

骨腫瘍化の組織学的研究

第1編 臨床骨腫瘍の組織化学的研究

金沢大学大学院医学研究科整形外科科学講座(主任: 高瀬武平教授)

真 鍋 昌 平

(昭和38年2月16日受付)

本論文の要旨は昭和37年10月, 第20回中部日本整形外科災害外科学会において発表した。

酵素, 核酸, 多糖類, 蛋白質, 脂質等の組織化学的証明法が確立されて以来, 腫瘍, 特に癌腫についての組織化学的研究が多くの人々によつて報告されて来た。

骨腫瘍の組織化学的研究は, Gomori (1943) が骨肉腫に Alkaline Phosphatase が多量に認められたと報告して以来, この方面に注意が向けられるようになり Changus (1947) は Fibrous dysplasia において破骨細胞に Acid Phosphatase が認められたと述べ, Gilmer (1954), Pepler (1958), Schajowicz (1961) は骨巨細胞腫について酵素特に Phosphatase の組織化学的研究を行い巨細胞の由来について検討している。また Schajowicz (1959) は Ewing 肉腫, 骨細網肉腫について Glycogen 染色を行い両者を鑑別出来ると述べた。しかし, 骨腫瘍の組織化学的研究は未だ少なく, 特に, 骨腫瘍一般についての研究は僅かに Schajowicz, 北川の報告を見るにすぎず, 且つ, それらの報告には, 骨腫瘍の組織化学的に体系づけられた研究は見出せない。

よつて著者は手術により得られた骨腫瘍一般についての組織化学的検索を行い, 個々の骨腫瘍の代謝型式を見出さんとして本研究を行った。

被検材料及び組織化学的検索方法

被検材料は金沢大学医学部整形外科及び関係病院を訪れた症例から採取した骨腫瘍で, その内訳は次の如くである。

1) 骨肉腫	7例
2) 軟骨肉腫	3例
3) 骨細網肉腫	1例
4) 骨髄腫	2例

5) 骨巨細胞腫	9例
6) 軟骨腫	3例
7) 骨軟骨腫	8例
8) Fibrous dysplasia	1例
9) 転移骨癌	12例
計	46例

以上の腫瘍組織の各々について, 可及的に軟部をカルノア氏液で固定, その他の部を冷アセトンで固定, 後者については5%中性EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) 液を用いて脱灰, パラフィン切片とした。本研究ではパラフィンは融点46°~48°Cのパラフィンを使用した。

冷アセトン固定の組織は Phosphatase 染色に, カルノア氏液固定の組織は Periodic Acid Schiff 反応, Toluidine blue 染色, 核酸染色に用いた。

施行した組織化学的染色方法は下記の如くである。

- 1) Phosphatase (以下 P-ase と略す) 染色
 - a) Alkaline Phosphatase (以下 Al. P-ase と略す) (高松・赤星氏法による)
 - b) Acid Phosphatase (以下 Acid P-ase と略す) (高松・小沢氏法による)
- 2) 多糖類染色
 - a) Periodic Acid Schiff 反応 (以下 PAS 反応と略す)
 - b) Glycogen のための 1% Takadiastase による消化試験
 - c) 糖蛋白のための Pepsin による消化試験
 用いた Pepsin 液は, 結晶性 Pepsin 0.05mg を N/200 HCl, 1 cc に溶かして作製した。
- 3) 酸性多糖類のための大野氏法 (Metachromasia)
 - a) pH 2.5 Toluidine blue 染色

Histochemical Studies of Bone Tumors. Part I. Histochemical Studies of Human Bone Tumors. Shohei Manabe, Department of Orthopaedic Surgery (Director: Prof. B. Takase), School of Medicine, University of Kanazawa.

b) pH 7.0 Toluidine blue 染色. 及びヒアルロニダーゼ消化試験

4) 核酸染色

- a) Methylgreen Pyronin 染色
- b) Erickson, Sax et Ogur 氏法
- c) Feulgen 反応

対照として Haematoxylin-Eosin 染色を併施して比較検討した.

実験成績

(1) 骨肉腫

Al. P-ase は腫瘍細胞の原形質, 核に強い活性を示し(図1), 腫瘍性類骨組織形成せる腫瘍細胞にも強い活性を示すものがあるが, その多くの腫瘍細胞に Al. P-ase 活性は減弱する(図2). 腫瘍性巨細胞にも同様に強い活性を認める(図1の↑印). 腫瘍性類骨組織の基質にも強い活性を示すものが多いが(図2), 腫瘍性骨組織の基質には, その活性は減弱しており, 且つ, 腫瘍性骨組織形成の腫瘍細胞にも本活性の減弱が認められた. 腫瘍組織中, 腫瘍性巨細胞を多く含む細胞成分に富んだ組織が類骨組織形成部より離れて存在している場合, その組織では本活性は認められないか, または細胞に極めて弱い反応を示している. かかる組織はしばしば認められ, 悪性巨細胞腫によく類似した組織像を示している.

Acid P-ase は, 同一切片でも全然本活性を示さない部, 強く示す部が混在しており, 従つて一定した型式を示さないが, 本活性を認め得る部では, 腫瘍細胞, 腫瘍性巨細胞(図5), 及び腫瘍性類骨組織の基質に本活性を認め, しばしば, 腫瘍性類骨組織の基質に認められて腫瘍細胞に認められないかまたは極めて弱い活性を認める部(図4)が散在している. 本活性は Al.P-ase 活性と同様に細胞の原形質のみならず, 核にも認めることが出来た.

PAS 反応は腫瘍細胞に弱く, 腫瘍性巨細胞にはやや強く認められる(図6). 腫瘍性類骨, 骨組織形成の腫瘍細胞には同程度に認められるかまたはやや弱い反応を示す(図7, 8, 9). これらの腫瘍細胞の原形質の PAS 反応とは別に, これらの細胞間の間質に網状, 雲状の反応陽性物質(図7, 図9の↑印)があり, これが腫瘍性類骨組織の基質に移行し, その反応は増強する. 従つて腫瘍性類骨組織の基質における PAS 反応は強い(図7, 8, 9). これに反し, 腫瘍性骨組織の基質における PAS 反応は弱い.

これら PAS 反応陽性物質は Takadiastase の消化に抵抗し, Pepsin 消化で, ほとんど消失する. 従つ

てこの PAS 反応陽性物質は糖蛋白であると考えられる.

酸性多糖類のための大野氏法による pH 2.5, 7.0 Toluidine blue 染色では, 腫瘍細胞, 腫瘍性巨細胞, 腫瘍性類骨組織, 腫瘍性骨組織は全く Metachromasia (以下 Meta と略す)を示さない.

核酸については, 腫瘍細胞の原形質に多量の RNA を有しており, その分布は原形質内に一様に瀰漫性に存在し, 顆粒状を示さず, 核の周囲, 原形質の辺縁部に特に強く認められるということはなかつた(図10). 腫瘍性巨細胞には原形質 RNA は腫瘍細胞のそれより強い(図10). 原形質 RNA の他に, 核小体に, 周囲に DNA 顆粒を伴つた核小体 RNA が1~2個乃至しばしば数個認められた. 核分裂を起している細胞では核小体 RNA は認められなく原形質 RNA は増強を認めないものが多いが, まれに一部増強或いは減弱を示すものも認められる. 腫瘍性類骨, 骨組織形成の腫瘍細胞には, これらの RNA は減弱する(図11, B).

DNA は細胞核内に認められるが, Feulgen 反応で観察される DNA は種々の形態を示す.

即ち

1) 微細 DNA 顆粒(図64の3, 4)

顆粒状を示し微細にしてしかもかなり均一であり, 核内分布も概ね瀰漫性である. しかしこの微細 DNA 顆粒のみが核内に認められることは少なく, やや粗大な顆粒または糸状, 網状 DNA を併有することが多い.

2) 糸状, 網状 DNA (図64の1, 2)

概ね繊細で太さやや均一なる糸状或いは網状を呈する DNA で, 核内に瀰漫性分布を示す場合, 核膜附近に分布する場合, また不規則な分布を示す場合がある. この糸状, 網状 DNA のみが核内に認められることは比較的少なく, 微細 DNA 顆粒, 粗大 DNA 顆粒を併有することが多い.

3) 索状 DNA (図64の5, 6, 15, 16)

糸状, 網状 DNA より太く, その太さも大小不同であるが, 核内分布は糸状, 網状 DNA の場合とよく類似している. 多くの場合, 粗大 DNA 顆粒と共存している.

4) 粗大 DNA 顆粒(図64の7, 8, 9, 10)

微細 DNA 顆粒より大きく, 時に不規則塊状を呈するものもある(塊状 DNA 顆粒)(図64の11, 12, 17, 19, 20, 21). 多くの場合索状 DNA, 糸状, 網状 DNA と共に認められる.

5) 部分的結節を有する糸状, 網状 DNA (図64の13, 14, 18)

糸状, 網状 DNA において, 部分的に結節状肥厚

を示すもので、その肥厚は大小不同で、しばしば粗大顆粒状、塊状を示すものが多い。

6) 核膜 DNA

核膜に菲薄に認められ、時に認められない場合がある。

7) 核膜附着 DNA 顆粒 (図64の1, ↑印)

上記の核膜 DNA に附着して、粗大顆粒状、或いは塊状に認められ、時に、微細顆粒状に見られる場合がある。

8) 核小体附随 DNA 顆粒 (図64の1, ↑印)

核小体を囲む如くに粗大顆粒状、塊状の DNA が認められ、核小体の数が増すと、これらの DNA 顆粒も増強する。

以上の如く、Feulgen 反応によつて DNA の形態が示されるが、微細 DNA 顆粒、糸状、網状 DNA、核膜 DNA は一般に弱い反応を示している。

これらの DNA を有する細胞の組織内分布は細胞成分に富んだ部と腫瘍性類骨、骨肥織を形成せる部とはやや趣を異にしている。即ち前者では糸状、網状 DNA、微細 DNA 顆粒を有する Feulgen 反応の弱い細胞は極めて少なく、粗大 DNA 顆粒、塊状 DNA 顆粒、粗大顆粒状、塊状に結節を有する糸状、網状 DNA を有する Feulgen 反応の強い細胞が多く認められ、且つ、核膜附着 DNA 顆粒、核小体附随 DNA 顆粒も粗大顆粒状、塊状として認められる(図12)。後者では糸状、網状 DNA を有する細胞は前者と同様少ないが、塊状 DNA 顆粒、太い索状 DNA を持つ細胞もあるが、主として、やや大きい微細 DNA 顆粒、粗大 DNA 顆粒を有する細胞が多く、核膜附着 DNA 顆粒、核小体附随 DNA 顆粒も前者に比して倭小となっている(図13)。

(2) 軟骨肉腫

比較的成熟度の高い分化した軟骨肉腫では、Al. P-ase 陽性の細胞、陰性の細胞があり、且つ、Al. P-ase 陽性の細胞に相接して陰性の細胞が見られる場合がある(図14)。また腫瘍性軟骨基質には Al. P-ase は不規則に出現し、これを認める部 (図14, ↑印)、と認ない部がある。Acid P-ase は腫瘍細胞にも、腫瘍性軟骨基質にも認められない。

PAS 反応は腫瘍細胞の原形質に比較的強く、軟骨基質には極めて弱い(図15)。これらの PAS 反応陽性物質は Takadiastase 消化試験に抵抗し、Pepsin により消失する。即ち糖蛋白と考えられ、Glycogen は存在しないといえる。

大野氏法 pH 2.5 Toluidine blue 染色は腫瘍性軟骨基質に弱い Meta を認めるが細胞の原形質には認め

ない。pH 7.0 Toluidine blue 染色は腫瘍性軟骨基質に強い Meta を認めるが、その際、Meta を示さない小空胞が無数に存在し、腫瘍細胞原形質に弱い Meta を認めることが出来た(図16)。pH 7.0 Toluidine blue で Meta を示した細胞の原形質、基質は、ヒアルロニダーゼ消化試験で Meta は減弱する。

未分化な軟骨肉腫では、Al. P-ase, Acid P-ase は腫瘍細胞に全く認められず、また PAS 反応は腫瘍細胞の原形質に極めて弱いか、または全く認められない。この弱い PAS 反応陽性物質は Pepsin 消化試験で消失する。大野氏法 pH 2.5, 7.0 Toluidine blue 染色で共に腫瘍細胞に Meta は認められない。

核酸については比較的成熟度の高い軟骨肉腫も未分化な軟骨肉腫もほぼ同様の態度を示している。

腫瘍細胞の原形質に多量の RNA が認められその分布は原形質内に一様、且つ、瀰漫性で、核の周囲、原形質の周辺部に特に強いという所見は認められなかつた(図17)。核小体 RNA は核小体附随 DNA 顆粒に囲まれるように認められ、その数は1個から数個に及ぶ。核分裂を起している細胞では核小体 RNA は消失し、原形質 RNA は増減を示さないもの、やや増強を示すもの、または減少を示すものがある。減少を認める細胞では、核の周囲に RNA が弱まっている。

DNA は細胞の核内に認められ、糸状、網状 DNA を持つ細胞は極めて少なく、Feulgen 反応の強い索状、塊状、粗大顆粒、粗大顆粒状及び塊状に結節を有する糸状及び網状 DNA、及び、粗大顆粒を混えた微細顆粒状の DNA が主として認められ、核膜附着及び核小体附随 DNA 顆粒も Feulgen 反応の強い塊状、粗大顆粒状に認められた(図18, 19, 64)。

(3) 骨細網肉腫

Al. P-ase は腫瘍細胞の原形質、核にやや強いが(図20)、Acid P-ase は腫瘍細胞の原形質、核に認めるもの、全く認めないものが混在している。

PAS 反応は腫瘍細胞に全く認めることが出来ない。

大野氏法による pH 2.5, 7.0 Toluidine blue 染色では腫瘍細胞は全く Meta を示さない。

RNA は腫瘍細胞の原形質に一様、且つ、瀰漫性に多量に認められ(図21)、核小体 RNA は核小体附随 DNA 顆粒に囲まれて1~数個認められた。核分裂時は核小体 RNA は消失し、原形質 RNA は、変化を示さないもの、増減を示すものがあつた。

