

分離した膵臓細胞核の Staining differences 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

Staining Differences of Nuclei in Isolated Acinar Cells
of Rat Pancreas

Osamu Shibata

First Department of Anatomy, Shinshu University

(Director: Prof. Sh. Omochi)

Sheinin and Davenport^①は Mallory 3 重染色によつて肝細胞核が青色、或いは赤色に染まることを観察し、これを Staining differences として報告した。それ以来、多くの人々が肝細胞を用いてこの現象について報告している。

Parr 等^{②③}は蛋白質欠食を与えた、あるいは絶食させたラットの肝細胞を Mallory の変法で染色し、青色に染まる核(青色核)と黄色に染まる核(黄色核)の比率が完全食を与えたものと異なることをみた。さらに同様の現象が tryptophan 欠食を与えた時にも観察されることを報告し、これが生理的、あるいは組織化学的な差によるものと考えた。一方 Lison^④はこのような核の染まり方の差異は核膜に対する染料の透過性の差に原因するもので、したがつて切片における核の切断の有無に関係があるとした。しかし、Nagata^⑤は切片標本ではなしに、細胞分離標本のように核膜の損傷されない細胞でも核の Staining differences がみられることを報告し、Lison の考えを否定した。

著者は膵臓細胞を用い、Mallory 染色の変法によつて Staining differences を調べた結果、青色核と黄色核の比率は肝細胞のそれとは異るとはいえ、膵細胞においても Staining differences がみられることを知り、さらにこのような核の染色性が核酸の存否によつて著しく影響をうけることを見出したので、これらの結果について報告する。

材料と方法

体重 150g の Wistar 系ラット(雄)の膵臓細胞を用いた。これらのラットは人工基礎食によつて飼養されていたものであるが、この人工基礎食は栄養学的には全く完全なものでラットも非常に元気であつた。

膵臓の細胞分離標本は尾持等^⑥の方法にしたがつて

作製したが、こゝでは固定液としてアルコール・ホルマリン(3:1)混合液を用いた。細胞を塗抹した標本は3組つくり1組は固定後直接に Parr 等^②が用いた Mallory 染色の変法で染色し、残り2組の標本は各々 DNase、あるいは RNase で核酸を消化した後と同様の染色を行なつた。

核酸分解酵素の調整および核酸消化の条件は次の如くであつた; DNase は 0.2mg/ml になるように再蒸溜水にとかし、さらにこれに $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ を 0.01M になるようにとくす。pH は 5.7 で反応は 37°C で 1 時間行なつた。RNase は 0.2mg/ml になるように再蒸溜水にとかし、反応は 37°C で 1 時間行なつた。

結 果

膵臓の分離された細胞においても、Mallory 染色の変法によつて核は青色あるいは黄色に染め分けられ、Staining differences がみられた。細胞質はいずれも暗青色であつたが、青あるいは黄色核をもつた 1 核細胞と (Fig. 1, 3), 2 核ともに青色または黄色のもの (Fig. 2, 4), あるいは 1 核が青色で他のものが黄色のもの (Fig. 5) の 3 種類の 2 核細胞がみられた。

200 個の細胞について、このような核の色と核の数で分類した結果を表 1 に示した。この表中にはさらにこれらの染色性が核酸に由来する可能性を調べるため、DNase あるいは RNase で核酸を消化した結果も示した。核酸消化実験において、DNase または RNase を作用させたものでは未消化のものとは異なり、青色と黄色の中間色とみられる褐色核がかなりの数みられたことが特に注目される (Fig. 6, 7, 8)。また、DNase 消化をすると 1 核細胞でも 2 核細胞でも青色核が全くみられなくなつた。

1 核細胞について、核酸の消化が核の染色性を変え

Table 1. Staining differences of the nuclei in isolated acinar cells of the pancreas of albino rats as was influenced by the digestion of nucleic acids.

nucleus	stainability of nucleus	nucleic acid digestion		
		non	DNase	RNase
mononucleate	blue	50	0	11
	yellow	46	51	37
	brown	0	29	44
binucleate	blue-blue	54	0	3
	blue-yellow	11	0	0
	yellow-yellow	39	40	36
	blue-brown	0	0	2
	yellow-brown	0	9	8
	brown-brown	0	71	59

