

腹水腫瘍の細胞化学的研究

金沢大学医学部第二病理学教室(主任 石川太刀雄教授)

沢 口 正 夫

(昭和34年4月13日受付)

緒 言

この報告は「組織発生の形態と化学」に関する教室同人の研究の一部をなすものである。

組織発生には正常発生としての胚の発生に対して、異常発生としての悪性腫瘍の発生があげられる。両者の発生は互いに比較生理生化学的に調べられることが望ましく、その試みはすでに教室同人によつて行なわれつつあるが、私は腹水腫瘍の発生を時間的におつて、組織化学的に、一部は生化学的に調べて知見を追加することにした。腫瘍の生化学的な分析は Greenstein¹⁾ 等の広汎な成績があり、教室では胃癌についての三富²⁾ の組織化学的な成績があげられるけれども、それらはいずれも一時期の腫瘍の像であつて、発生過程上の腫瘍細胞の動きにつれての測定はなされていない。しかし腫瘍を異常発生として、正常発生と対比せしめるのであれば、これは当然時系列として細胞の動きをおつていく必要があり、そのためにはおそらく実験的腹水腫瘍こそが唯一の材料となるだろう。私は主としてエールリッヒ腹水腫瘍を材料として、そのことの吟味を行なつた。成績は本文に述べる通りである。

実 験 材 料

エールリッヒ腹水癌は 1mm³ 約8万の癌細胞を含む腹水 0.025cc を体重約 20g の dd 系の雑交配マウス腹腔内に接種し、一定日後のものを探取して実験に用いた。その際出血性の腹水を用いないように留意した。

腹水肝癌(130系)は体重約 100g の雑系ラッテに 0.05cc 宛腹腔内に接種し、同様に一定日後腹水を探取して用いた。

吉田肉腫は約 0.05cc の腹水を体重約 100g のラッテに腹腔内接種し、同様に処理した。

本論文に用いた組織化学的検査術式、生化学的定量方法などについては以下の各項に記載する。

実験方法と結果

I 形態について

まずギームザ染色によつて各移植日数の腹水癌細胞を観察することによつて、この癌細胞の形の動く方向を明らかにしようと試みた。同じ試みはすでに吉田肉腫についてはよく行なわれている。³⁾ その結果エールリッヒ癌についても、一応各期の分類の行なわれうることが明らかとなつた。即ち、

第I期 分裂完了直後の時期で細胞は小さく、核はほぼ中央にあつて胞体がとぼしい。核は第III期のものに較べてクロマチン構造がやや粗のもの多く、核小体はつきりしない。

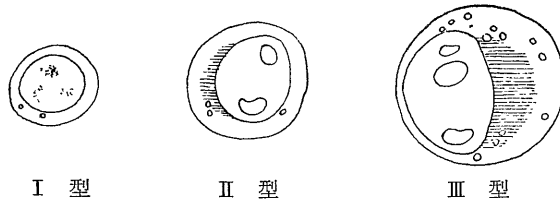
第II期 細胞はやや大きく、核は微細クロマチン構造のものが多く、しばしば偏在し、分葉することがない。核小体は認められる。胞体の核に接する部に吉田肉腫の明庭部に近い明るく染まる部分が認められる。

第III期 細胞は最も大きく、核は必ず胞体の一方にかたより、微細クロマチン構造で、核小体をもつている。広い原形質部分には上述のように明庭部に相当する明るい部分がある(第1図)。

全期を通じて吉田肉腫のようなアズール顆粒は認められず、好塩基性の微細顆粒がみられるが、原形質部分の増加につれて顆粒もまた増加してくる。また粗大空胞が細胞体内に出現するが、これも第III期に近づくに従つて数が多くなる。この微細顆粒はその殆んどが糸粒体であろうと考えられる。高木⁴⁾によれば糸粒体の増減は細胞の生理的機能の高低に相関がなく細胞分化の過程と関係があつて、細胞分化につれて細胞質が増し、細胞が大きくなるときに糸粒体も増加するという。

分裂細胞においては、この顆粒は分裂前期では球状のものがびまん性に拡がってみえるが、分裂中期になるとやや大きな顆粒状を呈し、分裂後期には両染色体間に球状、桿状の顆粒が線状に配列するものがあるの

第1図 エールリッヒ腹水癌細胞の分類



第 2 図

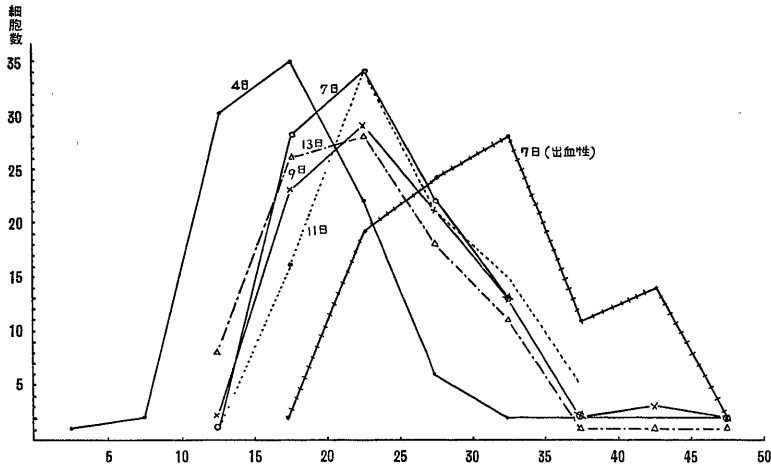


表 1

日 \ 型	I	II	III
4	68	28	4
7	29	56	15
9	25	50	25
11	17	55	28
13	34	46	20

表 2

日	4	7	9	11	13
腫瘍細胞	95	97	97	97	99
白血球	1	0	1	1	0
単核球	2	3	2	3	1
リンパ球	2	0	0	0	0

II型, III型が増加してくる. 即ちこの間に第I型→II型→III型の分化が起ると考えられる. そしてこの実験群では13日頃になると再び強い第I型の増加とそれに伴う第II型, III型の減少が起っている. このことをプラニメトリーによる面積計測によつて調べてみた. 腹水塗抹標本を直ちに空気乾燥し, 無水アルコール固定1分, ギムザ染色を行なつたものについて, アッベ描画器で拡大4270倍で紙上に投影描画し, プラニメーターで面積を計測した. 結果は第2図のようである. この図からも上述の所見が裏付けられる. なお出血性の腹水では大きい細胞の出現が多い. 肉眼的観察とプラニメトリー所見を対比してみると, それぞれの細胞型と面積の関係は一応次のようになる.

- 第I型 110 μ^2 以下
- 第II型 110 μ^2 ~140 μ^2
- 第III型 140 μ^2 以上

を認めた.

dd系マウスの一実験群に腹水移植後各日の細胞塗抹標本につき, 無選択的に100個を選び, 上述各型に分類してみると第1表のようになった.

