

給食後のマウス膵臓細胞と回腸上皮細胞のRNA合成の ラジオオートグラフ的研究, 特に2核細胞について

昭和42年10月4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)

柴 田 治

A Radioautographic Study on the RNA Synthesis in the
Pancreatic Acinar and the Ileum Epithelial Cells of Mice
after Feeding, with Special Reference to Binucleate Cells

Osamu SHIBATA

First Department of Anatomy, Shinshu University

(Director: Prof. Sh. Omochi)

多くの腺あるいは消化管上皮の細胞でしばしば観察される2核細胞は, 1核細胞が細胞質の分裂を伴わない無糸核分裂を行なうことによってつくられたもので, このような2核細胞は細胞機能の昂進時に増加することが認められている^{①②③④}。このことから, 腺あるいは消化管上皮における2核細胞の出現は, 分泌物の生成とその分泌活動, あるいは栄養分吸収と関係があるものと考えられる。

このような1核細胞と2核細胞の代謝機能の量的な違いについては, Nagata^⑤は肝臓で, 柴田^⑥は膵臓でDNAの放射性前駆物質を用いたラジオオートグラフによって, 物質代謝の鍵であると思われるDNAの合成について報告している。それによると, 2核細胞は1核細胞よりDNA前駆物質の取込みが多いという。Nagata^⑦, Nagata と Nawa^⑧はさらにDNA代謝に依存し, 蛋白質代謝とも密接な関係をもつことが知られているRNA代謝においても全く同様の結果を報告している。

ここでは, 膵臓と回腸上皮の1核細胞と2核細胞におけるRNA前駆物質の取込みについて得られた結果を報告する。

材料と方法

体重15gの雄のマウス25匹を実験に用いた。これらのマウスには, 完全栄養の人工食を午前10時から10時30分までの30分間だけ与えて馴育した。水は自由に与えた。1週間後に, RNAの放射性前駆物質として³H-uridineの20 μ c/g. body weightを午前9時に皮下注射し, その後午前10時から10時30分までは通常の如くに給餌した。マウスはその後5匹ずつ5群に分け経時的に殺した。各実験群の時間条件は次のごとく

であった。実験群1: 注射後2時間(食後では1時間, 午前11時), 実験群2: 注射後4時間(食後では3時間, 午後1時), 実験群3: 注射後8時間(食後では7時間, 午後5時), 実験群4: 注射後24時間(食後では23時間, 翌日午前9時), 実験群5: 注射後28時間(翌日定時に再給食後3時間, 翌日午後1時)。第5群は実験の途中で3匹が死んでしまったため, 実際に実験に用いたのは2匹であった。

マウスはすべて電気ショックで麻酔して直ちに開腹し, 膵臓と回腸を切り出して細切した後にRanvier 1/8アルコールに投入した。これ以後, 細胞分離永久標本のラジオオートグラフ作製の過程はNagata等の方法^⑨によった。ラジオオートグラフ作製はストリップ法によったが, そのためのストリップ用乾板は富士ET-2Eを用いた。露出は55日間行ない, 現像は指定処法(FD-111)によった。分離標本の作製と同時に組織の一部を10%ホルマリンで固定し, パラフィン包埋後5 μ の切片とした後ラジオオートグラフを作製した。分離標本, 切片標本いずれの場合も, ヘマトキシリン・エオジンで染色をした。またラジオオートグラフィの前に各標本1枚ずつをAmanoの方法^⑩によりDNaseおよびRNaseで処理をした。

こうして得られたそれぞれの組織の分離標本のラジオオートグラフで, 各実験群の各個体から, 1核細胞と2核細胞を各々10個ずつ無作為に選び, 細胞を標識した銀粒子数を数えた。なお, 回腸の場合には, 1核細胞をさらに絨毛細胞と腸陰窩細胞とに区別して, 各々の細胞10個ずつについて銀粒子数を計測した。得られた数値はすべて推計学的に処理をして, 差の有意性を検定した。

結 果

RNase 処理をした標本ではすべての動物で銀粒子が認められなかったが、DNase 処理の標本は無処置のものとの差がなかった。

一般に、細胞を標識した銀粒子はRNA前駆物質注射後の時間が早い程、細胞質よりも核に多かったが、時間の経過につれて銀粒子は細胞質に多くみられるようになり、核と細胞質の間に量的な差はみられなくなった (Fig. 3, 4, 5)。

