

利胆剤の肝細胞核分裂に及ぼす影響 (I)

昭和39年9月11日 受付

信州大学医学部第一解剖学教室

(指導: 尾持昌次教授)

平 野 格

Influence of Cholagogues and Cholagogue upon the Cell Division in the Hepatic Cells of Rats (I)

Itaru Hirano

Department of Anatomy, Faculty of Medicine,
Shinshu University

(Director: Prof. Sh. Omochi)

肝細胞に2核細胞の多いことは昔からよく知られている。Münzer^①は動物毎に2核細胞の出現率を調べて、2核細胞の増加は生体の生活条件の変化により、核の表面積を増加させるために起るものであると考えた。またPfuhl^②はモルモットにトリパン青を与えると、肝臓に有糸核分裂殊に中期が多く現われ、毒物や温熱等により2核細胞が増し、またpyknomitosis (pseudomitosis)も現われ、無糸核分裂は核の成長と関係づけられるという。

教室の百瀬^③も尾持等の細胞分離永久標本作製法^④を用いて、ラツテにベンチール・イミダゾリンおよびヒスタミンを注射し、前者による胆汁分泌最高時期に2核細胞の増加を認め、また永田^⑤、永田百瀬^⑥は胎生期と生後ことに乳離れした仔犬において、肝細胞の2核細胞数が顕著に異なることを報告している。

以上のごとく、肝細胞の核分裂および核分裂の1種であるところの、無糸核分裂によつて生成されたと思われる2核細胞の数と、肝機能との間には密接な関係があるとの報告があるので、著者は肝機能と肝細胞における核分裂数との関係をさらに明らかにすべく、催胆剤としてデヒドロコール酸ナトリウム(以下D. H. C.と略す)およびウルソ・デスオキシコール酸(以下ウルソと略す)を、また排胆剤として硫苦を選んで、これらの作用が肝細胞核分裂に及ぼす影響について実験を試みた。

研究材料および方法

材料は、予め毎朝午前9時から30分間、人工基礎食10gを与え、食餌の残りは撤去する様に習慣づけて1週間飼育し、食餌の影響を均一になる様にした雌のラツテ(体重約150g)である。このラツテ65匹を4群に分け、対照群(K)20匹、実験群としてD群・U群・

M群各々15匹に分け、実験当日は食餌を与えなかつた。

K群はこれを、さらに5匹ずつK₀, K₁, K₂, K₃の4群に分けた。D群は5%のD. H. C.を2cc皮下注射した群であつて、これをさらに5匹ずつD₁, D₂, D₃の3群に分けた。U群は0.25%のウルソ2ccを皮下注射した群であつて、これをさらに5匹ずつU₁, U₂, U₃の3群とした。M群は33%の硫苦の胃内注入群であつて、これをさらに5匹ずつM₁, M₂, M₃の3群に分けた。

先ず午前9時にK群を除く各群に上記の薬剤を注射または注入し、直ちにK₀群を、1時間後にK₁, D₁, U₁, M₁群を、2時間後にK₂, D₂, U₂, M₂群を、3時間後にK₃, D₃, U₃, M₃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取り出した。各組織片は2ケに分け、その1ケを尾持等による細胞分離永久標本に作製し、他の1ケは10%フォルマリンで固定後、厚さ8μの連続パラフィン切片に作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して対照とした。

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1,000ケを数え、無糸核分裂(くびれ期・中隔期・離断期)^{⑦⑧}、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I型は0<d≤r、II型はd>rとする。)3核細胞、核変形(歪鈴型・出芽型・一側陥凹型・その他)^⑨および有糸核分裂に分けて、その出現率を求めた。その結果を1,000ケ中の実数として表1に示す。ただし細胞数が1,000ケに達しなかつた標本2例は除外した。なお

