

Title	ラット正常肝並びに再生肝抽出物質のLp1株細胞増殖に及ぼす影響
Author(s)	田中, 元
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/29306
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名・(本籍)	田 中 元 た なか はじめ
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 1 0 4 8 号
学位授与の日付	昭 和 4 1 年 1 1 月 2 1 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	ラット正常肝並びに再生肝抽出物質の Lp_1 株細胞増殖に 及ぼす影響
論文審査委員	(主査) 教 授 陣内伝之助 (副査) 教 授 天野 恒久 教 授 萩原 文二

論 文 内 容 の 要 旨

I) 目的 肝部分切除後にみられる旺盛な肝再生現象については、従来多くの研究があるが未だ尚定見がえられていない。私は、肝部分切除後の再生肝にはその再生現象に關与する何らかの因子があるのではないかと考え、ラット肝部分切除後の再生肝抽出物質及びそのエタノール分画を用い、組織培養 Lp_1 株細胞の増殖に及ぼす影響を検討した結果、次のような成績をえた。

II) 実験材料並に実験方法

1) 再生肝及び正常肝の採取

生後約 3 ヶ月、体重 150~180g の雄 S 系ラットを用い、再生肝作成は Higgins, Anderson の方法に従った。肝採取はラットを頸椎脱臼により屠殺し、生理的食塩水で充分肝を灌流後採取した。次に、採取した肝に約 3 倍量の生理的食塩水を加え Waring blender (VirTis) で 45,000 r.p.m. 2 分間処理後 0~5°C で 10,000 g 15 分遠沈した上清を S_0 分画、これに 30 容量%になるよう氷冷エタノールを加えて同様遠沈した沈渣の水溶液を S_1 分画、その上清に更に 70 容量%となるよう氷冷エタノールを加え遠沈してえた沈渣の水溶液を S_2 分画、上清を S_3 分画とした。

2) 組織培養細胞増殖に及ぼす効果の検定法

TD 40 型瓶内で継代培養後 4~6 日経過して monolayer sheet となった Lp_1 株細胞をラバークリーナーで剝離し、維持培地で約 3 万個 /ml の細胞浮遊液を作りメスピペットで正確に 1.5 ml ずつ短試験管に分注し 37°C 孵卵器中に 5 度の傾斜をもたせて 1 夜静置したのち at random に各群 10 本ずつに分ち、培地をすてて実験材料を含む培地を夫々 1.5ml ずつ添加培養をつゞけ 2 日毎に培地を交換する。第 2, 4, 7 日目に各群 3~4 本の試験管をとり培地をすてクリスタルバイオレット加 20%クエン酸 5~7 ml を加え細胞核を遊離染色し、Bürker-Türk 血球計算盤で細胞核数を算定した。

III) 実験成績

1) 正常肝並に肝部分切除後24時間の再生肝よりえた S_0, S_1, S_2, S_3 各分画の効果

i) 粗抽出液 S_0 分画。正常肝, 再生肝いずれも終濃度 0.001~0.005 mgN/ml で僅かに増殖促進作用を示し, 0.005 mgN/ml 以上の濃度では増殖を抑制する。

ii) S_1 分画。正常肝, 再生肝とも Lp_1 株細胞増殖促進作用は殆んどみられず, 終濃度 0.015 mgN/ml 以上で増殖を抑制する。増殖抑制作用は正常肝にやゝ強い傾向がみられる。

iii) S_2 分画。正常肝では終濃度 0.001 mgN/ml で Lp_1 株細胞に対し30~40%の増殖促進率(培養第7日の細胞核数より対照の細胞核数を減じた数値の対照の細胞核数に対する百分率)を示し, 再生肝では同濃度で約80%の増殖促進率を示す。正常肝, 再生肝いずれも終濃度 0.001mgN/ml 以下では次第に増殖促進効果は減弱し, 又より高濃度の添加では次第に増殖抑制作用を示すようになる。増殖抑制作用を示しはじめる濃度は正常肝では 0.003 mgN/ml, 再生肝では 0.01 mgN/ml である。

iv) S_3 分画。正常肝, 再生肝いずれも終濃度 0.0003~0.015 mgN/ml の範囲内で Lp_1 株細胞の増殖に対し殆んど影響を示さない。

2) 肝部分切除後再生肝採取までの時間と S_2 分画の効果。

肝に部分切除を行なって12, 24, 48, 96時間目に夫々採取した肝の S_2 分画についてその効果を比較すると, 増殖抑制作用には殆んど差を認めないが, 増殖促進作用は24時間目採取のものが最も顕著であった。

