

マウス胃旁細胞と十二指腸上皮細胞の蛋白合成に関するラジオ・オートグラフ的研究, ことに2核細胞について

昭和42年12月26日 受付

信州大学医学部第一解剖学教室

(主任: 尾持昌次教授)

名 和 橙 黄 雄

A Radioautographic Study on the Protein Synthesis in the Parietal Cells of the Stomachs and the Duodenal Epithelial Cells of Mice With Special Reference to Binucleate Cells

Tokio Nawa

The First Department of Anatomy, Shinshu University

(Director: Prof. S. Omochi)

近年, ラジオ・オートグラフの技術が生物学へ導入されてから, 特に組織化学, 細胞化学への応用が急速に発展し, ラジオ・アイソトープが種々の物質代謝のトレーサーとして用いられるようになった。現在のようになら種々の標識物質が得られるようになると応用範囲も広がり, 多種多様な研究報告がなされている。しかしながら各種組織にみられる2核細胞と1核細胞との関連についての報告は核酸合成についてのもの以外はほとんどみられない。そこで今回は胃旁細胞と十二指腸上皮細胞について蛋白前駆物質の ^3H -DL-tryptophan と ^3H -DL-leucine の二種のアミノ酸を用いて, 2核細胞と1核細胞との比較検討を試みた。

材料および方法

体重15~20gのマウス(雄)6匹を使用し, 3匹ずつ tryptophan 群と leucine 群に分け, 各群とも動物に I, II, III, の番号をつけた。一週間, 49mの基礎食(CLEA CE-2)を投与し, 食餌は毎朝9時30分から10時までの30分間与えた。一週間基礎食で馴らした後に100 $\mu\text{g}/9\text{m}$ の ^3H -DL-tryptophan (1.46c/mM), ^3H -DL-leucine (785mc/mM)を午前9時に各群一斉に腹腔内に注射した。午前9時30分から10時までの30分間, II群とIII群に基礎食を与え, I群には給食しないでおいた。I群は午前10時30分に殺した。これは前日に基礎食を与えただけなので給食後24時間, 注射後1時間30分である。II群も同じ10時30分に殺したが, これは給食後1時間, 注射後1時間30分となる。III群は同日の午後1時30分に殺した。これは給食後4時

間, 注射後4時間30分にあたる。

各動物から胃と十二指腸を取り Nagata 他¹⁾の方法で分離標本を作製し, サクラ NR-M1 乳剤を用いて Dipping 法でラジオ・オートグラフィーを行なった。露出は4°Cで62日間, 現像はSDX-1で20°C 5分間, 定着, 水洗後ヘマトキシリン・エオジン二重染色を施した。各々の群とも1核細胞10個, 2核細胞10個を at random に選び, 核, 細胞質の銀粒子数を算えた。他方同一組織の一部を取り10% Formalin で固定し, パラフィン包埋5 μ の切片とし, 同じようにサクラ NR-M1 乳剤で Dipping 法を行ない4°Cで露出した。露出は70日間で, SDX-1で20°C, 5分間現像, 定着, 水洗後ヘマトキシリン・エオジン二重染色を施した。

実験成績

胃は切片標本で観察すると図15, 16のように胃腺の主細胞, 旁細胞に tryptophan および leucine が取り込まれる。分離標本において旁細胞を観察すると, 1核細胞, 2核細胞ともに取り込みが見られる(図7, 8, 9, 10)。各動物において旁細胞の1核細胞と2核細胞を各10個ずつ at random に選び, 核および細胞質に現われた銀粒子数を平均で示すと表1を得る。図1は tryptophan の取り込みであるが, 核と細胞質の取り込みをみると, 各時期とも2核細胞の方が1核細胞よりも多い。

群別の取り込みをみるとI群, II群, III群の順に増加を示している。図2は leucine の取り込みであるが, 核, 細胞質ともに1核細胞よりも2核細胞の方が

Table 1. Mean Grain Counts of 10 Mononucleate and 10 Binucleate Cells in the Parietal Cells of the Stomachs of Mice after Giving ^3H -Amino Acids

