Polkissen の組織學的及び組織化學的研究

第5報 核酸を中心として

千葉大學醫學部皮膚科泌尿器科學教室

(指導 並木重郎教授)

原 田 澄

HISTOLOGICAL AND HISTOCHEMICAL STUDIES

ON POLKISSEN (ZIMMERMANN)

V. REPORT ON NUCLEIC ACID

Kiyoshi Harada

From the Dermato-Urological Clinic of Medical Faculty of Chiba University

(Director: Prof. Juro Namiki)

緒 言

核は形態學的ならびに 遺傳學的にその性質はかなり明瞭であるのに反し, 細胞内に於ける核の生理學に就いては未だ不明な点が多い. 併し核と胞體は密接な關係を有し, その間に物質代謝が行われていることは種々の研究に依つて確められている. と共に核が分裂することや, 細胞呼吸の中心であること, 又酵素作用の中心であるとか, 蛋白質合成の中心であることがだんだんと判つて來た. そして核膜, クロマチン網には, 鹽基性色素や, ヘマトキシリン, Pappenheim-Unna 液のメチール緑に染色される物質が存在する. 又形態學的に Karyolyse, Pyknose, Karyorhexis の様な現象が起る. そして, 原形質内に於ては, 有形物質 (Cytoplasmic inclusion) と後形質 (metaplasm) が存在することが判明した. そして古くより Hertwig が核に由來するすべての細胞成分はクロミヂア (Chromisia) と云うはんちゆうに入れ, その中には, 細胞質内の微細な顆粒から種々の形態を持つ大きな顆粒も含まれてきた. そしてそれはミトコンドリアとも混同されていたが, 最近原形質内に Feulgen 反應陰性の核酸の存在することが判明した. 即ち核のクロマチンとクロミヂアとは明らかに異つた核酸を有することが判つた. 即ち Brachet (1940)¹⁾ は Pappenheim-Unna 液で染色すると,

核はメチール緑で染まり, 仁と細胞質内に存在する或る顆粒はピロニンで染まる. この切片をあらかじめ牛の脾から抽出したりボヌクレアーゼで處置すると, ピロニンで, 仁と細胞質内に存在する顆粒は染まらない. だから核にあるものは, デゾキシリボ核酸 (DNA) であり仁と細胞質に存在する顆粒はリボ核酸 (RNA) であることを證明した. 又 Caspersson²⁾ (1941) は細胞質内に紫外線を 2600Å で強く吸収し Feulgen 反應陰性の物質のあることを發見しリボ核酸の存在を確認した.

又我々は古くから組織學や細胞學で酸好性とか鹽基好性とか云う言葉を使用し, 鹽基性色素が核酸と結合することは上述の言葉からもうかわれとくにチアジン及びオキサジン系の色素はデゾキシリボ核酸とはメタクロマジーを起さないが, リボ核酸とはメタクロマジーを起す. だから細胞質内に存在して上述の如き色素によりメタクロマジーを起す顆粒はリボ核酸を含むと云われている³⁾. (柴谷, 1948). けれども他方, Ehrlich⁴⁾ (1877) が Waldeyer (1875) の形質細胞と稱したものを檢索中, 鹽基性色素に對してメタクロマジーを呈する特有の顆粒を有する細胞を認め新たに肥胖細胞 (Mastzellen) なる名稱を附した. その後 Lison⁵⁾ (1935), Holmgren und Wilander⁶⁾ (1938), Hempelmann⁷⁾ (1940) 等に依り, 軟骨, 粘液, 肥胖

細胞等が鹽基性色素で、メタクロマジーを呈するのは多糖類硫酸エステル（コンドロイチン硫酸、ムコイチン硫酸）へパリン等に依ることが判明した。

さて Goormaghtigh⁹⁾(1932), Dunihne⁹⁾(1940)等は Polkissen の細胞に於て二核を有するものあることを證明した。即ち核が分裂して第二の核が造られることを主張し、又細胞質中には酸好性と鹽基好性の顆粒が存在し、細胞の分泌の増減に依り、その比率が變化すると主張した。又並木¹⁰⁾等は細胞質内に稀釋ゲンチアナ紫で染色され、メタクロマジーを起す顆粒を選擇的に染色し、その鹽基好性より核に由來するものでないかと想像した。私はこの研究の第1報に於て Polkissen の構造について報告したが、その中で、ゲンチアナ紫で染まる好鹽基性顆粒を有する細胞 (epitheloide Muskelzellen) の形態學に就いて述べたが、この報告では核及び核酸檢出のための色々の組織化學的及び細胞學的方法を利用し、この顆粒の本態を、とくに核及び核酸を中心として追求せんとした。

