

平成 24 年度 修士論文

腹膜透析排液由来細胞の抗酸化能と老化

*Anti-Oxidative Potential and Cellular senescence of
Peritoneal Dialysis Effluent Derived Cells*

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

阿部 功児

目次

1	諸言	1
1.1	腎不全と腹膜透析療法	
1.1.1	腹膜透析療法と合併症	
1.1.2	腹膜透析液の pH とグルコース分解産物(GDPs)	
1.1.3	腹膜透析排液	
1.1.4	腹膜と腹膜中皮細胞	
1.2	腹膜透析による酸化ストレスと抗酸化物質	
1.2.1	酸化ストレス (ROS の生成)	
1.2.2	抗酸化物質 (ROS の消去)	
1.2.2.1	アスコルビン酸とその誘導体	
1.2.2.2	トコフェロールとその誘導体	
1.3	細胞老化	
1.3.1	複製老化	
1.3.2	腹膜透析療法と細胞老化	
2	目的	19
3	方法	20
3.1	腹膜透析排液(PDE)からのヒト腹膜中皮細胞(HPMC)の分離	
3.1.1	PDE の入手	
3.1.2	HPMC の採取と培養	
3.1.3	外挿法による初期接着細胞数の算出	
3.2	間葉系幹細胞(MSC)の培養	
3.2.1	抗酸化物質添加培地の調整	
3.3	腹膜透析排液由来腹膜中皮細胞(PDE-HPMC)の細胞老化測定	

3.4 PDE-HPMC の細胞内 ROS の測定

3.4.1 過酸化水素による DCF 感受性-細胞内 ROS の測定

3.4.2 抗酸化物質添加による DCF 感受性-細胞内 ROS の測定

3.4.3 細胞内 ROS の定量化

3.5 PDE-HPMC の Cytokeratin-18, α -SMA 発現測定

3.6 二次元電気泳動

3.6.1 タンパク抽出

3.6.2 一次元目電気泳動

3.6.3 二次元目電気泳動

3.6.4 Flamingo による蛍光染色および画像解析方法

3.7 統計処理

4 結果 29

4.1 腹膜透析排液由来細胞の初期接着率および細胞の形態観察

4.1.1 初期接着率の算出

4.1.2 細胞の形態観察および既報データとの比較

4.2 細胞老化測定

4.2.1 MSC での継代時の SA- β -Gal 染色

4.2.2 Senescence-Associated β -Galactosidase (SA- β -Gal) 染色

4.2.3 CAPD 期間との相関

4.3 細胞内 ROS 測定

4.3.1 過酸化水素による DCF 感受性-細胞内 ROS 測定

4.3.2 CAPD 期間との相関

4.3.3 抗酸化物質(AAG)の濃度依存測定

4.3.4 抗酸化物質(TMG)濃度依存測定

4.4	Cytokeratin-18, α -SMA タンパク発現	
4.4.1	Cytokeratin-18 タンパク発現	
4.4.2	α -SMA タンパク発現	
4.4.3	CAPD 期間との相関	
4.5	二次元電気泳動	
4.5.1	抗酸化物質添加時でのタンパク発現の比較	
4.5.1.1	AAG 添加時でのタンパク発現	
4.5.1.2	TMG 添加時でのタンパク発現	
5	考察	• • • • • 45
5.1	PDE-HPMC の形態	
5.2	細胞老化、形質変換マーカー(α -SMA)の発現およびその経路	
5.3	細胞内 ROS 生成系と消去系	
5.4	抗酸化物質 AAG, TMG の細胞内への取り込み機序	
5.5	AAG, TMG 添加でのタンパク変動	
6	結論	• • • • • 60
7	今後の展望	• • • • • 61
8	参考文献	• • • • • 62
9	謝辞	• • • • • 67

11 APPENDIX

• • • • • 68

A-1. 細胞培養プロトコール

A-1-1. 培地調整

A-1-2. 腹膜透析排液由来細胞の分離

A-1-3. 継代培養

A-2. SA- β -Gal 染色

A-3. 細胞内 ROS 測定

A-4. 免疫化学蛍光染色

A-5. 二次元電気泳動

B-1. 滅菌について

B-2. 本研究で使用した試薬について

C-1. 腹膜透析排液サンプル結果まとめ(#1~#103)

1. 諸言

1.1 腎不全と腹膜透析療法

1.1.1 腹膜透析療法と合併症

腎機能が 30%以下になることを腎不全と言い、10%以下になると末期腎不全となり透析療法が必要となる。腎不全の原因は以前までは慢性糸球体腎炎であったが、現在では生活習慣の変化に伴い、糖尿病性腎症が原因の 1 位となっている。

日本では、透析患者数は毎年 1 万人ずつ増加しており現在では約 30 万人が透析療法を行っている。透析療法には大きく分類して血液透析 (Hemodialysis: HD) と腹膜透析 (Peritoneal Dialysis: PD) の 2 種類が存在しており、本研究では腹膜透析に着目している。腹膜透析では、患者の腹腔内に高濃度の D-glucose を浸透圧勾配形成物質として利用した透析液を注入し、腹膜を介して拡散と限外濾過により水・老廃物の除去、電解質、pH の調整を行う治療法である。血液透析では、週に 3 回、1 回に 4~5 時間の通院が必要となるが、腹膜透析は自分で行うことができる在宅治療であるため、月に 1~2 回の通院で良い。また、腹膜透析は通常は 1 日に 3 回から 4 回行うが、自己の残存腎機能の維持というメリットもあるため、導入初期には 1 日 1 回から始めることもできる。従って、血液透析に比べ、腹膜透析は就学や就労がしやすく、必要な機材や薬剤が血液透析に比べ僅かですみ生産コストの面でも医療廃棄物処理の面でも設備投資がほとんど必要ないという面など、経済効果が大きいこともメリットである。医学的にも、連続的な水・老廃物除去による循環器系への負担軽減から、特に高齢者への適応がさらに広がると期待されている。

しかし、腹膜透析では、透析液中の高濃度の D-glucose やグルコース分解産物(Glucose Degradation Products: GDPs)や pH の影響による酸化ストレスや溶質透過性、除水不足、さらに腹膜線維症、腹膜硬化症、腹膜肥厚などの合併症が問題となっている^{[1][2]}。そのため、腹膜機能を維持し、長期間の PD 治療を可能にすることが大きな課題となっている。また、腹膜機能の診断として、現在主に行われている診断法に比べ、簡便かつ無侵襲的な診断方法の確立が急がれている。

1.1.2 腹膜透析液の pH とグルコース分解産物(GDPs)

腹膜透析と血液透析はほぼ同時期に治療が開始されている。医療機器の開発は血液透析が猛烈な勢いで進歩した一方、腹膜透析は透析バッグのプラスチック化程度の進歩であった。また、腹膜透析の透析液は主成分の D-glucose の安定性の観点から 2000 年まではすべて酸性透析液であった。この酸性透析液を長期間使用すると、被嚢性腹膜硬化症(EPS)が発症する可能性が高くなるということが示された^[3]。これを避けるために、医師が腹膜透析の新規導入を控え、血液透析の導入を進めることが腹膜透析の低い普及率の原因であると考えられる。

しかし、その後 EPS の最も危険な因子は透析液の GDPs や pH であることが考えられ、2000 年ごろから中性透析液が研究・開発され、販売が開始された。これにより、透析液の pH による影響はもちろん、GDPs の産生量も軽減され (Table.1-1)、ダメージを与える危険因子を軽減することができ、腹膜透析を長期間行うことが可能になりつつある^{[4][5]}。

Table.1-1 酸性透析液と中性透析液の GDPs の比較

GDPs ($\mu\text{M/L}$)	酸性液	Two chambered 中性液
3,4-DGE	16	< 1.7
Formaldehyde	3.9	0.4
Methylglyoxal	8.1	< 0.2
Glyoxal	7.8	0.3
5-HMF	5.1	0.3
Furfural	1.1	16
3-DG	328	22
Acetaldehyde	60	< 0.9

また、上記の D-glucose を浸透圧物質として主成分とする中性透析液の他に、イコデキトリン(polyglucose; icodextrin)を浸透圧物質として用いる透析液がある。イコデキストリン透析液においては、Glucose のポリマーであり、Glucose のように体内に吸収されにくく、腹腔内での浸透圧勾配を長時間維持することができる。除水量が少ない患者や除水が求められる際に使われる透析液である。しかし、イコデキストリン透析液は pH が酸性に傾いているため、これを改善することも課題であると考えられる。

現在使用されている腹膜透析液はD-glucoseを使用したものが主であるが、これは腹膜透析液には安価で容易に手に入りやすく、体内に吸収されても分解できる浸透圧物質であることが理由である。D-glucoseは安価であり、解糖系によって体内で代謝されるメカニズムも知られている。そのため、1960年代の腹膜透析療法初期から広く使用されてきた。透析液に含まれるD-glucose以外の溶質は電解質である。代表的な透析液の電解質はNa⁺: 132mEq/L, Ca²⁺: 3.5mEq/L, Mg²⁺: 1.5mEq/L, Cl⁻: 96mEq/L, Lactate⁻: 35mEq/Lである^[6]。

D-glucose水層ではpHにより安定性が異なり、pHが上昇するにつれて断片化しやすくなる。一方で、pHを低く保つと分解を抑えられるが、エンジオールを経て、グルコソンを形成しやすくなる。また、酸性の透析液を腹腔内にいれることで、被嚢性腹膜硬化症(EPS)などの合併症の危険性も高くなる。従来の酸性透析液はpHを5前後にしていたが、2液混合型の混合前のpHは3前後である。

D-glucose透析液は腹腔内に貯留するため、滅菌処理が必要であり、酸性下で滅菌している。現在の透析液の滅菌は一度に大量かつ確実、さらに安価で安全に行うことができる高圧蒸気滅菌が主流である。しかし、加熱の際にD-glucoseが分解、断片化してGDPsが生成してしまう。GDPsのジカルボニル化合物は反応性が高く、AGEs形成促進や抗酸化タンパクの変性を引き起こすことが報告されている^[7]。GDPsはメチルグリオキサール、グリオキサール、3-デオキシグルコソン、3, 4-デオキシグルコソン-3-エンなどが存在する(Fig.1-1)。

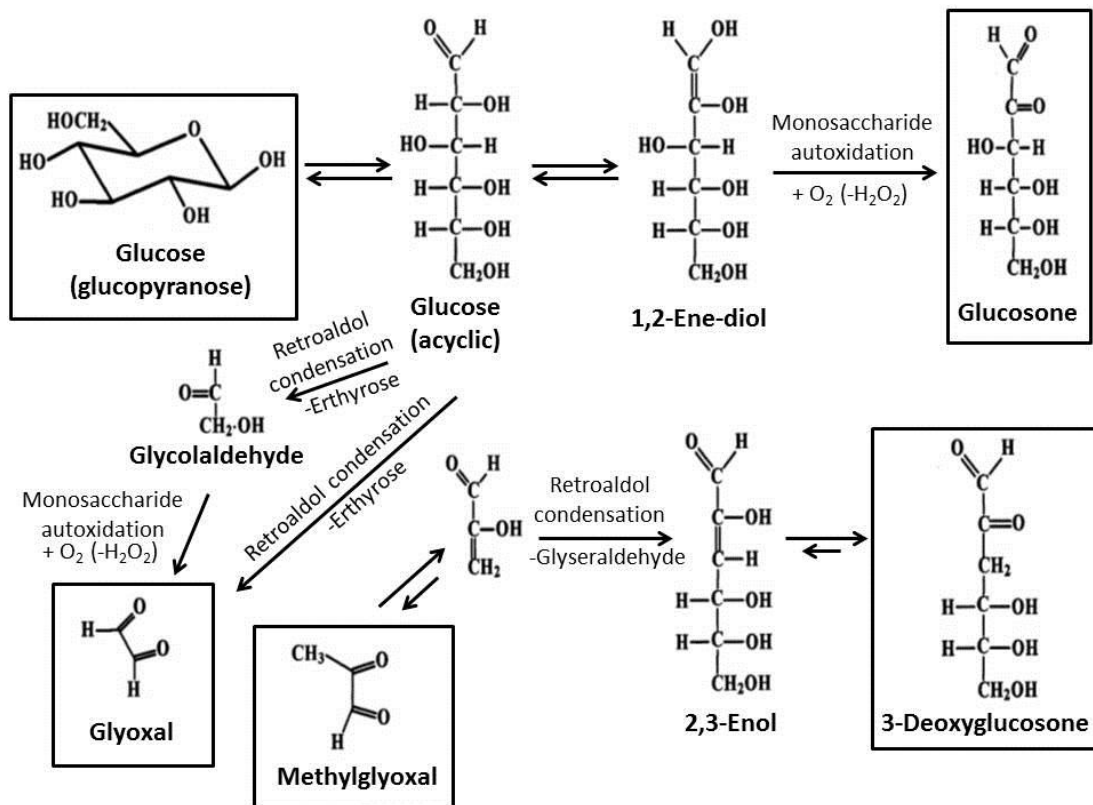


Fig.1-1 GDPs 形成の経路

1.1.3 腹膜透析排液

腹膜透析は、腹腔内に高濃度の D-glucose を含む透析液を注入して浸透圧濃度勾配により、水分や老廃物の除去を行っている。しかし、時間経過により濃度勾配がなくなり、水分や老廃物の除去ができなくなる。そのため、透析効率を維持させるために 1 日に 3~4 回透析液を交換する必要がある。その際に生じるのが、腹膜透析排液である。この腹膜透析排液は 1 回に約 2 リットル、1 日に 4 回の透析液を注入するので、約 8 リットルの排液が 1 日に生じる。また、この透析排液には透析によって体内から排出された水や老廃物が主に含まれている。老廃物とは尿素、尿酸、クレアチニン(Cr)などであり、ナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオンといった電解質もバランス調整され、透析排液中に含まれている。また、細胞成分としてマクロファージ、リンパ球、好中球といった血球系の細胞や腹膜を構成する腹膜中皮細胞などが含まれていることが、Betjes らによって報告されている^{[8][9]}(Fig.1-2)。

腹膜透析排液から得られる細胞や液性因子などからの情報は多く、腹膜機能を診断する際にも利用され始めている。しかし、現在では採取した腹膜中皮細胞の面積評価や赤血球の有無などの診断法しかなく、細胞機能での診断法はないため、今後患者の腹膜機能を診断する際や、腹膜透析を離脱する際の指標となる診断法の確立が必要となる。

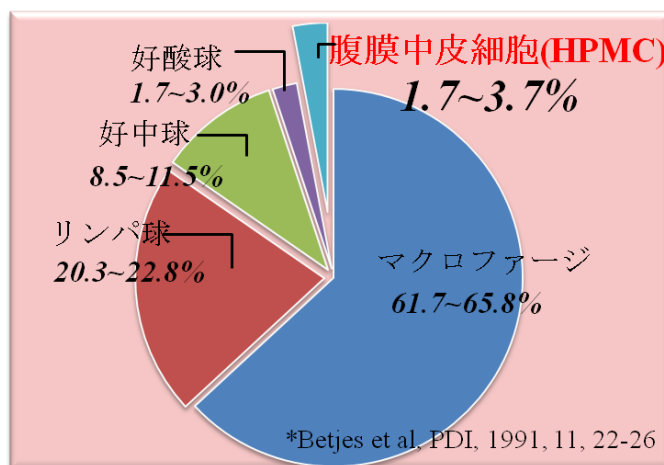


Fig.1-2 腹膜透析排液に含まれる細胞群^[8]

1.1.4 腹膜と腹膜中皮細胞

腹膜透析療法で生体半透膜として利用される腹膜は、腹壁の内面を覆う壁側腹膜と腹部臓器を覆う臓側腹膜からなる漿膜組織である。この腹膜はたくさんの微絨毛を持つ単層の中皮細胞と、膠原繊維、弾性繊維、ヒアルロン酸などの細胞外マトリックスなどが存在する基底膜下の間質から構成された生体複合膜である。間質組織中に線維芽細胞、脂肪細胞、肥満細胞、マクロファージなどの細胞や毛細血管が散在する構造をとる。(Fig.1-3)

腹膜の表面積は成人で約 1.7~2.2m²、厚さは 50~150μm であるが、長期の腹膜透析で肥厚すると約 500μm に至る。

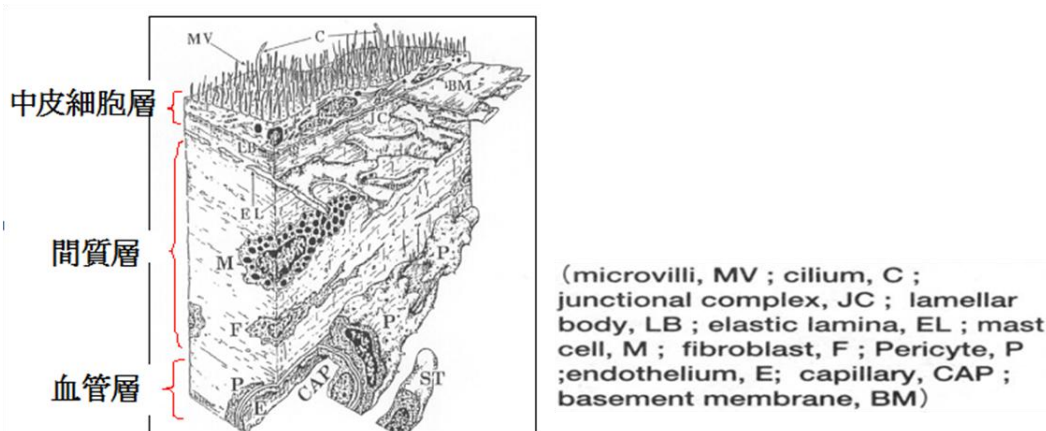


Fig.1-3 正常な腹膜の形態学的模式図

腹膜中皮細胞(Human Peritoneal Mesothelial Cells: HPMC)は細胞単層を形成する上皮系細胞である。腹膜中皮細胞は長さ 2~3μm、直径 0.08μm、の微絨毛の厚い外套に覆われていて、微絨毛は細胞表面一面に一様に広がっている(Fig.1-4)。微絨毛はリン脂質を分泌し、臓器間の癒着を防ぐ働きをしている。中皮細胞同士は斜めに重なり合い、固く組み合わせるように接着している。

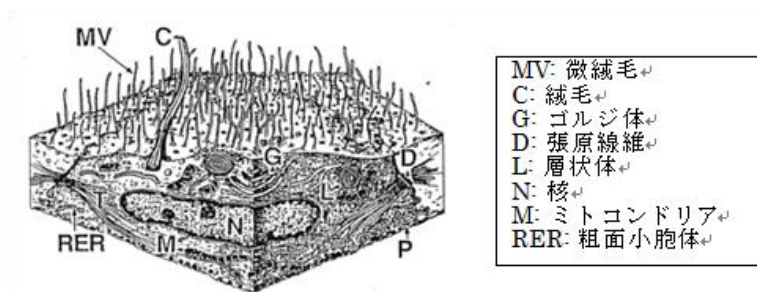


Fig.1-4 正常中皮細胞の形態学的模式図

1.2 腹膜透析による酸化ストレスと抗酸化物質

1.2.1 酸化ストレス (ROS の生成)

生体内では呼吸によって得られる酸素は体内でエネルギーとして使われる他に、一部は活性酸素(Reactive Oxygen Species: ROS)のスーパーオキシドアニオンラジカル(O_2^-)となる^[10]。酸化ストレスとは、生体の内因性・外因性の原因になり発生された ROS を処理できなくなった状態を示している。生体は酸化ストレスに対してまず、適応するがそれができない場合は組織障害や細胞死(アポトーシス)を引き起こす。しかし、生成した ROS は生体の抗酸化酵素と呼ばれるものや、抗酸化物質と呼ばれる低分子化合物抗酸化作用を持つタンパク質によって消去される。ROS の種類を下記の表に記す (Table.1-2)。

Table.1-2 活性酸素種(ROS)の種類と化学式

活性酸素ラジカル	
スーパーオキシドアニオンラジカル	$O_2^- \cdot$
ヒドロキシラジカル	$HO \cdot$
過酸化ラジカル	$LOO \cdot$
アルコキシラジカル	$RO \cdot$
活性酸素分子	
過酸化水素	H_2O_2
一重項酸素	1O_2
過酸化物	$LOOH$
次亜塩素酸	$ClOH$
酸素錯体	
鉄酸素錯体	

また、透析液の D-glucose が細胞内に取り込まれた後、ROS を生成させるメカニズムは近年様々な経路が提唱されている^{[10][11][12][13][14]}。通常、D-glucose は上記の酸素と同様にエネルギー源として細胞に供給され、細胞質内で解糖によりピルビン酸を生成する。ピルビン酸はミトコンドリア内に入り、クエン酸回路、電子伝達系を経て ATP を合成する。電子伝達系は ATP 生成(酸化リン酸化)反応に必要なプロトン(H^+)をミトコンドリアのマトリックスから膜間腔側へ汲み出す機能がある。その際に、ROS の一種のスーパーオキシドアニオンラジカル (O_2^-)を生成させることが知られている^{[15][10]}(Fig.1-5)。

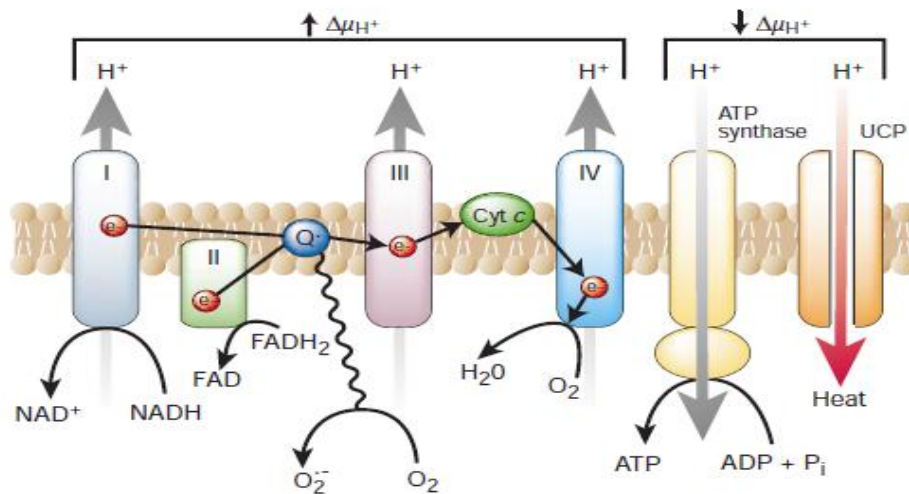


Fig.1-5 ミトコンドリアの電子伝達系と ROS 生成^[10]

複合体 I は NADH から始まり、複合体 II はコハク酸から始まる。電子伝達体として機能するユビキノン(Q)からの電子は複合体 III を経てシトクロム c (Cyt c) に、次いで複合体 IV を経て最終的に酸素に電子を伝達する。

このスーパーオキシドアニオンラジカルが始まりとなり、過酸化水素(H₂O₂)などが産生される。そして、ヒドロキシラジカルでは、細胞内の鉄イオンとフェントン反応(Fig.1-6)を起こし、ヒドロキシラジカル(•OH)を生成させる。このヒドロキシラジカルは ROS の中でも特に強い酸化能力を持つ^[16]。



Fig.1-6 フェントン反応

細胞が高濃度の D-glucose に曝されると解糖やミトコンドリアの代謝経路が亢進する。また、その他にポリオール経路、ヘキソサミン経路、プロテインキナーゼ C (Protein Kinase C: PKC) 活性経路、AGEs 形成経路の 4 つの代謝経路も亢進すると報告されている^[10]。ポリオール経路の代謝亢進は細胞内のグルタチオンの抗酸化力を抑制する。AGEs 形成経路の代謝亢進はメチルグリオキサールやグリオキサールなどの GDPs の生成を増加させる。その結果、AGEs 形成が促進し、反応副産物として ROS が生成する^[17]。PKC 活性経路の代謝亢進はジアシルグリセロール (Diacylglycerol: DAG)-PKC 活性誘導により NADPH オキシダーゼが活性化する。活性化した NADPH オキシダーゼは O₂ を生成させる^[14]。NADPH オキシダーゼは食

食細胞(好中球、単球/マクロファージ、好酸球)が生体防御のために豊富に所有している(Fig.1-7)。

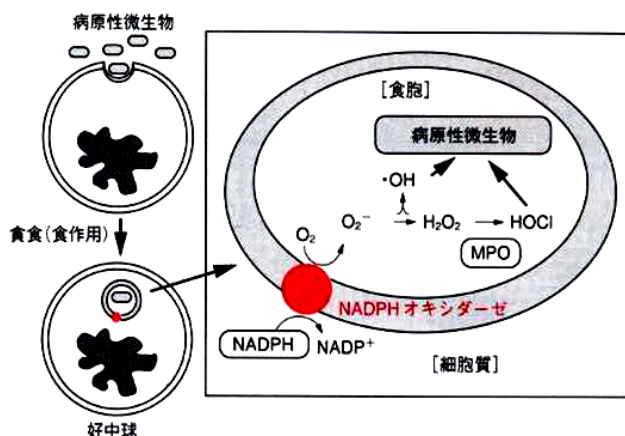


Fig.1-7 食細胞 NADPH オキシダーゼの ROS 生成^[18]

病原性微生物などの食食時に O_2^- を生成する。 O_2^- は不均化反応により過酸化水素 (H_2O_2) となる。さらに好中球顆粒から放出されたミエロペルオキシダーゼ(MPO)の作用で次亜塩素酸(HOCl)へと変換される。また、 O_2^- と過酸化水素の反応からヒドロキシラジカル($\cdot OH$)を生成させ、殺菌剤として働かせる。

1.2.2 抗酸化物質 (ROS の消去)

生体は ROS を免疫効果や血圧の調整などに利用し、恒常性を維持している。細胞や組織内で ROS の生成系と消去系のバランスを保つことは生命の維持に繋がっている。生体は生成した ROS を抗酸化酵素(Superoxide dismutase: SOD、グルタチオンペルオキシダーゼ、カタラーゼなど)により消去するシステムを所有している。ミトコンドリアや細菌が所有する SOD はマンガンを含む 4 量体酵素であり、真核生物が有する SOD は銅と亜鉛イオンを含む 2 量体酵素である。 O_2^- は Cu, Zn-SOD が触媒するとほぼ拡散律速まで反応速度が増大するほど効率よく機能している^[19]。生成した過酸化水素も速やかにグルタチオンペルオキシダーゼやペルオキシレドキシニンによって無毒化される(Fig.1-8)。

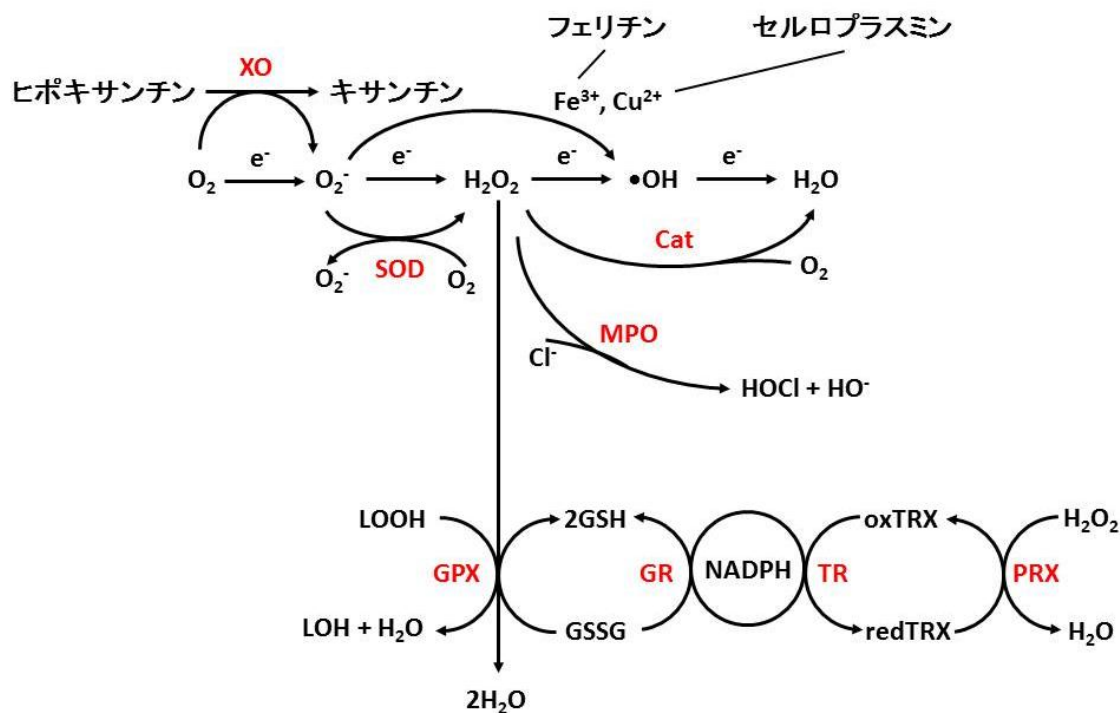


Fig.1-8 ROS 消去系のメカニズム^[18]

XO: キサンチンオキシダーゼ、SOD: スーパーオキシドジスムターゼ、Cat: カタラーゼ、
MPO: ミエロペルオキシダーゼ、GPX: グルタチオンペルオキシダーゼ、
GR: グルタチオンレダクダーゼ、TR: チオレドキシソレダクダーゼ、
PRX: ペルオキシレドキシソ、GSH: 還元型グルタチオン、GSSG: 酸化型グルタチオン、
oxTRX: 酸化型チオレドキシソ、redTRX: 還元型チオレドキシソ

しかし、生体の ROS 消去能力を超えた ROS が生成すると、ROS は脂質、DNA、タンパク質にランダムに攻撃する。連鎖的酸化反応による細胞膜の破壊や DNA の酸化的損傷による点変異、またはタンパクの変性や酵素の失活といった酸化的障害を与える。以下に酵素の抗酸化物質と非酵素の抗酸化物質を示す(Table.1-3)。

