Anat. Inst. d. Med. Fak., Univ. Okayama (Vorstand: Prof. M. SEKI).

Über die Häufigkeit des Auftretens von zweikernigen und grosskernigen Zellen in der Leber der Maus in verschiedenen adnornmen Zuständen.

種々異常状態の二十日鼠の肝に於いて2核細胞と大核細胞が出現する
頻度について.

Fumio MURAKAMI 村上 文雄.

(Eingegangen am 27. August 1959.)

Es liegen viele Mitteilungen über die Häufigkeit des Auftretens von zweikernigen Zellen vor. MÜNZER (1923 u. 1925) hat schon in breitem Rahmen einschlägige Literatur bekanntgegeben. Er selbst untersuchte die Zahl von zweikernigen und großkernigen Zellen von verschiedenen Säugetieren und fand, daß die Prozentzahl von zweikernigen Zellen nach der Art des Tieres verschieden ist. Nach PFUHL (1930) ist das Vorkommen von zweikernigen Zellen der Leber nicht zufällig, sondern hängt von gewissen inneren und äußeren Ursachen ab. Er bemerkte, daß ihre beiden Kerne fast immer gleichgroß sind und von der Größe des Regelkernes im Sinne von JACOB (1925). PFUHL gab ferner eine neue Methode zur Rechnung der Häufigkeit des Auftretens von zweikernigen Zellen, dabei hielt er die Dicke der Gewebeschnitte von 5μ für zu dünn und die von 10μ für die beste. AUBIN und BUCHER (1952) wiesen darauf hin, daß bei den bisherigen Untersuchungen meistens $5-8\mu$ dicke Gewebeschnitte benutzt wurden, wobei die beiden Kerne der zweikernigen Leberzellen, deren Durchmesser mehrmals größer ist als die Schnittdicke, meistens durchschnitten werden oder aber nur ein Kern im Schnitt erscheint, so daß also zweikernige Zellen häufig als einkernige gezählt werden können. Sie empfahlen die von PFUHL angegebene Methode, nach welcher man aus der Verbindungslinie zwischen den Mittelpunkten beider Kerne, dem Winkel zwischen dieser Linie und der Schnittebene, der Dicke des Schnittes usw. die Häufigkeit des Auftretens der zweikernigen Zellen ermittelt.

Es seien nur ein paar Angaben über die zweikernigen Zellen der Leber aus der Literatur neuerer Zeit genannt. WILSON u. a. (1953) konstatierte an der Leber der Maus nach partieller Resektion eine Ab- und dann Zunahme von zweikernigen Zellen und bemerkte einen Zusammenhang derselben mit der mitotischen Aktivität der Zellen. PHAN und DAVID (1958) stellte nach der PFUHL'schen Methode die Vermehrung von zweikernigen und großkernigen Zellen der Leberzellen an der Maus im Hunger fest. Meine folgende Untersuchung wurde nach demselben Verfahren vorgenommen.

I. Material und Methode.

a) *Im Hunger und Durst.*

Man gab der ersten Gruppe der Mäusen 1—4 Tage gar keine Speise und Trank. Der zweiten Gruppe der Tiere wurde 1—4 Tage nur kleine Mengen von Blättern von Gemüse gegeben. Die dritte Tiergruppe bekam 2—11 Tage nur zerkleinerte Reiskörner. Die Untersuchung wurde im November ausgeführt.

b) *Darreichung von Chemikalien.*

1. Perorale Darreichung von Buttergelb.

Das Buttergelb ist eine karcinogene Substanz. Man fütterte Mäuse anfangs mit zerkleinerten Reiskörnern mit einem Zusatz von 2%igem Buttergelb-Olivenöl (1:100). Vom 17. Tage an verdreifachte man die Buttergelb-Menge. Daneben gab man nur Gemüse. Die Tiere wurden nach 10—300 Tagen getötet, und zwar immer nach 3 Stunden nach der letzten Fütterung.

2. Subkutane Injektion von Thioacetamid.

Eine mit 0.5%iger Kochsalzlösung bereitete 2%ige Lösung von einer karcinogenen Substanz, Thioacetamid, wurde täglich um 0.05 cc injiziert, und zwar 3—31 Tage lang.

3. Perorale Darreichung des Thibion.

Thibion täglich 0.05g, zwei Tage. Nach 12 Stunden bis 4 Tagen nach der ersten Darreichung wurden die Tiere getötet.

