腫瘍ネズミにおける生殖細胞の異常分裂について

加 納 恭 子

北海道大学理学部動物学教室

昭和26年12月22日受領

UDC 576.356 : 599.323 :
616-006

我々の教室では癌の細胞学的研究の材料として、数年来シロネズミにおける吉田肉腫、MTK肉腫及びアゾ色素によつて生じた実験的肝癌を用いている。吉田肉腫及びMTK肉腫は、既に報告された通り（吉田1949, 牧野・田中・加納1951, 田中・加納1951）共に極めて類似した悪性の腹水腫瘍であつて、腫瘍を移植された動物は平均2週間前後で死亡する。その際、腹腔内で盛に増殖する腫瘍細胞は次第に内臓諸器官及び組織へと浸潤していくが、雄では睾丸は浸潤から免れるのが普通であるとされている。しかしながら私は腫瘍死した個体を剖検している間に、かかる腫瘍ネズミの睾丸が陰嚢から腹腔内へと上昇していわゆる潜伏睾丸となり、腹水或は浸潤組織に囲まれて萎縮の傾向を示す場合に少からず遭遇した。そしてこれらの生殖細胞の分裂は、程度の差はあるけれども種々の異常を呈していた。この原因として先ず頭に浮んだのは、腹水を伴つた腫瘍という特殊な異常環境が直接的に影響を及ぼすのではなからうかということであつた。一方、アゾ色素飼養によつて肝癌を発生したネズミでは、同じく悪性腫瘍であるけれども腹水を伴わず、又腫瘍部位が直接睾丸に接触して存在しない点で、前者とは対照的である。更に肝癌ネズミでは多くの場合睾丸は正常位置を占め、外観上は異常を認め得ないのであるが、稀に吉田肉腫ネズミのような潜伏睾丸となり萎縮している場合を見出した。ここでも生殖細胞には大なり小なり異常性がみられた。私は腫瘍をもつたネズミ、主に吉田肉腫ならびにMTK肉腫、又比較検討する意味でアゾ肝癌ネズミを材料として生殖細胞の細胞学的観察を行い、異常をもたらす原因についていささか考察してみたので、ここに簡単に報告する。

本稿を草するに当り、終始御懇切な御指導を賜つた恩師牧野佐二郎教授に深甚な謝意を表する。

材料及び実験方法

我々の実験はすべて当教室で飼育繁殖させているウィスター系シロネズミを用いている。今回の材料はすべて雄で、吉田肉腫及びMTK肉腫ネズミ10個体、肝癌ネズミ2個体と、対称実験区として、正常個体、吉田肉腫移植初期及びアゾ投与後早期のネズミ各々1個体宛で、計15個体である。対称区を除き、すべてネズミが死期に近づいたと思われた時、撲殺して固定した。それ故、固定時の日数は吉田肉腫ネズミ群ではおおむね移植後2週間前後であつたが、1個体は異常経過例で37日生存したものであつた。肝癌ネズミ群は *o*-Amino azo toluene (以下 O・A・T と略す) 投与日数約10ヶ月と、*p*-Dimethyl amino azo-benzene (以下 D・A・B と略す) 投与日数約5カ月のものでどちらも完全な肝癌を形成していた。対照として用いた O・A・T 飼養後150日の個体ではまだ肝癌の形成をみなかった。又、材料はすべて1951年2月より9月までに得たものである。以上の詳細については第I表に示す通りである。

観察は大部分、押しつぶし標本によつて行つた。これは Koller (1942) や田中 (1951) が癌組織や体細胞の細胞学的観察に用いた押しつぶし方法に準じたものである。即ち、先ずカルノア液で2~24時間固定した材料を、10%醋酸に約10分浸漬した後、直ちにアセト・オルセイン又はアセティック・チェンチャンバイオレットで約10~20分染色し押しつぶし標本とする。これは細胞個々の観察に極めて適している。また材料の一部は同時にアレン・ブアン液或はカルノア液固定後切片標本となし、ハイデンハイン氏鉄ヘマトキシリンーライトグリーンの二重染色を施して組織像の観察に供した。

