

図6. ラット頭部神経堤細胞の遊走を阻害した発生毒性を有する化学物質
 平均値と標準誤差を示す。アスタリスクは、対照群と比較して統計学的に有意差があることを示す (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$)。

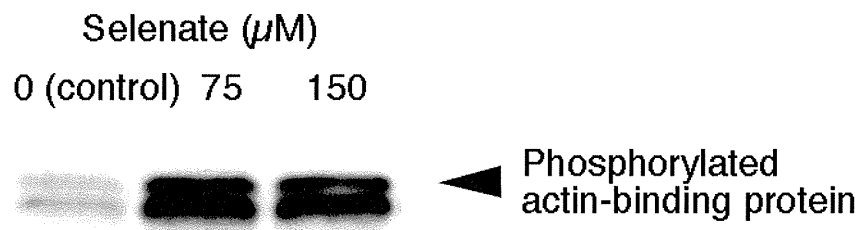


図7. セレン酸が神経堤細胞アクチン結合タンパクリン酸化に及ぼす影響のウェスタンブロット解析

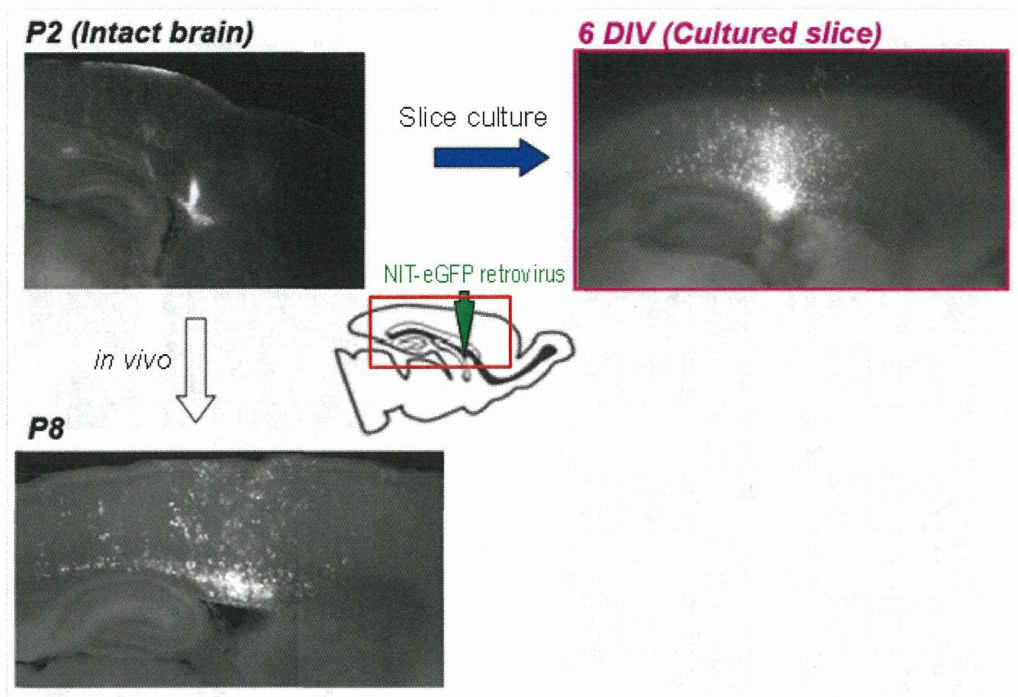


図 8. SVZ 神経幹細胞および前駆細胞の可視化、培養前脳矢状面切片における eGFP 標識細胞の遊走経路確認

生後 2 日齢ラット SVZ に NIT-eGFP を注入し、8 日齢で還流固定し、矢状面切片を作成し観察したところ、eGFP 標識細胞は SVZ の前後軸を通過して遊走する群と放射状に大脳皮質表面へ向かって遊走する群にわかれた (左下)。生後 2 日齢ラットの前脳矢状面切片を作成し、直ちに NIT-eGFP を滴下し 6 日間培養した場合も、上記と同様に eGFP 標識細胞は SVZ の前後軸を通過して遊走する群と放射状に大脳皮質表面へ向かって遊走する群にわかれた (右)。培養前脳矢状面切片において、eGFP 標識細胞は *in vivo* と同様の経路を遊走することが確かめられた。

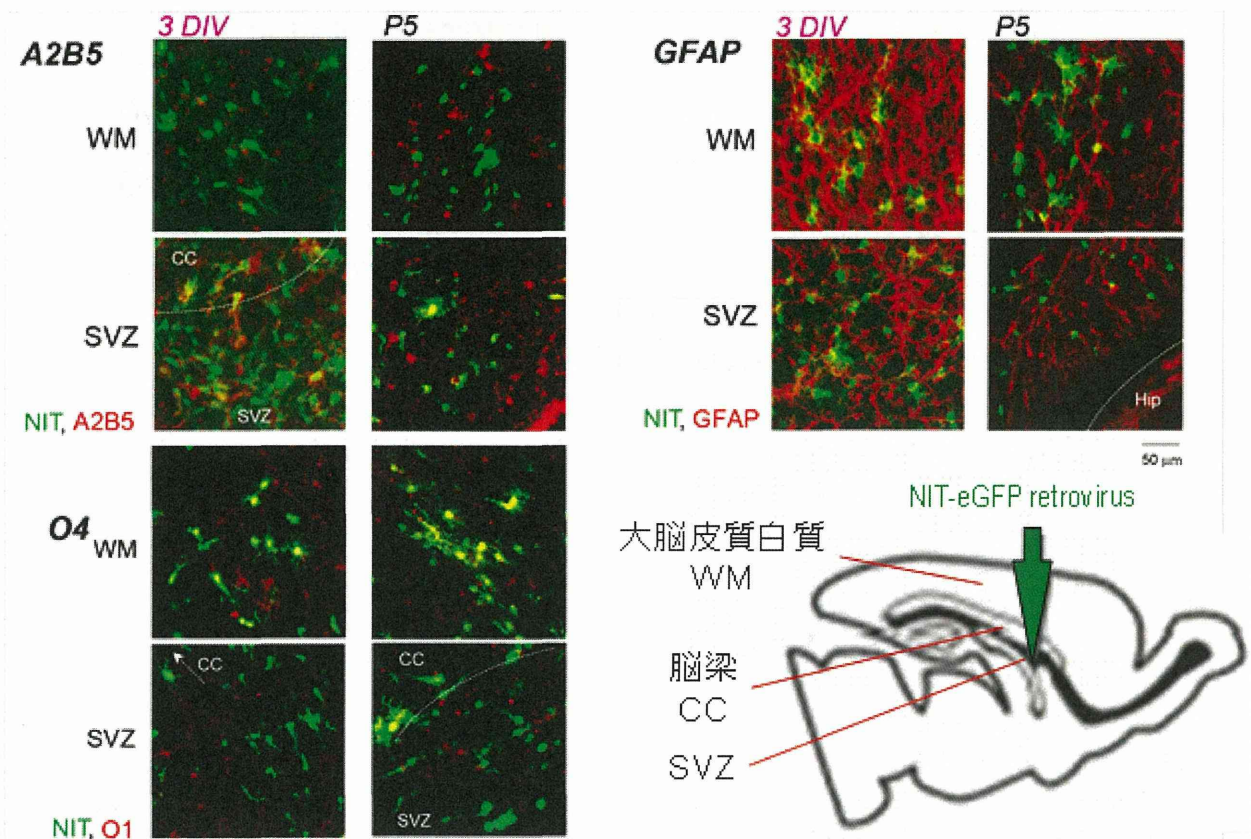
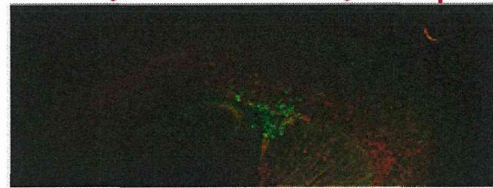