3) 正常肝及び再生肝 S_2 分画に含まれる Lp_1 株細胞増殖促進物質並に抑制物質の性状。

i) 耐熱性。56°C 30分, 60°C 5分の加熱では両物質とも影響をうけない。100°C 5分加熱すると S_2 分画の増殖抑制作用は殆んど消失する。100°C 30分加熱では増殖促進作用も失われる。

ii) 透析性。セロファンチューブで蒸留水に対して透析すると両活性とも内液に残り, 外液には全く認められない。

iii) 加水分解に対する態度。

プロナーゼで処理すると両活性とも消失する。トリプシン処理では増殖促進作用は殆んど影響をうけず残されるが, 増殖抑制作用は失われる。

iv) イオン交換樹脂通過分画について。

IRC-50 カラム通過分画には増殖促進効果が充分残されるが, IR-45 カラム通過分画では増殖促進効果は全くみられなくなる。

以上の範囲内では, 正常肝, 再生肝いずれの S_2 分画もその性状に差は認められなかった。

IV) 結 語

i) 正常肝, 再生肝いずれもその S_2 分画は高濃度添加で Lp_1 株細胞増殖を抑制し, 低濃度では増殖を促進させるが, 増殖抑制作用は正常肝により著しく, 促進作用は再生肝において高度であった。

ii) 肝部分切除24時間後採取の再生肝よりえられた S_2 分画が, Lp_1 株細胞増殖促進効果が最も顕著であった。

iii) 増殖促進, 抑制物質はいずれも透析により内液に残り, プロナーゼ消化によって作用を失う。

iv) 増殖促進物質は100°C 5分の加熱又はトリプシン処理に耐えるが, 増殖抑制物質は同処理によって作用を消失する点において両物質は異なるものと思われる。

論文の審査結果の要旨

創傷の治癒過程をはじめ、生体にみられる再生、成長の調節機構については古くより注目され、とくに肝部分切除後に見られる旺盛な再生現象については数多くの研究がある。現在までのところ、肝再生現象を増殖促進物質の増加によって説明しようとするものと、反対に増殖抑制物質の減少によるもの2つがあるが、その各々についての反論もあり、なおその本態については不明の点が多い。

田中はラット肝部分切除後の再生肝および正常肝の抽出液並びにそのエタノール分画を用い、それぞれの組織培養 Lp_1 株細胞の増殖に及ぼす影響を検討した結果、正常肝、再生肝ともにそのエタノール30~70容量%で沈澱する分画 (S_2 分画) において、高濃度添加では Lp_1 株細胞増殖抑制作用を、低濃度添加では増殖促進効果を示すことを知り、又増殖抑制効果は正常肝により著しく、促進効果は再生肝により高度におこることを認めた。又肝部分切除後、DNA合成が最も盛んであるとされる24時間目に採取した再生肝よりえた S_2 分画がその促進効果も最も顕著であった。次に正常肝及び再生肝の S_2 分画を更に検討して、この分画に含まれる増殖抑制物質がトリプシン処理又は 100°C 、5分の加熱によって全くその作用を失うのに反し、促進物質は同様処理によく耐えることを認めた。又増殖抑制並びに促進両作用物質は透析によって内液に残り、プロナーゼ処理によって完全にその作用を失う。

以上の事実は、正常肝、再生肝いずれにおいても2つの相異なる作用物質即ち Lp_1 株細胞に対する増殖促進物質と抑制物質を含むが、再生肝においては抑制物質が減少し、促進物質が増加していることを推定せしめるものであり、これが肝再生現象に何らかの影響を与えていることを推測せしめる。

以上のことからこの研究は肝再生現象に関与する因子の解明に一つの手がかりを与えうるものと考えられる。