

成熟ラットと幼若ラットにおける再生肝動態の研究

金沢大学大学院医学研究科外科学第一講座(主任 卜部美代志教授)

小 島 道 久

(昭和43年3月29日受付)

肝の再生という概念は古くは Prometheus の神話のなかにその最初の姿をみだし得る。しかし、現在にも通じ得る肝再生という意味での最初の研究は1885～1886年に von Podwyssozki¹⁾ がラット、猫、モルモット、家兎においてその肝の小片を切除した研究に端を発する。

その後、約80年の間に幾多の研究がなされ、その研究方法も重量、mitosis をみる時代から ^{14}C - ^3H -thymidine, ^{14}C -orotic acid などの isotope を使用する現在の段階へと変化してきている。しかし、その研究集積にもかかわらず、肝再生の調節機構ということに関しては確たるものはなく、現在の状況は混沌としたものである^{2)~4)}。

とはいえ、その本流をなす理論は、血液、あるいは、肝組織中に肝再生に対する促進因子、あるいは、抑制因子をみいだそうとする方向である。そして、それらの研究結果を展望するに、肝 homogenate に関する研究よりも serum に関するものが多く、また、被投与動物をみると、再生肝ラットに対してよりも正常ラットに対して投与が行なわれている研究の方が多数をしめるのである。いいかえると、肝 homogenate を再生肝ラットに投与したものは少なく、さらに再生肝の homogenate を再生肝ラットに投与した研究は、僅かに Stich⁵⁾ の報告においてみとめられるのみである。

一方、肝再生の研究のほとんど大部分は、成熟ラットによって行なわれ、幼若ラットの再生肝をその研究対象としたものは少ない。がんらい成熟ラットの諸臓器の発育に比較して幼若ラットのそれがより旺盛なる発育をしているであろうことは想像に難くなく、いわんやその幼若ラットの再生肝であれば、かなり特徴的な動態を呈しているであろうことは考え得るところである。

本研究は幼若ラット再生肝の動態を核酸の前駆物質

である ^{14}C -orotic acid を投与することにより生化学的に検索し、成熟ラット再生肝との間の相違を明確にするとともに、それぞれに actinomycin D および mitomycin C を投与し、その感受性の態度を検討し、さらに幼若ラット再生肝 homogenate を成熟再生肝ラットに投与し、その肝再生動態の変化を追求し、再生肝調節機構解明へのアプローチを意図する目的で行なったものである。

研究 方 法

I. ラットの飼育状況および年令的区分

Wistar 系ラットの雌を主体にして約700匹を使用した。飼料としては、オリエンタル繁殖用固形飼料と水を ad libitum に与え、週2～3回のわりで野菜を投与した。

雌雄の交配は ♂:♀=3:7 のわりで飼育し、妊娠1.5～2.0週に繁殖用ケージに独立させ、分娩後約3.5～4.0週で親子を分離した。

ラットの区分は、雌を主体とし、体重 90 ± 20 gm. (生後4.0～5.5週) のラットを幼若ラットとし、体重 210 ± 30 gm. (♀で8週以上、♂で6.5週) のラットを成熟ラットとした(図1)。

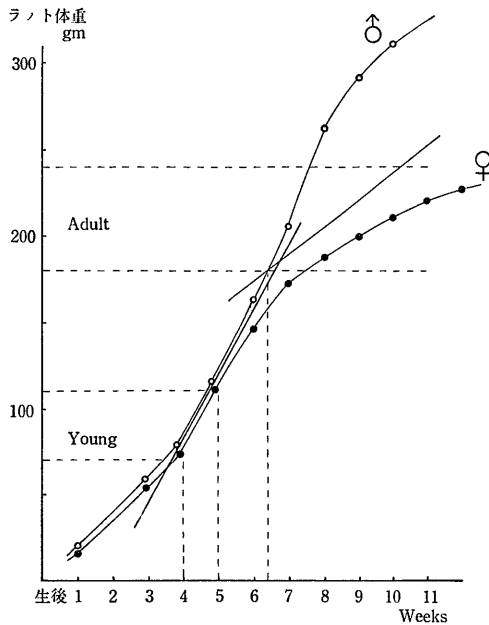
II. 肝切除法

術前とくに節食をさせず、肝切除は Higgins & Anderson⁶⁾ の方法に準じた。なお、そのさい、剣状突起の一部を切除した。麻酔には ether の開放点滴を用い、左右中葉および左外葉を切除した(切除率約65%～75%)。術後とくに抗生物質は homogenate 投与時以外には使用しなかった。術後ただちに水を、さらに、3時間後より固形飼料を、ad libitum に与えた。再生肝は diurnal²⁷⁾ な変化をしめすので、測定時間が p.m. 6:00～p.m. 9:00 になるように肝切除を行なった。

III. 肝重量の測定および表記法

Studies of Regeneration of Liver in Adult and Young Rats. Michihisa Kojima, Department of Surgery (I) (Director: Prof. M. Urabe), School of Medicine, Kanazawa University.

図1 正常ラットの発育曲線



再生肝を摘出する場合、etherで軽麻酔ののち、decapitationにより瀉血をし、cold生理食塩水をラットの体重に応じて0.5~1.0 ccを腸間膜静脈より注入し、肝のbloodを洗い出した。そのwet liver重量を測定し、次の二つを再生肝指数とした。

$$\frac{\text{再生肝 wet 重量}}{\text{ラット体重}} \times 100 = \text{比体重再生肝指数}$$

$$\frac{\text{再生肝 wet 重量}}{\text{切除肝 wet 重量}} = \text{比切除肝再生肝指数}$$

IV. 核酸代謝の測定法

specific activity 30.0 mC/mM の 6-¹⁴C-orotic acid (第一化学薬品 K.K.) を生理食塩水に溶解し、1μC/ラット体重 100 gm を肝摘出2時間前に経腹腔的に投与した。

摘出された肝組織は、Schneider法により、ribose nucleic acid (RNA) および deoxyribonucleic acid (DNA) に分離抽出された。そのRNAとDNAの比色定量は、RNAはorcinol reaction, DNAはdiphenylamine reactionにより行なわれた。

count測定は2π gas flow counter, Model PR-123 (Kobekogyo)により3分間の測定を行ない、back groundを補正ののちcpmを算出した。

表記法としてRNA, DNAのそれぞれにおいて、cpm/mg=specific activity (s.a.), および、総肝RNA当りのcpm, 総肝DNA当りのcpmを算出した。

V. 抗癌剤の投与方法

抗癌剤として、actinomycin D (LYOVAC, CO-SMEGEN) (Merck Sharp & Dohme, Division of Merck & Co., U.S.A.) および MT-C (マイトマイシン協和s) (協和醸酵工業 K.K., 東京) を使用した。

投与は経腹腔的に行なわれ、使用量として actinomycin D が 0.1 mg/kg および 0.05 mg/kg を、MT-C が 2.0 mg/kg および 1.0 mg/kg をすべて1回のみ投与された。

投与時期として、actinomycin D は、成熟ラット、幼若ラットに同じく肝切2時間後に投与され、MT-C (MMC) は、幼若ラットには肝切3時間後、成熟ラットには肝切5時間後に投与された。

VI. 肝 homogenate の作製法

donorとなるラットをetherで軽麻酔したのち、decapitationにより瀉血をし、腸間膜静脈より、ラットの体重に応じてラット1匹当たり0.5~1.0 ccのcold生理食塩水を注入し、肝のbloodを洗ったのち、滅菌的操作により肝摘出を行なった。摘出肝より、Takagi, Hecht & Potterの法により、細胞質成分の分画および核成分の分画を抽出した。この際、それぞれの分画の2.0 ccに肝実質の1.0 gmが含まれるように調整した。

分画はいずれも経腹腔的に投与され、その際、注入1回当たり5 mgの tetracycline を使用した。

研究成績

I. 正常肝についての成績

正常ラットの体重は、図1で示されるごとく、単位期間の増加率が幼若ラットにおいて大である。また、ラット体重当りの肝wet重量を検索したところ、体重当りの肝重量の増加は、成熟ラット、幼若ラットにおいてともに同一の傾向を示している(図2)。

従って、この二つの事実より、成熟ラットの正常肝発育よりも幼若ラットのそれが急速に進行していると結論される。

核酸代謝の差異を検索する目的で、成熟ラットと幼若ラットとの正常肝について、経腹腔的に6-¹⁴C-orotic acidを投与した後に、それぞれのRNAおよびDNAへのとり込みを観察した。しかし、平均値は幼若ラット再生肝においてやや高いが、有意の差とはみとめ難い(0.3>p>0.2), (表1)。

II. 再生肝についての成績

成熟ラット、幼若ラットに同じく肝部分切除(切除率65~75%)を行ない、その結果として起る急激なる

図2 成熟ラットと幼若ラットの正常肝重量の比較

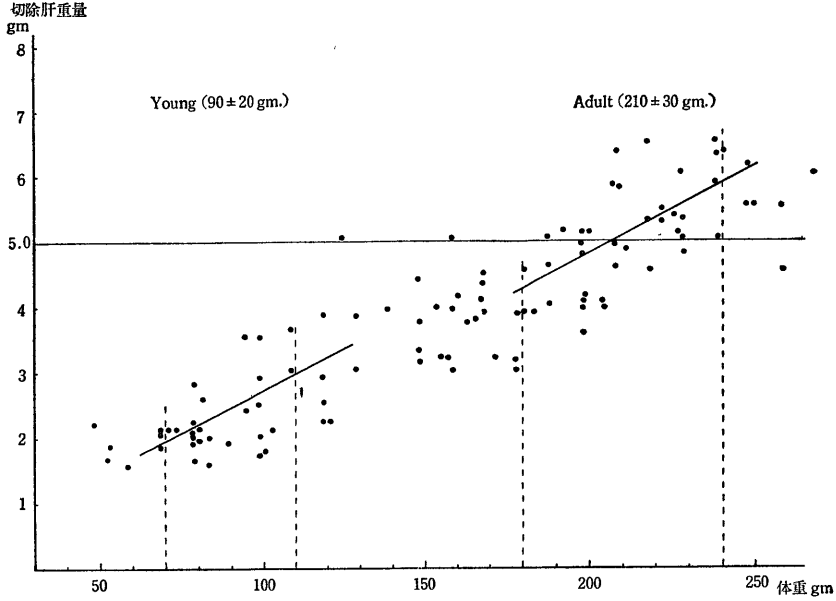


表1 正常成熟ラットおよび幼若ラットの肝指数および核酸代謝

ラット	ラット数	体重 (gm.)	肝重量* (gm.)	肝指数 (比体重)	RNA			DNA		
					mg	cpm	s. a.	mg	cpm	s. a.
成熟ラット	5	240	7.95	3.31	0.876	649	742	0.443	53	120
幼若ラット	5	92	4.14	4.50	0.814	620	762	0.472	60	127

* 肝重量は全肝の重量である。

表2 成熟ラット再生肝の肝指数の経時的変化

肝切除後 hr.	ラット数	体重 (gm.)	肝重量 (gm.)		再生肝指数	
			切除肝	再生肝	比体重	比切除肝
4	6	233.1	5.0	2.96	1.25	0.583
7	5	230.6	5.5	3.50	1.47	0.630
10	5	223.0	5.4	3.48	1.50	0.623
15	5	210.3	5.9	3.48	1.43	0.513
18	5	225.6	5.5	3.51	1.36	0.55
20	5	240.0	6.0	3.71	1.94	0.74
24	9	198.6	5.1	3.67	1.96	0.77
27	5	220.3	4.8	3.70	1.88	0.81
30	8	205.1	5.2	3.98	1.89	0.86
33	17	230.3	5.0	4.38	1.89	0.90
36	16	230.0	4.6	4.41	2.00	0.96
40	5	185.5	4.2	4.50	2.42	1.10
45	5	237.7	4.6	4.70	1.98	1.11
48	5	237.8	4.3	4.76	1.99	1.09

