

利胆剤の肝細胞核分裂に及ぼす影響 (II)

昭和40年5月11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)

平野 格

Influence of a Choleretic upon the Cell Division
in the Hepatic Cells of Rats (II)

Itaru Hirano

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

著者の前回の論文^①でも述べたごとく、肝細胞の機能とその無糸核分裂ならびに2核細胞とは密接な関係を有するようと思われる。

この関係については、Münzer^{②③}、Jacobj^④、Pfuhl^⑤、Beams^⑥、Wilson^{⑦⑧}等の外国の諸研究がある。これ等の文献によれば、2核細胞の起源について、Münzerは無糸核分裂に由来するとし、Pfuhl以下は有糸核分裂によつて生ずるとし、Jacobjはそのいずれによつても生じるといふ。Münzerは2核細胞数は、動物の種類および年齢によつて一定しており、その動物の生理的条件によつて変動するとし、無糸核分裂は細胞の変性と死滅の徴候であるといふ。Pfuhlもまた、毒物や温熱の刺激に反応して、多核細胞と大核細胞が増加して来るといつている。

当教室においても尾持等の細胞分離永久標本作製法^⑨を用いて、永田^{⑩⑪⑫}、百瀬^⑬が肝細胞の刺激、部分的肝切除、D. A. B. 投与等に対する肝細胞の反応性無糸核分裂および2核細胞出現率の変化を観察している。

著者は前回の実験において、デヒドロコール酸ナトリウム(以下D. H. C. と略す)、ウルソデスオキシコール酸、硫酸マグネシウムの3者をラツテに投与して、24時間毎に72時間まで無糸核分裂および2核細胞各型の出現率を観察し、D. H. C. 皮下注射後24時間群において、2核細胞総数と2核細胞分離期が対照群より有意に多いことを認めたので、D. H. C. の催胆作用が最も強い1時間以内において、胆汁排出曲線と無糸核分裂ならびに2核細胞出現率と相関性があるか否か検討するため、今回の実験を試みた。また同時に、核変形および細胞質の空胞形成を示す細胞の出現率をも観察して、排胆曲線ならびに2核細胞出現率との関係を考察することとした。

研究材料および方法

材料としては、体重約150gのWister系の雌のラツテ25匹を用意し、実験前1週間、毎朝午前9時から30分間人工基礎食10gずつを与え、残つた食餌は撤去するように習慣づけて、食餌の影響を均一にするようにした。

このラツテ25匹を5匹ずつ5群に分け、一群を無処置対照群(0群)とし、他の4群を注射群として、I・II・III・IV群に分けた。

実験当日は食餌を与えず、午前9時に、0群を除く各群のラツテに、5%のD. H. C. を2ccずつ背部の皮下へ注射し、その直後に0群を、15分後にI群を、30分後にII群を、45分後にIII群を、60分後にIV群を、各々電気ショックにより麻酔した後、心切開を加え放血して屠殺し、肝臓内側右葉の一部を摘出した。各組織片は2つに分けて、その1ヶは尾持等による細胞分離永久標本に作製し、他の1ヶは1% Formalin で固定後、厚さ8μの連続Paraffine切片に作製し、Hematoxyline-Eosine 染色を施して、病理組織学的観察に用いた。

研究成績

細胞分裂の観察は分離永久標本において行ない、各個体毎に肝細胞2,000ヶずつを観察し、無糸核分裂(くびれ期・中隔期・分離期)、2核細胞(接触期・分離期のI型および同II型…核半径を r とし、核縁間距離を d とした時、接触期は $d=0$ 、分離期のI型は $0 < d \leq r$ 、同II型は $d > r$ とする)、3核細胞、核変形(歪輪型・出芽型・側陥凹型・その他)、有糸核分裂(前期・中期・後期・終期)に分けて、その出現率を求め、また細胞質中に空胞形成を示す肝細胞を観えた。その結果を2,000ヶ中の実数としてTab. 1に