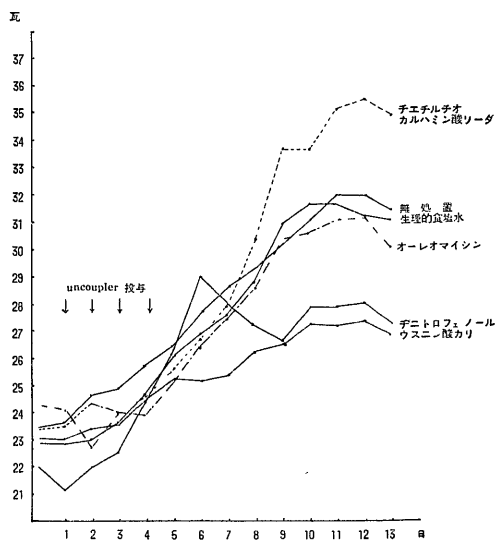
この表から明らかなように, 幼若型である第I型細胞は4~11日まで日をおつて減少し, それにつれて第

これらの結果からみると, マウスに接種された腫瘍細胞は急激に分裂増加するが, やがて分裂速度が低下して, 11日目を超える頃まで細胞の第II型, III型への分化が起っているが, 13日目を超える頃から再び分裂速度が上昇して, 第I型細胞が増加し, 14日前後で個体の死を招いたという経過が考えられる.

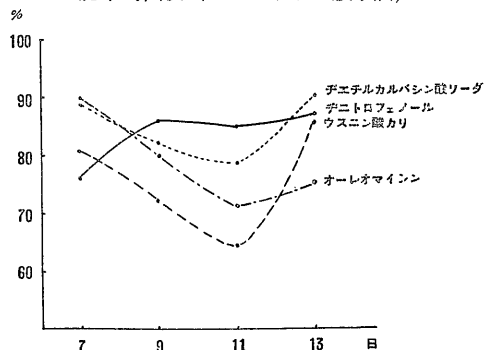
なお第I型→III型までの分化過程において、染色性を失い、変性崩壊傾向を示す細胞が出現する。私の経験ではその出現率は4日目腹水で6%、7日目と13日目に3%、9日目、11日目には認められなかった。また腹水中に出現する白血球の細胞100個に対する百分率は第2表のごとくである。

ついで胚において細胞分裂を停止させることが知られている酸化の磷酸化遮断剤 (uncoupler) が腹水細胞の分化に及ぼす作用を計測的に調べて、果して上述の分化過程が正しいものであるか否かを調べてみることにした。選んだ uncoupler は 2-4-ジニトロフェノール、ジエチルチオカルバミン酸ソーダ、ウスニン酸カリ、オーレオマイシンで、6群 (各群4匹) の dd 系マウスに7日目腹水 (1mm³ 約8万) を生理的食塩水で2倍に薄めたもの 0.05cc 宛全マウス腹腔内に移植

第3図 エールリッヒ腹水癌接種マウスに uncoupler を投与せる各群の平均体重



第4図 対照を100とした場合の腫瘍細胞平均面積 (エールリッヒ腹水癌)



し、24時間、48時間、72時間、96時間の4回、各 uncoupler を体重 20g あたり 1mg の割合で 1cc の生理的食塩水に溶かしたものを腹腔内に投与した。全マウスは体重を毎日測定し、腹水接種後7日目、9日目、11日目、13日目に全マウスより腹水1滴あて採取して塗抹標本をつくり、ギムザ染色後、アッペ描画器とプランメーターにより、腫瘍細胞の面積計測を行なった。各群の平均体重の変動は第3図のごとくであつて、ウスニン酸カリ、ジニトロフェノール群の平均体重は対照より低く、ジエチルチオカルバミン酸ソーダ群のそれは高く、オールオマイシン群は差がみられなかった。

塗抹標本についてプランメトリーを行なった結果は、実験群腫瘍細胞平均面積は対照のそれを100とすると第4図のごとくになつた。

即ち uncoupler のいずれもが、面積の少ない細胞即ち幼若型の細胞の多い腹水組成を招来することが明らかであり、たとえそれらが癌接種マウスの生命を延長する効果がなかつたとしても、腹水腫瘍細胞それ自体の分化に対しては抑制的に働くことが明らかであつた。

II 組織化学

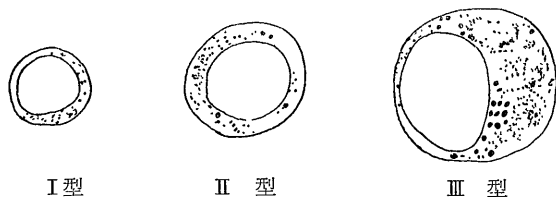
1) コハク酸脱水素酵素

大原・倉田・橋の TTC (トリフェニールテトラゾリウムクロライド) 法⁵⁾によつた。即ち腹水 1.0cc をホモジェナイズすることなしに 0.2M 磷酸緩衝液 (pH 7.2) 1.0cc, 0.2M コハク酸 1.0cc, TTC 1.0mg とツンベルグ管に入れて減圧し、37°C 30分反応せしめた後、遠心沈渣を塗抹検鏡した。

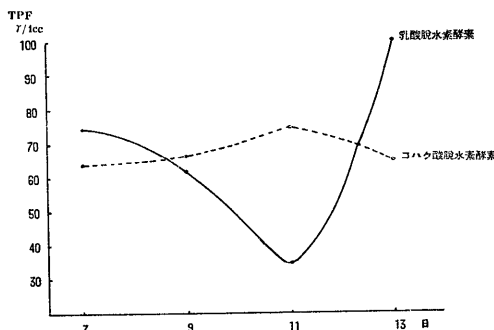
結果は脂肪染色陽性の空胞が濃染するが、これは TTC の還元によつて生じた TPF (トリフェニールフォルマザン) が脂肪溶解陽性のため細胞内で転溶したためと考えられる。この粗大顆粒以外に第5図のように微細顆粒状に陽性に出るものがある。その顆粒は脂肪染色に際しても認められる明庭部位に多いが、その部位をこえて広く出現する場合がある。これも微細顆粒状の脂肪、たとえばミトコンドリアの表層のもつりポイド⁶⁾への転溶が考えられるが、同じ TTC を用いる乳酸脱水素酵素染色の場合 (後述) には見出されなところからみて、それは転溶によるものでなく、その部位に酵素能があるものと考えられる。脂肪顆粒は細胞発生の進むにつれて粗大化する傾向があるが、陽性微細顆粒もその数が増加してくる。なお反応液中のコハク酸を除いたものを対照としたが、これは全く陰性であつた。

