



Title	吉田肉腫細胞に対する放射線の影響, 電子顕微鏡による観察
Author(s)	加藤, 敏郎
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1962, 22(3), p. 209-225
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/19708
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

吉田肉腫細胞に対する放射線の影響 電子顕微鏡による観察

東北大学医学部放射線医学教室 (主任 古賀良彦教授)

加藤 敏 郎

(昭和37年5月10日受付)

Effect of X-irradiation on Yoshida Ascites Tumor Cells in vivo.
An Electron Microscope Study.

By

Toshio Kato

Department of Radiology, Tohoku University Medical School, Sendai, Japan

(Director: Prof. Y. Koga)

Changes of the submicroscopic structures of Yoshida ascites tumor cells after X-irradiation in vivo has been studied electron-microscopically.

The ultrastructure of untreated control series was observed previously.

Respective doses of 250r and 500r were given to a series of male white rats four days after inoculation.

Every test portion of ascitic fluids were removed just before the irradiation and at 1, 3, 6 and 12 hours after the exposure to X-rays.

The preparation of cells for electron microscopy was performed as usual manner, all sections were stained with uranyl acetate solution.

Typical changes after the irradiation will be summarized as follows.

- 1) Cell surface was rounded owing to the disappearance of microvilli.
- 2) Chromatin condensation on the nuclear envelope was followed by the vacuolization of nuclear content, that is, chromatolysis.

Thickening of the nuclear membrane was observed in such chromatolytic cells.

Pycnotic nucleus was also found occasionally and nucleolus tended to agglutinate.

- 3) Ribonucleoprotein-particles, diffusively distributed in the cytoplasm, were diminished so markedly that the cytoplasm became electron less dense, and this cytolytic changes were promoted by the vacuolization of cytoplasmic element.

- 4) Various degrees of destruction, swelling and vacuolization of mitochondria were observed frequently, and the restoration of the damage was also found at intervals of 3 hours or more following irradiation.

- 5) Soon after the irradiation, endoplasmic reticulums of lamellar type appeared eminently, winding along the cell surface or surrounding the nucleus. Photographs

suggesting a close relationship between regenerating mitochondria and endoplasmic reticuli-ums were easily seen in later period.

Among these changes, the most intensive one such as a complete chromatolysis or cytolysis was considered to express the death of the cell.

This was found most frequently in animals 1 hour after the irradiation with 500r, and was scarcely seen in other animals.

Restorative changes of the damage were found on mitochondria and endoplasmic reticulum 3 hours or more after the irradiation.

Findings which enable to conclude the radiosensitivity of each organella were not obtained in this experiment.

Changes in ultrastructure were compared with the results of the biochemical studies and discussed briefly.

I) 緒言

放射線の細胞に対する影響は種々の角度から検討されて来た。大別すれば一つは光学顕微鏡を中心にした形態の変化の追究であるが、他方生化学的研究方法による機能の動態の観察からも多くの知見が得られている。

近来頃に発達した電子顕微鏡的観察は、その優れた分解能から細胞を構成する諸要素の微細構造を極めて鮮明に浮きぼりにすると共に、生化学的所見との対比により単なる形態学に止まらず細胞の生理的状态の把握をも可能とした。

著者は従来照射実験に賞用された吉田肉腫細胞を用いて電子顕微鏡観察を行い、放射線のこれに及ぼす影響をその微細構造の変化として追究し多くの知見を得たので報告する。

II) 実験材料及び方法

1) 実験動物

体重 100～120g の大沢系雑種雄性ラットに吉田肉腫腹水約 0.1cc を移植する。移植 3 日以後腹水塗沫標本により移植陽性の確認されたものを実験に用いた。

2) 照射条件

ラットを背位に固定して X 線一回全身照射を行った。

管電圧 180KVp, 管電流 20mA, 焦点動物間距離 40cm, 濾過板 Cu 0.7mm Al 1.0mm, 線量率 63.5r/min. で大量照射群として 500r, 中等照射群として 250r を照射した。

3) 実験方法

A) 非照射吉田肉腫細胞の経日的観察

移植後 3 日目で移植陽性を確認した動物について 3 日乃至 7 日まで毎日及び 10 日目の腹水の電子顕微鏡的観察を行った。

B) X 線照射吉田肉腫細胞の経時的観察

移植 3 日目で移植陽性を確認した動物について、4 日目に X 線照射を行い、照射直前、照射 1 時間後、3 時間後、6 時間後及び 12 時間後に腹水を採取し電子顕微鏡観察を行った。

C) 観察方法

電子顕微鏡標本の作成は Epstein¹⁾ の方法に準じて行った。即ち吉田肉腫腹水を硝子毛細管ピペットで採取する。豫め氷冷しておいた遠心管内の 2cc の 1% オスミック酸溶液* に腹水約 0.15cc を急速に注入し 20 分間氷室で固定する。固定の後半に 2,000r/m 5 分間の遠心を行うと細胞は遠心管底にペレットとなる、遠心管を破壊しペレットを濾紙片上に半米粒大位に分割して盛り上げる。以下はこの細胞塊を組織片と同様に取扱う。脱水はエタノール系列で 25%, 50%, 70%, 90%, 100%

* 固定液は Palade²⁾ に従って酢酸ペロナルで緩衝 (pH 7.4) した 1% オスミック酸液であるが Caulfield³⁾ にならつて 1cc 当り 0.045g の蔗糖を加えて等張とした。その組成は次の如し。

0.14M	酢酸ペロナル液	0.4cc
N/10	塩酸	0.4cc
45%	蔗糖液	0.2cc
2%	オスミック酸液	1.0cc
	計	2.0cc

2回各5分間、次でエタノール・モノマ；モノマ2回各5分間宛渡し最後に適当な大きさにトリミングしてゼラチンカプセルに入れる。包埋は n-Butylmethacrylate と n-Methylmethacrylate の6：4又は7：3の混合比のものを45°Cで12時間以上で重合させた。

超薄切片は日本電子 JUM-5 型 Ultra-Microtome で作成し酢酸ウラニールで電子線染色を行った。電子顕微鏡は日本電子 JEM-4D 型を使用し直接倍率 2,500~8,000倍で撮影した。

III) 実験結果

1) 非照射吉田肉腫細胞の経日的観察

吉田肉腫細胞は移植後分裂増殖を重ねて動物の死に至るまでの間に大小及び形態の微細な点で決して一様でなく絶えず変動して行くことが光学顕微鏡的に知られている⁴⁾。然らば電子顕微鏡的にはこのような変動はその微細構造にどのように現われるであろうか。腫瘍細胞のこのような宿命的な変動の像を充分に把握することは照射後に予想される種々の変化を捉えるためには不可欠のことと考えられる。

そこで移植後3日乃至7日及び10日の動物について経日的に標本を作成観察した。

吉田肉腫細胞の電子顕微鏡像を先人の業績に求めると、堀井⁵⁾ Wessel u. Bernhard⁶⁾ Yasuzumi & Sugihara⁷⁾ 杉原⁸⁾ 大里⁴⁾ 森¹⁰⁾ Schmidt u. Themann¹¹⁾ Bairati¹²⁾ などがある。これらは夫々の著者の着眼点の差、他の腹水腫瘍細胞との比較を行つたための表現のニュアンス、又一部は使用した吉田肉腫細胞株或いは担腫瘍動物の系統が異なることなどによりその微細構造例えば糸粒体の多寡、小胞体系やゴルジ野の発達程度などの点で必しも完全な一致を見ているわけではないが大綱においては著しい懸隔はない。著者の所見もこれらの諸論文に通ずるものが多い。

定型的な吉田肉腫細胞の電子顕微鏡像を記載すれば次のように言えるであろう。

A) 吉田肉腫細胞の電子顕微鏡

形及び大きさ：

腫瘍細胞の断面は円形であるが、これはしばし

ば超薄切片作成の際の歪で楕円形となる。大きさは腫瘍細胞が任意の部位で切断されるので区々であるが大体 5.5 μ ~12 μ である。細胞膜は凹凸不整で各所に小突起 (microvilli) を認める。

静止核：

核は約30 μ の二重膜構造を示す核膜により細胞質と境されていて、形は円形、楕円形、腎形又高度の陥入や分葉を示すものなど種々あり、細胞質内で占める部位や面積も切断面によって区々である。

核内の微細なクロマチン顆粒は略々均等に分布する。核小体は電子密度大で濃い糸球状の構造として認められる。

糸粒体：

糸粒体 (mitochondria) はゴルジ野を除く細胞質内に随所に散在し比較的多数認められる。即ち、細胞の一割面当り20個程度は認めるが、核を含まない切断面では更に多数の糸粒体が密集している像もある。

