

Affymetrix 社 GeneChip Microarray を用い、網羅的遺伝子発現解析を行った。また、その結果に基づき、RT-PCR および免疫組織化学的検索を実施した。その結果、BN ラットの 2 週投与群では、MHC class II 関連遺伝子、炎症関連遺伝子、ストレス／細胞傷害関連遺伝子、分泌産物および増殖反応タンパク関連遺伝子の発現の増加が認められた。一方、Wistar ラットでは、4 週投与群で MHC class II 関連遺伝子および炎症関連遺伝子の発現が増加した。MHC class II 分子に関する RT-PCR を用いた検索では、GeneChip Microarray 解析結果とほぼ同様の結果が得られた。さらに、免疫組織化学的検索では、BN ラットで 1 週あるいは 2 週投与群より PS、OX-6、CD4 および CD8 陽性細胞が増加し、一方、Wistar ラットでは 4 週投与群で有意な増加が認められた。

以上の結果から、ブタ血清誘発肝線維化モデルでは肝炎発症時に一致して MHC class II 分子の発現および PS、OX-6、CD4 および CD8 陽性細胞の出現がみられ、本モデルの病態発現に MHC class II を介した抗原提示機構が深く関与していることが示唆された。

(3) ブタ血清特異的免疫グロブリンの動態

ELISA 法を用い、血中のブタ血清特異的免疫グロブリンの動態について検討するとともに、肝臓、胸腺、脾臓および腎臓について病理組織学および免疫組織化

学的検索を実施した。その結果、ELISA 法では、血中のブタ血清特異的 IgG1、IgG2a および IgM の増加が両系統で認められた。肝炎および肝線維化が遅延する Wistar ラットでは、BN ラットと比べ、発現値が低値を示し、また、発現時期が遅延する傾向を示した。両系統で脾臓では 1 週あるいは 2 週投与群より、相対重量の有意な増加がみられ、白脾髄の腫大が認められた。BN ラットの 8 週投与群で白脾髄胚中心の拡大が観察された。さらに、免疫組織化学的検索では、肝臓で肝炎発症時に一致して IgG1 および IgG2a 陽性細胞が有意に増加し、線維中隔に IgG1 および IgG2a の沈着が認められた。8 週投与群の脾臓では白脾髄の胚中心に PS、IgG1 および IgG2a 陽性細胞がみられ、また、腎臓でも糸球体メサンギウム領域に PS および IgG1 の沈着が認められた。

以上の結果から、ブタ血清誘発肝線維化モデルでは、肝炎発症時からブタ血清特異的免疫グロブリンの産生増加がみられ、高免疫グロブリン血症を生ずることが明らかとなった。免疫グロブリン産生細胞は肝臓および脾臓で観察され、これらの細胞からの免疫グロブリン産生が病態の進展に関与しているものと推察された。肝臓の線維中隔および腎糸球体メサンギウム領域での免疫グロブリンの沈着は、高免疫グロブリン血症に起因するものと思われ、特に腎糸球体の所見は本モデルの長期投与群で報告されているよう

な免疫グロブリン沈着による糸球体腎炎の初期病態に相当するものと考えられた。

(4) 胸腺・脾臓摘出による肝線維化抑制効果

本モデルの病態発現に免疫系が密接に関与していることが推察されたため、5週齢雄のBNラットおよびWistarラットに胸腺あるいは脾臓摘出術を実施し、主に肝臓について病理組織学的検索、免疫組織化学的検索、フローサイトメトリー解析およびRT-PCRを用いた検索を実施した。その結果、ラットの系統に無関係に、胸腺あるいは脾臓の摘出によって肝炎および肝線維化病変が著しく抑制された。脾臓摘出に比べ、胸腺摘出では抑制効果は弱かった。フローサイトメトリー解析では、胸腺、脾臓および末梢血から肝臓への細胞動員は、CD45RA および RT1. B 陽性細胞を除き、ほとんどみられなかった。サイトカインに関する RT-PCR を用いた検索では、肝臓でのみ TGF- β 1、NF- κ B および PDGF の発現の増加がみられた。一方、ケモカインに関する RT-PCR を用いた検索では、肝臓、胸腺および脾臓で MIP-1 α および Eotaxin の発現の増加ならびに胸腺および脾臓で IP-10 の発現の増加が認められた。

以上の結果から、ブタ血清誘発肝線維化モデルでは、病態発現に胸腺および脾臓が密接に関与していることが明らかとなった。胸腺および脾臓が本モデルに果たす役割としては、細胞動員というより

はむしろ炎症細胞誘導因子であるケモカインの産生組織として働いていることが示唆された。すなわち、肝臓でみられる炎症は胸腺および脾臓からのケモカイン産生により支持されている可能性が示唆された。

E. 結論

妊娠後期および泌乳期において Phase I と Phase II の薬物代謝酵素遺伝子の一部、および核内受容体遺伝子の発現が未経産ラットに比べて減少した。ブタ血清投与ラットの肝線維化病変では MHC class II 関連遺伝子、炎症関連遺伝子、ストレス/細胞傷害関連遺伝子、分泌産物および増殖反応タンパク関連遺伝子の発現増加が認められた。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

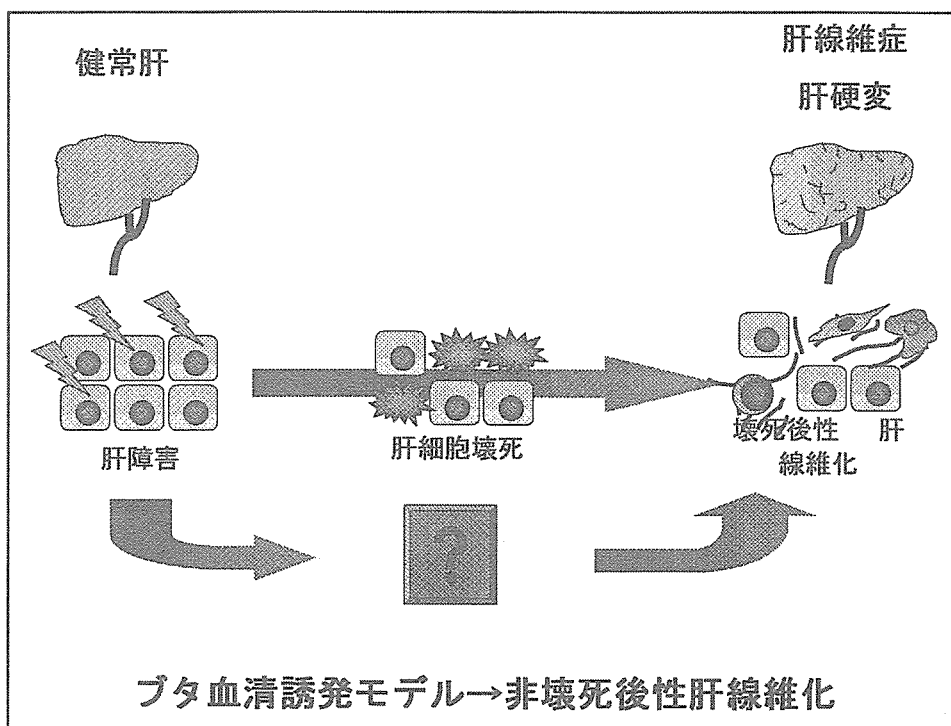
1. He X. J., Ejiri N., Nakayama H., and Doi K. Changes in cytochrome P450 isozymes (CYPs) protein levels during lactation in rat liver. *Exp. Mol. Pathol.*, 79:224-228, 2005.
2. Doi K., Shinozuka J., and Sehata S. T-2 toxin and apoptosis. *J. Toxicol. Pathol.*, 19: 15-27. 2006.

