

[原著論文]

ラット遊離肝細胞の呼吸速度および 生存率に対するニコチンの効果

山下 弘二¹⁾

The effects of nicotine on the respiratory rate and cell viability of isolated rat hepatocytes

Kouji Yamashita¹⁾

Abstract

The purpose of this study was to determine the effects of nicotine on the respiratory rate and cell viability of isolated rat hepatocytes. The effects of nicotine on isolated mitochondria were also investigated in preliminary experiments. Hepatocytes were isolated from 48-hour-starved male Wistar rats by the method of Berry and Friend⁴⁾ with some modification. The isolated hepatocytes were suspended in Krebs-Henseleit solution containing 2% BSA (albumin). The respiratory rate of the cells was measured at 37°C using a Clark oxygen electrode. Viability was calculated by the trypan blue exclusion test. The effects of nicotine, in terms of dependency on time and concentration, were compared in the nicotine group and no nicotine group (control group). Nicotine began to reduce the respiratory rate of hepatocytes from a final concentration of 1 μM, and a dramatic reduction in the respiratory rate was seen at 10 μM. The suppressive effect of nicotine on the respiratory rate appeared within several minutes in the range of nicotine concentrations of 1 ~ 10 μM, and the effect of nicotine was found to be concentration-dependent. Although the sample number was small, a clear tendency for viability to decrease with time was seen in the presence of nicotine at concentrations of 1 ~ 10 μM. However, in the presence of 10 μM of nicotine, the reduction in viability was not as great as the reduction in respiratory activity, suggesting that 10 μM of nicotine was not a sufficiently high concentration to cause cell death within a short time. The mechanism by which nicotine acts on hepatocytes could not be elucidated from the results of these experiments. However, preliminary experiments using isolated mitochondria revealed that nicotine at concentrations of 1 ~ 10 μM caused uncoupling, suggesting that the effects of nicotine on respiratory rate and cell viability of rat hepatocytes are due to suppressive action on a multienzyme system in the energy expenditure system.

(J.Aomori Univ.Health Welf.3(1):115-120, 2001)

キーワード：ラット遊離肝細胞, ニコチン, 効果
isolated rat hepatocytes, nicotine, effects

要 旨

本研究の目的は、ラット遊離肝細胞の呼吸速度と生存率を計測して、ニコチンの効果について検討することである。さらに単離ミトコンドリアに対するニコチンの影響についての予備的な実験も行った。遊離肝細胞は、48時間以上絶食したWistar系の雄ラットを用いて、BerryとFriend⁴⁾の方法によって調製し、2%BSA(牛アルブ

ミン)を含むKrebs-Henseleit溶液に懸濁した。呼吸速度は、クラーク型酸素電極を用いて37°Cで測定した。生存率は、トリパンブルー排除試験によって計測した。ニコチンの効果は、時間依存性と濃度依存性の点から、ニコチン添加群とニコチンを添加しない群(対照群)と比較した。その結果、ラット遊離肝細胞の呼吸速度は、ニコチンの終濃度が1 μMから抑制がみられ、10 μMで顕

1) 青森県立保健大学健康科学部理学療法学科

Department of Physical Therapy, Faculty of Health Sciences, Aomori University of Health and Welfare

著な抑制効果が認められた。さらに呼吸速度に対するニコチンの効果は、1~10 μ Mの範囲で数分で現れ、しかも濃度依存性が認められた。一方、生存率については、ニコチンの濃度が1~10 μ Mの範囲で時間経過とともに低下する傾向にあった。しかし、10 μ Mで呼吸速度の顕著な抑制に比較して、生存率の低下はさほど大きなものではなかった。即ち、ニコチンの濃度が10 μ Mでは、短時間に細胞死を起こすような濃度でなかったと考えられた。遊離肝細胞に対するニコチンの作用機序は、この実験からだけでは不明であるが、単離ミトコンドリアを用いた予備的な実験によって、1~10 μ Mの範囲内では脱共役作用(uncoupling)が認められなかった。このことから、ニコチンの効果は、むしろエネルギー消費系における多酵素システム(multienzyme system)に対する何らかの抑制作用によると推察された。

