

ピロカルピン注射によるラツテ膵細胞の無糸 分裂数の変動について

昭和35年7月9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)

大久保 幹 雄

Variation of Frequency of Amitotic Cells in the Acinar Cells of Rat Pancreas Following Pilocarpine Injection.

Mikio ŌKUBO

Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Shinshu University
(Director; Prof. Sh. OMOCHI)

緒 言

著者は先に種々の実験^{①②③}を行つた結果膵細胞の分泌機能亢進時に無糸核分裂およびそれによつて出来たとと思われる二核細胞数の増加する事実を観察し、これら無糸核分裂が反応性、機能性無糸核分裂であると結論した。ピロカルピンを注射すると副交感神経を刺激し、従つて神経性に膵分泌機能が亢進することは薬理学、生理学の教えるところであるが、この膵細胞の機能亢進は形態学的にも証明されている。すなわち小川^④はマウスにピロカルピンを注射し膵分泌機能の亢進の状態を細胞学的に観察し、白沢^⑤もまたピロカルピン注射によりラツテ膵細胞の無糸核分裂および二核状態が増加することを観察し、これらは反応性的のものであると結論しているが、白沢の研究はラツテにピロカルピンを注射して後一定の時間(10時間)経つたものを観察したに止まつている。

さて、無糸核分裂および二核細胞の数は1日の中でどの時刻にも均等であるのではなく、時間的に増減するものである事は島村^⑥が胃旁細胞において、又藤原^⑦、永田^⑧が膀胱の被蓋細胞および肝細胞において報告しているところであるから、著者はラツテにピロカルピンを注射した後24時間にわたつて膵細胞の無糸核分裂数および二核細胞数を観察し膵細胞にみられたこれらの変動が注射後の時間により、どのようになるか、またこれらの変動が細胞機能と如何なる関係にあるかをしらべ、同時に1日中の時刻による変動についても研究し次の様な結果を得たので報告する。

実験材料および方法

体重150g前後のラツテ160匹(すべて雌)を5匹ずつ32群に分け、各群各個体に昨年10月11, 12, 13日の3日間前編において述べたのと同じ組成の人工基礎食

10gずつを午前12時より午後5時までの間に与えて飼ひ馴らし、13日以後は全群ともに全く絶食させた。32群のうち17群を対照群とし屠殺順序によりK0, K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7, K8, K9, K10, K11, K12, K13, K14, K15, K16, K17と呼ぶ。残りの15群は実験群であつてピロカルピンを生理的食塩水に4000倍にとかしたものを0.6cc (1mg/kg)を殺す順に従つて、すなわちP1, P2, P3, P4, P5, P6, P7, P8, P9, P10, P11, P12, P13, P14, P15の順に注射したが、注射に要した時間は15分で14日午前9時より9時15分までであった。この対照群(以後K群と呼ぶ)とピロカルピン注射実験群(P群と呼ぶ)を電気ショックを与えて開腹屠殺し、膵臓を取り出したが、同じ番号の対照群と実験群との屠殺時刻の差を少なくするためできるだけ短時間内に処置を行う様にした。すなわちK0は10日午前8時35分~55分、P1は午前10時1分~10時9分、K1 10時12分~10時23分、P2 10時58分~11時3分、K2 11時5分~11時15分、P3 11時59分~12時4分、K3 12時5分~12時13分、P4 午後0時59分~1時2分、K4 1時3分~1時10分、P5 1時59分~2時2分、K5 2時4分~2時11分、P6 2時58分~3時1分、K6 3時3分~3時8分、P7 3時58分~4時1分、K7 4時1分~4時5分、P8 5時58分~6時6分、K8 6時8分~6時18分と1時間おきに材料を採取したがそれ以後は2時間おきに屠殺し、P9 8時~8時10分、K9 8時12分~8時25分、P10 10時~10時18分、K10 10時22分~10時31分、P11 12時~12時7分、K11 12時9分~12時19分、P12 15日午前1時58分~2時9分、K12 2時11分~2時23分、P13 3時58分~4時8分、K13 4時10分~4時30分、P14 6時~6時13分、K14 6時15分~6時30分、K14' 8時~8時9分、P15 9時14分~9時17分、K15 9時18分~9時20分のごとくであった。取り出した膵臓の大部分は尾持等^⑨の分離永久標本作製法により分離永久標本に

