岡 山 医 学 会 雑 誌

第85巻　9～10合併号（第946, 947号）

昭和48年10月30日発行

ラット再生肝の分裂調節について

岡山大学医学部第1生理学教室（主任：西田　勇教授）

大　野　尚　文

〔昭和48年8月31日受稿〕

緒　言

ラットやマウスなどの動物の肝臓は部分的切除により，一定の潜伏期を経て，DNA合成が始まり，代償性細胞肥大，肥厚並びに細胞増殖によって，約1カ月後に肝臓は元の大きさに再生する。そのため，再生肝は DNA 合成及び細胞増殖の制御機構を知るために，よくつかわれている．1931年の Higgins と Anderson[1] による簡易なラット再生肝手術法の紹介により， DNA 合成の制御機構に関して，厖大な論文が発表されてきた．今回，著者はウシ肝臓 cornin を用い，in vivo の実験として，ラット再生肝に及ぼすウシ肝臓 cornin の影響，並びに in vivo ではあるが，マウスの腹腔を借りて生活している故に in vitro に近似していると考えられるエールリッヒ腹水腫瘍細胞並びに，発生期の細胞としてウニ受精卵に及ぼすウシ肝臓 cornin の影響について調べた．

ウシ肝臓 cornin の投与量と抑制効果の点で興味ある実験結果を得たので，ここに報告する．

材料及び実験方法

A．ウシ肝臓 cornin の抽出

以前に報告された方法[2] によって，ウシ肝臓から cornin を抽出した．即ち，ウシの肝臓をミンチし，3倍量の脱イオン水を加え，100℃で10分間煮沸，直ちに冷却し，チーズクロスで濾過，濾液に冷却した99％アルコールを加えて70％濃度とし，0°～4℃の冷凍室に2～3時間放置，12,000 rpm の連続遠沈機（久保田製 model KCF-62）で沈澱物を除き，上清に再び99％アルコールを加えて90％とし，一夜放置，70％アルコールから90％アルコールの間に落ちる沈澱の分離は，同様に連続遠沈機を使用し，12,000 rpm で行った．沈澱物を遠沈によって，エタノール，メタノール，アセトン，エーテルの順に洗浄した．収量は，組織1kg当り約3.8gr であった。尚，この方法によって得られた cornin を粗製の cornin とし，氷室で脱イオン水に対して透析を行い，透析膜内に残った非透析分画を u-fraction とした．使用に際しては，各 cornin の生理的食塩水溶液（0.1％濃度）を，10,000 rpm 15分遠沈し，その上清をオートクレーブで滅菌した Millipore filter HA (pore size 0.45 μ ）で濾過した．

B．完全なる同期的分裂を行ない，かつ正常な分裂経過を経るサンショウウニ（Temnopleurus toreumaticus）を用いて，ウシ肝臓 cornin の crude 及び ú-fraction の影響を調べた，これは岡山大学理学部附属臨海実験所にて行った．成熟卵は，0.5M KCℓ にて排卵させ，海水を濾過した液で洗ったものを実験に供した．受精率は常に97％以上のものを選

び，比較対照例（濾過した海水使用）が第2分裂まで完全に分裂を行った実験例のみの成績を採用した。各 cornin は，濾過した海水溶液として用い，それに卵浮遊液を加え，最終濃度が図1になるよう操作し，ウニ卵は受精前に cornin 溶液を作用させて，後10分放置，その後加精し，実験例と対照例の第2分裂までを，光学顕微鏡にて観察し，時間－分裂細胞数曲線として求めた．更に，ウシ肝臓 cornin の u-fraction は，粗製 cornin 溶液を脱イオン水に対して visking のセロファンチューブで透析し，透析膜内に残った分画を非透析性分画とし，凍結乾燥した後使用した．尚，透析は4℃以下で1日2回脱イオン水をかえ，連続3日間行った．

図1

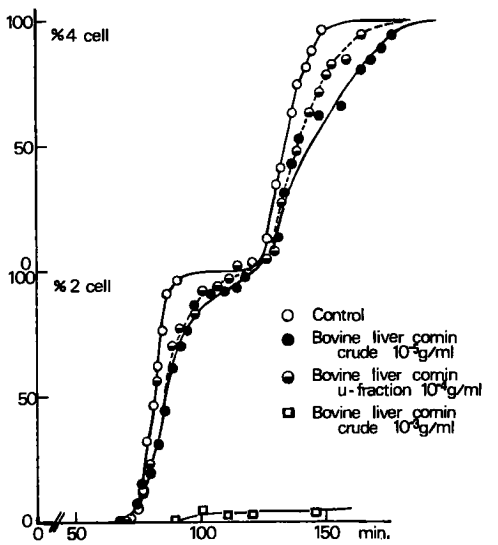


Fig. 1

続いて，電顕レベルでの形態学的変化をみるため，crude のウシ肝臓 cornin 10^{-4}g/mℓで前処置したのと，対照例とを，上記と同様の方法で受精させ，光学顕微鏡観察の下で，1視野に3～5％の furrow が認められる時点で，手回しの遠沈器で受精卵を沈澱させ，それに 2.5％ glutaraldehyde（50％ glutaraldehyde solution を海水で希釈）を加え，氷室（4℃以下）で1.5時間前固定し，30分間，濾過した海水で洗浄し，さらに1％のオスミウム酸固定液（2％オスミウム酸を海水で希釈）で同様に氷室で2時間後固定した後，エタノール系列によって脱水し，Laft 包埋法にて包埋した．包埋試料をPorter-blum の ultramicrotome でガラスナイフを用い，超薄切片を作製し，酢酸ウラニウム及び水酸化鉛で二重染色を施し，日立製HS-8型電子顕微鏡で観察し，写真撮影した．

C．エールリッヒ腹水腫瘍細胞に関する実験は，腫瘍細胞として，岡山大学医学部附属癌源研究施設病理部門にて，in vitro で2020日間継代維持されたエールリッヒ腹水腫瘍細胞を再びマウスに移殖継代した JTC-II [3] を用いた．0.5％ crystal violet による核数計算法により，JTC-II細胞の4.5～5.0×10^6個を体重20～25grの成熟ddNマウス（雄）の腹腔内に移殖した．継代は，移殖後7日目のマウスの腹腔内より無菌的に腫瘍細胞をとり出し，同様に4.5～5.0×10^6個を腹腔内に移殖した．実験には，300代以上継代した細胞を用いた．マウスには，オリエンタル固型飼料（MF）および水は自由に与え，室温は，年間を通じて，冬期は15℃，夏期は25℃前後に保った．

