

癌の細胞学的研究

第 I 編

遊離癌細胞による細胞学的研究

岡山大学医学部産科婦人科教室（主任：橋本 清教授）

三 宅 清 平

〔昭和 42 年 9 月 14 日受稿〕

内 容 目 次

第 1 章 緒 言	1. 染色体数
第 2 章 実験材料並びに方法	2. 核 DNA 量
第 1 節 実験材料	3. 核 DNA 量と染色体数との関係
1. 実験動物	4. 核 DNA 量と核容積との関係
2. 実験用腫瘍	5. 細胞内総蛋白量
第 2 節 実験方法	6. 細胞内総蛋白量と細胞容積との関係
1. 染色体検索法	7. 核 DNA 量と細胞内総蛋白量との関係
2. 細胞核内 DNA 量及び細胞内総蛋白量測定法	第 4 章 総括並びに考按
3. 核容積及び細胞容積測定法	第 5 章 結 論
第 3 章 実験成績	参考文献

第 1 章 緒 言

核酸は 19 世紀末に Miesher¹⁾ により、細胞の重要な成分として発見された。核酸が細胞の生活現象の維持に、重要な役割を演じていることは、いうまでもない。核酸には、DNA (Desoxyribonucleic Acid) と、RNA (Ribonucleic Acid) の 2 種類がある。DNA は染色体及び遺伝子の構成成分であり、細胞核における遺伝情報の担い手であって²⁾、細胞機能の中心的存在であり、RNA は蛋白合成機構に密接な関係を有する。

さて、生体をつくる構造上の単位は細胞であり、この個々の細胞が生活現象を営むことによつて、生体の生命が維持されている。これらの細胞は、それぞれ遺伝的要素をもち、生体にあらわれる総ての形質は、この遺伝的要素の作用に帰することが出来る。

癌細胞の自律的増殖も、正常体細胞におけるこの遺伝的要素の変化によつて起る^{3) 4)}と考えれば、DNA が極めて重要な因子として関連していると言

うことが出来る。癌細胞の特徴は、「その細胞が、周囲の組織と無関係に、即ち、一定の制御機構をはずれて、無限に増殖する。」という言葉によつて表現出来る。この癌細胞の分裂における重要な因子と考えられる DNA、及び染色体の研究が、癌の発生、及びその生物学的性状の解明に、極めて有意義なものであることは言うまでもない。

現在までに、悪性腫瘍細胞における染色体、核 DNA 量、核容積、細胞内総蛋白量、細胞容積などに関する個々の研究は、少なからず見受けられる。しかし、これら相互の相関関係についての研究は、非常に興味深い問題であるが、その研究技術の繁雑さのために殆んで見当らない。著者はこの点に着目し、癌細胞を多方面から総合的に観察するため、この研究を企てた。

著者は、この第 I 編において、まず遊離癌細胞の得られる MH-134 腹水肝癌細胞を用いての基礎実験を報告し、次いで第 II 編において固形癌組織である人子宮頸癌細胞についての研究報告を行うことにする。

第2章 実験材料並びに方法

第1節 実験材料

1. 実験動物

本実験に使用した C₃H マウスは、岡山大学医学部マウスコロニーにおいて繁殖した純系のもので、体重 22g 前後の成熟かつ健康なものである。飼育は、室温 20~25°C に保ち、オリエンタル固形飼料と水道水を十分に与えた。

2. 実験用腫瘍

東北大学より分譲された MH-134 腹水肝癌細胞を使用した。

第2節 実験方法

C₃H マウスの腹腔内に、充分増殖した MH-134 腹水肝癌を、ツベルクリン用注射器で採取し、その 0.2ml を倍量の生理的食塩水で稀釈し、他の C₃H マウスの腹腔内に移植した。勿論これらの操作は、すべて無菌的に行うよう留意した。なお予備実験として、Mitotic Index (腫瘍細胞1000個に対する中期核板数をもって表わす) を調べて、最も中期像の多い移植 8 日目の腹水を採取し実験に供した。