表4 幼若ラット再生肝の肝指数の経時的変化

肝切除後 hr.	ラット数	体重 (gm.)	肝重量 (gm.)		再生肝指数	
			切除肝	再生肝	比体重	比切除肝
4	5	90.1	2.60	1.71	1.89	0.66
7	8	90.6	2.02	2.03	2.22	0.64
10	9	90.7	2.74	2.04	2.10	0.72
15	5	110.0	3.1	2.11	2.54	0.68
18	9	110.0	2.9	2.12	1.98	0.76
20	11	110.2	3.0	2.36	2.23	0.786
24	6	92.6	2.55	2.41	2.65	0.85
26	5	92.1	2.88	2.42	2.63	0.84
30	5	101.3	2.86	2.43	2.36	0.86
35	5	110.1	3.31	3.37	3.05	1.01
40	4	110.3	3.65	3.90	3.54	1.07

肝再生の動態を、その再生肝 wet 重量および $6\text{-}^{14}\text{C}$ -orotic acid の核酸へのとり込みを指標として検討した。

1. 再生肝重量の推移

再生肝 wet 重量および再生肝指数（比切除肝）により、成熟ラットおよび幼若ラットの再生肝を観察すると、部分切除後残存肝の回復過程が、幼若ラットにおいて急速であることがみとめられた（表2, 4）(図3, 4)。

2. 再生肝への $6\text{-}^{14}\text{C}$ -orotic acid のとり込み

肝部分切除術施行のラットに、その測定時間の2時間前に $6\text{-}^{14}\text{C}$ -orotic acid を $1\mu\text{C}/\text{体重}100\text{ gm}$ になるように経腹腔的に投与し、再生肝の RNA および DNA へのとり込みを経時的に観察した。

その結果、成熟ラットと幼若ラットの間にはかなりきわだった相違があることがみとめられた（表3, 5）(図5, 6)。

まず、RNA に関しては、そのとり込み曲線の pattern が異なり、同時にその peak に時間差がみとめられた。すなわち、幼若ラットにおいては、peak が

図3 成熟ラットと幼若ラットの再生肝重量の比較（肝切除後経時変化）

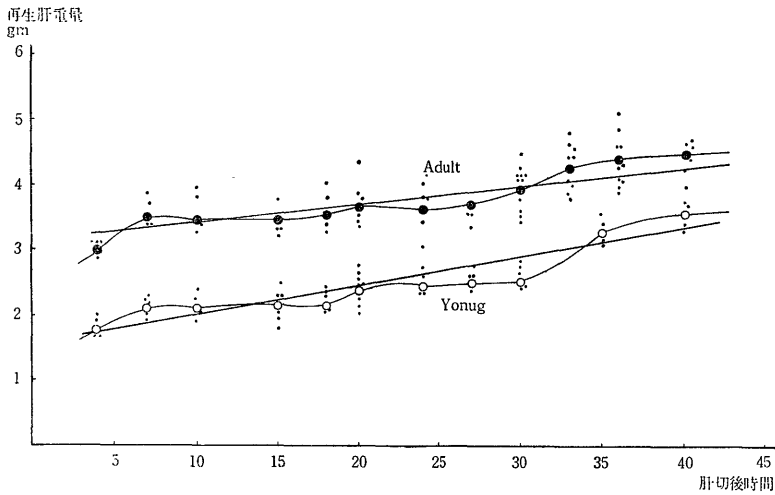
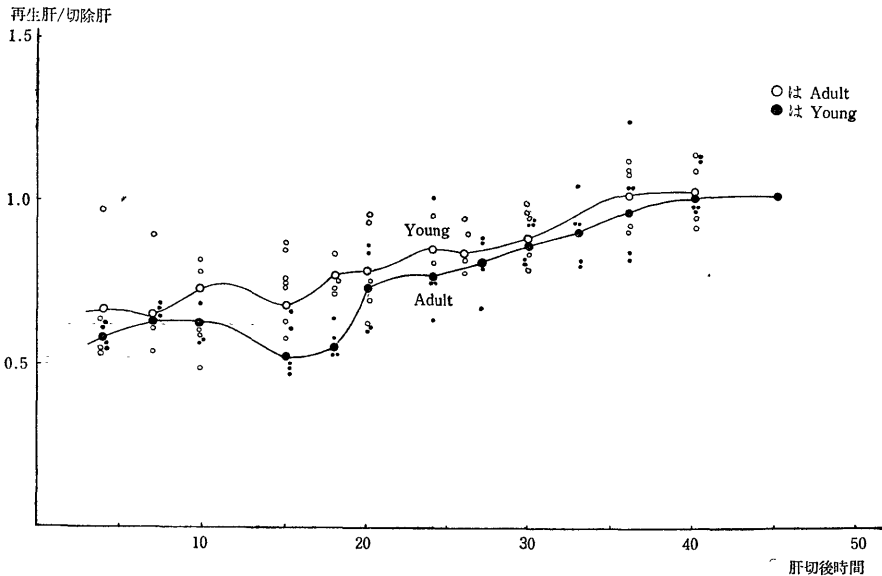


図4 成熟ラットと幼若ラットの再生肝重量の比較（比切除肝指数）



肝切除後6~10時間でみとめられ、全体として、ゆるやかな3峰性の曲線を示すのに対し、成熟ラットにおいては、peakが10~12時間にあり、曲線の3峰性が明確にみとめられないことである。

この傾向は、DNAについてもみとめられ、幼若ラットではpeakを19~21時間にみとめ、はっきりとした2峰性の曲線を示すが、成熟ラットではpeakが33~36時間にあり、2峰性を示さない。

この事実は、いずれも、幼若ラットの再生肝核酸代謝が急速に開始され、しかもその反応形態がsharpであることを示している。

3. 再生肝に対する抗癌剤の影響

上述の実験により、成熟ラット再生肝組織と幼若ラット再生肝組織の間には発育ならびに代謝において明確なる相違が存在することが明らかになったが、著者

は、さらにこの両者に actinomycin D および mitomycin C を負荷し、その反応動態の差異を検討した。

薬剤は、いずれも経腹腔的に投与され、投与量として、actinomycin D は 0.1 mg/kg および 0.05 mg/kg を、mitomycin C は 2.0 mg/kg および 1.0 mg/kg を用い、すべて1回投与が行なわれた。

投与時間については、さきの実験で得られた再生肝の経時的動態を考慮し、actinomycin D は、再生肝 RNA 代謝の下降と再生肝 DNA 代謝の上昇が重映する時間にむけて与えられ、また、mitomycin C は再生肝 DNA 代謝の peak の時にむけて与えられた。すなわち、actinomycin D は、幼若ラットの肝切除後2時間に投与され、肝切除15時間での測定が行なわれ、成熟ラットでは、肝切除後2時間に投与され、

図5 成熟ラットと幼若ラットの再生肝 RAN 代謝の比較

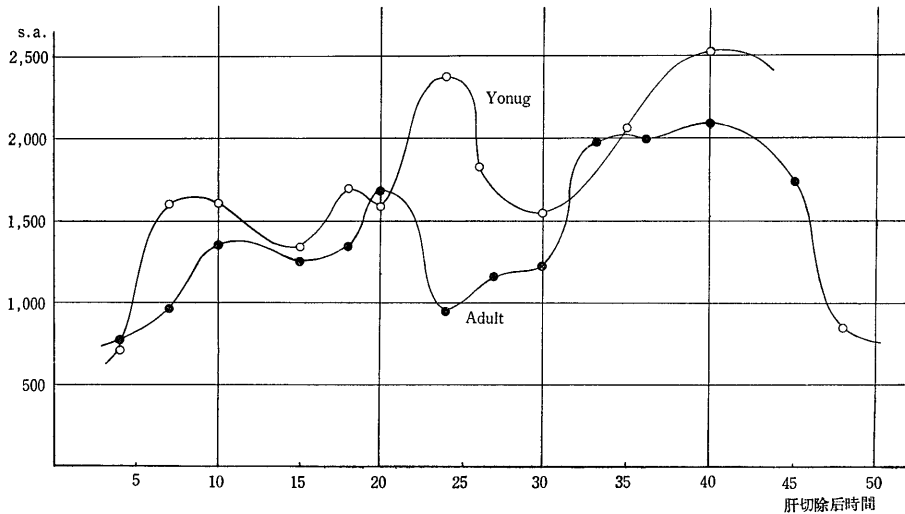
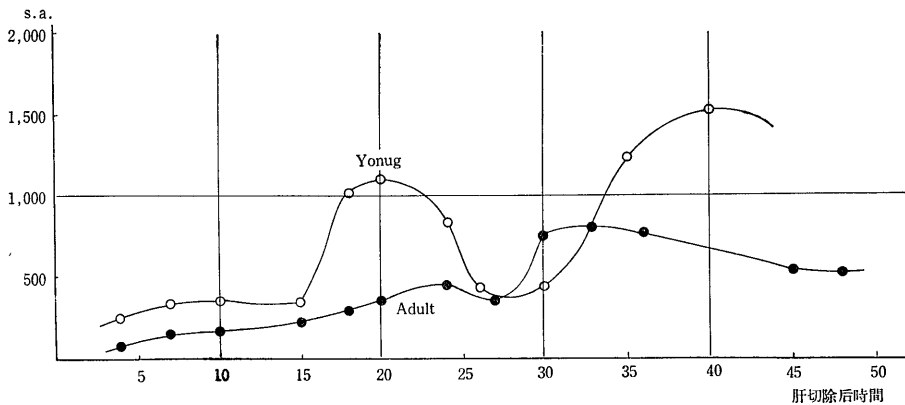


図6 成熟ラットと幼若ラットの再生肝 DNA 代謝の比較



24時間での測定が行なわれた。一方, mitomycin C は, 幼若ラットで肝切後3時間に投与され, 18時間での測定が行なわれ, 成熟ラットでは肝切後5時間で投与され, 30時間での測定が行なわれた。

その結果, actinomycin D は再生肝の RNA 代謝を, 成熟ラット, 幼若ラットの双方において阻害し, 再生肝の DNA 代謝を軽度障害することがみとめられた。この再生肝 RNA 阻害度は成熟ラットにおいてより (対照群の 56.8% の cpm) 幼若ラットにおいて強い傾向を示し (48.3%), 再生肝 DNA 代謝の阻害度も同様の傾向を (成熟ラット 103.0%, 幼若ラット 60.1%) 示した (表 6, 8)(図 7)。

mitomycin C も両ラット群において, 再生肝 RNA 代謝および再生肝 DNA 代謝を阻害し, actinomycin D の場合と同様に, その再生肝 RNA 代謝阻害は成熟ラットにおけるより (対照群の 83.6% の cpm) 幼若ラットにおいて強く (72.1%), また, 再生肝 DNA 代謝の阻害も同様の型を (成熟ラット 64.2%, 幼若ラット 46.1%) 示した (表 7, 9)(図 8)。

