

ラット肝上清中に存在する細胞増殖抑制因子について

岡山大学医学部第一生理学教室（主任：堀 泰雄教授）

倉 光 誠

（昭和54年12月21日受稿）

Key words : 細胞増殖抑制因子, ラット肝上清, L細胞

緒 言

1931年 Higgins と Anderson¹⁾が、ラット肝臓の部分切除法を確立して以来、同法適用後にみられる肝再生の現象は、動物細胞増殖制御機構に関する研究に、しばしば利用されてきた。現在、肝再生機構に関する理論は、大別して次のいづれかに分類される。すなわち、一つは、肝の部分切除によって増殖促進物質が、肝外に生じるとする体液性細胞増殖促進因子説であり、他は、元来正常肝細胞内に存在する増殖抑制物質が再生誘導により、その抑制力を失なうとする臓器性細胞増殖抑制因子説である。前者による細胞増殖促進因子としては、インスリン様物質^{2),3),4),5),6)}、血清成分^{7),8)}、ホルモン^{9),10)}などがあげられている。従来の研究により、これらの体液性因子の存在が、肝再生のための必要条件であることは、充分証明されているが、一方それが、その十分条件を満たしているとはいいがたい。後者の説による細胞増殖抑制因子として、コルニン、Chalone などがあげられる。臓器性細胞増殖抑制因子説は、極めて興味ある仮説である。しかし、抑制因子の存在を証明するための理想的な検定系がないため、肝コルニン^{11),12),13),14),15),16)}を始め、Hepatic chalone^{17),18),19),20),28)}、その他のLiver factor^{21),22),23),24),25),26),27)}などは、培養細胞系、臓器切片あるいは、in vivo細胞系を用いて検索され、これらの系において細胞増殖抑制効果が示されているにすぎない。臓器性細胞増殖抑制因子として、肝細胞の増殖を制御する因子であることを示すには、各因子において、より一層の精製と物性検索を行なうと同時に、非特異的な抑制因子の除外が必要である。

著者は、西田らの肝コルニンについてさらに詳しく検索する目的で、培養L₉₂₉線維芽細胞

の増殖及びDNA合成に対する効果を指標にして、ラット正常肝上清中に存在する細胞増殖抑制因子の分離精製を行ない、その物性と作用機序とを明らかにするための実験を行なった。その結果、ラット正常肝上清より二つのL₉₂₉線維芽細胞増殖抑制因子が分離された。第一の因子は、Arginase活性をもつ因子であった。第二の因子は、L₉₂₉線維芽細胞の蛋白合成を第一義的に抑制する因子で、Trypsin, RNase および熱処理に対して安定な因子であった。

材料及び方法

I. 増殖抑制効果検定のための細胞系

マウス由来線維芽細胞L₉₂₉株（以下、L細胞）を増殖培養液（Growing Medium, 以下、GM）すなわち2% Triptose-Phosphate-Broth（以下、TPB）（DIFCO）と5% 牛血清（半井化学）を含有するEagle's Minimum Essential Medium（以下、MEM）（日水）に継代培養したものを用いた。閉鎖系の培養は培養用恒温器内で、プラスチックシャーレによる開放系培養は、5% CO₂含有1気圧大気培養恒温器内で行なった。温度は37±2℃に保った。

II. 正常肝及び再生肝材料の調製

当教室で自家繁殖させたウィスター系ラット（生後4週～6週）において、Higgins & Anderson¹⁾の方法により、その肝臓の3分の2を切除し、切除肝を正常肝として、0°～4°CのSTE溶液すなわち、0.25M Sucrose および1mM EDTAを含む10mM Tris-Hcl (pH 7.4) 溶液中でよく脱血洗浄し、-80℃で凍結保存した。残存肝は、肝切除手術24時間後に、ラットを断首屠殺して採取し、再生肝としてSTE溶液で脱血洗浄後-80℃で凍結保存し、使用した。尚、部分肝切除術は前日午後6時よりラットを

絶食・自由給水としておき、当日午前10時より午後1時の間に施行した²⁹⁾。

III. 肝細胞分画

-80℃に保存した肝臓を解凍し、直ちに冷STE溶液中で細切し、充分血液成分を除去した後、Waring blenderで破碎し、ガーゼ布続いてテロン布で濾過した。濾液をテフロンホモゲナイザーで破碎した後、5 M KOHを加えてpH 7.4に調整した。次に10,000×g、10分間の遠沈を行なって核及びミトコンドリア画分を除き、その上清を105,000×g、60分間遠沈して、ミクロゾーム画分を除去した³⁰⁾。この上清を肝細胞上清画分(正常肝よりのものをNS₂、再生肝よりのものをRS₂)とし、β-mercaptoethanolを5 mMの濃度になるように加え、5 mM β-mercaptoethanolを含む1 mM Tris-Hcl (pH 7.4) 溶液に対し、充分透析した後、濃縮、凍結乾燥し、さらに以下の操作を行なった。

IV. DEAE cellulose クロマトグラフィーによる肝上清画分の分画

IIIにより得られた肝上清画分を5 mM β-mercaptoethanolを含む10 mM Tris-Hcl (pH 7.8) 溶液(以下、TM 溶液)に溶解し、破碎後、10,000×g、10分間遠沈し、不溶成分を除去し、TM 溶液で平衡化したDEAE cellulose カラムにかけた。非結合画分(N-A)が完全に流出した後、0.5 M Naclを含むTM 溶液添加により溶出する画分をN-B画分、更に1.0 M Naclを含むTM 溶液添加により溶出する画分をN-C画分として、それぞれの画分を、5 mM β-mercaptoethanol含有1 mM Tris-Hcl (pH 7.4) 溶液に対し充分透析し、濃縮、凍結乾燥して保存し、抑制因子試料として活性測定に使用した。