たことの可能性について X^2 検定を行なつた。

$$n = (3 - 1)(3 - 1) = 4 \quad \chi^2_S = 79.8$$

$$\Pr \left\{ \frac{\chi^2}{n} > 18.465 \right\} = 0.1\%$$

したがつて、0.1%の危険率で核酸消化が核の染色性を変えたといふ得る。こゝで χ^2_S に大きく影響していたのは核酸未消化の細胞で青色核が多いことゝ、褐色核が少なかつたことにあり、また DNase 消化で青色核が少なく、RNase 消化で褐色核が多いことによつていた。核酸未消化のものは消化したものに対してこゝでは対照となる故、相対的には核酸消化、ことに RNase を作用させることにより著しく褐色核が増加し、DNase により青色核が著しく減少したことゝなる。

2核細胞における同様の検定から、

$$n = (6 - 1)(3 - 1) = 10 \quad \chi^2_S = 201.3$$

$$\Pr \left\{ \frac{\chi^2}{n} > 18.307 \right\} = 5\%$$

となり、こゝでも5%の危険率で核酸消化が核の染色性を変化させたといふ得る。こゝで染色性の変化はDNAの消化による2核ともに青色のものの減少、DNAまたはRNAの消化による2核ともに褐色のものの増加と1核が青色で他が黄色のものの減少としてあらわれた。

考 察

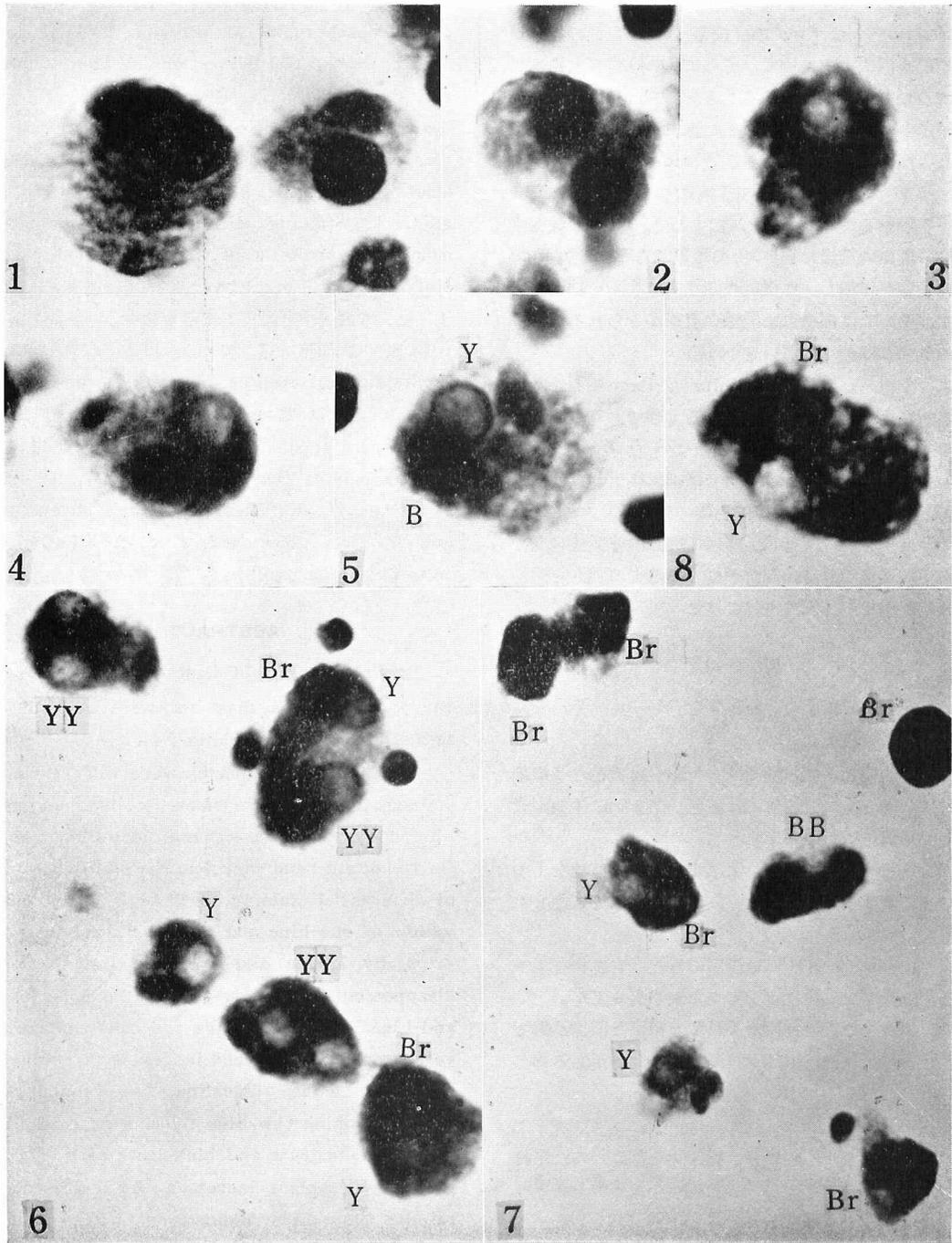
Staining differences の研究には今まではもつぱら肝細胞が用いられ、他の組織細胞はほとんど用いられていなかった。したがつて、肝細胞以外の細胞では