腹水のホモジネートについて TTC 法で倉田・沢口

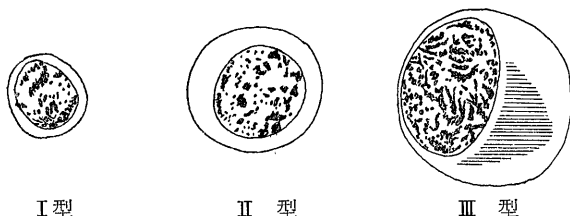
第5図 エールリッヒ腹水癌細胞の
コハク酸脱水素酵素



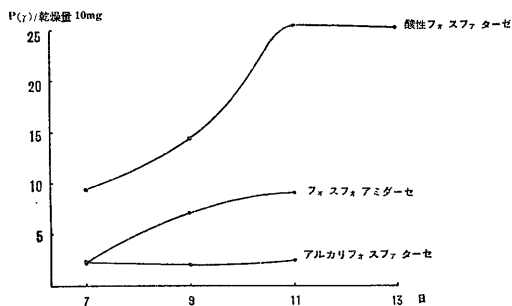
第6図 エールリッヒ腹水癌の発生
に伴うコハク酸一、乳酸脱水素
酵素活性の変動 (T. T. C. 法)



第7図 エールリッヒ腹水癌細胞の
酸性フォスファターゼ



第8図 エールリッヒ腹水癌の発生に伴
うフォスファターゼ群活性の変動



7) が測定したコハク酸脱水素酵素活性の消長は第6図のごとくである。それによれば活性は11日目まで漸増し、13乃至14日目に低下するが、その時期に腹水組成中第I型細胞の占める比率の再増加があつたから、細胞型の消長と比較すれば、この酵素活性が細胞分化

とともに増加することが明らかである。組織化学的所見もそれと矛盾しない。即ち第I型→III型の細胞分化につれてコハク酸脱水素酵素能増加が、定量的にも、組織化学的にも明らかである。

2) 乳酸脱水素酵素

方法は大原・倉田・橋法⁵⁾によつたが、腹水 1.0cc をホモゲナイズすることなしに 0.2M 磷酸緩衝液 (pH 7.2) 5cc, TTC 5mg, ニコチン酸アミド 1.0cc (7.33 mg), 1M シアンカリ (中和) 1.0cc, 0.8M 乳酸ソーダ 1.25cc, 蒸溜水 1.75cc とツンベルグ管に入れて減圧し、37°C 30分反応せしめた後遠心沈渣を塗抹検鏡した。

粗大な脂肪顆粒と思われるものが濃染する。そして濃染顆粒は必ずしも第III型細胞に多くはなく、第I型細胞にもコハク酸脱水素酵素の場合に較べて、より多くの濃染顆粒が現われる傾向がある。しかもこの顆粒は胞体内で酵素反応によつて生じた TPF が細胞内で脂肪に転溶したものであるから、この酵素の細胞内分布を示すものではない。コハク酸脱水素酵素の場合にみられたような微細顆粒状の陽性顆粒は、粗大顆粒に混つてまぎらわしいものが僅かに認められた以外には、まず認められなかつた。このことは呼吸系であるコハク酸脱水素酵素と解糖系である乳酸脱水素酵素の細胞内分布の差に基づくものだろう。前者は一般にミトコンドリアに局在し、後者は細胞内非顆粒部分に分散することがウニ卵などで確かめている⁸⁾。

TTC 法による倉田・沢口⁷⁾の定量的測定結果第6図のごとくである。即ち7日目、13日目に活性は高く、9日目、11日目には低い。このことを腹水細胞組成の消長と比較すれば、乳酸脱水素酵素活性は第I型細胞に高く、第II型、III型となるに従つて低下することが明らかである。同様な傾向は筆者等が他の解糖酵素活性についても確かめられている。

3) 酸性フォスファターゼ

腹水を塗抹し直ちに空气中で乾燥後、-18°C で中性ホルマリン蒸気で10分固定したものにつき、Gomori の可及的人工産物を生じないように検討された改良法によつて染色を行なつた。対照は反応液中のグリセロ磷酸ソーダを除いた。結果(第7図)は一般に細胞質に弱く、核に強く陽性に出た。細胞質には殆んど反応の認められないものから微細顆粒状に出るものの各段階があるが、一般に第I型には陽性顆粒の部位がとぼしく、第II型、III型となるに従つて濃度も、陽性顆粒数も増加の傾向があり、第III型に近づくに従つてよく見出される明窓部は濃厚に染まつてくる。核は一般によく染まり、陽性部位は粗大顆粒状であるこ

とが多く、細胞の形の動きに伴ってその顆粒の量が増加する傾向を認めるが、分裂期では染色体は濃染し、しだいに濃度を増し、分裂中期には著しく濃厚に染まるようになるが、以後減少の傾向を示した。なお対照標本はすべてが全く陰性であつた。フォスファターゼ反応における核の染色が人工産物である可能性は否定できないから、この所見の示す意義については論ずることができない。

つぎにこの酵素定量を腹水の日をおつて行なつた。腹水を氷冷しながら2分間ホモゲナイズした液を酵素液とし、その0.5cc、基質、バッファー混液(グリセロリン酸ソーダ 1.0g、ペロナールソーダ 0.848g、0.1N 醋酸で pH 5 とし溜水で全量 100cc としたもの) 2.0 cc、溜水 0.5cc を 37°C、1時間保つて後、15% トリクロル醋酸 3cc で除蛋白、遠心上清 4cc につき中村法で遊離リン酸を測定した。対照は反応液中のグリセロリン酸ソーダを除いたものについて同時に操作した。酵素活性の変動を腹水乾燥量あたりの遊離リン酸量で示すならば第8図のようである。

腫瘍細胞が発生日数を経るに従つて酵素活性を増す所見は組織化学的所見と対比して別に矛盾がない。組織化学的には日数を経るに従つて増加する第Ⅲ型の細胞に反応の強い傾向があるから、腹水全体の活性度の上昇は、第Ⅱ型を経た第Ⅲ型細胞の増加によることにならう。分裂細胞は組織化学的に反応が核に強く出るが、この細胞の出現は阪大小山⁹⁾によれば3日目、7日目腹水に出現のピークがあり、筆者らの接種条件では4日目、9日目にピークを生じ、9日目腹水で分裂細胞が全腫瘍細胞の8%を示したのが最高であつて、この程度の出現ではそれが全腹水の酵素活性の消長曲線にあまり影響を及ぼさないものと考えられる。

4) アルカリフォスファターゼ

アルカリフォスファターゼは氷冷アセトン固定30分のもの-18°C フォルマリン蒸気固定10分のものについて Gomori 法¹⁰⁾によつて染色した。対照は基質液中のグリセロリン酸を除いたものについて同様に処理した。

結果はエールリッヒ癌では微弱陽性でその分布を明らかにすることが困難である。

吉田肉腫も陽性所見が組織化学的には得られない。

腹水肝癌では、その酸性フォスファターゼ反応に比較して必ずしも劣らない陽性所見が得られる。即ち核は殆んど陽性所見を示さず、細胞質が細胞の如何をとわず、種々雑多な染まり方を示し、pair 細胞では相当の強陽性から殆んど反応陰性のごときものまで含んでいる。2個の細胞が同程度のものもあれば、差異を

