

ラット膵細胞における ^3H -thymidine の取りこみと 無糸核分裂の関係

昭和42年2月28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 relation between tritium thymidine incorporation and the amitotic nuclear division in the pancreatic acinar cells of rats

Osamu Shibata

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

細胞機能の増大に伴って2核細胞数が増加し、この2核細胞は細胞質の分裂を伴わない1核細胞の無糸核分裂によつてつくられる、ということが Omochi^①, Nagata et al.^②によつて報告されており、この場合細胞が2核となる意義は細胞機能の昂進と関係があると考えられている。また一方には、細胞機能の高まりは有糸分裂とは関係なしに核DNA量を増加させるという報告^③がある。前者では核表面積の増加という面から、また後者ではRNA代謝への影響を介して、これら2つの事実は細胞機能と密接に関係していることを示すものと思われる。これら両者の細胞学的な関係を暗示するものとして肝細胞では Nagata^④, 膵細胞では柴田^⑤の報告がある。それによると、 ^3H -thymidine 注射後に標識された2核細胞はある細胞では無糸核分裂前に、またある細胞では核分裂後にDNA合成を行なつた結果であるという。

Mallory 染色の変法による細胞核の Staining differences^⑥で、青色に染まる核(青色核)の青染色性がDNAと密接な関係にあることはすでに報告したが^⑦, 今回はこの Mallory 染色にオートラジオグラフィを併用することによつて、2核細胞の形成とDNA合成の関係について検討を行なつた結果を報告する。

材料と方法

体重150gの雄ラット2匹を実験の1週間前から、完全栄養の人工食を定時(午前9時)に一定時間(30分間)与えて馴育した。

放射性的DNA前駆物質として ^3H -thymidine (specific activity 3.1 C/mM)を用い、1個体につ

き0.6mlの生理的食塩水にとかした1mcを背部に皮下注射した(午前9時)。注射後8時間(午後5時)と24時間(翌日午前9時、食前)に1匹ずつ電気ショックで麻酔し、直ちに開腹、膵臓をとり出して細切後Ranvier $1/8$ アルコールに投入した。細胞分離永久標本のオートラジオグラフの作製は Nagata et al.の方法^⑧に従つて行なつた。なお、ここでは標本はアルコール・ホルマリン(3:1)混合液で固定し、染色は固定に続いて Mallory 染色の変法によつて行なつた。オートラジオグラフは Mallory 染色をした標本でストリップ法によつて作製した。ストリップ用乾板は富士 ET-2Eを用い、露出は50°Cで45日間行ない、現像は指定処法(FD-111)によつた。

こうしてえられたオートラジオグラフで、細胞核の標識の有無と核の染色性の関係について観察したが、そのための個々の詳細な方法については観察結果と共に述べる。えられた結果の有意性は推計学的に検定を行なつて判定した。

結 果

注射後8時間と24時間の標本について各々1000個の細胞を観察し、核の染色性と標識の有無によつてそれを分けた。

えられた結果は Table 1 に示した (Fig. 1-9)。標識された細胞数は注射後24時間で多少多くなる傾向はあつたが、差は有意ではなかつた。なお、これらの標識された細胞核はほとんどが青色であつた。核の染色性のみについての結果では、1核細胞、2核細胞のいずれも注射後8時間より24時間で青色核をもつた細胞が減少し、黄色核をもつた細胞と青-黄色核の2核細

Table 1. Frequencies of both incorporation of tritium thymidine and staining characteristics of nuclei stained by a modified Mallory's method in the acinar cells of the pancreases of the rats injected with tritium thymidine on the basis of 1000 cells.

cell	nuclear color	hours after the thymidine injection			
		8		24	
		unlabelled	labelled	unlabelled	labelled
mononucleate	blue	374	2	287	2
	yellow	165	0	215	1
binucleate	blue-blue	322	1	289	2
	blue-yellow	6	0	12	0
	yellow-yellow	130	0	192	0