形は円形、楕円形のもが大部分であるが約1割程度は長桿状のものを認め大きさも区々である。

定型的なものは二重の限界膜 (mitochondrial membrane) と明瞭な略々平行に並んだ数本乃至それ以上の糸粒体櫛 (cristae mitochondriales) を認め基質 (mitochondrial matrix) は略々細胞質基質の電子密度に等しい。

一方種々の程度の変化を来しているものも可成り多い。これは基質の電子密度が大で糸粒体櫛を認め難いものや、糸粒体櫛が減少し、その排列が不整だつたり断裂したりしており、限界膜が一部消失しているものもある。然し高度に膨化し空胞化した像は見当らない。このように変形している糸粒体は全体の約3割程度を占めるようである。

ゴルジ野：

吉田肉腫の細胞中心部は特異な構造を示し他の細胞質と區別して認められる。多くは核の側でその陥凹部に対向して、又分葉した核の間に存在し大小区々の小胞より成る。これら小胞は直径50~300 μ 程度で一重の膜で囲まれ、その内容は更に小さな一二の小空胞を入れるもの、電子密度

大な顆粒を入れるもの、或いは全く空虚なものなど多彩であり漸次周辺の細胞質に移行する。この部分はゴルジ野に相当するものであるが定型的なゴルジ膜を認めることは少い。これらの小胞のあるものは小胞体系に属するものであろう。

小胞体系：

小胞体系の中で二層膜又は小空胞で顆粒を持たない Palade¹³⁾ の言う滑面小胞体 (smooth surfaced endoplasmic reticulum) は主に細胞中心部に多く存在する。一方平行な二層膜とこれに附着する微細なりボ核蛋白粒子 (ribonucleoprotein-particle) とで特長づけられる粗面小胞体 (rough surfaced endoplasmic reticulum) は少い乍らも存在する。これは細胞中心部以外の細胞質中に随所に散在し大略 600m μ 位の長さを有するが時に更に長く延びることもある。一切断面について4~5個は認めうる。

このように吉田肉腫細胞では多くの人が言うように粗面小胞体は発達が悪いが、殆ど全細胞質基質にわたって Palade のリボ核蛋白粒子がこれら模様構造とは関係なく密に分布することは注目し値する。

3乃至数条の平行する小桿構造の “Membranae fenestratae” を時に認めることもある。

その他：

多くの人の指摘する線維様構造 (filamentous structure¹²⁾, Faserbuendel¹¹⁾ が核の近くに在るのを認めることがある。

脂肪顆粒は電子密度大で細胞質内に限界膜を被ることなく不定型にわれるが余り大きいものはない。この外に色素顆粒、食食顆粒なども時に認めらる。

以上の所見の要約を図1及び2に示す。

B) 吉田肉腫細胞電子顕微鏡像の経日的変化

上述したものは腫瘍細胞の定型的な像であるが、これは移植後3日乃至7日の各細胞に共通している。

吉田⁴⁾によると移植された腫瘍細胞は分裂増殖して3~4日では純培養状態になり(第1期)更に進んで5~8日で細胞は殖え腹水も増す。(第2期)その後9~10日以降は細胞の増加は余り強

くなく、細胞は変性した型のものが多くなり(第3期)平均12日で動物は死亡する。この間光学顕微鏡的变化の特長は核では小形の分葉状のものが次第に大形の円形、楕円形のものに変化して行く。一方細胞が次第に大きくなると共に原形質では核が偏在してその陥凹部が好塩基性の度の弱い明庭が明かとなり後に至つてこゝにアズール顆粒が出現する(第2期型の細胞)が更に細胞は大きくなり核は淡明となりアズール顆粒も増して老廃或いは変性の像を呈するようになる。(第3期型の細胞)

このように一定の順序を追つて増殖する腫瘍細胞の微細構造は時期によつてどのような差を示すかが検討の対象であつたが、移植3日乃至7日の細胞では殆んど差異がない。即ち、核、糸粒体、小胞体についてその基本的な像は前述した如くであり、核内クロマチン顆粒の分布が変化したり、著しく膨化し空胞化した糸粒体が多くなるといつたような事実は認めない。

移植10日目の標本では核や糸粒体は同様であるが、粗面小胞体は紐状にやゝ長くなつたものが幾分多くなる傾向があり、ゴルジ野では一重の境界膜と電子密度の大きい顆粒性内容から成る空胞様構造が著明でアズール顆粒と考えられる。又脂肪顆粒もやゝその数をまして容易に散見するようになる。

細胞の自然の生長発達の過程で自己崩壊により死滅する所謂 Nekrobiose (向死変性⁴⁾) の像は当然現われる筈であるが観察の範囲内では捉えることが出来なかつた。

以上の観察から、腫瘍細胞の移植後の日数従つて細胞の成長老化の経過に対応する微細構造の変化は、その基本的な小器管については先ずないと云つてよく、従つて照射実験では少くとも移植後4~6日位の短期間に限れば認められる変化は一応X線照射に関連するものとして扱つてよいと考えられる。

C) 小括

非照射吉田肉腫細胞は移植後3日乃至7日ではその微細構造に本質的な差異は認められない。基

本的な腫瘍細胞像を略述すると次の如くである。

イ) 細胞表面は凹凸不整で *microvilli* を有す。

ロ) 核は二重構造の核膜で境され、微細なクロマチン顆粒は核内に均等に分布する。核小体は電子密度大で糸毬状に認める。

ハ) 細胞質基質に *Palade* のリボ核蛋白粒子が膜様構造とは無関係に均等に分布する。

ニ) ゴルジ野は核陥凹部に対向して他の細胞質と明かに區別し得る。複雑な小胞構造より成る。

ホ) 糸粒体は円形、楕円形時に長桿状のものが比較的多数認められ限界膜、糸粒体櫛など明瞭であるが、中には相当の変化を示しているものもある。

ヘ) 小胞体では滑面小胞体は主にゴルジ野及びこれに接する細胞質に認められるが、*Palade* の粒子を有する粗面小胞体はそれ以外の細胞質内に比較的小数を認める。“*membranae fenestratae*”もある。

2) X線照射吉田肉腫細胞の経時的観察

X線照射を受けた吉田肉腫細胞では一見して著明な変化を示すものもあり、蛍光板上では殆ど正常像に止まるも写真撮影ではじめて変化の認められるものもあり、一方写真上でも尙正常像と考えられるものもある。

これらの種々の程度の変化を呈する細胞を無作意的に多数撮影して観察すれば腫瘍細胞の変化の数量的な解釈が可能であろうが、このような電子顕微鏡的観察は実際問題としては極めて難しい。従つて観察はいきおい質的なものに向けられる。

著者は照射実験にあつて次のような疑問を設定した。即ち、

A) X線照射を受けた腫瘍細胞は電子顕微鏡的にその微細構造にはどのような変化が見られるであろうか。

B) 次に経時的に追求したとき微細構造の変化はどのように推移するであろうか。X線障害からの回復の像は認められるかどうか。

C) 更に線量の多少と微細構造の変化の間の関

係は如何。換言すれば細胞内小器官の放射線感受性或いは放射線の侵襲点は何処であるか。

以上の三点である。以下順を追つて観察の結果を述べる。

A) X線照射細胞に認められる諸変化

腫瘍細胞の微細構造に認められる変化は、線量や観察時期の如何で表われ方に量的な差は勿論あるが或程度定性的に記述することが出来よう。

主要な変化を総括的に述べれば次の如くなる形：

細胞は凹凸不整で *microvilli* を有するがこれが減少し次第に丸味を帯びてくる。甚しい場合には完全に平滑となつた像を認める。(図3)時には細胞膜が失われて細胞周辺部から崩壊している像もある。(図4)

核：

核内に均等に分布していたクロマチン顆粒は次第に処所に集合し、特に核膜周辺部に著明に集まる。この結果核は粗鬆となり小空胞によつて充され蜂窠状を呈することもある。(図3, 4)

核小体は糸毬状の構造が失われて濃縮した電子密度の大きい無構造の塊となる。

核膜は滑かな感じがなくなりゴッゴッした感じ或いは波打つたようになり、時には著しく二重構造の間隙が開大した像を呈することもある。(図4)

一方クロマチン顆粒が集合し核は不規則に濃染し、核膜に接した細胞質に空隙が生じ核濃縮に対応すると考えられる像もある。(図5)