示すものがあり、しばしば相接する細胞質部分が濃く染まっているものがある。なお吉田肉腫の明庭に相当する部分は他の部位に比して顆粒が粗大で著しく濃厚である傾向を示すものが多い。これらの所見は従来の報告にほぼ一致する。吉田肉腫については武内¹¹⁾、杉本¹²⁾等が、腹水肝癌については翠川¹³⁾、飛岡¹⁴⁾、堤¹⁵⁾等の報告がある。ただ青木等¹⁶⁾は肝内に注入増殖させた肝癌のアルカリフォスファターゼが陰性であることを報告しているが、さらに検討を要するだろう。堤¹⁵⁾の定量所見では腹水肝癌のアルカリフォスファターゼ活性は酸性フォスファターゼ活性より高く、発生に伴つて活性上昇がある。

エールリッヒ癌については安田等¹⁷⁾が常に陰性の所見を得ているが、筆者の所見では対照標本と比較して微弱陽性の結果を得ている。これは定量的結果も裏付けている。即ち酸性フォスファターゼ定量と同様な操作によつて定量を行なつてみた。ただ反応液の組成中の基質緩衝液を 0.1 N 苛性ソーダで pH 9 にかえたのみで、他の処方、操作は全く異ならない。結果は第8図のごとくで、酵素活性は酸性フォスファターゼに比較して明らかに弱いが、確かに認められ、腫瘍発生の日数に従つての活性増加はここでも認められた。

しかし組織化学的には、反応微弱でありすぎて、その傾向を確認することはできなかつたが、反応が細胞質によるものであつて、核や細胞外の液体成分に基づくものでないことは明らかに示された。

細胞の成長分化に伴うフォスファターゼの増強は胚の初期発生においても常に認められることであるが、この場合アルカリフォスファターゼ活性増加が酸性のそれに比較してはるかに強い。

腫瘍の方ではこの関係が逆になつていことはさらに多数の他の腫瘍についても調べられる必要があるにせよ一応興味深い所見というべきである。

5) フォスフォアミダーゼ

フォスフォアミダーゼの組織化学は高松等によつて初めて試みられたが、この場合クレアチンリン酸が基質として用いられアルカリ側で反応が行なわれた。ところが Gomori は p-クロルアニリッドリン酸を基質として酸性で反応を行なつて特異な酵素活性分布を見出した。なお同基質を用いてアルカリ側で反応を行なつた場合は、その分布はアルカリフォスファターゼと差異がない。これは酸性フォスフォアミダーゼといふべきものであり、癌に強く反応の出ることが見出された。そこで Gomori 法に従つてエールリッヒ癌について調べてみた。

結果は腫瘍細胞核が濃染し、細胞の大型化に伴い、

核の濃染度も増加する。細胞質は弱いが微弱顆粒状の陽性反応が認められ、明庭相当部位には陽性のやや粗大な顆粒がある。分裂細胞については、休止期より分裂前期に入ると染色体は濃度を減じ、分裂中期に最も反応が弱く、後期、終期になるに従って濃度を回復する。吉田肉腫についてはやはり核に反応があり、細胞が大きくなるに従って濃度上昇の傾向がみられた。細胞分裂における態度もエールリッヒ癌の場合と異なる。

つづいてエールリッヒ癌についてこの酵素活性の定量を行なつたが、p- クロロアニリッド 磷酸は不安定であるから、そのまま遊離磷酸定量を行ないえない。そこで磷酸を低温で Ca 塩として沈澱させて分離し、それについて磷酸を定量する方法によつた。

方法は次のごとくである。

基質原液

強アンモニア 0.5cc を蒸溜水 20cc に加え氷冷し、これに p- クロロアニリッド 磷酸 0.5g を溶かし、1M 醋酸を加えて pH 8.4 とし蒸溜水で全量 25cc として氷室保存す。

基質液

0.05 M マレイン酸バッファー 10cc

基質原液 2cc

0.2 M MnCl₂ 0.1cc

腹水を冷却しながら 2 分間ホモゲナイズした液を酵素液とし、その 0.5cc、基質液 2.0cc、溜水 0.5cc を 37°C に保つた。氷冷下で 10% 三塩化醋酸 3.0cc で除蛋白、上清を 10% 苛性ソーダで中和（氷冷下）、1/2 量の水酸化カルシウム飽和 10% 塩化カルシウム (pH 8.8) を加えて 10 分放置後遠心、沈渣を上述カルシウム液 2.0cc で再び洗つて後、7.5% H₂SO₄ 1.5cc を加えて、かくはん後遠心（カルシウム除去）。上清 1.0cc につき中村法で磷酸定量、測定は反応 0 分、60 分について行ない、また基質液、酵素液をそれぞれ溜水に加えたものについて同様に測定を行なつて対照とし、上の測定値から差し引いた。

結果は第 8 図のごとくで、この酵素活性も、アルカリ、酸性フォスファターゼと同様に癌細胞の発生に伴う増加が認められ、組織化学的所見と一応の一致がみられた。

6) 糖蛋白

過沃度酸シッフ法による糖蛋白の証明を大原法¹⁹⁾によつて行なつた。固定はツェンケル固定、5 分を行い、0.5% ヨードアルコールで脱昇汞を行い、ついで 0.5% チオ硫酸ソーダ 5 分間で脱ヨードを行なつたものにつき、0.3% 過沃度酸酸化を行ない、ロイコフク

シンによつて発色させた。

結果は過沃度酸酸化は 1 時間以上 24 時間に近づくと従つて染まりがよくなり、ロイコフクシンにつける時間は 2~3 時間が適当であつた。なお過沃度酸処理前に塗抹標本に脱脂操作を加えることにより、染め上がりのコントラストをよくすることができた。即ち脱脂は 60%、80%、90%、95%、純アルコール各 10 分後キシロール 10 分宛 2 回、さらに純アルコール 10 分宛 2 回通し、最後に水洗を 15 分行なつた。

結果は原形質内に微細顆粒状に出るものが多く、第 III 型細胞では微細びまん性の顆粒を持つものが多い。なお注目されることは所謂明庭部に顆粒が集団して濃染している像である。杉本等¹⁹⁾は吉田肉腫の明庭部に陽性顆粒を欠くと述べているし、腹水肝癌でもこのような像は見出されていないが、ここには固定の条件が問題になるかもしれない。メタノールまたはメタノール・フォルモール混液等の固定よりも昇汞の入つた固定液がよい結果を得ることは私共が経験している事実である。

安田等¹⁷⁾によると粗大陽性顆粒に満ちた細胞は移植後 24 時間~2 日目までに最高に現われ、以後減少して殆んど消失するから、筆者が調べた 7~13 日の腹水では当然多く見出されないわけである。ただそのような顆粒がグリコーゲン由来のものであるかどうかの検討はないようである。筆者の場合は唾液試験によつて陽性顆粒の消失しないことを確認した。なおエールリッヒ癌について PAS 反応陰性の報告⁹⁾もあるけれども、これらはさらに手技に検討を加える必要がある。

