肝由来培養細胞のアミノ酸のとりこみと有機リン農薬(IBP)の影響

誌名	農林水産省家畜衛生試験場研究報告
ISSN	03882403
著者名	新林,恒一 權,文柱 梅村,泰清
発行元	農林水産省家畜衛生試験場
巻/号	83号
掲載ページ	p. 23-30
発行年月	1982年2月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council Secretariat

肝由来培養細胞のアミノ酸のとりこみと有機リン農薬（IBP）の影響

新林恒一[1]　權　文柱[2]　梅村泰清[3]

（昭和56年10月3日受付）

ラット肝由来の RLC-10 株細胞の培養経過に伴う培地からのアミノ酸のとりこみを経時的に観察し，さらに低毒性有機リン農薬（*O*, *O*-Diisopropyl-*S*-benzyl thiophosphate）およびグリオキシル酸添加時の細胞の増殖状態とアミノ酸のとりこみについて検討した。

ラット培養細胞のアミノ酸組成は肝蛋白（豚）のアミノ酸組成と類似していた。細胞の増殖は農薬濃度が 10^{-6}M 以下ではあまり影響を受けなかったが，10^{-3}M 以上では著しく抑制され，細胞の崩壊がみられた。アミノ酸のとりこみは細胞の増殖とかならずしも経時的に一致しなかったが，一般に培養初期に増加の傾向がみられた。細胞で合成の多かったアミノ酸は，アスパラギン酸，グルタミン酸，プロリン，グリシンで，わずかに合成が観察されたものはヒスチジン，アルギニン，バリン，チロシン，フェニールアラニンであった。農薬の添加によりアミノ酸のとりこみは減少した。培養が進むにつれてグリシンとプロリンの培地への放出がみられ，とくにグリシンの放出は顕著であった。

生体において肝のアミノ酸代謝様式は複雑で多岐にわたっており，その動態解明に困難な点があるので *in vitro* の系で各アミノ酸と細胞との相互作用を調べ，生体での肝のアミノ酸代謝に関する基礎資料を得ることを目的として，肝由来の培養細胞を用いて実験を行なった。さらに阻害剤としての農薬の影響とグリシン生成に対するグリオキシル酸の関与を検討するために，これらの化合物の添加実験を行なった。

材料と方法

培養に用いたラット肝細胞：実験に用いた細胞は東京大学医科学研究所勝田教授から分与されたラット肝実質細胞由来の RLC-10 株であった。

Uptake of amino acids during proliferation of rat liver cells and effect of agricultural chemical on proliferation

1 Koichi SHIMBAYASHI：農林水産省家畜衛生試験場研究第4部 〒305 茨城県筑波郡谷田部町観音台3丁目1番1号

2 Munju KUON：研修生（現在，日本獣医畜産大学生理化学教室，〒180 東京都武蔵野市境南町1丁目7番1号）

3 Yasukiyo UMEMURA：農林水産省家畜衛生試験場研究第4部（現在，飼料安全性研究部）

培地および培養条件：培地は高岡・勝田[9]の肝細胞培養に最適である蛋白質および脂質を含まない DM-153 合成培地（極東製薬）に牛胎児血清を10%の割合で加えたものを用いた。培養方法は高岡ら[10]の方法に準じ，培養条件は37℃で空気95%，二酸化炭素5%を含む気相中で炭酸ガス培養を行なった。

添加剤

培養細胞に対する有機リン農薬の添加量：細胞増殖に及ぼす低毒性有機リン農薬（*O*, *O*-Diisopropyl-*S*-benzyl thiophosphate：IBP）の影響を検討するため，5×10^5 個/mℓ の細胞に IBP 濃度を 10^{-8}M から 10^{-3}M と段階的に加えて培養し，3，6，9日目に細胞数を計測した。他方，細胞増殖時のアミノ酸のとりこみを測定するため，5×10^4/mℓ の細胞を培養し，3，6，9日目に採材と細胞数の計測を行なった。

培養細胞に対するグリオキシル酸の添加量：培養細胞でグリオキシル酸からグリシンの生成が起こるかどうかを調べる目的で行なった。培地に添加したグリオキシル酸濃度は 10^{-3}M で培養は4日間行なった。並

