

# 顕微分光測光法による肝細胞核 DNA 量の年令的変動, ことに二核細胞との関係について

昭和42年3月9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 澄 黄 雄

A microspectrophotometrical study on the variation of DNA contents in rat hepatic cell nuclei during the postnatal growth, with special reference to binucleate cells.

Tokio Nawa

The First Department of Anatomy, Shinshu University  
(Director: Prof. Sh. Omochi)

顕微分光々度計 (MSP) は細胞内の各構成々分の検索のために Caspersson<sup>①</sup> によつて作製されて以来今日までその応用範囲は単に生物学の領域に止まらず、他の科学領域をも含めて、有力な研究手段として広く発展して来た。特に DNA 量に関する研究はめざましく数多くの報告がみられる<sup>②③</sup>。

しかしながら MSP による二核細胞についての研究報告はほとんどみられていない<sup>④⑤</sup>。

一般に二核細胞は Feulgen 染色した場合組織切片では一核細胞との判別が非常にむずかしく、なおかつ組織切片にすると細胞核が切断され全量を正確に把握するには複雑な計算を必要とする。これらの不利な点を排除する最も簡単な方法は細胞をバラバラにして血液のように塗抹した状態で観察できればよい訳で、著者は尾持等<sup>⑥</sup> によつて創案された細胞分離永久標本作製法を永田<sup>④</sup> が Feulgen 反応用に改良した方法を用いて、二核細胞についての一連の研究の一つとして、今回は同腹ラットを用いて生後7日から400日にわたつて成長にとまらぬ肝臓の二核細胞と一核細胞との DNA 量の変化を二波長法を用いて測定した結果を報告する。

## 材料および方法

同腹ラット 10 匹を用いて生後7日 (体重10g), 14日 (20g), 17日 (30g), 27日 (40g), 37日 (50g), 47日 (80g), 67日 (150g), 97日 (200g), 200日 (260g), 400日 (360g) に各々を殺し直ちに肝臓内側右葉の一部を取り 0.25M Sucrose を入れた等張 1/8 アルコールに浸漬し1時間ほど放置する。これを信大式細胞振とう分離機にかけて細胞を分離し細

胞分離永久標本作製法にしたがい、厚さ0.17mmのカバーガラスに塗抹し Carnoy 液で固定 (10分間) する。Feulgen 染色は次の順序で行なう。

1. 塗抹標本を固定液からアルコール列を下降して水まで持つてくる。
2. 30~40°C の 1N-HCl に1分間入れる。(塗抹組織の脱落をふせぐ)
3. 60°C の 1N-HCl 10分間加水分解する。
4. 30~40°C の 1N HCl に1分間入れる。
5. 水洗 (蒸留水を数度交換して) 10分間
6. Feulgen 染色液にて4時間反応<sup>⑦</sup>
7. 洗浄液にて3回計15分間
8. 流水で水洗する (10~20分間)
9. 0.1% ライトグリーン70% アルコール液で細胞質染色 (必要に応じて)
10. アルコール列上昇して脱水する
11. 0.17mm カバーガラスを用いてピオライト (応研) で封入する

上記のようにピオライトで封入した標本は Feulgen-DNA 色素が数ヶ月保持される。このようにしてできた標本をオリンパス顕微分光々度計 (MSP-AIV) で可視光で二波長法を用いて計測し、核1個当たりの DNA 相対量を Mendelsohn<sup>⑧</sup> の表より求めた。計測した細胞数は1標本につき1核細胞50個, 2核細胞25個である。

## 実験成績

Table 1 は各成長期における細胞1000個中の二核細胞数であるが、胎児から生後17日までは二核細胞数が少なく、生後27日に急激な増加を示しながら成熟す

Table 1. Frequencies of mononucleate and binucleate cells in the hepatic cells of albino rats during the postnatal growth on the basis of 1000 cells

Days after birth	Body weight	Mono-nucleate cell	Bi-nucleate cell	Ratio M/B
7	10g	994	6	0.6
14	20g	963	37	3.8
17	30g	947	53	5.6
27	40g	717	283	39.5
37	50g	825	175	21.2
47	80g	864	136	15.7
67	150g	859	141	16.5
97	200g	865	135	15.6
200	260g	846	154	18.2
400	360g	854	146	17.1

Table 2. Mean amount of DNA in each nucleus of mononucleate and binucleate hepatic cells.

