

図6B 予備実験6

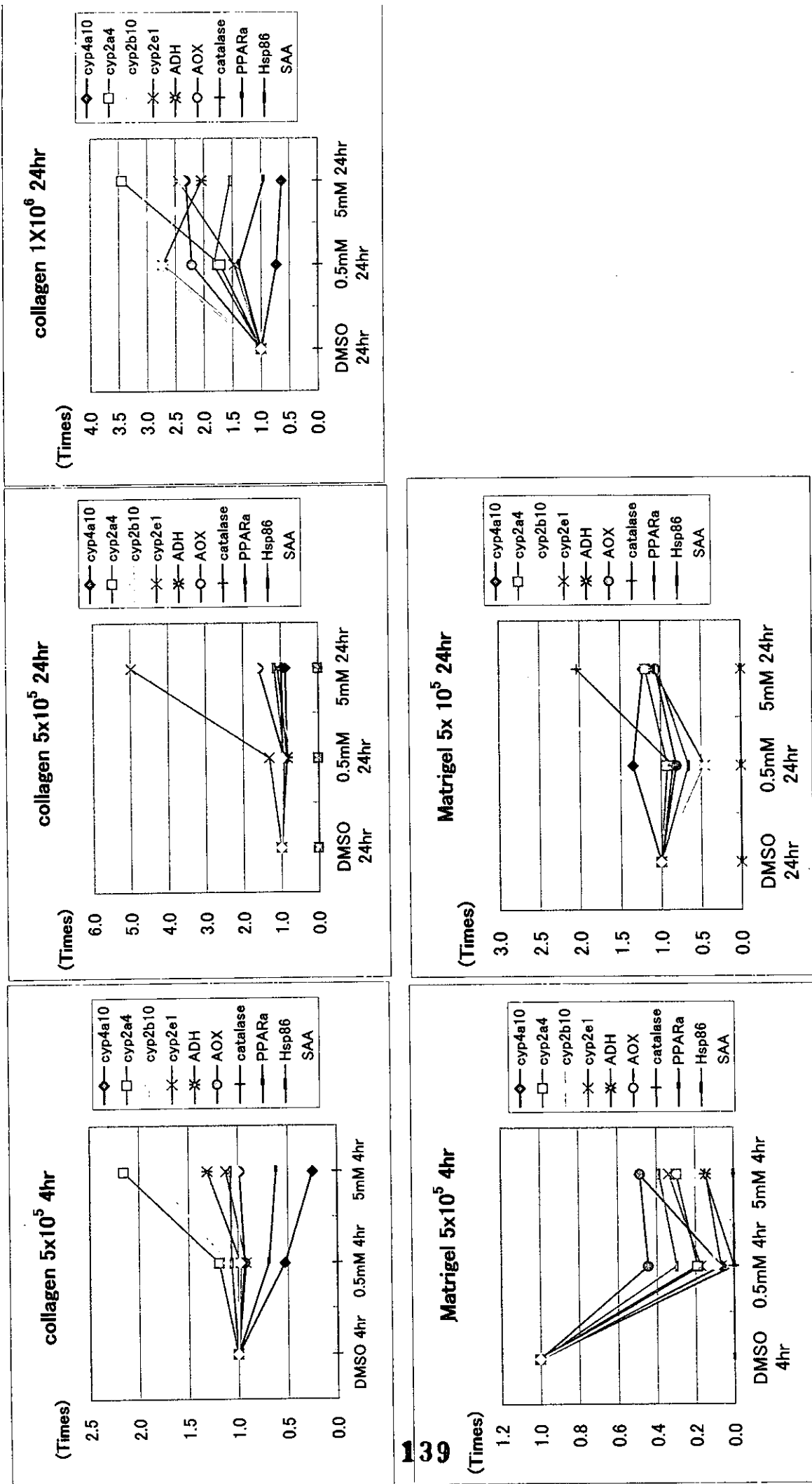


図7B 予備実験7

|           | Cyp4a10 | Cyp2a4 | Cyo2b10 | Cyp2e1 | ADH  | AOX  | Hsp86 | PPARa | SAA  | UO   |
|-----------|---------|--------|---------|--------|------|------|-------|-------|------|------|
| DMSO 4hr  | 1.00    | 1.00   | 1.00    | 1.00   | 1.00 | 1.00 | 1.00  | 1.00  | 1.00 | 1.00 |
| 0.5mM 4hr | 0.98    | 1.27   | 1.12    | 0.53   | 0.97 | 0.93 | 1.12  | 0.92  | 1.13 | 0.83 |
| 1mM 4hr   | 0.89    | 6.09   | 1.80    | 0.62   | 0.92 | 1.11 | 0.88  | 0.87  | 0.91 | 1.03 |
| 5mM 4hr   | 0.71    | 3.71   | 1.27    | 0.46   | 0.94 | 0.94 | 1.01  | 1.04  | 0.92 | 0.74 |

|           | Cyp4a10 | Cyp2a4 | Cyo2b10 | Cyp2e1 | ADH  | AOX  | Hsp86 | PPARa | SAA  | UO   |
|-----------|---------|--------|---------|--------|------|------|-------|-------|------|------|
| DMSO 6hr  | 1.00    | 1.00   | 1.00    | 1.00   | 1.00 | 1.00 | 1.00  | 1.00  | 1.00 | 1.00 |
| 0.5mM 6hr | 1.24    | 0.85   | 1.14    | 0.92   | 1.04 | 1.24 | 1.12  | 1.11  | 1.19 | 1.37 |
| 1mM 6hr   | 1.35    | 1.62   | 1.00    | 0.93   | 0.95 | 1.15 | 1.06  | 1.19  | 1.33 | 1.11 |
| 5mM 6hr   | 1.27    | 1.51   | 0.85    | 0.82   | 0.58 | 1.04 | 0.85  | 1.06  | 0.86 | 0.86 |

|            | Cyp4a10 | Cyp2a4 | Cyo2b10 | Cyp2e1 | ADH  | AOX  | Hsp86 | PPARa | SAA  | UO   |
|------------|---------|--------|---------|--------|------|------|-------|-------|------|------|
| DMSO 24hr  | 1.00    | 1.00   | 1.00    | 1.00   | 1.00 | 1.00 | 1.00  | 1.00  | 1.00 | 1.00 |
| 0.5mM 24hr | 1.02    | 1.25   | 0.95    | 0.96   | 1.27 | 0.99 | 1.07  | 0.92  | 1.46 | 0.88 |
| 1mM 24hr   | 0.82    | 0.95   | 0.91    | 0.62   | 1.60 | 1.06 | 1.20  | 0.81  | 1.21 | 0.74 |
| 5mM 24hr   | 2.61    | 3.71   | 1.67    | 0.81   | 1.68 | 1.17 | 1.21  | 1.32  | 1.00 | 1.74 |