4. Perorale Darreichung von Nekoirazu.

Das Rattengift, Nekoirazu, ein Gelbphosphorpräparat, wurde um 50 mg zusammen mit Kornpulvern darreicht. Nach 4—14 Stunden wurden die Mäuse getötet.

5. Subkutane Injektion von Chloroform.

0.05 cc Chloroform, einmal injiziert. Nach 6 Stunden—2 Tagen wurden die Tiere getötet.

6. Subkutane Injektion von Tetrachlorkohlenstoff.

Einmale Injektion von 0.05 cc. Töten nach 3 Stunden—3 Tagen.

c) *Einverleibung von pathogenen Erregern.*1. Intraperitoneale Injektion von *Rickettsia orientalis*.

Der Saft aus der zerkleinerten Leber und Milz von erkrankten Tieren wurde um 0.2 cc in die Peritonealhöhle der Maus injiziert. Töten der Tiere nach 2—9 Tagen.

2. Intraperitoneale Injektion von *Ectromelia*-Virus.

Der Organensaft wurde wie oben injiziert. Töten der Tiere nach 1—4 Tagen.

Die entnommene Leber ließ ich immer in einem mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellten 15%igen Formalin fixieren. Nach 2 Tagen wurden 15 μ dicke Gefrierschnitte mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Bei jedem Versuch wurden zur Messung zwei Mäuse benutzt.

Die Bestimmung der Prozentzahl von zweikernigen Zellen wurde unter 900facher Vergrößerung nach der folgenden Formel von PFUHL (1930) vorgenommen, welche das wirkliche Verhältnis der zweikernigen zu den einkernigen Zellen zeigt.

1. Falls $q + \delta > e$, dann $2mq/(2q + 2\delta - e) : [n - \{2mq/(2q + 2\delta - e) - m\}]$,
2. falls $q + \delta < e$, dann $2meq/(q + \delta)^2 : [n - \{2meq/(q + \delta)^2 - m\}]$,

dabei bedeutet q die Dicke des Schnittes, δ die Dicke der sog. Kernmittelzone, e den Abstand zwischen den beiden Kernmittelpunkten, m die praktische Vermessungszahl der zweikernigen Zellen gegen n und n die praktische Vermessungszahl der einkernigen Zellen.

In meiner Untersuchung war q 15μ . Es ließ sich δ so bestimmen, daß man an 100 kugligen Kernen mit scharf erscheinender Kernmembran den Abstand von der Ebene der am schärfsten gefundenen Kernmembran bis zur Ebene der erst unscharf erscheinenden maß, indem man den Fokus des Mikroskopes mit Hilfe der Mikrometerschraube leicht veränderte. Die so gemessene Kernmittelzone δ betrug 0.7μ . Man nahm den Mittelwert von e aus 100 Bestimmungen, wobei zwei gleichgroße kuglige Kerne von der Grösse des Regelkerns und mit deutlich sichtbarer Kernmembran in Betracht gezogen wurden.

Unter großkernigen Zellen versteht man diejenigen, deren Kern im Durchmesser mehr als 1.5fach größer ist als die durchschnittlich Größe. Ihre Bestimmung vollzog sich nach MÜNZER (1923) aus 1,000 Leberzellen, wie bei der Bestimmung der Zahl gewisser Leukocyten in Blutausrich.

II. Ergebnisse.

Die Resultate der Bestimmung der Zahl von zweikernigen und großkernigen Leberzellen sind übersichtlich in Tabelle 1—2 zusammengestellt und dazu noch graphisch in Abbildung 1—5 dargestellt.

A. Im Hunger und Durst.

1. Bei Verweigerung von Speise und Trank vermehren sich zweikernige Leberzellen ständig, aber die großkernigen vermehren sich bis zum 3. Tage und vermindern sich darauf (Abb. 1 und Tabelle 1). Dieser Befund stimmt mit dem von PHAN

Abb. 1. Die Prozentzahl von zweikernigen und großkernigen Leberzellen. A im Hunger, B bei der ausschließlichen Gemüse-Gabe, C bei der ausschließlichen Reis-Gabe. ●—● zweikernige Leberzellen, ●—●—● großkernige Leberzellen. —○— Kernplasmarelation.

Tabelle 1. Die Prozentzahl von zweikernigen und großkernigen Leberzellen.

