信州医誌，41(6)：579～593，1993

ラット肝細胞における ペルオキシゾーム増殖機構に関する研究

百瀬泰紀
信州大学医学部第1解剖学教室
（主任：永田　哲士教授）

Study on the Mechanism of Peroxisome Proliferation in Rat Hepatocytes

Yasunori MOMOSE
Department of Anatomy and Cell Biology, Shinshu University School of Medicine
(Director : Prof. Tetsuji NAGATA)

Bezafibrate, a hypolipidemic agent, induces peroxisome proliferation in rat liver. In order to elucidate the mechanism of peroxisome proliferation, the intracellular localization of the peroxisome proliferator in cultured hepatocytes was examined by means of light and electron microscopic radioautography using ^{14}C-labeled bezafibrate. Furthermore, in order to study the relation between peroxisomes and endoplasmic reticulum in peroxisome proliferation, electron microscopic enzyme cytochemistry of the catalase and G6Pase on the same cells were carried out. On light microscopic radioautograms, about 90% of all the silver grains were localized over the cytoplasm, and statistical significance was evaluated on grain density in the cytoplasm. On electron microscopic radioautograms of whole mount cultured cells, silver grains were localized on cytoplasmic matrix especially over endoplasmic reticulum. Electron microscopic and biochemical studies on rat liver treated orally with bezafibrate revealed the proliferation of smooth membranous structure resembling SER. With enzyme cytochemistry, the G6Pase reaction products were observed inside the peroxisomal membrane of rat hepatocytes treated orally with bezafibrate.

From these results, it is concluded that bezafibrate was localized over endoplasmic reticulum. This fact suggests that the receptor of peroxisome proliferator should be associated with the endoplasmic reticulum or the receptor exists on the endoplasmic reticulum. *Shinshu Med J 41 : 579—593, 1993*

(Received for publication July 30, 1993)

Key words : rat liver, bezafibrate, peroxisome, radioautography, enzyme cytochemistry
ラット肝臓，ベザフィブレート，ペルオキシゾーム，ラジオオートグラフィー，酵素組織化学

I 緒　　言

Clofibrate をはじめとする高脂血症治療剤や di(2-ethylhexyl)phthalate（DEHP）などのプラスチック可塑剤は経口投与することによって肝臓の腫大，滑面小胞体の増生，ペルオキシゾームの増生およびそれに伴うペルオキシゾーム関連酵素が誘導されることが知られている[1)-9)]。最近開発された bezafibrate は高脂血症治療剤であり，clofibrate 等と同様な反応を示すことはすでに確認されている[7)10)]。また，このような

高脂血症治療剤の反応は動物種差が著明であり，特に齧歯類で強く反応することが確かめられている[9)-11)]。そして様々な手法によりこの増殖機構の解析が行われてきたが，増殖機構を知るうえで大変重要と思われるペルオキシゾーム増殖剤の体内分布あるいは細胞内分布に関する研究は僅かしかない[12)13)]。そこで，^{14}Cで標識したbezafibrateを用いて培養肝細胞での光顕および電顕ラジオオートグラフィーにより細胞内分布の解析を試みた。

一方，ペルオキシゾームの生合成機構については，ペルオキシゾームと滑面小胞体様の膜とが連続している所見に裏付けされた小胞体発芽説[14)-21)]および既存のペルオキシゾームの成長と分裂による増殖説[22)-28)]が主要なものであり，近年の研究結果では分裂による増殖説が広く受け入れられている。しかし，ペルオキシゾーム増殖剤を経口投与したラット肝臓では滑面小胞体の増生が認められ，ペルオキシゾーム周囲には小胞体が高頻度に観察されることから，ペルオキシゾームと小胞体とが何らかの関わりをもっていることは否定できない。そこで小胞体とペルオキシゾームとの関係を詳細に調べるため，小胞体のマーカー酵素であるglucose-6-phosphatase（G6Pase）およびペルオキシゾームのマーカー酵素であるcatalaseの酵素組織化学反応を同一切片上で行い，電子顕微鏡で詳細に観察した。また，bezafibrateを投与したラット肝臓のG6Paseおよびcytochrome P-450を生化学的に測定し，これらの結果も合わせてペルオキシゾーム増殖における小胞体とペルオキシゾームとの関係について考察した。

II　実験材料および方法

A　Bezafibrateによる初代培養肝細胞のペルオキシゾーム増殖実験

雄，5週齢のSprague-Dawley（SD）ラット，2匹を日本エスエルシー株式会社（日本SLC，静岡）より購入し，固形飼料および水を自由摂取させ，1週間予備飼育後，コラーゲナーゼ灌流法[29)]により肝細胞を分散し，Type Iコラーゲンをコートした35×10mmプラスチックシャーレ（Corning，岩城硝子，東京）に細胞浮遊液を入れ（1×10^6細胞/シャーレ），10%の子牛血清（Flow Laboratories, Stanmore, NSW, Australia）を含むL-15培養液（Flow Laboratories）で48時間培養した。その後bezafibrate（キッセイ薬品工業，松本）が0.5mMとなるように培養液に添加してさらに24時間培養した。0.1Mリン酸緩衝2%パラフォルムアルデヒド固定液（pH7.2）で30分間固定後，Angermüller と Fahimi[30)]の方法により3,3'-diaminobenzidinetetrahydrochloride（DAB）反応を行い，1%四酸化オスミウス液で1時間後固定した。アルコール上昇系列で脱水，プロピレンオキサイドで置換後，ルベアック812（半井化学薬品，京都）に包埋し，超ミクロトームV 2088（LKB, Bromma, Sweden）およびダイヤモンドナイフ（DiATOME Ltd, Switzerland）で厚さ0.1μmの超薄切片を作製，透過型電子顕微鏡JEM-1200EX（JEOL，東京）で加速電圧80kVで観察した。

B　^{14}C-bezafibrateを用いた初代培養肝細胞の光顕および全載標本電顕ラジオオートグラフィー

培養肝細胞の調製は前述と同様に行った。光顕ラジオオートグラフィーはType Iコラーゲンをコートしたカバーグラスを，また全載標本電顕ラジオオートグラフィー[31)]はフォルンバール支持膜を張った金メッシュに薄くカーボン蒸着し，Type Iコラーゲンをコートした後，それぞれ35×10mmプラスチックシャーレに並べ，上から細胞浮遊液を静かに分注してL-15培養液で48時間培養した。その後，^{14}C-bezafibrate（Boehringer Mannheim GmbH, FRG, 2.83MBq/mg）7.4MBqを添加した2ml（3.7MBq/ml）の培養液中で10～60分間培養した。0.1Mリン酸緩衝2%パラフォルムアルデヒド固定液（pH7.2）で30分間固定後DAB反応[30)]を行い，1%四酸化オスミウム液で1時間後固定した。

光顕ラジオオートグラフィーのための標本はアルコール上昇系列で脱水，プロピレンオキサイドで置換後，ルベアック812（半井化学薬品，京都）に包埋し，超ミクロトームV 2088（LKB, Bromma, Sweden）およびダイヤモンドナイフ（DiATOME Ltd, Switzerland）で1μmの切片を作製してスライドグラスにのせ，Konica NR-M2乳剤（コニカ，東京）をdip法[32)33)]により適用し，4°Cの暗箱内で2あるいは4ヵ月間露出した。

電顕ラジオオートグラフィーのための標本はアルコール上昇系列で脱水，臨界点乾燥（JCPD-5, JEOL, 東京）後，Konica NR-H2乳剤（コニカ，東京）をwire-loop法[34)35)]により湿性適用し，4°Cの暗箱内で4あるいは8ヵ月間露出した。

光顕および電顕ラジオオートグラフィーの現像はSDX-1現像液（コニカ，東京）で20°C，4分間行っ

た[34)35)]。光顕ラジオオートグラムはOlympus Vanox-S顕微鏡（Olympus，東京）で観察，各個体それぞれ20個の肝細胞について核および細胞質内の銀粒子数を計数し，さらにそれぞれの銀粒子密度を画像解析装置（DigigramerMGA-1300，武藤工業，東京）により計測，値はStudent's t-testにより検定を行った。全載標本電顕ラジオオートグラムは透過型電子顕微鏡JEM-1200EX（JEOL，東京）を用い加速電圧120kVで観察し写真撮影した。

