

四塩化炭素による急性肝障害の肝細胞核分裂 に及ぼす影響

昭和40年7月3日 受付

信州大学医学部第1解剖学教室

(主任：尾持昌次教授)

平 野 格

Influence of Acute Carbon Tetrachloride Intoxication upon the Cell Division in the Hepatic Cells of Rats

Itaru Hirano

Department of Anatomy, Shinshu University School of Medicine

(Director: Prof. Sh. Omochi)

Münzer^①, Pfuhl^②以来、肝2核細胞と肝機能との関係が種々研究されている。当教室においても、尾持等の細胞分離永久標本作製法^③を用いて、百瀬^④、永田^{⑤⑥}等が実験を行ない、ベンチールイミダゾリンによる2核細胞数の増加、DAB(パラ・ジメチル・アミノアゾベンツオール)による無糸核分裂ならびに2核細胞数の減少を認めている。著者も前2回の実験^{⑦⑧}によつて催胆剤たるデヒコール、ウルソと排胆剤たる硫酸マグネシウムが、肝細胞の無糸核分裂、2核細胞数に及ぼす影響を見、またデヒコールによる2核細胞数の増加が、催胆作用の最盛時刻とよく一致することを実験により裏付けることができた。

前2回の実験では、肝細胞を刺戟して、催胆作用と共に無糸核分裂ならびに2核細胞数の増加を見たのであるが、今回は逆に肝臓毒として四塩化炭素を用いて、肝細胞に障害を与え、それによる肝細胞の変性と核分裂ならびに2核細胞の関係を調べることにした。

和田^⑨も四塩化炭素、ニコチン、バター・イエロウを用いて、ラツテに肝障害を起こさせ、2核細胞数を観察しているが、和田は四塩化炭素を与えても2核細胞数の数には、有意の変動はないといっている。著者は和田が用いたよりも、四塩化炭素の量を増加して、注射することとし、かつ抱合解毒作用をもつて、肝庇護剤とされているグロンサンを同時に注射した一群をも加えて、その影響をみることにした。なおこの肝障害実験については、大田原^⑩、村上^⑪、弓田^⑫、那谷^⑬等の実験法を参考とし、比較的大量を用いた。

研究材料および方法

体重約150gのWistar系のメスのラツテ55匹に、

毎朝午前9時から30分間人工基礎食10gを与え食べ残りの食餌は撤去するようにして、5日間飼育し、食餌の影響を均一になるようにした。

この55匹をK群5匹、A、B、C群各々15匹、D群5匹に分け、別に予備実験に用いたラツテ4匹をV群とした。

V群は本実験の約一ヶ月前に四塩化炭素を各々0.3, 0.4, 0.4, 0.5ccずつ筋肉内注射した群であつて、4週間後に殺し、後述の本実験群と同様に標本作製した。

K群は無処置群である。A群は四塩化炭素原液を0.5ccずつ筋肉内注射した群であつて、これを5匹ずつA₁, A₂, A₃の3群に分けた。

B群は四塩化炭素の50%オレーフ油溶液を0.5ccずつ筋肉内注射した群であつて、これをB₁, B₂, B₃の3群に分けた。C群は対照としてオレーフ油のみ注射した群であつて、これをC₁, C₂, C₃の3群に分けた。D群は、四塩化炭素原液0.5ccを右側背筋に筋肉内注射すると同時に、左側背筋に25%グロンサン溶液0.4cc(100mg)を筋肉内注射した群である。

本実験においては第1日の午前9時から30分間食餌を与えて後、午前11時から12時の間にK群を除く各群に上記の薬剤を注射し、K群は直ちに殺し、第2日には同時刻に食餌を与え、11時~12時にA₁, B₁, C₁の各群を殺し、第3日には同様にしてA₂, B₂, C₂, Dの各群を、第4日にA₃, B₃, C₃の各群を殺した。予備実験、本実験共に電気ショックで麻酔した後、心切開を加えて放血し、肝臓内側右葉の一部を取出し、これを2つの組織片に分け、その1つを尾持等による細胞分離永久標本^⑭に作製し、他の1つは、10%のFormalinで固定した後、一部はParaffin包埋後、

厚さ7 μ の連続切片に作製し、Haematoxylin-Eosin染色ならびに、P.A.S.染色を施し残りはCarbowax包埋後、Sudan III染色を施して、病理組織学的検査に供した。

研究成績

A) 細胞分離永久標本の観察

各個体毎に肝細胞1,000ヶずつを油浸装置で観察し、有糸核分裂、無糸核分裂(くびれ期、中隔期、離断期)2核細胞接触期、分離期I型(2核細胞の核縁間距離が核半径に等しいか、またはより小なるもの)、分離期II型(核縁間距離が核半径より大なるもの)、核変形(出芽型、1側陥凹型、鉤頭型等)^④、核変性(濃染、萎縮、溶解、崩壊)、細胞質脂肪変性の8つについて、出現頻度を調べた。以下各型について推計学的に

検討した結果を述べる。(B₁群の1匹が事故により注射後6時間以内に死亡し、B₁群が4匹になつたため、他の各群も2核細胞数が、その群の平均値より最もかけ離れた値を有する個体を除いて、4匹ずつに統一した。)各群各核形についての平均出現率を表1に示す。

