金沢大学十全医学会雑誌　第86巻　第2・3号　232－244　(1977)

成熟肝細胞の分散浮遊化とその試験管内増殖性について

金沢大学医学部病理学第Ⅱ講座（主任：太田五六教授）
金沢医科大学病理学第Ⅰ講座（主任：小田島粛夫教授）
谷　内　勝　子

（昭和52年2月8日受付）

肝細胞を分散浮遊化する方法は古くから行なわれているが[1)2)]，分散された肝細胞は呼吸活性が低く，その多くの細胞が急激に死滅して実験材料としては極めて不適当なものであった[3)]．近年 Howard ら[4)]，がコラゲネースを用いて肝細胞の分散浮遊化に良好な結果を得たと報告しているが，In vitro における酸素消費の実験結果からはなおいくつかの問題があり，In vitro の実験材料として必らずしも完全なものではない．

一方，肝細胞の Primary culture も試みられているが，胎児性肝細胞[5)6)]．肝がん細胞の[7)]試験管内培養は比較的容易であるが，分化した機能をもつ成熟肝細胞の培養は極めて困難なものであり，その培養が強く望まれているにもかかわらず報告例は極めて少ない[8)9)]．

本研究ではこれまで報告された結果を中心に成熟肝細胞の分離浮遊化法を改良し，分散浮遊化した肝細胞について，肝湿重量あたりの収量および生存率，さらに In vitro における生細胞の動態について検討し，実験材料として充分に使用し得る分散浮遊化肝細胞を得ることができた．さらに，これら分散浮遊化肝細胞の試験管内増殖性を検討し，パパインによる細胞処理が試験管内細胞増殖性に極めて重要であることを見い出した．

実験材料並びに方法

1．肝細胞の分離法

肝細胞の分離浮遊化はこれまで EDTA 処理機械的分散法[1)~3)]とコラゲネース処理分散法[4)17)]によって行なわれているが，本研究ではさらに蛋白分解酵素（トリプシンあるいはパパイン）処理による肝細胞の分散浮遊化を試み，細胞の収量、生存率を中心に同一条件下でこれら分離法の優劣を比較検討した．

Wister 系成熟ラット(静岡県実験協同組合より購入，10週以上飼育，体重400g以上)をエーテル麻酔下で開腹し，門脈より氷冷 Alsever 液で，ついで0.05%コラゲネースを含む Ca^{++} free ハンクス液で充分に潅流した後肝を剔出し、メスで薄切して得られた肝組織細片を3等分し，EDTA 処理機械的分散法，コラゲネース処理分散法および蛋白分解酵素処理による肝細胞の分散浮遊化を行なった．**EDTA・機械的分散法**では，肝組織細片に0.01%EDTA を含む Ca^{++} free ハンクス液を加え，ゴムで被覆したガラスホモジナイザーでゆるやかに機械的処理を行なった．**コラゲネース処理分散法**は原法[4)12)]に従い，肝組織細片に0.05% コラゲネースを含む Ca^{++} free ハンクス液を加え，95%air，5%CO_2 の気相で，37°C，1時間ゆるやかに振盪した．また**蛋白分解酵素処理法**では，肝組織細片1gあたり，0.01%のトリプシンまたはパパインを含むハンクス液25mlを加え，95%air，5%CO_2 の気相室温中で15分間ゆるやかに振盪した．

上記の諸方法で分散化した各分画にそれぞれに大量の氷冷培養液あるいは冷仔牛血清を加えた後，8枚のガーゼで濾過し，分散細胞を含む濾液を600rpmで遠沈して肝細胞分画を得た．この肝細胞分画は原則として培養液あるいはハンクス液で2回洗浄した．600rpm(g=63)，1分以内の遠沈では Kupffer 細胞などは肝細胞分画の上層に集積し，吸引で容易に除去することが可能である．

2．細胞数の算出と生存率の決定

肝細胞浮遊液を白血球数計算用メランジュールに取り，0.2%トリパンブラウを含むハンクス液で稀釈し，Thoma-Zeiss 型計算盤で細胞数および生細胞数（染色されない細胞数）を算出した．

3．肝がん細胞および肝細胞の継代培養法

実験に用いたラット肝がん細胞は (MH_1C_1) Rich-

Isolation of the viable liver cells from adult rats and their propagation in *in vitro* culture. **Katsuko Taniuchi**, the 2nd Department of Pathology, (Director : Prof. G. Ohta) School of Medicine, Kanazawa University and the 1st Department of Pathology. (Director : Prof. S. Odashima), Kanazawa Medical University.

ardson ら[7]，によって Morris 移殖肝癌（No.7795）より分離培養されたものである．細胞は小型上皮様で島形成能をもち，染色体は異数性（2_n=45〜49）であるが，ラット血清アルブミンを産生する．この細胞の培養には15%馬血清，2.5%仔牛血清添加ハムF-10培養液を用いた．

正常肝細胞は小田島ら[11]，によって成熟ラット肝から分離培養されたもので，染色体は軽度の異数性（2_n=38〜42）を示すが，血清アルブミン，α_1,α_2およびβ_1，β_2 グロブリンを産生する．この細胞の培養には20%仔牛血清添加ハムF-10（30%），L-15（70%）の混合培養液を用いた．肝細胞の初代培養試験にも同じ培養液を使用した．

何れの細胞についても培養液の交換は週2回とし，継代培養は週1回規則的に行ない，培養（継代培養）中における細胞形質の変換を可能なかぎり防ぐように留意した．

4．増殖曲線

トリプシン（0.125%）－EDTA（0.02%）混液で細胞を分散後，細胞の最終濃度を 2×10^4 cell/ml とし35mmプラステイックシヤーレ（ファルコン社）に播種し，炭酸ガス培養器(池本製）で37°Cで培養した．各2日目毎に2枚のシャーレについて，トリプシン（0.125%）－EDTA（0.02%）混液で細胞を分散後に細胞数を算出した．

5．細胞内^{3}H-Thymidine（TdR）の取り込み

一定条件で培養中の細胞をハンクス液で洗浄後0.1 μCi/5 ml ^{3}H-TdR を含む新鮮な培養液を加え，CO_2ガス培養器で37°Cで培養した．1時間後に培養液を捨て，生理的食塩水でよく洗浄後，トリプシン-EDTA 混液で細胞を剥離，分散した．この細胞浮遊液をミリポアーフィルターで濾過し，細胞を濾紙上に集め，PBS（燐酸緩衝液）で数回洗浄後，氷冷 TCA（10%）さらに80%エタノールで洗浄した．濾紙上の Trichloroacetic Acid（TCA）不溶細胞分画を室温で乾燥し，5 mlの PCS（Amersham）を加え，液体シンチレーションカウンターで測定した．