7) 核 酸

RNA (リボ核酸) 染色は、フォルマリン・メタノール (1:9) の混液、カルノア固定液またはツェンケル固定液で固定後、メチルグリーン・ピロニン染色を行なつたが、いずれの標本も染まり方のコントラストが悪いので、つぎのごとく脱脂を行なつた。固定標本を 60% アルコールより順次濃度の高いアルコールをとおして、無水アルコールをへた後、純キシロール 5 分 2 回、ついで純アルコール 5 分 2 回後、染色を行なう。なお対照の RNA 除去は 5% トリクロル醋酸 90°C 15 分処理を行なつた。結果はツェンケル固定、脱脂標本が最もすぐれた RNA 染色効果をあげた。

陽性部位は細胞質及び核小体にみられ、休止核細胞では第 II 型に近づくと従つて濃い顆粒が多く、細胞質周辺部には粗大顆粒、核周辺部には微細顆粒が多い傾向があるが、第 III 型になると薄くなる傾向があつた。飛岡²⁰⁾が吉田肉腫について定量した結果では、移植

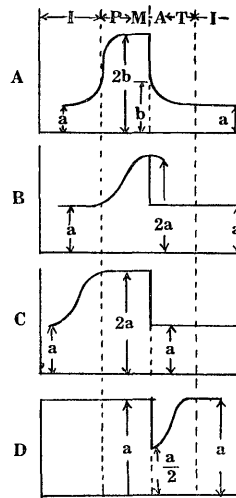
後日数により腫瘍細胞の含む RNA 量に差のあることが見出されており、初期に高く、末期に低い値が得られているが、そのときの腹水の細胞組成が明らかにされていないから、細胞の動きにつれての RNA 量の変動は明らかでない。私の所見は肉眼的観察ではあるが、細胞の大きさと染色の濃度を考慮しても、なお RNA 量の一時上昇後低下を示すように思われたが、このことは今後の定量的測定結果をまつて明らかにされるべきである。分裂過程に入ると、その前期から細胞質にびまん性な染色を示すようになり、粗大顆粒も少なくなつて、染色体周辺と細胞辺縁に集まるように見え、分裂中期では顆粒は極めて微細となり、細胞質は明るくみえてくるが、染色体周囲はやはり濃く、分裂後期には顆粒の大きさが再び増し、分裂終期には粗大顆粒が両極染色体間に数条の「じゆず」状配列を示す。

フォイルゲン反応による DNA (デオキシリボ核酸) は静止核細胞では小細胞 (第 I 型) の核に濃いものが多く、大細胞では淡いものが増える。マイクロスペクトロフォトメトリーの特技を用いての研究では、核の平均 DNA 含量は一つの動物種では組織が違つても、著しい差を示さないという結果が得られている^{21) 22)} が、これは細胞集団の平均値が比較的安定しているということであつて、同じ種類の細胞のなかでも変動が実在する可能性は否定されない。腹水癌についても化学的定量的裏付けがなくては決定的なデータにならないが、肉眼的所見では細胞分化につれて核 DNA 量の一時上昇後低下が考えられた。勿論ここでは核面積と染色度を考慮してのことである。分裂期に入るとしだいに濃度を増し分裂中期では最高になり、後期、終期になるに従つてしだいに濃度が減ずる。有糸分裂における DNA の消長については、これまでいろいろの主張が発表されていて、問題の焦点は一つの細胞が二つに分裂するとき核に一定量存在する DNA がどの時期に倍加されるかということであつた。その点については第 9 図のように 4 説に要約されている²³⁾。これらの所見は主にマイクロスペクトロフォトメトリーによつていて、その測定方法にも疑問が残つている。私の肉眼的観察では一応第 9 図の A のような DNA の消長が考えられたが、それが果してこの材料の特異性であるのか、主観的な観察の誤りに過ぎないかは今後さらに検討されるべき余地のあるところである。

8) 脂 質

Chiffelle and Putt²⁴⁾の方法によるプロピレングリコールズダンブラック B 法によつた。

第 9 図



有糸分裂のさいの DNA 含量の変化に関するいろいろの説
I, 間期(静止核). P, 前期. M, 中期. A, 後期. T, 終期. a, b は DNA 含量に関する単位を現わし, 互いに独立。

(a) 塗抹標本の乾燥しないうちに染色液を滴下する染色

(b) 塗抹後直ちに乾燥して染色

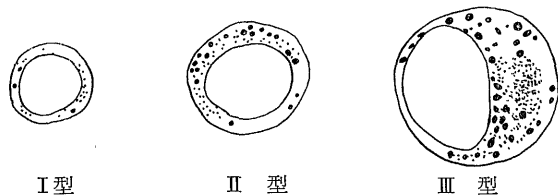
(c) 塗抹乾燥後中性フォルマリン 1 分間固定のもの

についての染色では、いずれも原形質内空胞が染色されたが、最上の結果は (b) 法によつて得られた。小山²⁵⁾によると塗抹乾燥標本では脂肪染色されず、超生体染色によつてのみ染まるといふが、これは少し疑問がもたれる。吉田肉腫、腹水肝癌などでは固定標本について充分脂肪が染め出されているのだから、エールリッヒ癌だけに、そのような特異機構があるとは考えにくい。筆者の経験では、乾燥乃至固定後でも充分脂肪の染まることが、確かめられた。

吉田肉腫、腹水肝癌などの実験腹水腫瘍では、増殖の盛んな小型の幼若細胞には脂肪がみられないが、小数にすぎないが、末期になるにつれ顆粒の数が増し、大型のものが多数出現してくることが知られている。^{25) 26)}

エールリッヒ癌でも、ほぼ同様な所見が得られた (第 10 図)。即ち幼若小型細胞 (第 I 型) では、小型の脂肪顆粒が数個胞体内に出現するものが多いが、第 II 型、III 型になるに従つて顆粒の大きさ、数ともに増加する傾向がみられた。なおこのような粗大脂肪顆粒以外に微細粒状の脂肪が第 10 図のように胞体中に出現した。その場所は吉田肉腫にある明庭部所在部位にほぼ一致するが、その範囲はより広く、この本態は一応ミトコンドリアではないかと考えられる。ミトコンドリアはリポドを含んでおり、ズダンブラック B で容易に染まることはよく知られたことである。ただここで問

第10図 エールリッヒ腹水癌細胞の脂肪



題になるのはゴルジ体であろう。それがこの明庭部位に存在することはうなずけることである。ゴルジ体が磷脂質を含み、ズダン黒可染性であることも報告されているから、この脂肪染色陽性の微細顆粒がゴルジ体を含まぬとはいいきれないが、一般にゴルジ体は酵素に乏しいものとされておるのに、コハク酸脱水素酵素、酸性フォスファターゼ等がこの部位に活性を示すところからみると、この部位は糸粒体、ゴルジ体が共存する部位であるかも知れない。