1. 染色体検索法

標本作製は、牧野・西村 (1952)⁵⁾ の「水処理押し潰し法」を用いた。まず腹水肝癌細胞を含む腹水を、よく脱脂されたスライドガラスの上に 1 滴落し、倍量の 0.2% 食塩水を加えて、ガラス棒で軽く攪拌し、10分間放置す。次で醋酸ダーリア (30% 醋酸に、和製の *Dahlia violet* を 0.75% の割合に溶かし、1~2分間煮沸した後、室温まで冷却し、濾紙でこしたものを) 1 滴落し、10分間染色す⁶⁾。その上にカバーガラス (24×40mm, No. 1) をかける。次にこれを濾紙の間に入れ、机の上に水平に置いて、カバーガラスを両拇指の腹で、静かに垂直の方向に、出来るだけ強く加圧して標本作製し、標本が乾燥しないうちに顕微鏡撮影を行った。

2. 細胞核内 DNA 量及び細胞内総蛋白質量測定法

まず柴谷・直良の方法⁷⁾により、Feulgen 反応⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾を行い、次で Deitch の方法¹¹⁾で重染色を施した標本について、顕微分光測光法 (Microspectrophotometry, 以下 M. S. P. と略記す) により測定した。

(1) 核 DNA 量測定のための Feulgen 反応 (柴谷・直良の方法)

ツベルクリン注射器で採取した MH-134 腹水肝癌細胞を、カバーガラス (24×50mm, No. 1) の上に塗抹乾燥す。次で、醋酸アルコール (1:3) で10

分間固定後、一規定塩酸で60°C、4分間加水分解し、水洗 (10分間以上冷たい蒸留水中におく) した後、4時間染色する。染色されたものは、洗浄液で3回、15分ずつ洗浄する¹²⁾。染色液に用いる Schiff 試薬は、Matheson 社製のものを用いた。そして加水分解の条件を一定にするために、一時に同条件で加水分解を行った。

(2) 細胞蛋白測定のための Naphtol Yellow S 染色 (Deitch の方法)

1% Naphtol Yellow S 液を、1% 醋酸で pH2.8 にした液をつくり、30分間室温で染色し、1% 醋酸で3回一夜洗浄する。水洗・脱水後、屈折率 1.572 の Oil で封入する。

(3) M. S. P.

本法の原理は、一般の分光光度計と同様で、その構造は、光学的経路に顕微鏡を挿入したもので、細胞あるいは、その形態的構成要素などの微小な部位について、その光学的透過率を求め、これらの吸光度から、被測定物中に含まれている物質の質と量を物理的に測定し得る装置である。

著者はオリンパス製顕微分光測光機2001号を使用した。測定にあたっては、被測定物の存在する部分と、存在しない部分との吸光度の差をとり、それに被測定物の平均半径を2乗したものを、測定値の相対値として、任意単位 (Arbitrary Unit, 以下 A. U. と略記す) で示した。即ち、吸光度を E とし、被測定物の平均半径を r とすれば、測定値は $E r^2$ で示される。

なお M. S. P. を行うに際し、DNA は 560m μ の波長で、細胞総蛋白は 435m μ の波長で測定した。この測定波長は、各々に最大吸収を有する単光色の波長である。

まず対照として、マウスの正常末梢血リンパ球50個を測定し、次で MH-134 腹水肝癌細胞100個の核 DNA 量、及び同時にその 100 個の細胞総蛋白量について測定した。

3. 核容積並びに細胞容積測定法

これらの容積は、核 DNA 量並びに細胞総蛋白量を測定する際、M. S. P. の目盛から、それぞれの平均半径 r を求め、それを3乗することにより求めた。ここでは同時に同一細胞の100個の核、及び100個の細胞容積を求めた。

