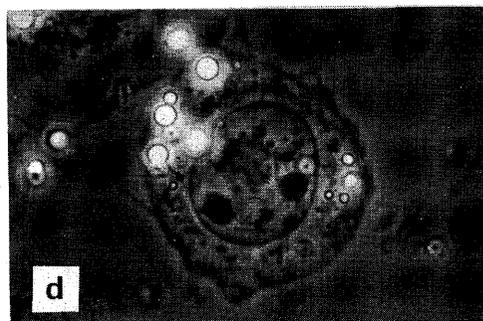
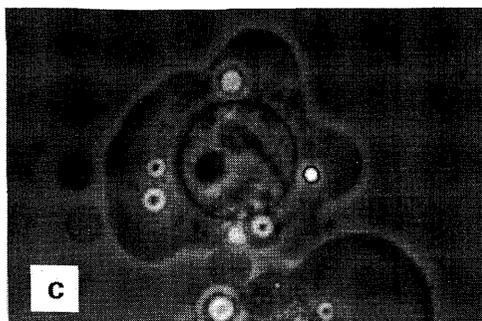


Fig. 6

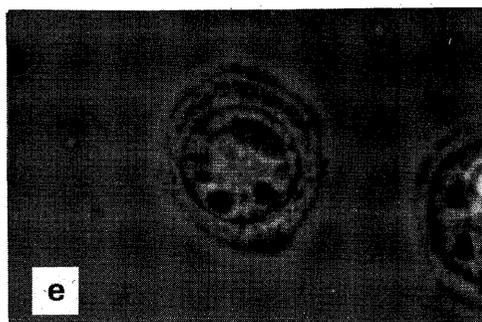


Fig. 6



Fig. 7

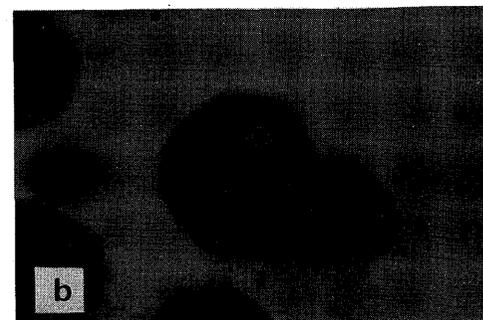
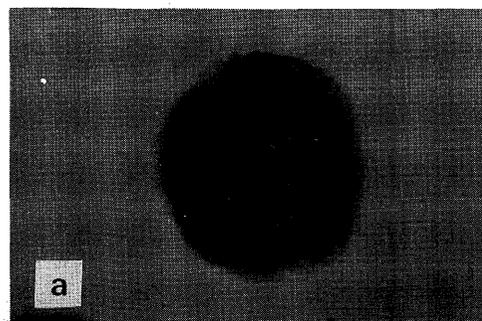


Fig. 8

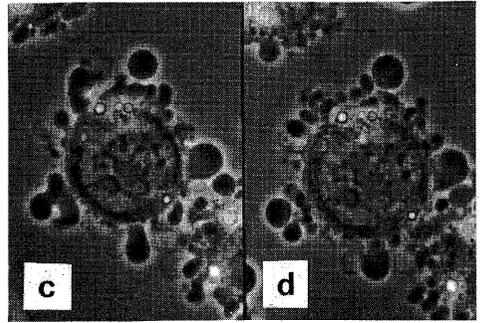
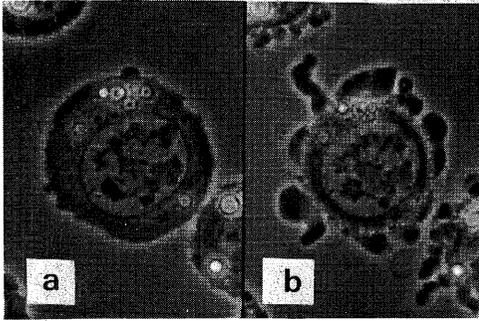