第 1 表 固定時における実験腫瘍ネズミの状態

腫 瘍 名	固 定 月 日	固定時の日数 (移植後又は アゾ投与後)	体 重	睪丸の上昇	腫瘍の浸潤	睪丸の萎縮	生殖細胞の異常
吉 田 肉 腫	1951.2.10	16 日	85 gr	+	強 度	+	+++
〃	1951.2.19	9 日	85 gr	+	弱 度	+	+
〃	1951.3.26	12 日	105 gr	+	中 度	+	++
〃	1951.9.21	18 日	125 gr	+	強 度	+	+++
MTK 肉腫-I	1951.2.28	13 日	80 gr	+	中 度	+	++
〃	1951.5.25	17 日	80 gr	+	弱 度	-	-
〃	1951.6.30	12 日	90 gr	-	中 度	-	-
〃	1951.8.17	37 日	120 gr	+	強 度	+	+++
MTK 肉腫-II	1951.2.17	10 日	83 gr	+	中 度	+	++
〃	1951.4.20	10 日	75 gr	-	弱 度	-	-
O・A・T 肝癌	1951.9. 2	10ヶ月	160 gr	+	—	+	++
D・A・B 肝癌	1951.9.14	5ヶ月	220 gr	-	—	-	+

対 照 実 験 区

正 常	1951.3. 5	—	100 gr	-	—	-	-
吉 田 肉 腫	1951.5.15	4 日	95 gr	-	なし	-	-
O・A・T 肝癌	1951.6.10	3ヶ月	130 gr	-	—	-	-

観 察 結 果

吉田肉腫および MTK 肉腫ネズミにおける睪丸の萎縮，生殖細胞の異常性は，睪丸の腹腔内への上昇と腫瘍の浸潤度合と相関々係にあるようである。第 I 表に掲げた通り，腫瘍の浸潤が強度であつて，睪丸が潜伏状態にある時ほど生殖細胞の異常退化が著しいが，潜伏睪丸であつても浸潤の少ない時，又は浸潤が或程度すすんでいても睪丸の上昇をみない時には異常は殆どみられなかつた。それ故，異常性は必ずしも腫瘍動物の生存日数と平行しているとはいえないが，37 日を経過した個体では最も甚しい退化現象がみられ，細精管内は荒廃し，精子形成は全く停止していた（第 1 図）。

第1-2図 腫瘍ネズミの睪丸における細精管像，1，MTK 肉腫-I ネズミ 37 日経過例，精子形成は全く停止し著しい退化を示す。×100。 2，吉田肉腫ネズミ 18 日経過例，多核細胞の出現。×350。

肝癌ネズミにおいても，個体数は少いが類似の傾向がうかがわれた。この場合は睪丸が潜伏性でない場合にも軽度ながら生殖細胞の分裂は乱され，上昇していた例ではその異常も大きかつた。

生殖細胞の異常分裂は第一，第二精母細胞の中期から後期にかけて多数出現する。これに対して，かかる異常分裂の出現する同一材料においても精原細胞の分裂は影響を受けることが比較的少く，正常像が多いのは興味深く思われる。一般にバッタの生殖細胞を化学薬品で処理した場合にも，精原細胞の分裂よりも精母細胞のそれに作用することがしばしば見られるようである。

第 3—17 図 腫瘍ネズミの生殖細胞にみられた異常分裂。3，第一分裂中期核板における染色体排列の異常。4，精原細胞における高異数性（染色体数は約 50）。5，第一分裂後期における紡錘体極性の混乱。6，同，分配の不等。不分離の染色体がみられる。7，同，末期における染色体の遅れ。8—9，同，染色体橋の形成。9 はこのまま復帰核を形成すると思われる。10，二核細胞の形成。11，復帰核形成。12，分裂後期における染色体の融着。13—14，染色体内部構造の螺旋化或は珠数状化。15，3 極分裂。16—17，二核細胞の分裂。16 は第二分裂中期核板。7，8，14 は肝癌ネズミ，他は吉田肉腫及び MKT 肉腫ネズミ。×1200。

観察された異常性としては：中期核板における染色体排列の異常及び散在（第 3 図），染色体数の変異（第 4 図），分裂後期における染色体移行の方向性の混乱ならびに不等配分（第 5—6 図），染色体の遅れや染色体橋の形成（第 7—9 図），二核細胞（第 10 図）及び復帰核形成（第 11 図）等最も普遍的なものとして挙げられる。更に染色体の内部構造の変化にもとづくと思われる染色体の融着或は膨潤現象（第 12 図），珠数状化或は螺旋化（第 13—14 図），球状化を示す像も数多く認められる。細精管の退化が甚しい場合には，この他に多極分裂（第 15 図），多核分裂（第 16—17 図），倍数性細胞などが出現する。染色体の強度の凝縮や崩壊も珍しくないようである。一般に紡錘体の存在は顕著にみとめ得るが，これが障害されると細胞質からその存在を区別することが出来なくなる。又，分裂活動ならびに精子形成能力の全く停止した細精管内において，その中軸部の腔所に 3—4 核を有するいわゆる巨大細胞が群をなして見出された例も 2, 3 あつた（第 2 図）。以上のべた異常性は，中村・牧野

