

培養細胞を用いた腹膜透過モデルによる  
溶質透過機構の解明

平成 18 年 度

三重大学大学院工学研究科  
博士前期課程 分子素材工学専攻

中 野 雄 介

平成 18 年度 修士論文

培養細胞を用いた腹膜透過モデルによる  
溶質透過機構の解明



三重大学大学院工学研究科 博士前期課程

分子素材工学専攻

中野 雄介

## 目次

1. 緒言	1
腹膜を介する物質透過	
1-1. 腹膜の構造	2
1-1-1. 腹膜透析と腹膜の機能劣化	
1-1-2. 腹膜の構造と機能	
1-1-3. 腹膜と物質透過	
1-2. 細胞単層の溶質透過性	3
1-2-1. 細胞単層	
1-2-2. 細胞の溶質透過経路	
1-2-3. 細胞種による透過性の違い	
1-3. 生体膜の“Pore”の解析	8
1-3-1. 膜の孔径と溶質半径	
1-3-2. “three pore model”	
2. 目的	12
・腹膜各層の溶質透過性の評価	
・各層を統合した人工模擬腹膜透過モデルの作成	
3. 方法	13
3-1. 腹膜透過モデル(血管内皮細胞層)の作成	13
3-1-1. 臍帯静脈血管内皮細胞の培養と継代	
3-1-2. Transwell®を用いた腹膜透過モデル(血管内皮細胞部)の作成	
3-1-3. 膜間電気抵抗値測定	
3-2. 血管内皮細胞層の透過性評価	14
3-2-1. 溶質透過試験	
3-2-2. 細胞間結合タンパクの同定	
3-3. 過酸化水素曝露による溶質透過性の変化	16
3-3-1. 過酸化水素による HUVEC の細胞活性に与える影響	
3-3-2. 膜間電気抵抗値測定(過酸化水素曝露時)	
3-3-3. 溶質透過試験(過酸化水素曝露時)	
3-3-4. 細胞間結合タンパクの同定 (過酸化水素曝露時)	
3-4. 溶質透過性亢進におけるシグナル伝達経路の検証	17
3-4-1. 膜間電気抵抗値測定(シグナル伝達経路阻害時)	
3-4-2. 溶質透過試験(シグナル伝達経路阻害時)	
3-4-3. 細胞間結合タンパクの同定(シグナル伝達経路阻害時)	

3-5. 間質層の透過性評価	17
3-5-1. 間質層モデルの作成	
3-5-2. 膜間電気抵抗値測定	
3-5-3. 溶質透過試験	
3-5-4. 光学顕微鏡による観察	
3-6. 透過型電子顕微鏡による HUVEC 単層の厚み測定	18
3-7. 統計処理	18
4. 結果	19
4-1. 腹膜透過モデル(血管内皮細胞層)の作成	19
4-1-1. 膜間電気抵抗値測定	
4-1-2. 位相差顕微鏡による観察	
4-2. 血管内皮細胞層の透過性評価	20
4-2-1. 溶質透過試験	
4-2-2. 細胞間結合蛋白質の同定	
4-3. 過酸化水素曝露による溶質透過性の変化	21
4-3-1. 過酸化水素による HUVEC の細胞活性に与える影響	
4-3-2. 膜間電気抵抗値測定(過酸化水素曝露時)	
4-3-3. 溶質透過試験(過酸化水素曝露時)	
4-3-4. 細胞間結合タンパクの同定 (過酸化水素曝露時)	
4-4. 溶質透過性亢進におけるシグナル伝達経路の検証	23
4-4-1. 膜間電気抵抗値測定(シグナル伝達経路阻害時)	
4-4-2. 溶質透過試験(シグナル伝達経路阻害時)	
4-4-3. 細胞間結合蛋白質の同定(シグナル伝達経路阻害時)	
4-5. 間質層の透過性評価	24
4-5-1. 間質層モデルの作成	
4-5-2. 膜間電気抵抗値測定	
4-5-3. 溶質透過試験	
4-5-4. 光学顕微鏡による観察	
4-6. TEM による HUVEC 単層、HPMC 単層の厚み測定	25
5. 考察	26
5-1. 腹膜透過モデル(血管内皮細胞層)評価	26
5-2. HUVEC と HPMC の細胞単層の透過性	26
5-3. 過酸化水素曝露による溶質透過性	32
5-4. 溶質透過性亢進におけるシグナル伝達経路(中皮細胞と内皮細胞)	34
6. 総括	35

7. 参考文献 . . . . .	36
8. 謝辞 . . . . .	38
9. 付録 . . . . .	39

## 語句説明

ZO-1(zonula occludens-1) ・ ・ ・ ・ ・ タイトジャンクション構成蛋白質  
HPMC(Human peritoneal mesothelial cell) ・ ・ ・ ・ ・ ヒト腹膜中皮細胞  
HUVEC(Human umbilical vein endothelial cells) ・ ヒト臍帯静脈血管内皮細胞  
VEGF(vascular endothelial growth factor) ・ ・ ・ ・ ・ 血管内皮増殖因子  
TGF- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ ) ・ ・ ・ ・ トランスフォーミング成長因子  
TER(Transmesothelial electrical resistance) ・ ・ ・ ・ ・ 経腹膜電気抵抗  
MEK(MAPK-ERK kinase) ・ ・ ・ ・ ・ リン酸基を転移する酵素  
PKC(Protein kinase C) ・ ・ ・ ・ ・ リン酸化酵素  
Src ・ ・ ・ ・ ・ 非レセプター型チロシンキナーゼ  
PI3K(phosphatidylinositol-3-kinase) ・ ・ ・ ・ ・ リン酸基を転移する酵素  
PLC(phospholipase C) ・ ・ ・ ・ ・ リン脂質を加水分解する酵素  
ROS (Reactive Oxygen Species) ・ ・ ・ ・ ・ 活性酸素種  
MAPK (mitogen-activated protein kinases) ・ ・ ・ ・ ・ リン酸基を転移する酵素  
DAG(diacylglycerol) ・ ・ ・ ・ ・ C キナーゼを活性化する物質  
JNK(c-Jun N-terminal kinase) ・ ・ ・ ・ ・ リン酸基を転移する酵素  
ERK(extracellular signal-related kinase) ・ ・ ・ ・ ・ リン酸基を転移する酵素  
Ras ・ ・ ・ ・ ・ GTP 結合蛋白  
Raf(Ras substrate of C3) ・ ・ ・ ・ ・ GTP 結合蛋白  
ROS(Reactive oxygen species) ・ ・ ・ ・ ・ 活性酸素種  
GF109203X ・ ・ ・ ・ ・ PKC 阻害剤  
PD98059 ・ ・ ・ ・ ・ MEK1/2 阻害剤  
SB203580 ・ ・ ・ ・ ・ p38 阻害剤  
LDH(lactate dehydrogenase) ・ ・ ・ ・ ・ 乳酸脱水素酵素  
PBS(phosphate buffer solution) ・ ・ ・ ・ ・ リン酸緩衝溶液  
FITC(fluorescein isothiocyanate) ・ ・ ・ ・ ・ 標識用蛍光色素

# 1. 緒言

## 実験の経緯

本研究は平成15年度より三重大学工学部分子素材工学科生体材料化学研究室で始められたものである。

腎不全の対症療法の一つに腹膜透析があるが、これを長期間継続することができない重要な問題に除水能の低下がある。この現象は、腹膜が透析液により傷害を受け、半透膜としての機能が低下するために起こる。この前段階に溶質透過性の亢進が報告されていることから、溶質透過性亢進が除水能低下の一因と考え、この問題を解決すべく、まず腹膜の透過性を担う部位を特定、そして透過性亢進の原因およびその機構を解明することが本研究の主旨である。

腹膜はいくつかの層からなる複合膜であるが、その中でも透過の制御を行う部位として物質透過に関わる2つの細胞単層、中皮細胞層と血管内皮細胞層に着目した。これらの層では細胞間はタイトジャンクションと呼ばれる構造により密接に結合しており、この構造が腹膜を介する物質移動の制御に重要な役割を担っていると考えられる。

また、透析液には浸透圧剤として高濃度の D-グルコースが含まれており、これにより腹膜細胞が活性酸素種(ROS)を産生することが報告されている。さらに ROS による血管内皮細胞層の透過性亢進も報告(Lee, Kevil)されていることから、D-グルコース由来の ROS が腹膜の細胞単層の透過性になんらかの影響を及ぼすものと考え、ROS の一種である過酸化水素を用いて細胞層の透過性へ与える影響を検証した。

金田健一氏は腹膜の最も透析側に存在する中皮細胞層に着目し、細胞層を介する透過について研究を進めた(平成 18 年度三重大学大学院修士論文)。その結果、中皮細胞層が透過を制限する働きがあること、過酸化水素により細胞層の透過性が亢進すること、そしてその際に伝達するであろうシグナル経路の一部が示唆された。そこで本研究では血管内皮細胞層について実験を行い、2つの細胞層における透過性を比較、律速部を示すことを目指した。

## 腹膜を介する物質透過

### 1-1. 腹膜の構造

#### 1-1-1. 腹膜透析と腹膜の機能劣化

腎不全患者への対症療法に腹膜透析がある。腹膜透析とは、腹膜の半透膜としての機能を利用して、血液中の老廃物を除去する方法であるが、この方法を長期に行うことで透析液由来の酸化ストレス等により腹膜に機能劣化が生じ、除水能の低下や様々な合併症を引き起こすと考えられている。そして、その前段階として溶質透過性の亢進が起こることもまた、報告されている<sup>(1)</sup>。

#### 1-1-2. 腹膜の構造と機能

腹膜とは腹腔の内面を覆う壁側腹膜と腹部臓器(肝臓、脾臓、脾臓、腎臓)とその間膜(大網、胃、腸間膜)を覆う臓壁腹膜からなる漿膜組織で、たくさんの微絨毛を持つ一層の中皮細胞に覆われており、基底膜下(間質)には弾性繊維、膠原繊維、毛細血管、顆粒を含む肥満細胞などのあらゆる結合組織で支持されている複合的な膜と定義されている。

腹膜の厚さは50～150 $\mu\text{m}$ で、壁側腹膜と臓側腹膜に囲まれた空間を腹腔といいここに腹腔液が満たされている。腹膜の第一の機能は腹部臓器が自由に動くことができる滑面を提供することにある。他には感染防御、臓器・器官の癒着防止、溶質移動として働く。

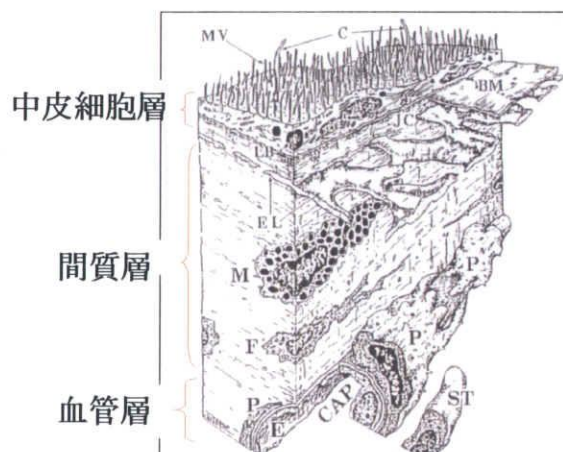


図 1-1 腹膜構造の模式図<sup>(5)</sup>



### 1-1-3. 腹膜と物質透過

腹膜透析時には、血液側から毛細血管側の境膜(R1)、血管内皮細胞層(R2)、内皮細胞基底膜(R3)、間質層(R4)、中皮細胞層(R5)、透析液側の境膜(R6)の順に溶質に移動抵抗がかかる。(図 1-2)

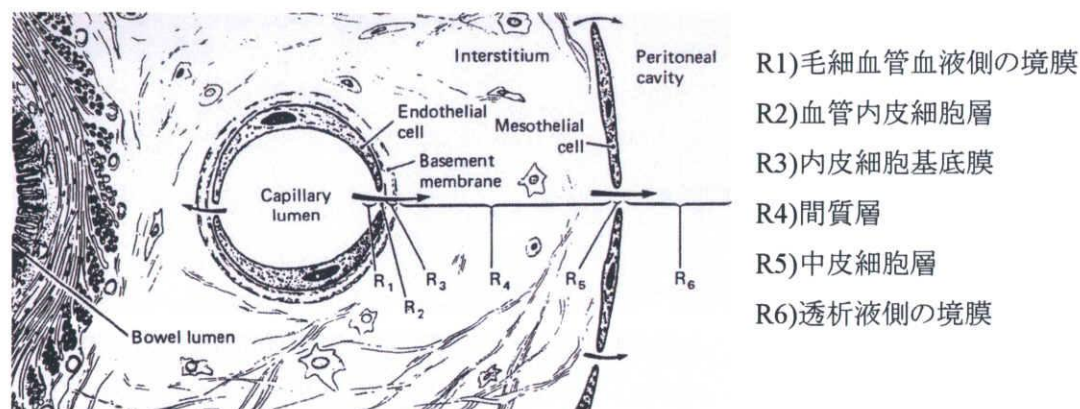


図 1-2 毛細血管－腹腔間の溶質抵抗<sup>(5)</sup>

つまり腹膜の溶質透過性亢進を考えると、この各層のいずれかもしくは複数の場所で透過性が亢進していることが推測できる。各層の物質移動係数の逆数の和が総括物質移動係数の逆数となり、透過性亢進部位を把握することは腹膜劣化の機序を探る上でも重要であるが、臨床から得られる情報は総括物質移動係数のみである。

## 1-2. 細胞単層の溶質透過性

### 1-2-1. 細胞単層

腹膜の構造において、まず物質移動に関わる2つの細胞単層に着目した。

多細胞生物の体の中は上皮細胞や内皮細胞の層でいくつもの組織器官に分かれて存在しており、細胞層を介して器官の内部と外部で様々な物質の交換を行うことでこれら器官の内部環境の恒常性を維持している。腹膜においても同様に、細胞単層は物質透過を制御する一つの重要な部分であると考えられる。

### 1-2-2. 細胞単層の溶質透過経路

細胞単層を介する溶質の透過経路について、EUGENE M. RENKIN らは毛細血管壁で推定される通路を以下のように述べている。<sup>(6)</sup> (図 1-3)。

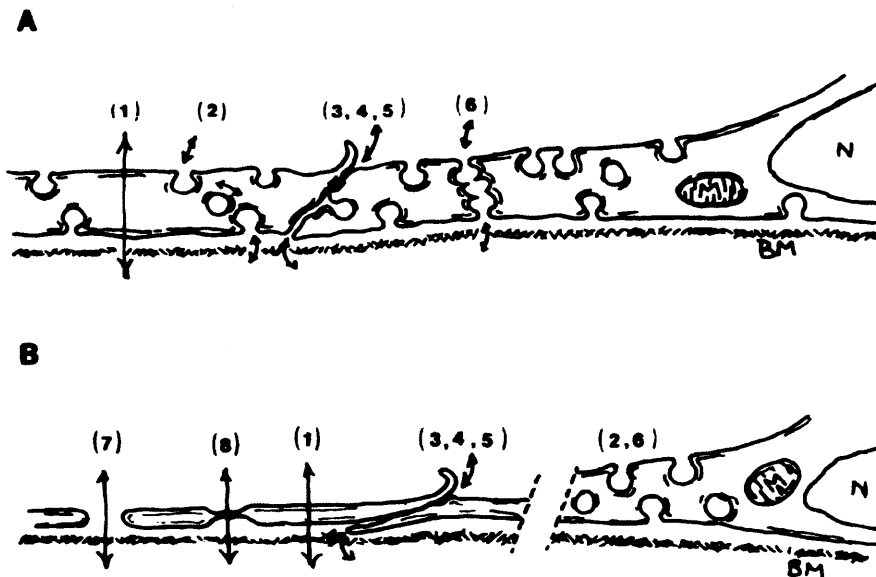


図 1-3 毛細血管壁の非脂溶性溶質の推定される透過経路<sup>(6)</sup>

上段は無窓性、下段は有窓性毛細血管の模式図である。(1)は細胞膜を通して細胞自身を通過していく経路、水などごく小さい分子が可能である。(2)は細胞体内の小胞による能動輸送、血清成分は小胞内に取り込まれ、小胞の泳動により組織側に運搬され放出される。(3), (4), (5)は内皮細胞同士の接合部の間隙を細孔(small pore)、広い間隙を巨孔(Large pore)と呼び、血清タンパク以下の小さい分子とそれ以上の大きい分子の透過経路となる。(6)は小胞が数個融合してできる小胞管で巨孔と同じ機能を行う。そして(7), (8)は細胞間結合部の大きな窓である。この中でも細胞の間を通過する **paracellular** 経路に着目した。

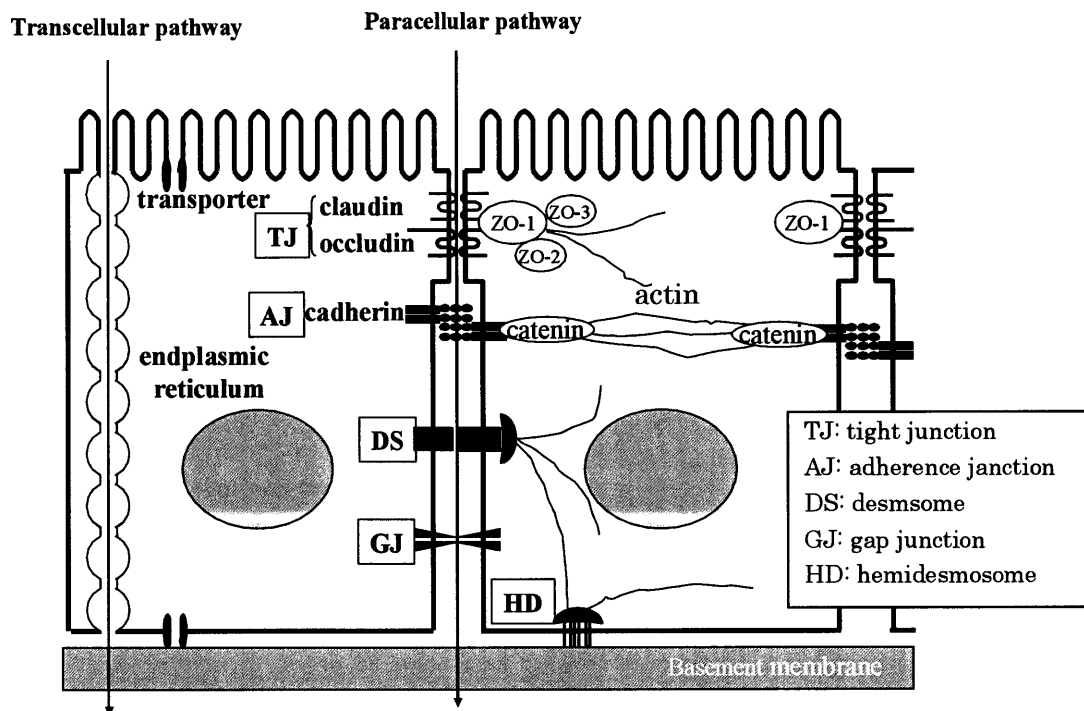


図 1-4 細胞単層を通り抜ける溶質透過経路<sup>(2)</sup>

paracellular 経路には、細胞間結合を担うタイトジャンクション、アドヘレンスジャンクション、デスモソーム、ギャップジャンクションといった結合装置が関わっている。

