



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	大阪大学, 1966, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/29306">https://hdl.handle.net/11094/29306</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

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 41 年 11 月 21 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関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剥離し、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1.5ml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5~7ml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み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とするものの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  $L_{p_1}$  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  $L_{p_1}$  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  $100^{\circ}\text{C}$ , 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  $L_{p_1}$  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ものと考ええる。