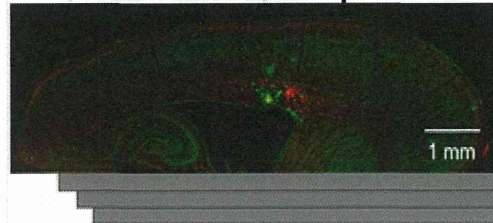
図9. 培養前脳矢状面切片における eGFP 標識細胞の分化マーカー発現

生後2日齢ラット SVZ に NIT-eGFP を注入し、5日齢で還流固定し作成した矢状面切片、生後2日齢ラット前脳矢状面切片に NIT-eGFP を滴下し3日間培養した標本、のそれぞれにおける eGFP 標識細胞の分化マーカー発現、細胞分布を比較したところ、両者共にグリア前駆細胞マーカー A2B5 の発現は SVZ 内に限られ、白質では発現している細胞は見られなかった。オリゴデンドロサイト前駆細胞マーカー O4 の発現は SVZ にはほとんど見られず、白質で多くの陽性細胞を確認した。アストロサイトマーカーである GFAP については、SVZ、白質ともに陽性細胞を確認した。培養前脳矢状面切片において eGFP 標識細胞は *in vivo* と同様の分化パターンを示すことが確認された。

3 DIV (cultured slice) 150 μm



P5 (Intact brain) 20 μm x 7-8



Sum

NIT, O1

	cultured slice	Intact brain
eGFP(+) cell No.	381.2 \pm 521.7	469.5 \pm 56.58
O1 (%eGFP(+) cells)	13.13 \pm 1.114	14.28 \pm 1.439

図 1 0. 培養前脳矢状面切片におけるオリゴデンドロサイト新生の定量的検討
 生後 2 日齢ラット SVZ に NIT-eGFP を注入し、5 日齢で還流固定し作成した矢状面切片、生後 2 日齢ラット前脳矢状面切片に NIT-eGFP を滴下し 3 日間培養した標本とで、eGFP 標識細胞中の O1(+) 細胞出現率を比較した。両標本ともにオリゴデンドロサイト新生がほぼ同じ出現率で起きていることが確認された。

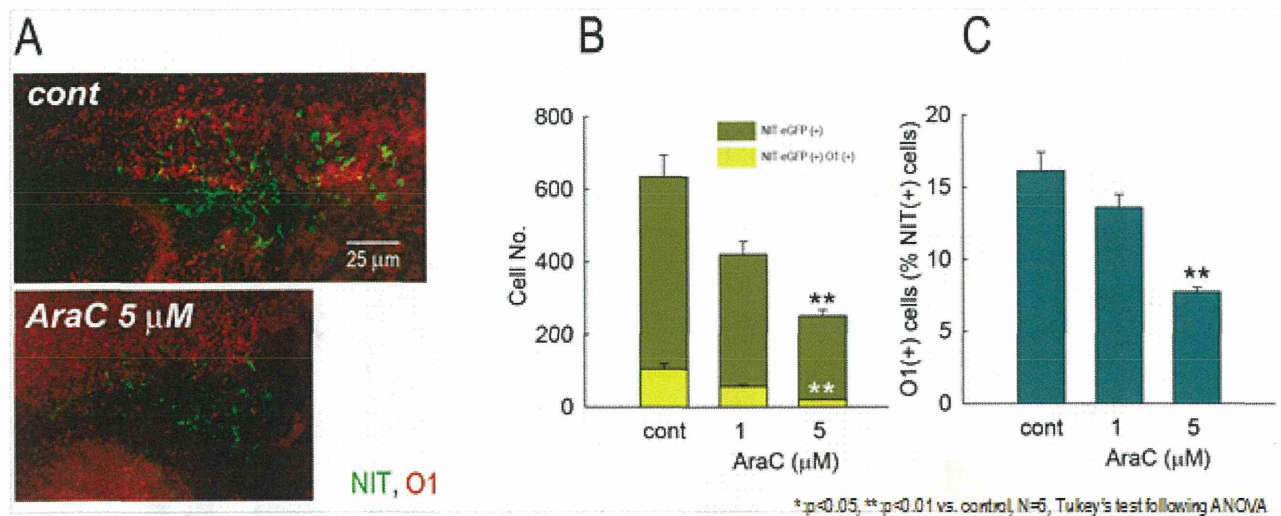


図 1 1. eGFP 標識された神経幹細胞および前駆細胞を含む前脳矢状面切片培養系を用いた薬理的検討—AraC のオリゴデンドロサイト新生に対する影響
 eGFP 標識細胞を含む培養前脳矢状面切片を AraC 処理したところ、eGFP 標識細胞の分布範囲は狭くなっていた (A)。eGFP 標識細胞数を計測したところ有意に減少していた (B)。eGFP 標識細胞に占める O1 (+) 細胞の比率も有意に減少していた (C)。AraC は神経幹細胞および前駆細胞の分裂を抑制すること、神経幹細胞および前駆細胞の分裂が抑制されるとオリゴデンドロサイト前駆細胞の遊走および分化がさらに抑制されることが示された。*:p<0.05, **:p<0.01 vs. control, N=6, Tukey's test following ANOVA

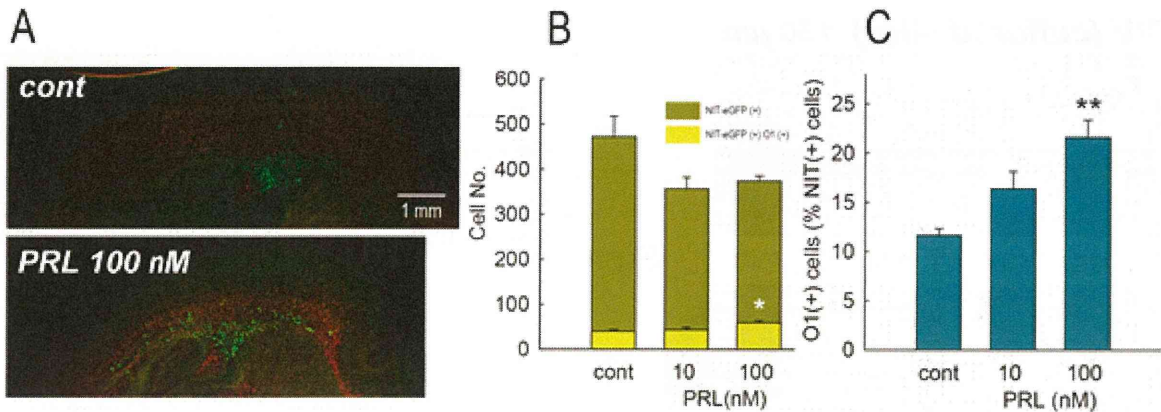


図1 2 eGFP 標識された神経幹細胞および前駆細胞を含む前脳矢状面切片培養系を用いた薬理的検討—Prl のオリゴデンドロサイト新生に対する影響

eGFP 標識神経幹細胞、前駆細胞を含む前脳矢状面切片を Prl (10, 100 nM) 存在下で培養したところ、eGFP 標識細胞の分布範囲が広がった (A)。赤 : O1、緑 : eGFP。eGFP 標識細胞数を計測したところ細胞数に有意な変化は見られなかった (B)。しかし、eGFP(+)O1(+) 細胞数は 100 nM Prl によって有意に増加していた。eGFP 標識細胞に占める O1(+) 細胞の比率も有意に増加していた (C)。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs. control, $N=6$, Tukey's test following ANOVA

