

“ミトコンドリアトキシシ”スクリーニングシステムの研究, (1)

B-3 形態学的スクリーニングシステムラット培養肝細胞  
超微細構造の経時的変化 (第一報)

分担研究者 山下文雄 久留米大学小児科

共同研究者 木村昭彦・村上龍夫・小野栄一郎  
吉田一郎 久留米大学 小児科

今回、Reye症候群もしくはReye様症候群をきたす薬物の肝への影響を知るために、正常Rat肝細胞を培養し、その経時的変化を観察した。その目的は、Reye症候群およびReye様症候群をおこすと考えられている薬物および各種ウイルスなどの肝微細構造への影響を知ること、さらにはReye症候群およびReye様症候群の治療の影響を形態学的に観察することである。

今回はまず第一報として正常ラット肝細胞の培養法の確立および経時的変化を中心として述べる。

1. 肝細胞単離は1969年BerryとFriend<sup>1)</sup>が始めた灌流法の変法1976年Seglen<sup>2)</sup>の方法に準じて行った(図1)。この方法で単離した肝細胞は、培養後6時間ぐらいで着床する。

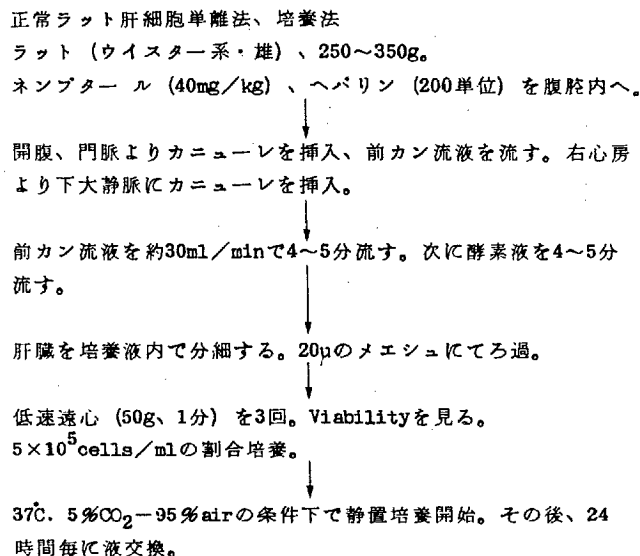


図1 肝細胞単離法、培養法

2. 前灌流液, 酵素液, 培養液を示す。

(1) Preperfusion medium (pH 7.2, 37°C)

Ca<sup>++</sup>-Free Hanks balanced salt solution

HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid)

EGTA (Ethyleneglycolbis-(β-aminoethylether) N, N'-tetraacetic acid)

(2) Perfusion medium (pH 7.5, 37°C)

Collagenase

Hanks balanced salt solution

HEPES

Trypsin inhibitor

(3) Williams' medium

Fetal Calf Serum

Penicillin and Streptomycin

3. 電顕用の標本作成のための固定法を図2に示す。

Phosphate Buffered Salineにて2回洗浄。

K2液 (pH 7.4) にて1時間室温にて放置。

K2 : A. paraformaldehyde	2g
NaOH	10滴
H <sub>2</sub> O	25ml
B. 0.1M sodium cacodylate buffer	9ml
2.5% glutaraldehyde	10ml
2.5% CaCl <sub>2</sub>	1ml
H <sub>2</sub> O	55ml

0.1M sodium cacodylate buffer pH 7.4 4°C にて24時間~7日間放置。

Osmium acid, Millonig buffer を1 : 1 に混合した液にて1時間室温にて放置。

Alcohol にて脱水。

100% Alcohol, EPON を1 : 1 に混合した液にて24時間デシケーター内にて放置。

EPON にて包埋、65°C インキュベーター内にて48時間放置。

図2 電顕固定法

4. 写真1は培養後48時間の肝細胞である。nucleus, mitochondria, peroxisome, ribosome, roughER, filamentなどの形態はほぼ正常に保たれている。また肝細胞間のbile canaliculusもみられる。

