

実験的神経膠腫の前癌期に出現するウィルス様粒子の意義

京都大学医学部脳神経外科学教室 (指導: 半田 肇教授)

河 村 悌 夫

〔原稿受付: 昭和44年1月16日〕

Significance of Virus-like Particles in Precancerous Lesions of Experimental Gliomas

by

YASUO KAWAMURA

From the Department of Neurosurgery, Kyoto University Medical School
(Director: Prof. Dr. HAJIME HANDA)

A carcinogenic hydrocarbon, 20-methylcholanthrene, was implanted in the right parietal region of C3H strain mice maintained in the animal colonies of Montefiore Hospital, New York and Kyoto University, and small precancerous lesions around the carcinogen were examined with the aid of electron microscope.

Virus-like particles were found in the cytoplasm of phagocytes and reactive astrocytes during the precancerous stages of Montefiore colony mice. They were similar in fine structure to those reported with the use of 3-methylcholanthrene and had a doughnut-like appearance with outer and inner membranes or shells in transverse sections and tubular forms in longitudinal sections. Their size was about 77 m μ in outer diameter and around 22 m μ in diameter of axial holes. The inner membrane consisted of two dense layers with about 8 m μ in total thickness. The formation of virus-like particles evidently involved the endoplasmic reticulum. Many inner shells of particles were visualized within the cistern, and their outer shells were derived from the membranous component of the endoplasmic reticulum.

Examination of structural details of reactive cells, induced by 20-methylcholanthrene and 1,2,5,6-dibenzanthracene in mice from Kyoto University animal colony, could not reveal any virus-like particles during the precancerous stages. However, in both colonies, phagocytes and reactive astrocytes engulfed the carcinogen pellet which was surrounded by two layers of limiting membranes, into their cytoplasm, and their fine structures were identical with each other.

In order to examine further details of clear cut difference in occurrences of the virus-like particles in both colonies, small pieces of the tissue around the carcinogen pellets were ultracentrifuged. The fractionation studies also showed virus-like particles in microsomal fraction (43830 $\times$ g for 30 min.) in Montefiore colony, not in Kyoto University colony.

In this series of experiments, 6 gliomas, 1 gliosarcoma, 2 intracranial sarcomas and 1 squamous carcinoma were developed in 20 Kyoto University mice by intracerebral implantation of 20-methylcholanthrene powder. No difference in occurrence of brain tumor development was observed between either of mouse colonies. Although these particles represent immature or incomplete forms as an oncogenic virus, it might be reasonably assumed that C3H mice of Montefiore Hospital colony showed a product arisen from an unknown specific interaction by the carcinogen or had latent viruses which were concentrated in an unknown way in the tissue in the neighbourhood of the chemical carcinogen.

緒 言

脳腫瘍の実験的研究, ことに多環芳香族炭化水素による神経膠腫の作製は, 1939年 Seligman and Shear⁵⁰⁾ 或いは Peers³⁶⁾ により始めて成功した。続いて1941年以來, Zimmerman 一派の多数の輝やかなしい業績¹⁾⁵⁸⁾⁵⁹⁾⁶⁰⁾⁶¹⁾⁶²⁾の他に, Tansley⁵⁴⁾, Russel⁴⁸⁾, Perese & Moore³⁷⁾ に至り, その成果は神経膠腫の組織発生, 病理, 分布, 局在性等の問題に寄与する処が大であつた。

しかし, 実験的神経膠腫の組織が, 人脳腫瘍組織と多少異なる事²²⁾⁵⁷⁾からも理解しうる様に, 自然発生する人脳腫瘍の発生機構を, 発癌剤により極めて不自然に腫瘍を発生せしめた実験からは十分に伺いえない。

処が近年, Simian vacuolating virus (SV40) のハムスター及びラット脳内接種による Ependymoma 発生¹¹⁾¹⁴⁾²⁸⁾⁴³⁾⁵⁷⁾, および培養下で人胎生グリア細胞の Transformation⁵¹⁾, 或いは Rous sarcoma virus のハムスターおよび犬脳内接種による神経膠腫¹⁵⁾⁴⁰⁾⁴¹⁾⁴²⁾および肉腫発生⁷⁾の報告があり, 人脳腫瘍組織にはウィルスは発見されてこそいないが, これらは人脳腫瘍発生にもウィルス関与の可能性を示唆するものである。

これと関連して, 1965年生田と Zimmerman は C3H マウス脳内に 1, 2, 5, 6-Dibenzanthracene を挿入し, そのマウス脳腫瘍の前癌状態すなわち反応細胞の細胞質内に, cylindrical 或いは filamentous なウィルス様粒子が発現し, この粒子は腫瘍形成後には発見されなかつた¹⁷⁾と報告した。仮りに, この粒子がマウス脳腫瘍発生に関与するウィルスならば, 将来このウィルス様粒子の単離により, in vitro における oncogenesis 或いは免疫学的実験の可能性が生じ, 現在, 形態学的, 生化学的, 更には治療上行きつまりの感を与える脳腫瘍の研究に新しいアプローチを与えるものと考えられる。

本実験では, 徐々に解明されつつあるウィルス或いは発癌剤による発癌機構に, 一つの鍵を与える事を目的として, ウィルス様粒子とマウスの種, ウィルス様

粒子と発癌剤との関係を検討した。

第1章 実験材料及び方法

1) 実験動物

京都大学純系動物センター飼育の C3H マウス (K 系マウスと略す) および New York, Montefiore 病院動物室より分与された C3H マウス¹⁷⁾ (M 系マウスと略す) を使用し, 年令は生後 1 ヶ月目のものを雌雄同数使つた。

2) 実験方法

実験 I

マウスを 0.07% Nembutal⁶⁾ 腹腔内注入により麻酔の後, 右頭頂骨を齒科用⁵⁸⁾バーで穿孔し, この部の硬膜を除去し, 頭頂葉皮質下に, 1, 2, 5, 6-dibenzanthracene (半井化学製, 以後 DB と略す) を加熱融解, 冷却凝固の後 Peller¹⁾⁵⁰⁾ とし, 或いは精製された 20-methylcholanthrene (和光純薬製, 以後 20-MC と略す) 粉末を挿入した。頭皮はコロジオン液で閉鎖した。

マウス飼育はプラスチックケージにて行ない, 飼料は固形飼料を使用 (クレア及びオリエンタル製) した。

標本作製は発癌物質を含む脳切片を切り出し, 8% 蔗糖加 5% ホルマリン燐酸緩衝液 (pH=7.4, 0°C) にて前固定し, 電子顕微鏡標本を採取した残りは, 10% 中性ホルマリン固定後, パラフィン包埋, H.E. 染色を行なつた。

電子顕微鏡標本は, 発癌物質周辺の 1 × 2 mm 小片を前記ホルマリン前固定 2 時間に続き, 1% オスミウム・タルトン緩衝液⁹⁾ にて 2 時間固定後, 緩衝液にて洗浄し, 漸強アセトン列を通して脱水を行ない, Vestopal に包埋した。超薄切片は Porter-Blum MT-2 Ultramicrotome, ガラスナイフにて作製した。また超薄切片作製にあたつては, Vestopal ブロックより 1 μm に切片を切り, methylene blue Azur II 混合液⁴⁴⁾ で染色し指標となした。超薄切片は, ウラニル⁵⁵⁾ 及び鉛³⁰⁾ の二重染色

の上, Hitachi 11-Aおよび11-D型電子顕微鏡にて観察した。

第1群; K系マウス脳内20-MC 挿入により脳腫瘍を発生せしめた群。

観察動物数; 20-MC 挿入後264日 以上生存した20匹。

観察期間; 20-MC挿入後264日より365日。

標本はH.E.染色のみを行なった。

第2群; K系マウス脳内へ1, 2, 5, 6-DB を挿入した群。

観察動物数; 48匹。但し, 腫瘍形成したものは除去した。

観察期間; DB 挿入後6 週より1年6 ヶ月。4 ヶ月迄は各週, 以後は月毎にDB 周辺部の脳組織を光学顕微鏡及び電子顕微鏡標本となした。

第3群; K系マウス脳内へ20-MC 粉末を挿入した群。

観察動物数; 57匹。

観察期間; 20-MC挿入後4 週より28週。

標本の作製は第2群に同じ。

第4群; M系マウス脳内へ20-MC 粉末を挿入した群。

観察動物数; 8 匹。

観察期間; 20-MC挿入後4 週より6 週。

標本作製は第2群と同じ。

実験 II

(1) ウィルス様粒子の分画遠心

発癌物質によりマウス脳内反応細胞の細胞質中に発現したウィルス様粒子が, 果してマウスの Colony の相違に依存するものや否や, 第2には, このウィルス様粒子が細胞分画のいずれの分画に入るか, 今後の粒子の単離の第一歩として, 表1の如き条件で分画遠心を行なった。

K及びM系マウス脳を各々切り出し, 手早く発癌物質を含めて $3 \times 2 \times 4$ mm小片になし, 溶媒を10%溶液になる様にとり, Potter-Elvehjem型ホモゲナイザーにて5分間均一化し, 順次超遠心を行ない, 各沈渣を1%オスミウム液で固定, 以下実験Iと同様に電子顕微鏡標本作製し鏡検した。溶媒は0.25M蔗糖, 0.033 M Tris aminomethan, 0.01 mM EDTA, pH=7.4に調製した。ローターは Hitachi RPS40A を使用した。

第1群; 20-MC 脳内挿入後4 ヶ月を経たK系マウスの発癌物質を含む脳小片の分画遠心を行なった。超遠心1回に付きマウス15匹を使用した。

第2群; M系マウスにて第1群と同様の処置を行なった。

(2) ウィルス様粒子のネガチブ染色

K及びM系マウスの発癌物質を含む脳極小片を Hanks 氏液にて洗浄した後, 2%隣タングステン酸液⁸⁾中にとり, 脳小片をすりつぶし, 液表面にカーボン蒸着メッシュをつけ, 余分の液を濾紙で除去後, 直ちに電子顕微鏡にて観察した。

第2章 実験結果

1) 実験 I

(1) 第1群 20-MC 脳内挿入によるK系マウスの脳腫瘍発生

20-MC 粉末脳内挿入後, 早期に皮下腫瘍を形成して死亡するものがあり, これは明らかに肉腫のみであつた。その多くは Fig. 1 に代表されるが如き Fibrosarcoma である。本実験では, この様な早期に 頭部皮下腫瘍を形成したものを除外し, 20-MC 挿入後264日に頭部膨隆, るいそう, 或いは一般状態不良のものをと殺し, 残りは全て365日にと殺した。その結果を表2に示す。