6．S-GOT の測定

肝細胞分散浮遊液中に漏出する S-GOT 量は試料を遠沈して細胞を沈澱除去した後の上清について，行なった．測定法には SIGMA 社製の S-GOT 測定用 Kit を用いた．

7．細胞膜表層物質の調整方法

細胞表層物質の調整は Winzler[12] の方法を改良した小田島ら[11]の方法に従った．即ち，機械的方法で分散浮遊化した成熟肝細胞を0.01%パパインあるいはトリプシンを含むハンクス液中で室温，15分間インクベートし，ラット肝細胞膜表層より遊離してくるいわゆる膜表層物質をさらにプロナーゼPで室温12時間再消化し，氷冷 TCA 液（最終濃度10%）を加えて除蛋白した後，上清を冷脱イオン水で透析した．この上清を凍結乾燥してそれぞれ F-PAP，F-TRY として実験に用いた．一方小泉ら[13]の方法を若干改良して全肝臓組織から同様の物質を調整し，対照として用いた．すなわち，肝臓を氷冷ハンクス液で灌流後，細切して直ちに5倍量（V/W）のアセトンを加え，ワーリングブレンダーでホモジナイズした．得られた肝ホモジネートを氷室で約12時間ゆるやかに攪拌後，遠沈して上清を除き，さらに5倍量のエーテルを加えて氷室で12時間ゆるやかに攪拌し，再び遠沈して上清を除去した．このようなアセトン・エーテル抽出を再度くり返えして後，デシケーターで乾燥したものについて上記の細胞表層物質の調整法と同様の操作を行なった．即ち，乾燥肝末 1gr につき0.1N-NaOH を15mlの割合で加え，室温でゆるやかに攪拌し，充分に水解後，0.1N-HCl でpH8.0〜8.2に調整し，プロナーゼPを加えて充分に消化し，TCA による除蛋白透析、凍結乾燥によって得られた物質を F-WLT として実験に用いた．

8．蛋白質，核酸，およびウロン酸の定量

蛋白質の定量は Phenol 試薬を用いる Lowry ら[14]，の方法に従った．DNA の定量は Diphenylamin 試薬を，RNA の定量は Orcinol 試薬を用いる標準的な[15]核酸定量法で行なった．標準 DNA，RNA 試料はシグマ社から購入した．ウロン酸の定量は Bitter ら[16]，のカルバゾール硫酸法を改良した方法に従った．即ち，5 mlの硫酸溶液を試験管にとり氷冷した後試料1 mlを静かに重層し，よく攪拌した．さらに沸騰浴中で10′加熱した後室温まで冷却し，さらに15分間沸騰浴中で加熱した．室温に冷却後，530 μmでその吸収を測定し，標準曲線からウロン酸量を算出した．

9．再生肝の作り方

再生肝は Higgins と Anderson[10] の方法に従い成熟ラットを麻酔下で開腹し，左葉および中葉にいたる血管を結紮後，両葉を結紮部近くで切断除去し，腹腔内にペニシリンを注入後縫合した．切除肝は全肝のほぼ3/4に相当する．

10．実験材料

細胞培養液および仔牛血清，馬血清はすべて FLOW-Laboratories INC.（U.S.A.）を用いた．また培養に用いたペトリ・デイッシュ培養用フラスコはファ

ルコナイズされたプラステイック製（ファルコン社 U.S.A.）である．コラゲネース（TYPE-I），再結晶化パパインは SIGMA 社（U.S.A.）より，またトリプシンは再結晶し，0.25%液としたものを GIBCO 社（U.S.A.）より購入した．^{3}H-Thymidin，は（S.A，50Ci/mmole）New England Nuclear CO. より購入した．蛋白量および DNA 定量用の標準曲線作成のための Bovine serum Albumin, DNA (Salmon) は Sigma 社より購入した．その他実験に用いた化学薬品は半井化学，和光純薬より購入した．

結　　果

1．ラット肝細胞の分離法の検討

本研究では予備実験的に良好な結果を得た，蛋白分解酵素処理による肝細胞浮遊化を中心に，これまで報告されている EDTA-機械的処理およびコラゲナーゼ処理による肝細胞の分散浮遊化法を比較検討した．

図1は EDTA 機械的処理法および酵素処理法によって得られた肝細胞について，生存率ならびに In vitro でインクベート中の生存率ならびに時間的変化を示したものである．インクベートは予測される実験条件を考慮して37°Cで水平振盪（60cps）を行なった．機械的処理法では分離細胞のほぼ50%が死滅しており，In vitro での培養初期でも急激に生存細胞が減少する．洗浄液や培養メデイウムとしてハンクス液を用いた時は特にこの変化は著しい．10%牛胎児血清を加えた培養液を加えると生存細胞数はやや増加する．酵素処理法のうちコラゲネースを用いた場合では，分離直後の肝細胞の生存率（90%）は最も高いが，インクベーションの過程で，時間と共に生存率は低下し，3時間後にはほぼ55%になった．トリプシン処理による場合では，分離した直後の細胞生存率は80%であるが，In vitro でのインクベーションではよく安定し，3時間後の細胞生存率は65%であった（写真1）．

図2は EDTA・機械的処理によって分離した肝細

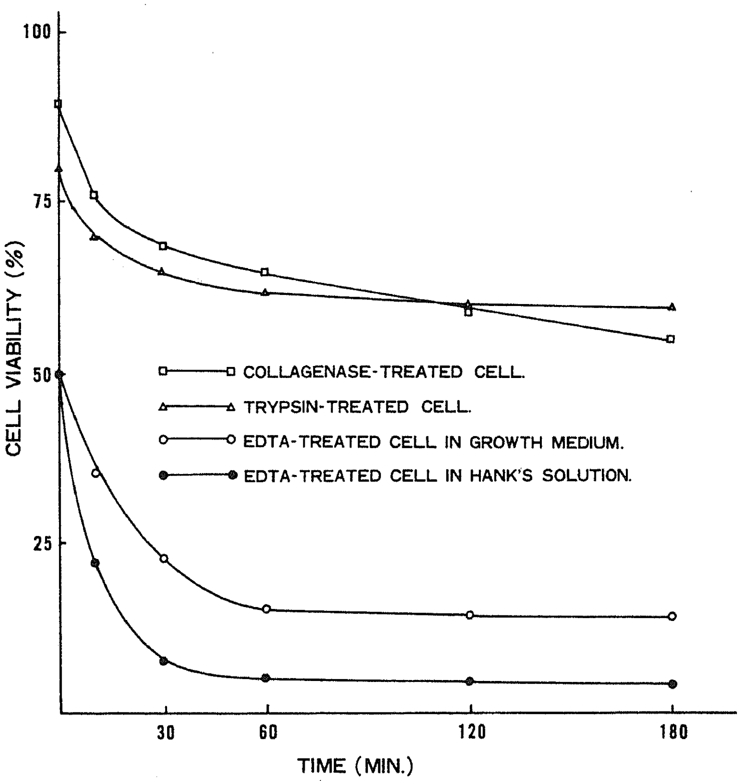


Fig. 1. Viability of the liver cells treated in vitro with EDTA and enzymes respectively from adult rats.

