

培養肝細胞のビタミン B₁ 代謝

佐藤 雅子

(1991年10月15日 受理)

Thiamin Metabolism in Hepatocytes

Masako SATO

Abstract

Hepatocytes of carp, *Cyprinus Carpio*, were cultured in completely medium, Williams' E containing fetal bovine serum and insulin for 3 days and in its thiamin free medium for 1 day. ¹⁴C-Thiamin was added into the medium to investigate thiamin metabolism in the primary culture of carp hepatocytes. Radioactivity was mainly found in thiamin diphosphate (TDP) fraction in the cell, and in TDP and thiamin monophosphate (TMP) fraction and in thiazole (Tz) fraction in the medium of carp hepatocytes by high-performance liquid chromatography (HPLC).

ビタミン B₁ 代謝についてはラットや他の実験動物に B₁ を投与し組織や臓器の B₁ 代謝回転をみる研究が進められている¹⁻³⁾。動物の固体全体を用いるこれらの方法は貴重なものであるが、複雑な問題が多く関係しているため代謝を詳細に検討するには個々の組織または臓器について細胞レベルで代謝をみる必要がある。細胞培養の技術が進歩し肝臓やその他の臓器の初代培養細胞の調製が可能になったので⁴⁻⁷⁾ B₁ 代謝について初代培養肝細胞を調整し検討を加えた。

振盪法によりコイの肝細胞を分離し牛胎児血清及びインシュリンを含むウイリアム E の培地で 3 日間培養し培養肝細胞を調整後、培地に ¹⁴C-B₁ を添加して 24 時間培養し細胞と培地の B₁ 代謝産物を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分画した。放射活性の分析から細胞では TDP が高く、培地には TDP, TMP のほか Tz が分泌あるいは排泄されることが明らかにされた。

実験方法

振盪法によるコイの肝細胞の調製法⁸⁻¹⁰⁾

魚類の肝細胞の調製は林^{8,9)}によって報告されているのでその方法に準じてコイの肝細胞を調製

した。コイの肝臓は腸の周りに付着して存在しており、組織も軟弱であるため、他の動物のように灌流法で分離肝細胞を調製することは困難であるので振盪法により分離肝細胞を調製した。

1) 3~5匹の体重 200~250g のコイを MS222 で麻酔後、70%エタノールで体表面を滅菌した。クリーンベンチ内で口頭部からハサミを入れ腹線に沿って肛門の手前まで開腹し片側の腹部を切除し肝臓を露出させた。肛門に近い部分の腸をピンセットでほぐし左指で軽くつまみ上げながら、屈折した腸をほぐし、腸の周りに付着している肝臓をピンセットで取り外し約 50ml の Ca^{2+} -free リンゲル液の入ったビーカー内で軽くすすぎ、このすすぎを3回繰り返し血液を洗い流した。

2) 20ml の 5 mM コラーゲナーゼ/リンゲル液の入ったビーカー内に入れハサミで細切した。細切したものを 20ml の注射筒に入れ注射筒の穴を通過させ更に 18G の注射針を付した注射筒を通過させ肝臓を出来るかぎり細切した。

3) 5% CO_2 -95% O_2 をガス滅菌用フィルターを通して30秒間通気し密栓した。

4) インキュベーター内で25℃, 30分間, 110往復/分の振盪をした。

5) 110メッシュのステンレス製フィルターで細胞を濾過した。

6) 濾液は 1000rpm (100×g) で1.5分間遠心分離し上清はパスツールピペットで吸引除去した。

7) 沈殿に約 40ml の 2 mM EDTA リンゲル液を加え、駒込めピペットで充分ピペッチングし 1000rpm で1.5分遠心分離し、この操作を2回繰り返した。