(I)①継代7日目のddNマウス（雄）の腹水中に浮遊しているエールリッヒ腹水腫瘍細胞をとり出し，塗抹標本を作成し，酢酸：エタノール＝1：3で30分固定し，後 Feulgen 染色を行い，分裂指数を求めた．

②継代7日目 colchicine 0.05mg を生理的食塩水にとかし，腹腔内に注射し2時間作用させた後，①と同様に分裂指数を求めた．

③継代6日目 ウシ肝臓 cornin を，体重100gr当り25mg腹腔内に注射し，7日目に分裂指数を求めた．

④継代6日目 ウシ肝臓 cornin を，体重100gr当り25mg腹腔内に注射し，7日目 colchicine を0.05mg腹腔内注射し，2時間作用させ，分裂指数を求めた．

⑤上記③と④の他 colchicine が細胞内のどの部位にとり込まれるかを調べる目的で，non-labeled colchicine 0.05mg/0.5mℓの中に15μCi 含むように，^{3}H-colchicine (the Radiochemical Center, Amersham製，ring C-methoxyl-H^3，specific activity 2Ci/mmol）を加えた溶液を腹腔内に注射し，2時間 label させ，腹水腫瘍細胞の塗抹標本をつくり，70％エタノールで固定した後，所定の方法に従い，ラジオオートグラフを作成した．

(II) 次に同じく継代3日目のddNマウス（雄）に，ウシ肝臓 cornin を体重100gr当り100mg及び50mg腹腔内に注射し，その後12時間目に ^{3}H-thymidine (the Radiochemical Center, Amersham製，specific activity 5.0Ci/mmol)15μCi ずつ腹腔内に注射し，

2時間 label し，腹腔内に浮遊しているエールリッヒ腹水腫瘍細胞を開腹し取り出し，後述する再生肝の場合と同様，Schneider 法にて，DNA の定量を行い，DNA にとり込まれた ^{3}H-thymidine の量を測定して，specific activity を求めた．

D．再生肝に関する実験は，自家増殖させた Wister系ラットで，実験に際しては，生後約1カ月前後で，体重50gr～70grで同腹のものを用い，飼料及び水は自由に与えた．エーテル麻酔の下に，$\frac{2}{3}$肝切除（中，左葉）を行い，以下の実験を行った．尚，3'-M-DAB実験肝癌ラット用には，日本クレア動物ケージにて作成した飼料を与え，その成分は表1に示してある．又，肝切除は午前8：30～10：30の間に行った．

Table 1. Composition of DAB diet for the rat

Dose		
	Rice powder	850gr
	NaCl	4gr
	Oil	1gr
	3'-M-DAB (Pージメチルアミノ アゾベンゼン特級品)	0.06%
	Vit B1	0.5 mg/
	Vit B2	0.25mg/
	Vit B6	0.25mg/

（日本クレア動物ケージにて作成）

(I) 再生肝の分裂指数に及ぼすウシ肝臓 cornin の影響を調べる実験は，いずれも肝切除後48時間目に断頭し，再生肝を切り出し，酢酸：エタノール＝1：3にて2時間固定し，以下脱水，包埋，切片を作り，ヘマトキシリン－エオジン染色を行った．

①肝切除後24時間目に，他の正常肝のホモジネートを体重100gr当り肝重量800mgの割合に腹腔内に注射し，それから24時間後断頭し，再生肝の分裂指数を求めた．尚，肝ホモジネートは，肝重量の4倍量の生理的食塩水を加え，10,000rpm10分で遠心し，その上清部分を使用した．

②上記正常肝のホモジネートの代わりに，ウシ肝臓 cornin を体重100gr当り50mgの割合に腹腔内に注射し，分裂指数を求めた．

③対照用として，生理的食塩水のみ，腹腔内に注射した．

尚，ウシ肝臓 cornin の 3'-M-DAB 発癌ラットの再生肝に及ぼす影響をみるため，DAB 投与6カ月目のラットを使用した．尚，このラットは，肝切除時，中，左葉の組織標本を作製し，hepatoma と診断された。

① 肝切除後24時間目に，生理的食塩水のみ腹腔内に注射し，48時間目に断頭し，分裂指数を求めた．

② 肝切除後24時間目に，ウシ肝臓 cornin を体重 100gr当り50mg腹腔内に注射し，分裂指数を求めた．

③ 対照用として，DAB 投与ラットを断頭し，分裂指数を求めた．

(II) 次に再生肝のＤＮＡ合成に及ぼすウシ肝臓 cornin の影響を調べる実験は，肝切除後，所定の時間に，種々の濃度の cornin を腹腔内に注射し，その後 ^{3}H-thymidine (100μci/100gr体重或いは40μci/100gr体重）を腹腔内に注射し，2時間 label し，断頭し，肝切片を切り出し，Schneider 法により，DNA の定量と DNA にとり込まれた ^{3}H-thymidine を測定した．測定法は，ラット肝1grに10倍量の氷冷した 10％TCA を加え，ホモジネートし，それを 3,000rpm 5分遠心し，その沈澱物に氷冷した5％TCA を加え，よく洗浄し，3,000rpm 5分遠心した．上記操作を4回繰り返し，酸可溶性画分をとり除いた．以上の操作はすべて冷室（0～4℃）で行った．続いてその沈澱物に，5％TCA 1mℓ を加え，90℃15分熱処理した後，3,000rpm15分遠心し，その上清をメスシリンダーに保存し，さらに沈澱物に5％TCA 0.5mℓ加え，よく洗浄し，3,000rpm15分遠心し，上清をメスシリンダーに追加し，5％ TCA を適当量加え，総量を2mℓにし，中1mℓを DNA 定量に，残りをバイアル中に入れ，10mℓの Bray の scintillation liquid を加えて，Packard liquid scintillation spectrometer (Aloka LSC-650) にて DNA にとり込まれた ^{3}H-thymidine の量を測定した．尚，scintillation liquid の組成は，naphtalene 60 gr, PPO 4 gr, POPOP 0.2gr, methanol (absolute) 100mℓ, ethylene glycol in 1ℓ dioxane である．尚 DNA 定量は，Burton, K. (1956)[4] の方法に従い，分光光度計を用い，OD 600mμ で測定した．

① 肝切除後12時間目に，ウシ肝臓 cornin を体重100gr当り 5mg, 50mg, 100mg, 200mgの割合いに腹腔内に注射し，その後12時間目に ^{3}H-thymidine を40μCi/100gr体重あて腹腔内に注射し，2時間 label し，断頭し，relative specific activity を求めた．

② 肝切除後12時間目に，ウシ肝臓 cornin を体重100gr当り50mg, 100mgの割合いに腹腔内に注射し，

その後6時間目に ^{3}H-thymidine を40μCi/100gr体重あて腹腔内に注射し，2時間 label し，断頭し，relative specific activity を求めた.

