

対照両群共に陰性に終つたのは、此らの戻り接種が腫瘍腹水をマウスに接種後6日目に穿刺した液によつて行はれた為に、上述の如く正常マウスの天然免疫によつて G. Z. が障害され、変性消失したためである。

### 結 論

1. Virus HST 免疫マウスの腹腔内に吉田腫瘍腹水を接種し逐日的に之の腹水をラツテへ戻り接種した所、腫瘍の形成が全く認められなかつた。

2. 対照群ラツテでは明かに腫瘍が形成され、肉眼的に認められない場合でも大網伸展

標本によつて顕微鏡的に腫瘍の形成が認められた。

3. 以上の事実から Virus HST によつて作られた中和抗体は吉田腫瘍細胞の増殖性を特異的に抑制すると信ぜられる。

4. 対照群ラツテでは漿膜細胞の腫瘍細胞への移行型が逐日的に追及できたが、免疫群ではこのような所見が得られなかつた。

5. 免疫群ラツテの腹腔内では、単核球、白血球及び肥胖細胞の増加を来すが、対照群ではそれらが減少又は消失する。

擧筆するに臨み終始御懇篤な御指導と御校閲を賜つた恩師浜崎教授に慎んで謝意を表す。

### 参 考 文 献

- 1) 浜崎等. 第11回日本癌学会総会 (昭27)
- 2) 川喜田. 瀧過性病原体. 225. (昭24) 学術書院
- 3) Rous, P. J. *Exp. Med.* **13**; 397. (1911)
- 4) 藤浪. 京都医学会雑誌. **7**; 3, 115. (明43)
- 5) Shope, R. E. *J. Exp. Med.* **58**; 603. (1933)
- 6) 青木. 岡山医学会雑誌掲載予定.
- 7) 浜崎・佐藤等. 第61回岡山医学会総会 (1951)
- 8) 浜崎・佐藤・永野. *癌*. **41**; 109. (1950)
- 9) 浜崎等. *癌*. **42**; 237. (1951)
- 10) 佐藤. 岡山医学会雑誌掲載予定.
- 11) 吉田. 吉田肉腫. 137. (1949) 寧楽書房.
- 12) 浜崎・谷. *癌*. **42**; 235. (1951)
- 13) 浜崎等. 第11回日本癌学会総会 (昭27)
- 14) Banting, F. G. *Proc. Roy. Soc. Med.* **32**; 245-254. (1939)
- 15) Magill & Francis, 川喜田及び田崎. 瀧過性病原体 142. (1949) 学術書院.
- 16) 吉田. 吉田肉腫. 155. (1949) 寧楽書房.
- 17) 菅原. 新臨牀. **4**; 4, 136. (1950)

## ケトエノル顆粒の Ribonuclease による検索

岡山大学医学部病理学教室 (指導 浜崎教授)

研 究 生 谷 弘 光

[昭和27年8月10日受稿]

### 序 言

最近10年間の生物学界を展望して、最も著しい進歩を示したものの一つに組織化学がある。数十年来純形態学的に探求されてきた組織学が近来頓に発達して来た化学、殊に核酸化学を導入して幾多の未開の分野を開拓し、細胞や細胞核の形態と機能との生物学的

関聯が今や明かにされようとしている。

浜崎教授<sup>1)</sup>は早くからこの問題に着目され、昭和8年解合性 DNA (desoxyribonucleic acid) の特殊証明法である「石炭酸フクシン沃度法 (KFJ法) を発見され、爾来教授並びに門下生の広範囲に亘る研究によつて、ケトエノル顆粒 (KEG) が Oligonucleotide を主成分とし之に少量のリポイドの加はつた DNA 系物

質であることは最早間然する所なく解明され、DNAの組織化学的証明法として重合性DNAを証明する Feulgen 反応 (F 反応) と並んで、KFJ 法は解合性 DNA の特殊証明法として核酸代謝の研究には必要不可欠からざる証明法となった。