なお細胞分裂係数は、塗抹癌細胞の May-Giemsa 染色標本において、分裂期にある 2,000 個の細胞を中期、後期、末期に分類した。

第1表 MH-134 腹水肝癌の染色体数

染 色 体 数																																		
35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69
1	1	3		3	2	3	5	6	16	12	3		1		1			1	1						2	3	4	1	1		1	2		

染 色 体 数																																
70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	>100	合計	
												2	1		1			1													2	80

また核細胞質比 (NP) は、次の式により算出した¹³⁾。

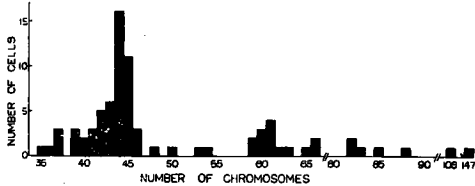
$$NP = \frac{\text{核容積}}{\text{細胞質容積}} = \frac{V_n}{V_c - V_n} \quad \begin{matrix} V_n = \text{核容積} \\ V_c = \text{細胞容積} \end{matrix}$$

第3章 実験成績

1. 染色体数

成績は第1表に示す如くであり、それをヒストグラムにして表わしたものが第1図である。即ち、染

第1図 MH-134 腹水肝癌における染色体数

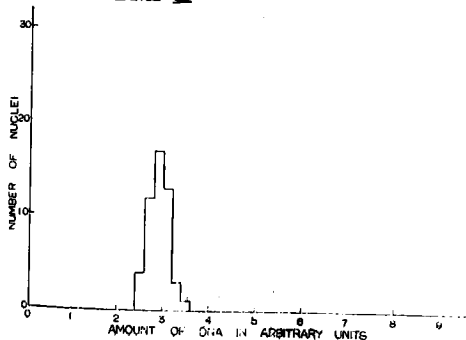


色体数の分布は、35～147の極めて広い範囲にわたり、特に42～45 (高2倍体域) の染色体数を有する細胞が多く、mode は44にみられる。また61前後(近3倍体域) にも小さなピークが認められた。

2. 核 DNA 量

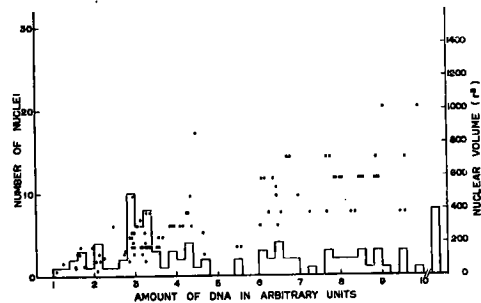
対照として測定したマウスの正常末梢血リンパ球の核 DNA 量は、第2図に示した。これによれば、

第2図 マウスの正常末梢血リンパ球の核 DNA 量



分布範囲は狭く、2.4～3.6 A. U. で、mode は2.6～3.2 A. U. であり、このあたりがマウスの正常2倍体域と考えられる。次に、染色体検索と同時期の癌細胞100個について、核 DNA 量を測定し、その結果は同じくヒストグラムにして第3図に示した。これによれば、正常例に比し、癌細胞の核 DNA 量

第3図 MH-134 腹水肝癌細胞の核 DNA 量分布及び核容積分布



の分布範囲は極めて広く、1.0～10.0 A. U. あるいは、それ以上にも及んでおり、mode は、高2倍体域(2.8～3.4 A. U.) と考えられる。なおこの他にも、3倍体附近(略4～5 A. U.)、4倍体附近(略6～7 A. U.) にも小さなピークが認められた。

3. 核 DNA 量と染色体数との関係

癌細胞核 DNA 量の mode は、最大のものが高2倍体域で、次に3倍体附近及び、4倍体附近にみられる。染色体の mode は、最大のものはやはり高2倍体域で、次に近3倍体附近となっており、4倍体附近にも若干のものを認めることが出来る。従つて両者の間には、かなり著明な相関関係の存在を認めることが出来た。