マウス20匹中, Glioma 5例, Medulloblastoma 1例, Gliosarcoma 1例, 頭蓋内肉腫, 頭蓋外肉

表 1

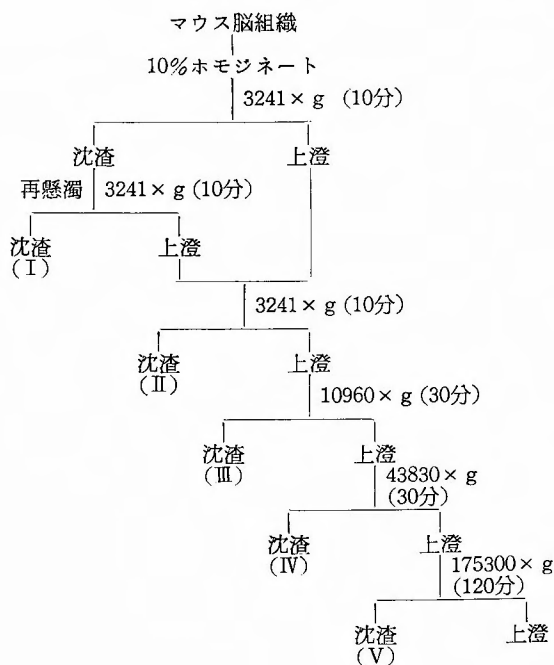


表 2

Mous No.	Autopsy No.	Experim. period (day)	Type of Tumors	Location of Tumors
1	260	264	Astrocytoma-Oligodendroglioma	intracerebral
2	261	264	meningeal sarcoma	basis
3	262	264	Fibrosarcoma	subctaneous
4	263	365	negative	
5	264	365	Glioblastoma multiforme	intracerebral
6	265	365	negative	
7	266	365	negative	
8	267	365	negative	
9	268	365	negative	
10	269	365	negative	
11	270	365	Ependymoma-Oligodendroglioma	intra-and extracerebral
12	271	365	Glioblastoma multiforme	intracerebral
13	272	365	Fibrosarcoma	extra-and intracerebral
14	273	365	Oligodendroglioma, Fibrosarcoma	intracerebral, subcutaneous
15	274	365	Squamous cell carcinoma	extra-and intracerebral
16	275a	365	negative	
17	275b	365	Medulloblastoma	intracerebral
18	276	365	Gliosarcoma	intra-and extracerebral
19	277	365	negative	
20	278	365	negative	

腫各2例，頭蓋内扁平上皮癌1例であつた。

次に個々の腫瘍組織像について述べる。

mouse No. 260；MC 挿入後264日，MC 結晶は右頭頂葉にあり，腫瘍組織は脳中心部では傍脳室部迄，背側は脳表へ出て逆に腹側へ拡つている。組織学的には，核が比較的明るく大型楕円形で，核小体，クロマチン分布が明瞭，胞体は大きく好エオシン性の星状か多角状の細胞が柵状に拡る部分と，核は円型均一，濃染し，胞体部は明るく honey combed appearance を呈する部分と入り乱れ，或いは一部では各々塊状をなしている。血管の増生はみられるが放射線状配列は認めない。Astrocytoma と Oligodonoroglioma との混合した腫瘍である (Fig. 2)。

mouse No. 264；MC 挿入後365日，腫瘍組織は右半球中央部を占める。血管増生が多いが，内皮細胞の増生は少い。血管を囲んで細胞が柵状の配列をなす。細胞は多形性で不均一濃染性の核を有し，少数の巨細胞，Mitosis を有する。細胞は壊死巣をも放射柵状に囲む。Glioblastoma multiforme (Fig. 3) である。

mouse No. 270；20-MC 挿入後365日，腫瘍組織は右半球脳室上部より周囲に拡り，脳底より外側に達する。組織学的には，核は長楕円形で若干の多形性あり，不均一に濃染し，核小体は明瞭，胞体自体も細長く全体として尖つた印象を与え，細胞群の中に増生した微細血管が樹枝状に入り込んでいる (Fig. 4)。また，この細胞の間に或いは塊りをなして一群の細胞が

あり、核は円形濃染し胞体は明るい (Fig. 5)。また極く一部には巨細胞も有り Glioblastoma 様の場所もあるが、Ependymoma と Oligodendroglioma の混合したものである。

mouse No. 271; 20-MC挿入後365日。腫瘍は右半球皮質下の20-MC結晶の周囲から発生し、左半球にも及んでいる。Pellet 周囲には核、胞体共に紡錘形の細胞もあるが、多くは胞体が大きく、円或いは楕円核細胞であり、その他、巨細胞等有り、多形性の強い Glioblastoma multiforme である (Fig. 6)。

mouse No. 273; 皮下肉腫とは別に脳腫瘍が存在し、この両者の連絡は認められない。MC 挿入後365日。脳腫瘍組織は、右半球中心部を占めMC結晶の周りに発生し、典型的な honey combed appearance を呈す Oligodendroglioma (Fig. 7)。皮下腫瘍は、Fig. 1の如く Fibrosarcoma である。

mouse No. 275; 20-MC挿入後365日。右頭頂葉皮質下に黄色色素を喰食した細胞群に隣接して、小形の円或いは楕円形の濃染核、狭い胞体の細胞集団があり、一部脳実質内に浸潤している。核は濃染するが不均一に染る。また、周囲に紫色にそまる不定形のがみられる。細胞の配列に特別の傾向を認めない (Fig. 8)。Medulloblastoma である。

mouse No. 276; 20-MC挿入後365日、脳実質内より脳表に迄拡った腫瘍で、円或いは楕円形の多形性を示す核および比較的大きい胞体を有する Glioma 組織と、大きな明るい長楕円或いは紡錘形の核および胞体の大きい肉腫組織を示す部分が混在している。Gliosarcoma (Fig. 9)。

mouse No. 272; 20-MC挿入後365日。紡錘形細胞群が頭蓋内に侵入している為脳実質が圧迫されている。Fibrosarcoma (Fig. 10)。

mouse No. 262; MC挿入後264日、皮下に存在した腫瘍で Fibrosarcoma である (Fig. 11)。

mouse No. 261; 20-MC挿入後264日、脳底部の小腫瘍塊、組織学的には脳膜に連続する細胞集団で、核は濃染、多形性に富み円型或いは紡錘形である。whorl 形成は認めぬ。meningeal origin の Sarcoma である (Fig. 12)。

mouse No. 274; 20-MC挿入後365日。腫瘍細胞群は頭蓋外より内部に侵入し強く脳実質を圧迫している。胞体は好塩基性で、多形性に富む明るい楕円形核を有する細胞が多層に並び、脳とは一線を画し、場所によつて壊死部がある扁平上皮癌の頭蓋内侵入である (Fig. 13)。

次にMC挿入後、腫瘍発生なく365日経過したものの組織像を Fig. 14に示す。MC結晶は存在するが反応細胞が殆んど認められぬ。Fig. 15は105日経過したもので反応細胞の出現が明らかで、特に発癌物質をとり込んだ喰食細胞がみられる。

(2) 第2, 3及び4群、発癌物質挿入後のK系及びM系マウス脳局所の経時的電子顕微鏡学的観察

脳内に挿入された発癌物質は、脳切片を肉眼的にみれば、1, 2, 5, 6-DB 或いは20-MC共々可成り長い月日の経過の後においても、脳実質内にくい込んだ状態で変化がない様に観察される。

光学顕微鏡学的には、1, 2, 5, 6-DB は一つの比較的大きな結晶であり、脳実質との反応はこの結晶の全周に一樣に起るわけでないが、20-MC は針状粉末である為その反応場所は多数である。これに対し電子顕微鏡学的には、脳実質内の1, 2, 5, 6-DB および20-MC の両者に差は見出せない。すなわち発癌物質の大きなものは、細胞外において細胞の一部に取り囲まれ、また小さいものは細胞内に喰食せられている (Fig. 16, 17)。この様な発癌物質を胞体内に有する細胞の多くは、偽足の多い、暗調な胞体およびクロマチンに富む不整円形核を有する細胞であり、他は胞体の明るい楕円核を有する細胞である。両者共に胞体内に微細線維を有するが、前者の方が粗大である。

細胞内発癌物質の形態は、結晶が脱水包埋中に溶出し空胞となつて認められ、その周囲は一層の限界膜ではなく二重膜構造を有し、内膜は比較的直線状を示し、外膜は内膜に沿うが多少不規則に走り、更に二層よりなり、unit membrane を示す (Fig. 16, 17)。

次に細胞質内発癌物質結晶の近くには脂肪顆粒 (Fig. 18) や、形態内容も様々な dense body*が多数みられる。dense body の内容は均一なもの (Fig. 16) より、微細顆粒状 (Fig. 17) を呈するもの、層状或いは二重膜円弧状 (Fig. 18) を示すものなど多様で、発癌物質をとり込んでいる様にみえるものもある。

この様な所見は、K系及びM系マウスに共通して観察されるが、第2群、第3群すなわちK系マウス脳の反応細胞には全観察期間を通じ、ウィルス様粒子の発現を全く認めなかつた。

第4群すなわちM系マウス脳内に、20-MC 挿入後4週より6週の間に鏡検した8匹中5匹のマウスに、その発癌物質結晶を持つ上記の細胞中にウィルス様粒子の出現を認めた。

この粒子は結晶を喰食した細胞の全てに存在すると云うのではない。しかし、喰食せられた結晶の近辺に多く認められ、その横断面ではドーナツ型二重膜構造を有し、縦断面では管状を示し、その配列には一定の規則は認められない (Fig. 19, 20)。横断面に於いて二重膜を示すが、その外膜は小胞体膜に連絡し、数個の外膜が連なり珠数状を呈するものもある。また内膜部のみ数個が、裸のまま小胞体膜に囲れた腔に存在し、或いはこの小胞体膜が一個の内膜部を包み、小胞体膜よりくびれを生じて存在するものもある (Fig. 21, 22)。

この粒子の構造は、横断面で二重膜構造を示し、外径約77 μm 、内径約22 μm で外膜と内膜との間は比較的电子密度高く、内腔内にはリボソーム様の粒子を認める事もある。内膜は、更に二層の膜構造よりなり、最も電子密度高く、約8 μm の厚さを有する (Fig. 22, 23)。外膜は、不正円形で、中には尾状構造、星状を示すものもあるが、ほぼ正円形部の直径が略77 μm で矢張り二層の膜より形成されている。縦断面では竹の如き管状を呈し、その長さは種々であるが長いものは約1600 μm を呈する (Fig. 24)。

小胞体腔には、内膜部のみ粒子が存在し、これにはリボソームの附着は認められない。小胞体腔は拡大し、その電子密度は比較的高く、この中に管状粒子の内膜部が存在し、この小胞体腔外へ突出した部分は小胞体膜を外側に被り細胞質内へ芽出するが如き形態を示すものもある (Fig. 25, 26)。