行して 10^{-3} M 濃度の IBP とグリオキシル酸および IBP を同時に添加してグリシン生成の影響を検討した。

遊離アミノ酸の分析：アミノ酸の分析は，著者ら[4]が血漿について行なった方法に準じた。方法の概略は次の通りである。4.17 mℓの培地に 16.7 mℓの 1％ピクリン酸を加えて除蛋白を行ない，3,000 rpm で15分間遠心分離した。16.7 mℓ の上清をDowex 2, Cl型，1×15 cm カラムを通してピクリン酸を除去した。溶出液を 2.5 mℓ に濃縮し，Spackman[8] らの方法により日立 KLA-3B 型アミノ酸分析計を用いて分析した。

培養細胞のアミノ酸分析：増殖が定常状態に達した培養6日目の 9.57×10^6個/mℓ の細胞を含む無添加培養液から細胞を分離し，培地および夾雑物を除いて懸濁液を調製した。4.8 mℓ の懸濁液と 5.3 mℓ の濃塩酸をパイレックス管に入れ減圧下に封じ，加水分解炉で110℃，24時間加水分解した。加水分解後，濾過によりフミン質を除き，減圧下で過剰の塩酸を除いて乾固させ，pH 2.2 のクエン酸緩衝液を加えて 2.5 mℓ とした。この試料中のアミノ酸をアミノ酸分析計で分析した。

結　　果

1. 細胞増殖と添加剤の影響

1) **細胞増殖**：無添加培養細胞（対照群）では，培養開始時の細胞数が異なっていても細胞の増殖パターンはほぼ同じであった。培養開始時の細胞数が，5×10^4個/mℓ の9日間培養（長期培養）では培養後6日目まで，4×10^5個/mℓ の細胞数での4日間培養（短期培養）では3日目まで，ともに細胞は急速な増加を示したが，その後はゆるやかな増加か，ときには減少を示した。

2) **IBP 添加の影響**：IBP の細胞増殖に及ぼす影響を検討した。結果は図1に示した。細胞の増殖は IBP 濃度が 10^{-6} M 以下ではほとんど影響されなかったが，10^{-4} M でわずかな抑制，10^{-3} M では著しい抑制と細胞の崩壊が観察された。

3) **グリオキシル酸添加の影響**：グリオキシル酸の細胞増殖に及ぼす影響を図2に示した。グリオキシル酸添加により，細胞数は1日目に減少したが，2日目は培養前の数に戻り，それ以降は対照群と同じような増殖様式で推移した。

