

組織内核酸系物質に対する過塩素酸処理について

第Ⅰ篇 ケトエノール物質に対する温過塩素酸処理並に

バリット水処理に対する温度影響について

岡山大学医学部病理学教室 (指導 浜崎教授)

助手 青 木 徹

[昭和 27 年 10 月 10 日受稿]

緒 言

冷過塩素酸によつて組織内のリボ核酸が抽出され温過塩素酸によつてデオキシリボ核酸が抽出されることは生化学的に周知の事実である。私は従に第一篇に於て冷過塩素酸処理により組織内リボ核酸 (RNA) の分別所見について検索し前者は完全に抽出されるが後者は全く変化のないことを報告した。今回は温過塩素酸処理のケトエノール物質 (KES) 及びデオキシリボ核酸 (DNA) に及ぼす影響を観察し組織化学的に甚だ興味ある所見を得たので茲に報告する。

実験材料及実験方法

正常なマウスを用ひ主要全臓器の小片に浜崎氏 Cr 台剤固定法を施し型の如く 5μ のパラフィン切片となし下記の如き種々前処理を行つた。1) 対照 (無処理の切片) 2) 4°C 10% 過塩素酸 (P 酸) 18 時間 3) 0.25% 4°C , 10°C , 20°C , 30°C Baryt 水 (B 水) 15 時間 4) 60°C 蒸溜水 15 分間 5) 60°C 10% P 酸 15 分間, 以上何れも水洗後浜崎氏の石炭酸フクシン沃度法 (KFJ 法)¹⁾を行ふ。6) 対照 (無処置切片) 7) 60°C 蒸溜水 15 分間 8) 60°C 10% P 酸 15 分間, 以上 6)~8) は Foulgen 反応 (F 反応) を行ふ。9) 温 P 酸 15 分間前処理後, 定規温塩酸加水分解を省略して F 反応を行つた。他方同組織小切片に F 氏原法固定を施し加水分解に夫々温 P 酸及び定規温塩酸を使用し F 反応を行ひ加水分解法の呈色に及ぼす影響を比較した。

実験成績

以下無処置対照切片を基準にして述べる。

心臓：筋繊維中には $0.3\sim 0.5\mu$ から不整塊状粗大稜角性のケトエノール顆粒 (KEG) 多数を認め、微細な KEG 筋繊維間に縦列的にやや規則正しく現はれているが、粗大顆粒はその間隙或は筋繊維外側に露出して存し類円形或は滴状中空性に見える。 40°C B 水では KEG は完全に消失し類円形顆粒も幾分呈色性を減ずるが 20°C になると KEG 及 KEL は凡て消失する。温 P 酸分別を行ふと微細顆粒及不整粗大稜角形顆粒は完全に消失するが少数の類円形乃至滴状顆粒 (KEL) は淡赤色を呈して残留する、又無処置では呈色しなかつた筋核は核膜、色質共に呈色しその出現状態は F 反応所見に一致する。但しこの色調はやゝ赤味が強い。

肺臓：中隔細胞原形質内には顆粒は一般に認め難いが一部に於て 0.5μ 大の KEG が僅かに密集する所がある。又肺胞内に遊離せる細胞内には $0.5\sim 2.0\mu$ 類円形乃至中空性の KEL を少数に認める。微細 KEG は 4°C B 水で消失するが KEE は 10°C に於ても尙呈色の増強を示し 20°C になると紫色調を失ふに至る。温 P 酸分別では中隔細胞内の KEG は全く消失するが一部に於て又肺胞内に遊離せる細胞内には類円形乃至滴状顆粒は淡紫赤色に認められる。尙すべての細胞核は淡紫染し F 反応像に全く一致して現はれる。