I. はじめに

タバコの煙の中には化学物質が約4,000種含まれているが、そのうち200種類以上が有害物質であり、もっとも主要な成分はニコチン(nicotine)である¹⁾。ニコチンは、タバコを1本吸うと約3mgが口腔粘膜、気道、肺から吸収され、数分から10分後に血液中濃度が40ng/mlに達し、血液中の半減期が30分前後と言われている²⁾。またニコチンは、肝臓のCYP26によって特異的に代謝されて生理活性の低いコチニン(cotinine)になり解毒される。コチニンは、腎から速やかに尿として完全に排泄されるが、微量であるが授乳時の乳汁中にも排泄される。またコチニンの尿中濃度は、タバコの煙への暴露指標として有用とされている。

ニコチンは、タバコの多くの作用の原因となる毒性揮発性アルカロイドであり、自律神経節と神経筋接合部を、少量(最初に)で刺激し、大量(時間経過とともに)になると抑制すると言われている。ニコチンは、コチニンの酸化的代謝過程で生成し、イミニウムイオンも反応性が高く、生体内に存在する高分子の求核官能基と反応し毒性を示す。この毒性は、ピロリジン環を有する薬物の代謝的活性化によると考えられている³⁾。

化学物質の肝臓における代謝や毒性を検討するためのin vitro試験法の一つに灌流肝臓標本がある。BerryとFriend⁴⁾やMoldeusら⁵⁾によって報告された肝実質細胞懸濁液は、in situあるいはin vitroで肝臓をコラゲナーゼで灌流する方法により、収率良く、生存率の高い状態で調製できるようになった。肝臓より遊離させた直後の遊離肝細胞は、化学物質の毒性発現に重要な意味を持つ薬物代謝活性が生体内に存在していた状態に近く、薬物等の代謝と細胞の毒性的変化を同時に追跡できる点で優れている。さらに遊離肝細胞は無傷の肝臓が有する

ほとんどの代謝活性を有しており、薬物代謝の速度の研究に有効とされている⁶⁾。

ニコチンは、腎および肺でも代謝されるが80~90%が肝臓で代謝され、経口致死量が成人で約60mgの猛毒物質であり、症状の発現は急速で、摂取後数分で死亡すると言われている³⁾。しかし、ニコチンの細胞レベルでの毒性効果についての研究は少ないと思われる。そこで本研究では、その作用モデルとしてラット遊離肝細胞を用いて、その呼吸速度と生存率に対するニコチンの効果について検討した。また細胞呼吸で重要な役割を果たしているミトコンドリアに対するニコチンの影響についても予備的な実験を行った。

II. 対象と方法

1. 対象

実験動物は7~14週齢、48時間以上絶食したWistar系雄ラットを用い、門脈から血管灌流下でコラゲナーゼ処理し、遊離肝細胞を得た。分離後、細胞は2%BSA(牛血清アルブミン)を含むKrebs-Henseleit溶液に懸濁し、生存率70%以上の遊離肝細胞を実験に使用した。具体的な手順⁷⁻⁹⁾は、ラットをpentobarbital sodiumの腹腔内注射により麻酔し、ハサミで開腹し、門脈に切れ目を入れ、前灌流用緩衝液で洗い流しながら、すばやく門脈の切開面からカニューレを挿入し縫合糸で結紮した。同時に肝臓の下大静脈を切断し血液を放出させた。そのまま40ml/minの流速でペリスクリポンプを作動させ、約40℃に保温した前灌流用緩衝液を灌流した。さらに胸廓部を開き、心臓を露出させた。下大静脈をハサミで切開し、右心房側からカニューレを挿入し結紮した。この状態で4~5分間灌流を続け、スムーズに灌流することを確かめた上でポンプを止め、循環液をコラゲナーゼ溶液に切り替え、再び灌流をはじめた。8~10分間コラゲナーゼ溶液の灌流を続けると肝臓は、次第に消化された。この状態で灌流を中止し、肝臓の各葉をハサミで切り離してからシャーレに移し、ピンセットで細分すると消化された肝細胞が分散した。次にナイロンメッシュを用いて濾過した。この細胞浮遊液を細胞遠心管に集め、冷却遠心機で低速遠心した(50 \times g, 5min)。この遠心条件では、肝実質細胞は他の細胞に比べ大きいので遠心管の底にバックされ、非実質細胞、損傷細胞、赤血球、細胞破片等は沈殿しないで上清中に残った。上清を静かに駒込ピペットで除き、新たに細胞洗浄用緩衝液を加え、細胞をピペットで軽く懸濁した後、再び低速遠心した。この操作を3~4回繰り返す。最終的にはBSA入りのKrebs-Henseleit溶液に懸濁することによって、ほぼ均一な肝実質細胞(遊離肝細胞)を得ることができた。なお細胞洗浄用緩衝液は前もって冷却しておき、できるだけ肝細胞