C Bezafibrate投与ラット肝臓の電子顕微鏡観察

雄，5週齢のSDラット6匹を日本エスエルシー株式会社（静岡）より購入し，固形飼料および水を自由摂取させて飼育した。1週間予備飼育後，メチルセルロース（和光純薬工業，大阪）0.5%水溶液に懸濁したbezafibrate（キッセイ薬品工業，松本）100mg/kgを10日あるいは14日間金属製経口ゾンデ（フチガミ器械，京都）を用いて強制経口投与した。0.1Mカコジル酸緩衝2%パラホルムアルデヒド液（pH7.2）を門脈よりペリスタポンプ（アトー株式会社，東京）を用いて流速20ml/minで灌流して肝臓を固定し，約1mm角に細切後，さらに同固定液で30分間浸漬固定した。1%四酸化オスミウスで1時間後固定し，アルコール上昇系列で脱水，ルベアック812（半井化学薬品，京都）に包埋した。超ミクロトームV 2088（LKB, Bromma, Sweden）およびダイヤモンドナイフ（DiATOME Ltd., Switzerland）で厚さ0.1μmの超薄切片を作製し，酢酸ウラン[36)]とクエン酸鉛[37)]で電子染色後JEM-1200EX電子顕微鏡（JEOL，東京）で加速電圧80kVで観察した。

D Bezafibrate投与ラット肝臓のglucose-6-phosphataseおよびcatalaseの二重酵素組織化学

雄，5週齢のSDラット9匹を日本エスエルシー株式会社（静岡）より購入し，固形飼料および水を自由摂取させて飼育した。1週間予備飼育後メチルセルロース（和光純薬工業，大阪）0.5%水溶液に懸濁したbezafibrate（キッセイ薬品工業，松本）100mg/kgを10日あるいは14日間金属製経口ゾンデ（フチガミ器械，京都）を用いて強制経口投与した。0.1Mカコジル酸緩衝2%パラホルムアルデヒド液（pH7.2）を門脈よりペリスタポンプ（アトー株式会社，東京）を用いて流速20ml/minで灌流して肝臓を固定し，約1 mm角に細切後，さらに同固定液で30分間浸漬固定した。マイクロスライサー（堂坂，京都）で約30μmの切片を作製，Watanabeら[38)]の方法に従ってG6Paseの酵素組織化学反応を行った。すなわち4°Cで8%ショ糖を含む0.1Mカコジル酸緩衝液（pH7.2）で15分間洗浄，80mMカコジル酸緩衝（pH6.8），3.7mMグルコース-6-リン酸，3.6mM $Pb(NO_3)_2$，30mMショ糖を含む反応液中で室温，30分間反応後，8%ショ糖を含む0.1Mカコジル酸緩衝液（pH7.2）で洗浄した。Catalaseの酵素組織化学反応はAngermüllerとFahimi[30)]の方法に従って行った。すなわち2.5mM DABを含むグリシン緩衝液（pH10.0）に室温で15分間浸漬後，0.03%過酸化水素を加えた同液で10分間反応，2%四酸化オスミウムで1時間後固定し，アルコール上昇系列で脱水，ルベアック812（半井化学薬品，京都）に包埋した。超ミクロトームV 2088（LKB, Bromma, Sweden）およびダイヤモンドナイフ（DiATOME Ltd., Switzerland）で厚さ0.1μmの超薄切片を作製し，クエン酸鉛単独で電子染色[37)]後，JEM-1200EX電子顕微鏡（JEOL，東京）で加速電圧80kVで観察した。

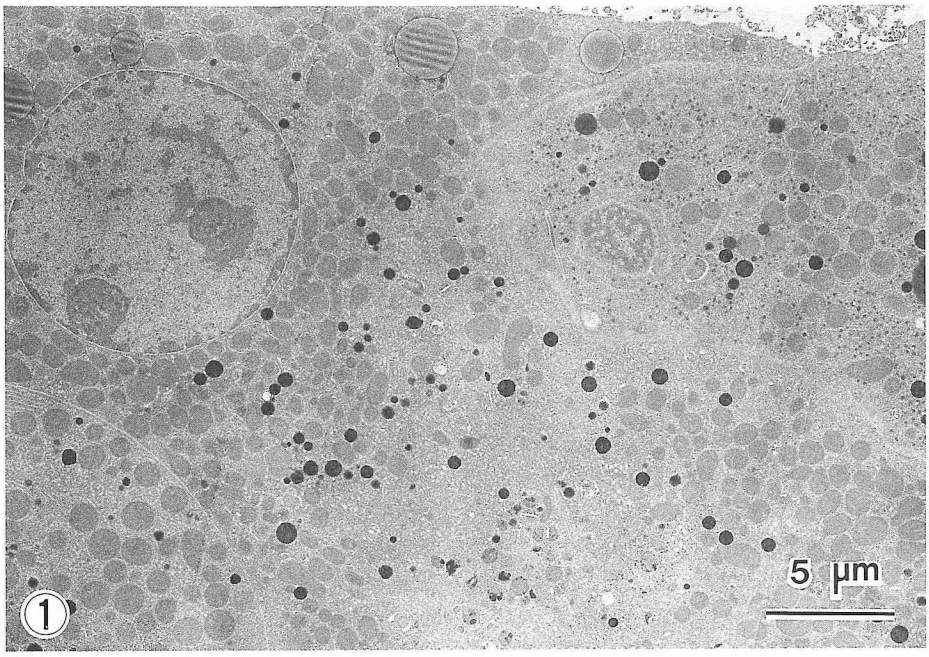
E Bezafibrate投与ラット肝臓のP-450およびG6Pase活性の測定

雄，5週齢のSDラット15匹を日本エスエルシー株式会社（静岡）より購入し，固型飼料および水を自由摂取させて飼育した。1週間予備飼育後メチルセルロース（和光純薬工業，大阪）0.5%水溶液に懸濁したbezafibrate（キッセイ薬品工業，松本），100mg/kgを10あるいは14日間それぞれ5匹ずつに金属製経口ゾンデ（フチガミ器械，京都）を用いて強制経口投与した。また，5匹に0.5%メチルセルロース水溶液のみを14日間投与し，対照群とした。肝臓を摘出，0.25Mショ糖を含む5mM炭酸ナトリウム緩衝液（pH7.6）で10%(W/V)のホモジェネートを作製した。G6Pase活性の測定はSwanson[39)]の方法，またP-450はOmuraとSato[40)]の方法に従って測定した。蛋白量はLowryら[41)]の方法により測定した。

III 結　　果

A 初代培養肝細胞のペルオキシゾーム増殖

初代培養肝細胞におけるbezafibrateによるペルオキシゾーム増殖を確認した。無処置培養肝細胞（Fig. 1）に比較して0.5mM bezafibrate添加した肝細胞では著明なペルオキシゾーム増加が認められたが，ペルオキシゾームからのbuddingは観察されなかった（Fig. 2）。また，ペルオキシゾームの周囲にしばしば滑面小胞体が認められたがこれらの間に連続性はみら