肝臓：実質細胞原形質内には主として $1\sim 5\mu$, 稀に融合して更に大なる滴状或は中空性

の KEL が多数に存するが顆粒は一般にその辺縁紫色調を呈し中央部は赤味を帯びる。その間隙には少数の $0.2\sim 0.5\mu$ 大の KEG を認めるが一般に両顆粒共に細葉中心部に多い。4°C B水では KEL は紫色調を増して明瞭であるが微細な KEG は一部は消失し尙少数は残留する。10°C になると微細 KEG は更に一部減少するが極く少数は残留し、KEL には変化を認めない。20°C では KEG は凡て消失し又滴状顆粒もやゝ紫色調を減じ一部消失し始めるが 30°C で完全に消失する。温 P 酸分別では KEG は凡て消失し KEL は対照に比し呈色性を減弱して淡紫赤色であるが尙明瞭である。又肝細胞核は核膜及少量乃至中等量の色質は淡紫赤色を呈し一部のものは核小体殻も比較的明瞭であつて本所見は全く F 反応に一致する。

脾臓： 腺胞細胞核は一般に淡明なものが多い。顆粒は僅少であつてその着染性も余り強くないが、粉末状から微細稜角形乃至短糸状のもの及び $2\sim 3\mu$ 類円形乃至滴状を呈しその分布状態は不規則である。ラ氏島にも 1μ 大の円形顆粒少数を認めるに過ぎない。4°C B水分別を行ふも微細 KEG は尙少数散見せられ KEL は凡て濃紫色を呈する。10°C B水では KEG は極く少数を残留するのみで又 KEL もやや呈色性を減ずるが、20°C になると KEG は完全に消失し KEL も殆ど認め難くなる。温 P 酸分別では KEG は全く消失するが KEL は僅かに紫赤色調を呈して残留する。細胞核は鮮明であつて核膜、色質は淡紫赤色に現はれる。

腎臓： 糸球体内皮細胞及びヘンレ氏係蹄狭部には顆粒は殆ど認められない。細尿管主部及び潤管に於ては極く少数の 0.5μ 大 KEG 及び $1\sim 3\mu$ 大の KEL 少数を認める。髓質のヘンレ氏係蹄広部には少数の微細 KEG 並に中等数の $2\sim 3\mu$ 大 KEL を散見する。4°C B水分別では上記 KEG は一部消失するが尙主部及び潤管に稜角形顆粒少数残留し KEL は凡て紫色調を増強する。10°C B水では KEG の大部分は消失し 20°C になると完全

に消失する。KEL は残留するが次第に呈色性を減じて来る。30°C では顆粒は全く認められない。温 P 酸分別では KEG は完全に消失し KEL はやゝ紫色調に乏しいが類円形乃至滴状中空性として明瞭に認めることが出来る。尙凡ての細胞核は呈色性に与かり核膜、色質及び一部の核小体殻共に紫赤色を呈し鮮明である。

脾臓： 一般に脾臓に於ては顆粒は極く少数であるが一少部分に於て網状織細胞の核膜に接して呈色性の弱い微細稜角形或は類円形顆粒少数を認めるに過ぎない。4°C B水分別にても微細稜角形 KEG は尙一部残留するが 10°C B水では上記顆粒は殆ど凡て消失する。温 P 酸分別では顆粒は殆ど呈色性を失ひ認め難いようであるが、網状織細胞の核膜に接して僅かに淡赤色調を呈する類円形 KEL を認めることが出来る。又リンパ球の核液は彌漫性に淡紫赤色に染り、為に色質の不明瞭なものが多いが中には色質及び核小体殻が鮮明に紫赤色を呈するものがある。網状織細胞核は淡明であつて核構造極めて明瞭でありその呈色は F 反応に全く一致する。

後胃： 粘膜上皮細胞内には顆粒は少数であるが粘膜中層から深層にかけて類円形乃至滴状中空性を呈する $1\sim 3\mu$ 大の顆粒少数を散見し、その間隙に 0.5μ 大の稜角形 KEG を僅かに認めるに過ぎない。一般に壁細胞に多く主細胞に少い。固有層及び筋層にも 0.5μ 大 KEG を散見するが少数である。微細な KEG は 4°C B水では一部残留し 10°C になると殆ど消失するが色調が強い。20°C では KEL はやゝ呈色性を減ずる傾向がある。温 P 酸分別では KEG は完全に消失し KEL も幾分呈色性を減じ又は比較的小さい類円形顆粒は消失の傾向を示すが淡紫赤色顆粒として認められる。尙核は主細胞、壁細胞共に呈色度は同様で核膜及び色質は明瞭であり少数のものに核小体殻を認め又主細胞では一部核液の僅かに呈色するものがある。以上の核所見は F 反応とよく一致する。