胞を等張食塩水（308mOsm, pH7.5）で室温でインクベートし，時間的な生存細胞の動態と培養液中に放出される S-GOT の量をプロットしたものである．生細胞の低下と培養液中の S-GOT の増加が一致してみられる．図3はトリプシン処理によって分離された肝細胞について同様の実験を行なったものであるが，初期20′で大量の S-GOT の遊出がみられるが，その後はほぼ一定値になる．

なお，酵素処理法による生存細胞の収量は平均 2×10^6～1×10^7細胞/グラム肝湿重量であり，EDTA・機械的処理法ではその半分以下であった．

2．正常肝細胞の試験管内増殖性

肝組織を機械的処理および蛋白分解酵素処理で得られた分離細胞について，その試験管内増殖性を検討した．分離された肝細胞を 5×10^5cells の濃度で60mmファルコン製プラステイック・シャーレに播種し，7日目のコロニー形成率によって試験管内増殖性を比較した．写真2aは肝実質細胞由来の典型的な上皮性細胞のコロニーである．非増殖性肝実質細胞はコロニーを形成せず（2b），その他 origin 不明の細胞（2C）と繊維芽細胞様細胞を極く少数含むが，増殖率の判定にはほとんど影響しなかった．また表1でみられるように EDTA・機械的処理で得られた肝細胞はほとんど増殖性を示さない．トリプシン処理で得られた肝細胞では 1×10^4細胞あたり1コのコロニーが，またパパイン処理による肝細胞では 1×10^4細胞あたり平均3コのコロニー形成がみられ増殖性の高いことを示した．0.05%コラゲネースで灌流後に EDTA で機械的に分離した細胞についてパパイン処理を行い，その増殖性の変化を検討した．（図4）即ち機械的に分離した細胞をパパイン濃度（5μg，25μg，50μg，100μg/ml）で処理した後，播種し，炭酸ガス培養器で37°C 2日間培養した後に^{3}H-TdR の取り込みを検討した．パパインで処理しなかった細胞群ではほとんど^{3}H-TdR の取り込みはみられなかったが，パパイン処理した細胞群ではパパインの濃度に比例して，^{3}H-TdR の取り込みは増加し，50μg/ml以上ではほぼ一定値を示した．

3．再生肝細胞の In vitro での増殖性

以上の実験から成熟肝細胞の In vitro での増殖性はパパイン処理によって著しく増大することが明らかになった．この増殖性促進の機構を明らかにするために次の実験を行なった．麻酔下で成熟ラットの肝臓を3/4切除して再生肝を作成し，40時間後に0.05%コ

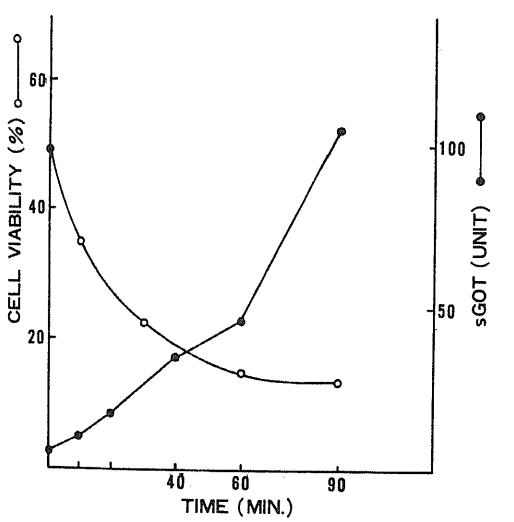


Fig. 2. Relation between the viability of EDTA-treated cells and release of SGOT into the medium.

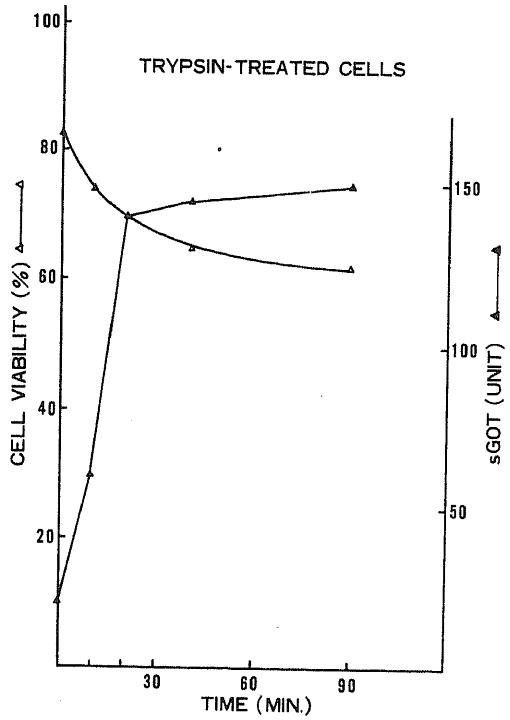


Fig. 3. Relation between the viability of tripsin-treated cells and release of SGOT into the medium.

Table 1. Colony formation of the 7 days culture cells (1×10^5 cells) after *in vitro* pretreatment with EDTA and enzymes.

	Number of colony		
	EDTA treated cells	Trypsin treated cells	Papain treated cells
Exp. 1	0	9	33
Exp. 2	2	13	35
Exp. 3	0	7	24
Exp. 4	0	10	30
Exp. 5	1	8	29
Average;	–	9.4	30.2

Table 2. Colony formation of the 5 days culture cells (1×10^5 cells), obtained from rats treated with partial hepatectomy, following *in vitro* pretreatment with enzymes.

	Number of colony	
	Trypsin treated cells	Papain treated cells
Exp. 1	18	12
Exp. 2	18	20
Exp. 3	20	19
Exp. 4	16	20
Exp. 5	16	23
Average;	17.8	18.8

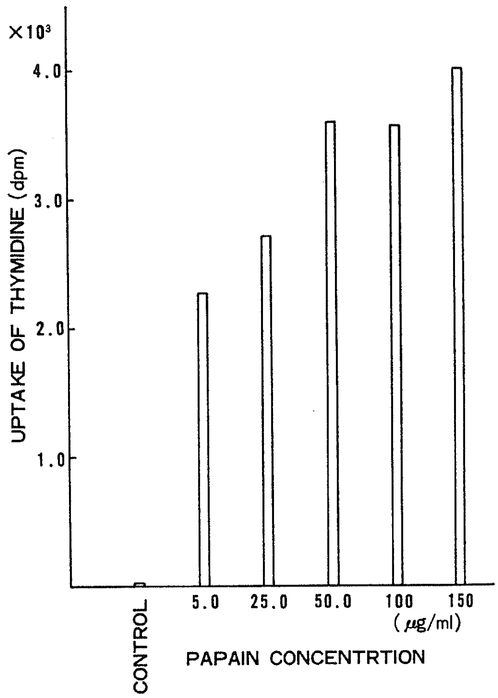


Fig. 4. ^{3}H-TdR uptake of the 2 days culture cells following in vitro pretreatment with papain.