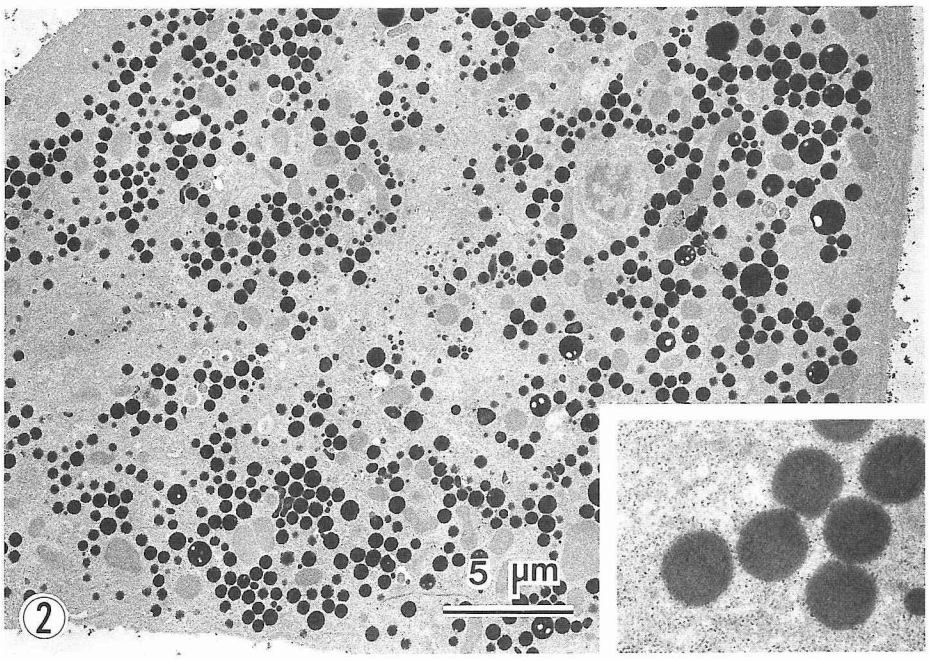
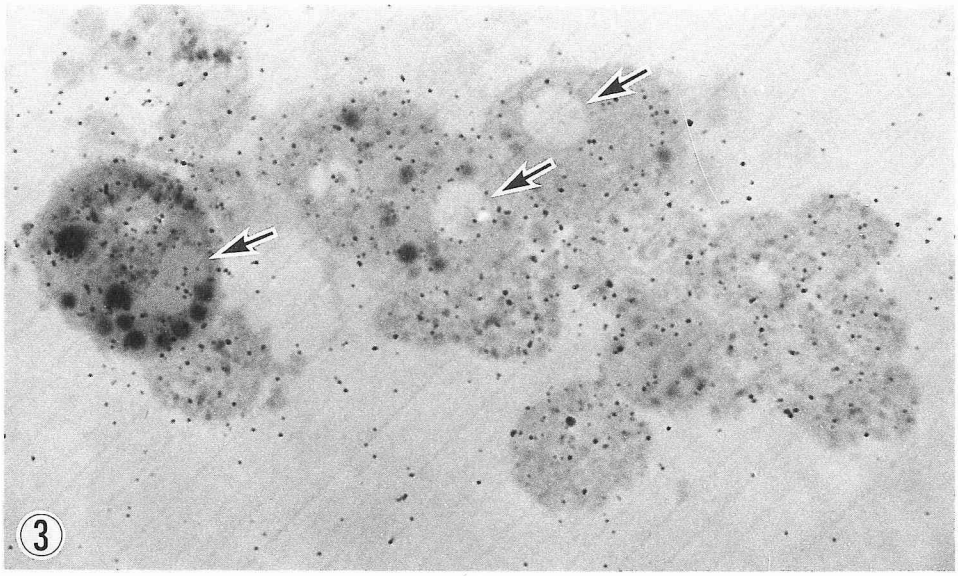


Fig. 1 Electron micrograph of normal cultured rat hepatocytes visualized with enzyme cytochemistry for catalase. Small number of peroxisomes are observed.

Fig. 2 Electron micrograph of a cultured rat hepatocyte treated with 0.5mM bezafibrate for 48 hours visualized with enzyme cytochemistry for catalase. The cytoplasm is filled with numerous peroxisomes which are DAB positive.

Inset shows high magnification view of the relation between peroxisomes and smooth endoplasmic reticulum. Smooth endoplasmic reticulum are frequently seen around the peroxisomes which are not in contact with each other. No budding is seen in both of them.



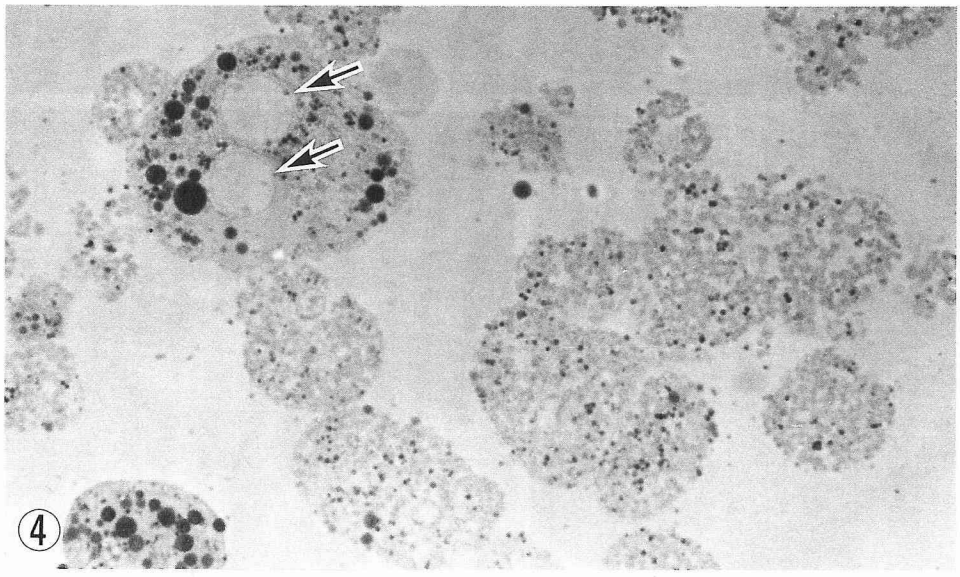


Fig. 3 Light microscopic radioautogram of cultured rat hepatocytes after incorporation of ^{14}C-bezafibrate for 10 min, fixed with 2% paraformaldehyde, stained with DAB, embedded in epoxy resin, radioautographed by wet-mounting and exposed for 2 months. DAB positive peroxisomes and silver grains are seen. Many silver grains are observed over the cytoplasm, but only a few silver grains are observable over the karyoplasm (arrows). ×1,700.

Fig. 4 Light microscopic radioautogram of cultured rat hepatocytes after incorporation of ^{14}C-bezafibrate for 60 min, fixed with 2% paraformaldehyde, stained with DAB, embedded in epoxy resin, radioautographed by wet-mounting and exposed for 2 months. DAB positive peroxisomes and silver grains are seen. Many silver grains are observed over the cytoplasm, but very few silver grains are seen over the karyoplasm (arrows). ×1,700.

