原 著

細胞核クロマチンの微細構造*

(日綿実業株式会社技術部)

佐藤 昭彦**

1. クロマチン研究の意義

細胞学の進歩により、核内構造の生理的意義の重要性が、非常に大きくなってきたことは当然のことであり、生化学的方法、遺伝学的方法によって膨大な研究が行なわれている。さらに癌細胞の研究や、細胞診の発展により、形態学的研究も進歩してきた。とくに電顕的研究、オートラジオグラフィー、組織化学などの研究で、非常に詳細な研究が行なわれている。しかるに静止核(間期核)の微細構造については、大きさの問題から、電顕も全体的な微細構造を観察することは不可能であり、最近開発された走査型電顕も内部構造の観察にはまったく無力である。そのため静止核の微細構造は、染色法による観察と、位相差、干渉位相差などの方法によって研究されているのみで、クロマチンについては、概略的な分類が行なわれているのみで、もっとも代謝の活発であると考えられる静止核の微細構造は、いまだに仮定的な構造が提案されているのみで不明である。さらにクロマチンと染色体との対応も、Sex-Chromatinを除いては、どのような対応関係にあるのかも不明である。とくに組織培養の困難な分化型細胞については、染色体分析も困難であり、組織培養法では、組織のどの部分の細胞が、どのような構造にあるのかが不明である。このような困難性はまったく、電顕と光顕との性能の差に基づくギャップによるもので、静止核クロマチンの構造は、両方法のギャップの中にあるわけである。

したがって従来の研究をみても、クロマチンについては、網状構造説¹⁾や、染色体とクロマチンの染色中心とが一致するという説など、いろいろ仮説が行なわれており、いまだ形態学的な明確な研究は行なわれていない。このことは細胞診においても同じで、細胞診断上、核内

の構造については、概略的な表現しか行なわれていない状況にある。

以上の状況は、その原因が、光顕の分解能にあるわけであり、この問題が解決されれば、生きた細胞の微細構造の研究にも役立つものと思われる。筆者は、この点を解決するために、偏光暗視野斜照明法が、一つの突破口であることを確認した。いろいろな方法が考えられるのでこれらの方法論を論じ、次に実際の結果の一部を報告する次第である。なお、この研究は続行中で、一部は第8回日本臨床細胞学会で発表した。

2. 高分解能光学顕微鏡の研究

光顕で資料をみる場合、物が存在するということと、見えるということとは、まったく別である。

例えば、屈折率の差が微小であるときは、数ミクロンのものも見えないし、特殊な方法で見ると、光顕で4ミリミクロンまで検出できるのである。まず光顕の分解能(ϵ)について述べると、次式で表わされる。

$$\epsilon = K \frac{\lambda}{n \sin u}$$

ただし $K=f(R)$, $R=NAc/NAo$ で、 λ は使用光源の波長、 n は対物レンズとカバーガラス間の媒質の屈折率、 u は対物レンズに入る光線の光軸との角の最大値であり、 NAc はコンデンサーの開口数、 NAo は対物レンズの開口数である。資料が発光体の場合は、 $K=0.61$ となるが、普通の明視野透過法の場合は K の値が変わる。もし NAc と NAo が等しい場合は $K=0.61$ となり、発光体の場合と同一式となる。したがって対物レンズの開口数のみあげてもコンデンサーの開口数が低いと分解能は低下する。逆に対物レンズの開口数が少し低くても、コンデンサーの開口数が大きいと分解能は大きくなる。計算によれば、 K の最少値は 0.57 であり、 $R=1.4$ のときである。しかし対物レンズの開口数が小さいと、 K が最大値となっても、 $n \sin u$ が小さいので、分解能は低下する。

以上の式から、明視野透過法の分解能増大のために

* Fine structure of interphase nuclear chromatin.

** Akihiko Sato
(Sub-Manager, Technical Research Dept.,
Nichimen Co., Ltd.)

は、次の方法が考えられる。

(1) コンデンサー、対物レンズの開口数の大きいものを用いる（市販品では最高1.40）。

(2) 媒質の屈折率を大きくする（メチレン・ヨージッドの $n=1.7425$ が最大、実用的には、油浸オイル $n=1.52$ を用いる）。

(3) 使用波長を短くする（可視波長の最短のものは 0.4μ であるが、紫色でコントラストが悪く、対物レンズの収差の問題から 0.43μ が限界である。ただし紫外線を用いると 0.25μ まで可能）。

使用波長については、レンズの収差の問題があり、 0.55μ がもっとも収差が少ないので、普通のレンズには干渉フィルターで 0.55μ を選出するのが良い。ただし高度修正された特別レンズ、および色収差のない反射対物レンズを用いると短波長のものが使える。