Table 1. Frequency of cell divisions on the basis of 1000 cells

animal	nucl	amitosis				binucleate cells					trinucle cells	nucl. transf.	mitos.	vesicl in cyt. pl.
		cons.	sept.	div.	total.	cont.	separating			total.				
							I	II	total.					
K 01	0	0	2	2	16	138	48	186	202	0	8	0		
K 02	0	0	2	2	10	131	42	173	183	0	6	0		
K 03	0	0	3	3	13	125	32	157	170	0	8	0		
K 04	0	0	1	1	5	98	34	132	137	0	3	0		
*K 05	0	0	0	0	7	114	42	156	163	0	5	0	+	
K 11	0	0	4	4	15	121	37	158	173	0	4	0		
K 12	0	0	7	7	13	93	14	107	120	0	6	0		
K 13	1	0	7	8	13	103	22	125	138	0	8	meta 1		
K 14	0	0	2	2	4	97	54	151	155	0	1	0		
*K 15	1	0	3	4	14	158	41	199	213	0	1	0		
K 21	0	0	4	4	21	128	33	161	182	0	1	0		
*K 22	0	0	2	2	14	179	50	229	243	0	0	0		
K 23	0	0	6	6	12	161	36	197	209	0	5	0		
K 24	0	0	3	3	6	84	36	120	126	0	1	0		
K 25	0	0	3	3	3	107	26	133	136	0	6	0		
K 31	0	0	2	2	11	98	18	116	127	0	3	0		
K 32	0	0	4	4	15	123	14	137	152	0	2	0		
K 33	0	0	2	2	6	101	30	131	137	0	5	0		
K 34	0	0	2	2	16	133	18	151	167	1	2	0		
*K 35	0	0	3	3	27	166	33	199	226	0	1	0	+	
D 11	0	0	8	8	10	119	36	182	192	0	8	0		
D 12	0	0	5	5	13	134	17	151	164	0	3	0		
D 13	0	0	4	4	14	152	31	183	197	0	3	0		
*D 14	0	0	2	2	10	48	9	57	67	0	8	meta 1		
D 15	0	0	2	2	11	113	58	171	182	0	3	0		
D 21	0	0	5	5	21	156	27	183	204	0	4	0		
D 22	0	0	3	3	9	78	14	92	101	0	3	0		
D 23	0	0	5	5	12	116	45	161	173	0	6	0		
*D 24	0	0	2	2	9	63	8	71	80	0	7	0		
D 25	0	0	2	2	5	148	33	181	186	0	6	0		
D 31	0	0	4	4	24	123	36	159	183	0	7	ana 1		
D 32	0	0	7	7	15	124	13	137	152	0	8	0		
D 33	0	0	6	6	13	110	12	122	135	0	5	0		
D 34	0	0	3	3	19	127	8	135	154	1	1	0		
U 11	0	0	5	5	15	145	26	171	186	0	0	0		
U 12	0	0	2	2	13	82	12	94	107	0	1	0		
U 13	0	0	3	3	12	172	18	190	202	0	0	0		
U 14	0	0	3	3	25	208	32	240	265	0	1	0		
U 21	0	0	4	4	3	90	28	118	121	1	1	0		
U 22	0	0	0	0	10	110	23	133	143	1	3	0		
U 23	0	0	7	7	18	146	21	167	185	0	7	0		
*U 24	0	0	1	1	10	113	38	151	161	0	3	0	+	
U 25	0	0	3	3	9	105	39	144	153	0	4	0		
U 31	0	0	2	2	6	128	30	158	164	0	7	0		
U 32	0	0	1	1	12	134	26	160	172	0	1	0		
*U 33	1	0	5	6	13	207	33	240	253	0	3	0	+	
U 34	0	0	4	4	33	147	45	192	225	0	3	0		
U 35	0	0	4	4	6	109	25	134	140	0	5	0		
*M 11	0	0	3	3	27	103	13	116	143	0	4	0	+	
M 12	0	0	3	3	2	102	31	133	135	0	1	0		
M 13	0	0	6	6	31	144	13	157	188	0	0	0		
M 14	0	0	0	0	10	127	25	152	162	0	1	0		
M 15	0	0	3	3	5	118	33	151	156	0	1	0		
M 22	2	0	1	3	6	133	50	183	189	0	5	0		
M 23	0	0	1	1	4	99	18	117	121	0	9	0		
M 24	0	0	3	3	15	166	12	178	193	0	3	0		
M 25	0	0	4	4	9	88	9	97	106	0	4	0		
*M 31	0	0	1	1	5	92	20	112	117	0	5	0		
M 32	0	0	4	4	10	135	23	158	168	0	3	0		
M 33	0	0	2	2	1	92	53	145	146	0	2	0		
M 34	0	0	3	3	14	136	32	168	182	1	1	0		
M 35	0	0	4	4	10	134	34	168	178	0	9	0		