8) 沈殿に約 40ml のリンゲル液を加え、同様にピペッチングし遠心分離する操作を2回繰り返した。

9) 淡黄褐色のペレット状態の細胞に 15-20ml の培地を加え細胞懸濁液を調製した。

10) 細胞懸濁液から一定量を試験管に取り、0.5%トリパンプルーを加え血球計算盤を用いて生細胞数および死細胞数を測定した。

コイの分離肝細胞の単層培養法

1) 培養ディッシュはコラーゲン (豚腱由来ペプシン可溶化 Type I Collagen, Cellmatrix I-P, 新田ゼラチン) を 1 mM HCl で希釈し、0.5mg 蛋白質/ml とし 10cm ディッシュに 1 ml 添加した。2時間以上クリーンベンチ内で乾燥させた後リン酸緩衝液 (PBS) で2回洗浄し、ウイリアム E 培地にインシュリンを 0.16 μM および牛胎児血清 (FBS) を 5% となるように加えた培養液 (Table 1) を 7-10ml 添加して 28℃, 5% CO_2 インキュベーター内に静置した。

2) コイの分離肝細胞は 2×10^5 cells/cm²

Table 1. Medium composition.

Williams' Medium E	11 mg/ml
Penicillin	100 U/ml
Kanamycin	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
NaHCO_3	23 mM
Fetal bovine serum	5 %
Insulin	0.16 μM

佐藤：培養肝細胞のビタミン B₁ 代謝

の密度でデイッシュに加え前後左右に揺り動かし細胞を均等に分散させた。28℃, 5% CO₂ インキュベーターに静置すると細胞はデイッシュの底面に接着し大体3日後には球状であった細胞はやや扁平となり伸展が見られ、細胞核が認められるようになるので培養液を交換した。

コイの培養肝細胞のビタミン B₁ 代謝

1) 培養2-3日後の培養肝細胞に B₁ を含まない培養液を添加して24時間培養後新しい培養液と交換し、チアゾールの C-2 にラベルしたチアミン (¹⁴C-B₁) を添加し24時間培養した。培養液はパスツールピペットで分取し1 ml の PBS で2回細胞表面を洗浄し直ちに TCA を終濃度5%になるように加えた。細胞には5% TCA を加えシリコンラバーで細胞を掻き集めテフロン製ホモジナイザーでホモジナイズした。TCA で除蛋白した培地および細胞は遠心分離し上清に同量のエーテルを加えてこの操作を2回繰返し TCA を取り除いた。試料は凍結乾燥し標準の TTP, TDP, TMP, チアミン (T), T₂ を添加しカラムクロマトで B₁ 代謝産物を分画した。

HPLC によるビタミン B₁ 代謝産物の分画及び定量

μ Bondapak C₁₈ (39×300mm) 及び Cosmosil 5C₁₈-AR (4.6×150mm) を用いた逆相系 HPLC によるビタミン B₁ 代謝産物の分画を行った。溶出液は 253nm の紫外吸収を測定しその一部を取り放射活性を測定した。

結果及び考察

振盪法によるコイの肝細胞の調製

コイの肝臓は腸の周りに付着して存在し組織も軟弱であるため他の動物のように灌流法で分離肝細胞を調製することは困難であるので振盪法により分離肝細胞を調製したが、分離されない細胞集団が一部観察され回収率も低くなる傾向が見られた。均一な分離肝細胞を効率よく調製するため細胞の細切をハサミで細切した後注射筒や注射針を通過させ更に細かくしたり、ステンレス製フィルターで細胞を濾過したりすることなどで写真1のように均一な分離肝細胞を調製することが出来た。このようにして調製された分離肝細胞の生存率はトリパンブルー染色によると90%以上であった。調製直後の分離肝細胞(写真1)は培養3日後(写真2)には接着し核が見えるようになり、5日後(写真3, 4)にはデイッシュ全体に細胞の接着伸展が進んでいることがわかる (Fig. 1)。

HPLC によるビタミン B₁ 代謝産物の分画及び定量

ビタミン B₁ 及びそのリン酸エステルの HPLC による分画及び定量は詳細に研究されている¹¹⁾ -¹⁴⁾。B₁ の分解産物であるチアゾールについても報告されているが^{11, 12)}、この実験では培養肝細胞