9) その他の組織化学

アミノ酸についての組織化学はアルギニン、チロジン、トリプトファン、塩基性アミノ酸について行なった。アルギニンは坂口反応による大原・倉田法²⁷⁾、チロジンはαニトロβナフトールによる大原・倉田法²⁷⁾、トリプトファンはデメチルアミノベンツアルデヒドによる法²⁸⁾、塩基性アミノ酸は Tropaeolin O で pH 1.2~1.8 の緩衝液中で染色する大原法²⁹⁾によつた。固定はカルノア法、ホルマリン・メタノール(1:9)、またはツェンケル液を用いた。

アルギニンはびまん性に弱陽性に出るが、核に幾分濃い傾向がある。各期の細胞による濃染は明らかでない。チロジン、トリプトファンはともに痕跡かつびまん性に出る程度であるが、Tropaeolin 染色では核は胞体より濃厚に染まり、細胞質は小型の細胞より大型のものに濃く染まるものが多い。分裂細胞では染色体が、休止核よりも濃厚に染まり、退行変性に陥つた細胞は染まりが薄い。

吉田肉腫では大小の細胞にあまり差なく、核は胞体より濃厚に染まる。分裂細胞では染色体が休止核よりも濃く染まり、前期、中期、後期、終期の順に濃厚に染まる。明庭部は他の部位よりやや淡く染まる。

腹水肝癌では濃度種々。小さい遊離の単一細胞及び空胞をもつ中等大の単一細胞は核が胞体より濃く、吉田肉腫細胞の明庭部に相当する部位が濃厚に染まるものもあり、pair 細胞では濃度が同程度の染まるものから差のあるものあり、核よりも向い合っている胞体が濃厚に染まる。核の濃淡の差はエールリッヒ癌細胞のごとく著明でない。

金属イオンについては核酸との共存が考えられる

Mg イオンについて岡本法のチタン黄による方法³⁰⁾によつて証明を行なつてみたが、陰性の結果しか得られなかつた。無水アルコール標本について無処置のまま染色を行なつたものも、水洗1時間または5%トリクロル醋酸 90°C 15分操作後に染色したものにも、陽性の結果は得られなかつたが、これは非仮装性のイオンの存在が、おそらくこの染色法の鋭敏度以下であることが原因で、仮装性イオンまででないことにはならない。

リパーゼについては Tween 60 を用いて Gomori 法³¹⁾による染色を行なつたが、対照に比較して極めて僅かの陽性という程度で分布所見は全く取り得なかつた。これまでもエールリッヒ癌については小山等¹⁷⁾は陰性の成績を得ているし、吉田肉腫、腹水肝癌についても陰性データが多い¹⁸⁾ 19)。結局リパーゼは組織化学的には実験腹水腫瘍では証明されていないが、この場合はリパーゼというよりも、むしろエステラーゼというべきで、教室安田・細等³²⁾ 33)は吉田肉腫細胞について、とくにその嫌色圈にリパーゼを染め出しているから、実験腹水腫瘍はエステラーゼには乏しくともリパーゼがないとは断言し難いのである。このことはさらに検討の必要があらう。

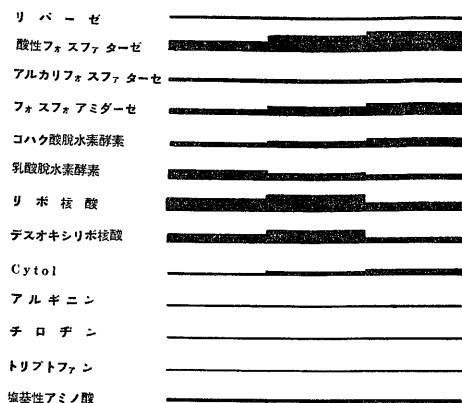
コリンエステラーゼについてはこれまで報告がないが、Koelle 法³⁴⁾による私の結果では腫瘍細胞では全く陰性であつた。

総括及び考按

腫瘍細胞の酵素産生能は発生母組織に関連し³⁵⁾ 36) 37)、細胞腫瘍化によつてその活性の低下、保持、増強等³⁸⁾があり、その不規則性が腫瘍の特長であると思なされた。ところがもし腫瘍がその発生途上において、酵素活性に種々の変動をきたすとしたなら、その変動を理解した上でなければ腫瘍酵素能を正常組織のそれと比較することは正しくないであろう。かりにある腫瘍の酵素能が、その発生母組織のそれより高いと思なされたとしても、それは測定した一時期における酵素能が高かつたのであつて、その腫瘍の全発生経過を通じて高いということにならず、却つてある時期ではより低かつたことがあるかもしれないのである。そして一般に腫瘍の発生に際して個々の腫瘍細胞が同一発生時期にあるわけでないから、ある細胞では酵素活性が低く、ある細胞では高いという不規則性も当然現われてくるであろう。

この問題を明らかにできる唯一の材料は腹水腫瘍であるといえよう。この場合も全腫瘍細胞が同調して同一発生を示すのではないけれども、統計的には時期を

第 11 図



おつて調べてみると、記述のように発生に一定の法則性を見出すことができる。そこで定量的データと比較して、その組織化学的検索を行なうならば、はじめて腫瘍細胞の発生に伴う酵素能の変動が明らかにされ、そこに一定の法則を見出す可能性が生まれるのである。これは酵素以外の諸物質についてもいえることであろう。この立場に立つて私はコハク酸脱水素酵素、乳酸脱水素酵素、フォスファターゼ群、酸性フォスフォアミダーゼについて、組織化学的検索を生化学的定量と併行させ、腫瘍細胞の発生に伴う変動をみた。さらに糖蛋白、核酸、アミノ酸その他についても知見を補遺した。それらの主なものについての組織化学的所見を図示(総括)すれば第11図のようになる。

この図の示すようにエールリッヒ腹水腫瘍細胞の発生に伴つて、酵素活性消長には一定の法則性がある。特に注目されることは、その定量値とも一致する乳酸脱水素酵素活性の発生に伴つての低下とコハク酸脱水素酵素活性及びフォスファターゼ群の活性の上昇である。

解糖は生物進化の途上において、呼吸に先行する力源過程であると考えられる。個体発生は生化学的にも系統発生をくりかえすことが Needham³⁶⁾により化学的反覆説 (Chemical Recapitulation) として、いろいろの根拠を提示されつつあるが、もしこの考えが正しいとするならば、細胞にとつて最も重要な力源過程について、解糖が呼吸に先行するという現象は生物進化における代謝変換のパターンが再現されたものと考えられることができよう。同様なことは胚の発生についてもすでに見出されているのであるが、一個の細胞が胚の分化よりはるかに低度の分化までで発生が終る腹水腫瘍では、その酵素変換様式はさらに簡単にまさにモデル的であるといえよう。フォスファターゼ群については、胚発生において分化に伴い活性の上昇がみられ、

