

ラット膵細胞における 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

昭和41年10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

An Autoradiographic Study on DNA Synthesis in the Acinar Cell of the Pancreas of Albino Rats, with Special Reference to Amitotic and Binucleate Cells

Osamu Shibata

First Department of Anatomy, Shinshu University

(Director: Prof. Sh. Omochi)

核酸合成、さらには細胞増殖の研究に放射性同位元素で標識したDNA前駆物質を用いることは非常に有効な手段であり、これらの分野において多大の貢献をしている。殊に ^{14}C にかわる ^3H の使用は組織学的にかなり詳細な論議を可能にし、銀粒子の計数によつて前駆物質の取りこみを定量的に論ずることも可能にした。

一般に2核細胞の出現は細胞機能と密接に関係している^{①②③④}と考えられている。この2核細胞の形成にあつて、核内DNAの動向はRNA合成能と関連し、さらにこれは間接的に細胞機能と関係づけられる。DNA合成は原則として有糸核分裂に先立つて行なわれるが、核DNA量の倍数性が認められているかぎりにおいては、有糸分裂を前提としないDNA量の増加もありうることになる。Nagata^⑤は ^3H -thymidineを注射したラットの肝細胞で有糸核分裂を伴わない1核細胞のDNA合成を観察し、さらに2核細胞のあるものが ^3H -thymidineによつて標識されることから、この2核細胞の中の ^3H -thymidineが細胞内に取りこまれた時期について考察している。

無糸核分裂によつてつくられたと思われる2核細胞とDNA合成が、どのような関係にあるかを知ることが、細胞学的に意義のあることと思われる。そこでラット膵臓の特に2核細胞におけるDNA合成をオートラジオグラフによつて調べ、無糸核分裂との関係において2核細胞を標識したDNAが合成された時期について考察した。

材料と方法

体重150gの雄Wistar系ラット2匹の膵臓を用いた。ラットは実験に先だち1週間人工基礎食と水を常時与えて、給食、給水を特に制限しなかつた。

放射性的DNA前駆物質としては ^3H -thymidineを用い、ラット1体につき1mcを生理的食塩水0.6mlにとかし、これ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)に電気ショックで麻酔し、直ちに開腹、膵臓をとりだし、細切したのちにRanvier 1/8アルコールに投入した。これ以後、細胞の分離からオートラジオグラフ作製まではNagata et al.^⑥の方法によつた。なお、ここで用いたオートラジオグラフ用乳剤は富士のストリップ用乾板ET-2Eである。露出は5°Cで46日間行ない、現像はFD-111で20°C、5分間とした。その後すべての標本は反転することなく、ヘマトキシリン-エオジン染色を行なつた。

1核細胞と2核細胞の標識の頻度を推計学的に検定する際には、上述と全く同様の条件下で行なつた実験群の1つを加え、くり返えしとして処理をした。また、標識された無糸核分裂の過程の観察は、この実験群の ^3H -thymidine注射後8時間のラットからの標本で行なつた。

結 果

すでに成熟期にあるラットの膵臓におけるDNA前駆物質の膵細胞核内への取りこみがどの程度の頻度でなされるかを知るために、無作為に1000個の細胞をえらび、標識の有無を調べた。

核形、核数と注射後の時間との関係はTable 1に

示した通りで、有糸核分裂像は全くみられなかつた。成熟期の睪臓においても、ごく少数の細胞ではあるがDNA 前駆物質を取りこみ、DNA 合成を行なつたことが示された (Fig. 1, 2, 3, 4)。

1核細胞と2核細胞各々1000個のうちで標識されたものをかぞえた。この場合には、全く同一条件で行なつた他の実験群の結果を加え、推計学的処理ではくり返えしとした。

これらの値は Table 2 に示した。2核細胞が標識される場合、1核のみの標識と2核が標識される可能性とがあるが、こゝでみられたものはすべて1核のみ

が標識された細胞 (Fig. 4) であつた。標識された細胞数は2核より1核のもので多く、各群間の変動を核形 (N) と注射時間 (T) の2要因について推計学的に要因分析すると、5%の危険率で核形による変動が有意であつた。