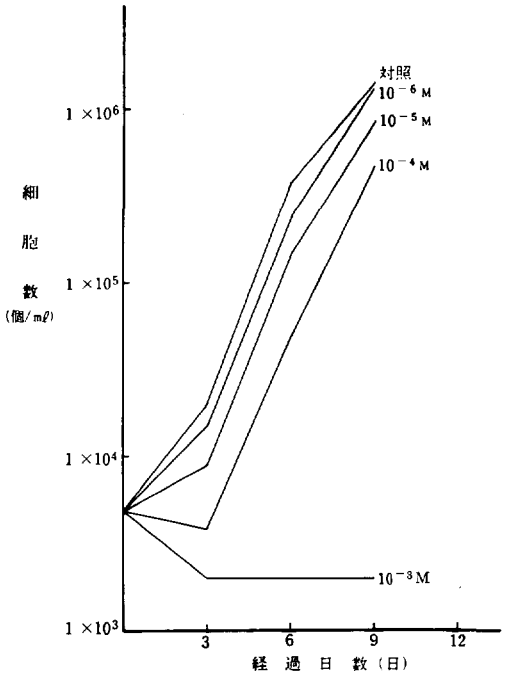

図1　細胞増殖に及ぼす低毒性有機リン農薬 IBP 添加の影響

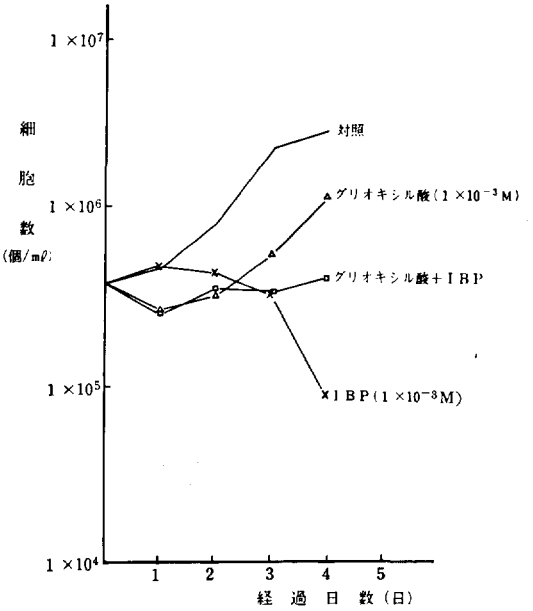

図2　細胞増殖に及ぼすグリオキシル酸と低毒性有機リン農薬 IBP 添加の影響

表1　培養細胞のアミノ酸組成

アミノ酸	アミノ酸組成	細胞1個当りのアミノ酸量
	%	10^{-12} g
リジン	10.86	34.2
ヒスチジン	1.50	4.7
アルギニン	8.04	25.3
アスパラギン酸	10.07	31.7
スレオニン	5.22	16.4
セリン	4.95	15.6
グルタミン酸	14.09	44.3
プロリン	3.42	10.8
グリシン	5.08	16.0
アラニン	6.58	20.7
バリン	6.11	19.2
メチオニン	1.06	3.3
イソロイシン	4.49	14.1
ロイシン	11.79	37.1
チロシン	2.86	9.0
フェニールアラニン	3.89	12.2
計		321.6

4）グリオキシル酸および IBP 同時添加の影響：

培養2日目までの細胞数はグリオキシル酸添加例と同様で，1日目減少，2日目には培養前の細胞数に戻ったが，以後は増加することなく，IBP 添加例とグリオキシル酸添加例の中間の細胞数を保ちながら推移した。

2.　培養細胞のアミノ酸組成

対照群の培養細胞のアミノ酸を測定し，さらに細胞1個当たりのアミノ酸量を算出し，その結果を表1に示した。細胞1個当たりのアミノ酸含量は 10^{-12} g のレベルであった。細胞中に多く含まれていたアミノ酸はリジン，アスパラギン酸，グルタミン酸，ロイシンで，含量の少なかったものはプロリン，チロシン，ヒスチジン，メチオニンであった。

3.　培養細胞におけるアミノ酸のとりこみと添加剤の影響

1）長期培養におけるアミノ酸のとりこみ

培養細胞が培地からとりこんだアミノ酸量を3日ごとに測定し，結果を表2に示した。表中 A 欄は3日間にとりこまれたアミノ酸量を示し，細胞1個当たりのアミノ酸値（表1）を基準として，増加した細胞数（3日目　37×10^6，6日目　138×10^6，9日目　-52×10^6 個/dℓ）に相当するアミノ酸量を算出し B 欄に示した。この表から最初の3日間に細胞にとりこまれたアミノ酸総量は培地中のそれの約46%で，増殖した

表2　長期培養による培養細胞のアミノ酸のとりこみ

アミノ酸	0日～3日		3日～6日		6日～9日		0日～9日
	A*1	B*2	A	B	A	B	A/B*3
	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	
アスパラギン酸	0.22	1.17	0.09	4.38	-0.16	-1.65	0.04
スレオニン	7.30	0.61	2.21	2.26	0.44	-0.85	4.93
セリン	6.46	0.58	3.82	2.15	1.47	-0.81	6.12
グルタミン酸	11.47	1.64	2.87	6.11	2.08	-2.30	3.01
プロリン	0.41	0.40	-0.75	1.49	-1.11	-0.56	-1.09
グリシン	0.88	0.59	-1.19	2.21	-0.35	-0.83	-0.34
アラニン	20.63	0.77	0.53	2.86	4.74	-1.08	10.16
バリン	4.96	0.71	1.21	2.65	0.76	-1.00	4.57
メチオニン	5.80	0.12	0.46	0.46	0.05	-0.17	15.39
イソロイシン	9.20	0.52	1.30	1.95	1.50	-0.73	6.90
ロイシン	19.88	1.37	2.53	5.12	2.93	-1.93	5.56
チロシン	2.92	0.33	0.40	1.24	0.17	-0.47	3.14
フェニールアラニン	4.50	0.45	0.67	1.68	0.22	-0.64	3.59