DNA は細胞の核内に認められ、糸状、網状、微細顆粒状のものは極めて少なく、塊状顆粒、索状、粗大顆粒、及び粗大顆粒状に結節を有する糸状及び網状 DNA が主として認められ、また核膜附着及び核小体

附随 DNA 顆粒は粗大顆粒状、そしてしばしば塊状を呈している。これらの DNA はかなり強い Feulgen 反応で認められた (図22, 64)。

(4) 骨 髄 腫

Al. P-ase は腫瘍細胞の原形質、核に微細顆粒状にやや強く認められるもの、弱く認められるものが混在している (図23)。Acid P-ase は腫瘍細胞の原形質、核に弱く認められた (図24)。

PAS 反応は腫瘍全細胞に全く認められない。

大野氏法による pH 2.5, 7.0 Toluidine blue 染色では腫瘍細胞は全く Meta を示さない。

RNA は腫瘍細胞の原形質に一樣、且つ、瀰漫性に増強し (図25)、核小体 RNA は核小体附随 DNA を伴って 1~数個認められる。核分裂時には核小体 RNA は消失し、原形質 RNA は原形質内に濃淡なく一樣で変化を認めないもの、一部、原形質内に一樣に増強するもの、また減弱するものでは核の周囲に減弱が認められた。

DNA は核内に、塊状顆粒、索状、粗大顆粒、及び粗大顆粒状、塊状に結節を有する糸状、網状として認められ、微細顆粒、糸状及び網状 DNA は極めて少ない。即ちこれらの DNA は強い Feulgen 反応で示されている (図26, 64)。核膜附着、核小体附随 DNA 顆粒は塊状、粗大顆粒状に認められ、核小体附随 DNA は、核小体 RNA の数が増すと増強している。

(5) 骨巨細胞腫

本腫瘍については、Al. P-ase、及び PAS 反応の強弱により 3 群に大別して観察した。

第 1 群は、Al. P-ase 活性出現の不規則性と強い PAS 反応を認めるもの。

Al. P-ase は間質細胞、巨細胞に強く認められる部 (図28) と全く認められない部があり、Acid P-ase は間質細胞にかなり強く認められる部、弱く認められる部、また全く認められない部があり、一方巨細胞は一樣に強くまたは弱く認められる (図29)。これら Al. P-ase、Acid P-ase は細胞の原形質のみならず核にも認められる。

PAS 反応は、間質細胞の原形質に比較的強く、巨細胞の原形質には強く認められ (図30)、後者の PAS 反応陽性物質は数条の脚を形成して間質細胞間に入り、漸次反応が減弱し、しばしばこの脚は間質細胞の原形質の反応陽性物質と連絡している。またしばしば巨細胞に核濃縮像を認めることが出来るが、かかる巨細胞の原形質には、より強い PAS 反応が認められるものがある。また原形質に PAS 反応陰性の小さな空胞が多数認められる巨細胞もある。これら間質細胞、

巨細胞の PAS 反応陽性物質は Takadiastase 消化試験に抵抗し、Pepsin 消化試験によりほとんど消失する。即ち糖蛋白であるといえる。

大野氏法 pH 2.5, 7.0 Toluidine blue 染色では間質細胞、巨細胞共に Meta を示さない。

RNA は間質細胞の原形質に弱く、その原形質内分布は一樣、且つ、瀰漫性であり、巨細胞では強く認められる (図31)。核小体 RNA は間質細胞、巨細胞の中央に 1~2 個認められ、巨細胞に特に強い事実はない。

DNA は間質細胞の核には、糸状、網状、微細顆粒、やや粗大顆粒状に結節を有する糸状及び網状、及び、粗大顆粒として認められ、これらの Feulgen 反応はかなり弱い (図32)。核膜附着、核小体附随 DNA 顆粒は微細顆粒状、やや粗大顆粒状に認められる。巨細胞核も間質細胞の DNA と同様の態度を示し (図32)、核濃縮あるものでは塊状、点滴状に認められる。

第 2 群は間質細胞の Al. P-ase 活性増強と PAS 反応の減弱を認めるものであり、Al. P-ase は間質細胞の原形質に極めて強く、また核にも認められるが (図34)、他方、巨細胞には微細顆粒状で極めて弱い (図34, 35)。かかる所見は一樣に認められ、第 1 群に見る如き活性出現の不規則性は認められなかつた。

Acid P-ase は間質細胞に強く、巨細胞には更に強く (図36)、主として原形質、核に認められる。本活性増強は Al. P-ase は間質細胞にのみに、Acid P-ase は間質細胞、巨細胞に、第 1 群より増強している。

PAS 反応は、間質細胞の原形質に弱く、第 1 群より減弱し、巨細胞ではやや強いが第 1 群に比し減弱している (図37)。しばしば、ほとんど反応を示さない巨細胞もあり、これら PAS 反応陽性物質は Takadiastase 消化試験に抵抗し、Pepsin 消化試験でほとんど消失するので糖蛋白といえる。

大野氏法 pH 2.5, 7.0 Toluidine blue 染色では間質細胞、巨細胞共に全く Meta を示さない。

RNA は間質細胞では、原形質内に一樣、且つ、瀰漫性に比較的弱く、巨細胞では豊富に一樣に認められる (図38)。核小体 RNA は間質細胞、巨細胞共に核内に 1~2 個認められ、Pyronin の発色はかなり強い (図38)。これらの RNA は第 1 群に比し間質細胞、巨細胞共に原形質内には認むべき増強を示さないが、両細胞とも核小体 RNA の Pyronin 発色は第 1 群よりかなり強い。

DNA は間質細胞、巨細胞の核内に認められ、両者における DNA の態度は極めてよく類似しており、微細顆粒、粗大顆粒、粗大顆粒状に結節を有する糸状及

び網状 DNA が主であり、Feulgen 反応の強い塊状 DNA 顆粒、索状 DNA がわずかに存在する(図39)。核小体附随、核膜附着 DNA は粗大顆粒状を呈する。間質細胞に、極めて少数乍ら、核分裂を示すものがあった。以上 DNA は第1群に比し粗大な DNA があり、塊状顆粒、索状 DNA がわずかに出現し、全般的に DNA の増強を示している。

第3群は不規則な弱い Al. P-ase と PAS 反応の減弱乃至消失を認めるものであり、Al. P-ase は間質細胞の原形質、核に弱い部、全く陰性の部、またやや強い部が混在しており、巨細胞も同様な態度を示す。またしばしば、Al. P-ase 陽性の細胞が陰性の細胞に接する如く混在している部も認められる。

Acid P-ase は Al. P-ase と同様に、間質細胞、巨細胞共に強い部、共に弱い部、また全く認めない部が混在する。Acid P-ase 陽性の部では、間質細胞、巨細胞共に同程度に活性を示し、核にも認めることが出来る。

P-ase は以上の如く活性出現の不規則性を示し、且つ、その活性は第2群のそれに比し減弱している。

PAS 反応は間質細胞、巨細胞共に原形質に弱いかまたは全く認められない。弱い PAS 反応を認めるものは、Pepsin 消化試験で消失を示す。即ち第3群では第1群、2群に比して PAS 反応の減弱乃至消失を示している。

大野氏法 pH 2.5, 7.0 Toluidine blue 染色では間質細胞、巨細胞共に Meta を示さない。

RNA は間質細胞、巨細胞の原形質内に一様、瀰漫性に多量に認められる(図40)。核小体 RNA は、両細胞とも同様に、1~2個、しばしば数個認められ、各々の核小体 RNA は核小体附随 DNA 顆粒を伴って存在する。しばしば間質細胞に核分裂を認めるが、この場合、核小体 RNA は消失し、原形質 RNA は変化を示さないもの、核膜周囲に減弱を認めるもの、原形質内に一様に増強を示すものがある。

DNA は間質細胞、巨細胞の核に、塊状顆粒、粗大顆粒、索状、及び、粗大顆粒状、塊状に結節を有する糸状、網状 DNA が主であり、この Feulgen 反応は強い。その他、糸状、網状、微細顆粒のものは少ない(図41)。また、核膜附着及び核小体附随 DNA 顆粒も粗大顆粒状、塊状を示す。

即ち第3群の RNA, DNA は第1, 2群より増強している。

以上の如く骨巨細胞腫を3群に大別したが、Haematoxylin-Eosin 染色では第1群は円形または楕円形、時に紡錘形の原形質を有し、同じ形の、且つ、小

量のクロマチンを有する核を持った間質細胞が主体をなし、これらの細胞間に散在する大きな、時に、やや小さな胞体を有し、その中間質細胞のそれに似た核を多数有する多核巨細胞が見られ、核分裂像、異型性は認められない(図27)。第2群では間質細胞は紡錘形の傾向が強核は膨大し、クロマチンはやや多くなり、時々核分裂を示すものがある。巨細胞はやや小さく、核の数が減少し、その形は間質細胞の核によく類似しているが核分裂は認め得ない(図33)。第3群は肉腫に類似し、間質細胞の異型性が強まり、核分裂も多くなり、且つ、巨細胞も異型性を示し、核の数も減少する。

(6) 軟骨腫

Al. P-ase は腫瘍細胞に強い活性を示し、軟骨基質にやや弱い(図42)。

Acid P-ase は腫瘍細胞に強い活性を示す場合、弱い活性を示す場合があり、軟骨基質には弱い活性を示すか、または全く活性を示さない。

PAS 反応は腫瘍細胞の原形質に強く、軟骨基質にやや弱い(図43)。これらの PAS 反応陽性物質は Taka-diastase によりわずかに消化され、Pepsin で中等度消化される。即ち Glycogen 及び糖蛋白と考えられる。

大野氏法 pH 2.5 Toluidine blue 染色では軟骨基質に強く、腫瘍細胞原形質には弱い Meta を示す(図45)。pH 7.0 Toluidine blue 染色でも同様である(図44)。pH 7.0 Toluidine blue 染色で Meta を示したものはヒアルロニダーゼ消化試験で減弱する。即ち Meta 陽性物質はヒアルロン酸と考えられる。

RNA は腫瘍細胞の原形質に弱く一様、且つ、瀰漫性に認められ、核小体 RNA も弱く核に1~2個認められる(図46)。

DNA は腫瘍細胞は核内に認められ、糸状、網状、微細顆粒、やや粗大顆粒状に結節を有する糸状及び網状 DNA が認められ、核膜附着及び核小体附随 DNA 顆粒はやや粗大顆粒状を呈している(図47, 64)。

(7) 骨軟骨腫

骨軟骨腫の組織像は骨端部軟骨組織のそれに類似するが、軟骨細胞の配列は後者ほど明瞭に認められず、非常に不規則な配列を呈す。

Al. P-ase は静止細胞の原形質、核及びその軟骨基質に弱い活性を示すか、または全く示さない。増殖細胞には強い活性を示すが、軟骨基質には微細顆粒状に弱い活性を示す(図48, ↑印)。肥大細胞では増殖細胞と同様に強い活性を示し(図48, ↑印)、変性細胞には減弱する。骨柱の造骨細胞、破骨細胞は活性弱く、骨

細胞原形質に樹枝状または不定型に弱く認められる。

Acid P-ase は静止細胞原形質及び基質に弱く、増殖細胞 (図49, ↑印)、肥大細胞 (図49, ↑印)、及び基質にやや強く活性を示す。変性細胞では弱いか、または全く認められない。骨柱の造骨細胞、破骨細胞、骨細胞には弱く、また、活性の認められないものもある。

PAS 反応は静止細胞の原形質、軟骨基質及び増殖細胞の原形質、軟骨基質にも同様に強い反応を示し、肥大細胞の原形質ではやや減弱し、軟骨基質では変性細胞の軟骨基質と共に強度である (図50, 51)。骨基質に、造骨細胞、骨細胞には弱い、破骨細胞にはやや強い反応を認める。これら **PAS** 反応陽性物質は、**Takadiastase** 消化試験で、軟骨細胞の原形質及び軟骨基質のそれはやや消化されるが、骨基質、骨細胞、造骨細胞、破骨細胞のそれは消化されない。**Pepsin** 消化試験では、軟骨細胞、軟骨基質のそれはかなり強く消化され、また、造骨細胞、破骨細胞、骨細胞、骨基質のそれもよく消化される。

即ち軟骨細胞の原形質、軟骨基質に **Glycogen** と糖蛋白、骨細胞、造骨細胞、破骨細胞、骨基質には糖蛋白が存在していると考えられる。

大野氏法 pH 2.5 **Toluidine blue** 染色では静止細胞の軟骨基質には弱い、増殖細胞、肥大細胞のそれには強い、変性細胞のそれには弱い **Meta** を示し、軟骨細胞の原形質には、ほとんど認められない (図53)。骨細胞、造骨細胞、破骨細胞、骨基質には **Meta** を示さない。

pH 7.0 **Toluidine blue** 染色では静止細胞の軟骨基質には強い **Meta** を示すが、増殖細胞、肥大細胞、変性細胞のそれには減弱が見られる (図52)。軟骨細胞、造骨細胞、破骨細胞、骨細胞、骨基質は **Meta** を呈しない。軟骨基質に認められた **Meta** 陽性物質はヒアルロニダーゼ消化試験で減弱する。

RNA は静止細胞、増殖細胞、肥大細胞の原形質内に一様、且つ、瀰漫性に弱く認められる。核小体 **RNA** は1~2個か、または認められない。造骨細胞では原形質 **RNA** は弱く、核小体 **RNA** は1~2個弱く認められた。破骨細胞の原形質 **RNA** はかなり多量に認められ、核小体 **RNA** は各々の核内に1~2個、時に全く認められないものもある。骨細胞では **RNA** は認め難い。