(1950) が人為的潜伏睾丸の実験によつて観察したものに殆ど一致した共通性を見出すことができた。

対照実験区の動物では、正常個体は勿論、吉田肉腫治癒個体、吉田肉腫移植後4日の個体、発癌前の個体、いずれにおいても生殖細胞は全く正常で活潑な精子形成がみられた。正常分裂過程については牧野 (1943) の研究を参照されたい。

考 察

ネズミの生殖細胞に異常や退化現象がみられることについてはいくつかの実験や観察がなされている。一般に陰嚢を有する動物においては、睾丸が陰嚢に降下することを妨げると短時日のうちに生殖細胞の崩壊に伴う細精管の萎縮がおこることが知られている。Moore と共同研究者 (1924, 1926) は人為的に潜伏睾丸をつくることによつて広範な実験を行い、その直接原因が陰嚢と腹腔との温度差にあることを指摘した。最近、中村・牧野 (1950) はかかる潜伏睾丸の詳細な細胞学的研究によつて多数の生殖細胞分裂の異常を観察し、これは温度その他の生理条件の異常な環境におかれたせいではあるが、そのために細胞の正常な水分関係が乱された結果として誘起されたものであると考察している。

一方、Koller (1946) はハムスターにおいて、例えば冬期 (非発情期)、栄養不足、飢餓、病氣、老齢というような精子形成の能力を低下させるすべての条件の下で精細胞のX染色体に特殊の退色現象がみられ、甚しい場合には生殖細胞の分裂が乱れたり分裂が抑制されたりすることを認め、その原因を主として細胞内の核酸の欠乏に求めている。更に最近では直接化学薬品によつて蛋白質代謝を阻害して精細胞に傷害をみたという報告もある (Jacquez & Biesele 1951)。これによると C-57 黒系ハツカネズミに抗アミノ酸物質 β -1 Naphthalanine を注射すると、精細胞においてのみその核内に大きな空胞が形成され、この時期を除いて精子形成の過程は何ら影響をうけぬという特異作用のあることがわかった。

アゾ肝癌ネズミについても簡単ながら生殖器の異常がしられているが、雌の場合が主である。天野・富田 (1938) によれば、O・A・T を与えると卵巣は著しく退化するのに反し、精巣はかえつて機能亢進の状態になるという。但し、これは比較的初期 (飼養後 270 日) の肝腺腫より癌腫に移行すると推定される時期に調べられたもので、彼らは結果が腫瘍の悪液質に起因するものではなく、O・A・T と性ホルモンに関した影響によるものとみなしている。更に D・A・B を投与したネズミの雌は大半が不妊になるという報告もあるが (楠本 1933, 杉浦—Rhoads 1941)、細胞学的な観察はなされていない。しかし今回の観察結果から考えると、少くとも腫瘍個体の不妊に関する一因は雄の側にもあるように思われる。

以上の報告から、ネズミの睾丸は環境の変化、栄養状態その他の生理的条件の悪化、細胞の新陳代謝妨害などによつて精子形成過程を乱されることがうかがわれる。腫瘍をもつた動物、特に悪性腫瘍においては、腫瘍が増大すると腫瘍自身の新陳代謝産物又はその頽廃物が全身に対して特有の有害作用を及ぼし、これに栄養障碍も加つて、いわゆる悪液質の状態を招来することが知られている。それ故に、このような害作用や生理条件の悪化が感受性の高い生殖細胞へも及んで、これを異常に陥れることは、上述の数例からみても充分納得の行くところである。この事は又、吉田肉腫ネズミにおいて浸潤度が高い程、異常性が著しいことによつても裏づけされると思う。しかしここで注目されるのは、異常性は更に潜伏睾丸の形成に關聯して増加していたことである。前述の通りこの研究の結果は、中村・牧野 (1950) の報告に甚だ類似した。彼らは生殖細胞の分裂異常を既に手術後 8~15 日で観察し、30~40 日では大多数の生殖細胞が退化の傾向にあると述べている。そこでみられたという分裂異常、即ち、染色体の融着及び凝固、膨潤、球状化、分裂後期から末期にかけて出現する染色体橋や不等分裂、中期核板における染色体排列の異常、染色体数の異常、二核あるいは多核細胞の形成、多極分裂

は悉く今回の実験において出現した。これは腫瘍ネズミにおいても潜伏辜丸となつたことが、生殖細胞の異常を促す主要因の一つであることを裏書するものといえよう。しかしながらいかなる原因又は機構の下で潜伏性辜丸になるかは、現在明確な説明を有さない。一方、観察された異常型を詳細に分析してみると、著者の場合には以上の他に染色体の螺旋化或は珠数状化ともいふべき崩壊像が、吉田肉腫群、肝癌群を通じて普遍的にみられた。それ故にかかる現象は潜伏辜丸に起因するというよりも、むしろ腫瘍の影響としてより強くあらわれるもののようにも推察される。