V. 細胞増殖に対する試料の抑制活性の測定法

L 細胞を付着培養液(Seeding Medium, 以下、SM)すなわち2% TPBを含有するMEMに1% 仔牛血清を添加した培養液中に浮遊させ、7.55cm²プラスチックシャーレ(豊島製作所)に、2×10⁴個/シャーレの割合で、植え込んだ。約24時間後、休止培養液(Resting Medium, 以下、RM)すなわち2% TPB含有MEMにより培養液を交換し、さらに約72時間培養して休止状態にした。その後、GMあるいは、IVによって得た試料を添加したGMに培養液交換し、

48時間培養後にトリプシン・EDTA溶液すなわち、0.05% Trypsin, 0.02% EDTAを含有するPBS(-)(Phosphate-Buffered-Saline)で細胞を浮遊化させ、Coulter Counter (Coulter Electronics Inc. USA)で細胞数を計数した。

試料の添加は、次の方法で行なった。まず、凍結乾燥粉末状態の試料をPBS(-)に溶解し、破碎後、10,000×g、10分間の遠沈により不溶成分を除き、上清をmillipore filter (Type HA 0.45 μm Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts 01730)で濾過した。次に、Lowry法³¹⁾により試料の蛋白量を測定し、それによって添加すべき試料の量を決定して、GMに添加した。

試料の細胞増殖抑制活性の算定のために、各試料につき、3シャーレの培養細胞を使用し、各シャーレごとに細胞数を計測して、その平均値を求めた。コントロール系との比較は次式により行なった。

$$\text{Percent of control} = \frac{\text{試料添加GM系における平均細胞数}}{\text{GM系における平均細胞数}} \times 100 (\%)$$

VI. L-arginine の添加の方法及び Arginase 活性の測定法

L-arginineを培養液に添加する場合、L-arginine(半井化学)をPBS(-)に溶解し、millipore filter (0.45 μm)で濾過した後、一定の濃度になるように培養液に添加した。

Arginase活性は、Van Slykeの方法³²⁾により測定した。

VII. G-150 Sephadex クロマトグラフィーによる分画

TM 溶液で平衡化したG-150 Sephadex (Pharmacia Fine Chemical) カラムに、IVで述べた操作により可溶化したN-B画分をかけ、分画した。

VIII. 核酸・蛋白質合成能の測定

SMに浮遊させた細胞を18.1cm²のプラスチックシャーレ(豊島製作所)に、約4×10⁵個/シャーレの割合でまきこみ、細胞が互いに接触するまで増殖させたあと、培養液をRMに交換し休止状態にする。その後さらに、RMをGMに変換する(Turn-on)ことにより、G₁-S変換期

への誘導をはかった⁴⁰⁾。ここで、G₁-S 変換期とは、準同調培養系における G₁-S 変換期であり、Turn-on より16時間後までの時期をいう。Turn-on 16時間後より20時間後までの4時間は³H-thymidine のとりこみの最も盛んな時期で、この時期を準同調系のS期という。

培養細胞のDNA合成能の評価は、S期における³H-thymidine のとりこみをRudlandの方法³³⁾に従って測定することによって行なった。

蛋白合成能の評価のために¹⁴C-leucine のとりこみをRudlandの方法で測定した。

またRNA合成能の評価は、³H-uridine のとりこみを測定することによって行なった。すなわち、ラベリング後、Rozenfurtの方法³⁴⁾で酸可溶性画分を取り除き、その後細胞をNaOHで処理し、遠沈を行なった後、上清中の放射活性をTriton X-100シンチレーター⁴¹⁾を用いて測定した。DNA合成系及び蛋白合成系にとりこまれた放射活性の測定は、トルエンベースシンチレーター³⁵⁾を用いて行なった。

測定は、すべて、Packard Scintillation Counterで行なった。RNA合成系及び蛋白合成系での放射活性前駆体のとりこみは、ともに、G₁-S変換期において、30分、60分、120分間のラベリング、すなわちkineticな系により行なった。³H-thymidine、³H-uridine および¹⁴C-leucine は、Radiochemical Centre (Amersham, England) より購入したものを使用した。

培養細胞の核酸及び蛋白合成能に対する各試料の効果を評価するために、Vに述べた方法で滅菌処理した試料を、DNA合成系の場合は、Turn-onと同時に、RNA合成系と蛋白合成系の場合は、放射活性前駆体の添加と同時にGMに添加した。コントロール培養系および、試料添加培養系ともに、3シャーレの細胞を使用し、とりこまれた放射活性の平均値を求めた。次式によりコントロール系との比較を行なった。

$$\text{Percent of control} = \frac{\text{試料添加 GM 系における平均 c. p. m.}}{\text{GM 系における平均 c. p. m.}} \times 100 (\%)$$