DNA は静止細胞、増殖細胞、肥大細胞では同様の所見を示し、糸状、網状、微細顆粒、やや粗大な顆粒、及びやや粗大顆粒状の結節を有する糸状、網状 **DNA** が認められ、核小体附随、及び核膜附着 **DNA** 顆粒も

やや粗大である。造骨細胞、破骨細胞、骨細胞もほぼ同様の所見を示したが、骨細胞の **DNA** は弱い **Feulgen** 反応を呈する (図64)。

(8) Fibrous dysplasia

Al. P-ase は線維芽細胞 (図55, ↑印)、新生骨部に見られる造骨細胞 (図55, ↑印)、骨細胞、骨基質に強く、一部破骨細胞にも認められる。

Acid P-ase 活性は破骨細胞に弱く、線維芽細胞、造骨細胞、骨細胞、骨基質には陰性である。

PAS 反応は、線維芽細胞、造骨細胞に弱く、破骨細胞にやや強く、骨細胞、新生骨基質にはほとんど認めない。これらの **PAS** 反応陽性物質は **Takadiastase** の消化に抵抗し、**Pepsin** によりかなり消化される。即ち糖蛋白であるといえる。

大野氏法 pH 2.5, 7.0 **Toluidine blue** 染色では、線維芽細胞、造骨細胞、破骨細胞、骨細胞、骨基質は **Meta** を示さない。

RNA は線維芽細胞の原形質に弱く、一様、瀰漫性であり、造骨細胞では更に弱く、骨細胞には、ほとんど認められない。破骨細胞では原形質 **RNA** はかなり多量に認められる。これらの細胞には核小体 **RNA** は1~2個弱く認められる。

DNA は線維芽細胞の核に、糸状、網状、微細顆粒、やや粗大顆粒、微細顆粒状、やや粗大顆粒状に結節を有する糸状、網状 **DNA** が認められる。核小体附随及び核膜附着 **DNA** 顆粒は比較的小さい (図56, A)。造骨細胞、破骨細胞、骨細胞の **DNA** の態度も同様である (図56, B)。

(9) 転移骨癌

Al. P-ase はほとんど癌細胞に認められないか、或いは活性を見る場合が多い (図57, 58)。例外的に腺癌の細胞に強い活性を認め、原形質のみならず、核にも陽性であった。

間質は毛細血管、線維性組織からなるものが多く、これら間質組織の多くは **Al. P-ase** が強く、活性を有しない癌細胞とは明瞭に区別出来る (図57, 58)。間質組織の **Al. P-ase** 出現の態度と癌細胞の **Al. P-ase** 出現の態度との間には一定の関係は認められない。

Acid P-ase は **Al. P-ase** と同様に癌細胞には全く活性を示さないもの、また弱い活性を示すものが多く、例外的に上述の **Al. P-ase** 活性強度の癌細胞には、**Acid P-ase** も同様に強い活性を認めた。間質の **Acid P-ase** 活性は、認められるもの、認められないものがあつて甚だ不規則な態度を示す。

PAS 反応は癌細胞には認めない場合が多いが、し

ばしば癌細胞の原形質内、及び細胞間に認められ、腺癌では管腔内に強い PAS 反応陽性物質が認められる (図59, ↑印)。これら PAS 反応陽性物質は Takadiastase で消化されず、Pepsin ではよく消化されるものと消化されないものがある。

癌細胞 PAS 反応とは別に間質の線維性組織、血管壁に PAS 反応を認める。

大野氏法 pH 2.5, 7.0 Toluidine blue 染色では、癌細胞、間質組織に Meta は認めない。

核酸については、RNA が癌細胞の原形質内に顆粒状に強く認められ、その原形質内分布は一様である (図60)。PAS 反応陽性物質を分泌しつつある癌細胞の原形質 RNA は特に多量に認められる。核小体 RNA は 1~数個、かなり強く認められた。核分裂の場合、原形質 RNA は変化を示さないもの、原形質内様に増強を示すもの、核の周囲に減弱を示すものが見られ、一方、核小体 RNA は消失している。

DNA は癌細胞核内に認められるものでは、Feulgen 反応の強い粗大顆粒、塊状顆粒、索状、及び、塊状、粗大顆粒状に結節を有する糸状、網状 DNA が認められ (図61, 64)、糸状、網状、微細顆粒は認め難い。核小体附随及び核膜附着 DNA 顆粒は粗大顆粒状、塊状である。

(10) 反応性骨新生

腫瘍組織に反応して、非腫瘍性の骨新生がしばしば観察されるが、本研究では、骨細網肉腫、骨巨細胞腫、転移骨癌において認められたが、新生骨に関する組織化学的態度は腫瘍の種類に関係なく一定しているので一括して述べる。

Al. P-ase は造骨細胞 (図62, ↑印)、破骨細胞 (図62, ↑印) に強く認められ、骨細胞にはやや強く樹枝状または不正形に認められ、骨基質には時にかなり強いこともある (図62)。

Acid P-ase は造骨細胞 (図63, ↑印)、破骨細胞 (図63, ↑印) に強く、骨細胞、骨基質に弱い (図63)。

Al. P-ase は造骨細胞に、Acid P-ase は破骨細胞にのみ認められるということはなかつた。

PAS 反応は造骨細胞原形質にやや強く、破骨細胞のそれに強く認められ、骨細胞原形質には極めて弱いか、または全く認められない。骨基質には PAS 反応は極めて弱いか、時にはやや強く認められる。これら PAS 反応陽性物質は Takadiastase に抵抗し、Pepsin により消化される。糖蛋白であるといえる。

大野氏法 pH 2.5, 7.0 Toluidine blue 染色では、造骨細胞、破骨細胞、骨細胞、骨基質に全く Meta を示さない。

RNA は造骨細胞では原形質 RNA は弱く、骨細胞原形質 RNA はほとんど認められない。破骨細胞原形質 RNA はかなり多量に認められる。核小体 RNA はこれらの細胞に 1~2 個認められる。

DNA は造骨細胞、破骨細胞、骨細胞の核内に認められ、類似の所見を示す。即ち、糸状、網状、微細顆粒、及び、微細顆粒状に結節を有する糸状、網状 DNA が見られる。核小体附随、核膜附着 DNA 顆粒は微細顆粒状を呈している (図64)。

これらの新生骨の組織化学的所見は、それを惹起せしめる腫瘍の組織化学的所見との間に一定した関係を有せず、且つ、新生骨を惹起せしめる腫瘍に共通の組織化学的特異性も認められない。

総括並びに考按

腫瘍の組織化学的研究は従来主として癌腫について行われており、原発性骨腫瘍のそれについての報告は多くを見ない。Gomori (1943)、Changus (1957)、Pepler (1958)、Gilmer (1954)、Schajowicz (1961) らは主として骨腫瘍の P-ase 活性度を検索した。また Schajowicz (1961) は骨巨細胞腫の巨細胞に強い PAS 反応陽性物質があると述べ、また Ewing 肉腫に Glycogen が多量に認められたと報告している。最近、池田 (1962) は、骨巨細胞腫、Fibrous dysplasia、骨嚢腫における巨細胞、単核細胞について核酸の研究を発表している。

著者は骨肉腫、軟骨肉腫、骨細網肉腫、骨髄腫、骨巨細胞腫、軟骨腫、骨軟骨腫、Fibrous dysplasia、転移骨癌につき、P-ase、多糖類、酸性多糖類、核酸の詳細な組織化学的検索を行い、各種腫瘍の代謝型式と、良性腫瘍と悪性腫瘍における代謝型式の変動を追求した。

骨肉腫については、Gomori (1943) は細胞成分に富んだ部は Al. P-ase が強く認められ、類骨、骨組織形成の部では Al. P-ase が弱いと述べ、Schajowicz (1961) は腫瘍細胞に強度の Al. P-ase、Acid P-ase 活性と多量の Glycogen を有しているといい、北川 (1958) は同様に強い Al. P-ase、Acid P-ase を示すが Glycogen は認められないと主張している。

本研究では、骨肉腫の腫瘍細胞において、類骨、骨組織を作らぬ腫瘍細胞では、

- 1) 強い Al. P-ase 活性の出現、
- 2) Acid P-ase 活性出現の不規則性、
- 3) 比較的弱い反応を示す糖蛋白、
- 4) Glycogen の欠除、
- 5) 酸性多糖類の欠除、

6) 多量の RNA,

7) 多量の DNA, が認められ, これが本腫瘍細胞の基本的な代謝型式と考えられる。

類骨組織, 骨組織を形成している腫瘍細胞では

1) Al. P-ase 活性の減弱,

2) 糖蛋白の減弱,

3) RNA の減弱,

4) DNA の減弱, が認められた。

骨肉腫の腫瘍細胞は以上の如き態度を示すが, しばしば観察される腫瘍性巨細胞では, Al. P-ase, Acid P-ase, Glycogen, 酸性多糖類, DNA の態度は腫瘍細胞と類似しており, 糖蛋白, RNA は腫瘍細胞のそれより増強している。

従来, 本腫瘍細胞に Glycogen が存在するという説と, 存在しないという説があるが, 本研究では, 腫瘍細胞, 腫瘍性巨細胞の原形質, 腫瘍性類骨, 骨組織の基質に PAS 反応を認めたが, これらの PAS 反応陽性物質は 1% Takadiastase により消化されないので Glycogen ではないと考えられ, Pepsin により, よく消化されるので糖蛋白であるといえる。

なお, 特記すべき所見は, 腫瘍細胞間の間質に網状, 雲状の PAS 反応陽性物質があり, これが腫瘍細胞の PAS 反応陽性物質と連絡しながら漸次腫瘍性類骨組織の基質へと移行し, その反応は増強する。この PAS 反応陽性物質は糖蛋白であり, 腫瘍細胞が類骨組織形成にあたり, 極めて重要な物質であると考えられる。

軟骨肉腫については, 唯一つ, Schajowicz (1954) の報告に接するが, 彼によれば腫瘍細胞に多量の Glycogen を有し, P-ase は認めないが, 化骨を示す部では, P-ase 活性が認められるようになると述べている。本研究では, 比較的成熟度の高いかなり分化したものと, 未分化なものとを観察し得たが, 後者では極めて Cellular となり軟骨基質はほとんど認められない。これらの軟骨肉腫の組織化学的所見と, 軟骨腫のそれと比較観察し, 且つ, 「軟骨腫・比較的成熟度の高い軟骨肉腫→未分化な軟骨肉腫」の型式において検討すると,

1) Al. P-ase 活性の変動

細胞及び軟骨基質に強い活性→細胞及び軟骨基質に活性の減弱と消失→細胞に活性の消失。

2) Acid P-ase 活性の変動

細胞及び軟骨基質に活性陽性→活性の消失→活性の消失。

3) 糖蛋白の変動

細胞及び軟骨基質に多量→細胞にやや減弱, 軟骨基

質に消失→細胞に更に減弱, 或いは消失。

4) Glycogen の変動

細胞及び軟骨基質に多量→消失→消失。

5) 酸性多糖類の変動

細胞に少量, 軟骨基質に多量→細胞に消失, 軟骨基質に減少→消失。

6) RNA の変動

細胞に少量→細胞に増量→細胞に増量。

7) DNA の変動

細胞核に少量→細胞核に増強→細胞核に増強。

以上の如く軟骨細胞は悪性変化と共に, Al. P-ase, Acid P-ase, 糖蛋白, Glycogen, 酸性多糖類は減弱, 消失し, 一方, 核酸は増強する。Schajowicz は軟骨肉腫に化骨部を検索し, Al. P-ase, Glycogen を証明している。本研究においては化骨部を検索し得なかつたが, 上記の P-ase, 糖蛋白, Glycogen, 酸性多糖類の消失を伴った悪性変化は, 即ち化骨能の消失を物語るものであると考えられる。

骨細網肉腫については, Schajowicz (1959) は腫瘍細胞に Al. P-ase, 及び Glycogen は認められないと報告している。本研究では, Al. P-ase は腫瘍細胞にやや強く認められ, Schajowicz の所見と一致しない。本検索例では反応性骨新生を認めたので, この事実は Schajowicz の所見と矛盾する原因となつてゐることは当然考えられるが, この反応性骨新生の組織化学的所見と, 腫瘍細胞の組織化学的所見は互に無関係に, 独立した態度をとり, 且つ, 互に組織化学的に影響を及ぼさないことにより, 本腫瘍細胞には Al. P-ase は存在すると考えられる。PAS 反応が腫瘍細胞に認められないことは, 即ち, Glycogen, 糖蛋白が存在しないことを示しており, Schajowicz の報告と一致している。更に, Schajowicz によれば, Ewing 肉腫に Glycogen が認められ, 骨細網肉腫に認められないことから, この PAS 反応の出現の有無は両腫瘍の大きな鑑別点となるという。

骨細網肉腫の腫瘍細胞の代謝型式は次の如くに示される。

1) やや強い Al. P-ase 活性の出現,

2) Acid P-ase 活性出現の不規則性,

3) 糖蛋白の欠除,

4) Glycogen の欠除,

5) 酸性多糖類の欠除,

6) 多量の RNA,

7) 多量の DNA,

次に骨髄腫では, Al. P-ase 活性出現の不規則性と弱い Acid P-ase 活性を腫瘍細胞に認めることが出来

た。この所見は Schajowicz の報告と一致する。且つ、腫瘍細胞に PAS 反応、酸性多糖類の欠除、及び、多量の RNA, DNA を有する点から、骨髄腫は骨細網肉腫の代謝型式によく類似した型式を示しているといえる。