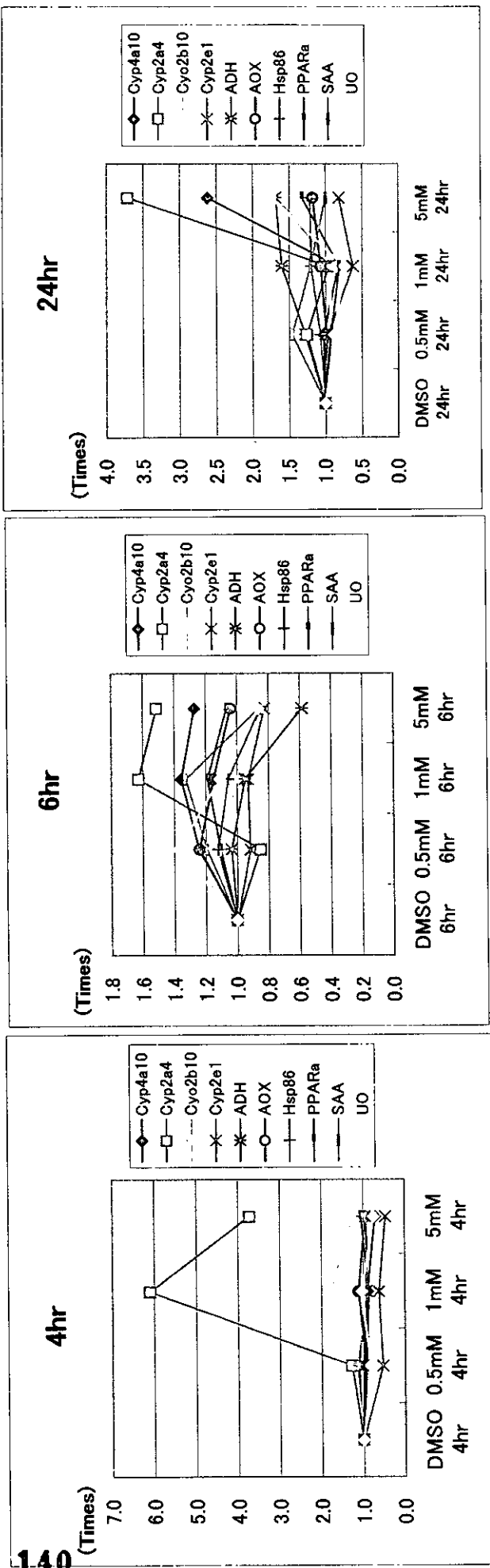


図8B 予備実験8

|           | Cyp4a10 | Cyp2a4 | Cyo2b10 | Cyp2e1 | ADH  | AOX  | Hsp86 | PPARa | SAA  | UO   |
|-----------|---------|--------|---------|--------|------|------|-------|-------|------|------|
| DMSO 4hr  | 1.00    | 1.00   | 1.00    | 1.00   | 1.00 | 1.00 | 1.00  | 1.00  | 1.00 | 1.00 |
| 2.5mM 4hr | 1.17    | 1.58   | 1.15    | 1.53   | 1.46 | 0.99 | 1.32  | 0.98  | 1.06 | 1.11 |

|            | Cyp4a10 | Cyp2a4 | Cyo2b10 | Cyp2e1 | ADH  | AOX  | Hsp86 | PPARa | SAA  | UO   |
|------------|---------|--------|---------|--------|------|------|-------|-------|------|------|
| DMSO 24hr  | 1.00    | 1.00   | 1.00    | 1.00   | 1.00 | 1.00 | 1.00  | 1.00  | 1.00 | 1.00 |
| 2.5mM 24hr | 1.24    | 1.01   | 1.21    | 2.08   | 1.22 | 1.02 | 1.01  | 1.39  | 1.06 | 1.10 |
| 5.0mM 24hr | 1.35    | 2.64   | 0.90    | 3.10   | 1.54 | 1.27 | 1.15  | 1.24  | 1.53 | 1.26 |
| 10mM 24hr  | 1.27    | 1.18   | 1.64    | 3.47   | 1.56 | 1.39 | 1.30  | 1.66  | 1.51 | 1.39 |

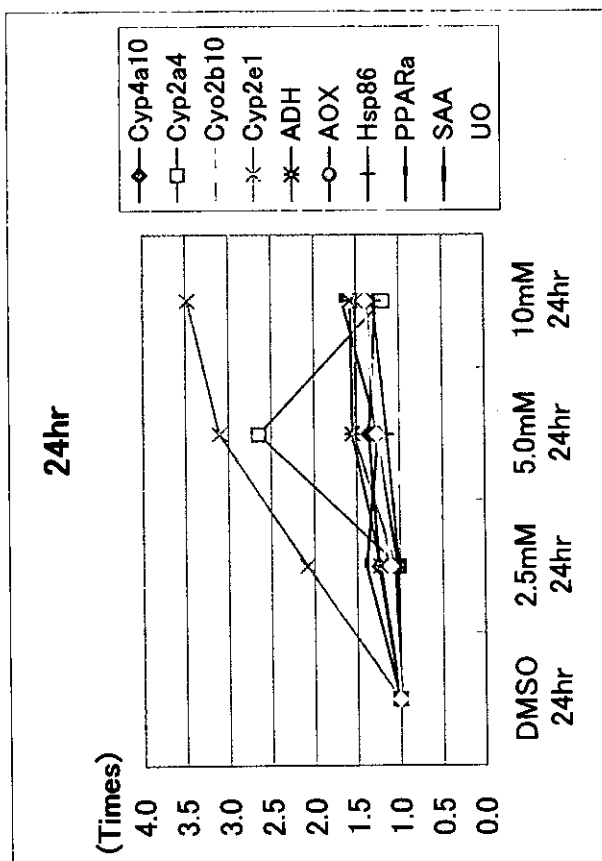
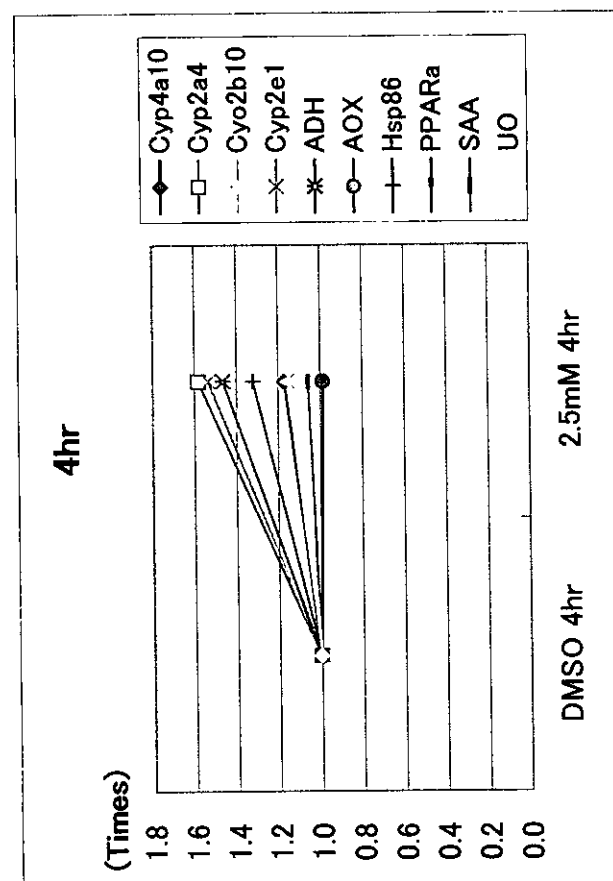