アドヘレンスジャンクションにはカドヘリンが接着分子として裏打ちタンパクであるカテニンを介してアクチンフィラメントと結合している。

デスモソームでもやはりカドヘリン様の接着分子が中間系フィラメントと結合している。これら 2 つの接着装置は、その結合力を細胞骨格につなげることで、組織全体としての機械的強度を保つ役割を果たし、細胞間隙の距離は 15-20nm に保たれている。

それに比べタイトジャンクションは細胞間隙の距離を限りなくゼロにまで近づけている特殊な接着装置である。この構造は特に細胞間の物質移動の制御に重要な役割を担っていると考えられる。さらに、細胞膜脂質二重層の流動性により膜のタンパク質は細胞膜上を移動することができるが、タイトジャンクションを超えては移動できない。よって、細胞の apical side と basal side の細胞膜タンパクが入り交じることなく細胞の極性が保たれる。すなわち、タイトジャンクションは、膜タンパクの通行を妨げるフェンス機能の役割もまた有している。

タイトジャンクションの構成タンパクについては現在 ZO-1(zonula occludens-1)、ZO-2、ZO-3、AF-6(afadin-6)、cingulin、syplekin、JEAP、CLMP、

ZAK(ZO-associated kinase) fodrin、JEAP の 10 種類の細胞膜裏打ちタンパク質と、4 回膜貫通型タンパク質である occludin、claudin と 1 回膜貫通型タンパク質の JAM の 13 種類が知られている。現在の研究ではまだ詳細は分かっていないが、タイトジャンクション部ではこれらのタンパク複合体が細胞の周囲を直線状に並んでタイトジャンクションストランドと呼ばれる構造を形成している。Occludin と Claudin が形成に関わっていると考えられている。

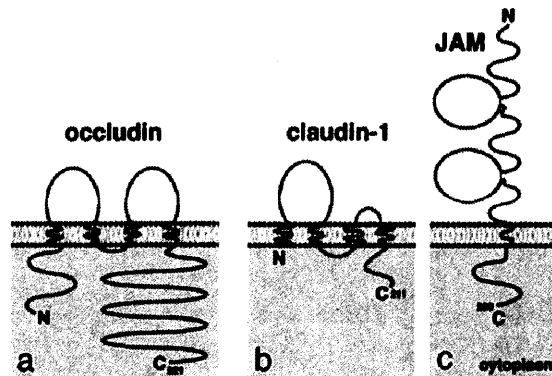


図 1-5 タイトジャンクションの膜貫通型タンパク (27)

図 1-5 はタイトジャンクションを形成する膜貫通型タンパクである。

occludin は、1993 年に月田らによって同定された。occludin は分子量 65kDa で、4 回膜貫通型タンパク質である。よって、細胞外のループは 2 つ存在する。ループはそれぞれ約 40 個のアミノ酸からできている。特に、N 末端に近い細胞外ループでは、約 70% がチロシンもしくはグリシンという特殊なアミノ酸構成をしている。おそらく、これが tight junction の特性と関係しているものと考えられる。しかし、occludin の遺伝子を欠損したノックアウトマウスが tight junction を形成しているのが確認され、occludin のみが tight junction を形成しているわけではないことが判明した。その後、分子量 23kDa の 4 回膜貫通型タンパク質が同定され、claudin(-1)が発見された。claudin は遺伝子ファミリーを形成しており、現在までに 20 種類の claudin が報告されている。さらに近年、JAM(junctional adhesion molecule)という免疫グロブリンスーパーファミリーに属するタンパク質が単離、同定された。このタンパク質は、隣の細胞の JAM との間で強く結合を形成している。

### 1-2-3. 細胞種による透過性の違い

#### 膜間電気抵抗値の原理

TER は細胞層を介して設置された電極間に交流矩形波を印加した時の電位測定により、オームの法則を用いて計算された値である。この際、電荷を運ぶ媒体は paracellular pathway(細胞間隙経路)に存在する電解質である。従って培地中の電解質中に最も多いナトリウムイオン、塩化物イオンの動き易さの指標と考えられ、流路長と流路面積の比と考えることができる。敷き詰められた細胞単層では paracellular 経路の長さ、つまり流路長は一定と仮定できることから、細胞種間の相対的評価を行う場合、流路の面積、即ち間隙部の状態を反映するものと考えられる。間隙の中は上記で述べた通り 4 つに大別される細胞間結合が存在するが、その中でも最も狭小なタイトジャンクションに代表される。従って、その狭い流路を構成する結合タンパクである Occludin や Claudin の密集性と結合性により TER 値は変化すると仮定している。

### 1-3. 生体膜の“Pore”の解析

#### 1-3-2. 膜の孔径と溶質半径

EUGENE M. RENKINらはセルロース膜の pore を介する分子の移動を計算により算出できる経験式を導いた<sup>(22)</sup>。膜のもつ極性など様々な問題も考えられるが、細胞層を均一の pore と仮定し pore 半径を求めるためにこの方法を適用することを考えた。ここでは拡散定数と物質移動係数から pore 半径を算出するための式の変形を記載する<sup>(20, 21)</sup>。

自由拡散における物質移動係数(P)は以下のように表せる。

$$P = \frac{D}{A} \frac{A_p}{l} \quad [\text{m/s}]$$

制限された拡散透過の場合は、pore の断面積( $A_p$ )が拡散に利用可能な pore 面積( $A'_p$ )になるため、その比率  $F(a/r)$  を用いて

$$P = \frac{D}{A} \frac{A_p}{l} F(a/r) \quad (A'_p/A_p) = F(a/r) \quad \text{---(1)}$$

と考えなければならない。

ここで、 $F(a/r)$  を得るための流れを説明する。

分子半径  $a$  の溶質が半径  $r$  の pore 内を通過するとき、有効断面積( $A_p$ )は

$$A_p' = A_p \left(1 - \frac{a}{r}\right)^2$$

として表せると、Ferry により提唱された。

次に分子と pore の壁との間の摩擦を補正するため、

Ladenburg により以下の経験式が導かれた。

$$\frac{A_p'}{A_p} = 1 - 2.104\left(\frac{a}{r}\right) + 2.09\left(\frac{a}{r}\right)^3 - 0.95\left(\frac{a}{r}\right)^5$$

以上より、全体としての拡散の制限は pore 入り口の立体障害と pore 内での摩擦抵抗の影響を重ね合わせて次のように表すことができる。

$$\frac{A_p'}{A_p} = \left(1 - \frac{a}{r}\right)^2 \left[1 - 2.104 \left(\frac{a}{r}\right) + 2.09 \left(\frac{a}{r}\right)^3 - 0.95 \left(\frac{a}{r}\right)^6\right]$$

しかし、(1)式で  $A_p/l$  は不明である。

実験に 2 種類以上の溶質を用いている場合は、その結果から式(1)を用いて以下のように変形させることができる。

$$\frac{P_{\text{man}}/D_{\text{man}}}{P_{\text{suc}}/D_{\text{suc}}} = \frac{A_p / Al \ F(a/r)_{\text{man}}}{A_p / Al \ F(a/r)_{\text{suc}}}$$

上記にすることで  $A_p/l$  を消去し、変数を  $r$  のみとして理論的な  $r$  を求めることができる。

P : 拡散透過性

D : 拡散係数

A : 膜面積

$A_p$  : poreの断面積

l : poreの長さ

$F(a/r)$  : 制限された拡散条件下での有効pore面積比

a : 分子半径

r : pore半径

### 1-3-2. “three pore model”

腹膜の物質輸送能の測定には腹膜透析後の透析廃液中(D)と血液中の溶質濃度(P)から  $D/P$  として算出する腹膜平衡試験(PET)が主に用いられている。

腹膜での物質(溶質)輸送を単純な半透膜を介する物質移動と考えた場合、物質移動面積係数  $KA$  [ml/min]を以下の式で計算できる。

$$KA = \frac{\bar{V}}{t_2 - t_1} \ln \left[ \frac{v_1(C_b - C_{d1})}{v_2(C_b - C_{d2})} \right] \quad [\text{ml} / \text{min}]$$

$V_1$  : 透析液体積

$V_2$  : 排液体積

$C_b$  : 血中溶質濃度

$C_{d1}$  : 透析液中溶質濃度

$C_{d2}$  : 排液中溶質濃度

排液中の溶質濃度の変化から算出した物質移動速度と、溶質の大きさと仮想的な膜孔をパラメータに計算機でカーブフィッティングすることにより、求めた物質移動



面積係数と溶質の分子量との関係をプロットしたものが次頁図 1-である。

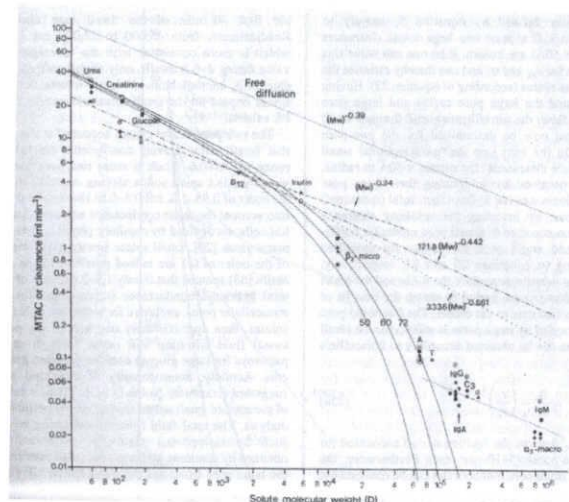


図 1-5 腹膜の物質移動面積係数と溶質の分子量

分子量  $10^4$  程度までは孔径 50-72 Å と仮定した場合のカーブに乗るが高分子量帯に予想を超える物質移動が確認された。Rippe らは、溶質は分子量により 2 つの異なる大きさの孔を介して透過が行われていると仮定し、two pore model によるデータ解析を行った<sup>(19)</sup>。それにより実際の溶質の透過に近い関係を得ることに成功した。さらに、小分子溶質における篩係数の理論値からのズレは水だけの透過経路を考慮することで都合よく補正できることからこれら 3 つの孔からなる“three pore model”を提唱した。(図 1-6、図 1-7)

small pore :

半径は 4.0~6.0 nm(40~60 Å)である。それは内皮細胞間の間隙といわれており、非常に多数存在し、多くの溶質、例えば尿素、クレアチニン、アルブミン、 $\text{Na}^+$ 、さらに  $\text{K}^+$ などの通路と考えられている。

large pore :

半径は 20~40 nm(200~400 Å)である。タンパク質のような高分子量物質は濃度勾配に従って、この孔を通じて移動する。

ultrasmall pore (transcellular pore) :

その半径は 0.5 nm 以下である。これは水分だけの通路であり、アクアポリン(aquaporin : AQP)に一致するものとして考えられている。アクアポリンは細胞膜上に存在するチャンネルであり、能動輸送により水が細胞層を通過する。



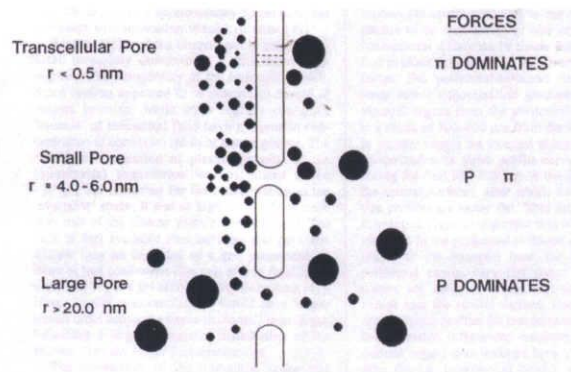


図 1-6 “three pore model”の模式図

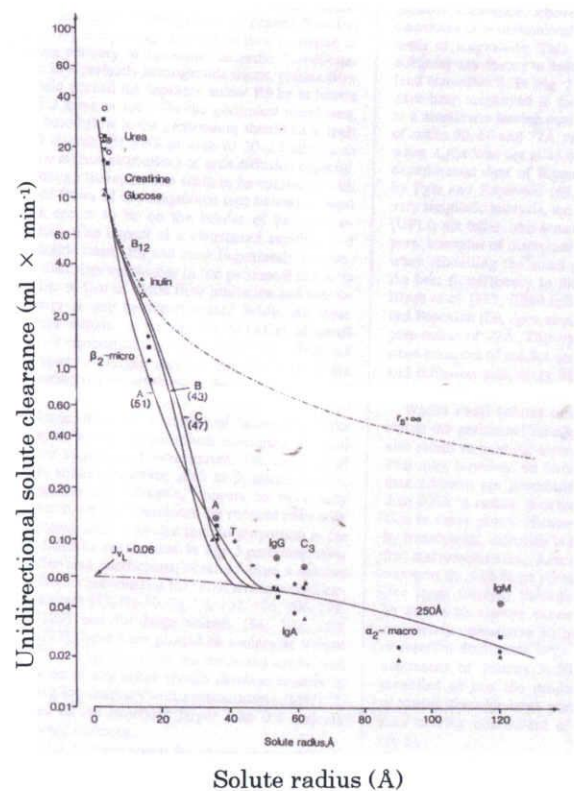


図 1-7 “three pore model”を用いたクリアランスと分子半径の関係を表した片対数グラフ

## 2.目的

本研究の目的はin vitro 血管内皮細胞単層モデルを作成し、その溶質透過性測定と細胞間結合タンパクの局在化を可視化し両者の関連を調べ、腹膜中皮細胞単層から得られた測定値(平成18年度修士論文)と比較し、腹膜における溶質透過においてどちらが律速であるか考察することである。

具体的には、

1. ヒト臍帯静脈血管内皮細胞の単層モデルを作成し、透過性を測定
2. ヒドロキシラジカル産生系による溶質透過性亢進機構を検証
3. 溶質透過性亢進のシグナル伝達経路の検証

4. 腸間膜を用いた間質層の透過性測定

を行うことで腹膜の溶質透過性を各層ごとに分離して捉え、透過性の律速部の探索、および透過性亢進機序の解明を目的とした。

### 3. 方法

#### 3-1. 腹膜透過モデル(血管内皮細胞層)の作成

##### 3-1-1. 臍帯静脈血管内皮細胞の培養と継代

実験で使用したヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)は臍帯静脈血管内皮細胞の cell line(CC-2517 Cryo HUVEC/三光純薬)を購入し、解凍、継代培養をして得た。納品後の凍結細胞懸濁液を解凍し 75cm<sup>2</sup> フラスコ 4 枚に播種、これらを Passage 1 とした。上記の 4 枚の内 3 枚は、細胞凍結保存液セルバンカー(日本全薬工業)、バンバンカー(日本ジェネティクス)を用いた凍結保存を行い、必要に応じて必要に応じて解凍、継代し実験に供した。培地は 10%FBS/EGM2:M199 (1:1)を用い、3 日に 1 度培地交換を行った。HUVEC は passages 3-6 を実験に用いた。また、実験に使用するサンプルは播種後、EGM2 のみで培養した。(付録 9-1,9-2 参照)

##### 3-1-2. Transwell®を用いた腹膜透過モデル(血管内皮細胞部)の作成

HUVEC の細胞懸濁液(細胞密度  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>)を、ポリエステルフィルター(孔径 0.4  $\mu$ m, 培養面積 1 cm<sup>2</sup>, Transwell, 12well-type, Costar, MA, USA)上に 50  $\mu$ l 播種し EGM-2 培地で培養した。apical 側には 0.5ml、basal 側には 1.5ml の培地を加え、3 日に 1 回培地交換を行った。膜間電気抵抗値(下記参照)を経日的に測定し、細胞間の結合状態の指標とした。通常、細胞間結合の発達とともに上昇し、プラトーに達するが、この状態のポリエステルフィルター上培養細胞を腹膜透過モデルとして実験に用いた。(付録 9-2 参照)

##### 3-1-3. 膜間電気抵抗値測定

膜間電気抵抗値(TER: Transmesothelial electrical resistance)は EVOM ボルトオームメーターと STX-2 電極(World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA)(表 3-1)を用いて測定した(図 3-1)。STX-2 電極は 2 本の電極で構成され、外側の電極は、微小銀電極、内側の電極は微小銀/塩化銀電極である。電圧検知用  $\pm 20 \mu$ A の交流矩形波電流を 1.25Hz の低周波で印加し、電圧を測定し、オームの法則  $R = E/I$  より抵抗値を算出し測定値とした。

測定に先立ち、STX-2 電極は 70%エタノールに 20 分浸漬し、殺菌処理をした。apical 側、basal 側の培地を 37℃に加温した新鮮な EGM2 培地に交換し、電解質組成の違いによる誤差を最小とした。測定値は、ポリエステルフィルターのみの抵抗値を blank として、実測値と blank 値の差とした。同時に位相差顕微鏡による観察も行い、TER との関係性を評価した。(付録 9-4 参照)

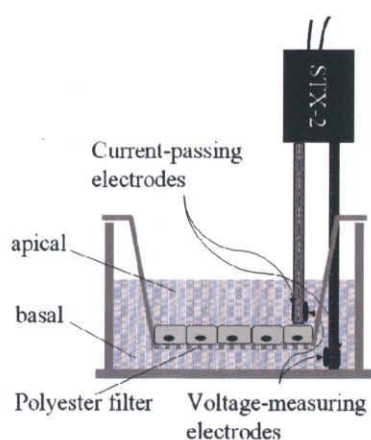


図 3-1 TER 測定装置

表 3-1 EVOM/STX-2 電極の概要

膜電圧範囲	$\pm 199.9\text{mV}$
抵抗範囲	$0\sim 1999\Omega$ , $0\sim 20\text{k}\Omega$ の 2 レンジ
交流矩形波電流	$\pm 20\mu\text{A}$ , $12.5\text{Hz}$
電極	銀/塩化銀電極 (電圧測定用) 銀電極 (電流通電用)