すなわち再生肝の核酸代謝に関して, 両薬剤に対する感受性は, ともに幼若ラットにおいて強くあらわれたわけである。また, この両薬剤のいずれの再生肝核酸代謝への阻害度も, その薬剤の投与量に平行する傾向を示した。

表 3 成熟ラット再生肝の核酸代謝における経時的変化

肝切後 hr.	DNA				RNA			
	mg	cpm	s. a.	総肝 DNA 当りのcpm	mg	cpm	s. a.	総肝 RNA 当りのcpm
4	0.415	34	83	540	1.434	1,030	754	22,981
7	0.362	56	140	1,076	1.181	1,165	988	29,014
10	0.371	59	161	1,127	1.201	1,658	1,372	45,971
15	0.402	96	219	1,620	1.355	1,719	1,268	41,325
18	0.321	95	296	1,620	1.137	1,571	1,385	38,411
20	0.237	88	371	2,220	1.181	2,035	1,720	65,216
24	0.248	114	457	2,032	1.224	1,156	956	29,454
27	0.230	78	338	1,964	1.210	1,406	1,160	39,861
30	0.387	291	766	5,580	1.457	1,705	1,205	57,316
33	0.333	263	790	7,361	1.131	2,347	2,095	96,514
36	0.389	306	787	8,745	0.956	1,954	2,061	75,013
40	0.318	246.5	723	5,370	1.023	2,754	2,134	87,912
45	0.172	92.3	537	2,641	0.849	1,381	1,764	50,813
48	0.252	132.1	512	3,864	0.892	684	864	28,713

表 5 幼若ラット再生肝の核酸代謝における経時的変化

肝切後 hr.	DNA				RNA			
	mg	cpm	s. a.	総肝 DNA 当りのcpm	mg	cpm	s. a.	総肝 RNA 当りのcpm
4	0.276	71	250	712	0.440	594	733	783
7	0.236	78	330	810	0.718	1,168	1,627	12,315
10	0.298	101	350	1,213	0.543	1,685	1,662	23,512
15	0.385	111	348	1,596	1.010	1,188	1,360	28,208
18	0.265	275	1,038	3,150	1.006	1,727	1,715	28,351
20	0.244	295	1,130	4,132	1.269	2,073	1,630	46,300
24	0.2815	238	840	3,205	1.078	2,081	2,401	39,300
26	0.435	156	359	1,189	0.656	1,196	1,824	13,014
30	0.2426	106	437	1,424	1.137	1,774	1,560	34,057
35	0.2621	332	1,265	6,235	1.206	2,518	2,085	67,601
40	0.3180	492	1,545	10,742	1.321	3,511	2,655	109,512

4. 再生肝に対する同種肝 homogenate の効果

著者は、上述の研究により、幼若ラット再生肝の代謝活性が大であることを確認したので、幼若ラットの肝 homogenate を成熟ラットに投与し、その肝再生動態がいかなる変化を示すかについて検索した。

なお、この種の実験においては、その時間的因子をおろそかにしないことが肝要であり、その点に関して留意した。

1) 再生肝におよぼす幼若肝および成熟肝 homogenate の効果、とくに、homogenate 採取時間による変化

まず、幼若正常肝の homogenate を成熟ラットの肝切除後6時間に投与すると、その肝切除後33時間の再生肝（以下、とくに明記しない場合は、いずれも肝切除後33時間の成熟ラット再生肝を指す。）の核酸代謝は軽度抑制された ($0.2 > p > 0.1$)。しかし、成熟ラット

表6 ラット再生肝におよぼす actinomycin D の影響

ラ ッ ト	act. D 量	ラ ッ ト 数	体 重 (gm.)	肝 重 量 (gm.)		再 生 肝 指 数	
				切 除 肝	再 生 肝	比 体 重	比 切 除 肝
成 熟 ラ ッ ト	0.1 mg/kg	5	169.5	4.32	3.39	2.00	0.79
	0.05 mg/kg	5	164.5	4.16	3.40	2.07	0.82
	対 照 群	4	162.0	4.10	3.17	1.96	0.77
幼 若 ラ ッ ト	0.1 mg/kg	5	100.0	2.08	1.68	1.28	0.68
	0.05 mg/kg	5	97.0	2.86	1.68	1.60	0.55
	対 照 群	5	110.0	3.10	2.61	2.54	0.82

表8 ラット再生肝におよぼす MMC の影響

ラ ッ ト	MMC 量	ラ ッ ト 数	体 重 (gm.)	肝 重 量 (gm.)		再 生 肝 指 数	
				切 除 肝	再 生 肝	比 体 重	比 切 除 肝
成 熟 ラ ッ ト	2 mg/kg	5	198.3	4.6	3.21	1.53	0.70
	1 mg/kg	4	202.2	4.9	3.34	1.68	0.68
	対 照 群	5	189.0	4.1	3.56	1.84	0.90
幼 若 ラ ッ ト	2 mg/kg	5	110.0	2.8	1.81	1.82	0.65
	1 mg/kg	5	105.0	2.8	1.90	1.90	0.66
	対 照 群	5	110.0	2.9	1.88	1.87	0.66

図7 成熟ラットと幼若ラットとの再生肝 RNA, DNA におよぼす actinomycin D の影響 (0.1 mg/kg おおび 0.05 mg/投与)

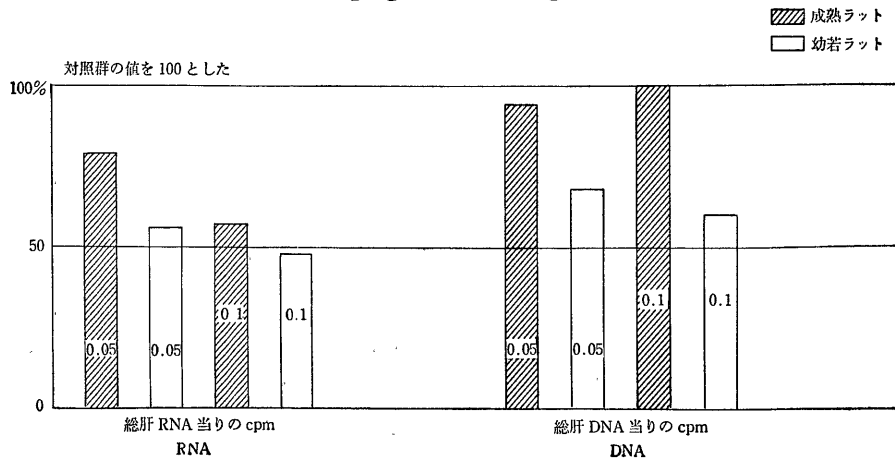


表7 ラット再生肝の核酸代謝におよぼす actinomycin D の影響

ラット	act. D 量	RNA			DNA				
		mg	cpm	s. a. (%)*	総肝 RNA 当りのcpm	mg	cpm	s. a. (%)	総肝 DNA 当りのcpm
成熟ラット	0.1 mg/kg	1.225	596	508 (53.2)	16,694 (56.8)	0.314	101	340 (75.1)	2,086 (103.0)
	0.05 mg/kg	1.303	846	655 (69.0)	23,340 (79.0)	0.338	121	382 (83.2)	1,913 (94.3)
	対照群	1.224	1,156	956	29,454	0.248	114	457	2,032
幼若ラット	0.1 mg/kg	0.875	807	922 (67.8)	13,610 (48.3)	0.290	82	282 (81.1)	964 (60.1)
	0.05 mg/kg	0.965	1,254	1,257 (92.0)	15,626 (55.3)	0.331	125	347 (100.0)	1,088 (68.6)
	対照群	1.010	1,188	1,360	28,208	0.385	111	348	1,596

* (%) は、対照群に対する百分率である。

表9 ラット再生肝の核酸代謝におよぼす MMC の影響

ラット	MMC 量	RNA			DNA				
		mg	cpm	s. a. (%)*	総肝 RNA 当りのcpm	mg	cpm	s. a. (%)	総肝 DNA 当りのcpm
成熟ラット	2 mg/kg	1.444	1,244	979 (93.0)	29,933 (83.6)	0.383	141	552 (72.1)	3,590 (64.2)
	1 mg/kg	1.112	1,113	1,020 (97.1)	30,050 (84.8)	0.371	167	699 (91.5)	4,815 (81.3)
	対照群	1.254	1,293	1,053	35,800	0.387	291	766	5,580
幼若ラット	2 mg/kg	1.124	1,428	1,273 (74.3)	20,400 (72.1)	0.264	146	552 (53.1)	780 (46.1)
	1 mg/kg	1.334	1,278	1,046 (61.0)	21,215 (75.5)	0.300	193	651 (63.0)	1,072 (64.3)
	対照群	1,006	1,727	1,715	28,351	0.265	275	1,038	3,150

* (%) は、対照群に対する百分率である

正常肝の homogenate を与えた場合には、とくに変化を示さなかった。

ついで、肝 homogenate の再生肝核酸代謝に対する抑制作用を解析するために、肝切除後種々の時間でその再生肝を摘出し、その homogenate を成熟ラット肝切除後の6時間で投与し、再生肝核酸代謝 (6- C^{14} -urotic acid のとり込みを s.a. で示す) の変化を追求めた。なお、この際、成熟ラット肝切除後6時間に再生肝 homogenate の代わりに抗生物質混和生理食塩水 (2.0 cc) を投与し、その際の再生肝核酸代謝を検し対照とした (表10, 11, 12, 13.) (図9)。

i) 初期再生肝 homogenate の効果

幼若ラット肝切除後5時間の再生肝の homogenate を成熟ラット肝切除後6時間で投与するに、再生肝 DNA 代謝は s.a. 712.3 である。対照群の DNA 代謝は s.a. 790 である。従って軽度の抑制効果が示され、これは幼若正常肝 homogenate の抑制力に近いものである。

成熟ラット肝切除後6時間の再生肝 homogenate を注入した場合、recipient 再生肝の DNA の s.a. は 756 であった。従って、ラット再生肝初期のもの homogenate による抑制力は、成熟ラットのものよりも幼若ラットのものの方が大であった。

ii) 中期再生肝 homogenate の効果

幼若ラット肝切除後12時間の再生肝 homogenate を投与すると、投与されたラット再生肝の DNA の s.a. は 654 である。この場合の抑制は初期再生肝 homogenate による抑制より強い。

iii) 極期再生肝 homogenate の効果

幼若ラットの肝切除後19時間の再生肝は、その DNA 合成において、最大の peak を示している。この時の再生肝 homogenate を成熟ラット肝切除後に与えると、その再生肝の DNA の s.a. 626 である。従って、この場合抑制力は前2回の場合に比べ最大であった ($p < 0.05$)。

このもっとも強い核酸代謝抑制力を示す homogenate を用い、その homogenate 投与量および recipient 側の再生肝の時間的差異による変化を観察した。すなわち、幼若ラット肝切除20時間後の再生肝の homogenate (1.0 cc および 2.0 cc) および幼若ラット正常肝 homogenate (2.0 cc) を、成熟ラットの肝切除後6時間で投与し、肝切除後27, 30, 33, 36時間における再生肝の核酸代謝および再生肝指数を観察したのである。その結果、それらの抑制に対して最も強く反応するのは recipient ラットの肝切除後33時間であり、ついで36, 30時間の順であった。従って、この種の homogenate 効果を検する実験では、recipient ラットの、肝切除後33時間の再生肝を検索対象とすべきである。