表1 予備実験結果 要約

|                      | 予備実験1                                          | 予備実験2                                      | 予備実験3                              | 予備実験4                               |
|----------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| 目的                   | 至適曝露濃度、曝露時間の検索                                 | Weid vs hepatocyte<br>hepatocyteは本当にLDH↑か？ | 細胞外マトリックの検討                        | MatrigelでのCyp系の反応を観察                |
| hepatocyte viability | 83.80%                                         | 92%                                        | 88.80%                             | 84%                                 |
| seeding cell conc.   | 5x 10 <sup>6</sup> cell/ml                     | 5x 10 <sup>6</sup> cell/ml                 | 5x 10 <sup>6</sup> cell/ml         |                                     |
| 曝露までの時間              | 4hr                                            | 4hr or 12hr                                | 12hr                               | 4hr                                 |
| 曝露までのMedium          | WE id + FBS                                    | WE id + FBS                                | hepatocyte                         |                                     |
| Medium               | hepatocyte                                     | WE id or hepatocyte                        | hepatocyte                         |                                     |
| environment          | collagen coat                                  | collagen coat                              | collagen coat, Matrigel            | Matrigel                            |
| exposed conc.        | control (DMSO-, DMSO+), 0.1mM, 0.5mM, 1mM, 5mM | DMSO, 0.5, 5                               | DMSO, 0.5mM, 5mM, 10mM             | DMSO, 0.5mM, 5mM                    |
| exposed time         | 1, 2, 12, 24hr                                 | 12, 24hr                                   | 12, 24hr                           | 2, 6, 12, 24 hr                     |
| result:LDH 代謝産物      | LDHは濃度依存性に↑                                    | LDHはWeid→。hepatocyteはやや↑ではあるが35>           | Collagen coatはTTCが↑だがTCAは→         | 代謝産物は検出されなかった。                      |
|                      | 代謝産物は濃度依存性に↑                                   | 代謝産物はWeid > hepatocyte                     | MatrigelはTTC,TCA→である。              | LDHは3ヶタ                             |
|                      |                                                |                                            | LDHはCollagen coatは高いがMatrigelは→    |                                     |
| result:RealTime PCR  | 1hr、2hr後はCyp系は↑せず、4a10,2a4は↓が見られた。             | hepatocyteは12hr,24hrともに5mMでCyp系↑           | Collagen coatは12hr後、5mMでCyp2e1↑のみ。 | どの時点でもCyp系の反応は良かった。                 |
|                      | AOX↑↑、Hsp86やや↑が観察された。                          | WEidはCyp系→                                 | Matrigelはほとんど変化なし。                 | 2hrと6hrでは2hrの方が反応が大きい。              |
|                      | Cyp系は12hr後にCyp4a10やや↑が観察された以外は→                |                                            |                                    | early responseを観察するならば、4hrが妥当と思われる。 |

|                      | 予備実験5                                                                                                | 予備実験6                                                                              | 予備実験7                                                   | 予備実験8                                          |
|----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| 目的                   | collagen coat-collagen gel sandwich法でCyp系が変化する                                                       | cell attachmentまでの時間を3hrとするとcellの形とCyp系の変化collagen overlay VS Matrigel overlay     | 曝露濃度、曝露時間の検討                                            | 曝露濃度の検討                                        |
| hepatocyte viability | 86%                                                                                                  | 89%                                                                                | 89%                                                     | 86%                                            |
| seeding cell conc.   | 5x 10 <sup>5</sup> cell/ml                                                                           | 5x 10 <sup>5</sup> cell/ml, 1x 10 <sup>6</sup> cell/ml                             | 1x 10 <sup>6</sup> cell/ml                              | 1.5x 10 <sup>6</sup> cell/ml                   |
| Medium までの時間         | 4hr                                                                                                  | 3hr                                                                                | 3hr                                                     | 4hr                                            |
| 曝露までのMedium          | WE id + FBS<br>Bubbling                                                                              | WE id + FBS<br>Bubbling                                                            | WE id + FBS<br>Bubbling                                 | WE id + FBS<br>Bubbling                        |
| Gel overlay までの時間    | 24hr                                                                                                 | 4hr                                                                                | 4hr                                                     | 4hr                                            |
| 曝露までの時間              | 24+18hr                                                                                              | 38hr                                                                               | 38hr                                                    | 38hr                                           |
| Medium               | hepatocyte                                                                                           | hepatocyte                                                                         | hepatocyte                                              | hepatocyte                                     |
| environment          | collagen coat-collagen gel sandwich                                                                  | collagen coat-collagen gel, collagen coat-Matrigel                                 | collagen coat-collagen gel                              | collagen coat-collagen gel                     |
| exposed conc.        | DMSO, 0.5mM, 5mM                                                                                     | DMSO, 0.5mM, 5mM                                                                   | DMSO, 0.5mM, 1mM, 5mM                                   | DMSO, 2.5mM, 5mM, 10mM                         |
| exposed time         | 4, 24 hr                                                                                             | 4, 24 hr                                                                           | 4, 6, 24 hr                                             | 4, 24 hr                                       |
| result:LDH 代謝産物      | LDHはdose dependentに↑だが2桁で納まっている。                                                                     | LDHはどのenvironmentでも2桁。Matrigelがやや高め？                                               | LDHはほぼdose dependentに↑だが2桁で納まっている。                      |                                                |
|                      | TTCのみdose dependentに検出された。                                                                           | TTCのみdose dependentに検出された。Matrigelは低め。                                             | TTCのみdose dependentに検出された。                              |                                                |
|                      | Gel(-)であるとTTC↑、LDH↑である。                                                                              |                                                                                    |                                                         |                                                |
| result:RealTime PCR  | 4hr後ではあまり変化ない。                                                                                       | 5x 10 <sup>5</sup> cell/mlは5mM 4hrでCyp2a4 ↑, 5mM 24hrでCyp2e1 ↑であった。                | 曝露24hrは5mMでCyp2A4, Cyp4a10が↑。                           | 曝露4hrは2.5mMではどの遺伝子も軽度の↑が見られるが2倍の変化ではない。        |
|                      | 24hr後はCyp4a10のみが2倍以上の変化が見られた。                                                                        | 1x 10 <sup>6</sup> cell/mlは0.5mMでも殆んどのCyp系が↑した。(データは24hrのみ)                        | 曝露4hrはCyp2a4が1mM, 5mMで↑以外は遺伝子の発現に変化なし。                  | 曝露24hrはCyp2e1が2.5mMより↑じている。Cyp2a4の↑が5mMで観察された。 |
|                      | 24hrのCell attachment timeを設けたので、cellが完全にmonolayerとなった。Cellがextensionしなない、Cypの代謝を誘導しないmolophologyなのは？ | Matrigelは5x 10 <sup>5</sup> cell/mlでは4hrで→or ↓, 24hrでは5mMでCyp2b10, Cyp2e1 ↑が観察された。 | 曝露6hrは2倍を超える変化は見られなかった。Cyp2a4がやや↑                       |                                                |
|                      |                                                                                                      |                                                                                    | 4hrと6hrの比較では6hrの方が変化は乏しい。                               |                                                |
|                      |                                                                                                      |                                                                                    | 0.5mMと1mMの比較では1mMでCyp2a4の大きい変化が見られたが、その他の遺伝子の変化はわずかである。 |                                                |