細胞質基質及びゴルジ野：

細胞質基質に瀰漫性に分布しているリボ核蛋白粒子が減少し、又不規則に集合して細胞質は空粗となる。このため核は勿論糸粒体や小胞体などの膜構造は浮き出したように見える、更に高度の場合は糸粒体や小胞体の空胞化が加わり細胞質全体が不規則な蜂窠状となる。(図3, 5)

ゴルジ野でも同様に基質の好オミウム性が低下し、小胞、小桿状構造が幾分拡大してはつきりとしてくるほか、数十 μ 或いはそれ以上の円形又は小桿形の極めて電子密度の大きい小顆粒が増し

てくる。従つてゴルジ野全体が極めて単純化され膨化した印象を受ける。(図7, 10)

糸粒体:

糸粒体の変化は多様である。形が小さくなり基質も密となつて辛うじて糸粒体櫛を認める塊状化した糸粒体もあるが少い。(図3) 多くは逆に膨大し空胞化の傾向を示す。即ち、殆んどすべての糸粒体の電子密度が減少し極めて明るい乃至は全く空虚な空胞に変化した細胞をしばしば認める。限界膜は一重になり比較的良く保存されるが一部消失するものもあり、糸粒体櫛は断裂し、数が減り、一二本の糸粒体櫛が痕跡的に認められるものもあり、多くはそれすらもなくなり完全な空胞となつている。(図7, 8)

この傾向が更に著しい場合もあり糸粒体は極度に膨大し巨大な空胞となり直径 1μ を超えるものすらある。このような空胞が若し一二個のみ散在するとすれば糸粒体の膨化像であることを断言し得ないと思われるが殆ど同じ位の大きさの円形の空胞が多数存在し、一部のものに前述のような痕跡的糸粒体櫛を認めることから判定が可能である。

(図6)

一方照射後時間を経た細胞ではこのような大空胞化を示すものは殆んどなく、大きさの揃つた比較的小さな糸粒体が多く見られ基質の電子密度が大となつている。これらの糸粒体は限界膜は比較的保在されているが糸粒体櫛の排列の不整、断裂、消失など種々の程度の変形を示すものが正常よりは遙かに多い。

空胞化した糸粒体群の間に大きさは略々これらと同じかこれよりも大で、一重の限界膜で境されその中に電子密度の極めて大きい顆粒を容れた空胞がしばしば認められる。限界膜は判然としないことも多く、顆粒は円形で空胞を略々満す位の大きなものから半月状或いはコマ状で小さく空胞壁に近く偏在しているものもあり電子密度の余り大きくないものもある。

このような空胞は細胞周辺部で余り変化のない糸粒体と共にあることもあり、或いは細胞質内に孤立して存在することもある。このものの本態は

不明であるがしばしば認められる。(図7, 10)

これについては後にふれるであろう。

小胞体:

小胞体は大部分滑面小胞体で、小管状、小桿状でゴルジ野やこれに接した細胞質に多く認められるが、照射後これらは拡大し細長い小空胞化している像をよく見るが、極めて大きな空胞形成を示すことはない。

一方甚だ注目をひくのは平行な二重膜構造を呈する小胞体が極度にふえていることである。これは正常では一割面当り数個程度しか認めないが、照射例では数がふえて居り、長く延びて $2\sim 3\mu$ 或いは更に長くなつているものもある。(図10) これらには少数のリボ核蛋白粒子が付着するがこれを欠くものも多い。

時にこの二重膜が核膜に沿つて核を取り囲むように長く伸び、又細胞膜に沿つて長く伸びている像もある。(図3, 8) 糸粒体のすぐ傍に密接して存在するものや糸粒体を完全に取り囲んでいる像もしばしば認める。(図9)

その他

線維様構造は核の近傍の細胞質内に現われるが照射例ではこれが長く川が流れるように伸びているのを認めることがあるが対照との差は著しくない。(図10)

脂肪顆粒は照射後時を経るにつれて多くなるが非常に増加したという印象はうけない。

B) 微細構造の変化の経時的推移

上述した諸変化は一つの細胞にすべてが現われるわけでは勿論なく、極めて軽微な一、二の変化の認められるものから各種の高度の変化が揃つているものまで種々の組合せで認められ、全体を通覧するとこのような傾向を捉えることが出来たのである。

然らば時間の経過と共にこの変化はどのように推移するであろうか。

核の変化即ち核内クロマチン顆粒の分布が不均等になり核膜周辺に集積する傾向(chromatin margination; Kernwandhyphchromatose)や核膜のゴッゴッした波打つた感じなどは照射後各

時期の細胞にひとしく認められるが、クロマチン顆粒の融解消失による著明な核の蜂巢様空胞化即ち染色質融解 (chromatolysis) や核膜肥厚像は1時間後に最も多く、それ以後は遥に少く稀に散見する程度である。

細胞質基質のリボ核蛋白粒子の融解消失による細胞質の空粗化も各時期の細胞に容易に認める。このような変化の高度のものは原形質融解 (cytolysis) であるが、これは照射後早い時期に見ることが多い。

糸粒体は一般に細胞の機能状態を反映して構造上種々の変化を示すことが知られて居り Gansler et Rouiller¹⁴⁾ はその変化の各相を小粒形成、断裂、更に可逆的な腫脹、貯留の像、不可逆変化として大空胞形成、硝子滴状化を挙げている。

この意見にしたがえば照射1時間後の細胞に見る多数の大空胞は糸粒体の変性像であることは疑のない所であるが、このようなものは恐らく不可逆的な変化で、一方同じく1時間後の細胞でも基質の淡明化、糸粒体櫛の断裂、減少、空胞化の傾向を示しているものは回復可能なものと考えられる。然も照射後時間を経るにつれて上述の如き変化は少くなり、比較的小きな、大ききの揃ったものが多くなる。これらは依然として糸粒体櫛、限界膜などに変化があり正常のものとは異なるが、基質の電子密度も大きくなり、その傍に小胞体が密接して認められることもあり正常像に戻りつつあると考えられる。但し、糸粒体の再生過程で認められると言われる“microbody¹⁵⁾”と認められる確実な像は認めることが出来なかつた。

小胞体系の中、小胞状、短桿状の滑面小胞体は軽度の拡大を示すものが認められるが、極めて特長的なものは二重膜構造のものが著しく多くなることである。

これは各時期の細胞に共通するが、照射1時間後の核や糸粒体の変化の高度のものでは、小胞体が核膜に沿って、或いは細胞膜に沿って延々と伸びている像がしばしば見られる。時間が経つと共にこのような像は少くなるが、12時間でも依然正常例より遥かに著明に認められ細胞中心部より周

辺に放射状に走る像や(図10)種々の程度に変性した糸粒体と密接して存在する像など(図9)も見逃せない。

これらの変性像を通覧すると細胞内小器官の夫々について極めて高度の変化が表われるのは照射後1時間である。そのような変性像を要約すれば、核内クロマチン顆粒の融解消失、核質の空胞化、核小体の融合塊状化、細胞質基質顆粒成分の消失、粗鬆化、糸粒体の大空胞化、細胞全体の平滑化、時に細胞周辺からの崩壊などで、染色質融解と原形質融解を基盤にした変化であつて、これらは細胞の死後の自己融解像¹⁶⁾と見做される所見である。このような細胞は腫瘍の自然の生長発達の過程の中で所謂 Nekrobiose として認められる筈であるが、X線照射例では容易に認めることが出来た。これは放射線の致死効果の直接の表現であるが、弱拡大で無作意的に撮影した写真及び蛍光板上の観察での印象から取ってその出現の頻度をあげると、500r 照射例では照射1時間後に最大で略々10%位、3時間以後は急速に減少する。

一方このような細胞死を物語る変化以外に各時期の照射細胞に見られた種々の変化は、或るものは更に進行して死に至るものもあり得ようが、3時間以降細胞死を認める頻度が次第に少くなることから推して、個々の小器官についていえば時間と共にその障害の度は軽減しているといつてよく、事実糸粒体では明かな回復の傾向が認められ、小胞体系も亦これに通ずる態度を示していると思われるべきであろう。

C) 照射線量と微細構造変化との関係

照射線量は悪性腫瘍の治療の際の慣用量を考慮して250rを又強照射として倍量の500rを照射した。

或る一つの小器官を対象にすると、そこに見られる変化は250r群でも500r群でも本質的な差はなく、一群が正常に止まるのに他群で変化を認めるといつた事実はない。単に変化の程度が500r群でより大きいと文は言える。例えば、大空胞化を示す糸粒体の変性像は500r群では遥かに容