1) 有糸核分裂

各群平均値の変動を図1で示した。全観察値につきE(実験)、T(時間)の2要因について、要因分析を行ない表2を得た。これによればTによる変動は1%の危険率で、Eによる変動は、5%の危険率でそれぞれ有意であり、有糸核分裂出現率が、A、B群において、C群より多いこと、また、A、B群において時間と共に増加していることは有意である。

なおA₃とV群では、出現率に有意の差は認められ

Table 1. Frequency of Respective Nuclear Types on the Basis of 1,000 Hepatic cells

| Nuclear Type | Group | K | C | | | B | | | A | | | D | V |
|--------------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 | | |
| Amitosis | | 3.00 | 4.50 | 4.25 | 5.00 | 2.25 | 0.50 | 0.50 | 2.75 | 0.50 | 0.25 | 1.75 | 0.75 |
| Binucleate Cell | | | | | | | | | | | | | |
| Total | | 158.00 | 192.75 | 194.00 | 174.75 | 160.25 | 58.75 | 34.75 | 177.50 | 54.00 | 31.25 | 159.25 | 69.75 |
| Contact Stage | | 17.50 | 21.00 | 17.75 | 27.75 | 22.50 | 12.00 | 5.00 | 37.75 | 12.00 | 6.00 | 33.25 | 4.00 |
| I Type | | 109.75 | 147.75 | 155.00 | 119.75 | 106.50 | 37.00 | 24.50 | 117.00 | 38.25 | 18.25 | 101.25 | 45.00 |
| II Type | | 30.75 | 24.00 | 22.25 | 27.25 | 31.25 | 9.75 | 5.25 | 22.75 | 3.75 | 7.00 | 24.75 | 20.75 |
| Mitosis | | 0.50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.75 | 6.75 | 0.50 | 1.50 | 5.25 | 2.00 | 0.50 |
| Nuclear Transformation | | 5.75 | 3.00 | 4.25 | 5.50 | 5.00 | 14.25 | 9.25 | 16.25 | 18.00 | 19.50 | 34.25 | 10.50 |
| Nuclear Degeneration | | 0.40 | 0.50 | 0.25 | 0.25 | 0.75 | 11.50 | 5.50 | 0.50 | 8.25 | 2.00 | 13.25 | 0.25 |
| Cytoplasmic Fatty Degeneration | | 18.75 | 7.00 | 1.50 | 19.00 | 239.75 | 239.50 | 171.50 | 16.25 | 211.75 | 454.50 | 470.75 | 14.50 |

K=Control, C=Olive-oil Inj., B=(Olive-oil 0.25+CCl₄ 0.25) Inj., A=CCl₄ 0.5 Inj., D=CCl₄ 0.5, Gulonsan 100mg Inj., V=CCl₄ 0.3~0.5 Inj. (4 Weeks Later)

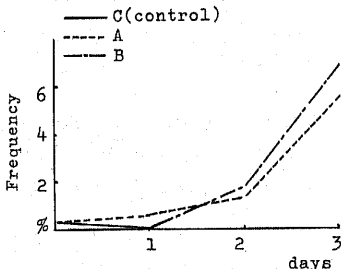


Fig. 1. Mitosis

Table 2. Factorial Design from the Fig.1.

| F | SS | DF | MS |
|---------|--------|----|---------|
| E | 57.55 | 2 | 28.78* |
| T | 100.72 | 2 | 50.36** |
| E x T | 53.45 | 4 | 13.36 |
| R (E T) | 216.50 | 27 | 8.02 |
| E T R | 428.22 | 35 | |

ず、一方 A₂ と D との間でも、その差は有意でなかつた。

2) 無糸核分裂

各期をまとめて各群の平均値の変動を、図 2 に示す。有糸核分裂と同様、E、T 2 要因について、要因分析を行なつて、表 3 を得た。

表 3 によれば E による変動は、1% の危険率で有意であるが、T による変動は、5% の危険率で有意でない。従つて図に示された時間的変動は、有意でないが、C 群と A、B 群との差は裏付けられている。以上から A、B 両群は、C 群に比して出現率の減少していることは、確かである。

無糸核分裂においても、有糸核分裂と同様 A₂ と D の出現率の差は有意でなく、また A₃ と V の間のその差も有意でない。

3) 2 核細胞接触期

各群平均値の変動を図 3 に、要因分析の結果を表 4 に示す。これによれば、E による変動は有意でないが、T による変動および E と T との交互作用項は有意である。すなわち注射後 3 日目の A、B 両群の出現率は C 群より少ないことが有意である。

4) 2 核細胞分離期 I 型

各群の平均値の変動を図 4 に、要因分析の結果を表

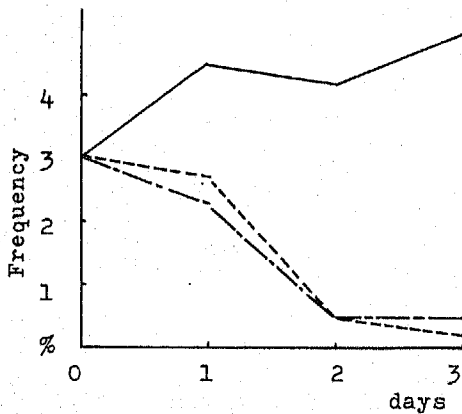


Fig. 2. Amitosis

Table 3. Factorial Design from the Fig. 2.