私は今回生鮮組織に Ribonuclease (RNase) を作用せしめ KEG の消長を検索して一知見を得たのでここに報告する。

### 実験材料並びに実験方法

実験材料は同一正常マウスの肝、腎、心の小片をとり、之を柴谷氏より譲渡された精製 RNase の 0.15% 蒸溜水溶液中に、35°C 30 分 1 時間及び 60°C 1 時間、1.5 時間、3 時間浸漬した後、クローム合剤固定を施し型の如くパラフィン切片として、KFJ 法並びに F 反応原法を行い、対照として酵素を含まない蒸溜水中に上記組織小片を実験と同様浸漬処理し、両者を比較検討して KEG に対する RNase の作用を検索した。

### 実験成績

肝  
35°C 30 分

F 反応では組織表面の肝細胞核は濃縮性となり彌漫性淡紅色乃至紫紅色に染り、中に F 反応陽性顆粒 (F-Gr) を数個容れているが、やゝ深部では 0.5~1 $\mu$  大の核内 F-Gr が少々増加している。星細胞核は組織辺縁部において濃縮性となり彌漫性に紅染している。

KFJ 法を行うと組織辺縁部では核は淡紫紅色乃至淡紫色に彌漫性或は微細顆粒状にそまつて核内に KEG を認めず、原形質内に 0.5 $\mu$  大の KEG の他に 2~3 $\mu$  大時に数  $\mu$  大の稜角性 KEG の増加を認める。これ等の所見は対照標本でも同様に認められる。

35°C 1 時間

F 反応で肝細胞核の彌漫性呈色及び少々呈色性の減弱した核内 Gr の増加は少々深部に進み、組織辺縁部の肝細胞核は自家融解のために彌漫性呈色を減弱して 0.5~1 $\mu$  大の F-

Gr が明瞭に認められるようになり、更に核は次第に反応陰性化して空泡化する。中心部においても自家融解のため核内 Gr は減少し核は淡明となる。

KFJ 法を施すと核内に呈色性のやゝ弱い F-Gr が増加した細胞核では KFJ 法に僅かに呈色する淡紫色の Gr が核内に増加する。組織辺縁部で核の空泡化を認めた肝細胞では、原形質内に呈色性中等度の小さい (0.5~1 $\mu$  大) KEG の増加を認めるが原形質の彌漫性呈色はなく、核の空泡化が更に進行した肝細胞では KEG は減少し少々増大して 2~3 $\mu$  大となり、時に中空性の大きいケトエノルリポイド (KEL) を少数認めるようになる。

対照では実験に比し F 反応で核の彌漫性に呈色する肝細胞が少々多く認められ、KFJ 法を行うと 0.5~2 $\mu$  大の KEG が原形質内に少々多く認められる。

60°C 1 時間

F 反応を検すると組織中央部の核内 Gr は減少且小さくなっているが、組織表面に近い部分では核内 F-Gr が増加増大し、更に外層部の肝細胞核は彌漫性呈色を示している。星細胞核は実質細胞核に比し抵抗強く組織全般に彌漫性に呈色している。

KFJ 法では KEG は 35°C 1 時間に比し減少し組織中央部では原形質内に 1~2 $\mu$  大の少数の KEG を見るが、核内に F-Gr の増加した肝細胞核内には淡紫色 Gr を認めることが出来る。

対照では F 反応で核の彌漫性呈色は実験に比して深部迄及び、原形質は彌漫性淡紫色に呈色しているが、表層部ではそれは既に減弱している。KFJ 法を行うと深部では原形質は彌漫性淡紫色に呈色し中に微細顆粒状の KEG を多数認めるが、表層部では KEG は増大し原形質の彌漫性呈色も減弱している。

60°C 1.5 時間

F 反応では実質細胞核の彌漫性呈色は 1 時間に比し減少し、組織深部の核内 Gr は 1 時間に比し増加し、表面に近づく程増加しているが、一般に小さく 0.5~1 $\mu$  大で原形質内

には F-Gr を認めない。星細胞核も組織周辺部において彌漫性呈色が減弱し空泡化したものもある。

KFJ 法を行うと組織中央部において KEL の他に少数の小さい KEG を見るが、周辺部では明瞭な KEG を認めず、核内に  $0.5\mu$  大の淡紫色 Gr の増加を認め、核膜はそれより稍々強く呈色している。