以上より明視野透過型光顕の分解能は、実的には、その分解能 (ϵ') は次のごとくなる。

$$\epsilon' = 0.61 \times 0.55 / 1.4 = 0.24(\mu)$$

もし紫外線光顕ならば、その分解能 (ϵ'') は、

$$\epsilon'' = 0.61 \times 0.25 / 1.25 = 0.12(\mu)$$

となる。実際にはレンズの収差などの問題で、この限界値は高級レンズとコンデンサーを用いないと出ないが、高級顕微鏡を用いるとこの値が出る。すなわち開口数が大きくても、収差の補正が良くないと、それだけの性能が出ない。例えば、*Amphipleura pellucida* という硅藻は、開口数1.63の対物レンズを用いないと、明視野でその 0.24μ の縞を見ることはできないが、筆者は、カールツァイスイエナの偏光顕微鏡で、明視野で撮影に成功した。この場合、開口数は1.25であった。したがってレンズの収差の補正と、用いる方式により分解能は極限にまで増大できる。最近の干渉位相差法では、光路差 $1/250 \sim 1/500$ 波長までの分解能のものが出ており（例えば、カールツァイスイエナおよびライツ製、国産品は実に $1/8 \sim 1/10$ 波長が限度）、これで 0.22μ まで可能である。

普通一般に使用されている国産の光顕は、最大分解能が $0.4\mu \sim 0.35\mu$ であり、これを世界最高の光顕まで上昇させても、クロマチンの微細構造は、さらに小さいので解像不可能である。

かくて明視野法を突破する方法が必要である（ただし紫外線光顕では 0.12μ まで可能であるが、特別のものしか見えないので除く）。

その方法としては、以下の方法がある。

a. 偏斜照明法（斜斜照明法）

b. 暗視野法

c. 偏光法、偏光位相差法、偏光暗視野法

d. 位相差暗視野法、位相差斜光法

e. 紫外偏光法、紫外位相差法、紫外暗視野法

以上のうち位相差法の利用は halo が多く、不正確で、結局、斜光法と偏光法が基本的な方法となる。暗視野法は、斜光法の一種であり、斜光法が一定方向のみの分解能を示すのに比べて全体の分解能を上昇できて有利であるが、halo が多く、これを解決するのが偏光暗視野法で、さらに偏光暗視野斜光法を行なうと、驚くべき分解能を示す。この理由は、資料より送られる光が普通の光顕では、一次回折光のみ利用しているためで、これをもし二次回折光まで利用すると、その分解能 (E) は、次の式のごとくになる。

$$E = K \frac{\lambda}{2n \sin u}$$

もし全体の視野について観察するときは、暗視野偏光法を用いると、この式にだいたい一致する。この場合、コンデンサーの性能上開口数は 1.05 までしか利用できないので、これで計算すると、その場合の分解能 E' は、

$$E' = 0.61 \times 0.55 / 1.05 \times 2 = 0.16(\mu)$$

となる。筆者は、この方法で、 0.18μ の構造まで写真を撮ることができた（ただし、これらの性能は、資料の厚さ、屈折率、大きさ、と、レンズの性能、光源の輝度数、ガラスの厚さ、屈折率により変わるので、どんな物体をみても同じ性能は出ない。すなわち対象によって方法を変えねばならない）。

さらに、これを偏光暗視野斜斜照明法にすると第三次回折光まで利用でき、その場合の分解能 E'' は、

$$E'' = 0.61 \times 0.55 / 4 \times 1.05 = 0.08(\mu)$$

となる。筆者は、この方法で最高 0.1μ の構造を撮影できた。理論的には、ある特別の資料を用いると、第七次回折光まで利用できる、最大分解能は $3m\mu$ である。ただし人間の眼の解像力が最高 $0.06mm$ であるため、2,000 倍にしても 0.06μ 以下のものは見えないので、形がわからず、存在がわかるのみである（ただし写真フィルムの解像力を利用すると 0.02μ まで可能）。この方式は、方位板や各種の単波長を用いた場合の波長の変化より、形がわからずとも、方向、大きさは測定できる。ただし核のような大きなものの内部の微細構造は、将来改良されても 0.05μ 以下は解像できないと思われる（カールツァイス・オーバーコッヘン社の Reuchtbild condenser は、暗視野法で開口数1.30まで利用でき、ultra-Slit condenser は1.40まで利用できる。国産品は1.05までしか利用できない。これらの高級暗視野コンデンサーを用いると、さらに分解能は上昇するが、使用