細胞外には、この粒子と全く同一の粒子の存在を認めなかつた。

小 括

20-MCによるK系マウスグリオーマの発生率は、マウス20匹中、Glioma 5例、Gliosarcoma 1例、Medulloblastoma 1例の結果を得た。これは他種マウス、特にM系マウスにおける実験的脳腫瘍の発生率と比較しても勝るともおとらぬ数値である。このK系及びM系マウスに等しく20-MC粉末を右頭頂葉に挿入し、挿入局所を経時的に電子顕微鏡的観察を行なうと、M系マウス脳の所謂前癌状態と云うべき時期の反応細胞中に、横断面にてドーナツ型の二重膜構造、縦断面で管状を呈するウィルス様粒子の発現するのを認めた。このウィルス様粒子は、小胞体と非常に密接な関係を有し、その外膜は明らかに小胞体膜より形成され、又内膜もこの部で形成される可能性を示唆する所見を得た。

しかし、一方K系マウスにて全く同一処置を施した

にも拘わらず、ウィルス様粒子は全く一匹にも認められなかつた。この点を除いては、両系には有意の差を持つ所見はなかつた。

粒子の出現の有無は、同じC3HでもColonyの相違によると考えられた。

2) 実験 II

(1) ウィルス様粒子の分画遠心

沈渣を電子顕微鏡的に観察すると、沈渣1には核成分と大きなミエリンおよび小血管が主であり、沈渣2は殆んどなく、沈渣3は、ミトコンドリア、シナプス、lysosomes、沈渣4はミクロゾーム、沈渣5はポストミクロゾームであつた。

第1群 K系マウスにはウィルス様粒子は全くどの沈渣にも認められなかつた。

第2群 M系マウスにおいては、第4分画即ちミクロゾーム分画 (43830 $\times$ g, 30分) に、実験Iで観察したと同様のウィルス様粒子を認めた (Fig. 27, 28)。しかし、観察された粒子は少かつたが、明らかに二重膜より形成されている。

(2) ウィルス様粒子のネガチブ染色

M系マウス標本においてのみ、ウィルス様粒子と思われるものを得た。管状でその中心部は、概ね中空である。内外膜間は白く描出されている。この大きさは実験I結果で記載したものと同一である (Fig. 29)。この方法では、他の細胞成分も多く混入しているので粒子の鑑別は煩雑であつた。

小 括

20-MC挿入局所脳の分画遠心によるウィルス様粒子の追求およびこのウィルス様粒子のネガチブ染色の結果、実験Iで得た発癌物質による脳腫瘍前癌状態に発現するウィルス様粒子は、K系マウスには存在しなく、M系マウスにのみ存在すると云う事実を確認した。

また、このウィルス様粒子が、分画遠心法によればミクロゾーム分画に混入して来ると云う結果を得た。粒子の中心部は概ね中空と思われる像を得た。

第3章 総括並びに考按

多環芳香族炭化水素によるマウス脳腫瘍の作製は、Seligman & Shear⁵⁰⁾により20-MCの加熱、融解後、作製されたCylindrical pelletを用いて始めて成功し、20匹中11匹にGlioma、2例におそらくmeningeal originと思われるFibrosarcomを得た。これ以前にもラッテ、

マウス, モルモットを使用して, Oberling, Guérin & Guérin³⁵⁾はベンツピレン結晶, Ilfeld²⁰⁾は5% DB-cholesterol pellet, Athias²⁾はMCピーナツ油液, Weil⁵⁶⁾はDB-ラード溶液を各々動物脳内に入れたが, 何れも negative data に終っている。

Peers³⁶⁾は, Seligman, Shear⁵⁰⁾に従い, 10% MC-cholesterol pellet を作製し, アルビノマウス87匹中15例に Glioma, 17例に Sarcoma, Sarcoma 中混合腫瘍3例を得た。

Zimmerman, Arnold⁵⁸⁾は, 20-MC の cylindrical pellet を C3H マウス脳内に埋没し, 57匹中 Glioma 15例, Sarcoma 5例, 分類しえぬ腫瘍1例, Sarcoma 中混合腫瘍5例の成果を上げた。

この様に化学的発癌物質による脳腫瘍の作製の成功の鍵は使用動物と発癌物質の使用方法であろう。動物はマウスが最適で, 特にC3H, C57BLなどに高率に脳腫瘍が発生する事は Zimmerman, Arnold⁶⁰⁾, 西川³⁴⁾などにより明らかにされている。

また, 発癌物質は, MC⁵⁸⁾或いはベンツピレン, 1, 2, 5, 6-DB の Pellet 法が Seligman, Shear により始められて以来この方法が一般的である。

本実験では, 1965年 生田, Zimmerman が発癌物質挿入後のマウス脳前癌状態反応細胞中にウィルス様粒子が発現したとの報告¹⁷⁾の追討を, K系マウスで原法通り行つたが, ウィルス様粒子の出現を認めず, 更に局所を光学顕微鏡で観察すると, 発癌物質挿入による脳局所の反応は Pellet 全周より生ずるものでなく, その周囲に局所的に発生して来る様に思われる。

また 1, 2, 5, 6-DB pellet を打砕してマウス脳に挿入すると, Pellet 挿入時よりも腫瘍発生が多い事²⁶⁾および矢張りウィルス様粒子の発現には, これを中に発生せしめる反応細胞が必須条件である為, 一様に多数の場所に反応細胞を出現せしめる様に粉末状発癌物質の方が理想的であると考え, 実験 I においてDB以外は, 20-MC 精製結晶粉末そのままを使用した。同じ考えから3-MC粉末を, 生田, Zimmeman¹⁶⁾も筋肉内に挿入している。

第1群の20-MC 粉末脳内挿入実験では, 発癌物質が粉末状である為, 慎重な処置にもかかわらず脳内よりMC粉末が浮き出したり, 当初より骨孔部脳膜に附着したりして, 術後2~4ヵ月の間に局所頭皮部に腫瘍を形成する事が多いが, これは全て Fibrosarcoma であった。この様に初期に死亡したり, と殺した残りの20匹について Glioma 5例, Medulloblastoma 1例, Gliosarcoma 1例, Sarcoma 4例を得た。

Sarcoma の内2例は頭蓋内, 2例は頭蓋外であつたが, この内1例は Oligodendroglioma と Fibrosarcoma を独立して有していた。この20匹は術後264日及び365日に標本作製したものである。

この結果は Peers³⁶⁾, Zimmerman⁵⁸⁾, 川合²⁵⁾, 西川³⁴⁾等とはほぼ同率で, K系マウスにおいても20-MCを使用して諸家の報告とはほぼ等しく脳腫瘍を発生せしめうる事を確認した。

本実験では, 実験的脳腫瘍の組織発生およびその組織像, 発生期間については諸家¹⁾³⁶⁾²²⁾²⁵⁾³³⁾³⁴⁾³⁶⁾³⁷⁾⁵⁰⁾⁵⁴⁾⁵⁸⁾⁵⁹⁾⁶¹⁾⁶²⁾の報告があり, 且つ実験目的と異なるので詳述しないが, この実験で得た Glioma においても, 単一の細胞成分から形成されているものは, No. 264, Glioblastoma multiforme, No. 273の Oligodendroglioma のみである。他は大なり小なり他のグリア成分を含み, 或る部分では Astrocytoma, また或る部分では Oligodendroglioma, また或る部分ではお互いに50%の割合もあれば, No. 270の如く Ependymoma の細胞群の中に Oligodendroglioma 細胞が混在してくる場合があり, また脳内にあつては Gliosarcoma だが脳外へ伸展し次第に Sarcoma 成分が多く存在する腫瘍もある。

これは Zimmerman⁶¹⁾ が主張する様に, いくつかの成熟グリア細胞が発癌物質により同時に刺激され増殖し腫瘍化する 為に当然いくつかの細胞成分を有し, Glioma のどの型にも成り得る multipotential tumor である事を示している。人グリオーマも後天的に成熟グリア細胞が, 何らかの発癌を来す Agent, 例えばウィルスなどの様なものに刺激され腫瘍化すると考えれば, 人グリオーマ組織も当然 multipotentiality があり, 数種の細胞成分から構成されるものもあつて良く, 唯人グリオーマと組織学的に複雑さを示す化学的発癌物質による脳腫瘍との相違は, その刺激が穏和であつたか否かによるとも考えられる。

次に mouse No. 275bにみられた 大脳半球内の腫瘍は一見 Medulloblastoma 様である。実験的脳腫瘍では, Pellet が小脳に挿入されれば好んで Medulloblastoma が出来, これは小脳顆粒層から生ずる故に Neuroblastoma と云うべきであると Zimmeman⁶³⁾は主張している。西川³³⁾はマウス右頭頂葉に Medulloblastoma を, Peers³⁶⁾, Zimmerman⁵⁹⁾も大脳皮質内に Medulloblastoma を得ているが, その他の報告はない。No. 275の腫瘍は細胞が密で, 核は類円形, 不均一に, 濃染し胞体は小さい。しかし, rosette 等の特別な細胞配列を示さぬ。処々に変性細胞の如き紫色に染つたものがみられる。

また、腫瘍組織周辺に Astrocyte の増殖を認める。

Russel, Rubinstein⁴⁷⁾ は、Neuroblastoma は大きな多角形細胞で vesiculated nuclei をもつものより成ると記載し、Kernohan, Sayre²⁷⁾ の Neuroastrocytoma の記載とも本腫瘍は異なる。矢張り Medulloblastoma の中に入れるのが最も妥当かと考える。また発生に関し奇形的要素が強いと云われる脳腫瘍も確かに存在する事は事実であるが、その腫瘍の1つと云われる Medulloblastoma も小脳虫部に限らず大脳においても後天的発癌刺激により作りうるものである。

発癌物質と反応細胞に関しては、既に光学顕微鏡的には、伊藤、生田²²⁾、西川³⁴⁾に詳細な報告があり、初期には microglia, mast cell, 更に生田, Zimmerman¹⁷⁾ は Phagocyte, Plasma cell を記載し、何れも更に時期が経過すると MC色素をとり込んだ macroglia の出現が多くなると報告している。本実験もほぼ同様の結果を得た。

電子顕微鏡学的には、生田, Zimmerman¹⁷⁾は上記の細胞の存在を認めるが必ずしも同定出来なく、またこれらの細胞の内のあるものは初期には白血球であり、後期には Astrocyte であると報告している。しかし、細胞内に MC結晶を喰食している細胞を電子顕微鏡下でみると、確かに偽足を有しているが、これには2種ある様に思われる。その1つは多くの偽足を有し、脂肪顆粒, dense body の多い、非常に細胞質が暗調を呈し、核は楕円か不規則なもので、胞体内に比較的粗な微細線維を有するものである。1つは明るい胞体に大きな楕円核を持ち矢張り微細線維を細胞質内に有する。

この様な脳内反応細胞の細胞質内にウィルス様粒子¹⁷⁾を認めるのであるが、筋組織¹⁶⁾³⁹⁾においても同様の細胞に全く同一の粒子を認めている。従つて、2種の細胞の内前者は形態学的にも Macrophage で、酵素活性試験³¹⁾で mesenchymal origin と証明されたのも当然である。しかし、脳においては後者も認められ glia 細胞と考えられる。MC挿入後1ヵ月頃の MC-pellet を持つ細胞は、矢張り前者が多いが、後者である reactive Astrocyte もみられる。Macrophage は、MC挿入後6ヵ月頃になつても存在するか、この時期には既に後者の方が多く認められ、この様な reactive Astrocyte の喰食機能の存在を示すものである。

