

1. 研究課題名：ラット肝細胞の細胞凝集体形成による肝細胞機能発現の優位性のメカニズムの究明

2. 研究機関：科学技術振興事業団・長崎研究室 (jstyoko@tc.nagasaki.go.jp)

3. 研究者：横山兼久

4. 研究協力者：児玉靖司（長崎大学薬学部放射線生命科学教室）

中山由紀子（科学技術振興事業団長崎研究室）

渡邊正己（長崎大学薬学部放射線生命科学教室）

5. 研究期間：平成9年～平成11年

## 6. 要約

ラット肝細胞は細胞凝集体を形成することによる高い肝細胞機能の発現メカニズムの解明を活性酸素に着目し検討を行った。その結果、コラーゲンゲル上では細胞が伸展しないことにより、細胞内の活性酸素レベルが高く保たれる、ミトコンドリアの活性が高い、細胞内のGSH（還元型グルタチオン）レベルが高い、細胞内のATPレベルが高い、ことが判った。GSHの阻害は細胞内のATP量の減少、アルブミン合成量およびp450活性の低下として認められた。また、低酸素培養では細胞内の活性酸素レベルの低下、アルブミン合成およびp450活性の低下が認められ、抗酸化剤の添加では、細胞内の活性酸素レベルの低下およびp450活性の低下が認められた。

以上から、ラット肝細胞は細胞凝集体を形成することによる高い肝細胞機能の発現は、ミトコンドリアの機能の活性化による、細胞内のATPのレベルの保持および細胞内の活性酸素レベルの保持にあることが示唆される。

## 7. 研究目的

肝細胞などの機能性細胞では、その細胞機能の発現および維持を目的とし、従来の単層培養に変わり細胞の凝集体を形成させた、いわゆる3次元培養の試みがなされ、細胞機能の発現に有効であることが、多く報告されている。

我々は、コラーゲンゲル上で形成させたラット肝細胞の細胞凝集体について、細胞凝集体の形成および維持に有効な条件、細胞凝集体の形態と細胞機能の発現について検討し、しっかりとした細胞凝集体の形成と維持が、肝細胞機能の発現および維持に必要であることを、改めて確認した。

しかしながら、なぜ細胞凝集体の形成が、細胞機能の発現に有効なのか、そのメカニズムは詳細には判っていない。種々の遺伝子の発現の差異等、細かい点については議論されているが、細胞凝集体のような3次元培養の方がより生体内に近いからというただ漠然な理由でかたづけられているように思われる。我々は、単層培養と細胞凝集体の形成について、より入り口に近い、より単純な、より明確な部分でのメカニズムの解明を試みた。

## 8. 材料と方法

### 8-1. ラット肝細胞

ウィスター系ラット雄 5～6 週齢より、コラゲナーゼ灌流法により、ラット肝実質細胞を分

離採取した。

#### 8-2. コラーゲンゲル培養器の作製

ペプシン処理 1 型酸性コラーゲン溶液を中和し、ディッシュおよびプレートに分注し、37℃ インキュベーター中に静置し、コラーゲンをゲル化した。

#### 8-3. コラーゲンコート培養床の作製

0.3%牛真皮由来ペプシン処理 1 型コラーゲン酸性溶液を PBS(-)に 10 倍希釈し、コラーゲンコート溶液を調製、このコラーゲンコート溶液を培養器中に培養面が覆われる量を分注し、24 時間放置したのち、コラーゲンコート溶液を除去し、超純水で洗浄し、室温でクリーンベンチ中で風乾した。

#### 8-4. 蛍光顕微鏡用コラーゲンゲル培養床の作製

低蛍光プラスチック製カバースリップ（住友ベークライト社製、セルデスク（直径 30mm））上に、コラーゲンゲル層を形成させ、蛍光顕微鏡用コラーゲンゲル培養床を作製した。

#### 8-5. 培地の調製

##### 培地 1

培地は、ライホビッツ L-15 培地に 10%FBS、30mg/l プロリン、20mM HEPES、20mM NaHCO<sub>3</sub>、ペニシリン G カリウム 10<sup>5</sup> U/l、ストレプトマイシン 200mg/l を添加したものを基本とし、0.1 μM デキサメタゾン（和光）、0.1 μM インシュリン（和光）、10 μg/l EGF（和光）、2%DMSO を添加した。

##### 培地 2

ダルベッコ変法 MEM 培地に L-プロリン 30mg/l、L-アラニン 90mg/l、L-アスパラギン（一水和物）20mg/l、HEPES 20mM、NaHCO<sub>3</sub> 20mM、亜セレン酸ナトリウム 10<sup>-7</sup> M を加えたものを基礎培地とし、0.1 μM デキサメタゾン（和光）、0.1 μM インシュリン（和光）、10 μg/l EGF（和光）、2%DMSO を添加した。

#### 8-6. 培養

コラーゲンゲル上およびコラーゲンコート上へは、1 平方センチメートルあたり約 2 × 10<sup>4</sup> 個で細胞を播種し、培地交換は 1 乃至 2 日毎におこなった。