Fig. 8

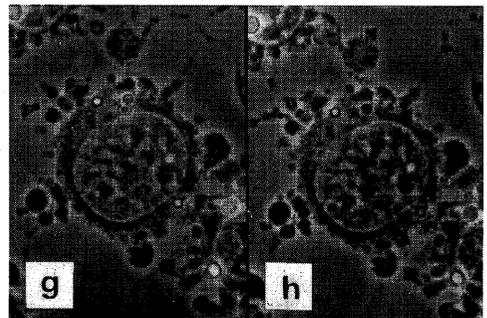
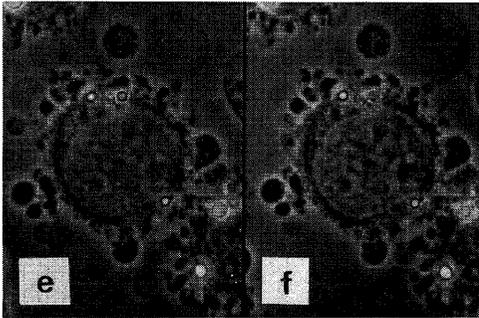


Fig. 9

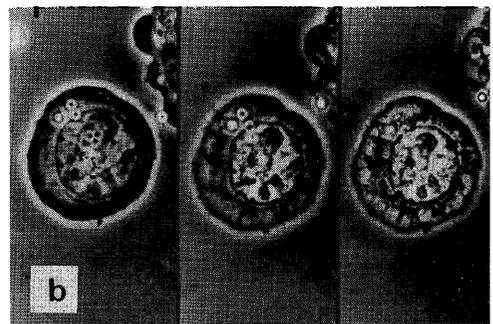
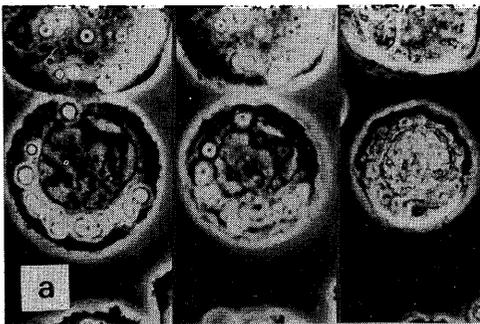


Fig. 9

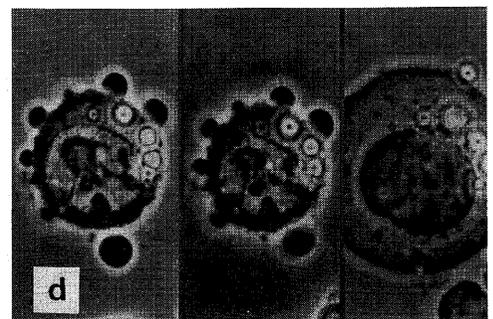
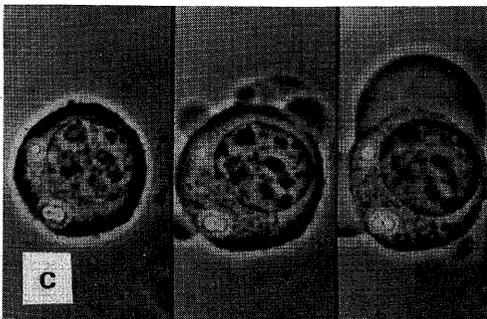


Fig. 9

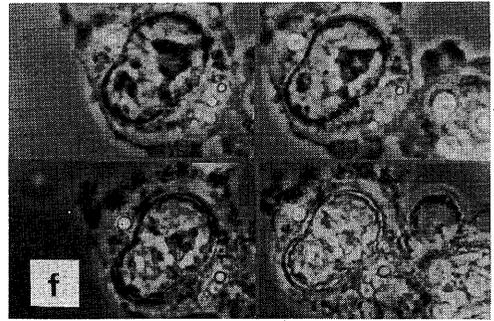
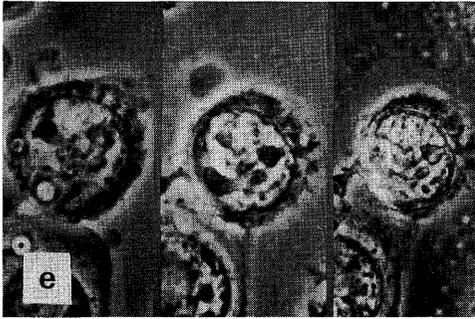