膵臓について各個体毎に得られた結果は Table 1 に示し、これらの平均値によってあらわされた各実験群間の時間的変動は Fig. 1 に示した。Fig. 1 から明らかなように、一般に細胞1個当たりの銀粒子数は³H-uridine 注射後の時間に伴って増加し、注射後24時間で最大となり、28時間には減少した。このような標識銀粒子数の変動は、1核細胞、2核細胞ともに全く同一の経過をたどったが、注射後2時間の群を除いてすべての場合に、2核細胞は1核細胞より常に多くの銀粒子によって標識されていた。殊に、銀粒子数が最大となった注射後24時間の群において、その差は顕著であった。

このような銀粒子数の違いを、注射後の時間と細胞の核の数とに関して推計学的に検定した結果を Table

Table 1. Grain counts on the basis of 10 mononucleate and 10 binucleate cells in the pancreatic acinar cells of the mice injected with tritium labelled uridine.

experimental animal group	number	nuclearity	
		mononucleate	binucleate
1	1	0.5 ± 1.5	0.3 ± 0.9
	2	3.7 ± 4.2	4.0 ± 5.4
	3	2.0 ± 2.7	0.6 ± 1.8
	4	0	0
	5	0	0.9 ± 1.8
2	1	0.3 ± 0.9	0
	2	9.2 ± 2.9	9.7 ± 3.3
	3	10.2 ± 5.0	12.4 ± 5.3
	4	11.2 ± 3.5	13.6 ± 4.3
	5	23.4 ± 11.1	28.1 ± 7.1
3	1	21.8 ± 8.0	30.7 ± 14.7
	2	14.7 ± 7.6	15.0 ± 4.9
	3	17.8 ± 4.8	20.2 ± 5.6
	4	28.6 ± 9.4	40.0 ± 17.8
	5	19.7 ± 6.4	27.6 ± 6.3
4	1	42.0 ± 12.1	66.4 ± 15.6
	2	8.7 ± 7.5	12.0 ± 5.4
	3	27.5 ± 8.4	38.7 ± 8.8
	4	33.1 ± 12.9	41.7 ± 16.3
	5	34.5 ± 8.9	43.0 ± 9.8
5	1	17.1 ± 5.6	27.2 ± 2.8
	2	10.4 ± 5.5	13.2 ± 6.4

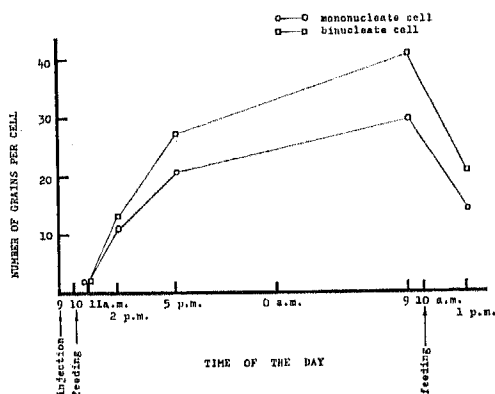


Fig. 1. Transition of the mean grain counts in the pancreatic acinar cells of mice after the injection of ³H-uridine.

Table 2-A. Factorial design of the date listed in Table 1.

	SS	DF	Ms
G	59940.56	4-1=3	19980.15**
I (G)	28134.09	4 × (5-1)=16	1758.38**
N	1844.70	2-1=1	1844.70
R (N)	10563.85	2 × (10-1)=18	586.88
G × N	3122.74	(4-1)(2-1)=3	1040.91*
E	122024.36	358	340.85
Total	225630.30	400-1=399	

Table 2-B. Factorial design of N factor when the group 1 was omitted from the data listed in Table 1.

	SS	DF	Ms
N	2482.57	1	2482.57*
R (N)	6437.40	18	357.63

G: Experimental group; experiment 1, 2, 3 and 4.

N: Nuclearity; mononucleate and binucleate cells.

** : Stochastically significant in 1% level of significance.

* : Stochastically significant in 5% level of significance.