	Zeitablauf (Tage)	Zweikernige Zellen (%)	Großkernige Zellen (%)
Im Hunger	1	8.9	3.8
	2	10.8	3.9
	3	25.2	6.6
	4	33.7	5.4
Bei ausschließl. Gemüse-Gabe	1	12.4	2.6
	2	13.2	2.8
	3	19.6	3.3
	4	25.5	7.8
Bei ausschließl. Reis-Gabe	2	10.5	7.4
	4	14.9	7.5
	6	23.3	7.8
	8	27.6	8.6
	11	36.6	9.8
Bei Buttergelb- zufuhr	10	15.7	13.1
	30	13.2	15.1
	60	8.7	21.3
	90	6.0	22.8
	120	4.0	23.4
	150	3.8	22.4
	190	8.5	20.9
	300	14.5	18.6
Bei Thioacetamid- zufuhr	3	17.9	11.1
	6	15.9	20.6
	9	9.6	25.6
	12	4.2	28.6
	17	1.4	28.8
	31	1.4	29.2

und DAVID (1958) (an weißen Ratten) überein. Sie nahmen an, daß die frühzeitige Vermehrung der zweikernigen Zellen und die spätere Verminderung der großkernigen durch die häufigere Amitose bedingt sei. SCHLICHT (1957) beobachtete auch eine Vermehrung der zweikernigen Zellen im Hunger.

2. Bei ausschließlicher Gabe von kleinen Mengen von Gemüse nehmen sowohl zweikernigen als auch großkernigen Zellen an Zahl zu (Abb. 1 und Tabelle 1).

3. Bei ausschließlicher Gabe von zerkleinerten Reiskörnern vermehren sich zweikernigen und großkernigen Zellen stetig (Abb. 1 und Tabelle 1).

B. Bei der Darreichung von Chemikalien.

1. Die perorale Zufuhr von Buttergelb verursacht bis zum 150. Tage eine bedeutende Verminderung von zweikernigen Leberzellen. Dagegen nehmen die großkernigen Zellen bis zum 120. Tage an Zahl bedeutend zu und dann allmäh-

lich ab (Abb. 2 und Tabelle 1). Dieses Phänomen entspricht der Angabe von JACOBJ (1942), nach welcher die Verminderung von zweikernigen Zellen die Vermehrung von großkernigen Zellen begleitet. PFUHL (1930) fand auch vermehrte zweikernige Zellen in bösartigen Geschwülsten, und auch FISCHER (1954) in dem durch Buttergelbdarreichung erzeugten Leberkrebs, dagegen soll sich nach LANGER (1940) dabei keine Vermehrung der zweikernigen Zellen konstatieren lassen.

2. Durch die Zufuhr von Thioacetamid per Subkutis vermindern sich zweikernige Leberzellen dauernd, dagegen vermehren sich großkernige Zellen, und zwar, bis zum 12. Tage sehr rasch (Abb. 3 und Tabelle 1).

3. Infolge der peroralen Zufuhr von Thibion erfolgt eine bedeutende Vermeh-

Abb. 2. Die Prozentzahl von zweikernigen und großkernigen Leberzellen bei der Zufuhr von Buttergelb.

Abb. 3. Die Prozentzahl von zweikernigen und großkernigen Leberzellen bei der Zufuhr von Thioacetamid.

rung von zweikernigen Leberzellen und eine leichte Vermehrung von großkernigen Zellen (Abb. 4 und Tabelle 2).

4. Durch die perorale Zufuhr von Rattengift, Nekoirazu, ein Gelbphosphorpräparat, erfolgen beträchtliche Vermehrungen von zweikernigen und großkernigen Leberzellen (Abb. 4 und Tabelle 2).

5. Nach der Zufuhr von Chloroform per Subkutis nehmen die zweikernigen Leberzellen an Zahl zu, die großkernigen aber ab (Abb. 4 und Tabelle 2). SCHULTZ u. a. (1923) haben auch beim Kaninchen nach der Injektion von Chloroform eine Vermehrung von zweikernigen Leberzellen beobachtet.

6. Die Resultate nach der Zufuhr von Tetrachlorkohlenstoff per Subkutis sind wie bei dem Chloroform (Abb. 4 und Tabelle 2).

Abb. 4. Die Prozentzahl von zweikernigen und großkernigen Leberzellen. *A* bei der Zufuhr von Thibion, *B* bei der Zufuhr von Rattengift Nekoiraz, *C* bei der Zufuhr von Chloroform, *D* bei der Zufuhr von Tetrachlorkohlenstoff.