| F | SS | DS | MS |
|---------|--------|----|---------|
| E | 95.72 | 2 | 47.86** |
| T | 14.39 | 2 | 7.20 |
| E × T | 10.11 | 4 | 2.53 |
| R (E T) | 63.00 | 27 | 2.33 |
| E T R | 183.22 | 35 | |

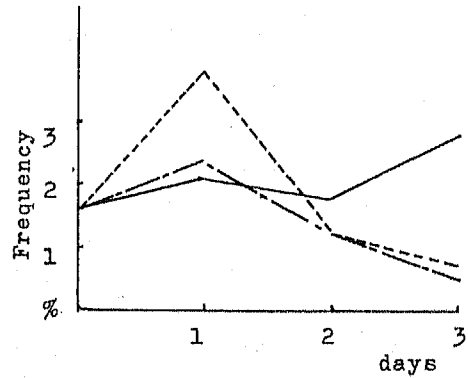


Fig. 3. Contact Stage of Binucleate

Table 4. Factorial Design from the Fig. 3.

| F | SS | DF | MS |
|---------|----------|----|----------|
| E | 476.17 | 2 | 238.09 |
| T | 1,464.00 | 2 | 732.00** |
| E × T | 1,646.33 | 4 | 411.58** |
| R (E T) | 2,229.25 | 27 | 82.56 |
| E T R | 5,815.75 | 35 | |

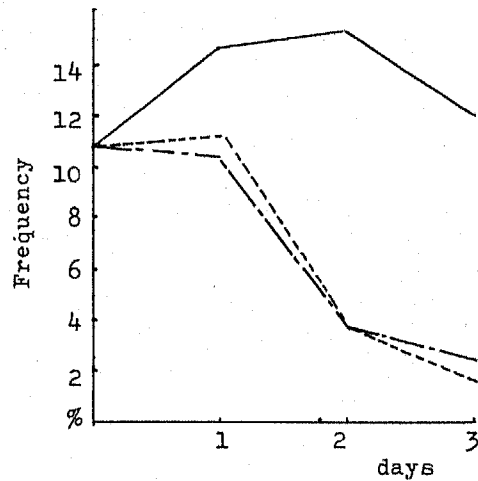


Fig. 4. Type I of Binucleate

Table 5. Factorial Design from the Fig. 4.

| F | SS | DF | MS |
|---------|---------|----|----------|
| E | 56,357 | 2 | 28,179** |
| T | 30,244 | 2 | 15,122** |
| E × T | 9,956 | 4 | 2,489** |
| R (E T) | 9,169 | 27 | 340 |
| E T R | 105,726 | 35 | |

5に示す。それによると、E、T、E×Tの交互作用はすべて1%の危険率で有意である。またA、B2群について同様に、E、Tについて要因分析を行なうと、Eの変動は $F_s < 1$ で有意でなくTの変動が $F_s = 49.12 > F_{18}^2 (0.01)$ で有意である。すなわちA、B両群共ほぼ同様の時間的変化を示しつつ時間と共に、C群より減少することが有意である。K、A₁、B₁、C₁のみについては、Eの差は、 $F_s = 1.86 < F_{12}^2 (0.05)$ であつて有意でない。すなわち注射後24時間においては、まだ実験による出現率の差は認められない。以上からA、B両群は2日後と3日後にC群に比して出現率の減少が、有意となるといえる。

一方A₃とVの間の出現率の差は、 $F_s = 8.67 > F_6^1 (0.05)$ で有意であり、V群はA₃群より出現率大であるといえる。またA₂とDとの間の差は、 $F_s = 30.46 > F_6^1 (0.01)$ で有意であり、Dの出現率(平均10.1%)はA₂群の出現率(平均3.8%)より多いといえる。

5) 2核細胞分離期Ⅱ型

各群の平均値の変動を図5に、要因分析の結果を表6に示す。Ⅱ型においてもⅠ型と同じく、実験による変動も、時間による変動も1%の危険率で有意である。すなわちA、B両群は、2日後、3日後においてC群より少ない出現率を示す。

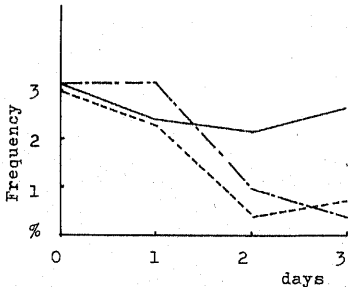


Fig. 5. Type II of Binucleate

Table 6. Factorial Design from the Fig.5.

| F | SS | DF | MS |
|---------|-------|----|-------|
| E | 1,175 | 2 | 588** |
| T | 1,458 | 2 | 729** |
| E×T | 925 | 4 | 231 |
| R (E T) | 2,597 | 27 | 96 |
| E T R | 6,155 | 35 | |

6) 核変形

各種の変形をまとめて、各群の平均値の変動を図6に示し、要因分析の結果を表7に示す。それによれば、Tの変動は有意でないが、Eの変動は1%の危険率で有意であり、A、B両群において、C群より増加していることがわかる。一方A₂とD群A₃とV群の間には、出現率に有意の差は認められない。

7) 核変性

平均値は、A₂、A₃、B₂、B₃がC₂、C₃より多いが、要因分析の結果によれば、E、Tいずれの要因による変動も有意でなかつた。(表8)