を低温に保ち、代謝活性を抑えておいた。遊離肝細胞はビカーに95%O₂-5%CO₂混合ガスを入れて栓をして、水中で振盪（インキュベーション）した。

2. 呼吸速度の測定

呼吸速度は酸素消費速度を指標とした。酸素消費速度は、微量試料用酸素モニターシステムを用い、遊離肝細胞の懸濁液系にて溶存酸素濃度を測定し、その変化から算出した。飽和状態の溶存酸素濃度は、258 μmoles O₂/l (25℃) とした。ニコチン添加群は、終濃度 1 μM, 5 μM, 10 μM で測定した。酸素消費速度は、単位時間あたりの溶存酸素濃度の変化であり、ある時間内の平均酸素消費速度となる。

$$\begin{aligned} \text{酸素消費速度} &= \mu \text{ moles O}_2 / \text{l} / \text{min} \\ &\quad \text{湿重量 mg} \cdot \text{Wet} \cdot \text{WT} / \text{ml} \\ &= \mu \text{ moles O}_2 / \text{min} / \text{g} \cdot \text{Wet} \cdot \text{WT} \end{aligned}$$

さらに、ニコチンの影響を確実に計測するために、呼吸活性を促進させるグルタミン (Glutamine, 終濃度 4 mM) 添加して同様な実験を行った。ニコチン添加群は、終濃度 1 μM, 3 μM, 5 μM, 10 μM で測定した。

3. 生存率の算出

生存率は、遊離肝細胞のトリパンブルー排除試験法¹⁰⁾にて顕微鏡下に算出した。0.4%トリパンブルー溶液 (Krebs - Henseleit 溶液入り) と細胞懸濁液を加え、顕微鏡下、細胞計測盤上で生細胞数と死細胞数を計測した。顕微鏡下 (200倍) に細胞を観察し、青染される肝実質細胞を死細胞、それ以外を生細胞として数え、数取器を使って細胞を少なくとも、生細胞と死細胞の総数が500個くらいまで数えた。生存率 (%) は (生細胞数/生細胞数+死細胞数) ×100から算出した。対照群は恒温槽 (37℃, 70/minでインキュベーション) に入れる直前に、ニコチン添加群は恒温槽に入れた直後から経過時間を測定した。対照群、次にニコチン添加群 1 μM, 3 μM, 5 μM, 10 μM と順に、それぞれ15分経過 (0分, 15分, 30分, 45分, 60分) ごとに生存率を計測し算出した。

4. 単離ミトコンドリアの呼吸速度の測定

呼吸で取り入れた酸素は、99%以上が細胞のミトコンドリアの酸化反応に使われている。ミトコンドリアの呼吸速度は、十分な酸化基質 (ピルビン酸、コハク酸) とリン酸が存在していても低いが、ここにADP (アデノシン・二リン酸) を添加すると急激な酸素消費の増加が起る。ADPがATP (アデノシン・三リン酸) になってADPがなくなると呼吸は再び元の低いレベルに戻る。ADPのリン酸化の起らない条件下では、呼吸は持続的に高まる。このようにミトコンドリアの呼吸速度は、ATPの消