細胞厚形質に空泡形成を示すものがあり、切片標本観察により、その分布の広いもの+をとって表の右端に記載して参考とした。これらの空泡は脂肪変性によるものと思われる。

先ずこの表で、同一群間における2核細胞総数のかけ離れた値について Smirnov の棄却検定を行い、D14の67を5%の危険率で棄却し、さらに空泡形成(+)の例を除き、(+)のない群では2核細胞総数が、その群の平均値より、かけ離れた値を有するものを除いて……除外例は標本番号の左にx印を附す……各群4匹宛に統一し、E(実験)、T(時間)、N(核形)、の3要因について3元配置法による要因分析を行ない、表2を得た。その結果、核形の差による変動が、

1%の危険率で有意であつた他は、有意な変動は認められなかつた。

よつて次に2核細胞数のみについて同様にE、Tに関して要因分析を行なつて表3を得たが、どの要因も有意でなかつた。

そこで各時間毎、各薬剤毎に、無糸核分裂、2核細胞、核変形の各々について、2群ずつの値をとり出し、標本平均の比較検定を行なうこととした。各々の核形について、各群平均値の時間的変動を図1、2、3に示す。この図から平均値の差が大きき2群について、母分散の等しい場合はt分布を、母分散の異なる場合はF分布を用いて、その差の有意法を検定した。

Table 2. Factorial design on the variations of nuclear types

Factor	SS	FD	Ms	Fs
E	735.22	4 - 1 = 3	245.07	1.002 < 2.67 = F_{144}^3 (0.05)
T	257.84	3 - 1 = 2	128.92	0.53 < 3.06 = F_{144}^2 (0.05)
N	755345.22	4 - 1 = 3	251781.74**	1030.29 \gg 3.92 = F_{144}^3 (0.01)
E × T	1112.83	3 × 2 = 6	185.47	0.76 < 2.16 = F_{144}^6 (0.05)
T × N	774.33	2 × 3 = 6	129.06	0.53 < 2.16 = F_{144}^6 (0.05)
E × N	1575.18	3 × 3 = 9	175.02	0.72 < 1.94 = F_{144}^9 (0.05)
E × T × N	4100.83	3 × 2 × 3 = 18	227.82	0.93 < 1.68 = F_{144}^{18} (0.05)
R(ETN)	35190.25	191 - 47 = 144	244.38	
ETNR	799091.70	192 - 1 = 191		

E=Experiment T=Time N=Nuclear Type

Table 3. Factorial design on the variations of binucleate cells

Factor	SS	DF	Ms	Fs
E	2908.50	4 - 1 = 3	969.50	0.83 < 2.86 = F_{36}^3 (0.05)
T	1253.17	3 - 1 = 2	626.59	0.54 < 3.26 = F_{36}^2 (0.05)
E × T	4825.50	3 × 2 = 6	804.25	0.69 < 2.36 = F_{36}^3 (0.05)
R(ET)	41972.50	47 - 11 = 36	1165.90	
ETR	50959.67	48 - 1 = 47		

E=Experiment T=Time

Fig. 1 Binucleate Cell

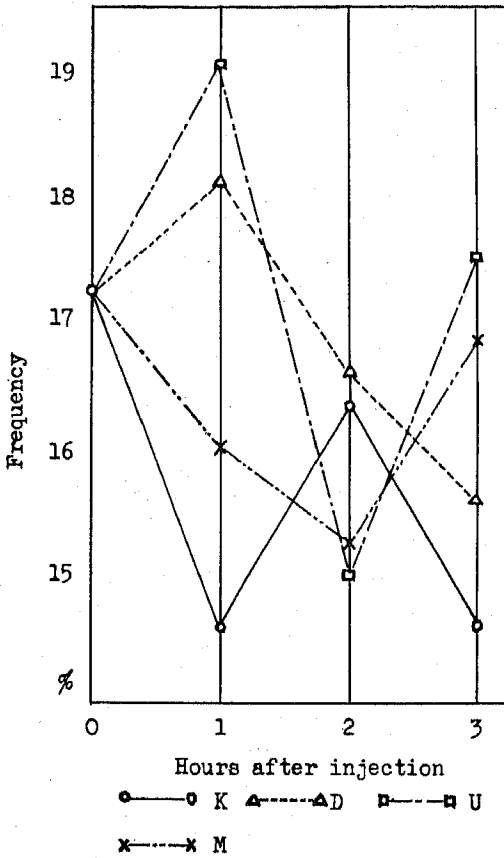
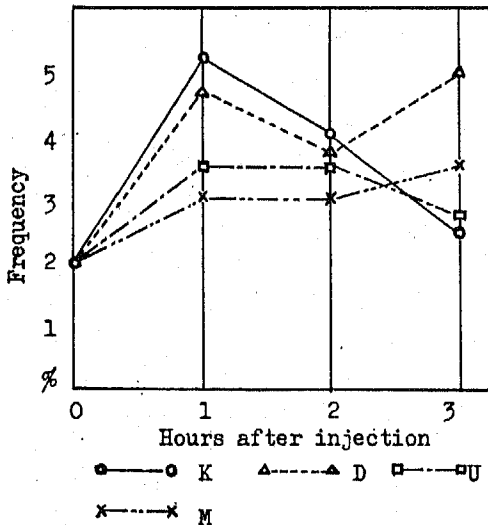