できる範囲が少なくなるので、smear 位しか利用できない。組織切片は困難である。

以上のごとく特殊方法を利用すると、今まで不可能とされていた微細構造が観察できる。以下、その中より一部を発表する。

3. 特殊光顕によるクロマチンの研究

筆者の偏光暗視野斜光法（偏暗斜法）は、今のところ Papanicolaou で染色された固定の単細胞（Smear）にもっとも有効に威力を発揮できる。生細胞や、固定された組織については研究中であるが、完全にうまくゆかない。しかし、まもなく改善されると思う。

まず写真で説明すると、図1は正常婦人の Vaginal smear を Papanicolaou 染色したものを偏暗斜法で撮影し、5,000 倍に拡大した静止核の写真である。多くの粒子は、今のところクロマチン粒子と考えているが、各

図1 Vaginal smear cell (×5,000)

照明角度で写した同一核について、これら粒子の数を数えると、約50個あることがわかった（この数え方は非常に困難である）。形も大小いろいろあり、明視野写真と対比すると、大型の粒子は、ヘテロクロマチンに相当するようである（仁も含まれる）。この粒子の数は、染色

図2 子宮頸癌細胞 (×4,000)

体の数と対応していると思われる。次に図2は、子宮頸癌患者の Cervical smear 中の癌細胞の核で、4,000倍に拡大してある。

上記の方法でクロマチンの数を計ると、約100個あることがわかった。癌細胞の種属細胞説³⁾によれば、初代培養細胞の染色体の異数化と同様に、癌細胞にも一定の染色体構成があり、ヒト子宮頸癌細胞では4n 体が多いといわれ、これは約100個の染色体に相当するので、この粒子が染色体となんらかの対応関係があるとすれば、この粒子の数は興味ある数字である。

図3 HeLa 細胞 (×4,500)

図3は、HeLa 細胞で、約4,500倍に拡大してあるが、クロマチン粒子の数は、約80個である。HeLa 細胞の染色体は65~85個といわれており⁴⁾、これも興味ある数を示す。筆者は、この方法を用い、あらゆる生理状態の場合のクロマチン粒子の構造を Papanicolaou 染色の明視野像と、Acridin orange 染色の蛍光顕像と対応させながら、おのおののクロマチンについて、形、大きさ、染色性がどのように変動するかを研究中である。さらにオートラジオグラフや組織培養による染色体分析とも対比しつつ、詳細な対応関係と、その変動を研究中である。図1と図2の比較によっても明かなごとく、癌細胞と正常細胞では、明確にその構造の差を認めることができるので、染色体分析による差と同じ位の区別が可能と思う。染色体分析では、個々の細胞の染色体の差異は簡単に分別が困難であるが、本法では、分化型の細胞にまで応用できる利点があると思う。さらに組織中の各細胞のクロマチンの構造を分析できれば、癌化の過程が組織や細胞のレベルで、クロマチンの構造変化として追及できると思う。これらについては目下研究続行中であり、別の機会に報告したい。

終わりに資料提供などのご協力をいただいた大阪市立大学医学部産婦人科教室（主任・藤森速水教授、野田定講師）に感謝申し上げるとともに、クロマチン、染色体

についてご教示いただいた北海道大学理学部牧野佐二郎教授, 東京大学医学部病理学教室太田邦夫教授に厚くお礼申し上げます。

(追記: 本研究には, カールツアイスイエナ社の偏光暗視野斜光装置付顕微鏡を使用したことを参考までに付記します)。

Summary

The observation of fine structure of interphase nuclear chromatines in the whole nucleus have neither been successful by optical microscope nor by electron microscope, which is the newly developed polarized dark field oblique illumination microscope, makes successful to take photography of the fine structure of interphase nuclear chromatines.

The result is as follows:

- 1) The numbers of chromatine morecules are approximately 50 in a normal cell, approximately 80 in HeLa cell and approximately

100 in a cell of cervical cancer.

- 2) The size, the form and the stain activity of each chromatine were observed clearly.
- 3) Studying chromatines in physiological condition in this method may realize possibility in correspondence between chromatine and chromosome.

This method may has a possibility to reveal the meaning of further fine structure and the process of cancer development.

文 献

- 1) H. Ris: Symp. on the chem, Basis of Hered, 23 : 1957.
- 2) 大 野: 細胞化学シンポジウム, 11, 1961.
- 3) 牧 野: J. Fac. Soc., Hokkaido Univ. Ser. VI. 10 : 225~242, 1951.
同 : Gann, 43 : 17~43, 1952.
同 : Internat. Rev. Cytol., 6 : 26~84, 1957.
- 4) E. Chu et al. : J. Nat. Cancer Inst, 20 : 383~401, 1958.