A：培地から肝細胞によってとりこまれたアミノ酸
B：変化した細胞数に相当するアミノ酸量（表1を参照にし，細胞の各アミノ酸量から算出）
*1　Aの－値は培地への放出
*2　Bの－値は細胞数の減少を表わす.
*3　A/B 値が大きいほど培地中のアミノ酸に対する依存度が高いと考えられる.

細胞数に相当するアミノ酸量をはるかに超えており，シスチンを除くほとんどのアミノ酸のとりこみは培地中のアミノ酸濃度に比例していた。3日以降は増殖した細胞数に相当するアミノ酸のとりこみはほとんどなかった。6日目と9日目のプロリンとグリシンの値から，これらのアミノ酸は培養前における培地中のアミノ酸濃度を上廻っており，この時期に細胞で合成されて培地中に放出されたものと解釈される。

IBP を添加した細胞は，IBP 濃度が低かったためか増殖にほとんど影響がみられず，アミノ酸のとりこみも対照と類似していた。プロリンとグリシンは対照と同様に培地中に放出されていた。

2）短期培養におけるアミノ酸のとりこみ

（1）**対照群**：細胞のアミノ酸のとりこみを1日ごとに観察し，結果を表3に示した。培地からのアミノ酸消失総量は1日目と4日目に多く，細胞数の増加が著しかった2，3日目にはむしろ少なかった。この結果は，長期培養と同様に細胞数の増加とアミノ酸のとりこみ量がかならずしも一致しないことを示している。1日ごとの各アミノ酸のとりこみ量と培養中に増加した細胞数に相当するアミノ酸量を表1より算出し，これと細胞にとりこまれたアミノ酸を対比すると，1日目はアスパラギン酸とグリシンが負（表中A<Bの場合）であったが，他のアミノ酸は正（A>B）であった。アミノ酸の正のとりこみ量は培地中のアミノ酸濃度にほぼ比例していた。スレオニン画分はグルタミンを含むので，この画分のとりこみの増加は，培地に多量含まれていたグルタミンに影響されたものと推察される。培養1日目にとりこみの特に多かったアミノ酸は，グルタミン，グルタミン酸，セリン，アラニン，バリン，イソロイシン，ロイシンであった。2日目には負を示したアミノ酸が増え，リジン，アスパラ

表3　短期培養による培養細胞のアミノ酸のとりこみ

培養日数 / アミノ酸	0日～1日		1日～2日		2日～3日		3日～4日		0日～4日
	A	B	A	B	A	B	A	B	A/B
	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	
リジン	0.42	0.28	0.76	1.40	0.35	5.13	0.65	2.12	0.25
ヒスチジン	0.11	0.04	0.39	0.19	0.25	0.70	0.24	0.29	0.81
アルギニン	0.67	0.21	1.55	1.03	1.34	3.79	1.54	1.57	0.77
アスパラギン酸	0.08	0.26	0.07	1.29	-0.07	4.75	0.18	1.97	0.03
スレオニン	5.65	0.14	0.99	0.67	0.54	2.46	0.83	1.02	1.87
セリン	2.54	0.13	1.71	0.63	1.98	2.34	1.91	0.97	2.00
グルタミン酸	4.21	0.37	1.45	1.81	0.37	6.64	3.07	2.75	0.79
プロリン	0.44	0.09	-0.74	1.62	-0.74	1.62	-0.64	0.67	-0.39
グリシン	-0.03	0.13	-0.38	0.65	-0.74	2.40	-0.52	0.99	-0.40
アラニン	4.83	0.17	0.98	0.85	-0.82	3.10	3.96	1.28	1.66
バリン	2.29	0.16	0.79	0.78	0.48	2.88	1.00	1.19	0.91
メチオニン	1.70	0.03	0.09	0.14	0.40	0.50	0.00	0.21	2.49
イソロイシン	3.86	0.12	0.92	0.58	0.48	2.11	1.24	0.87	1.77
ロイシン	10.29	0.31	1.97	1.51	-0.05	5.56	3.19	2.30	0.13
チロシン	1.07	0.08	0.39	0.36	0.17	1.35	0.37	0.56	0.85
フェニールアラニン	1.71	0.10	0.91	0.50	-0.22	1.83	0.44	0.76	0.89
総アミノ酸 mg/dℓ	39.84		12.43		3.72		17.46		
必須総アミノ酸（E）mg/dℓ	27.1		7.21		2.40		7.96		
非必須総アミノ酸（NE）mg/dℓ	12.74		5.22		1.32		9.50		
E/NE	2.13		1.38		1.82		0.84		