最後に問題となるのは、吉田肉腫の腹水という特殊な環境が直接に滲透的作用、あるいは又毒作用をあたえないかということである。これについてはさらに多くの実験例の観察と適切な実験によらなければ確答は得られないようであるが、この実験においては、第Ⅰ表によつて明らかな通り、腹水がたまつていて潜伏辜丸になつた場合にすらも浸潤度が少い時には異常が起らなかったことからして、この問題は主因としてとり上げるに至らないようである。

いずれにせよ、腫瘍動物の生殖細胞が短期間で異常に陥るのは単純な機構によるものではないかもしれない。そして究極の原因としては細胞内の正常な水分関係が乱されたり、毒素が作用したりすることによつて異常性をもたらすものと考えられるけれども、私は今回の吉田肉腫ネズミを主にした観察にたいしては、その主な原因を腫瘍形成にもとづく種々な生理条件の悪化と潜伏辜丸の形成とに求めておきたいと思う。

摘 要

1) 吉田肉腫及び MTK 肉腫を移植したネズミにおいては、動物が死期に近づくとその辜丸はしばしば潜伏性となり、浸潤組織に囲まれて萎縮する。このような辜丸において生殖細胞の異常分裂が観察されたので、その原因をアゾ色素を与えて発生させた肝癌ネズミのそれと比較することによつて調査した。

2) 観察された異常性は次のとおりである。中期赤道板における染色体の排列異常、染色体数の異常、分裂後一末期にみられる不等分裂、極性の混乱、染色体移行の遅れや染色体橋の形成、多核細胞の形成、多核及び多極分裂、染色体内部構造の崩壊、粘着及び凝縮。

3) 異常を生ずる主な原因として、腫瘍によつて生ずる生理条件の悪化と、潜伏辜丸による影響とをあげたい。

文 献

- 天野重安・富田隆雄 1938. 癌 32 : 73-83.
Jacquez, J. A. and J. J. Bieseke 1951. Anat. Rec. 109 : 699-702.
Koller, P. C. 1942. Nature 149 : 193.
——— 1946. Proc. Royal Soc. B 133 : 313-326.
桶本正治 1938. 新興医学 1 : 715-717.
Makino, S. 1943. Jour. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. 6 Zool. 9 : 19-57.
Makino, S., T. Tanaka and K. Kanô 1951. Gann 42 : 199-202.
Moore, C. R. 1924 a. Amer. Jour. Anat. 34 : 269-316.
——— 1924 b. Minesota Medicine, Dec. 1924 : 753-761.
——— 1924 c. Amer. Jour. Physiol. 77 : 59-68.
Moore, C. R. and Wm. J. Quick 1924. Ibid. 68 : 70-79.
Nakamura, T. and S. Makino 1950. Cytologia 16 : 27-36.
Sugiura, K. and C. P. Rhoads 1941. Cancer Res. 1 : 3-16.
Tanaka, T. 1951. Gann 42 : 81-85.

- Tanaka, T. and K. Kanô 1951. Jour. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. 6 Zool. 10 : 289-301.
Yoshida, T. 1949. Gann. 40 : 1-21.

Résumé

KANÔ, K: MITOTIC ABNORMALITIES OF GERM CELLS OBSERVED IN THE TESTES OF SOME TUMOR-BEARING RATS.

In most cases, the testes of the Yoshida sarcoma-bearing rats were retained in the abdominal cavity during the latter part of their life span. These elevated testes are highly disorganized showing a remarkable decrease in size. Quite similar condition of the testis was found also in the MTK-sarcomas.

Microscopical observations of the elevated testes showed that little or no spermatogenic activity was occurring. The seminiferous tubules had shrunk as a result of the disintegration of germ cells. The germ cells showed various types of mitotic abnormalities. They are as follows: scattering or displacement of chromosomes at metaphase, varying numbers of chromosomes, irregular distribution of chromosomes at anaphase, spindle disturbance, non-disjunction and lagging of chromosomes at anaphase, chromosome bridges at anaphase, formation of bi- and multi-nucleate cells, formation of restitution-nucleus, multi-polar mitoses, stickiness and coalescence of chromosomes, swelling of chromosomes, deformation of chromosomes into round bodies, breaking down of the inner chromonema spirals with bead-like appearance.

A tentative conclusion was given on the cause of the degeneration of germ cells in the elevated testis of the tumor animal as follows: the influence of strange environmental condition of the elevated testis, coupled with the effect of the injurious body fluid produced by the tumor, may form the cause of the disturbance in the supplies of blood, nutrient and other secreting substances in the testis, and this may result in the production of mitotic abnormality in germ cells which are most susceptible to strange environment.