対照では実験に比し自家融解が強く肝細胞離開を認める。F 反応では核内 Gr は実験よりやゝ多く原形質は淡紫色彌漫性に呈色しており、KFJ 法でも前時間同様の微細な KEG を多数認めるが、周辺部では KEG は前時間に比し減少し  $2\sim 3\mu$  大の KEG を少数認める。

#### 60°C 3 時間

F 反応では肝細胞離開を認め肝細胞核は彌漫性に呈色し原形質も彌漫性淡紫色に染つている。深部の実質細胞核は 1.5 時間に比し核内 Gr の減少、呈色性の減弱を来し空泡化の傾向が強く認められる。

KFJ 法では空泡化した肝細胞核は核膜のみ紫色に呈色し核内は全く淡明に見えるが、中央部では核内に淡紫色 Gr に混在して呈色性は稍々弱い明瞭な KEG を認め、原形質は淡紫色彌漫性或は微細顆粒状に呈色し  $1\sim 2\mu$  大類円形濃紫色の KEG を少数認める。

対照の F 反応で肝細胞離開は実験より強く周辺部の核は消失している。深部の肝細胞核は彌漫性に呈色し、KFJ 法で原形質はやゝ強く紫色彌漫性に染り明瞭な KEG を認めない。

#### 腎

#### 35°C 30 分

F 反応でやゝ深部の主部上皮細胞核は核内 Gr が稍々増加し、それより周辺部では核は彌漫性紫紅色にそまり、最外層  $2\sim 3$  列では核は反応陰性化している。間質細胞核は濃縮性で彌漫性紫紅色にそまつている。

KFJ 法では F 反応で核内 Gr の増加した主部上皮細胞核は核内に  $0.5\sim 1\mu$  大淡紫色の Gr を容れているが明瞭な KEG を認めず、原形質内に KEG がやゝ増加している。周辺部では核は彌漫性淡紫色に染り核膜が淡紫色

に呈色性を帯びてくると、核周に  $0.5\sim 1\mu$  大の明らかな KEG が出現して更に増加増大し、この部の原形質内 KEG は最も増加している。F 反応で核の反応陰性化したものでは原形質の KEG は減少する。

対照では F 反応で核の反応陰性と化したものが実験に比し多く、KFJ 法では KEG は実験に比しやゝ粗大でその数が少い。

#### 35°C 1 時間

F 反応で主部細胞核の反応陰性化は組織表面より  $100\sim 200\mu$  の深さに及び、核内 Gr の増加乃至彌漫性呈色は中心部にまで及んでいる。

KFJ 法では 30 分に比し一般に KEG は減少し、殊に組織周辺部の KEG に著しいが、中央部では増加している。最も興味ある事は核が F 反応陰性化の傾向にある時、核内に  $0.5\sim 1\mu$  大稜角性境界明瞭な KEG が認められる事である。

対照では F 反応で核の反応陰性化は殆んど全組織に及び、KFJ 法を行うと KEG は実験に比し粗大で少い。尙実験、対照の間質細胞核や糸毬体上皮核は F 反応で濃縮性彌漫性に染り、KFJ 法では淡紫紅色彌漫性に染つて KEG を認めない。

#### 60°C 1 時間

F 反応では  $35^\circ\text{C}$  1 時間で反応陰性化した核内に微細な F-Gr が組織周辺部より深部に向つて次第に増加し、表層部では核内 Gr の増加した核や彌漫性呈色を示した核が混在している。

原形質は組織全体にわたり彌漫性淡紫色に呈色し稀に核に近く  $0.5\mu$  大の微細な F-Gr を認めるが、組織周辺部では原形質の呈色性は減弱している。

KFJ 法を行うと組織表面より稍々深部において核に近く微細顆粒状乃至  $1\sim 2\mu$  大の KEG が増加し、核内にも明らかに KEG が認められ一部の核は KEG が充満している。間質細胞核や糸毬体上皮の核膜に外接して  $0.5\sim 1\mu$  大の KEG が  $1\sim 2$  個出現する。