骨巨細胞腫については、Gilmer (1954), Pepler (1958), Schajowicz (1961), 北川 (1961), 池田 (1962) らの報告があり、骨腫瘍の組織化学的研究は骨巨細胞腫を中心に行われて来た。Gilmer は Acid P-ase が間質細胞、巨細胞共に認められ、Al. P-ase は両細胞共に認めないと述べ、Pepler は Al. P-ase は間質細胞に、Acid P-ase は巨細胞に認められ、巨細胞は活動性破骨細胞であると述べた。また Schajowicz は Al. P-ase は間質細胞、巨細胞共に認めず、Acid P-ase は巨細胞に認められると述べ、更に、巨細胞、及び稀に間質細胞に PAS 反応が認められるが、この PAS 反応陽性物質は Glycogen ではないと報告している。池田は Al. P-ase は間質細胞に認めることがあり、Acid P-ase は巨細胞、間質細胞共に認めることがありと述べ、更に RNA が巨細胞に多量に認められ、DNA は巨細胞、間質細胞共にほぼ同程度に認められたと報告している。

私は、間質細胞の Al. P-ase 活性と PAS 反応の消長により骨巨細胞腫を 3 群に大別して観察することが出来た。即ち

1) Al. P-ase 活性出現の不規則性と強い PAS 反応を示すもの。

2) 強い Al. P-ase 活性出現と、PAS 反応の減弱を示すもの。

3) 弱い Al. P-ase 活性出現の不規則性と PAS 反応の減弱乃至消失を示すもの。

以上の如く 3 群に大別したが、第 1 群では Al. P-ase は間質細胞、巨細胞に不規則性に出現し、Acid P-ase は間質細胞においては活性出現の不規則性を示し、巨細胞においては一様に強く認められた。PAS 反応は間質細胞、巨細胞に認められたが、巨細胞は間質細胞より強い PAS 反応を示しており、この所見は Schajowicz の報告と一致するが、Schajowicz はこの PAS 反応陽性物質を Takadiastase で消化することが出来なかつたので Glycogen ではないと述べたが、如何なる物質であるかを決定出来なかつた。本研究では、第 1 群のみならず、第 2 群に関しても同様であるが、この PAS 反応陽性物質は Pepsin によつてよく消化された。即ち糖蛋白であることが判明した。

第 1 群の型式は、

1) Al. P-ase 活性出現の不規則性、

2) 間質細胞に Acid P-ase 活性出現の不規則性及び巨細胞に強い活性の出現、

3) 多量の糖蛋白の出現、

4) Glycogen の欠除、

5) 酸性多糖類の欠除、

6) 巨細胞に多量の RNA, 間質細胞に少量の RNA の出現、

7) 比較的少量の DNA の出現、

第 2 群の型式は、

1) 間質細胞に増強した Al. P-ase 活性、巨細胞に弱い Al. P-ase 活性、

2) 間質細胞、巨細胞共に増強した Acid P-ase、

3) 糖蛋白の減弱、

4) Glycogen の欠除、

5) 酸性多糖類の欠除、

6) 巨細胞に多量の RNA, 間質細胞に少量の RNA 及び核小体の出現、

7) やや増強した DNA, 及び間質細胞の核分裂の出現、

第 3 群の型式は、

1) 不規則な弱い Al. P-ase 活性、

2) 不規則な弱い Acid P-ase 活性、

3) 糖蛋白の消失、

4) Glycogen の欠除、

5) 酸性多糖類の欠除、

6) 多量の RNA、

7) 多量の DNA, 及び間質細胞の核分裂の出現、

以上の如くに分類された 3 群は、Lichtenstein の分類によく一致し、第 1 群は、Lichtenstein のいう第 1 度に、第 2 群は第 2 度に、そして、第 3 群は第 3 度に相当した。即ち第 1 群は良性巨細胞腫を、第 3 群は悪性巨細胞腫を示し、第 2 群は悪性巨細胞腫への移行型と考えられる。悪性変化への移行を組織化学的に観察すると、Al. P-ase, Acid P-ase は一度増強の過程を経て減弱し、糖蛋白は減弱の一途を辿り、反対に、RNA, DNA は増強を示しており、Glycogen, 酸性多糖類はこの過程において出現しなかつた。この組織化学的变化は、Al. P-ase の態度を除いては、巨細胞についても同様の変化を認めることが出来た。

従来、巨細胞腫における巨細胞の由来に関して、血管内皮、破骨細胞、骨髄巨細胞、組織球性細胞、及び間質細胞の合胞体、等の多くの説が提唱されて来た。本研究では同一腫瘍における Feulgen 反応の態度が、間質細胞と巨細胞において極めてよく類似しており、且つ、悪性変化の過程においても、この類似性をよく保持していることより、巨細胞の核が間質細胞の核と

同一種類のものであると考えられ、加え、巨細胞の RNA、糖蛋白が間質細胞のそれより多量に認められることより、巨細胞は常に間質細胞の合胞により生まれるのではないかと示唆される。しかし Al. P-ase は巨細胞より間質細胞に、Acid P-ase は間質細胞より巨細胞に活性が強い場合があるが、この所見が上述の合胞説を否定する根拠にはならない。この両細胞の P-ase の強弱は、細胞の種類の異なっていることを示すものでなく細胞の turnover の相違を示しているものであろうと考えられるからである。最近、Schajowicz (1961)、阿部 (1962)、太田 (1962) らにより、骨巨細胞腫の組織培養で巨細胞は単核細胞の合胞により出来ることが認められ、更に阿部、太田は巨細胞は単核細胞より Vitality に乏しく、消失する傾向にあることを報告している。本研究で観察した P-ase の相違はこのような Vitality の相違によるものであろうと考えられる。

骨軟骨腫は組織学的に Enchondral Ossification によく似ており、Schajowicz (1954)、北川 (1958) によれば組織化学的にもよく似ていると述べている。本研究においてもほぼ同様の所見を得たが、軟骨細胞及び軟骨基質に Glycogen の他に、多量の糖蛋白を認めることが出来た。また、静止細胞、増殖細胞、肥大細胞に少量の RNA 及び DNA を一様に認め、各細胞が増殖性に乏しいことを示していると考えられる。

Fibrous dysplasia では Al. P-ase が所謂“線維芽細胞”及び新生骨をとりまく造骨細胞及び骨細胞、骨基質に強く認められ、Acid P-ase は破骨細胞に弱く認められた。この P-ase の所見は Changus (1957) の報告に一致する。Schlumberg (1946) は線維性結合組織の直接化生によつて新生骨を形成すると述べたが、Changus は所謂“線維芽細胞”に造骨細胞と同様に、Al. P-ase 活性が強いことより、これを組織化学的造骨細胞と呼び、両細胞が同一種類の細胞であろうと考えた。本研究でも線維性結合組織細胞は、造骨細胞と同様に Al. P-ase 活性を認めたが、Fibrous dysplasia のみならず、転移骨癌の間質において、骨新生を伴わない線維性結合組織にも強い Al. P-ase を認めることが出来た。骨組織のみならず、軟部組織においても、若い結合組織は P-ase を有しているということは一般に認められている。Changus は Al. P-ase を有する線維芽細胞を組織化学的造骨細胞、Al. P-ase を有しない線維芽細胞を組織化学的線維芽細胞と述べているが、私は上述の理由により Al. P-ase の有無によつて細胞を分類することは不可能であろうと考える。むしろ、同一細胞の turnover の相違が Al. P-ase の有無

となつて現われるものとするのが妥当と思われる。

線維芽細胞、造骨細胞には RNA、DNA は弱く認められ、糖蛋白反応も弱く、高い増殖能を示さないと考えられる。

癌腫の組織化学的研究は多くの人々によつてなされ、癌細胞の代謝異常を特徴的に表示している。即ち、Al. P-ase、Acid P-ase 活性の減少、Glycogen の減少、及び RNA、DNA の増量が癌細胞の代謝型式の一般型として認められて来た。更に、高瀬 (1955) は胃癌の生化学的分類に際して、この一般型に合致しない異型のを 4 型に分類した。即ち、Cytol 物質 (Mucoprotein) 増加型、P-ase 増加型、RNA、DNA 異常増加型、Trypsin、Tryptophan 非減少型である。

転移骨癌に関する組織化学的研究に関しては、Schajowicz (1954) は Al. P-ase が反応性骨新生の部にのみ出現すると述べ、北川 (1961) は Acid P-ase、Al. P-ase は癌細胞に出現せず、間質組織に出現すると述べた。

本研究では Al. P-ase、Acid P-ase は癌細胞に弱い活性を示すか、または全く活性を示さないのが一般的であるが、Al. P-ase、Acid P-ase 共、かなり強く活性を示したものが例外的に認められた。

PAS 反応は癌細胞に認められないものが多いが、しばしば、細胞の胞体内、細胞間、そして腺癌では管腔内に認められるものもあつた。これらの PAS 反応陽性物質は Glycogen ではなく、主として糖蛋白であつたが、中には Pepsin に消化されないものも認められた。これは多糖類産生能を有する癌細胞として理解される。

RNA、DNA は癌細胞に多量認められ、特に多糖類産生能を有する癌細胞には RNA の異常な増強が認められた。一般に癌細胞に認められる RNA は骨原発悪性腫瘍に見られるそれより多量に存在しているようである。

以上の如く、本研究で観察し得た骨癌の代謝型式は、一般型として、

- 1) 弱い Al. P-ase、或いはその欠除、
- 2) 弱い Acid P-ase、或いはその欠除、
- 3) 糖蛋白の欠除、
- 4) Glycogen の欠除、
- 5) 酸性多糖類の欠除、
- 6) 多量の RNA
- 7) 多量の DNA

以上の如き態度を示し、特殊型として次の 2 型を分類する。即ち、

- 1) P-ase 増強型

2) 多糖類出現及び RNA 異常増加型

骨癌に認められた一般型は、従来研究されて来た癌腫の一般型と全く同様であり、これは即ち、転移骨癌は原発巣の癌腫の組織化学的態度を維持するものと考えられ、従つて骨転移性癌腫もその代謝型式を変えないと結論することが出来る。

反応性骨新生は転移骨癌、骨巨細胞腫、骨細網肉腫に認められたが、骨新生を起すべき腫瘍に、共通した組織化学的特異性は認められなかつた。しかし新生骨の組織化学的特徴はいかなる腫瘍に発生しても、一定した態度を示すことが判明した。

以上、検索し得た各腫瘍につきその代謝型式につき論じたが、良性腫瘍と悪性腫瘍とを比較すると、PAS 反応陽性物質と RNA, DNA の態度は非常に重要と思われる。

Glycogen については、検索し得た悪性腫瘍には全く認められず、また軟骨腫に認められて軟骨肉腫に陰性の所見は極めて重要で、悪性化と共に解糖作用が亢進していることを示していると考えられ、代謝異常の一種を示していると思われる。Glycogen のみならず、糖蛋白も同様の所見を示した。

RNA に関しては、悪性腫瘍は良性腫瘍に比して増強を示し、特に「軟骨腫→軟骨肉腫」、「骨巨細胞腫第 1 群→第 3 群」の変化における RNA の増強は典型的と思われる。

DNA に関しても同様に悪性腫瘍は良性腫瘍に比して増強を示し、良性腫瘍では Feulgen 反応の弱い、糸状、網状 DNA、微細 DNA 顆粒、微細顆粒状に結節を有する糸状、網状 DNA が主として認められるに反して、悪性腫瘍では、Feulgen 反応の強い、粗大 DNA 顆粒、塊状 DNA 顆粒、索状 DNA、及び粗大顆粒状、塊状に結節を有する糸状、網状 DNA が主として認められる。また核膜附着 DNA 顆粒は前者では微細顆粒状であるに反し、後者は粗大、塊状となり、また、核小体附随 DNA 顆粒は前者では微細顆粒状を示し、後者では核小体 (RNA) 数増加の細胞出現し、従つて塊状、粗大顆粒状の核小体附随 DNA も増加している。この核膜附着及び核小体附随 DNA 顆粒は Caspersson に従い heterochromatin と推定される。

Caspersson (1936) によれば、悪性腫瘍発生は、細胞内蛋白合成機構の中核である heterochromatin の突然変異的機能異常により生ずると述べ、Sandritter (1952) は Euchromatin と heterochromatin に別々の調節機構があつて、この失調により癌腫に RNA, DNA の減少或いは増強を見ると述べている。

Caspersson によれば①急激に増加しつつある細胞、

②蛋白質を分泌する細胞、③細胞中に蛋白質を蓄積しつつある細胞、には RNA が多量に存在すると述べ、柴谷もこれを認めており、青木 (1951)、杉本 (1951)、河原 (1956) らは癌細胞に RNA が多量に存在することを認めた。

DNA に関しては、Bader (1952)、Leuchtenberg (1958)、Atkins (1956) らは癌細胞に、染色体数と関連してその増強を認めたと述べている。

Sandritter は癌腫に RNA, DNA が必ずしも増強しないことを観察し、核酸の増強は腫瘍の悪性度の判定にはならないと述べた。

骨腫瘍における核酸についての報告は、骨巨細胞腫の巨細胞に RNA が多いという池田 (1962) の研究以外には認められず、従つて、骨悪性腫瘍の核酸の態度は未だ論じられていない。しかし本研究では骨悪性腫瘍に、他の悪性腫瘍と同様に、RNA、及び DNA の増強していることを知ることが出来た。

結 語

金沢大学医学部整形外科及び関係病院を訪れた症例から採取した骨腫瘍につき組織化学的研究を行つてはば次の如き結果を得た。

1) 骨肉腫の腫瘍細胞には強い Al. P-ase, 不規則な出現を示す Acid P-ase, 少量の糖蛋白, 多量の RNA, DNA, 及び, Glycogen, 酸性多糖類の欠除とが、基本的代謝型式と認められる。類骨組織形成の腫瘍細胞では Al. P-ase, 糖蛋白, RNA, DNA の減弱が認められ、これは細胞代謝の変動として理解される。

2) 軟骨肉腫では、軟骨腫との関連において観察されたが、軟骨腫の細胞に認められた Al. P-ase, Acid P-ase, 糖蛋白, Glycogen, 酸性多糖類は、軟骨肉腫の細胞には減弱、消失を示し、反対に RNA, DNA は極めて増強する。この組織化学的变化は、悪性変化に伴う代謝型式の変動を極めてよく表示しているものと思われる。