詳細な報告は全くなされていながつた。しかし、今回の実験において腺細胞核でも肝細胞と同様に、Mallory 染色の変法によつて、青色または黄色に染まる Staining differences がみられた。さらに、こゝでは切断されない完全形の分離細胞を用いているので、この染色性が物理的原因で生じたものではないことは Parr 等^{②③}または Nagata^④の論じた如くである。

1核、2核細胞のいずれにおいても、核酸消化と未消化のもの間での著しい違いは、後者では全くみられなかつた褐色核が、前者ではかなりの数みられたことであろう。これに反し、後者ではかなりみられた青色核が前者では著しく少なかつた。これらのことは、DNAを消化した場合に黄色核が増加したことと共に、核酸未消化の時に青色になるべき核が核酸消化によつて、その多くが褐色または黄色になつたことを示すものと思われる。

DNAの消化で顕著な変化は青色核が全くみられなかつたということであろう。これに反して黄色核または褐色核をもつた細胞があつた。これらのことは核が青く染まることとDNAの間に密接な関係があることを示すものと考えられる。また、この場合にみられた褐色核は青色から黄色へ変る際の中間色の核として説明しうるであろう。なお、青色核といえども多少は orange G に対する親和性をもっているものであるから、黄色核は aniline blue に対する親和性がDNA消化で失われた結果黄色になつたもので、特に orange G に対する親和性が増加したものではないと考えられる。

RNA消化ではDNA消化と異なり、青色核をもつ



た細胞が少数にせよみられ、褐色核をもつた細胞が1核，2核細胞共に著しく増加した。したがって，RNA 消化は青色に染まることとは無関係に黄色に染まること，すなわち orange G に対する親和性の増加と関係があるように思われる。RNA 消化によつて

多くの青色核が orange G に対する親和性も得た結果，青色核の減少と逆に褐色核の増加となつたものであろう。核よりも RNA のより豊富な細胞質ではその染色性は RNA を消化してもほとんど変化しなかつたが，これがいかなる理由によるものなのかは現在のと

ころではわからない。

Nagata^{⑥⑦}はラットの肝細胞で、染色性の違いが生理的原因によると論じ、さらに DAB 投与したラットで核の染色性が変化することをみて、核酸との関係を暗示した。Parr 等^③もまた蛋白質、或いは核蛋白質との関係を推論している。White^⑧は人の肝細胞の塗抹標本で核酸と染色性の関係について、かなり詳しい報告をしている。それによると、1 M の食塩水 (DNA 抽出に適当な濃度) で前処理すると核の orange G 親和性が増加し、低濃度の食塩水 (RNA 抽出が可能な濃度) では細胞質と同様の現象がみられるが、核の場合よりはかなり弱いという。