ラゲネースで灌流後，得られた肝細胞分画を0.01%トリプシンあるいはパパインで処理し，そのコロニー形成を検討した．表2から明らかなように再生肝細胞の増殖性はトリプシンあるいはパパイン処理のあいだに著明な相違は見い出されなかった．

4．継代培養細胞のパパイン処理と^{3}H-TdR の取込みについて

次に，すでに継代培養中の肝細胞についてパパイン処理による増殖能の変化を検討した．肝細胞を単層培養し，パパイン（5 μg/mlおよび50μg/ml）を含むハンクス液を加え，室温で15分ゆるやかに振盪し，再び新鮮な培養液で培養した細胞について^{3}H-TdR をパルスラベルし，48時間および72時間後の取り込み量を測定した．表3に示すようにパパイン処理した継代培養細胞の48時間，72時間後の^{3}H-TdR の取り込みは対照に比してむしろ低く，増殖促進はみられなかった．

5．成熟ラット肝細胞の表面物質による増殖阻止作用について．

以上の実験から蛋白分解酵素，とくにパパインには正常肝細胞の In vitro における増殖性を著しく促進させる効果があるが，すでに増殖能力をもつ再生肝や継代培養肝細胞に対しては増殖促進効果がないことが明らかになった．このことはパパインなどの蛋白分

解酵素は細胞の増殖機構には直接作用しないことを示している．一方正常肝細胞に対するパパインの増殖促進効果については多くの可能性が考えられるが，本研究では正常肝細胞表面に増殖阻止因子が存在し，このために肝細胞は In vivo では G_1期に停止しているが，パパイン処理によってこの阻止因子が除去されるのであれば In vitro における増殖が促進されるであろうという仮説のもとに以下の実験を行なった．パパインあるいはトリプシン処理によって成熟肝細胞の表層から遊離してくるいわゆる surface substance (F-PAP, F-TRY) とほぼ同様の方法で全肝組織のホモジネートから得られる分画 (F-WLT) について単層培養中の Morris 肝がん細胞（写真3a）の増殖性に対する阻止効果を比較検討した．

図5は対数増殖期にある Morris 肝がん細胞に各分画をそれぞれ100μg/ml添加して培養を継続し，4日目にコントロールを規準として細胞の増殖阻止率を示したものである．F-PAP および F-TRY 分画の添加群では細胞数からみても，Thymidine uptake からみても著しい増殖低下が起っていることを示している．増殖阻止率を%で示すと，表4となり，100μg/mlの抽出物質をメディウム中に加えると，それぞれ79%と64%であるが，F-WLT 分画の増殖阻止率は18%である．そして増殖阻止%は F-WLT を除いて，抽出物質の添加量によく比例している．

写真3b，は F-PAP を200μg/mlの濃度で培養液に添加し，4日目の Morris 肝がん培養細胞であるが，形態学的に異常はみとめられず，この分画による増殖率の低下は細胞障害によるものではないことを示

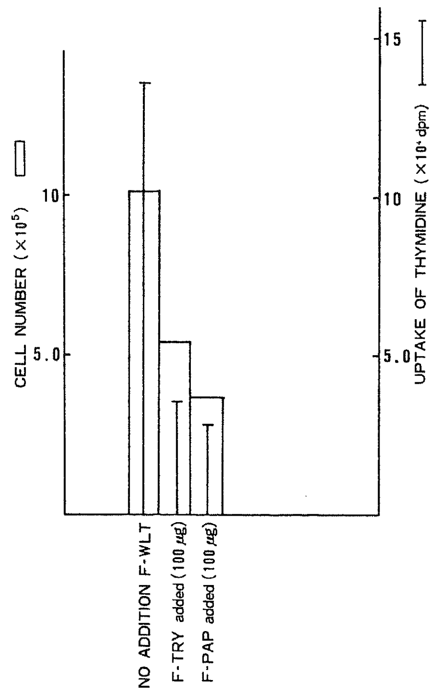


Fig. 5. Inhibition of in vitro proliferation of the Morris hepatoma cells by addition of the cell surface substances, obtained from adult rat liver cells by means of Trypsin (F-TRY) and Papain (F-PAP) treatment, into the medium. The harvest was made 4 days following addition of the substances into the medium.

Table 3. Pulse labelled ^{3}H-TdR uptake of the culture cells, from established rat liver cell strain, following *in vitro* pretreatment with papain.

Treatment	Uptake of thymidine (cpm)		
	12 h	48 h	72 h
None	250.0	881.8	5199.0
Papain (5μg/ml)	220.0	592.0	2390.1
Papain (50μg/ml)	235.0	620.0	3590.2

Table 4. % inhibition of F-TRY, F-PAP and F-WLT (the substance extracted from acetone powder of rat normal liver cells) to the same cells proliferation, as illustrated in Fig. 5. The harvest was done 7 days following additions of the substances.

	% Inhibition Rate				
	2.0(μg/ml)	20.0(μg/ml)	50.0(μg/ml)	100.0(μg/ml)	200.0(μg/ml)
F-WLT	——	——	13%	18%	——
F-TRY	2 %	15%	58%	64%	92%
F-PAP	5 %	15%	50%	79%	95%

している．この細胞膜表層物質は成熟ラット肝細胞から分離し，継代培養中の肝細胞に対しても，同様の増殖阻止効果を示した．これらの各分画の生化学的組成については検討中であるが，F-WLT は約50%の酸性ムコ多糖類と少量の蛋白を含み，F-PAP，F-TRY は34%の蛋白と少量の酸性ムコ多糖類を含んでいる．

考　　察

肝実質細胞の分散浮遊化について

肝実質細胞の分散浮遊化は細胞生物学的な研究材料として極めて有用であると考えられており，その方法の確立が強く望まれている．

肝組織から肝実質細胞を分散浮遊化する方法は(1)初期の機械的分散法，あるいは機械的方法にキレート剤として EDTA などを用いる分散浮遊化法と(2)コラゲネースによる酵素処理法[4]，に大別される．肝細胞の分散浮遊化法の選択は研究目的によっても異なるが，これまで報告された結果を総合すると，機械的分散法で得られた肝実質細胞は内部呼吸能は認められるが，強い細胞膜の障害が推定されている．これに比してコラゲネース処理によって得られた肝細胞は分散直後の生存率も高く収量も多いが，インクベーションの過程で，時間と共に生存率が低下し，実験材料としては極めて不安定である．またこれら細胞は試験管内増殖性を示さない．