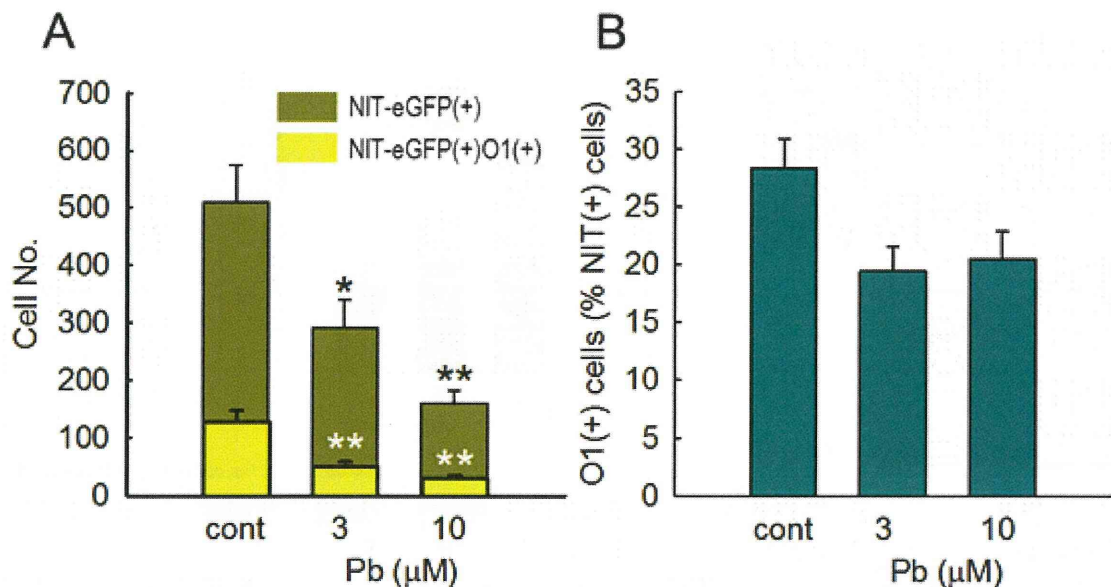


図1 3. オリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖および遊走に対する酢酸鉛の影響

生後2日齢ラット前脳矢状面切片脳室下帯に NIT-eGFP ウィルスを滴下し酢酸鉛 (3, 10 mM) 存在下で3日間培養し、eGFP(+) および eGFP(+)O1(+) 細胞数を計測した (A)。酢酸鉛 (3, 10 mM) により eGFP(+) 細胞数は濃度依存的に減少した。また、eGFP(+)O1(+) 細胞数も濃度に依存して減少した。eGFP(+) 細胞における O1(+) 細胞の割合を算出した (B)。eGFP(+) 細胞における O1(+) 細胞の割合は 3, 10 mM とともに同程度減少していた。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs. control, $N=6$, Tukey's test following ANOVA

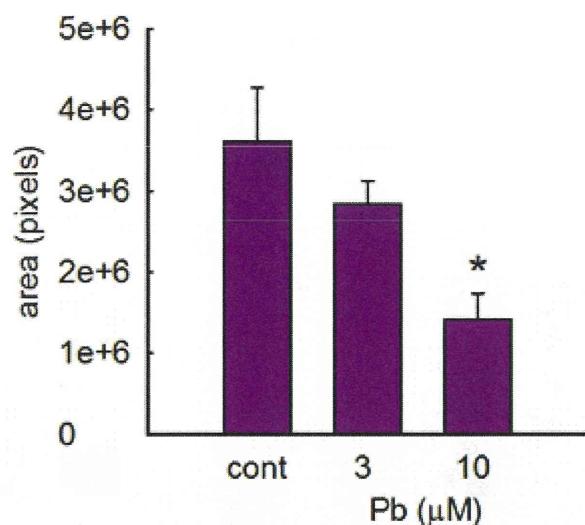


図14. オリゴデンドロサイト前駆細胞遊走に対する酢酸鉛の影響
 遊走後の eGFP(+)O1(+) 細胞を線で結んだ際の最大面積を遊走のパラメーターとしたところ、濃度依存的に遊走が阻害されていた。*: $p < 0.05$ vs. control, $N=6$, Tukey's test following ANOVA