Fig. 9

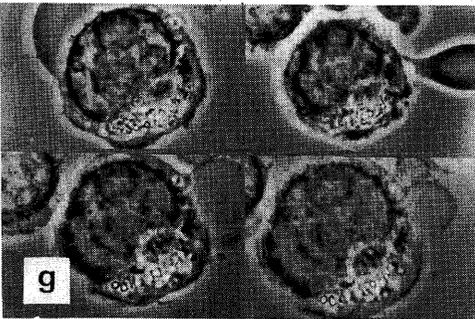


Fig. 10

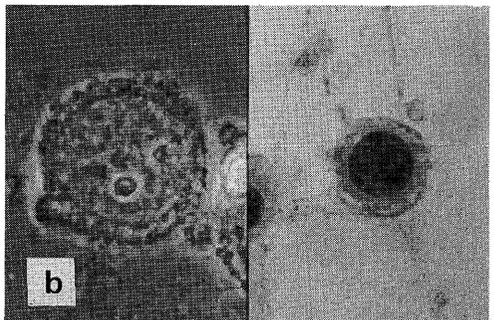
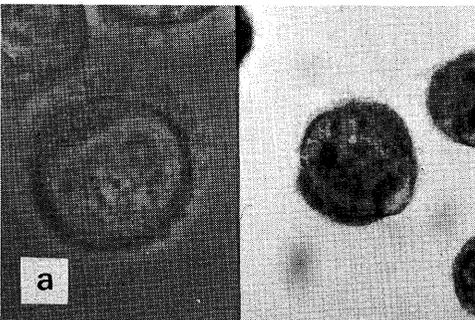


Fig. 10

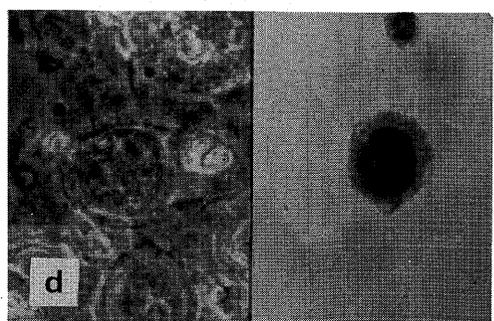
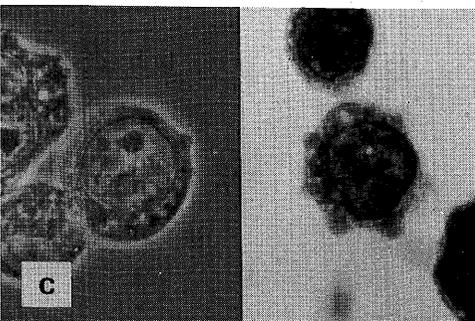


Fig. 10

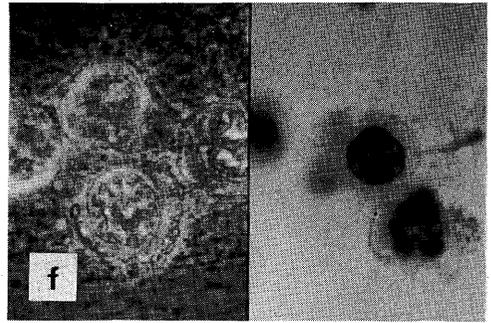
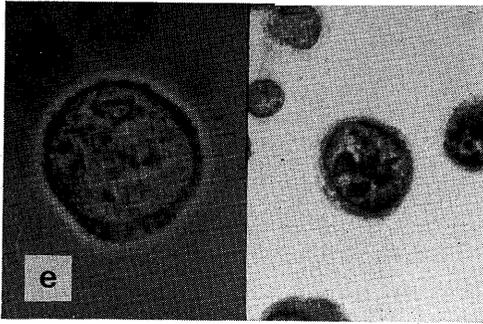