4. 核 DNA 量と核容積との関係

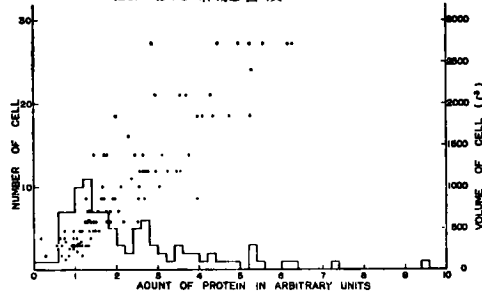
核容積の測定結果は、核 DNA 量との関係を一見して判りやすくするため、核 DNA 量を示したヒストグラム(第3図)の上に同時に表わした。これに

よれば、癌細胞の核 DNA 量は、核容積と大体比例しているようである。

5. 細胞内総蛋白質量

測定結果は、ヒストグラムにして第4図に示した。

第4図 MH-134 腹水肝癌細胞の細胞内総蛋白質量、及び細胞容積



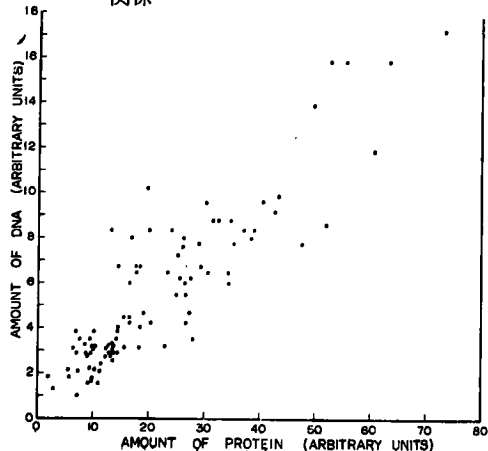
これによれば、癌細胞内総蛋白質量は、かなり巾の広い分布を示していることが判る。最大のピークは、1.0~1.4 A. U. のあたりにあり、2番目に大きなピークは、2.4~2.8 A. U. のあたりにみられる。

6. 細胞内総蛋白質量と細胞容積

細胞容積の測定結果は、細胞内総蛋白質量との関係が、一見してよく判るようになるために、細胞内総蛋白質量を示した第4図の上に、同時に表わした。これによれば、細胞内総蛋白質量と細胞容積は、ほぼ比例し、小さい細胞には少量の蛋白が、大きい細胞には多量の蛋白が存在することを示している。

7. 各細胞あたりの核 DNA 量と細胞内総蛋白質量との関係

第5図 MH-134 腹水肝癌における各細胞あたりの核 DNA 量と細胞内総蛋白質量との関係



同一細胞についての、核 DNA 量と細胞総蛋白質量との相関関係は第5図に示した。これによれば、概して核 DNA 量の多い細胞は、細胞総蛋白質量も多く、これら相互の間には、大体の比例関係が認められた。

なお上記実験時期の核細胞質比は、2.45と高い値を示していた。また細胞分裂系数は、中期 $23 \pm (5)$ 、後期 $3 \pm (2)$ 、末期 $5 \pm (2)$ であった。

第4章 総括並びに考按

1. 染色体に関する考按

染色体の研究は、細胞学の黎明期である19世紀末頃から、今日までの過去70余年にわたつているが、1952年牧野・西野⁵⁾が、「水処理押し潰し法」を発表する迄は、パラフィン切片法という方法が行われており、研究技術も幼稚であつた。1956年 Tjio & Levan¹⁴⁾が、人胎児肺の組織培養により、従来の説に反し、人類の正常染色体数は $2n=46$ であると発表し、世界の注目を集めた。しかし、人類染色体に本格的な関心が集り始めたのは、1959年以降であり、したがつて新しい染色体研究の歴史はまだ浅い。

1957年牧野¹⁵⁾は、腫瘍細胞の研究から、種族細胞説を提唱した。即ち、彼は一個体に発生した腫瘍細胞の中には、それぞれに特有な染色体型を含んだ細胞が、増殖の主体をなすと考え、この腫瘍増殖の主体となる細胞を「種族細胞 (Stem-cell)」と名づけた。