Table.1-3 抗酸化物質とその機能

	抗酸化物質	機能
酵素	スーパーオキシドジスムターゼ (SOD)	O ₂ ⁻ 除去
	カタラーゼ	H ₂ O ₂ 除去
	グルタチオンペルオキシダーゼ	H ₂ O ₂ 除去、LOOH除去
	グルタチオン-S-トランスフェラーゼ	LOOH除去
	ペルオキシダーゼ	H ₂ O ₂ 除去
非酵素	ビタミンC	ラジカルの補足 (O ₂ ⁻ , ·OH, ¹ O ₂ , H ₂ O ₂)
	ビタミンE	ラジカルの補足 (脂質の酸化的連鎖反応の 停止)
	グルタチオン	ラジカルの補足 (O ₂ ⁻ , ·OH, ¹ O ₂)
	尿酸	·OH, ¹ O ₂ , HOCl 除去
	アルブミン	·OH, HOCl 除去

1.2.2.1 アスコルビン酸とその誘導体

生体内の必須な抗酸化物質にビタミンがある。不足すると食物から取り込んだ栄養素を生体に必要な物質にうまく転換できなくなり、体に様々な影響を与える。ビタミンは13種類存在し、その性質から脂溶性と水溶性に分類される(Table.1-4)。

Table.1-4 各種ビタミンとその働き

	ビタミンの種類	化学名	主な働き
水溶性	ビタミン B1	チアミン	糖代謝を促進
	ビタミン B2	リボフラビン	エネルギー代謝と物質代謝に関与
	ビタミン B6	ピリドキシン	アミノ酸とタンパク質代謝に関与
	ビタミン B12	コバラミン	赤血球精製や神経細胞の修復
	ビタミン C	アスコルビン酸	抗酸化作用、コラーゲン生成、 メラニンの抑制
	葉酸	プロテイルモノ グルタミン酸	ビタミン B12 と共に赤血球生成や 神経細胞の修復

	ナイアシン酸		糖質・脂質・タンパク質の代謝、 エネルギー産生促進
	ビタミン H	ビオチン	脂肪酸やアミノ酸の代謝の促進
	パントテン酸		脂肪酸など、体の構造成分の合成 と分解を促進、脂肪の代謝
脂溶性	ビタミン A	レチノール	皮膚や粘膜の細胞の正常な文化 を促進、粘膜の産生に関与
	ビタミン D	カルシフェロール	小腸からのカルシウムとリンの吸収 の補助
	ビタミン E	トコフェロール	抗酸化作用 (過酸化脂質の増加を抑制)
	ビタミン K	フィロキニン	血液凝固因子を活性化、骨に存 在するオステオカルシンの活性化

アスコルビン酸(Ascorbic Acid: AA)はコラーゲンの生合成や鉄の吸収促進などの生理作用があり、最も顕著な化学的性質は還元剤(電子供与体)として作用する能力である。この還元作用の範囲は広く、スーパーオキシドアニオンラジカルや過酸化水素、一重項酸素だけでなく、ROS の中でも最も反応性の強いヒドロキシラジカルをも消去する非常に優れた抗酸化物質である。糖尿病動物の組織中では AA レベルが低くなることが報告されているが、これは糖尿病を特徴づける高血糖と過酸化が AA の減少を引き起こしたと考えられている^[20]。このことから AA による抗酸化作用は、病気から生体を守る上で非常に重要な役割をしていることがわかる。

AA の還元機構を Fig.1-9 に示した。AA は 1 個の電子を供与すると、モノデヒドロアスコルビン酸を生成する。これらはさらに酸化されてデヒドロアスコルビン酸(DHA)を生成する。DHA は不安定な構造のため、容易にかつ不可逆的にラクトン環を開き、2,3-ジケト-L-グルロン酸を生成する。その後、非常に複雑な経路を経て速やかに分解し、シュウ酸と L-スレオニン酸になる。また、DHA の分解産物であるシュウ酸は生体にとって好ましいものではないため、グルタチオン(GSH)を用いて DHA を AA へと還元させる機構を有している。

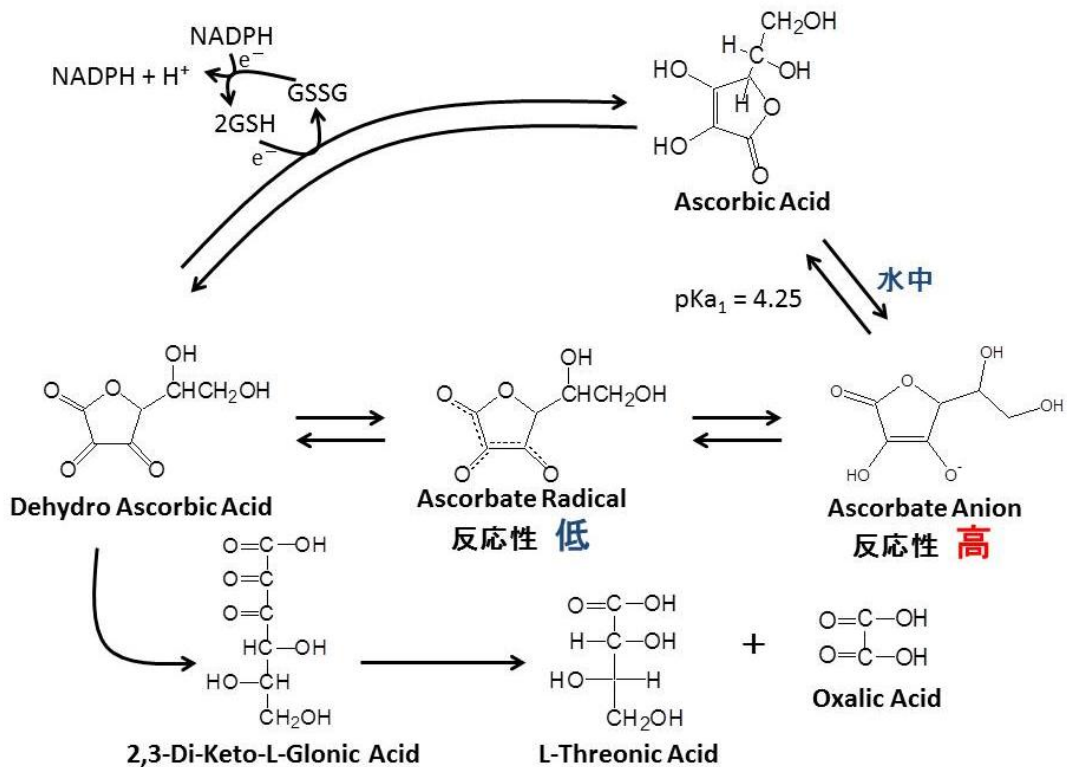


Fig.1-9 AA の抗酸化機構

DHA は AA よりも若干脂溶性であるため細胞外へ取り込まれやすいが、AA 自身は血中でほとんど酸化されないため細胞外では大部分が AA の形で存在し、特異的な輸送メカニズムによって取り込まれる。AA は細胞膜上の SVCT(sodium-dependent vitamin C transporter)という膜輸送体を介して細胞内に取り込まれることが分かっている^{[21][22]}。一方で、DHA の細胞内輸送メカニズムは古くから研究されており、その構造が D-glucose と類似するため、膜上の GLUT(glucose transporter)からも多く取り込まれることが分かっている^{[23][24]}(Fig.1-10)。細胞内に取り込まれた DHA は AA に還元され、抗酸化作用を発揮する。一般に ROS が産生されやすい組織、例えば紫外線の影響を受けやすく ROS が産生しやすいとされる角膜や水晶体、細胞内での主要な ROS 産生源の場であるミトコンドリアなどには抗酸化物質も豊富に含まれている。特に AA の生体内の分布は、脳下垂体、副腎、黄体などで高い。一方、筋組織では低く、膵臓、肝臓、肺、脾臓、胸腺、腎臓はそれらの中間である。

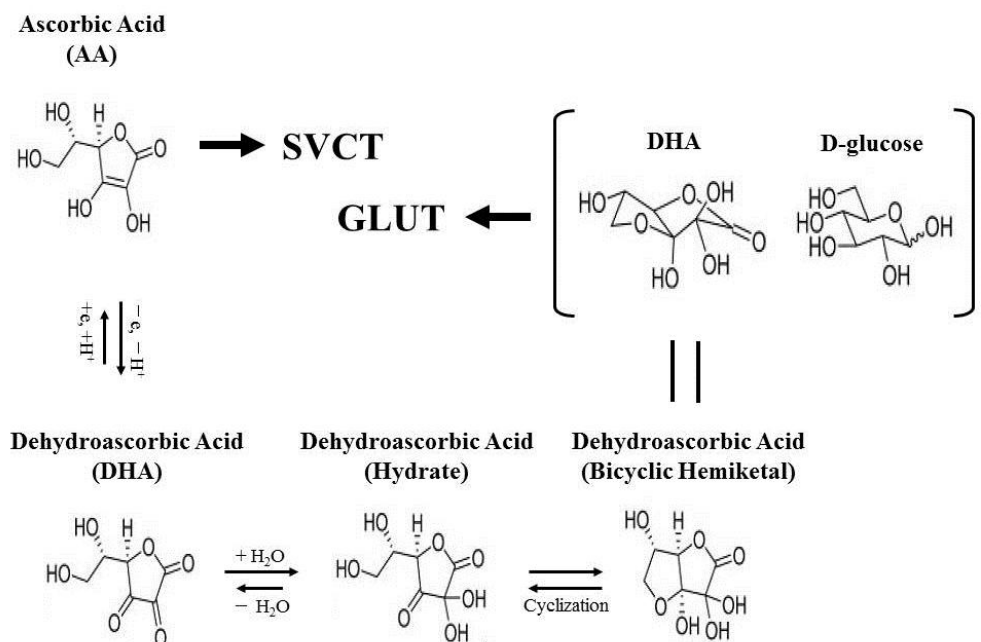


Fig.1-10 AA と DHA の細胞内取りこみ機構

また、アスコルビン酸の誘導体であるアスコルビン酸 2 グルコシド (Ascorbic Acid 2-Glucoside: AAG)は CGTase(cyclomalto-dextrin glucanotransferase)という酵素を触媒に AA と α -シクロデキストリンを混合して反応させることで合成される^[25](Fig.1-11)。AA の 2 位 C に D-glucose がグリコシド結合した構造で、分子量 338.27 の白色の結晶性固体である。

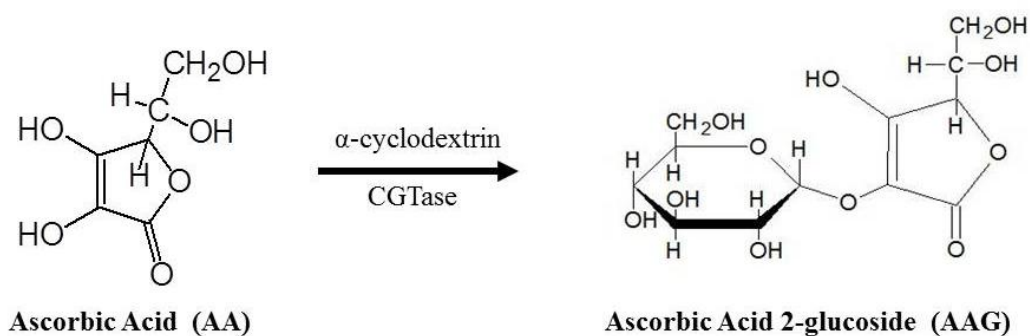


Fig.1-11 Ascorbic acid 2-glucoside (AAG)の合成

AA は安定性が低く、空気に触れることで酸化され、水に溶けるとその活性を失ってしまう。しかし、AAG は AA に比べて熱や酸化、光、重金属に対して極めて安定な物質である。生体内に適応すると細胞や組織に存在する酵素(α -グルコシダーゼ)によって AA と Glucose(ブドウ糖)に分解されることが考えられている。

1.2.2.2 α -トコフェロールとその誘導体

α -トコフェロール(ビタミン E)は生体内細胞膜の酸化を防御する重要な役割を担っている。血管細胞膜の酸化による硬化が進むと血行が悪くなり、肌のつやなどが悪くなると考えられている。 α -トコフェロールの長いアルキル鎖は脂質に溶けるために重要であり、抗酸化作用はフェノール部分が受けもつ。細胞膜中に過酸化脂質ラジカルができた時に、 α -トコフェロールラジカルでも、不対電子が π 共役系に広がることでフェノキシルラジカルの安定化に重要な役割を果たしている。 α -トコフェロールは過酸化脂質ラジカル($\text{LOO}\cdot$)のラジカルを速やかに補足して消去し、フェノール水素原子を渡して、過酸化脂質ラジカルを消去し、自らはフェノキシルラジカルとなる(Fig.1-12)。 α -トコフェロールのパラ位の酸素原子の p 軌道との共役が不対電子軌道の分布を広げ、ラジカルの安定化に寄与している^[16]。

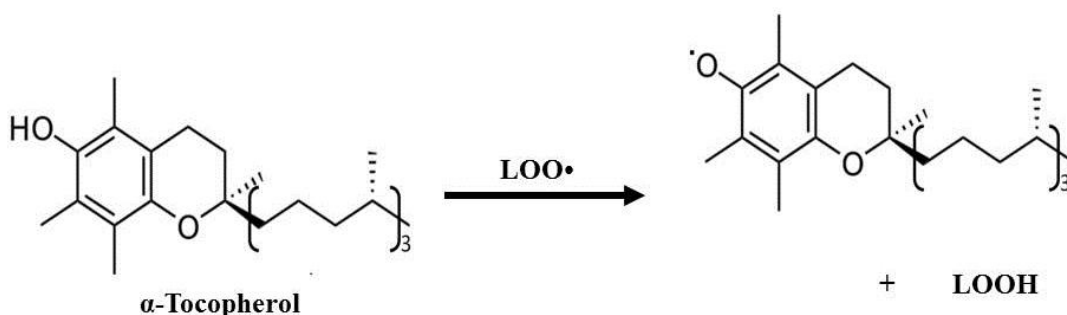


Fig.1-12 α -トコフェロールの抗酸化反応

アスコルビン酸と α -トコフェロールは古くから生体内において重要な抗酸化剤であることが知られていたが、近年、この両者の相乗的抗酸化作用が重要視されている。脂質内で抗酸化反応によって生じた α -トコフェロールラジカルは、その境界面でアスコルビン酸により、元の α -トコフェロールに戻る。すなわち、アスコルビン酸は α -トコフェロールを介在して細胞の酸化反応を防御する役割を果たしている^[16](Fig.1-13)。生体内組織には、一般にアスコルビン酸の方がより多く存している。

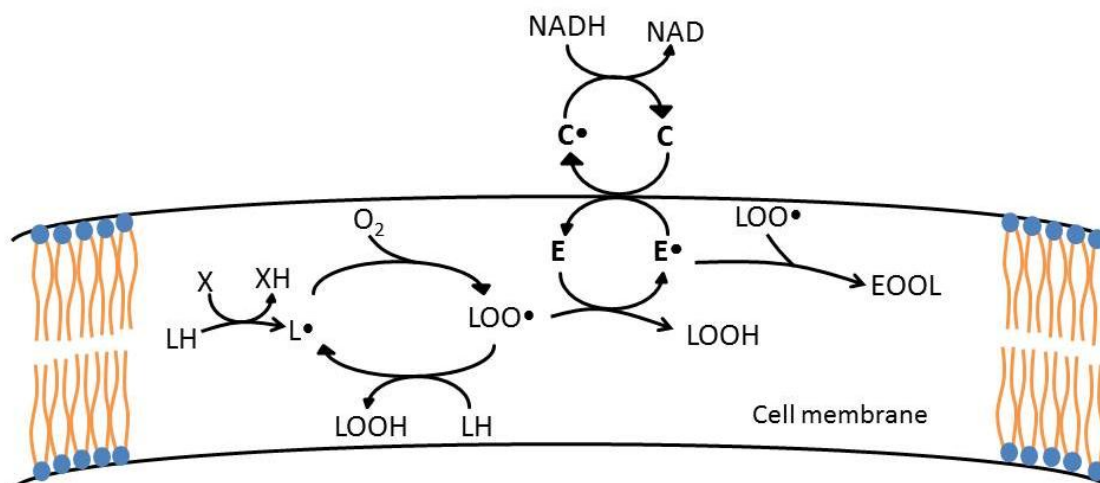


Fig.1-13 アスコルビン酸と α -トコフェロールの相乗的抗酸化作用^[16]

E: α -トコフェロール、C: アスコルビン酸、L: 脂質、
 LOO: 過酸化脂質ラジカル、NAD: ニコチンアミド

また、 α -トコフェロールの誘導体であるトコフェロールモノグルコシド (Tocopherol monoglucoside: TMG)は生体内での安定性が高く、水溶性があり、微量で効果を発揮する(Fig.1-14)。また、透析液の浸透圧に影響しない、蓄積性がない、炎症などを惹起しない、膜障害や腹膜肥厚を抑制するなど腹膜透析療法への応用が期待される物質である。

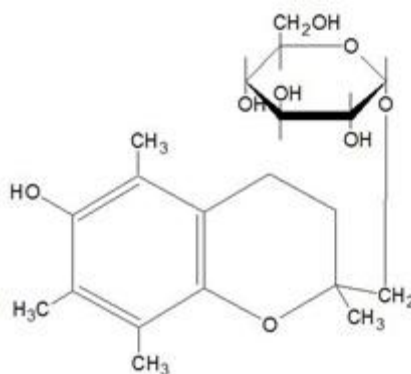


Fig.1-14 TMG の構造

1.3 細胞老化

1.3.1 複製老化

ヒトの正常組織から単離した細胞は、培養環境下で有限の回数分裂した後、増殖能力を失い、増殖を停止する。この有限分裂の限界はヘイフリック限界と呼ばれ、ヘイフリック限界に達し増殖を停止した場合、これは複製老化と呼ばれる。未分化細胞を除いた正常ヒト細胞では、染色体末端テロメアを伸長する酵素であるテロメラーゼを持たないため、合成期(S期)にテロメアを完全に複製することが出来ず、増殖を重ねる結果、テロメアが短小化する(Fig.1-15)。短小化したテロメアはDNA損傷部位を活性化し続け、その結果細胞は増殖を停止する。テロメラーゼを強制発現させた正常細胞では細胞分裂に伴うテロメアの短小化およびDNA損傷部位を活性化させないことから、複製老化はテロメア短小依存の細胞老化であると考えられている^[26]。複製老化によって細胞は、増殖能の低下とともに、細胞の肥大化、pH 6.0条件での β -ガラクトシダーゼ活性の増加やクロマチンの凝縮などの変化を示すことが知られている^[27]。

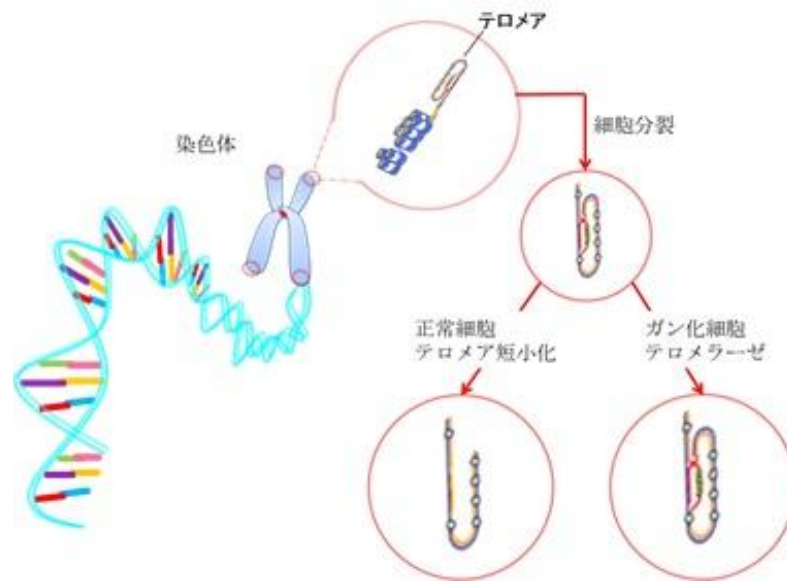


Fig.1-15 テロメア短小化概要

1.3.2 腹膜透析療法と細胞老化

細胞老化には先述した複製老化だけではなく様々なストレスによってテロメア短小に依存しない細胞老化が起こることが知られている。これはストレス誘導性早期老化と呼ばれ、*in vitro* における培養ストレスや酸化ストレス、ガン遺伝子の活性化といった様々なストレスによって誘導される。これらのストレスの内、最も早期老化を誘導するストレスとして注目されているのは酸化ストレスである。

ミトコンドリア電子伝達系でのエネルギー捕捉のためには、酸素分子の 4 電子還元を伴うが、中間産物として反応性が高い活性酸素種が同時に生じる。活性酸素種は過酸化水素やヒドロキシルラジカルなどにも代謝され、生体内の高分子と反応し、細胞に対して様々な機能劣化をもたらす。このような酸化ストレスに対して細胞はグルタチオンなどの抗酸化物質を産出して活性酸素種を除去し、機能劣化を修復するような防御反応を示す。しかし、この防御反応を超過する酸化ストレスが蓄積した場合には、細胞はアポトーシスや老化を示すことが示されている^{[28][29]}。過度な酸化ストレスによって DNA 損傷がより多く蓄積しそれに伴って細胞老化を誘導する p53 タンパク質が活性化されるという報告からも、ストレス誘導性早期老化が酸化ストレスに起因するものと考えられる^[30]。

腹膜透析療法においては浸透圧勾配形成物質として用いられている高濃度の D-glucose 由来のストレス誘導性早期老化が亢進されているものと考えられ、腹膜機能の低下の一因となっている可能性がある^[31]。

2. 目的

腹膜透析排液中には腹膜を構成する腹膜中皮細胞(Human Peritoneal Mesothelial Cells: HPMC)が含まれていることが分かっている。透析液の主成分である D-glucose は非生理的な濃度であることから、HPMC が過剰な酸化ストレスを受けて透析排液中に剥離してきていると考えられる。そこで、本研究では、排液中に剥離してきた HPMC を分離し、キャラクターゼーションを行うことで、患者の腹膜状態を診断、または抗酸化物質の添加により新規腹膜透析液の開発への応用を目的に実験を行った。

3. 方法

本研究で使用した試薬・機器に関する詳細なデータ、プロトコールに関しては、10. APPENDIX に示した。

3.1. 腹膜透析排液(PDE)からのヒト腹膜中皮細胞(HPMC)の分離

3.1.1. PDE の入手

本研究で使用した腹膜透析排液は、予め本学医学部倫理委員会によって患者の腹膜透析排液の採取につき、承認を得て informed consent を得た患者から頂いている。透析液の交換の際に腹腔内から排液したバッグから細胞を採取した。

3.1.2. HPMC の採取と培養

実験に使用した腹膜透析患者は男性 12 名、女性 2 名であり、平均年齢は 71.56 (50-84)才、透析期間は 29.64 (1-71)ヶ月である。全患者情報は以下の Table.3-1 に示す。

Table.3-1 腹膜透析患者情報

* 他界

Patients ID	A	B	C*	E*	H	N	O	Q	R	S	T	U	V	W
Sex	M	M	M	M	M	M	F	F	M	M	M	M	M	M
Age	83	78	69	62	83	50	68	68	71	75	71	41	73	59
CAPD duration (month)	39-71	11-41	24-27	4	2-16	37-50	20	1-2	1-5	36	1	1-3	1	12
Dialysate	①② ③	①③	①③	①② ③	①③	①③	①③	①	①③	②	①	①	①	①
Amount of dialysate	1500, 2000	1500, 2000	1500	1500	1500	1500, 2500	1500	1000	1500	1500	1500	1500	1500	1500
Number of PDE collected	22	24	4	3	5	13	2	4	8	1	2	3	1	1

①Dianeal N PD-2 1.5 (Baxter) ②Dianeal N PD-2 2.5 (Baxter) ③Extraneal (Baxter)

<細胞分離・培養方法>

腹膜透析排液バッグに濾過滅菌した 5.0mmol EDTA / 5mL NaCl Solution (最終濃度 2.5mmol / L)をバッグのカテーテルからシリンジと針を用いて無菌的に加え、排液全体に広がるようによく振り混ぜた。透析排液を遠心ボトル (TA-18)に移し、800r.p.m で 10 分間遠心分離した。上澄みを取り除き、30mL ほどを遠心管に移して再度遠心分離をかけ、1mL の細胞懸濁液になるまで行った。その後、血球計算盤を用いて細胞数をカウントし、プラスチック培養用 φ35mm シャーレに播種し、細胞培養用培地 10% FBS/M199 で培養した。培地は 2,3 日に置きに交換した。

排液由来 HPMC の詳細な分離方法および使用器具・試薬は、APPENDIX に示した。

3.1.3. 外挿法による初期接着細胞数の算出

腹膜透析排液由来細胞は φ35mm シャーレで培養し、増殖の様子を位相差顕微鏡(CK2, Olympus, Tokyo, Japan)で観察し、デジタルカメラ CAMEDIA C-3040 ZOOM にてランダムに4ヶ所撮影し、PCに取り込んだ(Fig.3-1)。継時的に画像を撮影し、細胞数をカウントすることで、グラフを作成し、その片対数座標上の切片から初期接着細胞数を算出した(Fig.3-2)。

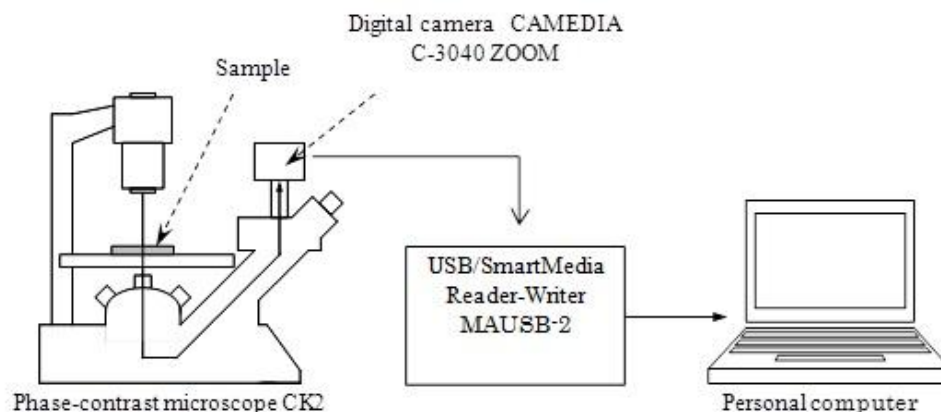


Fig.3-1 画像取り込みダイアグラム

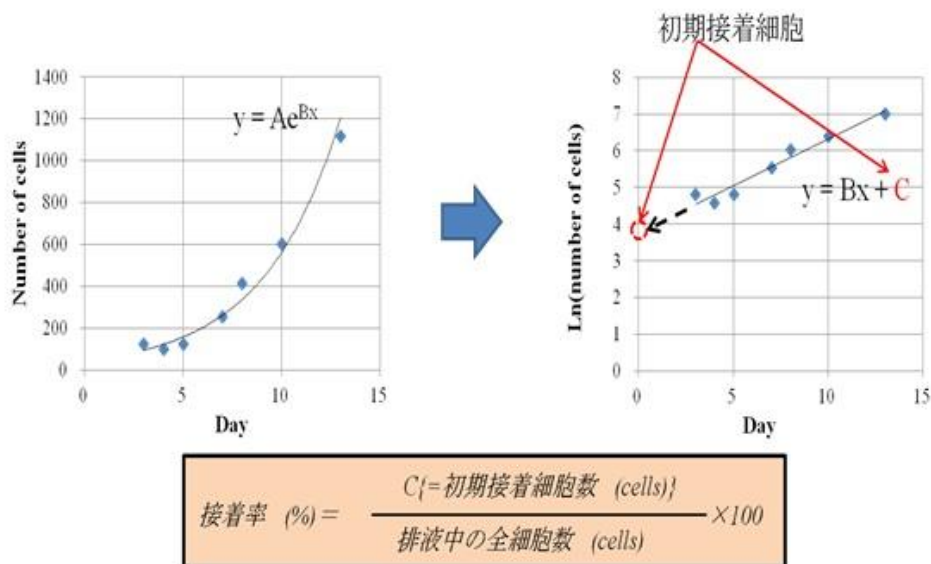


Fig.3-2 初期接着細胞数の算出方法

3.2. 間葉系幹細胞(MSC)の培養

本研究で使用した間葉系幹細胞(MSC)は、理化学研究所バイオリソースセンターから購入した MSC を用いた。5000cells/cm² で細胞を播種し、培地に 3ng/μL bFGF を添加した 10% FBS/DMEM を用いて φ35mm シャーレで培養した。培地は 3 日に 1 回交換した。

3.2.1. 抗酸化物質添加培地の調整

添加した各抗酸化物質の濃度は以下の Table.3-2 に示した。

Table.3-2 培地に添加する抗酸化物質の濃度

	添加する AAG 濃度	添加する TMG 濃度
Control	-	-
AAG	25μM	-
	250μM	-
TMG	-	5μM
	-	50μM

3.3. 腹膜透析排液由来腹膜中皮細胞(PDE-HPMC)の細胞老化測定

老化細胞の染色は老化関連 β-galactosidase (Senescent-Associated β-Galactosidase: SA-β-Gal) 染色キット (Sigma, Saint Louis, USA) を用いて行った。

老化細胞では、pH 6.0 における β-Galactosidase 活性が増加しているため、β-Galactosidase に反応する基質の X-Gal を加え、X-Gal の加水分解を触媒し、青色に呈色することで老化細胞の検出を行う。

腹膜透析排液由来腹膜中皮細胞(PDE-HPMC)はセルディスク上で培養後、培地を吸引し、PBS で洗浄し、固定液により細胞を固定した。固定液を取り除き、再び PBS で洗浄した後、Staining Mixture を添加し、細胞が青色を呈するまで 37°C で約 15 時間インキュベートした(CO₂ 非存在下)。染色後、位相差顕微鏡で細胞を観察し、染色された細胞と細胞数をカウントすることで SA-β-Gal 陽性細胞率を算出した。

詳細は 10. APPENDIX に記した。

3.4. PDE-HPMC の細胞内 ROS の測定

3.4.1. 過酸化水素による DCF 感受性—細胞内 ROS の測定

蛍光プローブ(DCFH-DA: 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate)を用いて、細胞内の ROS 生成状態を観察した。DCFH-DA は細胞膜を通過し細胞内に存在する酵素のエステラーゼによって DCFH へと脱アセチル化される。DCFH は ROS により速やかに酸化され蛍光物質の DCF を合成する(励起波長 502nm、蛍光波長 520nm)^{[52][53]}。ROS 生成のポジティブコントロールとして過酸化水素を用い、DCF 感受性-細胞内 ROS 測定法のプロトコールを作成した。