作製し、他の一部はホルマリン固定、ヘマトキシリン・エオジン複染色の切片標本とし、これを参考にしながら分離標本を観察し、一個体につき1000個の膵細胞を数え、無糸核分裂(くびれ期, 中隔期, 離断期)および二核細胞の出現率を求めた。

実験成績

ピロカルピン注射実験群, 対照群の無糸核分裂および二核細胞の出現率を表1, 2に掲げる。無糸核分裂は各期の出現率が少ないので各群間における総和の平均値についての時間経過曲線を図1に示す。図1をみるとピロカルピン注射実験群と対照群との経過曲線はVI群以後では差がないようであるが, 注射直後のI群よりV群までの実験群の無糸核分裂総和は対照群より増加している。その有意性を検定するためピロカルピン注射による要因をV, 時間的経過による変動の要因をBとし, 各個体を繰返しと見なして二元配置法による要因分析を試みると表3のごとき要因分析表を得る。すなわちピロカルピン注射の要因Vの分散比は $F_s = 40.44 > F_{120}^{11}(0.01) = 6.89$ となり1%の危険率で, また時間的変動による要因Bは $F_s = 2.204 > F_{120}^{11}(0.05) = 1.77$ となり5%の危険率でそれぞれ有意である。従つてピロカルピン注射による実験群における無糸核分裂数の増加ならびに実験群, 対照群におけるその時間的変動は共に有意である。また交互作用項 $V \times B$ の分散比は $F_s = 4.64 > F_{120}^{11}(0.01) = 2.27$ となつて1%の危険率で有意である。これは対照群における無糸核分裂の24時間の変動がピロカルピン注射によつて実験群においては異なつた経過曲線をとることを示している。

二核細胞についても無糸核分裂と同様に群間平均の時間的経過曲線を図2に, 要因分析の結果を表4に示す。これによるとピロカルピン注射の要因Vは分散比 $F_s = 149.76$ で1%の危険率で, 時間的変動の要因Bは5%の危険率で, また両要因の交互作用も1%の危険率でそれぞれ有意である。すなわち二核細胞は無糸核分裂と同様, ピロカルピン注射により有意に増加したこと, また1日の時間的変動も有意であるのみならず, その変動が対照群とピロカルピン注射群とは異なることが明らかになつた。

考 察

迷走神経は膵分泌神経であるが, ピロカルピンを注射するとこれが興奮する結果膵分泌が促進される。しかし Kudrewetzky, Sawitsch, Babkin und Sawitsch^⑩によると迷走神経刺激により得られた膵