③ 肝切除と同時に，ウシ肝臓 cornin を，体重100gr当り50mg，100mgの割合いに腹腔内に注射し，その後24時間目に ^{3}H-thymidine 40μCi/100gr体重あて腹腔内に注射し，2時間 label し，断頭し，relative specific activity を求めた.

④ 対照用としては，ウシ肝臓 cornin の代わりに，生理的食塩水を腹腔内に注射した.

尚，^{3}H-thymidine 腹腔内注射による再生肝への ^{3}H のとり込みは，同時に所定の方法に従い，ラジオオートグラフを行い，光学顕微鏡写真によって確認された.

(III) 次に，ウシ肝臓 cornin の生理的濃度以上の投与による正常肝のDNA合成に及ぼす影響を調べる実験は，約70gr位の幼若ラットを使用して，ウシ肝臓 cornin を200mg/100gr体重の割合いに腹腔内に注射し，12時間後，^{3}H-thymidine (40μCi/100gr体重) を腹腔内に注射し，2時間 label し，断頭後，肝切片を切り出し，前記と同様に，Schneider法により DNA の定量と，DNA にとり込まれた ^{3}H-thymidine を測定した. 尚，対照用として，生理的食塩水を用いた.

実験結果

ウシ肝臓 cornin のサンショウウニ受精卵に及ぼす影響について，図1に示す. crude のウシ肝臓 cornin の10^{-3}g /mℓ溶液中での分裂阻害効果は著しく，星状体の形成並びに受精膜の形成は，ほとんどなされず，第1分裂は殆んど完全に阻止されている. 10^{-5}g /mℓ溶液でも，第1分裂及び第2分裂共にかなり阻害されており，最終有効濃度は，10^{-5}g/mℓ であり，ウシ肝臓 cornin u-fraction における最終有効濃度は，10^{-4}g/mℓである.

次に，ウニ受精卵に及ぼすウシ肝臓 cornin の影響の中で，電子顕微鏡レベルでの形態学的変化の有無について調べ，その結果を写真(3)，(4)，(5)，(6)に示す。写真(3)及び(4)は，cornin 非投与で核膜が消失しかかっており，卵由来と思われる annulate lamellae 及び，microtubules と endoplasmic reticulum の column がみられる. 一方 cornin 投与群は，写真(5)(6)に示している. annulate lamellae は観察されるが，未だ，microtubules like の物は見られない. 写真(6)では annulate lamellae と endoplasmic reticulum の移行がよく観察できる. cornin のウニ受精卵の発生に及ぼす影響は，電子顕微鏡での観察では，形態学的には特異的な変化をもたらしておらず，図1に示すように，発生の進行に遅れを生じさせるのが主なる作用と云える.

次に，エールリッヒ腹水腫瘍細胞に及ぼすウシ肝臓 cornin の影響については，以下の如くである.

(I)①継代7日目のエールリッヒ腹水腫瘍細胞の分裂指数：37.3‰

②継代7日目 colchicine0.05mgを腹腔内注射し，2時間作用させた場合の分裂指数：60.1‰

③継代6日目 ウシ肝臓cornin を体重100gr当り25mg腹腔内に注射し，7日目の分裂指数：10.0‰

④継代6日目 ウシ肝臓cornin を体重100gr当り25mg腹腔内に注射し，7日目に colchicine を0.05mg腹腔内に注射，2時間作用させた場合の分裂指数：17.1‰

⑤継代7日目 non-labeled colchicine の中に15μci 含むように ^{3}H-colchicine を加えた溶液を腹腔内に注射し，2時間 label させた後のラジオオートグラフは，写真1に示す. ^{3}H の取り込みは，分裂中の細胞だけでなく，あらゆる時期の細胞中に取り込まれているのがわかる.

(II) 次に，エールリッヒ腹水腫瘍細胞の DNA合成に及ぼすウシ肝臓 cornin の影響については，対照例を100％としたときの relative specific activity であらわすと以下の如くで，ウシ肝臓 cornin の濃度に応じて，抑制効果が大である.

対照群：100％

ウシ肝臓 cornin 50mg/100gr体重：38.3％（2匹）

ウシ肝臓 cornin 100mg/100gr体重：24.6％（2匹）

以上より，ウシ肝臓cornin の腹腔内注射により，エールリッヒ腹水腫瘍細胞の分裂指数は，著明に抑制されており，又，DNA 合成に対しても，cornin の投与量が多い程，抑制も著しい事を示している.

次に，再生肝の分裂指数に及ぼす影響については，表2及び3に示す.

健康な他のラットの肝ホモジネート及びウシ肝臓 cornin は，著明に再生肝の分裂指数を抑制しているが，抑制程度は，ウシ肝臓 cornin の方が著しい. しかしながら，3'-M-DAB 投与により発癌したラット肝では，部分的肝切除による再生もほんのわずかであるし，従つて，それに対するウシ肝臓cornin の影響も，ほとんどわずかである.

続いて，再生肝のDNA合成に対するウシ肝臓

Table 2. The influence of liver homogenates and bovine liver cornin on the mitotic rate in regenerating rat liver

	No. of rats	mitosis per 1000 cells	
		average	range
partial hepatectomy	11	33.3	26.3～36.8
partial hepatectomy + liver homogenate	5	26.3	16.7～37.1
partial hepatectomy + bovine liver cornin	13	18.9	12.1～27.4

Partial hepatectomies were performed at 8 : 30 A. M. to 10: 30 A. M., the homogenates and bovine liver cornin were prepared and were injected at 9 : 30 A. M. on the following day, and the tissues were fixed at 9 : 30 A. M. of the third day.

Table 3. The influence of bovine liver cornin on the mitotic rate in regenerating rat liver of rat fed on a DAB diet.