A, B, A/B：表2の注参照

表4　培養細胞のアミノ酸のとりこみに対する IBP 添加の影響

培養日数 / アミノ酸	0日～1日		1日～2日		2日～3日		3日～4日		0日～4日
	A	B	A	B	A	B	A	B	A/B
	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	
リジン	0.58	0.34	-0.22	-0.14	-0.31	-0.35	-0.04	-0.92	-0.01
ヒスチジン	0.27	0.05	-0.01	-0.02	0.16	-0.05	-0.18	-0.13	-1.60
アルギニン	0.92	0.25	0.32	-0.10	0.83	-0.26	-0.02	-0.68	-2.60
アスパラギン酸	0.06	0.32	0.03	-0.13	0.03	-0.32	-0.09	-0.85	-0.03
スレオニン	5.92	0.16	0.08	-0.07	0.53	-0.17	-0.36	-0.44	-12.10
セリン	2.39	0.16	0.71	-0.06	1.08	-0.16	-0.38	-0.42	-7.76
グルタミン酸	4.00	0.44	0.14	-0.18	0.97	-0.45	-1.24	-1.19	-2.80
プロリン	0.42	0.11	-0.27	-0.04	0.03	-0.11	-0.07	-0.29	-0.32
グリシン	0.03	0.16	-0.39	-0.06	0.34	-0.16	-0.19	-0.43	1.78
アラニン	3.65	0.21	-0.31	-0.08	1.62	-0.21	-0.32	-0.56	-7.25
バリン	2.06	0.19	0.08	-0.08	0.66	-0.20	-0.34	-0.52	-4.10
メチオニン	0.96	0.03	0.09	-0.01	0.36	-0.03	-0.20	-0.09	-12.10
イソロイシン	3.50	0.14	0.08	-0.06	0.98	-0.14	-0.59	-0.38	-9.02
ロイシン	9.14	0.37	-0.02	-0.15	2.61	-0.38	-1.22	-0.99	-9.14
チロシン	1.12	0.09	0.01	-0.04	0.22	-0.09	-0.29	-0.24	-3.79
フェニールアラニン	1.73	0.12	-0.02	-0.05	0.24	-0.12	-0.32	-0.33	-4.29