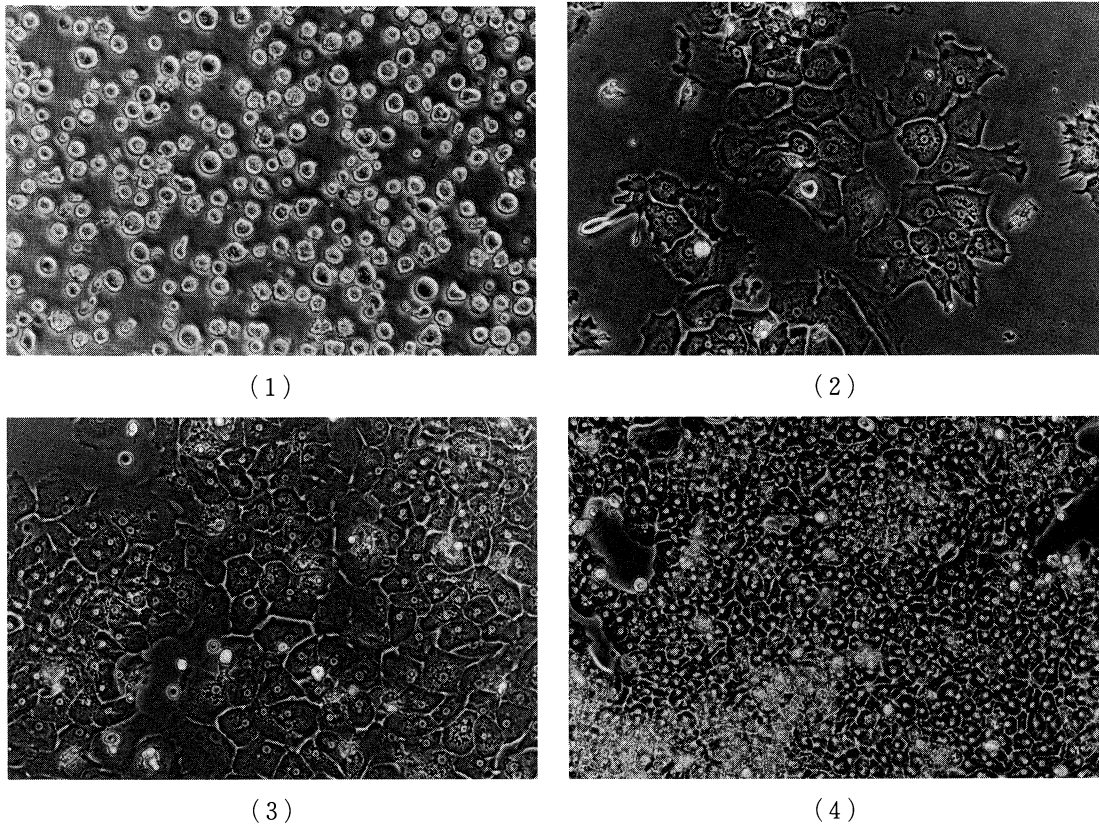


Fig. 1 Micrographs of carp hepatocytes cultured in Williams' medium E for 0 day (1), 3 days (2), 5 days (3) and 5 days (4). Magnification; $\times 200$ (1-3), $\times 82$ (4).