<方法>

セルデスク上でPDE-HPMCをコンフルエントまで培養し、測定を行った。終濃度 0.1mM 過酸化水素と終濃度 10 μ M DCFH-DA を同時に曝露し、暗所・室温下条件で 15 分静置した後に測定を行った。測定は走査型共焦点レーザー顕微鏡で行い、1well につき、ランダムに 4 ヶ所撮影をした。

走査型共焦点レーザーの設定条件は以下に示した。

<共焦点レーザー顕微鏡の条件設定>

Table.3-3 走査型共焦点レーザー顕微鏡の測定条件

蛍光フィルター	NIBA
Dyelist	Alexa Fluor 488
検出器の感度調節 (HV)	650HV
Gain	1x
Offset	0%
レーザーの出力の調整 (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	2.0us / Pixel
画像サイズ	1:1, 512by
対物レンズ	x 10, x 20

3.4.2. 抗酸化物質添加による DCF 感受性—細胞内 ROS の測定

セルデスク上で PDE-HPMC を抗酸化物質添加培地で 1 週間培養した。添加した抗酸化物質は 250 μ M の Ascorbic Acid 2-glucoside(AAG)、5 μ M の Tocopherol monoglucoside(TMG)である。また、それぞれの濃度依存測定を行った場合には、AAG が 25 μ M、125 μ M、250 μ M、TMG が 0.05 μ M、0.5 μ M、5 μ M、50 μ M である。その後、終濃度 0.1mM 過酸化水素と 10 μ M DCFH-DA を同時に曝露し、暗所・室温条件下で 15 分静置した後に測定を行った。測定は走査型共焦点レーザー顕微鏡で行い、1well につき、ランダムに 4ヶ所撮影をした。

走査型共焦点レーザー顕微鏡の設定条件は Table.3-3 と同様に設定した。

3.4.3. 細胞内 ROS の定量化

撮影した画像は画像解析ソフト(Image J)を用いて数値化した。Image J に画像を取り込み、カラースケールの画像をグレースケールにし、バックグラウンド補正を行い、バックグラウンドの輝度を 0 にした。その後、Threshold を設定し、細胞 1 つずつの解析を行った。

得られた数値の平均化を行い、それを 1 サンプルにつき 4 枚ずつ行い、これを 1 サンプルの蛍光強度とした。

詳細は 10. APPENDIX に記した。

3.5. PDE-HPMC の Cytokeratin-18, α -SMA 発現測定

PDE-HPMC の特異タンパク発現は免疫化学蛍光染色により測定を行った。特異タンパクとして中皮細胞マーカーである Cytokeratin-18 および間葉系マーカーである α -SMA に着目した。免疫化学蛍光染色は生体材料化学研究室の共通のプロトコールに従って行った。ここではその概略を記す。

PDE-HPMC をセルデスク上でサブコンフルエントまで培養し、培地を吸引し、PBS で洗浄した後、アセトン/メタノールにより固定した。次に、1%BSA/PBS でブロッキングし、希釈倍率 1 : 200 で希釈した Anti-cytokeratin-18 mouse mono antibody (Funakoshi, Japan) 及び anti-human smooth muscle actin antibody (Dako, Glostrup, Denmark) の一次抗体溶液を添加し、4℃で overnight 反応させた。その後、1%BSA/PBS で 3 回洗浄し、希釈倍率 1 : 200 で希釈した二次抗体 Goat anti-mouse IgG(H+L) FITC conjugate antibody (Millipore, MA, USA) と反応させた。サンプルは走査型共焦点レーザー顕微鏡(Fluoview FV1000, Olympus, Tokyo, Japan)により観察した。タンパク発現率はそれぞれランダムに撮影された画像から少なくとも 100 個の細胞数をカウントすることにより測定した。

また、走査型共焦点レーザー顕微鏡の蛍光の測定は以下の設定で行った。

Table.3-4 走査型共焦点レーザー顕微鏡の設定値

Dylist	NIBA WIG
検出器の感度調節 (HV)	650HV
Gain	1x
Offset	0%
レーザーの出力の調整 (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
スキャン速度	2.0us / Pixel
画像サイズ	1:1, 512by
対物レンズ	x 10, x 20

3.6. 二次元電気泳動

二次元電気泳動は生体材料化学研究室の共通プロトコールに従い、行った。ここでは、簡潔にその概要を示す。詳細は 10. APPENDIX を参照。

3.6.1. タンパク抽出

φ35mm シャーレでコンフルエントまで培養した PDE-HPMC を PBS で 2 回洗浄し、PBS を 1mL 入れた状態でセルスクレーパーをして細胞を集め、5000rpm/4°C で 5 分遠心分離させた。その後、上澄みの PBS を完全に取除いて細胞の質重量を量り、その質重量に対して 4 倍量のタンパク抽出液を加えた後、氷冷下で超音波破碎し、15000rpm/4°C で 20 分遠心分離した。

この上澄みを採取し、試料とした。

3.6.2. 一次元目電気泳動

前日にゲル膨潤液で膨潤させておいた一次元目のゲルストリップ (Immobiline DryStrio pH4-7NL, 18cm) を取り出し、一次元目ゲル電気泳動槽にセットし、Milli-Q を染み込ませた電極用ろ紙を一次元目のゲルストリップゲルの両端にセットした。試料塗布用ろ紙に抽出した試料を染み込ませ、電極用ろ紙の 1mm 離れた場所にセットした後に、白金線の付いた電極とサンプルアタッチメントを取り付けた。その後、空気との遮断のため、シリコンオイルを約 150mL~200mL 流し込んだ。

電源装置とつなぎ、プログラム通り 18 時間の等電点電気泳動を行った。

等電点電気泳動のプログラムは以下に記した。

Table.3-5 等電点電気泳動の電圧値プログラム

ステップ	モード	設定電圧	設定電流	時間
1	V	500V	250mA	2:00M
2	SG	3500V	2mA	6:00M
3	SV	3500V	2mA	10:00M
4	SV	3500V	2mA	∞

3.6.3. 二次元目電気泳動

一次元目の泳動が終わったゲルストリップを前日に作って置いた SDS 処理液に入れ、30 分間振とうさせた後に、次にアルキル化処理液に入れ 15 分間振とうさせた。

その間に、10%アクリルアミドゲルを二次元目電気泳動槽にセットした。

アルキル化が終了したゲルストリップの端を切り取り、二次元目のアクリルアミドゲルの上にゲル面が内側になるように載せ、ゲルが浮き上がらないようにゲルストリップの上にシャークコームを載せた。

Tris-Glycine バッファーを陽極、陰極の両方に同じ高さになるように入れた。その後、電源装置とつなぎ、最初は 20mA、その後は 30~40mA の定電流で電気泳動を行った。

3.6.4. Flamingo による蛍光染色および画像解析方法

Flamingo ゲルステインは、翻訳産物であるタンパク質を解析する 1 つのツールである。二次元電気泳動で得たゲルを固定液で浸し、30 分振とうした。Milli-Q で 3 回洗浄した後、10 倍希釈した Flamingo 染色液でゲルを浸し、1 時間振とうさせた。染色が終わり次第、Milli-Q で 1 回洗浄し、予め準備してあったクリアファイルに挟み、遺伝子実験施設の蛍光撮影機によりスポット検出を行った。

二次元電気泳動を行って得られたゲルを解析するため、フルオロホレスター3000 Ver3.1 を用いて画像解析を行った。また、2 つのゲル染色画像をマッチングさせて比較するため、Progenesis PG200/PG220 解析ソフトウェアを使用した。

3.7. 統計処理

統計的な有意性は StatView®-J 5.0(SAS 社)を使用した。Control に対する優位性を出す際には、t 検定(対応あり)で試験を行い、Control 以外のデータの比較の際には、t 検定(対応なし)で試験を行うことで確率値(P 値)の算出を行い、P 値<0.05 を有意とした。

4. 結果

4.1 腹膜透析排液由来細胞の初期接着率および細胞の形態観察

4.1.1 初期接着率の算出

腹膜透析排液から分離した細胞のうち、培養用シャーレに接着した細胞の割合は $3.1 \pm 3.1\%$ であった(Fig.4-1)。

また、分離し接着した細胞は正常組織から分離した腹膜中皮細胞と同様な玉石状の形態を示す細胞が多く確認された(Fig.4-2)。

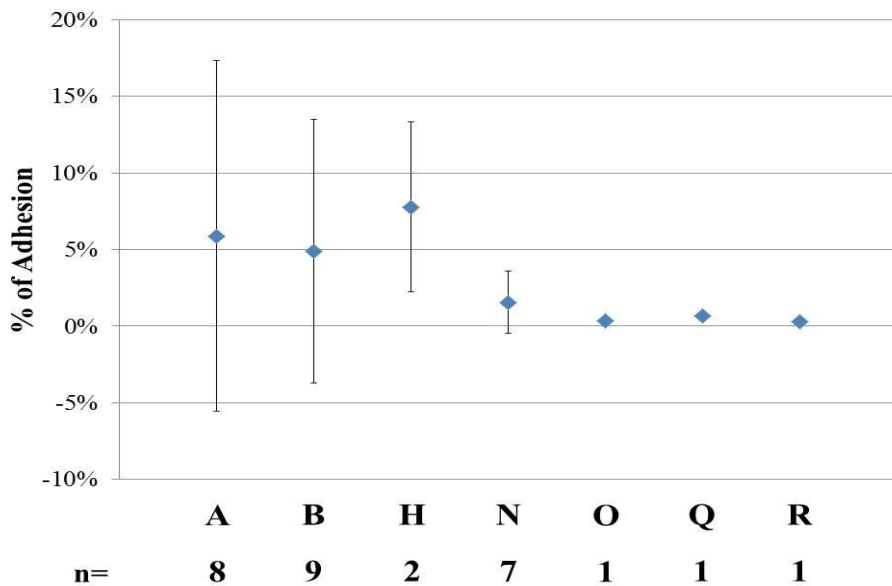
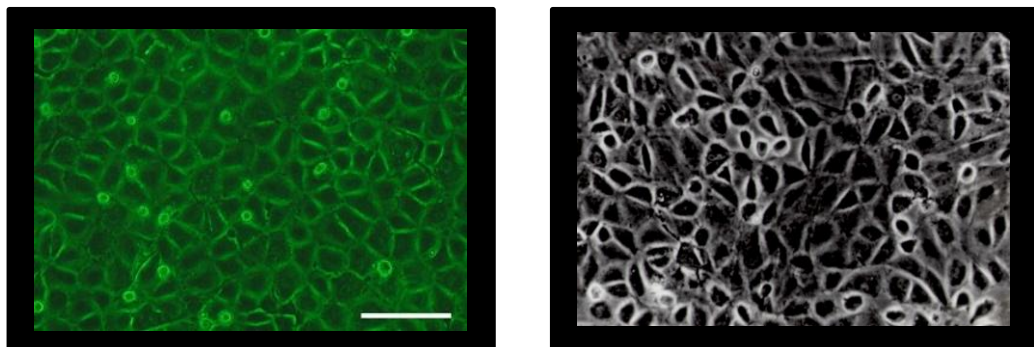


Fig.4-1 PDE-HPMC の初期接着率



PDE-HPMC

正常組織由来 HPMC

Fig.4-2 PDE-HPMC と組織由来 HPMC の形態比較
(Scale bar: 200 μ m)

4.1.2 細胞の形態観察および既報データとの比較

腹膜透析排液から分離し接着した細胞は玉石状の形態を示す細胞が多く見られた。既報^[32]では、透析期間が長期になるにつれて、線維芽様の形態を示す細胞が多く存在していると報告されている(Fig.4-3)。しかし、本研究では透析期間が長期になっても玉石状の形態を維持していた。

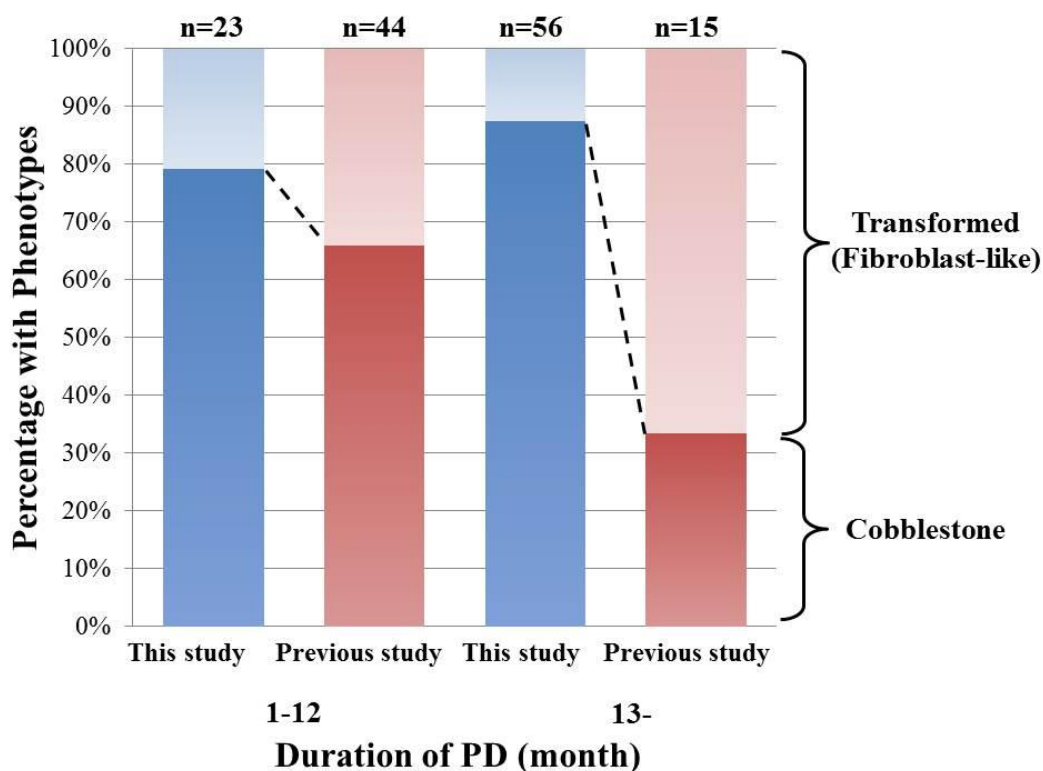
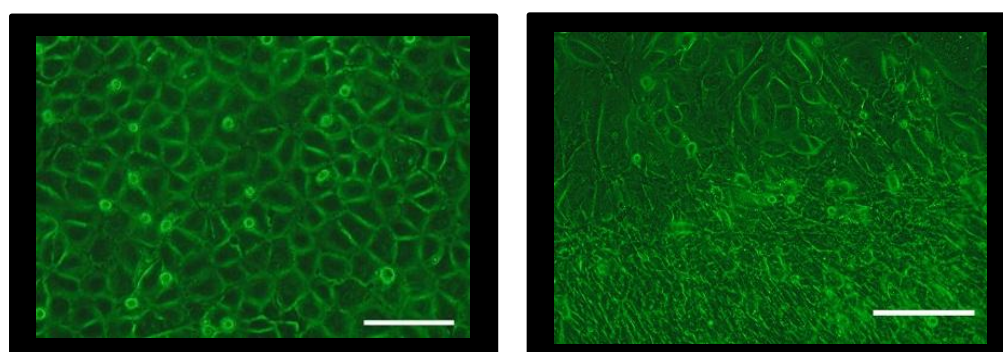


Fig.4-3 CAPD 期間による PDE-HPMC の形態変化



Cobblestone-like Morphology

Fibroblast-like Morphology

Fig.4-4 PDE-HPMC の細胞形態写真
(Scale bar: 200μm)

以上の結果は共同研究者(原 拓也)と共に行った。

また、3 回に 1 回の割合で酸性透析液の Extraneal を使用している患者群と中性透析液のみを使用している患者群別にグラフ化すると酸性透析液を使用した患者群でのみ線維芽様の形態を示す細胞の存在が確認された (Fig.4-5)。

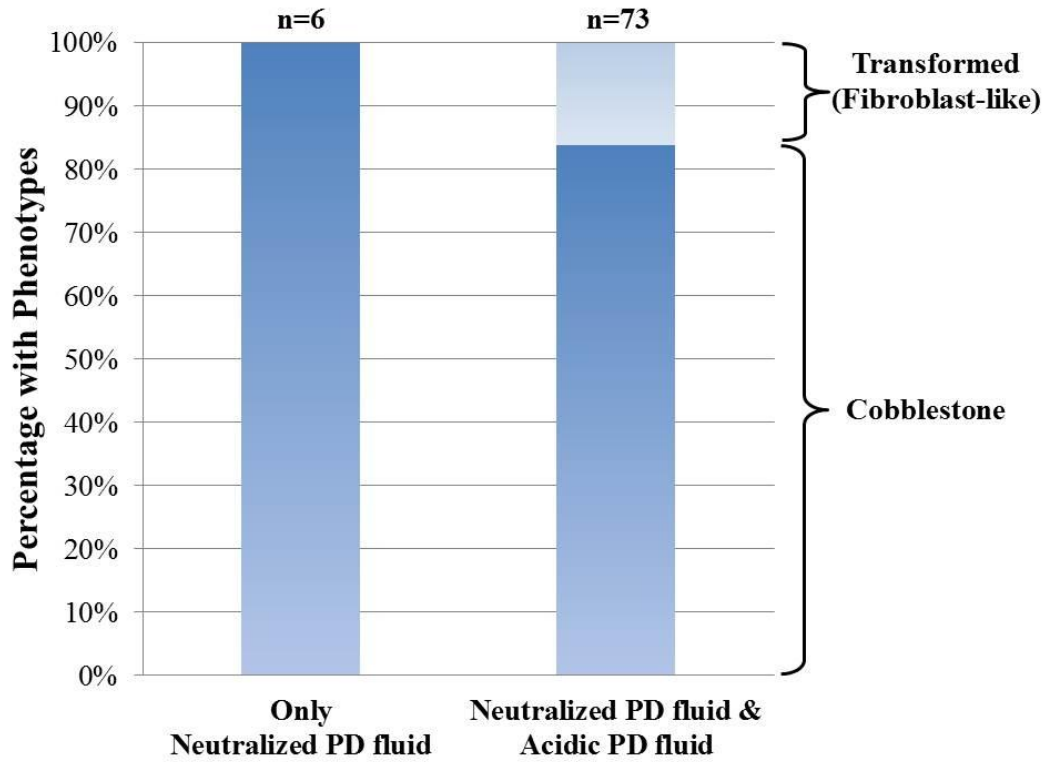


Fig.4-5 使用透析液の違いによる PDE-HPMC の形態変化

さらに患者別に Fig.4-5 の結果を再グラフ化すると、亡くなった患者、または腹膜透析を離脱した患者で線維芽様の形態を示す細胞が多く確認されていることが示された(Fig.4-6)。グラフは、黄色の棒グラフ(左の 2 本)が中性透析液のみの使用者であり、C, E が他界した患者、O のサンプルは入院中の排液であった。

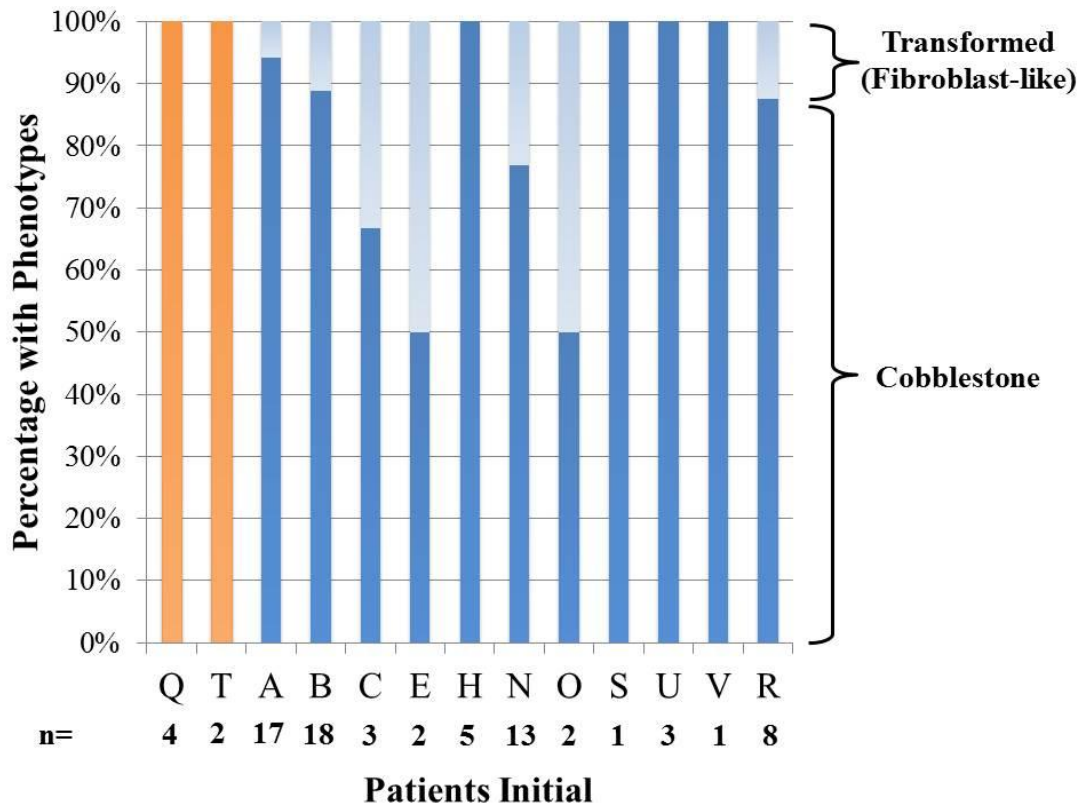


Fig.4-6 患者の違いによる PDE-HPMC の形態変化

4.2 細胞老化測定

4.2.1 MSC での継代時の SA-β-Gal 染色

老化細胞において、pH 6.0 で特異的に酵素活性を示す β-galactosidase(SA-β-Gal) で老化細胞の染色を行った。pH 6.0 で β-galactosidase 活性は老化細胞で容易に検出できるが、静止状態、不死化、腫瘍細胞においては検出されない。

MSC は継代を重ねるごとに SA-β-Gal 陽性率が増加した。また、細胞の肥大化が観察された。

P8, P15 において、AAG, TMG 添加での減少する傾向が見られた(Fig. 4-7)。

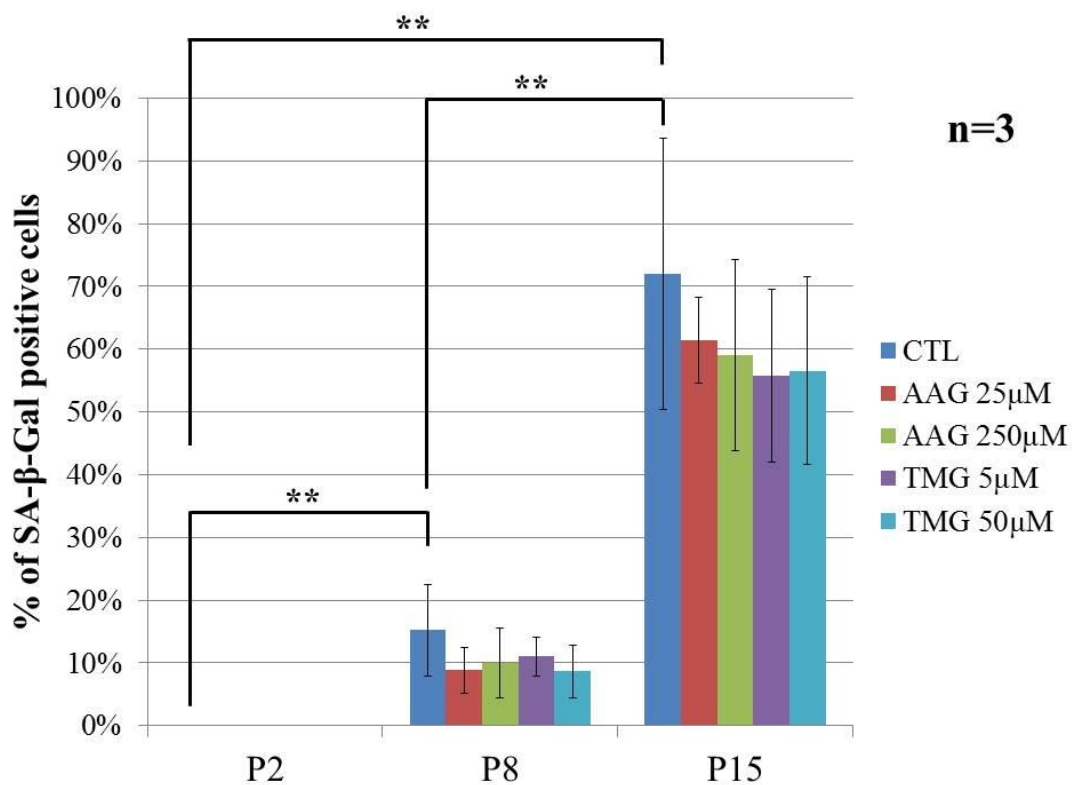


Fig.4-7 MSC での継代時の SA-β-Gal 陽性率
Tukey-Kramer; **: P<0.01, *: P<0.05

4.2.2 Senescence-Associated β -Galactosidase (SA- β -Gal)染色

老化細胞において pH 6.0 で特異的である老化関連 β -galactosidase (SA- β -Gal)は P0 で染色を行い、患者毎の発現率をまとめた(Table.4-1)。SA- β -Gal 陽性細胞が確認され、PDE-HPMC 中には老化が進行した細胞が存在することが示された。

Table.4-1 患者毎の SA- β -Gal 陽性率

Patients ID	Age (years)	CAPD duration (months)	SA- β -Gal (%)
A	83	53-71	19.07 \pm 12.36 (n=9)
B	77	27-41	27.45 \pm 22.89 (n=12)
H	83	13-16	21.06 \pm 12.11 (n=3)
N	50	45-50	26.49 \pm 31.17 (n=6)
Q	68	1-2	4.36 \pm 2.11 (n=4)
R	71	1-5	12.65 \pm 3.83 (n=8)
U	41	3	8.38 (n=1)

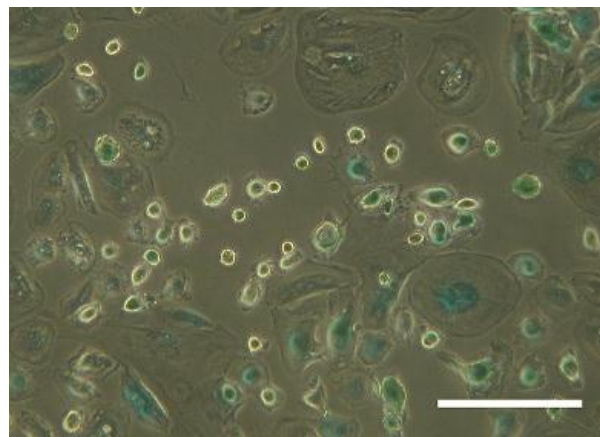


Fig.4-8 SA- β -Gal 染色画像
(Scale Bar; 200 μ m)

4.2.3 CAPD 期間との相関

また、CAPD 期間を 12 ヶ月以下と 13 ヶ月以上で分けて、患者平均の平均化を行い、比較すると、CAPD 期間が増加するに従って発現率が有意 ($p<0.01$)に増加した(Fig.4-9)。長期間の腹膜透析液の曝露により、細胞の老化が生じている可能性が示唆された。

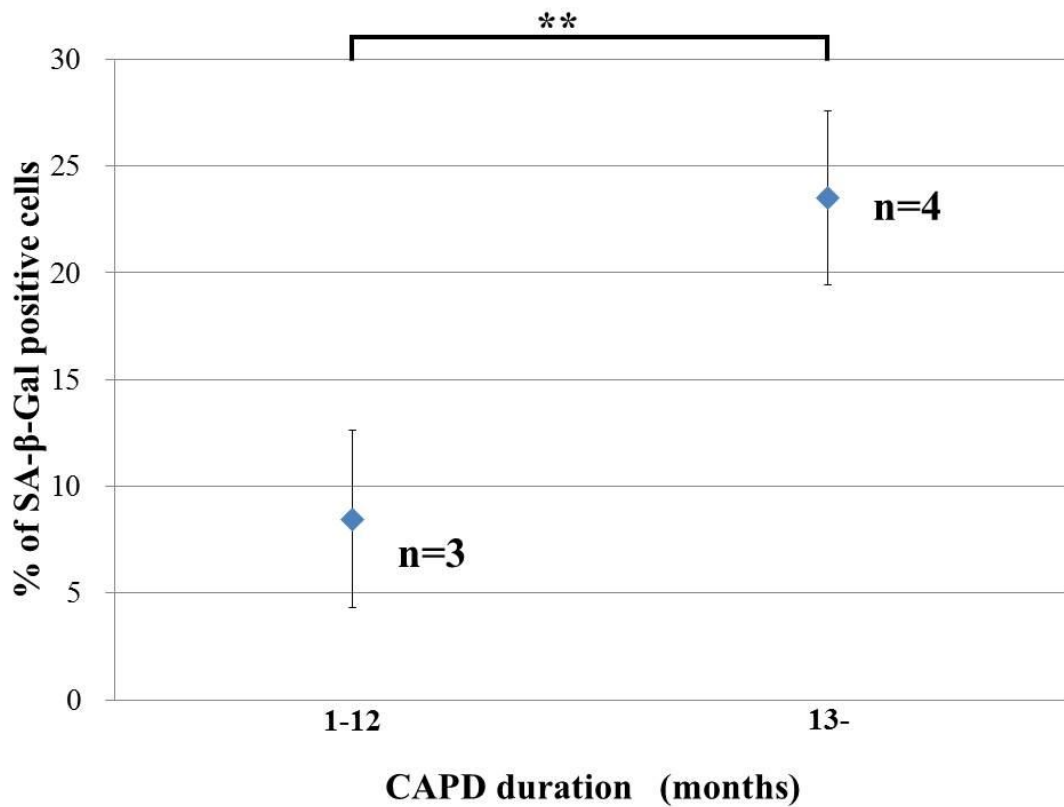


Fig.4-9 CAPD 期間別での SA-β-Gal 陽性率の比較
Tukey-Kramer; **: $P<0.01$, *: $P<0.05$

4.3 細胞内 ROS 測定

4.3.1 過酸化水素による DCF 感受性-細胞内 ROS 測定

下図(Table.4-2)に 0.1mM の過酸化水素による DCF 感受性-PDE-HPMC 内 ROS 測定の結果を示す。患者ごとに蛍光強度の変動が見られる。