各時刻毎に標識された1核細胞と2核細胞を各々10個づつえらび、これらの銀粒子数をかぞえた。その値と推計学的処理の結果を Table 4 と5に示した。銀粒子数の核形による変動は有意でなかつたが、経過時間による変動は有意であつた。すなわち、8時間より24時間の方が有意に銀粒子数を減少した。

Table 1. Frequencies of various nuclear forms labelled in the acinar cells of the pancreas of albino rat after tritium thymidine injection.

hours after injection labelling	8		24	
	labelled	unlabelled	labelled	unlabelled
mitosis	0	0	0	0
amitosis	0	30	0	27
nuclear transformation	0	0	0	1
mononucleate	4	590	8	547
binucleate	2	374	0	417
total	6	994	8	992

Table 2. Frequencies of labelled cells in mononucleate and binucleate cells on the basis of 1000 cells.

hours after injection labelling	8		24	
	labelled	unlabelled	labelled	unlabelled
mononucleate	10	990	14	986
	8	992	10	990
binucleate	6	994	8	992
	3	997	5	995

Table 3 Factorial design of Table 2.

	SS	DF	Ms
T	11.5	1	11.5
N	50.0	1	50.0*
T × N	1.5	1	1.5
TN	19.0	4	4.8
TNR	82.0	7	

Abbreviations to the table

T : time, hours after injection

N : nucleus, mono- or bi-nucleate

* : stochastically significant in 5% level of significance

以上の結果から標識の頻度は低いとはいえ、2核細胞も1核細胞と同様に標識されることがわかつた。そこで、2核細胞のこの標識が無糸核分裂とどのような関係にあるかを知るために、³H-thymidine 注射後8時間のラットの標本で観察例数をふやし、核分裂の過程にある細胞核の標識の有無を調べた。

総数2000個の細胞のうち1核細胞は12個が標識され、2核細胞では2核のうち1核が標識されたものが2個、そして無糸核分裂の過程にある細胞は4個が標識されていた。この標識された無糸核分裂の細胞4個は中隔期のもの1個、離断期のもの3個であつた。中隔期の細胞では銀粒子は核の中隔を覆つていた (Fig.

Table 4. Grain count in mononucleate and binucleate cells on the basis of 10 cells.

hours after injection	8	24
mononucleate cell	49.3±19.2	34.2±17.7
binucleate cell	37.9±20.9	31.6±10.3

Table 5 Factorial design of Table 4.

	SS	DF	Ms
T	1166.4	1	1166.4*
N	504.1	1	504.1
T × N	184.9	1	184.9
TN	11977.0	36	332.7
TNR	14583.9	39	

Abbreviation to the table

T : time, hours after injection

N : nucleus, mononucleate or binucleate

* : stochastically significant in 5% level of significance

8)。標識された離断期の3個の細胞のうち2個は離断された核中隔の両断面の上のみ銀粒子がみられ (Fig. 9), 他のものでは、2個の核のうち1個の核中隔の断面とその内部が標識されていたが、他の核は全く標識されていなかった (Fig. 10)。

くびれ期の細胞で標識されたものはみつけることが出来なかつた

考 察

各種組織における2核細胞の形成とその意義については尾持^①が綜説しているが、一般に細胞機能の増進時には無糸核分裂によつて2核細胞が増加することが認められている。このような2核細胞の形成機序としては、細胞体の分裂を伴わない無糸核分裂以外に、有糸核分裂の異常型として核分裂のみで細胞体の分裂を伴わない場合^⑦も考えられる。しかし、こゝで観察した標本中には有糸核分裂像は全く見出しえなかつたのに反し、無糸核分裂の過程とみられる種々の核形が観察されたことから、前者の可能性は全く否定しえないまでも無視しうる程に稀であつたとみてよいであろう。したがつて、有糸核分裂をとまわずにDNA合成を行なつた細胞があつたことは確かであろう。