反応細胞中の Pellet は電子顕微鏡下では白い腔間となつてみられ二重の膜に囲まれている。その内膜は結晶の形態を如実に示し直線的である。外膜は内膜に沿つてはいるがやや不規則である。なお外膜を詳細に観

察すると、これは2層の膜より構成され、喰食時の細胞膜由来で Phagosomes の境界膜である事を示している。一方、内膜の成立に付いては明瞭ではないが、発癌物質結晶の直接周囲に何か或る細胞成分が密着し、結晶部分のみが脱水包埋中に溶出し去り、膜となつて残されたと考えられない事もない。

また、Pellet を有する細胞の細胞質中にみられる形態、内容共に多様性を示す dense body 或いは脂肪顆粒は、髄鞘崩壊過程に観察されたもの⁵²⁾と一致するものもあり Phagosomes の1つと考えられる。

京大(K)系マウスにおいて、DB及びMCを用い、この様な脳内反応細胞中にウィルス様粒子を検索したが全く1例にも認めなかつた。これに対し、M系マウスの20-MC脳内挿入局所の反応細胞中に、二重膜構造を有する管状のウィルス様粒子の発現を認めた。この粒子の発現に関しては、発癌物質が DB¹⁷⁾であれ、MC及びベンツピレン¹⁶⁾であれ、また反応組織が脳組織であれ筋組織であれ、全く同一の粒子が出現し、これが発癌物質と反応細胞との相互作用によつて生じるのは確かであるが、本実験において、更にこの粒子の出現は、M系マウスに特有のものではないかと云う可能性を示唆する結果を得た。

何故全くこの粒子がK系マウスには出現せず、M系マウスにのみ発生するものであろうか。電顕用超薄切片は、発癌物質による脳組織反応の極く一端を伝えるに過ぎない為、ここに問題が生じ、これを解決する為に発癌物質を含めてその周囲組織を採取し、分画超遠心を行ない粒子の検索を行なつた。この結果、ウィルス様粒子はK系マウスには認めず、M系マウス脳のミクロゾーム分画に粒子の混入を認めた。今後この粒子の精製には、更に密度勾配遠心法などを駆使し、粒子の形態および生物学的活性を損わず抽出する方法を講ぜねばならないと云う大きな問題が残されている。

ウィルス様粒子の微細構造は、横断面で内径約22 μ mの中心部の囲りに約8 μ mの内膜があり、この部の電子密度高く、この周囲を外膜が囲み、平均約77 μ mの径を持つている。縦断面では管状であり、ネガチブ染色の結果、中心部は概ね中空であると思われる。この粒子は横断面のみとり上げれば Bernhard⁴⁾の分類に従えばA型腫瘍ウィルスに類似している。また、管状であり且つ粗面小胞体腔に径の小さい内膜部が存在する点などは狂犬病ウィルス²⁰⁾に類似している。この粒子と他の腫瘍ウィルスおよび植物ウィルスとの類似ないし相違点は既に 生田, Zimmerman¹⁷⁾により挙げら

れている如くであるか、oncogenic virus としては未熟または不完全形と云わざるを得ない。化学的発癌物質によるウィルス様粒子の出現の報告¹⁰⁾²¹⁾⁴⁶⁾⁵¹⁾²⁴⁾が既に有り、また、このウィルス様粒子が発癌物質の存在下でのみ発生し、発生した腫瘍組織には認められぬ事実¹⁶⁾は、この粒子のウィルス性⁴⁵⁾を考えさせるに足りる。然らば何故この粒子がK系マウスには発生せず、M系マウスにのみ現れるのであろうか。

化学的発癌物質により発生したウィルス様粒子は、若しウィルスならば、その成熟過程の何れにあるか定かではないが、M系マウスの潜在性ウィルスであつたとみるのが1つの大きな可能性である。Kajimaら²⁴⁾が3-MCにより発生した肉腫標本中に、A型及びC型ウィルスを認め、この粒子が同時実験の germ-free マウスのみに存在し、他方の germ-free ラットには認められず、腫瘍の有無に拘わらずこのマウスの胸腺内に認められた事により、このウィルスは単なる Passenger virus か、実験動物に特有な潜在性ウィルスと考えると同様である。

次に粒子と発癌との関係は、Friedewald, Rous¹³⁾の主張した二段階説が考えられ、例えばC57BL/6にレントゲン前照射後、その臓器ミンスを同系マウスに移殖した上に urethan 処置をすると白血病が生じる³⁾とか、雑系新生マウスにポリオーマウィルスを接種後発癌剤を投与すると腫瘍発生率を上昇させうる⁴⁹⁾。またMCおよびBPによる皮下肉腫には、腫瘍形成前には認められなかつたウィルスの増殖がみられる⁵¹⁾などと同様に、initiating factor としてM系マウスにこの粒子が不活型で存在し、これに発癌物質が promoting factor として加わつた為にウィルス様粒子が活性化されて現れ、発癌への過程が始められたと考える事が出来る。ウィルス様粒子の存在が全て腫瘍形成に連結しているとは限らぬ。何故ならば、ウィルス脳内接種動物全例に、脳腫瘍が形成されない事から明らかである¹¹⁾¹⁴⁾¹⁵⁾²⁸⁾⁴⁰⁾⁴¹⁾⁴²⁾⁴³⁾⁵⁷⁾。M系マウスの潜在性ウィルスを目下検索中であるが、既に形成された粒子として発見されるか否か問題がある。しかし、M系乳癌組織内に観察された乳癌ウィルスは、明らかにこの粒子と形態学的に異なるものであつた。

最後にウィルス様粒子の形成に関連して、この粒子の本態の可能性にふれる。先ず電子顕微鏡下でみると、余りにも発癌物質結晶を喰食した細胞は、dense body或いは脂肪顆粒は確かに多いが、正常の細胞小器官は少く、崩壊しつつあり、この様な細胞にはウィルス

様粒子は認められない。粒子を持つ細胞は、結晶も存在するが、正常の細胞活動を行なつていると思われるものである。従つてウィルス様粒子を持つ細胞は、発癌物質の影響をうけて細胞成分殊に遺伝子の活動状態が全く變つて、この関与の下に細胞の営みを始めたと考えられる。発癌剤と細胞の結びつきが、DNA⁵⁾であれ、蛋白³⁸⁾であれ、何らかの細胞内生化学的變化が生じ、その一つの現れとしてウィルス様粒子が誘発形成されたと考えられる。粒子はウィルスならば、その形態から云えば未熟域いは不完全型と考えられるが、類似の小胞体内 tube-like structure をマウス肝の過形成結節にみられた事を Essner¹²⁾が報告し、これは小胞体内腔への蛋白、Lipoprotein の蓄積と推定している。一方、Jensen²³⁾により植物綿胚の小胞体内にも管状構造物が認められ、小胞体膜の Invagination によつて形成されると報告している。

本実験における粒子も、内膜の巾が約8m μ 、内径約22m μ を有する事、外膜自体が可成り不規則であり、時に珠数状をなし小胞体膜に連続している点を考慮すれば、発癌物質による何か或る細胞内の變化の現れとして、小胞体膜が複雑化し、迷路状となつたと考えられる。

生田¹⁸⁾¹⁹⁾も小胞体膜の内陥により粒子が形成される、と考えている。一方粒子内膜部が直線の構造であり、更に小胞体内腔が拡大し電子密度が増加している事は、この粒子形成に更に2次、3次的變化がこの部で行なわれている事を示唆するものとする。

化学的発癌物質と共に腫瘍を形成するウィルスは、oncogenic のものもあれば、non-oncogenic のものもあり、また一方、形成される腫瘍も発癌物質のみで惹起される腫瘍とは抗元的に異なる³⁰⁾かも知れぬが、組織学的には異らず、その上、更に腫瘍細胞からはウィルスは証明されぬ為、ウィルスの発癌に対する役割は解明されていない現在である。

本実験で観察されたウィルス様粒子の脳腫瘍発生との関係は、この粒子の精製とこれを用いた免疫学的検索に待たねばならない。

第4章 結 語

1) 京大系(K系)C3H マウス脳内に、1, 2, 5, 6-dibenzanthracene pellet および 20-methylcholanthrene 粉末を挿入後、経時的に各々1年6ヵ月の間、マウス48匹、および7ヵ月間、マウス57匹について、局所脳組織の電子顕微鏡的検索を行なつたが、生田の示したウィル

ス様粒子の発現を認めなかつた。

2) Montefiore 病院系 (M系) C3H マウス脳内に 20-Methylcholanthrene を挿入し、術後4週目より反応細胞中に横断面では二重膜構造を呈する外径約77 μ 、内径約22 μ のA型腫瘍ウィルス様の構造を示し、外膜と内膜との間は比較的電子密度高く、時に腔内にリボゾーム様の粒子を入れる事がある粒子の出現を認めた。

この粒子の内膜は更に2層の膜構造より成り、電子密度高く、約8 μ の厚さを有する。縦断面では管状を呈する。

3) K系マウス脳内に、20-MC 挿入後264日以上生存した20匹のマウスに、Glioma 5例、Gliosarcoma 1例、Medulloblastoma 1例、肉腫4例、扁平上皮癌1例を得た。

4) K及びM系マウスの20-MC 脳挿入局所を分画遠心し、M系マウスの方に、ミクロゾーム分画にウィルス様粒子の混入を認めたが、K系マウス脳分画にはこの粒子を認めなかつた。

5) この結果より、20-MC による脳腫瘍発生率がほぼ等しいK及びM系マウスにおいて、M系マウスの前癌状態の反応細胞中のみ出現したウィルス様粒子は、M系マウスに不活性型で存在した潜在性ウィルスであり、20-MC により誘発顕在化したと云う腫瘍発生の二段階説を適用し、粒子の潜在性ウィルスの可能性を示唆した。

6) ウィルス様粒子の外膜が小胞体膜より形成され、外膜自体の不規則な事、小胞体の拡大、小胞体腔の電子密度の増加などにより、粒子の形成は小胞体でなされると考えた。

7) 発癌物質結晶を喰食する細胞は、脳では macrophage のみでなく、グリア細胞も存在する事、更に反応細胞中の結晶の形態、dense body、脂肪顆粒にはK系及びM系マウスに有意の差を認めなかつた。