IX. 紫外外部吸収測定

試料の紫外外部吸収測定は、日立分光光度計 (EPS 3 T 自記分光計) を使用して行なった。

X. Trypsin, RNase および熱処理による試料

の活性変化

Vに述べた方法で滅菌処理したB-5 (詳しくは後述) の1 mgあたりに、10 μ gのTrypsin (DIFCO) を添加し、37 $^{\circ}$ Cで1時間処理を行なった。処理後直ちに、10 μ gのTrypsin Inhibitor (T 9003, SIGMA) を加えて反応を停止させた。RNaseによる処理は、B-5 1 mgあたりに、1mM MgCl₂を含む25 μ gのRNase A (15140, Boehringer Mann.) を添加し、37 $^{\circ}$ Cで1時間行ない、その後、2 mM EDTA を加えて反応を停止させた。熱処理は、B-5 を沸湯槽内に、1分、10分、60分間保ったのち、直ちに冷却することによって行なった。これらの処理を加えた試料のDNA合成抑制効果をVIIIに述べた方法に従って調べ、処理による抑制活性の変化を検索した。測定系と同様の処理を行なったPBS (-) をDNA合成系に添加し、Trypsin, Trypsin Inhibitor, RNase A, MgCl₂, EDTA などの添加がDNA合成に認むべき影響を与えないことを確認している。

結 果

正常肝上清 (NS₂) は、100 μ g/ml の濃度でL細胞の増殖を約14%抑制した (Table 1)。Table 1. Effects of NS₂ fractionated by DEAE-cellulose on cell proliferation.

System	Cell No. a) ($\times 10^{-3}$)	Percent b) of control
Growing Medium (GM)	29.8	100
GM+NS ₂ (100 μ g/ml)	25.6	85.9
GM+N-A (100 μ g/ml)	10.8	36.2
GM+N-B (100 μ g/ml)	26.8	89.9
GM+N-C (30 μ g/ml)	28.6	96.0

a) Triplicate identical dishes were used for one assay point to calculate the mean value of the cell number.

The standard deviation did not exceed 10% of mean value.

b) Percent of control was calculated by the formula described in the Materials and Methods.

NS₂に存在する細胞増殖抑制因子を精製する目的で、まず、DEAE cellulose による分画を行なった。この分画法によって得られた、N-A, N-B, N-Cの各画分 (Fig. 1) について細胞増

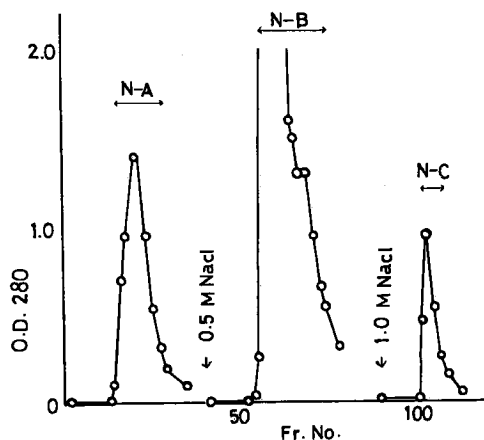


Fig. 1. Elution pattern of NS₂ from DEAE-Cellulose column.

抑制効果を検索した結果、非結合画分の N-A には、強い抑制活性が認められ、0.5 M NaCl 添加により溶出する画分 N-B には約10%の抑制活性が認められた。1 M NaCl 添加により溶出する画分 N-C には、ほとんど抑制効果は認められなかった。

ラット肝より抽出される Arginase は生理的 pH の範囲内では正に荷電するので³⁶⁾、DEAE cellulose 非結合画分 N-A には、Arginase 活性の存在する可能性が考えられたが、検索した結果、Fig. 2 に示す如く、N-A には、Arginase 活性が著明に認められた。

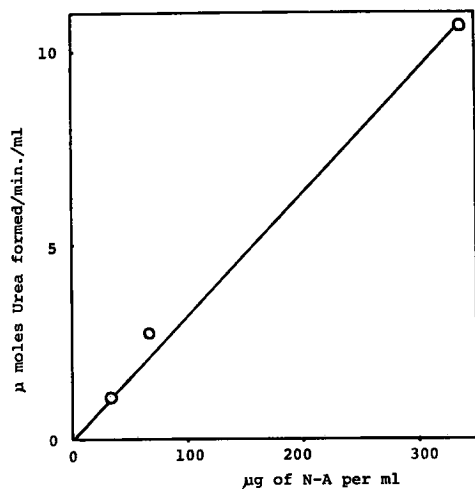


Fig. 2. Arginase activity in N-A.

Curve showed the proportionality between the amount of arginine hydrolyzed and the amount of enzyme present in N-A.

次に N-A が持つ強い細胞増殖抑制作用は、N-A 中の Arginase 活性のみに起因するものか否かを明らかにするために、L-arginine (以下、L-arg.) を培養液に添加して、N-A の細胞増殖抑制効果の変化を検索した。その結果、Fig. 3 に示す様に、L-arg. を約7.5mM 添加することにより N-A の細胞増殖抑制効果は完全に消失した。従って、N-A 中に存在する細胞増殖抑制因子は、Arginase であることが示された。

つぎに、N-B は100 μg/ml の濃度で、L 細胞

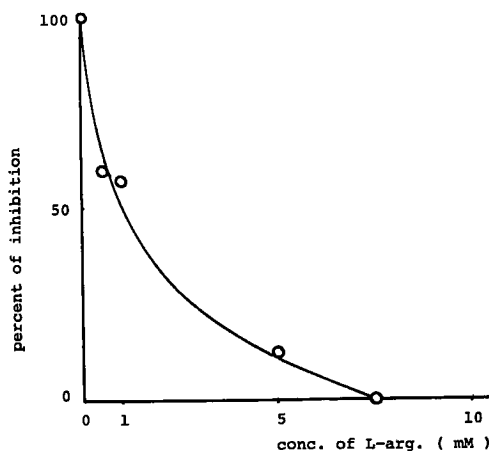


Fig. 3. Competitive effect of L-arginine on the inhibitory effect of N-A on cell proliferation.