またA₂とD群、A₃とD群との間にも出現率に有意の差は認められない。

8) 細胞質脂肪変性

各群の平均値の変動を図7に、要因分析の結果を表

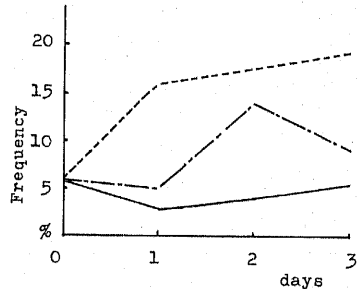


Fig. 6. Nuclear Transformation

Table 7. Factorial Design from the Fig.6.

| F | SS | DF | MS |
|---------|----------|----|----------|
| E | 1,140.72 | 2 | 570.36** |
| T | 113.39 | 2 | 56.70 |
| E×T | 91.78 | 4 | 22.95 |
| R (E T) | 1,175.00 | 27 | 43.52 |
| E T R | 2,520.89 | 35 | |

Table 8. Factorial Design of Nuclear Degeneration

| F | SS | DF | MS |
|---------|----------|----|--------|
| E | 188.72 | 2 | 94.36 |
| T | 230.72 | 2 | 115.36 |
| E×T | 136.78 | 4 | 34.20 |
| R (E T) | 1,059.00 | 27 | 39.22 |
| E T R | 1,615.22 | 35 | |

9に示す。

これによれば、要因Tによる変動は有意でなく、要因Eによる変動は、1%の危険率で有意である。

次にA、B両群のみについて要因分析を行なつたところ、こゝでもEによる変動は $F_S=8.60 \gg F_{18}^1(0.01)$ で有意であつた。よつて出現率は、 $A > B > C$ の順になることが確かめられた。

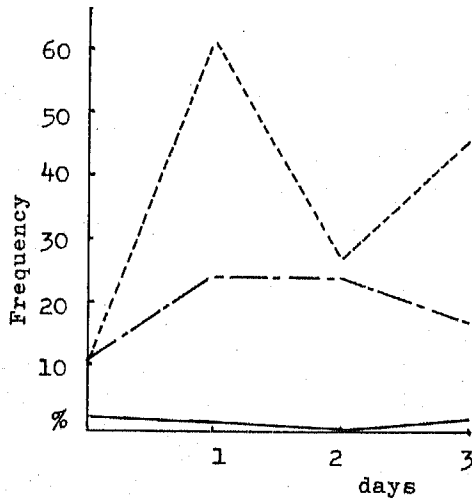


Fig. 7. Cytoplasmic Fatty Degeneration

Tabl. 9. Factorial Design from the Fig. 7.

| F | SS | DF | MS |
|--------|-----------|----|-----------|
| E | 1,050,032 | 2 | 525,016** |
| T | 112,350 | 2 | 56,175 |
| E × T | 232,282 | 4 | 58,071 |
| R (ET) | 557,524 | 27 | 20,649 |
| ETR | 1,952,188 | 35 | |

またA₂、D両群について、出現率の差の検定を行ない、 $F_S=7.52 > F_6^1(0.05)$ で有意であることを認めた。すなわちD群(平均値47.1%)は、A₂群(平均値21.2%)より出現率大である。

さらにA₃とVの両群について比較したところ、その差は、 $F_S=82.86 \gg F_6^1(0.01)$ で有意であり、V群(平均値1.5%)は、A₃群(平均値45.5%)より脂肪変性細胞が少ないといえる。

9) 無糸核分裂+2核細胞各型

今まで述べたごとく、無糸核分裂と2核細胞各型は、大体平行した変動曲線を示すので、これをまとめて平均値の変動および要因分析の結果を示したのが、図8および表10である。

表10によれば、E、T、N(核型)の各要因およびその相互の組合せによる相互作用による変動が、いずれも1%の危険率で有意である。

次にA、B2群のみについて、E、Tの2要因の分析を行なうと、Eについては、 $F_S < 1$ で有意でなく、Tは $F_S=71.03 \gg F_{18}^2(0.01)$ で有意である。

またK、A₁、B₁、C₁群についてEは、 $F_S > 1$ で有意でないことを確かめ得たので、これらの出現率は、注射後1日目は対照群と実験群との間に差はないが、2日目、3日目においてA、B両群共減少するといえる。

さらにA₂、B₂、D群について、出現率の差を検定すると、 $F_S=21.58 \gg F_{36}^2(0.01)$ で有意となり、D群(平均値16.1%)は、A₂、B₂群(平均値5.7%)より

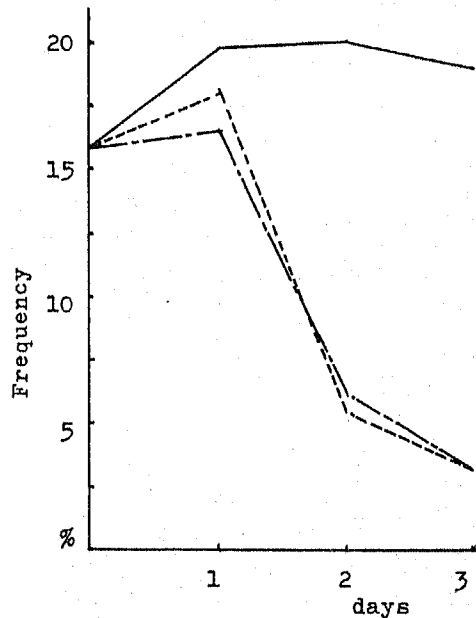


Fig. 8. Amitosis+Binucleate

Tabl. 10. Factorial Design from the Fig.8.