このようなDNA合成によつて標識された細胞数は2核細胞よりも1核細胞の方が有意に多かつた。肝細胞で同様の解析をした Nagata^⑥もこれらの間に有意差を認めている。

標識された銀粒子数、したがつて、核内に取りこま

れた³H-thymidineの量は1核細胞と2核細胞で差はなかつたが、経過時間に伴う銀粒子数の減少は Nagata^⑥が肝細胞において認めたと同様に明白であつた。この理由としては生体中での放射性同位元素の濃度の稀薄化がもつとも大きな原因であると考えられる。

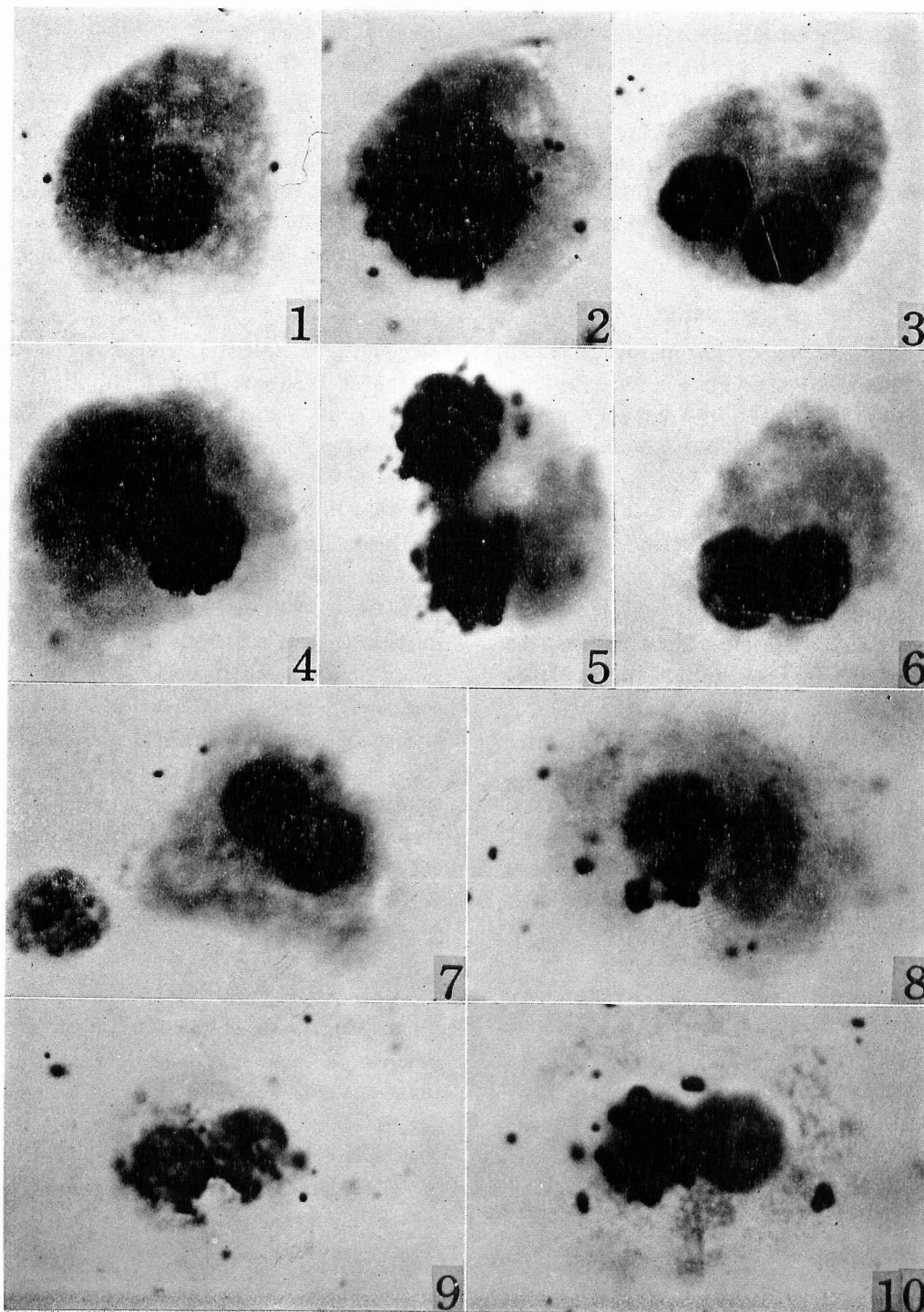
標識された2核細胞があらわれる場合、無糸核分裂の前と後における同位元素の取りこみが考えられる。Nagata^⑥は³H-thymidineを注射したラットの肝細胞の無糸核分裂細胞では標識された細胞がみられなかつたと報告し、2核細胞の標識は無糸核分裂後に1つまたは2つの核がとりこんだ³H-thymidineによるものであると結論した。しかし、肝細胞では無糸核分裂のくびれ期で標識された細胞をみることは出来なかつたといへ、分裂の他の過程ではわずかな数にせよこれを見ることが出来た。標識された無糸核分裂細胞のうちの中隔期の細胞があつたことは、ある細胞では2核細胞の放射性的DNAが核分裂前に合成されたという可能性を示すものと思われる。