費反応 (分解) と共役している、言い方を変えるとATPが使われADPが生じた時に呼吸が高まる。こうして酸素消費されると同時に炭酸ガスが生じ、ATP含有量はいつも一定に維持される¹¹⁾。本研究では、ニコチンがATPを合成するリン酸化を伴わないで、ミトコンドリア中の酸化を進めるような代謝阻害作用、即ち酸化とリン酸化を脱共役作用 (uncoupling) を行っているかについて予備的な実験を行った。

単離ミトコンドリアの調製の手順¹²⁾ は、遊離肝細胞の調製と同様の方法で解剖し、ホモジェナイズ溶液で灌流を行ったら、肝臓を切り取り、ホモジェナイズ (homogenize) 操作と遠心分離操作によって、ミトコンドリアを分離した。この単離ミトコンドリアの呼吸活性を測定して、ニコチンの脱共役作用を調べた。呼吸速度は、反応混液とミトコンドリア懸濁液を混ぜて測定した。対照群は、順にコハク酸 (10mM succinate), ADP (200 μM), 最後に代謝阻害剤であるDNP (dinitrophenol, 50 μM) を添加し、溶存酸素濃度の変化を記録した。一方ニコチン添加群では、DNPの代わりに、終濃度 1 ~ 10 μM, さらに高濃度のニコチンを添加して溶存酸素濃度の変化を比較した。

ニコチンの効果は、時間依存性と濃度依存性の点から、ニコチンを添加しない対照群と比較した。統計学的処理としては分散分析を用い、有意差を認めた場合には2群間の検定を行った。なお有意水準は5%未満とした。

Ⅲ. 結果

1. 呼吸活性

実験回数が6回、ラットの体重の平均が218.3±25.4 g, 生存率の平均が81.3±6.8%であった。溶存酸素濃度の時間的变化を観察すると、酸素消費速度の変曲点が測定開始後7分前後にあったため、測定開始後7分間と7分~17分間との2区間の酸素消費速度を算出した。

測定開始後の7分間の酸素消費速度は、7~17分間より高い値を示した (図1)。ニコチン添加群の酸素消費速度は、対照群に比較して低下する傾向が認められた (図

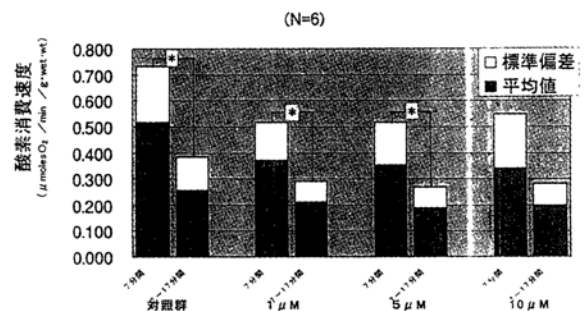


図1 測定開始後の経過時間と酸素消費速度の比較
測定開始後7分間の酸素消費度は、7~17分間より高値を示した
*:P<0.05

2)。特に測定開始後7分間の中で酸素消費速度を比較すると、ニコチン濃度10 μ Mは対照群より有意な低い値を

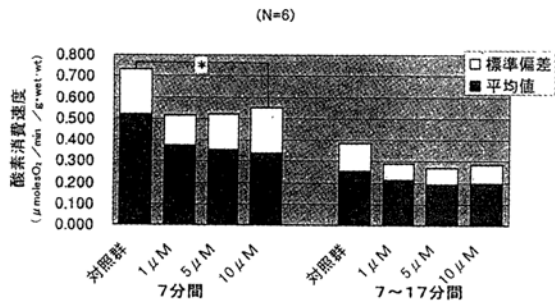


図2 ニコチンの濃度と酸素消費速度の比較
測定開始後7分間では、ニコチン濃度10 μ Mと対照群とに有意な差が、認められた。
*:P<0.05

示した (P<0.05)。

次に、グルタミンを添加して行った実験では、実験回数が8回、ラットの体重が195.0 \pm 19.4g、生存率の平均が78.1 \pm 5.2%、測定開始後7分間と7~14分間の2区間に分けて算出した。測定開始後7分間と7~14分間との酸素消費速度を比較すると、対照群は7分間より7~14分間の方が高い値を示したが、ニコチン添加群では7分間より7分~14分間の方が低い値を示していた(図3)。測定開始後7分~14分間の中で酸素消費速度を比較すると、ニコチン添加群は対照群に比較して有意な低い値を