Table.4-2 0.1mM H₂O₂ による DCF 感受性—細胞内 ROS 測定

Patients ID	Age (years)	CAPD duration (months)	Fluorescence Intensity
A	83	59-71	21.6 ± 15.3 (n=5)
B	77	29-41	21.5 ± 17.8 (n=9)
N	83	50	27.0 (n=1)
Q	50	1-2	10.7 ± 6.0 (n=4)
R	68	1-2	10.8 ± 1.1 (n=4)
T	71	1	19.3 (n=1)
U	41	2	22.6 (n=1)

4.3.2 CAPD 期間との相関

CAPD 期間を 12 ヶ月以下、13 ヶ月以上で分けて患者平均の平均化を行い、蛍光強度を比較すると、CAPD 期間が増加するにつれて蛍光強度の増加する傾向が見られた(Fig.4-10)。つまり、CAPD 期間に依存して抗酸化能が低下するということが示唆された。

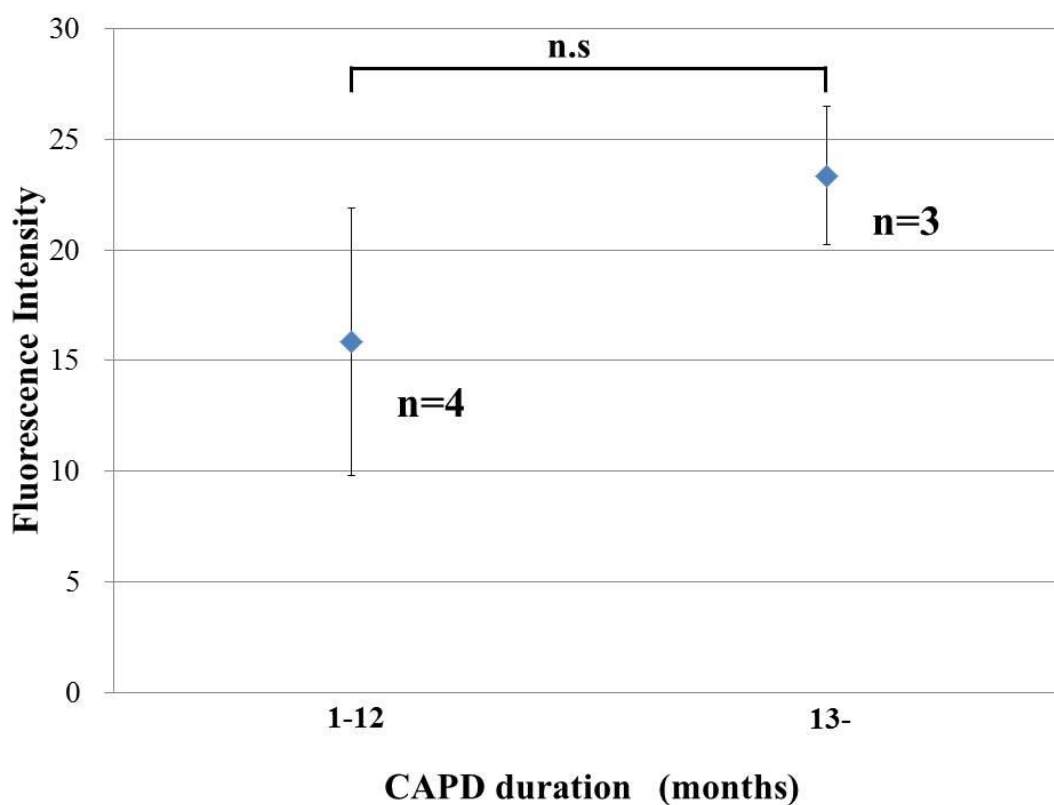


Fig.4-10 CAPD 期間別での蛍光強度の比較
Tukey-Kramer; **: P<0.01, *: P<0.05, n.s: Not Significant

4.3.3 抗酸化物質(AAG)の濃度依存測定

活性酸素産生抑制効果を持つ抗酸化物質(AAG)の濃度依存の測定を行った結果を以下(Fig.4-11)に示す。横軸は対数軸である。濃度は、2.5 μ M, 25 μ M, 125 μ M, 250 μ M の4条件での測定を行った。

AAG は濃度依存的な効果が示されており、受動輸送の可能性が示唆される。

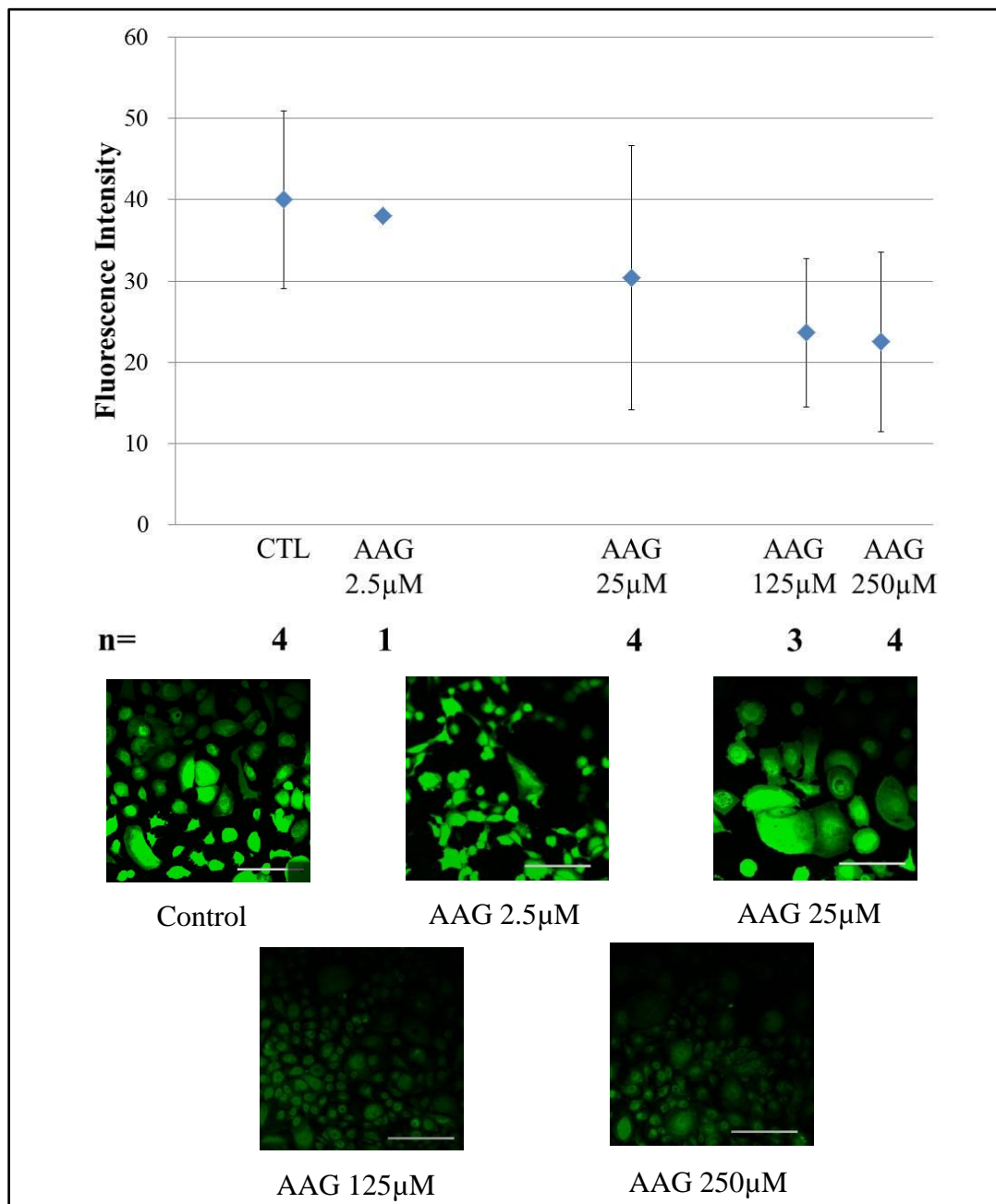


Fig.4-11 AAG の濃度依存別細胞内 ROS 測定 (Scale bar: 200 μ m)

Tukey-Kramer,**: P<0.01, *: P<0.05

4.3.4 抗酸化物質(TMGS)の濃度依存測定

抗酸化物質(TMGS)の0.05 μ M, 0.5 μ M, 5 μ M, 50 μ M, 500 μ Mの5条件で濃度依存測定を行った(Fig.4-12)。横軸は対数軸をとり、グラフ化してある。

TMGSは、0.05 μ Mの非常に低濃度でも効果が示され、それ以降も同程度の効果が示された。

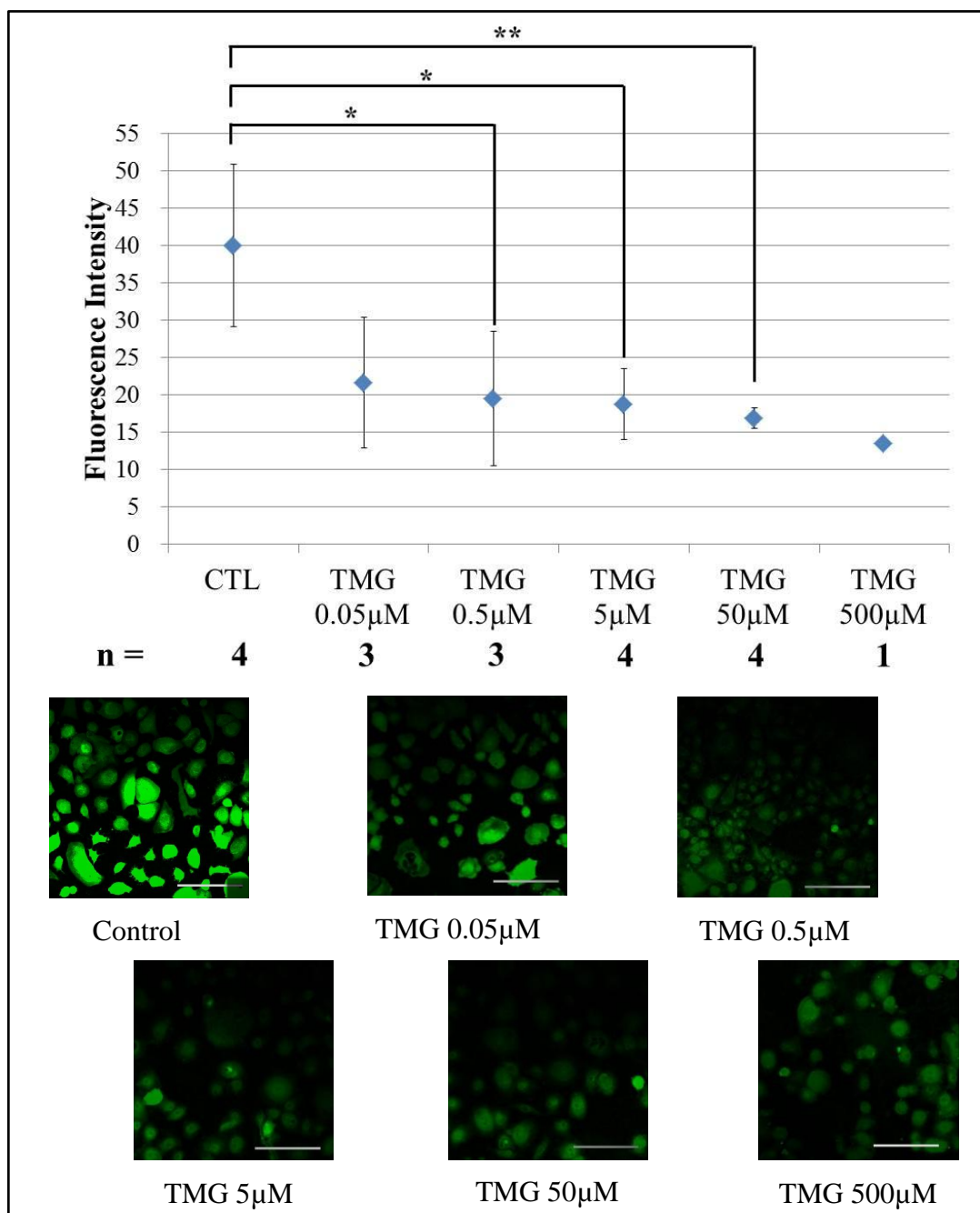


Fig.4-12 TMGSの濃度依存別細胞内ROS測定 (Scale bar: 200 μ m)

Tukey-Kramer; **: P<0.01, *: P<0.05

4.4 Cytokeratin-18, α -SMA タンパク発現

本結果(Cytokeratin-18, α -SMA タンパク発現)は共同研究者(原 拓也)と共に
行った結果である。

4.4.1 Cytokeratin-18 タンパク発現

PDE-HPMC は中皮細胞マーカーである Cytokeratin-18 タンパクを患者、
サンプルに関することなく $98.2 \pm 2.2\%$ の割合で発現が確認された(Fig.4-13)。
この結果より、PDE-HPMC が腹膜中皮細胞であることが示されている。

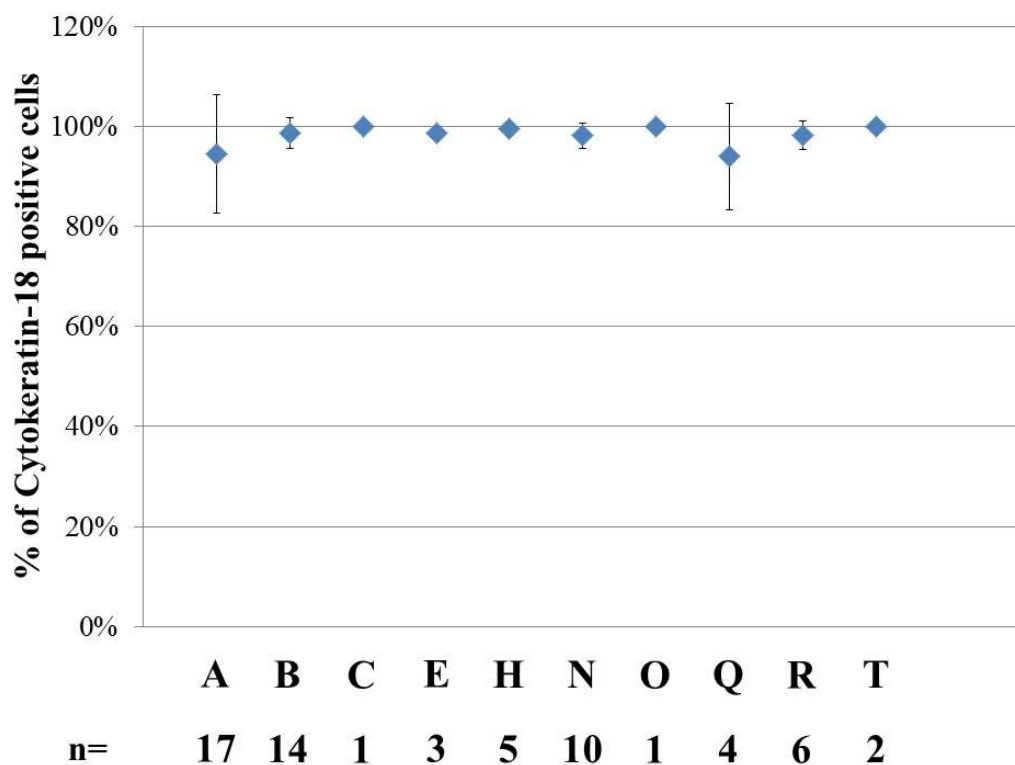


Fig.4-13 患者別 Cytokeratin-18 タンパク発現

4.4.2 α -SMA タンパク発現

間葉系マーカーである α -SMA タンパクは PDE-HPMC で $28.2 \pm 10.7\%$ の細胞で発現みられた(Fig.4-14)。このことより、PDE-HPMC 中には上皮-間葉系形質変換(Epithelial to Mesenchymal Transition: EMT)を受けた細胞が混在していることが示された。

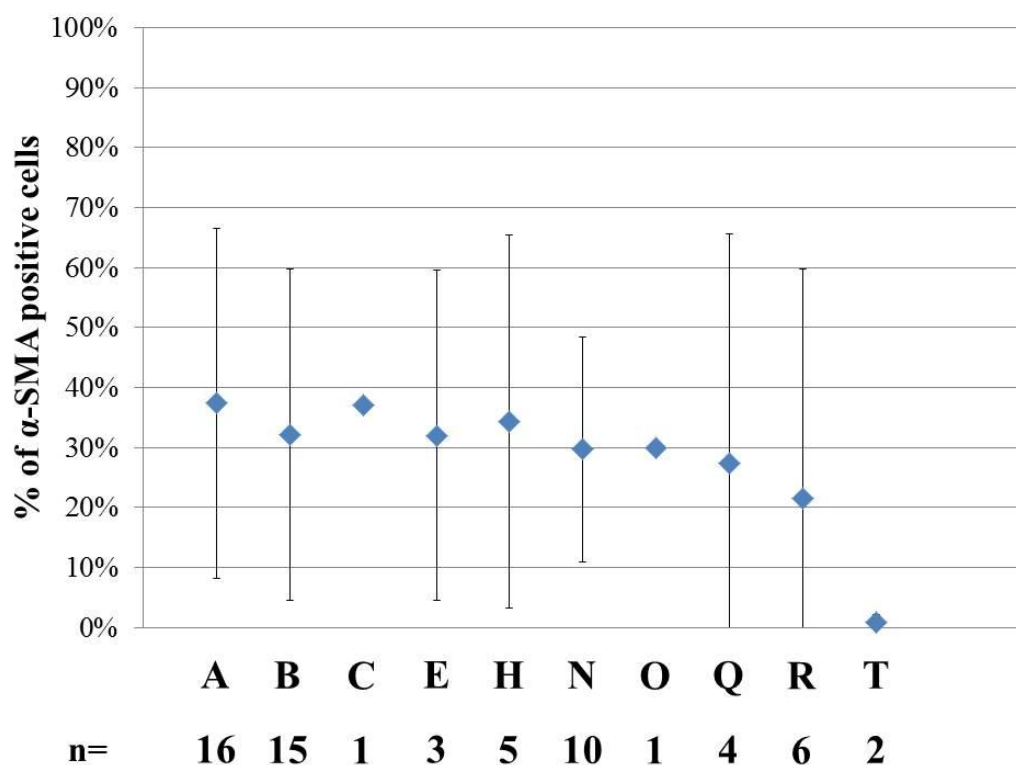


Fig.4-14 患者別 α -SMA タンパク発現

4.4.3 CAPD 期間との相関

また、透析期間を 12 ヶ月で分けて α -SMA タンパク発現をみると、陽性率は変化しないということが示された(Fig.4-15)。透析液の酸化ストレスを受け、継続的に EMT が生じている可能性が示唆された。

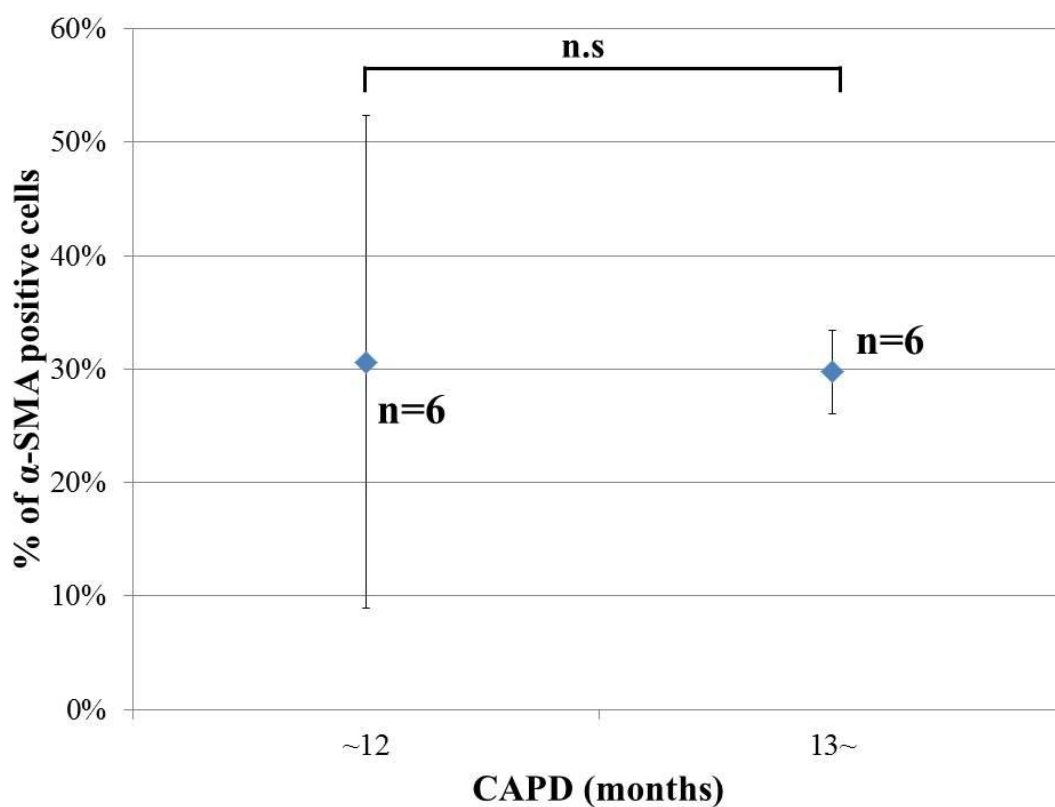


Fig.4-15 CAPD 期間別での α -SMA タンパク発現の比較
Tukey-Kramer; **: $P < 0.01$, *: $P < 0.05$, n.s: Not Significant

4.5 二次元電気泳動

4.5.1 抗酸化物質添加時でのタンパク発現の比較

4.5.1.1 AAG 添加時でのタンパク発現

二次元電気泳動により、タンパク発現が各々500 スポットほど得られた。(Fig.4-16, Fig.4-17)。この両者の染色画像をマッチングさせると、タンパク変動が伺えた(Fig.4-18)。

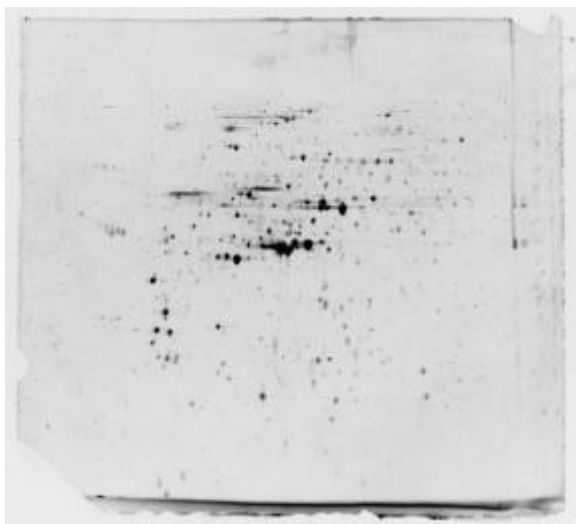


Fig.4-16 Control

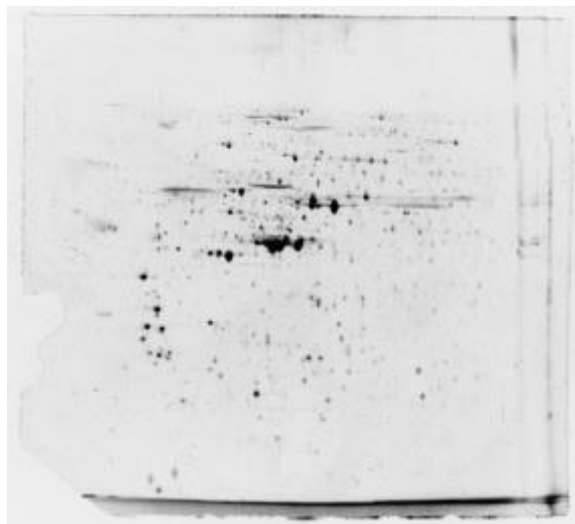


Fig.4-17 AAG 250 μ M 添加

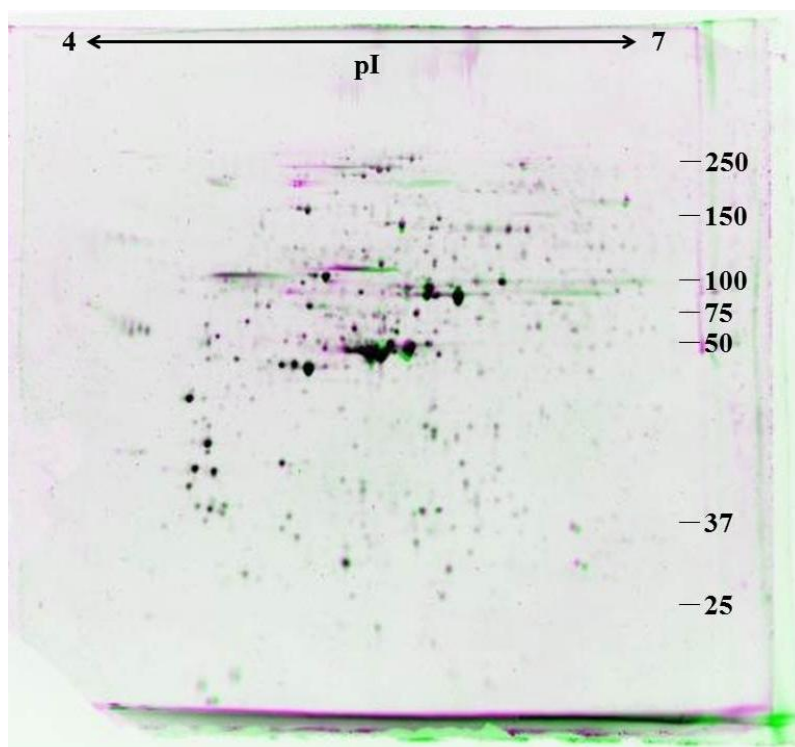


Fig.4-18 マッチング画像(Red: Control, Green: AAG 250 μ M)

4.5.1.2. TMG 添加時でのタンパク発現

抗酸化物質のTMG添加時でのタンパク発現の変化を観察した(Fig.4-19, Fig.4-20)。この両者の染色画像をマッチングさせると、タンパク変動が伺えた(Fig.4-21)。

今後は、抗酸化物質添加で、酸化ストレスタンパクの増加はもちろんであるが、それ以外の形態に関わるタンパクの発現などにも着目し、TOF/MSによりタンパクの同定をする必要があると考えられる。

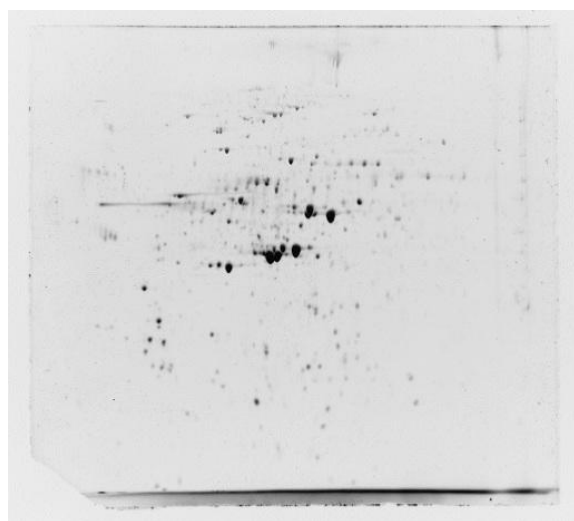


Fig.4-19 Control

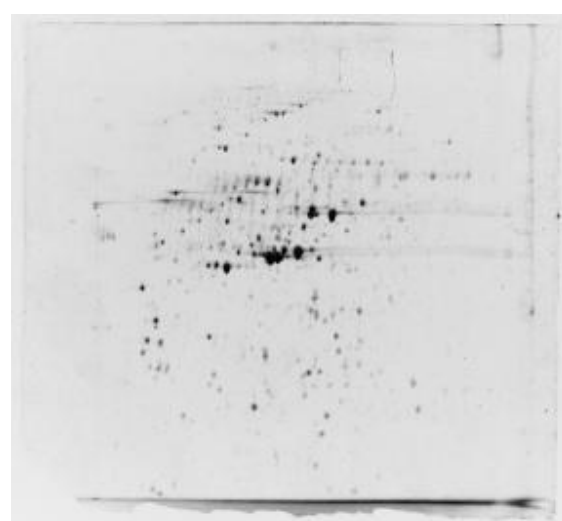


Fig.4-20 TMG 50 μ M 添加

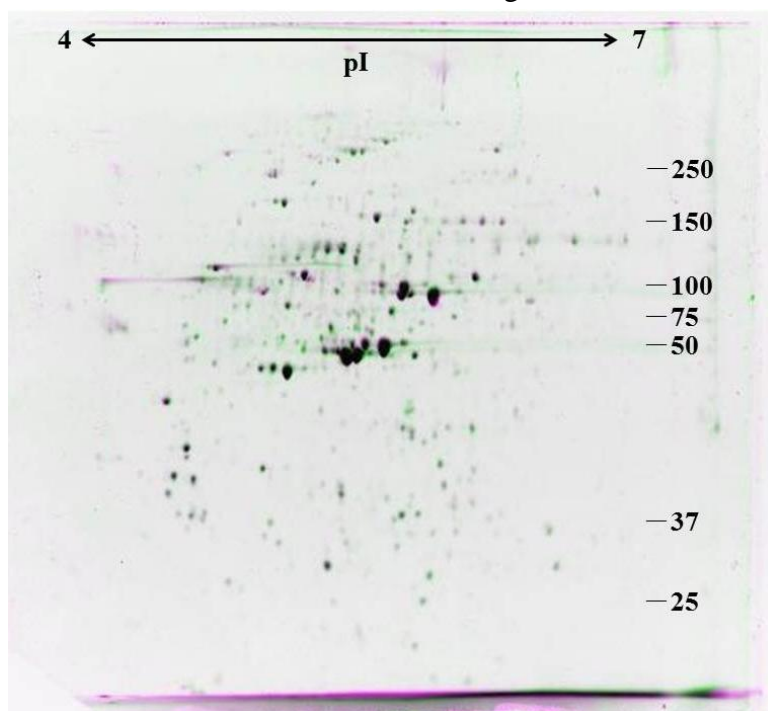


Fig.4-21 マッチング画像(Red: Control, Green: TMG 50 μ M)