#### 8-7. 細胞内酸化状態の評価

##### 【蛍光顕微鏡による評価】

##### 1) ジヒドロローダミン 123

コラーゲンゲル層を形成したカバースリップおよびコラーゲンコートしたカバーガラス上

にラット肝細胞を播種し、培養開始から経時的に細胞凝集体および単層を形成する過程培養での細胞内の酸化状態の変化を観察した。

ジヒドロローダミン 123 添加培地により培養を行い、細胞内の活性酸素量に応じ変換されたローダミン 123 が発する蛍光を、共焦点レーザー顕微鏡により確認した。

## 2) ジクロロフルオレセインジアセテート (DCFH-DA)

蛍光顕微鏡用コラーゲンゲル培養床上に肝細胞を播種し、抗酸化剤を添加および低酸素(酸素濃度 5%)で 24 時間培養を行った後、ジクロロフルオレセインジアセテート (DCFH-DA)を 5  $\mu$ M の濃度で添加し、10 分間、37  $^{\circ}$ C で CO<sub>2</sub> インキュベーター中でインキュベートし、直ちに氷冷した PBS(-)で洗浄を行い、10%ホルマリンで固定後、細胞内の活性酸素量に応じて変換された DCFH が発する蛍光を、共焦点レーザー顕微鏡により確認した。

### 【蛍光分光光度計による確認】

抗酸化剤を添加し、24 時間培養を行った後、ジクロロフルオレセインジアセテート (DCFH-DA)を 100  $\mu$ M の濃度で添加し、2 時間、37  $^{\circ}$ C で CO<sub>2</sub> インキュベーター中でインキュベートし、培地除去後、コラゲナーゼ処理を行い、肝細胞を回収し、氷冷したハンクス液で洗浄したのち、RIPA を添加し、細胞を可溶化し、フルオレセインの蛍光量を蛍光分光光度計により測定した。

## 8-8 . ミトコンドリア活性の評価

ローダミン 123 を 2  $\mu$ g/ml で添加し、37  $^{\circ}$ C 1 時間培養し、培地除去後、コラゲナーゼ処理を行い、肝細胞を回収し、超音波で破碎し、遠心によりミトコンドリア画分を調製し、RIPA を添加し可溶化し、蛍光分光光度計によりローダミン 123 の蛍光量を測定し、ミトコンドリア活性とした。

## 8-9 . 細胞内還元型グルタチオン量の測定

コラゲナーゼ処理により、細胞を剥離回収し、超音波破碎機により細胞を破碎し、BIOXIS International 社 BIOXYTECH GR-400 還元型グルタチオンアッセイキットを用い、本キットのプロトコールに準拠し、細胞内還元型グルタチオン量を測定した。

## 8-10 . 培養上清中のアルブミン量の測定

抗酸化剤を添加した培地に変換し、24 時間培養後、培養上清を回収し、アルブミン量を測定した。アルブミン量は抗ラットアルブミンポリクローナル抗体を用いサンドイッチ法による ELISA により測定した。

## 8-11 . P-450 活性の評価

抗酸化剤を添加した培地に変換時、3-メチルコラントレンを添加し、24 時間処理し活性を誘導し、誘導用培地を除去後、エトキシキシクマリン添加培地を加え、37  $^{\circ}$ C で CO<sub>2</sub> インキュ

ベーター中で 2 時間培養し、エトキシマリンからハイドロキシマリンへの変換量を蛍光分光光度計により定量した。

#### 8-12. 生細胞数の評価

WST-1 (同人) を添加し、培養上清中の生成したホルマザン量を 450nm での吸光度により測定した。

#### 8-13. コネクシンの発現の確認

コラーゲングル上の肝細胞凝集体を、コラゲナーゼ処理により剥離回収し、トータル蛋白を調製し、ウエスタンブロットにより、コネクシン 26 の発現を確認した。

#### 8-14. 細胞内 ATP 量の測定

コラゲナーゼ処理により、細胞を剥離回収し、ATP アッセイキットを用い、本キットのプロトコールに準拠し、細胞内 ATP 量をルシフェリン-ルシフェラーゼ発光法により測定した。

### 9. 結果

#### 9-1. コラーゲングル上培養とコラーゲンコート上単層培養におけるギャップジャンクションの機能の比較

ウエスタンブロットでのコネクシン 26 の発現および、ギャップジャンクションの機能を阻害するオクタノールの影響をコラーゲングル上培養と単層培養で比較した。

コネクシンの発現はコラーゲングル上では長期に亘り維持されるが、培養初期ではコラーゲングル上およびコラーゲンコート上での差は認められなかった。オクタノール添加の影響もコラーゲングル上と単層培養であまり差は認められない。