Table 1. Frequency of cell division on the basis of 2 000 cells

animal	nucl.	amitosis				binucleate cells					trinucleat. cells	nucl. transf.	mitosis	vesicle in cyt. pl.
		cons.	sept.	div.	total	cont.	separating			total				
							I	II	total					
0 1	0	0	4	4	21	288	110	398	419	1	2	1	36	
0 2	0	0	11	11	42	264	44	308	350	1	4	1	48	
0 3	0	0	6	6	20	276	84	360	380	1	4	2	145	
0 4	0	0	7	7	17	257	70	327	344	1	6	1	91	
0 5	0	0	4	4	18	149	77	226	244	0	7	0	415	
I 1	0	0	7	7	17	193	85	278	295	0	9	1	170	
I 2	0	0	6	6	32	257	76	333	365	0	4	0	239	
I 3	0	0	7	7	23	313	68	381	404	0	21	0	31	
I 4	0	0	10	10	26	280	31	311	337	0	4	0	64	
I 5	0	0	8	8	26	235	30	265	291	1	6	0	246	
II 1	0	0	16	16	45	415	103	518	563	1	12	0	111	
II 2	0	0	3	3	27	284	60	344	371	0	4	1	260	
II 3	0	0	8	8	22	256	59	315	337	0	6	0	15	
II 4	0	0	6	6	35	330	72	402	437	0	10	1	62	
II 5	0	0	12	12	57	363	64	427	484	2	3	6	53	
III 1	0	0	0	0	17	224	100	324	341	9	5	2	112	
III 2	0	0	4	4	32	184	68	252	284	0	10	3	642	
III 3	0	0	6	6	23	279	61	340	363	0	6	1	138	
III 4	0	0	7	7	28	249	38	287	315	0	4	1	92	
III 5	0	0	7	7	36	289	54	343	379	0	8	5	143	
IV 1	0	0	5	5	15	250	57	307	322	1	6	1	517	
IV 2	0	0	9	9	18	252	54	306	324	0	5	0	137	
IV 3	0	0	2	2	27	303	69	372	399	1	4	3	155	
IV 4	0	0	11	11	33	394	109	503	539	0	11	1	149	
IV 5	0	0	5	5	21	289	88	377	398	0	2	2	94	

示す。

先ず、この表において同一群間における2核細胞数のかけ離れた値、すなわち05の244、I3の404 II1の563、II2の281、IV4の539についてSmirnofの棄却検定を行なつてみたが、いずれも棄却できる値ではなかつた。

次に出現の稀である3核細胞を除外した後、無糸核分裂・2核細胞・核変形・有糸核分裂の5つの核形(N)と時間(T)について要因分析を行ない、Tab. 2を得た。これによれば、核形の差による変動は1%の危険率で有意であるが、時間の変動は有意でない。

I) 無糸核分裂および2核細胞各型

2核細胞各型の平均値の時間的変動を Fig. 1 に、無糸核分裂の平均値の時間的変動を Fig. 2 に示す。この図によると、時間的変動があるように思われるの

Table 2. Factorial design of the table 1 (except trinucleat. cells)

Factor	SS	DF	MS
N	2,519,113.92	4-1=3	839,704.64**
T	10,520.76	5-1=4	2,630.19
N×T	29,611.08	3×4=12	2,467.59
R(N,T)	95,765.21	99-19=80	1,197.19
NTR	2,655,010.95	100-1=99	

N: Nuclear Type T: Time
 $N: F_S = 701.40 > F_{80}^3 (0.01) = 4.04$
 $T: F_S = 2.20 < F_{80}^4 (0.05) = 2.48$
 $N \times T: F_S = 2.06 < F_{80}^{12} (0.05) = 2.41$

で、無糸核分裂、2核細胞接触期、分離期I型、同II型の4核形(N)とTについて要因分析を行なつて、

Tab. 3を得た。この表によればTは5%の危険率で、Nは1%の危険率で有意である。すなわち時間的変動があるといえる。

次いで2つずつの群をとり出して、上と同じく無糸核分裂に由来すると思われる4つの核形について群間の変動の有意性を検討した。0(対照群)とII(注射後30分群)間の変動の要因分析表がTab. 4であり、T, N, T×Nの3要因共 各々5%, 1%, 5%の危険率をもつて有意である。