また、homogenate の投与量を変えて再生肝の核酸代謝抑制度を検索すると、その投与量に平行して抑制力が増強することをみとめた。すなわち、recipient ラット再生肝 DNA の s.a. は、肝切除30, 33, 36時間の検索において、2 cc 投与群ではそれぞれ 599, 626, 612 であり、1 cc 投与群ではそれぞれ 779, 734, 751 であった。

なお、この傾向は肝指数においてもみとめられ、recipient ラット再生肝指数 (比切除肝) は、肝切除

図8 成熟ラットと幼若ラットの再生肝 RNA, DNA 代謝におよぼす MMC の影響 (2 mg/kg および 1 mg/kg 投与)

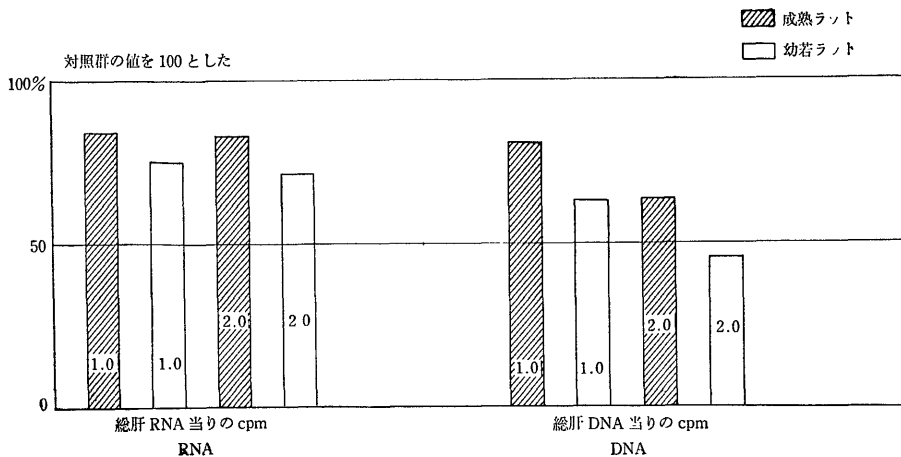


図9 再生肝核酸代謝におよぼす幼若ラット肝 homogenate の効果
(幼若ラット肝 homo. 採取時間による変化)

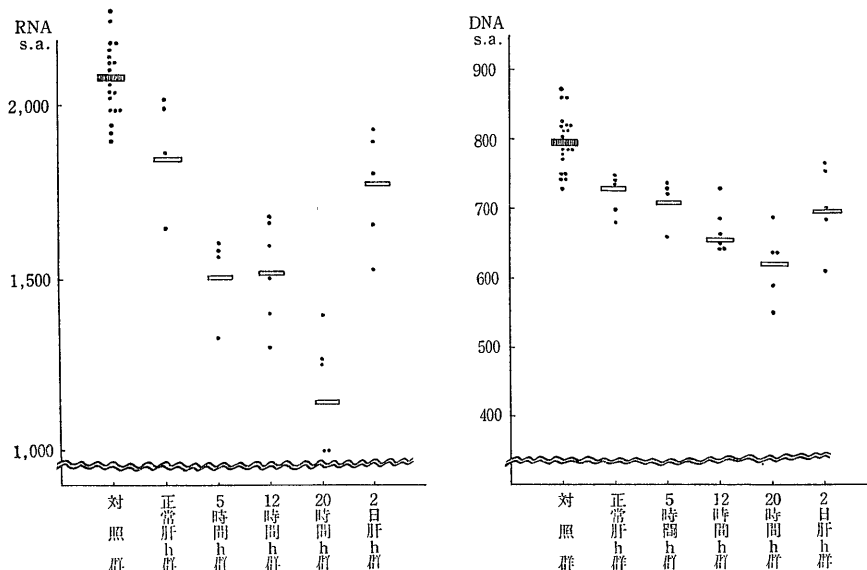


表10 再生肝におよぼす幼若ラット肝 homogenate の効果
(幼若ラット肝 homo. 採取時間による変化)

donor 肝切後時間	recipient ラット数	体 重 (gm.)	肝 重 量 (gm.)		再 生 肝 指 数	
			切 除 肝	再 生 肝	比 体 重	比 切 除 肝
正 常 肝	5	203	5.3	5.0	1.93	0.75
再 生 肝 5時間後	4	240	5.3	4.9	2.04	0.90
12時間後	6	235	6.37	5.63	2.23	1.14
20時間後	5	213	5.8	4.8	2.26	0.835
48時間後	5	206.7	4.7	4.0	1.95	0.869
対 照	17	230.3	5.0	4.38	1.89	0.90

表11 再生肝核酸代謝におよぼす幼若ラット肝 homogenate の効果
(幼若ラット肝 homo. 採取時間による変化)

donor 肝切後時間	RNA				DNA			
	mg	cpm	s. a.	総 肝 RNA 当りの cpm	mg	cpm	s. a.	総 肝 DNA 当りの cpm
正 常 肝	0.883	1,627	1,863	73,251	0,257	189	733	8,510
再 生 肝 5時間後	1.304	1,850	1,505	70,831	0.326	222	712.3	5,103
12時間後	1.387	2,090	1,497	83,124	0.343	224	654	6,951
20時間後	1.101	1,252	1,143	44,598	0.262	164	626	4,105
48時間後	1.341	2,391	1,782	77,211	0.381	258	694	8,401
対 照	1.131	2,347	2,095	96,514	0.333	263	790	7,361

表12 再生肝におよぼす幼若ラット肝 homogenate の効果

recipient 肝切除後 hr.	donor homo. 肝	homo. 量 (cc)	recipient ラット数	体 重 (gm.)	肝重量 (gm.)		再生肝指数	
					切除肝	再生肝	比体重	比切除肝
27	正 常 肝	2.0	5	219.1	4.65	3.67	1.67	0.790
	再 生 肝	1.0 2.0	5 5	200 202	4.5 4.3	3.5 3.5	1.25 1.24	0.792 0.837
30	正 常 肝	2.0	4	220	4.8	4.1	1.92	0.812
	再 生 肝	1.0 2.0	5 5	206 220.5	4.6 5.0	3.7 4.1	1.86 1.82	0.815 0.756
33	正 常 肝	2.0	5	203	5.3	5.0	1.93	0.75
	再 生 肝	1.0 2.0	5 5	225 213	5.9 5.8	5.1 4.8	2.24 2.26	0.848 0.835
36	正 常 肝	2.0	5	230.1	5.1	4.71	2.03	0.923
	再 生 肝	1.0 2.0	5 5	225.1 220.9	5.0 4.9	4.50 4.25	2.00 1.92	0.901 0.867

表13 再生肝の核酸代謝におよぼす幼若ラット肝 homogenate の効果

recipient 肝切除後 hr.	donor homo. 肝	homo. 量 (cc)	RNA				DNA			
			mg	cpm	s. a.	総肝 RNA 当りの cpm	mg	cpm	s. a.	総肝 DNA 当りの cpm
27	正 常 肝	2.0	1.162	1,326	1,141	37,567	0.216	78	359	1,905
	再 生 肝	1.0 2.0	1.516 1.417	1,384 1,259	961 1,121	42,101 39,215	0.202 0.213	95 97.3	476 458	1,858 1,807
30	正 常 肝	2.0	0.996	1,100	1,083	35,516	0.195	150	771	3,440
	再 生 肝	1.0 2.0	1.554 1.570	1,917 1,571	1,213 1,324	45,813 61,416	0.280 0.259	200.4 167.4	779 599	4,160 4,002
33	正 常 肝	2.0	0.883	1,627	1,863	73,251	0.257	189	733	8,510
	再 生 肝	1.0 2.0	1.031 1.101	1,153 1,252	1,129 1,143	51,862 44,598	0.245 0.262	197 164	734 626	6,862 4,105
36	正 常 肝	2.0	1.271	2,134	1,671	85,325	0.381	291	763	8,156
	再 生 肝	1.0 2.0	1.423 1.401	1,864 1,579	1,315 1,265	74,616 63,235	0.371 0.320	281 196	751 612	7,654 6,289

30, 33, 36時間の検索において, 2cc 投与群ではそれぞれ 0.756, 0.835, 0.867 であり, 1cc 投与群ではそれぞれ 0.815, 0.848, 0.901 であった (表14, 15) (図10).

一方, 成熟ラットの再生極期である肝切除後33時間における再生肝の homogenate を投与すると, 幼若ラット再生極期肝 homogenate を投与した場合と同じく, 成熟ラット再生肝 homogenate 投与例のうちで最も強い再生肝抑制効果を示した. 成熟ラット肝切除後33時間の再生肝 homogenate を与えた場合, re-

ipient 再生肝 DNA の s.a. は 701 (対照である, 抗生物質混和生理食塩水を投与された再生肝 DNA の s.a. は 790) であった.

したがって, 成熟ラット再生極期の肝 homogenate の抑制力は, 幼若ラット再生極期の肝 homogenate の抑制力 (recipient 再生肝 DNA の s.a. 694) より小である.

iv) 後期再生肝 homogenate の投与

肝切除48時間を経過した再生肝は, かなり at rest に近い活性状態になるのであるが, 幼若ラット肝切除

図10 再生肝の核酸代謝におよぼす幼若ラット肝 homogenate の効果

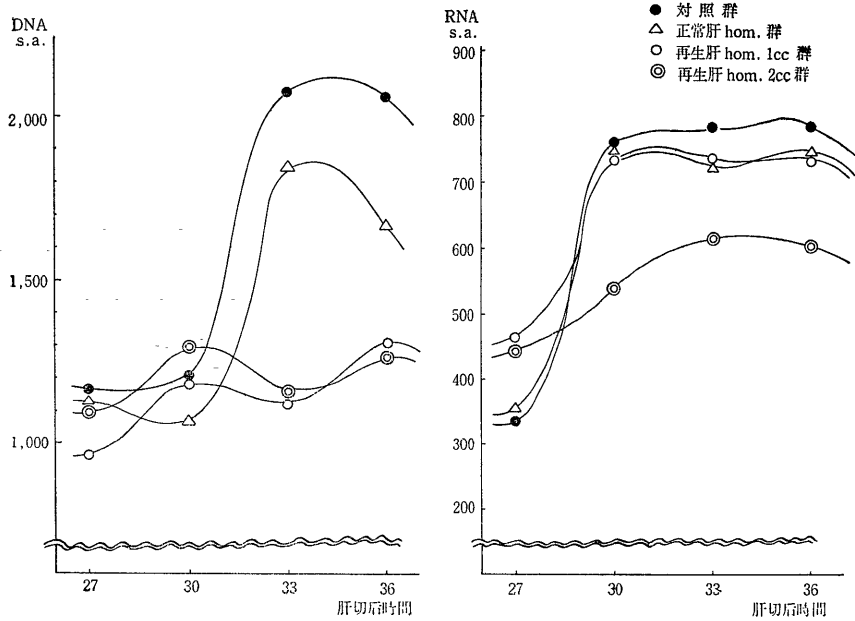


表14 再生肝におよぼす成熟ラット肝 homogenate の効果 (homogenate 採取時間による変化)

homogenate 採取時 donor 肝切後時間	homo. 量 (cc)	recipient ラット数	体 重 (gm.)	肝重量 (gm.)		再生肝指数	
				切除肝	再生肝	比体重	比切除肝
正 常 肝	2.0	5	180	3.65	3.65	2.03	1.00
肝切後 6時間	2.0	5	230	4.81	4.23	1.84	0.87
33時間	2.0	5	223	4.44	4.05	1.82	0.90
48時間	2.0	5	212	4.38	4.03	1.90	0.92
対 照		17	200.6	5.0	4.38	2.22	0.90