Table 2. Frequencies of staining differences of nuclei in the pancreatic acinar cells on the basis of 30 labelled cells.

cell	nuclear color	hours after the thymidine injection	
		8	24
mononucleate	blue	17	14
	yellow	9	3
binucleate	blue blue		
	one labelling	1	10
	two labelling	1	1
	blue-yellow		
	blue labelling	2	2
	yellow labelling	0	0
	two labelling	0	0
	yellow-yellow		
one labelling	0	0	
two labelling	0	0	

胞がふえた。これらはいずれも χ^2 検定により各々0.1%および5%以下の危険率で有意であつた。すなわち

- 1 核細胞 $n=(2-1)(2-1)=1, \chi^2_8=17.04$
 $\text{Pr}\{\chi^2>10.827\}=0.1\%$
- 2 核細胞 $n=(3-1)(2-1)=2, \chi^2_8=14.3$
 $\text{Pr}\{\chi^2>5.991\}=5\%$

であつた。

核の染色性と標識との関係を詳細に調べるために、30個の標識された細胞を無作為にえらび、これらを核の数と染色性によつて分けた。

えられた結果は Table 2 に示した。すなわち、核の染色性とは関係なしに標識された30個の細胞では、1核細胞の数は2核細胞より多かつたが、その差は有意ではなかつた。これに加えて時間の影響を考慮して検定を行なつたところ、

$$P = \frac{30 | 30 | 43 | 17 |}{60 |} \left\{ \frac{1}{26 | 17 | 4 | 13 |} + \frac{1}{27 | 16 | 3 | 14 |} + \frac{1}{28 | 15 | 2 | 15 |} + \frac{1}{29 | 14 | 1 | 16 |} + \frac{1}{30 | 13 | 0 | 17 |} \right\} = 0.0099$$

となり、時間による変動は1%以下の危険率で有意であつた。すなわち、8時間後より24時間後に標識された1核細胞は減少し、標識された2核細胞は増加することが認められた。

Table 2 から、標識された細胞の核の染色性と経過時間の間の関係を調べた結果は次の通りであつた。

$$P = \frac{31 | 31 | 50 | 12 |}{62 |} \left\{ \frac{1}{22 | 28 | 9 | 3 |} + \frac{1}{21 | 29 | 10 | 2 |} + \frac{1}{20 | 30 | 11 | 1 |} \right\}$$

$$+\frac{1}{19 \mid 31 \mid 12 \mid 0 \mid 1 \mid }$$

=0.050

したがって、標識された細胞は5%の危険率で8時間より24時間後に青色核がふえ、黄色核が減少したといえる。

1核細胞の標識は黄色より青色の核をもつたものの方が5%の危険率で有意に多かつた (Table 3)。2核細胞では標識された核のすべてが青色であつたから、1核細胞もふくめて標識された核が青色であることは、かなりの確からしさで認めることができる。

これらの観察を通して、有糸分裂像は全くみられなかつたが、無糸核分裂像は見出された。

Table 3. Factorial design of mononucleate cells listed in table 2.

	SS	DF	Ms
T	20.25	1	20.25
N	90.25	1	90.25*
T × N	2.25	1	2.25
TN	112.75	3	

Abbreviations to the table

T : hours after tritium thymidine injection

N : nuclear color, blue or yellow

* : significant in 5% level of significance

考 察

Staining differences における細胞核の青染色性と DNA が密接な関係にあることはすでに著者が報告した⁷⁾。今回得られた結果のうち、8時間と24時間の時間による差は、使用した動物が各1例ずつであるため個体差による変動を否定できないが、標識された細胞、したがって ³H-thymidine 注射後に DNA 合成をした細胞では、黄色核より青色核のものが多かつたことは、Mallory 染色における核の染色性と DNA との間に何等かの関係のあることを、さらに確かなものとするであろう。このことは標識された細胞のみの観察では、注射後の経過時間に伴つて黄色核が減少し、青色核がふえたことから推察される。多分、これは黄色核が DNA 合成を行なうことによつて、青染色性に変つたことを示すものと思われる。DNA 合成の有無によるこのような染色性の変化が、DNA の量的な変化によるものなのか、あるいは Friedkin et al.⁸⁾の暗示したような既存の DNA と新たに合成された DNA の質的な相異によるものなのかは明らかではない。