## 参照 1

### 肝細胞の初代培養法

#### 準備するもの

全ての過程は無菌室で行い、無菌室には以下の機材を設置した。

#### 無菌室に準備する機材

|                          |                           |         |
|--------------------------|---------------------------|---------|
| クリーンベンチ(解剖用)             | Clean Bench               | HITACHI |
| クリーンベンチ(培養用)             | NKsystem CleanBench       | シナノ製作所  |
| 低速冷却遠心機                  | himac CF702               | HITACHI |
| 倒立位相差顕微鏡                 | DIAPHOTO                  | NIKON   |
| CO <sub>2</sub> インキュベーター |                           | ESPEC   |
| pH メーター                  | pH METER F-21             | HORIBA  |
| 送液ポンプ                    | PERISTALTIC PUMP PST-106N | IWAKI   |
| サーキュレーター                 | THERMAL ROBO TR1          | iuchi   |
| アスピレーター                  | DAP-30                    | ULVAL   |
| 電子天秤                     | HF-400                    | AND     |
| スターラー                    | MGNETIC STIRRER           | iuchi   |

#### 準備する器具

|                                               |                 |         |
|-----------------------------------------------|-----------------|---------|
| メスピペット(1ml、5ml、10ml、25ml、50ml)                | STRIPETTE       | costar  |
| ピペッター                                         | EXPRESS         | FALCON  |
| 遠沈管(1.5ml、15ml、50ml)                          | Centrifuge Tube | Corning |
| ピペットチップ (20 $\mu$ l、200 $\mu$ l、1000 $\mu$ l) | PIPETTE TIP     | AXYGEN  |
| マイクロピット                                       | PIPETTE MAN     | GILSON  |
| 広口駒込ピペット                                      |                 | IWAKI   |
| パスツールピペット                                     |                 | IWAKI   |
| 消毒用アルコール                                      |                 | WAKO    |
| 滅菌フィルター                                       |                 | Corning |
| 培養フラスコ                                        |                 | FALCON  |
| シャーレ                                          | 60mm            | FALCON  |
| 細胞濾過用 mesh                                    |                 |         |
| 26G 注射針                                       | フローマックス 26G     | NIPRO   |
| 1ml シリンジ                                      |                 | TERUMO  |
| 18G 留置針                                       | サーフローフラッシュ 18G  | TERUMO  |

|         |                |        |
|---------|----------------|--------|
| 20G 留置針 | サーフローフラッシュ 20G | TERUMO |
| チューブ    | エクステンションチューブ   | トップ    |
| 三方活栓    | ロータリー三方活栓付チューブ |        |

---

準備する試薬

---

|                                                      |                   |            |
|------------------------------------------------------|-------------------|------------|
| NaCl                                                 |                   | WAKO       |
| KCl                                                  |                   | WAKO       |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O |                   | WAKO       |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      |                   | WAKO       |
| HEPES                                                |                   | SIGMA      |
| EGTA                                                 |                   | SIGMA      |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                 |                   | WAKO       |
| NaHCO <sub>3</sub>                                   |                   | WAKO       |
| Collagenase typeIV                                   |                   | SIGMA      |
| Trypsin Inhibitor                                    |                   | SIGMA      |
| NaOH                                                 |                   | WAKO       |
| HCl                                                  | 30% HCl           | WAKO       |
| 生理食塩水                                                |                   | 大塚製薬       |
| Heparin                                              | ノボヘパリン 1000U/ml   | Aventis    |
| Nembutal                                             | ネンブタール注射液 50mg/ml | DABBOT     |
| Williams' medium E                                   |                   | GIBCO BRL  |
| HepatoZYME-SFM                                       |                   | GIBCO BRL  |
| Dexamethasone                                        |                   | SIGMA      |
| Insulin                                              |                   | SIGMA      |
| Fetal Bovine Serum                                   |                   | GIBCO BRL  |
| L-glutamine                                          | 200mM             | GIBCO BRL  |
| Amphotericin B                                       | Fungizon 250mg/ml | GIBCO BRL  |
| 0.5%Trypan Blue                                      |                   | GIBCO BRL  |
| Collagen I                                           | 3.66 mg/ ml       | BD         |
| 10×PBS                                               |                   | GIBCO BRL  |
| TRIzol                                               |                   | Invitrogen |
| クロロホルム                                               |                   | WAKO       |
| エタノール                                                |                   | WAKO       |
| イソプロパノール                                             |                   | WAKO       |

---

## 試薬の調製

### I. 肝細胞分離に用いる溶液

#### 肝細胞分離に用いる溶液の組成

| 試薬                                                   | Preperfusion Buffer <sup>(5)</sup><br>(g/l) | Collagenase Buffer <sup>(6)</sup><br>(g/l) | Final<br>Concentration |
|------------------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------|
| NaCl                                                 | 8.0 g                                       | 8                                          |                        |
| KCl                                                  | 0.4                                         | 0.4                                        |                        |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O | 0.06                                        | 0.06                                       |                        |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 0.06                                        | 0.06                                       |                        |
| HEPES                                                | 2.4                                         | 2.4                                        | 10 mM                  |
| EGTA                                                 | 0.19                                        | -                                          | 0.5 mM                 |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                 | -                                           | 0.74                                       | 5 mM                   |
| NaHCO <sub>3</sub>                                   | 0.35                                        | 0.35                                       |                        |
| Collagenase<br>(Type IV)                             | -                                           | 0.25                                       | 0.025% (w/v)           |
| Trypsin Inhibitor<br>(Type II-S)                     | -                                           | 0.05                                       | 0.005% (w/v)           |
| PH                                                   | 7.4-7.5                                     | 7.5-7.6                                    |                        |