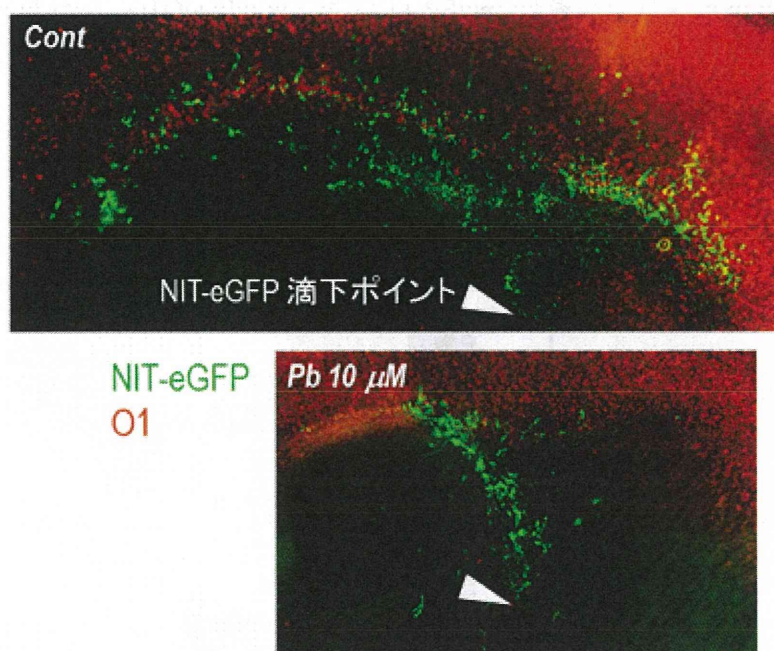


図15. 酢酸鉛を適用した培養前脳矢状面切片の eGFP および O1 による典型的な蛍光免疫組織化学染色像

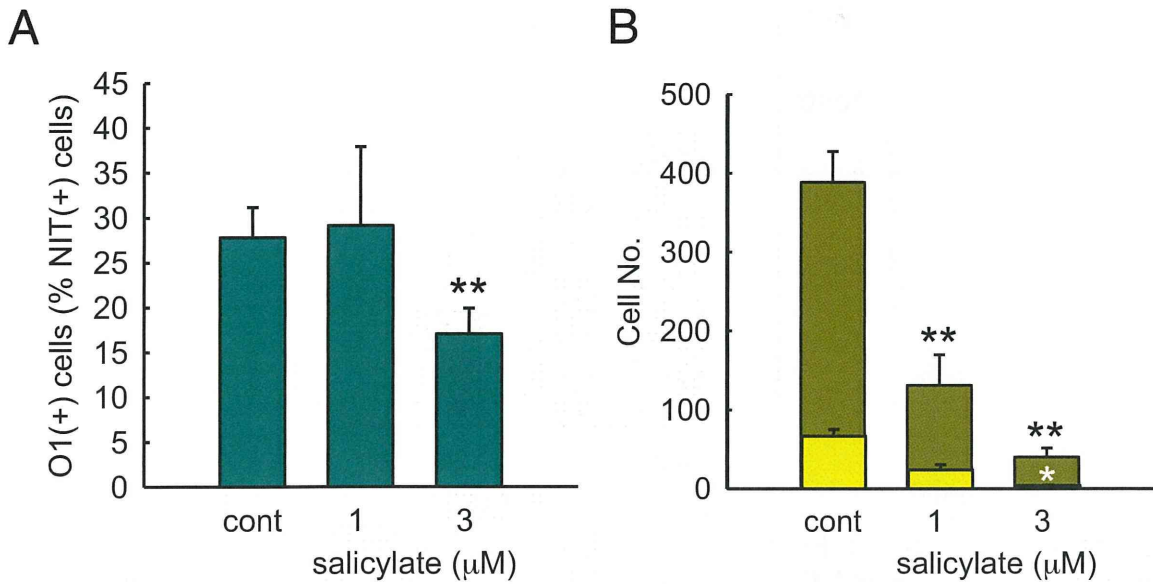


図16. オリゴデンドロサイト前駆細胞の増殖および遊走に対するサリチル酸の影響
 生後2日齢ラット前脳矢状面切片脳室下帯に NIT-eGFP ウィルスを滴下しサリチル酸ナトリウム (1, 3 mM) 存在下で3日間培養し、eGFP(+) および eGFP(+)O1(+) 細胞数を計測した (A)。サリチル酸 (1, 3 mM) により eGFP(+) 細胞数は濃度依存的に減少した。また、eGFP(+)O1(+) 細胞数も濃度に依存して減少した。eGFP(+) 細胞における O1(+) 細胞の割合を算出した (B)。eGFP(+) 細胞における O1(+) 細胞の割合は 3 mM で顕著に減少していた。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs. control, N=6, Tukey's test following ANOVA

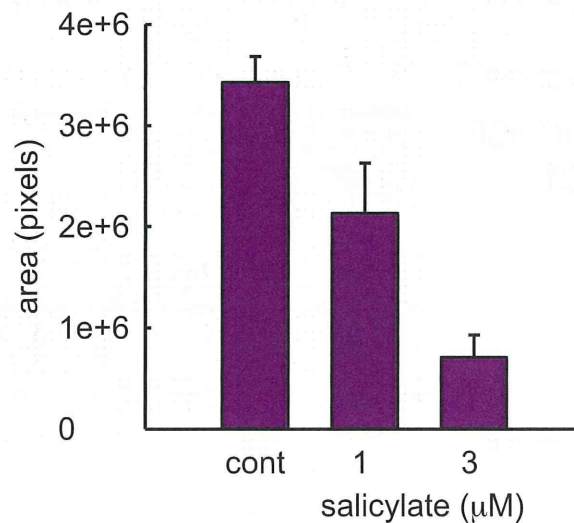


図17. オリゴデンドロサイト前駆細胞遊走に対するサリチル酸の影響
 遊走後の eGFP(+)O1(+) 細胞を線で結んだ際の最大面積を遊走のパラメーターとしたところ、濃度依存的に遊走が阻害される傾向を示した。

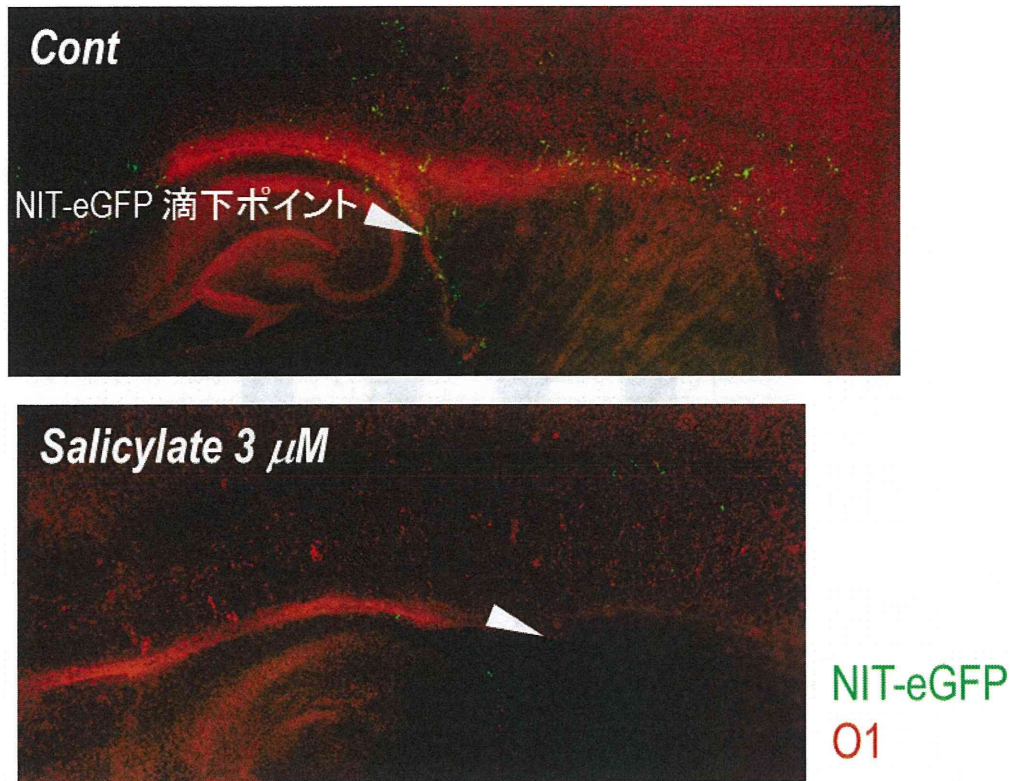


図 18. サリチル酸を適用した培養前脳矢状面切片の eGFP および O1 による典型的な蛍光免疫組織化学染色像

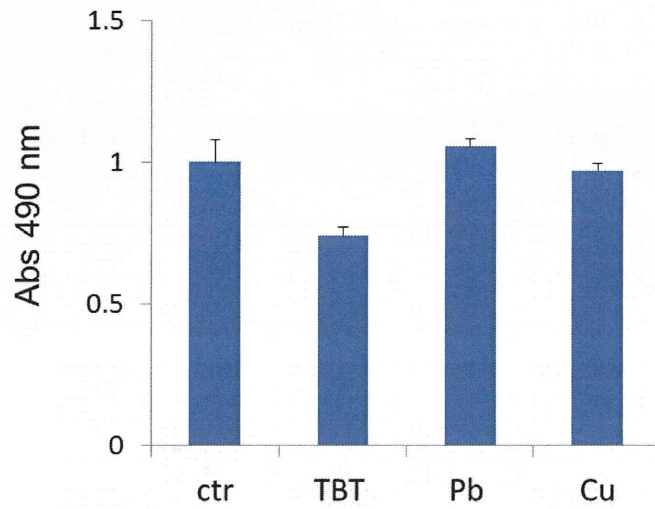


図19. 生細胞数に対する金属曝露の影響
TBT(100nM)の曝露によって生細胞数の低下が認められた。一方、PbやCuは10 μ Mの曝露によっても特に影響は認められなかった。