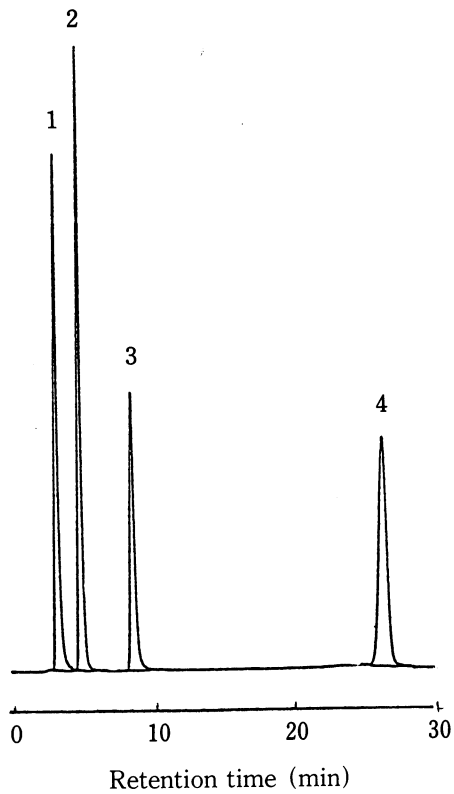


Fig. 2 Chromatogram of TDP, TMP, thiamin and thiazole. Column : Cosmocil 5C₁₈-AR (4.6 \times 150 mm), Mobile phase : 0.05M KH₂PO₄ + 0.005M Octan sulfonate Na : Metanol (3 : 1), Apparatus : Multisolvent Delivery System (Waters 600), Detector : Lambda-Max 481 LC Spectrophotometer (253nm UV), Recorder : Data Module M 741 (Waters), Flow rate : 1ml/min, 1 : TDP, 2 : TMP, 3 : Thiazole, 4 : Thiamin.

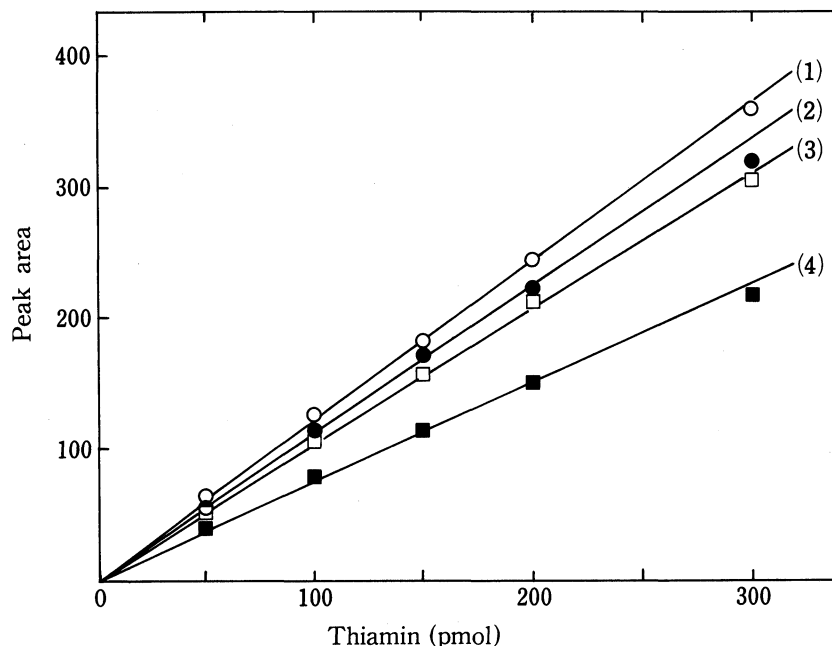
佐藤：培養肝細胞のビタミン B₁ 代謝

Fig. 3 Calibration graph of TDP, TMP, thiamin and thiazole. (1) : TMP, (2) : TDP, (3) : Thiamin, (4) : Thiazole.

の細胞および培地について B₁ とそのリン酸エステルおよびチアゾールの B₁ 代謝産物を同時に分画出来る条件を検討した。μ Bondapack C₁₈ でも分画は可能であったが Cosmosil 5C₁₈ を使用したイオン会合法による分画は分離度ははるかに高かったので (Fig. 2) 以下 Cosmosil 5C₁₈ で B₁ 代謝産物を分画した。検量曲線を Fig. 3 に示しているが 200pmol まで直線関係が得られた。紫外吸光による検出であるため蛍光分析に比べ最小検出量は大きかった。溶出液の分画量は溶出位置が隣接している B₁ リン酸エステルをうまく分取するよう 0.5ml とし溶出液の一部をとり放射活性を測定した。