稿を終るにあたり懇篤な御指導と御校閲を賜った恩師半田肇教授、又本研究の遂行に終始暖かき御鞭撻と御指導を戴いた谷栄一講師に深甚の謝意を捧げます。

更に分画遠心法について有意義な御示唆を賜った京都大学ウィルス研究所多村憲博士及び本研究に対し少からぬ御助言と御討論を戴いた教室の館谷敏男先生に深く感謝致します。

又電子顕微鏡観察に激励と御援助を戴いた天理よろず相談所脳神経外科、松村浩博¹⁾、牧田泰正博士、東

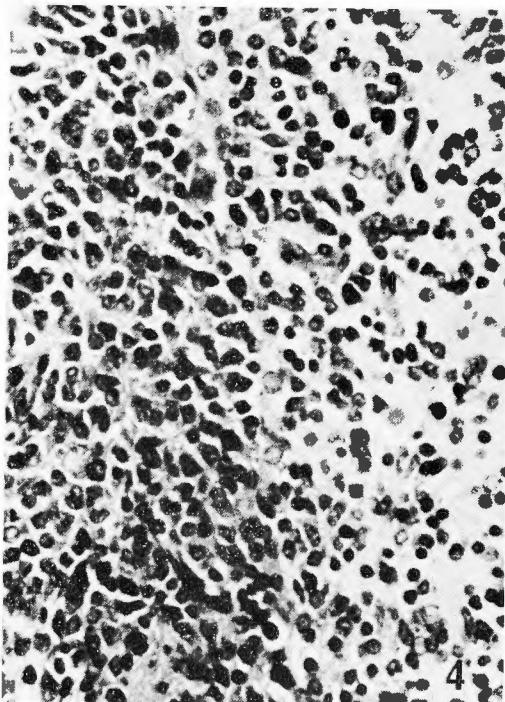
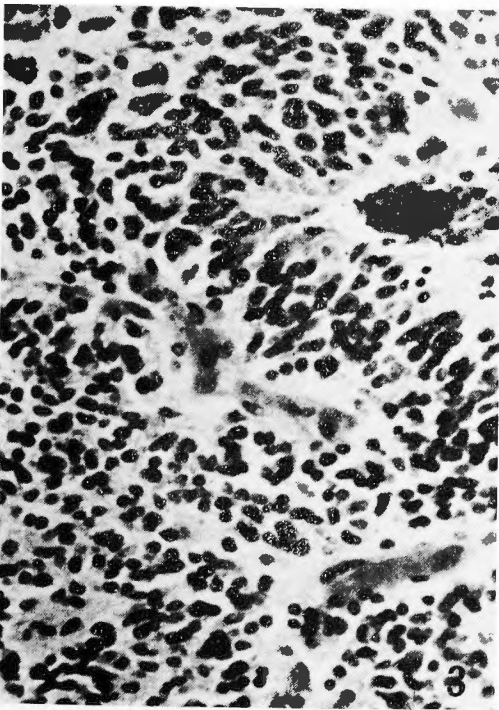
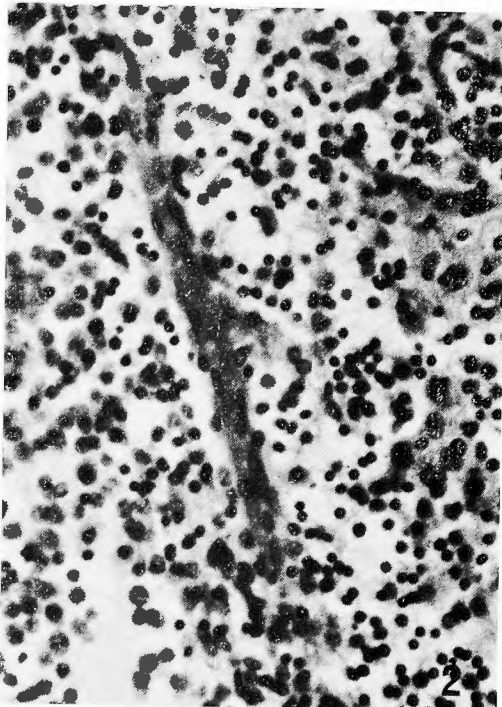
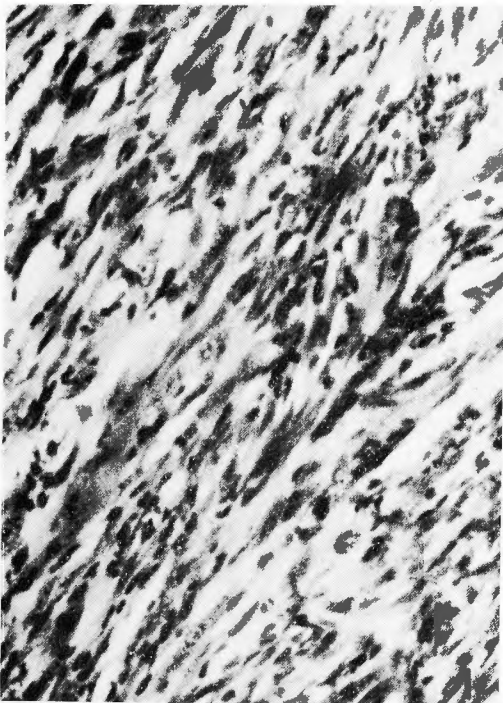
正弘技師に深謝致します。尚本文の要旨は第27回脳神経外科学会シンポジウム「グリオーマの細胞学」(於東京)で発表した。

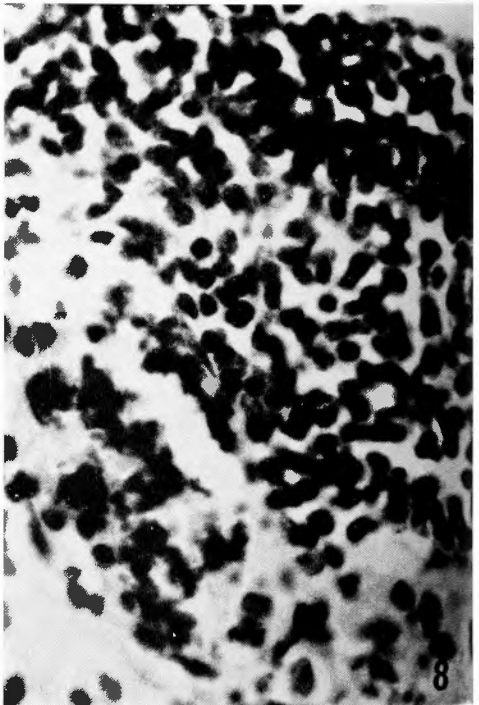
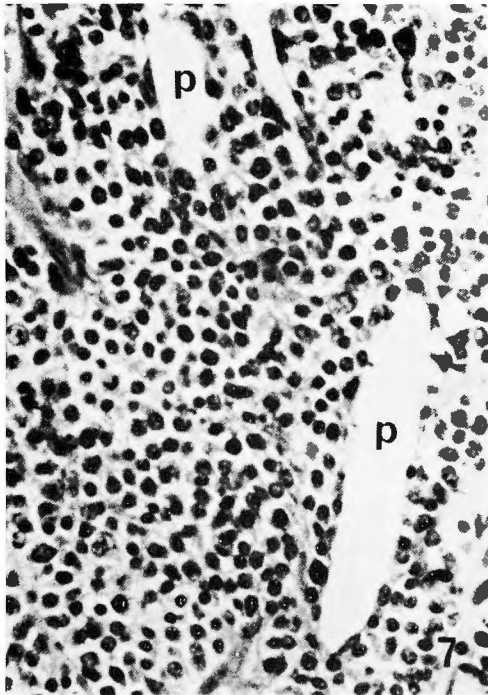
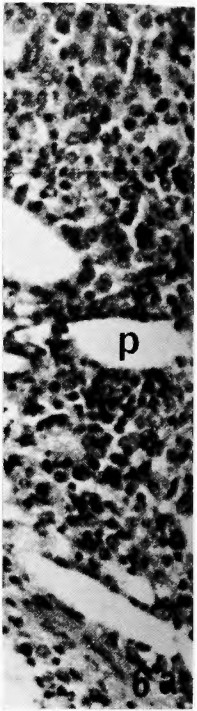
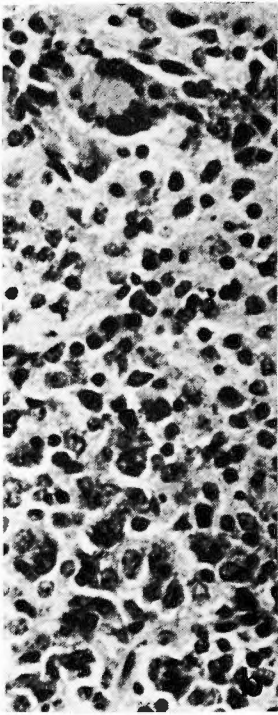
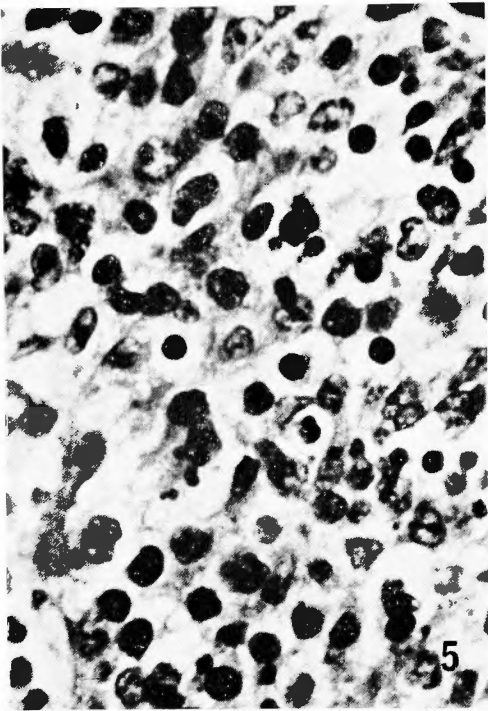
文 献