| F | SS | DF | MS |
|-----------|---------|-----|----------|
| E | 21,942 | 2 | 10,971** |
| T | 15,730 | 2 | 7,865** |
| N | 147,401 | 3 | 49,134** |
| E × T | 6,461 | 4 | 1,615** |
| E × N | 36,162 | 6 | 6,027** |
| T × N | 22,330 | 6 | 3,722** |
| E × T × N | 1,186 | 12 | 99 |
| R (ETN) | 14,069 | 108 | 130 |
| ETNR | 265,281 | 143 | |

多いといえる。A₃とVとの比較では、 $F_S=10.02 \gg F_{16}^1(0.01)$ でV群(平均値7.0%)は、A₃群(平均値3.2%)より多いといえる。

10) 核変形+核変性+細胞質脂肪変性

これらは、先の無核分裂2核細胞とほぼ反比例した出現率を示すので、これをまとめて要因分析を行なったが、表11のごとく、E, N, E×T, E×N, T×Nの各要因および、その相互作用が有意であり、E×T×Nの3重相互作用も有意である。Tのみは有意でなく、時間的変動は認められない。A, B両群についてのみ、要因分析を行なうと、TおよびE×Tは有意でなく、Eは $F_S=9.20 \gg F_{16}^1(0.01)$ で有意であり、したがって出現率は、A>B>Cであるといえる。A₂, B₂, Dの3群についての要因分析では、Eは $F_S=6.94 \gg F_{25}^2(0.01)$ で有意であり、A₂とB₂のみの比較では、Eは有意でないから、DはA₂, B₂両群より、これらの変化が多いといえる。

Tab. 11. Factorial Design from Nuclear Transormation and Fatty Degeneration

| F | SS | DF | MS |
|-----------|-----------|-----|-----------|
| E | 378,888 | 2 | 189,444** |
| T | 32,090 | 2 | 16,045 |
| N | 1,068,895 | 2 | 534,447** |
| E×T | 78,147 | 4 | 19,537* |
| E×N | 101,105 | 4 | 25,276** |
| T×N | 80,588 | 4 | 20,147* |
| E×T×N | 725,748 | 8 | 90,719** |
| R (E T N) | 559,758 | 81 | 6,911 |
| E T N R | 3,025,219 | 107 | |

また、A₃とVの比較では、Eは $F_S=85.51 \gg F_{16}^1(0.01)$ で有意であり、V群はA₃より変化が少ないといえる。

B) 切片標本の観察

先に記述したごとく、H.E.染色、P.A.S.染色、Sudan Ⅱ染色を施した3種類の標本について、各個体毎に観察したが、各群毎に大体同程度の変化を示したので、群毎の変化を、表12に示す。なお肝細胞障害等の各項目は、程度により(一)、(+), (++)、(###)の4段階に分けて記載してある。病変の分類は、Popper^⑩によって行なつた。

この表に示された通り、無処置のK群と、オリーブ油注射のC群には、殆ど変化は認められず、四塩化炭素を注射したA群とB群との間には、特に肝細胞障害程度に差は認められず、1日目より2日目に障害の程度が強くなり、3日目になるとやや回復することを感じて

ある。グロンサンを同時に注射したD群も、A₂, B₂群とほぼ同様な変化であるが、脂肪変性は、分離標本における観察と一致して多い感じである。

注射後4週間のV群において、病的変化は殆ど認められず、たゞグロブリンの減少が目立つ現象であつた。

考 察

前回、前々回の著者の実験で、催胆剤による肝細胞の刺激が、無核分裂および2核細胞の増加をもたらすことが、確かめられたので、逆に肝細胞を障害した時、これらが減少するのではないかということは、予想されるところである。

天野および安藤^⑨、和田^⑩は、発癌物質たるD.A.B.の投与によつて、2核細胞が減少するといっているが、無核分裂には、言及していない。

教室の永田^⑪はD.A.B.を投与して、無核分裂、有核分裂、2核細胞、核変形、偽2核細胞について観察しているが、それによれば、無核分裂と2核細胞は実験群で減少し、有核分裂、核変形は、増加の傾向があるとしている。

四塩化炭素を用いた実験では、前記せるごとく和田^⑩が、2核細胞に有意の変動なしとし、村上^⑫、BielawskiとBliczk^⑬がいずれも2核細胞が増加するとし、後者は無核分裂もこれと、並行して増加しているといっている。すなわち203例のマウスで、四塩化炭素投与後36時間で、無核分裂反応が頂点に達するというのが、これ等は恐らく投与量が少ないために、肝細胞を刺激して、反応性無核分裂を促進させたのでは、あるまいか。

Münzer^⑭は無核分裂を、細胞の変性と、死滅の徴候であると考え、Pfuhl^⑮は核の表面積を増加して、能力を増加するために、大核細胞や、多核細胞が生ずると考え、毒物刺激では、2核細胞が増すという。

著者の実験においては、先の永田と同様、無核分裂および、それに由来すると考えられる2核細胞は、四塩化炭素注射群において、A, B両群共、2日目、3日目に有意に減少している。分離期のI型、II型は共にほぼ同様の経過を示し、接触期は3日目に至つてはじめて減少している。先の永田の論文でも接触期には、実験群と対照群に有意の差を認めていないが、これは出現率が、比較的に低いためではなからうか。いづれにしても、無核分裂およびそれに由来する各核形共に、肝細胞の障害が高度のため、無核分裂が抑制されて、かゝる結果になつた様に思われる。病理学