2-Aに示した。これらの結果は、各実験群の銀粒子数の変動が1%の危険率で有意であることを示している。しかし、1核細胞と2核細胞の間には有意差はなかった。そこで、注射後2時間の群を省き、他の群について検定を行なったところ、1核細胞と2核細胞を標識した銀粒子数の差は5%の危険率で有意となった (Table 2-B)。したがって、³H-uridine 注射後2時

Table 3. Grain counts on the basis of 10 mononucleate and 10 binucleate cells in the ileum epithelial cells of the mice injected with rritium labelled uridine.

experimental group	animal number	nuclearity		
		mononucleate		binucleate
		crypt cells	villus cells	
1	1	10.8 ± 5.0	5.8 ± 4.3	13.8 ± 5.8
	2	9.9 ± 5.1	6.0 ± 2.6	
	3	14.9	4.3	
	4	5.0	3.2	
	5	14.8	4.1	
2	1	2.6	1.7	10.2 ± 6.4
	2	11.7 ± 7.2	1.6 ± 2.4	
	3	13.1 ± 4.8	4.0 ± 2.0	
	4	15.3	3.1	
	5	14.4	4.7	
3	1	31.0 ± 13.7	3.3 ± 2.1	14.5 ± 2.9
	2	31.3 ± 14.1	4.7 ± 1.9	
	3	36.9	8.5	
	4	22.4	5.5	
	5	29.7	6.1	
4	1	38.8 ± 7.9	15.0 ± 5.0	28.2 ± 5.9
	2	41.0	15.3	
	3	32.9 ± 9.0	18.7 ± 8.0	
	4	36.7	20.1	
	5	31.9	24.1	
5	1	25.9 ± 9.7	27.1 ± 7.5	25.3 ± 5.3
	2	26.4 ± 6.9	20.4 ± 6.2	

Table 4. Factorial design of the date listed in Table 3.

	SS	DF	Ms
G	11907.65	5-1=4	2976.92**
I(G)	118.25	5×(2-1)=5	23.65
N	3104.72	2-1=1	3104.72*
R(N)	608.48	18	33.80
G×N	15372.40	(5-1)(2-1)=4	3843.10**
E	32560.50	167	194.97

Total 63372.00 200-1=199

G : Experimental group; experiment 1, 2, 3, 4 and 5.

N : Nuclearity; mononucleate and binucleate cells.

** : Stochastically significant in 1% level of significance.

* : Stochastically significant in 5% level of significance.

間以後では、2核細胞は1核細胞より多くの ³H-uridine を取込んだことを示している。

回腸上皮細胞を分離した標本では、形態学的に2種類の細胞が区別しうる (Fig. 6)。すなわち、細胞の外形は三角形状で、やや円形の核をもった腸陰窩の細胞と、長方形の細胞質に長円形の核をもった絨毛上皮細胞とである。また、2核細胞はこれら2種類の上皮細胞

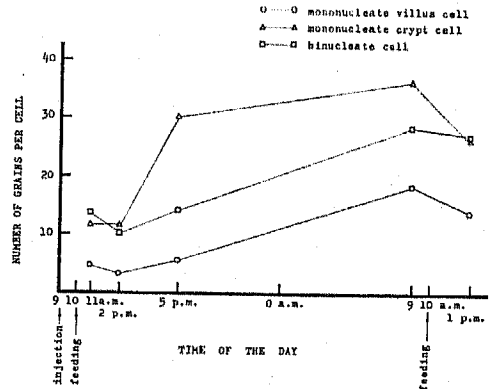


Fig. 2. Transition of the mean grain counts in the ileum epithelial cells of mice after the injection of ³H-uridine.

胞のうち、絨毛細胞にのみみられた。したがって、回腸に関しては、絨毛上皮細胞では1核細胞と2核細胞を、腸陰窩細胞では1核細胞を、各々10個ずつ観察した。

1細胞当たりの標識した銀粒子数を、各実験群で個体別に計測した結果は Table 3 に示し、実験群毎に平均値であらわした経過時間との関係は Fig. 2 に示した。

一般に、消化管上皮における2核細胞の出現頻度は非常に低い。それ故、各群5個体中から無作為に2個

体を選び、これらについて2核細胞10個を観察した。したがって、Table 4に示した推計学的処理に用いた全動物数は10個体であった。なお、2核細胞はすべて絨毛細胞に属するから、相互に比較した1核細胞もまた、絨毛のものであった。

経過時間に伴う銀粒子数の変動は全体として脾細胞のそれに似ていた。すなわち、1核細胞、2核細胞を含めた絨毛細胞では、 ^3H -uridine 注射後4時間で銀粒子数が僅かに減少したとはいえ、それ以後24時間までは腸陰窩細胞と同様に銀粒子数は増加し (Fig. 7, 8), 28時間後に再び減少した。