## 3-2. 血管内皮細胞層の透過性評価

### 3-2-1. 溶質透過試験

作成した腹膜モデルを用いて、Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識したデキストラン (分子量  $4\text{kDa}$ 、 $10\text{kDa}$ 、 $70\text{kDa}$ ) を分子量マーカーとして溶質透過試験 (SPT) を行った。Transwell® の apical 側に濃度  $50\mu\text{g/ml}$  で  $0.5\text{ml}$  充填し、basal 側には蛍光標識していないデキストランを同濃度で  $1.5\text{ml}$  充填し、溶質透過試験 (SPT) を行った。

basal 側に標識されていないデキストランを添加するのは浸透圧差による水移動を阻止し、蛍光標識したデキストランの拡散のみによる移動を測定するためである。2 時間後と 4 時間後に basal 側から  $10\mu\text{l}$  サンプルを採取し、apical 側から basal 側へ移動した蛍光デキストランの量を蛍光分光光度計 (F-2000, Hitachi, Tokyo, Japan) を用いて励起波長  $490\text{nm}$ 、蛍光波長  $520\text{nm}$  の条件で測定した。溶質透過性は、溶質透過係数として評価した。以下に算出式を示す。

basal 側の分子量マーカーの時間変化は、apical 側から basal 側への移動量に等しいので、次式が成立する。

$$\frac{dV_b C_b}{dt} = KA(C_a - C_b) \cdots \textcircled{1}$$

浸透圧較差による水移動が無視できるので  $\overline{V_b} = V =$  一定とみなせる。

$$\overline{V} \frac{dC_a}{dt} = KA(C_a - C_b) \cdots \textcircled{2}$$

$$\frac{1}{C_a - C_b} dC_a = \frac{KA}{\overline{V}} dt \cdots \textcircled{3}$$

$$\left[ \begin{array}{l} \text{ここで物質収支を考える。} \\ t=0 \text{ のとき } V_a \cdot C_{a0} \cdots \textcircled{4} \quad , \quad t=t \text{ のとき } V_a \cdot C_a + V_b \cdot C_b \cdots \textcircled{5} \\ \text{従って、} V_a \cdot C_{a0} = V_a \cdot C_a + V_b \cdot C_b \cdots \textcircled{6} \\ V_a = 0.5 \text{ ml, } V_b = 1.5 \text{ ml} \text{ であるから} \\ 0.5 \cdot C_{a0} = 0.5 \cdot C_a + 1.5 \cdot C_b \cdots \textcircled{7} \quad \therefore C_a = C_{a0} - 3C_b \cdots \textcircled{8} \end{array} \right]$$

$$\frac{1}{C_{a0} - 3C_b - C_b} dC_b = \frac{KA}{\overline{V}} dt \cdots \textcircled{9}$$

$$\frac{1}{C_{a0} - 4C_b} dC_b = \frac{KA}{\overline{V}} dt \cdots \textcircled{10}$$

時間  $t = 2$  と  $t = 4$  間で定積分する。

$$\int_{t=2}^{t=4} \frac{1}{C_{a0} - 4C_b} dC_b = \int_{t=2}^{t=4} \frac{KA}{\overline{V}} dt \cdots \textcircled{11}$$

$$[-4 \ln(C_{a0} - 4C_b)]_{t=2}^{t=4} = \frac{KA}{\overline{V}} [t]_{t=2}^{t=4} \cdots \textcircled{12}$$

$$4 \ln \frac{C_{a0} - 4C_{b4}}{C_{a0} - 4C_{b2}} = -\frac{KA}{\overline{V}} (t_4 - t_2) \cdots \textcircled{13}$$

よって

$$K = -\frac{4\overline{V}}{\Delta t \cdot A} \ln \left( \frac{C_{a0} - 4C_{b4}}{C_{a0} - 4C_{b2}} \right) \cdots \textcircled{14}$$

$K$	: 溶質透過係数(m/s)
$\overline{V}$	: basal side の体積(m <sup>3</sup> )
$A$	: 膜の面積(m <sup>2</sup> )
$t$	: 時間(s)
$C$	: 分子量マーカーの濃度
添字	$a$ : 頭頂側
	$b$ : 基底側
	$0$ : 初期値

溶質透過係数は  $t=t_2$  と  $t=t_4$  の 2 点での basal 側のマーカー濃度  $C_b=C_{b2}$ ,  $C_b=C_{b4}$ 、を測定することで算出した。(付録 9-6 参照)

### 3-2-2. 細胞間結合タンパクの同定

細胞間結合蛋白オクルディン、ZO-1 を免疫化学組織法にて染色し共焦点レーザー顕微鏡(FV1000, Olympus, Tokyo, Japan)を用いてその分布を観察した。8 穴チャンバー上に **confluent** 培養した HUVEC にアセトン/メタノール(1:1)を添加し-20℃/5 分間静置し固定した。ブロッキング液(ブロックエース、

大日本製薬)を加え 1 時間放置し、不特定部位への 1 次抗体の吸着を抑えた。一次抗体として rabbit anti-ZO-1 antibody/PBS (1:100)もしくは rabbit anti-occludin antibody/PBS (1:50) (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA)を 200  $\mu$ l/well 添加し 4℃で over night 静置した。十分に洗浄後、二次抗体には polyclonal swine anti-rabbit immunoglobulins labeled with FITC/PBS(1:50) (Dako, Glostrup, Denmark)を 200  $\mu$ l 添加し室温で 1 時間静置した。その後、十分に洗浄を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。(付録 9-7 参照)

### 3-3. 過酸化水素曝露による溶質透過性の変化

#### 3-3-1. 過酸化水素による HUVEC の細胞活性に与える影響

坂野真利君の実験結果(平成 18 年度三重大学大学院修士論文)から、過酸化水素と 2 価の鉄イオンを加えるとフェントン反応を起こしヒドロキシラジカルが産生すること、さらには細胞内でも添加した過酸化水素による活性酸素種(ROS)の産生が確認された。以上の結果に基づき、過酸化水素を酸化ストレスのモデルとして使用し、経細胞単層の溶質透過性に与える影響を評価した。

過酸化水素を用いた実験に先立ち、過酸化水素が HUVEC の活性へ与える影響を MTT 法を用いて評価した。96 穴プレートにて confluent に培養した HPMC に終濃度 0.05mM, 0.1mM, 0.5mM, 1mM, 10mM の過酸化水素を 30 分曝露した後、細胞活性を測定した。測定値はコントロール(EGM-2 培地のみ)に対する比として示した。(付録 9-3 参照)

#### 3-3-2. 膜間電気抵抗値測定(過酸化水素曝露時)

終濃度 0.1mM の過酸化水素を腹膜モデルに曝露し、TER の経時変化を測定した。培地は 37℃に保ち 30 分毎に 2 時間測定を行った。(付録 9-4 参照)

#### 3-3-3. 溶質透過試験(過酸化水素曝露時)

終濃度 0.1mM, 1mM の過酸化水素を 30 分腹膜モデルに曝露し、PBS で洗浄した後に蛍光デキストラン(4kDa, 10kDa, 70kDa)を Transwell®の apical 側に濃度 50  $\mu$ g/ml で 0.5ml 充填し、basal 側には蛍光標識していないデキストランを同濃度で 1.5ml 充填し、溶質透過試験(SPT)を行った。(付録 9-6 参照)

### 3-3-4. 細胞間結合タンパクの同定 (過酸化水素曝露時)

終濃度 0.1, 1mM の過酸化水素を 30 分曝露した後にオクルディン、ZO-1 を免疫組織化学法を用いて染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて可視化した。(付録 9-7 参照)

## 3-4. 溶質透過性亢進におけるシグナル伝達経路の検証

### 3-4-1. 膜間電気抵抗値測定(シグナル伝達経路阻害時)

シグナル伝達阻害剤による 30 分間の前処理後、終濃度 1mM の過酸化水素を曝露し、TER の経時変化を測定した。培地は 37℃に保ち 30 分毎に 2 時間測定を行った。阻害剤の濃度は過酸化水素を分解する酵素として catalase(500U/ml)、PKC を阻害する GF109203X(0.5μM)、MAPK を阻害する PD98059(10μM)、p38 を阻害する SB203580(10μM)で行った。(付録 9-4 参照)

### 3-4-2. 溶質透過試験(シグナル伝達経路阻害時)

シグナル伝達阻害剤による 30 分間の前処理後、終濃度 1mM の過酸化水素を 30 分曝露し、4kDa デキストランの溶質透過試験を行った。シグナル伝達阻害剤には、PKC 阻害剤として GF109203X(SIGMA)、MEK1/2 阻害剤として PD98059(SIGMA)を用い、過酸化水素を分解する酵素として catalase を用いて溶質透過試験を行った。阻害剤の曝露条件は catalase(500U/ml)、GF109203X(0.5μM)、PD98059(10μM)、SB203580 (10μM)とした。(付録 9-6 参照)

### 3-4-3. 細胞間結合タンパクの同定 (シグナル伝達物質阻害時)

シグナル伝達阻害剤使用時のオクルディン、ZO-1 蛋白の同定を行った。75cm<sup>2</sup> フラスコ上に confluent 培養した HUVEC に catalase(500U/ml)、GF109203X (0.5μM)、PD98059(10μM)、SB203580(10μM)を 30 分曝露し、過酸化水素(終濃度 0.1mM)を 30 分曝露した後、PBS で洗浄後、オクルディン、ZO-1 の免疫化学組織法による染色を行い観察した。(付録 9-7 参照)

## 3-5. 間質層の透過性評価

### 3-5-1. 間質層モデルの作成

ブタの腸間膜から1cm<sup>2</sup> 程度の脂肪が極力少ない面を取り去り、Transwell®を用いて作成した。脂肪面を Transwell®の Basal 側、膜面を Transwell®の Apical 側になるように膜を張り手術用縫合糸で縛り付け、PBS につけ保存した。(付録 9-8 参照)

### 3-5-2. 膜間電気抵抗値測定

作成したモデルの TER を測定した。培地は PBS から EGM-2 に交換し、37℃に保って行った。(付録 9-4 参照)

### 3-5-3. 溶質透過試験

Transwell<sup>®</sup>の apical 側に濃度 50  $\mu$ g/ml で 0.5ml 充填し、basal 側には蛍光標識していないデキストランを同濃度で 1.5ml 充填し、溶質透過試験(SPT)を行った。デキストラン溶液は EGM-2 を用いてそれぞれ作成した。(付録 9-6 参照)

### 3-5-4. 光学顕微鏡による観察

間質層モデルを 4%パラホルムアルデヒド/PBS に 24 時間浸透させた後、段階的にエタノール洗浄により脱水した。その後、キシレンで脱エタノールを行い、パラフィン包埋した。作成したサンプルから腸間膜断層切片を作成し、光学顕微鏡にて観察した。(付録 9-8 参照)

### 3-6. 透過型電子顕微鏡による HUVEC 単層、HPMC 単層の厚み測定

細胞層の厚みを測定するために、ポリエステル膜面上の単層臍帯静脈血管内皮細胞層(腹膜モデル)の断面を透過型電子顕微鏡により観察した。腹膜モデルを 2.5%グルタルアルデヒド(0.1M PBS 中)で 4 時間前固定した。その後、10%サッカロース溶液で 4 回洗浄し、2%オスミウム産(0.05M PBS 中)で 30 分後固定した。段階的なエタノール洗浄による脱水後、エポキシ樹脂にて置換した。1 日間室温で浸透させた後、2 日間 60℃に保ち固化させた。包埋後、試料を小片に切り分け、ダイヤモンドナイフで厚さ 80nm の電顕用切片を作成した。切片を 150 メッシュ(銅)に貼り付け、4%酢酸ウラニル染色液で 20 分、クエン酸鉛染色液で 2 分染色後、十分に洗浄して透過型電子顕微鏡で観察した。(付録 9-9 参照)

### 3-7. 統計処理

全ての測定値は“平均値±標準偏差”で示した。TER、MTT、SPT の統計処理は Student t test を行い、P 値 0.05 未満を有意差があったとした。



## 4. 結果

### 4-1. 腹膜透過モデル(血管内皮細胞層)の作成

#### 4-1-1. 膜間電気抵抗値測定

図 4-1 に HUVEC を Transwell に播種後の TER の経日変化を示した。培養日数と共に TER は上昇し、約  $23\text{ohms}\cdot\text{cm}^2$  で値は平衡に達した。抵抗値がプラトーとなった時点で、HUVEC が confluent になったものと判定した。後述する細胞間結合タンパクの局在化と位相差顕微鏡観察より、抵抗値が細胞間結合の指標となりうることを示された。本研究では細胞単層が confluent と確認でき TER が安定したものを腹膜透過モデルとし、以後の試験に用いた。

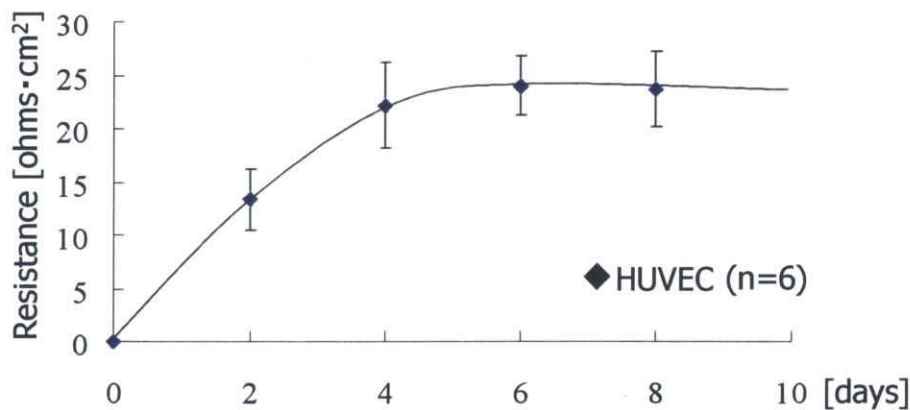


図4-1 膜間電気抵抗値測定

#### 4-1-2. 位相差顕微鏡による観察

播種直後と8日目の位相差顕微鏡像を示す。細胞は Transwell® 上で単層培養されて増殖し、抵抗値の安定化に伴い confluent が確認された。

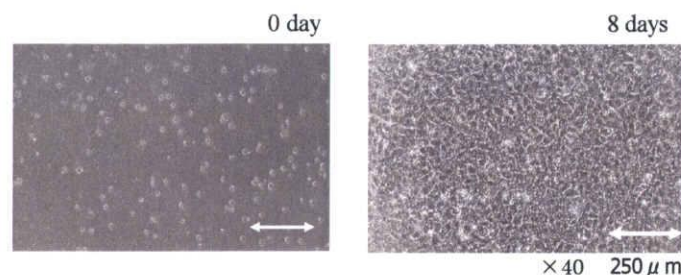


図 4-2 位相差顕微鏡による観察

## 4-2. 血管内皮細胞層の透過性評価

### 4-2-1. 溶質透過試験

図 4-2 に 4、10、70 kDa デキストランの溶質透過試験の結果を示す。ポリエステルフィルターのみの blank に比べ、HUVEC 単層モデルでは分子量依存的に溶質透過係数は減少した。

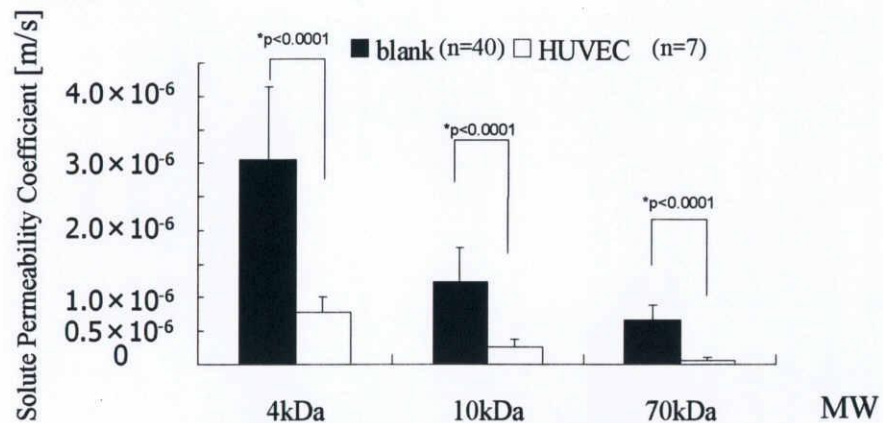


図4-3 デキストランの溶質透過係数

### 4-2-2. 細胞間結合タンパクの同定

図 4-4 に免疫染色したオクルディン、ZO-1 の共焦点レーザー顕微鏡画像を示した。A、B はそれぞれ HPMC でのオクルディン、ZO-1 の画像。C、D はそれぞれ HUVEC のオクルディン、ZO-1 の画像である。オクルディン、ZO-1 の細胞間隙部での局在化が見られた。

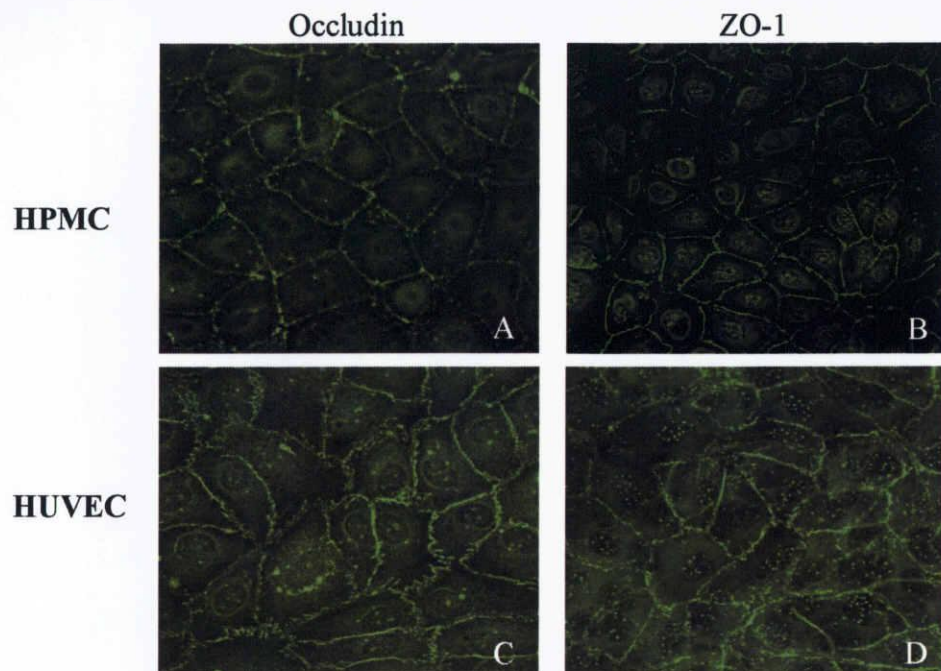


図4-4 細胞間結合タンパクの局在性

### 4-3. 過酸化水素曝露による溶質透過性の変化

#### 4-3-1. 過酸化水素による HUVEC の細胞活性に与える影響

図 4-5 に過酸化水素を 30 分曝露後の HUVEC の MTT 試験の結果を示した。HUVEC では、実験で用いた濃度範囲において有意な差は見られなかった。よってこの濃度範囲で下記実験に用いることとした。