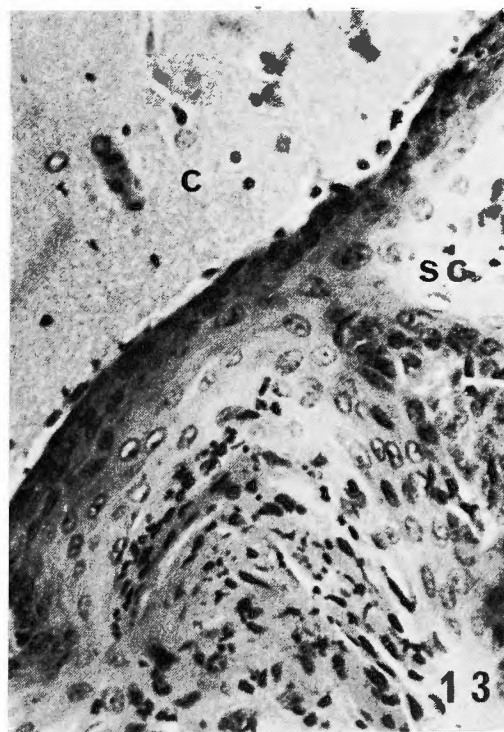
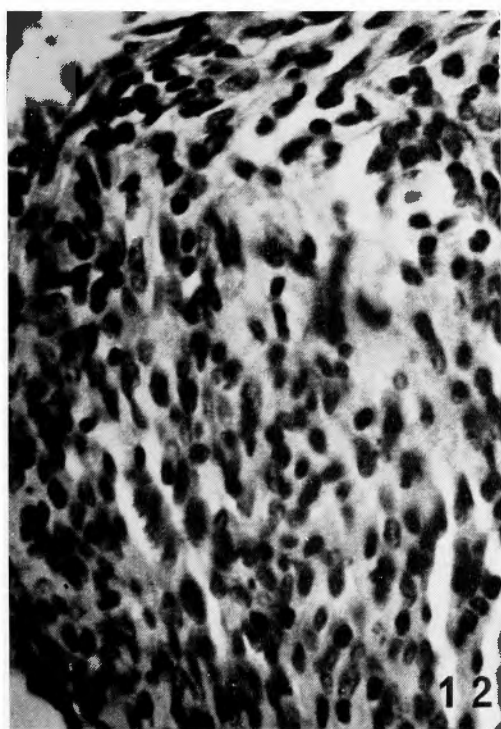
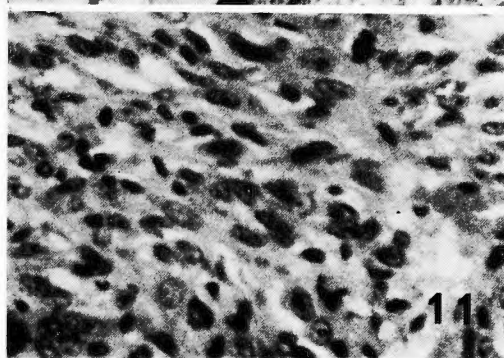
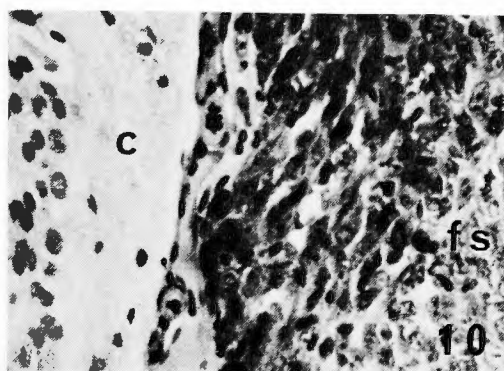
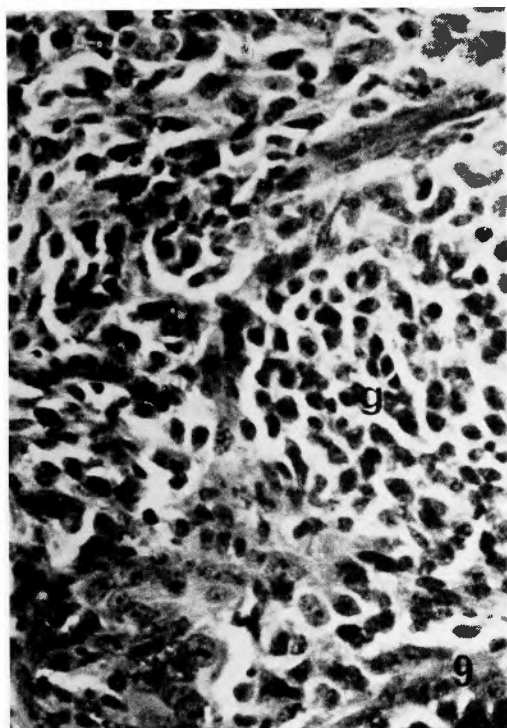
- 1) Arnold, H., and Zimmerman, H. M.: Experimental brain tumors. I Tumors produced with dibenzanthracene. *Cancer Res.*, **3**: 682, 1943.
- 2) Athias, M.: Sarcome du coeur chez un cobaye apres injection, dans le carveau, de methylcholanthrene. *C. R. Soc. de Biol.*, **126**: 585, 1937.
- 3) Berenblum, I.: The possible role of a transmissible factor in leukemia induction by radiation-urethan. *Viruses, Nucleic Acids and Cancer*. Baltimore, Williams and Wilkins Company, 1963.
- 4) Bernhard, W.: The detection and study of tumor viruses with the electron microscope. *Cancer Res.*, **20**: 712, 1960.
- 5) Brookes, P., and Lawley, P. D.: Reaction of some mutagenic and carcinogenic compounds with nucleic acids. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **64** (suppl. 1): 111, 1964.
- 6) Billingham, R. E. and Silvers, W. K.: Transplantation of tissues and cells. The Wister Institute Press, Phila. U. S. A. 1961.
- 7) Bucciarelli, E., Rabotti, G. F., and Delton, A. G.: Ultrastructure of meningeal tumors induced in dogs with Rous sarcoma virus. *J. Nat. Cancer Inst.*, **38**: 359, 1967.
- 8) Chambers, V. C., Ito, Y., and Evans, C. A.: Technique for visualizing Papova viruses and tissue cultures. *J. Bact.*, **91**: 2090, 1966.
- 9) Dalton, A. J.: Chrome-osmium fixative for electron microscopy. *Anat. Rec.*, **121**: 281, 1955.
- 10) De Harven, E.: Primary methylcholanthrene-induced sarcomas of mice: An integrated ultrastructural and immunological study. 6th Internat. Congress for electron microscopy. Vol. 2. Tokyo, Maruzen, Co. Ltd. 1966.
- 11) Duffel, D., Hinz, R., and Nelson, E.: Neoplasms in hamsters induced by Simian virus 40. Light and electron microscopic observation. *Am. J. Path.*, **51**: 59, 1964.

- 12) Essner, E. : Ultrastructure of spontaneous hy-perplastic nodules in mouse liver. *Cancer Res.*, **27** : 2137, 1967.
- 13) Friedewald, W. F., and Rous, P. : The initiating and promoting element in tumor production : An analysis of the effects of tar, benzpyrene and methylcholanthrene on rabbit skin. *J. Exp. Med.*, **80** : 101, 1944.
- 14) Gerber, P., and Kirschstein, R. L. : SV40 induced ependymomas in new born hamsters. I. Virus-tumor relationships. *Virology*, **18** : 582, 1962.
- 15) Grove, A. S. Jr., Di Chiro, G., and Rabotti, G. F. : Experimental brain tumors with a report of those induced in dogs by Rous sarcoma virus. *J. Neurosurg.*, **26** : 465, 1967.
- 16) Ikuta, F., and Zimmerman, H. M. : Intramuscular precancerous lesions from hydrocarbons. *Arch. Path.*, **78** : 377, 1964.
- 17) Ikuta, F., and Zimmerman, H. M. : Virus particles in reactive cells induced by intracerebral implantation of dibenzanthracene. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, **14** : 225, 1965.
- 18) Ikuta, F., and Zimmerman, H. M. : Virus particles induced with carcinogenic hydrocarbons. *Prof. Rudolf Virchow med. Soc. New York* 1968 : Suppl. to Vol. 26, L. M. Davidoff, pp. 394-415.
- 19) 生田房弘 : 発癌物質による前癌期病巣にみられたウィルス様小体の形成発現様式について。ウィルス学の進展, 京都大学ウィルス研究所編, 1966.
- 20) Ilfeld, F. W. : The experimental production of visceral tumors with hydrocarbons. *Am. J. Cancer* **26** : 743, 1936.
- 21) Irino, S., Ota, Z., Sezaki, M., and Hiraki, K. : Cell free transmission of 20-methylcholanthrene induced RF mouse leukemia and electron microscopic demonstration of virus particle in its leukemic tissue. *Gann*, **54** : 225, 1963.
- 22) 伊藤辰治, 生田房弘 : Gliomaの成り立ち及びその頭蓋外転移について。主としてRatの実験的脳腫瘍から, 神経研究の進歩, **5** : 780, 1961.
- 23) Jensen, W. A. : Cotton embryogenesis : The tube containing endoplasmic reticulum. *J. Ultrastruct. Res.*, **22** : 296, 1968.
- 24) Kajima, M., and Pollard, M. : Virus-like particles in 3-methylcholanthrene-induced primary and transplanted sarcomas of germ-free rodents. *Cancer Res.*, **27** : 980, 1967.
- 25) 川合貞郎 : 脳腫瘍の実験的研究。日病誌, **52** : 59, 昭38.
- 26) Kawamura, Y. : unpublished data.
- 27) Kernohan, J. W., and Sayre, G. P. : Tumors of the central nervous system. Armed Forces Institute of Pathology.
- 28) Kirschstein, R. L., and Gerber, P. : Ependymomas produced after intracerebral inoculation of SV40 into new born hamsters. *Nature*, **195** : 299, 1962.
- 29) Matsumoto, S. : Electron microscope studies of Rabies virus in mouse brain. *J. Cell Biol.*, **19** : 565, 1963.
- 30) Miller, J. A., and Miller, E. C. : Carcinogenesis : A survey of molecular aspects of chemical carcinogenesis. *Laborat. Invest.*, **15** : 217, 1966.
- 31) Millonig, G. : A modified procedure for lead staining of thin sections. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **11** : 736, 1961.
- 32) 直良博人 : 発癌の分子機構—ガンウィルスと細胞の相互作用に関する一試案。ウィルス学の進展。京都大学ウィルス研究所編, 1966.
- 33) 西川喜作 : 実験的脳腫瘍。脳神経, **14** : 657, 1962.
- 34) 西川喜作 : 実験的脳腫瘍。神経進歩, **7** : 37, 1963.
- 35) Oberling, C., Guérin, M., and Guérin, P. : La production expérimentale de tumors hypophysaire chez la rat. *C. R. Soc. Biol.*, **123** : 1152, 1936.
- 36) Peers, J. H. : The response of the central nervous system to the application of carcinogenic hydrocarbons. II Methylcholanthrene. *Am. J. Path.*, **16** : 799, 1940.
- 37) Perese, D. M., and Moore, G. E. : Methods of induction and histogenesis of experimental brain tumors. *J. Neurosurg.*, **17** : 675, 1960.
- 38) Pitot, H. C., and Heidelberger, C. : Metabolic