こゝで得られた結果は White^⑧、Parr 等^③と同様に核の青染色性は核蛋白質によるものであり、それも DNA であることを示す。このような青染色性も、DNA 消化によつて 1 核細胞では褐色核より黄色核の方が多く、2 核細胞では褐色核の方が多く、やゝ異なつた変化を示した。これは 1 核細胞と 2 核細胞の DNA の消化の難易、したがつて構造上の差異を想像させるが、その詳細についてはこゝではふれない。

要 約

1. ラット膵細胞の分離標本を Mallory 染色の変法によつて染色した。

2. 細胞核は 1 核細胞では青色または黄色、2 核細胞では 2 核ともに青色または黄色、あるいは 1 核が青色で他が黄色に染め分けられた。

3. DNase で DNA を消化すると、青色核をもつた細胞は全くみられなくなり、これに反して黄色または褐色の核がふえた。

4. RNase で RNA を消化すると、青色核をもつた細胞が減少し、褐色核をもつた細胞がふえた。

5. 細胞核の青染色性は DNA と密接な関係があると思われる。黄染色性は RNA と逆の関係があるらしい。

稿を終るに当り、御指導と御校閲をたまわつ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

- ①Sheinin, J. J. & Davenport, H. A.: Staining differences of nuclei in hepatic cells, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 28: 574-575, 1931
 ②Parr, L. L., Mossberg, S. M., Rossenzweig, M. W., Breslar, E. I. & Clark, G.: An alteration in the nuclei of rat liver cells in starva-

tion, Anat. Rec., 116: 457-468, 1953 ③Parr, L. L., Mossberg, S. M., Breslar, E. I., Dasler, W. & Clark, G.: Alteration in the staining characteristics of rat liver and by tryptophan deficiencies. Anat. Rec., 125: 725-730, 1956

④Lison, L.: Staining differences in cell nuclei, Quat. J. Micro. Sci., 96: 227-237, 1955 ⑤Na-

gata, T.: Staining differences of nuclei in isolated liver cells of rat, Med. J. Shinshu Univ., 3: 257-263, 1958 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: 20-23, 1958 ⑦Nagata,

T.: Staining differences of nuclei in rat hepatic cells during DAB administration, Med. J. Shinshu Univ., 4: 543-547, 1959. ⑧White, J. C.: Proc. Biochem. Soc. Biochem. J., 47: 16, 1950 (Pearse, A. G. E.: Histochemistry, Theoretical and Applied, p530, 1954, J. & A. Churchill Ltd., London より引用)

ABSTRACT

1. Preparations of isolated acinar cells of the pancreas of a male rat were stained by means of a modified Mallory's stain.

2. The cellular nuclei were differentially stained: Some mononucleate cells contained blue nuclei, and the others did yellow ones. On the other hand binucleate cells had 3 types of differential staining; both blue nuclei, both yellow or one blue and the others yellow.

3. By DNase digestion, the blue nucleus disappeared completely in both mononucleate and binucleate cells, while the cells containing yellow or brown nucleus increased in number.

4. By RNase digestion, the number of cells containing the blue nucleus decreased in both mononucleate and binucleate cells, while the brown nucleus increased. The cells containing the yellow nucleus or nuclei did not change in number comparing with the control cells without RNase digestion.

5. From these results, it is concluded that a blue staining characteristic of the nucleus has a relation with DNA level and that a yellow staining characteristic is intensified by the decrease of nuclear RNA.

PLATE**Explanation of Plate**

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

Explanation of Figures

1. A mononucleate cell, right, and a binucleate cell, left, each containing blue nuclei. ×2440
2. A binucleate cell containing two blue nuclei. ×2440
3. A mononucleate cell containing a yellow nucleus. ×2440
4. A binucleate cell containing two yellow nuclei. ×2440
5. A binucleate cell containing one blue and one yellow nuclei. ×2440
6. A general view of the specimen stained after DNase treatment. Many nuclei are appear yellow and the others brown, while no blue nucleus is observable. ×1950
7. A general view of the specimen stained after RNase treatment. Most of nuclei are yellow or brown, and very few blue. ×1340
8. A binucleate cell containing one yellow and one brown nuclei in the specimen treated by DNase. ×2440

Abbreviations to the figures ;

B : blue nucleus

Y : yellow nucleus

Br : brown nucleus