	No. of rats	mitosis per 1000 cells	
		average	range
3'-M-DAB induced rat	3	1.2	0.3 ～ 1.9
3'-M-DAB induced rat + partial hepatectomy	2	1.8	1.1 ～ 3.4
3'-M-DAB induced rat + partial hepatectomy + bovine liver cornin	3	1.9	1.2 ～ 3.1

Table 4. The influence of bovine liver cornin on the DNA synthesis in regenerating rat liver

	amount of cornin per 100g body weight	relative specific activity	
		individuals	average
physiological saline		100	100
bovine liver cornin	5 mg	96.4, 114.3	105.3
	50 mg	14.3, 29.5, 54.3, 56.8, 66.1, 44.7, 54.9	45.8± 6.79 (S. D.)
	100 mg	177.6, 77.7, 103.6, 81.0, 81.1, 108.5, 72.0	100.2±13.9 (S. D.)
	200 mg	135.7, 119.5, 63.2, 106.2	106.1±15.5 (S. D.)

Partial hepatectomies were performed at 8 : 30 A. M. to 10: 30 A. M., freshly prepared bovine liver cornin was injected intraperitoneally at 12 hours later and ^{3}H-thymidine was administered at 9 : 30 A. M. on the following day and the rat sacrificed 2 hours after ^{3}H-thymidine application.

cornin の影響について表4，5，6に示す．これらより，ウシ肝臓 cornin 50mg/100gr体重の腹腔内注射では，cornin 並びに ^{3}H-thymidine の打ち込む時期及び作用期間をかえても，著明に DNA 合成を抑えているが，ウシ肝臓 cornin 5mg/100gr体重，100mg/100gr体重，200mg/100gr体重の腹腔内注射では，ほとんど抑制効果はみられないし，かえって少しではあるが，促進効果を示す場合さえある．しかし，ウシ肝臓 cornin 100mg/100gr体重の場合，^{3}H-thymidine 打ち込みを，肝切除後18時間目にした場合，若干の抑制効果がみられた．

次に，生理的濃度以上のウシ肝臓 cornin の投与による正常肝の DNA 合成に及ぼす影響については，表7に示すが，対照用の生理的食塩水の腹腔内注射と比較すると，ウシ肝臓 cornin 200mg/100gr体重の腹腔内注射により，DNA合成は，2～3倍に亢進している．

尚，^{3}H-thymidine の再生肝への取り込みは，所定の方法に従い，ラジオオートグラフを作成し，写真(2)にて確認された．

Table 5. The influence of bovine liver cornin on the DNA synthesis in regenerating rat liver

	amount of cornin per 100g body weight	relative specific activity	
		individuals	average
physiological saline		100	100
bovine liver cornin	50 mg	54.9, 58.0	56.5
	100 mg	92.8, 38.7, 75.5, 87.5, 68.8	72.7±9.42 (S. D.)

Partial hepatectomies were performed at 8:30 A. M. to 10:30 A. M., bovine liver cornin was prepared and was injected intraperitoneally at 12 hours later and ^{3}H-thymidine was administered at 3:30 A. M. on the following day and the rat sacrificed 2 hours after ^{3}H-thymidine application.

Table 6. The influence of bovine liver cornin on the DNA synthesis in regenerating rat liver

	amount of cornin per 100g body weight	relative specific activity	
		individuals	average
physiological saline		100	100
bovine liver cornin	50 mg	2	2
	100 mg	129.3, 121.0	125.2

Partial hepatectomies were performed at 8:30 A. M. to 10:30 A. M., simultaneously bovine liver cornin was injected intraperitoneally, and ^{3}H-thymidine was administered at 24 hours later and the rat sacrificed 2 hours after ^{3}H-thymidine application.

Table 7. The influence of bovine liver cornin on the DNA synthesis in normal rat liver.

	amount of cornin per 100g body weight	relative specific activity	
		individuals	average
physiological saline		100	100
bovine liver cornin	200 mg	276.9, 224.7	250.8

Bovine liver cornin was prepared and was injected at 9:30 P. M. intraperitoneally, and ^{3}H-thymidine was administered at 9:30 A. M. on the following day and the rat sacrificed 2 hours after ^{3}H-thymidine application.

考　　察

細胞分裂及び細胞の分化に関する研究は，発癌や癌細胞の増殖と，その抑制という時代的要求の下に，現代医学界で最も注目をあびている課題の一つである．ところで細胞の増殖が行われるためには，細胞は必らず細胞周期を廻らねばならない．生体内或いは生体外にある細胞は，ある時期には増殖をくり返し，ある場合には，分裂能力は保有しながらも非増殖性の状態にとどまり，ときには特有の分化をする．その中，非増殖性の状態にある細胞の細胞周期上の位置を解明するためには，何らかの方法で，非増殖性細胞を増殖できる状態にするか，顕微分光光度計などで，核当りのＤＮＡ量を調べることにより解析できうる．部分的肝切除や，ＰＨＡなどで処理された末梢リンパ球などでは，各処理後ＤＮＡ合成を行ったあとＭ期に入ることにより，これらの元の細胞は，G_1期にとめられていたと思われる．次に細胞周期の模式図と細胞増殖の調節を支配している要素を，図２[5]に示すが，非増殖性細胞を増殖しうる状態にさせる刺激としては，薬品や抗原性刺激，ホルモン，傷，細胞密度の低下，血清濃度，細胞を殺すなど数多くのものが知られている．一方，種々の生体組織による部分的自己制御機構を説明するため，いくつ

図２

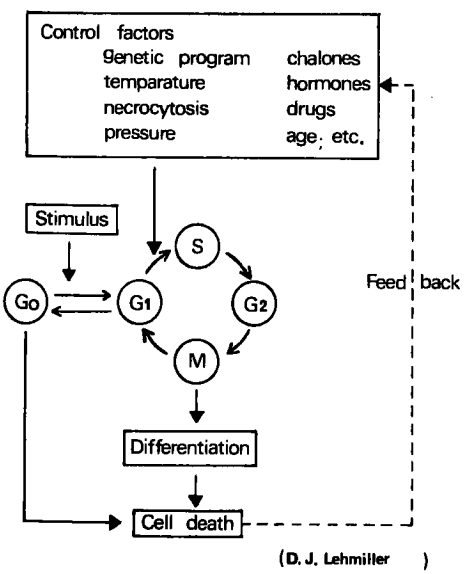


Fig. 2 Factors which control the cell cycle and the regulation of cell proliferation