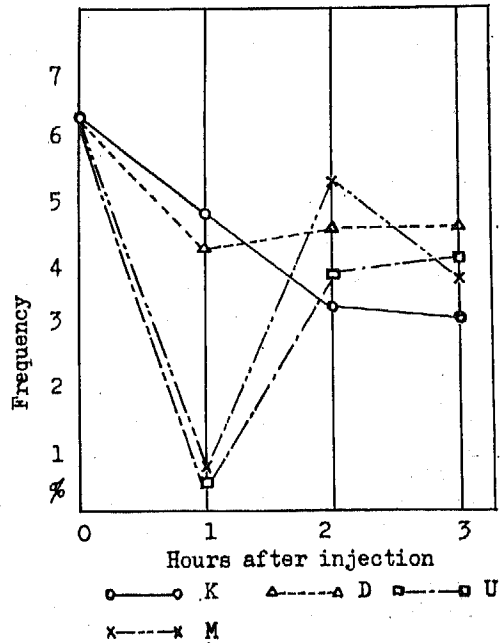
Fig. 2 Amitosis



1) 2核細胞総数

$t_s(K_1, D_1) = 2.75^*$ $t_s(K_1, U_1) = 1.26$

Fig. 3 Nucl. Transformation



$t_s(K_1, M_1) = 0.87$ $t_s(K_3, U_3) = 1.55$
 $t_s(K_3, M_3) = 1.91$ $t_s(K_0, K_1) = 1.37$
 $t_s(D_1, D_3) = 2.24$ $t_s(U_1, U_2) = 1.12$
 $t_s(U_2, U_3) = 1.15$ $t_s(M_2, M_3) = 0.67$
 $t_s(K_0, D_1) = 0.93$

$n = 6$ における $t_0(0.05) = 2.447$ であるから K_1 と D_1 の間の差は 5% の危険率で有意であり、D. H. C 注射群の 2 核細胞数は注射 1 時間後に対照群より多いといえる。 $t_s(D_1, D_3)$ も $t_0(0.05)$ に近いから標本数を増加すれば有意となりそうである。

2) 2核細胞接触期

いずれの 2 群をとり出して、平均値の差の検定を行っても有意の差はなかつた。

3) 2核細胞分離期

$t_s(K_1, D_1) = 2.61^* > t_0(0.05) = 2.447$ であり、 D_1 群の分離期細胞は K_1 群より多いといえる。

4) 2核細胞分離期 I 型 ($0 < \text{核縁間距離} \leq r$)

$t_s(K_1, D_1) = 2.425 < t_0(0.05)$ であり、僅かの差で有意とならない。

5) 有糸核分裂

いずれの 2 群間においても、その差は有意でない。

6) 核変形

$F_s(K_1, M_1) = 6.68 < F_3^1(0.05) = 10.13$

$F_s(K_1, U_1) = 4.63 < "$

であり、いずれの差も有意でない。

考 察

胆汁酸の催胆作用については1864年 Huppert の報告以来、甚だ多数の研究が発表されたが、その多くは胆汁または不純な胆汁酸混合物についての実験であつた。その後胆汁酸の化学的研究が進むにつれて、種々の胆汁酸が発見され、その各々の生理作用が究明される様になつた。その結果種々の胆汁酸の中、D. H. C. が最も毒性が少なく、しかも最も強い催胆作用を有することが明らかとなつた。D. H. C. の催胆作用については、本邦においても松村^⑩、小倉^⑪、矢野^⑫、高橋^⑬、中村^⑭などが実験的、ならびに臨床的にすでに種々の点を明らかにしている。また、その注射による胆汁量の増加率は200~250%に及ぶと矢野^⑫、高橋^⑬は実験により証明している。さらに D. H. C. の肝機能に及ぼす影響については、松村^⑩が肝臓家兔の肝機能を促進させるといふ、高橋^⑬はマウスに D. H. C. を投与して後2時間に³²Pを皮下注射し、³²Pの交替の促進を認めている。