このような時間的変動を通じて、2核細胞の銀粒子数は常に1核細胞より多く、推計学的にもその差は5%の危険率で有意であった (Table 4)。

考 察

消化器系の種々の腺組織にはかなりの頻度で2核細胞が見出されるが、Nagata 等^{①②③}、Omochi^④はこれら2核細胞の意義について研究し、2核細胞の出現は細胞機能の昂進することと関係があると結論している。この場合、昂進された細胞機能としては、消化腺組織では消化液の生成とこれの分泌であり、消化管上皮では、主としてこれによって消化された食餌の吸収にあると思われる。しかし、実際に1核細胞と2核細胞の機能を量的に比較した報告は、最近までほとんどみられなかった。Nagata と Nawa^⑤は組織培養した鶏胚の線維芽細胞で、Nagata^⑥はマウスの肝臓と空腸上皮の細胞で、蛋白質代謝と殊に密接な関係をもつ RNA の前駆物質 ^3H -uridine の取込みを調べたが、いずれの場合にも、2核細胞の方が1核細胞より多くの ^3H -uridine を取込むことをみた。ここに報告したマウスの脾臓と回腸上皮の細胞で得られた結果は、経時的には器官特異性を示すと思われる違いがみられたとはいえ、上記の各研究者の結論と全く一致している。すなわち、脾臓、回腸上皮ともに、2核細胞の方が1核細胞より ^3H -uridine の取込みは有意に多かった。これは1核細胞より2核細胞の方がRNA合成に関する活性度が高いことを示すものであり、このことはまた、細胞機能と直接結びつく蛋白質代謝の高まりを暗示するものと思われる。

脾臓において、 ^3H -uridine 注射後2時間では、1核細胞と2核細胞の間にRNA合成能に差はないが、注射から4時間以後ではその差は有意となり、さらに経過時間につれてその差は一層顕著となった。1核細胞と2核細胞のRNA合成に有意差の生じ始める時期は、給食後の時間よりみれば、食物が12指腸付近を通

過しつつある時刻である。したがって、ここで生じた差は、食物の通過に伴う脾液の分泌と、分泌後の脾液補充のためのこれの生成に関連して生じたものと思われる。それ以後翌日の消化活動までは脾液分泌のための刺激もなく、脾液の一時的な貯溜のみで、急激なRNA代謝を必要とするとは思われない。それ故、この脾液の貯溜期を通じて1核細胞と2核細胞の活性度の差が積算された結果、両細胞を標識した銀粒子数の再給食直前における著しい差となったものであろう。これによって、翌日の再給食後3時間で放射性のRNAが両種の細胞で減少したことも理解出来る。

回腸では、注射後1時間の実験群を除く他のすべての実験群で、銀粒子数は1核細胞、2核細胞、腸陰窩細胞の順に多くなり、ここでも1核細胞と2核細胞のRNA合成能に量的な差があることが示された。

経過時間に伴う銀粒子数の変動から、腸陰窩細胞が最も多く銀粒子をもつようになるのは、 ^3H -uridine 注射後8時間から24時間の間と思われる。1核細胞、2核細胞では注射後24時間前後と思われる。最大銀粒子数をもつまでのこの時間的なずれは、腸陰窩細胞が絨毛上皮に移動してゆくのに必要な時間と思われる (Fig. 7, 8)。

注射後2時間から4時間にかけて1核細胞と2核細胞を標識した銀粒子数が僅かに減少し、RNAの合成に比べて分解の強まりを予測させるような経過を示したが、このことが何等かの生理的意義があるのかあるいは個体差等によるものなのかはわからない。

要 約

^3H -uridine を注射したマウスの脾臓と回腸上皮の細胞の分離標本からラジオオートグラフをつくり、主として、1核細胞と2核細胞のRNA合成を調べた。

脾臓では、細胞を標識した銀粒子数は ^3H -uridine 注射後2時間から24時間まで増加したが、28時間後には減少した。この変動を通じて、2核細胞は常に1核細胞より多くの銀粒子によって標識され、2核細胞の方がRNA合成はより盛んであることを示した。

回腸上皮の絨毛細胞では ^3H -uridine 注射後4時間で細胞を標識した銀粒子数は一旦減少したが、後再び増加し、24時間で最大値に達した。絨毛細胞に属する2核細胞は、常に1核細胞より多量の ^3H -uridine を取込んだ。腸陰窩細胞はこれら絨毛上皮の1核細胞、2核細胞よりもRNA合成は盛んであった。

