

# 原 著

## 肝細胞の無糸核分裂に関する実験的研究

### 第Ⅲ報 去勢によるマウス肝細胞の無糸核分裂数の変動

沢 柳 精 倅

信州大学医学部第1解剖学教室(主任:尾持昌次教授)

#### EXPERIMENTAL STUDIES ON THE AMITOSIS IN THE HEPATIC CELLS

#### III. VARIATION OF THE FREQUENCY OF AMITOTIC CELLS IN THE HEPATIC CELLS OF CASTRATED MICE

Kiyotaka SAWAYANAGI

Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Shinshu University  
(Director: Prof. Sh. Omochi)

Key words: 肝細胞 (hepatic cells), 無糸分裂 (amitosis), 二核細胞 (binucleate cells),  
去勢 (castration), 多倍数体 (polyploid)

#### I 緒 言

哺乳類では成長と共にその細胞核は Polyploid のもの数が増加することを Alfert<sup>1)</sup>は指摘している。すなわち、出生時には Diploid の核が殆どを占めるが、成長と共に Tetraploid, Octaploid のものが増加することを認めている。これとは別に永田<sup>2)</sup>等はイスを用いて肝細胞について2核細胞の年令的変動を研究し、動物の成長と共に2核細胞数の増加を認めている。さらにまた永田<sup>3)</sup>は1核細胞の Ploidy が幼若動物および成体では主として Tetraploid よりなるのに対し、2核細胞のそれぞれの核の Ploidy は、幼若動物で Diploid が、成体では Tetraploid が多いことを明らかにした。また Ploidy とホルモンについて、Swartz<sup>4)</sup>, Hoffmann<sup>5)</sup>, および Geschwind<sup>6)</sup>らは去勢、甲状腺摘出、あるいは下垂体摘出と Ploidy との間に密接な関係があることを述べている。すなわち動物体内のホルモンの減少が Polyploid 核の減少、体成長の抑制、臓器発育の抑制をもたらすという。これらの諸家の研究よりして、動物の成長-ホルモン(特に性ホルモン)、-Ploidy および2核細胞の間に密接な関係のあることが推測できる。

著者は去勢による Ploidy および無糸核分裂の変化、並びに肝臓においてこれらの葉間差が存在するかどうかについて観察し、得た知見を報告する。

#### II 材料および方法

生後約1ヶ月の同腹マウス6~7匹ずつの3群をえらび、各々の群をさらに2分し、去勢群と対照群に分けた。

去勢手術はエーテル麻酔下に下腹部正中切開により開腹し、精巣または卵巣を摘出したのち手術創を閉鎖した。手術後28日目に動物を断頭によって殺し、それぞれの肝臓の右葉および左葉を取り出し、第I報<sup>7)</sup>と同様の方法により細胞分離標本作製した。染色法はヘマトキシリンエオジン染色によった。得られた標本について、Ocular Micrometer を用い1核および2核細胞の細胞核各々200個ずつにつきその直径を計測した。核の形態の変形したもの、あるいは正円でないものは除外した。さらに細胞1000個中2核細胞の出現率も算定した。

計測した核の Ploidy による分類は Carriere<sup>8)</sup>に従い、核の直径の大小により行なった。すなわち核の直

表 1 肝細胞における1核細胞および2核細胞の Ploidy の変動

実験群 動物番号 性 葉			去 勢 群								対 照 群							
			1 核 細 胞			2 核 細 胞					1 核 細 胞			2 核 細 胞				
			2n	4n	8n	2n	4n	8n	%	2n	4n	8n	2n	4n	8n	%		
1	♂	R	47	86	67	125	67	8	15.9	91	84	25	148	51	1	22.1		
		L	74	86	40	151	46	3	24.9	117	63	20	169	29	2	17.7		
2	♂	R	52	101	47	127	72	1	10.8	96	78	26	125	59	16	36.8		
		L	76	89	35	151	43	6	22.4	74	96	30	109	80	11	22.9		
3	♂	R	37	85	78	117	71	12	12.7	67	98	35	133	61	6	12.7		
		L	40	79	81	131	63	6	17.5	46	102	52	115	80	5	7.4		
4	♀	R	81	60	59	130	66	4	6.2	98	65	37	154	38	8	12.2		
		L	82	76	42	134	63	3	6.9	127	38	35	125	62	13	14.9		
5	♀	R	77	89	34	140	54	1	24.9	88	71	41	156	38	6	33.7		
		L	63	90	47	130	58	12	23.6	70	89	41	113	79	8	37.6		
6	♂	R								145	42	13	179	21	0	17.4		
		L								168	27	5	191	8	1	12.2		