コイの培養肝細胞のビタミン B₁ 代謝

¹⁴C-B₁ の添加量を変えて細胞および培地の B₁ 代謝産物の放射活性を測定したものである (Table. 2, Fig. 4, 5)。細胞の放射活性を見ると TDP の比率が高く、¹⁴C-B₁ の添加量を増加させると TDP も高くなるが 16nmol 添加では増加は横這いとなった。TTP, TMP, T, Tz, その他未確認物質も存在したがいずれも TDP に比べると低い比率であった。培地の放射活性は T の比率が 2 nmol 添加では添加量の約 10% であるが 6 nmol では約 50%, 16nmol 添加では約 70% と高くなった。これは過剰投与のため細胞に取り込まれず培地に残存した未代謝の ¹⁴C-B₁ であると思われる。培地の B₁ 代謝産物について放射活性は Tz の比率が高く、TDP は細胞内と同じくらいの放射活性であり、TMP は細胞内よりも高く、これらの代謝産物は ¹⁴C-B₁ の添加量を増加させると高くなった。未確認の代謝産物も存在したが培地には TTP は検出されなかった。細胞内、培地の B₁ 代謝産物の比率は細胞の B₁ レベルやこれらに影響を及ぼす酵素の活性により

変動することが考えられるので検討を加えたい。

細胞内の TDP が高かったがコイの肝細胞でも他の動物^{2,3)}と同じように脱炭酸酵素の補酵素としてエネルギー代謝に関与していることが考えられる。培地の TDP, TMP の値が高かったことについて細胞に取り込まれた B₁ の一部は TDP, TMP に合成され細胞内に保留されるがこれらの一部は培地に分泌あるいは排泄されたものと考えられる。ラットやマウスなどの動物では血液中の B₁ 形態は TDP や TMP がかなり高いこと¹³⁾からコイでも TDP や TMP は B₁ の輸送形態であることも考えられる。コイの培養肝細胞の B₁ 代謝では TTP, TDP, TMP など B₁ の合成系が存在することが確認されたが、培地では B₁ 分解産物である Tz の比率が高く分解系も存在するこ

Table. 2 Metabolites of ¹⁴C-thiamin in cultured hepatocytes of carp.

¹⁴ C-thiamin (nmol)		Total	TTP	TDP	TMP	Radioactivity (dpm × 10 ⁻³)		
						Thiamin	Thiazole	Unidentified
2	Cell	16.2 ± 2.1	0.6 ± 0.2	12.5 ± 3.2	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.5 ± 0.1
	Medium	104.0 ± 7.6	0	13.8 ± 1.1	8.1 ± 0.9	12.6 ± 3.6	51.6 ± 6.2	9.8 ± 2.2
6	Cell	36.0 ± 2.7	0.4 ± 0.0	26.1 ± 3.6	4.2 ± 1.2	1.7 ± 0.5	2.8 ± 0.5	0.8 ± 0.2
	Medium	293.7 ± 2.8	0	22.6 ± 3.4	23.1 ± 11.1	156.2 ± 10.7	77.2 ± 4.4	11.6 ± 2.4
16	Cell	45.0 ± 5.5	0.4 ± 0.1	27.0 ± 4.1	6.4 ± 1.3	4.6 ± 0.8	5.1 ± 0.6	1.3 ± 0.5
	Medium	853.5 ± 37.9	0	30.5 ± 1.2	34.8 ± 2.0	671.6 ± 37.5	101.6 ± 9.6	18.1 ± 0.9

Carp hepatocytes were cultured in Williams' medium E-5% FBS-0.16 μM insulin for 3 days and in its thiamin free medium for 1 day, and then cultured in the latter medium containing ¹⁴C-thiamin for 1 day at 28°C. Values are means ± SD (n=3).