本研究では予備実験的に好結果を得た低濃度の蛋白分解酵素の短時間処理による分散浮遊化法を中心に，同一条件下で，EDTA•機械的分散法，コラゲネース処理分散法を同時に行って，細胞の収量，生存率，生存期間について比較検討した．EDTA•機械的分散法では分離の時点でほぼ半分の細胞が死滅しており，肝湿重量 1gあたりの生存細胞収量も量も悪く，酵素法の半分以下である（平均 3×10^6cells)．これに対して酵素処理法では一般に細胞の収量，生存率がよく，コラゲネース•ヒアウロニデースによる分散細胞ではほぼ93%の生存率があったと Howard ら[4] が報じている．本実験の0.01%トリプシン処理群では平均83%であるが，その収量は量も高く，肝湿重量 1grあたり平均 5×10^6～1×10^7コの細胞が得られた．酵素処理法がこのように高い生存率を示す理由については，Berry ら[17]，が報告しているように，単に細胞の分離のみならず分離過程で死滅した細胞を消化し，生存率を高める上に重要であるからであろうと思われる．

次にこのような方法で分離した肝細胞の In vitro での生存期間が問題である． EDTA • 機械的分散法で得られた生細胞は37°Cでハンクス液中で分散しインクベートすると，初期の30分の間に急激に減少し，2時間後に僅かに5%前後が生存しているにすぎない．ハンクス液の代りに細胞培養液中でインクベートするとやや改善されるが，2時間後の生存率は20%以下である． Howard ら[4] のコラゲネース•ヒアウロニデース法で分散浮遊化した細胞は，同じく時間と共に生存率が低下し，2時間後の生存率は55%であり，前述の方法よりも好結果を得る．ところが0.01%トリプシン，15分消化による分離細胞はきわめて安定しており，2時間後の生存率も65%である．インクベーション初期における著しい細胞生存率の低下は何れの細胞分画法でもみられるが，とくに機械的処理細胞群で著しい．これは分離の過程で障害された細胞が遠沈などの処理とそれにつづく37°C水平振盪によって急激に死滅するためである．従って図1の結果は機械的処理による分離の過程で多くの細胞が障害されていることを示しており，このことは次の結果によっても明らかである．即ち，機械的およびトリプシン処理によって得られた各細胞分画について，インクベーション過程における sGOT 漏出と生存率低下の関係をみると（図2，3)，sGOT の細胞からの漏出と生存率の低下はほぼ一致している．しかし死滅細胞数とそれに対応する培養液中の sGOT の量的関係では両者の間に著しい相違がみられる．この相違は機械的処理法ではその分離の過程で，すでに細胞膜がかなり強く障害されて sGOT など細胞内物質が培養開始以前からかなり漏出してしまうと考えられ，トリプシン処理細胞群では分離の過程での膜障害による sGOT などの漏出が少なく，細胞死滅と一致して培養液中の急激な sGOT の増加が起ることによるものであろう．機械的分離過程での細胞障害は Takeda ら[18]，によっても観察されている．

以上の実験結果からも明らかなように，肝実質細胞の分散浮遊化には酵素処理法がすぐれていることを示し，肝実質細胞の相互の固い cellular junction から考えても当然であるといえよう．トリプシン（あるいはパパイン）やコラゲネース•ヒアウロニデースで分散浮遊化された細胞分画でもインクベート2時間後にかなりの程度の死細胞が混在している．とくに高濃度の酵素液を用いる Howard ら[4]，によって得られた細胞分画法は時間と共に生存細胞が低下する．

これまで種々の方法によって得られた肝分散細胞を用いた細胞生物学的実験が報告されているが，その場合，分散直後の生存率は記載されていても実験過程における生存率の変化に対する検討はなく，データーの解析に多くの問題が残されている．トリプシンで分散

浮遊化した肝細胞はインクベートの過程で安定した生存率を保持しており，In vitro の実験に充分使用し得ると考えられる．しかし，コラゲネースによる方法の場合と同様に分散浮遊化の過程でトリプシン（あるいはパパイン）によって細胞表面が修飾されている可能性を考慮することが必要である．また，これまでの報告では肝細胞の分離洗浄のために1000rpm（g＝120）2分以上の遠沈が行なわれているが，赤血球などと異なり複雑な細胞内構築をもつ肝細胞では容易に障害されて，細胞質一細胞膜分離や，protuberance fomation が起こり結果的に細胞死に導く．細胞質一細胞膜分離は Howard ら[4]，が図示した分離細胞にもみられる．600rpm，1分以内の遠沈でもこの変化を完全に防ぐことは困難でインクベーション初期の急激な細胞死の主な原因の1つであると考えられる．

肝細胞の試験管内増殖性について．

これまでに肝浮遊細胞を用いた実験がいくつか報告されているが，以上にのべたように，実験には大きな制約を受けることが明らかである．このために肝細胞の試験管内培養が望まれている．しかし，胎児肝あるいは幼若な肝細胞，悪性化した肝がん細胞の培養は比較的容易であるが，肝機能を保持した成熟肝細胞の培養は極めてむづかしく報告例も少ない．Bissell ら[19]，は成熟ラット肝臓の再生肝を作り，4日後にコラゲネースで肝細胞を分離浮遊化し，試験管内培養を試みたが，これら細胞は増殖性を示さなかったと報告している．一方 Coon ら[8]，は生後1週目の肝組織をコラゲネース・トリプシンの混合酵素液で処理して肝臓の培養に成功しており，また小田島ら[9]，はパパイン処理による成熟肝細胞の試験管内培養について報告している．

In vivo で成熟組織をコラゲネースで潅流し，細切した肝組織をパパインまたはトリプシンで処理して得られた肝浮遊細胞は試験管内増殖性をもつが，パパイン処理による細胞分画の方が明らかに増殖性が高い（表1）．トリプシン処理によって得られた分離肝細胞のコロニー形成率は肝細胞 1×10^4cell あたり1コで Kaighn ら[20]，の報告と一致している．またコラゲネースで潅流後にキレート・機械的方法で分離した肝細胞は試験管内増殖性を示さなかったことは，Bissell ら[19]，の実験結果をうらづけるものである．これらの分離細胞をさらにパパインで処理した後，^{3}H-TdR の取り込みを見ると明らかに増加する（図4）．従って，成熟肝細胞の試験管内増殖には，パパイン処理が重要であると考えられ，パパインを腹腔内に注入すると肝臓の分裂指数が増加するという報告[21]とも一致するものである．図4から明らかなように肝細胞を0.005％パパイン濃度以上で処理すると最も効果的であることが明らかになった．