実際に溶液を作成するには事前に 10×Buffer Base、Collagenase Buffer Base、10%NaHCO<sub>3</sub>、0.5%Trypsin Inhibitor を用意し調製した。

#### (1) ×10 Buffer Base (500ml)

|                                                      |        |
|------------------------------------------------------|--------|
| NaCl                                                 | 40.0 g |
| KCl                                                  | 2      |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O | 0.3    |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                      | 0.3    |
| HEPES                                                | 12     |

D.W で 500ml にメスアップし 4℃で保存

#### (2) 10% NaHCO<sub>3</sub>

|                    |        |
|--------------------|--------|
| NaHCO <sub>3</sub> | 10 g   |
| DW                 | 100 ml |

オートクレーブ滅菌を行い、室温で保存。

#### (3) Collagenase Buffer Base (500ml)

|                                |       |
|--------------------------------|-------|
| ×10 Buffer base <sup>(1)</sup> | 50 ml |
|--------------------------------|-------|



|                                       |         |
|---------------------------------------|---------|
| DW                                    | 450 ml  |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O  | 0.37 g  |
| 10% NaHCO <sub>3</sub> <sup>(2)</sup> | 1.75 ml |

10 % NaOH を用いて pH7.5 に調製した。

フィルター滅菌後、4℃にて保存。

(4) 0.5% Trypsin inhibitor

|                                      |        |
|--------------------------------------|--------|
| Trypsin inhibitor (Type II-S; Sigma) | 250 mg |
| PBS (-)                              | 50 ml  |

フィルター滅菌後、-20℃で保存。

(5) Preperfusion Buffer (500ml)

|                                       |         |
|---------------------------------------|---------|
| × 10 Buffer base <sup>(1)</sup>       | 50 ml   |
| DW                                    | 450 ml  |
| EGTA                                  | 0.095 g |
| 10% NaHCO <sub>3</sub> <sup>(2)</sup> | 1.75 ml |

10 % NaOH を用いて pH7.5 に調製後、フィルター滅菌し 4℃で保存。

(6) Collagenase Buffer

|                                        |        |
|----------------------------------------|--------|
| Collagenase Buffer Base <sup>(3)</sup> | 100 ml |
| Collagenase (Type IV; Sigma)           | 25 mg  |
| 0.5% trypsin inhibitor <sup>(4)</sup>  | 1.0 ml |

30 分間、スターラーで攪拌。PH7.5 に調製後、フィルター滅菌を行い 4℃で保存。調製当日に使用。

## II. 肝細胞初代培養に用いる培養液

肝細胞の初代培養には洗浄に Williams' medium E、接着・伸展に Williams' medium E + Fetal Bovine Serum、培養に HepatoZYME の培養液をそれぞれ用いた。Williams' medium E には insulin、dexamethasone を添加した。

|                    | Weid <sup>(10)</sup> | WEid·FBS <sup>(11)</sup> | HepatoZYME·L-glutamine <sup>(12)</sup> |
|--------------------|----------------------|--------------------------|----------------------------------------|
| WE                 | ○                    | ○                        | —                                      |
| Insulin            | 4mU/ml               | 4mU/ml                   | —                                      |
| Dexamethasone      | 0.1μM                | 0.1μM                    | —                                      |
| Fetal Bovine Serum | —                    | 5%                       | —                                      |
| HepatoZYME·SFM     | —                    | —                        | ○                                      |
| L-glutamine        | —                    | —                        | 2mM                                    |
| HEPES              | 25mM                 | 25mM                     | 25mM                                   |

- WE: Williams' medium E
- i: Insulin
- d: Dexamethasone
- FBS: Fetal Bovine Serum

培養液を調製するときは事前に Insulin (400mU/ml)、Dexamethasone (100  $\mu$  M)、HEPES(2.5M)を用意。

(7) Insulin (400mU/ml)

|                               |              |
|-------------------------------|--------------|
| 30% (9.81N) HCl               | 30.5 $\mu$ l |
| DW                            | 50 ml        |
| 6 mM HCl                      |              |
| Insulin (e.g. 25 U/mg; Sigma) | 14.3 mg      |
| 6 mM (ca. 0.06% (v/v)) HCl    | 10 ml        |
| 40 U/ml Insulin               |              |
| 40 U/ml Insulin               | 1.0 ml       |
| PBS (-)                       | 99 ml        |
| 400mU/ml Insulin              |              |

フィルター滅菌後、-20℃で保存。

(8) Dexamethasone (100  $\mu$  M)

|                           |         |
|---------------------------|---------|
| Dexamethasone (Sigma)     | 39.3 mg |
| 99.5% sterile ethanol     | 10 ml   |
| 10mM dexamethasone        |         |
| 10mM dexamethasone        | 1.0 ml  |
| PBS (-), sterile          | 99 ml   |
| 100 $\mu$ M dexamethasone |         |

-20℃で保存。

(9) HEPES(2.5M)

|       |        |
|-------|--------|
| HEPES | 29.8g  |
| DW    | 40ml+a |
| 50ml  |        |

フィルター滅菌後、4℃で保存

|      |                                    |         |
|------|------------------------------------|---------|
| (10) | <b>WEid</b>                        |         |
|      | WE                                 | 494.5ml |
|      | 400mU/ml Insulin <sup>(7)</sup>    | 5ml     |
|      | 100μM dexamethasone <sup>(8)</sup> | 0.5ml   |
|      |                                    | 500ml   |

|      |                                    |         |
|------|------------------------------------|---------|
| (11) | <b>WEid·FBS</b>                    |         |
|      | WE                                 | 464.5ml |
|      | 400mU/ml Insulin <sup>(7)</sup>    | 5ml     |
|      | 100μM dexamethasone <sup>(8)</sup> | 0.5ml   |
|      | Fetal Bovine Serum                 | 25ml    |
|      | 2.5M HEPES <sup>(9)</sup>          | 5ml     |
|      |                                    | 500ml   |

|      |                               |       |
|------|-------------------------------|-------|
| (12) | <b>HepatoZYME·L-glutamine</b> |       |
|      | HepatoZYME-SFM                | 490ml |
|      | 200mM L-glutamine             | 5ml   |
|      | 2.5M HEPES <sup>(9)</sup>     | 5ml   |
|      |                               | 500ml |

|      |                            |         |
|------|----------------------------|---------|
| (13) | <b>Collagen I (3mg/ml)</b> |         |
|      | 10×PBS                     | 2.2ml   |
|      | 1N NaOH                    | 0.414ml |
|      | DW                         | 1.086ml |
|      | Collagen I                 | 18.3ml  |
|      |                            | 22ml    |