蛋白合成との関連が述べられているが⁴⁰⁾、エールリッヒ癌でもやはり発生に伴う活性上昇が認められることは注目されてよい。

なおエールリッヒ癌についても、吉田肉腫の明庭部または嫌色圏とよばれた構造部分が発生が進んだ時期の細胞(第Ⅲ型細胞)に出現することを明らかにした。この部分は組織化学的にはコハク酸脱水素酵素、酸性フォスファターゼ、フォスフォアミダーゼ、糖蛋白、脂質に富むことが認められた。この部分は組織化学的にはミトコンドリアとゴルジ体の存在する部分と考えられる。安田等⁴¹⁾は吉田肉腫について、同部位を核、細胞質間物質交流と細胞全体の代謝に重大な機能的役割をもつと考えているが、いずれにせよこのような構造物の出現は腫瘍細胞の分化の一表徴と考えることができるであろう。それが正常細胞の分化と本質的な差をもつものか否かはこれからの問題ではあるけれども。

結 論

マウスのエールリッヒ癌を主として、腹水腫瘍の細胞化学的研究を行なつた。その結果

(1) エールリッヒ癌細胞もまた吉田肉腫におけるごとく、その分化の段階に従つて、形態学的に3型を区別でき、プラニメトリーによつても、そのことを裏付けできた。即ち腫瘍細胞は第Ⅰ型→Ⅱ型→Ⅲ型と分化し、核、胞体の面積を増加する。それらの出現率を腹水発生経過を追つて調べると、第Ⅰ型細胞は初期腹水に多く、日が経つに従つて、その率を減じたが13日目頃に再びその率を増加することがあつた。それに対し第Ⅲ型細胞はそれと全く反対の消長をとり、第Ⅱ型細胞は7~13日腹水ではあまり強い変動を示さない。

(2) 酸化的磷酸化遮断剤 (uncoupler) 各種がこれらの腫瘍細胞形態に及ぼす影響を調べた。ウスニン酸カリ、デニトロフェノール、ジエチルチオカルバミン酸ソーダ、オーレオマイシンの腹腔内投与は、腹水細胞の発生分化に抑制的であり、第Ⅰ型細胞の出現率を高く、第Ⅲ型細胞のそれを低くさせた。

(3) コハク酸脱水素酵素活性は定量的にも、組織化学的にも第Ⅲ型細胞に高く、乳酸脱水素酵素は逆に第Ⅰ型細胞に高いことが知られた。

(4) フォスファターゼは腫瘍細胞分化に伴い、酸性フォスファターゼ、フォスフォアミダーゼの増加が見られるが、アルカリフォスファターゼの増加は殆んど認められない。

(5) DNA, RNA は組織化学的には第Ⅱ型細胞に多いように見え、細胞分裂時、DNA は分裂前期に増加、

後期に半減し、漸次静止核量に達するのが認められたが、これらにはさらに定量的裏付けを必要とする。

(6) 各種アミノ酸染色, Mg 染色, コリンエステラーゼ, リパーゼ等では特記すべき所見が得られなかった。

(7) ズダン黒法によつて腫瘍細胞体に脂肪粗大顆粒を染出したが、第Ⅲ型細胞に最も多い。

(8) 腫瘍明庭部には、脂質、コハク酸脱水素酵素、酸性フォスファターゼ、糖蛋白が染め出され、その意義を検討した。

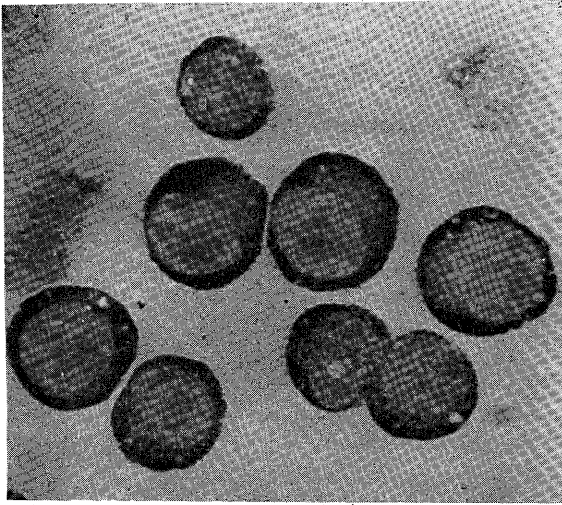
稿を終えるにあたり御指導御校閲下さつた石川教授、倉田助教授に感謝申し上げます。

文 献

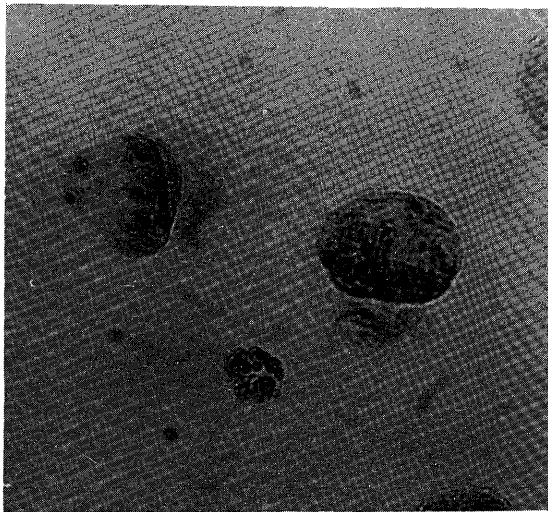
- 1) Greenstein : Biochemistry of cancer 2ed, 1954 New York.
- 2) 三富 : 十全医学会雑誌, 57 : 281-319 昭和30.
- 3) 吉田 : 吉田肉腫, 寧楽書房, 昭24.
- 4) 高木 : Mem. Coll. Sci., Kyoto Imp. Univ., Series B15 : 167-206, 1939.
- 5) 大原・倉田・橘 : 医学と生物学, 25 : 111-113, 昭27.
- 6) Bensley, R. R. : Anat. Rec. 69 : 341-353, 1937.
- 7) 倉田・沢口 : 未発表.
- 8) Gustafson, T., (G. H. Bourne & J. F. Danielle) : International Review of Cytology III.
- 9) 小山 : 大阪大学医学雑誌, 6 : 349-364, 昭29.
- 10) G. Gomori, M. D. : Microscopic Histochemistry. p. 184 Chicago.
- 11) 武内他 : 癌, 42 : 217-219, 1951.
- 12) 杉本他 : 癌, 42 : 258-260, 1951.
- 13) 嬰川他 : 癌, 44 : 138-140, 1953.
- 14) 飛岡他 : 癌, 44 : 117-120, 1953.
- 15) 堤 : 医学と生物学, 34 : 265-268, 昭30.
- 16) 青木他 : 癌, 45 : 223-226, 1954.
- 17) 安田他 : 癌, 45 : 170-172, 1954.
- 18) 大原・井上 : 日本病理学会々誌, 38 : 109-110, 1954.
- 19) 杉本他 : 癌, 44 : 167-169, 1953.
- 20) 飛岡他 : 癌, 43 : 227-228, 1952.
- 21) Boivin, A., Vendreley, R., Vendreley, C., : Compt. rend. 226 : 106, 1948.
- 22) Mirsky, A. E., Ris, H., : Nature. 163 : 666, 1949.
- 23) 柴谷・江上 : 核酸, 共立出版株式会社, 昭28.
- 24) Chiffelle and Putt : Histochemistry Theoretical and Applied by A. G. Everson Pearse. 445 London 1953.
- 25) 朝野 : 癌, 43 : 223-225, 1952.
- 26) 柴橋 : 癌, 44 : 132-134, 1953.
- 27) Oohara, Kurata : Saiensu. 1 : 87, 1946.
- 28) 森 : 組織化学の理論と方法, 81-82, 南山堂, 昭26.
- 29) 大原 : 未発表.
- 30) 岡本 : 日本病理学会々誌, 35 : 12-21, 昭21.
- 31) G. Gomori, M. D. : Microscopic Histochemistry. 205 Chicago. 1952.
- 32) 安田・細 : 癌, 43 : 64-65, 1952.
- 33) 倉田・細 : 医学と生物学, 18 : 103-105 昭26.
- 34) Koelle, G. B. : J. Pharm. & Exp. Therap. 103, 1 (1951).
- 35) 高松・大月 : 癌, 35 : 283, 1941.
- 36) 久保他 : 癌, 37 : 286-288, 1943.
- 37) 久保・高松 : 日本病理学会々誌, 33 : 219-220, 1944.
- 38) 武内 : 日本病理学会々誌 (地方会号), 42 : 4-6, 1953.
- 39) J. Needham : Chemical Embryology. Cambridge University Press, Cambridge 1931.
- 40) 倉田 : 蛋白質・核酸・酵素, 1 : 32, 1956.
- 41) 安田他 : 癌, 43 : 225-227, 1952.