易に認められる。又細胞死の頻度も500r群1時間後に最も高く、250r群1時間後では明かに低い。

このような線量と細胞変化との関連は照射後1時間では明かであるがそれ以後は余り明瞭でなくなる。

一方同一線量群の中で、どの小器官が最も著しい変化を呈するか、換言すればどの小器官がX線感受性が大きいかという疑問に対してはにわかには答えることが出来ない。すでに述べた如く照射1時間後より核質、核小体、細胞質基質、糸粒体、小胞体などがみな夫々に変化を示して居り正常像に止まるものはないので細胞微細構造の変化を指標にして小器官の感受性を云々することは本実験の照射線量や観察方法では不適当と思われる。

D) 小括

X線照射吉田肉種細胞微細構造の変化を経時的に観察するに、その変化は照射1時間後に最も著明であるが、以後12時間までの各時期に漸次その程度は軽度になるが本質的には差のない一連の変化を認めた。即ち、

イ) microvilli は消失し細胞は平滑となる。

ロ) 核内クロマチン顆粒の核膜周辺への集積(chromatin margination)クロマチン顆粒の融解消失による核の粗鬆空胞化(chromatolysis)、核膜の肥厚など。核小体は融合し塊状となり濃染する。

ハ) 細胞質基質に分布するリボ核蛋白粒子の融解消失による細胞質の空粗化。

ニ) 糸粒体は著明な膨化即ち糸粒体櫛の減少、断裂、基質の淡明化、更に高度になつて空胞化するものなどあり、これらは可逆的で正常に復する傾向を示す。一方不可逆性の大空胞化を認めることもある。

ホ) 小胞体は二重膜構造のものが著しくふえ、極度に長く伸び、又糸粒体を取り囲んで発達する像もある。又小桿状から小空胞状への拡大を示す像も認める。

ヘ) 比較的電子密度の大きい大小種々の顆粒を容れる空胞や脂肪顆粒が比較的容易に散見され

る。

これらの変化の中染色体融解、原形質融解を基盤とした高度の変化は細胞死の像であるが、これは照射1時間後に著明に認められ、以後時間と共に減少する。又糸粒体は照射後時間を経るにつれて回復の像が明かとなり、小胞体もこれに関与する。

照射線量との関係を見るとこれらの変化は500r群、250r群の両者に共通して認められ、両群の差は変化の軽重の度だけであるが、この差も照射1時間には明瞭であるが3時間以後は余り目立たない。

認められた諸変化から細胞内小器官の放射線感受性を云々することは不適当と考える。

IV) 考案

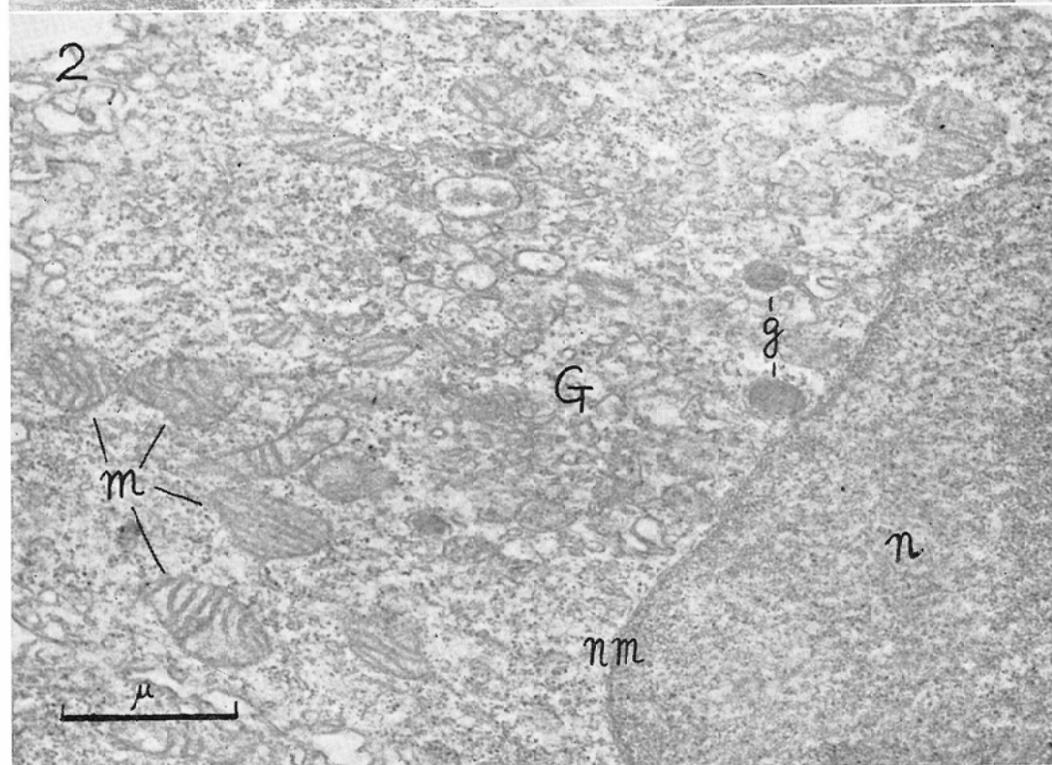
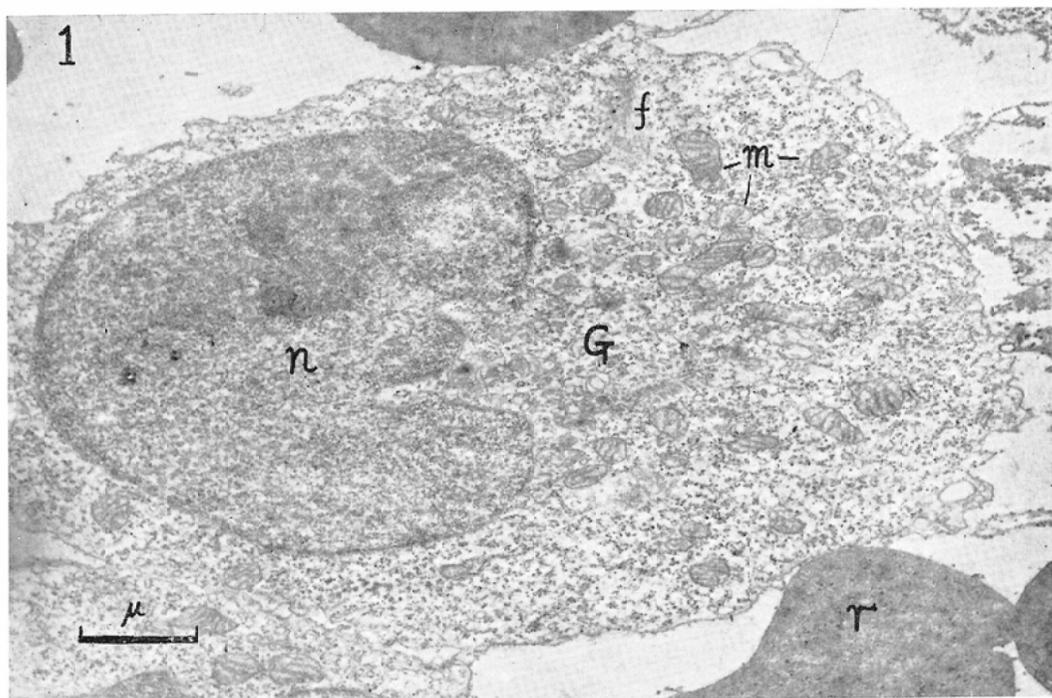
本実験ではX線照射後の吉田肉腫細胞の微細構造の変化を検討した。