次に、ウルソは熊の胆汁に含まれている胆汁酸であり、熊胆の主成分である。1927年に正田等^⑮が熊の胆汁から純粹結晶体として分離し、1952年星野等によつてコール酸から合成された。ウルソの催胆作用については内村^⑯、松村^⑩、牧野^⑰、工藤^⑱、中村^⑭、福井^⑲等の実験がある。内村はウルソの家兔への注射により約50%の胆汁量増加を認め、牧野は同じく家兔で筋注後15分で胆汁量モイレングラハト値が各々25%、60%増加するといふ、工藤は犬に静注すると5~30分で胆汁量は最高となるが、分泌される胆汁は稀薄であると述べている。一方、松村は犬において、ウルソ内服後、胆汁量増加をほとんど認めず(2~3時間で28%)固形成分の濃度および排泄総量が1~2時間に僅かに増加し、肝機能に関しては、むしろ抑制的であるという。

上記のごとき文献の結果から考えると、D₁群の2核細胞総数および分離期2核細胞がK₁群に比して有意に多いのはD. H. C. の催胆作用および肝機能促進作用を裏書していると認められる。

U₁群の2核細胞数が、K₁群との間に有意の差の認められないのはU₁群の分散が大きいためと思われる。

排胆剤としての硫苦が、3時間でやゝ2核細胞数の増加を示しながら、有意差のないのは、肝機能に対しての作用が間接的であり、従つて肝細胞の機能に影響を与えるまでの時間も長く要するためではなからうか。

和田^⑳は著者と同様に、5%のD. H. C. をラツテに皮注して1時間毎に3時間まで、おしつぶし標本において、2核細胞数を数え、3時間後において、2核細胞の有意の増加を見、2時間、1時間の順に2核細胞数が少なかったと報告している。しかし催胆作用を調べた前記諸実験の結果によれば、胆汁分泌最盛期は概ね1時間以内となつている。著者の今回の実験の結果によれば、2核細胞数の増加のピークは1時間後であり、これら諸実験の成績と比較的一致する様に思われるが、これを更に確かめるため、D. H. C. 注射後1時間以内の肝細胞核分裂について、さらに追加実験を行なう予定である。

無糸核分裂については、その経過が早い為か出現率が少なく、いずれの時間においても、対照群に比し、有意の差は認められなかつたが、先に尾持等^㉑が明らかにした如く、肝2核細胞は、ほとんど無糸核分裂に由来すると考えられ、本実験においても有糸核分裂は殆ど認められないのにもかかわらず、2核細胞が増減し、かつ無糸核分裂も、ほぼそれに平行して増減する傾向を示す点も、この推測を裏付ける。

核変形については、K₁、M₁両群間において自由度n即ち標本数を増加すれば、差は有意となるのではないかと思われるが、その意義については不明である。

結 論

(1) 有糸核分裂は非常に少数であり、全く認められない群が多い。

(2) 無糸核分裂も比較的少数で、各群間に有意の差は認められない。

(3) 2核細胞数はD. H. C. 注射後1時間群において、対照群より有意に多く、以後漸減する。これは文献に見られるD. H. C. による胆汁分泌曲線とほぼ並行する。2核細胞数増加の主体をなすのは、その分離期殊にI型であり、接触期には対照に比し有意の差が認められない。ウルソ注射群においても注射量を増加し、標本数を増せば、2核細胞数の増加は有意となりそうである。硫苦注入による2核細胞の変動は一定の傾向を示さなかつた。

(4) 核変形は出現率が小であり、且つ出現率に個体差が多く、有意の差は得られなかつたが、M₁群に少ない傾向がある。その意義は不明である。

(5) 2核細胞数の増加は、肝細胞の機能亢進による反応性無糸核分裂に由来すると考える。

要 約

ラツテ65匹を4群に分ち、1群は無処置対照群(K

群)とし、催胆剤の D. H. C. およびウルソをD群およびU群に皮下注射し、排胆剤の硫酸をM群に胃内注入し、注射又は注入から1時間目、2時間目、3時間目に電気ショック下に殺して、その肝臓の一部を尾持等の細胞分離永久標本に作製し、各例において肝細胞を1,000個宛数え、無糸核分裂、有糸核分裂、2核細胞(接触期・分離期I型、同II型)、核変形の出現率を調べた。他方、肝臓の他の一部を連続パラフィン切片に作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して対照とした。