3. Nam, C., Woo, G. H., Uetsuka, K., Nakayama, H., and Doi, K. Histopathological changes in the brain of mouse fetuses by etoposide-administration. *Histol. Histopathol.* 21: 257-263 (2006)
4. Ueno, M., Katayama, K., Yamauchi, H., Nakayama, H., and Doi, K. Cell cycle death regulation of neural progenitor cells in the 5-azacytidine (5AzC)-treated developing fetal brain. *Exp. Neurol.* 198: 154-166 (2006)
5. Woo, G. H., Bak, E. J., Nakayama, H., and Doi, K. Molecular mechanisms of hydroxyurea (HU)-induced apoptosis in the mouse fetal brain *Neurotoxicol. Teratol.* 28: 125-134 (2006)
6. He, X. J., Doi, K., and Nakayama, H. Incontrovertible evidence of apoptosis in the SVZ and RMS in the MPTP model of Parkinson's Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 65: 873-882 (2006)
7. Ueno, M., Katayama, K., Yamauchi, H., Nakayama, H., and Doi, K. Cell cycle progression is required for nuclear migration of neural progenitor cells. *Brain Res.* 1088: 57-67 (2006)
8. Nam, C., Yamauchi, H., Nakayama, H., and Doi, K. Etoposide induces apoptosis and cell cycle arrest of neuroepithelial cells in a p-53-related manner. *Neurotoxicol. Teratol.* 28: 664-672 (2006)
9. Ueno, M., Katayama, K., Yamauchi, H., Yasoshima, A., Nakayama, H., and Doi, K. Repair process of fetal brain after 5-azacytidine-induced damage. *Eur. J. Neurosci.* 24: 2758-2768 (2006)
10. He, X. J., Yamauchi, H., Suzuki, K., Ueno, M., Nakayama, H., and Doi, K. Gene expression profiles of drug-metabolizing enzymes (DMEs) in rat liver during pregnancy and lactation. *Exp. Mol. Pathol.* (in press)
2. 学会発表
1. 馬場也須子、土井邦雄「ブタ血清誘発ラット肝線維化モデルにおける胸腺・脾臓摘出術の影響」第140回に

本獣医学会、2005年9月、鹿児島

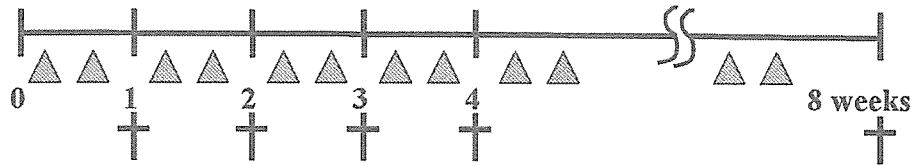
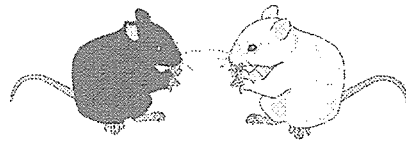
2. Yamauchi, H, Katayama, K, Ueno, M, Uetsuka K, Nakayama H, Doi K Pathway of p53-dependent trophoblast cell apoptosis in cytosine arabinoside-treated placenta. ACVP/ASVCP Annual Meeting, Dec. 3-7, 2005, Boston
3. He, XJ, Ejiri N, Yamauchi H, Nakayama H, Doi K Effect of pregnancy and lactation on CYPs protein and gene expression profiling during pregnancy in rat liver. ACVP/ASVCP Annual Meeting, Dec. 3-7, 2005, Boston
4. Baba Y, Uetsuka K, Nakayama H, Doi K Porcine-serum-induced fibrosis in Brown Norway and Wistar rats, 49th Annual Meeting of KSVS. Sep. 23, 2005 Cheju.
5. 何希君、中山裕之、山内啓史、上塚浩司、土井邦雄 「MPTP 誘発神経前駆細胞アポトーシス-MPTP 誘発パーキンソン病のマウスモデルにおける新知見」第33回日本トキシコロジー学会、2006年7月、名古屋
6. 山内啓史、上塚浩司、中山裕之、土井邦雄 「Cytosine arabinoside は胎盤迷路部栄養膜細胞に p53 依存性のアポトーシスを誘導する」第33回日本トキシコロジー学会、2006年7月、名古屋
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし
- I. 特許出願
なし

ブタ血清誘発肝線維化モデル ラットの病態解析



材料と方法

6週齢 雄



▲ ブタ血清 (PS) 、生理食塩水投与 (S)

0.5 ml i.p. / 2 times / week

✦ 安楽殺

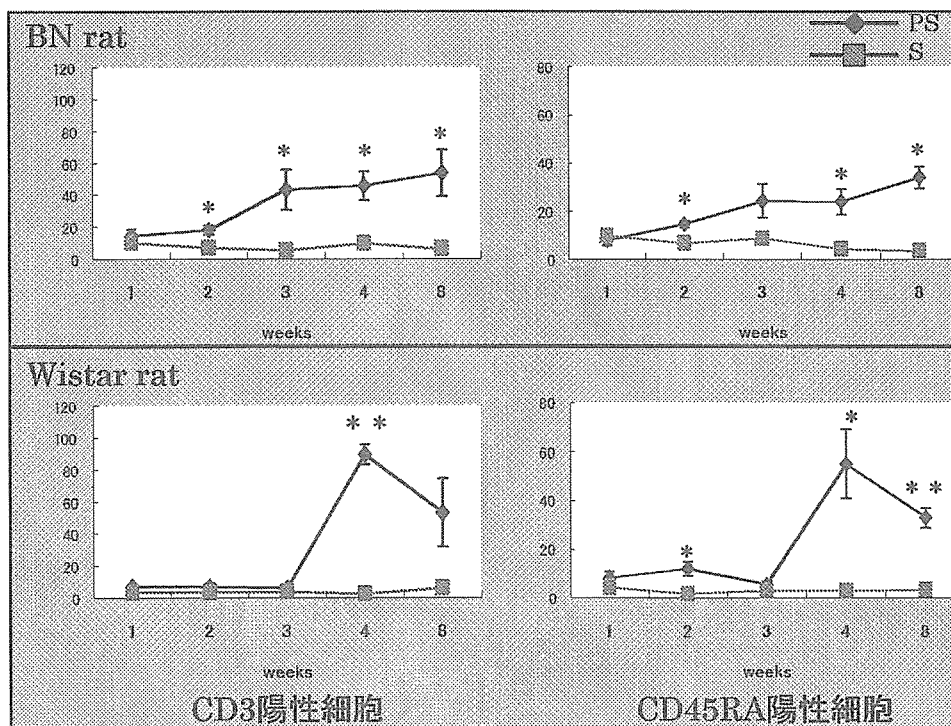
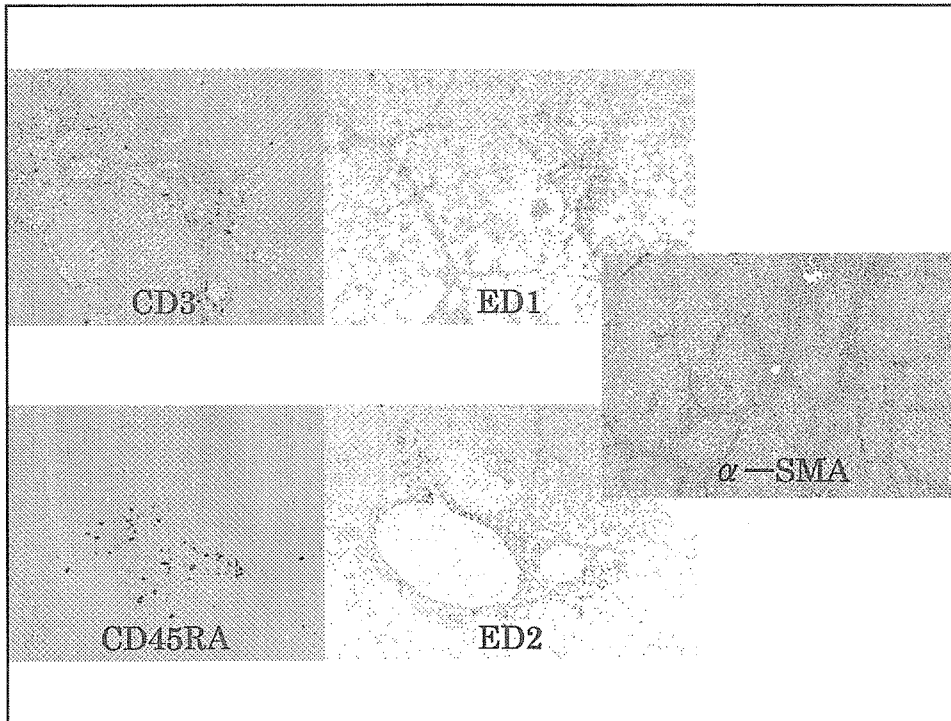
BN rat