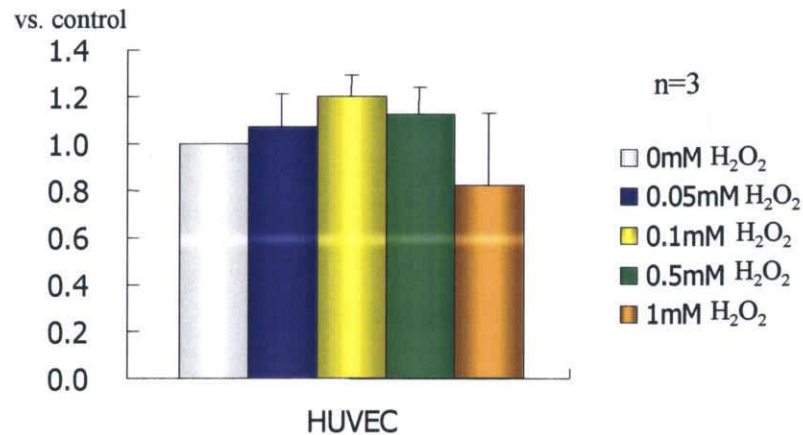


図4-5 過酸化水素曝露による細胞活性評価

#### 4-3-2. 膜間電気抵抗値測定(過酸化水素曝露時)

図 4-6 に過酸化水素を 2 時間曝露したときの TER の経時変化を示す。0.1mM の過酸化水素では TER の有意な減少は確認されなかったが、1mM の過酸化水素では時間経過とともに減少し、60 分以上で control に対し有意な差を示した。

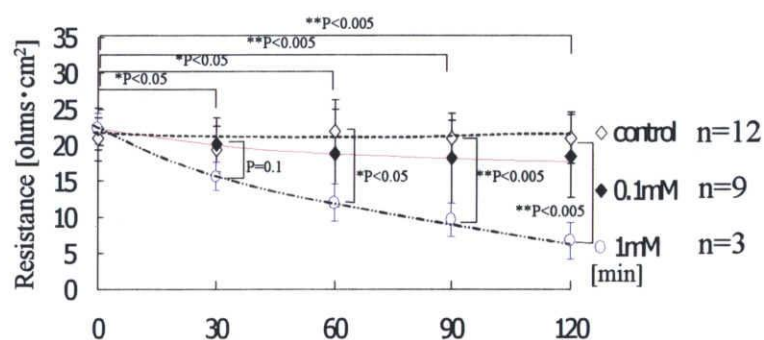


図4-6 過酸化水素曝露による膜間電気抵抗値の変化



#### 4-3-3. 溶質透過試験(過酸化水素曝露時)

図 4-7 に 0.1mM、1mM の過酸化水素 30 分曝露後の溶質透過係数を示す。デキストランの分子量として 4、10、70kDa のものを用いた。0.1mM 過酸化水素曝露ではどの分子量マーカーにおいても有意な差はみられなかったが、1mM 曝露においては 10kDa にて有意な上昇がみられた。

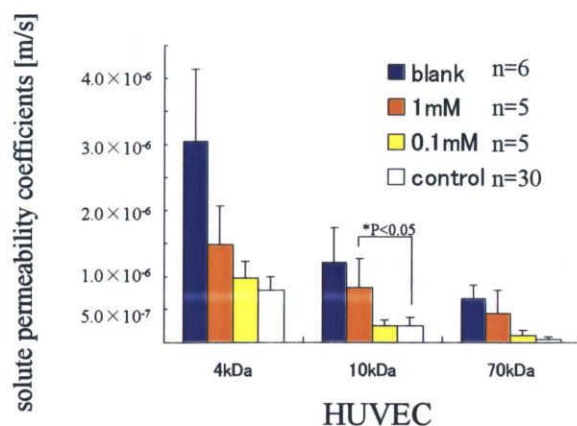


図4-7 過酸化水素曝露による溶質透過性の変化

#### 4-3-4. 細胞間結合タンパクの同定 (過酸化水素曝露時)

図 4-8 に 0.1 mM の過酸化水素を 30 min 曝露後の細胞間結合タンパク質を免疫染色した画像を示した。HUVEC では 0.1 mM 過酸化水素では違いが見られず、1 mM 濃度では occludin、ZO-1 共に細胞間隙部での部分的な非局在化が観察できた。

×80 (光学40倍、デジタル2倍)

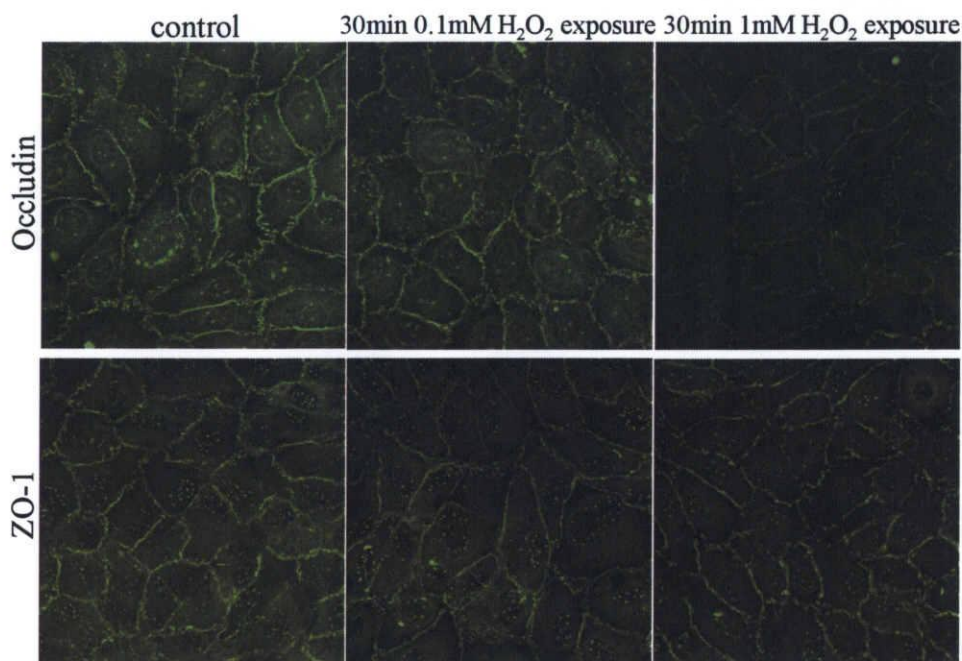


図 4-8 細胞間結合タンパク質に対する過酸化水素の影響

#### 4-4. 溶質透過性亢進におけるシグナル伝達経路の検証(現在実験中)

##### 4-4-1. 膜間電気抵抗値測定(シグナル伝達経路阻害時)

図 4-9 にシグナル伝達経路を遮断後の過酸化水素による膜間電気抵抗値の変化を示した。しかし、PKC、MEK1/2、p38 阻害剤を加えても透過性亢進を抑制することはできなかった。

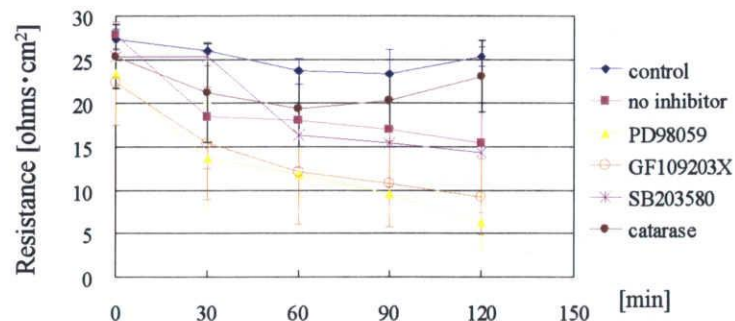


図4-9 過酸化水素誘導によるPKC、MEK1/2、p38阻害の膜間電気抵抗値への影響

##### 4-4-2. 溶質透過試験(シグナル伝達経路阻害時)

図 4-10 にシグナル伝達物質の阻害剤を用いた時の 4kDa-デキストランの溶質透過試験の結果を示した。過酸化水素を分解する酵素である catalase を加えた場合、透過性上昇が抑えられた。しかし、PKC、MEK1/2、p38 阻害剤を加えても透過性亢進を抑制することはできなかった。

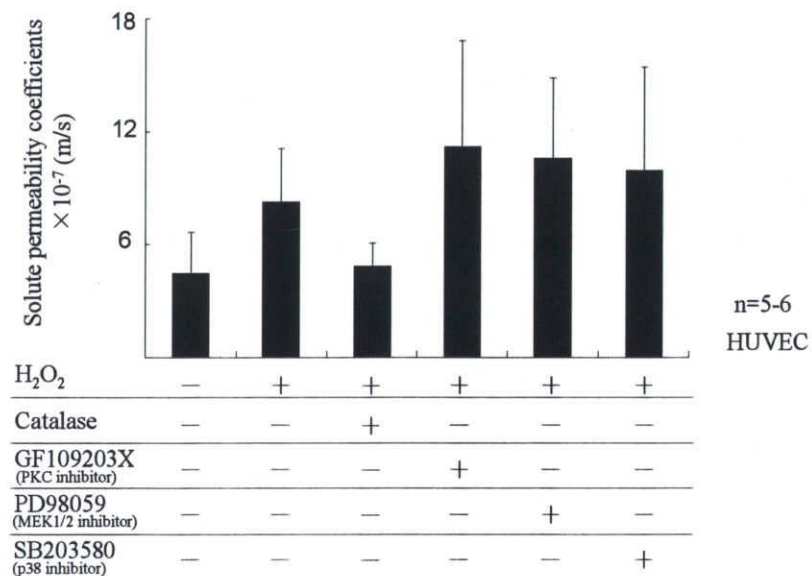


図 4-10 過酸化水素誘導による透過性亢進に対する PKC、MEK1/2、p38阻害の影響

## 4-5. 間質層の透過性評価

### 4-5-1. 間質層モデルの作成

右に作成した間質層モデルを表示した。



図 4-11 間質層モデル

### 4-5-2. 膜間電気抵抗値測定

間質層モデルの TER を測定した結果、腸間膜のみの well では  $119 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 、ポリエステル膜上に貼り付けたものでは  $209.6 \Omega \cdot \text{cm}^2$  となった。

### 4-5-3. 溶質透過試験

図 4-11 に間質層モデルの溶質透過試験の結果を HPMC、HUVEC での結果と併せて示した。間質層モデルの透過性は HUVEC の結果とほぼ同等の溶質透過係数を示した。

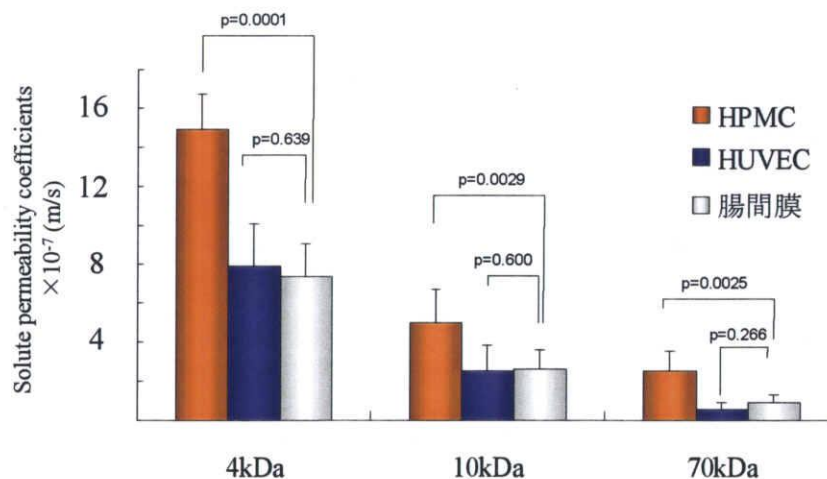


図4-12 間質層の溶質透過性



#### 4-5-4. 光学顕微鏡による観察

図 4-12 はパラフィン包埋した間質層モデルを光学顕微鏡を用いて観察した画像である。この画像からポリエステル膜の厚みとの比率により間質層モデルの厚みを測定した結果、腸間膜は  $30 \pm 6.0 \text{ } \mu\text{m}$  の厚みを持つことが確認できた。



図 4-13 光学顕微鏡による観察

#### 4-6. TEM による HUVEC 単層、HPMC 単層の厚み測定

Transwell® 上に培養した HUVEC の透過型電子顕微鏡による断面像を図 4-13 に示す。画像より細胞の厚みを測定し、既知のポリエステル膜の厚みにより標準化した結果、HUVEC 単層の厚みは  $2.21 \pm 0.47 \text{ } \mu\text{m}$  となった。

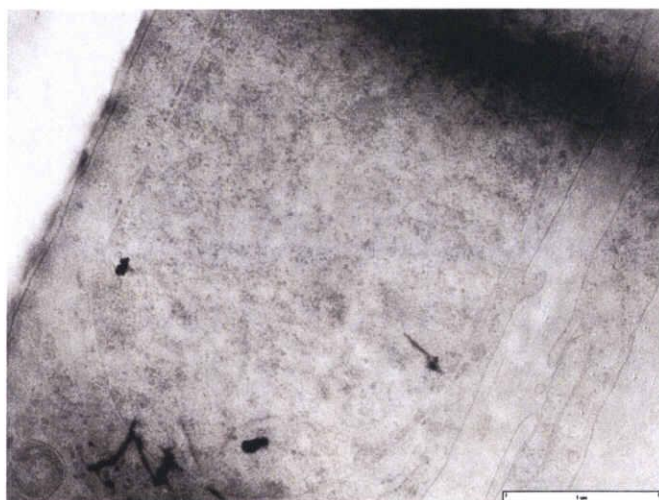


図 4-14 透過型電子顕微鏡による観察

## 5. 考察

### 5-1. 腹膜透過モデル(血管内皮細胞部)評価

細胞密度  $5 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup> で播種した場合は、培養 8 日目には confluent になることが位相差顕微鏡の観察により確認された。目視だけでなく細胞間結合度の測定として、腸管上皮細胞や血管内皮細胞で広く用いられている膜間電気抵抗値測定も併用した。TER は培養と共に上昇し、6 日目以降安定した値をとった。この状態は、confluent になり細胞間隙、厚みなどが安定した細胞層モデルであると評価した。また、この傾向は HPMC での実験結果とよく似ている。次より HPMC と HUVEC とを比較しながら実験結果を考察する。

### 5-2. HUVEC と HPMC の細胞単層の透過性

本実験で得られた TER の経日変化を腹膜中皮細胞の結果と併せて図 5-1 に示した。両者において TER は日数の経過と共に上昇し、HPMC は 3 日、HUVEC は 6 日目にプラトーに達している。HUVEC と HPMC では安定する値に違いが見られ、HPMC の方が約  $7 \Omega \cdot \text{cm}^2$  高い値を示すことが確認された。

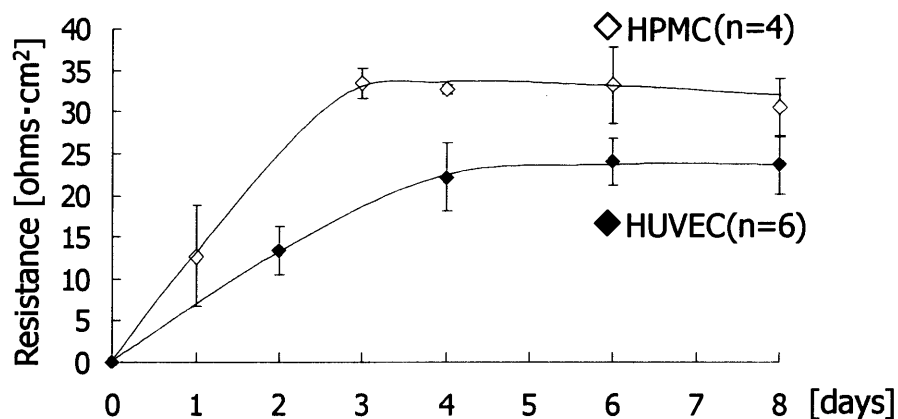


図5-1 膜間電気抵抗値測定

異なる細胞種の TER 値に関して既報の結果をまとめ次頁表 5-1 に記した。既報の雑誌では内皮細胞層の TER は  $10\text{--}15 \text{ ohms} \cdot \text{cm}^2$  と報告されており、本研究の結果と近い値となっている。内皮細胞層の TER 値は、中皮様細胞である ovarian surface epithelium と前回の研究で測定した HPMC の TER の両方と比較しても、低い値を示していることが読み取れる。つまり細胞種により差があるが、イオンの移動に関しては中皮細胞層がより大きな移動抵抗としての役割を持っているのではないかと示唆された。



表 5-1. 細胞種による膜間電気抵抗値の違い

Cell Type	Source	vivo/vitro	TER (ohms·cm <sup>2</sup> )	ref
Endo*	rabbit	in vivo	9.7	[8]
Endo*	bovine	in vitro	15	[9]
Endo*	rabbit	in vitro	14	[10]
Meso**	human	in vitro	40–60	[11]
Meso**	rat	in vitro	6	[12]
Epi***	human	in vitro	>1000	[13]
Meso**	human	in vitro	30	[1]
Endo**	human	in vitro	23	this study

\*Endo:Endothelial cell \*\*Meso:Mesothelial cell \*\*\*Epi: Epithelial cell

次に溶質透過試験による実験結果を HPMC での結果と併せて図 5-2 に示した。この測定は前研究者である金田の研究結果に基づき、デキストランが細胞単層の間隙を通過することを前提として行った<sup>(1, 24)</sup>。HPMC の 4 kDa、10 kDa、70 kDa のデキストランの物質移動係数[m/s]は HUVEC に比べ、4 kDa と 10 kDa で約 2 倍、70 kDa では約 5 倍高い値を示した。