3) 骨細網肉腫と骨髄腫は組織化学的によく類似しており、Al. P-ase, Acid P-ase の出現、糖蛋白, Glycogen, 酸性多糖類の欠除、多量の RNA, DNA が認められた。

4) 骨巨細胞腫は Al. P-ase の変動と PAS 反応の消長により 3 群に大別して観察され、且つ、この分類は Lichtenstein の分類によく一致していた。良性巨細胞腫から悪性巨細胞腫への悪性変化を組織化学的に観察すると、Al. P-ase, Acid P-ase は一度増強の過程を経て減弱し、糖蛋白は減弱の一途を辿り、反対に RNA 及び DNA は増強を続け、Glycogen, 酸性多糖

類はこの過程には出現しなかつた。巨細胞も Al. P-ase の変動を除いては、これと同様の变化を示している。

5) 骨軟骨腫は組織化学的にも Enchondral ossification のそれに類似しているが、軟骨細胞及び軟骨基質に、Glycogen と共に糖蛋白を有しており、且つ、軟骨細胞には少量の RNA, DNA を有することが判明した。

6) Fibrous dysplasia では線維芽細胞、造骨細胞に同様に Al. P-ase を認めたが、Al. P-ase は細胞の turnover の表現と考え、細胞の種類の鑑別には役立たないことを論じた。

7) 転移骨癌では、弱い Al. P-ase, Acid P-ase またはその欠除、糖蛋白、Glycogen、酸性多糖類の欠除、多量の RNA, DNA が一般型式として認められ、これは従来、研究されて来た癌腫のそれに一致しており、転移骨癌は原発巣の癌腫の組織化学的態度を維持するものと考えられる。

8) 反応性骨新生は種々の骨腫瘍に見られるが、腫瘍の組織化学的所見とは独立した一定の組織化学的態度を示す。

9) 悪性骨腫瘍で、Glycogen の欠除、糖蛋白の減弱乃至欠除、RNA, DNA の増強は重要な所見である。

終りに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲の労を賜りました恩師高瀬武平教授、御指導下さいました本学石川病理学教室倉田助教、本学附属病院中央検査部松原講師、御協力下さいました本学整形外科教室重信、井村学兄、並びに骨腫瘍の提供をいただきました各病院に深甚なる謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) 阿部光俊 : 日整会誌, 36, 125 (1960).
- 2) 青木卓章・大根田玄寿・望月 昇・片山憲二 : 癌, 43, 65 (1952).
- 3) 青木 徹・村上育郎 : 岡山医誌, 63, 別巻, 39 (1951).
- 4) Atkins, N. B., Richard, B. M. : Brit. J. Cancer, 10, 769 (1956).
- 5) Bräder, S. : Proc. Soc. Exp. Biol., 82, 312 (1952).
- 6) Bourne, G. H. : The Biochemistry and Physiology of Bone. Academic Press Inc., New York (1956).
- 7) Caspersson, T. : Skandinav. Arch. Physiol., 73, Supplement. 8 (1936).
- 8) Changus, G. W. : Cancer, 10, 1157 (1957).
- 9) Duthie, R. B., Baker, A. N. : J. Bone & Joint Surg., 37-B, 304 (1955).
- 10) 江上不二夫 : 核酸及び核蛋白, 上巻及び下巻, 共立出版株式会社, 東京, (1953).
- 11) Feulgen, R., Rossenbeck, H. : Zsch. f. Physiol. Chem., 135, 203 (1924).
- 12) Folis, R., Berthrong, M. : Bull. Johns Hopkins Hosp. 85, 281 (1946).
- 13) Geschickter, C. F. & Copeland, M. M. : Tumors of Bone, Philadelphia, J. B. Lippincott (1949).
- 14) Gilmer, W. S. : J. Bone & Joint Surg., 36-A, 182 (1954).
- 15) Gomori, G. : Am. J. Path., 19, 197 (1943).
- 16) Henrichsen, E. : Acta Orthop. Scand., 27, 173 (1958).
- 17) Hori, M., Takayama, S., Matsumoto, T., Makino, S. : Gann, 49, 319 (1958).
- 18) Hulth, A., Westertorn, O. : Acta Orthop. Scand., 30, 155 (1960).
- 19) 市川 収 : 細胞化学, 日本教学出版株式会社, 東京 (1957).
- 20) 井川幸雄 : 日本臨床, 15, 2065 (1957).
- 21) 池田亀夫 : 整外外科, 13, 765 (1962).
- 22) 井村慎一 : 十全医会誌, 68, 276 (1962).
- 23) 石臥紀久 : 熊本医誌, 29, 補冊 4, 572 (1955).
- 24) Jaffe, H. L. : Tumors and Tumorous Conditions of the Bones and Joints. Philadelphia, Lea & Febiger (1958).
- 25) 河原修三 : 医学研究, 26, 1828 (1956).
- 26) 北川敏夫 : 日整会誌, 32, 740 (1958).
- 27) 北川敏夫 : 日整会誌, 33, 28 (1959).
- 28) 北川敏夫・大宮和郎・中尾武久・西 一徳 : 整外外科, 12, 650 (1961).
- 29) 小島吉雄 : 日本臨床, 12, 2295 (1961).
- 30) Kroon, D. B. : Acta Anat., 21, 1 (1954).
- 31) Lettré, R., Siebs, W. : Z. Krebsforsch., 60, 19 (1954).
- 32) Lettré, R., Siebs, W. : Z. Krebsforsch., 60, 564 (1955).
- 33) Lichtenstein, L. : Bone Tumors, C. V. Mosby, St. Louis (1959).
- 34) Lison, L. (今泉正訳) : 組織化学および細胞化学, 白水社, 東京 (1945).
- 35) 宮地 徹 : 臨床組織病理学, 杏林書院, 東京 (1956).
- 36) 西村邦夫 : 医学研究, 26, 580 (1956).
- 37) 西崎太計志 : 岡山医誌, 63, 別巻, 150 (1951).
- 38) 大橋市郎 : 十全医会誌, 64, 44 (1960).
- 39) 岡本耕造・上田政雄・前田隆英 : 顕微鏡の組織化学, 医学書院, 東京・大阪, (1958).
- 40) 岡本 順 : 日本組織学記録, 6, 131 (1954).
- 41) 大野 乾・野附 巖・井川忠和 : 医学と生物学, 19, 326 (1951).
- 42) 太田丞一 : 日整会誌, 36, 521 (1962).
- 43) Pepler, W. P. : J. Path. Bact., 76, 505 (1958).
- 44)

- Sandritter, W. : Frankf. Z. Path., 63, 423 (1952). 45) Schajowicz, F., Cabraini, R. L. : J. Bone & Joint Surg., 36-B, 474 (1954). 46) Schajowicz, F., Cabraini, R. L. : J. Bone & Joint Surg., 40-A, 1081 (1958). 47) Schajowicz, F. : J. Bone & Joint Surg., 41-A, 349 (1959). 48) Schajowicz, F. : J. Bone & Joint Surg., 43-A, 1 (1961). 49) 重信弥八 : 十全医会誌, 60, 1683 (1958). 50) Sladden, R. A. : J. Bone & Joint Surg., 39-B, 346 (1957). 51) Stein, I., Stein, R. O. & Beller, M. L. : Living Bone in Health and Disease. J. B. Lippincott Co., Philadelphia and Montreal (1955). 52) 外村 晶 : 日本臨床, 12, 2285 (1961). 53) 杉本顕俊・土井甲子郎・平山雅生・石黒佐喜男 : 癌, 43, 221 (1952). 54) Sugimoto, A., Shimasaki, M., Yoshinaga, M. : Gann, 42, 285 (1951). 55) 高松英雄・赤星義彦 : 日外宝函, 26, 301 (1957). 56) 高嶺三郎 : 癌, 45, 242 (1954). 57) 高瀬武平 : 癌の臨床, 1, 378 (1955). 58) 高瀬武平 : 臨床外科, 9, 581 (1954). 59) 武内忠男・田上正男 : 癌, 42, 217 (1951). 60) 武内忠男 : 癌, 48, 593 (1957). 61) Thomas, W. C. : J. Bone & Joint Surg., 43-A, 419 (1961). 62) 富田耕二 : 熊本医誌, 29, 補冊 6, 1300 (1955). 63) 堤 郁郎 : 熊本医誌, 29, 補冊 4, 675 (1955). 64) Walf, A., Kabat, E. A., Newman, W. : Am. J. Path., 19, 423 (1943). 65) 安田竜夫・杉本顕俊 : 癌, 43, 225 (1952). 66) 安田常男 : 癌, 43, 225 (1952).

Abstract

Human bone tumors are studied histochemically and the following conclusions are obtained.

1) In osteogenic sarcoma, the tumor cell shows an intensive alkaline phosphatase activity, an irregular appearance of acid phosphatase activity, a small quantity of glycoprotein and is rich in RNA and DNA, while in the cell, concerned with osteoid formation, alkaline phosphatase activity, glycoprotein and nucleic acid are all alike poor. Intercellularly, increased PAS positive substance is demonstrated in the tumorous osteoid matrix.

2) Alkaline phosphatase and acid phosphatase activities, glycogen, glycoprotein and acid mucopolysaccharides decrease or disappear in chondrosarcoma. On the contrary nucleic acid increases in chondrosarcoma.

3) Reticulum cell sarcoma is histochemically similar to myeloma, that is, alkaline and acid phosphatase activities and abundant nucleic acid are demonstrable in these two tumor cells.

4) Giant cell tumors of bone are histochemically divided into 3 groups. In the stroma cell, according to the malignant tendency of tumor, alkaline and acid phosphatase activities increase temporarily, and together with glycoprotein decrease, while nucleic acid has a tendency of increase.

5) Osteochondroma is, histologically and histochemically, similar to enchondral ossification. Cartilage cell and matrix have not only glycogen but relatively abundant glycoprotein. In this cell a small quantity of nucleic acid is observed.

6) In fibrous dysplasia, alkaline phosphatase is demonstrated in osteoblast and fibroblast. It is thought that the grade of alkaline phosphatase activity is a type of the turnover of the cell, accordingly it is not utilizable in differentiation of the cell-characters.

7) Weak, or frequently no alkaline and acid phosphatase activities, an absence of glycoprotein, glycoprotein and acid mucopolysaccharides, and abundant nucleic acid are characteristics in metastatic cancer, and it is thought that histochemical property in primary cancer is introduced into metastatic bone cancer.

8) Reactive new bone formation is observed in several bone tumors, primary or metastatic, and has no relation to the histochemical properties of tumors.

9) In malignant bone tumors it is important that the tumor cell has an absence of glycogen, a small quantity of glycoprotein and abundant nucleic acid.

附 図 説 明

- 図1 骨肉腫, Al. P-ase 染色, ×400
腫瘍細胞, 腫瘍性巨細胞(↑)に強陽.
- 図2 骨肉腫, Al. P-ase 染色, ×200
腫瘍性類骨組織の基質に陽性, 腫瘍細胞にはやや減弱している.
- 図3 骨肉腫, Al. P-ase 染色, ×400
腫瘍細胞に強陽性, 腫瘍性類骨組織の基質に弱陽性.
- 図4 骨肉腫, Acid P-ase 染色, ×400
腫瘍細胞に弱陽性, 腫瘍性類骨組織の基質に強陽性.
- 図5 骨肉腫, Acid P-ase 染色, ×200
腫瘍細胞, 腫瘍性巨細胞(↑)に陽性.
- 図6 骨肉腫, PAS 反応, ×200
腫瘍細胞に弱, 腫瘍性巨細胞(↑)に強陽性.
- 図7 骨肉腫, PAS 反応, ×200
腫瘍性類骨組織の基質に強, 腫瘍細胞に弱陽性, 腫瘍細胞間 PAS 反応陽性物質(↑).
- 図8 骨肉腫, PAS 反応, ×100
腫瘍細胞に弱, 腫瘍性類骨組織の基質に強陽性, 腫瘍細胞間 PAS 反応陽性物質(↑).
- 図9 骨肉腫, PAS 反応, ×200
腫瘍細胞に弱, 腫瘍性類骨組織の基質に強陽性, 腫瘍細胞間 PAS 反応陽性物質(↑).
- 図10 骨肉腫, Methylgreen Pyronin 染色, ×400
- 図11 骨肉腫, Methylgreen Pyronin 染色, ×400
腫瘍細胞成分に富む部(A), 腫瘍性類骨組織形成の部(B).
- 図12 骨肉腫, Feulgen 反応, ×400
腫瘍細胞成分に富む部.
- 図13 骨肉腫, Feulgen 反応, ×400
腫瘍性類骨組織形成の部.
- 図14 軟骨肉腫, Al.P-ase 染色, ×300
腫瘍細胞に陽性, 基質に弱陽性の部(↑)あり.
(比較的成熟度の高い軟骨肉腫)
- 図15 軟骨肉腫, PAS 反応, ×150
腫瘍細胞に弱陽性.(比較的成熟度の高い軟骨肉腫)
- 図16 軟骨肉腫, pH 7.0 Toluidine blue 染色, ×150, 腫瘍細胞に Meta 陰性, 基質に陽性. 基質に小空胞の Meta 陰性の部が無数に認められる.(比較的成熟度の高い軟骨肉腫)
- 図17 軟骨肉腫, Methylgreen Pyronin 染色, ×400, 未分化な軟骨肉腫.
- 図18 軟骨肉腫, Feulgen 反応, ×200

未分化な軟骨肉腫.

図19 軟骨肉腫, Feulgen 反応, ×400

未分化な軟骨肉腫.

図20 骨細網肉腫, Al. P-ase 染色, ×200

腫瘍細胞に陽性.

図21 骨細網肉腫, Methylgreen Pyronin 染色, ×

400

図22 骨細網肉腫, Feulgen 反応, ×400

図23 骨髄腫, Al. P-ase 染色, ×400

腫瘍細胞に弱陽性.