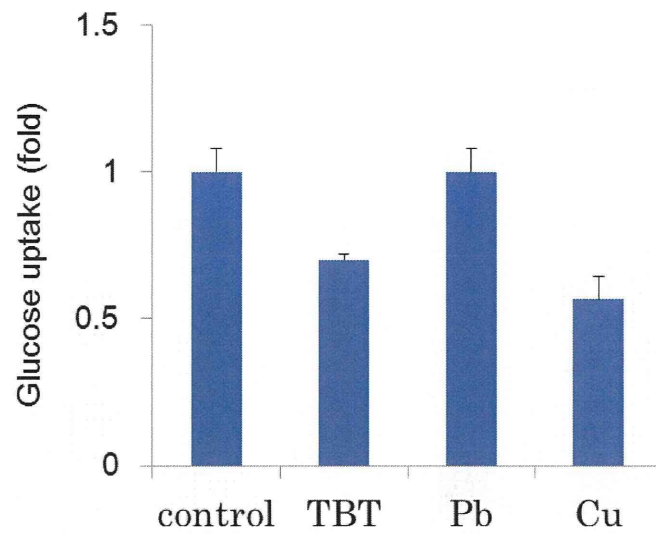


図 20. 糖取込に対する金属曝露の影響

糖取込は、細胞内へ取り込まれた 2-NBDG の蛍光強度の変化によって解析した。各金属は 24 時間の曝露を行った。TBT (100nM) および銅 (10 μ M) によって糖取込の抑制が認められた。一方、鉛 (10 μ M) はほとんど影響が認められなかった。

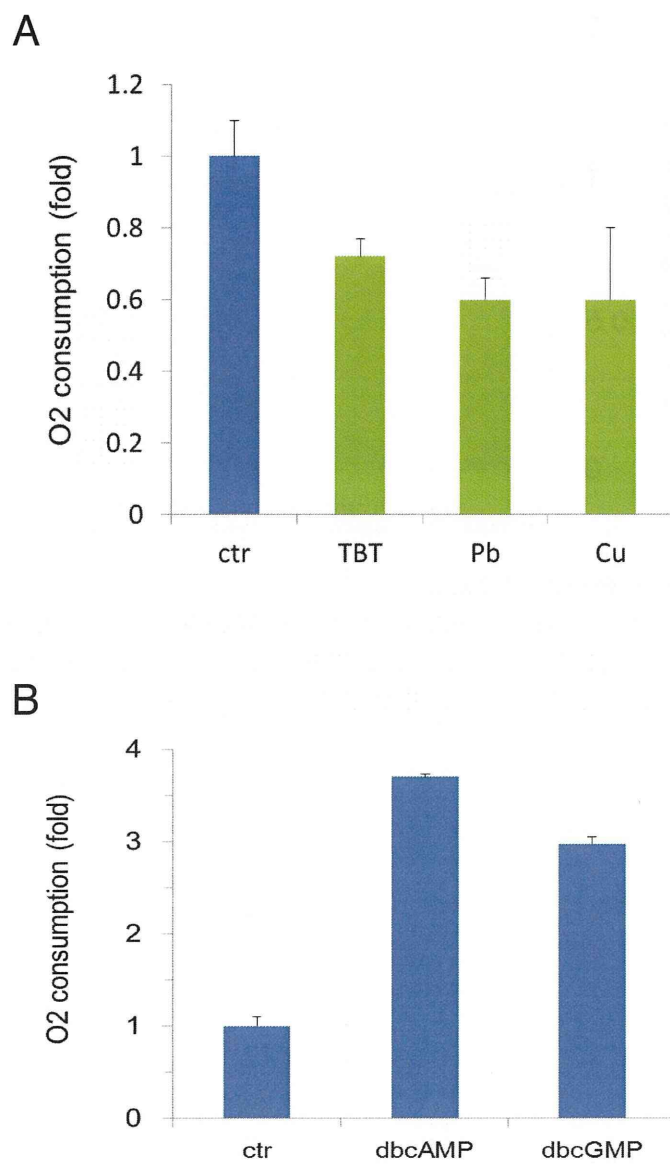


図2 1. 酸素消費量に対する金属曝露の影響

(A) 酸素消費量に対する TBT (100nM)、鉛 (10 μ M)、銅 (10 μ M) の 24 時間曝露の影響
 いずれの金属曝露においても酸素消費量の低下が認められた。

(B) cAMP アナログ (dbcAMP) あるいは cGMP アナログ (dbcAMP) によって酸素消費量
 の増加が観察された。

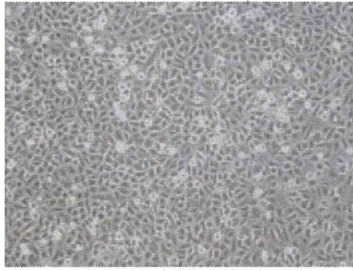


図 2 2. 胎児肝細胞

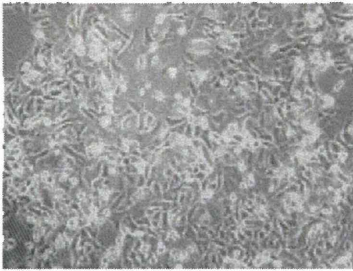


図 2 3. 肝芽細胞 (単層培養)

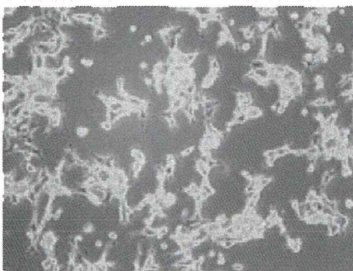


図 2 4 肝芽細胞 (スフェロイド)

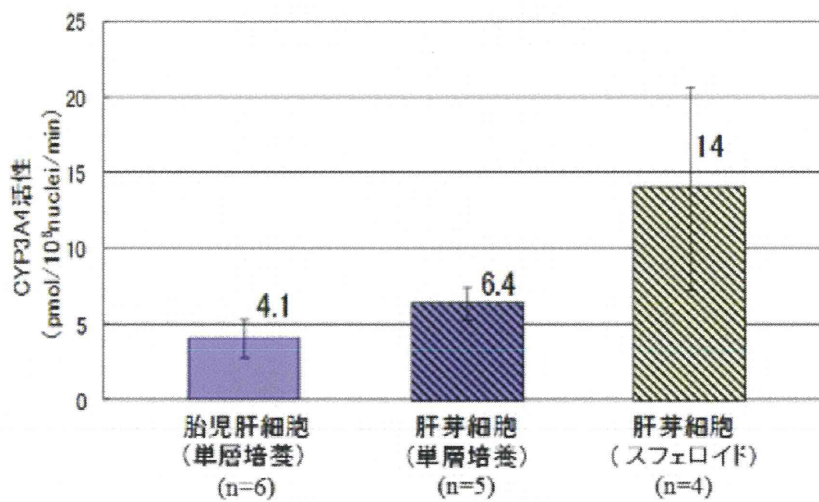


図 2 5. 各々の細胞の CYP3A4 活性の比較



HEP220523

Age: 81
Sex: Male
Ethnicity: Unknown
Liver pathology:
Hepatocellular carcinoma



HEP220524

Age: 66
Sex: Male
Ethnicity: Unknown
Liver pathology:
Hepatic metastases



HEP220527

Age: 62
Sex: Female
Ethnicity: Caucasian
Liver pathology:
Hepatocellular carcinoma