氷上で調製し、泡立てないように攪拌。調整後は 2-3 時間以内に使用。

### III. 麻酔薬

マウスの麻酔には Nembutal (5mg/ml) を用いた。

|      |                                 |      |
|------|---------------------------------|------|
| (14) | <b>Nembutal (5mg/ml)</b>        |      |
|      | Nembutal (50 mg/ml; Abbot Lab.) | 1 ml |
|      | Heparin (1000 U/ml; Nobo)       | 1 ml |
|      | PBS (-), sterile                | 8 ml |

## 参考文献

Beken S, Vanhaecke T, De Smet K, Pauwels M, Vercruysse A, Rogiers V: Collagen-gel sandwich and immobilization cultures. *Methods in molecular biology*, vol. 107: cytochrome P450 protocols (Ed) Phillips IR, Shephard EA, Humana Press, Totowa, p.303-9, 1998

De Smet K, Bruning T, Blaszkewicz M, Bolt HM, Vercruysse A, Rogiers V. Biotransformation of trichloroethylene in collagen gel sandwich cultures of rat hepatocytes. *Arch Toxicol*. 2000 Dec;74(10):587-92.

Dwivedi RS, Gruebele A, Novak RF. Effects of altered calcium homeostasis on the expression of glutathione S-transferase isozymes in primary cultured rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol*. 1992 Dec 1;44(11):2099-103.

Jiang PP, Frederick K, Hansen TH, Miller RD. Localization of the mouse gene releasing sex-limited expression of Slp. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jan 23;93(2):913-7.

LeCluyse EL, Bullock PL, Parkinson A, Hochman JH: Cultured rat hepatocytes. *Pharm Biotechnol* 8: 121-59, 1996

Lipscomb JC, Fisher JW, Confer PD, Byczkowski JZ. In vitro to in vivo extrapolation for trichloroethylene metabolism in humans. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1998 Oct;152(2):376-87.

宮崎正博、難波正義：ラット肝細胞。新培養細胞実験法 改訂第2版（黒木登志夫、許南浩、千田和広編集）。羊土社、p.103-108、1999

Morita T, El-Kazzaz W, Tanaka Y, Inada T, Aiba H. Accumulation of glucose-6-phosphate or fructose-6-phosphate is responsible for destabilization of glucose transporter mRNA in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 2003 Feb 10 [epub ahead of print]

Pervaiz S, Brew K. Homology and structure-function correlations between alpha 1-acid glycoprotein and serum retinol-binding protein and its relatives. *FASEB J*. 1987 Sep;1(3):209-14.

Rana B, Mischoulon D, Xie Y, Bucher NL, Farmer SR. Cell-extracellular matrix interactions can regulate the switch between growth and differentiation in rat hepatocytes: reciprocal expression of C/EBP alpha and immediate-early growth response transcription factors. *Mol Cell Biol.* 1994 Sep;14(9):5858-69.

Walgren JE, Kurtz DT, McMillan JM. The effect of the trichloroethylene metabolites trichloroacetate and dichloroacetate on peroxisome proliferation and DNA synthesis in cultured human hepatocytes. *Cell Biol Toxicol.* 2000;16(4):257-73.

Waxman DJ, Morrissey JJ, Naik S, Jauregui HO. Phenobarbital induction of cytochromes P-450. High-level long-term responsiveness of primary rat hepatocyte cultures to drug induction, and glucocorticoid dependence of the phenobarbital response. *Biochem J.* 1990 Oct 1;271(1):113-9.

#### I-2-4. トリクロロエチレン in vitro 実験

**要旨** この予備実験の結果により in vitro 実験における適切な曝露条件が決定され、DNA チップにハイブリダイゼーションさせることが可能となった。実験により得られたマウスの初代培養肝細胞の遺伝子発現プロファイルと in vivo 実験を直接的に比較すると、in vitro と in vivo の遺伝子発現プロファイルは階層的クラスター解析で大きく2つに分かれ、in vivo 実験内では腹腔内投与実験と経口投与実験から得られたプロファイルは2つに分かれるという結果が得られた。また、経時的変化を追いかけた経口投与実験と in vitro 実験では共通に有意差があった遺伝子の数が多かったことより、単一時間の観察は遺伝子発現変化を捉えるには不十分であり、経時的変化を観察することの重要性が示唆された。更に3つの実験系で共通に遺伝子発現が有意に変化した遺伝子の存在が明らかとなった。この遺伝子の中に TCE に対して特異的に反応する遺伝子が存在すれば、それは in vitro 実験、in vivo 実験の両者における曝露の指標となり、TCE 曝露による健康傷害発生の評価方法の一つとして大いに貢献する。

##### ○本実験

##### ○曝露方法

##### ●初代培養肝細胞の培養

前述の初代培養肝細胞の培養方法に従い、B6C3F1 マウス（8週齢、雄）の肝臓より初代培養肝細胞を分離し、コラーゲンを培養フラスコにコーティングした上に分離した肝細胞を  $1.5 \times 10^6$  cell/ml で撒いた。この際細胞の viability は 85% 以上である。インスリンとデキサメサゾン含有の WE 培地で細胞がフラスコ上に接着するまで培養（4時間）し、細胞が接着後にコラーゲンゲルを細胞の上に重層させて培地を 5%CO<sub>2</sub>、95%O<sub>2</sub> で飽和させた Hepatozyme に変更して培養フラスコのキャップを密閉し、5%CO<sub>2</sub>、95% Air、37℃のインキュベータ内で34時間培養した。

なお、この動物実験は慶應義塾大学医学部動物実験ガイドライン（平成9年改正）に基き計画を立案し、慶應義塾大学医学部動物実験委員会の承認を得て実施したもので

ある。

##### ●曝露方法

初代培養肝細胞を34時間培養後、以下の曝露時間及び曝露濃度で曝露した。なお、DMSO のみ曝露群はコントロールであるが、ばらつきを減じる目的でそれぞれの曝露時間で3枚ずつの培養フラスコを実験に用いた。また、実験は n=4 で行った。

| 曝露時間  | 曝露濃度              |
|-------|-------------------|
| 4 時間  | DMSO のみ           |
|       | 2.5mM TCE in DMSO |
|       | 5.0mM TCE in DMSO |
| 24 時間 | DMSO のみ           |
|       | 2.5mM TCE in DMSO |
|       | 5.0mM TCE in DMSO |

##### ●代謝産物測定

各曝露後の培地中のトリクロロ酢酸 (TCA) 及び総塩化物 (TTC) の濃度を測定した。

##### ●RNAの精製、cDNA合成

肝臓から抽出した totalRNA は抽出量が少ないため、mRNA の抽出を行わずに totalRNA

から直接 cDNA を合成した。cDNA 合成後、DMSO のみ曝露の 3 枚ずつのコントロールサンプルは各曝露時間毎に一つのサンプルにまとめ、cRNA へ逆転写させた。cRNA への転写後から DNA チップへハイブリダイゼーションするプロセスは in vivo 実験と同様の方法で行った。