5. 考察

5.1 PDE-HPMC の形態

腹膜透析排液中に存在する腹膜中皮細胞(PDE-HPMC; Peritoneal Dialysis Effluent derived Human Peritoneal Mesothelial Cells)は、HPMC 特異的な玉石状の形態を示す細胞が多く、存在率は約 3%であり、Betjes らの報告と同等の値であった^[8]。その他の細胞群は赤血球や白血球などの血球系の細胞であると考えられる。本研究で得られた PDE-HPMC は、PD(Peritoneal Dialysis)液の高濃度のグルコースやグルコース分解産物(Glucose Degradation Products: GDPs)により曝され、酸化ストレスを受けていると考えられ、その結果として上皮-間葉系形質変換(Epithelial to Mesenchymal Transition: EMT)や細胞老化が生じている可能性が考えられる^{[30][31][33][34][35]}。さらには、PD 液の pH により、細胞の Viability を低下させるという報告^[7]から、透析液の pH の影響も考えられる(Fig.5-1)。そこで、細胞老化や EMT は透析液の高濃度のグルコースによる影響か pH による影響かを考察した。

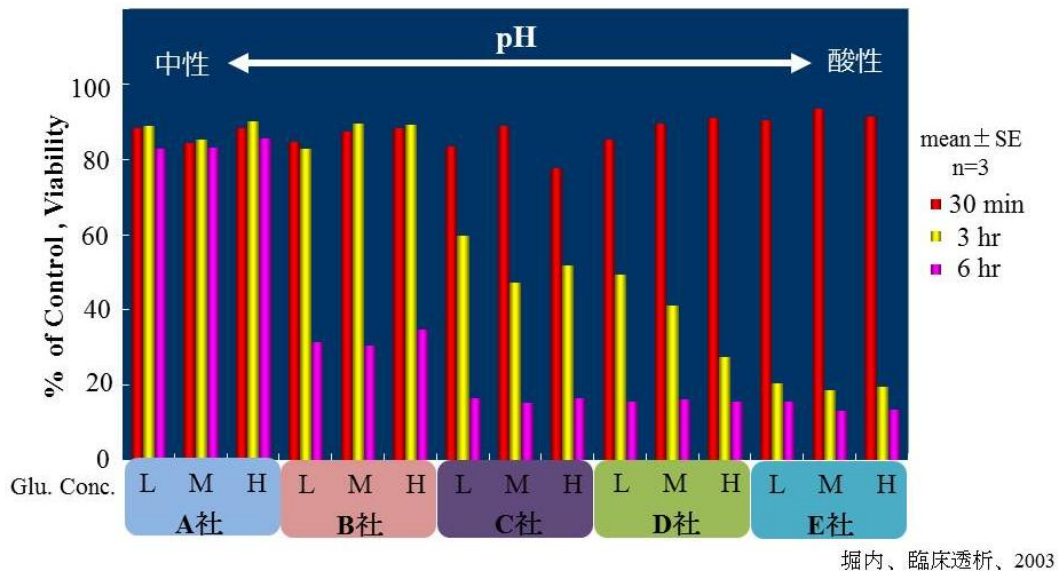


Fig.5-1 pH の違いによる HPMC の Viability^[7]

本研究では、2003 年に報告された Mo らのデータ^[32]よりも玉石状の形態を示す細胞が多いことが示された(Fig.4-3)。そして、長期間 PD を続けても線維芽様の形態を示す細胞が少なく、玉石状の形態を維持していることが示されている。これは、2000 年ごろから臨床使用されている中性 PD 液の影響が考えられる。

Moらのデータ^[32]は、中性 PD 液が使用されていない EU 圏であり、かつ 2003 年以前のデータであることより、ほぼ全例が酸性 PD 液の患者サンプルを使用していた。そのため、EMT を受けた HPMC が、PD 排液中に脱落してきたのではないかと考えられる。

しかし、本研究でも中性 PD 液を使用しているにも関わらず、線維芽様の形態を示す細胞の混在も確認された。これは、約 4 回に 1 回の割合で使用されていたグルコースポリマーが主成分のイコデキストリン酸性 PD 液を使用していることが原因の一つであると考えている(Fig.4-5)。イコデキストリンはグルコースのポリマーであり、浸透圧勾配を利用して体内から余分な水分の除去をする際に、通常のグルコースでは、体内に吸収され浸透圧勾配が徐々に減少してくるが、グルコースの高分子であるため、浸透圧勾配の維持ができ、腹膜の溶質透過性の亢進した患者に使用することが多い。イコデキストリンは、酸性条件下で分解されにくい、pH を高くすると、細胞毒性の強い GDPs の産生が生ずる。また、体内に入れる液体のため、滅菌が必要であり、一度に大量に滅菌することができる高压蒸気滅菌過程においても GDPs が産生されてしまう。

患者別に細胞形態を見ると、線維芽様の形態を示す細胞の出現確率の多い患者と少ない患者が存在することが示された(Fig.4-6)。その中でも線維芽様の形態を示す細胞の出現確率が多い患者は、C, E, O であった。C, E は、PD 治療中に死亡した患者であり、さらに O は入院中のサンプルであった。

臨床データは少ないが、PD 期間中に臨床的なイベントが発生した際に、線維芽様の形態を示す細胞の混在するのではないかと考えられる。PD は腹腔内に PD 液を注入するため、体内では異物として検出され、マクロファージが発生している。さらに、それに加えて腹膜炎などの臨床的なイベントが生じた際には、マクロファージが大量に発生する。通常の場合では、細胞内で酸化ストレスと抗酸化物質が平衡の状態であったが、臨床的なイベントが生じた場合では、マクロファージにより活性酸素種(ROS)が生成され、酸化ストレスと抗酸化のバランスが崩れ、HPMC が酸化ストレスを受けている可能性が考えられる。その結果、EMT が生じた HPMC が多く混在したのではないかと考えられる。

以上より、中性 PD 液により透析期間に依存することなく、細胞の形態が維持されることが示され、さらに線維芽様の細胞の出現により患者の腹膜状態の診断に応用できる可能性が示唆された。

5.2 細胞老化、形質変換マーカー(α -SMA)の発現およびその経路

PDE-HPMC は、玉石状の形態を示す細胞が多く確認されたが、EMT を受けて線維芽様になった細胞や肥大化した細胞も観察された。PDE-HPMC 中に細胞老化(SA- β -Gal)陽性細胞、形質変換マーカー(α -SMA)発現細胞が含まれる原因として以下の3つが考えられる。

- i. 高濃度のグルコースにより ROS が産生され、ミトコンドリア内で機能障害を起こし、さらに ROS が蓄積されることで DNA が損傷を受ける。その結果、p53 \rightarrow p21 の活性化に繋がり細胞周期が停止し、SA- β -Gal が陽性となった。
 - ii. 高濃度のグルコースにより TGF- β 1 が産生され、p16 が活性化し、細胞周期が停止して、SA- β -Gal が陽性となった。また、TGF- β 1 のオートクリン/パラクリンによって、形質変換マーカーの α -SMA が発現した。
 - iii. 透析液の滅菌により GDPs が産生され、高い細胞毒性により細胞内の抗酸化能が低下し、機能障害に陥り、細胞老化ならびに EMT を惹起させた。
-
- i. ROS が蓄積されることで DNA 損傷して、p53 \rightarrow p21 の活性化に繋がり細胞周期が停止し、SA- β -Gal が陽性となる。

まず、本研究で行った SA- β -Gal 染色の妥当性を検討するため、間葉系幹細胞(MSC)を用い、継代数と SA- β -Gal 陽性率を検討した。以前の研究結果^[37]と同様、本研究結果(Fig.4-7)においても、SA- β -Gal での染色により細胞老化を測定することの妥当性が認められた。

以前の研究^{[38][39]}より、本研究で得られた PDE-HPMC は、継代を繰り返すことで細胞増殖能が低下し、同様に細胞面積も肥大化することが示されている。本研究では得られた細胞を継代することなく SA- β -Gal の染色を行っていることから、SA- β -Gal 陽性細胞の存在が細胞の老化、即ち、腹腔内の状態を判定する手段になりえると考えた。患者の CAPD 期間の増加に伴い SA- β -Gal 陽性細胞が増加していることが示されたが(Fig.4-9)、腹膜に存在している HPMC が長期間、高濃度のグルコースに曝されていることが原因の一つと考えている。つまり、SA- β -Gal 陽性細胞の老化はテロメア短小の複製老化に、PD 液の酸化ストレスによる老化が重畳した結果であると考えている^[40]。

PD 液の成分である高濃度のグルコースは PKC 経路や NADPH oxidase を活

性化させて細胞内の活性酸素種(Reactive Oxygen Species: ROS)を増加させることが報告されている^{[12][31]}。また、ミトコンドリア内では解糖系の途中で ATP を産生するが、その際にも ROS の一種であるスーパーオキシドアニオンラジカルが産生される。つまり、中皮細胞層は ROS 産生場となっている可能性は否定できない^{[31][40][41]}。さらに、高濃度のグルコースにより細胞内に存在する抗酸化物質である還元型グルタチオンやグルタチオンペルオキシダーゼが抑制され、細胞内で ROS が蓄積されると考えられる^[31]。ROS の蓄積により DNA 損傷が DNA 修復速度を上回り、DNA 損傷が蓄積する。DNA 損傷が蓄積すると、p53 タンパクが活性化され、次に p53 が p21 を活性化し、細胞周期が停止することが知られている^[42]。

- ii. TGF- β 1 により p16 が活性化し、細胞周期が停止することで SA- β -Gal が陽性となる。さらに、TGF- β 1 のオートクリン/パラクリンにより、 α -SMA が発現。

細胞周期はサイクリン依存性キナーゼ(Cyclin Dependent Kinase; CDK)と、その機能を阻害するインヒビターにより調整されている。構造や機能の違いから2つのグループに分類されているが、その中の Ink4 ファミリータンパク(p16, p15, p18, p19)は CDK4 および CDK6 とのみ結合する。このうち、p16 は CDK の活性を阻害し、細胞周期を G1 期に制止させると考えられている。さらに、MAP キナーゼにより活性化される転写因子である Est1 および Est2 が p16 遺伝子の発現誘導に関与することが示されていることから DNA 損傷とは異なる経路、即ち、腹膜透析療法においては TGF- β 1 の発現の増加によっても p16 が発現し、細胞老化が進行することが考えられる^{[43][44][45]}。

また、PDE-HPMC 中には間葉系マーカーの α -SMA タンパクを発現している細胞も 30%程度確認された(Fig.4-14)。高濃度のグルコースにより HPMC は TGF- β 1 が産生され、オートクリン/パラクリンで作用することが知られている^{[34][12]}。つまり、高濃度のグルコースによる酸化ストレスにより HPMC が EMT を受け、排液中に脱落してきたと考えられる。HPMC から産生された TGF- β 1 がオートクリン/パラクリンで作用し、Smad, ILK, PI3K/Akt 経路を通り、 α -SMA タンパクを発現する^{[47][39]}。RhoA/ROCK 経路の活性化はストレスファイバー形成に関与しており、細胞形態の再構築を引き起こす^{[48][49][50]}。さらに、細胞間結合の消失に伴ってアクチンが脱重合して細胞内に遊離し、RhoA/ROCK 経路の活性化によって再重合した結果、 α -SMA ストレスファイバー形成を促進させたと考えられる。また、本研究室でも 10ng/mL の TGF- β 1 を体網由来正常 HPMC に添加した際に α -SMA タンパク発現が有意に上昇することを実験的に証明している^[47](Fig.5-2)。

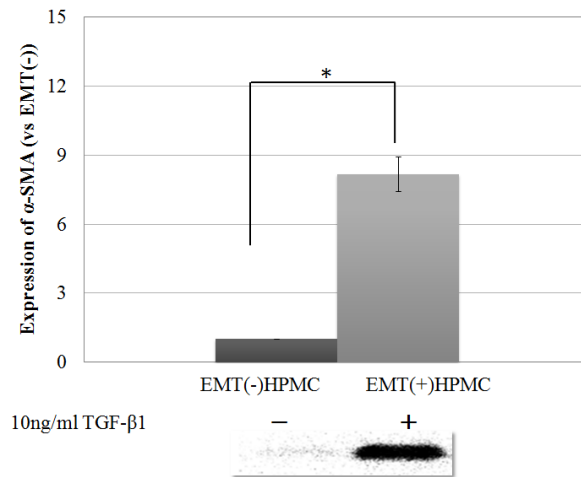


Fig.5-2 10ng/mL TGF- β 1 曝露による α -SMA タンパク発現量の変化^[47]

- iii. GDPs により、抗酸化能が低下して機能障害に陥り、細胞老化ならびに EMT を惹起。

さらに、GDPs の関与も考えなくてはならない。PD 液は腹腔内に貯留するために滅菌が必要となる。滅菌は、一度に大量の PD 液を滅菌し、安価で行うことができる高圧蒸気滅菌が採用されている。しかし、PD 液は高圧蒸気滅菌をかけることで GDPs が産生されることが知られている^[7]。その中でも、特に細胞毒性の高いメチルグリオキサールにより、細胞内の抗酸化能力を低下させ、細胞老化や EMT が生じていたと考えられる^[62]。

さらに、メチルグリオキサールは AGEs の形成でも産生される。グルコースの分解や AGEs 形成経路の促進により反応性の高いジカルボニル化合物を生成する。通常、反応性の高いカルボニル基はアルデヒドレダクターゼにより還元される。しかし、長期的にジカルボニル化合物がし続けると、アルデヒドレダクターゼ自身も糖化されて、酵素が不活性化されることが示されている^[17]。

以上をまとめると以下のシグナル経路となると考えられる(Fig.5-3)。

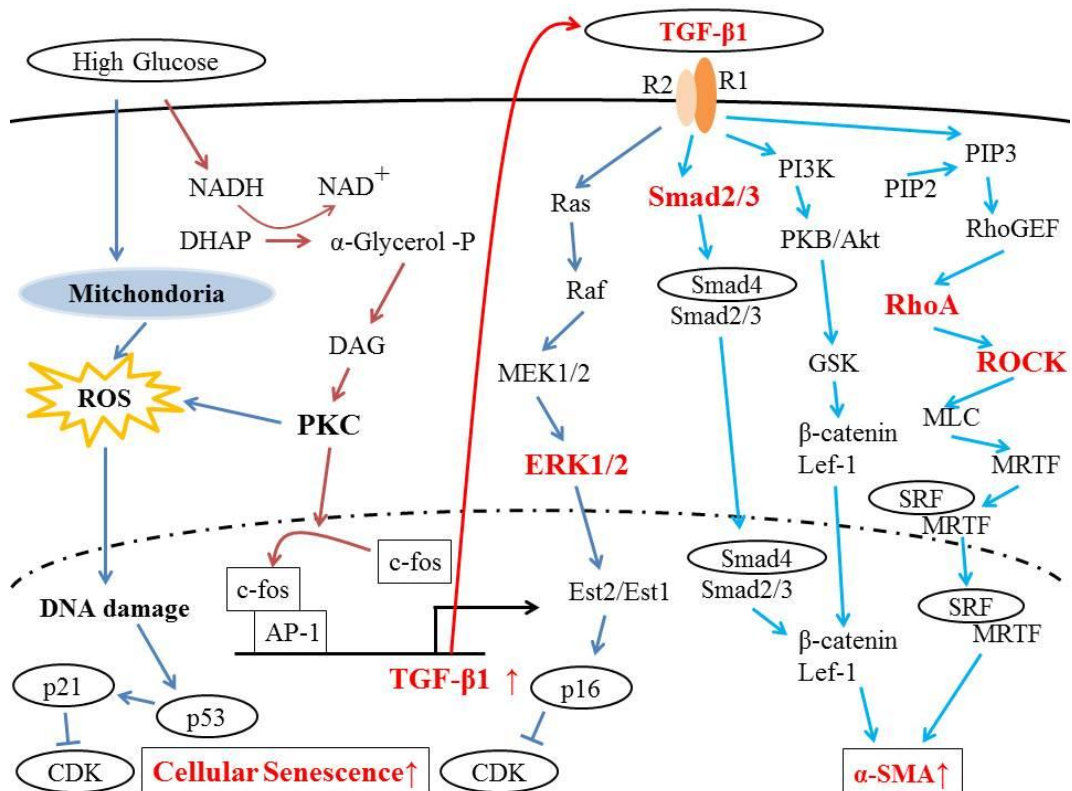


Fig.5-3 高濃度グルコースによる細胞老化および α -SMA タンパク発現上昇のメカニズム^{[12][31][37][40][41][42][43][44][45][47][48][49][50]}

以上の3つの可能性から共通して示されていることは、PD液の酸化ストレスにより細胞老化・EMTが惹起されているということが示され、以下のように関連して作用している可能性が示された(Fig.5-4)。

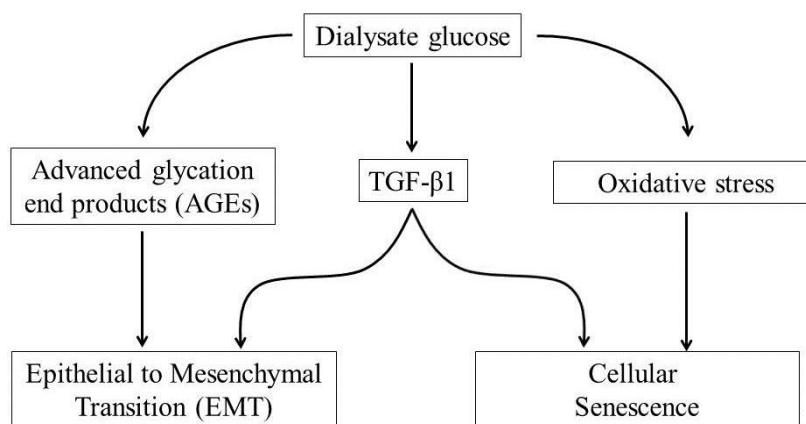


Fig.5-4 PD液によるEMT誘導と細胞老化の亢進の仮説^[34]

5.3 細胞内 ROS の生成系と消去系

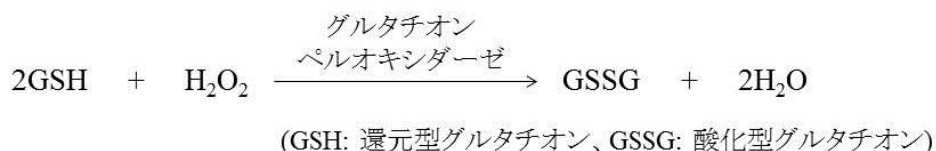
本研究で行った細胞内 ROS 測定は DCFH 感受性であり、その妥当性は本研究室においても確認されている^{[51][52]}。

本研究では透析期間ごとに細胞内の ROS 量が異なる結果が得られた (Fig.4-10)。これは、透析液の高濃度のグルコースが原因であることが考えられる。実際に、透析期間が長期になると細胞内の ROS が増加する傾向が得られている。

前述したが、細胞内に取り込まれたグルコースは、ROS を生成させることが知られている。グルコースは、ミトコンドリア内に入り、電子伝達系で副次的に ROS を生成させる^[13]。さらに、NADPH オキシダーゼにより、PKC 経路を活性化させて ROS を生成させる^[14]。この両者から生成される ROS はスーパーオキシドアニオンラジカル($O_2^{\cdot-}$)である。生成した $O_2^{\cdot-}$ は、SOD(Superoxide dismutase)が触媒する反応により速やかに過酸化水素になる。SOD は静電効果により $O_2^{\cdot-}$ を速やかに過酸化水素に変化させる構造をしている。例えば、Cu, Zn-SOD は、Glu132, Glu133, Lys136, Thr137 がポケット入口から Cu イオンと Arg143 側鎖の間の結合部位まで水素結合のネットワークを作り、 $O_2^{\cdot-}$ を静電的に誘導している^[19]。



続いて、グルタチオンレダクターゼやカタラーゼなどの酵素は過酸化水素を無毒な水に分解して、ROS の影響を抑制している。



しかし、ROS 生成が増加し続ける状態では、SOD やグルタチオンレダクターゼ、カタラーゼなどの酵素が ROS を消去しきれずに ROS 生成が ROS 消去を上回った結果、バランスが崩れて酸化ストレスとなる。

本研究室の研究結果では、透析液とほぼ同濃度の 200mM のグルコースを 6 時間以上曝露した際に ROS の増加傾向が確認されている。しかし、グルコースと等浸透圧であるマンニトールでは、ROS の増加傾向は確認できなかった。これは、

グルコースによる酸化ストレスであると考えられる。さらに、この6時間というのは腹膜透析療法の1回の貯留時間とほぼ同じである。しかし、腹膜透析は6時間後に貯留している透析液の交換を行うため、体内に取り込まれて低くなったグルコースがまた200mM注入され、繰り返し約200mMのグルコースに曝されていることになる。その結果として、細胞内ではさらにROSが増加していると考えられる。

本研究ではPDE-HPMCを使用しているが、本研究室では以前に正常組織由来HPMCで細胞内ROSを測定している。0.1mMと1mMの過酸化水素を負荷させた蛍光画像の比較を行ったところ、PDE-HPMCの方が強い蛍光を示しているようにみられる(Fig.5-5)。

正常組織由来HPMCは一度きりの負荷測定であるが、本実験で用いたPDE-HPMCは200mMのグルコースに絶えず曝されていたことから、排液中に離脱してきた際には細胞自身が持つ抗酸化能を失っている可能性が考えられる。

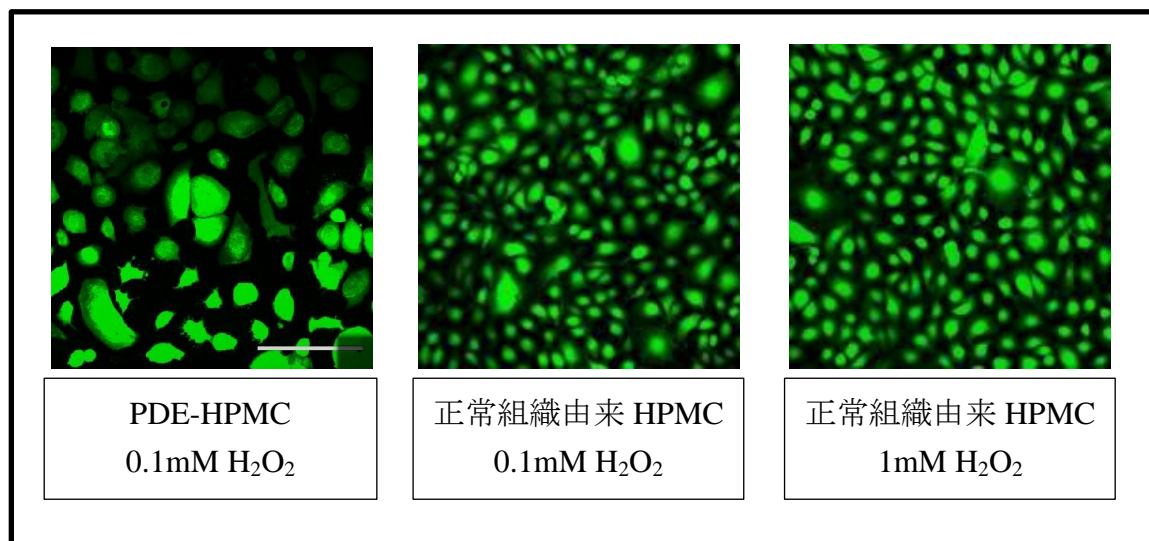


Fig.5-5 PDE-HPMC と正常組織由来 HPMC での細胞内 ROS の比較

加えて、0.1mMの過酸化水素は100mMのグルコースを曝露させた時と同程度のROS産生量であるという報告がある^[12]ことから、腹膜に存在しているHPMCは常にこれ以上のROSが生成されている間接的な裏付けともみなせる。

以上より、PDE-HPMCの細胞内ROS測定から透析液の200mMという非生理的な濃度のグルコースにより、ミトコンドリア内の電子伝達系でのROS産生と、PKC活性経路によるROS産生量が過剰量であったために、細胞内で機能障害が生じ、細胞老化・EMTに繋がったと考えられる(Table.4-1, Fig.4-14, Fig.4-15)。

5.4 抗酸化物質 AAG, TMG の細胞内への取り込み機序

本研究では、AAG, TMG により細胞内 ROS を抑制する結果を得た(Fig.4-11, Fig.4-12)。実験では、過酸化水素と DCFH-DA を曝露する際には PBS で 2 回洗浄した後に曝露用の培地に交換しているため、AAG, TMG が 0.1mM の過酸化水素を曝露する際の培地に混入している可能性は僅かである。このことから、AAG, TMG が細胞外の培地中で過酸化水素やヒドロキシラジカル消去しているとは考えにくく、細胞内に取り込まれ、過酸化水素やヒドロキシラジカルなどの ROS を消去していると考えている。

AAG では、2.5 μ M、25 μ M、125 μ M、250 μ M の 4 条件での測定を行っており、濃度依存的な効果が示されたことから、AAG は受動輸送である可能性が考えられる(Fig.4-11)。トランスポーターなどの仲介輸送では、徐々に濃度依存的な効果が見られなくプラトーになる。しかし、本研究の AAG では、濃度依存的に効果が見られた。つまり、AAG は非仲介輸送(拡散)により細胞内に取り込まれている可能性が考えられる。

AA(Ascorbic Acid)の細胞内への輸送メカニズムや代謝経路の解明はいくつか報告があるが^[21]、AA にグルコースを結合した AAG の輸送機構は詳しく分かっていない。細胞膜上に存在する SVCT(Sodium-dependent Vitamin C Transporter)というトランスポーターを介することで細胞内に輸送される^{[21][22][23][24]}との報告もある。SVCT は 12 回膜貫通型タンパク質で、SVCT1 と SVCT2 の 2 つの異性体があり、高親和性で Na⁺の電気化学勾配を駆動力とする。SVCT1 は主に腸、腎臓、肝臓などの上皮組織に含まれ、SVCT2 はその他の組織、脳や目、神経、内皮組織に含まれることが知られている^[22]。AAG は、AA 部位から SVCT を介し、細胞内に取り込まれる経路が考えられる。また、AAG は AA の 2 位にグルコースが結合しているため、細胞膜上に存在する GLUT (Glucose Transporter)を介して細胞内に取り込まれるとも考えられる。つまり、AAG は SVCT, GLUT という 2 つのトランスポーターを介して細胞内に取り込まれる可能性が考えられる。しかし、本研究では濃度依存的に取り込まれていることから、この経路以外の非仲介輸送(拡散)でも細胞内に取り込まれたと考えられる。非仲介輸送で細胞内に取り込まれることで濃度依存的に ROS を消去したと考えられる。

TMG では 0.05 μ M, 0.5 μ M, 5 μ M, 50 μ M, 500 μ M の 5 条件で測定を行った。ROS は低濃度の 0.05 μ M で効果がみられ、それ以降も同程度の効果が示された (Fig.4-12)。Fig.4-12 は対数軸であるため、線形軸でとり、グラフ化すると以下となる (Fig.5-6)。TMG では AAG とは異なり、プラトーになっている可能性が考えられ、単純な受動輸送ではないことを表している。つまり、TMG は細胞膜上に存在するトランスポーターを介して細胞内に取り込まれると考えられる。

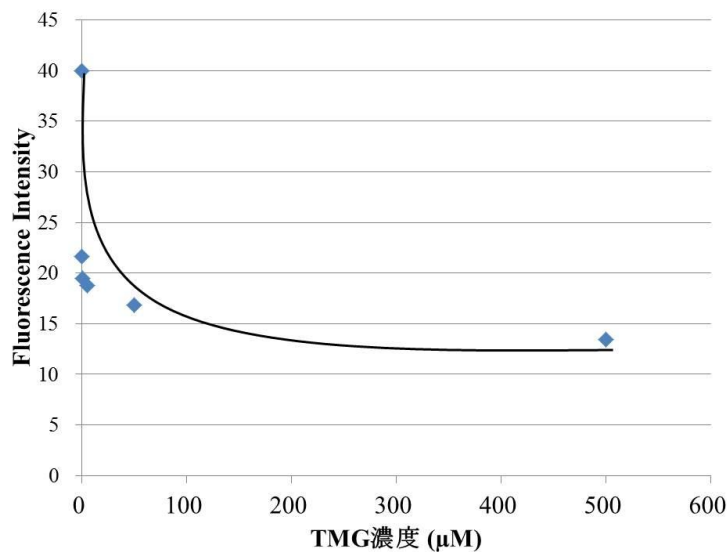


Fig.5-6 TMG の線形軸での濃度依存測定

TMG は、分子量 397 で Vitamin E の α -Tocopherol にグルコースが付加したものである。 α -Tocopherol は長いアルキル鎖があるため脂溶性であるが、TMG はアルキル鎖の代わりにグルコースが付加しているため、水溶性である。しかし、抗酸化能はフェノール基が受け持つので抗酸化作用を持ちつつ、水溶性に変化した物質である。

TMG も AAG 同様、グルコースが付加しているためグルコース部位から GLUT を通過できると考えられる。さらには、 α -Tocopherol は α -TTP (α -Tocopherol Transfer Protein) を介して細胞膜を透過することができることも知られている^{[53][54][55]}。 α -TTP は肝細胞で発見されたが、現在では上皮細胞でも存在することも知られている。 α -TTP は α -Tocopherol を認識し、チャンネルがオープンとなり、細胞内に取り込む (Fig.5-7)。従って、TMG は α -TTP を通過できると考えられる。