図 2 6 . BIOPREDIC 社非凍結肝細胞の顕微鏡像

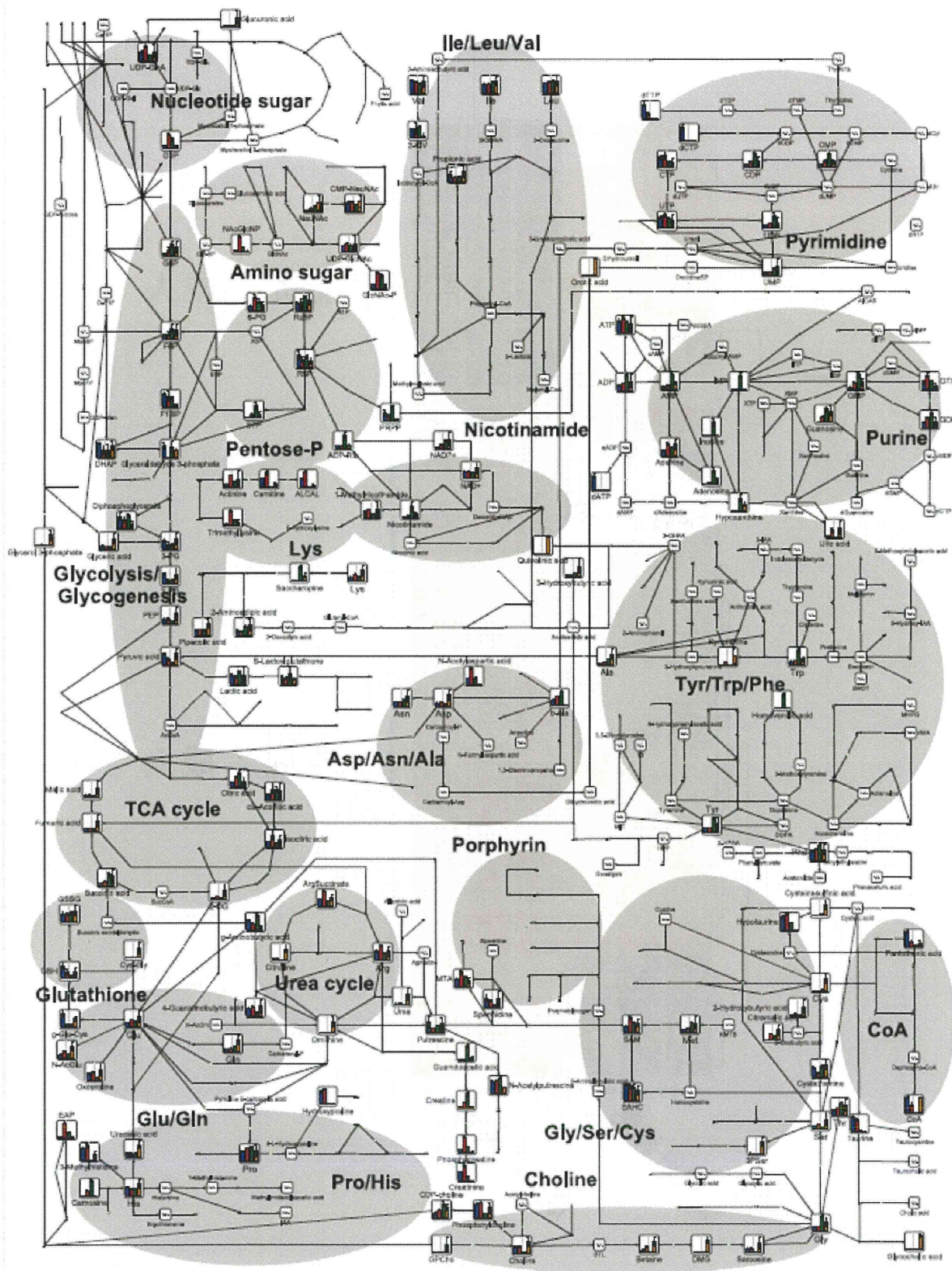


図 27. 代謝物質の経路図

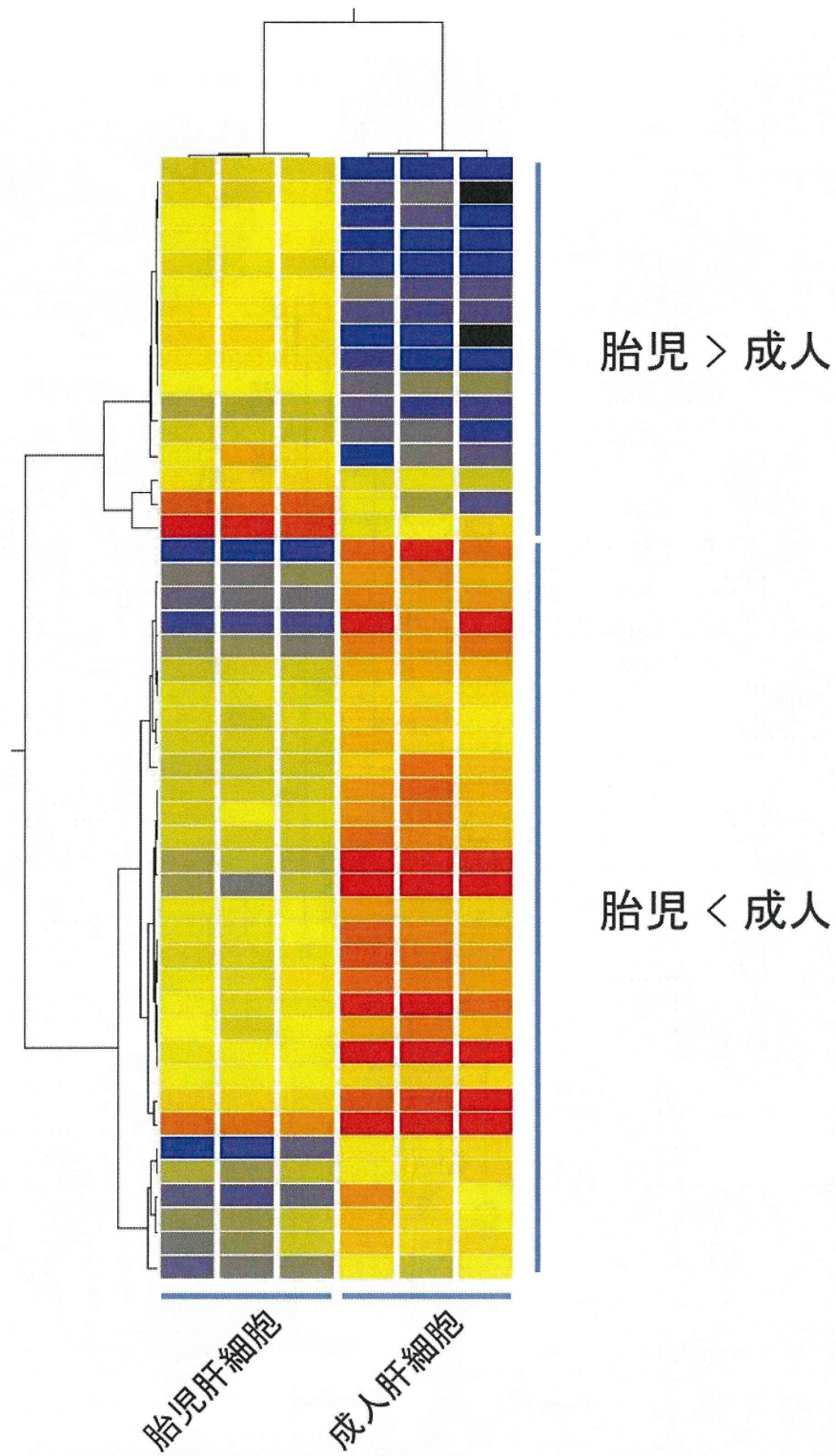


図 28. 胎児および成人肝細胞間で存在量が有意 (t-test, $p < 0.05$) に変化していた代謝産物の階層的クラスタリング

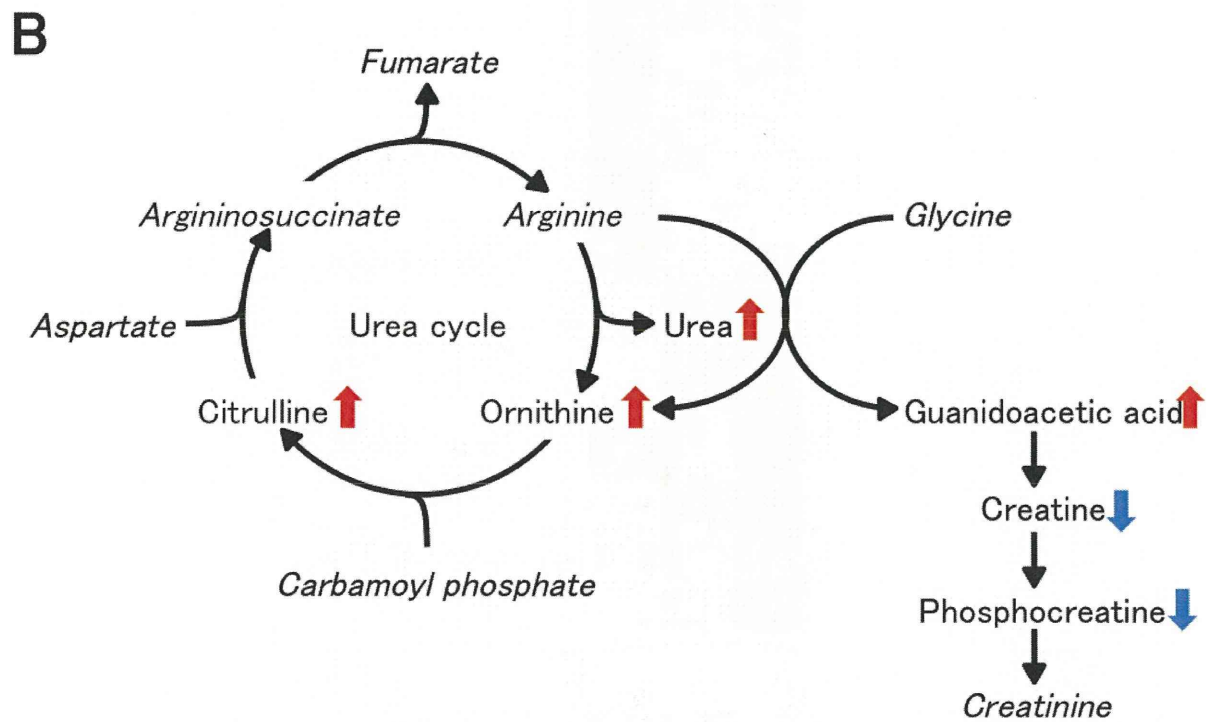
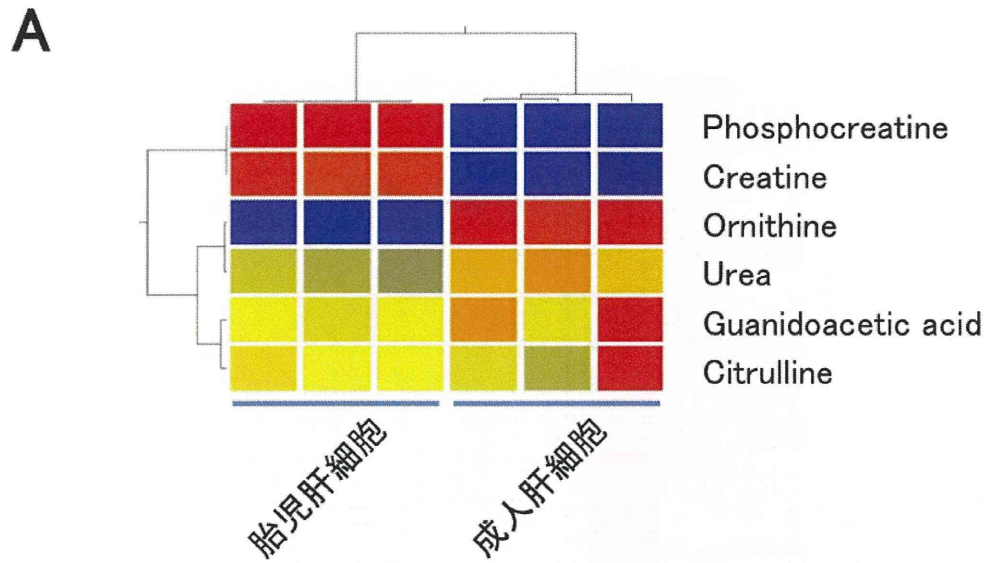


図 2 9. 胎児および成人肝細胞間での尿素回路とクレアチン経路の代謝産物の存在量の変化