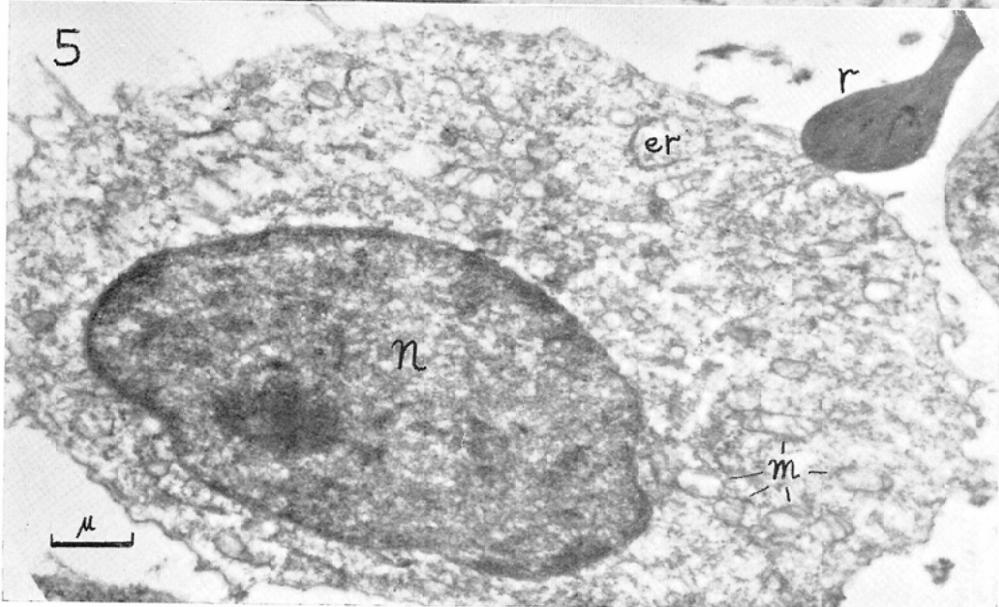
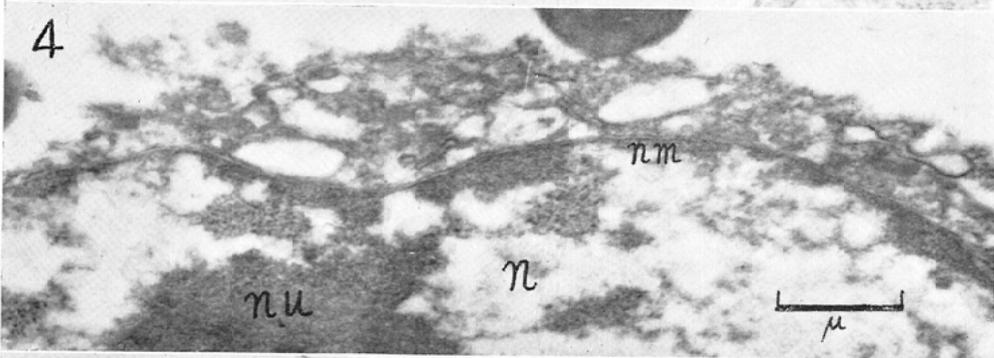
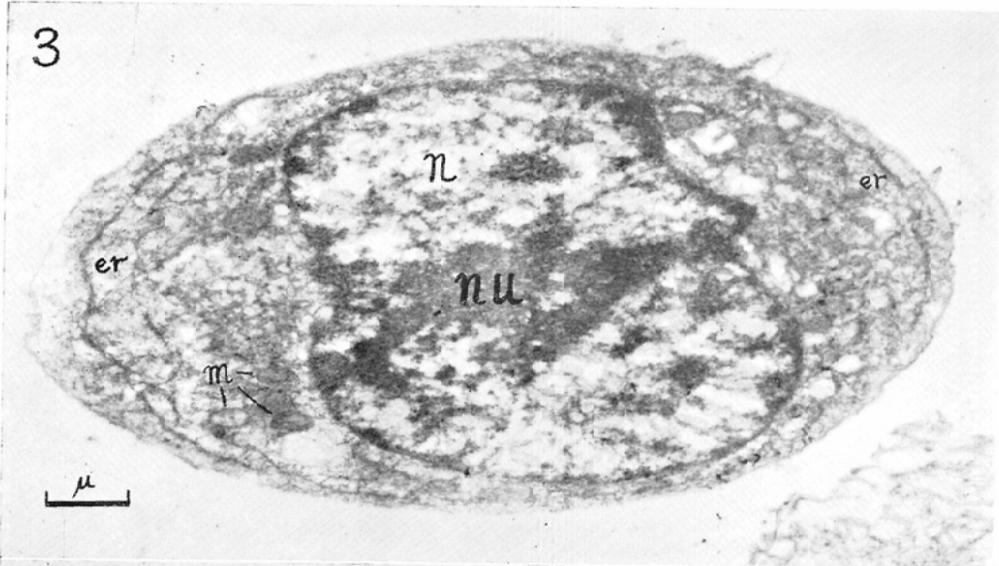
吉田肉腫細胞に対する放射線の影響は従来光学顕微鏡又は位相差顕微鏡により多くの観察が行われて居り、教室においても、貴家¹⁷⁾、泉¹⁸⁾、小原¹⁹⁾、一方井²⁰⁾、田島²¹⁾、松本²²⁾、中道²³⁾らによつて一連の報告が行われて来た。これらの中特に静止核異常細胞の消長を観察した泉の報告が本実験と関連が深い。

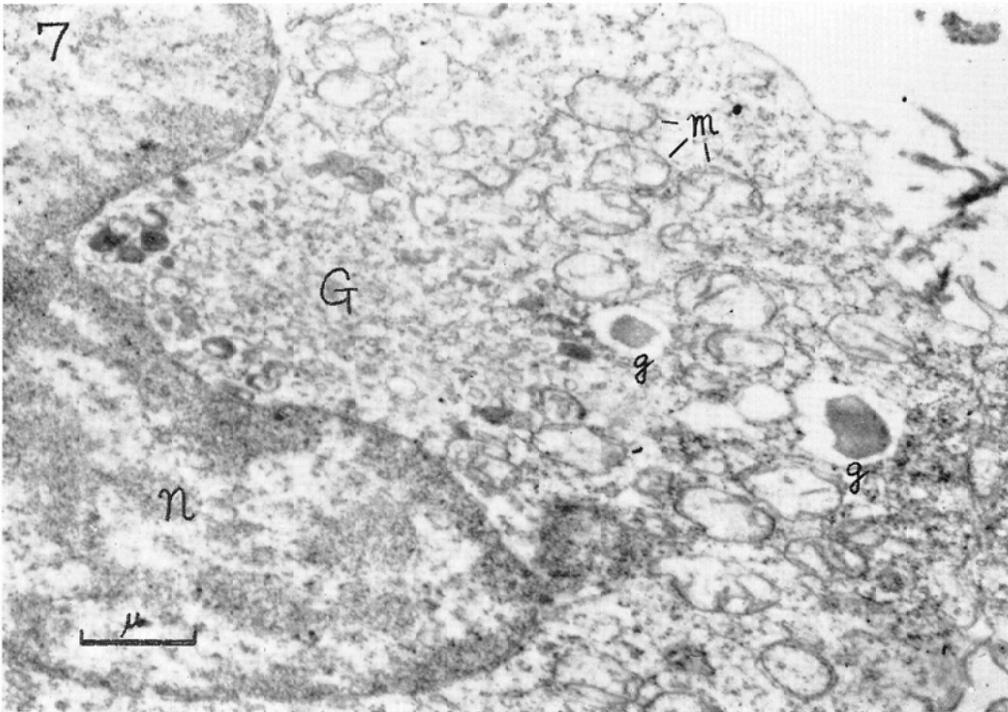
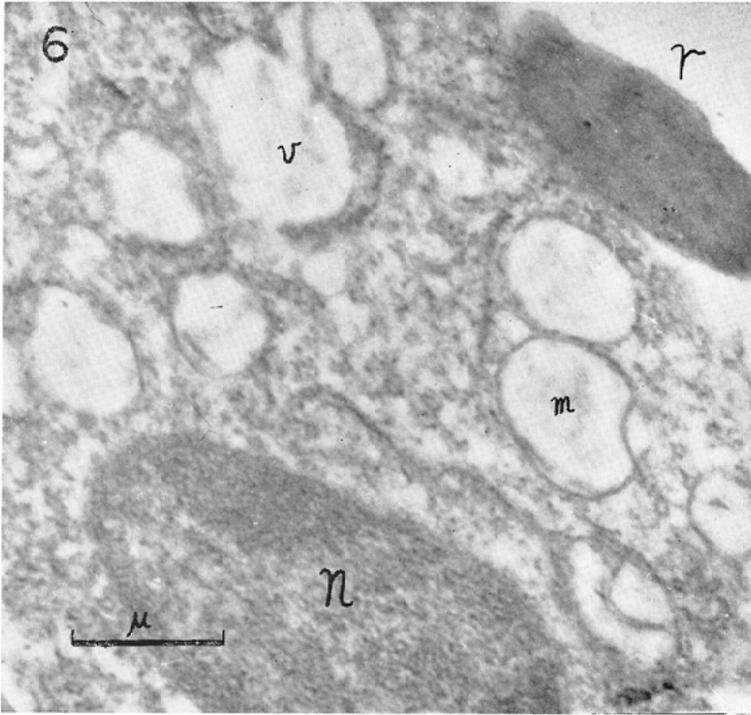
即ち、吉田肉腫細胞の異常なものを核異常と原形質異常に大別して、X線照射後の異常細胞の消長を経時的に且数量的に観察している。