The percent of inhibition was calculated by the following formula: $[\text{cell number in GM} + \text{L-arg.} - \text{cell no. in GM} + \text{N-A} (50 \mu\text{g/ml}) + \text{L-arg.}] \div [\text{cell no. in GM} - \text{cell no. in GM} + \text{N-A} (50 \mu\text{g/ml})]$
The abscissa indicates concentrations of L-arg. in GM.

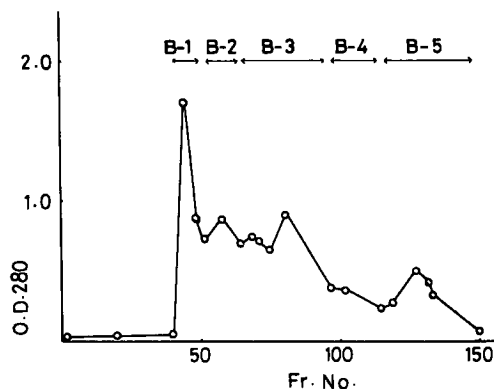


Fig. 4. The elution pattern of G-150 Sephadex chromatography of N-B.

の増殖を約10%抑制したが(Table 1), この中に存在する抑制因子を精製する為に, N-Bを Sephadex G-150 で分画し, 分子量の大きい順に, N-B-1, N-B-2, N-B-3, N-B-4, N-B-5 の五つの画分に分けた(Fig. 4). この5画分のそれぞれについて, L細胞のS期 DNA 合成に対する効果を検索した結果, N-B-5に, 強いDNA 合成抑制効果が認められた. Table 2にN-B-5のS

Table 2. Effects of N-B-5 and R-B-5 on DNA synthesis^{a)}

System	Percent of control ^{a)}
Growing Medium (GM)	100
GM + N-B-5	
Exp. ^{b)} 1 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	11.6
Exp. 2 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	43.1
Exp. 3 (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	53.7
Exp. 4 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	45.4
GM + R-B-5	
Exp. 1 (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	2.8
Exp. 2 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	35.4

a) The assay system of DNA synthesis in S phase was described in the Materials and Methods.

b) The sample from different batches was used in each Experiment.

c) Percent of control was calculated by the formula described in the Materials and Methods.

期DNA 合成抑制効果が示されているが, ここで明らかな様に, N-B-5のDNA 合成抑制効果の大きさは, その添加量を蛋白量で表示した場合, 添加量に比例しない. ここで, この抑制因子の活性が, バッチにより, 大きく違わないと仮定すれば, この結果は, この因子が, 蛋白質性のものではないという可能性を示すものであった.

N-B-5に, Arginase 活性が存在するか否かを検索したが, Arginase 活性は, まったく認められなかった.

次に, N-B-5のDNA 合成抑制効果が, 直接的効果あるいは間接的効果のいずれであるかを検索する目的で, 準同調培養系について, 4時間ごとに区切ったG₁-S変換期の各期, ならびにS期の4時間に, N-B-5を作用させ, S期DNA 合成すなわち, Turn-on 16時間後から20時間後

までの期間における³H-thymidineのとりこみを調べた(Fig. 5). その結果, Fig. 5に示されている様に, G₁-S変換期に作用させた場合の方が, S期に作用させた場合より抑制効果が大きであった. この結果から, N-B-5のDNA 合成抑制効果は, 間接的効果である可能性が示唆された.

次の問題は, N-B-5の第一義的作用点が, G₁-S変換期における, いかなる過程にあるかを決定することであった. そのため, この期における蛋白合成, RNA 合成に対するN-B-5のkineticな抑制パターンを見ることにした. Turn-on後8時間目に, N-B-5と, 放射性前駆体すなわち, 蛋白合成抑制効果を検索する実験においては, ¹⁴C-leucine, またRNA 合成抑制効果に関する実験においては, ³H-uridineを同時に培養液に添加し, 30分, 60分, 120分間の放射性物質のとりこみをしらべた. その結果, 蛋白合成は, N-B-5添加直後よりただちに抑制を受け, 以後同程度の抑制効果が持続することが明らかになった(Fig. 7). 一方RNA 合成に対しては, N-B-5添加後120分の間には明らかな抑制効果は認められなかった(Fig. 6). この結果は, N-B-5の抑制作用の第一義的な作用点があることを示唆したものである. Fig. 5に示される様に, G₁-S変換期中の, どの4時間にN-B-5を作用させても, 同程度の³H-thymidineとりこみ抑制効果もたらされ, 特異的な時期に, 特異的な蛋白合成を抑制する可能性はとぼしく, むしろ, N-B-5を作用させた4時間の間の蛋白合成抑制が, 一様にS期の始まりを遅延させたという可能性が強いと思われた. また, S期の4時間に作用させた場合には, ³H-thymidineとりこみ抑制効果が, G₁-S変換期作用の場合の約2分の1程度認められたが, これは, S期におけるDNA 合成過程は, 同時に進む蛋白合成過程に依存する³⁷⁾ためであると解釈された.