Amino acids	Animal No.	Binucleate		Mononucleate	
		Nucleus	Cytoplasm	Nucleus	Cytoplasm
^3H -Tryptophan	I	34.2±15.4	71.0±19.6	3.2±3.1	33.8±10.4
	II	41.9±13.0	82.5±23.9	18.3±6.6	63.1±12.0
	III	44.8±13.6	103.4±19.0	7.9±6.2	77.6±18.5
^3H -Leucine	I	73.7±21.9	154.9±32.1	33.9±13.4	113.0±36.3
	II	54.3±29.2	125.2±49.1	29.7±8.3	128.9±30.0
	III	36.2±16.8	113.1±37.6	20.8±10.7	109.0±37.4

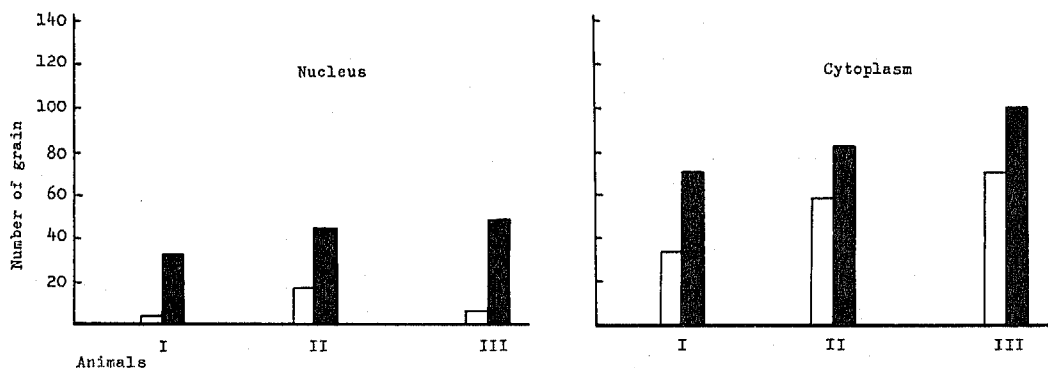


Fig. 1. Histogram showing the number of grains in the nucleus and the cytoplasm of the parietal cells after giving ^3H -DL-tryptophan
 ■ Binucleate cell, □ Mononucleate cell

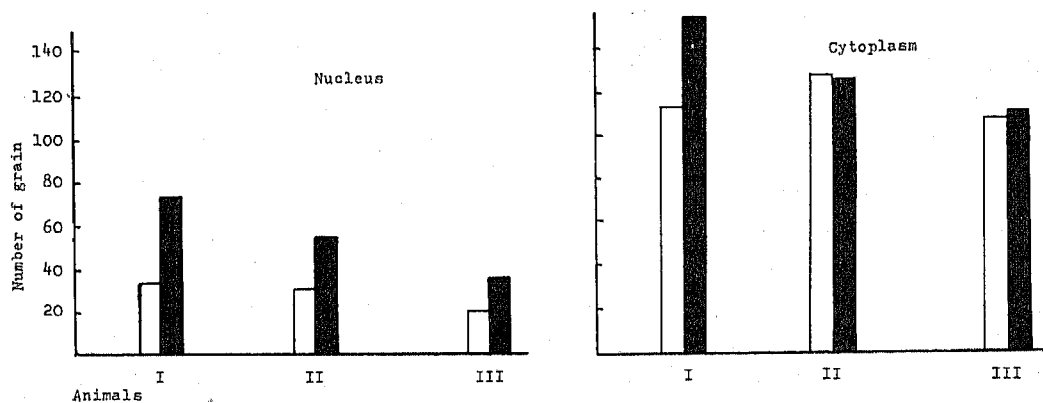


Fig. 2. Histogram showing the number of grains in the nucleus and the cytoplasm of the parietal cells after giving ^3H -DL-leucine
 ■ Binucleate cell, □ Mononucleate cell

多く取り込んでいる。Ⅱ群の細胞質のみは1核細胞の方が多いが、細胞全体としては、やはり2核細胞の方が多い。Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ群の取り込みの順序は図1と逆の傾向にある。