一方，In vivo で肝臓の部分的切除を行い，40時間後の再生肝細胞について同じようにパパインまたはトリプシンで処理してみたが，試験管内培養における増殖性については両者の間に著しい相違は見出されなかった．また，すでに増殖サイクルに入っている継代培養細胞でもパパインによる増殖促進効果はみられない．

肝細胞は In vivo でG_1期に停止しているが，肝の部分切除後，少しの Lag phase の後にS期に入る[22]，一方継代培養中の肝細胞は In vitro で約52時間の周期で，G_1期→S期→G_2期→M期→G_1期と連続的な増殖を繰返えしている．また，胎児性あるいは幼若な肝細胞は In vivo で同様に増殖を行なっていると考えられる．それ故に パパインは再生肝や継代培養中の肝細胞のようにすでに増殖期の細胞に対しては増殖促進効果はなく，成熟した肝細胞のようにG_1期に停止している細胞にのみ作用してその増殖を促進すると考えられる．即ち，パパインは細胞の増殖機構に直接作用してその増殖を促進せしめるものではなく，G_1期に抑制されている肝細胞をその抑制から解放する作用をもつものと推定される．成熟肝細胞をパパインあるいはトリプシンで処理して得られる細胞表層物質は明らかに継代単層培養中の Morris Hepatoma 細胞の増殖を阻止し，しかもパパイン処理で得られた表層物質はトリプシン処理によって得られるものよりも明らかに増殖阻止作用が強い．しかも同じようにして得られた全肝ホモジネート由来の物質は僅かな増殖阻止作用を示すにすぎなかったことなどから，パパイン処理による増殖促進効果はつぎのように考えてよいと思われる．即ち，In vivo における成熟肝細胞は表層物質によってその増殖性をある程度抑制されてG_1期にとどまっているが，パパインあるいはトリプシン処理によってその物質が除去されると試験管内での増殖が可能になると推定される．パパインとトリプシンの細胞増殖性に対する効果の相違の理由は不明であるが，その活性や細胞に対する作用部位さらには至適濃度などを今後検討する必要がある．細胞表層に存在する増殖抑制に関する因子はウロン酸を含む多糖類と蛋白質を含むことから Glycoprotein であろうと推定される．これまで報告されている Chalone[23,24] も同じように Glycoprotein と考えられているが，Chalone は細胞質内に存在するという点で本実験での増

殖抑制因子とは異なるが，さらに検討が望まれる．

結 論

成熟肝実質細胞の分散浮遊化の試みとその分散実質細胞の試験管内増殖性を検討して次の結果を得た．

1．コラゲネースで潅流した肝を EDTA・機械的分散浮遊化法で処理すると，分散肝細胞は細胞障害性が強く，細胞の収量も少く，生存率も低い，そしてその試験管内増殖性はみられなかった．

2．これに対してコラゲネースで潅流後，パパインあるいはトリプシン蛋白分解酵素処理法によって分散浮遊化された肝細胞は収量，生存率ともに良好で，とくにトリプシン（あるいはパパイン）15分間処理で得られた分散浮遊化細胞はインクベート中ももっとも安定していた．またそれらには試験管内増殖性もあり，とくにパパイン処理がトリプシン処理に比して3倍の増殖性を示した．

3．すでに増殖期にある継代培養肝細胞や肝部分切除後の再生肝細胞に対しては，パパイン処理は特別の増殖促進効果を示さなかった．

4．In vivo で増殖期にある肝部分切除後40時間目の再生肝細胞は成熟肝細胞に比して試験管内増殖性が著しく高い．しかし，コロニー形成率でみると，パパイン処理とトリプシン処理との間には有意の差がなかった．

5．パパイン，トリプシン処理によって得られた成熟肝細胞膜表層物質は，In vitro で対数増殖期にある Morris Hepatoma 細胞の増殖を阻止し，とくにパパイン処理によって得られた F-PAP（細胞表層物質）がより有効であった．

稿を終るにあたり，終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました恩師太田五六教授ならびに金沢医科大学第一病理学教室小田島粛夫教授に深く謝意を表します．併せてミドリ十字，内藤良一博士の御鞭撻に対して心から御礼申し上げるとともに，喜多洋子助手はじめ金沢医科大学第一病理学教室の諸姉に深く感謝いたします．

文 献

1) **Anderson, N. G.** : Science, **117**, 627 (1953).
2) **Lata, G. F. & Reinertson, J.** : Nature, Lond., **179**, 47 (1957).
3) **Jacob, S. T. & Bhargava, P. M.** : Exp. Cell. Res., **27**, 453 (1962).
4) **Howard, R. B. & LeRoy, A. P.** : J. Biol., Chem., **243**, 3105 (1968).
5) **Leffert H. L, & Paul, D.** : J. Cell Biol., **52**, 559 (1972).
6) **Paul, D. & Walter, S.** : J. Cell Biol., **85**, 113e (1974).
7) **Richardson, U. I., Tashjian A. H. & Levine, L. Jr** : J. Cell Biol., **40**, 236 (1969).
8) **Coon, H.** : J. Cell Biol., **39** 29a (1968).
9) **Odashima, S., Sturgess, J. M. & Rothstein, A.** : Cell and Tissue Res., **169**, 167 (1976).
10) **Higgins, G. M. & Anderson, R. M.** : Arch. Pathol., **12**, 186 (1931).
11) **Odashima, S. & Kita, Y.** : impreparation.
12) **Winzler, R. J. Harris, E. D. Pekas, D. J. Johnson, C. A. & Weber, P.** : Biochemistry, **6**, 2195 (1967).
13) 小泉岳夫，中村允人 ： ムコ多糖実験法〔II〕（吉沢・長谷川編）45頁，東京，南江堂，1973.
14) **Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.** : J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951).
15) **Burton, K** : Biochem. J. **62**, 315 (1956).
16) **Bitter, T., & Muir, H. M.** : Anal. Biochem., **4**, 330 (1962).
17) **Berry, M. N. & Friend, D. S.** : J. Cell Biol. **43**, 506 (1969).
18) **Takeda, S., Ichihara, A., Tanioka, H. & Inoue, H.** : J. Biol. Chem., **239**, 3590 (1964).
19) **Bissell, D. M., Hammaker, L. E. & Meyer U. A.** : J. Cell Biol. **59**, 722 (1973).
20) **Kaighan, M. E. & Prince A. M.** : Proc, Nat. Acard. Sic USA **68**, 2396 (1971).
21) **Kambara, T., Takagi, K. & Juono, T.** : Tohoku J. Exp. Med., **100**, 185 (1970).
22) **Lieberman, I., Abrams, R. Hunt, N. & Ove, P.** : J. Biol. Chem., **238**, 3955 (1963).
23) **Bullough, W. S. & Laurence, E. B.** : Cell Tissue Kinet., **1**, 5 (1968).
24) **Hondius-Boldingh, W. & Leurence, E. B.** : Europ. J. Biochem., **5**, 191 (1968).