次に, N-B-5中に存在する抑制因子の物性について, 検索を行なった.

N-B-5の紫外吸収曲線は, Fig. 8に示す如く, 260 m μ に最大吸収を持ち, ヌクレオチドの含量の多い画分であることが示された.

N-B-5, 及び, 再生肝上清より抽出した同様の画分R-B-5(Fig. 9, Table 2)に対し, Trypsin, RNase. あるいは熱処理を行ない, DNA 合成抑制活性の変化をみたところ, 末処理のB-5画

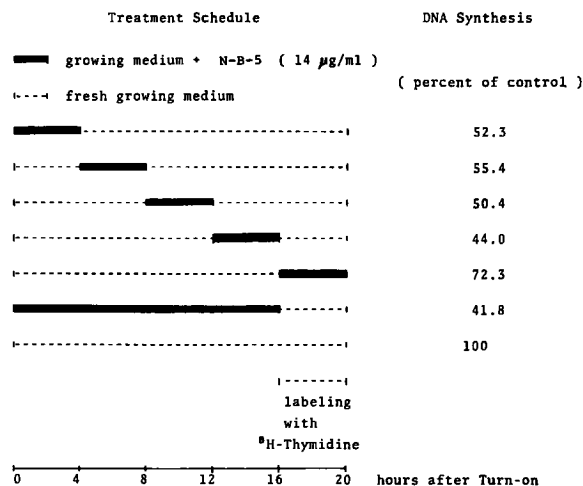


Fig. 5. Effect of N-B-5 on DNA synthesis in S phase by the treatment in G₁-S transitional phase.

Percent of control was calculated by the formula described in the Materials and Methods.

The mean value of the incorporated amount of ³H-thymidine was calculated from 3 identical experimental dishes in each system.

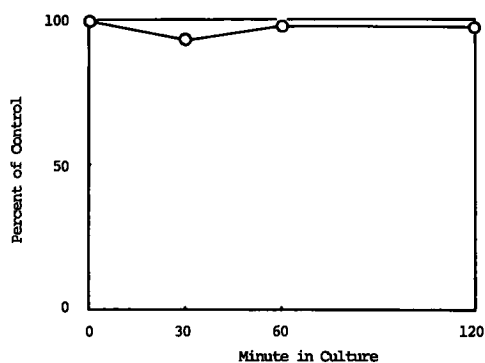


Fig. 6. Kinetic effect of N-B-5 on RNA synthesis in G₁-S transitional phase.

At 8 h after turning-on the resting L-cell, the incorporation of ³H-uridine to RNA was assayed for 30 min., 60min. and 120 min. in the presence of N-B-5 (50 µg/ml).

Percent of control was calculated by the formula described in the Materials and Methods.

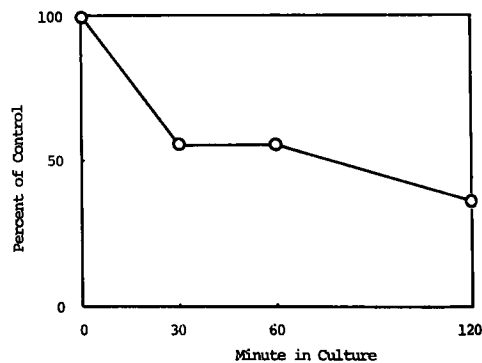


Fig. 7. Kinetic effect of N-B-5 on protein synthesis in G₁-S transitional phase.

At 8 h after turning-on the resting L-cell, the incorporation of ¹⁴C-leucine to protein was assayed for 30min., 60min. and 120 min. in the presence of N-B-5 (30 µg/ml).

Percent of control was calculated by the formula described in the Materials and Methods.

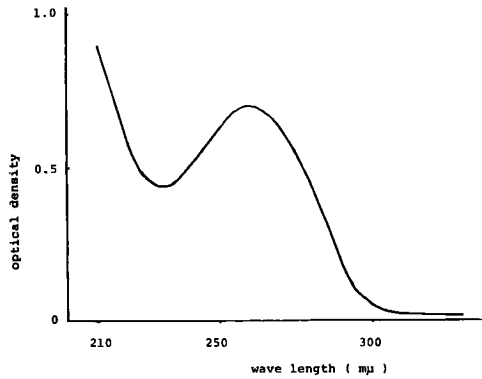


Fig. 8. Ultraviolet absorption spectra of N-B-5.

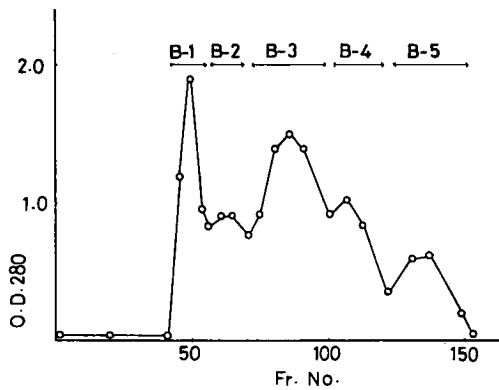


Fig. 9. The elution pattern of G-150 Sephadex chromatography of R-B.