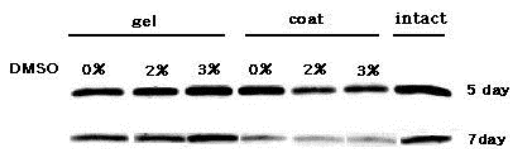


図1 コネクシン26の発現

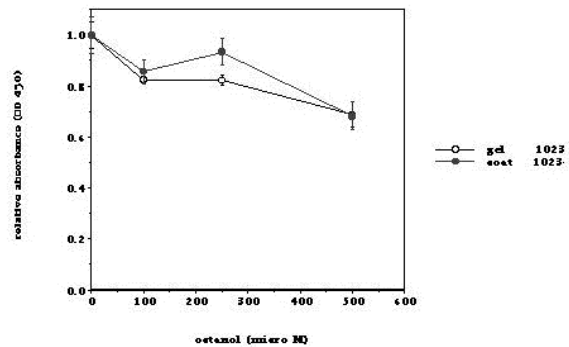


図2 octanol添加の細胞への影響

(WST-1 assayでのホルマザンの生成量)

octanolを添加して、24時間培養後WST-1 assayを行った

octanol無添加群のホルマザンの吸光度を1とした相対値による比較

上図: 培養4日目にoctanolを添加

下図: 培養7日目にoctanolを添加

## 9-2. 細胞内酸化レベル

### 【細胞内の活性酸素レベルの比較】

共焦点レーザー顕微鏡にてコントラスト、明るさ（感度）を一定にし、ローダミンの蛍光像を、細胞播種から経時的に観察した。コラーゲンゲル上に播種した場合、細胞播種時から蛍光強度は変化はほとんどない、一方コラーゲンコート上に播種した場合、細胞の伸展とともに蛍光強度は減弱する。コラーゲンゲル上では細胞内酸化状態（活性酸素量）が高いことを示していた。

### 【細胞内の還元型グルタチオン量の比較】

細胞内の還元型グルタチオン量は、コラーゲンゲル上では播種直後から急激に増加し培養24時間あたりをピークに徐々に減少した。コラーゲンコート上ではGSH量の大きな増加は認められずやはり24時間をピークに減少していった。コラーゲンゲル上では、コラーゲンコート上に比べ、GSHレベルが高い。また、培地への過酸化水素を添加し細胞へのサバイバルへの影響をみると、過酸化水素濃度増加による450nmでの吸光度（WST-1でのホルマザン生成による）、の減少は、コラーゲンコート上のモノレイヤーの方が大きく。モノレイヤーでは、過酸化水素添加に対する抵抗性は、コラーゲンゲル上での細胞凝集体は、モノレイヤーに比較し高かった。コラーゲンゲル上細胞凝集体形成の方がGSHが多く、高い活性酸素レベルでも耐えられる性質を獲得していることが判った。

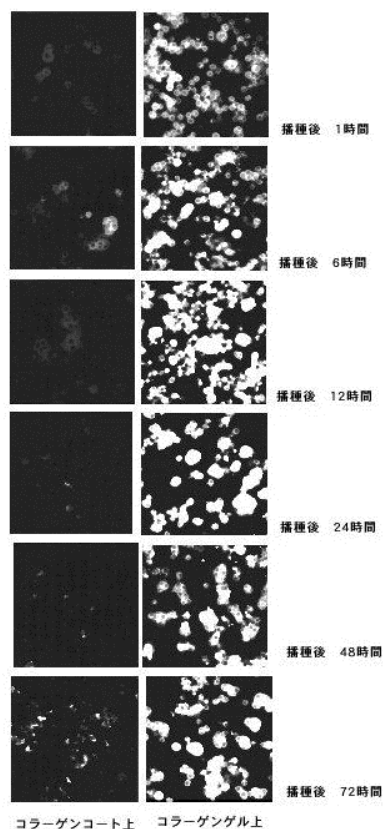


図3 細胞播種からの細胞内酸化状態の変化

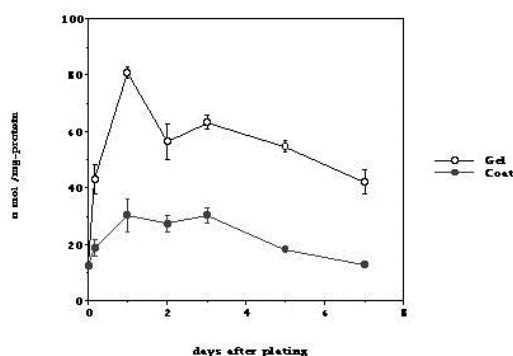


図4 細胞内の還元型グルタチオン（GSH）量の変化

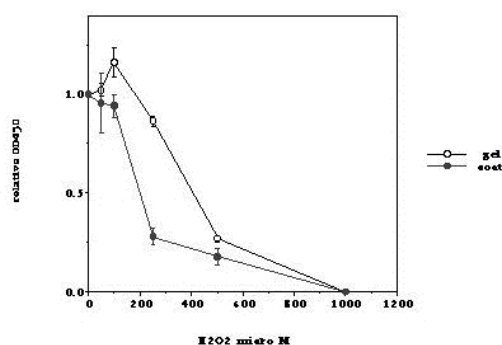


図5 過酸化水素添加の影響の比較

培養7日目、過酸化水素を培地に添加し、24時間培養した後WST-1によりホルマザンの生成量を比較。過酸化水素を添加しないときのホルマザンの吸光度を1とした

### 【ミトコンドリア機能の比較】

細胞内の活性酸素量の差は何に起因するのか、ミトコンドリアの機能の比較を行った。ローダミン123のミトコンドリア取り込みは、コラーゲンゲル上の方が高く、コラーゲンゲル

上の方がミトコンドリア活性が高いことが判った。また、細胞内の ATP 量もコラーゲンゲル上の方が高かった。このコラーゲンゲル上とコラーゲンコート上でのミトコンドリア活性の差は、培養 24 時間の段階ですでに認められ、細胞が伸展することにより、ミトコンドリアの活性も低下することが判った。