十二指腸： 粘膜上皮細胞の原形質内には

大小多数の顆粒を臓するが特に絨毛上皮の尖端部に多く、主として核の外側に帯状分布を示し 1~5 μ 大の類円形乃至滴状中空性 KEL 及びその間隙に細粉末から 0.5~1 μ 大の稜角形 KEG 中等数を混へている。又核内側にも少数分布するが一般に小さく粉末状のものが多く、微細粉末状 KEG は 4°C B 水分別により消失の傾向を示すがその他の顆粒はすべて濃紫色を呈し、10°C B 水では KEG は殆ど消失するが KEL は濃染する。20°C になると小さい円形状顆粒は尙一部乳糜管内に残留するのを認める。温 P 酸分別を行ふと粉末状のものから稜角形を呈する KEG は完全に消失し KEL の微細なものはやゝ減少或は呈色の減弱を来すが一般に紫赤色に濃染する。粘膜上皮細胞の核は核膜明瞭にして色調に乏しいため淡明であるが少量の色質も紫赤染され F 反応像に一致する。

小腸：顆粒の分布状態は十二指腸に似るが少数である。主として 0.5~3 μ の類円形乃至滴状 KEL が核外側に帯状分布を現はし、その間隙に 0.5 μ 大の稜角形 KEG 中等数を混へている。固有層に於ける所見は十二指腸のそれに同じい。4°C B 水では KEG の一部は消失するが尙少数は残留し 10°C になると微細な KEG は大部分消失するが 0.5~3 μ 大の円形 KEL は濃染し帯状に目立っている。20°C の所見は十二指腸に同じい。温 P 酸分別では稜角形乃至短糸状顆粒は完全に消失し又円形顆粒はその一部は呈色性を減じて不明瞭の部もあるが大部分は明瞭な紫赤色顆粒として認められる。細胞核はすべて明瞭に紫赤染され十二指腸の所見に一致するが一部の核液及び核小体殻も弱陽性に現はれている。

盲腸：顆粒は十二指腸、小腸に比し更に少く粘膜上皮細胞の尖端部に僅かに 0.5 μ 大の稜角形 KEG 及び 1~2 μ 大の類円形 KEL が少数づつ密集するのみである。基底部腺細胞もほぼ同様の所見を呈する。杯状細胞には全く認められない。固有層及び筋層にも顆粒は存しない。4°C B 水では稜角形 KEG は尙一部残留し 1~2 μ 大の類円形 KEL は反つて

呈色性を増して明瞭である。10°C 及び 20°C B 水では類円形顆粒は尙残留するが後者では呈色性を漸減する。30°C では更に呈色性を著減し僅かに淡紫色に認められるものが少数存するのみである。温 P 酸分別では稜角形 KEG は完全に消失し類円形 KEL もやゝ呈色性を減じて不明瞭であるが尙淡紫赤顆粒として一部に密集して残留する。粘膜上皮細胞核は核膜、色質は淡紫赤色に呈色し核小体殻は一般に不明瞭であるが一部呈色するものがある。杯状細胞の粘液は全く淡明中空性であつて核は不明瞭、固有層細胞核は核膜、色質共に濃染し核液も弱陽性に現はれる。以上の所見は F 反応のそれに全く一致する。

大腸：粘膜上皮細胞は一般に顆粒に乏しいが核内側に 0.5~2 μ 大の稜角形及び類円形顆粒少数を散見する。腺細胞もほぼ同様である。杯状細胞の所見は盲腸のそれに同じい。微細稜角形 KEG の一部は 4°C B 水で消失するが少数は残留しこれは 10°C で殆ど消失するが KEL は明瞭である。20°C になると KEL の一部は呈色性を漸減しやゝ赤味を増すが 30°C では完全に認められなくなる。温 P 酸分別を行うと稜角形 KEG は全く認められず 1~2 μ 大の類円形顆粒はやゝ紫色調を減弱するが尙明瞭であつて一部は淡紫色、一部は淡赤色を呈する。核の呈色並に粘液の所見は上記盲腸のそれと同様である。