写真説明

写真1．分散浮遊化した肝実質細胞

トリプシン処理法で分散浮遊化した肝実質細胞．60g，1分間の遠心で分画したために Kupffer 細胞など非実質性細胞はみとめられないが，1部に protuberance Formation がみとめられる．(位相差顕微鏡)

写真2．分散浮遊化細胞の primary culture 7日後のコロニー．

a： 肝実質細胞由来の上皮性細胞のコロニー形成：著明な核小体と微小顆粒の豊富な細胞質をもった上皮性細胞で，2核細胞もみられる．

b： 非増殖性肝実質細胞：培養初期には典型的な肝実質細胞の性質を示すが，時間の経過と共に細胞質の増大と核周辺に細胞顆果の集積がみられる．これらの細胞は増殖することはなく次第に変性する．矢印は変性過程の肝実質細胞である．

c： Origin 不明の細胞群：これらの細胞は培養初期には全くみとめられないが，培養7日目以後に観察されるようになる．これら細胞は肝細胞とは明らかに異なった形態学的特徴をもち，軽度の増殖性を示す．

写真3．Cutured Morris Hepatoma 細胞

a： 培養7日目の Morris Hepatoma 細胞

b： 同じ条件で培養し，3日目に細胞膜表層物質を添加し (200μg/ml)，4日後（培養7日目の Marris Hepatoma 細胞．著しい増殖阻止がみられるが細胞障害はみとめられない．

Abstract

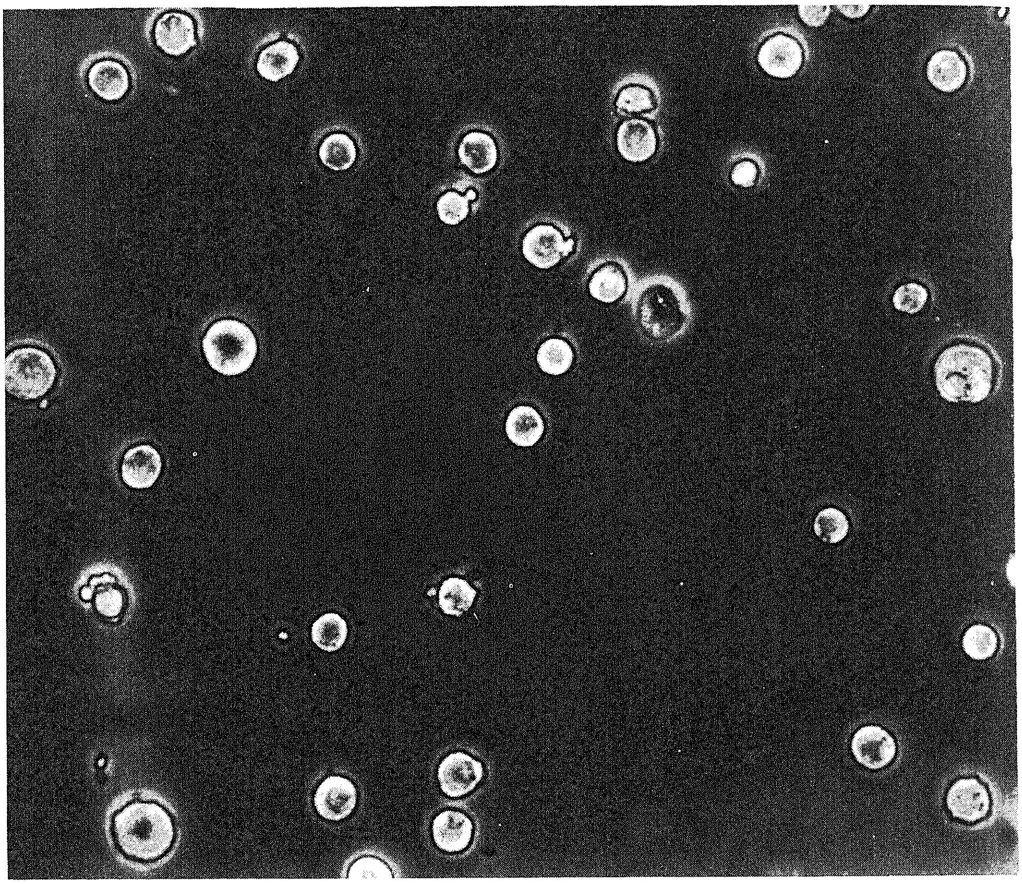
Comparative studies of isolation of the viable liver cells from adult rats and of their multiplication in *in vitro* culture were carried out. The results obtained were as follow:

1. Dispersion of the liver cells using chelating agents following perfusion of the livers with collagenase was found to cause severe liver cell damage, accompanied with poor harvest of the viable cells. When the cells were incubated in culture tubes in a conventional manner, they showed virtually no evidence of multiplication.

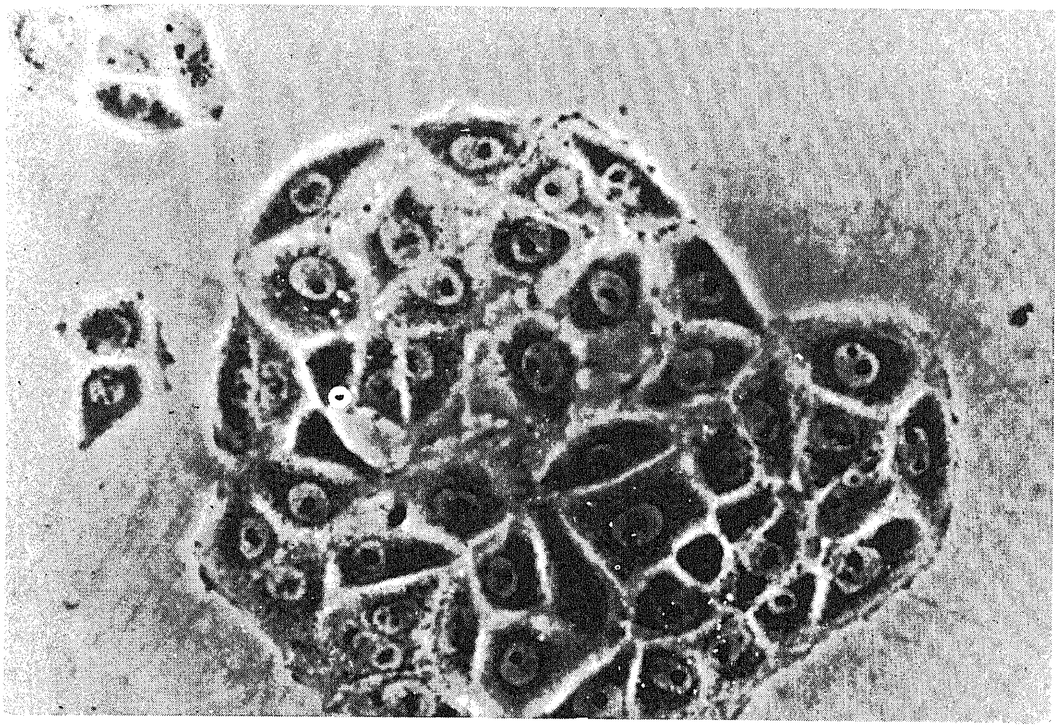
2. Dispersion of the cells, on the other hand, using trypsin or papain following the same perfusion of the livers yielded much better results for obtaining a number of the viable cells, as compared with those of the method mentioned above. The dispersed cells, when incubated similarly, revealed considerably stable viability for an appropriate time. Papain treatment of the cells offered three times more effectiveness to *in vitro* multiplication of the cells than trypsin treatment did.