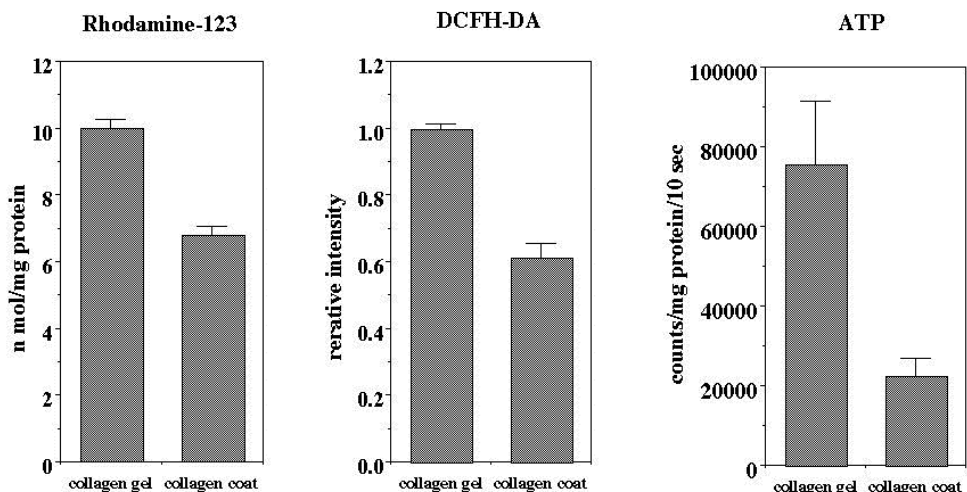


図6 ミトコンドリア活性の比較

【低酸素培養の影響の比較】

アルブミン合成、P 450 活性とも影響はコラーゲンコート上の方が大きく、細胞のサバイバルへの影響は両者に差は認めれ無かった。機能発現には、低酸素状態が大きく影響し、その影響はコラーゲンコート上での単層の方がより大きいことが判った。

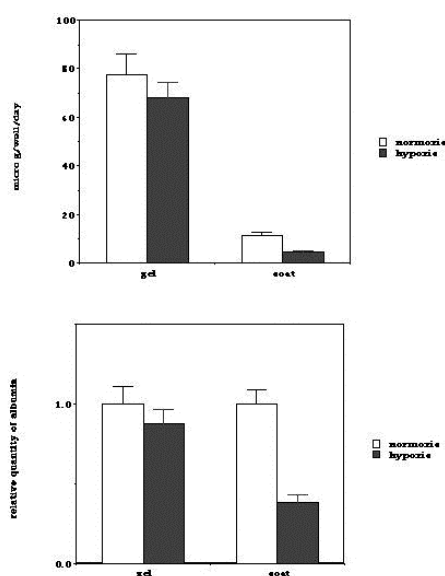


図7 低酸素培養のアルブミン産生への影響

培養 7 日目  
 上図：培養上清中のアルブミン量  
 下図：上図より大気酸素分圧下でのアルブミン生成量を 1 とした相対値による比較

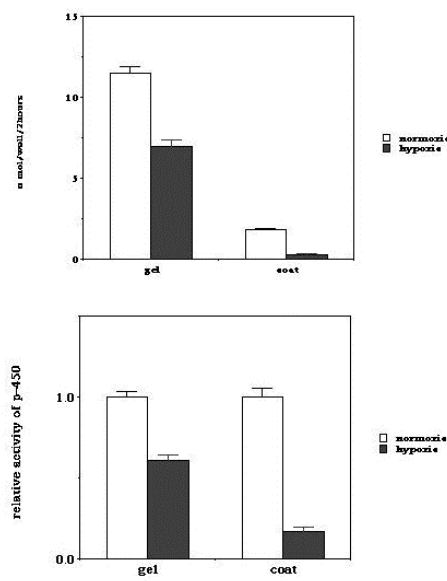


図8 低酸素培養のP-450活性誘導への影響

培養 7 日目に誘導し 8 日目に活性を測定  
 上図：エトキシマリンからハイドロキシマリンへの生成量  
 下図：上図より大気酸素分圧下でのハイドロキシマリンの生成量を 1 とした相対値による比較

### 【低酸素培養と抗酸化剤の添加の影響】

この時点で、機能発現の差を知るキーワードとして活性酸素、ミトコンドリア、GSH が出てきた、これらと細胞機能の発現との関係について、コラーゲンゲル上培養での検討を行った。培地へ、DMSO (2%)、L-アスコルビン酸 (1 mM)、N-アセチル-L-システイン (1mM) を添加し、酸素 20%の大気酸素濃度および 5%酸素濃度で 24 時間で培養し細胞内の酸化状態、アルブミン合成量、3-メチルコラントレンにより誘導される P-450 活性および細胞内の還元型グルタチオン量の比較を行った。

細胞内の酸化状態は、酸素濃度 20%においては、DMSO (2%) の添加で酸化状態は低かった、L-アスコルビン酸 (1 mM)、N-アセチル-L-システイン (1mM) の添加では、細胞内酸化状態の変化は認められなかった。酸素濃度 5%においては、コントロールを含め全てで酸素濃度 20%に比較し酸化状態の低下が観られた。