500r照射例について見ると非照射例では約3%の頻度で見られた異常細胞は照射直後から増加し始め、3時間後には13.8%と極限に達し6時間後より減少に傾き72時間で照射前値に戻つた。これら異常細胞の中、核に異常を認める細胞は4時間後に最も多く4.1%(対照例では0.4%)、原形質に異常の認められるものは3時間後に最も多く10.9%(対照例では1.7~3.2%)に上つた。そして核では核崩壊が原形質では原形質融解が異常の主な所見であり異常細胞の消長を左右するものは原形質融解細胞で、これらの結果から原形質に対する放射線の影響の著しいことを述べている。

この実験では一実験動物当り腫瘍細胞5000個を







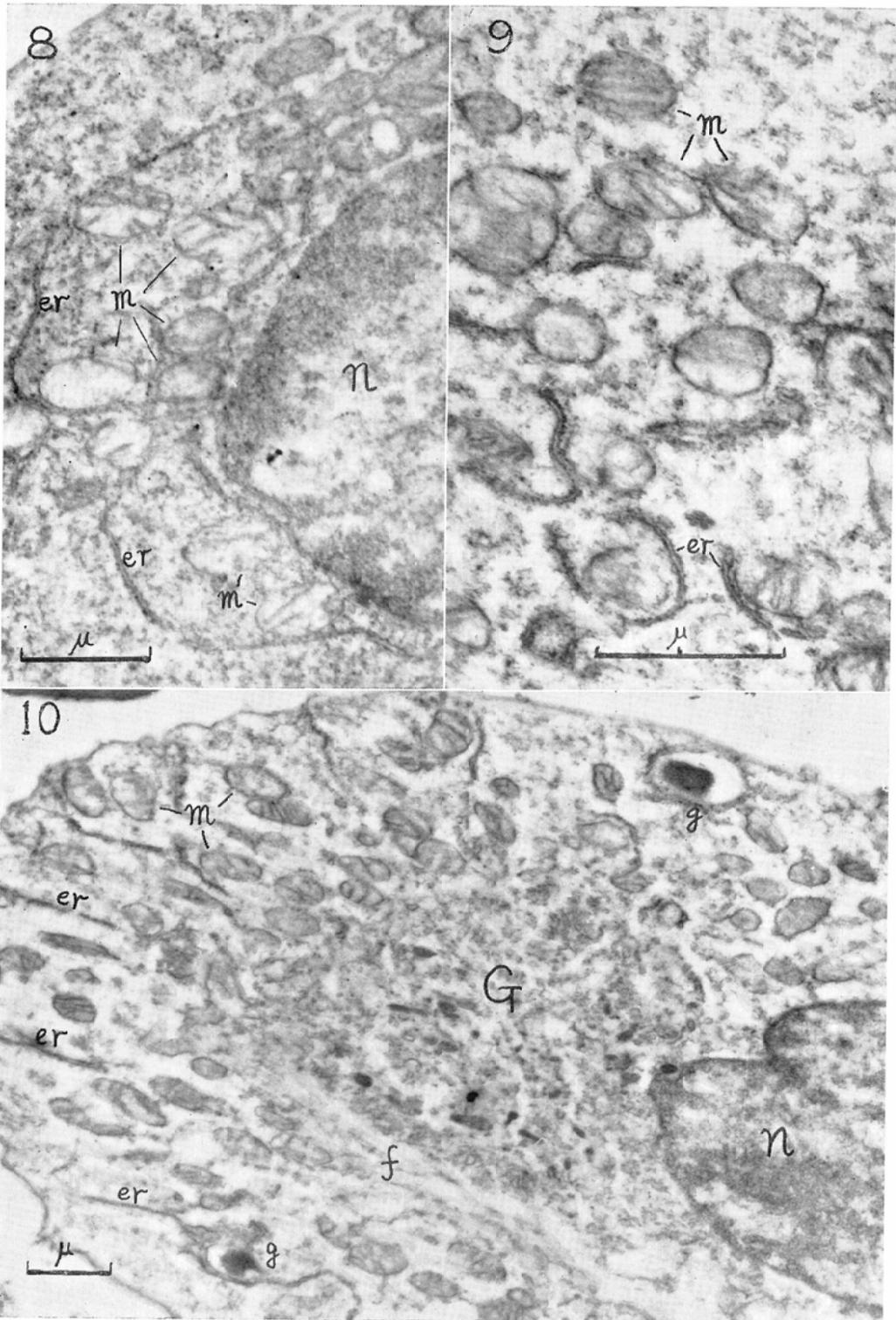


Illustration of Micrograph.

All sections were stained with uranyl acetate solution.

Figure 1. (Control, 15.600 \times) Section of a typical untreated Yoshida ascites tumor cell four days after inoculation. n: nucleus; m: mitochondria; G: Golgi area; f: fibrillar formation; r: red blood cell.

Figure 2. (control 24.000 \times) A portion of an untreated tumor cell demonstrating a relatively well developed Golgi-area.(G) Chromatin disperses homogenously throughout the nucleus. (n) Most of the mitochondria (m) are intact. Ribonucleoprotein-particles are diffusively distributed in the cytoplasm, g: granules.

Figure 3. (500r, 1h. 12.000 \times). Electron micrograph of intensely destroyed Yoshida ascites tumor cell 1 hour after the irradiation with 500 r. Cell surface is rounded owing to the absence of microvilli. The chromatolytic nucleus (n) is occupied with small vacuoles and agglutinated nucleolus. (nu) In the vacuolated cytoplasm, a number of elongated, lamellar endoplasmic reticulus (er) run windingly along the cell surface, and a few mitochondria (m) are seen as electron dense masses.

Figure 4. (500 r, 1h.18.000 \times) A portion of a irradiated tumor cell. Thickening of nuclear membrane (nm), chromatolytic nucleus with a chromatin margination and the destruction of cytoplasm are clearly demonstrated. Cell membrane can not be seen.

Figure 5. (500 r. 1h. 11.7000 \times) Yoshida ascites tumor cell 1 hour after the irradiation with 500 r, showing vacuolization of the cytoplasm and the pycnotic nucleus. er: endoplasmic reticulum; r: red blood cell.

Figure 6. (500r. 1h. 22.700 \times) Large vacuoles (v) in the cytoplasm of irradiated tumor cell. Some of them have a trace of crista mitochondrialis (m), so the origin of these vacuoles is evident. r: red blood cell.

Figure 7. (250 r. 1h. 15.600 \times) A portion of Yoshida ascites tumor cell 1 hour after the irradiation with 250 r. Chromatolysis, swelling and vacuolization of mitochondria (m) are visible. Vacuoles with electron dense granules (g) are also seen, of which nature still unknown. Cytoplasm is electron less dense owing to the diminution of ribonucleoprotein-particles. G: Golgi area

Figure 8. (250r, 1h. 20.500 \times) Section of a part of Yoshida ascites tumor cell 1 hour after the irradiation with 250 r. Mitochondria (m) show various degrees of swelling and vacuolization. Endoplasmic reticulus (er) of lamellar type are quite impressive in this photograph.

Figure 9. (500 r. 12h. 30.000 \times) A portion of irradiated tumor cell showing a close relationship between regenerating mitochondria (m) and endoplasmic reticulus. (er)

Figure 10. (500 r. 12h. 13.300 \times) A portion of irradiated tumor cell showing a rather swollen Golgi-area (G) and fibrillar formation (f). Mitochondria are uniformly small and some of them are with dense matrix with regularly arranged cristae mitochondriales, suggesting a restoration from radiation damage. Endoplasmic reticulum (er) and the granules (g) identical to those seen in figure 7 are also demonstrated.