対照では実験に比し F-Gr の増加及び原形

質の彌漫性呈色は著明でなく僅かに組織中央部に認められ、KEG も組織周辺部には認められず、中央部に微細顆粒状又は  $1\sim 2\mu$  大の KEG の増加を見る。

#### 60°C 1.5 時間

F 反応を検索すると主部上皮細胞核は深部においては 1 時間に比し核内 Gr の増加を来すが、周辺部では核の反応陰性化が起り、原形質の呈色性も消失している。KFJ 法を施すと深部では核内及び核膜に接して小さい KEG が増加し更に増加増大して原形質遊離縁に近く  $1\sim 3\mu$  大の大きい KEG を生ずるが周辺部では KEG は消失している。

対照では実験に比し核内 F-Gr は少く原形質は彌漫性に呈色しているが、組織周辺部では核及び原形質の呈色性が消失している。KFJ 法でも深部においては微細顆粒状乃至  $1\sim 2\mu$  大の KEG が主部上皮細胞内に多数充満しているが（この部の KEG は実験より多い）、辺縁部では減少している。

#### 60°C 3 時間

F 反応で主部上皮細胞原形質の呈色性はやや減弱し、核の空泡化も進行して表面より  $50\sim 70\mu$  の間の核は全く反応陰性と化している。

この部を KFJ 法で検索すると KEG は全く認められず、深部では  $2\sim 3\mu$  大の KEG 及び KEL を細胞遊離縁に近く認める。

#### 心

#### 35°C 30 分

F 反応では組織表層部の筋核の核内 Gr が増加して彌漫性呈色を示しやや濃縮性である。このような筋細胞の原形質は淡紫色彌漫性に染つている。間質細胞核は濃縮性である。

KFJ 法では組織表層部の筋核内に淡紫色 Gr を数個認め原形質は紫色彌漫性或は微細顆粒状にそまり  $1\sim 3\mu$  大濃紫色 KEG が増加している。

対照では F 反応で筋核の彌漫性呈色を示すものはやや深部まで認められ、原形質の呈色性も僅かに強く、KEG は微細なものがやや多数認められる。

#### 35°C 1 時間

F 反応で核内 Gr の増加、彌漫性に呈色した核及び原形質の増加を認める。

KFJ 法では 30 分に比し軽度に KEG は増加している。

対照は実験より筋核の彌漫性呈色及び核内 Gr の増加及び原形質の呈色性も著明で、KFJ 法で KEG も多少多く又大きい。

#### 60°C 1 時間

F 反応で核内 Gr の増加及び彌漫性呈色を示す筋核は増加して組織全般に亘つて認められるようになり、原形質の彌漫性呈色は  $35^\circ\text{C}$  1 時間に比し減弱している。

KFJ 法では KEG は一般に減少し稍々増大している。

対照では F 反応で核内 Gr の増加及び彌漫性呈色を示す筋核は実験に比し少く原形質の呈色性はやや強いが、KFJ 法で KEG は実験群に比し  $1\sim 2\mu$  大の KEG が稍々多く原形質は彌漫性紫色に呈色していて、核内には  $0.5\mu$  大境界がかなり明瞭な淡紫色 Gr を認める。

#### 60°C 1.5 時間

F 反応では組織全体にわたり彌漫性呈色を示す核は減少し原形質の彌漫性呈色は深部に稍々増強している。

KFJ 法では KEG は周辺部に少く深部に多いが、一般に小さく、その部の筋核内には明瞭な  $1\sim 2\mu$  大の KEG を 2~3 個認めるものがある。