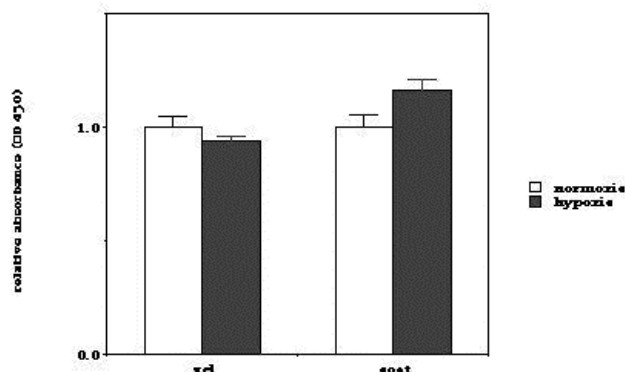


図9 WST-1 assay での低酸素培養の影響の評価  
培養 7 日目、酸素濃度 5% で 24 時間培養後、WST-1 assay にて評価  
大気酸素分圧下で培養した群のホルマザンの吸光度を 1 とした相対値による比較

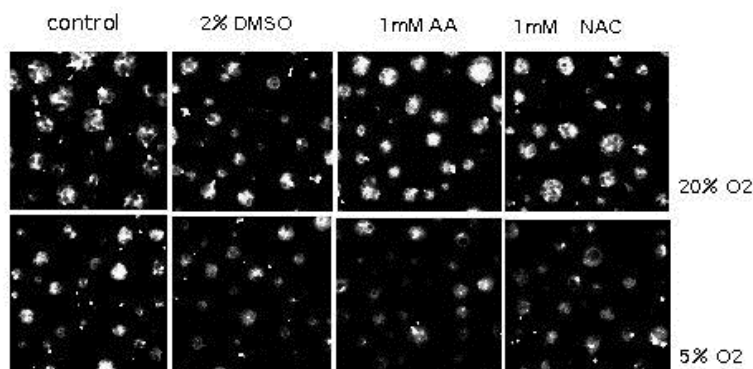


図10 抗酸化剤の添加および低酸素培養での細胞内活性酸素量の比較

アルブミン合成は、酸素濃度 20%では、DMSO (2%) 添加において、合成量の低下が認められた、L-アスコルビン酸 (1 mM) では変化は認められず、N-アセチル-L-システイン (1mM) では、逆に合成量の増加が認められた。酸素濃度 5%と酸素濃度 20%との比較では、酸素濃度を 5%にした場合、DMSO (2%) 添加において合成量の低下が認められ、N-アセチル-L-システイン (1mM) 添加では、酸素濃度 5%で合成量が酸素濃度 20%と比較して低下が認められたが、酸素濃度 5%でのアルブミン合成量は、コントロールでのアルブミン合成量とほぼ同等であった。コントロールおよび L-アスコルビン酸 (1 mM) では酸素濃度 5%においても、合成量の低下は認められなかった。

P-450 活性は、酸素濃度 20%では、DMSO (2%) および L-アスコルビン酸 (1 mM) 添加において、合成量の低下が認められた、N-アセチル-L-システイン (1mM) では、コントロールとの差は認められなかった。低下の度合いは DMSO (2%) で大きかった。酸素濃度 5%と酸素濃度 20%との比較では、酸素濃度を 5%にした場合、コントロール、DMSO (2%)、L-アスコルビン酸 (1 mM)、N-アセチル-L-システイン (1mM) 全てで酸素濃度 20%と比較し活性の大きな低下が認められた。