分とくらべて、その抑制活性に変化が認められなかった。すなわち、B-5 (N及びR)に存在する因子は、このどの処理に対しても安定な物質であることが示された (Table 3)。

考 察

ラット肝上清から二つのL細胞増殖抑制因子を分離し、その性質を調べた。これらの培養細胞増殖抑制因子が、その由来する肝細胞自身の増殖も抑制する臓器性細胞増殖抑制因子であることを示すためには、少なくとも次の四つの条件を満足させることが必要であろう。すなわち、まず第一に、その抑制因子は、培養液組成に変化をおこすことによって培養細胞の増殖を抑制するような、非特異的な抑制因子でないこと。第二に、再生肝上清より抽出した同様の因子の抑制活性が、正常肝のそれと比較して低いこと。あるいは、量的に少ないこと。第三に、培養細

Table 3. Loss of inhibitory activity of B-5 treated with Trypsin, RNase and Heat.^{a)}

System	DNA Synthesis (cpm/plate×10 ⁻³) ^{b)}
Growing Medium (GM)	82.7±9.1
GM + B-5 (30 μg/ml) ^{c)}	2.3±0.6
GM + 1 min. boiled B-5	2.4±0.5
GM + RNase treated B-5	2.5±0.8
GM + Trypsin treated B-5	3.7±0.5
Growing Medium (GM)	11.5±0.4
GM + B-5 (40 μg/ml) ^{d)}	6.2±0.2
GM + 10 min. boiled B-5	5.8±0.3
GM + 60 min. boiled B-5	5.8±0.1

- a) B-5 was treated according to the schedule described in the Materials and Methods.
- b) The assay system of DNA synthesis in S phase was described in the Materials and Methods.
- c) R-B-5
- d) N-B-5

胞系のみでなく、in vivo細胞系においても抑制効果を示すこと。すなわち、再生誘導後のラット肝の肝細胞増殖あるいはDNA合成に対しても抑制活性を持つこと。そして第四に、培養細胞及び肝細胞において、共通的作用様式をとること。すなわち、両細胞系にたいし、細胞内に取り込まれて作用するか、あるいは細胞表面に作用するかのいずれか一つの作用様式をとること。以上の四つの条件を満足する培養細胞増殖抑制因子は、臓器性細胞増殖抑制因子である可能性が非常に強いといえるであろう。

著者が検索を行なった二つのL細胞増殖抑制因子のうち第一の因子は、Arginase活性を持つ因子であった。この因子によるL細胞増殖抑制効果が、L-arg.の添加によって完全に消失したことから、この因子は、培養液中のL-arg.を分解することにより、その増殖抑制効果を発現する因子であることが示された。従って、この因子は、上記の条件のうちの第一の条件を満足しない、非特異的抑制因子であるということが出来る。ArginaseによるL-arg.分解に限らず、一般に培養液から、どの必須アミノ酸を欠乏させても培養細胞は、S期において顕著な抑制作用を受ける^{38),39)}。

第二の因子 B-5 は、以下にのべるように、今

までに知られていない培養細胞増殖抑制因子である。

肝臓から抽出された培養細胞増殖抑制因子に関しては、現在まで次の様な報告がなされている。Ohtsuki は西田らの方法により、牛肝臓から肝コルニンを抽出した。これは、L細胞のDNA合成抑制効果を持ち、非透析性で、熱に安定な物質であった¹³⁾¹⁴⁾。しかし、Ohtsuki は、これ以上、この因子の物性あるいは作用機序についてのべていない。Terayama らはラット肝臓の105,000×g上清より、腹水肝癌細胞のDNA合成を抑制する二つの因子を分離したが、これは、Arginase と Thymidine 分解酵素であることが明らかにされた^{21),22),23)}。Thymidine 分解酵素は、透析により失活する²⁰⁾ことから、強力な透析に安定で、熱処理に対して安定な B-5 は本酵素ではありえない。Nilsson はヒト肝抽出物の38,000×g上清より、HeLa 細胞の蛋白合成を第一義的に抑制する分子量約90,000の蛋白質性物質を分離した^{24),25)}。この因子は、B-5 と異なり、熱に不安定な因子である。Vinet はウサギ肝臓の105,000×g上清より、Novikoff cell のDNA合成を抑制し、非肝由来の培養細胞には効果を持たない分子量約40,000の蛋白質性物質を分離し報告している²⁷⁾。Aujard らはラット肝臓から抽出されたDNA合成抑制因子の作用点が、G₁期にあることをラット肝癌由来L F細胞の同調培養系を用いて明らかにしたが、彼らはこの因子のその他の性質については、言及していない²⁶⁾。Verley の報告している Hepatic chalone は分子量約1,000の熱に安定な物質であるが、Trypsin によって不活性化されるので、ポリペプチドであろうと考えられている¹⁷⁾²⁸⁾。

以上の各研究者の報告から明らかな様に、本論文でとりあげた B-5 のような、熱、Trypsin, RNase 処理に対して安定で、L細胞の蛋白合成を第一義的に抑制する因子の存在については、今までに報告がなされていない。

B-5 の分子量については、現在正確な数字は得られていないが、非透析性の下限付近の分子量をもつことが示唆されている。非透析性であることから、B-5 は放射活性前駆体を希釈させることによって取り込みを低下させる Thymidine や Uridine あるいは Leucine などではないことが示された。また、強力な透析に安定で60

分間の熱処理に対しても安定であることから、B-5 は、Terayama らの報告した抑制因子である Thymidine 分解酵素ではありえないのみならず、Arginase 以外の必須アミノ酸分解酵素あるいは、その他の水解酵素である可能性は、きわめて薄いといえる。従って、現在のところ、B-5 は、前述の臓器性細胞増殖抑制因子であるための第一の条件を満たしていると考えられる。