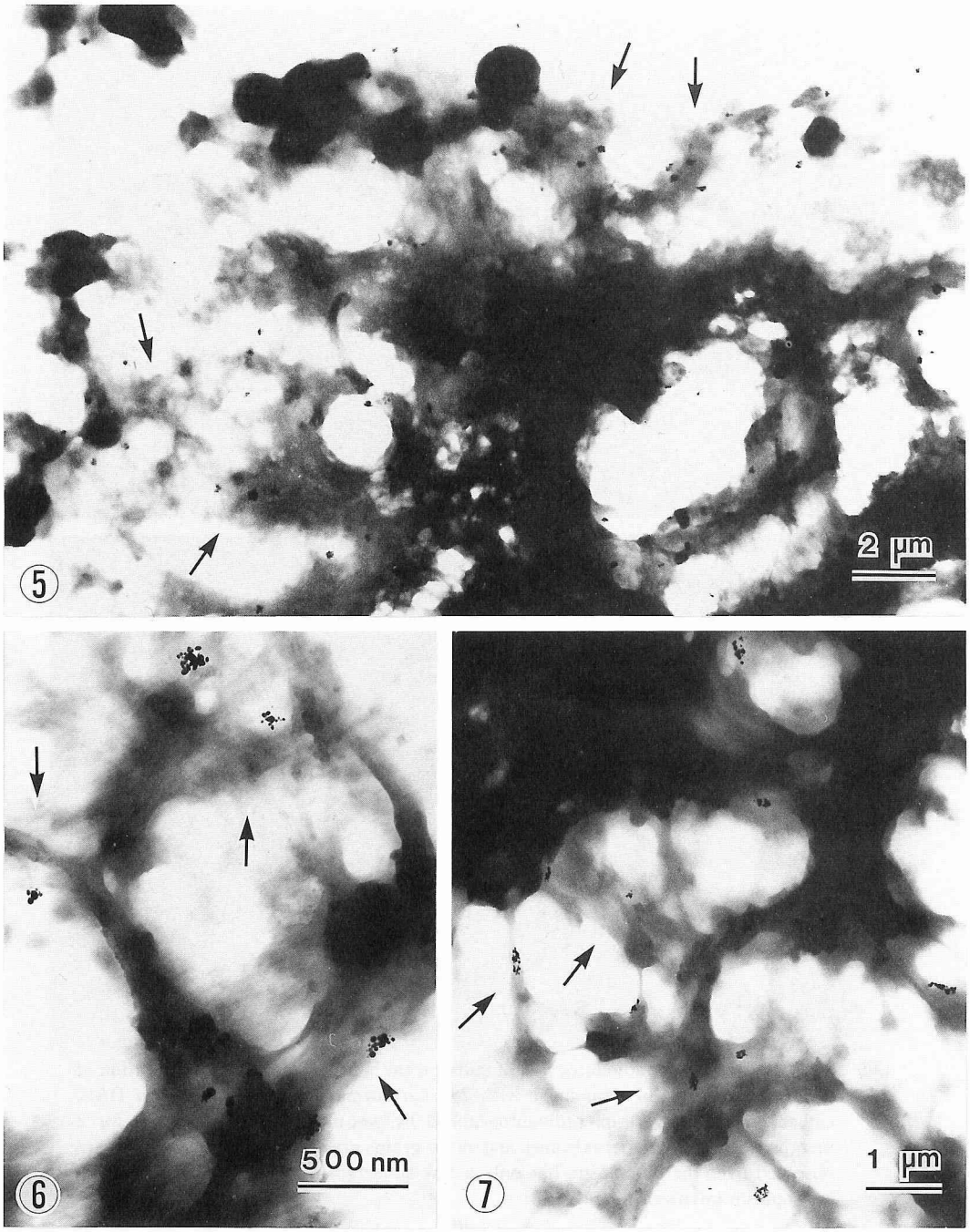


Fig. 5 Electron microscopic radioautogram of a whole mount cultured rat hepatocyte after incorporation of ^{14}C-bezafibrate for 10 min, fixed with 2% paraformaldehyde, stained with DAB and dried with critical point drying and radioautographed by wet-mounting. Silver grains are observed on the cytoplasmic matrix (arrows).

れなかった（Fig. 2）。以上，培養系でのbezafibrateによるペルオキシゾーム増殖が確認された。

B ラジオオートグラフィーによるbezafibrateのラット培養肝細胞内局在

^{14}C-bezafibrateを用いた光顕ラジオオートグラフィーでは，^{14}C-bezafibrate添加後の培養時間にかかわらず銀粒子は核で少なく細胞質に多数認められた（Fig. 3,4）。これを銀粒子数計測により定量的に比較すると，銀粒子数は核より細胞質で明らかに多く，1細胞当たりの銀粒子数の約90%が細胞質に存在した（Table 1）。また，銀粒子密度も核よりも細胞質で1.5～1.6倍，有意に高かった（Table 1）。

次に，細胞質内での局在を全載標本の電顕ラジオオートグラフィーで調べると，銀粒子の多くは細胞小器官の辺縁に局在しており（Fig. 5），DAB反応によって高電子密度となったペルオキシゾームにはむしろ乏しく，比較的電子密度の低い細胞質基質や特に小胞体と思われる領域に高い局在が認められた（Fig. 6,7）。

C Bezafibrate投与ラット肝臓の電子顕微鏡観察

Bezafibrate 100mg/kgを10あるいは14日間経口投与したラット肝臓の電顕像では，ペルオキシゾームの増殖とともに滑面小胞体と思われる膜構造の増生が特にペルオキシゾーム周囲で観察されたが，両者の間の連続性は観察されなかった（Fig. 8-10）。また，一部にミエリン様構造も認められた（Fig. 9,10）。

D 酵素組織化学

滑面小胞体とペルオキシゾームとの関係を調べるためそれぞれのマーカー酵素であるG6Paseおよびcatalaseの酵素組織化学反応を同一切片上で行って詳細に電顕観察した。無処置のラット肝臓においてcatalase反応産物は円形のペルオキシゾームでのみ陽性であり，G6Pase反応産物である鉛は小胞体（滑面および粗面）および核膜でのみ陽性であった（Fig. 11）。一方，bezafibrate 100mg/kgを10あるいは14日間投与したラット肝臓では，小胞体，核膜以外にペルオキシゾーム膜にG6Pase反応産物が時々認められた（Fig. 12）。この部分を強拡大で詳細に観察すると，G6Pase反応産物はペルオキシゾーム膜の内側および一部外側にも認められた（Fig. 13,14）。しかし，細胞質基質やミトコンドリアにG6Pase反応産物は認められなかった。また，無処置ラット肝臓に比較してbezafibrate投与ラット肝臓ではペルオキシゾームの電子密度の低下が認められた（Fig. 11-14）。

E Bezafibrate投与ラット肝臓のP-450およびG6Pase活性

滑面小胞体のマーカーであるG6Paseおよびcyto-

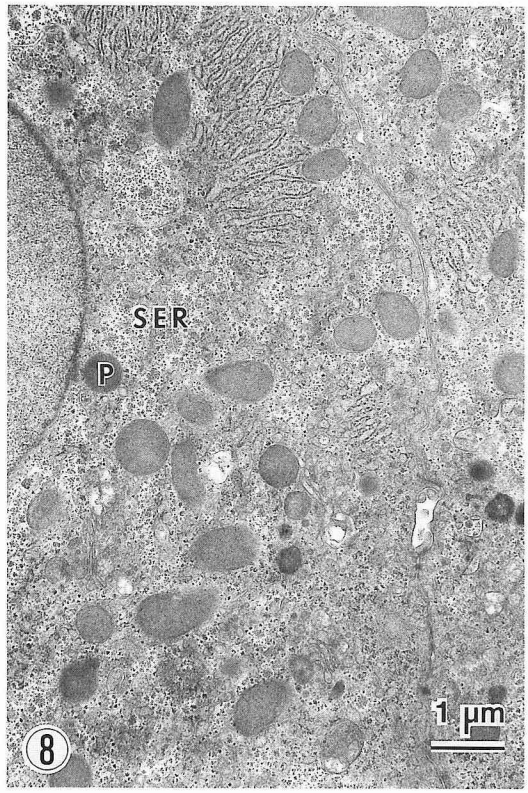
Table 1 Number of silver garains over cellular compartment of cultured rat hepatocytes in light microscopic radioautograms after incorporation of ^{14}C-bezafibrate

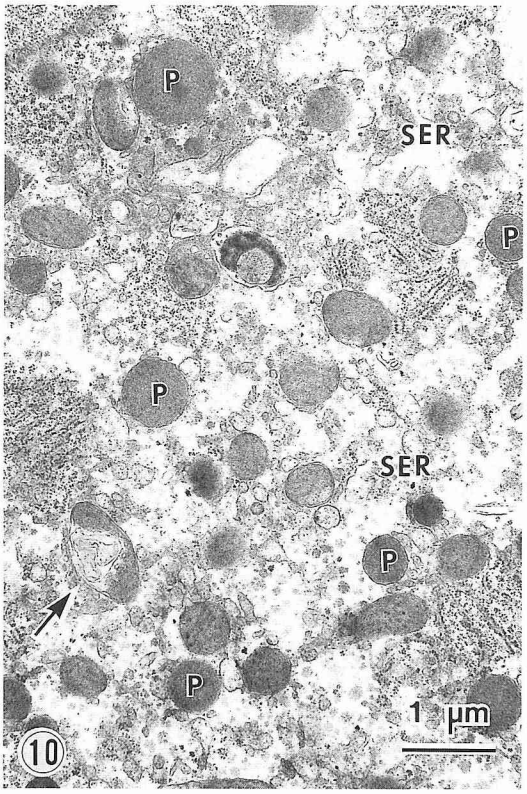
Incubation time (min)	Number of grains/cell			Density of grain (Number/μm^2)	
	Karyoplasm	Cytoplasm	Total	Karyoplasm	Cytoplasm
10	3.4±2.2 (9)	33.6±13.9 (91)	37.0±15.7 (100)	0.076±0.055	0.122±0.058*
60	4.7±2.6 (10)	43.7±16.7 (90)	48.4±18.9 (100)	0.104±0.048	0.160±0.082*

