<短 報>

ラット障害肝中の肝細胞増殖抑制因子の検討

伊藤 博之 中村 利夫 末盛 彰一 渡辺 恭行
 中西 敏夫 梶山 梧朗* 増田 昌彦 山田 一夫**

肝細胞増殖因子に関しては最近 HGF 等が分離精製¹⁾され広範な知見が得られている。しかしながら、増殖抑制因子に関しては比較的報告が少なく TGF β 等が肝細胞増殖抑制を行うことが報告されているに過ぎない²⁾。その他に正常肝、部分肝切除後の肝臓から抽出された増殖抑制因子の報告はあるが³⁾、障害肝から抽出された増殖抑制因子の報告はない。今回我々は障害肝中の肝細胞増殖因子（仮称：Hepatocyte proliferation inhibitory factor=HPIF）を部分精製後、諸性質の検討を行い興味ある結果を得たので報告する。

方法：1) 肝抽出物質の作成法：ウィスター系雄性ラット（200g）に D-ガラクトサミン塩酸塩 1,500mg/kg を腹腔内投与 96 時間後、氷冷生理食塩水で灌流後肝臓を摘出した。摘出した肝臓より Roberts らの方法⁴⁾に準じて酸エタノール法により酸可溶性タンパクを抽出し、肝抽出物質とした。また無処置ラットからも同様に肝抽出物質を作成した。2) HPIF の部分精製法：PBS に溶解した障害肝、正常肝抽出物質 4.3mg をセファクリル S300 カラム（1×12cm）にかけ、PBS で溶出した（0.5ml/分画）。各分画に関して肝細胞増殖抑制活性を検討した。また、肝細胞増殖抑制活性を認める分画に関して形質転換作用の有無を、NRK 49F 細胞を使用したコロニー形成能で検討した⁵⁾。3) 肝細胞増殖抑制活性の測定法：ラット肝細胞は体重 200g 前後のウィスター系雄性ラットからコラゲナーゼ灌流法により分離した。分離肝細胞は 40mM グルタミン、100 U/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン、10⁻⁶M デキサメサゾン、5%FCS を含む William's medium E を用いて 2×10⁶/ml に調整し、35mm collagen coated dish に 2ml/dish 蒔き、5%CO₂ 下、37℃ で培養を行った。分離培養開始 5 時間後、無血清培地に変更した。培養開始 24 時間後インスリン（10⁻⁷M）+ EGF（20ng/ml）を含んだ無血清培地に変更し、同時に各分画 200 μ l を添加した。更に 24 時間培養して、ラッ

ト肝細胞 DNA 合成能に及ぼす影響を [³H] チミジン（0.4 μ Ci/ml）の DNA への取り込みで測定した。肝細胞増殖抑制活性（%）=（EGF、インスリン添加時の DNA 合成能 - EGF、インスリン、各分画添加時の DNA 合成能）/（EGF、インスリン添加時の DNA 合成能 - 無添加時の DNA 合成能）×100 とした。また、肝細胞障害の検討のために培地中 LDH の測定と、生着細胞数の検討を行った。生着細胞数の検討は TCA 処理後の酸不溶性画分の蛋白量を Lowry 法で測定することで行った。

結果：HPIF の部分精製；肝細胞増殖抑制活性は高分子分画（Peak1）と分子量約 15,000 の分画（Peak 2）に認められた（Fig. 1）。高分子分画においては培地中 LDH が上昇し、生着細胞数が減少していることから、高分子分画の肝細胞増殖抑制活性は非特異的な肝細胞障害によると思われる（Fig. 2）。もう一つ肝細胞増殖

Fig. 1 Sephacryl S300 Chromatogram of liver extracts of rats treated with D-galactosamine. Protein concentration and %Inhibition of [³H] thymidine incorporation were assayed. The following markers for molecular weight were used: ferritin (450kDa), egg albumin (45kDa) and cytochrome C (12.5kDa).

* 広島大学第1内科

** 同 第1生化学

Fig. 2 Sephacryl S300 Chromatogram of liver extracts of rats treated with D-galactosamine. Survival cells and LDH in medium were assayed.

抑制活性を認める分子量約15,000の分画においては培地中LDHの上昇は認められず、この分画をHPIFとした(Fig. 2)。また、HPIFはコロニー形成能はなく、形質転換作用は認められなかった。以上の様に障害肝では分子量約15,000の分画に肝細胞増殖抑制能(HPIF)が認められるが(Fig. 1)、正常肝にはHPIFの発現は認められなかった。

考察：従来より、正常肝、部分肝切除後の肝臓からの肝細胞増殖因子の分離が諸家によって試みられてきたが、精製された因子はMcMahonら³⁾によって分離精製されたHPI (hepatic proliferation inhibitor)のみである。また、最近TGF β は肝細胞増殖抑制活性で注目されており、部分肝切除後にTGF β のmRNAの発現⁶⁾することが報告されている。

我々が部分精製したHPIFは正常肝には認められず、障害肝にのみ認められるが、HPIは正常肝から精製されている。TGF β は分子量25,000で形質転換作用を有しているが、HPIFは形質転換作用がなく、より低分子である。以上より、HPIFはHPI等既知の肝細胞増殖抑制因子とは異なる可能性が高く、現在更に精製を進めている。

索引用語：増殖抑制因子、初代培養肝細胞、D-ガラクトサミン肝障害

文献：1) Nakamura Toshikazu, et al: Proc Natl Acad Sci USA 83: 6489—6493, 1986 2) Nakamura Toshikazu, et al: Biochem Biophys Res Commun 133: 1042—1050, 1985 3) McMahon J B, et al: Proc Natl Acad Sci USA 79: 456—460, 1982 4) Roberts AB, et al: Proc Acad Sci USA 77: 3494—3498, 1980 5) De Larco J E, et al: Proc Natl Acad Sci USA 75: 4001—4005, 1978 6) Braun L, et al: Proc Natl Acad Sci USA 85: 1539—1543, 1988

Heptocyte proliferation inhibitory factor in liver extracts of rats treated with D-Galactosamine

Hiroyuki ITO, Toshio NAKAMURA, Shouichi SUEMORI, Yasuyuki WATANABE, Toshio NAKANISHI, Goro KAJIYAMA*, Masahiko MASUDA and Kazuo YAMADA**

* First Department of Internal Medicine, Hiroshima University School of Medicine (Hiroshima)

** First Department of Biochemistry, Hiroshima University School of Medicine (Hiroshima)