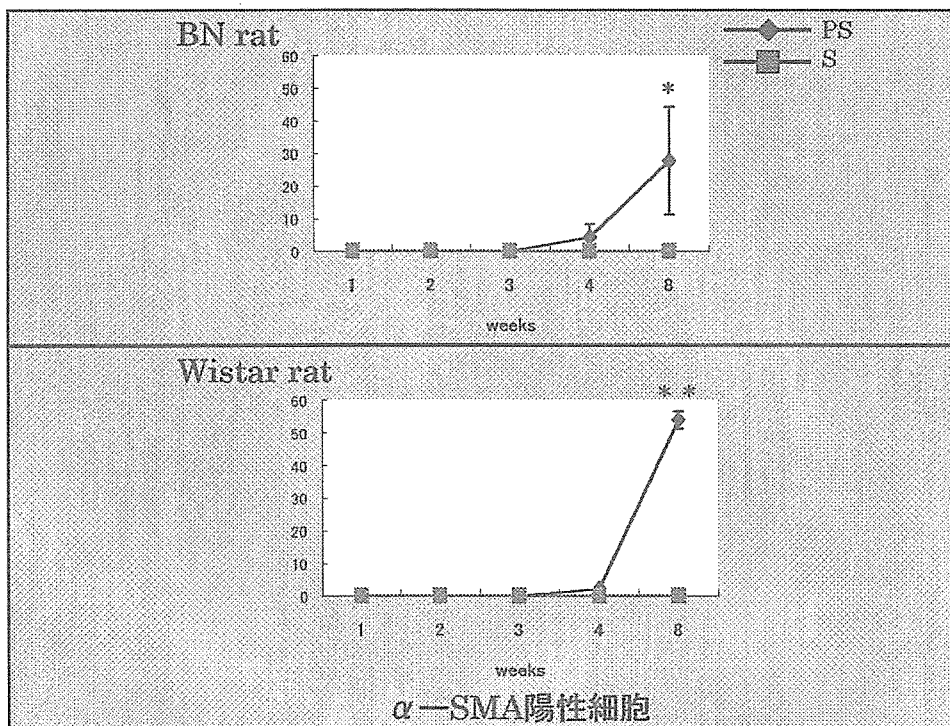
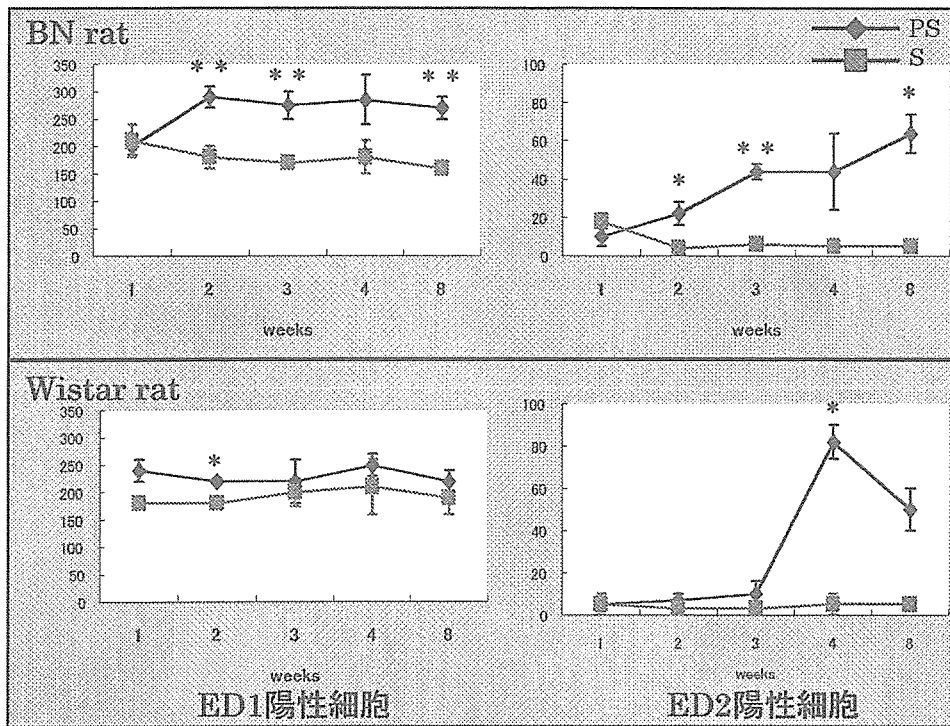
Wistar rat

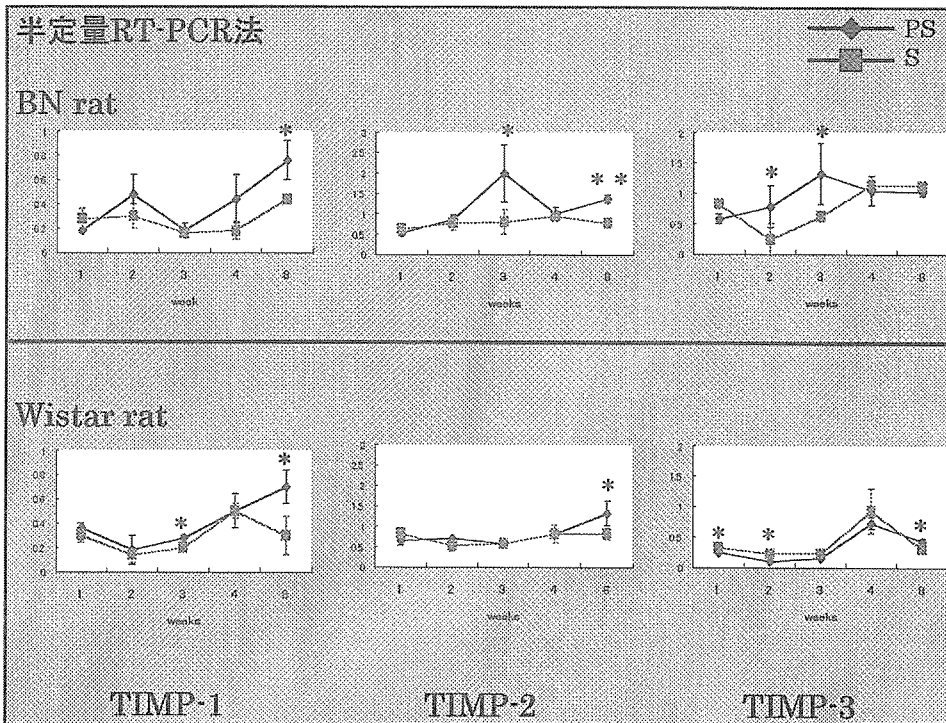
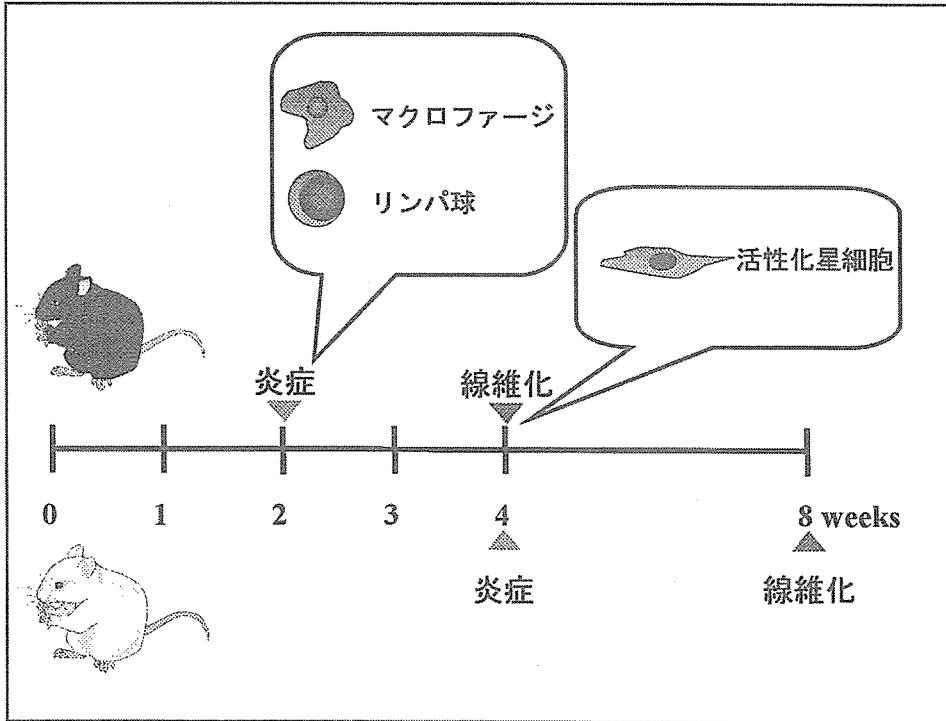
2週投与群