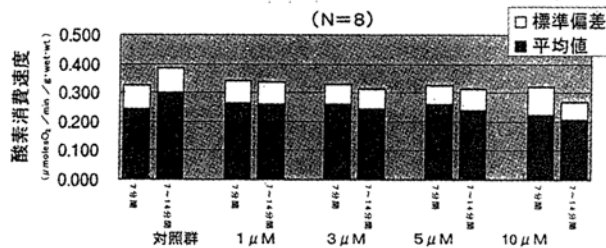


図3 測定開始後の経過時間えお酸素消費速度の比較

示し (P<0.05~P<0.01)、ニコチンの濃度が高くなるにしたがって酸素消費速度が低下する傾向にあった(図

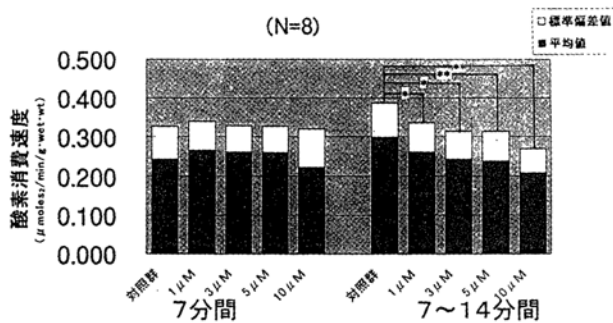


図4 ニコチンの濃度と酸素消費速度の比較
7~14分間では、ニコチン添加群が対照群との間に有意な定価が認められた。
*:P<0.05, **:P<0.01

4)。

2. 生存率

60分経過時の生存率を比較すると対照群の生存率の平均が71.9 \pm 5.6%であるのに対して、ニコチン添加濃度1 μ Mが66.6 \pm 8.7%、3 μ Mが62.6 \pm 8.6%、5 μ Mが68.1 \pm 3.7%、10 μ Mが65.7 \pm 6.1%と低下する傾向にあった(表1, 5図)。なお使用したラットの体重は、180.0 \pm 16.3gであった。

表1 生存率の時間的変化とニコチンの濃度

経過時間	対照群	1 μ M	3 μ M	5 μ M	10 μ M
N=3	平均値	平均値	平均値	平均値	平均値
0分	80.3	77.4	79.1	79.6	80.9
15分	77.5	75.4	75.5	72.1	75.4
30分	76.2	71.8	75.4	69.4	69.9
45分	74.3	68.1	66.6	73.4	71.1
60分	71.9	66.6	62.6	68.1	65.7
	標準偏差	標準偏差	標準偏差	標準偏差	標準偏差
0分	1.8	1.2	2.4	2.2	2.0
15分	3.5	1.9	0.6	4.7	2.4
30分	1.2	4.7	0.5	4.3	3.4
45分	3.0	7.2	5.3	7.8	4.3
60分	5.6	8.7	8.6	3.7	6.1

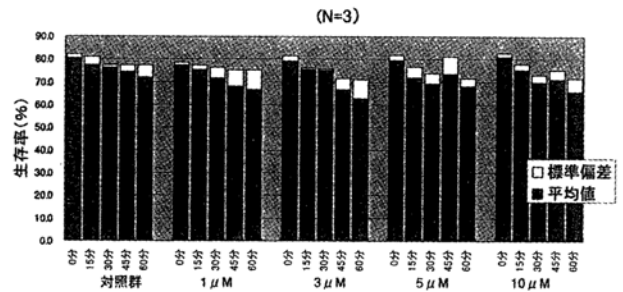


図5 ニコチンの濃度と生存率の時間的変化
対照群においても時間経過と共に生存率の低下がみられたが、ニコチン添加群では対照群より、さらに生存率が低下する傾向にあった。