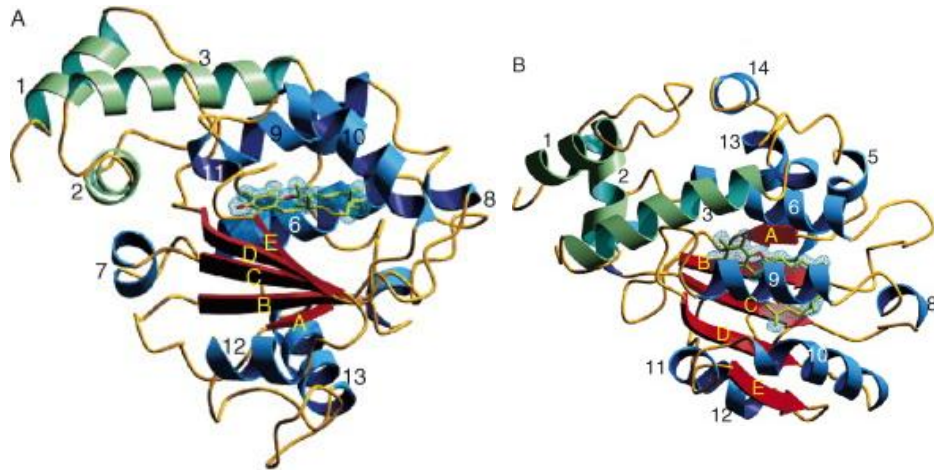


Fig.5-7 α -TTP の構造とその取り込み方 (左: open、右: close)^[55]

N 末端ドメインの helix: 緑、C 末端ドメインの helix: 青、 β -sheet: 赤
 C 末端ドメインは α -Tocopherol の結合ポケットを作る(左)。
 その後、 β -sheet が、底面を形成し、 α -helix がシーリングする(右)。

α -TTP と α -Tocopherol はファンデルワールス力と水素結合ネットワークにより α -TTP のポケットの中で結合している。 α -TTP の Val182 と Leu189 炭素原子は α -Tocopherol のクロマン環と 1 つの水分子を用いて水素結合相互作用で認識、結合している。また、クロマン環のその他の原子、アルキル鎖の原子はファンデルワールス相互作用により認識、結合していると考えられる(Fig.5-8)。

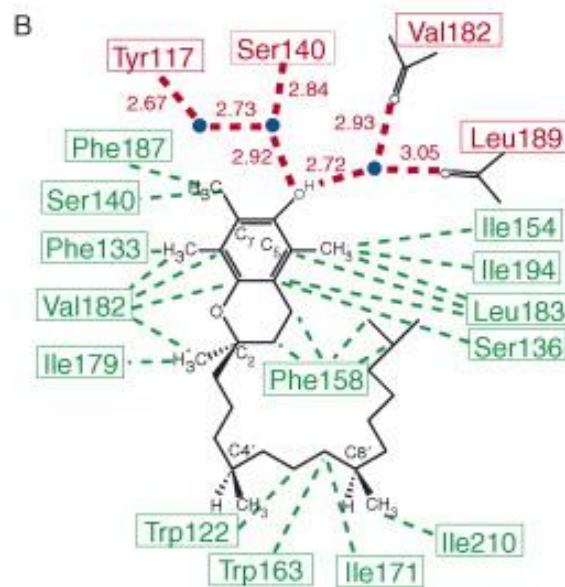


Fig.5-8 α -TTP のリガンド結合ポケットでの相互作用^[55]

α -TTP ポケット内の Val182, Leu189 が水素結合相互作用で結合(赤の点線)
 アルキル鎖、クロマン環のその他の原子はファンデルワールス相互作用で結合(緑の点線)

TMG は、GLUT と α -TTP の 2 つのチャネルを介して細胞膜に取り込まれる仲介輸送と考えられる。さらに、本研究ではかなりの低濃度でも AAG よりも効果的であった。これは、TMG が細胞膜の修復を行ったのではないかと考えられる。 α -Tocopherol は脂溶性であり、細胞膜上で抗酸化作用を示す。TMG 自身にも α -Tocopherol と同じ抗酸化部位を持つため、細胞膜上で抗酸化作用を示した可能性も考えられる。実際に、TMGと同様に α -Tocopherol の長いアルキル鎖を取り除いた Trolox においても膜修復機能を持つということが報告されている^{[56][57]}。Trolox や TMG は水溶性であるため、膜のリン脂質の疎水性の部位では作用しないと考えられるが、リン脂質の頭部である親水性で作用すると考えられる(Fig.5-9)。このことより、TMG は 2 つのチャネルを介して細胞内に取り込まれる経路と、さらに TMG を添加している際に細胞膜のリン脂質の修復を行っていたと考えられる。従って、細胞内と膜上で効果を示し、AAG よりも低濃度で効果が発揮されたのではないかと考えられる。

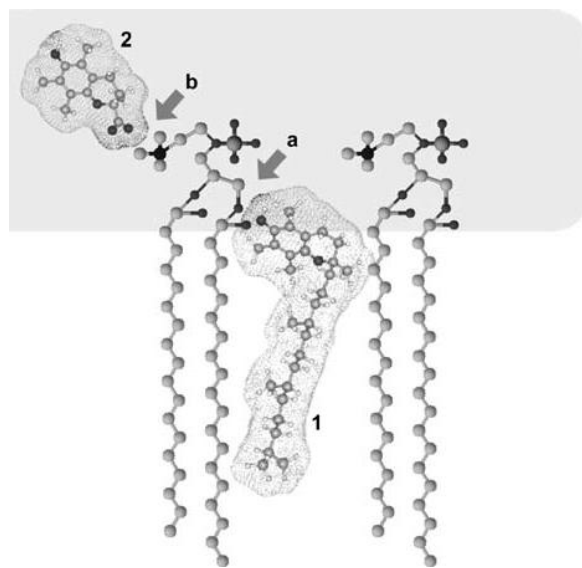
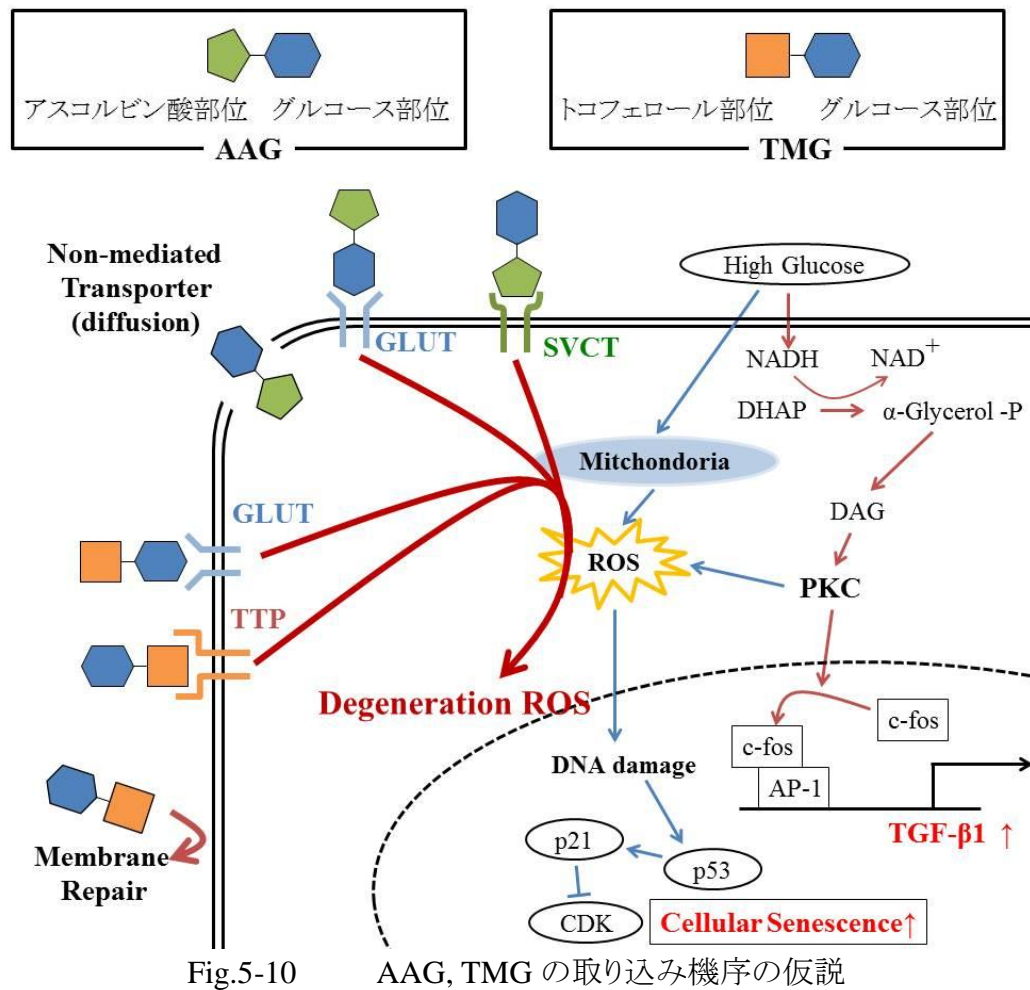


Fig.5-9 α -Tocopherol と Trolox のリン脂質での作用場所^[57]
(1: α -Tocopherol、2: Trolox)

脂溶性の α -Tocopherol はリン脂質の疎水基で作用するが、水溶性の Trolox はリン脂質の親水基で作用し、膜修復を行う。

以上からまとめると、

AAGは、細胞膜上に存在するSVCT, GLUTを介して細胞内へ取り込まれる経路と、非仲介輸送(拡散)により細胞内に取り込まれる経路が考えられる。TMGでも細胞膜上に存在するGLUT, α -TTPを介して細胞内へ取り込まれる経路が考えられる。さらに、TMGでは細胞膜のリン脂質の頭部の親水性の部分に抗酸化作用を発揮し、細胞膜の修復を行っていたと考えられる(Fig.5-10)。



今後は、さらに多くの濃度条件を行うことで仲介輸送か非仲介輸送かどうかを判明すると考えられる。さらに、SVCT, GLUT, α -TTP の阻害剤を用いることで明確な作用機序の解明に繋がると考えられる。

5.5 AAG, TMG 添加でのタンパク変動

AAG, TMG 添加での二次元電気泳動から若干のタンパク変動が伺えた。本研究ではタンパク同定を行っていないが、標的とするタンパクを絞り、既報のデータ [58][59][60][61] と比較することでタンパク変動を考察した(Fig.5-11, Fig.5-12)。

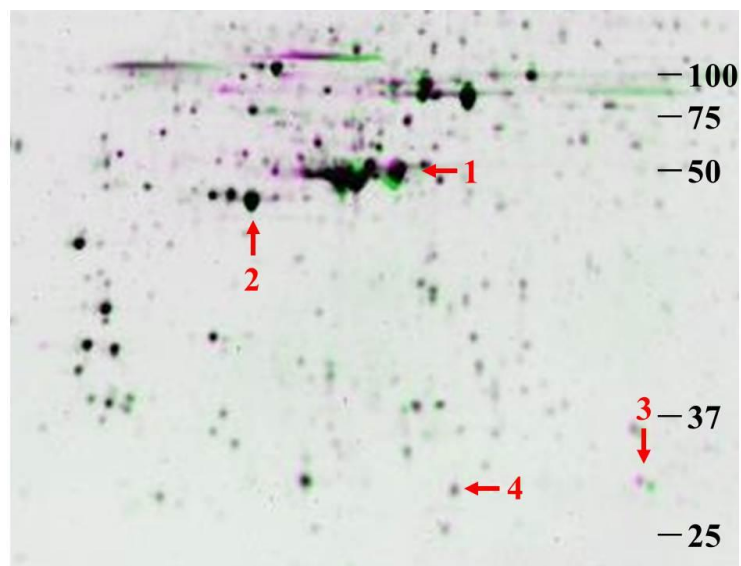


Fig.5-11 CTL vs. AAG のマッチング画像の拡大図
(Red: Control, Green: AAG 250 μ M)

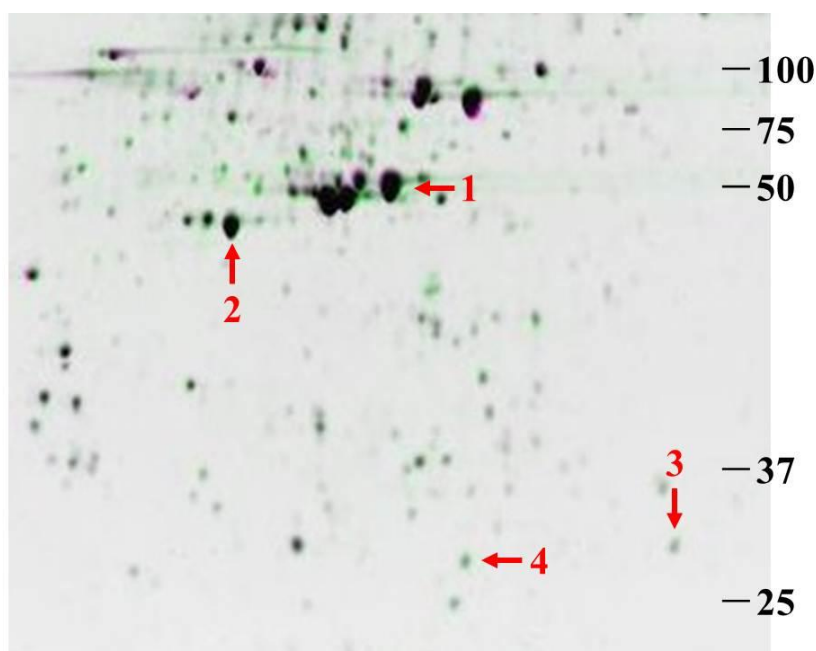


Fig.5-12 CTL vs. TMG のマッチング画像の拡大図
(Red: Control, Green: TMG 50 μ M)

既報の HPMC のデータと本研究の PDE-HPMC を比較することで、Fig.5-10, Fig5-11 で番号を付けた大きなスポットの照合ができた。以下に照合したタンパクを示す(Table.5-1)。

Table.5-1 2D 電気泳動で得られた可能性のあるタンパク質

Spot #	protein	MW (kDa)	pI
1	β -Actin	42	5.3
	Cytokeratin-8	54	5.5
	Cytokeratin-19	44	5
2	Cytokeratin-19	44	5
3	Heat Shock Protein 27 (HSP27)	23	6
4	Glutathione S-transferase	23	5.4

スポット 1 では、 β -Actin, Cytokeratin(CK)-8, -19 である可能性が示された。このスポットの中でもやや上にあるものが CK-8、中心あたりが β -Actin、やや下にあるものが CK-19 であると思われる。スポット 1 の比較では、AAG, TMG 添加のどちらでも下が緑になっている。つまり、CK-19 のタンパク量が多くなっている可能性が考えられる。その他の 2 つの β -Actin, CK-8 ではサチュレーションを起こしているため比較が困難である。さらに、スポット 2 では、CK-19 である可能性が高いと考えられる。スポット 1 で得られた CK-19 とは若干分子量・pI が異なる。これは CK-19 のタンパク質がタンパク抽出の際などに分解を受け、分子量・pI が異なるスポットに発現したと考えられる。骨格系タンパクはタンパク量が多いため、このようなことが起こりやすいと考えられる。

また、スポット 3 はストレス応答の際に発現する HSP(Heat Shock Protein)27 である可能性があり、スポット 4 は、酸化還元タンパク質のグルタチオン-S-トランスフェラーゼである可能性が考えられる。

しかし、これらのスポットは TOF/MS を行っていないためにタンパクの同定はできていない。今後は既報のデータを参考にし、標的タンパクを決め、TOF/MS を行う必要があると考えている。また、AAG, TMG は抗酸化物質であるが、細胞形態などの他の細胞機能にも作用している可能性も考えられるため、二次元電気泳動はそれらのマーカーを見つけることができる可能性が示唆された。さらには、現在の EMT マーカーに替わる早期診断マーカーの発見に繋がる可能性も考えられる。

6. 結論

本研究より以下のことが示された。

- ① 本研究で得られた PDE-HPMC は既報^[32]と比較し、HPMC 特異的な玉石状の形態を維持した。さらに、線維芽様の形態を示す細胞は酸性透析液 Extraneal 使用群のみで観察された。
- ② PDE-HPMC には細胞老化が生じた細胞が混在していることが示され、透析期間に依存して老化細胞が有意に増加することが示された。
- ③ 細胞内 ROS 測定より、PDE-HPMC の抗酸化能は透析期間に依存して低下する傾向が示された。
- ④ AAG, TMG が細胞の抗酸化能をサポートすることが示された。また、濃度依存測定より、AAG は SVCT, GLUT を介す経路と非仲介輸送(拡散)により細胞内へ、TMG は GLUT, TTP,介して細胞内へ取り込まれる経路と、細胞膜上での膜修復にも関与している可能性が示唆された。

本研究より、中性透析液の効果が明らかとなった。しかしながら、老化細胞・EMT を受けた細胞が確認されている点から、今後は透析期間だけでなく、糖尿病・合併症の有無などの他の臨床データと精査することで、患者の腹膜機能の診断法へと繋がると考えられる。さらには、AAG, TMG の効果より、新規腹膜透析液の添加剤として応用も期待できる結果となった。

7. 今後の展望

- **AAG, TMG の詳細な細胞内取り込み機序の解明**

本研究では AAG, TMG の濃度依存測定により SVCT, GLUT, TTP などのトランスポーターを介する経路と、非仲介輸送(拡散)による経路、膜修復による経路であるというメカニズムの仮説を立てた。今後は、SVCT, GLUT, TTP を阻害した場合の細胞内の取り込み試験を行い、明確にする必要がある。

この機序の解明により、新規腹膜透析液の添加剤としての応用へと繋がると考えている。

- **HPMC のタンパク変動による診断マーカーの発見**

本研究では、AAG, TMG 添加での二次元電気泳動でのタンパク変動を蛍光染色にて観察・考察した。今後は、患者ごと、透析期間ごとでのタンパク変動を観察し、TOF/MS をすることで変動タンパクの同定をする必要がある。

さらに、線維芽様の形質を示した細胞や TGF- β 1 で EMT を誘導した細胞での二次元電気泳動を行うことで、新規 EMT マーカーの確立、さらには早期診断マーカーの発見に繋がると考えている。

- **腹膜機能の無侵襲診断法への確立**

本研究では細胞形態、抗酸化能、細胞老化において細胞機能評価を行った。今後は更なる細胞機能評価や合併症などの臨床データとの相関を精査することで、細胞機能評価による患者の無侵襲な腹膜機能診断へと繋がると考えている。

8. 参考文献

1. 平原 一郎, 他. 中皮細胞の epithelial-to-mesenchymal transition(EMT)による腹膜肥厚の促進. 腹膜透析. 東京医学社(2007)
2. Williams JD, *et al.* Morphologic change in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13: 470-479
3. Nakamoto H, *et al.* New animal models for encapsulating peritoneal sclerosis—role of acidic solution. *Perit Dial Int.* 2001; 21: 349-53
4. 友 雅司. 腹膜透析療法の変遷と展望. 人工臓器 39 巻 1 号 2010 年
5. 中元 秀友. PD レジストリ 2011 年末調査報告—EPS 調査—. 第 18 回日本腹膜透析医学会 学術集会・総会(2012)
6. 飯田 喜俊, 他. EBM 血液浄化療法. 金芳堂(2000)
7. 堀内 孝, 他. 腹膜細胞に及ぼす腹膜透析液中グルコース分解産物の影響. 臨床透析. 2003; 19: 503-508
8. Betjes MGH, *et al.* The Mesothelial Cells in CAPD Effluent and Their Relation to Peritonitis Incidence. *Perit Dial Int.* 1991; 11: 22-26
9. Castro MF, *et al.* CELL POPULATIONS PRESENT IN THE NOCTURNAL PERITONEAL EFFLUENT OF PATIENTS ON CONTINUOUS AMBULATORY PERITONEAL DIALYSIS AND THEIR RELATIONSHIP WITH PERITONEAL FUNCTION AND INCIDENCE OF PERITONITIS. *Perit Dial Int.* 1994; 14: 265-270
10. Brownlee. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 2001; 414: 813-820
11. Shostak A, *et al.* Cultured rat mesothelial cells generate hydrogen peroxide: a new player in peritoneal defense? *J Am Soc Nephrol.* 1996; 7: 2371-2378
12. Lee HB, *et al.* Reactive oxygen species amplify protein kinase C signaling in high glucose-induced fibronectin expression by human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int.* 2004; 65: 1170-1179
13. Nishikawa T, *et al.* Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.* 2000; 404: 787-790
14. Inoguchi T, *et al.* Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14: s227-s232
15. 林 典夫, 他. シンプル生化学. 南江堂(2003)
16. 手老 省三, 他. フリーラジカル—生命・環境から先端技術にわたる技術—. 米田出版(1999)

17. 繁田 幸男, 他. 蛋白の糖化 AGE の基礎と臨床. 医学書院(1997)
18. 谷口 直之, 他. 酸化ストレス・レドックスの生化学. 共立出版(2000)
19. 田宮 信雄, 他. ヴォート基礎生化学. 東京化学同人(2004)
20. Wu X, *et al.* Upregulation of sodium-dependent vitamin C transporter 2 expression in adrenals increases norepinephrine production and aggravates hyperlipidemia in mice with streptozotocin-induced diabetes. *Biochem Pharmacol.* 2007; 74: 1020-1028
21. Seno T, *et al.* Functional expression of sodium-dependent vitamin C transporter 2 in human endothelial cells. *J Vasc Res.* 2004; 41: 345-351
22. Tsukaguchi H, *et al.* A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature.* 1999; 399: 70-75
23. Corpe C P, *et al.* 6-Bromo-6-deoxy-L-ascorbic acid: an ascorbate analog specific for Na⁺-dependent vitamin C transporter but not glucose transporter pathway. *J Biol Chem.* 2005; 280: 5211-5220
24. Kc S, *et al.* Vitamin C enters mitochondria via facilitative glucose transporter 1 (Glut 1) and confers mitochondrial protection against oxidative injury. *Faseb J.* 2005; 19: 1657-1667
25. Aga H, *et al.* Synthesis of 2-O- α -D-Glucopyranosyl L-Ascorbic Acid by Cyclomaltodextrin Glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*. *Agric Biol Chem.* 1991; 55: 1751-1756
26. 杉山 昌隆, 他. 蛋白質 核酸 酵素. 2006; 51(1): 10-17
27. Dimri GP, *et al.* A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92(20): 9363-7
28. 五十嵐 和彦, 他. 生化学. 2009; 81(6): 502-510
29. Parrinello S, *et al.* Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblast. *Nat Cell Biol.* 2003; 5(8): 741-7
30. Ksiazek K, *et al.* Oxidative stress-mediated early senescence contributes to the short replicative life span of human peritoneal mesothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 2008; 45(4): 460-467
31. Ksiazek K, *et al.* Oxidative stress contributes to accelerated development of the senescent phenotype in human peritoneal mesothelial cells exposed to high glucose. *Free Radic Biol Med.* 2007; 42: 636-641
32. Yanez-Mo M, *et al.* Peritoneal dialysis and epithelial -to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Eng J Med.* 2003; 348(5): 403-13
33. Ksiazek K, *et al.* Accelerated senescence of human peritoneal mesothelial cells exposed to high glucose: the role of TGF- β 1. *Lab Invest.* 2007; 87(4): 345-56

34. Witowski J, *et al.* New Insights into the Biology of Peritoneal Mesothelial Cells: The Roles of Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Cellular Senescence. *Nephron Exp Nephrol.* 2008; 108(4): e69-73
35. Witowski J, *et al.* Prolonged Exposure to Glucose Degradation Products Impairs Viability and Function of Human Peritoneal Mesothelial Cells. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12(11): 2434-41
36. Ha H, *et al.* High glucose-induced PKC activation mediated TGF-beta 1 and fibronectin synthesis by peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int.* 2001; 59: 463-47
37. 清水 佑典 著. アスコルビン酸と α -トコフェロールの誘導体の細胞老化に与える影響. 平成 23 年度 三重大学工学部分子素材工学科卒業論文 2012
38. Higashi Y, *et al.* Characterization of peritoneal dialysis effluent-derived cells: diagnosis of peritoneal integrity. *J Artif Organs.* 2012
39. 東 洋 著. 腹膜透析排液由来細胞の分画および腹膜機の診断への応用. 平成 23 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修士論文 2012
40. Ksiazek K, *et al.* Premature senescence of mesothelial cells is associated with non-telomeric DNA damage. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 362(3): 707-11
41. Ksiazek K, *et al.* Mitochondrial dysfunction is a possible cause of accelerated senescence of mesothelial cells exposed to high glucose. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 366(3): 793-9
42. Madan E, *et al.* Regulation of glucose metabolism by p53: Emerging new roles for the tumor suppressor. *Oncotarget.* 2011; 2(12): 948-57
43. Ohtani N, *et al.* Opposing effects of Ets and Id proteins on p16INK4a expression during cellular senescence. *Nature.* 2001; 409(6823): 1067-70
44. Takahashi A, *et al.* Mitogenic signaling and the p16INK4a-Rb pathway cooperated to enforce irreversible cellular senescence. *Nat Cell Biol.* 2006; 8(11): 1291-7
45. Takeuchi S, *et al.* Intrinsic Cooperation between p16INK4a and p21Waf1/Cip1 in the Onset of Cellular Senescence and Tumor Suppression *In Vivo.* *Cancer Res.* 2010; 70(23): 9381-90
46. 杉本 昌隆, 他. 蛋白質 核酸 酵素. 2006; 51(1): 10-17
47. Yamaguchi Y, *et al.* THREE-DIMENSIONAL INVASION OF EPITHELIAL-MESENCHYMAL TRANSITION-POSITIVE HUMAN PERITONEAL MESOTHELIAL CELLS INTO COLLAGEN GEL IS

- PROMOTED BY THE CONCENTRATION GRADIENT OF FIBRONECTIN. *Perit Dial Int.* 2011; 31(4): 477-85
48. Maszi A, *et al.* Central role for Rho in TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003; 284(5): F911-24
 49. Bhowmick NA, *et al.* Transforming Growth Factor- β 1 Mediates Epithelial to Mesenchymal Transdifferentiation through a RhoA-dependent Mechanism. *Mol Biol Cell.* 2001; 12(1): 27-36
 50. Fan L, *et al.* Cell Contact-dependent Regulation of Epithelial-Myofibroblast Transition via the Rho-Rho kinase-Phospho-Myosin Pathway. *Mol Biol Cell.* 2007; 18(3): 1083-97
 51. 坂野 真利 著. 活性酸素種による細胞間結合タンパクの非局在化に関する研究. 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修士論文 2007
 52. 松永 和也 著. 培養細胞を用いた細胞内活性酸素種(ROS)産生とアスコルビン酸グルコシドによる ROS 消去能評価. 平成 19 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修士論文 2008
 53. Biesalski HK. Vitamin E Requirements in Parenteral Nutrition. *Gastroenterology.* 2009; 137(5): S92-104
 54. Qian J, *et al.* Intracellular trafficking of vitamin E in hepatocytes: the role of tocopherol transfer protein. *J Lipid Res.* 2005; 46(10): 2072-82
 55. Christopher Min K, *et al.* Structure and function of alpha-tocopherol transfer: implications for vitamin E metabolism and ANED. *Vitam Horml.* 2007; 76: 23-43
 56. Howard AC, *et al.* Promotion of plasma membrane repair by Vitamin E. *Nat Commun.* 2011; 2: 597
 57. Luzio M, *et al.* Antioxidant Activity of Vitamin E and Trolox: Understanding of the Factors that Govern Lipid Peroxidation Studies *In Vitro.* *Food Biophys.* 2009; 4(4): 312-320
 58. Demir AY, *et al.* Proteome analysis of human mesothelial cells during epithelial to mesenchymal transitions induced by shed menstrual effluent. *Proteomics.* 2004; 4(9): 2608-23
 59. Kratochwill K, *et al.* Stress Responses and Conditioning Effects in Mesothelial Cells Exposed to Peritoneal Dialysis Fluid. *J Proteome Res.* 2009; 8(4): 1731-47
 60. Lechner M, *et al.* A Proteomic View on the Role of Glucose in Peritoneal Dialysis. *J Proteome Res.* 2010; 9(5): 2472-9

61. Lau AT, *et al.* A Proteome analysis of the arsenite response in cultured lung cells: evidence for *in vitro* oxidative-induced apoptosis. *Biochem J.* 2004; 382(Pt 2): 641-50
62. Hirahara I, *et al.* Methylglyoxal induces peritoneal thickening by mesenchymal-like mesothelial cells in rats. *Nephrol Dial Transplant.* 2009; 24(2): 437-47

9. 謝辞

本研究を行うにあたり、研究および研究生活全般において、適切かつ懇切なご指導を賜り、公私において非常にお世話になりました三重大学大学院 工学研究科 分子素材工学専攻 生体材料化学研究室の堀内 孝教授、宮本 啓一准教授、事務員の村上 節子様に深く感謝致します。

本研究を行う上で必要な腹膜透析排液を提供していただいた患者様、そして、そこに関わる三重大学医学部付属病院 血液浄化療法部の村田 智博先生、石川 英二先生、そして、鈴鹿回生病院 腎臓センターの埜村 信介先生には、腹膜透析排液の手配だけでなく、合同カンファレンスの中で大変貴重な臨床的な意見を頂いたことにも深く感謝いたします。また、抗酸化物質の AAG, TMG を提供していただいた大分大学医学部付属病院 腎臓内科の友 雅司先生にも深く感謝いたします。

そして、3 年間研究室の先輩として優しく、時には厳しく指導して下さった D3 水谷 直紀先輩を始めとする諸先輩方、また大学院生活で公私ともに、励まし、刺激し合い、共に成長した同期の神谷 歩君、境 淳志君、田野 裕美さん、中村 雅広君、丹羽 一喜君に深く感謝致します。

さらに、M1 伊藤 直人君、影山 聡志君、小山 直紀君、中町 信敏君、長谷川まりなさん、そして1年間ではありましたが、B4 角谷 優樹君、傍島 達也君、萩原 慎之君、畑 俊宏君、古藏 史子さん、堀江 俊貴君、水田 裕磨君、山田 将義君には様々な形でサポートしていただき、深く感謝致します。