Tabelle. 2. Die Prozentzahl von zweikernigen und Großkernigen Leberzellen.

	Zeitablauf (Tage)	Zweikernige Zellen (%)	Großkernige Zellen (%)
Bei Thibion- zufuhr	12	14.1	5.8
	24	21.4	6.4
	2	22.1	9.8
	4	37.1	11.8
Bei Nekoiraz- zufuhr	4	17.4	10.4
	6	22.6	12.4
	9	25.2	12.8
	14	32.1	18.2
Bei Chloroform- zufuhr	6	9.4	13.2
	12	12.5	11.8
	24	19.7	8.8
	2	23.7	7.4
Bei Tetrachlor- kohlenstoff- zufuhr	3	12.3	14.8
	12	13.3	14.2
	24	26.5	10.4
	2	34.5	10.2
	3	38.2	7.2

C. Nach der intraperitonealen Injektion von pathogenen Erregern.

1. Nach der intraperitonealen Zufuhr von *Rickettsia orientalis* nehmen sowohl zweikernige, als auch großkernige Leberzellen an Zahl zu (Abb. 5 und Tabelle 2).

2. Nach derselben Zufuhr von *Ectromelia*-Virus aber vermehren sich zwar die ersteren, aber vermindern sich die letzteren in Übereinstimmung mit der Regel von JACOB (1942) (Abb. 5 und Tabelle 2).

D. Statistische Auswertung.

a) Veränderung der Häufigkeit des Auftretens von zweikernigen Zellen.

Bei <i>Rickettsia</i> <i>orientalis</i> - Injektion	2	15.0	11.2
	3	17.7	12.8
	4	23.3	14.8
	7	27.2	17.4
	9	29.6	17.8
Bei <i>Ectromelia</i> - Virus- Injektion	1	12.6	18.0
	2	18.8	11.2
	3	25.2	9.6
	4	25.4	4.4

Die stetige Vermehrung von zweikernigen Zellen erfolgt in absolutem Hunger, bei der ausschließlichen Gabe von kleiner Menge von Gemüse und von zerkleinerten Reiskörnern, bei der Zufuhr von Thibion, Nekoirazu, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff und bei der Einverleibung von *Rickettsia orientalis* und *Ectromelia*-

Abb. 5. Die Prozentzahl von zweikernigen und großkernigen Leberzellen. A bei der Injektion von *Rickettsia orientalis*, B bei der Injektion von *Ectromelia*-Virus.

Virus. Die stetige Verminderung der zweikernigen Zellen geschieht bei der Einverleibung von Buttergelb und Thioacetamid, beim ersterem aber vermehren sie sich etwas in späteren Stadien.

b) Veränderung der Häufigkeit des Auftretens von grosskernigen Zellen.

Die großkernigen Zellen vermehren sich ständig bei der ausschließlichen Gabe von kleinen Mengen von Gemüse oder zerkleinerten Reiskörnern, bei der Zufuhr von Thioacetamid, Thibion, Nekoirazu und bei der Einverleibung von *Rickettsia orientalis*. Ihre anfängliche Vermehrung mit anschließender Verminderung sieht man in absolutem Hunger und bei der Zufuhr von Buttergelb. Sie vermindern sich stetig bei der Zufuhr von Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff und bei der Einverleibung von *Ectromelia*-Virus.

c) Beziehung zwischen der Häufigkeit des Auftretens von zweikernigen Leberzellen und der Kernplasmarelation der Leberzellen.

Die Vermehrung der zweikernigen Leberzellen und die Erhöhung der Kernplasmarelation, d. h. der relativen Vergrößerung des Kerns, welche in meiner letzten Mitteilung (1959) beschrieben ist, gehen bei der Verweigerung von Speise und Trank und bei der Gabe von kleinen Mengen von Gemüse parallel. Bei der ausschließlichen Gabe von zerkleinerten Reiskörnern, bei der Zufuhr von Thibion, Rattengift Nekoirazu, Chloroform und Tetrachlorkohlenstoff und bei der Einverleibung von *Rickettsia orientalis* und *Ectromelia*-Virus wird die Vermehrung von zweikernigen Zellen von der Erniedrigung der Kernplasmarelation begleitet. Bei der Einverleibung von Buttergelb und Thioacetamid findet die Abnahme der Zahl von zweikernigen Zellen und der Erniedrigung der Kernplasmarelation statt, aber später nehmen beim Buttergelb die beiden zu, während beim Thioacetamid nur die Kernplasmarelation zunimmt.