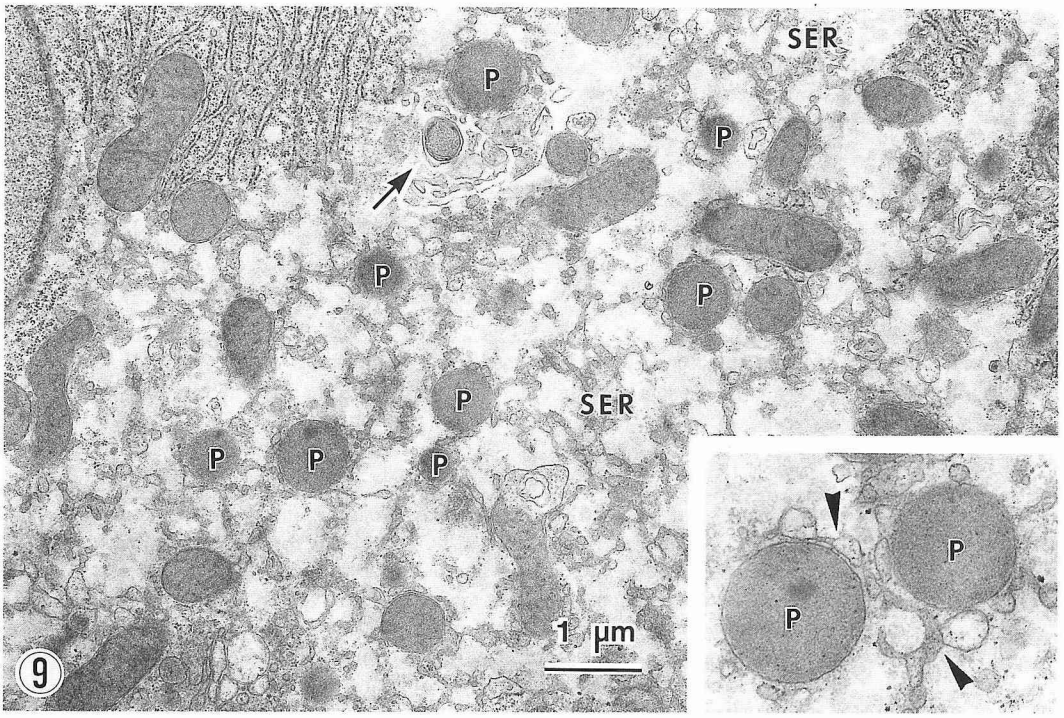
The grain analysis performed on 20 hepatocytes obtained from each dish.
Density of grains in the cytoplasm is significantly different from that in the karyoplasm (*: $p<0.05$).
Numbers in parentheses are % of total value.

Fig. 6 High magnification of an electron microscopic radioautogram of a whole mount cultured rat hepatocyte after incorporation of ^{14}C-bezafibrate for 10 min, fixed with 2% paraformaldehyde, stained with DAB and dried with critical point drying and radioautographed by wet-mounting. Silver grains are observed on the cytoplasmic matrix, especially over endoplasmic reticulum (arrows).

Fig. 7 Electron microscopic radioautogram of a whole mount cultured rat hepatocyte after incorporation of ^{14}C-bezafibrate for 10 min, fixed with 2% paraformaldehyde, stained with DAB and dried with critical point drying and radioautographed by wet-mounting. Silver grains are over the endoplasmic reticulum (arrows).


SER
P
1 μm
8


P
SER
P
P
SER
P
P
1 μm
10


SER
P
P
P
P
SER
P
P
P
1 μm
9
P
P

chrome P-450を生化学的に定量した。Bezafibrate投与によりP-450は有意に増加したが，G6Pase活性は有意に低下しており，必ずしも形態観察結果を反映した結果ではなかった（Table 2）。

Ⅳ 考　　察

本研究で用いた初代培養雄ラット肝細胞において，bezafibrateによるペルオキシゾーム増殖が確認された。この結果は他のペルオキシゾーム増殖剤を用いた研究結果[8)9)]ともよく一致しており，ペルオキシゾーム増殖機構を調べるために培養系は有用な実験系であると思われる。今回培養に用いた肝細胞は雄ラットのみであるが，bezafibrateによる肝臓でのペルオキシゾーム増殖は動物種による差が著明であり，雄ラットで特に反応性が高いことはすでに確認されている[7)10)]。

^{14}C-bezafibrateの細胞内局在を調べるために培養系を用いて光顕および電顕ラジオオートグラフィーを行った。光顕ラジオオートグラムの銀粒子数計測では1細胞当たりの銀粒子数の約90%が細胞質に局在し，細胞質と核の銀粒子数の比（細胞質/核）は9.6であった。また，銀粒子密度も核より細胞質のほうが有意に高く，比（細胞質/核）は1.6であった。それぞれの比の値を比較すると銀粒子数の値の方が非常に高値であった。この原因の1つとして核よりも細胞質の方が細胞での占める割合が大きいことが考えられる。しかし，計測した細胞の核および細胞質の面積はそれぞれ60.8±27.8μm^2および299.2±95.1μm^2であり，面積比（細胞質/核）は4.9であることから，この点を考慮しても細胞質で銀粒子の局在が高いものと思われる。

全載標本の電顕ラジオオートグラムにおいて銀粒子

Table 2 Biochemical parameters in rat liver homogenates from control and bezafibrate-treated animals

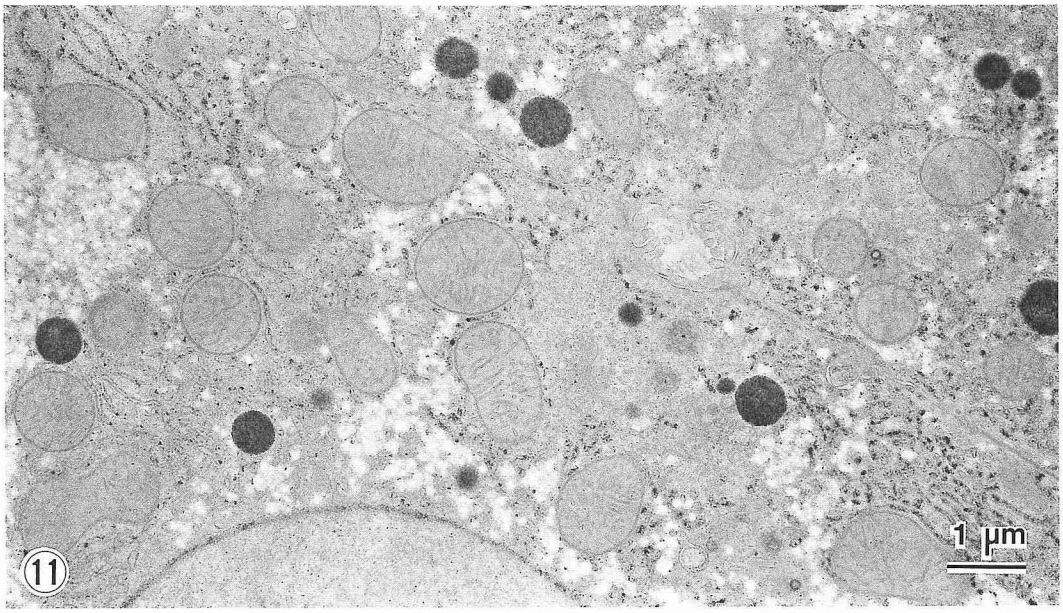
Parameter	Administration period		
	Control	10 days	14 days
Glucose-6-phosphatase (μmol/min/g protein)	124.4±13.9	106.8±3.7*	102.4±6.3*
Cytochrome P-450 (ng/mg protein)	0.270±0.022	0.351±0.037**	0.381±0.024***

Values represent the means ± SD, n=5.
Significantly different from control values, *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$.

