

原 著

肝細胞の無糸核分裂に関する実験的研究

第Ⅳ報 マウス肝細胞の無糸核分裂に及ぼすホルモンの影響

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

IV. EFFECTS OF SEVERAL HORMONES UPON THE  
AMITOSIS IN THE HEPATIC CELLS OF MICE

Kiyotaka SAWAYANAGI

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

Key words: mouse liver, amitosis, binucleate cell, hormones

緒 言

哺乳類の2核細胞あるいは、Ploidyが、いろいろな内的、外的因子によって変化することはすでに数多くの報告がある<sup>1)2)3)4)</sup>。著者もまたマウス肝臓を使用して、去勢による核分裂数の変動、利胆剤の影響、正常時の葉内および小葉内の無糸核分裂につきI報~Ⅱ報<sup>14)15)9)</sup>に報告した。

動物が出生し、その後の成長に従い内的あるいは外的環境変化に対しその個体を護る意味からして細胞レベルにおいていろいろな変動のありうることは想像に難くはない。また、動物の生存、成長に内分泌ホルモンが重要な役割を果すことは古くから知られているが、この点についてさえ今日においてもなお未知な部分が多くある。各種ホルモンがPloidyに対して影響することがGeschwind<sup>6)</sup>, Swartz<sup>6)7)</sup>, Hoffmann<sup>8)</sup>等により報告されている。

今回の著者の報告はこれら諸家と同じくホルモンとPloidyに関するものであるが、著者はさらに2核細胞におけるPloidyについても観察を試み、得た知見を報告する。

研究材料および方法

生後約1カ月の体重20g前後のマウスを同腹のもの

7~4匹を1つの群として6群を編成し、実験群の各匹についてInsulin, ACTH, Thyroxin, およびMacrobin(蛋白同化ホルモン)を注射したが、各群ともに1~3匹を対照とした。InsulinはLente Insulinを使用し、毎日0.04 $\mu$ g, ACTHはHp-ACTHゲルを毎日2 $\mu$ gを、Thyroxinは50mgを週2回、Macrobinは1mgを週1回それぞれ皮下注射した。

各群ともに注射開始後20日目に対照動物とともに断頭により殺し、肝臓のleft median lobeを採取し、既報のごとき方法により細胞分離永久標本を作製し、ヘマトキシリン-エオジンにより重複染色した。得られた標本について、第3報<sup>9)</sup>と同様の方法により核の直径の計測を行なう一方、2核の出現率の算定を行ない、この成績をもとは第1表を作製した。

成 績

得られた分離標本を観察すると、一般的に言って対照群に比較してホルモン投与群では細胞核の直径の増大したもの、核質の濃染したものが目立って多かったが、これの出現数(1核細胞では200個につき、2核細胞では100個につきその出現数)を示すと表1のごとくなる。この表を見ると、ホルモン投与群では対照群に比し2核細胞の出現率が多い。1核についてはは

表 1

動物群	ホルモンの種類	I 核			II 核			
		d	t	p	d	t	p	%
I	I	32	71	97	79	17	4	5.9
	A	53	74	73	61	37	2	4.4
	T	63	73	64	83	14	3	5.1
	M	22	59	119	53	47		5.2
	C <sub>1</sub>	82	85	33	84	16		3.3
	C <sub>2</sub>	116	69	15	76	23	1	2.9
	C <sub>3</sub>	93	86	21	79	21		3.6
II	I	54	83	63	60	36	4	4.9
	A	33	79	88	41	52	7	4.5
	T	42	80	78	61	37	2	4.3
	M	28	65	107	37	55	8	5.6
	C	67	86	47	54	42	4	3.1
III	I	68	89	43	76	24		4.6
	A	52	108	40	51	48	1	5.9
	T	44	37	119	44	54	2	4.4
	M	46	91	63	63	37		2.8
	C	105	78	17	72	28		2.8
IV	I	25	78	97	56	38	6	4.6
	A	40	81	79	44	46	10	3.7
	T	34	70	96	80	18	2	1.7
	M	44	87	69	79	20	1	5.9
	C	108	71	21	76	24		3.8
V	I	47	75	78	32	50	18	6.8
	A	43	71	86	43	46	11	5.1
	T	33	76	91	36	49	15	4.7
	M	30	70	100	36	52	12	2.4
	C <sub>1</sub>	106	83	11	86	14		4.4
	C <sub>2</sub>	140	52	8	95	5		6.1
	C <sub>3</sub>	121	64	15	92	8		3.9
VI	A	49	81	70	74	25	1	4.9
	T	36	79	85	73	25	2	6.2
	M	25	88	87	81	19		0.9
	C	99	85	16	88	12		1.8