表15 再生肝核酸代謝におよぼす成熟ラット肝 homogenate の効果 (homogenate 採取時間による変化)

homo. 採取時 dohor 肝切後時間	homo. 量 (cc)	RNA				DNA			
		mg	cpm	s. a.	総肝 RNA 当りのcpm	mg	cpm	s. a.	総肝 DNA 当りのcpm
正 常 肝	2.0	1.321	2,736	2,088	80,612	0.304	203	874	4,140
肝切後 6時間	2.0	1.183	2,351	1,987	79,679	0.279	211	756	4,995
33時間	2.0	1.418	2,728	1,920	86,315	0.222	226	701	5,138
48時間	2.0	1.365	2,741	2,006	88,325	0.338	248	734	5,601
対 照		1.131	2,347	2,095	96,514	0.223	176	790	5,761

48時間の再生肝 homogenate を投与すると、その際の成熟ラット肝切除後33時間の再生肝の DNA の s.a. は 694 であった (対照群の s. a. は 790). これは、比較的軽度の抑制力である。そして幼若ラット肝切除後6時間の再生肝 homogenate 投与群の再生肝 DNA の s.a. 712 に近い値である。

成熟ラット肝切除後48時間の再生肝 homogenate 投与群の、再生肝 DNA の s.a. は 734 であり (対照群の s. a. は 790), 成熟ラット再生肝 homogenate 投与群のなかでは、軽度の抑制力を示すものである。

以上、成熟ラット肝についても、幼若ラット肝についても、再生肝 homogenate の再生肝に対する核酸代謝等の抑制力は、その homogenate 肝の代謝活性の度合いに比例し、再生極期肝の homogenate の抑制力が最も強く、再生極期より時間的に離れるに従ってその再生肝 homogenate の有する抑制力は低下する。正常肝 homogenate の抑制力は再生肝 homogenate のそれよりも弱く、また、成熟ラット再生肝 homogenate は幼若ラット再生肝 homogenate よりも小なる抑制力を示した。

2) 再生肝におよぼすラット再生肝 homogenate の長時間の効果

成熟ラット再生極期 (肝切除後33時間) および幼若ラット再生極期 (切肝後20時間) の再生肝 homogenate 2.0 cc を、成熟ラットの肝切除後6時間に投与し、肝切除後第2, 3, 5, 7, 10日における再生肝動態を検討した (表16, 17) (図11)。

幼若ラット再生肝 homogenate 投与群では、再生

肝の代謝は当初抑制されるが、第2～第7日には、逆に、対照群 (肝切除後に抗生物質混和生理食塩水を投与した群) よりも、旺んな核酸代謝を示す。これは、当初の抑制効果に続く secondary な reaction であるときなされる。すなわち、対照群では肝切除後第2, 3, 5, 7日の再生肝 DNA の s.a. が 267, 329, 117.5, 116.8 を示すのに対して、幼若ラット再生極期肝 homogenate 投与群では recipient の肝切除後第2, 3, 5, 7日の再生肝 DNA の s.a. は 422, 496, 376, 252 を示すのである。そして、肝切除後第10日にいたり、はじめて、対照群と一致するのである (幼若再生肝 homogenate 投与群の再生肝 DNA の s.a. 131 に対し、対照群の再生肝 DNA s.a. 120)。

一方、成熟ラット再生極期肝 homogenate の再生肝核酸代謝への影響を観察すると、幼若ラット再生極期肝 homogenate 投与群にみられた secondary reaction はみとめられず、肝切除後第2～第3日も抑制された状態を続け、第5日に対照群に一致する状態を示す。この現象は、最初の抑制力が弱いため、secondary reaction を起すことなく再生肝の代謝過程が進むものと考えられる。すなわち、成熟ラット再生極期肝 homogenate 投与群の recipient 再生肝 DNA の s.a. は、肝切除後第2, 3, 5日においてそれぞれ 172, 187, 112.5 であり、対照群の再生肝 DNA の s.a. はそれぞれ 267, 329.5, 117.5 である。

なお、これらの過程は、再生肝指数においては必ずしもみとめられない。

図11 再生肝の核酸代謝 (DNA) におよぼす再生肝 homogenate の長時間効果

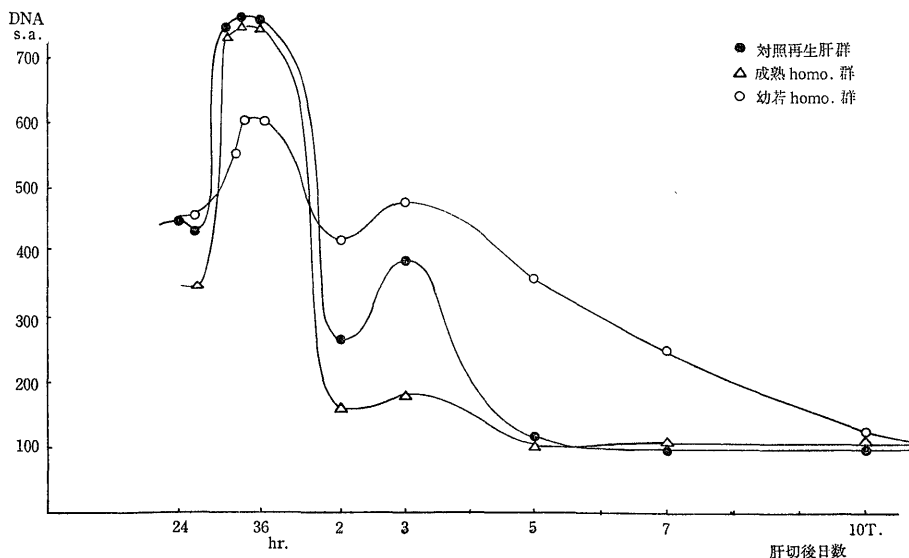


表16 再生肝におよぼすラット再生肝 homogenate の効果 (長時間効果)

recipient 肝切後日数	donor ラット		recipient ラット数	体 重 (gm.)		肝重量 (gm.)		再生肝指数	
				術 前	測定時	切除肝	再生肝	比体重	比切除肝
2 日	成	熟	5	200	180	4.45	4.8	2.66	1.08
	幼	若	5	214	192	4.1	5.5	2.86	1.34
	対	照	5	200	198	4.78	5.9	2.98	1.23
3 日	成	熟	4	190	170	4.3	5.3	3.12	1.23
	幼	若	5	233	212	5.16	7.0	3.30	1.54
	対	照	5	210	199	4.55	6.7	3.36	1.45
5 日	成	熟	5	220	222	5.1	9.4	4.23	1.56
	幼	若	4	240	223	5.25	9.65	4.33	1.84
	対	照	5	190	189	4.85	8.45	4.46	1.90
7 日	成	熟	5	195	191	5.18	8.5	4.45	1.64
	幼	若	5	190	142	4.75	8.6	6.05	1.69
	対	照	8	208	217	4.83	8.2	3.93	1.70
10 日	成	熟	5	240	264	5.1	8.5	3.22	1.68
	幼	若	5	210	209.5	5.24	9.60	4.58	1.84
	対	照	9	215	215	5.05	8.17	3.78	1.64

表17 再生肝の核酸代謝におよぼすラット再生肝 homogenate の効果 (長時間効果)

recipient 肝切後日数	donor ラット		RNA				DNA			
			mg	cpm	s. a.	総肝 RNA 当りの cpm	mg	cpm	s. a.	総肝 DNA 当りの cpm
2 日	成	熟	1.956	1,003	514	38,598	0.488	84	172	2,269
	幼	若	1.770	2,066	1,169	91,034	0.411	174	422	5,361
	対	照	1.926	1,381	707.5	62,851	0.463	125	267	3,976
3 日	成	熟	1.742	1,067	612	45,231	0.460	86	187	2,554
	幼	若	1.661	1,532	923	85,815	0.363	180	496	7,071
	対	照	1.652	1,333	781.5	70,251	0.457	151.5	329.5	5,545.7
5 日	成	熟	1.082	614	575.5	45,816	0.4395	49.5	112.5	2,565.6
	幼	若	1.191	1,041	874	80,425	0.254	95.5	376	5,157
	対	照	1.054	709	673	47,715	0.368	43.5	117.5	2,061
7 日	成	熟	0.767	781	814	53,018	0.474	57.4	121	2,715
	幼	若	1.173	1,075	917	69,315	0.321	81	252	3,658
	対	照	0.917	795	790.5	51,916	0.463	54.5	116.8	2,495
10 日	成	熟	1.116	703	714	50,183	0.279	36	129	2,516
	幼	若	1.031	794	772	61,015	0.386	50.6	131	2,715
	対	照	1.030	778	754	50,916	0.312	37.6	120	2,462

3) 再生肝 homogenate の分画

再生肝の homogenate を Takagi, Hecht & Potter の方法 (1956) で細胞質成分と核成分に分画し、それぞれを成熟ラット再生肝に与え、その肝切後33時間における再生肝への影響を検討した。

i) 幼若ラット肝切後20時間の再生肝 homogenate

の分画を、成熟ラット肝切後6時間に投与し、肝切後33時間の再生肝の核酸代謝を検討した。その結果、RNA, DNA のいずれにおいても、細胞質成分投与群 (RNA の s.a. 1,797, DNA の s.a. 645) よりも

核成分投与群において抑制を強くみとめた (RNA の s.a. 1,039, DNA の s.a. 533) ($p < 0.05$).

なお、再生肝指数では、この結果に一致する成績は得られなかった。

ii) 成熟ラット肝切後33時間の再生肝 homogenate の分画を、成熟ラット肝切後6時間に投与し、肝切後33時間の再生肝の核酸代謝を検討した。その結果、幼若ラット再生肝 homogenate 分画投与の場合と同じく、成熟ラット再生肝の DNA, RNA 代謝に対する抑制力は、核成分投与群において、細胞質成分投与群におけるよりも強い。すなわち、RNA の s.a. が細胞質成分投与群で 1,685, 核成分投与群で 1,586, DNA の s.a. が細胞質成分投与群で 651, 核成分投与群で 536 であった (抗生物質投与の対照群の RNA s.a. は 2,059, DNA は 778 である) (表18, 19) (図12).