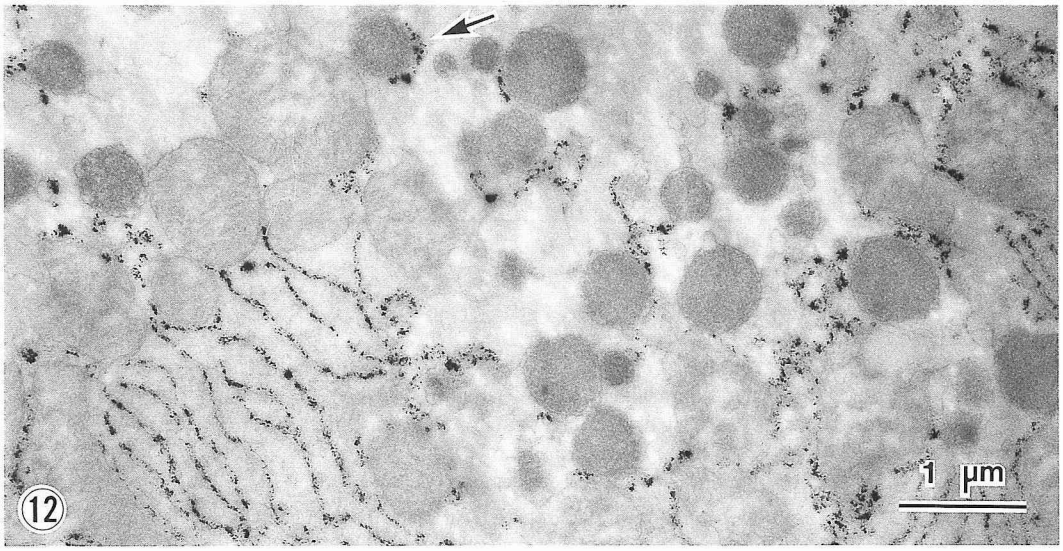
Fig. 8 Electron micrograph of a normal rat hepatocytes. The liver was fixed by perfusion with buffered 2% glutaraldehyde, postfixed in buffered 1% osmium tetroxide, embedded in epoxy resin and stained with uranyl acetate and lead citrate. Proliferation of peroxisome and SER are not seen.
P: peroxisome, SER: smooth endoplasmic reticulum.

Fig. 9 Electron micrograph of a rat hepatocyte treated orally with bezafibrate 100mg/kg for 10 days. The liver was fixed by perfusion with buffered 2% glutaraldehyde, postfixed in buffered 1% osmium tetroxied, embedded in epoxy resin and stained with uranyl acetate and lead citrate. Marked proliferation of peroxisome and SER, and myelin-like structure (arrow) are seen.
Inset shows high magnification view of the relation between peroxisomes and SER. Smooth membranous structure resembling SER(arrow heads) are frequently seen around the peroxisomes, but no relation is observed between them.
P: peroxisome, SER: smooth endoplasmic reticulum.

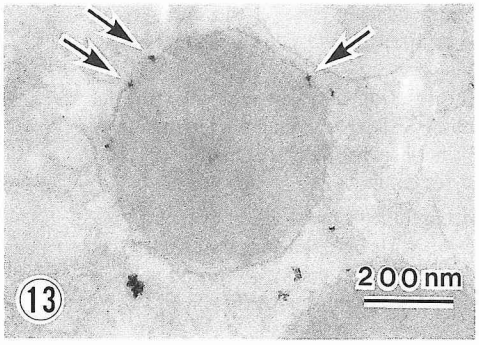
Fig. 10 Electron micrograph of a rat hepatocyte treated orally with bezafibrate 100mg/kg for 14 days. The liver was fixed by perfusion with buffered 2% glutaraldehyde, postfixed in buffered 1% osmium tetroxide, embedded in epoxy resin and stained with uranyl acetate and lead citrate. Marked proliferation of peroxisome and SER, and myelin-like structure (arrow) are seen.
P: peroxisome, SER: smooth endoplasmic reticulum.



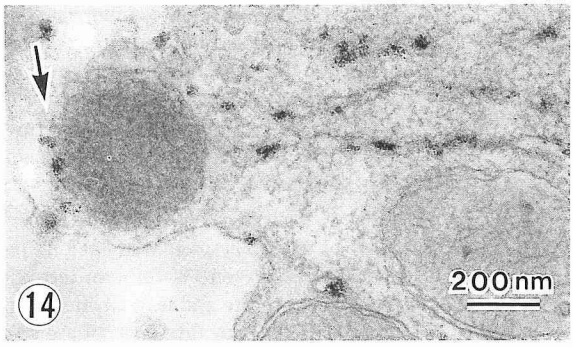
⑪



⑫



⑬



⑭

はペルオキシゾームではなく細胞質基質や特に小胞体での局在が認められた。近年，ペルオキシゾーム増殖剤結合蛋白（PPBP），70kDaがラット肝臓の可溶性分画より精製され[42)43)]，さらにこの蛋白はheat shock protein, Hsp72と関わりがあることが示された[44)]。一方，ペルオキシゾーム増殖剤に対するレセプターがnuclear hormone receptor superfamily，すなわちペルオキシゾーム増殖剤活性化レセプター（PPAR）として報告された[45)-47)]。しかし，ホルモンレセプターの細胞内分布に関しては一定の結論に至っていない[48)]。本研究における銀粒子はこの様なペルオキシゾーム増殖剤に対するレセプターに結合した^{14}C-bezafibrateおよびそれ以外の^{14}C-bezafibrateたとえばレセプター以外の蛋白と結合した^{14}C-bezafibrate等に由来しているものと思われるが，その多くはこの様なレセプターに関わっているものと推測される。そして銀粒子の局在が細胞質の特に小胞体で高かったことから，ペルオキシゾーム増殖剤に対するレセプターが小胞体に局在しているか，あるいはレセプターが小胞体と深く関わっているものと推察され，ペルオキシゾーム増殖剤が増殖発現のために小胞体上で何らかの役割を果たしているものと思われる。

Bezafibrate投与ラット肝臓の電顕観察で滑面小胞体と思われる膜構造の増生が観察されたが，同様の結果が他のペルオキシゾーム増殖剤でも報告されている[3)4)]。一方，bezafibrate投与により滑面小胞体に存在するcytochrome P-450は上昇し，G6Paseは僅かに低下した。したがって，ペルオキシゾーム増殖剤投与によりP-450は上昇し[3)4)49)50)]，G6Paseは減少あるいは変化しない[3)51)52)]とする報告が現在までに多くなされており，本研究結果もこれらの報告とよく一致した。Novikoff PMとNovikoff AB[18)]，Novikoffら[20)]をはじめとする多くの研究者はペルオキシゾームが滑面小胞体と連続しており，ペルオキシゾーム生合成の起源は小胞体であるとした[14)-21)]。しかし，近年の研究結果ではペルオキシゾームは滑面小胞体と連続しておらず，また，生化学的にペルオキシゾーム蛋白の生合成機構が明らかとなり，基質蛋白も膜蛋白も遊離リボソームで合成され，翻訳後にペルオキシゾームに移動すると考えられるようになったことから[22)23)25)27)28)]，既存のペルオキシゾームからbuddingにより生合成されるとする説が優位である[24)-26)]。しかしP-450やG6Paseの生化学的測定結果からbezafibrate投与による滑面小胞体の誘導は明らかではなく，むしろ増生した膜系は滑面小胞体のみではなくて滑面小胞体とは異なる膜系であることが考えられる。Kanamuraら[53)]はフェノバルビタール投与ではペルオキシゾーム生合成が抑制されていることから，滑面小胞体が増生するとペルオキシゾーム増殖は抑制されると推測している。

CatalaseとG6Paseの二重酵素組織化学においてbezafibrateで誘導されたペルオキシゾームの膜にG6Pase反応産物が観察された。これは切片の厚さに由来する像の重なりによること，あるいは非特異的な人工産物であること等が考えられる。しかし，この所見が重なりによるものであるならば，ペルオキシゾームの膜だけではなく細胞質基質や他の細胞小器官にも観察されるはずであり，また，非特異的な人工産物であるならば，やはり他の細胞小器官にも観察されるはずであるがそれらには認められなかった。一方，

Fig. 11 Electron micrograph of normal rat hepatocytes stained with enzyme cytochemistry for catalase and G6Pase. The G6Pase reaction products are seen on the endoplasmic reticulum and the nuclear envelope. The catalase reaction products are only seen inside the peroxisomes.

Fig. 12 Electron micrograph of rat hepatocyte treated orally with bezafibrate 100mg/kg for 14 days. The G6Pase reaction products are seen on the endoplasmic reticulum and the peroxisomal membrane (arrow).

Fig. 13 High magnification electron micrograph of peroxisomes of a rat hepatocyte treated orally with bezafibrate 100mg/kg for 10 days, and stained with enzyme cytochemistry for catalase and G6Pase. Note the reaction products of G6Pase inside the peroxisomal membrane (arrows).