R : 右葉 L : 左葉

表 2 肝細胞の Polyploidy の真の出現率

要 因	A <sub>1</sub>								A <sub>2</sub>							
	B <sub>1</sub>				B <sub>2</sub>				B <sub>1</sub>				B <sub>2</sub>			
	C <sub>1</sub>		C <sub>2</sub>		C <sub>1</sub>		C <sub>2</sub>		C <sub>1</sub>		C <sub>2</sub>		C <sub>1</sub>		C <sub>2</sub>	
	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>														
1	56.3	1.3	30.0	0.7					19.5	0.2	16.5	0.4				
2	41.9	0.1	27.2	1.3					16.4	5.9	23.1	2.5				
3	68.1	1.5	66.8	1.1					30.6	0.8	48.2	0.4				
4					55.3	0.2	39.1	0.2					32.5	1.0	29.8	1.9
5					25.5	0.2	35.9	2.8					27.2	2.0	25.6	3.0
6									10.7	0	4.4	0.1				
計	166.3	2.9	124	3.1	80.8	0.4	7.5	3.0	77.2	6.9	92.2	3.4	59.7	3.0	55.4	4.9
平均	55.4	1.0	41.3	1.0	40.4	0.2	37.5	1.5	19.3	1.7	23.1	0.9	29.9	1.5	27.7	2.5

表1より Octaploid のみについて2核細胞の出現率を乗じ、1核細胞および2核細胞の Polyploidy の出現率を再計算し本表を作製した。

A<sub>1</sub>: 去勢群 A<sub>2</sub>: 対照群 B<sub>1</sub>: 雄 B<sub>2</sub>: 雌  
 C<sub>1</sub>: 右葉 C<sub>2</sub>: 左葉 D<sub>1</sub>: 1核細胞 D<sub>2</sub>: 2核細胞

表 3 Ploidy 出現率の変動の要因分析表

要 因	SS	DF	MS	FS
A	321.3	2 - 1 = 1	321.3	0.46
B	0.4	2 - 1 = 1	0.4	0.0006
C	12.1	2 - 1 = 1	12.1	0.0175
D	4365.9	2 - 1 = 1	4365.9	6.299 *
A × B	79.7	1 × 1 = 1	79.7	0.115
A × C	19.1	1 × 1 = 1	19.1	0.027
A × D	375.4	1 × 1 = 1	375.1	0.541
B × C	4.3	1 × 1 = 1	4.3	0.006
B × D	1.4	1 × 1 = 1	1.4	0.002
C × D	17.8	1 × 1 = 1	17.8	0.026
A × B × C × D	127.0	1 × 1 × 1 × 1 = 1	127.0	0.183
T	10397.4	16 - 1 = 15	693.2	

略号 A:去勢 B:性 C:葉 D:1核と2核

\* 危険率5%で有意

径7.9 $\mu$ 以下のものを2n, 8 $\mu$ ~9 $\mu$ のものを4n, 9 $\mu$ 以上のものを8nとした。

### Ⅲ 成 績

標本を観察すると、全般的に去勢群においては大型の核および核質の濃染したものが目立った。これを計測した結果は表1に示す通りであった。

この表によると1核細胞については、去勢群は対照群に比し8nが多く、特にNo.1の動物では約2.5倍にも達しているのが目立った。これに反し2核細胞では、去勢群、対照群の間にPloidyの差は殆ど認められなかった。しかし2核細胞の出現率を見ると対照群に多く、去勢群に少ない傾向であった。

表2は、表1の8nのみを取出し、これに2核細胞の出現率を乗じて、8nの実際の出現率を再計算したものである。

Ploidyについての右葉、左葉の葉間差についてはその示す数字には一定した傾向がなかった。

表2の成績にもとづいて、各出現率をArcsine変換して、去勢(A)、性差(B)、葉間差(C)、1核細胞と2核細胞の差(D)の4要因による4元配置法で要因分析した結果を表3に示す。この結果は1核細胞と2核細胞の変動(D)のみが5%の危険率で有意で