Fig. 1. Binucleate cells

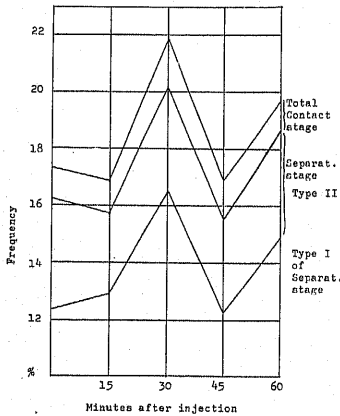


Fig. 2. Amitosis

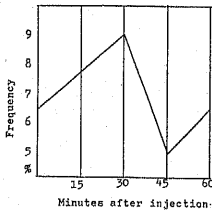


Table 3. Factorial design on the variations of amitosis and binucleate cells

Factor	SS	DF	MS	FS
T	10,493.7	5 - 1 = 4	2,623.4*	2.99
N	1,134,940.3	4 - 1 = 3	378,313.4**	430.85
T×N	19,315.8	4 × 3 = 12	1,609.7	1.83
R(TN)	70,244.8	99 - 19 = 80	878.1	
TRN	1,234,994.6	100 - 1 = 99		

危険率をもつて有意である。同様にII(注射後15分群)とIについて、要因分析を行なったのが、Tab. 5であり、こゝでもT, N, T×Nの3要因共それぞれ5%, 1%, 5%の危険率をもつて有意である。またIIとIII(注射後45分群)についての要因分析表がTab. 6であり、T, N, T×Nの3要因共1%, 1%, 5%の危険率をもつて有意である。

他の組合せ、すなわち0とI, 0とII, 0とIV(注射後1時間群), IとIII, IとIV, IIとIV, IIIとIVの間の要因分析では、いずれも要因Nは1%の危険率で有意であるが、要因TとT×Nは有意ではない。

よつて無糸核分裂と2核細胞各型はD, H, C. 注射後30分において、注射前ならびに注射後15分より増加し、注射後45分に至つて再び減少するということができる。

Table 4. Factorial design on the variations of amitosis and binucleate cell between 0- and II-groups

Factor	SS	DF	MS	FS
T	5,475.6	2 - 1 = 1	5,475.6*	5.25
N	494,430.9	4 - 1 = 3	164,810.3**	157.92
T×N	12,216.2	1 × 3 = 3	4,072.1*	3.99
R(TN)	33,396.4	2 × 4 × 4 = 32	1,043.6	
TRN	545,519.1	40 - 1 = 39		

Table 5. Factorial design on the variations of amitosis and binucleate cells between I- and II-groups

Factor	SS	DF	MS	FS
T	6,426.3	2 - 1 = 1	6,426.3*	7.05
N	514,886.1	4 - 1 = 3	171,628.7**	188.29
T×N	8,239.1	1 × 3 = 3	2,746.4*	3.01
R(TN)	29,168.4	2 × 4 × 4 = 32	911.5	
TRN	558,719.9	40 - 1 = 39		

Table 6. Factorial design on the variations of amitosis and binucleate cells between II- and III-groups

Factor	SS	DF	MS	FS
T	7,049.0	2 - 1 = 1	7,049.0*	8.13
N	493,680.3	4 - 1 = 3	164,560.1**	189.67
T×N	11,274.9	1 × 3 = 3	3,758.3*	4.33
R(TN)	27,763.6	2 × 4 × 4 = 32	867.6	
TRN	539,767.8	40 - 1 = 39		

最後に無糸核分裂と2核細胞の個々の核形について、同様2群ずつとり出して、次のごとくt分布を用いて、平均値の差の検定を行なった。

1) 無糸核分裂

$$t_s(0, II) = 1.00 \quad t_s(I, III) = 1.90$$

$$t_s(II, III) = 1.61$$

以上の値はいずれも $n=8$ における $t_0(0.05) = 2.306$ より小であり、その差は有意でない。

2) 2核細胞接触期

$$t_s(0, II) = 1.73 \quad t_s(I, II) = 1.84$$

$$t_s(II, III) = 1.41 \quad t_s(II, IV) = 1.88$$

これらの値も有意ではない。

3) 2核細胞I型

$$t_s(0, II) = 2.20 \quad t_s(0, IV) = 1.41$$

$$t_s(I, II) = 2.13 \quad t_s(I, IV) = 1.23$$

$$t_s(II, III) = 2.48^* \quad t_s(III, IV) = 1.63$$

以上からII群はIII群より有意に多く、また $t_s(0, II) = 2.20$ は $t_s(0.05) = 2.306$ に非常に近いから、標本数増加により有意となりそうである。