また、本テーマを与えられた時より研究室生活から実験まで、厳しく、優しく指導して私を成長させていただいた東 洋先輩を始め、同じ研究テーマを取り組み 3 年間ともに研究し、お互い支え合い、刺激し合った同期の葛本 智淳君、原 拓也君、そして後輩として実験のサポートや助言をしてくれた M1 清水 佑典君、叢 秀娜さん、B4 西町 早織さん、山口 直也君には感謝の意が絶えることはありません。心より深く感謝致します。

最後に、研究室生活や実験だけでなく、アメリカのクリーブランドクリニックへの留学や国際学会での英語でのプレゼンテーション発表など、非常に貴重な経験を勧めて下さった堀内 孝教授には再度、感謝致します。これら 3 年間の経験を糧に今後より一層精進していく所存です。

この素晴らしい研究室と、大変お世話になった皆様の今後のますますのご活躍、ご発展することを心より願っております。

平成 25 年 3 月
阿部 功児

10. Appendix

A-1. 細胞培養プロトコル

A-1-1. 培地調整

A-1-2. 腹膜透析排液由来細胞の分離

A-1-3. 継代培養

A-2. SA- β -Gal 染色

A-3. 細胞内 ROS 測定

A-4. 免疫化学蛍光染色

A-5. 二次元電気泳動

A-6. 統計処理

B-1. 滅菌について

B-2. 本研究で使用した試薬について

C-1. 腹膜透析排液サンプル結果まとめ (#1~#103)

A-1. 細胞培養プロトコル

A-1-1. 培地調整

<使用機器・器具・試薬>

- 50ml シリンジ(TERUMO®)
- 30ml アシストチューブ(アシスト/Cat.No.60.543.001S)
- 注射針
- PH メーター
- Millex-GV(MILLIPORE/Cat.No.SLGV025LS/孔径 0.22 μ m)
- Strivex GS(MILLIPORE/Cat.No.SVGSB1010/膜孔径 0.22 μ m)
- STERICUP™ フィルター(MILLIPORE/Cat.No.SCGVU05RE)
- 15ml 遠沈管
- 0.5ml アシストチューブ(アシスト/Cat.No.72.699 S)
- Medium 199(SIGMA/Cat.No.M2154)
- Penicillin streptomycin(SIGMA/Cat.No.P-0781)
- Insulin Transferin Selenate(SIGMA/Cat.No.I-1844)
- L-Glutamine(SIGMA/Cat.No.G-7513)
- Hydrocortisone(SIGMA/Cat.No.H-0888)
- 1N NaOH aq
- 1N HCL aq(080-08065/Wako)
- Fetal Bovine Serum(SIGMA/Cat.No.F9423)
- Diethylpyrocarbonate

<各溶液調整>

○ 培地調整

- ITS (Insulin Transferin Selenate)
ITS (パウダー状)の瓶に DEPC 処理水 50 ml を入れ攪拌し、1.5ml アシストチューブに 500 μ l ずつ分注し、冷蔵庫にて 4 $^{\circ}$ C で保存した。
- L-G (L-Glutamine)
15 ml 遠沈管に 5 ml ずつ分注し、冷蔵庫にて 4 $^{\circ}$ C で保存した。
- P-S (Penicillin-Streptomycin Solution)
5 ml アシストチューブに 5 ml ずつ分注し、冷凍庫にて -20 $^{\circ}$ C で保存した。
- HC (Hydrocortisone)
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 μ l ずつ分注し、室温で保存した。

[操作]

- ① L-G、P-S 各 5 ml を一本のチューブにまとめ、L-G,HC をそれぞれ 50 μ l ずつ加えた。
- ② 上記のサプリメントを、10 ml シリンジ (TERUMO[®]) を用いて Millex-GV を通してフィルター滅菌し、Medium-199 に添加した。

* pH を調整する場合

- ③ 培地の pH を調整した。また、pH は 7.2 に調整した。
※体内の pH は 7.4 である。
※pH を 7.2 にするのは、フィルター滅菌後に pH の値がおよそ 0.2 大きくなるためである。1N-HCl aq や 1N-NaOH aq を使用して pH を調整した。

○ Fetal bovine serum (牛胎児血清) の不活性化、分注、保存

[操作]

- ① 凍結の状態ですられてきた FBS は 37 $^{\circ}$ C で溶かした。溶かし終わったら数回振り、55~56 $^{\circ}$ C で、時折振り混ぜながら 30 分間温めた (不活性化)。
- ② 50 ml のシリンジ (TERUMO[®]) で吸い取り、Strivex GS、もしくは、Stericup フィルターユニットにてフィルター滅菌し、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、滅菌操作で行った。
- ③ 冷凍庫 (-20 $^{\circ}$ C) で保存した。

○ Trypsin-EDTA solution (10x)

[操作]

- ① 納品後、冷凍保存 (-20 $^{\circ}$ C 以下) した。
- ② 37 $^{\circ}$ C で解凍し、5 ml アシストチューブに 4 ml ずつ分注し、-20 $^{\circ}$ C にて保存した。

○ 滅菌水の作製

[操作]

- ① Milli-Q 水又は蒸留水 (用途に応じて) 滅菌瓶に小分けし、高圧蒸気滅菌 (121 $^{\circ}$ C、20 分) した。
- ② 滅菌後、栓をしたまま棚に保管した。

○ DEPC 処理水の作製

[操作]

- ① メディウムビンを Milli-Q 水で 2 回洗浄し、Milli-Q 水をメディウムビンに入れた。
 - ② Milli-Q 水の体積に対して 0.1% の DEPC (Diethylpyrocarbonate) を加え (500ml の Milli-Q 水に対してならば DEPC を 500 μ l)、蓋をきっちり締めてよく振り混ぜた。
- ※ DEPC は発癌性があるため、この作業は全てドラフト内で行うこと。
- ③ そのまま 37 $^{\circ}$ C のインキュベーター内に入れ、2 時間加温した。加温の際には 30 分に 1 回振り混ぜること。
- ※ 振り混ぜることでビンの蓋や首の部分、液体内に DEPC が均一に広がり、全体の RNase を失活させる。
- ④ ビンの蓋を十分緩めて、121 $^{\circ}$ C / 40 分 (1 本あたり 500ml ならば) オートクレーブにかけた。
- ※ オートクレーブをすることにより DEPC を除去する。オートクレーブ後にも DEPC の臭いが残っている場合は、もう一度オートクレーブにかける。
- ※ DEPC は発癌性であるため、むやみに蒸気を吸うことのないように気を付けること。また、オートクレーブに溜まった水は気化して抜けた DEPC が溶け込んでいるので、その排水は責任を持って処理すること (大量の水と共に排水口へ流す)。

A-1-2. 腹膜透析排液由来細胞の分離

〈使用機器・器具・試薬〉

- CO₂ インキュベーター (池本理工工業/10-0212)
- 遠心分離機 (TOMY RX-200 生命科学研究支援センター)
- 恒温槽
- Vortex
- 遠心ボトル (TA-18)
- 15ml 遠沈管 (住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-56150)
- 50ml 遠沈管 (住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-56500)
- 遠沈管立て
- 10ml ピペット (住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-66100)
- ピペッター
- ϕ 35mm シャーレ (住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-80240)

- パスツールピペット
- スパチュラ
- 血球計算盤
- カウンター
- Medium-199(SIGMA/Cat.No.M2154)
- PBS(SIGMA/D8537)
- EDTA(SIGMA/T4174)
- Fetal Bovine Serum(SIGMA/Cat.No.F9423)

〈組織の入手方法〉

本研究で用いた腹膜透析排液から分離した HPMC は、予め本学医学部倫理委員会にて患者の腹膜透析排液の採取について承認を得ており、informed consent を得た三重大学病院透析室における患者より頂いた透析排液である。基本的に週 1 回排液を頂き、その都度サンプル番号(#数字)をつけた。

〈前日の準備〉

[操作]

- ① 遠心ボトル、はさみ、クランプをオートクレーブにかけて器具滅菌しておく。
- ② 0.9% NaCl solution を調整し、5.0 mmol EDTA / 5 ml NaCl solution を濾過滅菌しシリンジに入れておく。

〈細胞分離〉

[操作]

- ① 排液バッグから 10cm ほどのカテーテルを残して、注入側の透析バッグを切り離す。この際に、メーカー、透析液の種類、液量を確認しておく。
- ② 濾過滅菌した 5.0mmol EDTA / 5.0ml 0.9%NaCl solution を調整しておき、排液 2L に最終濃度 2.5mmol/L になるようにシリンジを用いてカテーテルからインジェクトし、無菌的に加える。
- ③ EDTA 溶液が排液全体に行きわたるよう混ぜる。(EDTA 溶液は排液バッグ内側に接着している細胞を剥がすためや、細胞の生理活性を上げるために入れる。)

- ④ 排液をよく混ぜたのち、遠心ボトル（TA-18 ボトル）に 300~400ml ずつ分注し 37℃、800rpm(50G)で 10 分間遠心分離する。
(TOMY RX-200 生命科学 研究支援センター 3 階 加賀谷先生)



(この際に各ボトルの重量を求め、排液の総重量を算出する。)

- ⑤ 各遠心ボトルの上澄みを捨て、排液を 30ml くらいまでにし、50ml の遠心管に分注する。

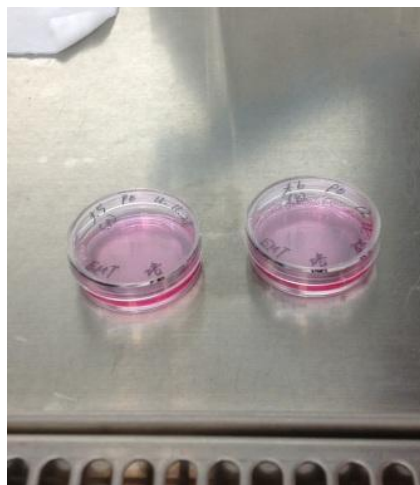


- ⑥ 各遠心管を 750~800rpm で 10 分間遠心分離し、上澄みを捨て、15mL 遠心管に集め、再び 750~800rpm で 10 分間遠心分離する。



⑦ 15mL 遠心管の上澄みを捨て、10%FBS/M199 培地を 1mL 加えて細胞懸濁液を作成し、血球計算盤で細胞数をカウントする。

⑧ 接着用 φ35 シャーレに 10%FBS/M199 を加えて 37°C / 5% CO₂ でプレインキュベートしておき、細胞懸濁液を播種する。(播種密度は 7~10×10⁴ cells / cm² が適度だと思われるが、それ以下の場合には全細胞数を播種するといいい。)



⑨ 翌日、PBS で 3 回洗浄後に培地 10%FBS/M199 を交換する。

⑩ 培地は 3 日に一回交換する。

A-1-3. 継代培養

<使用機器・器具・試薬>

- CO₂ インキュベーター(池本理科工業/10-0212)
- ウォーターバス
- Vortex
- 25cm² 培養フラスコ(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-21050)
- 75 cm² 培養フラスコ(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-21250)
- 6 穴プレート(友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-80060)
- φ35mm シャーレ(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-80240)
- 15ml 遠沈管(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-56150)
- 50ml 遠沈管(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-56500)
- 遠沈管立て
- 10ml ピペット(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-66100)
- ピペッター
- パスツールピペット
- チップ各種
- セルスクレーパー(住友ベークライト株式会社/Cat.No.MS-93170)
- カウンター

- 血球計算盤
- Medium-199(SIGMA/M2154)
- PBS(SIGMA/M8537)
- TRYPSIN-EDTA SOLUTION(10x)(SIGMA/T4174)
- Fetal Bovine Serum(SIGMA/Cat.No.F9423)

<細胞の洗浄>

[操作]

- 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 10ml ピペットを加熱滅菌し培養フラスコ内に挿入し、培養液を吸引した。
- ③ PBS 溶液 5ml/25cm² フラスコ又は 10ml/75 cm² フラスコを添加し、前後左右に振り洗浄した。
- ④ 滅菌済み 10ml ピペットを加熱滅菌し培養フラスコ内に挿入し、洗浄液を吸引した。

<継代作業>

[操作]

- ① 冷凍保存してあるトリプシン 1ml に培地 9ml を加え、10 倍希釈した。(以下トリプシン溶液)
- ② トリプシン溶液 5ml/25 cm² フラスコ又は 10ml/75 cm² フラスコを加え、37°Cの CO₂インキュベート内にて 10 分間放置した。
- ③ 顕微鏡で細胞が剥がれたことを確認後、FBS 1ml/25 cm² フラスコ又は 2ml/75 cm² フラスコを加えた。
- ④ 滅菌済みセルスクレーパーを培養フラスコ内に挿入し、細胞を剥離した。
- ⑤ 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。
- ⑥ 50G (750rpm) 5 分間原則 4°C) 遠心分離した。
- ⑦ 培養フラスコに 10%FBS/M-199 を入れ、37°Cの 5%CO₂インキュベート内にて放置した。
- ⑧ ⑥で遠心分離した上澄みをピペットで吸引した。
- ⑨ 10%FBS/M-199 を 1ml 又は 3ml を遠心管に沈殿している細胞に加え、細胞懸濁液を作成し、10 回ピペッティングを行った。
- ⑩ 細胞懸濁液を取り、⑦で用意しておいた培養フラスコに 200μl/25cm² フラスコ、1ml/75cm² フラスコ播種し、37°Cの CO₂ インキュベート内にて培養した。

A-2. SA-β-Gal 染色

[原理]

Senescent Cells Histochemical Staining Kit は老化細胞を同定する素早い染色方法に使用される全ての試薬が含まれる。β-galactosidase 活性の組織化学染色は pH6 に基づいている。これらの条件において β-galactosidase 活性は老化細胞で容易に検出できるが静止状態、不死化、腫瘍細胞においては検出されない。

[試薬]

• Senescent Cells Histochemical Staining Kit (Cat.No. CS0030 / Sigma-Aldrich)

Components

• Fixation Buffer 10x (Cat No. F1797) Solution containing 20% formaldehyde, 2% glutaraldehyde, 70 mM Na ₂ HPO ₄ , 14.7 mM KH ₂ PO ₄ , 1.37 M NaCl, and 26.8 mM KCl	<u>15 ml</u>
• Reagent B (Cat No. R5272) 400 mM Potassium Ferricyanide	<u>1.5 ml</u>
• Reagent C (Cat No. R5147) 400 mM Potassium Ferrocyanide	<u>1.5 ml</u>
• X-gal Solution (Cat No. X3753) 40 mg/ml	<u>4 ml</u>
• Staining Solution 10x (Cat No. S5818)	<u>15 ml</u>
• Phosphate Buffered Saline (PBS) 10x (Cat No P3621)	<u>60 ml</u>

Preparation Instructions

※この手順における試薬の分量は 24well plates で 10tests 用である。異なる plates/wells では Appendix 1 に従って量を計算する。

※使用前にキットの全てを解凍し、溶液が均質に溶けるまでよく混ぜる。

※キットの溶液の調整には滅菌水を使用する。

※X-gal Solution – 1時間、37°CでX-gal Solutionを温める。染色された細胞を観察するための妨げとなる凝集形成を防ぐために非常に大切である。

※1x Fixation Buffer – Fixation Buffer 10x を 10 倍の滅菌水で希釈する。1x Fixation Buffer の調整後、-20°Cで保存する。24well plates で 10tests では 3mL(0.3mL × 10well)調整する。

※1-PBS – PBS 10x を 10 倍の滅菌水で希釈する。調整後、1x PBS は 2-8°Cで保存する。24well plates で 10tests では 15mL 調整する。

※Staining Mixture – (Prepare just prior to use)

3mL/10well Staining Solution の調整に以下の試薬を用いる。

•300μL Staining Solution 10x

•37.5μL Reagent B

•37.5μL Reagent C

•75μL X-gal Solution

•2.55mL 滅菌水

溶液中に凝集が残らないように Staining Solution を 0.2μm filter を用いて濾過する。

Procedure

1. 細胞から培地を吸引する。
2. 0.3mL 1x PBS で 2 回洗浄する(per well/plate)。細胞がはがれないように丁寧に洗浄溶液を吸引する。
3. 0.3mL/well 1x Fixation Buffer を加え室温で 6-7 分インキュベートする。
4. 固定している間に上記の Staining Mixture を調整する。
5. 0.3mL 1x PBS で 3 回洗浄する(per well/plate)。
6. 0.3mL/well Staining Mixture を加える。
7. 細胞が青色に染色されるまで 37°Cでインキュベートする(w/o CO₂, 2hours to overnight)。

8. 乾かないように plate を Parafilm で密閉する。
 ※老化細胞の染色は pH に依存している。したがって、細胞は染色している間は CO₂ が豊富な状態でインキュベートしてはいけない。
9. 顕微鏡で細胞を観察する。染色された細胞数と総細胞数をカウントする。
 β-galactosidase 発現細胞の割合を求める。
10. 染色後、Staining Solution を除き 1x PBS と入れ替えてもよい。

Appendix 1

Relative Volumes for Scale Up/Down of Staining

Procedure

Plate	Well diameter (mm)	Growth area (cm ²)	Volumes relative to 35 mm plate
100 mm	100.00	78.50	8.26x
60 mm	60.00	30.00	3.15x
35 mm	35.00	9.50	1x
6 well	34.80	9.50	1x
12 well	22.10	3.80	0.4x
24 well	15.60	1.90	0.3x
96 well	6.40	0.32	0.034x

A-2. DCF 感受性-細胞内 ROS の測定法

[原理]

活性酸素種(ROS)の生体内での役割を解明するために、ESR 法、吸光法、蛍光法、化学発光法など種々の検出法が開発されてきた。その中でも蛍光プローブをロードした生細胞を蛍光顕微鏡下観測する方法は、生きている状態での生物応答を感度よく捉えることができ、近年汎用されている。ROS の蛍光プローブとして、2',7'-ジクロロジヒドロフルオロセイン(DCFH)やジヒドロローダミン123(Dihydrorhodamine-123)などがある。これらは分子内にベンゼン環を複数持つ。しかし、その共役系の広がり無く、可視領域に吸収・蛍光を持たない。また、ほぼ全ての ROS と反応して蛍光を発するため、ROS 蛍光プローブとして頻りに用いられている。本研究では蛍光プローブとして 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCFH-DA)を用いて測定を行った。

DCFH-DA は細胞膜を通過し細胞内に存在するエステラーゼによって DCFH へと加水分解される。DCFH-DA 自体は酸化作用によって蛍光を発することはほとんど無いと考えられている。加水分解された DCFH は ROS と速やかに反応して蛍光物質である DCF を生成する(励起波長 502 nm、蛍光波長 520 nm)(Fig.10-1)。

[試薬・器具・機器]

- 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCFH-DA) (D-6883/SIGMA)
- dimethyl sulfoxide(DMSO) (049-07213/Wako)
- Fluoview FV1000(共焦点レーザー顕微鏡) (OLYMPUS)
- FV10-ASW(測定ソフト) (OLYMPUS)
- Image J(輝度解析ソフト)

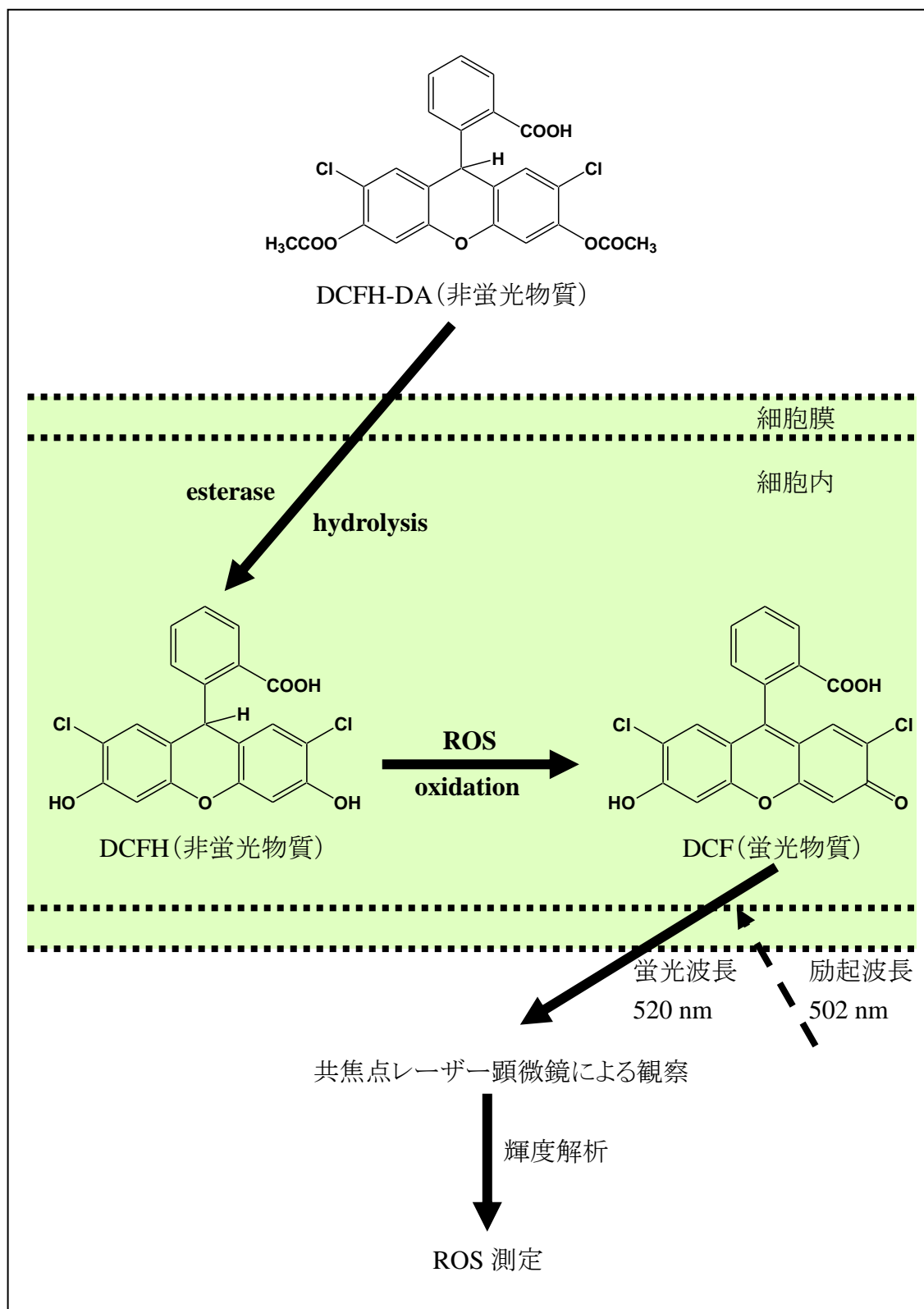


Fig.10-1 蛍光プローブ DCFH-DA の反応機構の概念

[操作準備]

DCFH-DA の調整

- ① DCFH-DA の保存方法: 窒素ガスで置換した容器に DCFH-DA(粉末)の入ったサンプル瓶を入れ、密封した。シリカゲルを用いて、 -20°C で乾燥保存した。
- ② Stock solution 調製: DCFH-DA(粉末)4 mgを無水の DMSO 826 μl に溶解し、10 mM DCFH-DA を調製した。0.5 ml アシストチューブに 20 μl ずつ分注した。
- ③ Stock solution 保存: 分注した DCFH-DA は 50 ml 遠沈管に入れ、窒素ガスで空気を置換し、密封した。シリカゲルを用いて、 -20°C で乾燥保存した。(溶媒が水分を吸収しやすく色素の分解を起こすため、無水状態にして乾燥保存しなければならない)
- ④ DMSO の蒸留: 減圧蒸留にて精製し、無水状態にした。保存は試薬ビンに移し、ビンの中の空気を窒素ガスで置換して、密封した。デシケーターを用いて、室温で乾燥保存した。
- ⑤ 100 μM DCFH-DA 調製: 使用直前に Stock solution を培地で 100 倍希釈し、0.22 μm フィルター滅菌を行った。

H_2O_2 水溶液の調整

- 100mM H_2O_2 水溶液の作製
113 μL の 30% H_2O_2 を 9.887mL の滅菌水に入れ、100mM H_2O_2 水溶液を作製した。
- 1mM H_2O_2 水溶液の作製
1.133mL の 30% H_2O_2 を 8.867mL の滅菌水に入れ、1M H_2O_2 水溶液を作製し、その 1M H_2O_2 水溶液から 10 μL を滅菌水 10mL にいれて 1mM H_2O_2 を作製した。

H_2O_2 + 10 μM DCFH 溶液の作製

- ① 凍結してある 10mM DCFH 溶液 20 μL を M199 培地 20mL に入れて 10 μM DCFH 混合培地を作製する。(これが、Control 用の培地となる。)
- ② 上記の 10 μM DCFH 混合培地を 1.08mL 取り、そこに 1mM H_2O_2 を 0.12mL 加える。(0.1mM H_2O_2 + 10 μM DCFH 混合培地)

[操作]

I 24well plate への播種

- ① 24well plate に細胞培養用セルディスクを置いた。
- ② 10%FBS/培地を 0.4mL/well でプレインキュベートした。
- ③ 細胞懸濁液(播種密度 1×10^4 cells/cm²)を播種した。
(この時に 1Sample につき、Control 用に 24well plates を 1well、0.1mM H₂O₂ 用に 2well 用意する。)
- ④ 37°C、5%CO₂ インキュベーター内で confluent まで培養した。
(AAG, TMG 添加時には 1 週間培養した。)

II 試験

- ① 培地を吸引し、PBS で洗浄した。
- ② 終濃度 0.1mM の H₂O₂ と終濃度 10μM の DCFH-DA を同時に曝露し、軽くピペッティングして暗所・室温条件下で 15 分間静地した。
(Control の 1well に DCFH のみの混合培地を、0.1mM H₂O₂ 用の 2well に 0.1mM H₂O₂ + 10μM DCFH 混合培地を加える。)
- ③ 曝露終了後、共焦点レーザー顕微鏡にて DCF 蛍光を観察した。

<AAG, TMG 添加培地の作製>

- 1mM AAG 水溶液の作製
AAG 0.0135g を 40mL の滅菌水に溶解し、1mM AAG 水溶液を作製する。
- 1mM TMG 水溶液の作製
TMG 0.0159g を 40mL の滅菌水に溶解し、1mM TMG 水溶液を作製する。

<AAG 添加培地>

1. 1mM AAG 水溶液を 3.70μL を 10% FBS/M199 5mL に加え、250μM AAG/10%FBS/M199 培地を作製した。
2. 250μM AAG 培地を 10 倍希釈、100 倍希釈することで、25μM、2.5μM AAG 培地を作製した。

<TMG 添加培地>

1. 1mM TMG 水溶液を 1.26μL を 10% FBS/M199 5mL に加え、500μM TMG/10%FBS/M199 培地を作製した。
2. 500μM TMG 培地を 10 倍希釈、100 倍希釈することで、50μM、5μM AAG 培地を作製した。

III 共焦点レーザー顕微鏡による蛍光の測定

- ① 電源を入れ、顕微鏡の条件設定を行った。
 - ② 顕微鏡の台にシャーレを置き、透過観察(目視)で焦点を合わせた。
 - ③ シャーレに励起光を照射し、スキャンしてコンピュータの画面を見ながら焦点を合わせた。蛍光が最も強く映る焦点で撮影した。
 - ④ シャーレを移動させていき、ランダムで計4ヶ所画像を撮影した。
- 共焦点レーザー顕微鏡による蛍光の測定は以下の設定で行った。

蛍光フィルター	NIBA
Dyelist	Alexa Fluor 488
検出器の感度調節(HV)	650 HV
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)	2.9 V
Filter Mode	Kalman Line 2
スキャン速度	2.0 us / Pixel
画像サイズ(size)	1 : 1 512by
対物レンズ、Zoom	x 10、x2

IV データ解析

輝度解析は画像解析ソフト Image J を用いて数値化した。手順は以下の通り。

- ① Image J を開き、輝度解析する画像を読み込んだ。(倍率は 200 倍の画像を選択した。)
- ② ツールバーの Image から 8 bit monoco を選択し、画像をグレースケールにした。
- ③ ツールバーの Process から subtract background を選択し、100pixels に合わせ、画像のバックグラウンドを調節した。(この操作によりバックグラウンドの pixel が 0 もしくは 1 になっていることを確認した。)

- ④ ツールバーの **Image** → **Adjust** → **Threshold** を選択し、細胞の輝度を手動で調節した。(この時に細胞がある程度区別できるように、かつバックグラウンドとの区別もできるように輝度を調節する。また、**apply** を押さないようにする。)
- ⑤ ツールバーの **Analyze** → **Set measurement** から **Mean Grey Value** にチェックを入れる。(この時に他にもチェックが入っていても良いが、必要なものは **Mean Grey Value** のみである。)
(一度、**Set measurement** でセットしたら以後この作業は行わなくても良い。)
- ⑥ ツールバーの **Analyze** から **Analyze particle** を選択し、**Size**、**Circulatory**、**shows** を変更し、**Display**、**Exclude on Edge**、**Clear** にチェックを入れる。(以下参照)
Size: 50-infinity (pixel のサイズの調整。基本はこの数値で良い。)
Circulatory: 0-1.0 (変更なしでよい。)
show: outlines (輝度解析を行った後にアウトラインを表示する。)
Display (on), **Exclude on Edges (on)**, **Clear (on)** **then OK**
- ⑦ 表示された数値をエクセルファイルにコピーし、画像4枚の平均値を算出し、それを蛍光強度とした。

A-4.免疫化学染色

[原理]

標的分子を非常的に認識する抗体の性質を利用して、細胞の中のタンパク質の局在を可視化する方法。観察したい標的分子に対する抗体(一次抗体)を加え、その次に一次抗体を認識する抗体(二次抗体)を加える。そして、二次抗体に付加されている蛍光を観察することで、標的分子の局在を知ることができる。一連の反応は全て適度な塩濃度を持った緩衝液中で行い、乾燥させないのが基本である。それぞれの蛍光物質に対応する波長の励起光当て、蛍光を検出する(Fig.10-2)。