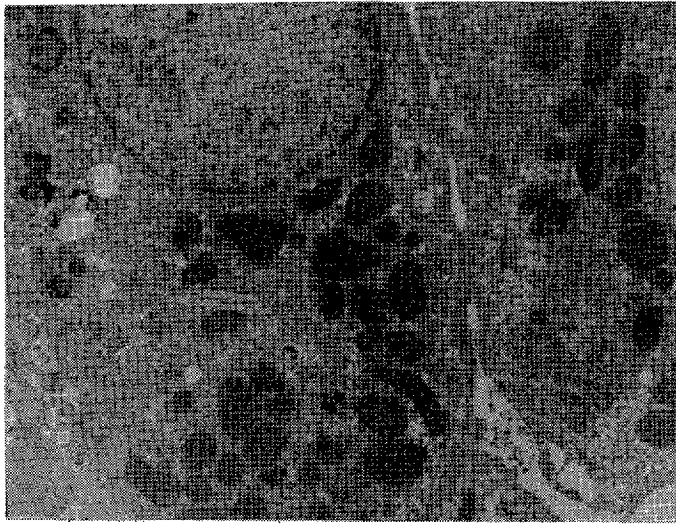


写真1 培養48時正常ラット肝細胞  
mitochondria, peroxisome, ribosome,  
rough ER, filamentなど形態はほぼ正常に  
保たれている。bile canaliculusもみられる。  
(×6000)

5. 脂質代謝およびバルプロ酸などの薬物代謝に大きく関与し、さらに細胞の増殖、分化、癌化の評価の指標となる peroxisome を中心に時間的变化を観察した。

peroxisome は種によって形態学的、生化学的に異なるようであるが、ラットの peroxisome は oxidase, catalase を含み  $\beta$ 酸化を行い、さらには acetyl-CoA, acylcarnitinなどを造る働きがある<sup>3)</sup>。

また、細胞量の約1.5~2%をしめ mitochondria の1/2~1/4 在存する。中心静脈のまわりに多いとされている<sup>3)</sup>。

一般には培養肝細胞の peroxisome は時間とともに数が少なくなり matrix が粗になる。またヌクレオシドが少なくなり消えていくといわれている<sup>4)</sup>。William<sup>5)</sup>らは72時間で peroxisome が消失したと報告している。

我々の観察でも72時間を過ぎると数は少なくなり、大きさも小さくなるが、matrix の粗、ヌクレオシドの消失はあまりみられなかった。写真2・3は48時間と96時間の peroxisome である。

尚、我々は培養後120時間迄、経過観察を行った。



写真2 培養48時間後の peroxisome (×16000)



写真3 培養96時間後の peroxisome (×16000)

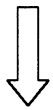
## 文 献

- 1) Berry M W, et al : High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. *J Cell Biol* 43 : 506, 1969.
- 2) Seglen PO : Preparation of isolated rat liver cells. *Method Cell Biol* 13 : 29, 1976.
- 3) Lazarow PB : Peroxisome, in Arias. I, Popper H, Schochter D. and Shafritz DA editors : *The liver biology and pathobiology*. New York, Raven Press 1982, pp 297-300.
- 4) 塚田英之・古川一典 : 初代培養のペルオキシゾーム, *組織培養* 7 : 189, 1981.
- 5) Williams GM, Bermudez E, San RC, Goldblatt PJ, and Laspia M F. : *In vitro* 14 : 824, 1978.



## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



今回,Reye症候群もしくはReye様症候群をきたす薬物の肝への影響を知るために,正常Rat肝細胞を培養し,その経時的变化を観察した。その目的は,Reye症候群およびReye様症候群をおこすと考えられている薬物および各種ウイルスなどの肝微細構造への影響を知ること,さらにはReye症候群およびReye様症候群の治療の影響を形態学的に観察することである。

今回はまず第一報として正常ラット肝細胞の培養法の確立および経時的变化を中心として述べる。

1.肝細胞単離は1969年BerryとFriendが始めた灌流法の変法(1976年Seglen<sup>2</sup>)の方法に準じて行った(図1)。この方法で単離した肝細胞は,培養後6時間ぐらいで着床する。