4) 2核細胞II型

$$t_s(0, I) = 1.13 \quad t_s(0, III) = 0.80$$

$$t_s(I, IV) = 1.13$$

以上いずれも有意ではない。

以上の結果から先に認められたII群における(無糸核分裂+2核細胞)の増加は、I型の増加によることが確かめられた。

II) 有糸核分裂

I) と同様に行なったTについての要因分析の結果は $F_s < 1$ であつて、時間的変動は認められない。

III) 核変形

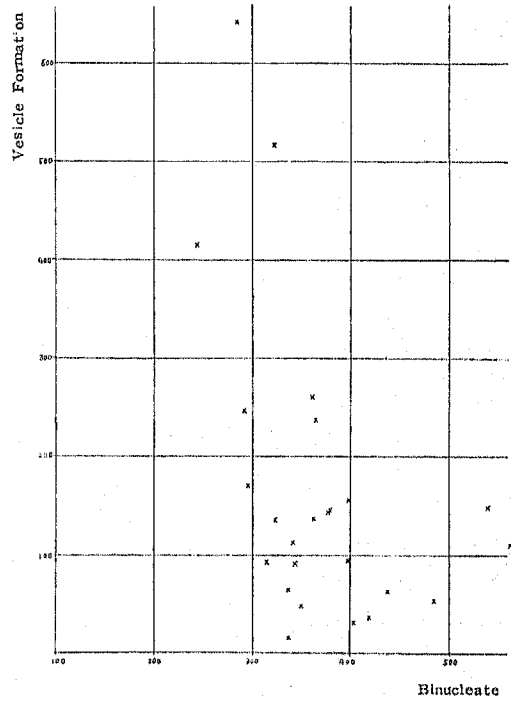
T・Nについての要因分析を行なった結果、Nの変動は1%の危険率で有意であり、出芽型は一側陥凹型より多いといえる。しかしTについては有意ではなく、時間的変動は認められず、またT×Nも有意ではない。

IV) 細胞質空胞形成

この出現率に関して Tab. 1 はの右端に示したごとくであるが、出現率の高い標本は2核細胞数が少ない様に感じられるので、両者の関係を相関図表として Fig. 3 に示す。次に各個体の値より相関係数 r を求めると $r = -0.4467$ となり、 $F_0 = r^2(N-2)/(1-r^2) = 5.73 > F_{23}^1(0.05) = 4.23$ が得られて、5%の危険率で両者の間に有意な負の相関関係があるといえる。

なお分離標本で空胞形成の多いラツテでは、切片標本においても同様に多くの空胞形成細胞が認められたから、この現象は分離標本作製中の人工産物ではな

Fig. 3. Correlation between the frequencies of binuclearity and vesicle formation



く其の空胞変性乃至は脂肪変性であろうと考えられる。

考 察

胆汁酸ならびに D. H. C. の性質については、すでに第1報^①で述べたのでここには省略する。

D. H. C. を注射した場合の催胆作用については多くの人の実験がある。すなわち水田^②は総胆管瘻を作製した家兎に20% D. H. C. 1~2cc を注射し、15分毎に胆汁量を測定して、0~15分で最高となり、30~45分その効果が持続するという。また赤間^③はマウスに20% D. H. C. 0.2cc を尾静脈より静注して、胆汁量は10~20分で最高となり、30分頃から減少し始めるという。一方工藤等^④は15kgの雑種成犬数頭に胆汁瘻を造設して、10% D. H. C. 1~10cc を静注したところ、胆汁量は1~3分後より増加し、5~30分で最高となり、少量では約1時間、大量では約2時間、その効果が持続するという。さらに山形^⑤は2.1~2.6kgの家兎に10% D. H. C. 1cc/kg 静注し、総胆管瘻より10分毎に胆汁を採取したが、胆汁量は20分で最大値を示し、その増加率は平均21.7%であり、一方胆色素は20分で最低値を示し、その減少率は平均81.5%であり、

D. H. C. の効果は2時間持続するという。高橋^⑥も犬で山形とは同様の成績を得ている。

催阻作用に関する上記の諸文献の結果より類推すれば、5%のD. H. C. 2ccを筋肉注射した本実験のラツテも25~30分位で胆汁分泌最盛期を迎えたものと思われる。注射後30分のⅡ群において、無糸核分裂および2核細胞各型が他群より有意に多いのは、この胆汁分泌最盛期とよく一致していると認められる。無糸核分裂のみではⅡ群と他群との間に有意差が認められないが、2核細胞が無糸核分裂に由来することは尾持等^⑧の研究で明らかであり、D. H. C. による肝細胞の刺激が反応性に無糸核分裂、更に2核細胞の増加をもたらしたものと考えることができる。なお2核細胞増加の主体をなすものは分離期Ⅰ型の細胞である。