対照では上記核及び原形質の呈色性はやや強く KFJ 法で KEG は実験より大きく稍々多い。

#### 60°C 3 時間

F 反応で筋核の彌漫性呈色はやや減弱し原形質の呈色性は増強しているので、KFJ 法を行うと KEG は 1.5 時間より増加している。

対照では KEG はやや大きく原形質は濃紫色彌漫性に呈色している。

### 總括並びに考按

KEG が Oligonucleotide を主成分とする

DNA 系物質である事は最早や疑いのない事実であるが、昭和8年浜崎教授の発見以来現在までに行はれた成績を顧みると、KEG は Nucleotidase<sup>2)</sup> 及び酸 Phosphatase<sup>3)</sup> の作用を受け、冷三塩化醋酸<sup>4)</sup>、温過クロール液<sup>5)</sup> 及び 0.25 % のパリット水<sup>6)</sup> によつて抽出される。紫外線吸収性<sup>7)</sup> は我国では設備の都合上 2600Å の光源を利用できないので、2750Å 及び 2800 Å の光源で紫外線顕微鏡写真を撮影し検索したところ、KEG は明らかに細胞顆粒中最も強い吸収性を示し、上記の抽出を行った後にはこれが消失する事が判明した。又 Desoxyribonuclease<sup>8)</sup> によつては KEG は消化されず、本酵素により核の Feulgen 陽性度が減少するに従つて細胞質が呈色性を得て KEG が増加する事が明らかとなつた。

R-Nase による消化試験は切片では不変であつたが、KEG は DNA 系の Oligonucleotide が少量のリポイドと結合して組織内に存在するものであるために、Cr 台剤固定を行った後ではリポイドに妨げられて酵素の作用は及び難い。従つて Cr 固定に先き立ち或程度リポイドを除いておくか、又は生鮮組織で処置してその後 Cr 固定を行はねばならない。然し乍ら生鮮組織では自家融解作用のために 37°C 3 時間以上の実験に耐えないし、又 R-Nase の至適温度は Kunitz<sup>9)</sup> によれば 65°C であるので、本実験のように R-Nase を 60°C の恒温槽で作用させると自家融解作用を避ける事は出来ない。

今回の実験を総括すると、肝では先づ核内に F-Gr の増加及び核の紫紅色彌漫性呈色が現はれ、KFJ 法では原形質内に微細な KEG がやや増加する。重合性 DNA の解合が進むと F 反応で核内 Gr の呈色性の減弱、更に核の反応陰性化が起るが、KFJ 法では核内に淡紫色に染る Gr が認められ、この Gr は F 反応が明瞭でなくて両者の中間に位置する KEG 前階級物である。KEG が F 反応原法によつては十分呈色しない事は浜崎教授<sup>10)</sup> (1939) が既に報告された所であるが、浜崎、佐野<sup>11)</sup> の F 反応改良法を行えば KEG が 1 規

定 HCl による 2~3 分の水解で最も著明に呈色するので、この KEG 前階級物も上記改良法を施せば十分呈色し、面白い結果が得られるであらうと想像される。

この KEG 前階級物が核内に増加する時期には原形質内に微細な KEG が新生されるが、核の空泡化が進行すると原形質 KEG も減少する。次いで空泡化した核内に再び F-Gr の増加及び彌漫性呈色が現はれ、前記同様の経過をとつて核の F 反応陰性化へと進むが、この際核の重合性 DNA は完全に Oligonucleotide にまで解合しないうちに原形質に浸出するために F 反応では原形質の彌漫性呈色となり、之が Cr 固定 KFJ 法を施されると微細な呈色性のやゝ弱い KEG として証明される。更に重合性 DNA の解合が核内で速かに行はれて Oligonucleotide を生ずると、F 反応では核は空泡化し反応陰性化するが、KFJ 法で核内に明瞭な KEG が検出される。この核内 KEG の出現及び原形質の F 反応陽性は、浜崎、谷<sup>8)</sup> が Desoxyribonuclease による実験を行った際、本酵素によつて重合性 DNA が核内で解合されるために一層著明に証明し得た事実であり、又三船<sup>12)</sup> が無菌的保存法による自家融解実験において 37°C 4 時間の肝細胞核内に KEG の出現を報告している所より、本実験においても重合性 DNA の分解が核内におこり、その一部が原形質内に浸出したと解釈することが出来よう。

又 R-Nase を作用させた実験群と然らざる対照群とを比較すると、組織化学的所見には大差がないが、唯実験群よりも対照群の方が上記の変化が早期に現はれ、KEG も前者より後者に多いので、実験群における自家融解作用即ち組織内諸酵素の作用が R-Nase の為に阻害されたと考えざるを得ず、又 KEG が対照群より実験群に少いと云う事実は KEG が R-Nase の作用を受けて幾分消化されたとも考えられる。況して Cohen<sup>13)</sup> も云つていように結晶性 R-Nase でも蛋白分解酵素を含むのであるから、今回の実験に供した R-Nase にも不純物が混じていたのかも知れない。