III. Zusammenfassung.

Es wurde nach PFUHL und MÜNZER die im Titel zum Ausdruck gebrachte Untersuchung vorgenommen.

1. Die Vermehrung von zweikernigen Zellen, die Verminderung von großkernigen Zellen und die Erniedrigung der Kernplasmarelation zeigten sich bei der Einverleibung von Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff und *Ectromelia*-Virus.

2. Die Vermehrung von zweikernigen und großkernigen Zellen und die Erhöhung der Kernplasmarelation vollzogen sich in absolutem Hunger und bei der ausschließlichen Gabe von kleinen Mengen von Gemüse, aber die Vermehrung von zweikernigen und großkernigen Zellen und die Erniedrigung der Kernplasmarelation bei der ausschließlichen Gabe von zerkleinerten Reiskörnern, bei der Zufuhr von Thibion, Rattengift Nekoirazu (ein Gelbphosphorpräparat) und bei der Einverleibung von *Rickettsia orientalis*.

3. Die Verminderung von zweikernigen Zellen, die markante Vermehrung von großkernigen Zellen und die Erniedrigung der Kernplasmarelation vollzogen sich bei der Einverleibung von karcinogenem Buttergelb und Thioacetamid.

内 容 自 抄.

2核細胞が増し、大核細胞が減じ、核胞形質比も減ずるのは、Chloroform、Tetrachlorkohlenstoffを与えるときと *Ectromelia*-Virusに感染の場合である。2核細胞と大核細胞がともに増し、核胞形質比も上がるのは飲食を全く与えぬ場合と少量の菜葉のみを与える場合で、そのとき核胞形質比のみ下がるのは、砕き米のみ、Thibion、ネコイラズを与え、また *Rickettsia orientalis*に感染させる場合である。2核細胞が減じ、大核細胞が増し、核胞形比質が減ずるのは発癌性物質の Buttergelb と Thioacetamid を投与した場合である。

Literatur.

Aubin, P. M. G. and N. L. R. Bucher: A study of binucleate cell counts in resting

and regenerating rat liver employing a mechanical method for the separation of liver cells. Anat. Rec. 112 (1952). — **Fischer, V. W.**: Durch Buttergelb erzeugte Tumoren. Arch. Geschwulstforsch. 7 (1954). — **Jacobj, W.**: Über das rhythmische Wachstum der Zellen durch Verdoppelung ihres Volumens. Arch. Entwickl.-mechan. 106 (1925). — Die verschiedenen Arten des gesetzmäßigen Zellwachstums und ihre Beziehung zu Zellfunktion, Umwelt, Krankheit, maligne Geschwulstbildung und inneren Bauplan. Arch. Entwickl.-mechan. 141 (1942). — **Langer, A.**: Zellkernmessungen an Rettenlebern nach Fütterung mit Dimethylaminoazobenzol (Buttergelb). Med. Klin. 36 (1940). — **Münzer, F. T.**: Über die Zweikernigkeit der Leberzellen. Arch. mikr. Anat. 98 (1923). — Experimentelle Studien über die Zweikernigkeit der Leberzellen. Arch. mikr. Anat. 104 (1925). — **Murakami, F.**: Bestimmung der Kernplasmarelation der Leberzellen nach der Treffermethode im Hunger, Durst und in verschiedenen Erkrankungen bei der Maus. Arch. hist. jap. 18 (1959). — **Pfuhl, W.**: Untersuchungen über zweikernige Zellen. I. Die Berechnung der zweikernigen Zellen nach der Auszählung im mikroskopischen Schnitt. Z. mik.-anat. Forsch. 22 (1930). — **Phan, N. V. u. H. David**: Zur Frage der Genese und Zahl groß- und zweikerniger Leberzellen bei Mäusen in und nach absolutem Hunger. Z. Zellforsch. 48 (1958). — **Schlicht, I.**: Experimentelle Untersuchungen über Lebernekrosen im absoluten Hungerzustand. Virchows Arch. 330 (1957). — **Schultz, E. W., E. M. Hall and H. V. Baker**: Repair of the liver following the injection of chloroform into the portalsystem. J. med. Res. 44 (1933). — **Wilson, M. E., R. E. Stowell, H. O. Yokoyama and K. K. Tsuboi**: Cytological changes in regenerating mouse liver. Cancer Res. 13 (1953).