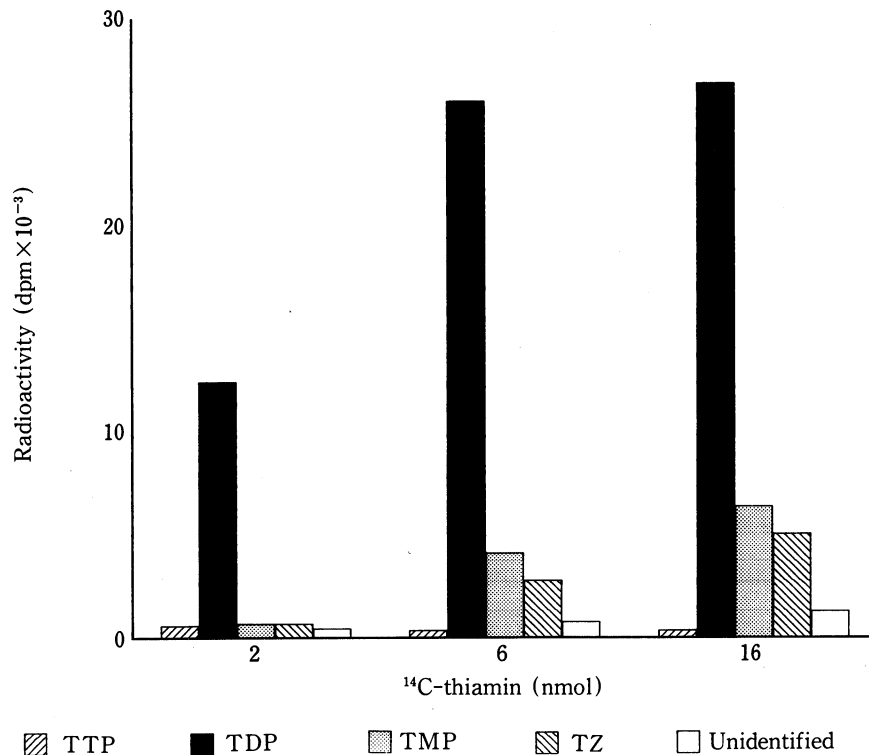
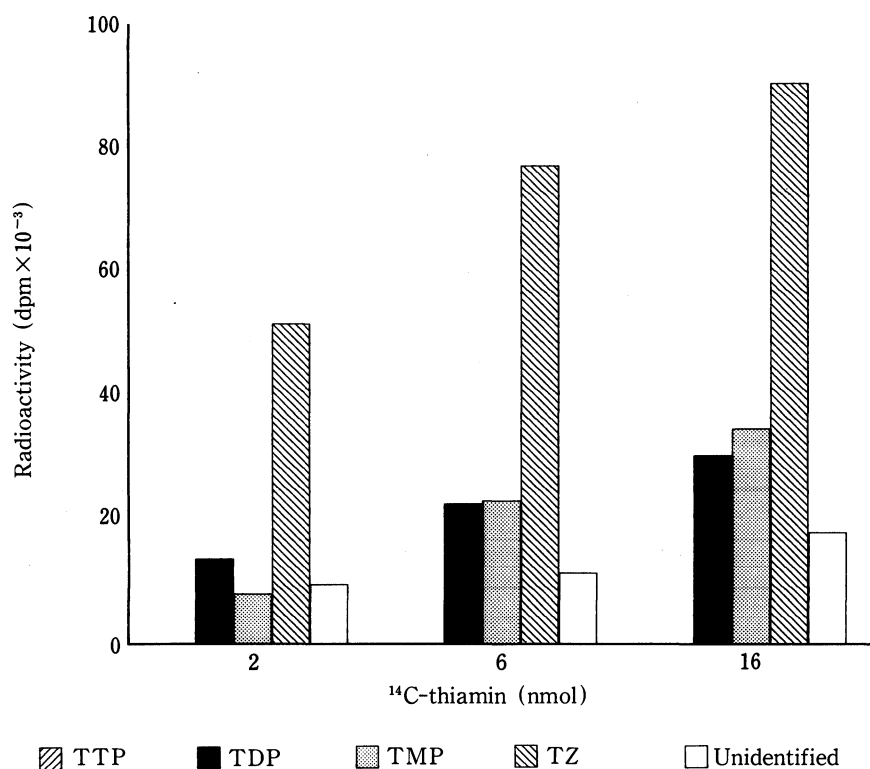


Fig. 4 Metabolites of ¹⁴C-thiamin in the cell of carp hepatocytes.