図12 再生肝核酸代謝におよぼす再生肝 homogenate 分画の効果

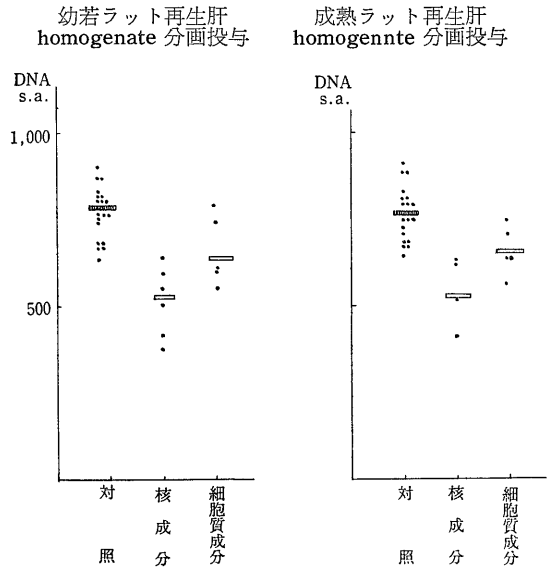


表18 再生肝におよぼすラット再生肝 homogenate の効果 (homogenate 分画)

recipient ラット	donor ラット	homo. 分画	recipient ラット数	体 重 (gm.)		肝重量 (gm.)		再生肝指数	
				術 前	測定時	切除肝	再生肝	比体重	比切除肝
肝 切 後 33 hr.	成 熟	細胞質成分	5	243	227	5.7	5.33	2.37	0.94
		核 成 分	4	236	216	4.8	4.52	2.87	0.96
		対 照	17	422	222	4.8	5.2	2.33	1.10
	幼 若	細胞質成分	5	230	230	5.0	5.9	2.56	0.91
		核 成 分	6	240	221	4.8	6.1	2.54	1.02
		対 照	17	230	228	5.0	4.38	1.89	0.90

表19 再生肝核酸代謝におよぼす再生肝 homogenate の効果 (homogenate 分画)

recipient ラット	donor ラット	homo. 分画	RNA				DNA			
			mg	cpm	s. a.	総肝 RNA 当りの cpm	mg	cpm	s. a.	総肝 DNA 当りの cpm
肝 切 後 33 hr.	成 熟	細胞質成分	1.207	2,002	1,685	65,321	0.394	219	651	7,772
		核 成 分	1.099	1,752	1,586	85,546	0.406	216	536	5,826
		対 照	1.131	2,347	2,059	95,514	0.348	271	778	7,563
	幼 若	細胞質成分	1.396	1,797	1,293	71,551	0.367	238	645	6,565
		核 成 分	1.549	1,619	1,039	75,431	0.388	206	533	5,293
		対 照	1.131	2,347	2,059	96,514	0.333	263	790	7,361

考 察

肝に対する実験病理はまず Italy において始まり、Colvcci, Corona ら Griffini らは肝細胞の新生あ

るいは増殖を観察した。しかし、かれらはその病理像を肝細胞それ自体の再生として明確に認識していたわけではない。1885年～1886年にいたり von Podwyssozki¹⁾ がラット、猫、モルモット、家兎に

においてその肝縁から小片を切除する実験を行ない、これが現在の肝再生の概念における最初の研究である。その後 Ponfick⁹⁾ (1889, 1890, 1895) が家兎および犬について75%に相当する肝葉の切除を行ない、von Meister (1894)¹⁰⁾ はラット、家兎、犬について75%の肝部分切除のち、80%以上の肥大再生をみとめた。

その後、肝再生の研究は Harkness²⁾, Paschke³⁾, 馬場・石井⁴⁾, その他¹¹⁾¹²⁾ の綜説に示されるごとく、肝重量あるいは mitosis を中心とする病理像の観察を、その研究手段としてきたが、現代にいたり isotope による研究法がさらに加わったわけである。しかし、現在にいたるも肝再生の調節機構に関しては未解決の状態である。また、多くの肝再生の研究は成熟ラットについてなされ、幼若ラットについての肝再生の研究は少ない。

本研究は幼若ラットを中心として、肝再生の動態を核酸代謝の面において追求するとともに、種々の状態にある肝の homogenate を再生肝に投与することにより、肝再生調節の機構の解明を企てたものである。

研究方法について：

再生肝における核酸代謝の指標として、RNA および DNA への 6-¹⁴C-orotic acid のとり込みをとりあげたわけであるが、本来 orotic acid は正常肝で容易に酸可溶性 uridine と cytidine の nucleotide にかわり、RNA 分子の pyrimidine 塩基¹³⁾ としてとり込まれるのであるが、再生肝や増殖の旺んな組織では DNA の pyrimidine 塩基にも入ることが知られている^{14)~16)}。それ故に、6-¹⁴C-orotic acid を指標として RNA および DNA 合成に関する研究を行った論文も多い^{17)~21)}。

ラット再生肝の増殖活性を、その肝切除手術と対比して観察した場合、再生肝の示す代謝活性の度合いはその切除率に比例することが Bucher ら²²⁾²³⁾, Tsukada ら²⁴⁾ によっても知られている。それ故、本研究においても、Higgins ら⁶⁾ の方法に準じて切除率が65~75%におよぶ切除法を採用した。そして、これだけの大きな侵襲にもかかわらず、幼若ラットにおいて手術死をみるようなことはなかった。

また、再生肝はその再生反応を示す際に diurnal な面を有することが知られている²⁷⁾。本実験においても、その diurnal な影響を除外するために、ラット肝の摘出が p. m. 6:00~p. m. 9:00 の間に行なわれるように肝切除手術を行なった。

なお、Bucher ら²⁵⁾ はラット再生肝におよぼす年令の影響をみた研究において、fasting ラットの C¹⁴-

thymidine のとり込みは、ad libitum に飼料を与えられた対照群の75%にしすぎず、しかも、この fasting の影響は weanling rat においてとくに強いことをみとめている。従って、本研究においても、肝切除手術の直後より水を、術後3時間より飼料を、それぞれ ad libitum に与えた。

正常肝について：

ラット正常肝に関する研究は再生肝のそれに比して少ないが、McKeller²⁶⁾ はラット正常肝の病理学的研究において、生後2~8週のラットに mitosis をみとめ、これを primary な反応とし、それ以後の mitosis を殆んどみとめない secondary な時期と区別している。

著者の研究においても、幼若ラットの肝重量の発育の勾配が強く(図1, 2)、また、6-¹⁴C-orotic acid の核酸へのとり込みが、幼若ラットにおいて、やや多い傾向を示している(表1)。

再生肝について：

ラット再生肝に関する論文は正常肝に関するそれよりは多いとはいえ、幼若ラットの再生肝に関するものは少ない。

von Meister¹⁰⁾, Norris ら²⁷⁾ はラット再生肝における再生肝重量の問題について、幼若ラットのそれが成熟ラットのそれよりも早いことをみとめている。この報告は著者の結果と一致するものであり、図3に示されるごとく、幼若ラットの重量回復が早い。

幼若ラット再生肝における mitosis に関する研究として、Marshak ら²⁸⁾ はその始まりが成熟ラットにおけるよりも早いことを、Bucher ら²⁹⁾ は幼若ラットにおいて双核数が多いこと、Zaki³⁰⁾ は mitosis の最大値が幼若ラットにおいて高値を示すことを報告している。また、Straube ら³¹⁾ が行なったマウスにおける観察によっても、幼若マウスの mitosis の始まりが早いことが知られている。

幼若ラット再生肝の核酸合成に関する研究として、1957年 Bourliere らは幼若ラットにおいてその核酸合成が早く行なわれることをみとめ、その後、1961年~1964年にわたり Bucher らの幼若ラット再生肝に関する一連の研究がある。Bucher ら²⁵⁾ はラットを weanling, young adult, older の3群にわけ、その再生肝におよぼす年令の影響を 2-¹⁴C-thymidine のとり込みを指標にして研究した。その結果 1. 2-¹⁴C-thymidine のとり込みの peak が年令に応じて遅れること、2. とり込みの pattern が年令により異なり、幼若ラットのそれが明確な2峰性を示すこと、しかし、そのとり込みの大きさは種々の因子が作用する

と考えられ、必ずしも一致しないこと、3. 幼若ラットは成熟ラット、あるいは、老ラットに比較して切除肝量に敏感に反応することをみとめた。

著者の研究の結果においても、成熟ラットと幼若ラットの再生肝動態には明確なる相違がみとめられる。まず、核酸への $6\text{-}^{14}\text{C}\text{-orotic acid}$ のとり込みの peak は RNA において、幼若ラットでは肝切後 8~10 時間、成熟ラットで肝切後 10~12 時間にある。また、DNA の peak については、幼若ラット、成熟ラットではそれぞれ肝切後 19~21 時間、33~35 時間にある。RNA への isotope のとり込みに関して、Tsukada ら²⁴⁾、Fujioka ら³²⁾ は幼若ラットにおいて肝切後 6~10 時間に大であるとし、著者の結果と一致する。成熟ラットにおいても、potter ら³³⁾、岩田³⁴⁾はそのとり込みは肝切後 10~12 時間に大であると報告している。

DNA のとり込みの peak について、幼若ラットで Fujioka ら³²⁾、Grisham³⁵⁾ は 20 時間にあり、Bucher ら²⁵⁾ は 23 時間にあるとしている。また、成熟ラットで Bucher ら²⁵⁾ は 25~32 時間に、岩田³⁶⁾ は 27~30 時間に、Cater ら³⁷⁾ は 29 時間に、Potter ら³³⁾ は 30 時間にあるとしており、著者の結果ともほぼ一致する、以上の結果よりわかるようにラット再生肝の動態はその年齢により異なり、従ってラット再生肝についての研究を行なうにあたってはこの年齢にともなう時間的変化に充分留意しなければならない。

著者は幼若ラットの再生肝における DNA のとり込み動態が 2 峰性曲線を示すことをみとめたが Bucher ら²⁵⁾はこの現象を、生後急速に成長しつつある幼若ラット肝に再生刺激が重複して加わり、肝細胞が近接した synchrony の型で反応した結果であるとしている。すなわち、第 1 の peak は肝切除に対する鋭敏な再生反応の表われであり、第 2 の peak は肝細胞の単なる proliferation の反映である。そして、成熟ラットにおいてはこの第 2 の proliferation が大きくない故に曲線上に peak としては表われないのであるとしている。この理論は、次の事実をも考慮に入れて肯首されるものである。すなわち、non hepatic cell は hepatic cell より大分遅れて分裂するのであるが、Cater ら、Grisham によるとその分裂は肝切後 42~45 時間に起る。従って、これは第 2 の peak の factor とは考えられないのである。

再生肝と抗癌剤について:

ラット再生肝と抗癌剤との関係についての研究は、actinomycin D¹⁹⁾²⁰⁾³⁸⁾³⁹⁾、mitomycin C³⁴⁾³⁶⁾ のそれぞれについて、あるいは、puromycin⁴⁰⁾ などにつ

いても行なわれているが、幼若ラット再生肝との関係についてとくに検討したののではない。

著者の得た結果では、幼若ラット再生肝の代謝は、actinomycin D, mitomycin C に対して鋭敏に反応する。これは、幼若ラット再生肝では $\text{H}^3\text{-thymidine}$ ³⁵⁾ のとり込みが旺盛であり、また、 CCl_4 ⁴¹⁾⁴²⁾ に対しても敏感であることに共通するところである。なお、actinomycin D, mitomycin C を投与する timing に一つの問題がある。著者は、正常再生肝の pattern を考慮し、幼若ラット、成熟ラットそれぞれの再生肝の代謝の peak に向けて投与した。

再生肝と肝 homogenate について:

肝再生の調節機構に関しては従来いくつかの説があり、現在においても、それらのいずれもが仮説の域を出ない状態である(下表)。

1. 排泄機能の負担加重⁴³⁾……総輸胆管結紮で胆管性細胞の増殖あり。
2. 流血量の因子⁴⁴⁾……門脈血量の相対的増加
3. 液性因子

serum	}	“促進因子” “抑制因子”の概念
肝 homogenate		
albumin 値		
4. ホルモン

{	下垂体ホルモン ⁴⁵⁾ ……生長ホルモンが促進
{	甲状腺ホルモン ⁴⁶⁾ ……促進
{	副腎ホルモン ⁴⁷⁾ ……adrenaline は促進, cortisone が抑制

