



Title	培養ラット肝細胞のANOXIAによる形態学的変化
Author(s)	堺, 秀行
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35269
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	堺	秀	行
学位の種類	医	学	博
学位記番号	第	7680	号
学位授与の日付	昭和	62年3月26日	
学位授与の要件	医学研究科外科系専攻		
	学位規則第5条第1項該当		
学位論文題目	培養ラット肝細胞のANOXIAによる形態学的变化		
論文審査委員	(主査) 教授 森 武貞		
	(副査) 教授 鎌田 武信 教授 藤田 尚男		

論文内容の要旨

[目的]

肝臓がanoxiaにおちいると、肝傷害の進行とともに肝細胞表面にblebが出現することが形態学的に指摘されている。しかし、anoxiaによる肝細胞表面でのbleb出現のメカニズムや、blebと細胞傷害の程度との関連性については未だ解明されていない。そこで、本研究ではこの点を明らかにするために、ラット肝細胞の初代培養を行い、これがanoxia実験のモデルとなり得ることを確認し、anoxia及びrexygenationによる肝細胞のviabilityの変化とそれに伴う細胞の形態的変化を経時的に光顕、走査型電顕(SEM)及び透過型電顕(TEM)を用いて検索した。そして、虚血肝細胞傷害の進展におけるいわゆる『reversible point』をbleb形成の面から検討した。

[方 法]

Seglenの方法に準じ、8-10週齢のWistar系雄ラットの肝臓をcollagenase含有のEagle MEM溶液で37°C、約10分間灌流し、viability 95%以上の分離肝細胞を得た。Fetal calf serum, insulin, dexamethasone, ampicillinを含むWilliams' E培養液で 5×10^5 cells/mlの濃度に調整し、直径35mmのculture dishに1.5ml散布後、CO₂ incubatorで37°C、48時間培養した。Anoxia群(1, 2, 3, 4時間)は、培養液を2.5mM Ca⁺⁺を含むMEM溶液と交換後、培養肝細胞を密封できる箱に入れ、5% CO₂、95% N₂の混合ガスを流入させることで作製した。Reoxygenation群は、anoxia終了後、通常のCO₂ incubatorにもどし更に1時間培養した。培養液交換後CO₂ incubatorで培養を続けたものをcontrolとした。肝細胞のviabilityは、trypan blue dye exclusion testにて判定した。各群の培養肝細胞を用いて、hematoxylin-eosin(HE)染色、acid phosphatase(ACP)染色、脂肪染色(Sudan III, Sudan black B),

PAS (Periodic acid Schiff) 染色, Feulgen DNA染色を行い, 光顕で観察した。電顕は各群の培養肝細胞を glutaraldehyde, osmiumtetroxideで固定後, 型のごとく処理し, SEM及びTEMで観察した。また, anoxia群で同一標本を光顕とSEMで観察し, 同一細胞の viability と細胞膜の SEM像を比較検討した。

[結果]

肝細胞の viability は, control群で100%, anoxia 1時間, 2時間, 3時間, 4時間群でそれぞれ99%, 99%, 88%, 35%と, 3時間を経過する頃より急速に低下した。光顕像においては, 4時間 anoxia群は control群に比してACP染色, PAS染色は染色性が低く, Feulgen DNA染色は染色性が高かったが, HE染色では著明な差は認められなかった。また, trypan blueで染まる細胞は, SEMで見ると細胞膜は完全に崩壊しており, viableな細胞と容易に区別できた。そこで以下の観察は viableな細胞について行った。Viabilityに殆ど変化の見られない2時間 anoxia群の細胞でも, SEM像では微絨毛の減少及び微絨毛からの small bleb (直径約 1 μm 前後) の出現が認められた。4時間の anoxia では, 微絨毛を持った細胞の割合は0となり, small bleb はさらに増加し, 直径約 5 μm 前後の large bleb が約10%の細胞に認められるようになった。各 anoxia群を reoxygenationすると, 2時間 anoxiaまでは微絨毛は完全に再生し, small bleb は消失した。しかし 3時間以上の anoxia ではこれらはある程度の改善を見たが, 完全には復帰しなかった。一方, TEM像においても細胞膜表面の変化は SEMと同様であった。細胞内小器官の一つの mitochondria は, anoxia 2時間までは著明な変化を示さなかったが, 3時間頃より膨化が見られるようになり, 4時間ではその傾向は更にすすんだ。そして large bleb を持った細胞の mitochondria は明らかに崩壊していた。

[総括]

培養肝細胞を anoxia にすると, 時間の経過と共に細胞表面の微絨毛の減少, 消失が観察され, 同時にサイズの異なる 2種類の bleb が出現した。先ず, 最初に微絨毛から発生すると考えられる直径約 1 μm 前後の small bleb が現れるが, これは reoxygenation すると見られなくなり, reversibleな変化と考えられた。Anoxia が更に進むと small bleb と混在するかまたは無関係に, 直径約 5 μm 前後の large bleb が出現した。Large bleb を有する細胞は細胞膜の破壊は未だないが, reoxygenationを行っても reverse しないで, このまま死に至ることが明らかとなった。以上より, 細胞表面の微絨毛が殆ど消失し small bleb が多数出現しているが, large bleb が出現していない状態がいわゆる『reversible point』であると考えられた。

論文の審査結果の要旨

本研究は, ラット肝細胞の初代培養を行い, これが anoxia 実験モデルとなり得ることを確認し, anoxia 及び reoxygenation による肝細胞の viability の変化とそれに伴う細胞の形態学的变化を経時的に光顕, 走査型電顕及び透過型電顕を用いて検索すると同時に, 虚血性肝細胞傷害の進展におけるいわゆる

『reversible point』をbleb形成の面から検討したものである。

培養肝細胞をanoxiaにすると、時間の経過と共に細胞表面の微絨毛の減少、消失が観察され、同時にサイズの異なる2種類のblebが出現した。先ず、最初に微絨毛から発生すると考えられる直径約1μm前後のsmall blebが現れるが、これはreoxygenationすると見られなくなり、reversibleな変化と考えられた。Anoxiaが更に進むとsmall blebと混在するかまたは無関係に、直径約5μm前後のlarge blebが出現した。Large blebを有する細胞は細胞膜の破壊は未だないが、reoxygenationを行ってもreverseしないで、このまま死に至ることが明らかとなった。以上より、細胞表面の微絨毛が殆ど消失しsmall blebが多数出現しているが、large blebが出現していない状態がいわゆる『reversible point』であることが示された。

これらの知見は肝細胞の研究のみならず、肝切除や肝移植などの肝臓外科における肝の機能評価に非常に有用で、学位に値するものと考える。