液は Sekretin によるものよりも有機性物, 酵素を多量に含んでいるという。小川^④は膵細胞機能亢進の目的をもつて, ピロカルピンをマウスに注射し細胞形態学的にZ顆粒, Plastosomen, NR顆粒を観察し, 細胞機能の異常亢進を観察しているが, その変化は1時間後に最も高度で次第に消退し, 12時間後には殆んど正常の状態に復するという。白沢^⑤もピロカルピンをラットに1% 0.5ccの大量を注射し10時間後の分泌促進作用がすでに終つていると思われる時期に, 膵細胞における無糸核分裂, 二核細胞数の増加を観察し, これらは過度の膵分泌後の休養期に見られたものであるから, 細胞の機能回復に必要な機能性のものであらうと述べている。さて著者の実験において, 無糸核分裂および二核細胞の数は, ともに対照群に比較して, ピロカルピン注射後, すでに1時間より著明に増加し, 5時間後に至るまで対照群よりも多い。本実験程度のピロカルピンの注射量では, 膵分泌機能促進作用は注射後数時間以内に止まるであらうと思われるから, 明らかにピロカルピン注射によつて, 無糸核分裂および二核細胞数が増加しているといえる。注射後5時間以後になると無糸核分裂数は減少し, 対照群の曲線と増減の差が殆んど認められない。しかし二核細胞は6時間目に一旦減少してから, 再び増加しはじめて注射後11時間目には曲線の第2の山の頂を記録している。すなわち二核細胞数の変動曲線は二峯性である。著者は先きに^①給食後のラット二核細胞, 無糸核分裂数の変動について研究し, 二核細胞数の変動曲線の二峯性を認め, 後の方の山すなわちすでに膵分泌作用は低下し機能回復期と思われる時期における二核細胞の増加は膵細胞の機能回復に必要な状態であると解釈した。さてピロカルピン注射の場合でも, 注射後10~12時間も経ては既に膵液分泌促進作用は終つているはずである。小川^④も上述の如くピロカルピン注射による膵細胞の分泌作用は, 注射後12時間を経れば細胞学的にもすでに注射前の状態に復しているといつている。しかしピロカルピン注射の場合には, セクレチンによる場合よりもより濃厚で, 酵素, 有機物に富んだ膵液を分泌するとすれば, それだけに膵細胞はピロカルピン注射により相当重い負荷を終えたと考えられることができるわけで, 従つて今回の著者の実験において回復期にあたる10時間前後に白沢^⑤が嘗て認めたのと同様に膵細胞における二核の状態が増加したものである。ピロカルピン注射後5時間は上述のように膵液分泌も増し, 腺細胞の機能も亢進している時期と考えられるが, この分泌促進時には二核細胞数, 無糸核分裂数ともに増加しているのであるが, 回復期にあたる注射後

表 1. ビロカルピン注射による無糸核分裂数および二核細胞数

群	個体番号	無糸核分裂				二核細胞	群	個体番号	無糸核分裂				二核細胞
		く び れ 期	中 隔 期	離 断 期	總 和				く び れ 期	中 隔 期	離 断 期	總 和	
PI	1	0	2	2	4	131	PIX	1	1	2	2	5	152
	2	0	2	2	4	123		2	0	2	2	4	150
	3	1	3	2	6	129		3	0	3	2	5	177
	4	1	3	2	6	141		4	0	3	2	5	150
	5	0	2	2	4	126		5	0	2	2	4	174
	平均					4.8		130	平均				
PII	1	0	2	2	4	116	PX	1	0	2	2	4	158
	2	0	3	2	5	124		2	0	2	2	4	160
	3	0	2	3	5	125		3	0	1	2	3	150
	4	0	2	3	5	139		4	0	2	2	4	150
	5	0	3	2	5	140		5	0	2	3	5	161
	平均					4.8		128.8	平均				
PIII	1	0	3	4	7	166	PXI	1	1	3	2	6	156
	2	0	2	3	5	139		2	0	2	2	4	161
	3	1	3	3	7	158		3	0	1	2	3	125
	4	0	3	3	6	125		4	0	1	1	2	113
	5	0	2	4	6	152		5	0	2	2	4	153
	平均					6.2		148	平均				
PIV	1	0	3	2	5	148	PXII	1	0	1	1	2	112
	2	1	3	4	8	145		2	0	2	2	4	140
	3	0	3	4	7	157		3	0	2	2	4	134
	4	0	2	2	4	131		4	0	2	2	4	133
	5	0	3	3	6	170		5	0	3	2	5	159
	平均					6		150.2	平均				
PV	1	0	2	3	5	143	PXIII	1	0	2	2	4	124
	2	0	3	2	5	147		2	0	2	2	4	145
	3	0	3	4	7	158		3	0	2	1	3	125
	4	0	3	2	5	148		4	0	2	3	5	161
	5	0	3	3	6	175		5	0	2	2	4	136
	平均					5.6		154.2	平均				
PVI	1	0	2	3	5	135	PXIV	1	0	1	1	2	108
	2	0	2	2	4	128		2	1	1	1	3	134
	3	0	2	2	4	130		3	0	2	1	3	98
	4	0	1	2	3	108		4	0	2	1	3	117
	5	0	1	3	4	116		5	0	1	1	2	103
	平均					4		123.4	平均				
PVII	1	0	2	3	5	134	PXV	1	0	1	1	2	91
	2	0	2	1	3	136		2	0	1	1	2	97
	3	0	2	2	4	115		3	1	1	2	4	110
	4	1	2	1	4	143		4	0	2	2	4	113
	5	0	2	2	4	153		5	1	2	1	4	106
	平均					4		136.4	平均				
PVIII	1	0	2	2	4	151							
	2	0	3	2	5	144							
	3	0	2	2	4	130							
	4	0	2	2	4	144							
	5	0	2	2	4	156							
	平均					4.2	145						