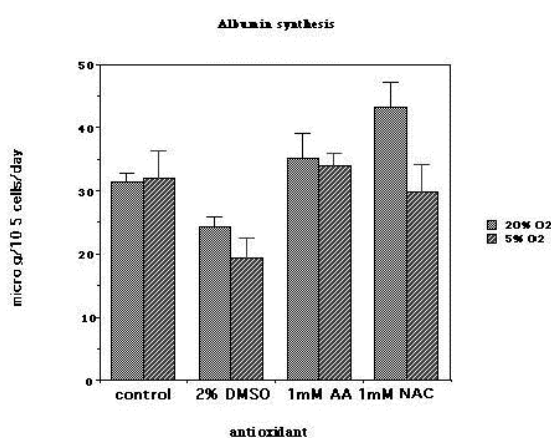


図11 抗酸化剤の添加および低酸素培養でのアルブミン合成への影響

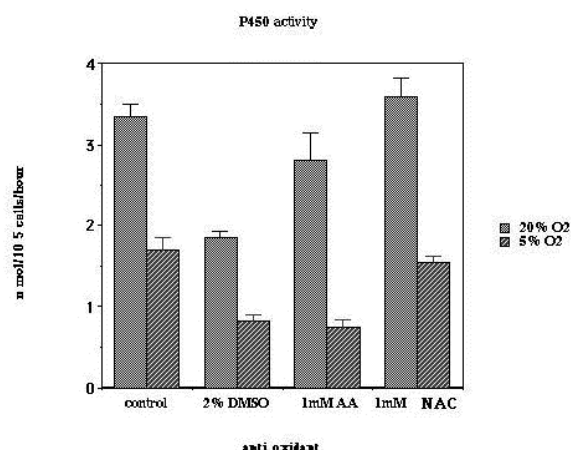


図12 抗酸化剤の添加および低酸素培養でのP450活性への影響

細胞内の還元型グルタチオン (GSH) 量は、酸素濃度 20%では、DMSO (2%) 添加において、GSH 量の低下が認められた、L-アスコルビン酸 (1 mM) では変化は認められず、N-アセチル-L-システイン (1mM) では、合成量の増加が認められた。酸素濃度 5%と酸素濃度 20%との比較では、酸素濃度を 5%にした場合、DMSO (2%) 添加において GSH 量の低下が認められたが、コントロール、L-アスコルビン酸 (1 mM) および N-アセチル-L-システイン (1mM) 添加では、酸素濃度 5%で GSH 量が酸素濃度 20%と比較して多かった。

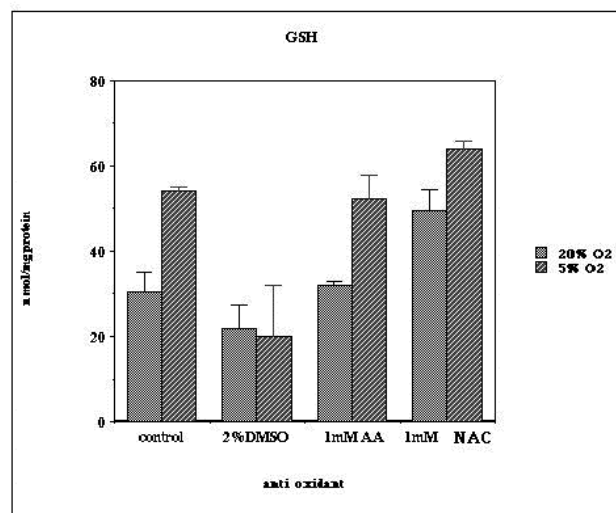


図13 抗酸化剤の添加および低酸素培養での細胞内GSH量の比較

以上をまとめるとつぎの表のようになり、細胞内の活性酸素量と機能との相関があることがわかる。



抗酸化剤	肝細胞機能の発現		細胞内 活性酸素量	細胞内 GSH量
	酸素 濃度	P-450活性 アルブミン 合成		
コントロール	20%	—	—	—
	5%	↘	→	↗
DMSO (2%)	20%	↘	↘	↘
	5%	↓	↘	↘
L-AA (1mM)	20%	↘	→	→
	5%	↓	→	↗
NAC (1mM)	20%	↗	→	↗
	5%	↘	↘	↑

表1 抗酸化剤の添加および低酸素培養の肝細胞機能への影響

【ミトコンドリア活性、グルタチオン、ATP の機能発現への影響】

ミトコンドリアの活性を阻害する rotenone、GSH を阻害する DEM (ジエチルマレインサン) を培地中に添加し、細胞内の ATP 量および機能発現への影響をみたところ、細胞内の ATP 量の低下および p450 活性の低下が認められた。GSH のミトコンドリア活性および機能の発現への影響が確認できた。