算えその中の異常細胞を分類集計している。従つて上記の数値は対照例照射例共に普遍的な姿が捉えられているものとする。一方著者の実験では電子顕微鏡の特性上このような計数処理の可能な観察は困難であり、写真撮影も蛍光板上で一見して変化の明かな細胞を対象とすることが多いため、得られた電子顕微鏡像の解釈にはこの間の事情を考慮する必要がある。

一応このことを念頭に入れ乍ら 500r 照射群について比較すると、異常細胞と見されるものは遥かに高い頻度で現われている。細胞死の所見は照射 1 時間後に約 10% 程度に見られ 3 時間以後は急

速に減少したが、これより軽度の種々の変化を認める細胞も矢張り照射 1 時間後に最も多いとの印象が深い。細胞死の場合程明瞭ではない。泉によると異常細胞は 3 時間後に 13.8% と最高値を示しているが、1 時間、2 時間でも 10% を超えており前述の著者の印象もこの記載と甚だ異なるというわけではない。

一方核異常と原形質異常とでは後者が数的に優勢で、異常細胞の消長を左右するとの記載も亦首肯し得る。光学顕微鏡的に原形質異常と認められたものは原形質融解であつたが、腫瘍細胞の好塩基性の因となるリボ核蛋白粒子が消失或は減少す

るという電子顕微鏡での所見はこれに対応するものと考えられる。

核の変化の実態は然し乍ら、彼此に相当の懸隔を認める。核異常としてその基本をなすものは核崩壊であり、これは照射後3～4時間頃に最高の頻度を示すとの記載であるが、著者の認めたものは、染色質融解であり、これは照射後1時間で最も著明であつた。この差の由るところは一つには数的観察の面で十分を尽せないことの外に電子顕微鏡の分解能の隔絶せるにあると考える。

次に細胞内小器官の示す変化を細胞化学的な幾多の知見と対比して検討して見よう。

核は細胞の中で最も放射線感受性の高い部分であるとの考えが一般的で、特にデオキシリボ核酸(DNA)の代謝は最も敏感でありその合成は100～150rですでに著明に阻害される⁴⁾といわれる。然も電子顕微鏡的に見られた変化は種々の程度の染色質融解であつた。核内でのDNAの所在は染色質であることを考えあわせるとこのような核の変化はDNA代謝に対する放射線の影響を裏書きするものであろう。

核膜は滑らかさを失つてゴッゴッとした感じや波打った感じとなり、染色質融解の著明な細胞では核膜は肥厚して二重構造が極めて明瞭になつている。核膜のこのような変化は Scherer u. Vogell²⁵⁾ がX線照射後の肝、腎、脾の電子顕微鏡像に見たものと軌を一にするが、大里⁹⁾は制癌物質 citral 投与後の腹水腫瘍細胞でこのような核膜の肥厚を認め、核内と細胞質との間の物質交換は円滑を欠くと考えられるので、citralの腫瘍細胞への侵襲点の一つはこのような物質代謝の障害であるとしているが著者もこれと同意見である。

染色質融解の高度のものは照射1時間後に最も多いが12時間後でも依然この傾向を示す多くの細胞が見られることは核の放射線感受性の高いことを物語る所見と考えられる。

腹水腫瘍細胞の一つの特長は好オスミウム性のリボ核蛋白粒子が小胞体の膜構造とは無関係に細胞質基質中に分散し、光学顕微鏡的に原形質の好

塩基性の因をなす²⁶⁾ことで、これは吉田肉腫細胞でも同様である⁶⁾⁷⁾¹²⁾。

X線照射後このリボ核蛋白粒子が著明に減少し細胞質は空粗となるが、このような像も亦染色質融解と同じく照射後12時間に至るまで各期の細胞に頻繁に認められた。Schmidtら¹¹⁾はEndoxan投与後の吉田肉腫細胞を電子顕微鏡的に観察したが、Endoxanでは細胞の融解(Protoplasm-entmischung)が或程度限局性に起るようによく窺われるが、X線照射の著者の実験では細胞質全体に均等に起つている。

リボ核蛋白粒子は粗面小胞体に附着するものも同じく減少しているが、これはリボ核酸(RNA)と蛋白質より成る。細胞の遠心分離を行つた際マイクロゾーム分割として得られるものはこのリボ核蛋白粒子を含む小胞体の断片と考えられており、細胞内の蛋白合成の場はこゝにあるとされている。X線照射後このリボ核蛋白粒子が著明に減少したことはX線により細胞の蛋白合成能が侵されたことを裏付けるもので、前述の核の変化と相俟つて細胞の蛋白代謝の障害が著しいことが想像される。

糸粒体の変化は極めて多様であつた。

照射後1時間では塊状化した濃厚な顆粒状のものもあるが多くは膨大し空胞化を示した。3時間以後はこのような空胞化を示すものは殆どなくなり正常像への回復が見られた。

X線照射後の糸粒体についての諸報告によると、Mcquadeら²⁰⁾は¹³¹Iを投与したラットの甲状腺上皮の糸粒体が種々の変性像を呈したことを述べているが、変性像そのもの記載はやゝ明確さを欠く憾がある。前述のSchererら²⁵⁾は糸粒体は1時間後に塊状化する傾向を認め、24時間後、3日後、7日後と追究した結果回復の像も認めるが、糸粒体はX線障害の指標として極めて敏感であるとしている。Themannら²⁸⁾は放射線療法を受けた子宮癌患者の試験切除標本で照射後数日或いは更に長期間の後に観察して正常と変らない糸粒体を有する細胞が大多数だが、明かに糸粒体の変性像と考える大空胞を有する細胞が混在するこ

とを述べている。

望月²⁹⁾は肝の糸粒体を組織内で或いは分割遠心材料としてX線照射し、全身照射30分後ですでに糸粒体の膨化、腫大、糸粒体櫛の変形を認めている。更に森本³⁰⁾はMTKⅢ型ラツテ肉腫に *in vitro* 又は *in vivo* でX線 200r 及び1000r を照射したところ、糸粒体の膨化、糸粒体櫛の崩壊、基質の淡明化などが照射直後に見られ、3時間後には回復の像を認めた。小胞体も変化するがこれは短時間で旧に復した。このような回復は *in vitro* の照射では認めなかつた。これらから放射線の作用は糸粒体、小胞体への直接の破壊がその機転の一つと考えている。

著者の認めた糸粒体の諸変化はこれら諸家の報告と軌を一にするが、これはX線照射時のみの所見でないことは明かである。即ち Endoxan 投与後の吉田肉腫¹¹⁾、Actinomycin 投与時の Hela 細胞³¹⁾、抗腫瘍家兎血清を注入した Ehrlich 癌³²⁾、又低圧下³³⁾や青酸カリその他の細胞毒投与時の肝³⁴⁾などでも観察されて居り、更に犬の心筋の血行停止時の糸粒体の変化が血行回復後次第に元に戻ることを見た例³⁵⁾などもあり、糸粒体の示す形態の変化は一つのモードを持つていようである。Gansler らが糸粒体の変性の各相としてあげたものはこれらを網羅している。

糸粒体の変化に関連して図7、図10などに見られる顆粒を有する空胞が問題となる。これは大きさは糸粒体のそれと略々同じ程度の、一重の限界膜の、時として限界膜のはつきりしない空胞で、その中に大きさ、形、電子密度區々の顆粒を容れる。これは多くの空胞様変化を呈する糸粒体群に混在して認める点から糸粒体の変性像の一つとも考えられるが、余り変化のない糸粒体と共にあることもあり、或いは細胞質内に孤立して認めることもあり、顆粒の形状が不規則な斑状を呈して脂肪顆粒に甚だ類似の印象を与えることもある。この顆粒がコマ状を呈することも屢々あり、このようなものは Nunez-Montiel ら³⁶⁾が ECHO ビールを感染させた猿の腎細胞で認めて細胞の防衛機構に関連ありと考えている “spiral body”

とも酷似した像となる。小胞体が拡大しそこに核質がとりこまれて同様の空胞を形成するとの報告³⁷⁾もある。

このような種々の形状を呈する空胞は照射後の細胞で比較的容易に散見するので上述の如く種々の可能性が考えられるがその本態は明かでない。

一方糸粒体には多くの酵素がこゝに局在し、細胞内酸化呼吸の場として、細胞内合成反応のエネルギー補給源となつて居ることは一般的な常識であり、糸粒体の構造の破壊に伴い、これら酵素のあるものは破壊され、あるものは活性を増すが知られて居り、望月²⁹⁾、森本³⁰⁾らはこの点を特に強調しているが、著者の認めた諸変化も当然このような酸素化学的機能を反映すべきものと考えられる。

Fawcett & Ito³⁸⁾ はモルモットの睪丸の精細胞で、新鮮な時期には小胞体は多くは小桿状又は小空胞状であるが睪丸より分離して時間の経過した標本ではこれらが小槽状になり、長く伸びて多層状に重なり合つたものとなることを見た。