A, B, A/B：表2の注参照

表5　培養細胞のアミノ酸のとりこみに対するグリオキシル酸添加の影響

培養日数 / アミノ酸	0日～1日		1日～2日		2日～3日		3日～4日		0日～4日
	A	B	A	B	A	B	A	B	A/B
	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	
リジン	0.65	-0.43	-0.26	0.23	0.17	0.85	0.14	2.23	0.24
ヒスチジン	0.49	-0.06	-0.28	0.03	0.24	0.12	0.12	0.31	1.43
アルギニン	0.99	-0.32	0.63	0.17	0.48	0.63	1.16	1.65	1.53
アスパラギン酸	0.07	-0.40	-0.02	0.21	-0.02	0.78	0.05	2.07	0.03
スレオニン	6.17	-0.21	-0.24	0.11	0.35	0.41	0.56	1.07	4.96
セリン	2.53	-0.20	0.04	0.10	0.23	0.39	1.20	1.02	3.05
グルタミン酸	5.02	-0.55	-0.83	0.29	0.78	1.09	0.77	2.89	1.54
プロリン	0.53	-0.14	-0.03	0.07	-0.03	0.27	-0.44	0.70	0.03
グリシン	-0.42	-0.20	-0.96	0.11	-0.50	0.40	-0.60	1.04	-1.85
アラニン	5.44	-0.26	-1.29	0.14	-0.10	0.51	0.67	1.35	2.98
バリン	2.54	-0.24	-0.34	0.13	1.07	0.47	-0.10	1.25	1.97
メチオニン	1.54	-0.04	-0.35	0.02	0.07	0.08	0.26	0.22	5.43
イソロイシン	4.19	-0.18	-0.46	0.09	0.72	0.35	0.83	0.92	4.48
ロイシン	11.25	-0.46	-1.44	0.25	1.78	0.92	1.30	2.42	4.13
チロシン	1.05	-0.11	-0.14	0.06	0.11	0.22	0.01	0.59	1.36
フェニールアラニン	1.76	-0.15	-0.15	0.08	0.13	0.30	0.31	0.80	2.05

A, B, A/B：表2の注参照

表6　培養細胞のアミノ酸のとりこみに対するIBPとグリオキシル酸同時添加の影響

培養日数 / アミノ酸	0日～1日		1日～2日		2日～3日		3日～4日		0日～4日
	A	B	A	B	A	B	A	B	A/B
	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	mg/dℓ	
リジン	0.75	-0.46	-0.67	0.34	0.57	-0.03	-0.35	0.24	3.33
ヒスチジン	0.52	-0.06	-0.20	0.05	0.04	-0.01	0.34	0.03	70.00
アルギニン	1.48	-0.34	-0.33	0.25	0.45	-0.03	0.68	0.18	38.67
アスパラギン酸	0.10	-0,44	-0.02	0.32	-0.06	-0.03	0.90	0.22	11.5
スレオニン	5.95	-0.22	-0.38	0.16	0.33	-0.02	0.70	0.11	165.0
セリン	2.06	-0.21	-0.41	0.16	-0.08	-0.02	0.68	0.11	56.25
グルタミン酸	4.54	-0.59	-0.98	0.44	0.80	-0.04	-0.11	0.31	38.64
プロリン	0.40	-0.15	-0.05	0.11	0.01	-0.01	-0.07	0.08	9.67
グリシン	0.62	-0.21	-1.72	0.16	-0.01	-0.02	0.11	0.11	-25.0
アラニン	0.70	-0.28	-1.92	0.21	1.02	-0.02	2.15	0.14	119.0
バリン	2.34	-0.26	-0.29	0.19	0.39	-0.02	0.37	0.13	56.2
メチオニン	1.15	-0.04	0.03	0.03	0.72	-0.003	-0.36	0.02	151.0
イソロイシン	3.94	-0.19	-0.60	0.14	0.63	-0.01	0.82	0.10	119.8
ロイシン	10.44	-0.50	-1.48	0.37	1.57	-0.04	1.66	0.26	135.4
チロシン	0.95	-0.12	-0.06	0.09	0.19	-0.01	0.21	0.06	64.5
フェニールアラニン	1.78	-0.16	-0.37	0.12	0.20	-0.01	0.45	0.08	68.7

A, B, A/B：表2の注参照

ギン酸，グルタミン酸，プロリン，グリシン，メチオニンがこれに該当した。3日目には，すべてのアミノ酸が負を示した。4日目にはセリン，グルタミン酸，アラニン，イソロイシン，ロイシンが正となり，他は負を示した。

(2) **IBP 添加の影響**：1×10^{-3} M 濃度の IBP 添加時のアミノ酸のとりこみの結果を表4に示した。1日目のアミノ酸のとりこみは対照とほぼ同じで，アスパラギン酸とグリシンは培地に放出された。2日目には，リジン，プロリン，グリシン，アラニンが負を示したほかは正のとりこみを示した。しかし，この時期には細胞数が減少し始めたので，細胞におけるアミノ酸の出納は真のとりこみによるものか，それとも細胞の崩壊に伴うアミノ酸放出によるものかは明らかでないが，おそらく両方の現象が重なって起こったものと思われる。4日間を通して，細胞内で合成されたと推察されるアミノ酸はグリシンのみであった。