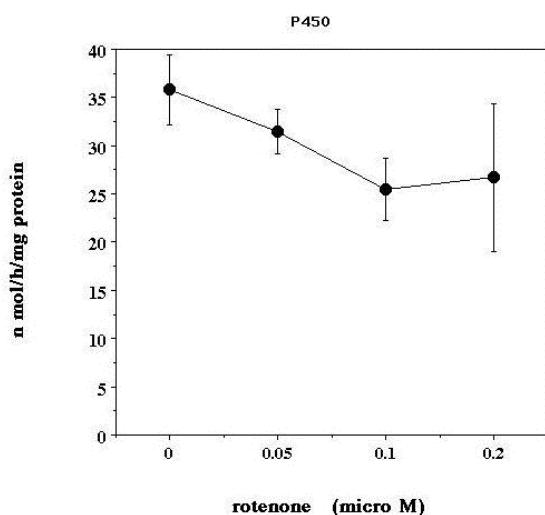


図14 rotenone 添加による GSH阻害のP450活性への影響

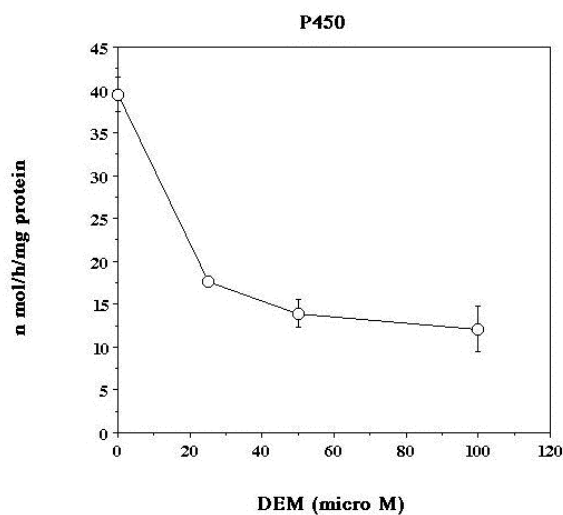


図15 ジエチルマレインサン添加による GSH阻害のP450活性への影響

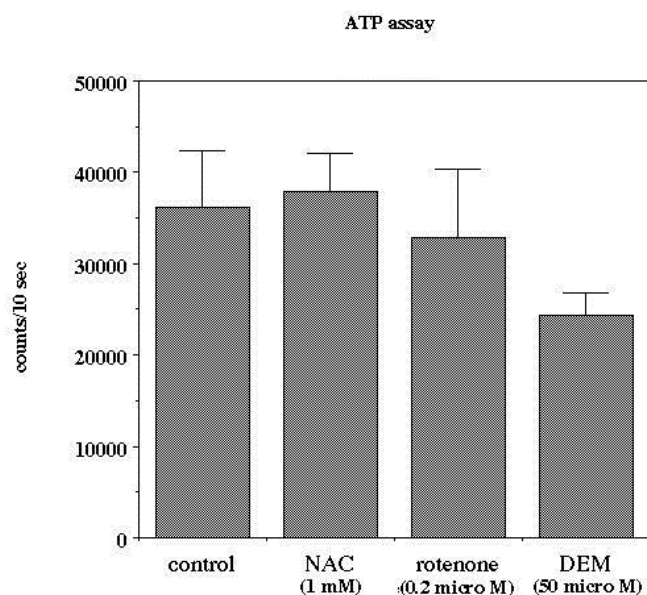


図16 NAC rotenone DEM 添加の細胞内ATP量への影響

## 10. 考察

### 【ギャップジャンクションと機能発現】

肝細胞における機能の発現には、ギャップジャンクションが大きく関わっている。肝細胞機能の発現にとの関りや肝細胞毒性を示す薬物にはギャップジャンクション遮断するものも多いと報告されている。そこでまず、このギャップジャンクションの機能が細胞凝集体形成の場合と単層の場合で異なることが、機能の発現レベルの差の要因であると考え、まずギャップジャンクションについて検討を行った。細胞凝集体の形成により、コネクシン 26 蛋白の発現はモノレイヤーに比較し、長期に亘り保持されることは確認できた。しかし、培養初期での発現には差は認められない。オクタノールによるギャップジャンクションの阻害での評価では、オクタノールの培地への添加により、アルブミン合成、P-450 活性、WST-1 のホルマザンの吸光度の低下が認められた。しかし、オクタノール添加の効果は細胞凝集体とモノレイヤーで差が認められない。

機能発現レベル比較では培養初期において、顕著に差が認められ、ギャップジャンクションの機能との相関は認められなかった。細胞凝集体形成により、コネクシン蛋白の発現が保持され、細胞の機能の維持されることは確かだと思われるが、細胞凝集体の形成によりギャップジャンクションを介したセルセルコミュニケーションが単層培養に比較し高いため、肝細胞機能の発現レベルが高いとは説明できないと思われる。

### 【酸化的ストレスと機能発現】

コラーゲンゲル上では、細胞播種後、肝細胞はコラーゲンゲル上に接着はするがほとんど伸展しない、一方コラーゲンコート上では肝細胞は接着し、伸展を始め、やがて単層を形成する。この過程での細胞内の活性酸素の発生状況はコラーゲンゲル上とコラーゲンコート上では大きく異り、コラーゲンゲル上では活性酸素の発生レベルが高かった。還元型グルタチ

オンレベルをみるとコラーゲンゲル上では細胞播種直後からレベルは上昇し、コラーゲンコートに比べ還元型グルタチオンレベルは高く保たれていおり、耐酸化ストレス能も高いことが確認された。低酸素培養での機能発現の低下をコラーゲンゲル上とコラーゲンコート上で比較すると、コラーゲンゲル上の細胞凝集体の方がコラーゲンコート上のモノレイヤーよりも小さく、これは、細胞内の活性酸素発生能力の差が細胞機能の差として現れたと考えられる。確かに活性酸素は細胞を損傷させる作用が強いのは事実であるが、肝臓においては、種々の代謝反応に活性酸素をうまく活用するシステムが備わっていて、ある程度の活性酸素の細胞内レベルを維持することが細胞機能に関っているのではとの仮説をたてた。

抗酸化剤の添加による影響をみると、細胞内の活性酸素量抑制されると、機能の発現が低下することが確認できた。アルブミン合成と P450 活性を比較すると、p 450 活性の方が影響が大きい。細胞内の酸化状態は、アスコルビン酸および N-アセチル-L-システイン (1mM) 添加では酸化状態の低下は認められない。N-アセチル-L-システイン (1mM) 添加では、アルブミン合成の亢進が認められた。N-アセチル-L-システインは、それ自身も抗酸化剤として作用するが、細胞内でのグルタチオン量を高めることが知られている。今回細