このように小胞体は細胞の機能や生活状態と関係があり、一定不変のものでなく種々の変形を示すことが知られている。

X線照射後の小胞体では滑面小胞体がやゝ拡大して小空胞様になる外に、粗面小胞体の数がふえ、極度に長く伸びて紐状になり、時には核膜や細胞膜に沿つてこれらを取り巻くような像も認められたがこのような像についての報告はないようである。

核膜は小胞体の一つの分化した型であるという考えが一般的であるが、杉原らによると吉田肉腫³⁹⁾や Ehrlich 癌⁴⁰⁾の核分裂の際に、核膜の破壊が起ると核膜に接してその外側を小胞体を取り囲み、両者間に電子密度の低い部分が出来ると。これは核膜破壊による細胞質の急激な崩壊を防ぐのであろうと想像している。図3や図8に見るような細胞はX線の影響の極めて高度に表われている細胞と考えられるから、小胞体のこのような像は杉原らの言うように核膜破壊或いは細胞膜の破壊の防禦的作用を示すものと考えてよいかも知れない。

Schmidt¹¹⁾らは吉田肉腫で Endoxan 投与後小胞体がふえ、これが脂肪顆粒を取り囲んで多層状を呈する像を認め、これは細胞の毒素による影響を代償しようとする努力の表われであるとして居り、Moelbert³⁴⁾も糸粒体を取り囲んで層状の小胞体が多くなっている像を捉えて、これらが糸粒体の再生に關与するものであるとしているが、X線照射後に見られた小胞体の変化はこれら諸家の説を支持するものと思われる。

最後に細胞内小器官のX線感受性について考えてみよう。

Scherer²⁵⁾は糸粒体が100rのX線照射で様々な変形を呈したことから糸粒体の放射線感受性の高いことを強調した。湯田⁴¹⁾も⁶⁰Co照射を行った子宮癌細胞について、少くとも先ず糸粒体が侵されたと言っている。Themann²⁸⁾はこれに反して糸粒体よりは細胞質の強く侵されたことを述べている。これらは放射線照射の場合であるが、他の抗癌物質や細胞毒などの例を見ると、核⁹⁾³⁶⁾、核小体³¹⁾、小胞体⁹⁾の変化を強調するものもあり細胞内小器官の変性の評価は區々である。

著者の成績では、核質、核小体、細胞質基質、糸粒体や小胞体などに夫々軽重種々の変化を認め、これらの一つ一つが放射線の腫瘍細胞の代謝過程への侵襲であることを述べたが、これらの中でどのものが特に感受性が高いかを断言することは出来ず、単に糸粒体や小胞体の変化は照射後時間と共に恢復する傾向を認めた。

実験材料、投与物質、観察方法などの異なる諸家の実験を同列で比較するわけにはいかないが、Moelbert³⁴⁾の実験は示唆的である。即ち、青酸カリなどの細胞毒を投与後数分より観察を開始して、初期の細胞機能の賦活されたと見るべき核の変化や、細胞質で先ず侵されるものは小胞体であり糸粒体ではないことなどを指摘している。放射線感受性の高い部分は照射後早期より変化を示すであろうし、その変化の持続も長期に亘るであろう。従つて照射後1時間での観察は早期に起り得る可能性のある変化を捉えるには長過ぎた憾がないわけではないが、線量についても更に微量の照射が何

らかの手掛りを与えたかも知れない。一方形態の変化と機能の変化が平行すると言う保証もないから、生化学的な知見との対比が更に必要となる。これらは今後の検討に俟つべき諸点である。

V) 総括及び結論

吉田肉腫細胞に対する放射線の影響を電子顕微鏡的に追究した。

非照射吉田肉腫細胞の経日的観察より、移植後3日乃至7日でその微細構造に本質的な差はないことを知り、又非照射細胞の基本的な電子顕微鏡像を把握し得た。

この知見をもとにしてX線照射細胞の検討を行った。先ず第一に、照射後に認められる微細構造の変化を対照と比較し乍ら正確に把握した。次に、これらの変化の個々について、照射後1, 3, 6及び12時間と経時的な推移を追い、細胞死を極限とする放射線の影響が照射1時間後に最大で以後次第にその程度が軽減すること及び、糸粒体、小胞体については明かな障害恢復の像を認めた。最後に細胞内小器官の放射線感受性の差を検討したが本実験の線量と観察時間からは断言し得る所見を捉えることが不適當と思われた。

以上の観察所見を諸家の報告と対比して、特に微細構造の変化が細胞の代謝機能と如何に關連するかを考案した。

本実験の遂行に当り、常に温い御配慮を賜つた本学細菌学教室石田教授に衷心より御礼申し上げます。

又、幾多の有益な助言と指導を戴いた電顕室天野保二鈴木健二、鬼川徹の三博士に深甚なる謝意を表します。

本実験の概要は第20回及び第21回日本医学放射線学会総会に展示発表した。

VI 文 献

- 1) Epstein, M.A.: J. Biophys. Biochem. Cytol., 3: 567, 57. —2) Palade, G.E.: J. Exp. Med., 95: 285, 52. —3) Caulfield, J.B.: J. Biophys. Biochem. Cytol., 3: 827, 57. —4) 吉田富三: 吉田肉腫, 寧楽書房, 昭27. —5) 堀井章市: 電子顕微鏡, 4: 129, 56. —6) Wessel, W. u W. Bernhard: Z. Krebsforsch., 62: 140, 57. —7) Yasuzumi G. & R. Sugihara: Cancer Research, 18: 1167, 58. —8) 杉原理一: 奈良医学雑誌, 9: 112, 昭33. —9) 大里俊吾: 日本内科学会雑誌, 48: 161, 昭34. —10) 森淑: 福島医学雑誌, 10:

49, 60. —11) Schmidt, C.G. u H. Themann: Z. Krebsforsch., 63 : 351, 60. —12) Bairati, A.: Cancer Research 21 : 989, 61. —13) Palade, G. E.: J. Biophys. Biochem. Cytol., 2 (Suppl.): 85, 56. —14) Gansler, H. et C. Rouiller, Schweiz. Zschft. fir Allg. Path. u. Bakt., 19 : 56 (細胞第二集58丸善より引用). —15) Rouiller, C. & Bernhard W.: J. Biophys. Biochem. Cytol., 2(Suppl.): 355, 56. —16) Takaki, F. et al.: Jikeikai Med. J. 2 : 21, 55. —17) 貴家貞而: 日医放線会誌, 12—8 : 8, 昭27. —18) 泉将: 日医放線会誌, 15 : 11 31昭31—19) 小原準之輔: 日医放線会誌, 15 : 624, 昭30. —20) 一方井卓四郎: 日医放線会誌, 17 : 6, 昭32. —21) 田島剛毅: 日医放線会誌, 16 : 416, 昭31. —22) 松本健二: 日医放線会誌, 17 : 1281, 昭33. —23) 中道五郎: 日医放線会誌, 20 : 1301, 昭35. —24) Hevesy G.: Radioactive Indicators. New York and London, Interscience Pub., 48. —25) Scherer E. u W. Vogell: Strahlentherapie 106 : 202, 58. —26) Bernhard W.: Cancer Re-

search, 18 : 491, 58. —27) Mcquade H.A. et al.: Rad. Research, 4 : 532, 56. —28) Themann H. u. A. Verhagen: Strahlentherapie 115 : 427, 61. —29) 望月捨晴: 日医放線会誌, 20 : 2532, 昭36. —30) 森本裕嘉: 四国医学会誌, 16 : 390, 60. —31) Journey L.J. & M.N. Goldstein: Cancer Research, 21 : 929, 61. —32) Loeblich H.J. u. Chr. Landschuetz: Z. Krebsforsch. 63 : 335, 60. —33) Moelbert E. u D. Guerritore: Beitr. Pathol. Anat., 117 : 32, 57. —34) Moelbert E.: ivd. 118 : 203, 57. —35) 掛札堅, 寺崎平: 日病会誌 46 : 901, 57. —36) Nunez-Montiel O. et al.: J. Biophys. Biochem. Cytol., 11 : 457, 61. —37) 田中博章他: 奈良医学雑誌, 10 : 39, 昭34. —38) Fawcett D.W. & S. Ito: J. Biophys. Biochem. Cytol., 4 : 135, 58. —39) 杉原理一他: 奈良医学雑誌, 10 : 31, 昭34. —40) 杉原理一他: 奈良医学雑誌, 10 : 476, 昭34. —41) 湯田雅馬: 日産婦誌, 10 : 1006, 昭23.