Abstract

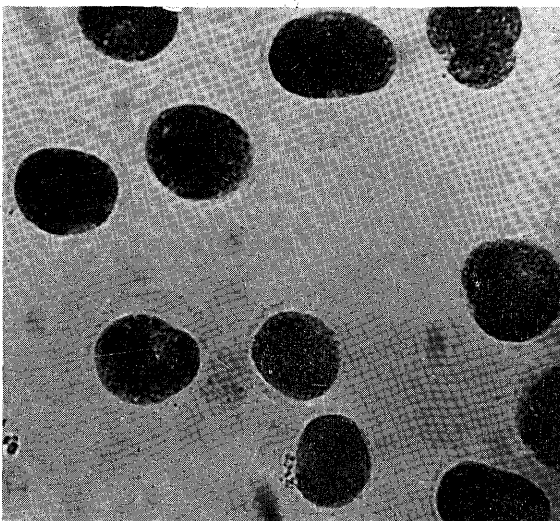
The author distinguished morphologically and planimetrically the three differentiation types of the Ehrlich ascites tumor cells. The uncouplers such as potassium usnicate, dinitrophenol, sodium diethyldithiocarbamate and aureomycine act inhibitorically on the differentiation of the tumor cell. It was observed quantitatively as well as histochemically that the succinic dehydrogenase, acid phosphatase, phosphoamidase and lipin increased during the development of the tumor cell, while the lactic dehydrogenase decreased. Succinic dehydrogenase, acid phosphatase, glycoprotein, lipin etc. were concentrated in the chromophobic zone of the cytoplasm.



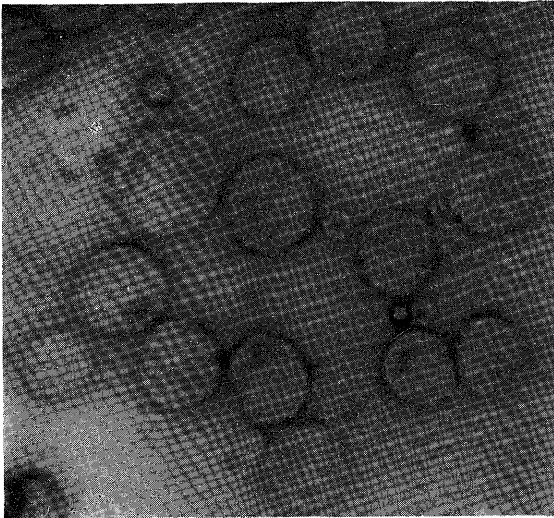
(1)
ギムザ染色



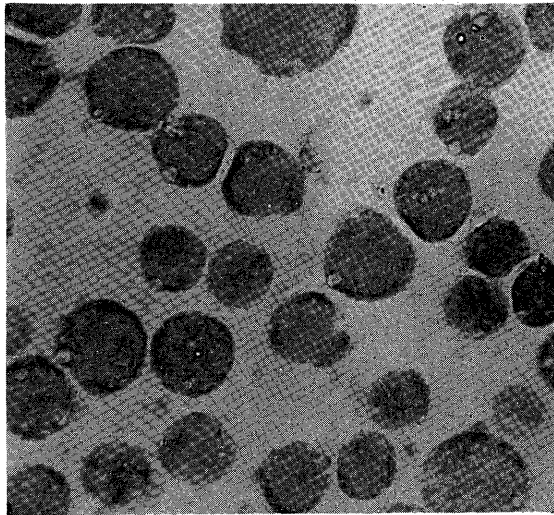
(2)
酸性フォスファターゼ
(Gomori 法)



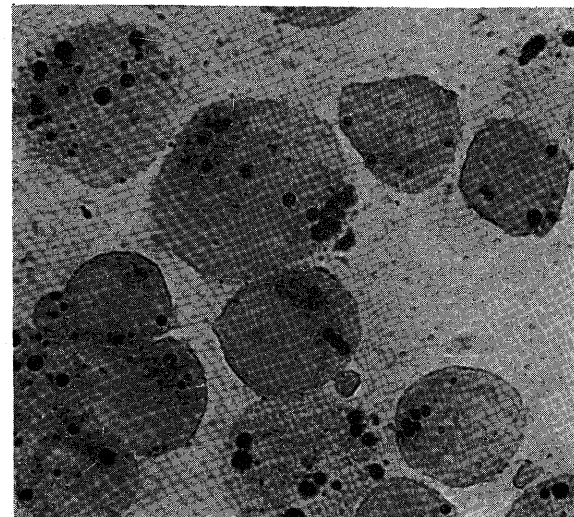
(3)
フォスファターゼ
(Gomori 法)



(4)
チトール
(糖蛋白反応)



(5)
リボ核酸
(メチルグリン・ピロニン染色)



(6)
脂 質
(ズダン黒染色)