11時間目では無糸核分裂数は対照群と比較して著差がない様に思われるのに、二核細胞数のみ増加しているのは一応奇異の感がしないでもない。このことについて

では、しかし次のような説明がつけられるのではなかろうか。すなわち無糸核分裂が注射後5時間位は盛んに起るがその後は対照群と著差がなくなってしまう。

表 2. 対照群の無糸分裂数および二核細胞

群	個体番号	無糸核分裂				二核細胞	群	個体番号	無糸核分裂				二核細胞
		くびれ期	中隔期	離断期	総和				くびれ期	中隔期	離断期	総和	
KO	1	1	1	3	5	120	KIX	1	0	2	3	5	115
	2	0	2	2	4	119		2	0	2	2	4	117
	3	0	1	2	3	118		3	0	2	2	4	100
	4	1	1	2	4	107		4	0	3	2	5	120
	5	1	1	2	4	105		5	0	3	2	5	116
	平均					4		113.8	平均				
KI	1	0	2	2	4	110	KX	1	1	3	2	6	120
	2	0	2	2	4	120		2	0	3	3	6	133
	3	1	2	2	5	115		3	0	2	2	4	118
	4	0	2	2	4	110		4	0	2	2	4	120
	5	1	1	2	4	100		5	0	2	1	3	109
	平均					4.2		111	平均				
KII	1	1	2	1	4	80	KXI	1	0	3	2	5	128
	2	2	2	1	5	120		2	0	2	2	4	124
	3	1	3	1	5	121		3	0	2	3	5	119
	4	0	1	1	2	91		4	0	2	2	4	111
	5	0	1	2	3	108		5	1	3	2	6	127
	平均					3.8		104	平均				
KIII	1	0	2	2	4	96	KXII	1	0	4	2	6	124
	2	0	1	2	3	102		2	0	2	2	4	118
	3	0	2	2	4	120		3	0	2	3	5	121
	4	1	2	2	5	118		4	0	3	2	5	127
	5	0	2	2	4	122		5	0	2	2	4	107
	平均					4		111.6	平均				
KIV	1	0	3	2	5	130	KXIII	1	0	2	1	3	110
	2	0	2	2	4	122		2	0	1	2	3	119
	3	0	2	2	4	128		3	0	2	2	4	125
	4	0	2	2	4	120		4	0	1	2	3	130
	5	0	3	2	5	115		5	1	2	2	5	141
	平均					4.4		123	平均				
KV	1	0	2	2	4	91	KXIV	1	1	2	2	5	145
	2	0	2	2	4	112		2	0	2	3	5	135
	3	0	1	2	3	90		3	0	2	2	4	140
	4	0	1	1	2	85		4	0	2	2	4	105
	5	0	1	1	2	92		5	0	2	2	4	117
	平均					3		94	平均				
KVI	1	1	2	2	5	124	KXIV'	1	0	2	1	3	104
	2	0	2	1	3	108		2	0	1	1	2	98
	3	0	2	2	4	110		3	0	1	1	2	99
	4	0	2	2	4	123		4	0	2	2	4	104
	5	0	1	2	3	98		5	1	1	2	4	108
	平均					3.8		112.6	平均				
KVII	1	0	2	1	3	106	KXV	1	1	1	3	5	101
	2	0	2	2	4	120		2	1	1	2	4	100
	3	0	3	2	5	115		3	1	2	2	5	106
	4	0	2	2	4	110		4	0	2	1	3	92
	5	0	2	2	4	116		5	0	1	2	3	96
	平均					4		113.4	平均				
KVIII	1	0	1	2	3	100							
	2	0	2	2	4	118							
	3	0	2	2	4	114							
	4	0	2	1	3	116							
	5	0	2	2	4	108							
	平均					3.6	131.2						