Fig. 14 High magnification electron micrograph of peroxisome of a rat hepatocyte treated orally with bezafibrate 100mg/kg for 14 days, and stained with enzyme cytochemistry for catalase and G6Pase. Note the reaction products of G6Pase inside and outside the peroxisomal membrane (arrow).

DAB反応では反応産物が拡散することが知られており[54]，得られた所見がこの拡散によることも考えられる。しかし，ペルオキシゾーム膜の識別は容易であり，おもに膜の内側にG6Pase反応産物が存在していることから，拡散による人工産物とも考え難い。したがって，このようにペルオキシゾーム膜にG6Pase反応産物が存在したことについて次の2通りのことが推測される。① ペルオキシゾーム生合成において小胞体との関連はないが，ペルオキシゾーム増殖時にG6Paseが膜に存在している。② ペルオキシゾーム生合成において膜系の供給が小胞体から行われている。これら2つの推測のうちいずれであるかは不明である。ペルオキシゾーム生合成がペルオキシゾームからのbuddingによるとする見解が大勢を占める今日において，本研究で得られた結果や，ペルオキシゾーム増殖剤を投与したラット肝臓ではペルオキシゾーム膜に正常では認められない膜の伸長やミエリン像を含むループ形成が観察されること[4]，また，ペルオキシゾーム誘導においてcatalaseのない膜系[55]やcatalaseの乏しい膜系[56]が存在すること等を考え合わせると，ペルオキシゾーム生合成における小胞体の関与の可能性も残されているものと思われる。

ShioとLazarow[57]は本研究と同様にG6Paseとcatalaseの二重染色を行い，ペルオキシゾームと小胞体との連続性がないことを報告している。また，膜蛋白に関する研究[58][59]でペルオキシゾームと小胞体の膜蛋白組成が異なっているとが報告されている。本研究においてもこれら2つの細胞内小器官が連続しているところは確認されなかったが，これら2つの細胞小器官の関係については細胞骨格との関係を含めた三次元的な研究を始めとし，さらに詳細な検討が必要と思われる。

V 結　　語

ペルオキシゾーム増殖剤の細胞内での局在はいまだ不明であるため，初代培養肝細胞に^{14}C標識bezafibrateを取り込ませ，細胞内局在を光顕および電顕ラジオオートグラフィーにより解析した。また，bezafibrate投与ラット肝臓では滑面小胞体類似の膜構造の増生が認められたことから，ペルオキシゾームと小胞体との関係を調べるため小胞体とペルオキシゾームの酵素組織化学反応を同一切片上で行い，電子顕微鏡で詳細に観察した結果，以下の結論を得た。

1　Bezafibrate含有培養液で培養したラット肝細胞およびbezafibrate投与ラット肝細胞においてペルオキシゾームの増殖が形態学的に観察された。

2　^{14}C-bezafibrate処理培養肝細胞の光顕ラジオオートグラムでは，細胞全体の約90%の銀粒子が細胞質に存在し，銀粒子密度も核よりも細胞質で有意に高かった。

3　^{14}C-bezafibrate処理培養肝細胞の電顕ラジオオートグラムでは，銀粒子はペルオキシゾームには乏しく，細胞質基質や特に小胞体と思われる領域に局在が認められた。これらのことからペルオキシゾーム増殖剤はペルオキシゾーム増殖発現のために小胞体と深い関係があるものと推測された。

4　Bezafibrate投与によりペルオキシゾーム増殖とともに滑面小胞体と思われる膜構造の増生が観察されたが，G6Pase活性は低下していることから，小胞体とは異なる膜系の増生が推察された。

5　Bezafibrate投与ラット肝臓のペルオキシゾーム膜にG6Pase反応産物が観察され，ペルオキシゾーム誘導時には膜にG6Paseをもつペルオキシゾームが存在しているものと考えられ，ペルオキシゾームの生合成において膜系の供給が小胞体に由来する可能性も否定できない。

本論文の要旨は第33回日本組織細胞化学会総会（1992年11月），第25回日本臨床電子顕微鏡学会総会（1993年9月）および第4回国際ラジオオートグラフィーシンポジウム（1993年9月）において発表した。

稿を終わるにあたり，御指導，御校閲を賜りました恩師永田哲士教授に深く謝意を表します。

文　　献

1) Hess DR, Stäubli W, Riess W: Nature of the hepatomegalic effect produced by ethylchlorophenoxy-isobutyrate in the rat. Nature 27: 856-858, 1965

2) Reddy JK, Krishnakantha TP: Hepatic peroxisome proliferation: Induction by two novel compounds structurally unrelated to clofibrate. Science 190: 787-789, 1975

3) Mann AH, Price SC, Mitchell FE, Grasso P, Hinton RH, Bridges JW: Comparison of the short-term

effects of di(2-ethylhexyl)phthalate, di(n-hexyl)phthalate, and di(n-octyl)phthalate in rats. Toxicol Appl Pharmacol 77: 116-132, 1985

4) Baumgart E, Stegmeier K, Schmidt FH, Fahimi HD: Proliferation of peroxisomes in pericentral hepatocytes of rat liver after administration of a new hypocholesterolemic agent (BM15766). Sex-dependent ultrastructural differences. Lab Invest 56: 554-564, 1987

5) Hawkins JM, Jones WE, Bonner FW, Gibson GG: The effect of peroxisome proliferators on microsomal, peroxisomal, and mitochondrial enzyme activities in the liver and kidney. Drug Metabol Rev 18: 441-515, 1987

6) Beier K, Völkl A, Hashimoto T, Fahimi HD: Selective induction of peroxisomal enzymes by the hypolipidemic drug bezafibrate. Detection of modulations by automatic image analysis in conjunction with immunoelectron microscopy and immunoblotting. Eur J Cell Biol 46: 383-393, 1988

7) Watanabe T, Horie S, Yamada J, Isaji M, Nishigaki T, Naito J, Suga T: Species differences in the effects of bezafibrate, a hypolipidemic agent, on hepatic peroxisome-associated enzymes. Biochem Pharmacol 38: 367-371, 1989

8) Blaauboer BJ, van Holsteijn CWM, Bleumink R, Mennes WC, van Pelt FNAM, Yap SH, van Pelt JF, van Iersel AAJ, Timmerman A, Schmid BP: The effect of beclobric acid and clofibric acid on peroxisomal β-oxidation and peroxisome proliferation in primary cultures of rat, monkey and human hepatocytes. Biochem Pharmacol 40: 521-528, 1990

9) Foxworthy PS, White SL, Hoover DM, Eacho PI: Effect of ciprofibrate, bezafibrate, and LY171883 on peroxisomal β-oxidation in cultured rat, dog, and rhesus monkey hepatocytes. Toxicol Appl Pharmacol 104: 386-394, 1990

10) Momose Y, Shibata N, Kiyosawa I, Naito J, Watanabe T, Horie S, Yamada J, Suga T, Nagata T: Morphometric evaluation of species differences in the effects of bezafibrate, a hypolipidemic agent, on hepatic peroxisomes and mitochondria. J Toxicol Pathol 6: 33-45, 1993

11) Gray RH, de la Iglesia FA: Quantitative microscopy comparison of peroxisome proliferation by the lipid-regulating agent gemfibrozil in several species. Hepatology 4: 520-530, 1984

12) Momose Y, Nagata T: Radioautographic study on the intracellular localization of a hypolipidemic agent, bezafibrate, a peroxisome proliferator, in cultured rat hepatocytes. Cell Mol Biol 1993 (in press)

13) Waddell WJ, Marlowe C, Rao MS, Reddy JK: In vivo distribution of a carcinogenic hepatic peroxisome proliferator: whole-body autoradiography of [^{14}C] ciprofibrate in the mouse. Carcinogenesis 10: 221-223, 1989

14) Essner E: Endoplasmic reticulum and the origin of microbodies in fetal mouse liver. Lab Invest 17: 71-87, 1976

15) Tsukada H, Mochizuki Y, Konishi T: Morphogenesis and development of microbodies of hepatocytes of rats during pre- and postnatal growth. J Cell Biol 37: 231-243, 1968

16) Reddy J, Svoboda D: Microbodies in experimentally altered cells. VIII. Continuities between microbodies and their possible biologic significance. Lab Invest 24: 74-81, 1971