(3) **グリオキシル酸添加の影響**：1×10^{-3} M 濃度のグリオキシル酸添加時のアミノ酸のとりこみを表5に示した。1日目に細胞数の減少がみられたにもかかわらず，アミノ酸のとりこみは対照とほぼ同様であった。その後わずかに細胞増殖がみられたが，アミノ酸のとりこみはほとんどなかった。4日間を通して合成されたとみられるアミノ酸はリジン，アスパラギン酸，プロリン，グリシンであった。1，2日目の培地中へのグリシンの放出は対照より顕著であった。

(4) **グリオキシル酸および IBP の同時添加の影響**：細胞のアミノ酸のとりこみに対するグリオキシル酸および IBP の同時添加の影響を表6に示した。1日目にとりこまれたアミノ酸総量は，グリオキシル酸添加例とほぼ同様であった。2日目には負のとりこみを示すアミノ酸が増加した。4日目にはリジン，グルタミン酸，プロリン，メチオニンが負のとりこみを示したが，それ以外はわずかながら正のとりこみを示した。4日間を通して合成されたとみられるアミノ酸はグリシンのみであった。

考　　察

一般に細胞の増殖速度は培養前の細胞数に影響されるといわれるが，今回の試験で，9～13日間培養における細胞の増殖パターン（図1）と4日間培養における増殖パターン（図2）を比較すると両者はかなり類似していた。

生体内における IBP の阻害効果をマウス血漿コリ

ンエステラーゼ活性を指標として観察した場合，その阻害効果は 10^{-6}～10^{-5} M ではほとんどなく，10^{-3} M 以上になると急激に強まることが知られている。[1] 本実験で培養細胞の増殖におよぼす IBP の影響は上述の知見ときわめて類似しており，10^{-3} M 以上で細胞増殖は著明に抑制された。

グリオキシル酸の添加は培養1日目に細胞数の減少をもたらした（図2）。これはグリオキシル酸の添加量が細胞の生理的耐量をはるかに超えていたため，細胞増殖に軽度の抑制効果を示したものと思われる。2日目から細胞が増殖し始めたのは，グリオキシル酸が細胞内で代謝されて細胞増殖に対する抑制濃度を下廻ったものと推察され，これらの結果からグリオキシル酸の細胞に対する毒性効果は低いものと考えられる。

ラットの肝由来培養細胞のアミノ酸組成（表1）と生体の幼豚肝のアミノ酸組成（未発表）を比較したところ，両者に著しい差は認められなかった。おそらく，肝蛋白質のアミノ酸組成には動物の種類による著しい差がないものと思われる。

表7は表3の4日間に細胞にとりこまれたアミノ酸の総量から各アミノ酸の比率（百分比）を計算し，培養細胞のアミノ酸組成（表1）と比較したものである。両者の比率が類似してるものはヒスチジン，グルタミン酸，アラニン，バリン，ロイシン，チロシン，フェニールアラニンで，差の著しかったものは，リジン，アスパラギン酸，グリシン，イソロイシンであった。後者のうち特に差の顕著であったアスパラギン酸とグリシンは培養細胞で活発に合成されたものと推察される。また，培地中でリジン，アスパラギン酸，プロリン，グリシンの濃度が著しく低いことからも，これらのアミノ酸が活発に生成されることが示唆される。実際に培養が進むにつれてグリシンとプロリンの放出がみられた（表2，3）。特に細胞内で生成が顕著であったグリシンとプロリンは肝組織の間質である線維の生成に対して他のアミノ酸より多く利用される。培養細胞におけるこれらのアミノ酸の生成の促進はおそらく細胞増殖に伴う結合織の増殖と関連あるものと思われる。

反芻動物の血中遊離アミノ酸の栄養生理学的なこれまでの研究で，低蛋白質給与，[5] 尿素飼料給与，[6] 四塩化炭素投与[7] などで血中遊離グリシンの割合が高くなることが報告されている。これらの原因を追求するため，グリシン生成の主経路であるセリン[2] 以外の経路としてグリオキシル酸の関与[3] を生体で検討したが，