的变化が、2日目、3日目に強いと、よく時間的にも一致して興味深い。

有糸核分裂は、逆に2日目、3日目に漸増している。これは細胞の変性と死滅に、適応した再生機転を思わせる。しかし2核細胞に増加の傾向なく、予備実験の4週間後をみても、なお少ないのは、2核細胞が有糸核分裂に由来するとの Beams と King¹⁰⁾、Wilson 等¹¹⁾の説を、打破するものであろう。

核変形の諸型については、主として観察されたのは、出芽型と一側陥凹型¹²⁾であるが、これらが表1、図6、7等を示すごとく、細胞質の脂肪変性と並行し、また有意の差は対照群との間になかったが、核の変性とほぼ並行的に2日目、2日目に増加が認められたのは、永田が推測するごとく⁶⁾肝細胞において、無糸核分裂の減少を代償するために起る現象なのであろうか。あるいは、退行変性の一型であろうか。分離標本における細胞質の脂肪変性出現率は、よく Sudan III 染色標本観察の結果と一致したが、グロンサン（以下Gと略す）を同時に注射したD群にA₂群より多いのは、如何なるわけであろうか。

Gは近年肝疾患の治療に、広く用いられているグルクロン酸の製剤である。その主な作用機序は、抱合解毒であるとされている¹³⁾¹⁴⁾。

その他Gは、田坂等¹⁵⁾によれば肝糖原量を増し、大島等¹⁶⁾によれば、四塩化炭素障害肝の膠原量増加を抑制し、小川¹⁷⁾によれば部分的肝切除後の残存肝組織の、再生を促進するなど多岐にわたつた実験が行なわれている。

しかし水田等¹⁸⁾によれば、家電における実験で、GはB.S.P.の胆汁内排泄をほとんど高めていないから、肝細胞賦活面は、微弱ではないかという。また、高橋¹⁹⁾はマウスにおいて、覚醒剤ヒロポンとGを用いての実験により、ヒロポンの急性、慢性いずれの肝障害においても、Gはこれを増強するという佐竹の報告を紹介している。一方川合は、四塩化炭素注射と同時に、Gを注射すると、肝細胞に脂肪滴はみられるが、核は濃縮その他の変性像に乏しく、肝細胞のGlycogen 蓄積量が比較的多いという²⁰⁾。

いずれにせよ著者の実験で、Gが無糸核分裂ひいて2核細胞の減少を抑制したこと、細胞質脂肪変性の増加ということと、相反するとはいえ、たしかな事実である。細胞の管理中枢たる核に、何か庇護的に作用しているのであろうか。肝糖原の減少に関しては、田坂等の実験¹⁵⁾に反し、B₂群と殆ど差はなかつたが、これは投与四塩化炭素の量が多いことによるのかも知れない。

予備実験4週後の群において、表のごとく軽度の細胞浸潤と、脂肪変性がみられるのみでありながら、肝糖原の減少が相当に存在し、無糸核分裂、2核細胞数も少ないのは、肝障害が残存しているためとも考えられるが^{①②③④}、また食餌の影響があるのかも知れない^{①②③④⑤}。

結 論

- 1) 障害肝の無糸核分裂、2核細胞の各型は、いずれも対照肝に比して、注射後2日目、3日目に減少する。
- 2) 障害肝の有糸核分裂、核変形、細胞質脂肪変性は、前者と逆比例して、注射後2日目、3日目に増加する。核変性については、有意の差は認められなかつた。
- 3) 切片標本における病理組織学的諸変化は表12のごとく、注射後1日目は軽度であり、2日目、次いで3日目において高度である。
- 4) 以上の観察結果から、肝細胞障害は、無糸核分裂と、それに由来する2核細胞を減少させ、一方肝障害によって、死滅した細胞を補充するため、有糸核分裂、核変形を増加させると考えられる。
- 5) グロンサン同時投与群において、相当の病的組織変化殊に脂肪変性を起こしながら、2核細胞数に有意の減少が認められないのは、グロンサンの肝細胞核の機能に対する庇護作用を、示すのであろう。
- 6) 予備実験の、4週間後の肝において、肝糖原の減少以外、病理組織的变化が軽微なのに、2核細胞数が少ないのは、肝細胞障害の残存、食餌の影響等が考えられる。

総 括

予備実験としてラツテ4匹を用いて、四塩化炭素0.3~0.5ccを筋肉内注射し、いずれも死亡しないことを確かめた後、4週間後に屠殺。次に本実験としてラツテ55匹を用い、これをK、A、B、C、Dの5群に分け、実験第1日に、A群には四塩化炭素原液0.5ccを、B群には四塩化炭素の50%オレーフ溶液0.5ccを、C群には単にオレーフ油0.5ccを筋肉内注射し、D群には四塩化炭素原液0.5ccを右背筋に注射すると同時に、G 100mgを左背筋に注射した。

K群は無処置のまま他群の注射終了直後に屠殺し、24時間後A₁、B₁、C₁群を、48時間後A₂、B₂、C₂、D群を、72時間後A₃、B₃、C₃群を屠殺した。予備実験、本実験共に、肝臓の内側右葉の一部を切除し、その一部は尾持等の細胞分離永久久標本に作製し、