しかし、上記のうち 1. 2. 4. は再生肝とは無関係でないものの、その調節の本体とは考えにくく、従来、3. の液性因子に関する研究が数多くなされてきた。それにもかかわらず、はっきりした結論のでない状態で現在にいたっている。研究の主題となっている点は、ラット serum、あるいは、肝 homogenate の中に何らかの肝再生促進因子、あるいは、抑制因子が存在しないかということである。

MacDonald ら⁴⁸⁾ (1961) は正常肝ラット、あるいは、再生肝ラットに対し、正常肝ラット、あるいは、再生肝ラット(肝切後 24 時間)の血清を投与し recipient ラット肝切後 20, 21, 28 時間の mitosis および $\text{H}^3\text{-thymidine labeled nuclei}$ を検索した。しかし、そのいずれにおいても促進効果のみとめなかった。さらに parabiose ラットの実験においても変化をみとめず、血清中の促進因子、あるいは、抑制因子の存在を疑問視している。

また、Fisher ら⁴⁹⁾ (1963) は 800 匹以上のラットを用い、正常肝ラット、あるいは、再生肝ラットの plasma (1 cc) および serum (1 cc) をラット正常

肝に投与し、mitosis および P³² のとり込みを観察した結果、そのいずれにおいても変化をみとめず、また、parabiose の実験においても同様の結果をみとめた。そして、前者らと同じく血清中の因子を疑問視している。

Glinos ら⁵⁰⁾(1952) は肝部分切除ラット血清の効果を経験培養で観察した。その結果、成長率は肝切除血清の濃度に比例し、正常血清の濃度に逆比例した。Glinos⁵¹⁾(1956) はまた、ラットの血清についての in vivo 実験において、再生肝の mitosis がその再生肝ラット血清の希釈により上昇し、濃縮により下降することをみいだした。そして、Glinos らは肝再生の調節機構として、血清 albumin を主体とする negative feedback mechanism を推論している。しかし、この成績は著者の結果とは一致しないものであり、また、のちに引用する Grisham ら (1966)⁵⁷⁾ の成績とも矛盾するものである。

Marshak ら⁵²⁾(1954) は生後 1 カ月のラットの肝部分切除を行なって、その 24 時間後のラット肝細胞核から Claude & Potter 法 (1943) で抽出した chromatin を経静脈的に投与して、3 時間後に、recipient ラット再生肝に、肝部分切除のみの対照に比べ 25~100% の分裂頻度の上昇をみた。しかし、この実験で注意すべき点として、牛・家兎肝細胞から抽出した chromatin でも同程度に有効性がみられ、種特異性がみとめられないこと、同時に、抽出材料の肝細胞に P³² を入れておくと、再生肝細胞核内に多量にその P³² がとり込まれていることである。これらの事実は投与された chromatin が再生核の構成素材として利用された可能性を示すものであり、従って、この chromatin の中に真の分裂誘起因子が含有されているかという点に疑問がある。なお、chromatin が経静脈的に投与されていることも、実験条件の相違である。

再生肝 homogenate を再生肝動物に与えてその変化をみた唯一の研究であると考えられる Stich ら⁵⁾(1958) の報告は次のようなものである。正常肝ラットおよび再生肝ラットの serum および肝の saline homogenate を再生肝ラットに投与し、その mitosis を観察したところ、正常ラットの材料を投与した群では軽度であり、再生肝動物の材料を投与した群では高度であった。

しかし、この種の因子の効果を判定するにあたって注意すべき二つの点がある。それは Teir (1952) が指摘しているように、試験物投与後最高の分裂頻度を示すまでの潜伏時間、および細胞分裂相の問題である。

効果陽性を示す物質は少なくとも 48 時間以内に分裂頻度の最高値を示すようなものであることが望ましく、また、細胞分裂相についてはすべての分裂期の細胞が各期の所要時間に比例する頻度でみとめられることが必要である。すなわち、corchitin 投与の場合のようなみかけ上の分裂促進とみ誤らないことが必要であるということである。さらに、さきの MacDonald⁴⁸⁾ や Fisher⁴⁹⁾ は、その考案の中で、mitosis の variation が強いことを指摘している。

Brues ら⁵³⁾(1939) は、胎生組織、マウス sarcoma、マウス carcinoma の組織培養に対して、ラット、あるいは、マウス肝の extract を加えることにより発育抑制効果のみとめ、さらに、その抑制力は、extract の濃度に比例することをみとめた。

Saetren⁵⁴⁾(1956) は一側腎の摘出と肝部分切除とを同時に行なったラットの腹腔内に、切除肝あるいは摘出腎組織の macerate を投与すると、24 時間後に、腹腔内に投与した macerate と同種組織の細胞分裂のみが阻止されることをみいだした。この際、異種組織の分裂頻度にはまったく影響を与えないという。そして阻子因子の性状は、非透折性で、1°C の氷室保存、あるいは、凍結融解、凍結乾燥に耐える。一方、60°C 10 分で不活性化し、機能を失った臓器には産出されないという。すなわち、分裂阻止因子も、あるいは、他の研究者によってみとめられた誘起因子も、同種細胞に由来し、組織、ないし、臓器特異性を有する物質であるといえる。

Teir ら⁵⁵⁾(1957) はラット眼球 homogenate、新生児ラット肝 homogenate および幼若ラット肝 homogenate を正常ラットに経腹腔的に投与し、1, 2, 7 日後の肝 RNA および肝 DNA 量を測定し、そのいずれにおいても変化をみとめなかった。この実験は核酸の定量であって isotope 法などによる代謝活性を検べたものではない。他の論文を見渡しても、肝 homogenate を投与した実験の場合、核酸へのとり込みを指標としたものはないようである。

著者は、再生力の旺盛な幼若ラットの再生肝を中心とした種々の肝 homogenate を成熟ラットに経腹腔的に投与し、その再生肝の動態の変化を wet 肝重量および 6-¹⁴C-orotic acid の RNA, DNA へのとり込みを指標にして追求した。なお、その際、とくに時間的な因子を重視し、次のような結果が得られた。

1. 再生肝 homogenate には再生肝を抑制する効果があり、とくに幼若ラットの再生肝 homogenate にその効果が強い。そして、効果はその投与量に比例する。一方、正常肝 homogenate には殆んどその作用

がみとめられない (表10, 11, 12, 13, 14, 15) (図9, 10). 2. 経時的な面で観察すると, その抑制の後に代償性の増生とみなされる secondary reaction が得られる (表16, 17) (図11). 3. 再生肝 homogenate の抑制力は, その肝再生の動態にはほぼ比例する (表10, 11, 14, 15) (図9, 10). 4. homogenate の分画を分析すると, 抑制力を示す分画は核成分にある (表18, 19) (図12).

Wilson ら⁵⁶⁾ (1947) は正常マウスに肝, 腎および卵黄の homogenate を経腹腔的に投与し肝の mitosis を観察し, 1. 幼若マウスにおいては投与後第2~第3日まで抑制効果がみられ, その後第5~第8日に促進効果がみられた. 2. 成熟マウスにおいては, mitosis が軽く, その変化は小さいものであるが, 第5~第8日に変化の増進傾向がみとめられた. この結果は, 著者の研究における代償増生の現象に一致するものと考えられる. 同じような意味で, 促進作用をみとめたとしている論文でこの代償増生と考えられる現象をみているものが数多い.

Grisham ら⁵⁷⁾ (1966) は1000匹以上のラットを用い, 正常肝ラット, あるいは, 再生肝ラットの間で交換輸血 (交換血液量 75~80%) を行ない mitosis および H^3 -thymidine による labeling を観察した結果, 1. 正常肝ラットは正常肝ラットおよび再生肝ラットより交換輸血をうけて, いずれの場合にも変化なし. 2. 再生肝ラットは正常肝ラットより交換輸血をうけて再生肝の depression, あるいは, delay を示す. 3. 再生肝ラットは再生肝ラットより交換輸血をうけて再生肝の variable depression, あるいは, delay を示し, その際の抑制力は, donor 再生肝ラット血液との置換率に比例した. 抑制効果は recipient ラットの肝切除後6~12時間の間に交換輸血を行なったものに強く現われ, さらに, donor 側の抑制力は肝部分切除後急激に失われ, 肝増生 (再生過程) に応じて現われてくる, と報告した. この実験は交換輸血を手段として行なわれたものであるが, とくに, 3. に示された結果は著者の結果とほぼ一致するものである. なお, 2. の結果は著者のそれと一致しないが, これは交換輸血ということによる結果であり, このあとの考案でふれる, 正常肝において抑制因子および促進因子の両者がともに欠如する (あるいは低値) ということと説明されうる.

調節機構を一般的に考えると, 1. 分裂に作用する促進因子と抑制因子とがあって, 両者の活性の度合いによって細胞の分裂相と機能相がきめられる. 2. 促進因子のみがあり, その濃度によって調節されている. 3.

抑制因子のみがある, という三つが成り立つ. まず, 促進因子のみという考え方は, 再生肝 homogenate が抑制効果を示すことで否定される. 次に, 抑制因子のみという考え方も否定される. なぜならば, 第一に, 本来 at rest の状態にあり, 従って, 抑制状態にあると考えられる正常肝の homogenate が殆んど抑制力を示さない. 第二に, 促進状態にあると考えられる再生肝に抑制力をみとめること, などがあるためである. さて, 抑制因子と促進因子とが共存・拮抗するという考え方を吟味しよう. 抑制因子の存在することは確実である. また, 促進因子の存在の直接の証明はないが, 1. 再生肝が抑制力を示しながら同時に再生現象が進展していること. 2. 強い再生力を示す幼若ラットの再生肝の homogenate が成熟ラット homogenate よりも強い抑制力を示すこと. ③正常肝には促進力, 抑制力の両作用のいずれもみとめられないこと, などは促進因子の共存することを間接的に示唆している. すなわち, 正常肝にあっては, at rest の動態にあり, 抑制, 促進の因子のいずれも存在しないか, あるいは, 存在してもごく微少であると考えられる. 再生肝にあっては, 肝切除が誘因となって促進因子が作用し肝の再生過程が進行する. それに伴って抑制因子も増大していき, 再生過程の限界点では抑制作用が促進作用を凌駕することになる. その時期に肝の細胞分裂が終了し, その後は at rest に近い動態に戻るものと考えられるのである.

再生肝の核酸代謝をみるに, DNA に関しては, 肝切除後16~18時間で deoxyribonucleotide が増量し, 酵素活性も DNA 合成に向って亢進する. なかでも, thymine の deoxyribonucleoside triphosphate 形成に強く集中する. すなわち, 一方では分解過程を抑え, 副次過程を動員し, 種々の thymic acid kinase の活性を高めるのである. 最後に4種の deoxyribonucleosid triphosphate (dTTP, dCTP, dATP, dGTP) から polimerase によって DNA が合成される. この合成系の最初の推進者として促進因子を考え, 旺盛となった. DNA 合成を調節し正常肝の状態に戻す過程に抑制因子が働くとも考えることができる.

結 論

ラットの肝組織は部分切除後急速に再生増大し, その代謝は肝切除後20~40時間に最大となる.

著者は幼若ラットの再生肝の動態を観察し, 肝再生の調節機構を明らかにした.