有糸核分裂においては、有意の時間的変動はないが、群別の平均値では、Ⅲ群すなわち45分後において最も多く、このⅢ群は一方2核細胞総数平均値が最も少ない。

無糸核分裂平均値はほぼ2核細胞数平均値と並行して増減しており、上記の有糸核分裂の態度はBeams^⑨、Wilson^⑦等が主張するとき「2核細胞は有糸核分裂の経過中、核は分裂したが分裂すべき2つの娘細胞が欠如したものである」との説に相反する所見である。

またMünzer^④の主張する「無糸核分裂は細胞の変性と死滅の徴候である」という説も、著者の前回の実験^①と今回の実験が細胞機能亢進をもたらすD. H. C. を用いて無糸核分裂と2核細胞の増加をみた点から考えるとあらゆる場合に適用されるべきものではない。

核変形については有意の時間的変動は認められず、平均値ではⅠ群が多いがその意義は不明である。

最後に興味あることは、細胞質に空胞を有する細胞の出現率と2核細胞の出現率が負の相関係を示すことである。この細胞質の空胞が何であるかは、次回の肝障害実験において、Sudan Ⅲ染色およびPAS染色を併用して調査する予定であるが、一応退行的変化恐らく脂肪変性が予想される。前回の実験でもかかる標本に2核細胞数の少ない傾向は認められており、肝細胞質の退行変性によつて無糸核分裂が障害され、ひいては2核細胞出現率の低下を来したものと考えてよいと思う。

結 論

- (1) 有糸核分裂は前回の実験よりは多く認められたが、比較的稀であり、有意の時間的変動はない。
- (2) 無糸核分裂および2核細胞各型はD. H. C.

注射後時間的変動が認められ、注射後30分において、注射前、注射後15分および45分の出現率より多いといえる。これは文献による胆汁分泌最盛期とよく一致する。増加の主体をなすものは分離期Ⅰ型の細胞である。

無糸核分裂のみの出現頻度曲線も2核細胞各型の同様曲線と相似である。

(3) 核変形については、時間的な変動は認められぬが、出芽型は一側陥凹型より有意に多い。

(4) 2核細胞数の増加は肝細胞の胆汁分泌機能亢進に基づく反応性無糸核分裂によると考えられる。

(5) 肝細胞質に空胞を形成する細胞が多い標本では、それが少ない標本より2核細胞出現率が低く、両者の間に有意な負の相関関係が認められ、恐らく脂肪変性による無糸核分裂の抑制が存在すると考える。

要 約

ラツテ5匹をもつて1群とし、その1群を無処置対照群とし、4群に5%のD. H. C. を2ccずつ筋肉注射し、注射前に対照群を、注射後に15分毎1時間まで1群ずつを殺し、その肝臓の一部を切除した。これを2つに分け、一半は尾持等の細胞分離永久標本に作製し、各標本において肝細胞を2,000ヶずつ観察し、無糸核分裂各期、2核細胞各型、有糸核分裂各期、核変形各型の出現率を調べると共に、細胞質に空胞を形成せる細胞の出現率をあわせて観察した。

無糸核分裂および2核細胞各型は時間的変動が認められ(Fig. 1)。注射後30分において最多であり、文献によるD. H. C. の催阻作用最盛期とよく一致するごとく思われる。また2核細胞増加の主体をなすものは分離期Ⅰ型の細胞である。

無糸核分裂のみでは有意の時間的変動がないが、その出現率曲線(Fig. 2)は2核細胞のそれと相似である。

有糸核分裂は有意の時間的変動は認められない。

核変形についても時間的変動は認められぬが、出芽型は一側陥凹型より有意に多い。

D. H. C. 注射による2核細胞数増加は、肝細胞機能亢進による反応性無糸核分裂によると考えられる。

細胞質に空胞を形成している細胞の出現率と2核細胞の出現率との値には負の相関係が認められる(Fig. 3)。これは脂肪変性による無糸核分裂の抑制のためと思われるが、次回の実験で確かめる予定である。