表2は表1の要因分析表でA(アミノ酸のちがいと

処置のちがいの因子), B(2核と1核の因子), C(核と細胞質の因子)はともに1%の危険率で有意の差を示している。

なお因子Aは実験個体数が少なくてアミノ酸のちがいと処置のちがいを分離出来なかったのをまとめてA

という因子として処置した。この因子Aは信頼限界を示す事により推測する事とした。

図3は因子Aの信頼限界を示したものであるが、これによると tryptophan のI群と leucine のI群にまた tryptophan と leucine のI群とII群の間に有意の差がみられ、表2における因子Aの有意性はおそらくアミノ酸の種類と食事の影響によるものと考えられる。

次に十二指腸を切片により観察すると、図17, 18のように腸絨毛および腸陰窩上皮細胞にアミノ酸の取り込みが見られる。分離標本においては腸上皮細胞は前報と同様に陰窩細胞 (Crypt cell) と絨毛細胞 (Villus cell) に分けられる。陰窩細胞は1核細胞のみから成り絨毛細胞は1核細胞と2核細胞に分けられる。(図11, 12, 13, 14)

表3は各々の細胞10個の平均の銀粒子数を示したものである。

Table 2. Factorial Design of the Data Listed in Table 1

Factor	SS	DF	SM
A	92231.68	5	18226.34**
B	36457.35	1	36457.35**
C	251294.82	1	251294.82**
A × B	9267.47	5	1853.49**
A × C	125126.50	5	25025.30**
B × C	954.13	1	954.13**
E	31112.65	221	140.78
ABCR	546444.60	239	

Abbreviation to the table

- A : Amino acids, Treatment
- B : Mononucleate, Binucleate
- C : Nucleus, Cytoplasm

** : Significant in 1% Level of Significance

Table 3. Mean Grain Counts of 10 Mononucleate and 10 Binucleate Cells in the Duodenal Epithelial Cells of Mice after Giving ³H-Amino Acids

Amino acids	Animal No.	Binucleate		Mononucleate			
		Nucleus	Cytoplasm	Crypt cells		Villus cells	
				Nucleus	Cytoplasm	Nucleus	Cytoplasm
³ H-Tryptophan	I	44.4±12.6	128.8±28.5	27.2±8.7	50.9±15.9	27.9±7.8	82.5±23.6
	II	80.9±15.4	111.0±31.3	34.2±14.7	33.4±12.1	32.3±8.6	67.2±11.1
	III	53.5±24.4	98.5±27.9	29.7±13.3	47.0±19.6	25.1±8.7	63.7±21.1
³ H-Leucine	I	15.9±7.6	93.8±32.3	6.6±4.9	34.7±11.3	8.8±2.5	66.2±12.7
	II	60.2±24.3	79.3±31.3	21.3±4.9	26.2±8.1	25.6±7.2	55.4±11.2
	III	48.2±11.3	111.3±25.7	19.3±4.2	54.3±22.9	15.6±6.6	74.1±11.4

図4-5はこれを図示したものである。図4は tryptophan で各群とも核、細胞質の銀粒子は2核細胞に多く、1核細胞の陰窩細胞と絨毛細胞の間では核の間に大差がないが細胞全体としては陰窩細胞よりも絨毛細胞の方が多いいえる。群別にみると核ではII群で銀粒子の取り込みが増加し、細胞質では逆に減少の傾向を示している。

図5は leucine 群で tryptophan 群と同様に2核細胞の核、細胞質の銀粒子はどの群でも常に他の2種の細胞よりも多く、1核細胞の陰窩細胞と絨毛細胞とでは絨毛細胞の方が多いいえる。群別ではII群で核の

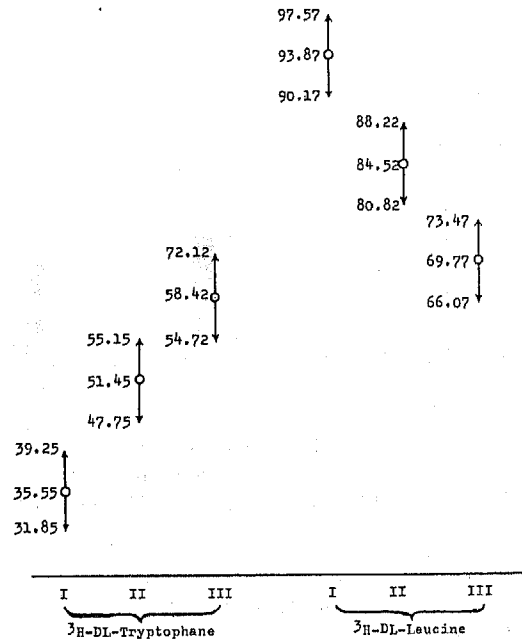


Fig. 3. Variation of the confidence limits of the factor A (Table 2) in 95% confidence coefficient