まとめ  
細胞凝集体の形成と機能の発現

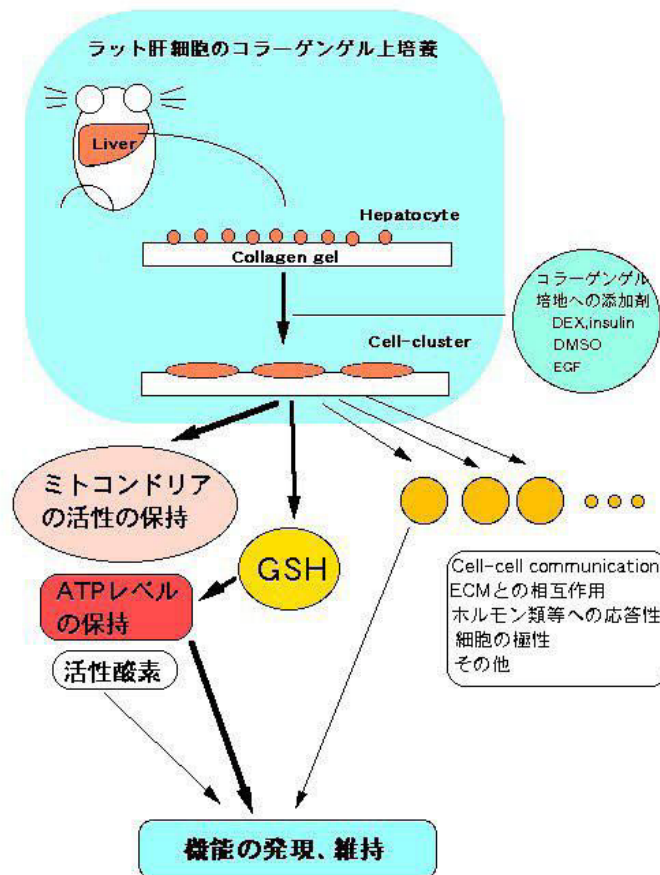


図17

胞内の GSH 量の確認でも、N-アセチル-L-システインの添加では GSH 量が多かった。このグルタチオンの効果により、ミトコンドリアの機能の亢進がはかられたためとも考えられる。また、細胞内の活性酸素量を比較すると N-アセチル-L-システインの添加ではむしろ、細胞内の活性酸素量は亢進しており、ミトコンドリアの活性の亢進と細胞内の活性酸素量の亢進により、機能発現が促進されたとも考えられる。

以上より、ラット肝細胞の細胞凝集体の形成での、機能の発現と活性酸素の関りを観ることにより、肝細胞機能の発現に、活性酸素が関わっていること、ATP の産生が必要であること、および細胞内 GSH が関わっていることが判った。発現や維持には、セルセルコミュニケーションや細胞外マトリックスとの相互作用、細胞の極性の維持などが必要とされている、しかしながら、これらだけでは、細胞凝集体を形成したときの、モノレイヤーと比較した肝細胞機能の発現の優位性は、説明できない。ラット肝細胞が、コラーゲンゲル上で細胞凝集体を形成することにより、モノレイヤーに比較して細胞機能の発現や維持が良好なことに對する答えの一つは、細胞が伸展しない状態にあることによるミトコンドリア活性の保持それに伴う、細胞内の活性酸素量や GSH 量保持にあると思われる。

## 10. 今後の展開

第 1 部では、ラット肝細胞のコラーゲンゲル上培養での、細胞凝集体形成における、必要条件を確定することができた、第 2 部では、ラット肝細胞培養での細胞凝集体形成の優位性を改めて確認することができた。今まで検討してきた、コラーゲンゲル上に小さなクラスターを形成させる方法が、ラット肝細胞では、機能の発現維持に最も有効な方法の 1 つであると結論づけられるが、生体により近い培養環境を目指し検討されている本培養方法であるが、細胞機能の発現という観点からは、より生体に近づいたといえる。しかし、培地への添加物の有効性は改善されているが、要求性は改善されておらず、また DMSO という生体に存在しないものの添加が必須であり、生体内の培養環境からは程遠いものである。本研究における知見をもとに、本培養方法をより生体に近い環境へと改善していきたい。

## 13. 研究業績

13-1. 原著論文 なし

13-2. 総説など なし

13-3. 国際学会発表 なし

13-4. 国内学会発表

1) 横山兼久、児玉靖司、渡邊正己: ラット肝細胞細胞凝集体形成での機能発現における活性酸素の関り、日本放射線影響学会第 41 回大会、長崎 (1998)

13-5. 新聞など なし

13-6 . 特許 なし

14 .

(1) A study of the mechanism about maintenance of cellular function of rat hepatocyte in cell-cluster culture on type1 collagen gel

(2) Laboratory of Cell and Stress Biology Japan Science and Technology Corporation at Nagasaki

(3) Kanehisa Yokoyama

(4) Seiji Kodama, Yukiko Nakayama and Masami Watanabe

(5) 1997-1999

(6) Abstract

The hepatocellular functions are maintained by forming the cell-clusters or spheroids. We studied the mechanism about maintenance of cellular function of rat hepatocyte in cell-cluster culture on type1 collagen gel in point of oxidative stress. Intra-cellular oxidative status, ATP level and GSH level are interactive with cell morphology. They are higher in not spreading morphology than spreading. By the inhibition of GSH, intra-cellular ATP, albumin synthesis and P450 activity declined. In hypoxic culture, albumin synthesis and P450 activity declined. And by addition of antioxidants, P450 activity declined.

Therefore it is suggested that ATP and ROS play important role for expression and maintenance of hepato-cellular functions, and intra-cellular ATP and ROS level are maintained by maintenance of mitochondrial activity by forming clusters on type 1 collagen gel.