睪丸：精原細胞、精母細胞の原形質内には極く少数の 0.5 μ 大の稜角形顆粒及び少数の 1~3 μ 稀に大滴状のものを散見する。前精子細胞、精子細胞には顆粒はやゝ多いが精子頭部には存しない。間細胞原形質内には 1~3 μ 、中には融合して粗大塊状顆粒多数が密集して濃染する。4°C B 水分別では実質細胞内の稜角形 KEG の大部分は消失するが前精子細胞、精子細胞には尙微細稜角形のもの少数残留し 10°C になると微細な顆粒は認められないが 0.5 μ 大 KEG を僅かに散見し尙 KEL は濃染する。20°C では KEG は全く認められないが KEL も 1 μ 前後のものは呈色性を減じ且つ間細胞の粗大顆粒も融合の傾

向を失つて $1\sim 2\mu$ 大の円形顆粒として認められる。これも 50°C では認められなくなる。尙温 P 酸分別を行うと稜角形 KEG は完全に消失するが類円形 KEL は幾分赤味を増すが残留し、又間細胞原形質内の粗大顆粒は B 水分別と同様に融合の傾向を失ひ円形に認められる。尙精原細胞核は核膜及び豊富な色質は明瞭、その他の実質細胞も核膜及び僅量の色質、並びに核小体殻も明瞭に反応に与る。

副辜丸：腺上皮細胞々体の核内側には管腔を繞つてほぼ輪状に少数の顆粒を認める。顆粒は微細稜角形乃至短糸状のものが胞体中央部或は核膜に接して認められ又 $1\sim 3\mu$ 大或は粗大な類円形乃至滴状のものを少数混へている。 4°C B 水分別を行うと微細 KEG は幾分消失するが尙残留し類円形乃至滴状 KEL と共に呈色性を増して濃紫色を呈する。 10°C では稜角形顆粒は更に減少するが尙短糸状顆粒は少数残留し 20°C になると KEG は完全に消失するが 1μ 前後の KEL も亦呈色の減弱を来す。温 P 酸分別を行うと稜角形乃至短糸状の KEG は完全に消失し又類円形、滴状 KEL の一部も呈色を減弱し淡赤色に認められるものもあるが大部分は明瞭に紫染される。又腺細胞核は核膜、色質共に紫赤染され F 反応所見と全く一致する。

大脳：皮質表層の Nissl 灰白層基質には 0.5μ 前後の稜角形顆粒を無数に認め、又錐体細胞、神経細胞原形質内にも $0.5\sim 1\mu$ 大の稜角形顆粒多数に存して極く少数は類円形を呈し濃染する。海馬廻の錐体細胞にはその核周に $0.5\sim 2\mu$ 大の類円形顆粒中等数及び 0.5μ 大の稜角形顆粒少数を認める。上記各層の稜角形 KEG は 4°C B 水に対して鋭敏であつてその大多数は消失する。但し極く少数は尙僅かに呈色性を残留する。 10°C になると大脳各層の稜角形 KEG は完全に消失し、僅かに残留する KEL も呈色性に乏しい。然し海馬廻、脈絡膜上皮の類円形乃至滴状 KEL は依然濃染され明瞭である。 20°C になると微細な類円形 KEL は幾分減少し初め又残留する顆粒も赤味を増すが 30°C になると顆粒

の大半は消失し 2μ 前後のもののみがその形骸を留める。温 P 酸分別では稜角形 KEG は完全に消失するが海馬廻及び脈絡膜上皮に於ては $0.5\sim 2\mu$ 大の類円形 KEL はすべて淡紫赤染され明瞭である。又グリヤ核は核膜、色質及び核小体殻共に明瞭。錐体細胞及び神経細胞核は一般に淡明であり呈色度はグリヤ核に比しやゝ乏しいが核膜並にその内面に接して存する僅の色質も明瞭であり F 反応所見とよく一致する。