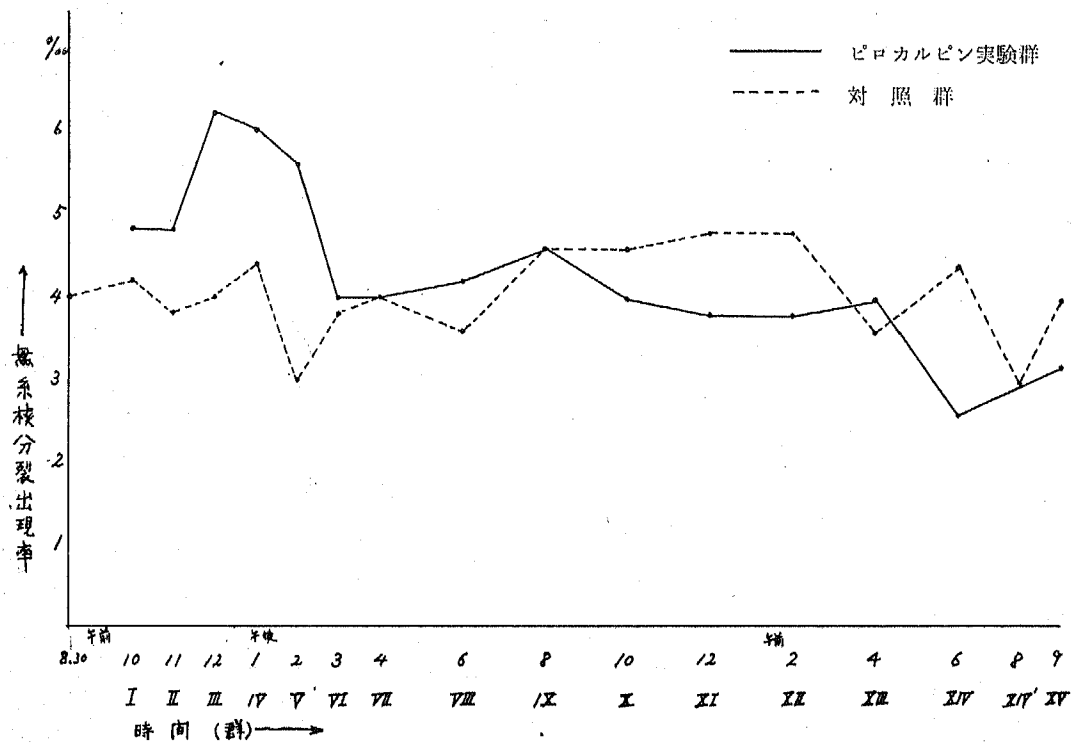


図 1. 無糸核分裂出現率の時間的変動曲線

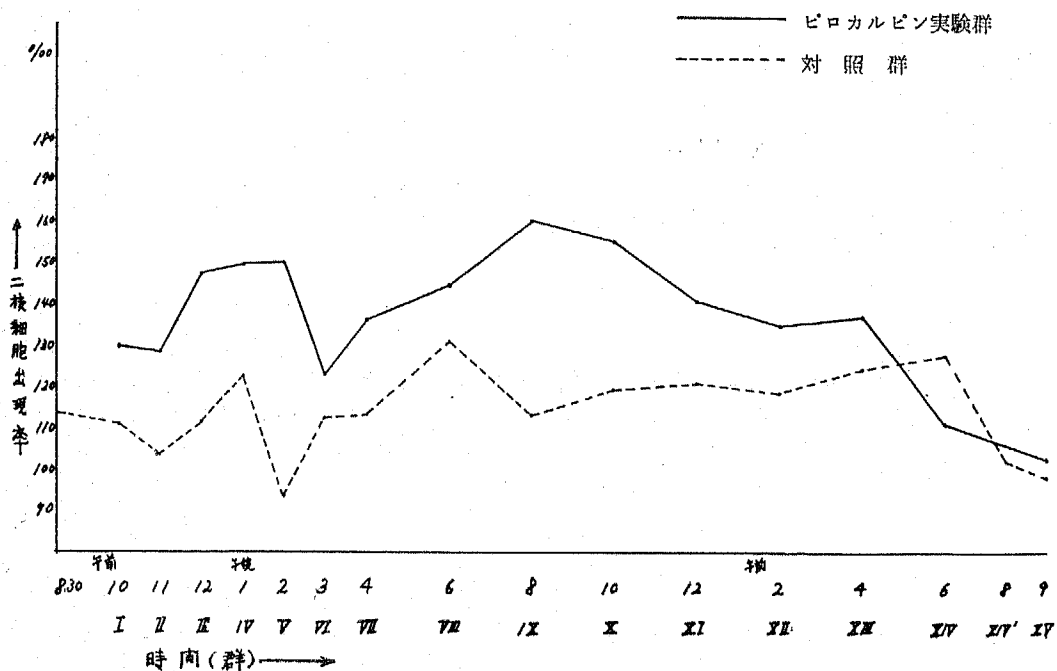


図 2. 二核細胞出現率の時間的変動曲線

表 3. 無糸核分裂出現率の要因分析表

F	SS	DF	MS
V	33.16	2 - 1 = 1	33.16**
B	2.53	15 - 1 = 14	1.807*
V × B	53.27	(2-1)(15-1) = 14	3.802**
R(VB)	98.40	2 · 15 (5-1) = 120	0.82
VBR	187.36	2 · 5 · 15 - 1 = 149	

さて、二核細胞となつたものは尾持等^③が肝細胞における観察で述べているように、再び二核の融合によつて一核細胞となると考えられるが、このように二核状態に止つている時間が注射後5時間位の分泌の盛んな時期と11時間後位の回復期とは異なり、回復期には二核状態に留まる時間がずつと長いために、無糸核分裂の数は多くはないのに、二核細胞が漸次蓄積してくるのである。そしてその後二核細胞から一核細胞に戻るものが殖えてくるので、二核細胞数も漸次減少の道をたどるのではあるまいかと。