3. ミトコンドリアの呼吸速度とニコチンの脱共役作用

単離ミトコンドリアをリン酸を含む等張液に懸濁し、その懸濁液にコハク酸、ADP、DNPを適時添加した。その時の溶液中の溶存酸素濃度と時間的変化の関係は、ミトコンドリアの呼吸速度(O₂吸収速度)が溶存酸素濃度の減少速度に反映される(図6-A, 図6-B)。ミトコンドリアの懸濁液だけでも非常に遅い酸素の消費がみられたが、これはミトコンドリアの内部に呼吸基質が少量存在するためであった。次に呼吸基質であるコハク酸を添加すると、呼吸速度は少し上昇した(state 4呼吸)。この状態でADPを添加すると、呼吸速度は数倍に増大した(state 3呼吸)。添加したADPがすべてATPに転換されると、再びstate 4呼吸に戻った。state 4呼吸の時にDNPのような脱共役剤を加えると、ミトコンドリア内膜のプロトン駆動力が消去されて酸素消費速度は促進される。しかし、この脱共役状態ではATPの合成は、起こってはいない。

一方、DNPの代わりにニコチンを1 μ M~10 μ M範囲で添加すると、酸素消費速度に大きな変化が認められなかった。次にニコチン1mMの添加では、酸素消費速度が大きく促進された(6図-A)。さらに、ニコチンの濃度50 μ M、100 μ M、250 μ M、500 μ Mを順に添加

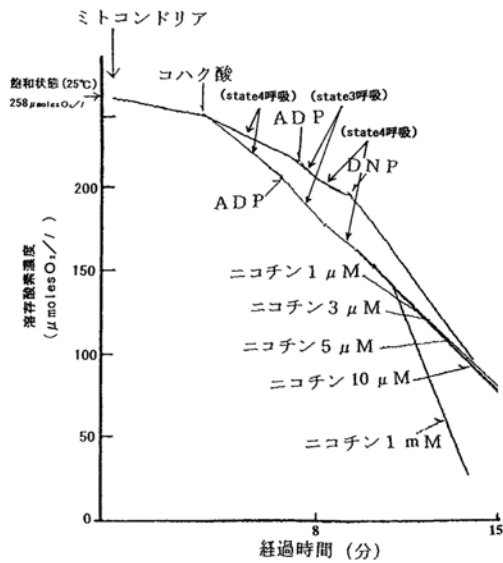


図6-A 単離ミトコンドリアの呼吸活性に対するニコチンの影響
ミトコンドリアの呼吸活性は、溶存酸素濃度の減少速度に反映される。state 4呼吸の時にDNP(脱共役剤)を加えると酸素消費速度は促進され、溶存酸素濃度は急激に減少した。DNPの代わりにニコチンの濃度1 μM、3 μM、5 μM、10 μMを添加した時は、酸素消費速度に変化が認められなかった。

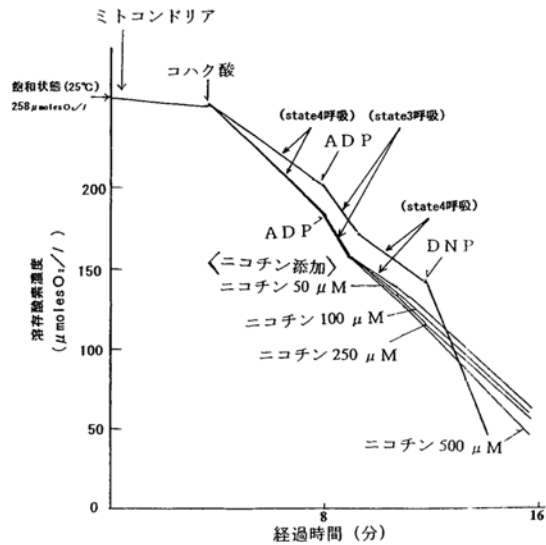


図6-B 単離ミトコンドリアの呼吸活性に対するニコチンの影響
ニコチンの濃度50 μM、100 μM、500 μMを添加すると、250 μM近辺から酸素消費速度が促進される傾向にあった。