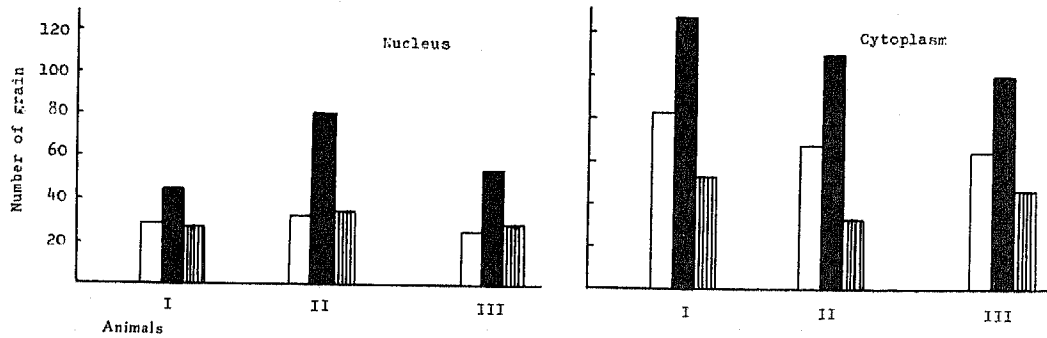


Fig. 4. Histogram showing the number of grains in the nucleus and the cytoplasm of the duodenal epithelial cells after giving ³H-DL-tryptophan
 ■ Binucleate cell, □ Mononucleate Villus cell, ▨ Mononucleate Crypt cell

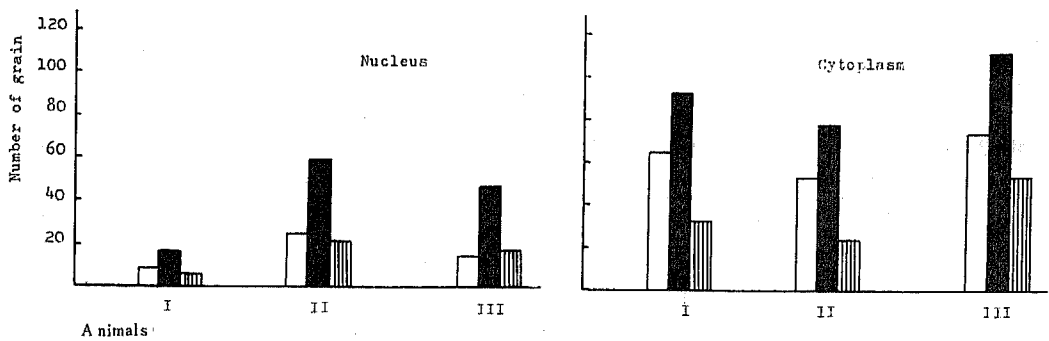


Fig. 4. Histogram showing the number of grains in the nucleus and the cytoplasm of the duodenal epithelial cells after giving ³H-DL-leucine
 ■ Binucleate cell, □ Mononucleate Villus cell, ▨ Mononucleate Crypt cell

Table 4. Factorial Desing of the Data Listed in Table 3

Factor	SS	DF	MS
A	23516.36	5	4703.27**
B	128783.09	2	64391.55**
C	136734.04	1	136734.04**
A × B	685.80	10	68.58
A × C	21516.42	5	4303.28**
B × C	20614.16	2	10307.08**
E	109055.85	334	326.51