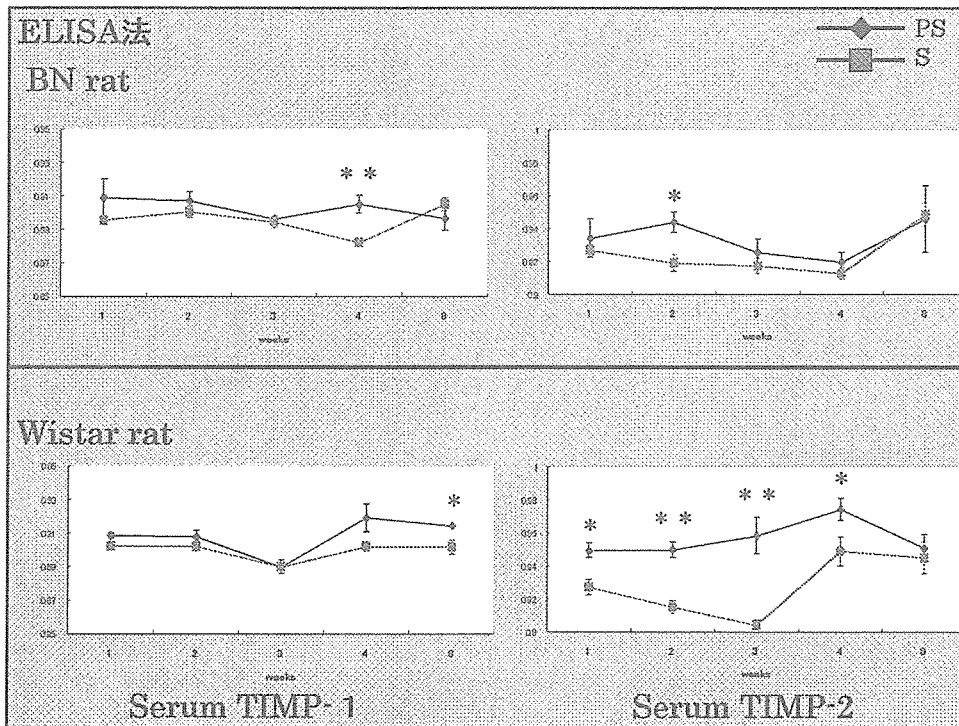
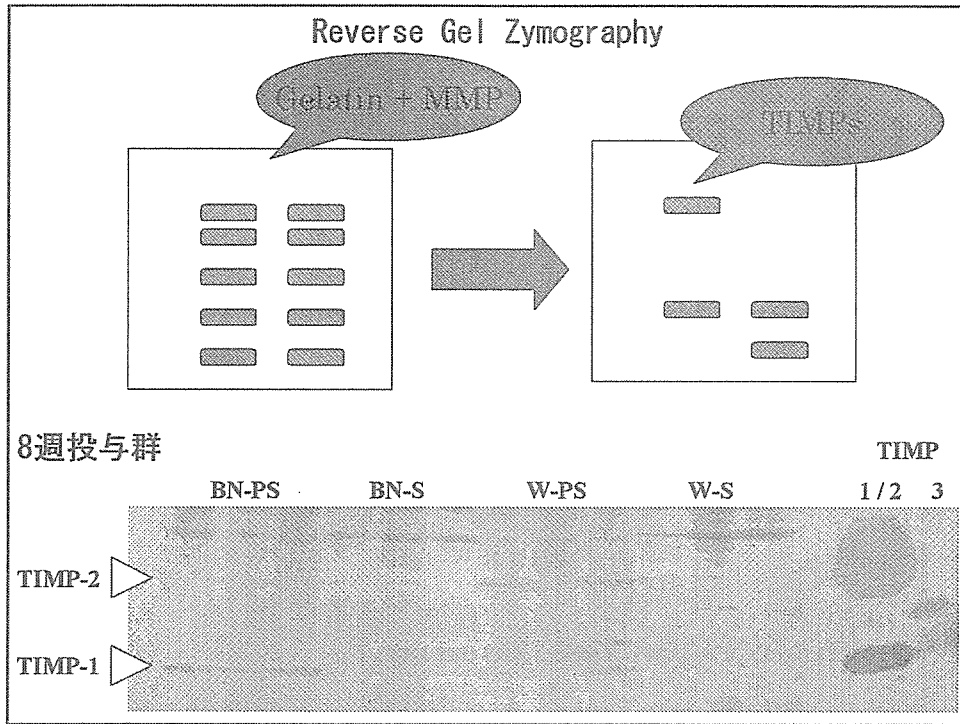
4週投与群