次に KEG の消長を見ると、肝、心においては 35°C 1 時間、腎では 35°C 30 分で最も増加し以後次第に減少している。三船は 37°C で無菌的に保存して肝は 8~12 時間、腎、心は 12~16 時間に於て最も著明に KEG が発現したと云ひ、又永野<sup>14)</sup>も同様に蛙の肝、腎、心を検索した所、8 時間で増加し始め以後 20 時間までに最も多数且著明に現れると云つてゐるが、氏等の実験方法は直後及び 4 時間以後をとつた為に 4 時間までの KEG の消長が不明であつたが、今回の実験によつて 35°C 30 分~1 時間頃にも KEG の増加がある事が判明した。

### 結 論

1. 生鮮組織にリボヌクレアーゼを作用さ

### 参 考 文 献

- 1) 浜崎幸雄. 日病会誌 24 ; 91. (1934)
- 2) 浜崎幸雄. 細胞核の生理と病理 65. (1952)
- 3) 浜崎幸雄. 細胞核の生理と病理 186. (1952)
- 4) 浜崎幸雄. 細胞核の生理と病理 185. (1952)
- 5) 浜崎幸雄. 細胞核の生理と病理 185. (1952)
- 6) 浜崎幸雄. 細胞核の生理と病理 185. (1952)
- 7) 浜崎・谷. 日新医学 39 ; 2, 69-71. (昭 27)
- 8) 浜崎・谷. 日新医学 38 ; 12, 677-679. (昭 26)

す場合には、之に自家融解が起り又蛋白融解酵素の作用が加はるために成績の判定が困難であるが、一般に KEG はリボヌクレアーゼの作用を受けないものと思はれる。

2. 核の重合性 DNA が核内で解合される際、F 反応原法にも KFJ 法にも弱陽性を示す KEG 前階級物が生ずる。

3. マウスの臓器では自家融解作用に因る KEG の増加は 25°C 30 分乃至 1 時間で既に認め得られる。

4. 自家融解作用は腎に最も強く、肝之に次ぎ、心は最も緩徐である。

終始御懇篤なる御指導と御高閣を賜つた恩師浜崎教授に深甚なる謝意を捧げる。

- 9) Kunitz, M. J. Gen. Physiol. 24 ; 15. (1940)
- 10) 浜崎幸雄. 細胞核の生理と病理 184. (1952)
- 11) 浜崎・佐野. 日病会誌(地方会号) 38 ; 5. (1949)
- 12) 三船. 岡山医学会雑誌 51 ; 1842. (1939)
- 13) Cohen, S. S. J. Biol. Chem. 158 ; 255. (1945)
- 14) 永野. 岡山医学会雑誌投稿中。

## 原発性肝臓癌の病理解剖學的並びに統計学的研究

岡山大学医学部病理学教室 (指導 浜崎教授)

研 究 生 谷 弘 光

[昭和 27 年 8 月 10 日受稿]

### 序 言

我国に於け原発性肝癌は欧米諸国に比し遙かに多く、三浦<sup>1)</sup>の報告以来山極<sup>2,3,4)</sup>、貴家<sup>5,6,7)</sup>の詳細な研究に次いで多数の報告例及び統計的観察が発表せられ、一方実験的肝癌も佐々木、吉田<sup>8)</sup>の発癌成功以来急速に進展してそれが腫瘍学に残した功績は大きい。

肝癌の統計的研究も貴家の 110 例に始まり、菅原<sup>9,10)</sup>の昭和 17 年末まで合計 348 例の多きに達している。岡山においては明治 4 年武内<sup>11)</sup>が 5 例を発表し、次いで中村<sup>12)</sup>が昭和 11 年迄の 10 年間に剖検せられた 16 例の原発性肝癌の統計学的並びに組織学的研究を発表した。

今回私は中村の報告以後 16 年間に当病理