- regulatory circuits and carcinogenesis. *Cancer Res.*, **23** : 1694, 1963.
- 39) Popoff, N., Sutton, C. H., and Zimmerman, H. M. : Virus like particles in reactive cells associated with crystals of implanted carcinogen. *Acta Neuropath.*, **10** : 308, 1968.
 - 40) Rabotti, G. F., and Raine, W. A. : Brain tumours induced in hamsters inoculated intracerebrally at birth with Rous sarcoma virus. *Nature*, **204** : 898, 1964.
 - 41) Rabotti, G. F., Raine, W. A., and Sellers, R. L. : Brain tumors (gliomas) induced in hamsters by Bryan's strain of Rous sarcoma virus. *Science*, **147** : 504, 1965.
 - 42) Rabotti, G. F., Grove, A. S. Jr., Sellers, R. L., and Anderson, W. R. : Induction of multiple brain tumours (gliomata and leptomeningeal sarcomata) in dogs by Rous sarcoma virus. *Nature*, **209** : 884, 1966.
 - 43) Rabson, A. S., O'Coner, G. T., Kirschstein, R. L., and Branigan, W. J. : Papillary ependymomas produced in *Rattus (Mastomys) Natalensis* inoculated with vacuolating virus (SV 40). *J. Nat. Cancer Inst.*, **29** : 765, 1962.
 - 44) Richardson, K. G., Jarett, L. and Finke, E. H. : Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy. *Stain techn.*, **35** : 313, 1960.
 - 45) Rubin, H., and Hanafusa, H. : Significance of the absence of infectious virus in virus-induced tumors. *Viruses, Nucleic Acids and Cancer*, Baltimore, The Williams and Wilkins Company, 1963.
 - 46) Rubin, R., Sutton, C. H., and Zimmerman, H. M. : Experimental ependymoblastoma. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, **27** : 421, 1968.
 - 47) Russell, D. S., and Rubinstein, L. J. : Pathology of tumours of the nervous system. Second ed. London, Edward Arnold (Publisher) Ltd., 1963.
 - 48) Russel, W. O. : The response of the central nervous system of the rat to methylcholanthrene. I. The induction of tumors derived from nervous tissue. *Cancer Res.*, **5** : 140, 1945.
 - 49) Salaman, M. H., Rowson, E. K. Roe, F. J., Ball, J. K., Harvey, J. J., and De Benedictis, G. : The combined action of viruses and other carcinogens. *Viruses, Nucleic Acids and Cancer*, Baltimore, The Williams and Wilkins Company, 1963.
 - 50) Seligman, A. M., and Shear, M. J. : Studies in carcinogenesis. VIII Experimental production of brain tumors in mice with methyl-cholanthrene. *Am. J. Cancer* **37** : 364, 1939.
 - 51) Schein, H. M. : Transformation of astrocytes and destruction of spongioblasts induced by Simian tumor virus (SV 40) in culture of human fetal neuroglia. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, **26** : 60, 1967.
 - 52) Suzuki, S., Ohta, Z., Muguruma, M., Takata, H., and Nagano, T. : An electron microscopic study on the virus-like particles in the chemically induced Sarcomas in mice. *J. Elect. Micr.* **17** : 264, 1968.
 - 53) 谷 栄一 : 中枢二次変性の電子顕微鏡的研究。軸索及び髄鞘の変化。 *神経進歩*, **9** : 723, 1965.
 - 54) Tansley, K. : Irradiation of experimental cerebral tumours. I. Experimental production of brain tumours in mice. *Radiology*, **49** : 62, 1947.
 - 55) Watson, M. L. : Staining of tissue section for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **4** : 475, 1958.
 - 56) Weil, A. : Experimental production of tumors in brain of white rats. *Arch. Path.* **26** : 777, 1938.
 - 57) Wilkins, R., and Odom, G. L. : Attempted induction of glioma utilizing Simian virus 40. *Arch. Neurol.*, **13** : 149, 1965.
 - 58) Zimmerman, H. M., and Arnold, H. : Experimental brain tumors. I. Tumors produced with methylcholanthrene. *Cancer Res.*, **1** : 919, 1941.
 - 59) Zimmerman, H. M., and Arnold, H. : Experimental brain tumors. II. Tumors produced with benzpyrene. *Am. J. Path.*, **19** : 939, 1943.
 - 60) Zimmerman, H. M., and Arnold, H. : Experimental brain tumors. IV. The incidence in different strains of mice. *Cancer Res.* **4** : 98, 1944.
 - 61) Zimmerman, H. M. : The natural history of intracranial neoplasms, with special reference to the gliomas. *Am. J. Surg.*, **93** : 913, 1957.
 - 62) Zimmerman, H. M. : The nature of gliomas as revealed by animal experimentation, *Am. J. Path.*, **31** : 1, 1955.
 - 63) Zimmerman, H. M. Experimental brain tumors. *脳神経*, **14** : 637, 1962.







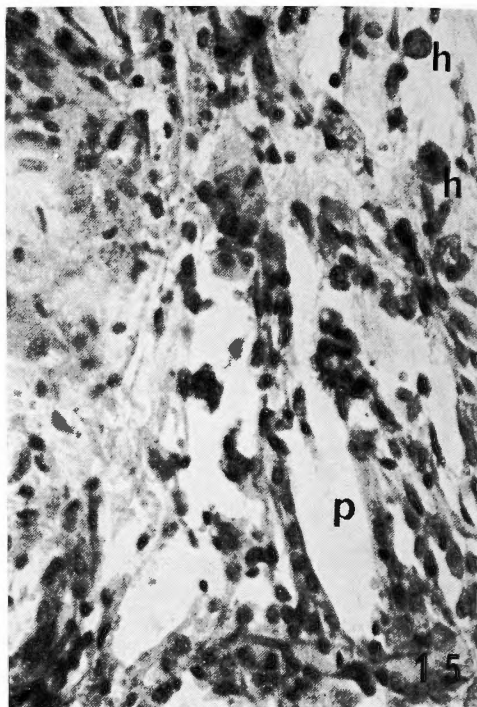
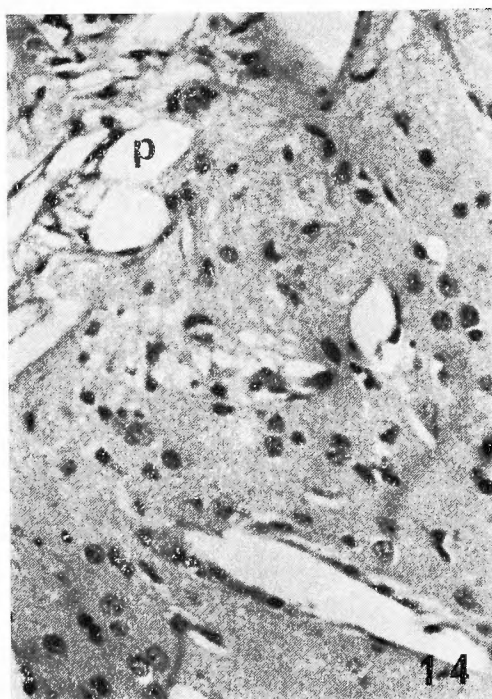


Fig. 1 mouse No. 273 : Fibrosarcoma developed in the subcutaneous region of head, showing numerous bands of spindle shaped cells. Mag. $\times 600$, Hematoxylin-eosin stain.

Fig. 2 mouse No. 260 : Astrocytoma cells coexist with Oligodendroglioma cells. Mag. $\times 600$, H. and E. stain.

Fig. 3 mouse No. 264 : Glioblastoma multiforme, showing polymorphies and pseudopalisade around necrosis. Mag. $\times 600$, H. and E. stain.

Fig. 4 mouse No. 270 : Ependymoma (left half) with Oligodendroglioma, showing mainly ependymoma portion. Mag. $\times 600$, H. and E. stain.

Fig. 5 High magnification. Ependymoma with oligodendroglioma. Oligodendrocytes are seen between ependymoma cells. Mag. $\times 1200$, H. and E. stain.

Fig. 6 mouse No. 271 : Glioblastoma multiforme, showing a) Tumor cells around carcinogen pellets (p) and b) Polymorphies of nuclei and a giant cell. Mag. a) $\times 180$, b) $\times 600$, H. and E. stain.

Fig. 7 mouse No. 273 : Oligodendroglioma around carcinogen pellets (p), showing characteristic honey combed appearances. Mag. $\times 600$, H. and E. stain.

Fig. 8 mouse No. 275b : Medulloblastoma in right cerebral hemisphere, showing a cluster of tumor cells with a uniform type. Mag. $\times 1200$, H. and E. stain.

Fig. 9 mouse No. 276 : Gliosarcoma in right cerebral hemisphere showed large spindle shaped sarcoma cells coexisted with glioma cells (g). Mag. $\times 600$, H. and E. stain.

Fig. 10 mouse No. 272 : Fibrosarcoma Compresses cerebral tissue (c) with intact meninges. Mag. $\times 600$, H. and E. stain.

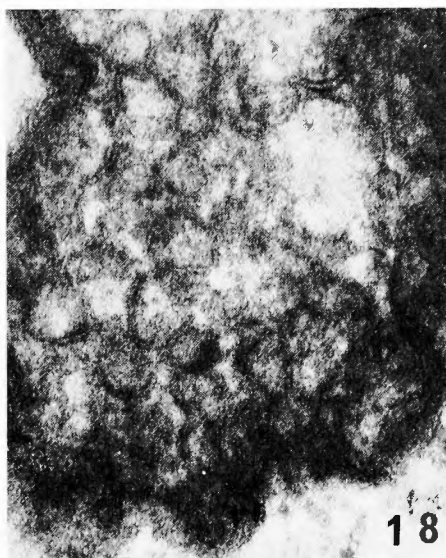
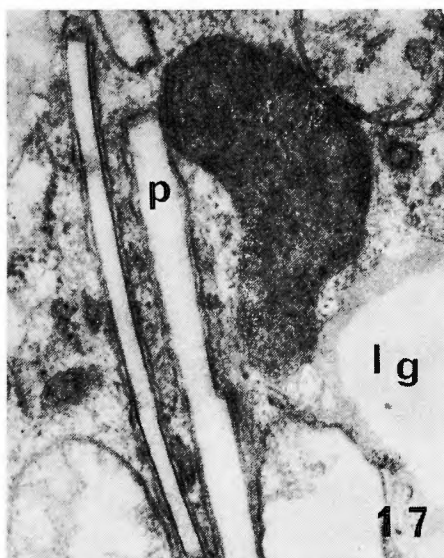
Fig. 11 mouse No. 262 : subcutaneous fibrosarcoma induced by 20-MC. Mag. $\times 600$, H. and E. stain.

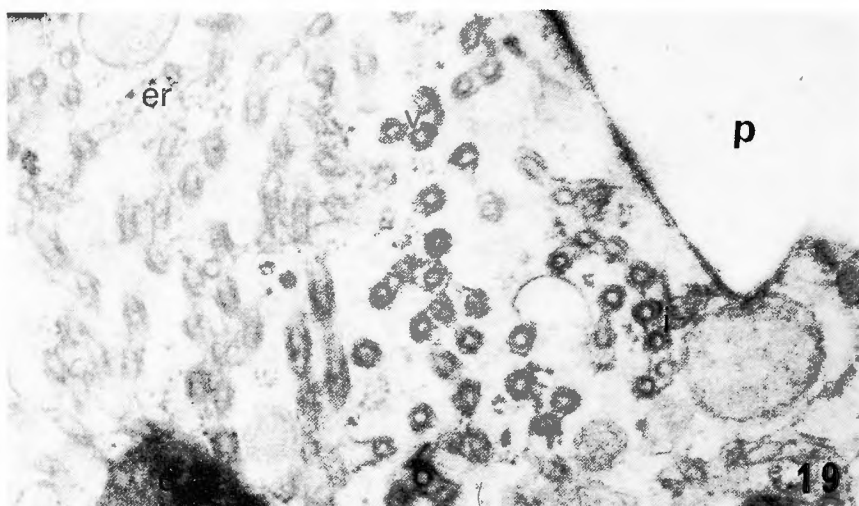
Fig. 12 mouse No. 261 : Sarcoma originated from basal meninges. Mag. $\times 1200$, H. and E. stain.