研究材料及び方法

成熟した二十日鼠 (18 g) の腎を摘出し、デゾキシリボ核酸の檢出には、無水アルコール、Carnoy 氏液固定、Feulgen 氏反應、凍結切片での Feulgen 反應、即ち Plasmal 反應、Bouin 氏液固定、Heidenhain 氏鐵へマトキシリン法 (小熊の方法による)。アルコール、フオルマリン、Ciaccio, Zenker, Helly, Lison 液固定、Gram-Weigert の Fibrin 染色、デゾキシリボ核酸 (DNA) とリボ核酸 (RNA) の檢出のためには、無水アルコール、Carnoy 氏液固定、Methylgrün-Pyronin¹¹⁾法 (柴谷の方法による。Methylgrün 液と Pyronin 液をあらかじめ柴谷の方法で作製し、使用直前に混合する。混合して長時日經過した染色液は不良である。アルコールでの脱水はすばやく行わねばならない。)

そして RNA, DNA 消化後の Methylgrün-Pyronin 染色をなし、RNA, DNA を確認する。

無水アルコール、Carnoy 氏液、固定、0.25%

Thionin 染色 (柴谷⁹⁾の方法に依る)。

Robertis による Azan 染色による RNA の證明法¹⁰⁾。ゲンチアナ紫法¹²⁾(25萬倍)とそして RNA, DNA 消化後のゲンチアナ紫法を使用した。

所 見

(1) フォイルゲン反應

固定	フォイルゲン反應	核	仁	細尿管上皮細胞顆粒	Polkissen 顆粒
アルコール	1 NHCl 4 分 (60°C)	+	—	—	—
Car-noy		+	—	—	—

(2) Plasmal 反應

		核	仁	細尿管上皮細胞顆粒	Polkissen 顆粒
凍結切片	フォイルゲン反應			—	—

この場合には細胞質には顆粒は表れないで平等に染色される。

(3) Heidenhain氏 鐵へマトキシリン法

固定	染 色	核	仁	細尿管上皮細胞顆粒	Polkissen 顆粒
Bouin	Heidenhain 鐵へマトキシリン	+	+	—	+

細尿管上皮細胞にへマトキシリンに染まる顆粒が見つからね程度まで分別する。

Polkissenの細胞群の或る細胞に於て大小の2核を有することがあり、又核が放出される様な像を認めることもある。細胞原形質内には大小不同の殆んど圓形のへマトキシリンに染まる濃淡、種々の顆粒を有し、そして或る細胞に於てはその数が多く、或る細胞に於ては少數である。

(4) Gram-Weigert の Fibrin 染色

固 定	染色	核	仁	細尿管上皮細胞顆粒	Polkissen 顆粒
アルコール	Gram-Weigert	++	++	—	—
フオルマリン		++	++	—	—
Ciaccio		±	—	—	—
Helly		—	—	—	—
Zenker		++	++	—	—
Lison		+	—	—	±

(5) リボ核酸の證明のために Methylgrün-Pyronin 法で染色すると RNA はピロニン好性の赤、DNA はメチール緑好性の青緑に染る。と主張されているが、分別、脱水をアルコールで行つ

固 定	染 色	分 別	核	仁	細尿管上皮細胞顆粒	細動脈	Polkissen顆粒	絲絨體
アルコール	Methylgrün-Pyromin	アルコール	紫青	赤橙	赤橙	濃赤	濃赤	濃赤
		アニリンキシロール	紫青	赤橙	赤橙	赤橙	赤橙	—
Carnoy		アルコール	紫青	赤橙	赤橙	赤橙	赤橙	—
		アニリンキシロール	紫青	赤橙	赤橙	濃赤	濃赤	濃赤