かの考えがなされてきている．そのうちの１つの有名な考え方は，Bullough[6] (1962) によって提唱されたchalone説である．chalone というのは，組織細胞から抽出された物質で，種特異性はあまりなく，非常に強い組織特異性をもった分裂抑制作用を持っている．例えば，マウスの耳上皮より抽出された標品は，20,000～40,000くらいの分子量をもつ糖蛋白質であり，局部的に，chalone の濃度があるレベルより以下になればいつでも，細胞数を正常に戻すため，胚芽細胞が増殖する様になり，逆に余りにも細胞数が多くなればchaloneの濃度は正常の場合より高くなり，分裂能力は低下する様になるという説である．その後，腫瘍の由来した正常組織から得たchalone は，その腫瘍の増殖を特異的に抑制することが示され，更にその後，顆粒球より得た標品では，もっと小さな分子量をもつことが知られ，組織によるchalone の異質性の存在が示唆された．chalone については，Ryotömaa & kiviniemi[7] (1968)，Mohr & Althoff[8] (1968)，Frankfurt[9] (1971) 等の総説もある．Teir et al[10] (1969) は，細胞の類壊死 (necrobiosis) の分解産物は，細胞の産生と消去との間の均衡に影響を与えているかも知れないと述べており，実際異常増殖反応は損傷を受けた組織にみられている．それ以外に，Whitfield[11] ら (1969)，Rixon[12] (1968)，Perris[13] ら (1968) は，$CaCl_2$の濃度を変更することにより，in vitro 或いは in vivo におけるラットの骨髄細胞や胸腺細胞の分裂活性の変動を起こさせた．そしてin vivo では，thyrocarcitonin と副甲状腺ホルモンの拮抗作用で血中のCa^{++}濃度を変動し，その効果として分裂活性が支配されると考えた．Együd[14] (1968) は，α-ケトーアルデードや2-メチルービニールケトンによる増殖阻害がＳＨ化合物の投与により解除されることをみている．

Stich[15] (1960)，Goutier[16] [17] (1962, 1963) は，ラット再生肝での実験で，正常肝のホモジネートを腹腔内に注射すると，再生肝の分裂細胞数が減少し，更にホモジネートを分画し，microsome分画にこの作用がある事を見い出している．この場合，特にＤＮＡ合成が抑制される事が言われている．又，Goutier は，再生肝の microsome 分画には，この様な分裂抑制作用はない事を見い出しており，これらから，再生肝の状態になると，分裂抑制因子がなくなるのか，或いは分裂促進物質が出現してくることに起因しているのではないかと考えられた．この

DNA合成促進物質の存在については，Morley and Kingdon[18] (1973) が，ラット肝切除後24時間目に血清を採り，その血清を正常マウスの腹腔内に注射し，マウス肝のＤＮＡ合成が惹起されることを述べている．そして，その血清から，イオン文換セルローズと Sephadex G-100クロマトグラフィとにより，分子量約26,000で熱に安定な蛋白質が，分裂促進要素であることを報告している．又，Szent-Györgyi[19]等 (1963) は，胸腺，大動脈，筋肉や腱から細胞分裂に対して，促進的に働く物質 "Promine" と抑制的に働く物質 "Retine" の2者の抽出に成功している．ところで，我々の教室で研究を続けている cornin に関しては，西田，村上[20] (1972) が総説しているように，金尾[2] (1965) は，家兎の骨格筋からウニ卵の初期分裂を著しく抑制する物質 "筋cornin" の抽出に成功し，又，寺坂[21] (1967) は，ウサギ及びイヌの各種内臓より cornin を抽出し，筋 cornin 及び角膜 cornin よりは弱いが，ウニ卵初期分裂を抑制する作用がある事を見い出している。又，Kobayashi[22] (1969) は，ウニ卵の核酸合成に対する cornin の影響をアイソトープを用いて調べ，ウサギ筋 cornin は，ウニ卵の ^{3}H-uridine の取り込みを増すが，^{3}H-thymidine ^{3}H-thymine，^{3}H-uracil の取り込みを抑制する事を報告した．今回，図1に示すように，正確に20℃の恒温槽中で発生させることにより，寺坂のウシ肝臓 cornin の最終有効濃度 10^{-4}g/mℓより$\frac{1}{10}$低濃度の10^{-5}g/mℓでも，ウニ卵の初期分裂を著しく抑制する作用のある事を見い出した．又，藤田[23] (1969) は，^{3}H-thymidine は，エールリッヒ腹水腫瘍細胞の whole cell，酸不溶性画分共に logarithmic phase に取り込まれ，その取り込みは，筋 cornin によって抑制される事を見い出した．又，半井[24] (1972) は，各種海産動物から抽出した cornin のエールリッヒ腹水腫瘍細胞の増殖に及ぼす影響を調べ，特にイガイからアルコール分画法で得た分画は，エールリッヒ腹水腫瘍細胞の増殖を抑制する事を見い出した．原田[25] (1967)，T. Ohya[26] (1967) は，マウスを用いて in vivo での cornin の抗腫瘍効果を確めた．それによると，イヌ小腸 cornin，ウサギ筋 cornin 共に，エールリッヒ腹水腫瘍に対し，毎日の腹腔内投与で増殖抑制作用を示し，特に，イヌ小腸 cornin が強力であった．皮下投与で，筋 cornin は無効で，イヌ小腸 cornin は，雄にやや抑制作用を示した．次に，越宗[27] (1966) は，ラットの再生肝への^{32}Pのとり込みに関しては，筋肉 cornin は，無機燐のとり込みを抑制し，かつ nucleotide への^{32}Pのとり込みを約$\frac{1}{3}$に抑えることを報告した．又，山田[28] (1970) は，呑竜系ダイコクネズミの肝臓から抽出した cornin を用い，同系動物の肝臓由来の長期培養株の1種である RLN-10 細胞の分裂抑制作用を，位相差顕微鏡16mm映画撮影法と，オートラジオグラフを用いて，ラット肝臓 cornin は，ラット由来の肝細胞の増殖を抑制することを報告した．