佐藤：培養肝細胞のビタミン B₁ 代謝Fig. 5 Metabolites of ¹⁴C-thiamin in the medium of carp hepatocytes.

とが明らかにされた。コイには B₁ 分解酵素が存在し肝臓でも酵素活性がかなり高いことは *in vitro* の実験ですでに明らかにされている¹⁵⁻¹⁷⁾。コイの培養肝細胞で Tz が生成されたことは *in vitro* だけでなく *in vivo* でも B₁ が分解されることを示すものである。コイに非経口的に ¹⁴C-B₁ を投与すると飼育水に Tz が排泄され (未発表), ラットやマウスでも同様に非経口的に ¹⁴C-B₁ を投与すると尿中に B₁ 分解産物が排泄される¹⁸⁻²⁰⁾。B₁ 分解産物はコイでは 4-メチル-5-ヒドロキシエチルチアゾールであるのに対しラットやマウスでは 4-メチル-5-ヒドロキシエチルチアゾールを径て 4-メチルチアゾール 5-酢酸が尿中に排泄される¹⁸⁾。 *in vitro* の実験ではコイには B₁ 分解酵素の活性が認められるが¹⁵⁻¹⁷⁾ ラットやマウスでは B₁ 分解酵素の存在は認められていない。ラットやマウスについては遊離肝細胞の B₁ 代謝の報告はあるが^{6,7)} 培養肝細胞の B₁ 代謝は明らかにされていない。コイの培養肝細胞で B₁ 分解産物が生成されることは明らかでありラットやマウスの培養肝細胞の B₁ 代謝と比較しながら B₁ 分解の意義について検討したい。

参 考 文 献

- 1) Trebukhina, R V., Ostrovsky, Yu. M., Velichko, M. G., Tumanov, V. N., J. Nutr., **113**, 1285 - 1291, (1983).

- 2) Rindi, G., Patrini, C., Comincioli, V., Reggiani, C., *Brain Research*, **181**, 369-380, (1980).
- 3) Sen, I., Cooper, J. R., *Neurochemical Research*, **1**, 65-71, (1976).
- 4) 中村敏一, 初代培養感細胞実験法, 1-101, (1987).
- 5) Lumeng, L., Edmondson, J. W., Li, T-K., *J. Biol. Chem.*, **254**, 7265-7268, (1979).
- 6) Yoshioka, K., Nishimura, H., Iwashima, A., *Biochimica et Biophysica Acta*, **732**, 308-311, (1983).
- 7) Yoshioka, K., *Biochimica et Biophysica Acta*, **778**, 201-209, (1984).
- 8) Hayashi, S., Ooshiro, Z., *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **52**, 1641-1651, (1986).
- 9) 林征一, マリンバイオテクノロジー, 44-56, (1991).
- 10) Bouche, G., Gas, N., Paris, H., *Biol. Cellulaire*, **36**, 17-24, (1979).
- 11) Panijipan, B., Kimura, M., Itokawa, Y., *J. Chromaogr.*, **258**, 307-309, (1983).
- 12) Panijipan, B., Kimura, M., Itokawa, Y., *J. Chromaogr.*, **245**, 144-147, (1982).
- 13) Kimura, M., Itokawa, Y., *J. Chromaogr.*, **332**, 118-188, (1985).
- 14) 川崎尚, 實森宏, ビタミン, **57**, 89-95, (1983).
- 15) 佐藤雅子, 鹿児島大学教育学部, 研究紀要. **22**, 28-34. (1971)
- 16) 藤田秋治, ビタミン. **7**, 1-11, (1954).
- 17) Murata, K., *Ann. NY. Acad. Sci.*, **378**, 146-156, (1982).
- 18) Amos, W. H., Neal, R. A., *J. Biol. Chem.*, **245**, 5643-5648, (1970).
- 19) Suzuoki, Z., Tominaga, F., Matsuo, T., *J. Nutri.*, 433-444, (1968).
- 20) Matsuo, T., Suzuoki, Z., *J. Biochem.*, **65**, 953-960, (1969).