小脳：分子層基質には微細粉末状から 0.5μ 大の稜角形顆粒多数が散在する。Purkinje 氏細胞々体は瀰漫性に紫堇色を呈し、内に $0.5\sim 1\mu$ 大の稜角形乃至不整小塊状の顆粒少数を認める。顆粒細胞層に於ても主として 0.5μ 大の稜角形顆粒を見るが少数である。小脳各層に於ける顆粒も大脳のそれと同様に 4°C B 水に対して相当鋭敏であつてその大多数は消失する。僅かに残留する微細 KEG も呈色は著しく減弱し 10°C になると殆んど認め難くなる。温 P 酸分別では稜角形 KEG は完全に消失し更に分子層に於ては小皮質細胞及び籠細胞の核は共に核膜、色質明瞭であり Purkinje 氏細胞核は不明瞭、顆粒細胞核は核膜、色質及び核小体殻はすべて濃紫赤色を呈し核液も淡染される。以上の所見は F 反応に全く一致する。

總括並に考按

第一篇に於て述べた如く Caspersson²⁾(1941) 等によつて紫外線顕微鏡の応用が始められた。併し紫外線吸収性だけではリボ核酸 (RNA) かデオキシリボ核酸 (DNA) かの区別はつかない。そこで Caspersson は紫外線顕微鏡で写し出した原形質内の吸収性物質が DNA の特殊検出法である F 反応陰性である所から此の核酸は RNA であるとした。之等の事実から一般に細胞原形質内には DNA 系物質は存しないを云はれているが注意せねばならないことは原形質内には RNA のみが存して DNA 乃至その分解産物が存しないと云うことは確証されていない。KEG の如き低分子 DNA

は温塩酸加水分解のときに融けて F 反応に与り得ないのである。

扱て温 P 酸が組織内 DNA を抽出することは化学的によく知られた事であるがこの際 KES がどんな態度を取るかは甚だ興味ある問題である。即ち浜崎の主張するが如く KES が DNA 系低分子物質なれば之によつて抽出されねばならぬ。クローム合剤固定組織切片に KFJ 法を行ふと実験成績の対照に記載の如く細胞質内には KEG, KEL の夫々稜角形及び類円形、滴状の紫赤色顆粒が各臓器特有の配列を示し、又第一篇のやうに冷 P 酸前処理を行つても RNA の如く分別せられず反つて KEG 及び KEL は共にその呈色性を増強して顆粒形態は極めて鮮明となるが温 P 酸前処理を 3 分、5 分、7 分、10 分、と経過を追つて観察した所その作用時間の進むに従つて稜角形乃至短絲状 KEG は組織切片より次第に分別せられ 15 分間の処理により完全に分別せしめることに成功した。

尙冷 B 水分別法で残留するやゝ抵抗強き KEG も本処理により完全に消失する。然も類円形乃至滴状の KEL は尙残留し紫赤色を呈する。又十二指腸等で見られた KEL は類脂体含量に富むため濃染して顆粒形態は明瞭である。他方 KEL でも紫色調を減少し又淡赤色円形顆粒として現われるものもあるが之は類脂体含量に比較的乏しいためと思はれる。尙 B 水分別に際して KEG 及び KEL が温度により影響されることを知り次のやうな結果を得た。即ち 4°C B 水分別では細胞質内の微細稜角形顆粒は心臓、大脳、小脳等に於て極く少数が残留するが殆ど大多数は消失しその他の臓器では一般にそれより多く残留する。又 KEL はすべて呈色性を増して濃染する。10°C では 4°C の所見に比し更に微細稜角形乃至短絲状のものは分別せられ完全に消失（心臓、大脳、小脳）或は極く少数が残留するのみであり然もやゝ呈色性を減ずる傾向があるが KEL には殆ど変化を認めない。20°C になると KEG は全く消失するが KEL でも微細円形のものは幾分消失の傾向を示し