今回使用したウシ肝臓 cornin は，ＲＮＡを含む核蛋白の1種で，アミノ酸分析機によるアミノ酸組成は，酸性アミノ酸としては，アスパラギン酸，グルタミン酸及びグリシンを，塩基性アミノ酸としては，リジンを多く含んでいる．今回の実験で，ウニ受精卵及びエールリッヒ腹水腫瘍細胞においては，実験結果で述べた様に，ウシ肝臓 cornin の濃度に応じて，ウニ卵の初期分裂及びエールリッヒ腹水腫瘍細胞の増殖は抑制された．又，表3に示すように，ＤＡＢ投与により発癌したラットにおいては，Stich も言及している様に，部分的肝切除によっても，細胞分裂はほとんど促進せず，又，部分的肝切除後のウシ肝臓 cornin 投与によっても，何ら影響を与えられない点からみてももはや，transformed cell では，正規の細胞分裂の調節機構範囲より逸脱しているものと考えられる．一方，再生肝においては，表4に示すように，肝切除後12時間目に，ウシ肝臓 cornin をいろいろの濃度で腹腔内注射し，2時間 label し，ＤＮＡ合成に及ぼす影響をみると，cornin濃度が50mg/100gr体重を注射した場合は，抑制効果は著しいが，cornin 濃度を100mg/100gr体重200mg/100gr体重にすると，対照群との差はなくなり，場合によっては逆に，若干の促進効果さえみられた．そこで，cornin 濃度が，100mg/100gr体重，或いは200mg/100gr体重投与の場合，生理的濃度より2～4倍もの高濃度であるため，DNA合成に及ぼす抑制作用が顕著であり，その為，肝切除後24時間目では，その rebound が出現し，それでＤＮＡ合成の抑制作用がなくなったのではないかと考え，^{3}H-thymidine を，肝切除後18時間目に注射してみたが，少し抑制作用がみられたが，あまり差はなかった．次に cornin の作用時間が関係しているのではないかと考え，肝切除と同時に，ウシ肝臓 cornin を腹腔内に注射してみたが，やはり cornin 濃度が100mg/100gr 体重投与では，ＤＮＡ合成抑制効果はみられなかった．以上のウシ肝臓 cornin 及び ^{3}H-

thymidine の投与時期及び作用時間をわかりやすく，図3に示す．

図－3

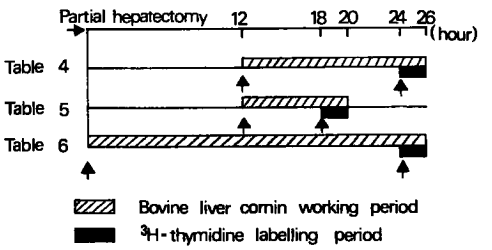


Fig. 3

上記の結果より，ウシ肝臓 cornin 作用機序に就いて，以下の様に考えてみた．生体には，細胞分裂抑制物質と細胞分裂促進物質があり，さらにそれらの balance を調節するため，高位の mitotic receptor があると予想される．分裂抑制物質としては，我々が抽出に成功している cornin があり，これは組織特異性があり，肝切除後完全に再生するまでに，約1カ月かかることから，この抑制物質の合成には時間がかかると考えられる．一方，分裂促進物質としては，前述した Promine 等があり，これらは，組織特異性はなく，全身から総動員されうる．ウニ受精卵及びエールリッヒ腹水腫瘍細胞は，in vivo といっても，in vitro に近いもので，ホメオスターシスを受けていない状態であると考えられる．従って，ウニ受精卵やエールリッヒ腹水腫瘍細胞では，細胞の増殖の抑制は，ウシ肝臓 cornin の濃度に応じた抑制を受けている．ところが一方，再生肝では，cornin濃度が，生理的濃度以下になると，分裂促進物質の濃度が相対的に大となるため，上位の mitotic receptor が探知し，ある trigger がひかれ，その結果として DNA 合成が増加するものと考えられる．そして細胞分裂がくり返され，丁度 cornin 濃度が生理的濃度になれば，DNA合成並びに細胞の増殖は中止される．部分的肝切除後，約1カ月で元の重量に戻り，そこで細胞の増殖が中止されるのは，このためであろうと考えられる．表(4)(5)(6)に示す様に，ウシ肝臓cornin を，100mg/100gr体重 200mg/100gr 体重の割合いに投与すれば，ラット再生肝での cornin 濃度は生理的濃度以上になり，それに対抗して，分裂促進物質が総動員され，結果的には分裂促進効果が出るのではないかと考えられる．正常ラットにウシ肝臓 cornin 200 mg/100gr 体重投与した場合，表(7)に示しているが，DNA 合成が増加しているのもこの為であろうと推察される．ウシ肝臓 cornin を50mg/100gr体重投与した場合，抑制効果があるのは，cornin が元の生理的濃度になり，分裂促進物質との balance がとれ，肝切除による DNA 合成の促進効果がなくなり，従って再生肝の DNA 合成に対する cornin の影響は，この濃度において，最も強い抑制を受けている．即ち，正常肝における DNA 合成に近い状態，$G^0 \leftarrow G^1$ に返そうとしているものと考えられる．しかし，mitotic receptor が，果して存在するのか？もし存在すればどこにあるのか？この2点は，現在の所，未だ不明である．しかし，大脳，小脳などの中枢神経系に多量に存在している substance Pは，細胞分裂に対し促進作用を持っており[29]同じ脳組織より分裂抑制因子も抽出されており，これらは高位の分裂調節物質の存在を暗示している．生物は全て，ある程度成長すれば，自からその成長を中止している点，皮膚や角膜上皮，消化管の上皮細胞の再生時に見られる様に，決して元以上に再生することはない点，及び，低血糖，飢餓時には成長ホルモン（GH）の分泌が増加し[30][31]その結果DNA合成が高まる点などより，mitotic receptor の存在が推察され，それと成長ホルモンとの関係等，必らずや，どこかで結びつく所があるだろうと思う．

次に，ウシ肝臓 cornin のウニ受精卵に及ぼす影響について，電顕レベルでの形態学的変化が生じてくるか否かについては，写真(3)，(4)，(5)，(6)に示している様に，cornin非投与では，annulate lamellae や，microtubules like の物が見られる時期に，cornin 投与では，写真(5)，(6)の如く，annulate lamellae だけで，未だ microtubules は見あたらない．つまり分裂の進行が遅延させられているのがわかる．しかしながら，他の細胞内構成物は，何らcornin投与によっても変形ないしは，崩壊はされていない事がわかった．

結　論

ウシ肝臓 cornin を用い，ウニ受精卵及びエールリッヒ腹水腫瘍細胞並びにラット再生肝の増殖に及ぼす影響を調べた．

1)　ウニ受精卵の発生を抑制する．しかし，電子顕微鏡による観察では，形態学的な変化は認められなかった．

2) エールリッヒ腹水腫瘍細胞の増殖に対しては，投与したウシ肝臓 cornin の量に応じて，分裂指数は減少し，DNA合成も抑制された．

3) ラット再生肝の増殖に対しては，投与したウシ肝臓 cornin により，分裂指数は減少した．

4) ラット再生肝の DNA 合成に対しては，ウシ肝臓 cornin の濃度が生理的濃度において，最も著しく抑制され，生理的濃度をはずれて過少又は，過大に投与すると，抑制効果は，減少する．