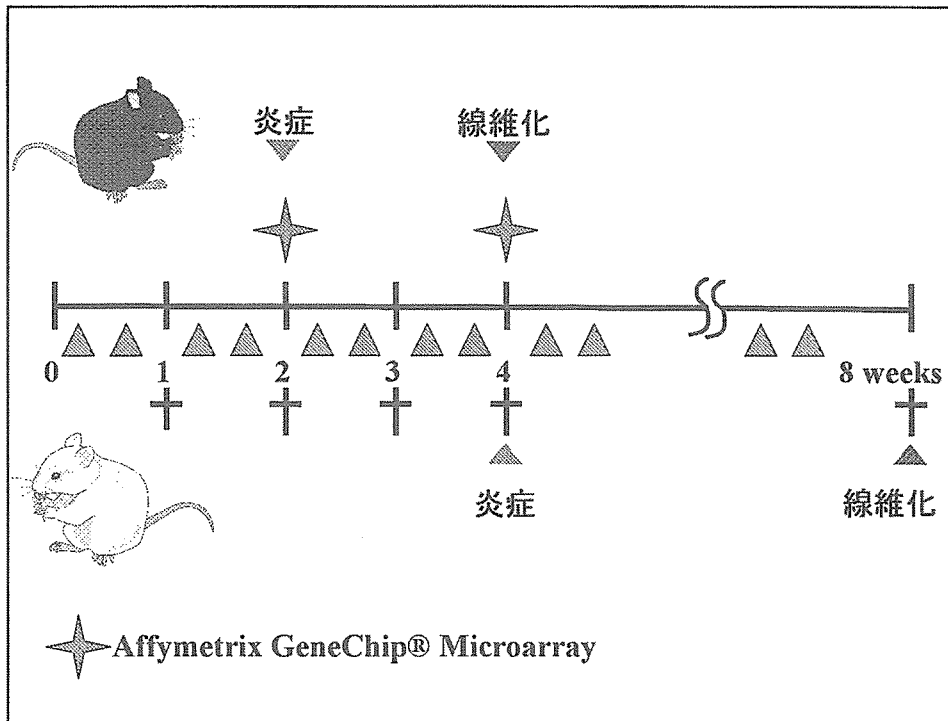
8週投与群









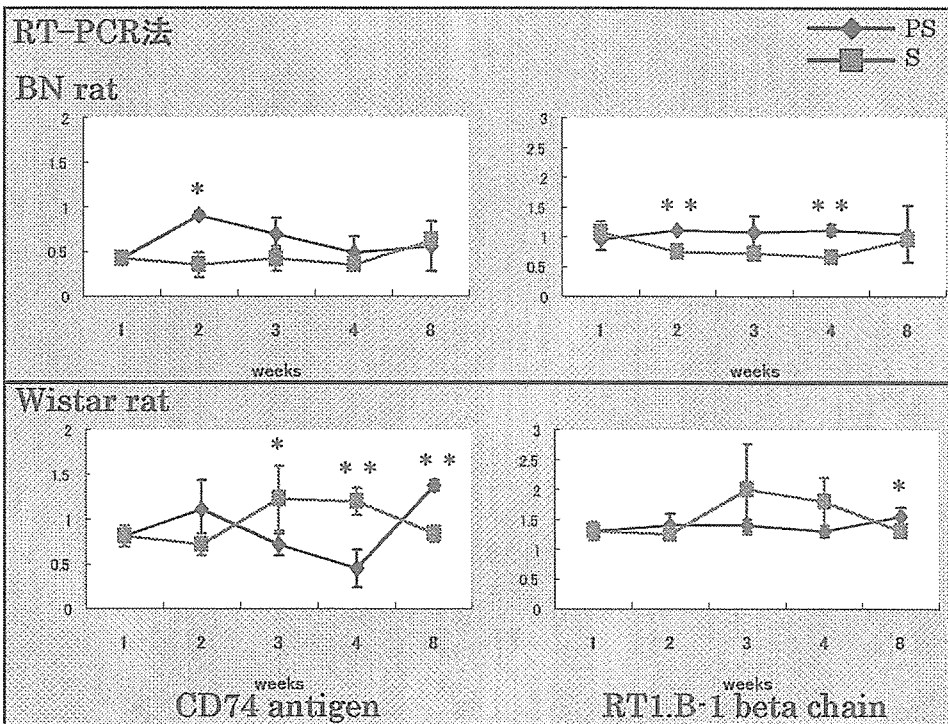


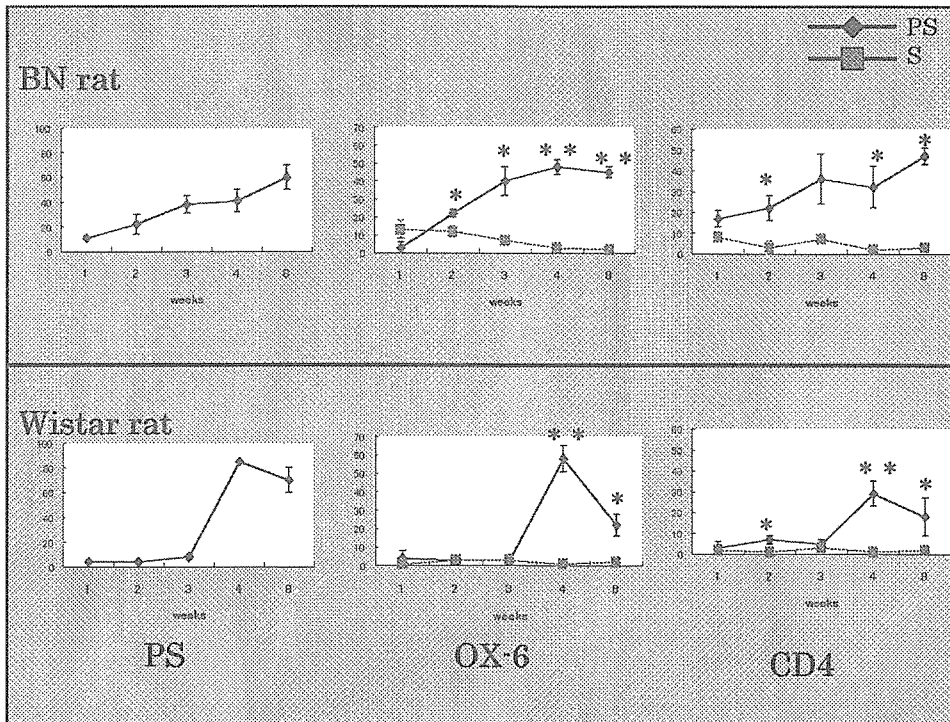
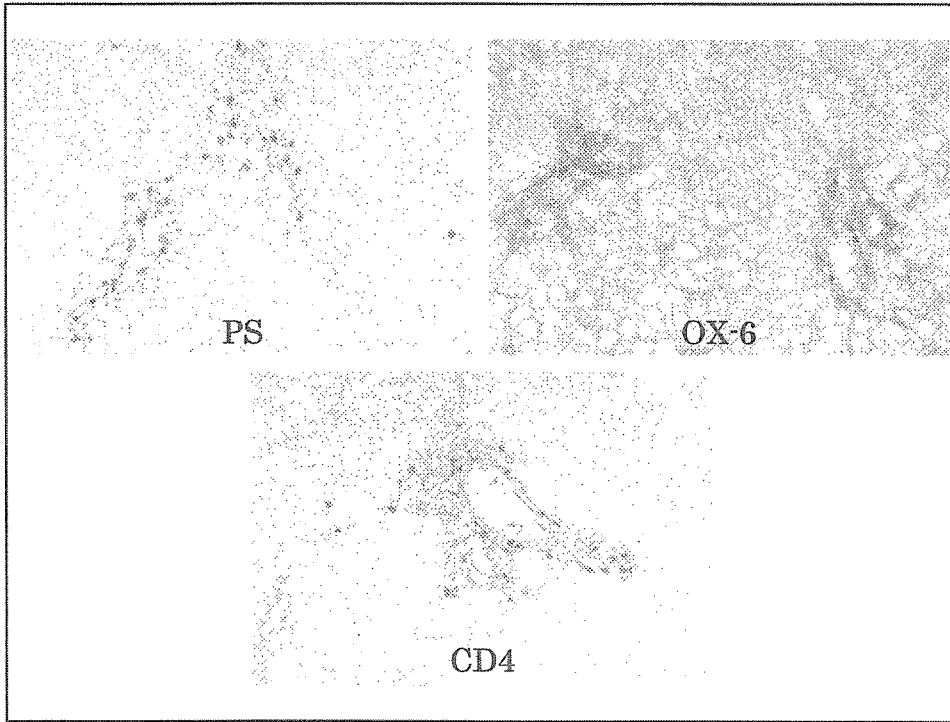
Up-regulate gene in GeneChip analysis