1核は200個、2核は100個の核の直径を計測した。

I : Insulin      A : ACTH  
 T : Thyroxin    M : Macrobin  
 C : 対照          d : diploid  
 t : tetraploid    p : polyplloid  
 %は2核の出現率を示す

Diploid のものと Polyplloid のもの間に判然とした差異が認められた。すなわち対照群ではすべて Diploid の細胞が多く、Polyplloid のもの2~10倍に達するのに対し、ホルモン投与群ではこの関係は全く逆になっていて Polyplloid のものが多く、特に1群の Macrobin 投与例の場合は Polyplloid のものは Diploid のもの5倍にもおよんでいた。その他のホルモン投与例でも一様に Diploid のものより Polyplloid のものが多く、この Ploidy の関係は対照群とホルモン投与群の間で完全に逆転していた。

2核については1核の場合ほどの顕著な差異はみとめられなかったが、それでもやはり対照群では Polyplloid のものが少ないのに、ホルモン投与群では Polyplloid のもの数がやゝ多い傾向がみられた。

各々のホルモン相互間の Polyplloid の差異について観察すると、1群の Macrobin 投与例のごとく Polyplloid の細胞数が Diploid のその約5倍多いもの、2群および5群の Macrobin 投与例での3~4倍の数を示すものが目立った。

また、Insulin 投与例においても Polyplloid の細胞が他のホルモン投与例に比較して増加していた。すなわち1群の Insulin 投与例では Polyplloid を示す細胞数は対照例の約3倍、4群のそれでは約4倍にそれぞれ達しているが、しかし3群のごとく例外的に Diploid のもの数が Polyplloid のそれよりも多い例もあった。

Thyroxin 実験群では Polyplloid の細胞数は Diploid のその2~3倍、ACTH 注射群では Polyplloid 細胞の増加の率は対照例の1.5~2倍に過ぎなかった。

以上得られた成績について推計学的に検討するためにホルモンをA、PloidyをB、1核2核の別をCとし、ABCの属性について独立性の検定を行なった。すなわち、表1の成績を3つの属性について3重分類し、公式

$$\chi^2_{A \times B \times C} = 2 \left\{ \sum_{ijk} \sum_{ijk} x_{ijk} \log_e x_{ijk} + \sum_k x_{..k} \log_e x_{..k} - \sum_{ik} \sum_{ik} x_{i.k} \log_e x_{i.k} - \sum_j \sum_j x_{.j} \log_e x_{.j} \right\}$$

にそれぞれの測定値を代入し計算した結果を、

自由度  $f = abc - (a + b + c) + 2$  の  $\chi^2$  分布と比較した。その結果は次の成績および表2の通りである。

- 1)  $\chi^2 (A, C) \times B > \chi^2 (18; 0.001) = 42.3$   
 $A_i C_k$  ( $i=1, 2, \dots, 5$ ;  $k=1, 2$ ) によって  $B_j$  の出現率が異なる。(有意水準 0.1%)
- 2)  $\chi^2 A \times B > \chi^2 (8; 0.001) = 26.125$   
 $A_i$  ( $i=1, 2, \dots, 5$ ) によって  $B_j$  の出現率が異なる。(有意水準 0.1%)
- 3)  $\chi^2 A \times B | C_1 > \chi^2 (8; 0.001) = 26.125$   
 $C_1$  では  $A_i$  ( $i=1, 2, \dots, 5$ ) によって  $B_j$  の出現率が異なる。(有意水準 0.1%)
- 4)  $\chi^2 A \times B | C_2 > \chi^2 (8; 0.001) = 26.125$   
 $C_2$  では  $A_i$  ( $i=1, 2, \dots, 5$ ) によって  $B_j$  の出現率が異なる。(有意水準 0.1%)
- 5)  $\chi^2 A \times B | C > \chi^2 (16; 0.001) = 39.3$   
 $k$  を固定したとき  $A_i$  ( $i=1, 2, \dots, 5$ ) によって  $B_j$  の出現率が異なる。(有意水準 0.1%)
- 6)  $\chi^2 B \times C > \chi^2 (2; 0.001) = 9.21$   
 $C_k$  ( $k=1, 2$ ) によって  $B_j$  の出現率が異なる。(有意水準 0.1%)

表 2 ホルモン (A), Ploidy (B), 2核細胞 (C) の3種の属性の独立性の検定結果

仮 説	$\chi^2$	自由度
$A \times B   C$ $B \times C$ } $(A, C) \times B$	$\left. \begin{matrix} 798.34 \\ 2160.22 \end{matrix} \right\} 2958.56$	$\left. \begin{matrix} 16 \\ 2 \end{matrix} \right\} 18$
$A \times B$	636.48	8