この考え方の他に著者^{①②}の先きに行つた実験および島村^④の冬期夏期におけるヒキガエルの無糸核分裂の変動についての実験の場合と同じような考え方、すなわち注射後11時間位の回復期では無糸核分裂の数も実際には増加しているのであるが、その分裂の経過が注射後5時間目位のものよりも速かであるために、瞬間的にあらわれる数では対照群との差が認められないのではなからうかとも思われる。いずれにしてもこの様にピロカルピン注射によつて、膵細胞の分泌促進時に二核細胞数および無糸核分裂数が対照群に比して有意に増加し、かつまた機能回復期と思われる時期にも再び二核細胞の数が増加する事は、無糸核分裂後の胞体分裂が全く観察されなかつたことと相まつて、これらの無糸核分裂およびその結果できた二核細胞が膵細胞の機能と非常に密接な関係にあることを明示するものであつて、著者をして膵細胞に見られる無糸核分裂が反応性機能性のものであると結論させる根拠となつている。無糸核分裂数および二核細胞数の時間的変動が有意であると認められた事は、島村^④が胃旁細胞、藤原^⑤が膀胱の上皮、尾持等^③が肝細胞で観察したようなことが膵細胞にもあてはまることを意味する。曲線を観察すると膵細胞における二核細胞は午後1時、6時、午前8時に増加の山が認められるが、午後1時の山は前記三氏の成績とは全く一致せず、午前8時の山は島村、藤原の成績と一致するものと尾持等のそれとは異なり、午後6時の山は前記三氏のそれとやゝ似た結果である。このように二核細胞数の時間的変動は器官の異なるにつれ、