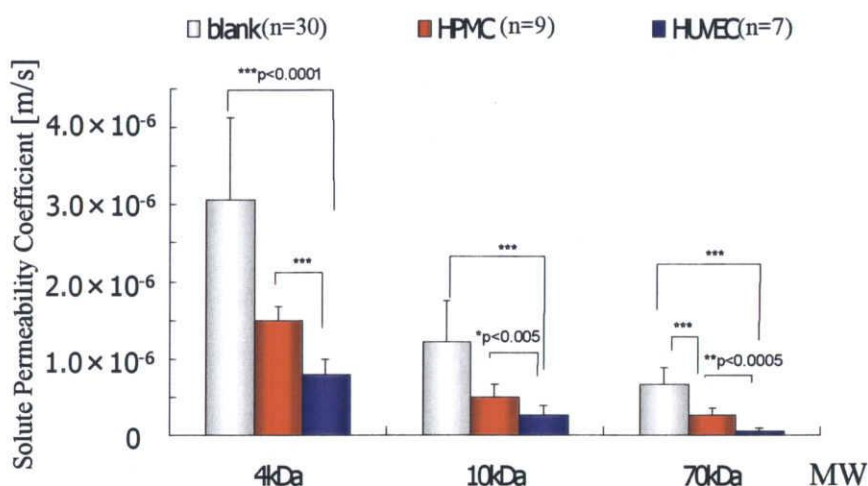


図5-2 デキストランの溶質透過係数

しかし、上記の値は細胞とポリエステル膜の両方を通過する溶質を見ているため、ポリエステル膜と細胞層の総括的な物質移動係数 ( $K_{\text{overall}}$ ) を表している。そこで抵抗の式より以下のようにして細胞単層のみの物質移動係数 ( $K_{\text{real}}$ ) を算出した。

$$\frac{1}{K_{\text{real}}} = \frac{1}{K_{\text{overall}}} - \frac{1}{K_{\text{polyester}}}$$

$K_{\text{real}}$  : cell monolayer  $K$  (m/s)  
 $K_{\text{polyester}}$  : polyester membrane  $K$  (m/s)

求めた結果を図 5-3 に示した。溶質の分子量 4kDa、10kDa、70kDa において、

HPMC での物質移動係数[m/s]はそれぞれ  $2.70 \times 10^{-6}$ 、 $8.28 \times 10^{-7}$ 、 $4.02 \times 10^{-7}$  であり、HUVEC では  $1.33 \times 10^{-6}$ 、 $3.33 \times 10^{-7}$ 、 $5.76 \times 10^{-8}$  となった。それぞれを HPMC / HUVEC で見てみると HPMC は HUVEC に比べ 4 kDa で約 2 倍、10 kDa では約 3 倍、70 kDa では約 8 倍の透過性を示した。

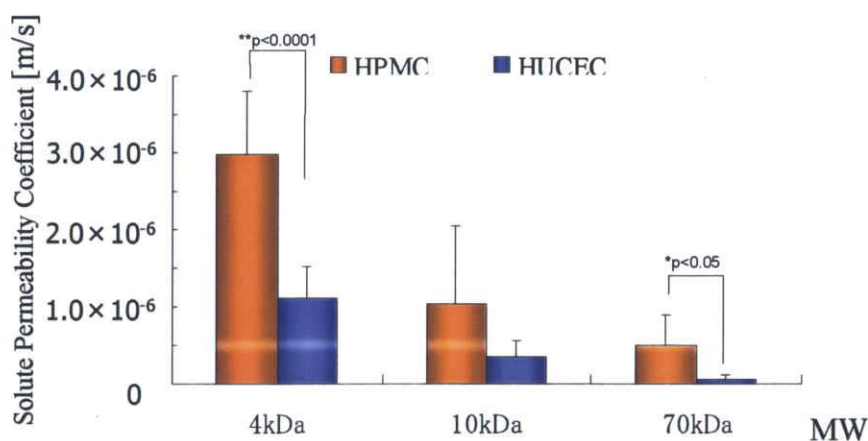


図5-3 デキストランの溶質透過係数

次にそれぞれの細胞単層の物質移動係数の数値を既報の結果との照合を行った。表 5-2 に報告されている物質移動係数をまとめた。

表 5-2 細胞単層の溶質透過係数

Cell Type	Source	Molecular Marker	Stokes Diameter(A)	Permeability $\times 10^{-8}$ (m/s)	ref
Endo	bovine	alb	70	4.5	[16]
Endo	bovine	alb	70	4.8–5.1	[17]
Endo	bovine	alb	70	5.6	[18]
		Dextran	120	3.9	[18]
<hr/>					
Meso	human	Dextran70	116	49	[1]
Endo	human	Dextran70	116	5.8	This study

実験で用いた 70 kDa デキストランの透過性は分子量約 66 kDa であるアルブミンに類似するものとして考えた。HUVEC での実験結果は既報の値に非常に近く、モデルの妥当性が認められた。よって本研究により同様のモデルを用いてデキストランの透過性を測定することで、HUVEC が透過の制御として大きな役割を担っていることが示された。

ここで、それぞれの細胞単層が実際どのくらいの孔径の孔によって透過が制限されているかを推定した。上式で用いた  $K_{real}$  を用いて、RENKIN 式から孔半径を算出した。4kDa と 10kDa のデキストランの物質移動係数を用いて算出した結果、HUVEC で 58 Å、HPMC では 69 Å という結果になった。この結果は Rippe らの提唱する three pore model における Small pore に近い値となり、この分子量帯は選択的に Small pore を通過していることが示唆された。また、10kDa と 70kDa のデータを用いて算出した場合では、HUVEC で 220 Å となった。three pore model の Large pore は 250 Å と報告されており、HUVEC から得られた 220 Å はこれに対応するものと考えられる。一方、HPMC の 10kDa と 70kDa デキストラン透過係数から得られた計算結果は不適当な数値であり考察することはできなかった。参考として 10kDa と 70kDa デキストラン透過係数から計算した場合の孔半径は 350 Å であり、培養中皮細胞の Large pore は 350 Å よりはるかに大きな値を持つことから、実際の腹膜の物質移動が内皮細胞層によって律速段階となっていることが示唆された。

また、これらの値には分子量依存性がみられたので、Granath の式を用いて計算したデキストランの分子半径と溶質透過係数の関係を対数表示で図 5-4 に示した。Rippe らの提唱により Large pore と small pore の 2 種類が存在するため 2 種類の直線が得られると考えられ、実際に HUVEC と HPMC でそれぞれ 2 本の直線が得られた。

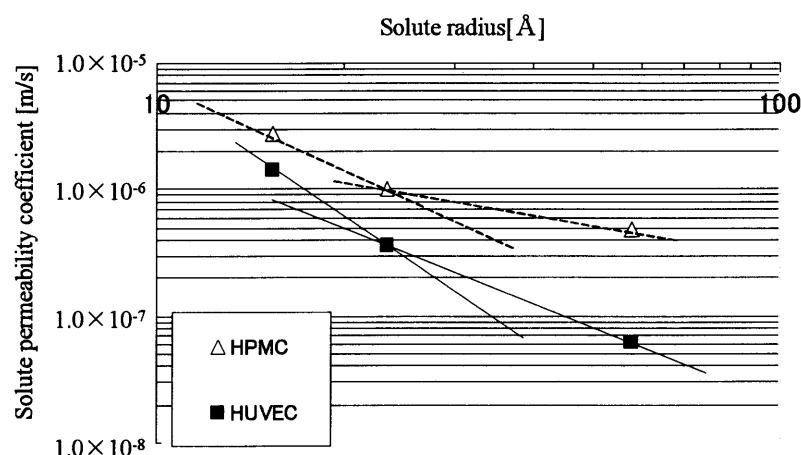


図 5-4 デキストランの分子半径と溶質透過係数

では一体 HUVEC と HPMC でデキストランの透過性の違いは何に起因しているのか、透過を抑制する原因について2つの仮説を立てた。一つに細胞間結合タンパクである Occludin や Claudin のタンパク量の違いではないかと考えた。細胞によりタイトジャンクションストランドの形成される数が異なり、多層に存在するものほど溶質透過の障壁部分が増え、透過が制限されるというものである。もう一つは細胞間結合タンパクの種類の違いである。1つの細胞に複数の Claudin が発現している場



合、それらはホモフィリック、またはヘテロフィリックに様々な組み合わせにより対をなし、タイトジャンクションを形成することが知られている。(図 5-4)発現する細胞間結合タンパクの種類、もしくはその組み合わせと溶質の透過性との間の関係も興味深い。本研究においても、細胞の持つ総タンパク量に対する細胞間結合タンパク量をウェスタンブロット法にて定量化する実験を進めていたが、信頼できる測定値を得るには至らなかった。今後、より細胞間の結合タンパクに焦点を当て細胞による透過性の違いがどのように関係しているかを明らかにしていくことは重要な課題である。

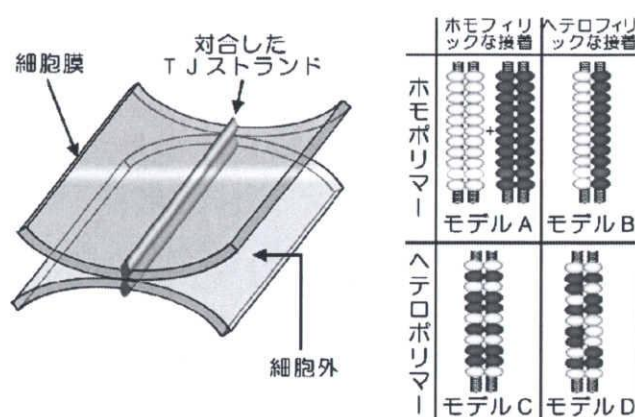


図 5-5 対合したタイトジャンクションストランドの分子構築モデル<sup>(26)</sup>

膜間電気抵抗値と溶質透過試験の実験結果は HPMC と HUVEC の各単層での透過性に対して、両層の溶質透過経路(孔径)の分布がイオンの移動(低分子領域)とデキストランの移動(中、高分子領域)で逆転していることを示している。Michael らは膜(人工)の孔径分布が通常正規分布座標上で直線関係があることを経験的に見出した。縦軸に阻止率、横軸に溶質の分子径をとり、得られた直線の 50%阻止を平均孔径、傾きを正規分布の幅を示すものである。本研究では溶質の阻止率を測定していないのでそのまま定量的な検討はできないが、デキストランの分子径を横軸に、透過係数を縦軸にとると図 5-6 のように小分子量の前で交差する膜孔分布をしているものと考えられる。この様な分布をしていれば、電気抵抗の測定で得られた結果とデキストランの透過実験で得られた結果を説明できると考えた。この関係が生体膜にも成り立つとすれば血管内皮細胞の形成する孔径分布幅が狭いという結論となる。ただし、この推論が成立するのは流路の長さが等しいという過程が必要であり、今後の検討を要する所である。

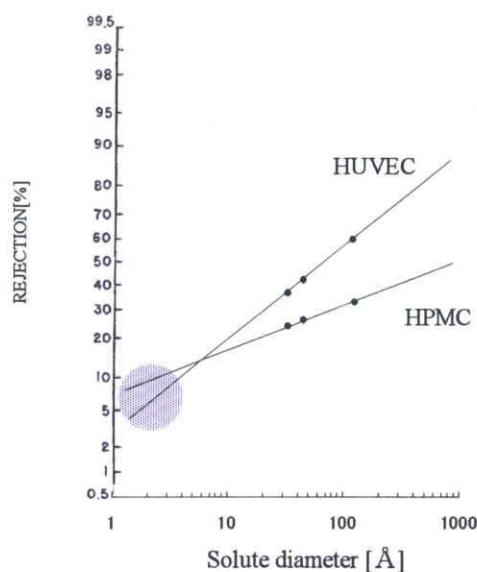


図 5-6 対数—正規分布

以上物理的な解釈であるが、生物的な説明も可能である。五十里は、MDCK 細胞にパラセリン-1(クローデイン 16)を発現させることで蛍光標識した高分子デキストランの透過性を変化させず、 $\text{Ca}^{2+}$ や  $\text{Mg}^{2+}$ などの 2 価カチオンの透過性を亢進できることが報告されている<sup>(25)</sup>。これらはタイトジャンクションの組成と選択的透過との関係を示唆していると考えられる。つまり細胞単層を半透膜とみなした場合、タイトジャンクションを構成するタンパクの組成が、Small pore、Large pore の孔の大きさや比率を決定する要因になりうるということである。また、膜間電気抵抗値測定と溶質透過試験の両者において、透過に関わる溶質の分子量が数十程度と 4000-70000 と大きな差があるため今後この間に当てはまるような溶質についての研究を行うことでこの問題を解決する糸口が生まれるのではないかと考えられる。今後ナトリウムイオンや塩化物イオンのような小さな溶質に対しても、溶質透過試験で比較できるような本モデルを用いた低分子量帯についての測定系を確立していくことが重要である。

#### 5-4. 過酸化水素曝露による溶質透過性

本研究では過酸化水素を酸化ストレスのモデルとして使用した。ROS は生体を与える影響の中に溶質透過性の亢進も報告されている<sup>0</sup>。過酸化水素から ROS が産生することも本研究室で確認している(坂野真利 平成 18 年度三重大学大学院修士論文)。以上より、過酸化水素由来の ROS を腹膜での透過性亢進に用いたことは妥当である。

HUVEC への 1mM 過酸化水素の曝露により、TER は減少し、デキストランの透過も亢進した。この TER の減少はヒト由来ではないがウシ血管内皮細胞を用いた Lee らの報告と一致する。また、昨年度の修士論文においても、0.1mM 過酸化水素により HPMC で TER の減少及びデキストランの透過の亢進を確認しており、過酸化水素が細胞単層の透過性を亢進させることが改めて示された。

図 5-5 に膜間電気抵抗値測定の本実験の結果と前年度の HPMC までの実験結果とを併せて記載した。HUVEC に 0.1 mM 過酸化水素を曝露した際、2 時間まで膜間電気抵抗値に有意な変化は見られず、HPMC での実験結果とは違いがみられた。

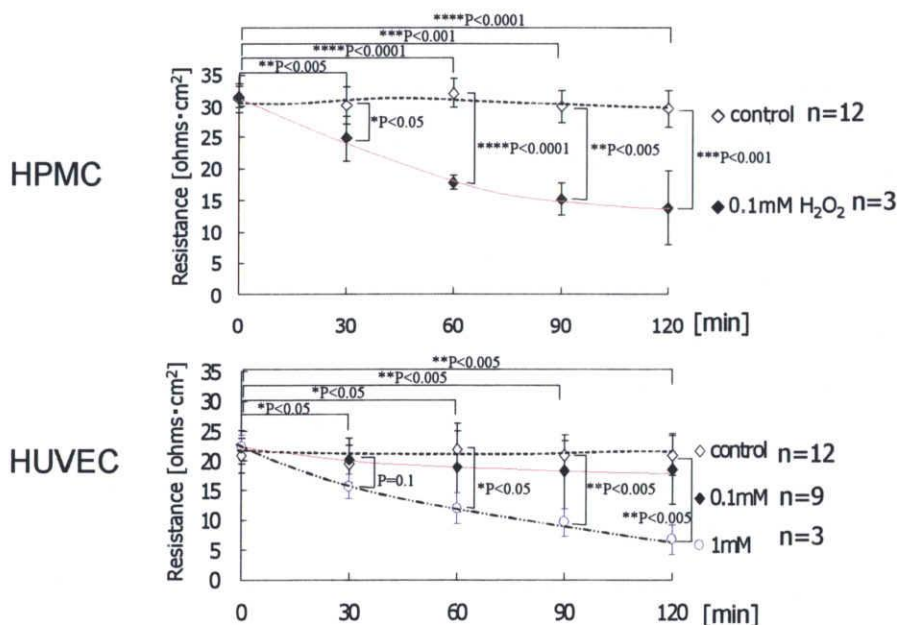


図 5-7 過酸化水素曝露による膜間電気抵抗値の変化



次にデキストランの透過について HUVEC と HPMC で比較した。こちらでも HPMC では 0.1mM の過酸化水素曝露により、10kDa デキストランで有意に透過性の亢進が確認されているのに対し、HUVEC では 1mM で 10kDa デキストランのみに有意な差がみられた。

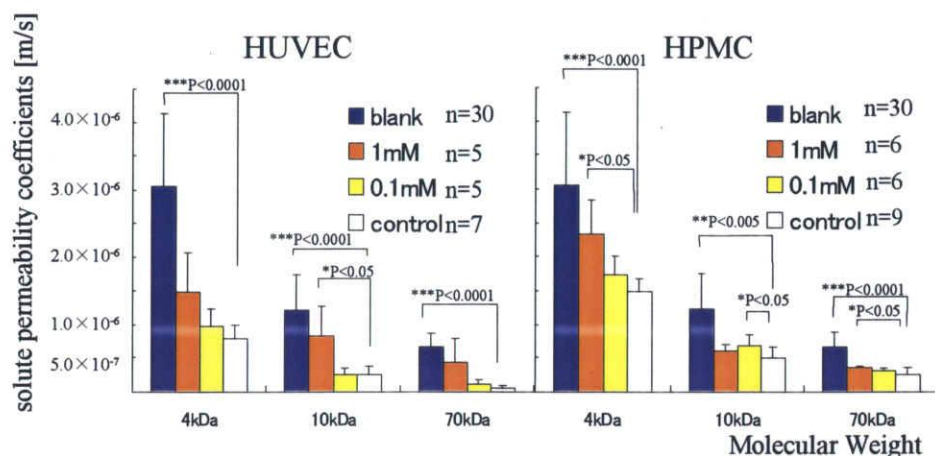


図 5-8 過酸化水素曝露による溶質透過性の変化

細胞間結合タンパクを観察すると、HPMC では 0.1mM 過酸化水素を 30 分曝露することで、細胞間隙部に局在していた Occludin の非局在化が確認されている一方、HUVEC では 0.1mM の過酸化水素曝露では Occludin、ZO-1 共に変化はなかったが、1mM で Occludin、ZO-1 の非局在化が確認された。

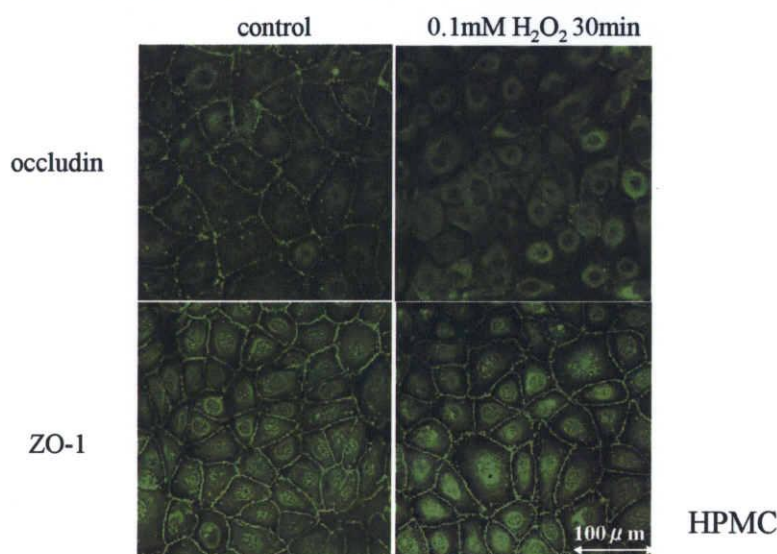


図 5-9 細胞間結合タンパクに対する過酸化水素の影響

以上のことから、細胞の透過性亢進に至る過酸化水素濃度は細胞種により異なることが示された。この原因について細胞が持つ抗酸化剤に注目した。細胞はスー



パーオキシドアニオンを分解する酵素として SOD を、過酸化水素を水と酸素に分解する酵素としてグルタチオンやカタラーゼ、ペルオキシダーゼなどをはじめ、多くの抗酸化物質を有している。本研究でも阻害剤を用いた実験でカタラーゼの前処理によって、HUVEC で 1 mM 過酸化水素の曝露によるデキストランの透過性亢進が完全に抑えられた。HPMC に比べ HUVEC が過酸化水素に対して耐性が強かった背景として、それぞれの細胞が持つ抗酸化作用の総量に違いがあるためではないかと考えている。そこで現在、それぞれの細胞が持つ抗酸化物質の量について測定を進めている。