すると、250 μM近辺から酸素消費速度が促進される傾向にあった(図6-B)。

この予備的な実験から、ニコチンの濃度が250 μM以上の高濃度では、酸素消費速度は促進される傾向にあったが、1~10 μMの範囲内では単離ミトコンドリアに対してエネルギー脱共役作用は認められなかった。

IV. 考 察

遊離肝細胞を用いたニコチン代謝の研究には、L.G. Aboodら¹³⁻¹⁴⁾のニコチンの輸送と結合の関連についての論文がある。ニコチンが結合するための最適pHは通常より高いが、脳膜ではニコチンがプロトン化されるのにpH6.5が最適であった。さらにニコチン類化合物の薬理的な能力と肝細胞膜へ結合能力との間に良好な相関があった。ラット肝細胞においてニコチンがコチニンへ変えられる割合は、集積(accumulation)と結合する温度に関連していると報告している。Kashiwaguraらは、ラット遊離肝細胞を用いてエネルギー代謝や呼吸活性についての研究を行っている¹⁵⁻¹⁶⁾。本研究では、Kashiwaguraらの実験系を用いて遊離肝細胞の酸素消費速度と生存率を計測し、ニコチンの効果について検討した。

ニコチンの経口致死量は成人で約60mg、体重1kgあたり1mgと言われている²⁾。ヒトの体重の60%が水分と仮定し、ニコチンの経口致死量を濃度に概算すると約10.2 μMとなった。本研究では、この濃度を参考に1~10 μM近辺から実験を行った。

1~10 μM範囲内でニコチン添加群の酸素消費速度は、対照群に比較して低下する傾向が認められた。特に測定開始後7分間の中で酸素消費速度を比較すると、ニコチン濃度10 μMでは対照群より有意な低値を示した。さらに、グルタミンを添加して行った実験では、グルタミンの呼吸速度を促進する作用があるためニコチンの抑制効果の方が強く現れるのに時間がかかったと考えられる。測定開始後7分間と7~14分間との酸素消費速度を比較すると、対照群では7分間より7~14分間の方が高値を示したのに対して、ニコチン添加群では、1~10 μMの範囲内では7分間より7分~14分間の方が低値を示した。特にニコチン添加群の7~14分間の酸素消費速度は対照群に比較して有意な低下が認められた。これらの結果から、ニコチンの濃度が1 μMからラット遊離肝細胞の呼吸速度の抑制がみられ、10 μMで顕著な抑制効果が認められた。さらに呼吸活性に対するニコチンの効果は、1~10 μM範囲で数分で現れ、しかも濃度依存性が認められた。

一方、生存率については、サンプル数が少なかったが、ニコチンの濃度が1~10 μMの範囲で添加後、時間経過とともに低下する傾向にあった。しかし、10 μMで呼吸速度の顕著な抑制に比較して、生存率の低下はさほど大きなものではなかった。即ち、ニコチンの濃度が10 μM程度では、短時間に細胞死を起こすような濃度でなかったと考えられる。

遊離肝細胞に対するニコチンの作用機序は、この実験からだけでは不明であるが、単離ミトコンドリアを用い

た予備的な実験によって、1~10 μ Mの範囲内では脱共役作用が認められなかった。このことから、ニコチンの効果は、むしろエネルギー消費系における多酵素システム (multienzyme system) に対する何らかの抑制作用によると考えられた。多酵素システムとは、細胞を正常に機能させるために働いている多くの酵素である。細胞膜ではATP分解酵素 (Na-K-ATPS) が能動輸送 (active transport) を行っている。能動輸送は細胞内の物質代謝によって生産されたエネルギーによって行われているため、細胞が死滅すると細胞膜の両側のイオン分布が平衡状態に達し、エネルギーも消費されることはない。このようなATPSにニコチンが何らかの影響を与えている可能性がある。ニコチンによって細胞でのNa-K-ATPSの機能障害を起し、生存率が低下したと推測される。