染色体の上からみて、その腫瘍細胞に発達するのは、数種の細胞系のうち、宿主に最もよく適応したものである。また、それまでおさえられていた他の細胞系のあるものが、環境の変化によつて、既存の種族細胞系より強い適応性を得て増殖してゆくことがあり、種族細胞といえども一定不変のものではないと述べている。

さて、正常マウス細胞の染色体数は、 $2n=40$ であるが、1956年佐藤ら¹⁶⁾は、MH-134 のそれは、42~48の範囲のものが最も多く、mode は46~47で、高2倍体域が種族細胞であり、近4倍体域にも小さなピークが認められたと報告している。著者の実験成績では、42~45の範囲のものが最も多く、mode はやはり高2倍体域であるが、44に認められた。また61前後(近3倍体域)にも小さなピークがみられた。本実験は約395代目の細胞で、この実験成績の差は、移植を重ねてゆくうちに、元の細胞とは多少異つた種族細胞が出現したためと考えられる。

2. 核 DNA 量及び細胞内総蛋白量についての考 按

DNA は量的に非常に安定性があり、細胞の代謝過程において量的な変化は少なく、一般に、核内の染色体数と密接な関係を保つていとされている。以上のことから、1948年 Boivin¹⁷⁾らは、“DNA Constancy theory”をとえ、彼等は、同一種の生物の正常組織において、DNA は極めて一定の値を示し、また生殖細胞の DNA 量は、正常体細胞の $1/2$ の値を示すことを報告した。他にも染色体数と核 DNA 量との間には、極めて密接な関係のあることが報告されている¹⁸⁾¹⁹⁾。

また McLeish²⁰⁾は、現在までの DNA 量に関する細胞化学的研究業績を次の如く示している。

- ① 同一種類の生物においては、DNA 量は一定性がある (Boivin et al. 1948¹⁷⁾, Ris & Minsky 1949²¹⁾)
- ② 正常な生理状態においては、各細胞単位の DNA 量と染色体数とは非常に密接な関係がある (Swift 1950 a⁴⁾ & b²²⁾, Leuchtenberger et al. 1954²³⁾)
- ③ 細胞の DNA 量は、染色体の倍数化、あるいは、分裂期によつて変化する (Swift 1950 a⁴⁾, Pattau & Swift 1953²⁴⁾)

さて、癌細胞の DNA 量と、正常細胞の DNA 量に関する報告に2つの異つた説を見出すことが出来る。即ち、Mark & Ris²⁵⁾ (1949), Price & Laird²⁶⁾ (1950), Davidson²⁷⁾²⁸⁾ (1951 a & b), Barder (1959)²⁹⁾らは、癌細胞と正常細胞の DNA 量には大きな変化がないと発表した。これに反し、McIndo & Davidson³⁰⁾ (1952), Leuchtenberger et al.²³⁾ (1954) らは、癌細胞の DNA 量は、正常細胞の DNA 量に比し多いと報告している。

さて、著者の核 DNA 量測定の実験成績は、後者の説に一致することを示している。即ち、MH-134 腹水肝癌の核 DNA 量は、正常細胞の核 DNA 量に比し、極めて広い分布範囲にわたつている。mode は高2倍体附近に認められ、これが種族細胞と思われる。

また第1図と第3図を対比することにより、癌細胞の染色体数と核 DNA 量との間には、かなり著明な相関関係を見出すことが出来る。

なお一般に核容積と核 DNA 量とは、ほぼ比例することが通説となつているが、本実験でも大体この法則に一致した結果を得た。

また MH-134 腹水肝癌の細胞内総蛋白量も、かなりの広い分布範囲を示した。このことは癌細胞内総蛋白も、量的変化にとんでることを表わしている。

以上により、癌細胞では、染色体数、核 DNA 量、核容積、細胞内総蛋白量及び細胞容積のすべての点において、正常細胞のそれにくらべて、均一性を欠いた状態にあることが認められた。