### 5-5. シグナル伝達経路(中皮細胞と内皮細胞)

現在までに様々な細胞について、細胞間結合タンパクによる透過性制御の機構解明が手掛けられている。本研究により過酸化水素曝露による TER の減少及び溶質透過性の亢進が確認されたが、本研究室でも膜間電気抵抗値測定において、VEGF による HUVEC の TER の減少を確認している(川村泰弘 平成 18 年度三重大学卒業論文)。

Kevil らは HUVEC を用いた実験から、過酸化水素による溶質透過性の亢進が ERK1/ERK2 のリン酸化を経由することを MAP、ERK1 の阻害剤である PD98059 を用いることで検証している<sup>(14)</sup>。また前回の HPMC を用いた研究により、我々は中皮細胞においては PKC が透過性亢進の主要な経路になることを示した。しかし HUVEC を用いた本研究では、過酸化水素の消去作用を持つ酵素であるカタラーゼにより透過性の亢進はコントロールまで抑制されたが、ERK1/ERK2 阻害剤、PKC 阻害剤、p38 阻害剤のそれぞれに過酸化水素誘導の透過性亢進を抑制する働きは確認できなかった。

平成十八年度

培養細胞を用いた腹膜透過モデルによる溶質透過機構の解明

中野 雄介

平成 18 年度 修士論文

培養細胞を用いた腹膜透過モデルによる  
溶質透過機構の解明

三重大学大学院工学研究科 博士前期課程  
分子素材工学専攻

中野 雄介

## 6. 総括

- ・ ヒト臍帯静脈血管内皮細胞を Transwell® 上に播種することにより、血管内皮細胞部の腹膜モデルの作成に成功した。
- ・ 腹膜中皮細胞と臍帯静脈血管内皮細胞の実験結果を比較することで、腹膜において HUVEC が最も物質透過の障壁となりうることが示唆された。
- ・ 過酸化水素曝露時には腹膜モデルの溶質透過性は亢進し、細胞間結合タンパクである Occludin と ZO-1 の間隙部での非局在化が認められた。

以上のことから、溶質の透過性亢進にはタイトジャンクションのオクルディンや ZO-1 の非局在化により引き起こされるものと示唆された。今後は血管内皮細胞部での細胞間結合タンパクについて、種類や総タンパク量、外部刺激によるそれらの変化に着目することでより詳細に腹膜を介する物質透過を理解できると考えられる。

・

## 7. 参考文献

- 1) 金田健一:細胞間結合蛋白オクルディン、zonula occludens-1(ZO-1)の培養腹膜中皮細胞における局在化と溶質透過性の関係, 平成17年度修士論文 2006
- 2) 山口照由:単層培養腹膜中皮細胞を介する溶質透過機構の研究. 三重大学工学部分子素材工学科, 平成16年度卒業論文 2005
- 3) 西村康平、宮本啓一、堀内孝:培養細胞を用いた腹膜透過モデルによる溶質透過機構の解明(Ⅰ)腹膜中皮細胞 vs 臍帯静脈血管内皮細胞 第12回日本腹膜透析研究会 2006:p121
- 4) 中野雄介、宮本啓一、堀内孝:培養細胞を用いた腹膜透過モデルによる溶質透過機構の解明(Ⅱ)酸化ストレスの溶質透過性への影響 第12回日本腹膜透析研究会 2006:p120
- 5) Ram Gokal and Karl D. Nolph: The Textbook of Peritoneal Dialysis. Kluwer Academic Publishers: Netherlands, 1994
- 6) RENKIN E.M. , et al:Capillary transport of macromolecules: pores and other endothelial pathways. J. appl. Physiol. 1985; 58(2): 315-325
- 7) RENKIN E.M. , et al:Capillary transport of macromolecules: pores and other endothelial pathways. J GEN Physiol. 1954; 38: 225-243
- 8) O'Donnell MP, Vargas FF: Electrical conductivity and its use in estimating an equivalent pore size for arterial endothelium. Am J Physiol 1986; 19: H16-H21
- 9) Terito M, Berliner JA, Fogelman AM: Effect of monocyte migration on low density lipoprotein transport across aortic endothelial cell monolayers. J Clin Invest 1984; 74: 2279-2284
- 10) Navab M, Hough GP, Berliner JA, et al: Rabbit beta-migrating very low density lipoprotein increase endothelial macromolecular transport without altering electrical resistance. J Clin Invest 1986; 78: 389-397
- 11) Zhu Y, Maric J, Nilsson M, et al: Formation and barrier function of tight junctions in human ovarian surface epithelium. Biol Rep 2004; 71: 53-59
- 12) Tobioka H, Sawada N, Zhong Y, et al: Enhanced paracellular barrier function of rat mesothelial cells partially protects against cancer cell penetration. Br J Cancer 1996; 74(3): 439-445
- 13) Youakim A, Ahdieh M: Interferon- $\gamma$  decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disruption apical actin. Am J Physiol (Gastrointest.Liver Physiol.39) 1999; 276: G1279-G1288
- 14) Christopher G Kevil, Tadayuki Oshima, Brett Alexander, Laura L. Coe, J. Steven Alexander, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated permeability: role of MAPK and occludin 2000; 279: C21-C30
- 15) Frank W, et al: Influence of Protein Kinase C on Transcription of the Tight junction Elements ZO-1 and Occludin. J cell physiol 2005, 204 83-86

- 16) Sill HW, Butler C, Hollis TM, et al: Albumin permeability and electrical resistance as means of assessing endothelial monolayer integrity in vitro. *J Tissue Cell Methods* 1992; 14: 253-258
- 17) Jo H, Dull RO, Hollis TM, et al: Endothelial albumin permeability is shear-dependent, time-dependent and reversible. *Am J Physiol* 1991; 260: H1991-H1996
- 18) Albelda SM, Sampson OM, Haselton FR, et al: Permeability characteristics of cultured endothelial cell monolayers. *J Appl Physiol* 1988; 64:308-322
- 19) Rippe B, Stelin G: Simulation of peritoneal solute transport during CAPD. Application of two-pore formalism. *Kidney Int.* 1989; 35:1234-44
- 20) Emilio Afostoni, Francesca Bodega, Luciano Zocchi, Equivalent radius of paracellular “pores” of the mesothelium 1999; 87(2): 538-544,
- 21) Francesca Bodega, Luciano Zocchi, Emilio Agostoni: Macromolecule transfer through mesothelium and connective tissue, *J Appl Physiol*, 2000; 89: 2165-2173
- 22) Renkin E. M: Filtration, diffusion, and molecular sieving through porous cellulose membranes. *J Gen Physiol* 1954; 38(2): 225-243
- 23) KATHRYN H, JACK GAULDIE, et al: TGF- $\beta$  effects on epithelial ion transport and barrier: reduced Cl<sup>-</sup> secretion blocked by ap38 MAPK inhibitor. *Am J Physiol* 2002; 283: C1667-C1674
- 24) Emmeline Martin, J. Coos Verhoef, Christopher, Stefan G Romeijn, J. Fred Nagelkerke, Frans W. H. M. Merkus: Confocal Laser Scanning Microscopic Visualization of the Transport of Dextran After Nasal Administration to Rats: Effect of Absorption Enhancers, *pharmaceutical Research* 1997; 14(5): 631-637
- 25) 五十里彰、松本里美: 上皮膜間マグネシウム輸送に対するパラセリン-1 の脱リン酸化の影響 第125回日本薬学会 2005 29-0581
- 26) <http://cell.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/new-pub/Claudin-1new.html#Anchor573779>
- 27) Tsukita S, Furuse M: Pores in the Wall: Claudins Constitute Tight Junction Strands Containing Aqueous Pores, *J cell biol* 2000, 149-1, 13-16
- 28) Takashi Horiuchi, Ken-ichi Kaneda, Shinsuke Nomura, Keiichi Miyamoto: Intercellular localization of occludins and ZO-1 (tight junction) as a solute transport barrier of the mesothelial monolayer. 8<sup>th</sup> Japanese-Polish Seminar on New Engineering Methods Supporting Human Life 2005: 43

## 8. 謝辞

本修士論文の作成、並びに研究全般において懇切丁寧なご指導及びたくさん  
の貴重なご助言を賜りました三重大学工学部 堀内 孝 教授、宮本 啓一 助教授  
に対し、心から感謝いたします。また、透過型電子顕微鏡を使用するにあたり大変  
お世話になりました三重大学生命科学支援センター電子顕微鏡施設 小川 寛 先  
生に対し深く感謝いたします。

本研究に際し、共に実験を行った高木 雅士君、川村 泰弘君、津留 慎吾君、  
研究室での生活において様々な形でお世話になりました奥田 和子さん、村上 節  
子さんをはじめ生体材料化学研究室の皆様方に深く感謝いたします。

平成 19 年 2 月

中野 雄介

## 9. 付録

9-1. 培地、試薬の調整.....	40
9-2. 細胞培養.....	43
9-3. MTT 法.....	47
9-4. 膜間電気抵抗値測定.....	49
9-5. デキストラン透過経路の推定.....	52
9-6. 溶質透過試験.....	54
9-7. 免疫化学染色法.....	59
9-8. 間質層モデルの作成.....	62
9-9. 細胞層の厚み測定.....	63



## 9. 付録

### 9-1. 培地、試薬の調整

#### [試薬・器具・機器]

- |   |                       |
|---|-----------------------|
| • Medium199(M199)                       | (M-2154/SIGMA)        |
| • Insulin Transferin Selenate(ITS)      | (I-3146/SIGMA)        |
| • L-Glutamine(L-G)                      | (G-7513/SIGMA)        |
| • Penicillin-Streptomycin Solution(P-S) | (P-0781/SIGMA)        |
| • Hydrocortisone(HC)                    | (H-0888/SIGMA)        |
| • hydrochloric acid(1N-HCl)             | (080-08065/Wako)      |
| • sodium hydroxide(2N-NaOH)             | (196-05635/Wako)      |
| • ブレットキット EGM-2(EGM-2)                  | (CC-3162/三光純薬)        |
| • Fetal bovine serum(FBS)               | (EQUITCH-BIO)         |
| • Trypsin-EDTA solution (10x)           | (T-4174/SIGMA)        |
| • 各種アシストチューブ                            | (アシスト)                |
| • 各種シリンジ                                | (テルモ)                 |
| • pH メーター                               | (D52~55/HORIBA)       |
| • 孔径 0.22 $\mu$ m フィルター(Millex-GV)      | (SLGV025LS/MILLIPORE) |
| • Stericup フィルターユニット                    | (SCGVU05RE/MILLIPORE) |

#### [培地の調整]

##### M199 培地

##### サプリメントの調製と保存方法

- ITS  
ITS (液体) を 1.5ml アシストチューブに 500 $\mu$ l ずつ分注し、冷蔵庫にて 4℃で保存した。
- L-G  
15 ml 遠沈管に 5 ml ずつ分注し、冷蔵庫にて 4℃で保存した。
- P-S  
5 ml アシストチューブに 5 ml ずつ分注し、冷凍庫にて -20℃で保存した。
- HC  
HC 4 mg を 2 ml の無水 ethanol で溶解し、DEPC 処理水 2 ml を加えて濾過した。

0.5 ml アシストチューブに 200  $\mu$ l ずつ分注し、室温で保存した。

#### [操作]

- ① P-S は 37°C の温水に浸し、解凍した。
- ② 500ml の M199 培地に対して L-G、P-S は 5 ml、ITS、HC は 50  $\mu$ l を添加量とした。
- ③ マイクロピペットで採集したサプリメントをシリンジで吸引し、0.22  $\mu$ m フィルター滅菌を行い、M199 培地に添加した。泡立たないように混ぜた。
- ④ 培地の容器に開封及び添加した日付を書き、冷蔵庫で保存した。

※この方法で作成した培地を M199 とし、各実験に用いた。

#### 培地の pH の調整

培地は 1N-HCl や 2N-NaOH を使用して pH7.2 に調整した。pH メーターは 2 点補正 (pH7, 9) をして測定を行った。pH の調整後の培地は 0.22 $\mu$ m フィルター滅菌を行った。

#### EGM-2 培地

##### サプリメントの種類と保存方法

・ EBM-2 (血管内皮細胞用基礎培地)	冷蔵保存
・ VEGF	添加因子 冷凍保存(−20°C)
・ hEGF	
・ FBS	
・ GA-1000	
・ ハイドロコーチゾン	
・ ヘパリン	
・ hFGF-B(W/ヘパリン)	
・ R3-IGF-1	
・ アスコルビン酸	

#### [操作]

- ① 添加因子セットの各バイアルの底から 3/4 を限度に 37°C の温水に浸し、解凍した。
- ② 解凍した添加因子の各バイアルと EBM-2 の容器を 70%エタノールで拭き滅菌した。
- ③ マイクロピペットで基礎培地に添加因子の全量を無菌的に加えた後、基礎培地でバイアルを共洗いし更に加えた。

④ 基礎培地の容器に開封及び添加した日付を書き、冷蔵庫で保存した。

※この方法で作成した培地を EGM-2 とし、各実験に用いた。

#### [各溶液の調製]

FBS（牛胎児血清）の不活性化、分注、保存

##### [操作]

- ・ 37℃の温水で解凍した後、数回振り、55～56℃の温水で、時折振り混ぜながら 30 分間加温した（不活性化）。
- ・ Stericup フィルターユニットでフィルター滅菌を行い、30 ml アシストチューブに 25 ml ずつ分注した。作業はクリーンベンチ内、滅菌状態で行った。
- ・ 分注後の溶液は冷凍庫（－20℃）で保存した。

Trypsin-EDTA solution (10x)

##### [操作]

- ・ 37℃の温水で解凍した後、5 ml アシストチューブに 4 ml ずつ分注し、冷凍庫(－20℃)で保存した。

## 9-2. 細胞培養

### [試薬・器具・機器]

- ・ Phosphate Buffered Saline (PBS) (D-8537/SIGMA)
- ・ セルバンカー (日本全薬工業)
- ・ バンバンカー (日本ジェネティクス)
- ・ 75cm<sup>2</sup> 培養フラスコ (MS-21250/住友ベークライト)
- ・ φ35 シャーレ、各種プレート (住友ベークライト)
- ・ Chamber slide 8 chamber(8 穴チャンバー) (117745/Nunc)
- ・ 12wells Transwell (3460/Costar)
- ・ 各種遠沈管 (住友ベークライト,Nunc)
- ・ エルマ血球計算盤 (Erma)
- ・ CO<sub>2</sub> インキュベーター (池本理化工業)
- ・ 遠心機 (2010/KUBOTA)
- ・ ボルテックス (S-100/TAITEC)
- ・ 恒温槽 (BT - 15/Yamato)

### [細胞の購入と培地の選択] ーヒト臍帯静脈血管内皮細胞ー

実験で使用したヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) は臍帯静脈血管内皮細胞の cell line (Cryo HUVEC/三光純薬) を購入した。冷凍状態で送られてきた細胞は解凍して、培養を行った。sub-confluent (約 80%) に増殖した時点を継代時期とし、トリプシン処理にて HUVEC を剥離させ、細胞懸濁液 (細胞密度  $5 \times 10^5$  cells/ml) を作成し継代培養を行った。細胞の解凍や細胞の増殖培養を目的とする場合、培地は EGM2:M199 (1:1) +10%FBS を用い、3 日に 1 度培地交換を行った。実験に使用する EGM2:M199 (1:1) +10%FBS を用いたシャーレ、プレートの細胞は、sub-confluent (約 80%) になった際に状態をそろえるため EGM-2 培地に交換した。トランスウェル、8 穴チャンバーで培養する場合、培地は EGM-2 を用いた。HUVEC は passages 3-6 を実験に用いた。また、実験の速度に合わせて凍結液セルバンカー、バンバンカーを用いた凍結保存を行った。

### [継代培養] ーヒト臍帯静脈血管内皮細胞ー

#### [操作]

#### I プレインキュベート

目的の培養フラスコ、シャーレ、プレートに選択した培地を入れ、37℃、5%CO<sub>2</sub> イ

ンキュベート内にブレインキュベートした。

## II 細胞の洗浄

- ① 培養フラスコの蓋を開け、口元を加熱殺菌した。
- ② 滅菌済みパスツールで培養フラスコ内の培養液を吸引した。
- ③ PBS 溶液 10ml/75 cm<sup>2</sup> フラスコを添加し、前後左右に振り洗浄した。
- ④ 滅菌済みパスツールで培養フラスコ内の洗浄液(PBS)を吸引した。

## III 培養細胞の剥離方法

- ① 融解した Trypsin-EDTA solution 1ml に PBS 9ml を加え、ボルテックスをかけた（以下トリプシン溶液とした）。
- ② トリプシン溶液 10ml を 75 cm<sup>2</sup> フラスコに加え、約 30 秒後、ゴムシートの上で 10 回を 2 セット叩いて細胞を剥離させた。
- ③ 顕微鏡で細胞の剥離を確認後、FBS 2ml を 75 cm<sup>2</sup> フラスコに加えた。
- ④ 滅菌済み 10ml ピペットで培養フラスコ内の細胞懸濁液を吸引し、15ml 遠心管に入れた。
- ⑤ 50G (800rpm5 分間原則 4℃) 遠心分離した。
- ⑥ 遠心分離した上澄み液を 10ml ピペットで吸引し、細胞に培養培地を 3ml 加えて細胞懸濁液を作成した。
- ⑦ 10 回ピペッティングを行った後、細胞懸濁液(濃度  $5 \times 10^5$  cells/ml)を取り、あらかじめ用意しておいた培養フラスコに適量播種し、37℃、CO<sub>2</sub> インキュベート内で培養した。

※細胞懸濁液濃度は血球計算版にカバーガラスをのせ、その隙間に培養フラスコに播種する直前の細胞懸濁液 3  $\mu$ l を注入して、顕微鏡で細胞数を測定し算出した。1mm<sup>2</sup> の面積の細胞を数えて、液の厚みを 0.1mm としたときの細胞懸濁液濃度は 細胞測定数  $\times 10^4$  cells/ml とした。