以上の推計学的検定は対照群をも加えたものであるので、次に対照群を除き、ホルモン投与群のみについて同様の検定を試みた。

$$\chi^2 (A, C) \times B > \chi^2 (14; 0.001) = 36.12$$

$$\chi^2 A \times B > \chi^2 (6; 0.001) = 22.5$$

$$\chi^2 B \times C > \chi^2 (2; 0.001) = 13.82$$

となり、いずれも 0.1% の危険率で有意であった (表 3)。

表 3 正常対照例を除いた3種の属性の独立性の検定結果

仮 説	$\chi^2$	自由度
$A \times B   C$ $B \times C$ } $(A, C) \times B$	$\left. \begin{matrix} 73.14 \\ 2054.84 \end{matrix} \right\} 2127.98$	$\left. \begin{matrix} 12 \\ 2 \end{matrix} \right\} 14$
$B \times A$	36.44	6

以上の推計学的検定は、ホルモンの相違によって Ploidy の差のあること、1核、2核の別についても

同様のことがいえることが判った。更に対照群を除いてもこの関係に変わりがないことが証明された。

### 考 察

生体はホルモンによる体液性調節機構によってその生命の維持、発育、および代謝等を行なっていることは古くから知られている事実である。血流中に入ったホルモンが特定あるいは不特定の臓器組織に到達し、その細胞膜を通して細胞に入り細胞内に酵素反応を起し、これによって最終的にはその組織の特定の生理的現象が現われるわけである<sup>10)</sup>。著者が第3報で述べたごとく、細胞内の DNA 合成の増加も前述の現象の現われの一端とみることが出来る。すなわち、各種ホルモンを投与した動物において DNA の変化を観察することはホルモン作用の細胞内における Ploidy への影響をうかがうことになると考えられる。

Insulin は糖代謝、脂質代謝、および蛋白代謝に密接な関係があり<sup>11)</sup>、しかもこれらの代謝は主に肝臓において行なわれている。このことは Insulin の肝細胞におよぼす影響がいかに大きいかを物語るもので、従って肝細胞内の代謝の充進の結果は分子レベルにおける変化、これがさらに進んでは、DNA 合成を促進し光学顕微鏡的な核の増大、核質の染色性の変化となって現われると考えることもできる。しかし ACTH, Thyroxin も糖代謝ならびに肝細胞機能と関連はあり Insulin のみが Polyploid に対して ACTH, Thyroxin より有意に大きい影響を与えている意義は不明である。ACTH は副腎皮質ホルモンの分泌を促し、これが肝臓に作用するものと思われる。一方 Hoffmann および Swartz<sup>9)</sup> は性ホルモンおよび下垂体のホルモンの肝細胞 Ploidy への影響を強調している。すなわち、去勢した動物に性ホルモンを投与した場合と、去勢しかつその下垂体を切除した上でさらにこれに性ホルモンを投与した場合とを比較すると後者では Polyploid の肝細胞の増加が殆どみられないことを認め、下垂体ホルモンの重要性を強調している。

Swartz<sup>9)</sup> は甲状腺摘出により、肝細胞の Polyploidization が遅延することを認めた。また Geschwind<sup>9)</sup> は Thyroxin を投与したマウスに Polyploidy の増加を認め、更に Thyroxin と成長ホルモンとを併用するとその Polyploidization に対する効果を一層高めることを認め、このことは2核細胞によっても認められ、こゝにおいてもホルモンと下垂体の関係の重要性が裏書きされている。

蛋白同化ホルモンは臨床にいろいろな疾患の治療に利用されているが、その肝障害作用についても注目されている。吉利ほか<sup>12)</sup>は蛋白同化ホルモンの肝臓への作用点は肝細胞から胆汁への排泄部位にあるといふ、またトランスアミナーゼの上昇する例の多いことから、一般的な肝細胞に対する侵襲も予想できるとしている。著者が本研究において Macrobin を使用してその作用を他のホルモンのそれと Ploidy, 2核細胞について比較してみた結果でも Macrobin が他のホルモンに比して Ploidy の増加に最も効果があることに気づく。この事実は Polyploidy が単なる細胞の機能亢進のみによるものでないことを証明するものであり、著者の2~3報<sup>13)9)</sup>でも述べたとおり、細胞の機能減退あるいは機能障害の場合にもそれを補うために Polyploidy の増加があり得ると言える。もちろん、細胞の機能減退、あるいは障害といっても非可逆的なものばかりではなく、可逆的な修復可能な範囲内のものが多いであろう。