つぎに、B-5 は、第二の条件を満足させるであろうか。いいかえれば、R-B-5 において、肝再生誘導による抑制活性の量的あるいは質的低下が、認められるであろうか。B-5 が、蛋白質性の物質である可能性は、前に述べた様に薄く、従って、280m μ 吸収によるパターン(Fig. 4 と Fig. 9)をもとにした量的な比較や、蛋白量を基準にした活性の比較(Table 2)から、正常肝および再生肝の間での抑制因子の量的、あるいは質的差異を検討することは不可能である。従って、現在のところ、B-5 が第二の条件を満足させるか否かについては、結論を引き出すことができない。この問題は、B-5 の物性が一層明らかにされた上ではじめて明らかにされるべきものであろう。

さらに、B-5 が、第三、第四の条件を満たすか否かについては、本論文では検討するまでにいたらなかった。今まで知られていなかった培養細胞増殖抑制因子 B-5 が、臓器性細胞増殖抑制因子として、肝細胞の増殖を制御するという可能性については、換言すれば、B-5 が、コルニンの概念に該当する因子であるか否かは、今後第二、第三、第四の条件を B-5 について検討する過程で、明らかになるはずである。

結 語

培養 L₉₂₉ 線維芽細胞を用いて、ラット肝上清中に存在する二つの細胞増殖抑制因子の諸性質をしらべた。

1) 第一の因子は、Arginase 活性を持ち、この因子による細胞増殖抑制効果は、培養液中の Arginine 分解によるものであった。

2) 第二の因子は、Trypsin, RNase および熱処理に対し安定な因子であり、蛋白合成を第一義的に抑制した。DNA合成に対する抑制効果は、第二義的なものと考えられた。

3)肝再生誘導による第二の因子の活性変化については、更に検討が必要である。

謝 辞

稿を終るに当たり、研究御指導下された恩師西田勇名誉教授に深く感謝致します。また、終始、実験御指導、論文御校閲下された島瀬修講師に深く感謝致します。また、本論文を御校閲下された堀泰雄教

授に深く感謝致します。そのほか、共同研究者の高橋史生先生、板野俊文先生、松井秀樹先生、徳田雅明先生、並びに、種々御協力を頂いた第一生理学教室教室員各位に感謝致します。

本論文の要旨は、第37回日本癌学会総会、第56回日本生理学会大会、第52回日本生化学会大会において発表した。

文 献

- Higgins, G. H. and Anderson, R. M.: Experimental pathology of the liver; I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.* **12**, 186, 1931.
- Moolten, F. L. and Bucher, N. L. R.: Regeneration of rat liver; Transfer of humoral agent by cross circulation. *Science* **158**, 272, 1967.
- Fisher, B., Szuch, P., Levine, M. and Fisher, E. R.: A portal blood factor as the humoral agent in liver regeneration. *Science* **171**, 575, 1971.
- Bucher, N. L. R. and Swaffield, M. N.: Regulation of hepatic regeneration in rats by synergistic action of insulin and glucagon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 1157, 1975.
- 三谷進, 菅原克彦: 肝再生のホルモン支配——体液性肝臓肝臓の重要性. *医学のあゆみ*, **105** (10), 868, 1978.
- 小澤和恵, 山岡義正, 本庄一夫: 肝再生と門脈血内の因子. *医学のあゆみ*, **88**(7), 283, 1974.
- Raul, D., Leffert, H., Sato, G. and Holley, R. W.: Stimulation of DNA and protein synthesis in fetal-rat liver cells by serum from partially hepatectomized rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **69**, 374, 1972.
- Morley, C. G. D. and Kingdon, H. S.: The regulation of cell growth, Identification and partial characterization of a DNA synthesis stimulating factor from the serum of partially hepatectomized rats. *Biochim. Biophys. Acta* **308**, 260, 1973.
- Carter, D. B., Holmes, B. E. and Mee, L. K.: The effect of growth hormone upon cell division and nucleic acid synthesis in the regenerating liver of the rat. *Biochim. J.* **66**, 482, 1957.
- Short, J., Brown, R. F., Husakova, A., Gilbertson, J. R., Zemel, R. and Lieberman, I.: Induction of deoxyribonucleic acid synthesis in the liver of the intact animal. *J. Biol. Chem.* **247**, 1757, 1972.
- 木本克彦, 藤田興, 小林芳治, 高橋誠一郎, 藤井義信, 山田俊典, 智片芳子, 大月恒, 村上哲英, 西田勇: 生物学的活性 Polypeptide "CORNING" の細胞分裂に及ぼす影響(IV). *岡山医誌*, **80**(11, 12), 1211, 1968.
- 西田勇, 村上哲英: 組織から抽出される細胞分裂調節物質について. *日本生理誌*, **34**(3), 131, 1972.
- Ohtsuki, H.: Studies on the CORNING extracted from bovine liver I. Purification of the CORNING and its physico-chemical properties. *Acta Med. Okayama* **28**, 1, 1974.
- Ohtsuki, H.: Studies on the CORNING extracted from bovine liver II. Inhibitory effect of the CORNING on DNA synthesis and cell growth of L cells cultured in suspension. *Acta Med. Okayama* **28**, 7, 1974.
- 大野尚文: ラット再生肝の分裂調節について. *岡山医誌*, **85**(9, 10), 393, 1973.
- 藤井利武: ラット肝上清中に共存せる細胞増殖抑制因子と促進因子の肝再生誘導による活性変換について. *岡山医誌*, **89**(7, 8), 883, 1977.
- Verley, W. G.: The hepatic chalone. *Natl. Cancer Inst. Monograph* **38**, 175, 1973.