このようなDNAは分裂した核の1個、あるいは2個に含まれることが可能である。こゝでは2核のうち1核が標識された細胞のみであつたが、Nagata^⑥は肝細胞で2核ともに標識されたものも報告しており、著者も肝細胞を用いた他の実験でそのような場合を観察している (Fig. 5)。したがつて、核の標識のされ方としては1核のみの標識も、2核の場合もありうらと思われる。

無糸核分裂細胞の標識は核の標識部位との関係で、

(1) 核中隔、あるいは分裂後の核中隔の断面のみの標識、(2) 核中隔、あるいはその断面と核内部の標識、(3) 核内部のみの標識、(4) 全く標識されない、の各々の場合が考えられよう。実際には無糸核分裂では標識されない細胞が圧倒的に多く、また(3)の例はこゝでは観察することが出来なかつた。さらに標識された無糸核分裂の細胞の観察例も少なく、またほとんどの細胞で標識の様子が互いに異つていた故、標識されたDNAが核の種々の部位にあらわれる細胞学的な意義をこれらの結果から知ることは困難である。核内部のみを標識された細胞がみられなかつたことから、核分裂に当つてDNAは初めに核内部で配分されて各々の必要量をみだし、次いで核中隔が形成されることを示しているのかも知れない。

Leedale^⑧はEuglenaの無糸核分裂で生じた2核細胞の各々の核が分裂前の核の半数の染色体をもつことをみた。またNagata^⑥はラット肝細胞の無糸核分裂で生じたと思われる2核細胞の各々の核のDNA量



は等しく、1核細胞に tetraploid が多く、2核細胞の各々の核は diploid が多く、1核細胞に octaploid が増加すると2核細胞に tetraploid が増加すると報告している。これらの報告は核分裂前のDNAの倍数性が偶数倍であったことを示すものと思われ、ここでえられた結果と共に、奇数倍量のDNAをもつ核のみが無糸核分裂に先立つてDNA合成を行なつた可能性がある。しかし、たとえ動物、器官は異なるとはいえ、DNAが不等に含まれるという報告^⑩もあり、これらについての詳細な点は今後の研究にまたねばならない。

要約および結論

1. 体重150gの雄ラットに³H-thymidineを注射し、脾臓の細胞分離永久標本をつくり、オートラジオグラフによつて脾細胞のDNA合成をしらべた。
2. 有糸核分裂像は全くみられなかつたが、無糸核分裂像はみられた。
3. ³H-thymidineの取りこみによつて標識された細胞数は2核細胞よりも1核細胞の方が有意に多かつた。
4. 細胞を標識した銀粒子数、したがつてDNAに取りこまれた³H-thymidine量は1核細胞と2核細胞で有意差はなかつたが、注射後24時間では8時間より有意に減少した。
5. 無糸核分裂の過程で、中隔期と離断期の細胞のあるものが銀粒子で標識された。
6. これらの結果から、有糸核分裂を前提としないDNA合成が行なわれ、細胞がこれによつて標識される頻度は2核細胞より1核細胞で多いというる。また、2核細胞を標識した³H-thymidineを含むDNAは無糸核分裂の前に合成されたものも存在する。