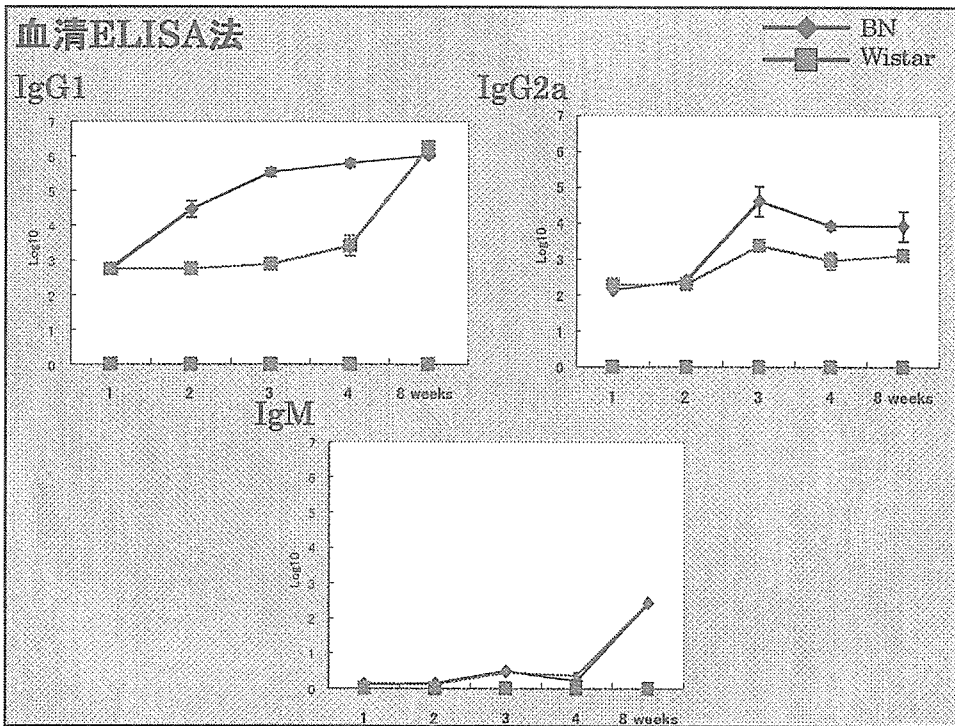
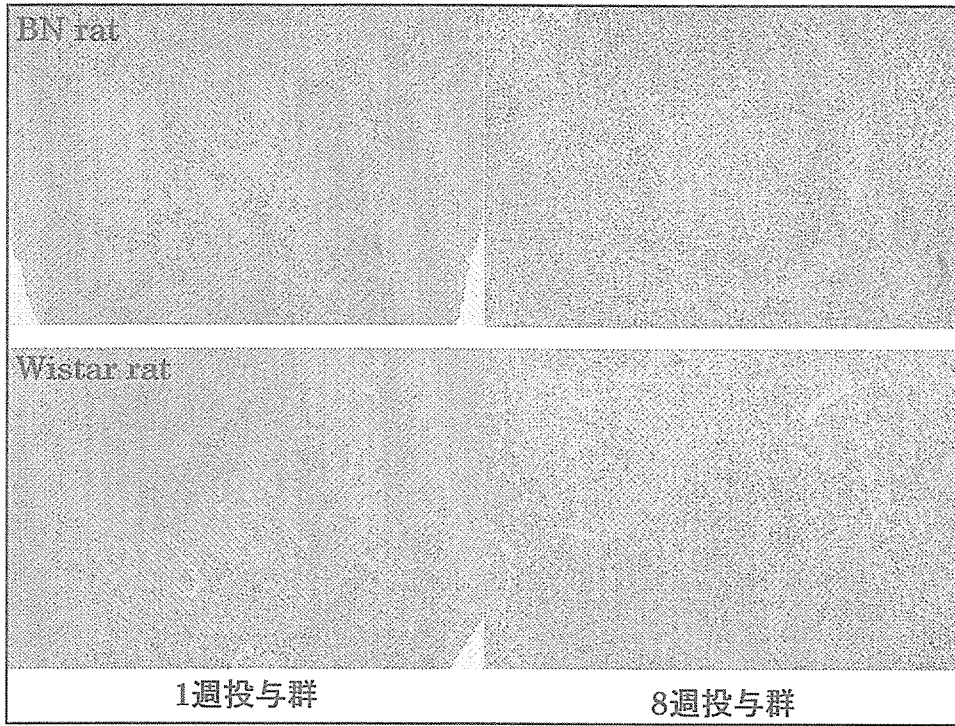
Genes	BN		Wistar		Accession No.
	2 weeks	4 weeks	2 weeks	4 weeks	
Cellular marker					
CD74 antigen (invariant polypeptide)	1.25		1.25		NM_013069.1
MHC class II alpha chain RT1.D alpha	1.85		1.45		Y00480.1
MHC class II antigen RT1. B-1 beta-chain	1.15		1.45		AJ715202
RT1.D beta chain	1.35		0.8		BI279526
RT1.Ma	1.5				BI301490
Cell proliferation					
growth response protein (CL-6)(LOC64194)	1.45				NM_022392
Inflammation					
orosomucoid 1 (Orm1)	1.6		1		NM_053288.1
T-kininogen, see also D11 Eh1 and D11 Mit	1.65				NM_012696.1
Stress / Cell damage					
lipopolysaccharide binding protein	3.25				BF289368

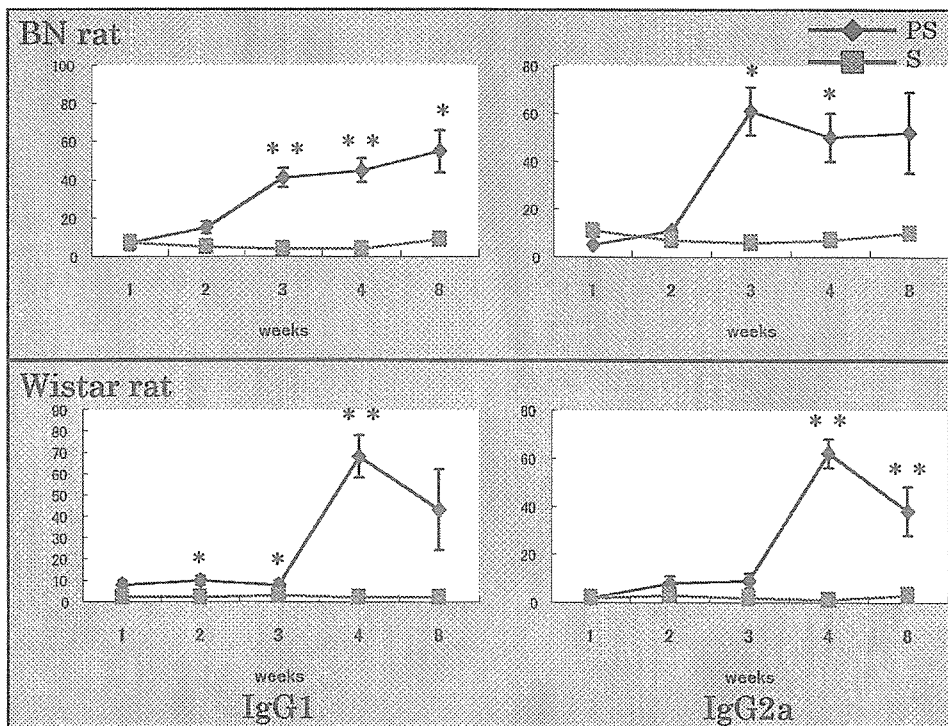
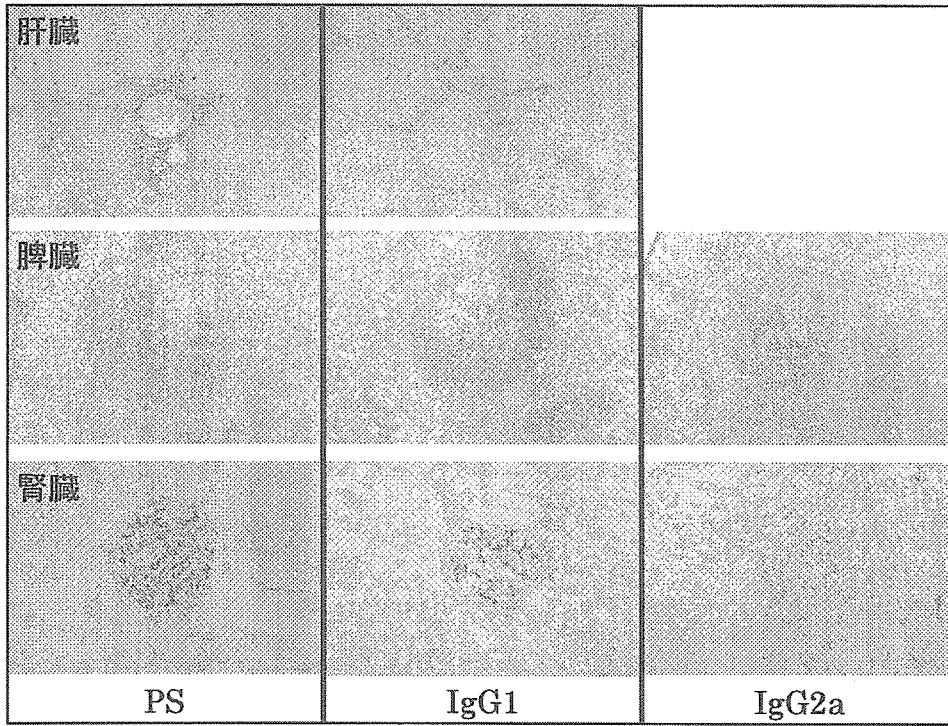
Down-regulate gene in GeneChip analysis