Days after birth	Body weight	Mono-nucleate cell	Bi-nucleate cell	Ratio B/M
7	10g	365	367	100.5
14	20g	349	369	105.7
17	30g	315	300	95.2
27	40g	240	308	128.3
37	50g	345	342	99.1
47	80g	359	366	101.9
67	150g	329	274	83.3
97	200g	342	329	96.2
200	260g	297	310	104.3
400	360g	386	380	98.4

るにしたがいほぼ15~18%内に一定化する傾向がみられる。この表の  $\chi^2$ -検定は  $\chi^2_{N \times T} = 46225.2634 > \chi^2_p(0.005) = 23.59$  となり1核細胞と2核細胞、成長期の間有意の差がみられる。

Table 2 は各成長期における、2核細胞25個、1核細胞50個のDNA量である。

要因分析表(表3)によると1核細胞と2核細胞との1核あたりのDNA量には有意の差がみられない。従つて1細胞あたりのDNA量は2核細胞では1核細胞の約2倍といふことができる。T(生後日数)についての変動をみると明らかに1%の危険率で有意である。このことから肝細胞DNA量は出生後の日数で変動することが有意であるといえる。N×Tの交互作用は5%の危険率で有意である。この事は2核細胞と1核細胞の1核あたりのDNA量は生後日数によつて変動することを示すものであり、すなわち差のある時もあり、差のない時もあるということである一定の傾向を示さないものと考えられる。

Table 3. Factorial design of Table 2.

Factor	SS	DF	MS
N	187	1	187
T	1106280	9	122920**
N×T	248872	9	27652*
R(NT)	12685695	980	12944
NRT	14041034	999	

Abbreviation

N: Nuclear type

T: Days after birth

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

\* : 5% level

Table 4. Amount of DNA in each nucleus of mononucleate and binucleate hepatic cells as was classified by the ploidy classes.

P \ T \ N	7		14		17		27		37		47		67		97		200		400		
	M	B	M	B	M	B	M	B	M	B	M	B	M	B	M	B	M	B	M	B	
Diploid range	13	14	16	24	11	36	21	14	27	31	35	35	14	21	9	13	7	11	4	8	364
Triploid range	16	13	10	9	17	8	9	12	7	5	4	6	18	10	14	8	16	12	12	13	218
Tetraploid range	18	16	18	13	17	6	16	17	16	14	11	9	18	15	20	23	20	19	26	22	334
Over tetraploid	3	8	6	4	5	0	4	7	0	0	0	0	0	4	7	6	7	8	8	7	84
	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	1000