#### ODNA チップ解析方法

MicroArray Suite ver.5.0(Affymetrix 社)でハイブリダイゼーションで得られたシグナルを読み込み、DNA チップ解析ソフトである Gene Spring Ver.5.0.2(Silicon Genetics 社)にデータを読み込ませ以下の解析を行った。

##### (1) Normalization

各 DNA チップ上の Present Call および Marginal Call と判定されたプローブの Signal 値の中央値を算出し、その中央値で全てのプローブの Signal 値を除すことにより DNA チップ間の標準化 (Normalization) を行った。

##### (2) 有意差のある遺伝子の検出

Cross-gene error model を用いて時点ごとにコントロール群と曝露群との間に有意差のあるプローブを算出した ( $p < 0.1$ , t-test)。

##### (3) クラスタリング解析

全てのプローブもしくはどこかの時点で有意差のあったプローブを用いて、階層的クラスタリング解析を行った。(Standard Correlation)。

##### (4) 機能別遺伝子発現変化の解析

Gene Ontology の概念を用いて遺伝子を機

能別に分類し、遺伝子の発現変化を観察した。

#### ○結果及び考察

##### ●TCE 代謝産物濃度及び生化学的肝機能データ

血中の TCE 代謝産物濃度を図 1 に示す。TCA は検出感度以下であった。これは Collagen gel を重層したため、培地中の TCA が Gel に吸収されたなどの理由が考えられる。TTC 濃度は曝露濃度に依存した変化を示した。

##### ●有意差のある遺伝子

実験は  $n=4$  で行っているが、DNA チップにハイブリダイゼーションを行い、遺伝子発現プロファイルが得られているのは現在のところ  $n=2$  であるので、このプロファイルを用いて解析を行った結果を以下に示す。

DNA チップの normalization 後、どこかの時点でコントロール群と曝露群に有意差があったプローブの個数は 327 個であった。その内訳は下記の表と通りである。4 時間後及び 24 時間後に有意差があったプローブを各曝露群ごとに算術平均をとり、それぞれの TCE 曝露群をコントロール群 (DMSO 曝露) で除した値 E/C を表 1 に示す。

| 比較群                              | 有意差のあったプローブ数 |
|----------------------------------|--------------|
| 4 時間曝露 (DMSO vs 2.5mM vs 5.0mM)  | 33 個         |
| 24 時間曝露 (DMSO vs 2.5mM vs 5.0mM) | 61 個         |
| DMSO 曝露 (4 時間曝露 vs 24 時間曝露)      | 182 個        |
| 2.5mM 曝露 (4 時間曝露 vs 24 時間曝露)     | 26 個         |
| 5.0mM 曝露 (4 時間曝露 vs 24 時間曝露)     | 160 個        |

#### ●クラスタリング解析

全てのプローブもしくはどこかの時点で有意差のあったプローブを用いて、階層的クラスタリング解析を行った。各群は  $n=2$  のサンプル数を有するが、これらの遺伝子発現シグナル値の算術平均をとって一つのデータとした後に、クラスタリング解析を行った結果を図 2A (全てのプローブ)、図 2B (有意差のあったプローブ) に示す。

どこかの時点で有意差があった遺伝子を用いて解析した場合と、全ての DNA チップを用いて解析した場合のどちらでも、曝露時間で大きく 2 つのクラスターに分かれた。曝露時間は 4 時間と 24 時間でその差は 20 時間であるが、DMSO のみ投与のコントロール群も同じ曝露時間のクラスターに含まれていた。細胞の形態は顕微鏡的には変化は見られなかったが、in vitro 実験は in vivo 実験に比べて遺伝子の発現変化が短時

間で起こっていることが窺えた。DMSO 曝露により近い遺伝子発現変化を示したのは 5mM TCE 曝露であり、2.5mM TCE 曝露の遺伝子発現変化は異なっていることを示した。ただし、 $n=2$  では有意差を示すプローブの検出力に限界があるので、 $n=4$  の遺伝子発現プロファイルが揃った時点で再度解析を行い結論を導く予定である。

#### ●機能別遺伝子発現変化

有意差があった遺伝子を Gene Ontology の概念を用いて機能別に分類した結果については in vitro 実験と in vivo 実験の比較の項で述べる。

#### ○in vitro 実験と in vivo 実験の比較

##### ●クラスタリング解析

解析は全てのプローブを使用した場合、有意差があったプローブのみを使用した場合で in vitro 実験と in vivo 実験の比較を行った。また、in vitro 実験と in vivo 実験内の腹腔内投与は曝露群及びコントロール群の  $n$  数が複数であるので、全てのデータを使用した場合と算術平均をとった場合で解析を行った。ここでは算術平均をとり、全てのプローブで解析した結果 (図 3A) と有意差があったプローブを用いたクラスタリング解析の結果 (図 3B) を示す。

in vitro と in vivo の遺伝子発現プロファイルは全てのプローブを使った場合と有意差があるプローブのみを使った場合の両方で大きく 2 つに分かれた。また、in vivo 内では腹腔内投与実験と経口投与実験から得られたプロファイルが 2 つに分かれていた。



## ●機能別遺伝子発現変化

### ○Gene Ontlog を用いた解析

有意差があった遺伝子を Gene Ontlogy の概念を用いて機能別に分類して in vitro 実験と in vivo 実験の比較を行った。その結果の一部を図 4 に示す。

### ○個々の遺伝子発現変化の解析

個々の遺伝子において、腹腔内投与実験、経口投与実験、in vitro 実験で有意差があったプローブのそれぞれの実験間における共通性の関係は下記の通りである。また、それらのプローブの内訳を表 2 に示す。

|                               | プローブ数 |
|-------------------------------|-------|
| 腹腔内投与実験 経口投与実験で共通             | 10 個  |
| 腹腔内投与実験 in vitro 実験で共通        | 12 個  |
| 経口投与実験 in vitro 実験で共通         | 87 個  |
| 腹腔内投与実験 経口投与実験 in vitro 実験で共通 | 3 個   |

経口投与実験と in vitro 実験で共通に有意差があったプローブ数が他と比して多かった理由として、この両者の実験デザインが経時的変化をとったところにあると考えられる。

化学物質が生体や細胞に及ぼす影響を観察する際は、少なくとも 2 時点以上の異なる曝露時間で行うことが望ましいと思われる。in vitro 実験、腹腔内投与実験、経口投与実験で有意差を示したプローブは共通なものも 3 遺伝子のみであった。