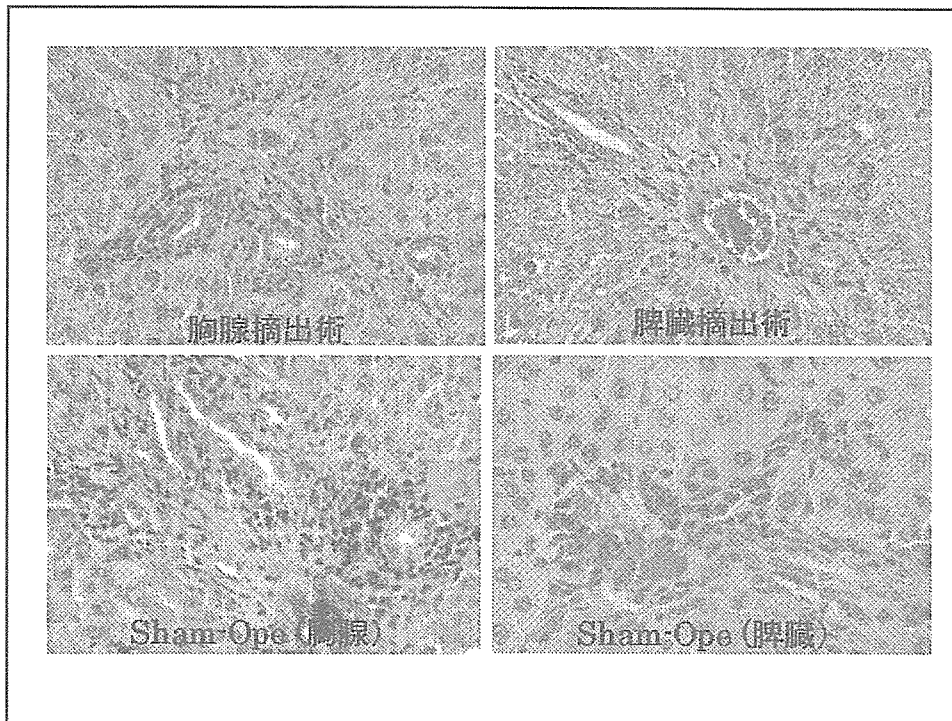
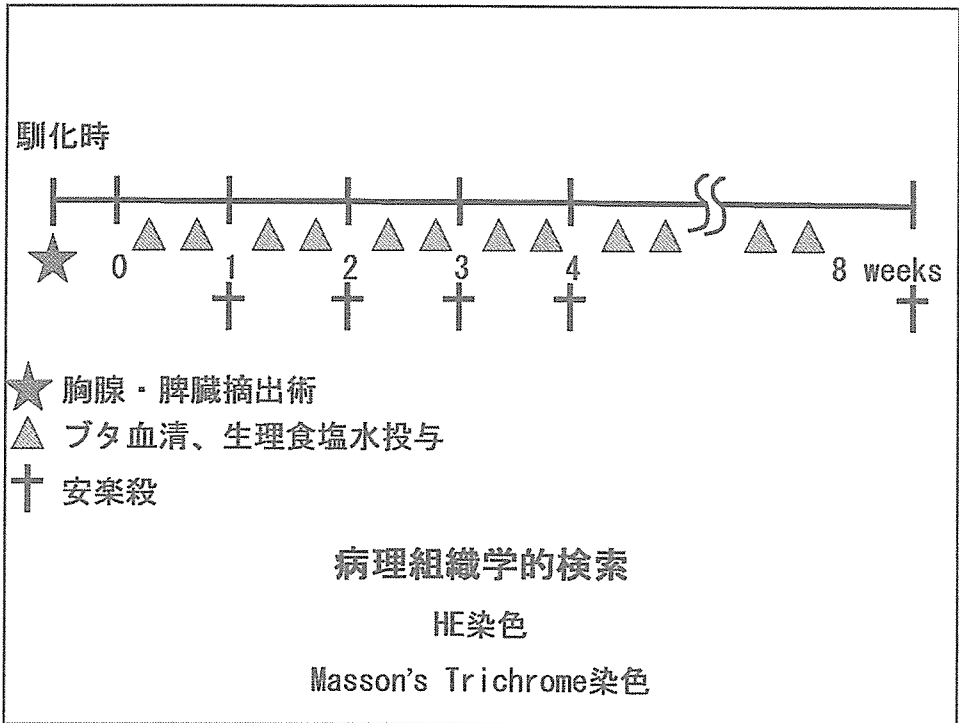
Genes	BN		Wistar		Accession No.
	2 weeks	4 weeks	2 weeks	4 weeks	
Amino acid metabolism					
ornithine aminotransferase		-1.35			L22855.1
Basal metabolism					
hepcidin antimicrobial peptide		-1.9			NM_053962.1
Carbohydrate metabolism					
glucokinase				-1.3	NM_012816.1
Transcription					
hepatocyte nuclear factor 3 gamma			-1.05		NM_017077.1
L-type pyruvate kinase	-1.25				MI7685.1
nuclear receptor subfamily 0				-1	NM_057133.1