Abbreviation to the table  
P: Ploidy

T: Days after birth  
M: Mononucleate cell

N: Nuclear type  
B: Binucleate cell

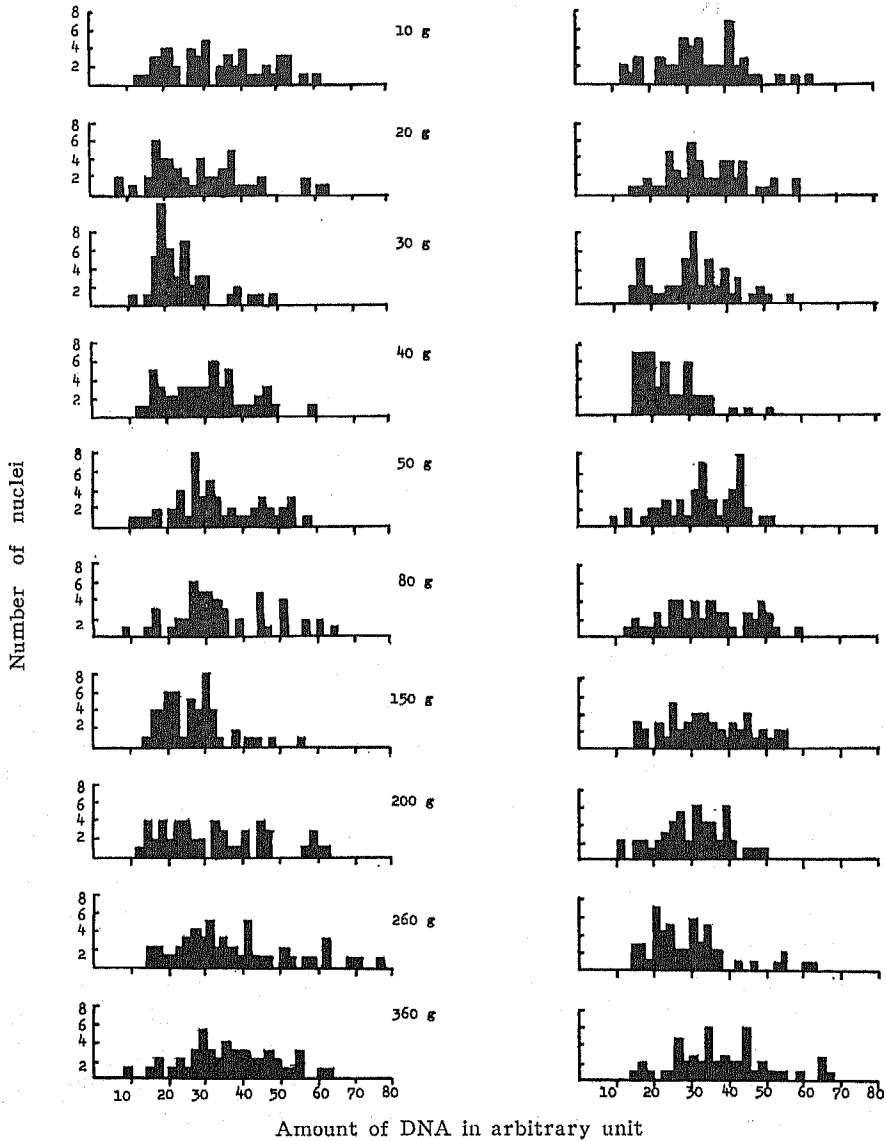


Fig. 1. Histogram showing individual DNA contents in the nuclei of mononucleate (right side) and binucleate (left side) hepatic cells.

Table 5. Chi-square test from Table 4.

Factor	DF	$\chi^2$
$P \times T/N$ ) $P \times N$ ) P D. N $T \times P$	54	153.7068**
	3	
	9	0
$P \times N \times T$	66	166.4156

Abbreviations are the same as in Table 4.

Fig. 1 は横軸に DNA 量の相対量を縦軸に細胞数をとつて各成長期における Ploidy の変動を示したものである。

Table 4 は各群毎に各々の Ploidy に属する核数を表わすもので Table 5 はこの  $\chi^2$ -検定の結果を示す。これによると T, N, P にそれぞれ独立性があり有意となつている。すなわち1核細胞と2核細胞では Ploidy の出現率に有意の差があり、生後日数と Ploidy の間の出現率にも有意の差が示される。

## 考 察

成長期における1核細胞と2核細胞のDNA量の変化を同腹ラットを用いて比較検討を試みた。一般に1核あたりのDNA量には有意の差がみられないが、1細胞あたりとすると2核細胞の方がほぼ2倍のDNA量を示していることは永田<sup>⑥</sup>の報告した通りである。Table 3の要因分析表によるとTは1%の危険率で有意であるが、成長にともなうDNA量は生後日数で変動があるということになり、DNA量の恒常性という考え方に相反する結果のように思われる。

しかしながら同時代の1核細胞と2核細胞の1核あたりのDNA量をPloidyによつて表4のように分類すると、生後日数により変動することが明らかであり、この倍数性の変動がDNA平均値の変動の原因と考えられる。