図24 骨髄腫, Acid P-ase 染色, ×400

腫瘍細胞に弱陽性.

図25 骨髄腫, Methylgreen Pyronin 染色, ×400

図26 骨髄腫, Feulgen 反応, ×200

図27 骨巨細胞腫, H-E 染色, ×200

第1群の骨巨細胞腫を示す.

図28 骨巨細胞腫, Al. P-ase 染色, ×200

第1群. 間質細胞, 巨細胞に陽性の部.

図29 骨巨細胞腫, Acid P-ase 染色, ×100

第1群. 間質細胞に弱, 巨細胞に強陽性.

図30 骨巨細胞腫, PAS 反応, ×100

第1群. 間質細胞に比較的強く, 巨細胞に強陽性.

図31 骨巨細胞腫, Methylgreen Pyronin 染色, ×100, 第1群.

図32 骨巨細胞腫, Feulgen 反応, ×200, 第1群.

図33 骨巨細胞腫, H-E 染色, ×200

第2群の骨巨細胞腫を示す.

図34 骨巨細胞腫, Al. P-ase 染色, ×200

第2群. 間質細胞に強陽性.

図35 骨巨細胞腫, Al. P-ase 染色, ×400

第2群. 巨細胞に弱陽性を示す.

図36 骨巨細胞腫, Acid P-ase 染色, ×200

第2群. 間質細胞に陽性, 巨細胞に強陽性.

図37 骨巨細胞腫, PAS 反応, ×200

第2群. 間質細胞, 巨細胞共反応弱い. 巨細胞の原形質は Haematoxylin の後染色で basophile を呈す.

図38 骨巨細胞腫, Methylgreen Pyronin 染色, ×400, 第2群.

図39 骨巨細胞腫, Feulgen 反応, ×200

第2群.

図40 骨巨細胞腫, Methylgreen Pyronin 染色, ×200, 第3群骨巨細胞腫.

図41 骨巨細胞腫, Feulgen 反応, ×400

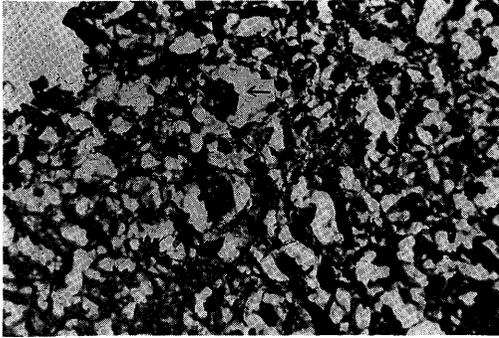
第3群.

図42 軟骨腫, Al. P-ase 染色, ×200

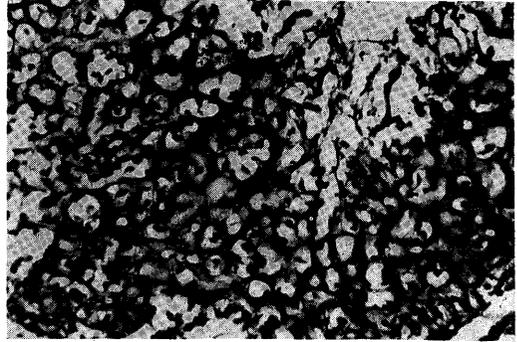
細胞及び基質に陽性.

- 図43 軟骨腫, PAS 反応, $\times 400$
腫瘍細胞に強陽性, 基質に弱陽性.
- 図44 軟骨腫, pH 7.0 Toluidine blue 染色, $\times 200$
基質に強い Meta を示す.
- 図45 軟骨腫, pH 2.5 Toluidine blue 染色, $\times 200$, 基質に強い Meta を示す.
- 図46 軟骨腫, Methylgreen Pyronin 染色, $\times 400$
- 図47 軟骨腫, Feulgen 反応, $\times 400$
- 図48 骨軟骨腫, Al. P-ase 染色, $\times 100$
増殖細胞 (\uparrow), 肥大細胞 (\uparrow) に陽性, 基質では細胞群から離れると減弱する.
- 図49 骨軟骨腫, Acid P-ase 染色, $\times 200$
増殖細胞 (\uparrow), 肥大細胞 (\uparrow) に陽性, 基質にも同様に陽性.
- 図50 骨軟骨腫, PAS 反応, $\times 40$
基質に反応強し.
- 図51 骨軟骨腫, PAS 反応, $\times 40$
基質に反応強く, 肥大細胞の原形質では反応減弱す.
- 図52 骨軟骨腫, pH 7.0 Toluidine blue 染色, $\times 40$, 基質にのみ Meta を呈す.
- 図53 骨軟骨腫, pH 2.5 Toluidine blue 染色, $\times 40$, 基質にのみ Meta を呈す.
- 図54 Fibrous dysplasia, H-E 染色, $\times 100$
- 図55 Fibrous dysplasia, Al. P-ase 染色, $\times 100$,
線維芽細胞 (\uparrow), 造骨細胞 (\uparrow), 骨細胞, 骨基質に陽性.
- 図56 Fibrous dysplasia, Feulgen 反応, $\times 200$
線維芽細胞の部 (A), 新生骨の部 (B).
- 図57 転移骨癌, Al. P-ase, $\times 75$,
間質組織に強陽性, 癌細胞に弱陽性,
- 図58 転移骨癌, Al. P-ase 染色, $\times 200$
癌細胞に弱陽性 (\uparrow).
- 図59 転移骨癌, PAS 反応, $\times 200$
PAS 反応陽性物質の産生 (\uparrow) を示す.
- 図60 転移骨癌, Methylgreen Pyronin 染色, $\times 200$
- 図61 転移骨癌, Feulgen 反応, $\times 200$
- 図62 反応性骨新生, Al. P-ase 染色, $\times 200$
造骨細胞 (\uparrow), 破骨細胞 (\uparrow), 骨基質にも陽性.
- 図63 反応性骨新生, Acid P-ase 染色, $\times 200$
造骨細胞 (\uparrow), 破骨細胞 (\uparrow), 骨基質にも陽性.
- 図64 Feulgen 反応により表現された DNA の種々の形態を示す.
(図附は描画器による. $\times 1500$)
1, 2 は糸状, 網状 DNA.
3, 4 は微細 DNA 顆粒.
5, 6, 15, 16 は索状 DNA.
7, 8, 9, 10 は粗大 DNA 顆粒.
11, 12, 17, 19, 20, 21 は塊状 DNA 顆粒.
14, 18 は粗大顆粒状に結節を有する糸状, 網状 DNA.
13 は塊状に結節を有する糸状 DNA.
核小体附随 DNA 顆粒は, 1, (\uparrow).
核膜附着 DNA 顆粒は, 1, (\uparrow).

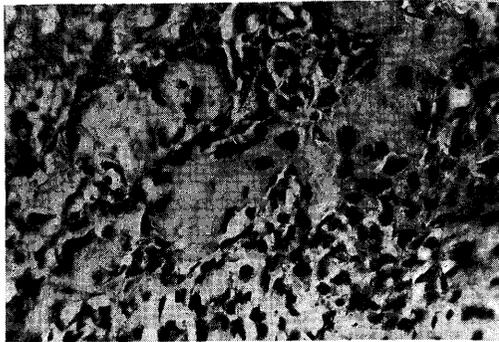
☒ 1



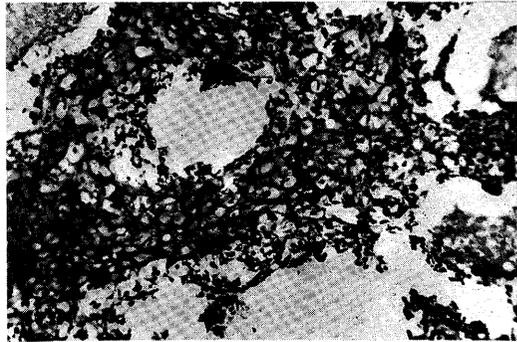
☒ 2



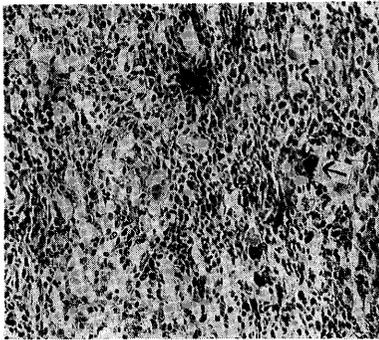
☒ 3



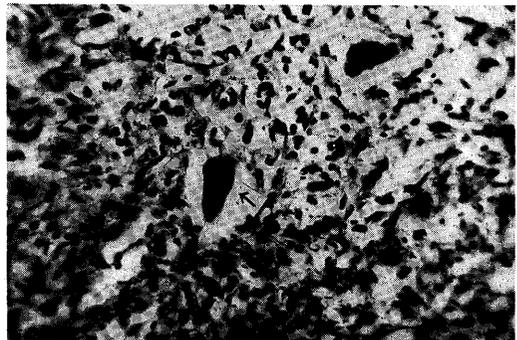
☒ 4



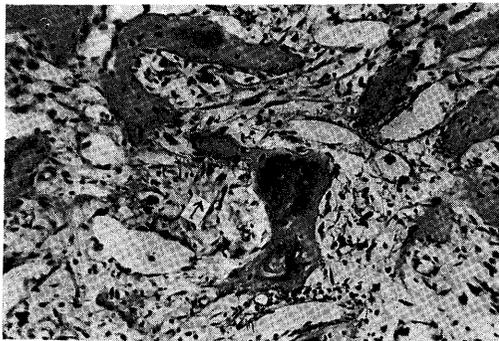
☒ 5



☒ 6



☒ 7



☒ 8

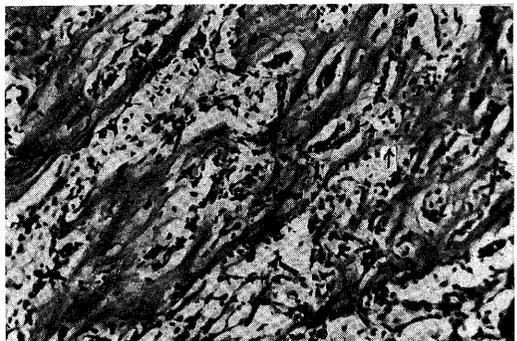


図 9

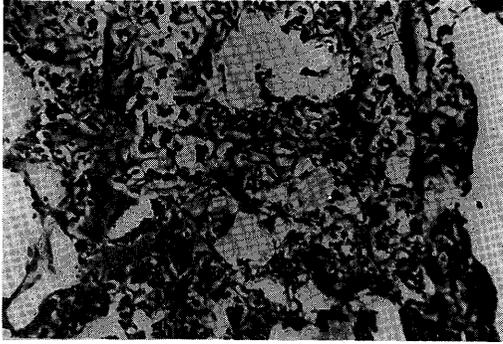


図 10

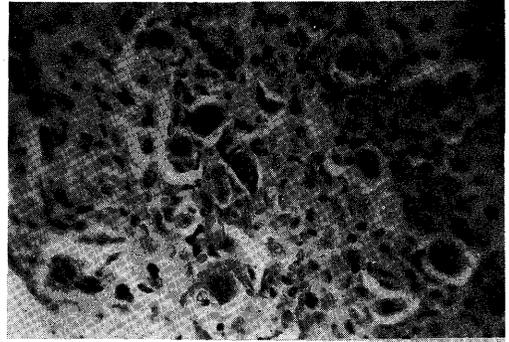


図 11

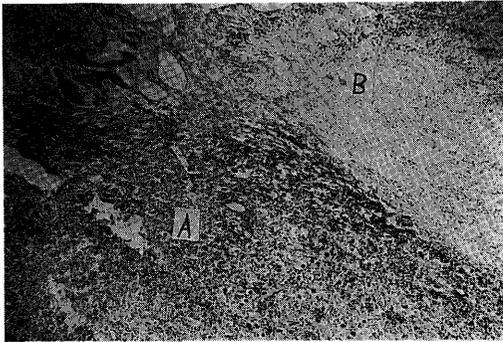


図 12

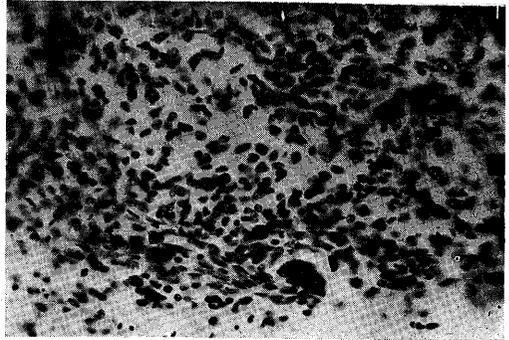


図 13

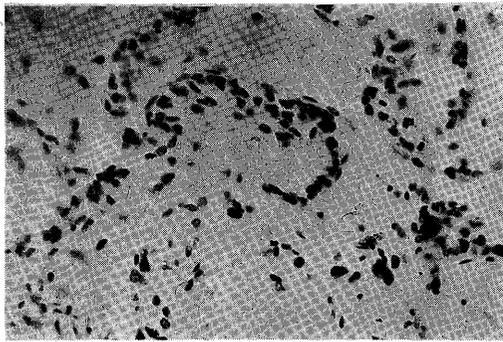


図 14

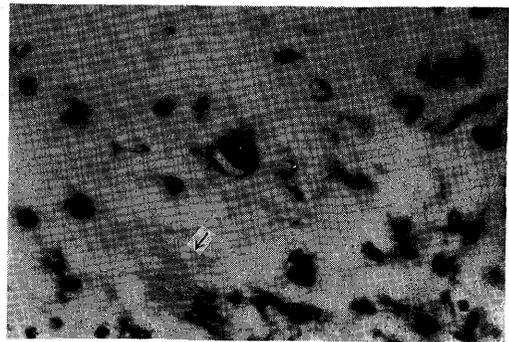


図 15

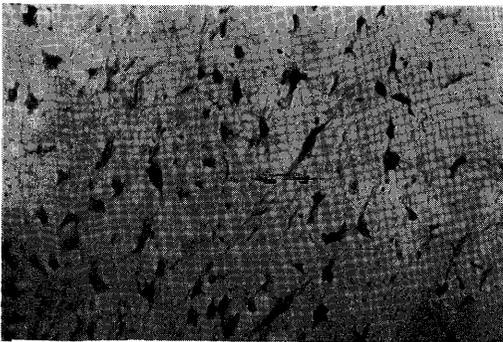
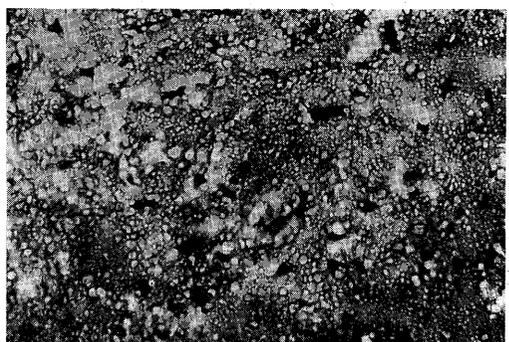
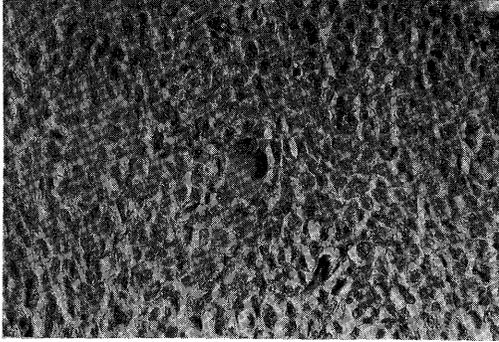