Fig. 10

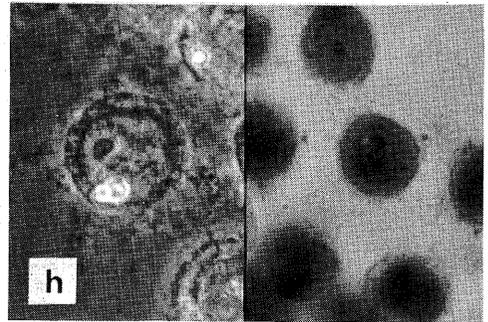
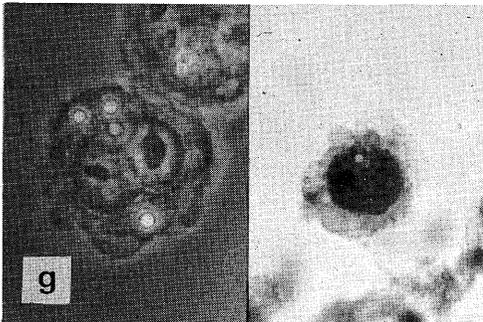


Fig. 10

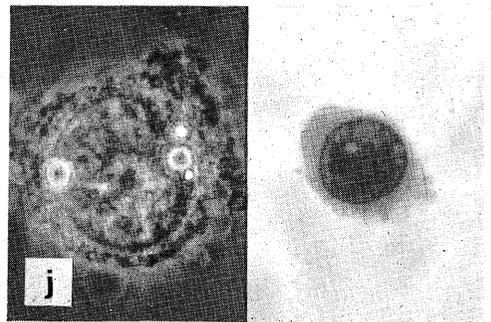
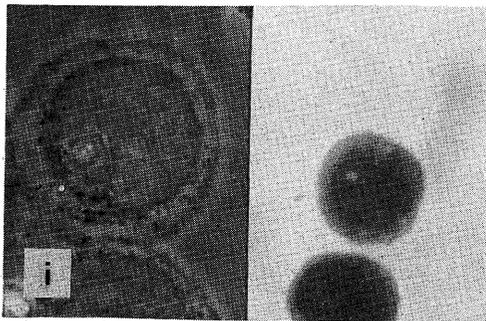


Fig. 11

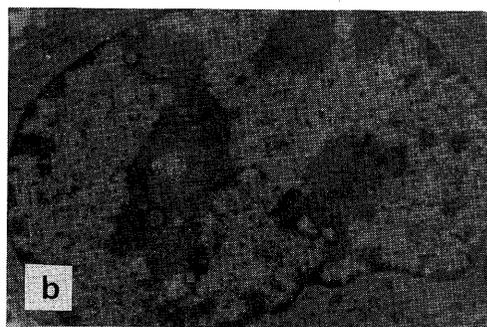


Fig. 11

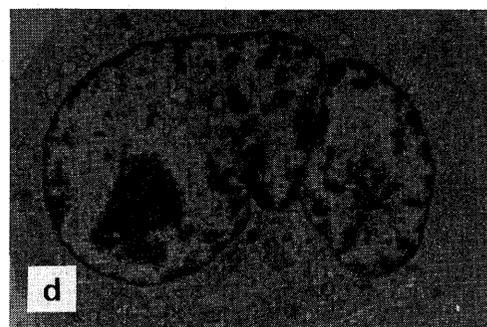
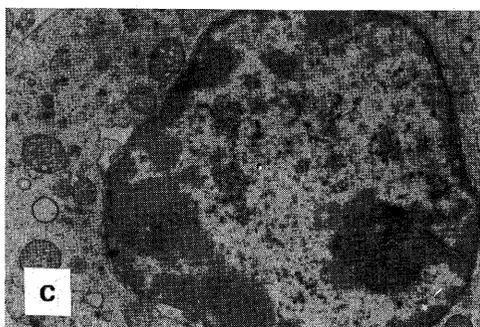


Fig. 11