た場合(原法)と、アニリン・キシロール(1:1)で行つた場合とでは次の如くそのメタクロマジーは異なる。
細動脈、絲絨體には顆粒は表れない。

(6) ピロニン好性の顆粒がはたしてRNAであるか否かを決定するために、前記の固定をなした切片を、次の様な方法で、DNA、RNA の消化處置をし、しかる後、Methylgrün-Pyronin法を行うと、

方 法	消化目的	前 處 置			染 色	核	仁	細尿管上皮細胞顆粒	細動脈	Polkissen顆粒	絲絨體
			温度	時間							
Brachet ¹⁾	RNA	0.03% リボヌクレアーゼ ¹³⁾ (Kunitz)	60°C	1 時間	Methylgrün-Pyronin 法	B (A)	B (A)	— (A)	— (A)	— (A)	— (A)
						B (C)	B (C)	— (C)	— (C)	— (C)	— (C)
	低分子 ¹⁷⁾ DNA	0.03% リボヌクレアーゼ (Kunitz)	60°C	1.5 時間		B (A)	B (A)	— (A)	— (A)	— (A)	— (A)
						B (C)	B (C)	— (C)	— (C)	— (C)	— (C)
柴 谷 ³⁾	高分子 DNA	1 N HCl	60°C	4 分		R (A)	R (A)	— (A)	— (A)	— (A)	— (A)
						R (C)	R (C)	— (C)	— (C)	— (C)	— (C)
Erickson ¹⁴⁾	RNA	10% 過鹽素酸	4°C	18 時間		R (A)	R (A)	— (A)	— (A)	— (A)	— (A)
						R (C)	R (C)	— (C)	— (C)	— (C)	— (C)
	DNA 及び RNA	10% 過鹽素酸	70°C	20 分		— (A)	— (A)	— (A)	— (A)	— (A)	— (A)
						— (C)	— (C)	— (C)	— (C)	— (C)	— (C)
Pollister ¹⁵⁾	DNA 及び RNA	10% トリクロール醋酸	90°C	15 分		— (A)	— (A)	— (A)	— (A)	— (A)	— (A)
						— (C)	— (C)	— (C)	— (C)	— (C)	— (C)

B=青 R=赤 (A) アルコール固定 (C) Carnoy 固定

(7) Thionin のメタクロマジーによる RNA の證明¹⁾
核、仁は濃青に染まり細尿管上皮細胞顆粒と Polkissen 顆粒は薄くメタクロマジーを呈す。けれども細尿管上皮細胞顆粒と Polkissen の顆粒は

固定	染色	核	仁	細尿管上皮細胞顆粒	Polkissen 顆粒
アルコール	0.25% Thionin	卅	卅	+(M)	+(M)
Carnoy		卅	卅	+(M)	+(M)

色調の上で同一である。(M)=メタクロマジー

固 定	染 色	核	仁	細尿管上皮細胞顆粒	Polkissen 顆粒
アルコール	Azan 染色	青	赤	橙	青(青、紫色の顆粒)
フォルマリン		青	赤		青(赤、橙褐色の顆粒)
Ciaccio					

(8) Robertis の方法¹⁶⁾
(9) Polkissen に表われるゲンチアナ紫顆粒が DNA、RNA に原因するか否かを決定するために DNA、RNA を消化する處置した後のゲンチアナ紫染色。

考 案

アルコールや Carnoy 液で固定し Feulgen の Nucleal 反応を行うと、核造構は赤紫色に明瞭に染色されるが、仁や細尿管上皮細胞及び Polkissen の細胞の細胞原形質にはフォイルゲン反応陽性の物質は表われない。(1)けれども凍結切片で鹽酸加水分解後フォイルゲン反応を施行すると、細尿

方 法	消化目的	染 色	核	仁	細尿管上皮細胞顆粒	Polkissen 顆粒
Brachet	RNA	25萬倍ゲンチアナ紫法	—(A) —(C)	—(A) —(C)	—(A) —(C)	≡≡(A) ≡≡(C)
	低分子DNA		—(A) —(C)	—(A) —(C)	—(A) —(C)	≡≡(A) ≡≡(C)
	高分子DNA		—(A) —(C)	—(A) —(C)	—(A) —(C)	≡≡(A) ≡≡(C)
	RNA		—(A) —(C)	—(A) —(C)	—(A) —(C)	≡≡(A) ≡≡(C)
	DNA 及び RNA		—(A) ±(C)	—(A) —(C)	—(A) —(C)	≡≡(A) ≡≡(C)
	DNA 及び RNA		—(A) —(C)	—(A) —(C)	—(A) —(C)	≡≡(A) ≡≡(C)