その呈色もやゝ紫色調を失ふに至る。30°C になると KEL も殆ど完全に消失するが中には粗大滴状顆粒の一部は尙痕跡的に残留する（十二指腸、大脳海馬廻及び脈絡膜上皮）。以上のやうな変化は顆粒内に含有せられる類脂体の増量するに従つて B 水に対し抵抗を高めたためであつて、ほゞ純粹に近い心臓等の KEG は速やかに分別せられる。温 P 酸分別所見に於ても B 水所見とはほぼ同様のことが言ひ得る。更に興味あることは正規の KFJ 法では全く呈色しない細胞核が温 P 酸処理により極めて明瞭に紫赤染されることである。然もその呈色度は同固定切片の F 反応に比しやゝ呈色性が赤味がちであるが核膜、色質、核小体殻並に核液は F 反応と殆ど同様の所見を呈するのである。これは温 P 酸によつて重合性 DNA が解合されて低分子 DNA が出来一部は抽出され一部は核内に残留する結果と解することが出来る。尙 F 反応の際の塩酸加水分解によつて DNA の会合度が低下し核物質はメチール緑染色性を失つてピロインで赤染されることが報告されているが温 P 酸処理によつても類似の化学変化が起ると解せられる。又 Cr 固定切片の F 反応に際して温塩酸の代りに温 P 酸を作用させても反応は強陽性に現はれるがこれは温 P 酸によりプリンが遊離してアルデヒド基が露出するためであらうが前者に比し反応は更に強度である。又温 P 酸処理後正規の F 反応を行つても著明な呈色の増強が認められる。温蒸溜水処理後の F 反応は対照より僅かに反応の増強を認めるが温 P 酸水解には勿論及ばない。

Seschacher¹⁾によれば P 酸の温度が高まるに従つて高分子 DNA が低分子化され 70°C 20 分間の処理により DNA は全部抽出され F 反応は陰性になるのであるが、ケトエノール物質 (KES) が又温 P 酸により核物質の完全に抽出され得る以前に於て既に消失する事実は KES が低分子 DNA 系物質の一証左である。更にこの際核物質は重合度が低下していることは明かであるが KFJ 法で呈色陽性であると云うこととも合致する。

さきに浜崎教授⁵⁾はF反応に際して低分子DNAは溶けて流失することを指摘し、之を防ぐために原法固定法を改良した。即ち無水アルコールで固定した薄い組織片をさらにCr合剤固定を行ひ之を切片として塩酸加水分解時間を2~3分としてF反応を行うと細胞質に無定形、斑紋状或は顆粒状に弱い反応が現われ、然もそれはKEGと同定された。

更に浜崎教授⁶⁾はKEGはNucleotidase、酸Phosphataseの作用を受け、Ribonucleaseの作用を被らないこと及び冷三塩化醋酸で抽出され得ることを発表し、又浜崎教授及び谷氏⁷⁾はマウスの各種臓器の小片にDesoxyribonucleaseを作用させて孵卵器中に2~5時間貯へ、これにCr固定を施す時は核のF反応は陰性となり、斯様な部位ではKESは増量するが一般にKESは影響を受けず又2800Åの紫外線顕微鏡像ではKESに全く一致する陰影を得ていることを発表した。以上の諸実験も亦KESはDNA系物質であることを示すものである。

結 論

1) 60°C 10%過塩素酸 15分間処理により

文 献

- 1) 浜崎：日新医学第24年2号。
- 2) Caspersson, 第一篇同様。
- 3) 柴谷：動物学雑誌58, 199 (1949)
- 4) Seschachar, B. R. & Flick, E. W. : Science,

組織切片のKEGは完全に分別せられ、KELは残留する。更に細胞核は核膜、色質、核小体殻及び核液は明瞭に紫赤色に呈色し、対照切片のFeulgen反応と全く同一の結果を得る。

2) Baryt水によりKEGに分別せられるが、0.25% 4°C 15時間では尙不充分で10°Cになると大部分は分別される。但しやゝ類脂体含量に富む顆粒は残留する。20°CではKEGは完全に分別されるが微細なKELも幾分呈色性を減弱或は消失するものがある。

3) 4°C 10%過塩素酸 18時間処理を行うもKESはRNAの如く分別されず反つて呈色性を増強し明瞭である。

4) Feulgen反応に際し定規温塩酸の代りに60°C 10%過塩素酸により15分間加水分解を行ふ時は原法に比し反応の増強を認める。

5) KEGが冷P酸によつて影響を受けず温P酸によつて抽出されることは、KESが低分子DNAに所属すると言ふ考へに合致する。

摺筆に当り終始御指導御校閲を辱うした恩師浜崎教授に対し深甚なる謝意を表す。

110, 659. (1949)

- 5) 浜崎：岡山医学会雑誌第61年3号。
- 6) 浜崎：岡山医学会雑誌第61年3号。
- 7) 浜崎, 谷：第40回日本病理学会總會, 昭26.