ABCR 440905.72 359

Abbreviation are the same as in Table 2

取り込みが増加し、細胞質では逆にⅡ群で減少している。

表4は表3の要因分析表であるが、これによると、因子A, B, Cともに1%の危険率で有意である。

図6は因子Aの信頼限界を示したものであるが、こ

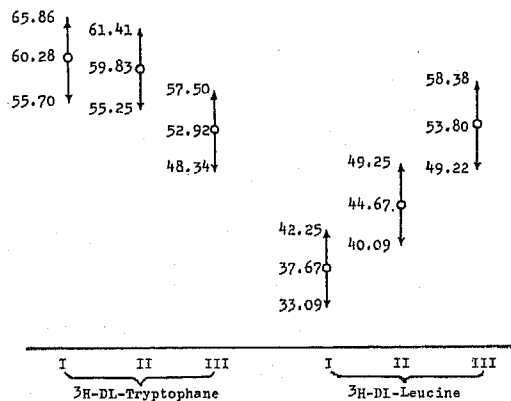


Fig. 6. Variation of the confidence limits of the factor A (Table 4) in 95% confidence coefficient

れによると因子Aの有意性はアミノ酸の種類の影響によるものと考えられる。

考 察

胃旁細胞の $^3\text{H-DL-tryptophan}$, $^3\text{H-DL-leucine}$ の取り込みは核, 細胞質ともに1核細胞より2核細胞の方が多く, 核よりも細胞質の取り込みが多い。表2の要因分析表によると因子A (アミノ酸の種類と処置の因子), B (1核細胞と2核細胞), C (核と細胞質) はともに1%の危険率で有意の差を示し, 因子Aの6水準について信頼係数95%で推定してみると図3のようになる。したがって有意の差は絶食と給食による差と, アミノ酸の相異により生じたものと考えられる。なお tryptophan 群では上昇し leucine 群では下降の傾向にあるが, これはおそらく組織でのアミノ酸摂取の差異によるものと考えられる。

tryptophan 代謝を群別にみると核, 細胞質ともにI群よりII群で増加している。I群, II群は注射は同時であるが, I群は絶食24時間であり, II群は給食1時間後のものであるから, この差は給食により細胞機能が盛んとなり, II群, III群での tryptophan 取り込みが促進されたのではないかと考えられる。

leucine の取り込みをみると tryptophan とは逆にI群, II群, III群の順に減少をみる。

図3の信頼限界の分布に示すように leucine と tryptophan の取り込みには上記のような傾向が推察されるが, これは給食による影響とアミノ酸の相異による結果と考えられ, また同一組織でも, アミノ酸の種類で取り込みの様相が異なることを示している。

川端⁹⁾によると胃旁細胞の tryptophan の取り込みは注射後2時間位で最大となり, Carneiro と Leblond⁴⁾は Purkije 細胞では4時間位, 錐体細胞では30分位で最大となるという。

Zetterberg⁵⁾のマウス線維芽細胞の組織培養では10分位に急激な取り込みがみられる。すなわちアミノ酸の要求度(蛋白合成度)は組織により各々異なり, 細胞機能の盛んな時期, 或いは盛んな組織ではきわめて短時間に蛋白合成が最大値に達すると考えられる。

十二指腸での tryptophan と leucine の取り込みをみると1核細胞よりも2核細胞での取り込みが常に多く, 細胞全体としてみれば陰窩細胞よりも絨毛細胞が多く, 核よりも細胞質の方が多く, 核ではI群よりもII群で増加し細胞質では逆に減少している。Carneiro and Leblond⁴⁾, Zetterberg⁵⁾等によると蛋白合成能は核, 細胞質に独自に存在し, さらに核と細胞質の間を移動する蛋白が存在するといわれるが, 今回は特に時間を細分して実験を行っていないので, はっきりとした事はわからないが, おそらく移動による変化か,

或いは食餌による影響がこの場合に現われてきたのではないかと考えられる。図6は十二指腸上皮での因子Aの信頼限界を示したものであるが, 因子Aの有意差はこの図により給食と絶食のちがいでではなく, アミノ酸の種類によって生じたものと考えられる。胃旁細胞と十二指腸上皮細胞でのアミノ酸の取り込みをみると, tryptophan, leucine ともにお互いに逆の傾向を示している。