あることを示した。

### Ⅳ 考 察

細胞核が分裂するときには有糸分裂、無糸分裂いずれの場合にも前もつて核内におけるDNAの合成増加を必要とする。一般にDNA増加があれば核質は濃染し、核の容積も増大して来る。この1核当りのDNA量の測定法にはFeulgen反応、または紫外線の吸光度を利用する顕微分光測光法、および通常の光学顕微鏡を用いて核の濃度、あるいは核の直径を計測して推定する方法<sup>3)</sup>がある。

Alfert<sup>1)</sup>によるとFeulgen反応による顕微分光測光法は核の99%迄Ploidy分類が可能で、非常に正確であるといっているが、Swartz<sup>4)</sup>は通常の光学顕微鏡を用いた核径測定による分類も熟練さえすればその誤差を数%に抑えることができると述べている。この故に著者はこの方法を採用した。

去勢によるPloidyの変化を考察する前に、年令による正常のPloidyの変動を知る必要がある。Alfert<sup>1)</sup>の顕微分光測光法を用いて1核細胞、2核細胞を区別せず、年令とPolyploidyの関係を調べたところによると、加令と共にPolyploid核が増加し、Diploid核の減少を認めた。永田<sup>5)</sup>によると1核、2核を区別

して測定しても2核細胞についても同様で、2核細胞の Tetraploid 核が増加し、Diploid 核が減少したことを認めた。

このような Polyloid 核の正常な年令的変動が性ホルモンによっていかに変化するかについて Swartz の実験がある。Swartz<sup>9)</sup> は生後31日目のマウスに去勢を行ない、101日目に殺し、対照と比較して、Diploid 核、Tetraploid 核は不変で Octaploid 核は認められなかったと報告している。Hoffmann および Swartz<sup>9)</sup> は性ホルモンと下垂体との関連に注目して、単に去勢だけしたものおよび去勢と下垂体摘出とを併用したものの2者の実験を行ない、去勢単独群に性ホルモンを投与したものは対照と比較して Diploid 核、Tetraploid 核の比率に差がなく、去勢と下垂体摘出併用群に性ホルモンを投与した群では、Tetraploid 核が少なく、Octaploid 核は全くなかったという。この結果、性ホルモンの Polyloid 核への作用は肝臓への直接作用よりも、下垂体を介しての間接的な作用であると考えている。

Carriere<sup>9)</sup> も総説において種々な条件下で Polyloid 核と性ホルモン、下垂体、および甲状腺の関係あることを強調している。すなわち、下垂体と甲状腺が性ホルモンの作用を増強させるといっている。

Swartz<sup>10)</sup> は甲状腺摘出による Polyloid 核変化を核の計測によつて調べ、術後55日、122日および230日目の観察で、対照は Diploid 核-Tetraploid 核の比率が次第に増加しているのに反し、実験群では日数が経過しても、Diploid 核-Tetraploid 核の比率が同じか、反って Tetraploid 核が減少していると報告している。すなわち Thyroxin は Polyploidy を促進させる作用をもち、体内よりの Thyroxin の減少が Polyploidy を抑制するといっている。

上記のごとく、去勢、下垂体摘出、甲状腺摘出、あるいはこれらの併用をした場合、Polyploidy の抑制のみならず動物体の成長の抑制、臓器の発育の抑制のあることは Carriere<sup>9)</sup> も指摘しており、これら内分泌臓器摘出動物にそのホルモンを投与すると、Polyloid 核の増加および体成長の改善を示すことから、内分泌ホルモンは Polyloid 核および動物体の成長と密接な関係のあることを物語るものである。

内分泌ホルモンがどのような機序によって肝臓に作用するのであろうか。Geschwind<sup>9)</sup> は dwarf mouse に Thyroxin と牛の成長ホルモンを用いた実験を行ない、夫々を併用した方が Polyloid 核に対する作用を

増強させることから、Thyroxin の肝臓に対する作用を3つあげている。すなわち、①肝細胞への直接作用、②肝に対する単なる物質代謝促進あるいは毒物作用、③下垂体のエオジン好性細胞の修復を促進し成長ホルモン分泌を促進する、3のつの仮説をあげ、③の仮説が有力であるといっている。著者もこの③の仮説を支持したい。