17) Reddy J, Svoboda D: Further evidence to suggest that microbodies do not exist as individual entities. Am J Pathol 70: 421-438, 1973

18) Novikoff PM, Novikoff AB: Peroxisomes in absorptive cells of mammalian small intestine. J Cell Biol 53: 532-560, 1972

19) Black VH, Bogart BI: Peroxisomes in inner adrenocortical cells of fetal and adult guinea pigs. J Cell Biol 57: 345-358, 1973

20) Novikoff PM, Novikoff AB, Quintana N, Davis C: Studies on microperoxisomes. III. Observations on

human and rat hepatocytes. J Histochem Cytochem 21 : 540-558, 1973
21) Goeckermann JA, Vigil EL : Peroxisome development in the metanephric kidney of mouse. J Histochem Cytochem 23 : 957-973, 1975
22) Fujiki Y, Rachubinski RA, Lazarow PB : Synthesis of a major integral membrane polypeptide of rat liver peroxisomes on free polysomes. Proc Natl Acad Sci U S A 81 : 7127-7131, 1984
23) Rachubinski RA, Fujiki Y, Mortensen RM, Lazarow PB : Acyl-CoA oxidase and hydratase-dehydrogenase, two enzymes of the peroxisomal β-oxidation system, are synthesized on free polysomes of clofibrate-treated rat liver. J Cell Biol 99 : 2241-2246, 1984
24) Lazarow PB, Fujiki Y : Biogenesis of peroxisomes. Ann Rev Cell Biol 1 : 489-530, 1985
25) Keller G-A, Gould SJ, Deluca M, Subramani S : Firefly luciferase is targeted to peroxisomes in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A 84 : 3264-3268, 1987
26) Yamamoto K, Fahimi HD : Three-dimensional reconstruction of a peroxisomal reticulum in regenerating rat liver : evidence of interconnections between heterogeneous segments. J Cell Biol 105 : 713-722, 1987
27) Miyazawa S, Osumi T, Hashimoto T, Ohno K, Miura S, Fujiki Y : Peroxisome targeting signal of rat liver carboxy terminus. Mol Cell Biol 9 : 83-91, 1989
28) Osumi T, Fujiki Y : Topogenesis of peroxisomal proteins. Bio Essays 12 : 217-222, 1990
29) Berry MN, Friend DS : High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study. J Cell Biol 43 : 506-520, 1969
30) Angermüller S, Fahimi HD : Selective cytochemical localization of peroxidase, cytochrome oxidase and catalase in rat liver with 3, 3'-diaminobenzidine. Histochemistry 71 : 33-44, 1981
31) Nagata T, Usuda N, Maruyama M : Observation on histochemical preparations of whole mount cultured cells by means of high voltage electron microscopy. J Clin Electron Microscopy 20 : 5-6, 1987
32) 永田哲士，柴田　治，名和橙黄雄：ラジオオートグラフ多量作製のための簡便法．解剖学雑誌　42：162-166，1967
33) 永田哲士：ラジオオートグラフ多量作製簡便法．細胞　14：40-50，1982
34) 永田哲士：ラジオオーオグラフィー，理論と実際．日本組織細胞化学会（編），組織細胞化学，pp 207-226，学際企画，東京，1985
35) Nagata T : Radiolabeling of soluble and insoluble compounds as demonstrated by light and electron microscopy. In : Wegmann RJ, Wegmann MA (eds), Recent advances in cellular and molecular biology, Vol 6, pp 9-21, Peeters Press, Leuven, Belgium, 1992
36) Watson ML : Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. II. Application of solutions containing lead and barium. J Biophysic Biochem Cytol 4 : 727-730, 1958
37) Sato T : A modified method for lead staining of thin sections. J Electron Micros 17 : 158-159, 1968
38) Watanabe J, Kanamura S, Kanai K, Yoshikawa M, Kubota M : Cytochemical glucose-6-phosphatase activity in the cells of mouse pancreas and submandibular gland. Histochem J 15 : 999-1009, 1983
39) Swanson MA : Glucose-6-phosphatase from liver. In : Colowick SP, Kaplan NO (eds), Methods in Enzymology, Vol II, pp 541-543, Academic Press, New York, 1969
40) Omura T, Sato R : The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. J Biol Chem 239 : 2370-2378, 1964
41) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ : Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193 : 265-275, 1951
42) Lalwani ND, Fahl WE, Reddy JK : Detection of a nafenopin-binding protein in rat liver cytosol associated with the induction of peroxisome proliferation by hypolipidemic compounds. Biochem Biophys Res

Commun 116: 388-393, 1983
43) Lalwani ND, Alvares K, Reddy MK, Reddy MN, Parikh I, Reddy JK: Peroxisome proliferator-binding protein: Identification and partial characterization of nafenopin-, clofibric acid-, and ciprofibrate-binding proteins from rat liver. Proc Natl Sci U S A 84: 5242-5246, 1987
44) Alvares K, Carrillo A, Yuan PM, Kawano H, Morimoto RI, Reddy JK: Identification of cytosolic peroxisome proliferator binding protein as a member of the heat shock protein HSP70 family. Proc Natl Acad Sci U S A 87: 5293-5297, 1990
45) Issemann I, Green S: Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. Nature 347: 645-650, 1990
46) Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W: Control of the peroxisomal β-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. Cell 68: 879-887, 1992
47) Togwood JD, Issemann I, Anderson RG, Bundell KR, McPheat WL, Green S: The mouse peroxisome proliferator activated receptor recognizes a response element in the 5' flanking sequence of the rat acyl CoA oxidase gene. EMBO J 11: 433-439, 1992
48) Guiochon-Mantel A, Lescop P, Christin-Maitre S, Loosfelt H, Perrot-Applanat M, Milgrom E: Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor. EMBO J 10: 3851-3859, 1991
49) Makowska JM, Anders C, Goldfarb PS, Bonner F, Gibson GG: Characterization of the hepatic responses to the short-term administration of ciprofibrate in several rat strains. Biochem Pharmacol 40: 1083-1093, 1990
50) Makowska JM, Gibson GG, Bonner FW: Species differences in ciprofibrate induction of hepatic cytochrome P450 4A1 and peroxisome proliferation. J Biochem Toxicol 7: 183-191, 1992
51) Charpentier D, Tuchweber B: Increased hepatotoxicity of carbon tetrachloride by the hypolipidemic drug nafenopin in rats. Res Commun Chem Pathol Pharmacol 36: 449-461, 1982
52) Bennett AM, Williams GM: Reduction of rat liver endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase activity and mobilization of hepatic intracellular calcium by ciprofibrate, a peroxisome proliferator. Biochem Pharmacol 43: 595-605, 1992
53) Kanamura S, Kanai K, Asaka Y, Watanabe J: Inhibitory effect of phenobarbital on peroxisome biogenesis in mouse hepatocytes. J Ultrastruct Mol Struct Res 100: 269-277, 1988
54) 斉藤多久馬：酵素組織化学の基礎．日本組織細胞化学会（編），組織細胞化学，pp 1-20，学際企画，東京，1986
55) Baumgart E, Völkl A, Hashimoto T, Fahimi HD: Biogenesis of peroxisomes: Immunocytochemical investigation of peroxisomal membrane proteins in proliferating rat liver peroxisomes and in catalase-negative membrane loops. J Cell Biol 108: 2221-2231, 1989
56) Ohno S, Fujii Y: Three-dimensional and histochemical studies of peroxisomes in cultured hepatocytes by quick-freezing and deep-etching method. Histochem J 22: 143-154, 1990
57) Shio H, Lazarow PB: Relationship between peroxisomes and endoplasmic reticulum investigated by combined catalase and glucose-6-phosphatase cytochemistry. J Histochem Cytochem 29: 1263-1272, 1981
58) Fujiki Y, Fowler S, Shio H, Hubbard AL, Lazarow PB: Polypeptide and phospholipid composition of the membrane of rat liver peroxisomes: Comparisom with endoplasmic reticulum and mitochondrial membranes. J Cell Biol 93: 103-110, 1982
59) Hashimoto T, Kuwabara T, Usuda N, Nagata T: Purification of membrane polypeptides of rat liver peroxisomes. J Biochem 100: 301-310, 1986

（5. 7. 30 受稿）