5) この現象は，高次の分裂調節中枢の存在を示唆していると思われる．

稿を終るにあたり本研究に終始ご指導を仰いだ恩師西田勇教授ならびに村上哲英助教授に深甚な謝意を表します．又，電子顕微鏡の使用にあたっては，岡山大学医学部寄生虫学教室の稲臣成一教授ならびに，岡山大学理学部臨海実験所の御好意を得ました．厚く御礼申し上げます．尚，本研究の一部は，財団法人山陽放送学術文化財団研究助成金の補助を受けました．ここに感謝の意をあらわします．

参 考 文 献

1) Higgins, G.M. & Anderson, R. M. (1931) Arch. Pathol., **12**, 186
2) 金尾浩志 (1965) 岡山医誌, **77**, 631
3) Sato, J., Matsuda, S., Yabe, T., Usui, K and Noda, M. (1961) Bull. Cancer Inst. Okayama Univ. Med. School, **1**, 42
4) Burton, K. (1956) Biochem. J., **62**, 315
5) Lehmiller, D. J. (1971) Academic Press. New York and London, pp. 1
6) Bullough, W. S. (1962) Biol. Rev., **37**, 307
7) Rytőmaa, T., and Kiviniemi, K. (1968) Europ. J. Cancer, **4**, 595
8) Mohr, U., and Althoff, J. (1968) Nature, **220**, 134
9) Frankfurt, O. S. (1971) Exptl, Cell Res., **64**, 140
10) Teir, H., Lahtiharju, A., Alho, A., and Forsell, K. J. (1967) Academic Press, New York and London, pp, 67
11) Whitfield, J. F., R. H. Rixon & T. Youdale (1969) Int. J. Radiat. Biol., **15**, 385
12) Rixon R. H. (1968) Currents in Modern Biol., **2**, 68
13) Perris, A. D., J. F. Whitfield & P. K. Tőlg (1968) Nature, **219**, 527
14) Egyűd, L. G. (1968) Currents in Modern Biol., **2**, 128
15) Stich, H. F. (1960) Ann. N. Y. Acad. Sci., **90**, 603
16) Goutier, R. et Bologna, I. (1962) Arch. Internat. Physiol. Biochim., **70**, 570
17) Goutier, R. et Bologna, I. (1963) Biochim. Biophys. Acta, **72**, 40
18) Colin G. D. Morley and Henry S. Kingdon (1973) Biochim. Biophys. Acta, **308**, 260
19) Szent-Györgyi, A., Hegyeli, A. & McLaughlin, J. A. (1963) Science, **140**, 1391
20) 西田勇，村上哲英 (1972) 日本生理誌, **34**, 131
21) 寺坂俊明 (1967) 岡山医誌, **79**, 734
22) Kobayashi, Y. (1969) Acta. Med. Okayama, **23**, 569
23) 藤田興 (1969) 日本生理誌, **31**, 543
24) 半井昭英 (1972) 岡山医誌, **84**, 535
25) 原田英樹 (1967) 岡山医誌, **79**, 89
26) Ohya, T. (1967) Acta Med. Okayama, **21**, 227
27) 越宗猪一郎 (1966) 日本生理誌, **28**, 308
28) 山田俊典 (1970) 岡山医誌, **82**, 561
29) 日野道夫 (1962) 岡山医誌, **74**, 729
30) Frohman, L. A., Bernardis, L. L. and Kant, K. J. (1968) Science, **162**, 580
31) 井村裕夫 (1973) 日本醫師会雑誌, **69**, 1573

写 真 説 明

写真1. The autoradiography when ^{3}H-colchicine was administered to Ehrlich ascites carcinoma cells.

写真2. The autoradiography when ^{3}H-thymidine was administered to regenerating rat liver.

写真3. The arrow points to regions of the nuclear envelope which are breaking down.
AL :annulate lamellae 4300×2.2

写真4. The arrows point the columns of microtubules and endoplasmic reticulum. 9600×3.2

写真5 . AL :annulate lamellae 5900×2.2

写真6. The arrows indicate the continuity of cisternae of annulate lamellae and endoplasmic reticulum. 15000×2.2

Regulation of mitosis in regenerating rat liver

Naohumi Ohno

Department of Physiology, Okayama University Medical School, Okayama, Japan
(Director : Prof. Isamu Nisida)

summary

The antimitotic effect of cornin extracted from bovine liver was studied. Obtained results are summerized as follows.

1) Bovine liver cornin has antimitotic effect on sea urchin eggs. But the author has not recognized the morphological differencies on their development when observing sea urchin eggs under the electron microscopy.