著者の実験結果は、Swart, Hoffmann の成績と異なり、去勢により Polyloid 核の増加がみられた。この諸家の成績と異なる成績を得たことに対しては種々の推論が可能である。第1に、著者の第2報<sup>11)</sup>で考察したごとく、Polyloid 核および2核細胞は種々の環境、条件のもとで変化しうる。第2に本実験の去勢群では2核細胞の減少している例が多いことを考慮するとき、何らかの原因により Polyloid 核から2核細胞への移行が抑制されているという推論ができるのである。すなわち無糸核分裂の抑制である。あるいは反対に2核細胞から Polyloid 核の1核細胞への戻りが促進されているという推論も可能である。去勢マウスからの脾臓および胃旁細胞を細胞分離永久標本として2核細胞の出現率を観察した実験(名和ほか<sup>12)</sup>)においては、去勢マウスで2核細胞が増加したという成績が得られているが、本実験との違いは器官の特殊性によると考えられる。

著者の実験成績を要因分析により推計学的検定を加えた結果は、Ploidy の比率、2核細胞数、葉間差、および性差についてはすべて有意が認められなかった。しかし、個々の実験例を検討するとき、Polyloid 核の増加、2核細胞数の減少は認められるので、この推計学的考察との矛盾は、実験群に死亡例が多く有効な実験数が少なかったことが原因かもしれない。もっと実験数が多ければ有意差は認められたと思われる。

このように種々の考察をすめるとき、Ploidy と2核細胞は種々の原因によって変化し、一元的に解決されるものでなく、二元的さらに高次の要因がからみ合せて変化しうるものであることがわかる。Polyloid 核が細胞の機能亢進のみならず、機能減退の場合もそれを補う意味で Polyloid 核の増加をもたらす可能性もある<sup>7)</sup>。

## V 結 論

(1) 生後1約ヶ月の同腹マウスの3群を選び、それぞれを去勢群と対照群に分けて去勢実験を行なったのち、細胞分離永久標本により1核細胞および2核細胞

胞の各 Ploidy の出現率を測定比較した。

(2) 去勢群は対照群に比較し Polyploid 核の増加, および 2 核細胞の減少がみられたが, 推計学的には有意差はなかった。

(3) 去勢群に Polyploid 核が多く 2 核細胞が少ないのは, Polyploid 核の 1 核細胞から 2 核細胞への移行が何らかの原因により抑制されていると推定される。

(4) Polyploidy と 2 核細胞の出現率の変動は密接な関係があり, 各種の要因が複雑に作用し合って変化するものであり, この点で 2~3 の考察を試みた。

文 献

(1972. 4. 24 受稿)

- 1) Alfert, M.: Classification of liver cell nuclei by size and Feulgen Reaction, *Am. Int. Biol. Science*, 4: 11-15, 1958.
- 2) 永田哲士, 百瀬節生: イヌ肝細胞の無糸核分裂および 2 核細胞の年令的変動, *解剖学雑誌*, 34: 187-190, 1959.
- 3) Nagata, T.: A quantitative study of the DNA contents in rat hepatic cell nuclei by means of microspectrophotometry with special reference to binucleate cells. *Med. J. Shinshu Univ.* 6: 143-153, 1960.
- 4) Swartz, F.: Polyploidization of rat liver following castration of males and females. *Exp. Cell Res.* 20: 438-446, 1960.
- 5) Hoffmann, J. H.: Effects of sex hormone on liver polyploidy in castrated pre-weanling and hypophysectomized post-weanling rats. *Growth*, 26: 273-282, 1962.
- 6) Geschwind, H.: The effects of thyroxin and growth hormon on liver polyploidy. *Biol. Bull.* 118: 66-69, 1960.
- 7) 沢柳精倅: 肝細胞の無糸核分裂に関する実験的研究, 第Ⅰ報: 正常マウス肝臓の葉および小葉内における無糸核分裂の出現率, *信州医誌*, 19: 278-283, 1971.
- 8) Carriere, R.: Polyploid cell reproduction in normal adult rat liver, *Exp. Cell Res.* 46: 533-540, 1967.
- 9) Carriere, R.: The growth of liver parenchymal nuclei and its endocrine regulation. *Intern. Rev. Cytol.* 25: 201-277, 1969.
- 10) Swartz, F. J.: Effect of thyroidectomy on development of polyploid nuclei in rat liver. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 104: 756-759, 1960.
- 11) 沢柳精倅: 肝細胞の無糸核分裂に関する実験的研究, 第Ⅱ報: 利胆剤注射マウス肝細胞の無糸核分裂数の変動, *信州医誌*, 20: 133-136, 1972.
- 12) 名和澄黄雄, 沢柳精倅, 永田哲士: 去勢によるマウス消化器官の 2 核細胞数の変動, *信州医誌*, 19: 141-145, 1971.