すなわち tryptophan と leucine との取り込みは同一組織でもちがいがあり, 異なった組織ではまたその取り込みの様子がちがってくるように推察される。Stenram 等⁶⁾の leucine と methionine による報告によると標識アミノ酸の種類でその取り込みの様相は異なっているといわれる。

しかしながら今回の研究では種々の因子が考えられ, 各々を独立に取り出すことが出来なかったので, はっきりとした推論を下すことが出来ず, これらの点は今後の研究にまきたい。

胃旁細胞と十二指腸上皮細胞のRNA合成に関する名和⁷⁾の報告によると胃旁細胞では1核細胞よりも2核細胞でのRNA合成が盛んであること, 経時的には陰窩細胞が絨毛側へ移行していることを報告しているが, 本実験ではこの移行はみられなかった。

結 論

胃旁細胞の tryptophan と leucine の取り込みをみると1核細胞よりも2核細胞の方が各群ともに多く, 2核細胞の方が蛋白合成が盛んであることを示している。

絶食群と給食群を比較すると tryptophan は給食で増加し, 逆に leucine は減少している。

十二指腸上皮細胞では絨毛2核細胞, 絨毛1核細胞, 陰窩1核細胞の三種に分類して銀粒子の取り込みをみると tryptophan, leucine ともに絨毛2核細胞>絨毛1核細胞>陰窩1核細胞の順で, 経時的には胃旁細胞と逆の結果を示し, 給食群では絶食群にくらべて tryptophan が減少し leucine が増加している。すなわち同一組織でも tryptophan と leucine の取り込みの傾向が異なり, 胃旁細胞と十二指腸上皮とではまた取り込みの様相が異なるものと推察される。

総 括

胃旁細胞と十二指腸上皮細胞の1核細胞と2核細胞の蛋白合成を比較検討するために, 体重15~20gのマウス(雌)に, それぞれ100 $\mu\text{c/gm}$ の $^3\text{H-DL-tryptophan}$ または $^3\text{H-DL-leucine}$ を腹腔内に注射し

た。I群は給食後24時間、注射後1時間30分に、II群は給食後1時間、注射後1時間30分に、III群は給食後4時間、注射後4時間30分に殺し、各々分離標本とし、ラジオ・オートグラフィーを行なった。各々の群とも1核細胞10個、2核細胞10個を無作為的に選び、核と細胞質の銀粒子を算えた。

胃旁細胞の tryptophan と leucine の取り込みをみると2核細胞の方が1核細胞よりも多く、核よりも細胞質での取り込みが多くなっている。経時的には leucine の取り込みが減少し tryptophan の取り込みが増加する傾向にある。

十二指腸上皮細胞では、絨毛1核細胞、絨毛2核細胞、陰窩1核細胞の三種に分類しその取り込みをみると tryptophan, leucine とともに絨毛2核細胞>絨毛1核細胞>陰窩1核細胞の順であった。経時的には胃旁細胞と逆の関係にあり、leucine が増加し、tryptophan が減少の傾向を示す。

すなわち細胞の蛋白合成能は組織の種類によって異なり、同じ組織でもアミノ酸の種類によって異なるのではないかと考えられる。

終りに臨み、本研究に指導と校閲を賜った尾持昌次教授、永田哲士助教授、推計学上の御教示をいただいた本学衛生学教室広沢毅一講師に深甚な謝意を表します。

本文の要旨は昭和41年8月24日第71回日本解剖学会総会(神戸)において発表した。

文 献

- 1) Nagata, T., Shibata, O. and Omochi, S.: A New Method for Radioautographic Observation on Isolated Cells, *Histochemie*, 2: 255, 1961
- 2) 永田哲士・柴田 治・名和橙黄雄: ラジオオートグラフ多量作製のための簡便法, *解剖誌*, 42: 162, 1967
- 3) 川端 潔: 胃腺基底明細細胞のオートラジオグラフィによる研究, *日組録*, 28: 274, 1967
- 4) Carneiro, J. and Leblond, C. P.: Continuous Protein Synthesis in Nuclei, shown by Radioautography with ^3H -Labeled Amino Acids, *Science*, 129: 391, 1959
- 5) Zetterberg, A.: Protein Migration between Cytoplasm and Cell Nucleus during Interphase in Mouse Fibroblast in Vitro, *Exp. Cell Res.*, 43: 526, 1966
- 6) Stenram, U. and Hirschman, R.: Radioautographic Studies of the Protein Synthesis in