## [培地交換と培地・懸濁液量]

### 培地交換

#### [操作]

- ① あらかじめ交換する培養培地を 37℃の温水で温めたものを使用した。
- ② 滅菌済みパスツールで細胞培養培地を吸引した。
- ③ 細胞培養に使用する各容器に対してそれぞれ適量の培養培地を加えた。

容器	培地量	懸濁液播種量
φ35 シャーレ	2ml	0.2ml
75cm <sup>2</sup> フラスコ	15ml	1ml
6 穴プレート(1 穴)	2ml	0.2ml
96 穴プレート(1 穴)	100μl	10 μ l
8 穴チャンバー(1 穴)	300μl	50 μ l
12wells Transwell <sup>®</sup>	0.5ml(apical)-1.5ml(basal)	50 μ l(apical)

培地量と細胞懸濁液(濃度  $5 \times 10^5$  cells/ml)播種量

表 9-1 各容器に対する培地量と懸濁液播種量

#### [細胞の凍結]

臍帯静脈血管内皮細胞の凍結はセルバンカー、バンバンカーの凍結液を用いた。

#### [操作]

- ① 継代培養の手順に従い、プレインキュベートを除く、Ⅲ 培養細胞の剥離方法の□まで行った。
- ② 上澄み液を除去し、凍結液 1ml を加えてピペッティングすることで凍結用細胞懸濁液を作成した。
- ③ 2ml アシストチューブに細胞懸濁液を加え、 $-80^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫内で凍結した。
- ④ 内皮細胞管理帳へ必要事項を記載した。

※冷凍庫の温度変化は細胞へ大きく影響を与えるため、発泡スチロールの入れ物などに入れ、凍結後の温度変化を防いだ。

#### [細胞の解凍]

#### [操作]

- ① 75cm<sup>2</sup> フラスコに EGM-2:M199(1:1)+10%FBS を 14ml 入れ、 $37^{\circ}\text{C}$ 、5%CO<sub>2</sub> インキュベート内でプレインキュベートした。
- ②  $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結してあった内皮細胞の 2ml アシストチューブを、 $37^{\circ}\text{C}$ の温水で解凍した。僅かに氷が残る程度に加温を抑えた。

- ③ 解凍した細胞懸濁液を、あらかじめ用意しておいた 15ml 遠沈管中の 9ml の EGM-2:M199(1:1)+10%FBS に加えた。
- ④ ボルテックス後、800rpm で 5 分間遠心分離を行った。
- ⑤ 上澄み液をとり、1ml の EGM-2:M199(1:1)+10%FBS を加えてピペッティング後、75cm<sup>2</sup> フラスコに加えた。
- ⑥ 内皮細胞管理帳に必要事項を記載した。



### 9-3. MTT 法

#### 原理

MTT[3-(4,5-dimethylthiazo-2,5-diphenyltetrazoliumbromide); $C_{18}H_{16}N_5SBr$  (分子量 414.3)]等のテトラゾリウム塩はミトコンドリアの酸化リン酸化反応である TCA 回路の脱水素酵素(コハク酸脱水素酵素)の基質である。ミトコンドリアは、真核細胞の細胞質中に見られる小器官であり、酸化リン酸化反応によるエネルギー産出の場として重要な役割を担っている。活発に活動・増殖する細胞はエネルギー産出量が多くなる。細胞が活発であれば、細胞がより多く分裂するために酵素活性が高くなり、MTT を多く分解する。MTT は分解されると青紫色のホルマゼンに変化するので、吸光度を測定すれば生存細胞数や細胞への毒性傷害効果を定量することができる。

本研究においては、細胞数はほぼ一定の条件であるので、MTT 法によって得られた値は、細胞活性を示すものとする。

#### [使用装置・器具・試薬]

- ・  $CO_2$  インキュベーター (池本理化工業株式会社)
- ・ 浸透機(MICROTUBE MIXER) (TAITEC)
- ・ Microplate Reader Model 550 (BIO-RAD)
- ・ 96 穴プレート (Cat. No. MS-8096F/SUMILON)
- ・ オートクレーブ滅菌済みクリーンベンチ内器具
- ・ 各種ピペットおよびチップ
- ・ パスツール
- ・ 吸引ポンプ
- ・ エルマ血球計算盤 (Erma)
- ・ Cell Proliferation Kit I (MTT) (Cat. No. 1 465 007/Roche)
  - 1 液 (MTT labeling reagent)
  - 2 液 (Solubilization buffer)

#### [操作]

##### 1) 96 穴プレートへの播種

- ① EGM-2:M199(1:1)+10%FBS を 100  $\mu$ l/well 添加してプレインキュベートする。
- ② 細胞懸濁液(細胞密度  $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  cells/ml)を 10  $\mu$ l/well 播種する。
- ③ 37°C/5% $CO_2$  インキュベーター内で培養する。

##### 2) 試験

- ① EGM-2 に培地交換して 37°C/5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで over night させた 96 穴プレートの培地を吸引し、PBS で洗浄後、各サンプル溶液を 100  $\mu$ l/well 曝露する。
- ② 37°C/5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で、各曝露時間培養する。
- ③ 培養終了後、サンプル溶液を吸引し、PBS で洗浄後、EGM-2 を 100 $\mu$ l/well 添加する。
- ④ MTT 1 液(MTT labeling reagent)を 10  $\mu$ l/well 添加する。
- ⑤ 37°C/5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 4 時間培養する。
- ⑥ MTT 2(Solubilization buffer)液を 100  $\mu$ l/well 添加し、10 分間振動させる。
- ⑦ 37°C/5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で overnight 静置する。
- ⑧ Microplate Reader を用いて、測定波長 550 nm、参考波長 655 nm の吸光度を測定する。

## 9-4. 膜間電気抵抗測定

### [原理]

膜間電気抵抗(TER: Transendothelial electrical resistance)の測定は2本の電極対で構成されている STX-2 電極(表 9-2)と EVOM ボルトオームメーターを用いて測定する。外側の電極は試料膜を介して電流を流すための微小な銀電極であり、内側の電極は電圧を測定するための銀/塩化銀電極である。電圧検知用 $\pm 20\mu\text{A}$ の交流矩形波電流を 1.25Hz の低周波で印加する。電圧を測定することで、オームの法則  $R = E/I$  より抵抗値を算出する。細胞間のイオンの透過に対しての抵抗を測定できることから、簡易的な細胞間の結合状態の評価を行うことができる。

表 9-2 EVOM/STX-2 電極の概要

膜電圧範囲	$\pm 199.9\text{mV}$
抵抗範囲	0~1999 $\Omega$ , 0~20k $\Omega$ の 2 レンジ
交流矩形波電流	$\pm 20\mu\text{A}$ , 12.5Hz
電極	銀/塩化銀電極 (電圧測定用) 銀電極 (電流通電用)

### [試薬・器具・機器]

- ・ 上皮膜用ボルト・オームメータ (EVOM) (World Precision Instruments)
- ・ EVOM 用 STX-2 電極 (World Precision Instruments)
- ・ ウォーターバス (SB-35/EYELA)
- ・ ポンプ (日機装)

### [方法]

12wells Transwell 上で培養した HUVEC に対して TER の測定を行った(図 9-2)。測定中は培地の温度変化により測定値が変化してしまうため、12well Transwell の下にヒーターを設置し、培地温度を 37℃に保った。測定前に apical 側、basal 側の培地を EGM-2 で培地交換し、2h、37℃、5%CO<sub>2</sub> インキュベートを行った。測定値は、ポリエステルフィルターのみの抵抗値を blank として、その差として示した。

### 腹膜透過モデルの作成

12wells Transwell 上で培養した HUVEC に対して、培養 8-10 日目で膜間電気抵抗値が安定してくるので、細胞間の結合状態が形成したと定義し、この状態のポリエステルフ

フィルター上培養細胞を腹膜透過モデルとして実験に用いた。

終濃度 100,200mM の D-glucose、100,200mM のマンニトール、50  $\mu$  M のメチルグリオキサールを腹膜透過モデルに曝露して 37°C、5%CO<sub>2</sub> インキュベートを行った。コントロールは EGM-2 培地を用いた。培地は 37°C に保ち、3,6,9,12,24h に TER 測定を行った。培地が 37°C で維持できるようヒーター上で測定を行った。1well に対して 3 回測定を行い、平均値を算出した。

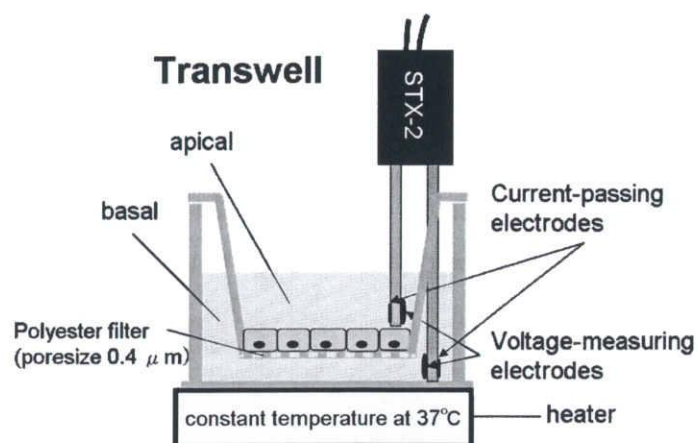


図 9-2 TER 測定装置

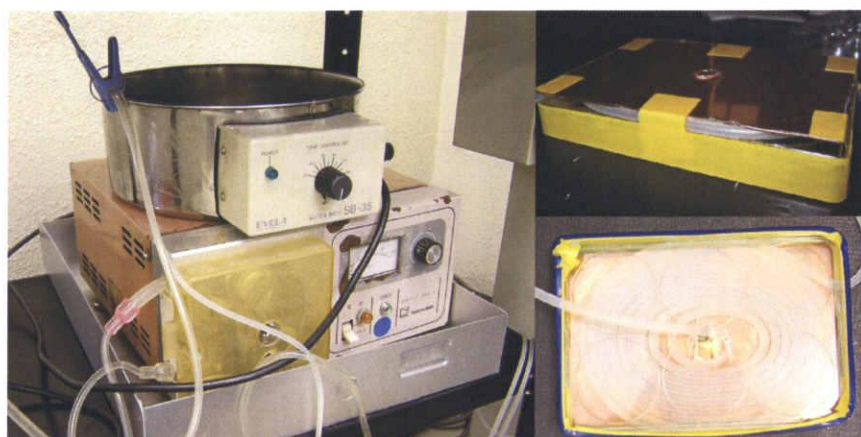


図 9-3 ヒーターの装置写真

左：ウォーターバスとポンプ、右上：ヒーター表、右下：ヒーター裏  
作成したヒーターのチューブに約 60 度の温水をポンプで流動させることで、  
トランスウェルの培地を 37°C に保つ。

[測定条件設定]

- Range 2000 $\Omega$  レンジ
- Mode R
- Power On
- Measure R で測定

[操作準備]

I STX-2 電極の消毒

- ① STX-2 電極を 70%エタノールに 15 分間浸漬した。
- ② STX-2 電極を取り出し、20 分間風乾させた。

II ヒーターの準備

- ① 恒温層の水をあらかじめ 60℃に温度を上げておいた。
- ② ポンプによって水を循環させた。

[操作]

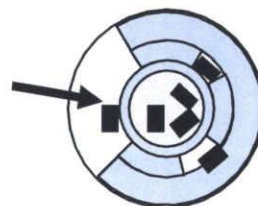
I 検体溶液の曝露

- ① 12well Transwell の培地を吸引し、細胞に検体溶液を曝露した。
- ② ヒーター上で曝露から 3,6,9,12,24h 膜間電気抵抗値を経時的に測定した。測定していない時は 37℃、5%CO<sub>2</sub> インキュベートを行った。

II 膜間電気抵抗値測定

- ① STX-2 電極を EVOM につないで、電源を入れた。
- ② STX-2 電極を Transwell に挿入し、Measure ボタンを押して各 well の TER を測定した。
- ③ ウェルに対する電極の位置を確認し、毎回一定の位置で測定を行った。
- ④ 3 箇所測定を行い、平均値を算出した。

トランスウェルの  
空いている部分を使用す



黒■の部分で測定

図 9-2 トランスウェル測定場所



## 9-5. デキストラン透過経路の推定

### 共焦点レーザー走査顕微鏡の原理

普通の顕微鏡を使っていると、焦点外のぼけの重なりによるコントラストの低下がしばしば観察の障害になる。高倍率になるとなおさらである。これを解決するものが共焦点レーザー走査顕微鏡である。最大の特徴は、ぼけを排除できること、高倍率でも鮮明な画像が得られ、立体観察も容易である。切片像を無浸襲で得られるので、組織や細胞を生きたまま詳細に見ることも可能である。

原理はシンプルで、その中核になるのは点光源とピンホールの2つである。これらが巧妙に配置されている。を示す(図9-4)。

レーザーから出力されたビームは、光ファイバーを通して共焦点顕微鏡に導かれ、点光源として用いられる。その光をレンズによって平行光に変換し、ダイクロイックミラーによって落射照明にされ、対物レンズの試料側の焦点に収束する。対物レンズの焦点に収束した照明光は、試料の蛍光色素を励起する。そこから発した蛍光を、対物レンズが集めて結像させる。この結像位置にあわせてピンホールを置くと、ピンホールに結像した光が通過し、検出器によって電気信号に変換されたものを観察する。

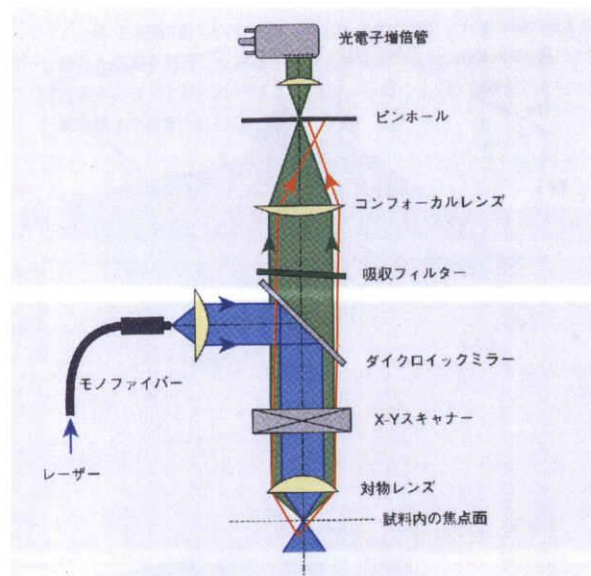


図9-4. 共焦点レーザー顕微鏡の概略図

### 〔使用装置・器具・試薬〕

・共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000, Olympus, Tokyo, Japan)

・EGM-2

・PBS (SIGMA)

・FITC-dextran

4 kDa (Cat. No. FD-4/Lot. No. 123K0723/SIGMA)

10 kDa (Cat. No. FD-10S/Lot. No. 053K5308/SIGMA)

70 kDa (Cat. No. FD-70/Lot. No. 103K1586/SIGMA)

・dextran

4 kDa (Cat. No. 31388/Lot. No. 1081228 53104064/SIGMA)



10 kDa (Cat. No. 9260/Lot. No. 083K12931/SIGMA)

70 kDa (Cat. No. 043-00555/Lot. No. F4540/WAKO)

〔操作〕

- ①位相差顕微鏡による観察を行い、細胞の状態に変化がないことを確認した。
- ②Transwell<sup>®</sup>の培地を吸引し、PBS で洗浄し、apical side に 50 µg/ml FITC-labeled dextran in EGM-2を 0.5 ml、basal side に 50 µg/ml unlabeled dextran in EGM-2 を 1.5 ml を添加した。使用したデキストランの分子量は 4 kDa、10 kDa、70 kDa である。
- ③37°C/5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 1 時間静置した。
- ④共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光デキストランを観察した。

## 9-6. 溶質透過試験

本研究において、蛍光標識したデキストランを分子量マーカーとして用いた。用いたデキストランの分子量は4 kDa、10 kDa、70 kDaである。この分子量を選んだのは、4 kDa は、inulin(分子量約 5 kDa)、10 kDa は、 $\beta$ 2-MG(ミクログロブリン、分子量約 12 kDa)、70 kDa は、albumin(分子量約 69 kDa)、というように腹膜透析の分子量マーカー類似の分子量のデキストランを選択した。以下に、デキストラン、FITC (fluorescein isothiocyanate) について説明する。

### ・dextran ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub>

グルコースからなる多糖で、 $\alpha(1\rightarrow6)$ 結合を主鎖とする。ショ糖を含む培地から、種々の細菌またはそれから得られる酵素デキストランスクラーゼの作用で合成される粘物質。培養濾液からアルコールにより白色の沈殿が得られる。水にわずかに溶けて強い右旋性を示す。連鎖球菌の *Leuconostoc dextranicum* が生産するデキストランは D-グルコピラノースが  $\alpha(1\rightarrow6)$ 結合で連なった高分子である。*L. mesenteroides* のデキストランは  $\alpha(1\rightarrow3)$ 結合により分枝している。デンプンと異なりヨウ素による呈色反応はない。アミラーゼで分解されない。部分加水分解物は血液増量剤や代用血漿として用いる。

### ・FITC (fluorescein isothiocyanate)

緑色系の蛍光色素で、この色素は安定で、抗体活性を阻害せず、抗体への標識が容易で安定、蛍光効率が低い、最大吸収波長と最大発光波長がかなり離れているなどの標識用蛍光色素の要件をかなり満たしている。

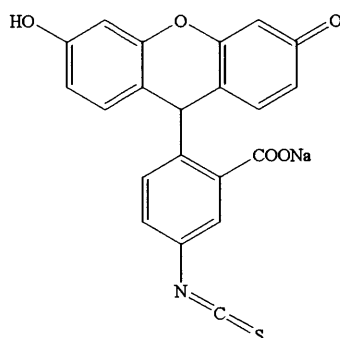


図 9-2. FITC

## 蛍光分光光度計

基底状態にある分子は、励起光を吸収して励起状態へ遷移する。この励起エネルギーの一部を振動エネルギーなどに失い、振動順位の低い位置に無輻射遷移し、そこから基底状態に戻る時に発せられる光が蛍光である。

物質に吸収された光の一部は、振動その他のエネルギーとして失われるので、物質から発せられる蛍光の波長は、励起光の波長よりも長くなる (Stokes の法則)。

物質によって吸収された光量と物質から放射された総蛍光光量の比を量子収率といい、この値の大きい物質の方が一般に蛍光を出しやすいと言える。また、物質が放射する蛍光の強度は、物質が吸収する光量に比例する。したがって、試料が希薄溶液の場合、蛍光強度を下記のように表すことができる。

$$F = KI_0 c l \epsilon \phi$$

$F$ : 蛍光強度	$K$ : 装置定数
$I_0$ : 励起光の強さ	$c$ : 物質の濃度
$l$ : セルの光路長	$\epsilon$ : 物質の吸光係数
$\phi$ : 物質の量子収率	