第5章 結 論

癌の細胞学的特異性を研究するため、基礎実験として、遊離癌細胞の得られる MH-134 腹水肝癌を用いて検索を行い、次の結果を得た。

- 1) 染色体数は、高2倍体域 (44) に最大の mode があり、これが種族細胞と考えられる。
なお3倍体附近にも小さなピークを認めた。
- 2) 核 DNA 量は、正常細胞のそれに比し多量で、極めて広い分布範囲を示した。
- 3) 染色体数と核 DNA 量との間には、かなり著明な相関関係が認められた。
- 4) 核 DNA 量と核容積との間には、相関関係が認められた。
- 5) 個々の細胞内総蛋白量は、個々の細胞の大きさと、比例していた。
- 6) 個々の核 DNA 量と個々の細胞内総蛋白量との間には、大体の比例関係が認められた。

稿を終るにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師橋本清教授に深甚の謝意を表わします。また御助言・御指導を戴いた田中良憲助教授に深謝致します。

参 考 文 献

- 1) Miescher, F.; "Histochem. & Physiolog. Arbeiten" Vogel, Leipzig 1897.
- 2) Hotchkiss, R. D.; The Nucleic Acid 2: 476, 1955.
- 3) Brachet, J.; Biochemical Cytology 226, 1957.
- 4) Swift, H.; Physiologie Zool. 23: 169, 1950a.
- 5) S. Makino, Nishimura.; Stain technology, 27, 1, 1952.

- 6) 佐々木本道 ; 日本臨床, 19 : 2233, 1961.
- 7) Shibatani, A. & Naora, H. ; *Biochem. et. Biophys. Acta.*, 12: 515, 1953.
- 8) Feulgen, R. & Rossenbek, H. ; *Hoppe-Seyler's Ztschr.*, 135 : 203, 1924.
- 9) Kasten, F. H. ; *J. Histochem. Cystochem.*, 4 : 462, 1956.
- 10) Leuchtenberger, C. ; *Science.*, 120 : 1022, 1954.
- 11) A. D. Deitch ; *Laborat. Inves.*, 4 : 324, 1955.
- 12) 妹尾左知丸, 内海耕髓 ; 蛋白質・核酸・酵素, 8 : 709, 1964.
- 13) 妹尾左知丸, 高木康敬著 ; 新細胞学, 朝倉書店, 1962.
- 14) Tjio, J. H. & Levan, A. ; *Hereditas*, 42 : 1, 1956.
- 15) Makino, S. ; *Intern. Rev. Cytol.*, 6 ; 25, 1957.
- 16) Sato, H. et al. ; *J. of the National Cancer Institute.*, 17 : 1, 1956.
- 17) Boivin, A., R. Vendrely & C. R. Vendrely ; *Acad. Sci. Paris.*, 226 : 1061, 1948.
- 18) Leuchtenberger, C. & G. F. Boyor ; *Biophys. Biochem. Cytol.*, 3 : 323, 1957.
- 19) Leuchtenberger, C. R. Leuchtenberger, C. Vendrely & R. Vendrely ; *Exp. Cell. Res.*, 3 : 240, 1952.
- 20) Mc Leish, J. ; *Chromosoma*, 10 : 417, 1959.
- 21) Ris, H. & A. E. Miraky ; *J. Gen. Physiol.*, 33 : 125, 1949.
- 22) Swift, H. ; *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 36 : 643, 1950b.
- 23) Leuchtenberger, C., R. Leuchtenberger & A. M. Davis ; *Am. J. Pathol.* 30 : 65, 1954.
- 24) Patau, K. & H. Swift ; *Chromosoma*, 6 : 149, 1953.
- 25) Mark, D. & H. Ris ; *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 71 : 727, 1949.
- 26) Price, J. M. & K. Laird ; *Cancer Res.*, 10 : 18, 1950.
- 27) Davidson, J. N. ; *Lancet*, 1 : 1287, 1951.
- 28) Davidson, J. N., I. Leslie, & J. C. White ; *J. Pathol. & Bact.*, 63 ; 471, 1951.
- 29) Barder, S. ; *J. Biophys. & Biochem. Cytology*, 5 : 217, 1959.
- 30) Mc Indo, W. M., & Davidson, J. M. ; *Brit. J. Cancer*, 6 : 200, 1952.