3. Papain- or trypsin- dispersed cells from the livers which were perfused with collagenase 40 hours after partial hepatectomy showed approximately the same degree of proliferation in culture.

4. Surface substances which were presumed to be extracted from normal liver cell membranes with papain or trypsin treatment inhibited *in vitro* proliferation of Morris hepatoma cells being in a phase of logarithmic growth. The inhibition activity of the substances obtained by papain treatment were more higher than that by trypsin treatment. The substances, however, extracted in the same way from acetone powder of whole normal liver homogenates revealed a slight degree of inhibition. The biological and biochemical nature of the substance was discussed.



写 真 1

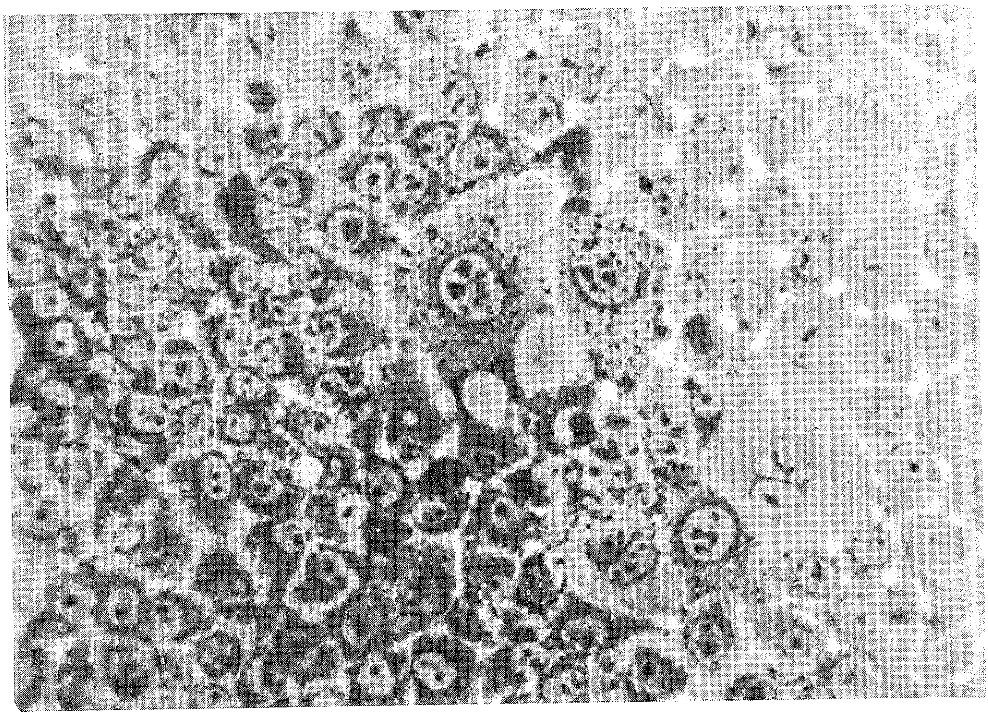


a

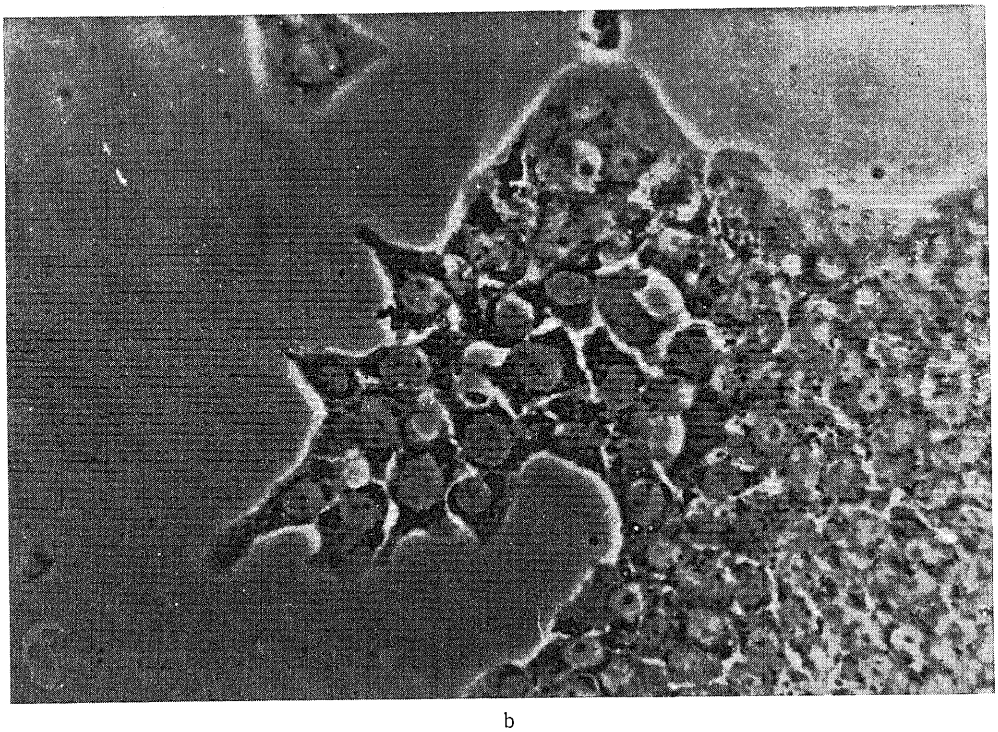
b

c

写 真 2



a



b

写 真 3