表 4. 二核細胞出現率の要因分析表

F	SS	DF	MS
V	21004.2	2 - 1 = 1	21004.2**
B	12996.6	15 - 1 = 14	928.33*
V × B	11663.9	(2-1)(15-1) = 14	833.14**
R(VB)	16830.0	2 · 15 (5-1) = 120	140.25
VBR	62494.7	2 · 5 · 15 - 1 = 149	

実験の日時の異なるによつて区々のようである。これは1日のうちの細胞の機能状態と、何等かの関係があるものと思われるが、その意義に関してはなお詳細は不明である。

要約ならびに結論

体重150gのラツテ160匹を5匹ずつ32群に分け、人工基礎食で3日間飼ひ馴らし、対照1群を4日目午前8時30分に殺し、他の31群を対照群16群、実験群15群に分け、実験群にピロカルピン1mg/kgすなわち4000倍0.6ccを注射し対照群、実験群ともに第VII群まで1時間おきに、第VIII群から第XV群まで2時間おきに殺し、膵臓を取り出し分離永久標本を作製、1標本につき1000個の膵細胞を数え、無糸核分裂および二核細胞数の出現率を求めた。

無糸核分裂数およびこれによつて出来た二核細胞の数は、ともにピロカルピン注射により有意に増加し、しかも胞体分割像を伴わないから無糸核分裂は反応性、機能性のもと考えられる。また無糸核分裂数と二核細胞数には対照群および実験群において、有意な時間的変動が認められると共に、ピロカルピン注射によつて時間的変動は異なる経過曲線をとることが明らかとなつた。

稿を終るに当り、御懇切なる御指導を賜わり御校閲の勞を執られた恩師尾持教授に深甚の謝意を表すとともに、終始御助言をおしまれなかつた永田講師に満腔の敬意を表します。

参考文献

- ①大久保幹雄：食餌によるラツテ膵細胞の無糸核分裂の変動について。信州医誌，9(4)：616，1960
- ②大久保幹雄：冬期および夏期における膵細胞の無糸核分裂の変動。信州医誌，9(4)：622，1960
- ③大久保幹雄：食餌の相違による膵細胞無糸核分裂の変動について。信州医誌，9(4)：626，1960
- ④小川ミヤ子：膵臓の形態学的研究。其一 生体観察，解剖誌，19(3)：197，1942
- ⑤白沢昭光：膵細胞

の無糸核分裂に関する研究. IV. 信州医誌, 6 (6): 509, 1957 ①島村和夫: ラッテ胃旁細胞における細胞分裂数の1日の変動について. 信州医誌, 6 (5): 398, 1957 ②藤原 泉: ラッテ膀胱上皮における細胞分裂数の1日の変動について. 解剖誌, 32 (5): 482, 1957 ③尾持昌次・永田哲士・百瀬節生: ラッテ肝細胞核分裂数の時間的変動および二核細胞の運命について. 解剖誌, 32 (3, 4): 416, 1957 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 (3): 20, 1958 ⑤Kudrewetzky, Sawitsch, Babkin und Sawitsch: (呉 建・沖中重雄: 自律神経系. 各論, P. 125, 日本医書出版, 東京, 1950より引用) ⑥島村和夫: 冬期および夏期におけるヒキガエル胃腺細胞の無糸核分裂数の変動. 解剖誌, 34 (4): 419, 1959