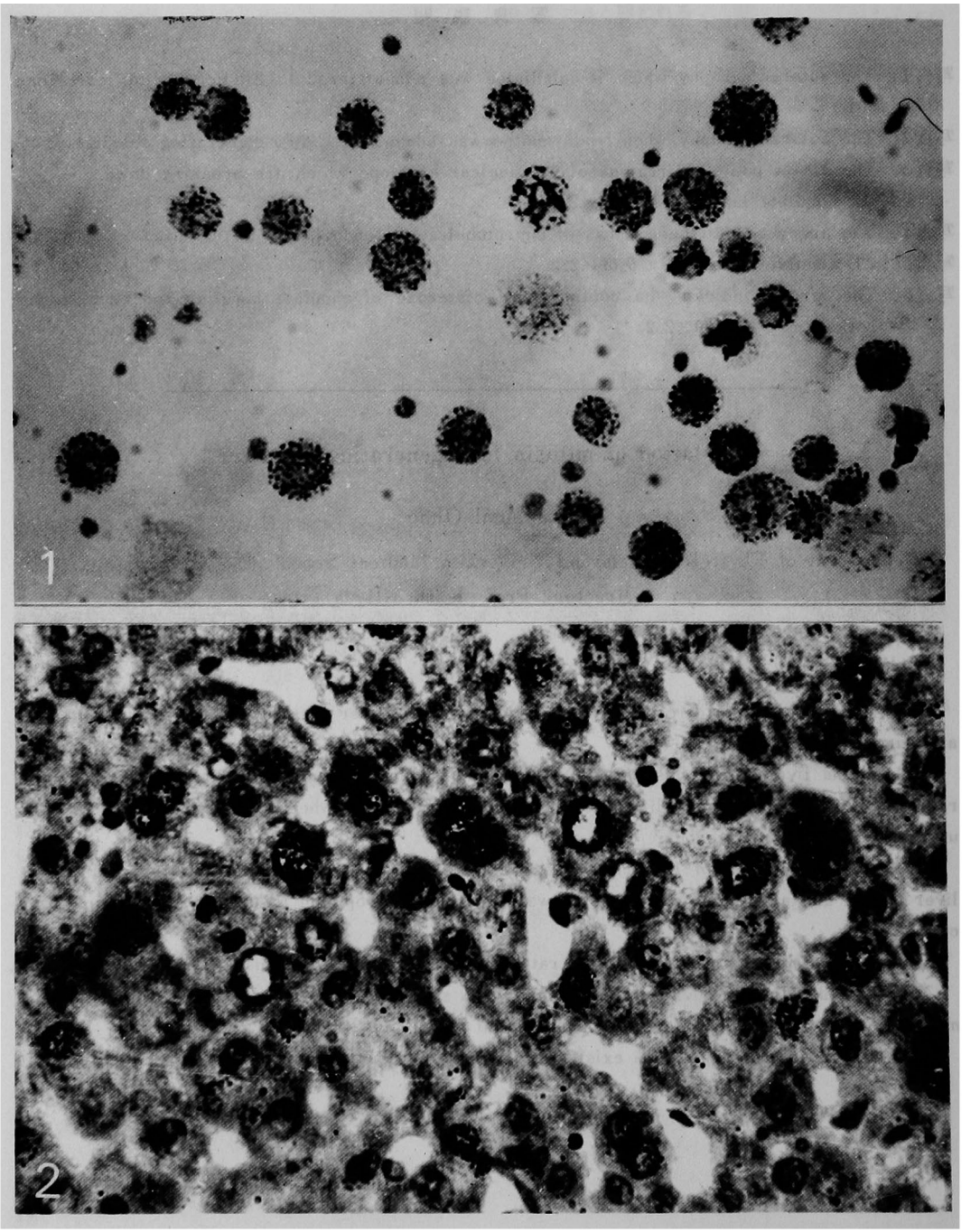
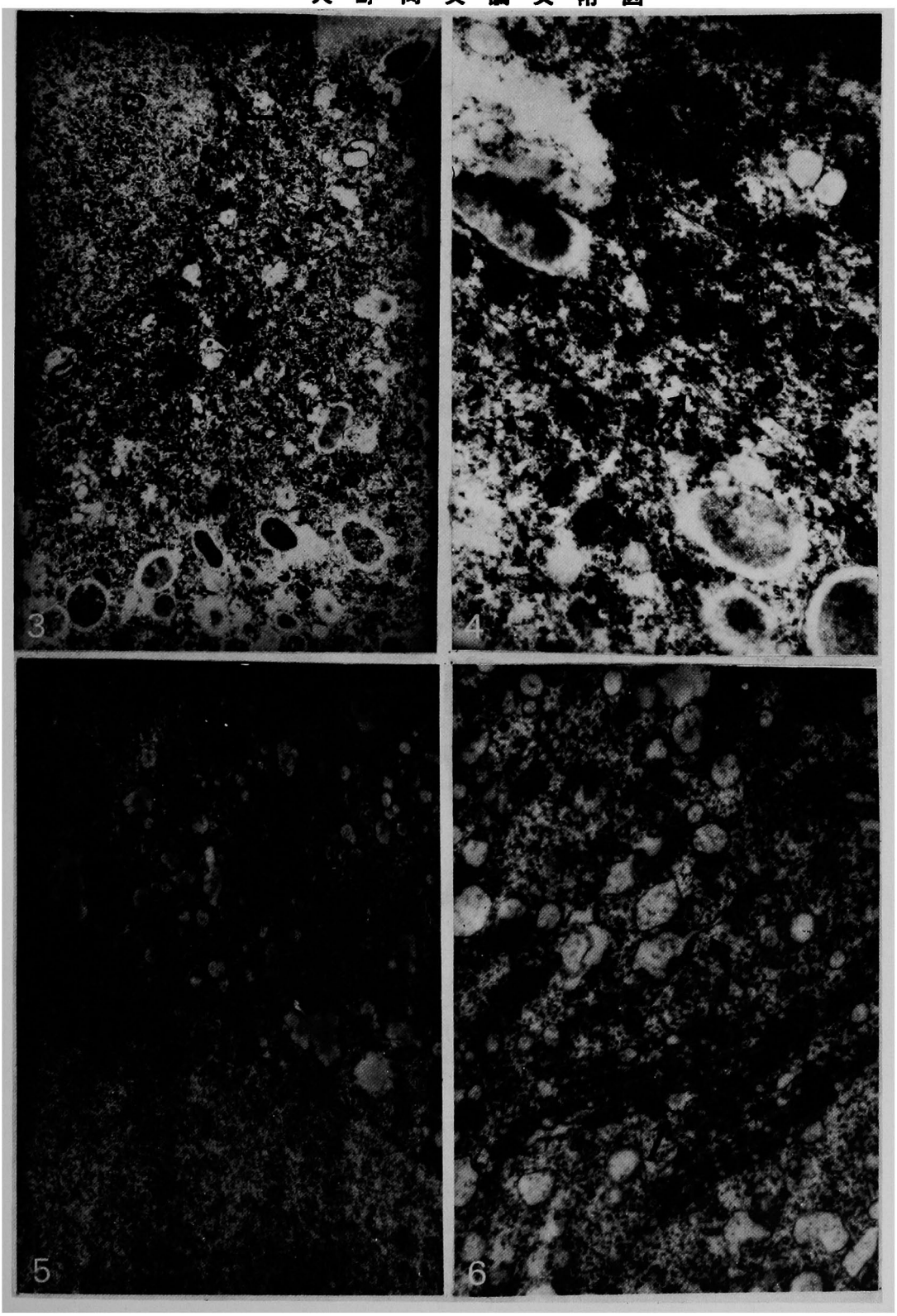
2) The mitotic rate of Ehrlich ascites carcinoma cells decreased by injections of bovine liver cornin and also the DNA synthesis was inhibited in propotion to the doses of bovine liver cornin.

3) The mitotic rate in regenerating rat liver decreased by injections of bovine liver cornin.

4) The inhibition of bovine cornin on the DNA synthesis in regenerating rat liver, was the most strongest when administered in equal to the physiological concentration.

5) Above results suggest the existense of the higher mitotic autoregulating center.

大野尚文論文附図



大野尚文論文附図