肝臓は生体において異物代謝を介して解毒、活性化を行う重要な器官であり、ニコチン代謝の大部分が肝臓で行われていることから、今回のラット遊離肝細胞用いた実験系はニコチン効果の研究するための有意義なモデルであると考えられる。

謝 辞

本稿は青森大学大学院環境科学研究科環境管理学専攻における修士論文の一部を再編・修正したものである。

稿を終えるにあたり、実験と修士論文に懇切・丁寧な御指導・御教示を賜った指導教授である柏倉正教授、並びに森哲哉助手に深謝致します。

(受理日：平成13年10月26日)

文 献

- 1) 川根博司：喫煙と呼吸器疾患. 医学のあゆみ, 185 (7): 433-436, 1998.
- 2) 香川順・中館俊夫・石原陽子：タバコの成分と作用. 呼吸と循環, 38: 11-16, 1990.
- 3) 田中千賀子：ニコチン. 田中千賀子・加藤隆一編集：薬理学. pp241-242. 南江堂. 1990.
- 4) Berry MN, Friend DS: High yield preparations of isolated rat parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. J. Cell Biol. 43, 506-520. 1969.
- 5) Moldeus P, Hogberg J, Orrenius S: Isolation and use of liver cells. In Method in Enzymol. Academic Press Vol 52, pp60-71. 1978.
- 6) Tsuru M, Erickson RR, Holtzman JL: The metabolism of phenytoin by isolated hepatocytes and hepatic microsomes from male rats. J. Pharmacol. Exp. Ther. 22: 658-661. 1982.
- 7) 野村保友：臓器灌流の行い方. 下西康嗣・永井克他・長谷俊治・本田武司編：新生物化学実験のてびき4 - 動物とその組織を用いる実験法. pp41-60. 化学同人, 1996.
- 8) 佐伯武頼：前処理から臓器摘出まで. 森脇和郎・山田淳三・勝木元也・米川博通・村松正実編：新生物化学実験講座19- 動物実験法. pp206-210. 日本生物化学会編, 1991.
- 9) 鈴木潔：初心者のための動物実験手技. pp185-198. 講談社. 1991.
- 10) Paul T. Sharpe著・志村清仁・笠井献二訳：生化学実験法13- 細胞分離法. pp 7-9. 東京化学同人, 1991.
- 11) Gerald C. Karp著・山本正幸訳：分子細胞生物学. pp188-192. 東京化学同人. 2000.
- 12) 田中啓二・市原明：細胞単離法. 中嶋輝美・野本明男・松橋通生・三浦謹一郎・松村正実編：新基礎生化学実験法- 生物材料の取り扱い. pp83-90. 丸善, 1987.
- 13) Aboud LG, Grassi S, Junig J, Crane A, Costanzo M: Specific binding and metabolism of (-)- and (+)- [3 H] - nicotine in isolated rat hepatocytes and hepatocyte membranes. Arch. int. Pharmacodyn. 273, 62-73. 1985.
- 14) Aboud LG, Grassi S, Costanza M: Binding of optically pure (-)- (3 H) - nicotine to rat brain membranes. FEBS Letters 157, 147-149. 1983.
- 15) Kashiwagura T, Deutsch CJ, Taylor J, Erecinska M, Wilson DF: Dependence of gluconeogenesis, urea synthesis, energy metabolism of hepatocytes on intracellular pH. The Journal of Biological Chemistry, 259 (1): 237-243, 1984.
- 16) Kashiwagura T, Wilson DF, Erecinska M: Oxygen dependence of cellular metabolism: the effect of O₂ tension on gluconeogenesis and urea synthesis in isolated rat hepatocytes. Journal of Cellular Physiology, 120: 13-18, 1984.