Nagata⁴⁾ は Mallory 染色をしたラットの肝細胞で無糸核分裂の過程を観察し、くびれ期と中隔期は青色核のみであつたが、離断期では1核のみあるいは2核とも黄色の細胞のあることをみて、青色核のみが無糸核分裂を行なうと結論している。器官は異なるとはいえ、ここでえられた結果で、標識された細胞核のほとんどが青色核であり、りまた時間差が個体差でないと考えれば、時間の経過に伴つて、この標識された1核細胞の数が減少するのに反して、標識された2核細胞は増加するという事実は、青色核のみが無糸核分裂を行なうという Nagata⁴⁾の主張と一致している。

2核細胞を標識した ³H-thymidine が有糸核分裂に際して取りこまれたという可能性は、有糸核分裂像が全くみられなかつたことから、ここでは否定されるであろう。この標識された DNA の合成時期について、³H-thymidine を注射したラットの肝細胞で無糸核分裂の過程を観察した Nagata⁴⁾は、核分裂前後における合成の可能性を検討し、分裂過程にある細胞では標識された核がみられなかつたことから、無糸核分裂後に1つあるいは2つの核が ³H-thymidine を取りこんだ可能性が大きい、と述べている。しかし、柴田⁶⁾は脾細胞において、無糸核分裂の過程の中隔期で標識された細胞をみて、無糸核分裂後と同様に分裂前においても DNA 合成が行なわれる可能性を示した。ここに報告したような、標識された2核細胞数と1核細胞数の経過時間に伴う増減と、その際の核の青染色性への変換は、2核細胞の標識が1核細胞の無糸核分裂前に合成した DNA 中に取りこまれた ³H-thymidine によるもので、分裂後に合成されたものではないことを示すものと思われる。

2核細胞が標識された場合、ここではほとんどが1核のみの標識であつた。無糸核分裂前に合成された DNA が1方の核のみに含まれやすいということが、細胞学的にどのような意義をもつものなのかは現在のところでは不明である。

標識とは関係なしに、1核細胞、2核細胞のいずれにおいても、注射後8時間より24時間で青色核を持つた細胞数が減少し、黄色核の細胞が増加した。染色時の条件の違いが標本の染色度を変える可能性を考慮して、染色操作はすべて同一容器内で同時に行なつており、この様な変化の原因が標本作製の過程にあつたとは思われぬ。ここで用いた注射後24時間のラットはそれ以前の23時間30分の間は全く食餌を与えられておらず、脾臓機能はかなり低下していた可能性がある。従つて、核の染色性の変つた原因として、(1)細胞機能の低下に伴う DNA 量の変化、(2)餓餓状態による

RNA 量の減少, (3) 個体差, (4) その他が考えられよう。時間の経過に伴う染色性の変化は, このような原因が単独に, あるいは幾つか組合わさつて生じたものかも知れないが, 現在のところでは明らかではない。

要 約

^3H -thymidine を注射したラットを注射後8時間と24時間ころし, 膵臓細胞の分離標本をつくつた。これを Mallory の変法で染色した後にオートラジオグラフィを行なつた。えられた標本で DNA 合成と核の染色性や無糸核分裂の関係を調べた結果は次の通りであつた。

1. 有糸核分裂像はみられなかつたが, 無糸核分裂像はみられた。
2. 注射後の時間の経過によつて, 標識された1核細胞数は減少したが, 2核細胞数は増加した。
3. 標識された1核細胞では黄色より青色核の方が有意に多く, 標識された2核細胞もふくめて経過時間による変動は, 8時間後より24時間後に青色核がふえ, 黄色核が減少した。
4. 2核細胞の標識された核はすべて青色であつた。
5. これらの結果から, 無糸核分裂を行なう細胞核で黄染色性のものは, 核分裂前に DNA 合成を行なつて青染色性を示すようになると結論しうる。