Rat during Protein Deprivation and Starvation, *Acta anat.*, 61: 445, 1965

- 7) 名和橙黄雄: 給食後のマウス胃旁細胞と十二指腸上皮細胞のRNA合成に関するラジオ・オートグラフィ的研究, ことに2核細胞について, *信州医誌*, 16: 88, 1967

ABSTRACT

An investigation was carried out to study the difference of protein synthesis between the binucleate and mononucleate cells of both the stomach and the duodenum. Mice were injected with either ^3H -DL-tryptophan or ^3H -DL-leucine intraperitoneally in a dose of 1.5 mc/g body weight.

The first group (I) was sacrificed at 1½ hour after injection and 24 hours after feeding. The second group (II) was sacrificed at 1½ hour after injection and 1 hour after feeding. The third group (III) was sacrificed at 4½ hours after injection and 4 hours after feeding.

The stomachs and duodena were taken out, isolated and radioautographed according to the method of Nagata et al. The emulsion used in the present study was Sakura NR-M1 for dipping method which was exposed for 62 days.

In the parietal cells of the stomach, the incorporations of both ^3H -DL-tryptophan and ^3H -DL-leucine were greater in the binucleate cells than in the mononucleate cells.

In the duodenal epithelial cells, the cells were classified in to three types; mononucleate villus cell, binucleate villus cell, mononucleate crypt cell. The incorporations of both ^3H -DL-tryptophan and ^3H -DL-leucine were high in the following descending order: mononucleate crypt cell, mononucleate villus cell, binucleate villus cell. The incorporations of both the labeled amino acids in the parietal cells or the duodenal epithelial cells were higher in the cytoplasm than in the nucleus, but the mode of incorporations of the both labeled amino acids were different between the two tissues.

From these result, it should be concluded that the protein synthesis were greater in binucleate cells comparing with mononucleate cells.

PLATE 1**EXPLANATION OF FIGURES**

All the figures are photomicrographs from the isolated cells of the stomachs and the duodenum of mice after the injection of ^3H -DL-tryptophan or ^3H -DL-leucine.

7. A labeled mononucleate parietal cell from an animal sacrificed $1\frac{1}{2}$ hours after the injection of ^3H -DL-tryptophane and 24 hours after feeding. $\times 1270$
8. A labeled binucleate parietal cell from the same animal as in Fig. 7. $\times 1270$
9. A labeled mononucleate parietal cell from an animal sacrificed $1\frac{1}{2}$ hours after the injection of ^3H -DL-leucine and 24 hours after feeding. $\times 1270$
10. A labeled binucleate parietal cell from the same animal as in Fig. 9. $\times 1270$
11. A labeled mononucleate villus cell (V) and crypt cell (C) of the duodenal epithelium from an animal sacrificed $1\frac{1}{2}$ hours after injection of ^3H -DL-tryptophan and 24 hours after feeding. $\times 1270$
12. A labeled binucleate cell from the same animal as in Fig. 11. $\times 1270$

13. A labeled mononucleate villus cell (V) and crypt cell (C) of the duodenal epithelium from an animal sacrificed $1\frac{1}{2}$ hours after the injection of ^3H -DL-leucine and 24 hours after feeding. $\times 1270$
14. A labeled binucleate cell from the same animal as in Fig. 13. $\times 1270$

PLATE 2**EXPLANATION OF FIGURES**

All the figures are photomicrographs from the sections of the stomachs and the duodenum of mice after the injection of ^3H -DL-tryptophan or ^3H -DL-leucine.