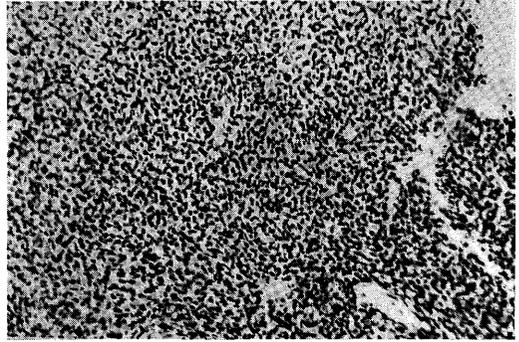
図 16



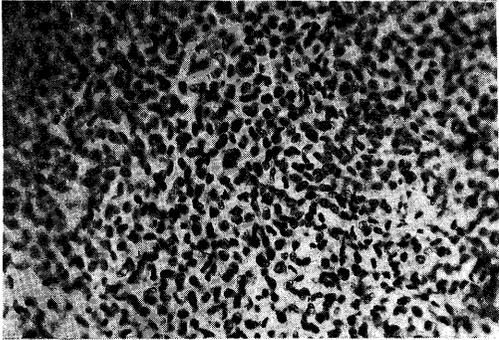
☒ 17



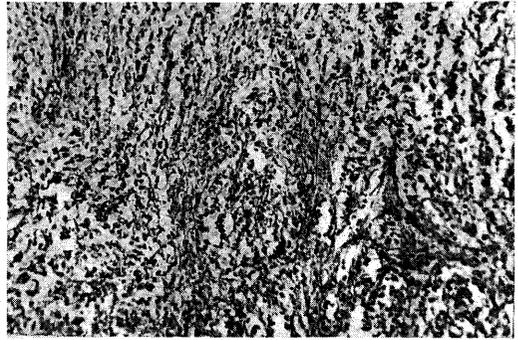
☒ 18



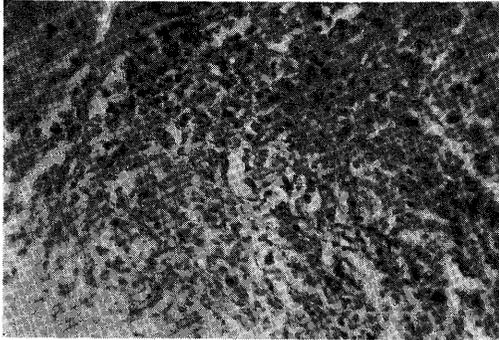
☒ 19



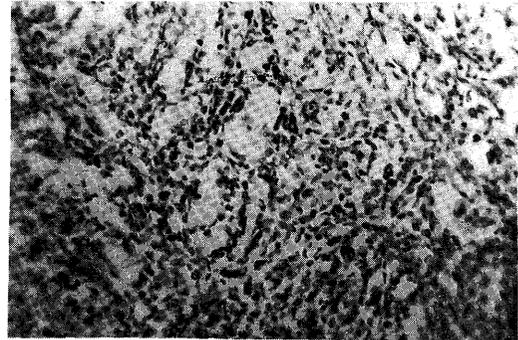
☒ 20



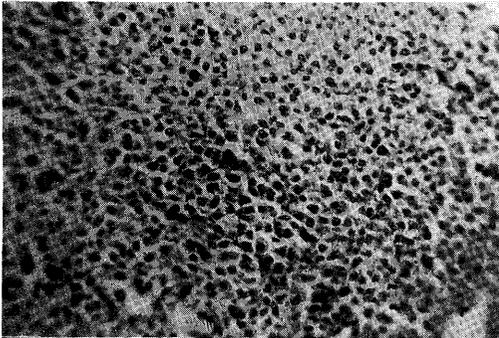
☒ 21



☒ 22



☒ 23



☒ 24

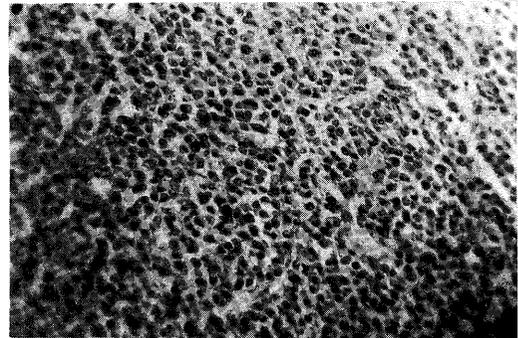


図 25

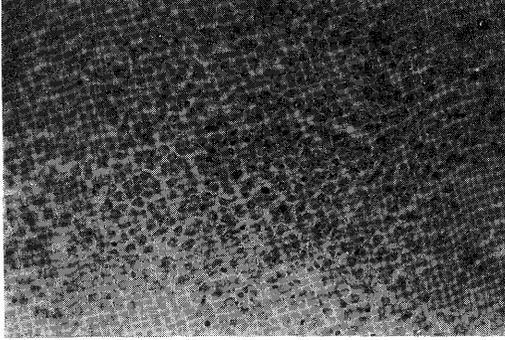


図 26

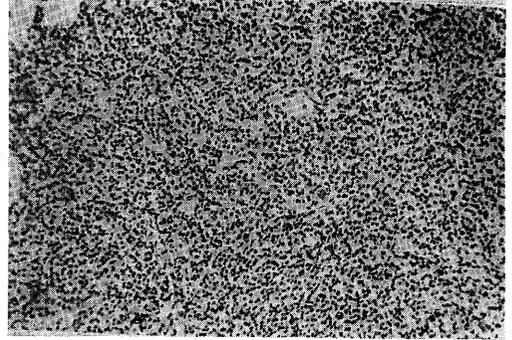


図 27

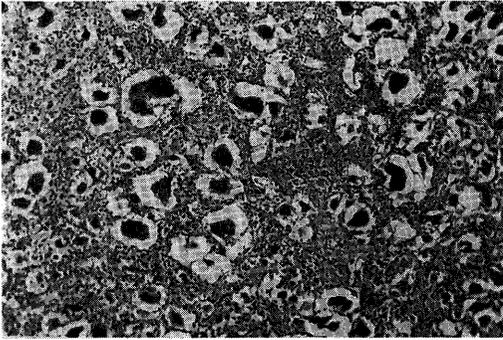


図 28

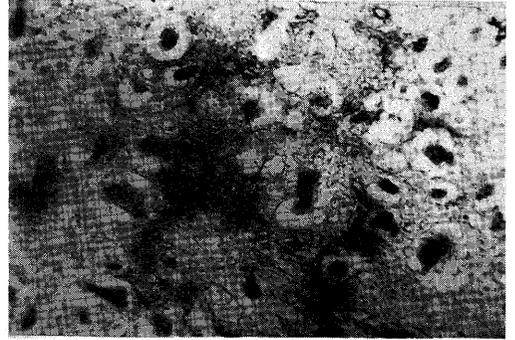


図 29

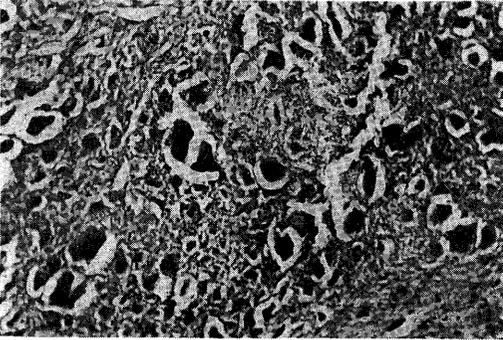


図 30

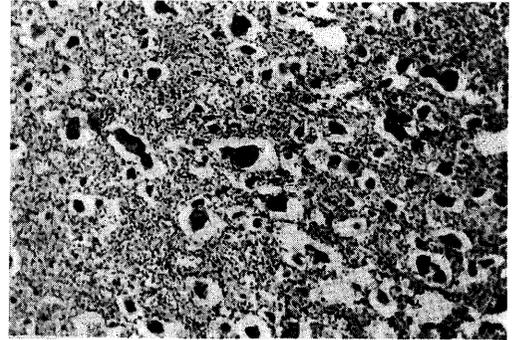


図 31

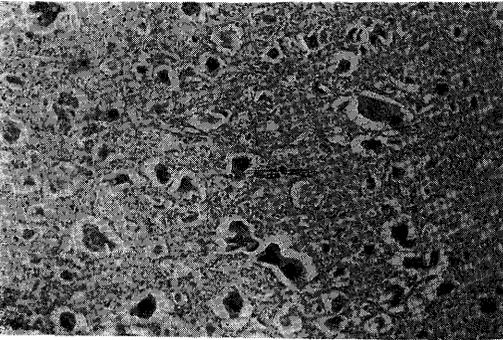
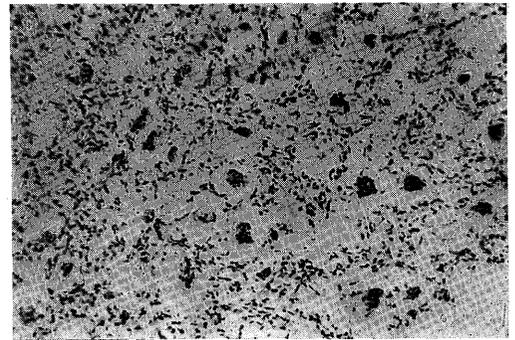
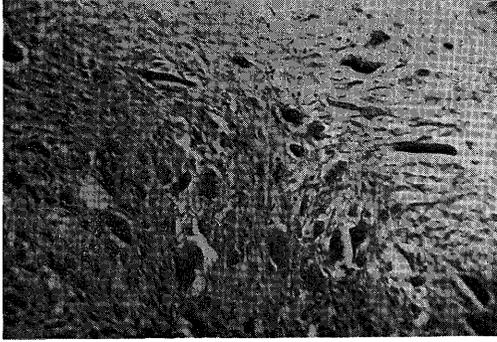