御指導と御校閲をいただいた尾持昌次教授ならびに永田哲士助教授に深謝致します。

文 献

- ①Omochi, Sh.: Über das Verhaältnis zwischen der Amitose und der Zellfunktion, *Med. J. Shinshu Univ.*, 6: 163-170, 1961
- ②Nagata, T., Shimamura, K. and Okubo, M.: Effets du régime alimentaire sur l'aspect des cellules binucléées dans le pancréas et l'estomac du rat, *Rev. Frans. Étud. Clin. Biol.*, 7: 714-718, 1960
- ③Verwoerd-Verhoef, H. L. and Verwoerd, C. P. A.: Start and progress of increase of nuclear deoxyribonucleic acid content after stimulation of cell activity, *Nature*, 193: 1208, 1962
- ④Nagata, 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
- ⑤柴田 治: ラット膵臓細胞における 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

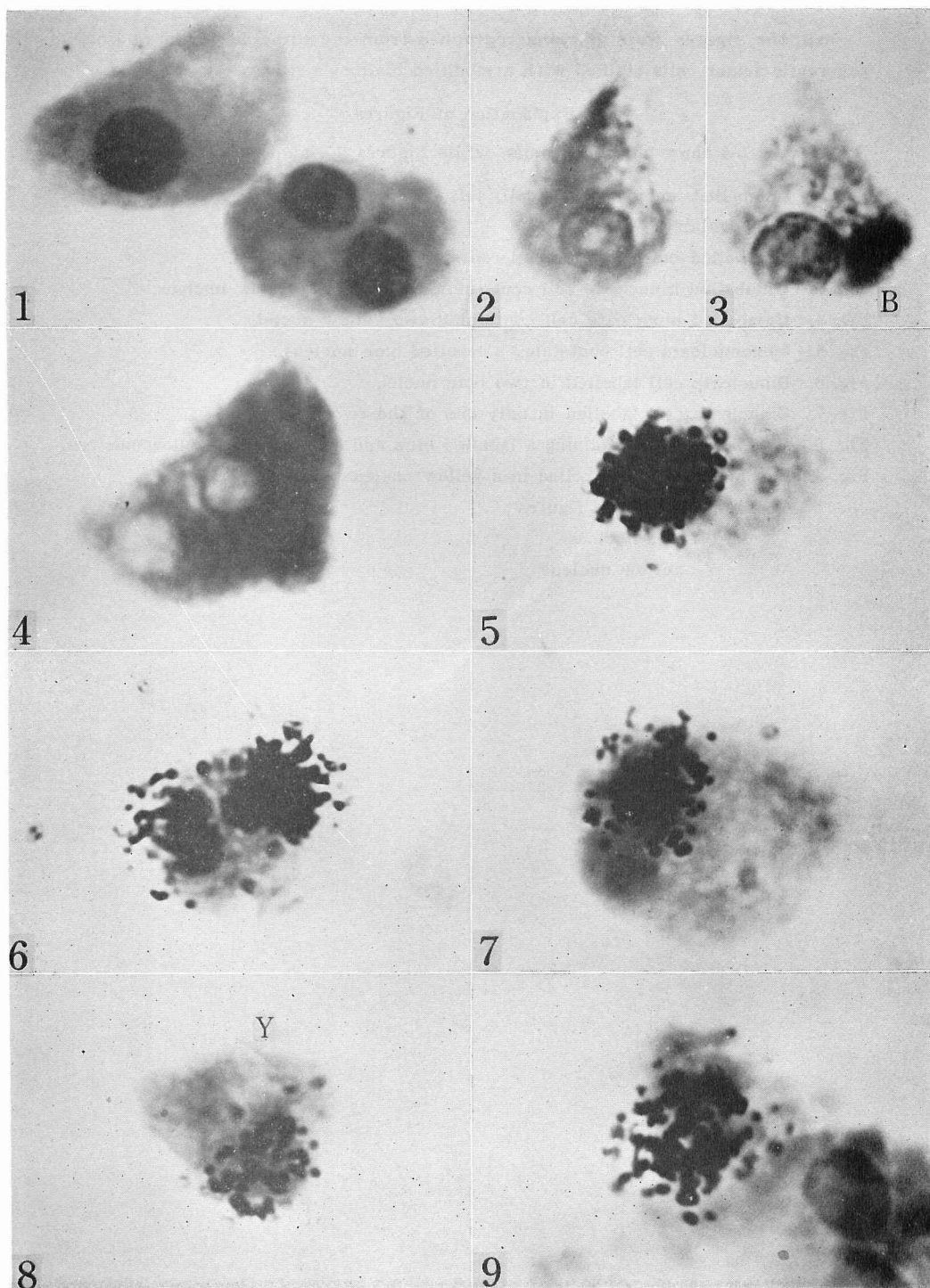
核細胞について, 信州医誌, 15: 497-502, 1966

- ⑥Nagata, T.: Staining differences of nuclei in isolated liver cells of rat, *Med. J. Shinshu Univ.* 3: 257-263, 1958
- ⑦柴田 治: 分離した膵臓細胞核の Staining differences について, 信州医誌, 15: 384-388, 1966
- ⑧Nagata, T., Shibata, O. and Omochi, Sh.: A new method for radioautographic observation on isolated cells, *Histochemie*, 2: 255-259, 1961
- ⑨Friedkin, M. and Wood, H.: Utilization of thymidine- C^{14} by bone marrow cells and isolated thymus nuclei, *J. Biol. Chem.*, 220: 639-651, 1956

ABSTRACT

Two albino rats injected with tritium thymidine were killed 8 and 24 hours later, respectively. Preparations of isolated acinar cells of the pancreases were stained by a modified Mallory's method, and then were autoradiographed.

1. Some amitotic figures in nuclear division were found, but mitotic one was not.
2. The number of mononucleate cells containing a labelled nucleus stained blue was greater than those containing a labelled nucleus stained yellow, while most of labelled nuclei in binucleate cells were blue.