15. A section of the stomach from an animal sacrificed $4\frac{1}{2}$ hours after the injection of ^3H -DL-tryptophan and 4 hours after feeding. $\times 870$
16. A section of the stomach from an animal sacrificed $4\frac{1}{2}$ hours after the injection ^3H -DL-leucine and 4 hours after feeding. $\times 870$
17. A section of the duodenum from the same animal as in Fig. 15. $\times 870$
18. A section of the duodenum from the same animal as in Fig. 16. $\times 870$

PLATE I

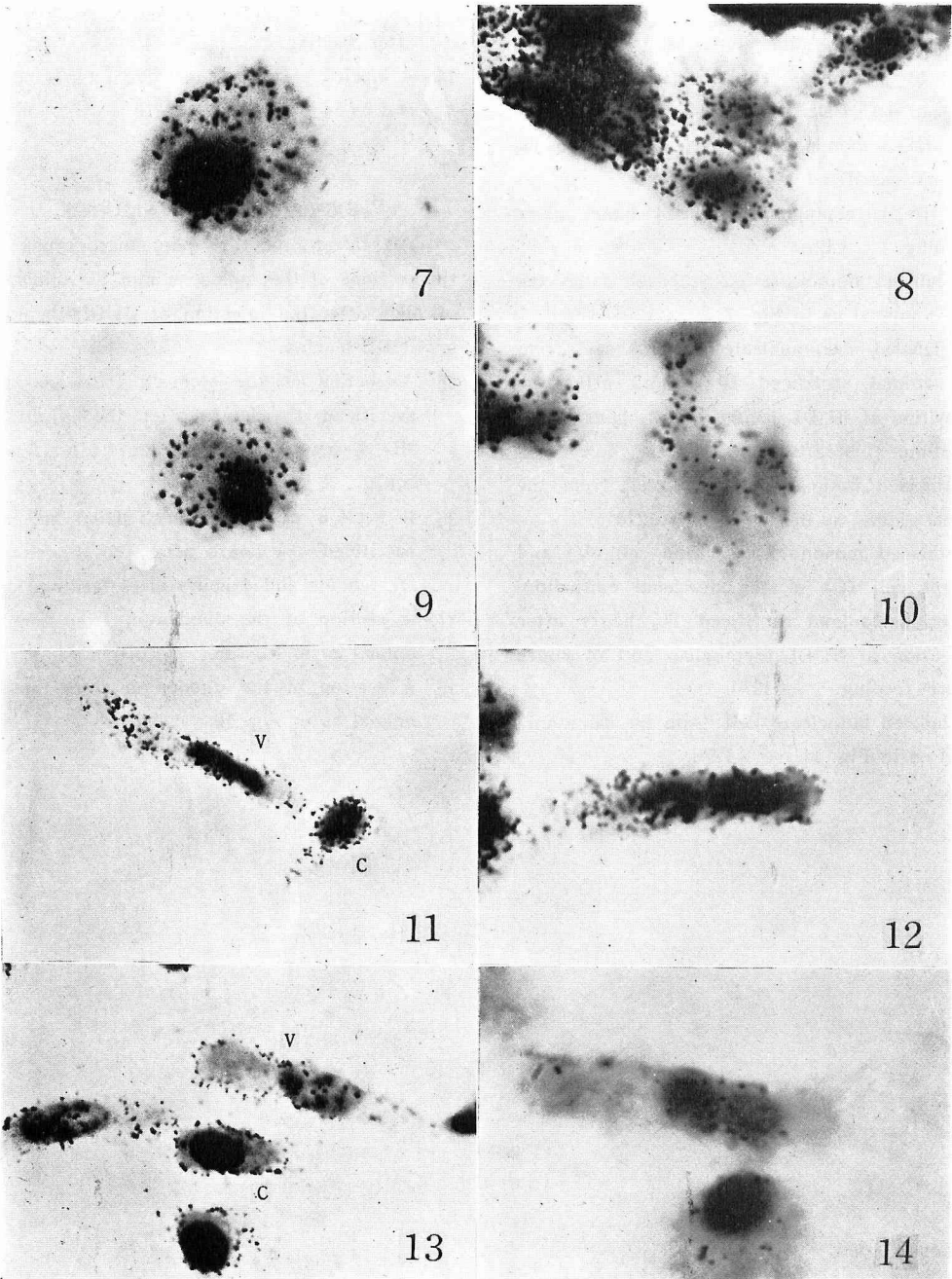


PLATE II