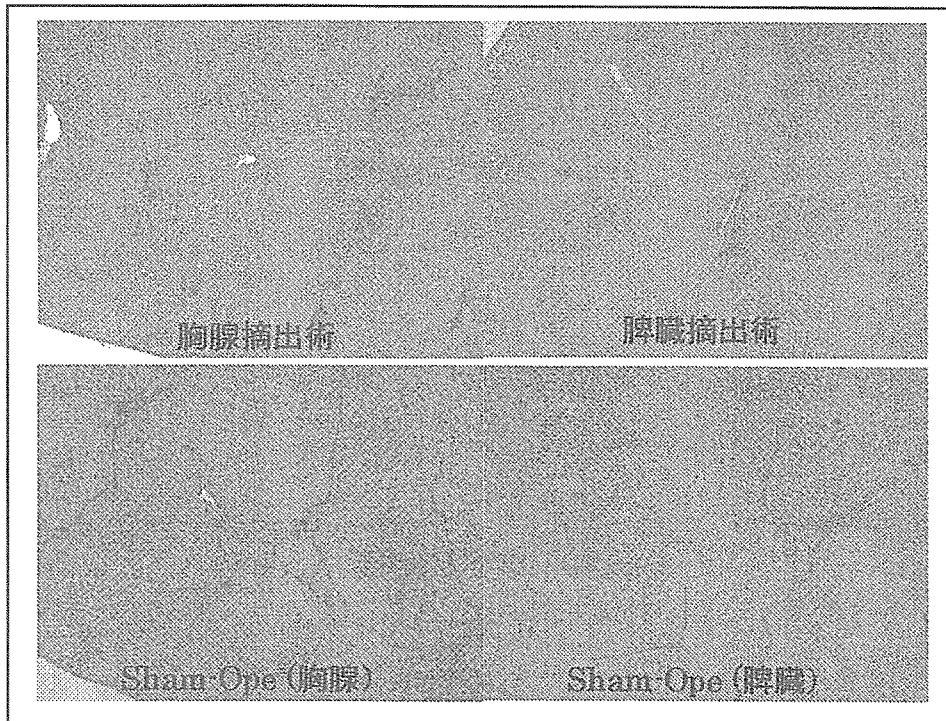












半定量RT-PCR解析結果

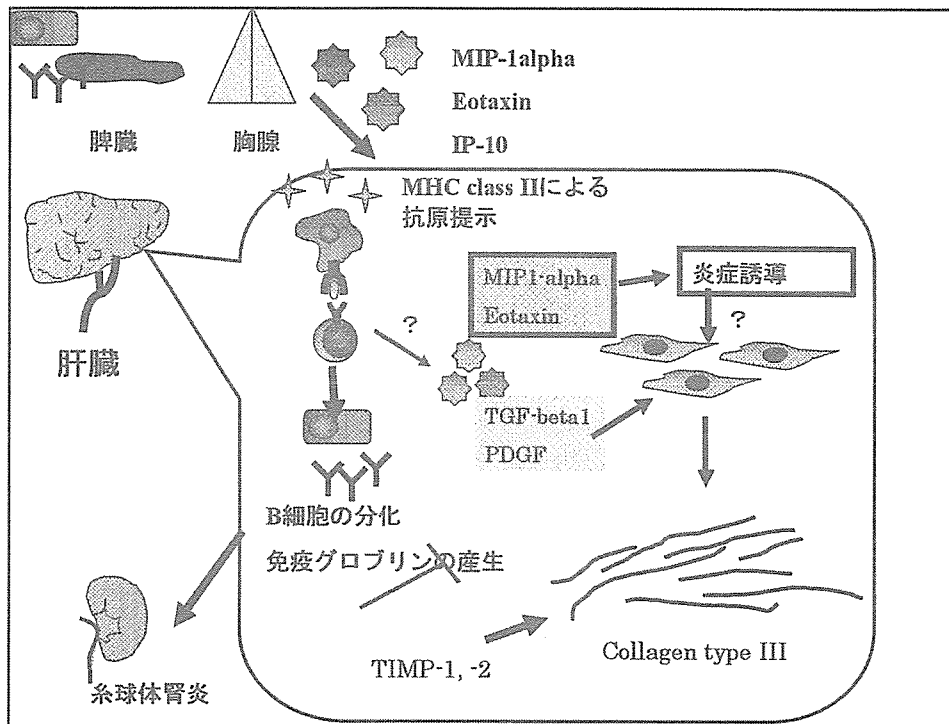
發現增加
發現減少

非摘出群

	Liver	Spleen	Thymus
TGF-beta1			
PDGF			
CTGF			
NF-kappaB			
Eotaxin			
MIP1-alpha			
IP-10			
MIP1-beta			
RANTES			
Osteopontin			

胸腺·脾臟摘出群
(肝臟)

→ 發現增加抑制

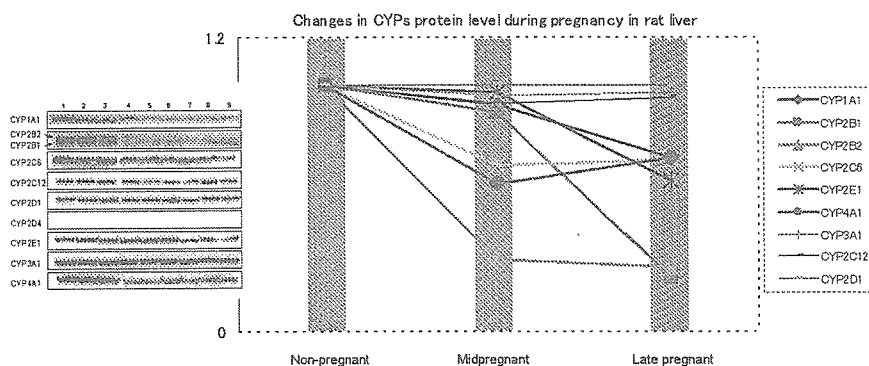


Changes in cytochrome P450 isozymes
(CYPs) protein levels during pregnancy
and lactation in rat liver

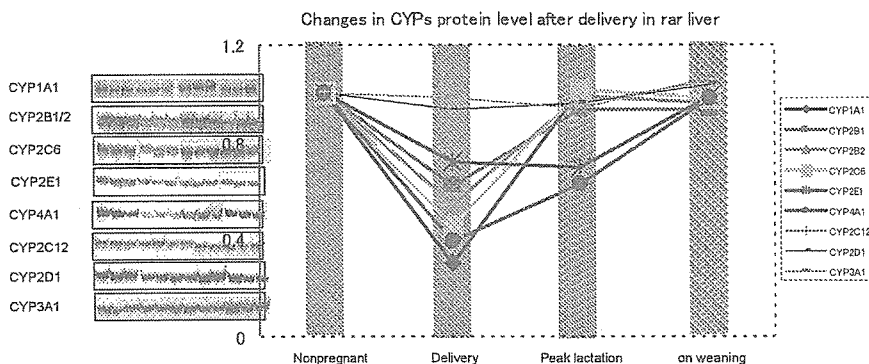
.....

1. Findings of Western blot analysis

1-1 In comparison to age-matched non-pregnant control rats, pregnant rats showed significantly decreased hepatic levels of 6 out of 9 CYPs proteins (CYP1A1, CYP2B1, CYP2B2, CYP2C6, CYP2E1 and CYP4A1) in midpregnancy and/or late pregnancy.



1-2 In comparison with age-matched virgin control rats, lactating rats showed significantly decreased hepatic levels of six out of nine CYPs proteins (CYP1A1, CYP2B1, CYP2B2, CYP2C6, CYP2E1 and CYP4A1) at day of delivery. By the day of peak lactation, CYP1A1, CYP2B1, CYP2B2 and CYP2C6 proteins returned to the virgin control levels. All of the hepatic CYPs proteins were at virgin control level at 7 days post-lactation.

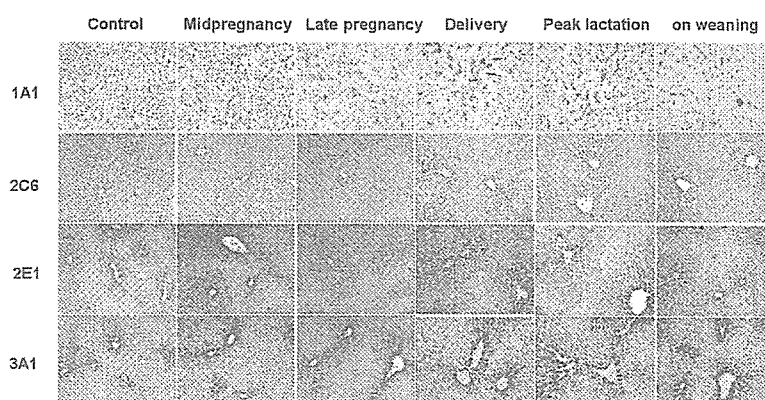


2. Immunohistochemical findings

2-1 Majority of detected CYP isozymes were mainly expressed in centrilobular hepatocytes of hepatic acinus.

2-2 No differences in the distribution and degree of immunostainability for nine CYPs between pregnant, lactational and non-pregnant rat livers.

2-3 CYP1A1 was expressed in endothelial cells of both sinusoids and veins in the liver



Drug Metabolising Enzymes (DMEs)-Related Gene Expression Profiling in rat liver during pregnancy and lactation Using cDNA Microarray Technology

- cDNA microarray analysis revealed a multitude of expression patterns occurring within pregnancy and lactation. Specifically, more DEMs (drug metabolising enzymes)-related genes demonstrated downregulation on late pregnancy and delivery in rat liver.