表7　培養細胞のアミノ酸組成ととりこまれた各アミノ酸の比率の比較

アミノ酸	細胞のアミノ酸の百分比	とりこまれたアミノ酸の百分比*1
	%	%
グルタミン酸	14.1	12.4
ロイシン	11.8	20.9
リジン	10.9	3.0
アスパラギン酸	10.1	0.4
アルギニン	8.0	6.9
アラニン	6.6	12.2
バリン	6.1	6.2
スレオニン	5.2	10.9
グリシン	5.1	-2.4*2
セリン	5.0	11.1
イソロイシン	4.5	8.8
フェニールアラニン	3.9	3.9
プロリン	3.4	-1.5*2
チロシン	2.9	2.7
ヒスチジン	1.5	1.4
メチオニン	1.1	3.0

*1 培養4日間のとりこみから計算した
*2 －記号は培地への放出を示す

明らかにできなかった。今回の培養細胞を用いた実験においてもグリオキシル酸の生理的意義は明らかにできなかった。しかし，グリオキシル酸添加によって細胞増殖が抑えられた初期に，グリシンの放出が対照を上廻った現象から，一部グリオキシル酸がグリシン生成に関与していることも考えられ，この点については将来検討する余地があると思う。

短期培養において，とりこまれたアミノ酸の E/NE（総必須アミノ酸/総非必須アミノ酸）は，培養の初期では必須アミノ酸のより多いとりこみにより高い値を示し，増殖が定常状態になるにつれて必須アミノ酸のとりこみが非必須アミノ酸に比して少なくなり E/NE が低くなった（表3）。培養細胞では生体のような代謝制御がなされていないので，生体との比較は困難であるが，定常状態に達した4日目の E/NE は定常状態にあると考えられる生体の肝遊離アミノ酸の E/NE（約0.3）に近づいたものと推察される。

本実験では細胞崩壊などによって培地中に放出されたアミノ酸については明らかな知見は得られなかったが，肝由来培養細胞を用いることによって生体で得られていないいくつかの事象が明らかになった。

引用文献

1) 後藤信男ほか：汚染環境が農漁業生物に与える慢性影響の解明に関する研究 (5) ストレス環境下における障害発現に関する研究. 環境庁企画調整局環境保全研究成果集. **1**, 29-28-38, (1977).

2) 菊地香郎, 吉田匡：脊椎動物におけるグリシン, セリンの生理的代謝経路. 蛋白質・核酸・酵素 **17**, 317-330 (1972).

3) Richardson, K. E. & Thompson, J. S. : L-Alanine : glyoxylate aminotransferase. *Method. Enzymol.* **17 A**, 163-167 (1970).

4) 新林恒一, 米村寿男：家畜の血漿遊離アミノ酸について. *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)* **3**, 36-43 (1963).〔本文英文. 和文抄録：家畜衛試研究報告 第47号, 68 (1963).〕

5) Shimbayashi, K., Ide, Y. & Yonemura, T. : Observation on plasma free amino acids of cow under different feeding. *Agric. Biol. Chem.* **31**, 628-632 (1967).

6) 新林恒一, 小原嘉昭, 米村寿男：尿素飼料給与時のめん羊の反芻胃および血中の遊離アミノ酸について. 日本畜産学会報 **46**, 146-153 (1975).

7) 新林恒一, 小原嘉昭：ヤギの四塩化炭素中毒における臨床生化学的観察. 家畜衛試研究報告 第77号, 58-63 (1978).

8) Spackman, D. H., Stein, W. H. & Moore, S. : Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acid. *Anal. Chem.* **30**, 1190-1206 (1958).

9) Takaoka, T. & Katsuta, H. : An improved synthetic medium suitable for tissue culture of various mammalian cells. *Jpn. J. Exp. Med.* **45**, 11-17 (1975),

10) Takaoka, T., Yasumoto, S. & Katsuta, H. : A simple method for the cultivation of rat liver cells. *Jpn. J. Exp. Med.* **45**, 317-326 (1975).