 A、存在量が有意 (t-test, $p < 0.05$) に変化する代謝産物のヒートマップ。B、尿素回路とクレアチン経路の代謝マップ。赤い上向きの矢印と青い下向きの矢印は、それぞれ胎児肝細胞と比較して成人肝細胞で相対的存在量が増加、または、減少した代謝産物を示す。

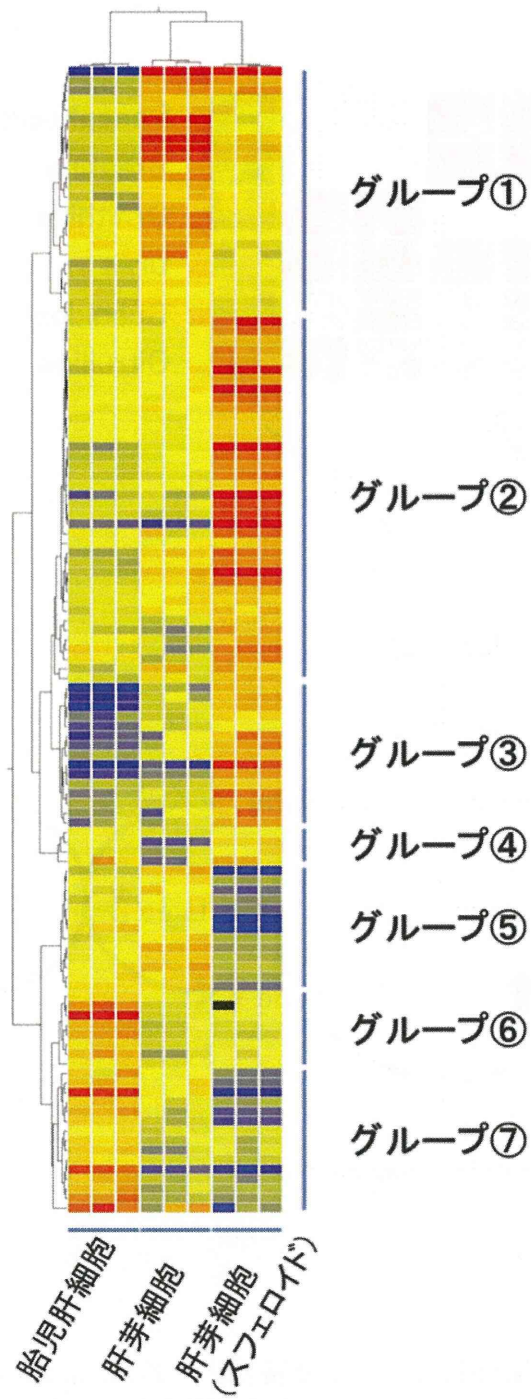


図30. 胎児肝細胞の単層培養および胎児肝細胞より分化誘導された肝芽細胞の単層培養、肝芽細胞のスフェロイド培養間で存在量が有意 (Oneway ANOVA, $p < 0.05$) に変化していた代謝産物の階層的クラスタリング