(A) アルコール固定 (C) Ciaccio 固定

管上皮細胞も Polkissen の細胞もその細胞原形質は homogen に赤紫色に染色される。之の反應は Feulgen¹⁸⁾(1924, 1938, 1939)や Inhauser¹⁹⁾(1927)に依れば Plasmogen が昇汞で處置したり鹽酸で加水分解すると Plasmalになり、そのアルデヒド基が、フクシン硫酸により反應して紫赤色の化合物を作ることによると云われる。又この反應は DNA によつても與えられる。それはそのプリン基が酸水解により變化した後に上述の反應が行われると云う。けれどもこの反應は RNA は與えない。

アルデヒドに對するフオイルゲン反應の特異性は度々提唱され、そしていろいろに云われている。即ち oleic acid, cinnamic acid は陽性となり、又 Ketosteroid はこの反應でアルデヒドと區別出来ないことが判つている。Oster K.A. Oster J.G²⁰⁾(1946)は眞の反應はアルデヒドに特異的であり、他のカルボキシル化合物に對しては偽の反應を與えると云つている。だから細胞原形質内に DNA は存在しないが Plasmal 反應が陽性になることは注目すべきで、之はカルボキシル基が存在する物質を有することが想像されるが、この點に就いては再び検討しなければならない。

又形態學的に Heidenhain氏 Eisenhämatoxylin で染色される細胞質内の顆粒は Polkissen の顆粒が Phosphomolybdic Acid Hematoxylin (Mallory)や Phosphotungstic Acid Hematoxylin で特異的に染色されることが對稱して興味ある事實であるが、この染色の機構が判明しないから核の

一部が細胞原形質内に放出したものであるかどうかは斷定することは困難である。即ちヘマトキシリンはミトコンドリアや粘液蛋白等色々の物質を染色するからである。

大澤²¹⁾(1944)や黒屋²¹⁾(1944)はグラム染色は細菌の RNA に關係し、グラム陽性菌には RNA が多いと云つた。けれども Bovin²²⁾(1947)によつてこのことは否定されている。又 Dubos²³⁾²⁴⁾等(1938, 1944)はリボヌクレアーゼを使用してグラム陽性菌を陰性菌にして RNA の介在が必要だと主張した。けれども Panjal²⁵⁾(1949)はこの様なリボヌクレアーゼの作用をそれが不純物として含む蛋白分解酵素のためであるとして恐らくプリンの介在の下に於ける反應であるとしている。

だから細尿管上皮細胞は RNA を有しPolkissen は RNA と多糖類を有するにかゝらず Gram-Weigert 法で細尿管上皮細胞顆粒も Polkissen 顆粒も染らない事實は Gram 染色がRNAとも多糖類とも關係のないことを示すものである。そして又稀釋ゲンチアナ紫法と Gram 染色の染色の構造は全く異なるものである。

Methylgrün-Pyronin 法で細尿管上皮細胞の細胞原形質に表われる顆粒と細動脈の中層Polkissen 顆粒、絲絨體の Intercapillary Spaceの Pyronin 染色は、その metachromasia を異にする。之の事實は後者が RNA 以外の成分を含んでいることを示すものである。即ちこの詳細は第6報に述べるが、前者は RNA のみを後者は RNA と多糖類を含むためであらう。

又 Pyronin の metachromasia は材料の固定及び染色後の分別，脱水により異なる態度を取ることは興味がある。

そこで之の様に metachromasia を異にする Pyronin 好性の顆粒ないしは物質がはたして RNA によるものか否かを決定するために，切片を DNA・RNA 消化のための前處置をなし，Methylgrün-Pyronin 法を行うと，細尿管上皮細胞の顆粒も Polkissen 顆粒等も共にその Pyronin 好性を失う。このことは Pyronin では RNA がなければ染色されないことを示し，他の鹽基性色素の如く多糖類のみでは染色されないことが判明する。