3. With the lapse of time after the injection, the number of labelled nucleus stained blue increased both in mono- and binucleate cells, while the number of labelled nucleus stained yellow decreased.
4. With the lapse of time after the injection, labelled binucleate cells increased in number, while labelled mononucleate cells decreased.
5. From these results, it should be concluded that yellow staining nuclei in mononucleate cells change for blue in staining characteristic by synthesizing DNA, and that, if the cells may undergo amitosis, the newly synthesized DNA is divided into one of or both of the two nuclei which arise from the amitotic nuclear division.



Explanation of Plate

All the figures were photomicrographed from the autoradiographs of isolated pancreatic acinar cells stained with a modified Mallory's stain.

Explanation of Figures

Figures 1-4 show unlabelled cells, while Figures 5-9 show labelled cells. x 2350

- Fig. 1. Unlabelled mononucleate cell, left, and unlabelled binucleate cell, right, each containing blue nuclei.
- Fig. 2. Unlabelled mononucleate cell containing a yellow nucleus.
- Fig. 3. Unlabelled binucleate cell containing a blue and a yellow nucleus.
- Fig. 4. Unlabelled binucleate cell containing two yellow nuclei.
- Fig. 5. Mononucleate cell containing a labelled blue nucleus.
- Fig. 6. Binucleate cell labelled in two blue nuclei.
- Fig. 7. Binucleate cell labelled in only one of the two blue nuclei.
- Fig. 8. Binucleate cell containing a labelled blue and an unlabelled yellow nucleus.
- Fig. 9. Mononucleate cell labelled in a yellow nucleus.

Abbreviations to the figures ;

B : blue nucleus

Y : yellow nucleus