J. Post等<sup>⑩~⑫</sup>の肝細胞のReplicationに関する報告によると、生後6ヶ月までのDiploid cellのReplication timeはほぼ同じであるが、分裂する細胞は次第に減少するという。しかし老年になるにしたがい、肝細胞ではReplication timeが延長し、細胞分裂はごく一部の集団に限られ、結果として倍数性の増加がおこる。しかしどの時期においても細胞分裂は多周期的(polycyclical)におこるといふ。このような周期をとらえる時間によつて、ここで見られたようなPloidyの変動がみられると考えられる。永田<sup>⑥</sup>の報告した体重150gから300gの間のPloidyの変動もこのような変動の一部であろう。一方生後日数による2核細胞の増加をみると(Table 1)、生後17日(体重30g)まではほとんど増加がみられず、生後27日(体重40g)のときに急激な増加がみられ約40%近くになり、以後は減少して約15~18%の値に落ち着く。DNA量をみると、1核細胞と2核細胞の1核あたりのDNA比では生後27日で2核細胞の方が約30%近くの増加を示している。生後日数の増加にともない、2核細胞と1核細胞とのDNA量の比率はほぼ一定になる傾向が示される。生後27日はいわゆる乳離れをして一般の飼料を摂るようになる時期で、このような時期にイヌ肝臓および胃腺の2核細胞は急激な増加を示すといわれる<sup>⑩⑪</sup>。一方1核細胞と2核細胞のDNA量は他の時期ではほぼ同比率を示すのにこの時期では1核細胞のDNA量が2核細胞のそれより減少していることがわかる。

この理由としては、おそらく2核細胞数の急激な増加は食餌の影響による肝機能の昂進のためと考えられ、Polyploidの1核細胞が2核細胞になつたため残つた1核細胞はDiploidが多くなり、その結果とし

て2核対1核のDNA量の比は増加したと説明できる。一方成熟期にむかつて細胞機能が確立されるにしたがい、2核細胞数もいつたん減少をみながらほぼ一定の割合になつていく結果、DNA比も一定値に落ち着くと考えられる。

Fig. 1はPloidyの分析を示すHistogramであるが、一般に成長にともないDiploidからTetraploidへの移行を示すと報告されている<sup>⑥⑪</sup>。今回の実験では例数の少ないこともあり、特徴あるPloidyの様相を示さなかつた。しかし全体としては1核細胞は47日(体重80g)以下の動物ではDiploidが多く67日(体重150g)以上の動物ではTetraploidが多いのに対し、2核細胞は97日(体重200g)以下の動物でDiploidが多く、200日(体重260g)以上の動物でTetraploidが多い傾向がうかがわれる。

## 結 論

1) 同腹のラットを用いて2核細胞と1核細胞のDNA量の変動を生後7日から400日にわたつて定量し比較検討した。

2) 2核細胞と1核細胞との出現率を比較すると、どの時期にも1核細胞が有意に多い。生後日数による変動も有意の差があり、2核細胞は生後27日に急激な増加を示し、以後いつたん減少して一定値に落ち着く。

3) 2核細胞と1核細胞のDNA量は1核あたりについてみると両者の間に有意の差がみられないが、1細胞あたりのDNA量は2核細胞では1核細胞の約2倍となつている。

4) 乳離れをして一般の飼料を摂る時期に2核細胞の急激な増加があり、2核細胞のDNA量の比率の増加をみるが、これは肝機能の昂進の結果2核細胞数の増加がおこりそのためPolyploidの1核細胞が2核細胞に変わつたと考えられる。

5) Ploidyの変化については例数の少ないことと、一般に分散度が大きいいため、はつきりとしたPloidyの様相が示されなかつた。しかしながら全体の傾向としては、幼若動物でDiploidが多く、成体でTetraploidが多くなり、DiploidからTetraploidへの移行は最初に1核細胞、次いで2核細胞でおこることがうかがわれる。その時期は1核細胞では47日と67日の間、2核細胞では67日と97日の間である。

## 総 括

ラットの成長にともなう肝細胞核のDNA量の変化を1核細胞および2核細胞に分けて観察した。同腹ラット生後7日、14日、17日、27日、37日、47日、67

日, 97日, 200日, 400日, 計10匹を用いて, 肝臓内側右葉の一部をとり, 分離標本を作製し Feulgen 染色したものを顕微分光測光法で可視光を用い, 二波長法で DNA 量を測定した。測定した細胞数は各動物について1核細胞50個, 2核細胞25個である。