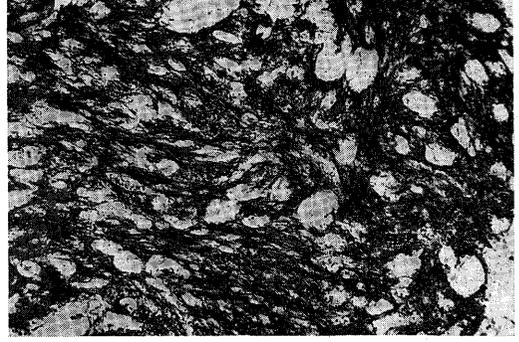
図 32



☒ 33



☒ 34



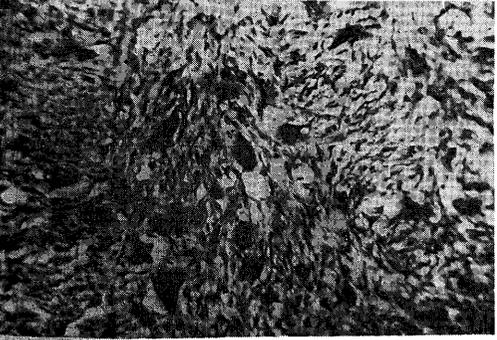
☒ 35



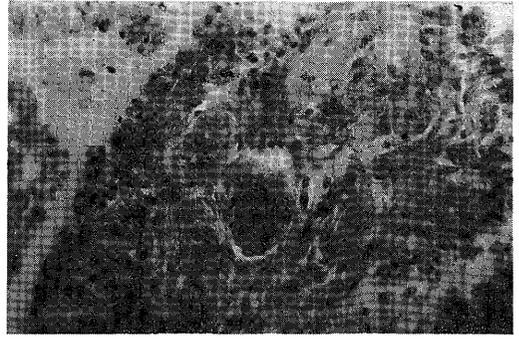
☒ 36



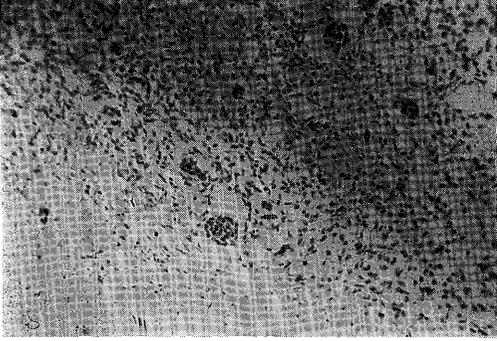
☒ 37



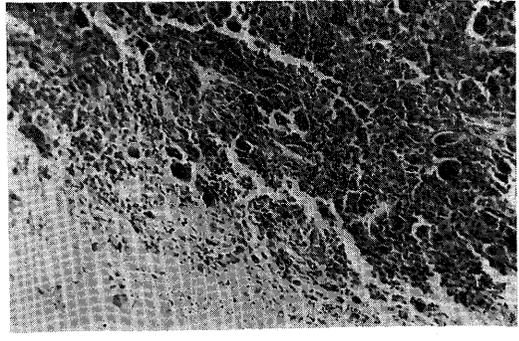
☒ 38



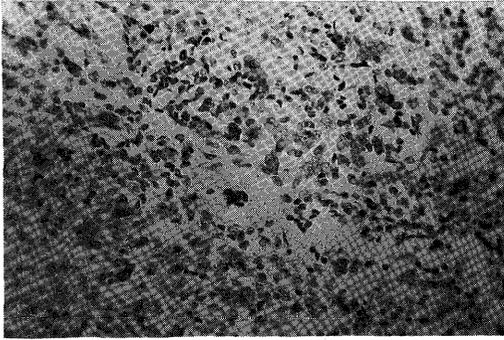
☒ 39



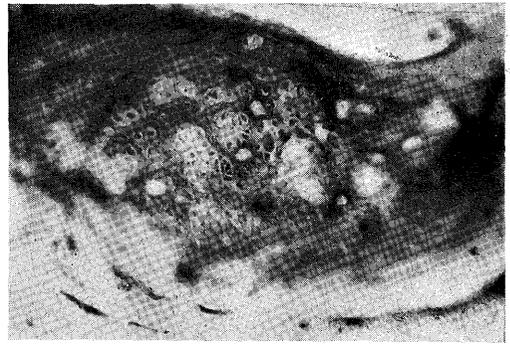
☒ 40



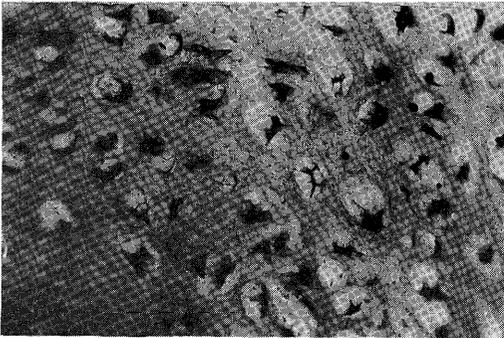
☒ 41



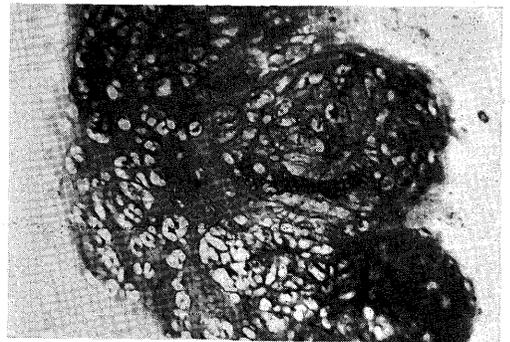
☒ 42



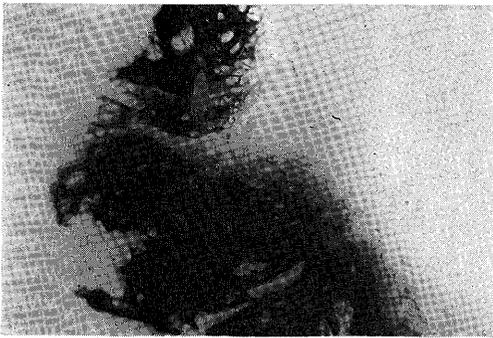
☒ 43



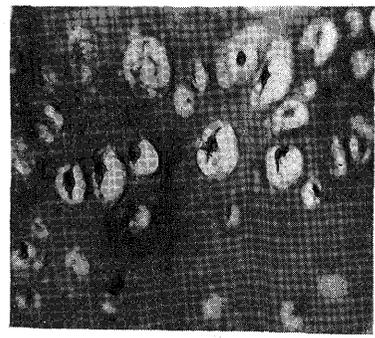
☒ 44



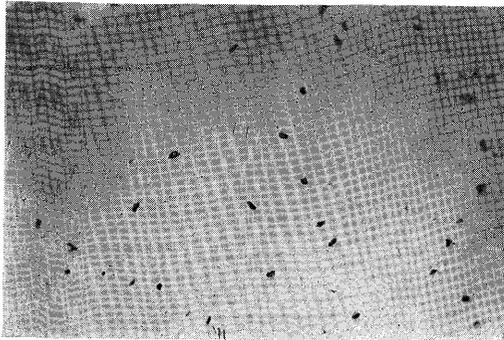
☒ 45



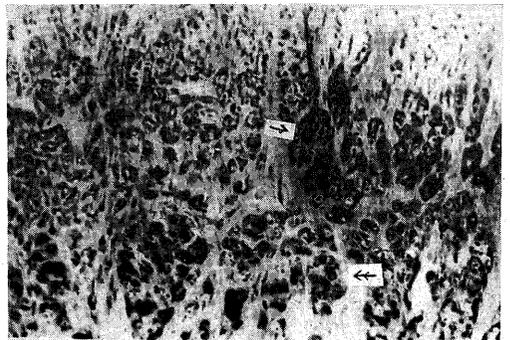
☒ 46



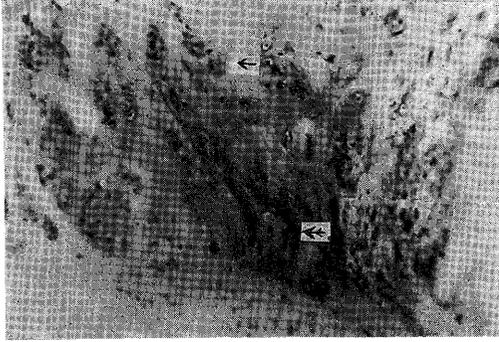
☒ 47



☒ 48



☒ 49



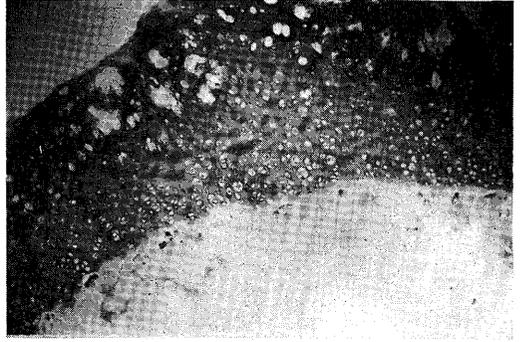
☒ 50



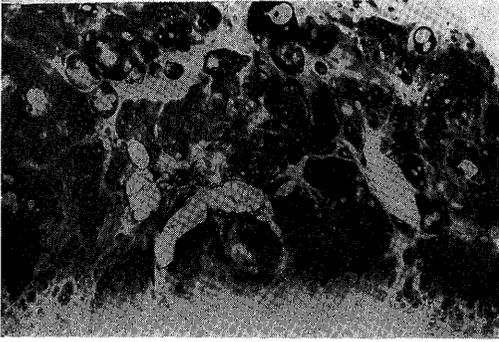
☒ 51



☒ 52



☒ 53



☒ 54



☒ 55



☒ 56

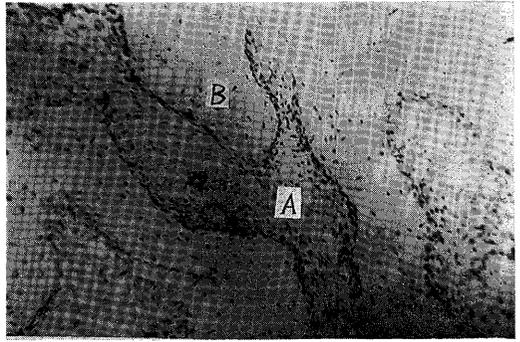


図 57

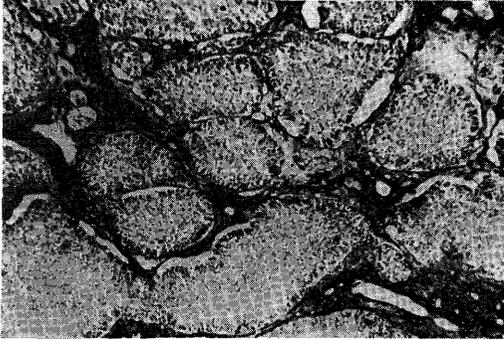


図 58

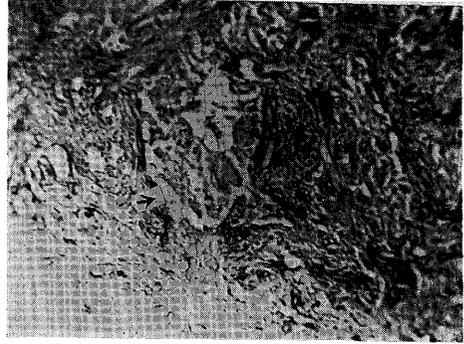


図 59

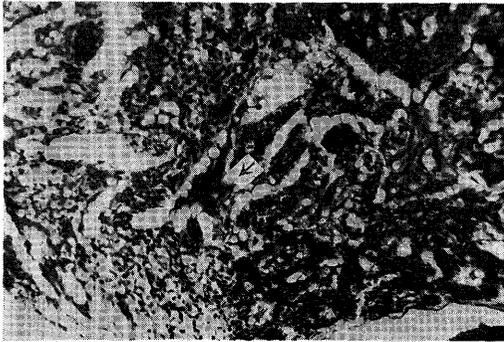


図 60

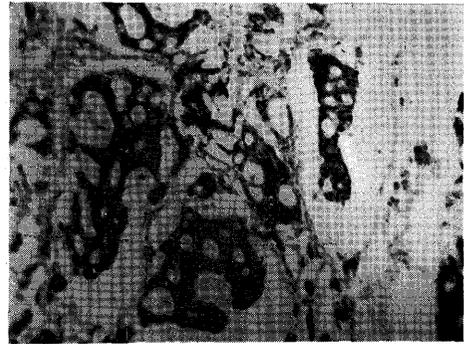


図 61



図 62

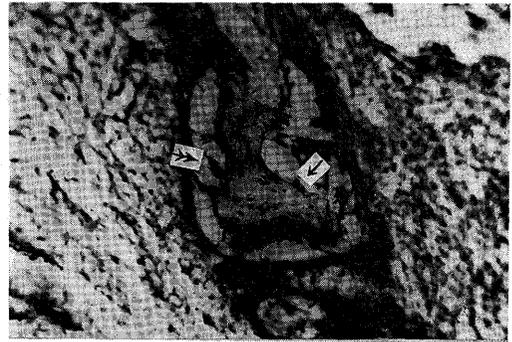
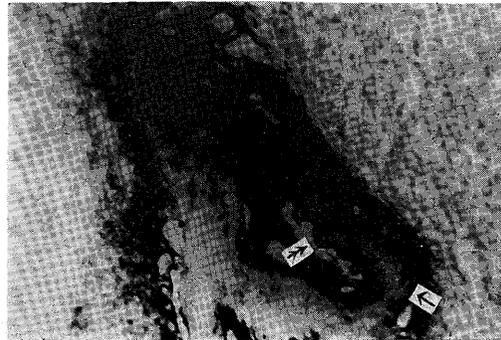
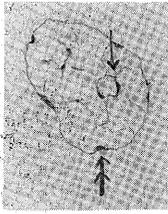


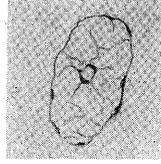
図 63



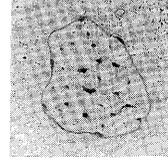
☒ 64



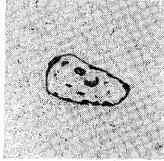
1



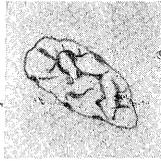
2



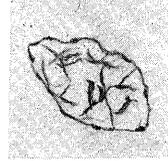
3



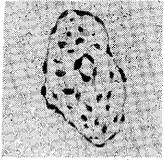
4



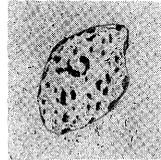
5



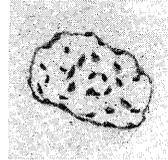
6



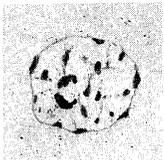
7



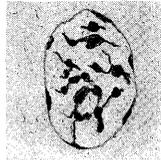
8



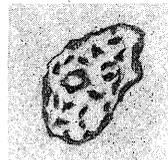
9



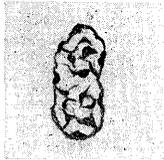
10



11



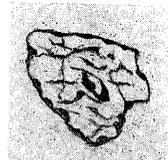
12



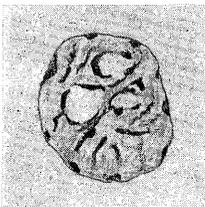
13



14



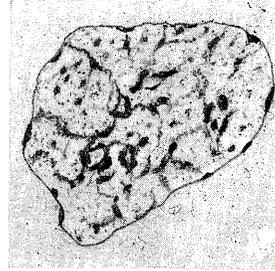
15



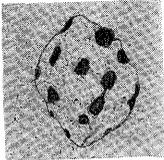
16



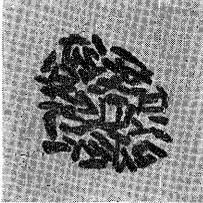
17



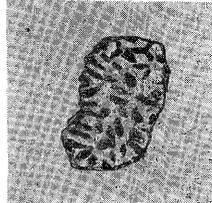
18



19



20



21