18. Kuo, C. Y. and Yoo, T. J.: In vivo inhibition of tritiated thymidine uptake in Morris Hepatoma cells by normal rat liver extract: A possible Liver Chalone. *J. Natl. Cancer Inst.* **59**, 1091, 1977.
19. Simard, A., Corneille, L., Deschamps, Y. and Verly, W.G.: Inhibition of cell proliferation in the livers of hepatectomized rats by a rabbit hepatic chalone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **71**, 1763, 1974.
20. Lavigne, J., Lalanne, M., Thompson, J.P. and Simard, A.: Specific inhibition of the incorporation of tritiated thymidine in regenerating rat liver by a rat hepatocytes supernatant. *Rev. Can. Biol.* **36**, 27, 1977.
21. Otsuka, H. and Terayama, H.: Inhibition of DNA synthesis in ascites hepatoma cells by normal liver extract. *Biochim. Biophys. Acta* **123**, 274, 1966.
22. Sasada, M. and Terayama, H.: The nature of inhibitors of DNA synthesis in rat liver Hepatoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* **190**, 73, 1969.
23. Miyamoto, M. and Terayama, H.: Nature of rat liver cell sap factors inhibiting the DNA synthesis in tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta* **228**, 324, 1971.
24. Nilsson, G.: Thymidine and Uridine metabolism at cell growth inhibition of HeLa cells by Human Liver Extract. *Exp. Cell Res.* **59**, 207, 1970.
25. Nilsson, G.: Inhibition of protein and nucleic acid synthesis of animal cells in vitro mediated by high molecular weight inhibitors in Human Liver Extract. *Biochim. Biophys. Acta* **418**, 376, 1976.
26. Aujard, C., Chany, E. and Frayssinet, C.: Inhibition of DNA synthesis of synchronized cells by liver extracts acting in G₁ phase. *Exp. Cell Res.* **78**, 476, 1973.
27. Vinet, B. and Verly, W.G.: Purification of a protein inhibitor of DNA synthesis in cells of hepatic origin. *Eur. J. Cancer* **12**, 211, 1975.
28. 八杉悦子, 福井紀子, 三浦義彰: かるん. 医学のあゆみ, **91**(2), 45, 1974.
29. Grisham, J.W.: Morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver: Autoradiography with thymidine-³H. *Cancer Res.* **22**, 842, 1962.
30. Hogeboom, G.H.: Fractionation of cell component of animal tissues. In *Methods in Enzymology* I, ed. S.P. Colowick, and N.O. Kaplan, Academic Press, N.Y., pp. 16-19, 1955.
31. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **93**, 265, 1951.
32. Van Slyke, D.D. and Archibald, R.M.: Gasometric and photometric measurement of arginase activity. *J. Biol. Chem.* **165**, 293, 1946.
33. Rudland, P.S.: Control of translation in cultured cells; Continued synthesis and accumulation of messenger RNA in nondividing cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **71**, 750, 1974.
34. Rozengurt, E. and Stein, W.D.: Regulation of uridine uptake by serum and insulin in density-inhibited 3T3 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **464**, 417, 1977.
35. Kobayashi, Y. and Maudsley, D.V.: Practical aspects of liquid scintillation counting. *Methods Biochem. Anal.* **17**, 55, 1969.
36. Hirsch-Kolb, H. and Greenberg, D.M.: Molecular characteristics of rat liver arginase. *J. Biol. Chem.* **243**, 6123, 1968.
37. Weiss, B.G.: The dependence of DNA synthesis on protein synthesis in HeLa S3 cells. *J. Cell. Physiol.* **73**, 85, 1969.
38. Freed, J.J. and Schatz, S.A.: Chromosome aberrations in cultured cells deprived of single essential amino acids. *Exp. Cell Res.* **55**, 393, 1969.
39. Everhart, L.P.: Effects of deprivation of two essential amino acids on DNA synthesis in chinese hamster cells. *Exp. Cell Res.* **74**, 311, 1972.
40. Temin, H.M.: Stimulation by serum of multiplication of stationary chicken cells. *J. Cell Physiol.* **78**,

161, 1971.

41. Ball, C. R., Van Den Berg, H. W. and Poynter, R. W.: The measurement of radioactive precursor incorporation into small monolayer cultures. In *Methods in Cell Biology*, VII, ed. Prescott, Academic Press, N. Y. and London, pp. 349-360, 1973.

Inhibitors of cell proliferation in a rat liver supernatant**Makoto KURAMITSU**

First Department of Physiology, Okayama University Medical School

(Director : Prof. Y. Hori)

The activities and properties of two inhibitors of cell proliferation, which are present in the supernatant of rat liver, have been studied in L₉₂₉ fibroblast systems.

- 1) One factor, which had arginase activity, completely inhibited cell proliferation by depletion of arginine in the culture medium.
- 2) The other factor was stable to Trypsin-, RNase- and Heat-treatment, and primarily inhibited protein synthesis. Inhibition of DNA synthesis was thought to be a secondary effect.
- 3) Whether the second factor changes the biological activity in regenerating liver is now under investigation.