稿を終るに当り、御指導と御校閲の労を執られた尾持昌次教授ならびに永田哲士助教授に深く謝意を表します。

文 献

- ①Omochi, Sh.: Über das Verhältnis zwischen der Amitose und der Zellfunktion, Med. J. Shinshu Univ., 6: 163-170, 1961
- ②Nagata, 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

③Nagata, T., Shimamura, K., Kondo, T., Onozawa, M., Momozé, S. and Okubo, M.: Relationship of binuclearity to cell function in some organs. II. Variation of frequencies of binucleate cells in some organs of dogs owing to aging, Med. J. Shinshu Univ., 5: 153-158, 1960

④Nagata, 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

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, 1932

⑥Nagata, T., Shibata, O. and Omochi, Sh.: A new method for radioautographic observation on isolated cells, Histochemie, 2: 255-259, 1961

⑦Beams, H. W. and King, R. L.: The origin of binucleate and large mononucleate cells in the liver of the rat, Anat. Rec., 83: 281-297, 1942

⑧Leedale, G. F.: Amitosis in three species of Euglena, Cytologia, 24: 213-219, 1959

⑨Nagata, 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: 143-153, 1961

⑩Goldstein, M. N.: The deoxyribose nucleic acid (DNA) content of human monocytes and their derivatives during giant cell formation in vitro, J. Histochem. Cytochem., 274-281, 1954

ABSTRACT

DNA synthesis in the acinar cells of the pancreas of male rats injected with tritium thymidine was examined with the autoradiographs on the preparations of isolated cells. The results obtained were as follows.

1. No mitotic cell was found either labeled or unlabeled. To the contrary, amitotic cells were found under both conditions as mentioned above.

2. Labeled amitotic cells were found on two stages in the process of amitotic nuclear division, one was the stage of formation of

nuclear splitting septum and the other was the stage of nuclear division.

3. Frequency in the labelling of mononucleate or binucleate cells was not influenced by the time after the injection. However, the labelled mononucleate cells were more in number than the labelled binucleate ones, and this difference was stochastically significant.

4. The grain counts revealed that the incorporated tritium thymidine in the labelled mononucleate cells was on the same level with that in the labelled binucleate cells.

5. From these results, it is suggested that the acinar cells of pancreas synthesize DNA without any mitotic nuclear division, and that the DNA containing tritium thymidine in some binucleate cells had been synthesized before the amitotic nuclear division.

Explanation of Plate

All the figures were photomicrographed from the radioautographs of isolated pancreatic acinar cells of rats.

Explanation of Figures

Figures 1-5 show the cells on the resting stage, while Figures 6-10 show the cells on

the stages of amitotic nuclear division.

Fig. 1. Unlabelled mononucleate cell. $\times 2700$.

Fig. 2. Labelled mononucleate cell. $\times 2700$.

Fig. 3. Unlabelled binucleate cell. $\times 2700$

Fig. 4. Binucleate cell labelled in only one nucleus. $\times 2700$.

Fig. 5. Binucleate cell labelled in two nuclei. $\times 2700$.

Fig. 6. Unlabelled amitotic cell on the stage of formation of the nuclear splitting septum. $\times 2700$

Fig. 7. Unlabelled amitotic cell on the stage of the nuclear division. $\times 2700$

Fig. 8. Labelled amitotic cell on the stage of formation of the nuclear splitting septum. Autoradiographic silver grains are observable over the nuclear splitting septum. $\times 2700$.

Fig. 9. Labelled amitotic cell on the stage of the nuclear division. Two nuclei are radioactive in their divided faces only. $\times 2160$.

Fig. 10. Labelled amitotic cell on the stage of the nuclear division. One nucleus at left is labelled in both the nuclear inside and its divided face, while another is out. $\times 2700$.