2核細胞数はD群において、胆汁量の増加減少とは並行して増減する。その主体をなすのは分離期殊にI型細胞である。U群、M群においてはK群との間に有意の差がない。

無糸核分裂、有糸核分裂、核変形の各々についてはK群と実験群との間に有意の差がない。

D群における2核細胞の増加は、肝細胞機能亢進にもとづく反応性無糸核分裂に由来するものであると考える。

本論文の要旨は、日本解剖学会第22回中部地方会において発表した。

稿を終るに臨んで、本研究に御指導、御校閲を賜った尾持教授ならびに永田助教授に深甚な謝意を表しますと共に、標本作製に協力して頂いた教室員各位に厚くお礼申し上げます。

文 献

- ①Münzer, Fr. Th.: Über die Zweikernigkeit der Leberzellen. Arch. Mikroskop. Anat. 98: 249-282, 1923 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 ④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 ⑤Tetsuji Nagata: Cell Division in the Liver of the Foetal and New-born Dogs. Med. J. Shinshu Univ. 4: 65-73, 1959 ⑥永田哲士・百瀬節生: イヌ肝細胞の無糸核分裂および2核細胞の年令的変動, 解剖誌, 34: 187-190, 1959 ⑦百瀬節生: 肝細胞の無糸核分裂に関する研究, I. 各種脊椎動物肝細胞の細胞分裂出現頻度, 解剖誌, 34: 199-204, 1959 ⑧尾持昌次・永田哲士・百瀬節生: ラツ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 ⑨T. Nagata: 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 ⑩松村達雄: 各種利胆剤の利胆作用及び副作用について, 広島医学, 8: 2477-2499, 1956 ⑪小倉道雄: D. H. C. 誘導体および P. T. M. C. の利胆作用, 米子誌医, 11: 182-185, 1960 ⑫矢野富士隆: 胆汁酸性利胆剤の効果におよぼす胆汁成分の影響, 山口医学, 8: 743-744, 1959 ⑬高橋忠雄: デヒコールの利胆作用について, 日榮デヒコール文献集, 2: 1-7, 1961 ⑭正田政人・富永猪佐雄: 各種胆汁酸の心臓作用ならびに溶血作用, 岡山医誌, 39: 1561-1569, 1927 ⑮内村富士子: 胆汁酸の溶血作用および利胆作用(補遺), 日医大誌, 28: 850-854, 1956 ⑯牧野光夫: ウルソデスオキシコール酸および β -フェニールプロパノールの作用機序, 阪大医誌, 11: 5347-5362, 1959 ⑰工藤祐三・笹川庄三: Urso 酸の利胆作用に関する実験的研究, 日本消化会誌, 56: 327-328, 1959 ⑱中村克衛: 放射性物質の胆汁内排泄におよぼす利胆剤の影響, 日内会誌, 49: 209-215, 1960 ⑲福井 興・他: 利胆剤の研究, 日本消化会誌, 55: 644-644, 1958 ⑳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

ABSTRACT

For the purpose of studying the influence of cholagogues and choleretics upon the cell division, especially on the amitosis in the hepatic cells of rats, 65 albino rats were divided into 4 groups K, D, U and M. Animals of the D- and U-groups were injected subcutaneously with dehydrocholic sodium (D. H. C.) and ursodesoxycholic acid as cholagogues (cholecretic), animals of the M-group were infused into the stomach with magnesium sulfuricum as a cholagogue (cholekinetic), while the animals of the K-group were remained untreated as the control.

They were sacrificed at one hour intervals after simultaneous administration with the above medicines in groups of five respectively, except the animals of the first K-group which were sacrificed at the start of the experiment as the original control. Permanent

preparations of the isolated 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 1,000 cells, respectively, classifying into the mitotic cells, the amitotic cells, the binucleate cells (contact stage, separating stage) and the cells in the nuclear transformation.

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

(1) Mitotic cells were few in number. They were not detectable in most specimens.

(2) Amitotic cells were more than mitotic. The differences of their frequencies be-

tween the groups were not stochastically significant. (Fig. 2)

(3) The frequencies of binucleate cells in D-group, one hour after the administration, were significantly more than that of the K-group. Then, they decreased gradually. Their increase is considered to be nearly parallel with bile secretion, which should suggest the amitosis in the hepatic cells to occur reactively. However the frequencies of binucleate cells in U-and M-groups did not show any significant differences from K-group. (Fig. 1)

(4) The frequencies of the nuclear transformations showed no significantly differences in any groups. (Fig. 3)