Thiazine 系の Thionin (0.25%) で染色すると核と細尿管上皮細胞顆粒及び Polkissen 顆粒はその Metachromasia で區別出来るが，核と仁とは區別出来難い。又細尿管上皮細胞顆粒と Polkissen 顆粒とはその Metachromasia で區別出来ない。だからこの方法では RNA の Metachromasia のみしか判らないし又標本全體が diffuse に染まりその中に顆粒が表れるのだから見難い。けれども Thionin 溶液の稀釋度を増加すればこの所見と結果が異なる(第6報参照)

又 Robertis の方法では仁は Azocarmin で染るか細胞原形質は Azocarmin では染らず他の色素でいろいろに染る。だから Azocarmin で染まるのは仁に RNA が存在する爲だとは云えない。恐らく他の因子があるのであろう。

さて Polkissen の細胞原形質に表れる特有なゲンチアナ紫顆粒が何の様な物質に原因するかについて RNA, DNA 消化後のゲンチアナ紫染色をなすと Pyronin 顆粒は消失するのに反し，ゲンチアナ紫顆粒は消失しない。この事實は此のゲンチアナ紫に染る顆粒が全く DNA や RNA に原因するのではなく全く他の物質によることの證明である。この物質が何であるかに就いては第6報にゆする。

結 論

Polkissen には RNA を含む顆粒が存在するけれども稀釋ゲンチアナ紫染色で染るのは顆粒が DNA も RNA も含むためではない。

(御指導して下さった恩師並木重郎教授ならびに色々と御教示下さったミノフアーゲン研究所長市川收博博士に感謝します)。

文 獻

- 1) Brachet, J.: Compt. rend. soc. biol., **133**, 88, (1940). —2) Caspersen, T.: Naturwiss., **29**, 33, (1941). —3) 柴谷: 動物學雜誌, **58**, 3, (1948), 同上 **85**, 5, (1948). —4) Ehrlich 天野: 血液學の基礎, 上巻, 458頁, 昭和23年より. —5) Lison, L: Compt. rend. soc. biol., **118**, 821, (1935). —6) Holmgren N. and O. Wilander. Z. mikro. anat. Forsch., **42**, 242, (1937). —7) Hempelmann, L: Anat. Rec. **78**, 197, (1940). —8) Goormaghtigh. N. Arch. de Biol. Paries t. **43**, 575, (1932). —9) Dunihne, F.W: Arch of Path., **29**, 777, (1940). —10) 並木: 日泌尿會誌, **36**, 1, 昭和18年. —11) 柴谷: 科學, **19**, 519, (1949). —12) 原田: 醫學と生物學. —13) Kunitz, M: Science, **90**, 112, (1939). —14) Erickson, R.O.: Sax K. B. Ogur M. Science **110**, 472, (1949). —15) Pollister: Cold Spring Harbor Symposia, **11**, 309, (1947). —16) Robertis: Ren. Assoc. Med. Argentina, **60**, (595-596), 1045, (1946). —17) 市川: 臨床皮膚泌尿器科, **5**, 53, (1951). —18) Feulgen, R. and Voit. K: Arch ges. Physiol. Pflügers. **206**, 389, (1924). Feulgen, R. and Behrens, M: Z. physiol. Chem. **256**, 15, (1938). Z. physiol Chem., **260**, 217, (1938). —19) Inhan-ser, K: Biochem Z, **186**, 360, (1927). —20) Os'er, K.A. and Orter J.G: J. Pharmacol. Exptl. Therap, **87**, 306, (1947). —21) 大澤: 東北醫學雜誌, **35**, 117, (1944). —22) 黒屋: 東京大學傳染病研究所集談會報告, (1944). 醫學のあゆみ, **4**, 178, (1947). —23) Borin, A. Tulasne, R. Vendrely, R., Minck, R.: Arch. Sci. physiol., **1**, 307, (1947). —24) Dubos R.J. MacLeod. C. H.: J. Expt. Med., **67**, 791, (1938). —25) Bratholomew. J.W. Umbreit. W.W.: J. Bact., **48**, 567, (1944). —26) Panjal, J.: Bull. Soc. Chem. biol., **31**, 510, (1949). 江上: 核酸及び核蛋白質上下(1950)に貢ふことが多い。