Fig. 13 mouse No. 274 : Squamous cell carcinoma (sc), compressing cerebral tissue (c). Mag. $\times 600$, H. and E. stain.

Fig. 14 mouse brain tissue with carcinogen pellets (p), showing no reaction 365 days after intracerebral implantation of 20-MC. Mag. $\times 600$, H. and E. stain.

Fig. 15 Cell reactions and phagocytes (h) around intracerebral carcinogen pellets (p) 150 days after implantation of 20-MC. Mag. $\times 600$, H. and E. stain.





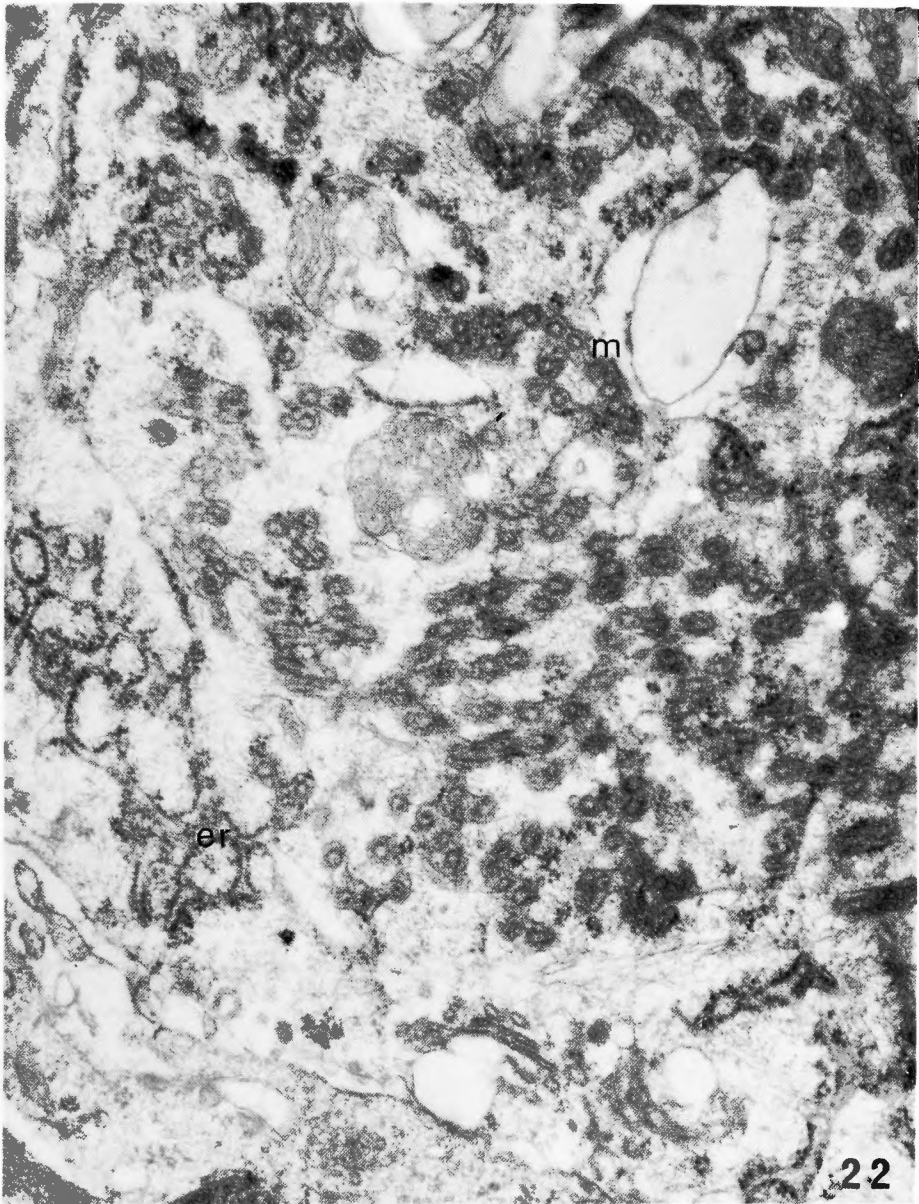


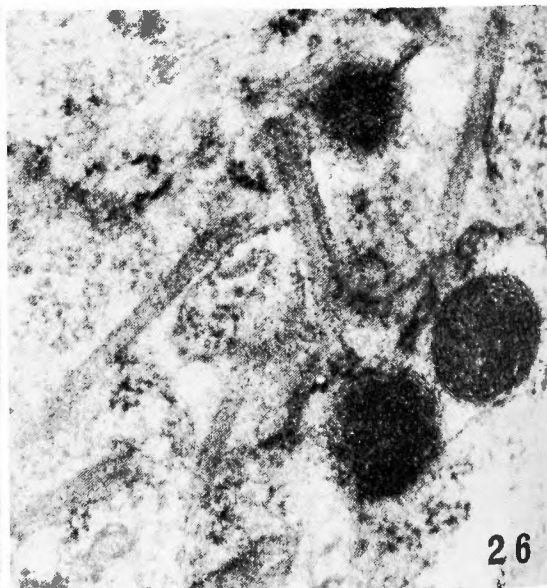
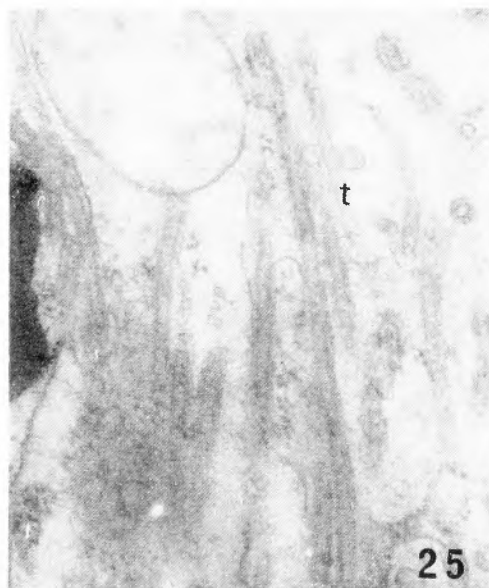
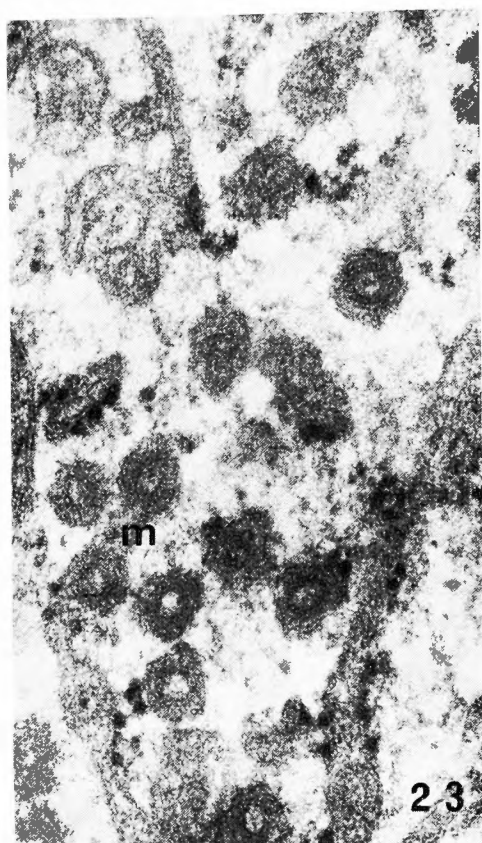
Fig. 16 Carcinogen pellets (p), homogenous dense bodies (d) and fine intracytoplasmic fibrils in cerebral reactive cells of Kyoto University mice 14 weeks after intracerebral implantation of 20-MC. Mag. $\times 33000$. uranyl and lead staining.

Fig. 17 Carcinogen pellet spaces (p) surrounded by two membranes and fine granular dense bodies (d) in cerebral reactive cells of Kyoto University mice 5 weeks after intracerebral implantation of 20-MC. Mag. $\times 20000$ U. and L. double stain.

Fig. 18 Dense body with double membrane structures in cerebral reactive cells of Kyoto University mice 5 weeks after intracerebral implantation of 20-MC. Mag. $\times 90000$. U. and L. double stain.

Fig. 19, 20, 21 Virus-like particles (v) in cerebral reactive cells of Montefiore mice 5 weeks after intracerebral implantation of 20-MC. Inner shells (i) with double membranes in cisterns of endoplasmic reticulum (er) are observed. No special arrangement of virus-like particles are observed. Magnification: Fig. 19. $\times 39000$, Fig. 20. $\times 39000$, Fig. 21. $\times 32460$. U. and L. double stain.

Fig. 22 Virus-like particles in cerebral reactive cells of Montefiore mice 6 weeks after intracerebral implantation of 20-MC. Their outer membranes continue with ER-membranes (m). Mag. $\times 41250$. uranyl and lead staining.



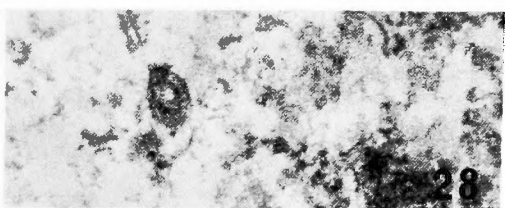
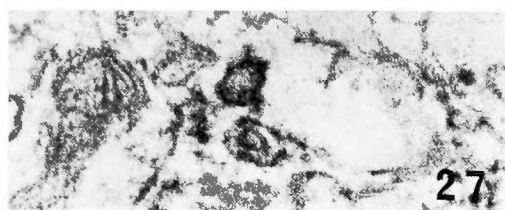


Fig. 23 Virus-like particles in transverse sections, showing details of their structures. Particles sometimes contain ribosome like particles in axial holes. Some outer membranes of particles continue with ER-membrane (m). Mag. $\times 78000$. uranyl and lead staining.

Fig. 24 Virus-like particles in longitudinal sections, showing their tubular forms. Mag. $\times 65000$, uranyl and lead staining.

Fig. 25, 26 Tubular forms (t) in cisterns of endoplasmic reticulums. Mag. Fig. 25, $\times 40000$. Fig. 26. $\times 65000$. uranyl and staining.

Fig. 27, 28 Virus-like particles in microsomal fraction of cerebral reactive tissues around carcinogens of Montefiore mice. Mag. $\times 63630$. uranyl and lead staining.

Fig. 29 Negative stained virus-like particle in cerebral reactive tissue of Montefiore mice after intracerebral implantation of 20-MC.