Cytological Studies on Cancer Cells

Part I. Cytological Studies on the Free Cell of Mouse Ascites Hepatoma 134

By

Seihei MIYAKE

Department of Obstetrics & Gynecology Okayama University Medical School
(Director : Prof. Kiyoshi Hashimoto, M.D.)

The present study was designed to determine cellular characters of the carcinoma of the human utrine cervix utilizing Microspectrophotometry for nuclear DNA and Squash technique for chromosome.

A fundamental study was carried out analysing chromosome number, nuclear DNA and nuclear volume in free cell of mouse ascites hepatoma 134.

Results were as follows :

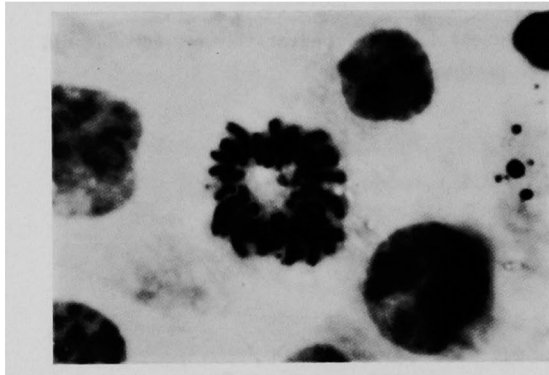
1) Since the highest peak of chromosome number was observed at hyperdiploid range (44). it was considered as the chromosome number the stem cell. Another small peak, however, was also noted at triploid range.

2) A amount of nuclear DNA in hepatoma cell was found to be higher than in normal lymphocyte and was distributed in wide range.

3) A significant correlation was observed between chromosome number and amount of nuclear DNA.

4) Correlations were also noted to amount of nuclear DNA to nuclear volume, cell protein to cell volume and amount of nuclear DNA to cell protein respectively.

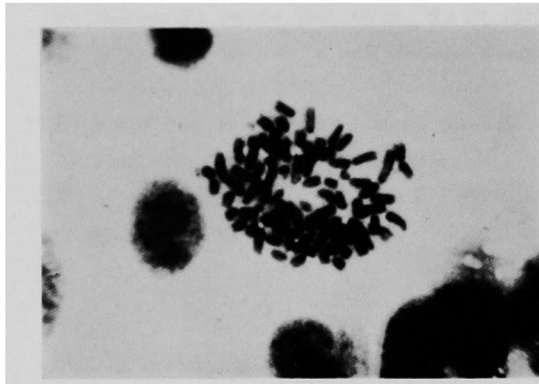
三宅論文附圖



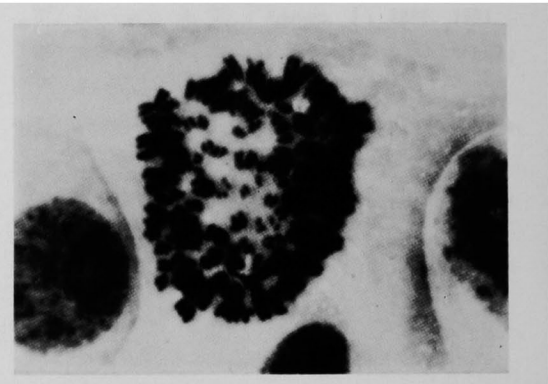
(1) MH-134₂ 腹水肝癌染色体 44個 (×1,000)



(2) MH-134 腹水肝癌染色体 41個 (×1,000)



(3) MH-134 腹水肝癌染色体 66個 (×1,000)



(4) MH-134 腹水肝癌染色体 約147個 (×1,000)