最後に、御指導と御校閲をたまわった尾持昌次教授ならびに永田哲士助教授に深く感謝します。

文 献

- ①Nagata, T., Shimamura, K., Onozawa, M., Kondo, T., Okubo, M. and Momozé, S.: Relationship of binuclearity to cell function in some organs. I. Frequencies of binucleate cells in some organs of toads in summer and in winter, *Med. J. Shinshu Univ.*, **5**: 147-152, 1960
- ②Nagata, T., Shimamura, K., Kondo, T., Onozawa, M., Momozé, S. and Okubo, M.: Relationship of binuclearity to cell function in some organs. II. Variation of the frequencies of binucleate cells in some organs of dogs owing to aging, *Med. J. Shinshu Univ.*, **5**: 153-158, 1960
- ③Nagata, T., Shimamura, K. et Okubo, M.: Effets du régime alimentaire sur l'aspect des cellules binucleées dans le pancréas et l'estomach du rat, *Rev. Franc. d'Etudes clin. Biol.*, **5**: 714-718, 1960
- ④Omochi, Sh.: Über das Verhältnis zwischen der Amitose und der Zellfunktion, *Med. J. Shinshu Univ.*, **6**: 163-170, 1961
- ⑤Nagata, T.: A radioautographic study of the DNA synthesis in rat liver, with special reference to binucleate cells, *Med. J. Shinshu Univ.*, **7**: 17-25, 1962
- ⑥柴田治: ラット肝細胞におけるDNA合成のオートラジオグラフによる研究, 特に無糸核分裂細胞と2核細胞について, *信州医誌*, **15**: 497-502, 1966
- ⑦Nagata, T.: A radioautographic study on the RNA synthesis in the hepatic and the intestinal epithelial cells of mice after feeding, with special reference to binuclearity, *Med. J. Shinshu Univ.*, **11**: 49-61, 1966
- ⑧Nagata, T. and Nawa, T.: A radioautographic study on the nucleic acids syntheses of binucleate cells in cultivated fibroblasts of chick embryos, *Med. J. Shinshu Univ.*, **11**: 1-5, 1966
- ⑨Nagata, T., Shibata, O. and Omochi, Sh.: A new method for radioautographic observation on isolated cells, *Histochemie*, **2**: 255-259, 1961
- ⑩Amano, M.: Improved technique for the enzymatic extraction of nucleic acids from tissue sections, *J. Histochem. Cytochem.*, **10**: 204-212, 1960

ABSTRACT

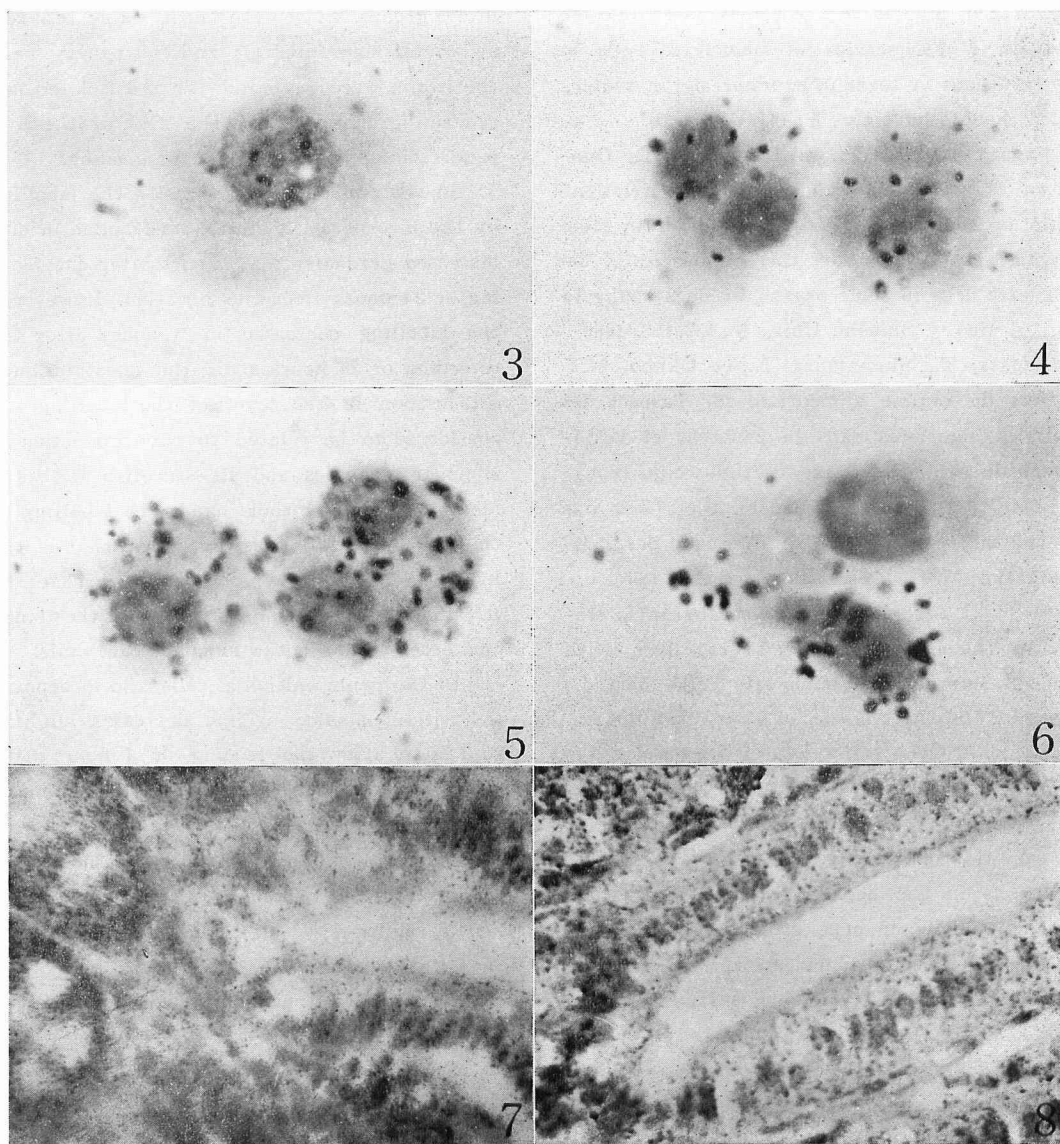
Tritium labelled uridine was injected subcutaneously into the mice, which were divided into 5 groups. They were sacrificed successively at several hour intervals and the pancreas and the ileum were prepared for the isolated cell radioautographs to study the RNA synthesis of pancreatic and ileum cells after feeding.