残余は連続切片標本に作製して、H.E.染色、P.A.S.染色、Sudan II染色を施し病理組織学的変化を観察した。分離標本においては、肝細胞1,000ヶずつを観察し、各核形、核変性および細胞質脂肪変性の出現率をしらべ、下記のごとき結果を得た。

1) 病理組織学的変化は、表10に示すごとく、A、B、C群に肝細胞障害強く、特にA₂、A₃、B₂、B₃、D群、に著しい。V群は糖原の減少だけが特徴的である。

2) 有糸核分裂は、C群に比しA₂、A₃、B₂、B₃、D群に有意に多い。殊にA₃、B₃群に著しい。これは肝細胞の死滅に対する再生機転を示す。(図1、表2)

3) 無糸核分裂および2核細胞の分離期I型、II型は、いずれも2日目、3日目において、実験群の出現率が有意に減少している。またこれらの3つの核形は、対照群、実験群共相似の曲線を有している。(図2、4、5、表3、5、6) これは2核細胞のI型、II型が共に無糸核分裂に由来することを示すと共に、肝細胞障害により、無糸核分裂機能が抑制されたことを意味している。

4) 接触期は少しく異つた曲線を示すが、3日目に実験群において減少を示している。(図3、表4)

5) 核変形は、細胞質脂肪変性とほぼ並行的な出現率曲線を有し、共に実験群で有意に多い。(図6、7、表7、8) これは核変形が、核変性の一つの現われか、または無糸核分裂の代償を示すか、いずれかであることを示唆する。

6) D群は、組織学的変化が、A₂、B₂群とほとんど変わらないか、むしろ強いのに、垂糸核分裂および2核細胞の出現率は、対照群と有意の差がない。一方細胞質脂肪変性の出現率は、A₂群より有意に多い。

7) 予備実験後、4週間の肝において、病理組織学的変化は、糖原の減少以外は、ほとんど認められないのに、2核細胞数が少ないのは、肝障害の残存、食餌の影響等が考えられる。

稿を終るに当つて、本研究に指導と校閲を賜つた尾持教授、永田助教授ならびに御教示を頂いた病理学教室、間宮講師、御協力頂いた当教室員各位に、深甚な謝意を表します。

文 献

- ①Münzer, F. T.: Experimentelle Studien über die Zweikernigkeit der Leberzellen, Arch. mikroskop. Anat. und Entwickl., 104: 138-184, 1925
- ②Pfuhl, W.: Die mitotischen Teilungen der Leberzellen im Zusammenhang mit den allgemeinen Fragen über Mitose und Amitose, Z. anat. Entwickl., 109: 99-133, 1938
- ③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
- ④百瀬節生: 肝細胞の無糸核分裂に関する研究. II 薬物投与による細胞分裂数の変動, 解剖誌, 34: 205-210, 1959
- ⑤Nagata, T.: Effect of DAB Administration upon the Cell Divisions in the Hepatic Cells of Rat, Med. J. Shinshu Univ., 4: 457-468, 1959
- ⑥Nagata, T.: Staining Differences of Nuclei in Rat Hepatic Cells during DAB Administration, Med. J. Shinshu Univ., 4: 543-547, 1959
- ⑦平野 格: 利胆剤の肝細胞核分裂に及ぼす影響(I), 信州医誌, 13: 435-441, 1964
- ⑧平野 格: 利胆剤の肝細胞核分裂に及ぼす影響(II), 信州医誌, 14: 174-180, 1965
- ⑨和田 寛: 2核性細胞についての実験的研究, 和歌山医学, 10: 501-510, 1959
- ⑩大田原一洋・緒方正名: 四塩化炭素中毒時における蛋白合成の研究. 特に濾紙電気泳動法について, 産業医学, 3: 211-212, 1961
- ⑪Murakami, F.: Über die Häufigkeit des Auftretens von zweikernigen und grosskernigen Zellen in der Leber der Maus in verschiedenen abnormen Zuständen, Arch. Histol. Jap., 18: 463-471, 1959
- ⑫弓田 守: 実験的肝障害家兎に対する諸種強肝剤の予防的並びに治療的效果について, 通信医学, 10: 974-980, 1958
- ⑬那谷賢治: 諸種化学物質中毒時のマウス肝小葉内における障害部位と毛細血管の態度との関係について, 日消会誌, 55: 859-871, 1958
- ⑭Nagata, T.: On the Existence of the Nuclear Transformation, especially of the Pseudobinucleate Cells in the Hepatic Cells of Normal Rats, Med. J. Shinshu Univ., 4: 179-183, 1959
- ⑮Popper, H., Schaffner, F.: Liver, Structure and Function, McGraw-Hill Book Company, New York, 200-214, 1957
- ⑯Amano, S. and Ando, T.: Das Verhalten der Chromosomen bei experimenteller Hepatomerzeugung, Gann, 34: 169-172, 1940
- ⑰Bielawski, D., Bilczuk, B.: Behaviour of Cells Containing Two Nuclei and Mitotic Reaction in Regenerating Mouse Livers, Zakl. Patol. Ogóln. i Doświadcz. A. M., Gdańsk, 12: 21-31, 1961
- ⑱Beams, E. V., King, R. L.: The Origin of Binucleate and Large Mononucleate Cells in the Liver of the