- glucose phosphate isomerase (GP1) は解糖系の 2 番目のステップにおいて glu

cose-6-phosphate を fructose-6-phosphate に代謝する酵素である。glucose-6-phosphate と fructose-6-phosphate の蓄積は糖輸送の不安定性を引き起こすと言われているので、この遺伝子は糖輸送で重要な役割を果たす遺伝子であると思われる。(Morita et al., 2003)

- sex-limited protein Slp(w7) alpha-gamma chain は、ヒトの補体である C4 に相当し、アンドロゲン依存性に雄で発現する。(Jiang et al., 1996)
- mouse major urinary protein は Lipocalin family に属する細胞外タンパクである。このタンパクは脂質親和体を取り囲み、溶媒との接触を最小限にする構造を有する。

これらの遺伝子が 3 つの実験系で有意差のある変化を示した理由は不明であるが、マウスの種特異的な変化であるのか、また TC E やペルオキシゾーム増殖薬に特異的な変化であるのか否かを検証することは意義深い。(Pervaiz et al., 1987)

### ○まとめ

1. in vitro 実験ではクラスター解析で曝露時間によって大きく 2 つのクラスターに分かれた。
2. in vitro と in vivo の遺伝子発現プロファイルはクラスター解析で大きく 2 つに分かれた。また、in vivo 内では腹腔内投与実験と経口投与実験から得られたプロファイルが 2 つに分かれた。
3. 経時的変化を追いかけた経口投与実験と in vitro 実験で、共通に有意差があった遺伝子の数が多かった。

4. 3つの実験系で共通に遺伝子発現が有意に変化した遺伝子が存在した。

以上より、DNA チップは *in vitro* 実験と *in vivo* 実験の比較や化学物質に特異的な遺伝子発現の変化を体系的に捉える可能性を持つ事が示された。

今後は個々の遺伝子の機能に基づいた解析と、ラット及びヒトにおける *in vitro* 実験の遺伝子発現プロファイルを加えた解析を行い、種差について検証していく。

#### 健康危害情報

なし

#### 研究発表

未

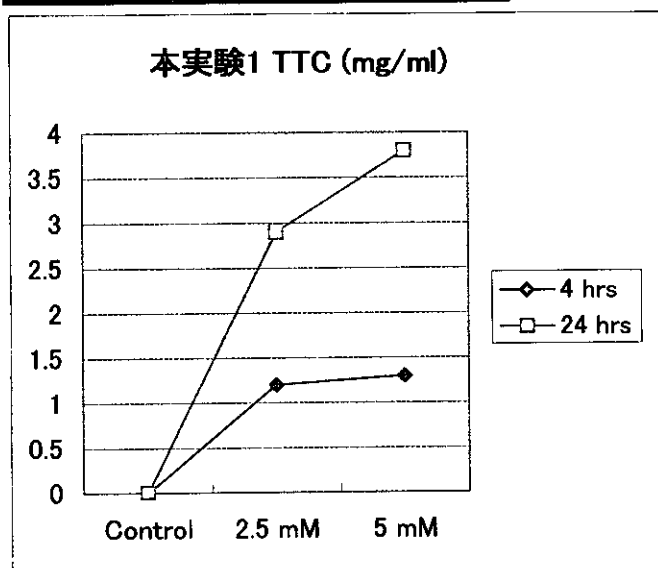
#### 知的財産権の出願・登録状況

未

図1 TCE代謝産物濃度

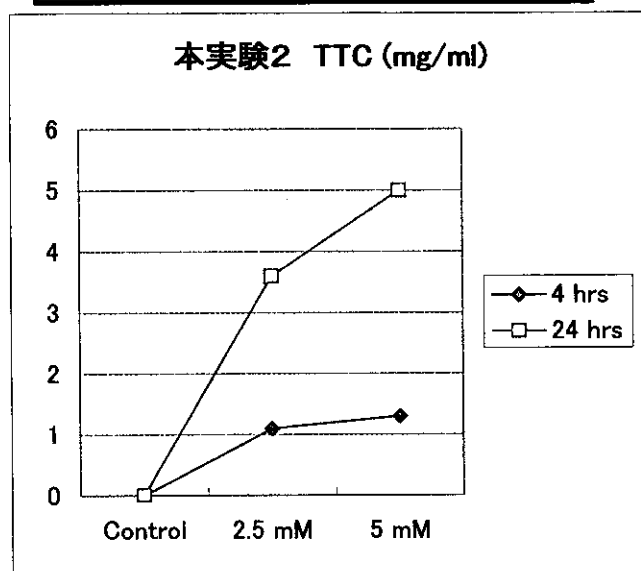
TTC(mg/ml)

|         | 4 hrs | 24 hrs |
|---------|-------|--------|
| Control | n.d.  | n.d.   |
| 2.5 mM  | 1.2   | 2.9    |
| 5 mM    | 1.3   | 3.8    |



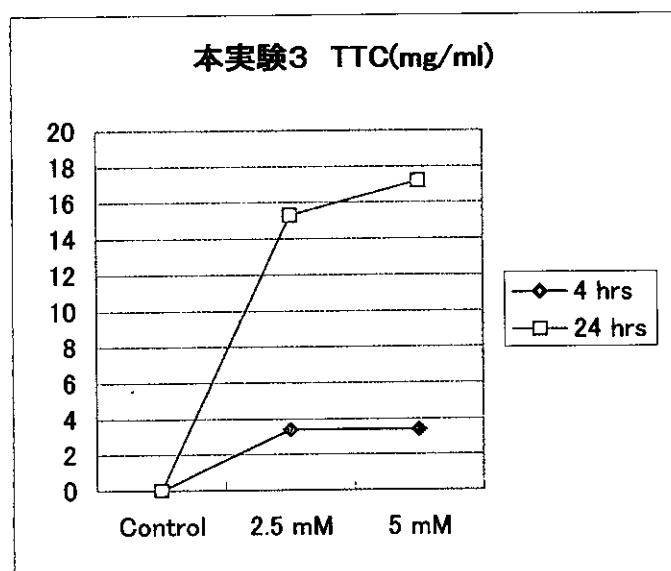
TTC(mg/ml)

|         | 4 hrs | 24 hrs |
|---------|-------|--------|
| Control | n.d.  | n.d.   |
| 2.5 mM  | 1.1   | 3.6    |
| 5 mM    | 1.3   | 5      |



TTC(mg/ml)

|         | 4 hrs | 24 hrs |
|---------|-------|--------|
| Control | n.d.  | n.d.   |
| 2.5 mM  | 3.4   | 15.3   |
| 5 mM    | 3.4   | 17.2   |



TTC(mg/ml)

|         | 4 hrs | 24 hrs |
|---------|-------|--------|
| Control | n.d.  | n.d.   |
| 2.5 mM  | 2.8   | 11.8   |
| 5 mM    | 3.1   | 12.9   |