In the pancreatic acinar cells, the labelling by the incorporation of tritium labelled uridine increased gradually to 23 hours after the feeding or 24 hours after the injection. However, the labelling decreased in 3 hours after the refeeding or 28 hours after the injection. Such a transition in the level of the labelling was considered to be related to the production of zymogen granules and its secretion with the feeding. On the other hand, the labelling of the binucleate cells was more than that of the mononucleate cells, which suggested that the RNA synthesis was more active in the binucleate cells than in the mononucleate cells.

In the ileum epithelial cells, the incorporated tritium labelled uridine decreased slightly to 3 hours after the feeding or 4 hours after the injection, and then increased gradually making a peak at 23 hours after the feeding or 24 hours after the injection. Throughout such a transition, the binucleate villus cells always kept a higher level of the RNA incorporation than the mononucleate villus cells. The crypt cells in the ileum epithelium were more active than the villus cells in the RNA synthesis.

From these results in both the tissues, it is concluded that the RNA synthesis of the binucleate cells is more active than that of the mononucleate cells.

PLATE



PLATE

EXPLANATION OF PLATE

All the figures were photomicrographed from radioautographs of isolated cells or sections of the pancreases and the ileums of the mice sacrificed at various time intervals after the injection of ^3H -uridine.

EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 3. A labelled mononucleate cell of the pancreatic acinus of the mouse sacrificed 2 hours after ^3H -uridine injection. $\times 2300$. The nucleus alone is scarcely labelled.

Fig. 4. A labelled binucleate cell (left) and a labelled mononucleate cell (right) of the pancreas of the mouse sacrificed 4 hours after giving ^3H -uridine. $\times 2200$. Labelling is found both in the nucleus and the cytoplasm.

Fig. 5. A labelled mononucleate cell (left) and a labelled binucleate cell (right) of the

pancreatic acinus of the mouse sacrificed 24 hours after ^3H -uridine injection. $\times 2200$. Both the cells are intensely labelled.

Fig. 6. A labelled mononucleate villus cell (top) and a labelled crypt cell (bottom) of the ileac epithelium of the mouse sacrificed 8 hours after ^3H -uridine injection. $\times 2400$. The villus cell is scarcely labelled, while the crypt cell is intensely labelled.

Fig. 7. Ileac epithelium of a section from the mouse sacrificed 2 hours after ^3H -uridine injection. $\times 520$. Labelling is intenser in the crypt at the left than in the villus at the right.

Fig. 8. Ileac epithelium of a section from the mouse sacrificed 24 hours after ^3H -uridine injection. $\times 500$. The villus epithelial cells are more intensely labelled in comparison with those in Fig. 5.