稿を終るに臨み、本研究に御指導を賜つた尾持教授、田中助教授、御援助を頂いた教員各位に深甚な感謝を捧げます。

文 献

- ①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 ②Münzer, F. T.: Über die Zweikernigkeit der Leberzellen, Arch. Mikroskop. Anat., 98: 249-282, 1923
- ③Münzer, F. T.: Experimentelle Studien über die Zweikernigkeit der Leberzellen, Arch. Mikroskop. Anat. u. Entwickl., 104: 138-184, 1925 ④Jacobi, W.: Über des rhythmischen Wachstum der Zellen durch Verdoppelung ihres Volumens, Arch. Entwickl., 106: 124-192, 1925 ⑤Pfuhl, W.: Die mitotischen Teilungen der Leberzellen im Zusammenhang mit den allgemeinen Fragen über Mitose und Amitose, Z. anat. Entwickl., 109: 99-133, 1938
- ⑥Beams, 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 ⑦Wilson, 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 ⑧Wilson, J. W. & Leduc, E. H.: Abnormal Mitosis in Mouse Liver, Ibid., 86: 51-73, 1953 ⑨尾持昌次: 細胞分離永久標本の作製法 (第4報), 解剖誌, 33: 20-23, 1958
- ⑩Nagata, T.: Cell Division in the Liver of the Foetal and Newborn Dogs, Med. J. Shinshu Univ., 4: 65-71, 1959 ⑪Nagata, T.: Variation of Cell Divisions in the Hepatic Cells of Rat Following Partial Hepatectomy, Ibid., 4: 253-258, 1959 ⑫Nagata, T.: Effect of DAB Administration upon the Cell Divisions in the Hepatic Cells of Rats, Ibid., 4: 457-468, 1959
- ⑬百瀬節生: 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 ⑭赤間 広: 強肝剤使用時の生体観察, 日本内科誌, 45: 1152-1160, 1956 ⑮工藤裕三・笹川庄三: Urso 酸の利胆作用に関する実験的研究. (抄録), 日本消化会誌, 53: 327-328, 1959 ⑯山形徹一: Dehydrochol 酸の胆道胆嚢疾患に対する治療効果, 日薬デヒコール文献集, 2: 8-16, 1961
- ⑰高橋忠雄: Dehydrochol の利胆作用について, 日薬デヒコール文献, 2: 1-7 1961 ⑱集尾持昌次・等: ラッテ肝臓細胞核分裂数の時間的変動および2核細胞

の運命について, 解剖誌, 32: 416-422, 1957

⑲水田信夫: デヒドロコール酸ソーダの肝並びに胆道疾患に対する応用について, 診断と治療, 18: 956-964, 1931

ABSTRACT

For the purpose of studying the influence of a choleric upon the cell division, especially on the amitosis, in the hepatic cells of rats, 25 albino rats were studied experimentally. The animals were divided into 5 groups, consisting of 5 animals respectively, named 0, I, II, III and IV. All the animals of the groups I-IV were injected intramuscularly with 5% dehydrocholic sodium (Dehychol) 0.2 cc, while those of group-0 were remained untreated as the control.

At first 5 animals of group-0 were sacrificed. Then, the animals of each group from I to IV were sacrificed successively at 15 minute intervals after simultaneous administration with Dehychol. Permanent preparations of the hepatic cells were made according to the method by Omochi et al., on which the frequencies of cell divisions were counted on the basis of 2000 cells respectively, classifying into the mitotic cells, the amitotic cells, the binucleate cells (contact stage, type I. and type II of separating stage) and the cells in the nuclear transformation. On the other hand, the frequencies of cytoplasmic vesicle formation, probably due to fatty degeneration, were counted on the basis of 1000 cells respectively.

The results of analysis are given in tables 1-6 and figures 1-3, which lead to the following conclusions.

(1) Mitotic cells were found only a few and the differences of their frequencies between the groups were stochastically not significant.

(2) Amitotic cells were found more frequently than mitotic, although the differences between the groups were likewise not significant. However, they were generally parallel with the frequencies of binucleate

cell Fig. 2).

(3) The binucleate cells, particularly of type I of separating stage, in 30 minutes after the injection were significantly more than those of the groups 15 and 45 minutes after the injection (Fig. 1).

This increase is considered to accord with the peak in the bile secretion curve after the Dehydrochol injection, which suggests the amitosis in the hepatic cells to occur reactively.

(4) The frequencies of the nuclear

transformation showed no significant difference between any groups. However, the bud-sprouting type cells were significantly more than the one-side concaved type cells.

(5) There was found a negative correlation between the frequency of binuclearity and the frequency of vesicle formation, which suggests that the fatty degeneration caused the suppression of amitosis in the hepatic cells. (Fig. 3)