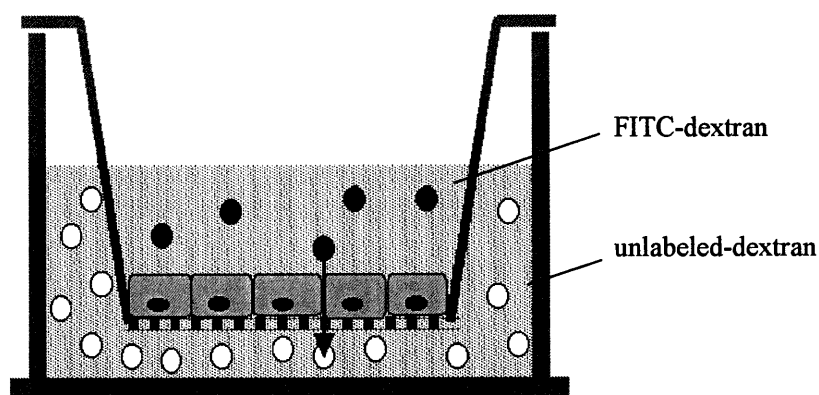


図 9-3 溶質透過試験の模式図

前項で作製した人工腹膜モデルを用いて溶質透過試験を行った。Transwell® の apical 側に蛍光物質である FITC 標識したデキストラン、basal 側に標識していないデキストランを 50  $\mu\text{g/ml}$  の濃度になるように添加した。そして、FITC 標識したデキストランの透過量を蛍光分光光度計により測定した。Basal 側に標識していないデキストランを添加する理由は浸透圧勾配による水の移動を起こさせないようにして溶質の拡散のみの移動を測定するためである。

算出された溶質透過係数を溶質透過性の指標とした。溶質透過係数は微小時間に变化した溶質量の物質収支式である微分方程式の解を用いた。以下に式の導出方法を示す。

basal 側の分子量マーカーの時間変化は、apical 側から basal 側への移動量に等しいので、次式が成立する。

$$\frac{dV_b C_b}{dt} = KA(C_a - C_b) \dots ①$$

浸透圧較差による水移動が無視できるので  $V_b = \bar{V}$  一定とみなせる。

$$\bar{V} \frac{dC_b}{dt} = KA(C_a - C_b) \dots ②$$

$$\frac{1}{C_a - C_b} dC_b = \frac{KA}{\bar{V}} dt \dots ③$$

$$\left[ \begin{array}{l} \text{ここで物質収支を考える。} \\ t=0 \text{ のとき } V_a \cdot C_{a0} \dots ④ \quad t=t \text{ のとき } V_a \cdot C_a + V_b \cdot C_b \dots ⑤ \\ \text{従って、} V_a \cdot C_{a0} = V_a \cdot C_a + V_b \cdot C_b \dots ⑥ \\ V_a = 0.5 \text{ ml, } V_b = 1.5 \text{ ml であるから} \\ 0.5 \cdot C_{a0} = 0.5 \cdot C_a + 1.5 \cdot C_b \dots ⑦ \quad \therefore C_a = C_{a0} - 3C_b \dots ⑧ \end{array} \right]$$

$$\frac{1}{C_{a0} - 3C_b - C_b} dC_b = \frac{KA}{\bar{V}} dt \dots ⑨$$

$$\frac{1}{C_{a0} - 4C_b} dC_b = \frac{KA}{\bar{V}} dt \dots ⑩$$

時間  $t = 2$  と  $t = 4$  間で定積分する。

$$\int_{t=2}^{t=4} \frac{1}{C_{a0} - 4C_b} dC_b = \int_{t=2}^{t=4} \frac{KA}{\bar{V}} dt \dots ⑪$$

$$[-4 \ln(C_{a0} - 4C_b)]_{t=2}^{t=4} = \frac{KA}{\bar{V}} [t]_{t=2}^{t=4} \dots ⑫$$

$$4 \ln \frac{C_{a0} - 4C_{b4}}{C_{a0} - 4C_{b2}} = -\frac{KA}{\bar{V}} (t_4 - t_2) \dots ⑬$$

よって

$$K = -\frac{4\bar{V}}{\Delta t \cdot A} \ln \left( \frac{C_{a0} - 4C_{b4}}{C_{a0} - 4C_{b2}} \right) \dots ⑭$$

K	: 溶質透過係数(m/s)
V	: basal side の体積(m <sup>3</sup> )
A	: 膜の面積(m <sup>2</sup> )
t	: 時間(s)
C	: 分子量マーカーの濃度
添字	a : 頭頂側
	b : 基底側
	0 : 初期値

溶質透過係数は  $t=t_2$  と  $t=t_4$  の 2 点での basal 側のマーカー濃度  $C_b=C_{b2}$ 、 $C_b=C_{b4}$ 、を測定することで算出した。

[使用装置・器具・試薬]

- ・F-2000 形分光蛍光光度計 (F-2000, Hitachi, Tokyo, Japan)
- ・蛍光測定用石英セル (アズワン株式会社)

・EGM-2

・PBS (SIGMA)

・FITC-dextran

4 kDa (Cat. No. FD-4/Lot. No. 123K0723/SIGMA)

10 kDa (Cat. No. FD-10S/Lot. No. 053K5308/SIGMA)

70 kDa (Cat. No. FD-70/Lot. No. 103K1586/SIGMA)

・dextran

4 kDa (Cat. No. 31388/Lot. No. 1081228 53104064/SIGMA)

10 kDa (Cat. No. 9260/Lot. No. 083K12931/SIGMA)

70 kDa (Cat. No. 043-00555/Lot. No. F4540/WAKO)

・hydrogen peroxide (Cat. No. 081-04215/Lot. No. ELG0125/WAKO)

・CATALASE (Cat. No. C-1345/Lot. No. 024K7034/SIGMA)

・GF109203X (Cat. No. G-2911/Lot. No. 123K1246/SIGMA)

・PD98059 (Cat. No. P-215/Lot. No. 124K1685/SIGMA)

・SB203580 (Cat. No. S8307/Lot. No. 105K46101/SIGMA)

・DMSO

[操作]

1) 溶質透過試験

① Transwell<sup>®</sup> の培地を吸引し、下記の条件で、細胞に test media を曝露した。

1. control: EGM-2

2. 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30min

3. 0.1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 0.1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30min

4. catarase: 500U/ml 30min → 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30min

5. GF109203X: 0.5μM 30min → 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30min

6. PD98059: 10μM 30min → 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30min

7. SB203580: 10μM 30min → 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30min

② PBS で洗浄し、apical side に 50 μg/ml FITC-labeled dextran in EGM-2 を 0.5 ml、basal side に 50 μg/ml unlabeled dextran in EGM-2 を 1.5 ml を添加した。使用したデキストランの分子量は 4 kDa、10 kDa、70 kDa である。

- ③2、4時間後にプレートを軽く攪拌し、basal 側から 10 $\mu$ l ずつサンプルを採り PBS 990  $\mu$ l に添加して 100 倍希釈した。
- ④蛍光分光光度計を用い、FITC の励起波長(490 nm)、蛍光波長(520 nm)に設定した。
- ⑤石英セルに溶液を移し、蛍光分光光度計にセットし、蛍光測定を行った。
- ⑥位相差顕微鏡による観察を行い、細胞の状態に変化がないことを確認した。

(細胞を播種していないポリエステル膜のみの blank においても同様に測定した。)



## 9-7. 免疫化学染色法

### [原理]

免疫化学染色法は、特定のタンパク質を検出する方法で、検出方法を大別すると直接法と間接法に分けられる。直接法は特異的抗体に直接標識し、その標識を検出することで特定のタンパク質の存在を知る方法である。間接法は特異的抗体（一次抗体）を抗原として認識する抗体（二次抗体）を標識し、その標識を検出することで特定のタンパク質を知る方法である。二次抗体には、特定の動物種の免疫グロブリンを標識する抗体を利用し、一次抗体を認識させる。同じ動物種の由来の一次抗体であれば同じ二次抗体が利用できることから汎用性が高く、また、直接法と比べ、検出感度が高い。

なお、本研究は間接法で行った。間接法として、1) 酵素抗体法、2) 蛍光抗体法、3) ABC法、4) 金コロイド法があるが本研究はすべて蛍光抗体法で行った。

### [試薬・器具・機器]

- Rabbit anti-occludin, human (71-1500/Zymed Laboratories)
- Rabbit anti-ZO-1, human (61-7300/Zymed Laboratories)
- Polyclonal swine anti-rabbit immunoglobulins/FITC (F 0205/DakoCytomation)
- ブロックエース<sup>TM</sup>粉末 (UK-B80/大日本製薬)
- Cellmatrix Type1-C (新田ゼラチン)
- Acetone(アセトン) (012-00343/Wako)
- Methanol(メタノール) (134-01833/Wako)

### [方法]

コラーゲンコート処理した 8 穴チャンバー上に HUVEC を confluent 培養した。アセトン/メタノール(1:1)を添加し氷上で 5 分間静置させ、固定した。PBS で希釈したブロッキング液(大日本製薬)を加え 1 時間放置し、不特定部位への 1 次抗体の吸着を抑えた。一次抗体として rabbit anti-ZO-1 antibody/ブロッキング液 (1:100)または rabbit anti-occludin antibody/ブロッキング液 (1:50)を 200  $\mu$ l/well 添加し 4℃で over night 静置した。十分に洗浄後、二次抗体には polyclonal swine anti-rabbit immunoglobulins labeled with FITC/ブロッキング液(1:100)を 200  $\mu$ l 添加し室温で 1 時間静置した。その後、十分に洗浄を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

[測定条件]

蛍光フィルター	NIBA
Dyelist	FITC
検出器の感度調節(HV)	500-600V
Gain	1x
Offset	0%
レーザー出力の調整(Laser)	20%
コンフォーカルアパチャー(C.A)	80um
ハロゲンランプ調光(Lamp)	2.9V
Filter Mode	Kalman Line 2
スキャン速度	10.0us/Pixel
画面サイズ(size)	1:1 512by
対物レンズ、Zoom	×40、×1or ×2

[操作準備]

I コラーゲンコート

- ① 8穴チャンバーを pH3 HCl(0.22  $\mu$ l フィルター滅菌済み)で 200  $\mu$ l/well ずつ洗浄した。
- ② Cellmatrix Type1-C を pH3 HCl で 30 倍希釈した溶液(4℃保存)で、200  $\mu$ l/well ずつコラーゲンコートした。溶液はゆすって全面にわたるようにした。
- ③ コートは室温で 2h 静置させた。(クリーンベンチ内でフタをしておく)
- ④ 残り溶液を吸引し、EGM-2 培地を 300  $\mu$ l/well ずつ入れて、プレインキュベートした。

II ブロックエースの調製・保存

- ① ブロックエース粉末 4g を脱イオン水 100ml で溶解した。
- ② PBS で 20%溶液になるように希釈した (以下、ブロッキング液とする)。
- ③ ブロッキング液は-20℃で冷凍保存した。

[操作]

I 8 穴チャンバーへの播種

- ① コラーゲンコートした 8 穴チャンバーに細胞懸濁液(濃度  $5 \times 10^5$  cells/ml)を 50 $\mu$ l/well 播種した。
- ② 37℃、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。

II 免疫染色

- ① confluent 培養後、8 穴チャンバーの培地を吸引した。
- ② 各検体溶液を 300  $\mu$  l/well ずつ 9h 曝露した。
- ③ PBS で洗浄した。
- ④ 培地を吸引し、氷上で ice-cold ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) acetone/methanol (1:1)をゆっくりやさしく 200  $\mu$  l/well ずつ加え、5min 浸透させた。
- ⑤ acetone/methanol (1:1)を取り除き、氷上で 10min 静置して(フタはしない)乾燥させた後、ブロッキング液を 300  $\mu$  l/well ずつ加え、室温で 1h 静置した。
- ⑥ 1 次抗体を 200  $\mu$  l/well 加え、4℃、飽和湿度で overnight 静置した。  
Rabbit anti-occludin/ブロッキング液 (1:50)  
Rabbit anti-ZO-1/ブロッキング液 (1:100)
- ⑦ 余剰な抗体を吸引除去し、PBS で 5 回洗浄した。
- ⑧ 2 次抗体を 200  $\mu$  l/well 加え、室温で 1h 静置した。  
Anti-rabbit-FITC in PBS (1:100)
- ⑨ 余剰な抗体を吸引除去し、PBS で 5 回洗浄した。
- ⑩ 8 穴チャンバーの well wall を取り除いた。
- ⑪ 蛍光顕微鏡、共焦点レーザースキャン顕微鏡を用いて観察および撮影を行った。

※8 穴チャンバーに PBS を使用してカバーガラスを接着させた。

## 9-8. 間質層モデルの作成

### 1 Transwell への腸間膜の接着

#### II パラフィン包埋

①腸間膜のついた Transwell を 4%パラホルムアルデヒド/PBS に 24 h 浸透させる。

②PBS で洗浄し段階的エタノール洗浄により脱水する。

70%エタノール 1 h

85%エタノール 1 h

90%エタノール 1 h × 2

95%エタノール 1 h × 2

99.9%エタノール 20min × 3

③キシレンを浸透させ脱エタノールを行う。

キシレン 20min × 3

④パラフィン包埋のために徐々にパラフィンを浸透させる

パラフィン 1 h × 3 70°C

⑤プレートに Transwell を並べ溶解したパラフィンを流し込み r.t. で静置する。

⑥細胞塊を作成し電子顕微鏡室の作業に移る。

⑦エポキシ樹脂台に細胞塊をのせ瞬間接着剤で接着させる。乾燥し接着したら研磨機と掃除機と顕微鏡とスタンドライトを使いエポキシ樹脂台に収まる直方体の大きさに研磨する。

#### III 光学顕微鏡用切片の作成

①chamber のフィルター断面が見えるように包埋した試料をのこぎりで切断した。

②型取りした台に接着剤で貼り付けた。

③ガラスナイフで厚さ 50μm の光顕用薄片を作成した。

④光学顕微鏡で観察した。

## 9-9. 細胞層の厚み測定

上記で求めてきた溶質透過性や膜間電気抵抗値は層の厚みにも関与していることが考えられる。そこで、細胞層、間質層の透過性の意味を深く理解するためには各層の持つ厚みを測定することは重要である。

電子顕微鏡は、電子を媒体とした顕微鏡であり、媒体が電子なので、当然色に関する情報は得られない。試料に高速の電子線を照射すると、電子は試料と様々な相互作用する。透過型電子顕微鏡(TEM)は、試料を透過した電子を用いる。コイルに電流を流すことで生じる磁界の電子線への力を利用した電磁レンズを使用して、流す電流量をコントロールして磁界を変化させることで、拡大倍率を変化させている。電磁レンズでは原理的に凹レンズを作ることは出来ないのも、TEM にはたくさんの収差が存在する。この収差が像解釈やレンズの調整を複雑にしている一つの要因である。また逆に、高分解能電子顕微鏡法ではこの収差を積極的に利用して、原子や結晶格子を直接観察することを可能にしている。

さらに、電子線はごく薄い物質しか透過できないので、透過電子顕微鏡観察用に非常に薄い試料を作製することが必要となる。

### [使用装置・器具・試薬]

・PBS (GIBCOBRL, Lot No.1028669, Cat No.10010-0223)

・0.1Nリン酸 Na 液 200ml

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Wako, Lot No.LDH2678, Cat No.192-02815)0.593g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Wako, Lot No.KCG5195, Cat No.197-02865)2.3g

これらを脱イオン水で 200ml に調整。

・前固定液: 2.5%glutaraldehyde in 0.1N sodium phosphate buffer pH7.4 (25ml)

0.1N HCl	0.75ml
0.1N sodium phosphate buffer	12.5ml
25%glutaraldehyde	2.5ml
glutaraldehyde (TAAB, BATCH No.39360, Cat No.G015)	
蒸留水	9ml

pH 測定し、1N NaOH を加え、pH7.4 に調整後、蒸留水で全量を 25ml にする。

・10%サッカロース in 0.05N sodium phosphate buffer、pH7.4 (100ml)

0.1N sodium phosphate buffer	50ml
0.1N HCl	6.2ml
蒸留水	2ml

サッカロース 10g

(Wako, Lot No. CAE0363, Cat No. 196-00015)

pH 測定し、0.1N HCl で pH7.2 に調整後、蒸留水で全量を 100ml にする。

・オスミウム酸 (TAAB 社)

・包埋用レジン

Quetol 812	6.3ml	(日新 EM 社)
MNA	3.7ml	(日新 EM 社)
DDSA	13.9ml	(日新 EM 社)
DMP-30	0.3ml	(日新 EM 社)
Total	24.2ml	

[操作]

1) 12well Transwell®を用いた培養細胞の樹脂固定

- ① Transwell®を PBS で 2 回洗浄した。
- ② 前固定液を apical に 0.5ml、basal に 1.5ml 添加した。RT、4h
- ③ PBS で 2 回洗浄した。
- ④ 10% サッカロース溶液を apical に 0.5ml、basal に 1.5ml 添加した。5min×4 回  
RT
- ⑤ 1～2% オスミウム酸と 10% サッカロース(in 0.05N sodium phosphate buffer)、を  
使用直前に当量混和し plate のふたに 0.2ml 添加し、その上に camber を乗せ、  
apical に 0.2ml 添加する。30min RT
- ⑥ 蒸留水ですばやく 3 回洗浄した。

⑦ 下記の順にエタノールを添加し脱水した。

35% EtOH	10min
50% EtOH	10min
70% EtOH	10min
95% EtOH	10min
100% EtOH	10min×4 回

⑧ 下記の条件で試料を包埋した。

1:1 100% EtOH: レジン	1h
100% レジン	RT 1day
100% レジン	60°C 2day

## 2) 電顕超薄切片の作成

- ①chamber のフィルター断面が見えるように包埋した試料をのこぎりで切断した。
- ②型取りした台に接着剤で貼り付けた。
- ③剃刀刃で四辺を削りとり一回り小さめの切片用試料を作成した。
- ④ガラスナイフでフィルター断面の付近だけを残すようにさらに四辺を削った。
- ⑤ダイヤモンドナイフで厚さ 80nm 超薄切片を作成し、150 メッシュ(銅)に貼り付けた。
- ⑥4%酢酸ウラニル染色液で 20 分間染色した。
- ⑦蒸留水で洗浄した。(洗浄後はよく水を切る)
- ⑧クエン酸鉛染色液で 2 分間染色した。
- ⑨蒸留水で洗浄した。(特に丁寧に行う)
- ⑩透過型電子顕微鏡で観察し、撮影した。