細胞1000個中の2核細胞数は生後27日まではほとんど増加せず27日で2核細胞数は約40%と最高の増加を示し, 以後は減少しながらほぼ一定の値に落ち着く。

DNA 量の1核細胞と2核細胞の比率はほぼ一定の傾向にあるが, 生後27日で2核細胞のDNA比が増加している。この時期はいわゆる乳離れをして一般の飼料を摂る時期で生後27日で2核細胞が急激に増加するため1核細胞の平均DNA量が減少すると考えられる。

Ploidy の様相の変化の傾向としては, 幼若動物で Diploid が多く, 成体で Tetraploid が多くなり, Diploid から Tetraploid への移行は最初に1核細胞, 次いで2核細胞でおこることがうかがわれる。

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39年10月25日第29回日本解剖学会関東地方会において発表した。

#### 文 献

- ①Caspersson, T.: Methods for the determination of the absorption spectra of cell structures, *J. Roy. Micro. Soc.*, **60**: 8, 1940
- ②妹尾佐知丸・宮原正信・内海耕造・野間正喜: 顕微分光測光法とその生物学への応用, 蛋白質・核酸・酵素, **10**: 1181, 1965 ③永田哲士: 顕微分光測光法の理論と応用, 信州医誌, **15**: 1, 1966
- ④Nagata, T.: A new method for preparing the specimens suitable to microspectrophotometry of binucleate cell nuclei stained with the Feulgen reaction, *Med. J. Shinshu Univ.*, **6**: 137, 1961 ⑤Nagata, 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, 1961
- ⑥尾持昌次・永田哲士・島村和夫・小野沢実: 細胞分離永久標本作製法(第4報) 解剖誌, **33**: 20, 1958
- ⑦Sibatani, A. and Naora, H.: Enhancement of

colour intensity in the histochemical Feulgen reaction: Method and quantitative estimation, *Experientia*, **8**: 263, 1952 ⑧Mendelsohn, M. L.: The two-wavelength method of microspectrophotometry II. A set of tables to facilitate the calculations, *J. B. B. C.*, **4**: 415, 1958 ⑨永田哲士・百瀬節生: イヌ肝細胞の無糸核分裂および二核細胞の年令的変動, 解剖誌, **34**: 187, 1959 ⑩島村和夫: イヌ旁細胞の胎生期, 哺乳期および離乳後における無糸核分裂数と二核細胞数の変動について, 解剖誌, **34**: 703, 1959 ⑪Naora, H.: Microspectrophotometry of cell nuclei stained with Feulgen reaction. IV. Formation of tetraploid nuclei in rat liver cells during postnatal growth, *J. B. B. C.*, **3**: 949, 1957 ⑫Post, J., Haung, C-Y, and Hoffman, J.: The replication time and pattern of the liver cell in the growing rat, *J. Cell Biol.*, **18**: 1, 1963 ⑬Post, J. and Hoffman, J.: Changes in the replication times and patterns of the liver cell during the life of the rat, *Exp. Cell Res.*, **36**: 111, 1964 ⑭Post, J. and Hoffman, J.: Further studies on the replication of rat liver cells in vivo, *Exp. Cell Res.*, **40**: 333, 1965

#### ABSTRACT

An investigation was carried out to study the difference of total DNA content between the binucleate and mononucleate hepatic cells during the postnatal growth. The materials used were a litter of albino rats, consisting of 10, which were sacrificed successively 7, 14, 17, 27, 37, 47, 67, 97, 200 and 400 days after the birth.

Measurement of the DNA content in each cell was done by means of two-wavelength method of microspectrophotometry utilizing MSP-A IV, Olympus Optical Co., Tokyo.

The results obtained were as follows.

1) Binucleate cells were observed significantly more than mononucleate cells. On the other hand the number of binucleate cells increased according to aging which was stochastically significant.

2) There was no significant difference in the DNA content per a nucleus between mono-

nucleate and binucleate cell. However, total DNA content of the two nuclei of a binucleate cell was almost as twice as that of a mononucleate cell.

3) The analysis of the ploidy class by means of histogram revealed that the diploid nuclei are predominant in younger animals and

the tetraploid in older ones. From the results, it seems probable that the replacement of ploidy class of the diploid nuclei by the tetraploid occurs between the growth stage from 47 to 67 days in mononucleate cells, while from 67 to 97 days in binucleate cells.