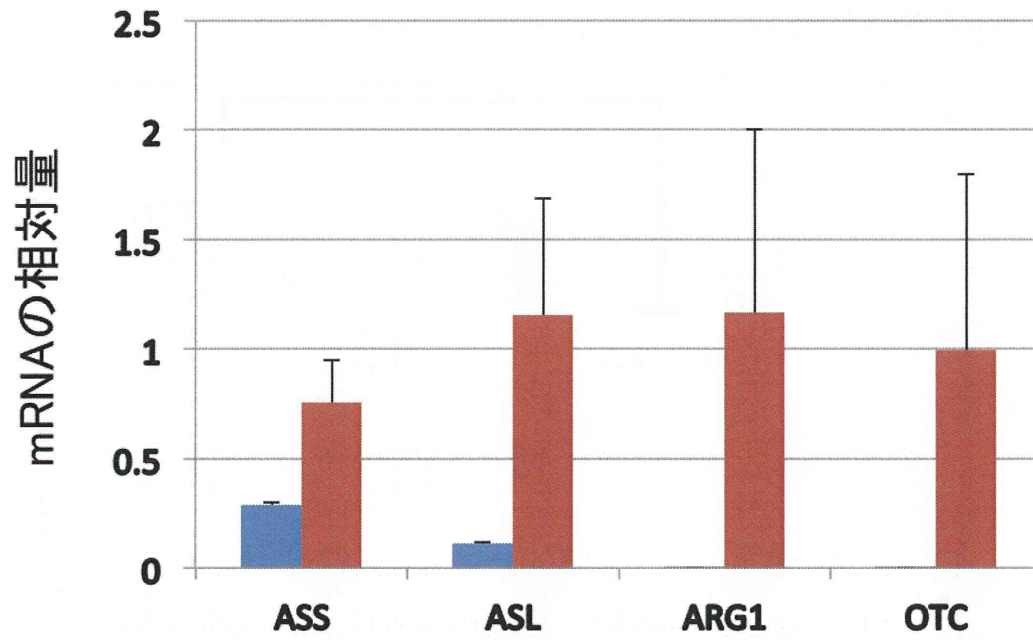
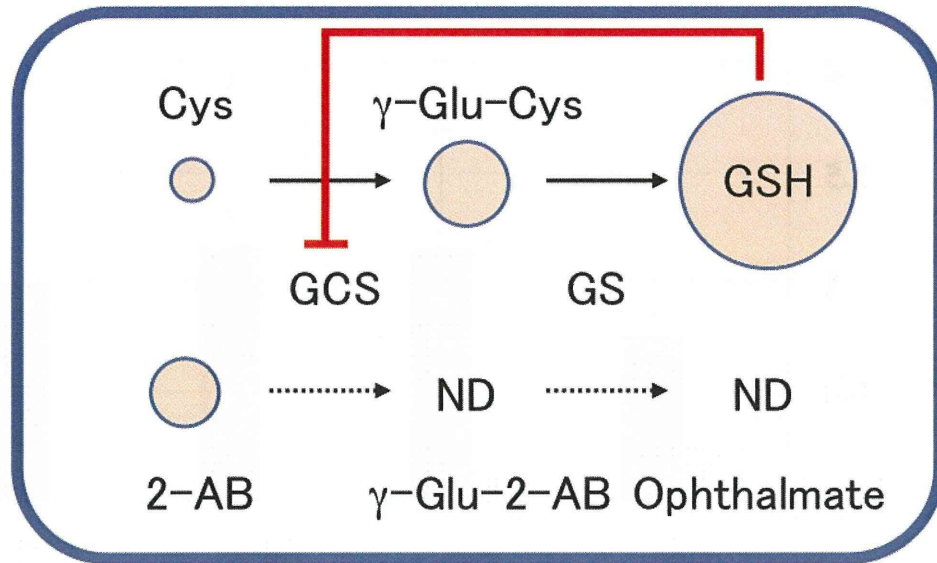


図 3 1. リアルタイム PCR 法による、胎児および成人肝細胞間での尿素回路の各遺伝子の発現量の比較

青い棒は胎児肝細胞を、赤い棒は成人肝細胞を表す。

ASS, argininosuccinate synthase 1; ASL, argininosuccinate lyase ; ARG1, arginase; OTC, ornithine transcarbamylase .

胎児肝細胞



成人肝細胞

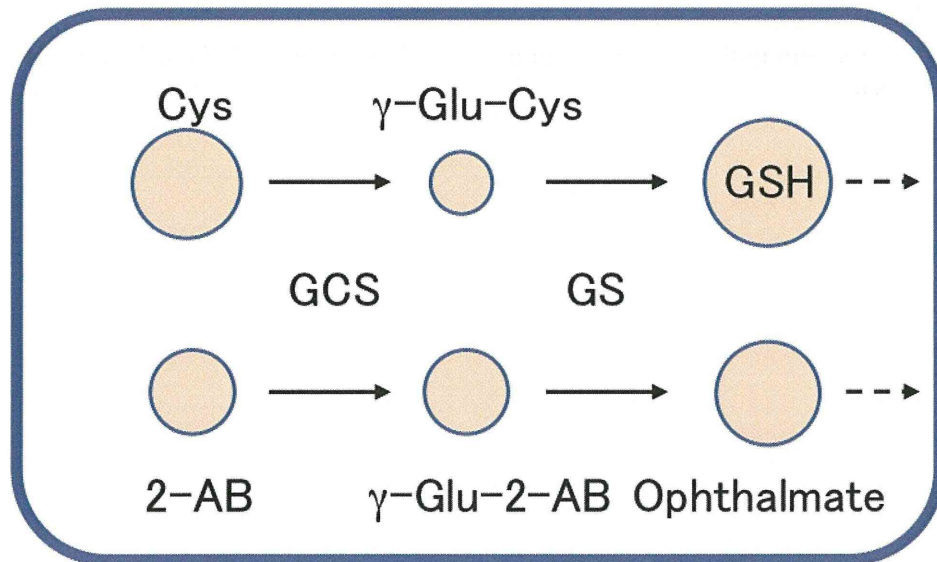


図 3 2. 胎児および成人肝細胞でのグルタチオン合成経路の模式図胎児肝細胞では生成した GSH により GCS がフィードバック阻害を受け、同酵素の働きにより合成される γ -Glu-2-AB, Ophthalmate が検出されない。成人肝細胞では、GSH が消費されているため GCS は阻害を受けず、 γ -Glu-2-AB, Ophthalmate が生産される。

GSH, glutathione; 2-AB, 2-aminobutyric acid; GCS, γ -glutamylcysteine synthetase; GS, glutathione synthetase.