1. 正常の成熟ラット, 幼若ラットにおいて, wet

肝の重量/比体重の時間的経過に従っての変化は同一の傾向を示した。一方、体重の増加率は成熟ラットにおけるより幼若ラットにおいて高値であり、従って、成熟ラットの肝発育よりも幼若ラットの肝発育が大である。

2. 肝の65~75%に相当する部分を切除した後、残存肝の再生を時間的経過に従って観察すると、成熟ラットにおけるよりも幼若ラットにおいて再生肝 wet 重量/比体重、再生肝 wet 重量/比切除肝 wet 重量の値が、高値を示し、幼若再生肝の重量回復過程の速いことが実証された。

6-¹⁴C-orotic acid の再生肝 RNA へのとり込みを経時的にみると、成熟ラットと幼若ラットとの間にとり込みの pattern の相違がみとめられ、RNA へのとり込みの peak が幼若ラットにおいて、時間的に早く現われる。

6-¹⁴C-orotic acid の再生肝の DNA へのとり込みについても、RNA の場合と同じくそのとり込みの pattern に差異がみとめられ、幼若ラットにおいて DNA へのとり込みの peak が早く現われる。すなわち、幼若ラットにおける peak は肝切除後19~21時間にみられ、成熟ラットにおけるそれは33~35時間にみられる。また、幼若ラットにおけるとり込み pattern の大きな特徴として、変化が2峰性曲線を示していることである。

3. actinomycin D および mitomycin C を、成熟ラットおよび幼若ラットのそれぞれが、6-¹⁴C-orotic acid の再生肝 RNA、DNA へのとり込みの peak を示す時期に投与すると、成熟ラットにおけるよりも幼若ラットにおいて RNA 合成、DNA 合成のいずれにおいてもその影響を強くうけた。

4. 成熟ラット再生肝におよぼす同種正常肝および再生肝の homogenate の効果を検討した結果は次の如くである。

成熟ラット再生肝に対して、経腹腔的に成熟ラットおよび幼若ラットの正常肝 homogenate を投与した場合、いずれも、recipient 再生肝の肝指数、あるいは、RNA、DNA 代謝に対して殆んど影響を与えなかった。

ラット再生肝の homogenate は、成熟ラットの肝再生に対して抑制的に作用し、しかも、幼若ラット再生肝 homogenate の抑制力が、成熟ラット再生肝 homogenate の抑制力より大である。

ラット再生肝 homogenate が recipient 成熟ラット再生肝に投与される場合、その抑制力は投与量に平行することがみとめられた。

再性肝 homogenate の抑制力を経時的に観察すると、肝切除後初期(肝切除後5~6時間)の再生肝 homogenate の抑制力は小さく、幼若ラットにおいては肝切除後20時間、成熟ラットにおいては肝切除後30時間の極期再生肝 homogenate の抑制力が最も強く、また肝切除後48時間の再生肝の homogenate は抑制力を殆んど示さなくなる。従って、再生肝 homogenate の抑制力は再生肝の動態と平行しているものと考えられる。

一度抑制された recipient 再生肝は、肝切除後第2~第7日にその second reaction として核酸代謝の亢進を示した。この reaction は肝切除分第10日に消失した。

成熟ラット再生肝に投与すべき再生肝 homogenate を細胞質成分および核成分に分画し、その抑制効果を検討すると、核成分の分画が抑制力を示し、細胞質成分の分画は抑制力を示さなかった。

稿を終るに臨み、本研究を私に課し、終始御懇篤なる御指導と本論文の御校閲を辱うした 恩師 卜部美代志教授に深謝の意を捧げるとともに御協力、御援助下された 網村史郎講師、奈良高明博士、宮下徹学兄、福田明史博士をはじめ教室諸先生の御厚意に深く感謝致します。

文 献

- 1) von Podwyssozki, W. Jr. : Beitr. z. path. Anat. u. z. allg. Path., 1, 259 (1886). 2) Harkness, R. D. : Brit. Med. Bull., 13, 87 (1957). 3) Paschkis, K. E. : Cancer Res., 18, 981 (1958). 4) 馬場恒男・石井美枝子 : 蛋白質核酸酵素, 「発生」, 952 (1966). 5) Stich, H. F. & Florian, M. L. : Can. J. Biochem. & Physiol., 36, 855 (1958). 6) Higgins, G. M. & Anderson, R. M. : Arch. Path., 12, 186 (1931). 7) Messier, B. & Leblond, C. P. : Am. J. Anat., 106, 247 (1960). 8) Takagi, Y., Hecht, L. I. & Potter, V. R. : Cancer Res., 16, 994 (1956). 9) Ponfick, E. : Virchows Arch. path. Anat., 119, 193 (1890). 10) von Meister, V. : Beitr. z. path. Anat. u. z. allg. Path., 15, 1 (1894). 11) Weinbren, K. : Gastroenterology, 37, 657 (1959). 12) 寺山 宏 : 最新医学, 20, 87 (1965). 13) Hurlbert, R. B. & Potter, V. R. : J. Biol. Chem., 195, 257 (1952). 14) Hammersten, E., Reichard, P & Saluste, E. : J.

- Biol. Chem., 183, 105 (1950). 15) Rose, I. A. & Schweigert, B. S. : J. Biol. Chem., 202, 635 (1953). 16) Takagi, Y., Hecht, L. I. & Potter, V. R. : Cancer Res., 16, 994 (1956). 17) Gottlieb, L. I., Fausto, N. & Lancker, J. L. V. : J. Biol. Chem., 239, 555 (1964). 18) Hecht, L. I. & Potter, V. R. : Fed. Proc., 15, 271 (1956). 19) Zimmerman, M. & Celozzi, E. : Fed. Proc., 19, 139 (1960). 20) Tsukada, K. & Lieberman, I. : J. Biol. Chem., 239, 1564 (1964). 21) Fujioka, M., Koga, M. & Lieberman, I. : J. Biol. Chem., 238, 3401 (1963). 22) Bucher, N. L. R. & Swaffield, M. N. : Cancer Res., 24, 1611 (1964). 23) Bucher, N. L. R. & Swaffield, M. N. : Fed. Proc., 21, 300 (1962). 24) Tsukada, K. & Lieberman, I. : J. Biol. Chem., 239, 1564 (1964). 25) Bucher, N. L. R., Swaffield, M. N. & Ditoier, J. F. : Cancer Res., 24, 509 (1964). 26) Mckellar, M. : Am. J. Anat., 85, 263 (1949). 27) Norris, J. L., Blanchard, J. & Povolny, C. : A. M. A. Arch. Path., 34, 208 (1942). 28) Marshak, A. & Byron, R. L. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 59, 200 (1945). 29) Bucher, N. L. R. & Glinos, A. D. : Cancer Res., 10, 324 (1950). 30) Zaki, F. G. : Ztsch. Naturforsch., 96, 239 (1954). 31) Straube, R. L. & Patt, H. M. : Fed. Proc., 20, 286 (1961). 32) Fujioka, M., Koga, M. & Lieberman, I. : J. Biol. Chem., 238, 3401 (1963). 33) Hecht, L. I. & Potter, V. R. : Cancer Res., 16, 988 (1956). 34) 岩田卓造 : 十全医会誌, 67, 3, 470 (1961). 35) Grisham, J. W. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 105, 555 (1960). 36) 岩田卓造・天羽弘行・太田和雄 : 第26回日本癌学会総会, 73 (1967). 37) Cater, D. B., Holmes, B. E. & Mee, L. K. : Acta radiol., 46, 655 (1956). 38) Schwartz, H. S., Sodergren, J. E., Garofals, M. & Sternberg, S. S. : Cancer Res., 25, 307 (1965). 39) Stenram, U. & Willén, R. : Cancer Res., 26, 765 (1966). 40) Gottlieb, L. I., Fausto, N. & Van Lancker, J. L. : J. Biol. Chem., 239, 555 (1964). 41) Post, J., Himes, M. B., Klein, A. & Hoffman, J. : A. M. A. Arch. Path., 64, 284 (1957). 42) Post, J., Klein, A. & Hoffman, J. : A. M. A. Arch. Path., 70, 314 (1960). 43) MacDonald, R. A. & Pechet, G. : Fed. Proc., 20, 287 (1961). 44) Mann, F. C., Fishback, F. C., Gay, J. G. & Green, G. F. : Arch. Path., 12, 787 (1931). 45) Post, J., Himes, M. B., Klein, A. & Hoffman, J. : A. M. A. Arch. Path., 64, 278 (1957). 46) Popper, H. & Schaffner, F. : LIVER, Structure & Function, 635 (1957). 47) Davis, J. C. & Hyde, T. A. : Cancer Res., 26, 217 (1966). 48) MacDonald, R. A. & Rogers, A. E. : Gastroenterology, 41, 1, 33 (1961). 49) Fisher, B., Fisher, E. R. & Saffer, E. : Cancer Res., 23, 914 (1963). 50) Glinos, A. D. & Gay, G. O. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 80, 421 (1952). 51) Glinos, A. D. : Science., 123, 673 (1956). 52) Marshak, A. & Walker, A. C. : Am. J. Physiol., 143 (1945). 53) Brues, A., Subbarow, Y., Jackson, E. B. & Aub, J. C. : J. Exp. Med., 71, 423 (1940). 54) Saetren, H. : Exp. Cell Res., 11, 229 (1956). 55) Teir, H., Larmo, A., Alho, A. & Blomqvist, K. : Exp. Cell Res., 13, 147 (1957). 56) Wilson, J. W. & Leduc, E. H. : Anat. Rec., 97, 471 (1947). 57) Grisham, J. W., Leong, G. F., Albright, M. L. & Emerson, J. D. : Cancer Res., 26, 1476 (1966).

Abstract

It is eighty years since studies of regeneration of the rat liver after partial resection was conducted with a scientific analysis. However, only a few works were done on liver regeneration of young rats.

There are many unsolved problems on the regulatory mechanism of regeneration after partial hepatectomy.

From this point of view, the present author carried out studies concerning differences of liver regeneration between young and adult rats. He also observed by means of $6\text{-}^{14}\text{C}$ -orotic acid incorporation into the nucleic acid, the behavior of the nucleic acid metabolism in the regenerating liver of the adult rat after an administration of regenerating liver homogenate of the young rat.

The results obtained were as follows:

1. In the normal young rat, the liver grew at the higher rate than in a normal adult rat.

2. The liver restoration after partial resection was much more achieved in regenerating liver of the young rat than in the adult rat.

Incorporation of $6\text{-}^{14}\text{C}$ -orotic acid into RNA and DNA in the regenerating liver showed the maximal peak earlier in the young rat than in the adult rat.

Incorporation of $6\text{-}^{14}\text{C}$ -orotic acid into the nucleic acid in regenerating liver of the young rat showed a different pattern from that of the adult rat.

3. Administration of actinomycin D and mitomycin C showed a marked decrease on the nucleic acid synthesis in the regenerating liver of the young rat.

4. No change was noticed in the nucleic acid metabolism of the regenerating liver of the adult rat when liver homogenate of intact adult rats was administered.

When homogenate of intact or regenerating liver of the young rat was administered, biosynthesis of RNA and DNA was inhibited in the regenerating liver of the adult rat.

This inhibitory effect of regenerating liver homogenate showed a close relation to the stage of regeneration of the liver from which the tissue was obtained for homogenation.

The inhibitory effect of regenerating liver homogenate was slighter when the homogenate was made 5~6 hours after partial hepatectomy, most intensive 19~20 hours after and became slighter again 2 days after resection.

The substance which showed the inhibitory effect was contained in the nuclear fraction rather than in the cytoplasmic fraction, of the regenerating liver homogenate.

In these recipient regenerating liver, the secondary enhancement of restoration appeared following the inhibition, 2 to 7 days after an administration of the regenerating liver homogenate.