本実験は正常マウスを使用しているのであるから、Insulin, ACTH, Thyroxin のいずれのホルモンについてもその欠乏状態のものについての実験はされていない。故にこのような正常なマウスではホルモン投与による反応もおのずから異なったものになることは予想される。このことが肝障害性のある Macrobin と他のホルモンとの差異となって現われたものと考えられる。Insulin 欠乏状態、下垂体摘出、あるいは甲状腺摘出のものにそれぞれのホルモンを投与すれば、本実験の成績とは異なった結果になったかもしれない。推計学的考察の結果も、各種ホルモンの間の差異、Ploidy の差異についていずれも有意であることが証明されている。

肝臓は多岐にわたる代謝を司る重要な器官で、その生体の代謝状態に鋭敏に反応して変化してゆくものと考えられる。また、ホルモンは臓器特異性をもち、全ての器官、組織に常に同じように作用するものではない。これを Ploidy, あるいは2核細胞の側から考えるならばある臓器には Polyploidy の増加となって現われ、また他の臓器では減少となって現われることもありうるであろう。

著者は1報より4報まで、無処置正常マウスの葉内および小葉内における無糸核分裂と2核細胞数を調べ、これらの出現率が利胆剤デヒコール酸ナトリウムによって変動することを明らかにし、また去勢によって2核細胞数と Ploidy が影響を受けることを見出し

た。今回はさらに性ホルモン、および他の各糖ホルモンによる Ploidy の変化、2核細胞の変化について論じた。これらを総合していえることは、核細胞数、Ploidy ともに流動的で、時間的にもその都度変化し、決して固定的、画一的なものでないこと、更に他の外的(利胆剤)および内的(ホルモン)要因も加わり複雑に変化するものであることがわかった。

## 結 論

- 1) 6群の同腹マウスを使用し、それぞれに Insulin, ACTH, Thyroxin および Macrobin を投与し、肝細胞の Polyploidy および2核細胞の数について観察を試みた。
- 2) 対照群に比しホルモン投与群は2核細胞の出現率が多い。また1核細胞および2核細胞様に Polyploid の細胞が多かった。
- 3) 各ホルモンの間にも1核, 2核について Polyploidy の程度に有意の差があった。
- 4) 従って、各ホルモンの作用により、肝細胞における2核細胞の出現率および Ploidy の出現率に変動の起きることが明らかになった。

## 文 献

- 1) 百瀬節生：肝細胞の無糸核分裂に関する研究，信州医誌，34：205-210，1959。
- 2) 和田 寛：2核細胞についての実験的研究，和歌山医学，10：501-510，1959。
- 3) 大久保幹雄：食餌によるラット肝細胞の無糸核分裂数の変動，信州医誌，9：616-621，1960。
- 4) 平野 格：利胆剤の肝細胞分裂におよぼす影響，信州医誌，13：96-102，1964。
- 5) Geschwind, H. et al.: The effects of thyroxin and growth hormone on liver polyploidy. Biol. Bull. 118: 66-69, 1960.
- 6) Swartz, F. J.: Effects of thyroidectomy on development of polyploid nuclei in rat liver. Proc. Society Exp. Biol. Med. 104: 756-759, 1960.
- 7) Swartz, F. J.: Polyploidization of rat liver following castration of males and females. Exp. Cell. Res. 20: 438-446, 1960.
- 8) Hoffmann, J. H. and Swartz, F. J.: Effect of sex hormone on liver polyploidy in castrated pre-weanling and hypophysectomized

肝細胞の無糸核分裂に関する実験的研究 (第Ⅳ報)

- post-weanling rats. Growth. 26 : 273-282, 1962.
- 9) 沢柳精彦：第Ⅱ報，去勢によるマウス肝細胞の無糸核分裂の変動，信州医誌，20 : 137-142, 1972.
  - 10) 兼子俊男：ホルモンの作用機序，内科，28 : 1, 4-9, 1971.
  - 11) 上田英雄：肝の生化学，肝臓病学，上巻，56-117, 1962.
  - 12) 吉利 和ほか：蛋白同化ステロイドの臨床応用と作用機序，最新医学，21 : 1059-1071, 1966.
  - 13) 沢柳精彦：第Ⅱ報，利胆剤注射マウス肝細胞の無糸核分裂数の葉間差，信州医誌，20 : 133-136, 1972.
  - 14) 沢柳精彦：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，信州医誌，19 : 280-285, 1971.

(1972. 9. 28 受稿)