Rat, *Anat. Rec.*, **83**: 281-297, 1942 @Wilson, J. W., Leduc, E. H.: The Occurrence and Formation of Binucleate and Multinucleate Cells and Polyploid Nuclei in the Mouse Liver, *Amer. J. Anat.*, **82**: 353-391, 1948 @グルクロン酸の基礎ならびに臨床研究の概要, 中外製薬, 東京, 27-43, 1964 @松下隆一: グルクロン酸の組織化学的研究, 岩手医誌, **13**: 778-791, 1961 @田坂定孝・他: グルクロン酸の実験的臨床的研究, 総合医学, **9**: 679-686, 1952 @大島良雄・二宮周一郎: CCl₄ 障碍肝膠原量におよぼすグルクロン酸の影響, *Advances in Glucuronic Acid Research*, (1955-1959), 149, 1960 @水田信夫・水田実: 強肝剤その薬理と臨床, 金原出版, 京都, 107-108, 1961 @Rubinstein, D.: Epinephrine Release and Liver Glycogen Levels after Carbontetrachloride Administration, *Amer. J. Physiol.*, **203**: 1033-1037, 1962 @伊藤陽子: 実験的肝障害同時の糖原の変動の年齢的差異, 新潟医学, **75**: 1204-1219, 1961 @百瀬節生: 肝細胞の無糸核分裂に関する研究 I, 解剖誌, **34**: 199-204, 1959 @百瀬節生: 肝細胞の無糸核分裂に関する研究 IV, 信州医誌, **8**: 537-541, 1959 @百瀬節生: 肝細胞の無糸核分裂に関する研究 V, 信州医誌, **8**: 609-613, 1959 @高橋皖正: 強肝保健薬批判の根拠, 日本医事新報, **2085**: 22-29, 1964 @高橋皖正: 肝臓薬は効くか, 自然, **17** (5): 28-35, 1962 @川合貞郎: 実験的肝傷害に対するグルクロン酸の影響, 中外製薬, **17** (7): 16-20, 1964 @小川恕人: 成長ならびに組織再生におよぼすグルクロン酸の影響, *グルクロン酸研究会報告集*, (1955-1959): 25-31, 1960

ABSTRACT

For the purpose of studying the influence of acute carbon tetrachloride (CCl₄) in toxication upon the cell division of liver, the following experiments were performed.

Preliminary Experiment: 0.3-0.5 ml. of CCl₄ were injected intramuscularly into 4 albino rats, respectively. All the animals survived the experiment and were sacrificed 4 weeks after the injection.

Main Experiment: 55 albino rats were divided into 5 groups K, A, B, C and D. Animals of the groups A and B were injected

intramuscularly with 0.5 ml of CCl₄ (A) or 0.5 ml of 50% solution of CCl₄ in olive oil (B), animals of the group C were injected with 0.5 ml of olive oil as the control, those of the group D with 100 mg of glucuronic acid and 0.5 ml of CCl₄ simultaneously, while those of group K were remained untreated as the initial control.

The animals of group K were sacrificed at the start of the experiment, while those of A, B, C were sacrificed at 24 hour intervals for three times successively after simultaneous administration with the above medicines, and those of D 48 hours after the injection, in groups of five, respectively.

In both the preliminary and the main experiments, permanent preparations of the isolated hepatic cells were made according to the method by Omochi et al., on which the frequencies of cell divisions, (classifying into the mitotic cells, the amitotic cells and the binucleate cells), the cells in the nuclear transformation, the nuclear degeneration and cytoplasmic fatty degeneration were counted on the basis of 1000 cells, respectively.

The other pieces of the livers were fixed in 10% formalin, cut serial sections, stained with hematoxylin and eosin, PAS or Sudan III. These specimens were examined histologically on morphologic changes, glycogen contents and fat deposit.

The results obtained are as follows.

1) Histological finding are listed in Table 12., which shows remarkable hepatic damages in the groups A, B and D. The animals of group V were found to show only glycogen reduction.

2) Mitotic cells were significantly increased in the animals of groups A₂, A₃, B₂, B₃ and D (Table 2, Fig. 1), which is considered to show the regeneration against the degeneration.

3) Both amitotic cells and binucleate cells in the separating stage decreased significantly in the animals of the experimental groups (Tables 3, 5, 6, Figs. 2, 4, 5). Their

decrease was parallel with the hepatic cell damages, which should suggest the suppression of amitosis by the damages.

4) Although binucleate cells in the contact stage tended to decrease in the experimental groups, no significant difference was proved between the experimental and normal groups. However, the variances by factor T or by interaction of two factors TXE were significant (Table 4, Fig. 3).

5) The frequency curves of the nuclear transformation were similar to those of the cytoplasmic fatty degeneration, which showed increases of both phenomena in the experimental animals (Tables 7, 8, Figs. 6, 7). The increase of nuclear transformation should

suggest to show either a sign of the nuclear degeneration or a compensation for the decrease of amitosis.

6) No significant difference was found histologically between the animals of groups D and A₂, notwithstanding that the frequencies of binucleate cells as well as of cytoplasmic fatty degeneration were frequent in the group D (Tables 1, 12).

7) In the preliminary experiment, both the reduction of glycogen contents in the cytoplasm and the decrease in the frequency of binucleate cells were observed. These results are considered to be due to the liver injury or the effect by the diet (Tables 1, 12).