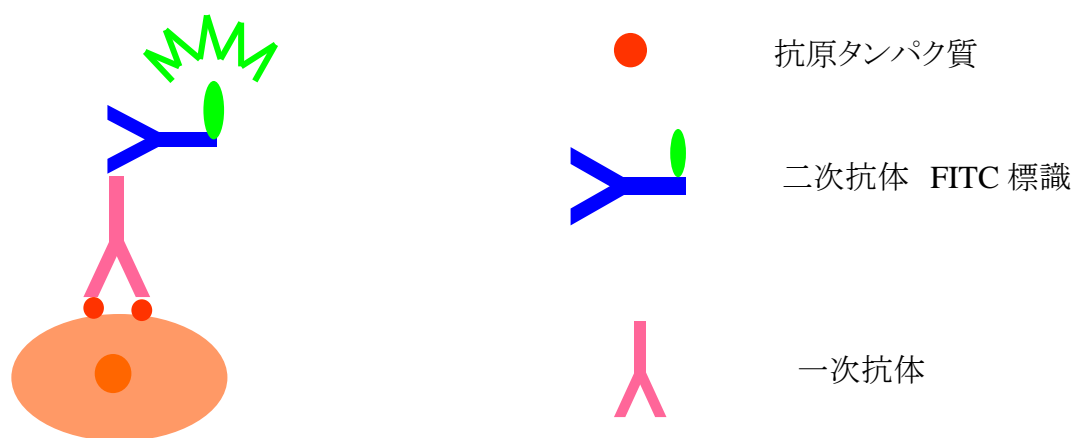


Fig.10-2 抗原抗体反応を用いた免疫化学染色

•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。

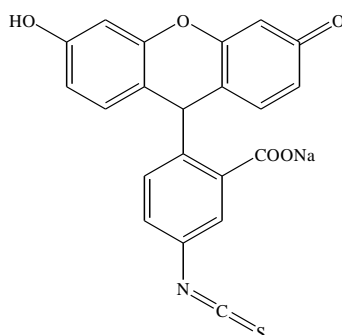


Fig.10-3 FITC

[試薬・器具・機器]

- 秤
- Vortex
- ピペット
- ピペッター
- マイクロピペット
- 遠沈管
- 遠沈管立て
- アルミホイル
- 共焦点顕微鏡(FV1000, Olympus, Tokyo, Japan)
- アルブミン
- acetone (WAKO)
- methanol(WAKO)
- PBS(SIGMA)
- Goat anti-mouse IgG(H+L) FITC conjugate
(Cat. No. AP308F / Millipore)
- Propidium iodide(PI) (P4170-25MG/SIGMA)
- Anti-Cytokeratin 18 Mouse-Mono(RGE53)
(Cat.No. MUB0327S / フナコシ)
- Anti-Cytokeratin 18 phospho Ser 52, Human Rabbit
(Cat.No. SC-17032-R /コスモバイオ)
- mouse anti-human smooth muscle actin
(Cat.No. M085101 / DAKO)

[前準備]

- ① 秤でアルブミンを 4g 量り取った後、50ml 遠沈管に移し、PBS をピペットで 40ml 入れ、Vortex にて遠心した。
- ② 作成した 1%BSA/PBS は冷蔵庫にて保存した。

[操作]

- ① 細胞がいる ϕ 35 シャーレの培地を取り除き、PBS 洗浄を行った。
- ② Aceton/methanol(1:1)をサンプルに加えて、r.t で 5 分間静置し固定した後、その固定液を取り除き 10 分間風乾した。
- ③ 1%BSA/PBS をサンプルに加えて 20 分静置した。
- ④ サンプルに一次抗体(希釈率;抗体:1%BSA/PBS=1:200)を 1ml 加え、4°C (冷蔵庫)、飽和湿度で overnight (10 時間以上)させた。

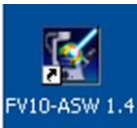
- ⑤ 一次抗体を取り除き、1%BSA/PBS で3回洗浄した。
- ⑥ サンプルに二次抗体(希釈率;抗体:1%BSA/PBS=1:200)を1ml加えて、アルミホイルで包み、30分間、暗所、rtで静置した。
- ⑦ 二次抗体を取り除き、1%BSA/PBS で3回洗浄した。
- ⑧ 共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

[共焦点レーザー顕微鏡操作方法]

I システムの立ち上げ

- ① パソコンをONにした。
- ② レーザーをONにした。
- ③ モニター上にパスワード入力画面が表示された後、水銀ランプをONにした。
- ④ ユーザー名・パスワードを入力しWindowsXPへログオン。

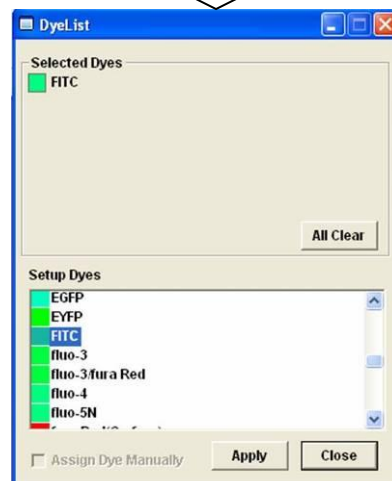
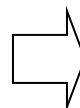
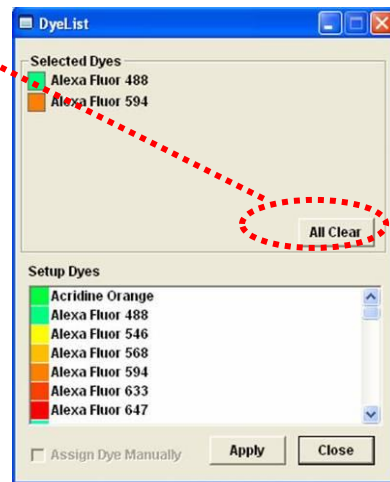
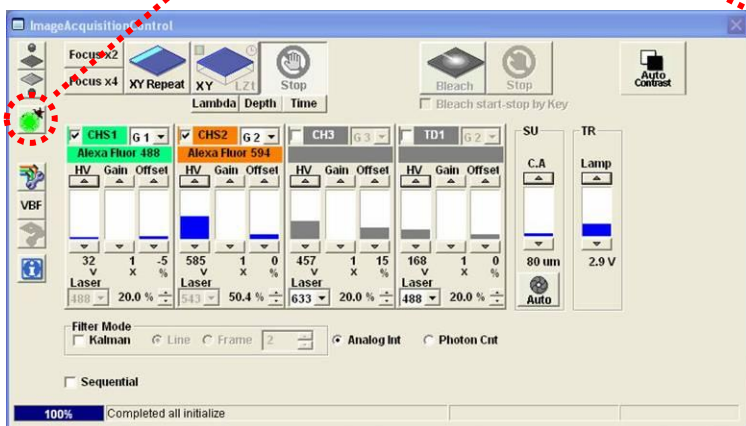
User ID: Administrator
Password: fluoview

- ⑤  をダブルクリックしユーザー名・パスワードを入力し、FV10-ASWソフトウェアを起動した。

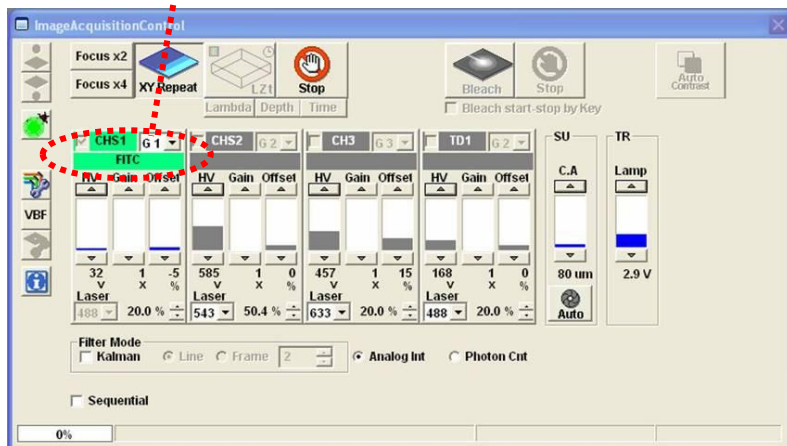
User ID: Administrator
Password: Administrator

II 蛍光試薬選択

- ① DyeList ボタンをクリックし、All Clear ボタンをクリックしリセットした。



- ② DyeList パネルから観察する蛍光試薬を選びダブルクリックした。
- ③ Apply ボタンをクリックして閉じる。
- ④ CHS1 の蛍光試薬が変更したことを確認した。



II 顕微鏡で目視観察

- ① ハンドスイッチで対物レンズを選択した。
(10,20 倍レンズ:ドライ 40,60 倍レンズ:オイルを用いた。)
- ② パソコン上のアイコンをクリックし、ハロゲンランプ、蛍光レーザーの ON、OFF をした。




- ② 顕微鏡手前のフォーカススイッチ等によりピント調節した。

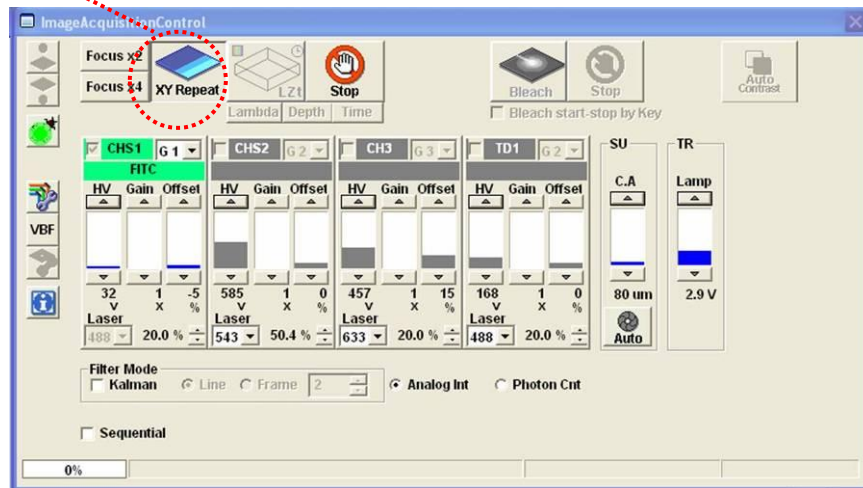
III 画像の取得(試し撮り)

- ① HV の値を 600~680、スキャン速度 8.0us/Pixel、画素数 512by にセットした。

The screenshot shows the 'ImageAcquisitionControl' software interface. The 'AcquisitionSetting' window is open, displaying various parameters. The 'Mode' section shows 'Fast' and '20.0us/Pixel'. The 'Size' section shows 'Aspect Ratio' as 1:1 and 'X' as 1024by. The 'Area' section shows 'Rotation' as 0.0 and 'Zoom' as 1.0. The 'Laser' section shows '488' at 10.0%, '488' at 20.0%, '515' at 7.5%, '543' at 50.4%, and '633' at 20.0%. The 'LambdaScan' section shows 'Start' at 531 nm, 'End' at 613 nm, 'StepSize' at 5 nm, and 'Num' at 2. The 'Microscope' section shows 'UPLSAPO 20X NA:0.75' and 'Start Set' at 860.56 um. The 'TimeScan' section shows 'Interval' as 'FreeRun' and 'sec Num' as 2. The 'ImageAcquisitionControl' window shows 'Focus x4', 'XY Repeat', 'XY', 'Lambda', 'Depth', and 'Time' buttons. The 'CHS1' section shows 'FITC' and 'HV' at 680. The 'TD1' section shows 'HV' at 118. The 'Filter Mode' is set to 'Kalman' and 'Analog Int' is checked. The 'Sequential' checkbox is unchecked.

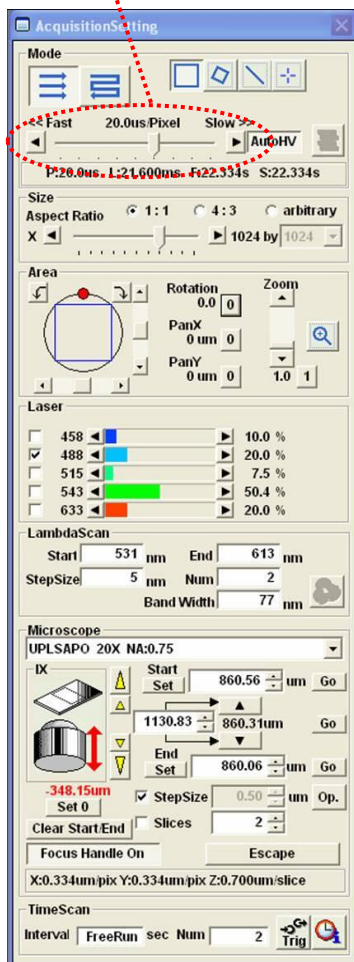
微分干渉像 TD1 の値は HV100 前後にする。
(微分干渉像が不必要の場合はチェックをはずす。)


- ②  をクリックし、画面を見ながらピントを合わせ微調整した。

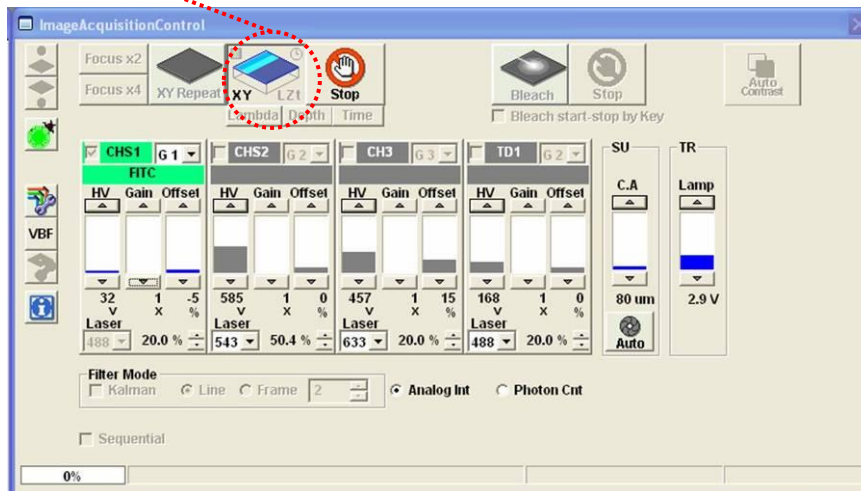


IV 画像の取得(本番)

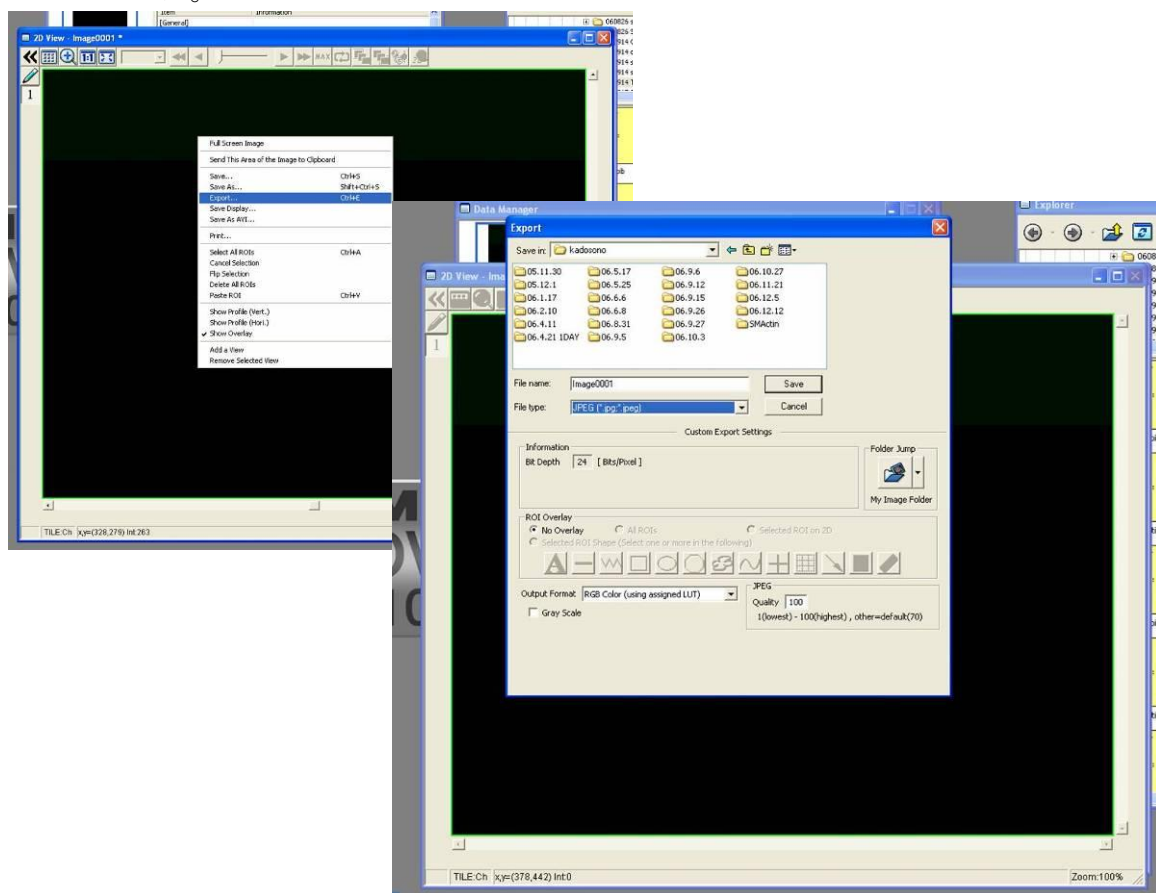
- ① 40.0us/Pixel に設定を変更した。



- ②  をクリックし、画像を取得した。



- ③ 取得した画像の上で、右クリックし **Export** を選択、名前をつけて保存した。



V システムの終了

- ① FV10-ASW ソフトウェアを終了した。
- ② WindowsXP を終了した (Start/ShutDown→「ShutDown」を選択)。
- ③ レーザーを OFF にした。
- ④ 水銀ランプを OFF にした。

補足

The screenshot displays two windows from the FV10-ASW software. The 'AcquisitionSetting' window (top left) includes controls for Mode (Fast, Slow), Size (Aspect Ratio, X, Y), Area (Rotation, Zoom, PanX, PanY), and Laser settings. The 'ImageAcquisitionControl' window (bottom) features controls for Focus, Lambda, Depth, Time, Bleach, and Stop, along with a table for channel settings (CHS1, CHS2, CHS3, TD1) and SU/TR parameters.

Annotations with red dotted lines point to specific features:

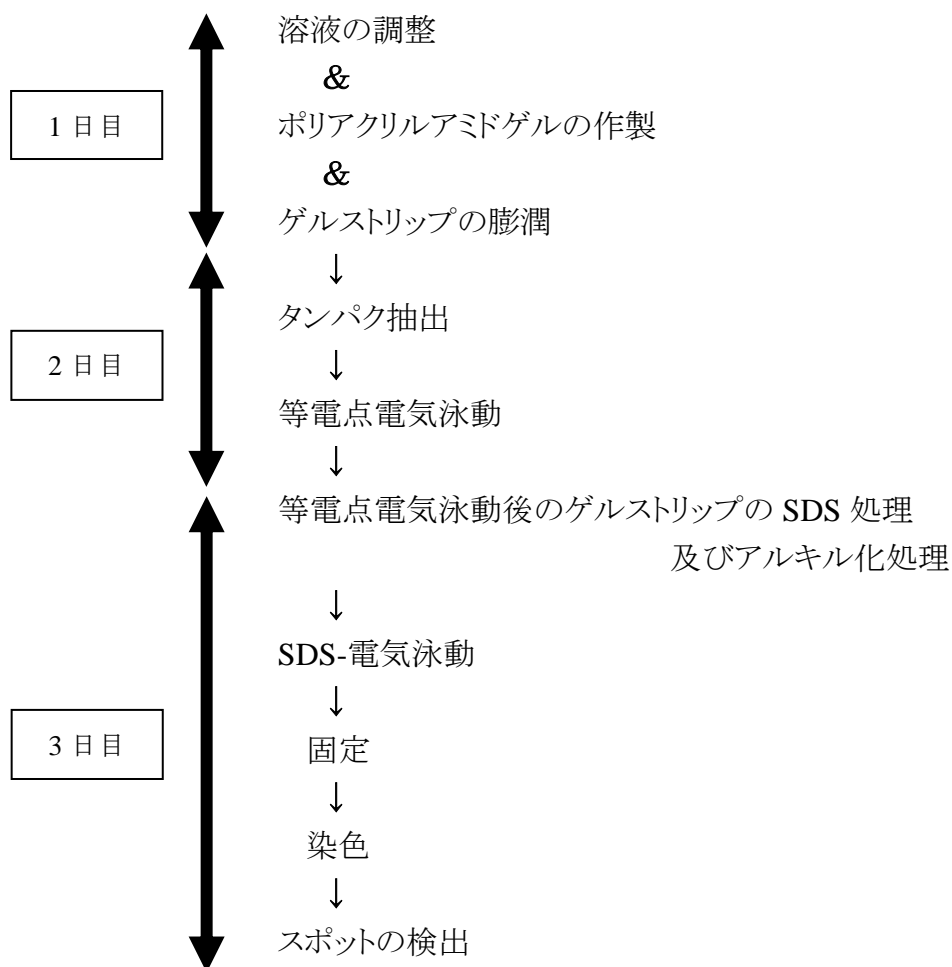
- 向き・角度の調整 (Adjustment of direction/angle) - points to the Area rotation control.
- デジタルズーム (Digital zoom) - points to the Area zoom control.
- 試料を動かさずに撮影可能 (Possible to shoot without moving the sample) - points to the PanX and PanY controls.
- 対物レンズを換えずに高倍率で観察可能 (Possible to observe at high magnification without changing objective lenses) - points to the Focus x2 and x4 controls.
- 通常、Offset を 0 にしておく。HV だけ値を変える。 (Usually, set Offset to 0. Only change the HV value.) - points to the HV, Gain, and Offset controls in the channel settings table.
- 単染色ではチェックを入れない。 (Do not check for single staining.) - points to the 'Kalman' checkbox in the Filter Mode section.

A-5. 二次元電気泳動

○目的

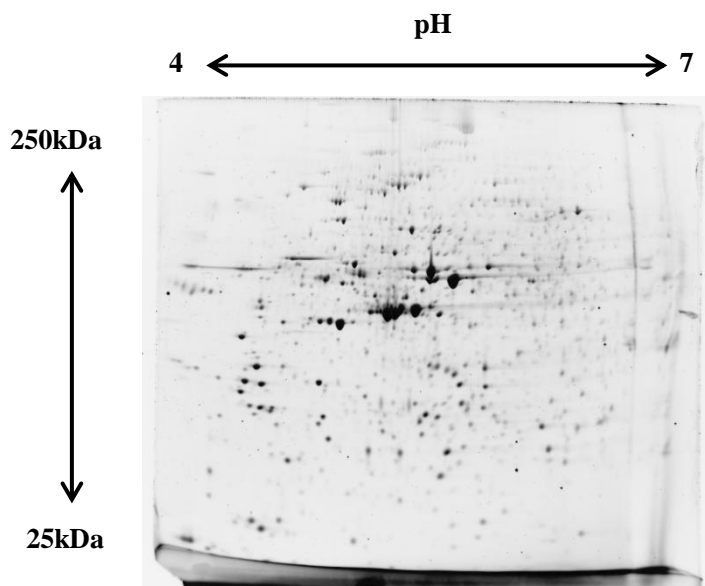
細胞や組織に存在するタンパク質を電解の電気泳動により二次元的に分離することで、通常分子量で分離する SDS-PAGE より多くのタンパク質の変化・定量を行う。

○操作の流れ



○測定原理

細胞や組織に存在するタンパク質を二段階の電気泳動により二次元的に分離する手法である。一次元目は等電点電気泳動によりタンパク質を分離し、二次元目は SDS-PAGE により分子量で分離する。



A-5-1. 溶液の調整およびゲルの作成

○溶液調整

基本的に使用する溶液は用事調整

<使用器具・試薬>

- Urea (219-00175/Wako)
- Thiourea (208-01205/Wako)
- CHAPS (347-04723/Wako)
- Dithiothreitol(DTT) (045-08974/Wako)
- Pharmalyte(pH 3-10) (17-0456-01/GE)
- Protease Inhibitor
- Triton X-100 (T9284/Sigma)
- Acetic acid (017-00256/Wako)
- Bromophenol Blue (BPB) (M8G8844/半井化学薬品株式会社)
- Tris (207-06275/Wako)
- HCl (080-01066/Wako)

- SDS (199-07141/Wako)
- Glycerol (17018-25/Nacalai)
- Iodoacetamide (095-02891/Wako)
- Glycine (077-00735/Wako)
- Methanol (137-01823/Wako)
- Flamingo (x10) 溶液 (161-0491/Bio-Rad)
- Milli-Q

<タンパク抽出液>

- Urea 1.50g
- Thiourea 0.75g
- 20%(w/v)CHAPS 0.50mL
(0.10g)
- Dithiothreitol(DTT) 0.05g
- Pharmalyte(pH 3-10; 使用ゲルの pH に合わせる) 0.10mL
- Protease Inhibitor 適量

以上を Milli-Q で 5mL にメスアップする。

*タンパク抽出液は DTT を入れずに 1mL ずつに分注し、冷凍庫で保存可能。

*DTT は強力な還元剤であるため、使用直前に入れる。

* Pharmalyte はゲルの pH レンジをカバーしているものを選択すること。

<一次元目ゲル膨潤液 (ゲルストリップ 4 本分)>

- Urea 7.2g
- Thiourea 3.04g
- 20%(w/v)Triton X-100 2mL
- Dithiothreitol (DTT) 0.04g
- Pharmalyte (pH 3-10; 使用ゲルの pH に合わせる) 0.20mL
- 0.1M acetic acid 0.50g
- 0.1%(w/v) BPB 0.50mL

以上を Milli-Q で 20mL にメスアップする。

*DTT は使用直前に入れる。

*BPB は着色するためであり、上記の通りの用量でなくても良い。

*20%(w/v)Triton X-100 は作り置き可能(約 1 年)

*0.1M acetic acid は作り置き可能(約 1 年)

* Pharmalyte はゲルの pH レンジをカバーしているものを選択すること。

<SDS 処理化液 (ゲルストリップ 2 本分)>

• Urea	3.63g
• Dithiothreitol (DTT)	0.05g
• 0.5M Tris-HCl, pH 6.8	0.5mL
• 10% (w/v) SDS	2.00mL
• 0.1%(w/v) BPB	0.25mL
• 50%(v/v) Glycerol	5.00mL

*DTT は使用直前に入れる。

*BPB は着色するためであり、上記の通りの用量でなくても良い。

*0.5M Tris-HCl, pH 6.8 は作り置き可能(約 1 年)

*10% (w/v) SDS は室温で保存可能

*50%(v/v) Glycerol は作り置き可能(約 1 年)

<アルキル化処理液 (ゲルストリップ 2 本分)>

• Urea	3.63g
• Iodoacetamide	0.45g
• 0.5M Tris-HCl, pH 6.8	0.50mL
• 10%(w/v) SDS	2.00mL
• 0.1%(w/v) BPB	0.25mL
• 50%(w/v) Glycerol	5.00mL

*BPB は着色するためであり、上記の通りの用量でなくても良い。

<SDS-泳動バッファー (Tris-Glycine 系)>

10x バッファー

- Tris 30.3g
- Glycine 144g
- SDS 10g
- Distilled Water to 1000mL

1x バッファー

- Tris 3.03g
- Glycine 14.4g
- SDS 1.0g
- Distilled Water to 1000mL

*二次元目の電気泳動では約 1.8L 使用するため 1 日目に作製するとよい。

*10x バッファーの場合はストックしておき、使用前に 10 倍希釈して用いる。

*このバッファーは陰極側も陽極側も同じバッファーで良い。

<タンパク固定液 (500mL / 二次元目ゲル 2 枚分)>

- メタノール 250mL (終濃度 50%)
- 酢酸 50mL (終濃度 10%)
- Milli-Q 200mL

*使用後はシンクには捨てずに 5 研のポリタンクへ捨てる。

*タンパク固定液は二次元目の電気泳動終了 30 分ほど前に作製する。

*タンパク固定液は SDS-電気泳動中に作製するとよい。

<染色液 (400mL / 二次元目ゲル 2 枚分)>

- Flamingo (x10) 溶液 40mL
- Milli-Q 360mL

*染色液は 1x の溶液を作製しておき、4°C で保存しておく。

*染色液は 5 回ほどリユース可能。

*SYPRO Ruby でも染色可能。ここでは Flamingo のみの組成を記す。

○ゲルの作成

ゲルメーカーにて作製する場合、4枚作製する場合は240mL、2枚作製する場合は160mL 調整する。

ゲルメーカーを使用しない場合は、1組あたり40mL 調整する。

*ゲルメーカーを使用して1枚作成する場合は80mL 調整する必要がある。

10% アクリルアミド溶液

ゲル枚数	1枚	2枚	4枚
ゲルメーカーの使用	無	有	有
全体量	40mL	160mL	240mL
30% Acrylamide, 0.8%Bis	13.3mL	53.3mL	80mL
1.5M Tris-HCl pH8.8	10mL	40mL	60mL
Water	16.1mL	64.2mL	96.3mL
10% SDS	0.4mL	1.6mL	2.4mL
10% APS	175 μ L	0.7mL	1.1mL
TEMED(直前)	30 μ L	120 μ L	180 μ L

※約1時間程度脱気させる(TEMEDを加える前)。

*ゲル濃度は10%~12.5%の範囲で作製する。(これ以外の濃度ではゲルが破損しやすいため)

*TEMEDは開始剤のため、流し込む直前に入れる。

*1.5M Tris-HCl pH 6.8は4°Cで保存可能。

*10% SDSは室温で保存可能。

*10%APSは用事調整が好ましいが、4°Cで保存可能。(約1週間)

*ゲルは30分で固まるが、一晩室温にて重合させた方が綺麗なスポットが得られる。

*ゲルの保存はジップロックにMilli-Qを入れ湿潤状態を保っていれば、4°Cで1週間保存可能。

○泳動用プレートの組み立て方法

<使用器具・試薬>

- SDS-PAGE 用ゲルメーカー (3037-00/anatech)
- セパレーター (3037-00/anatech)
- ダミーアクリルプレート (3022-07/anatech)
- アンダープレート (3037-00/anatech)
- ポリエステル粘着テープ (3070-41/anatech)
- サージカルテープ (3070-38/anatech)
- SDS ゲル作製コーム (3068-40/anatech)
- 泳動用プレート(プレーン) (3068-34/anatech)
- 泳動用プレート(ノッチ、スペーサー付き) (3068-35/anatech)

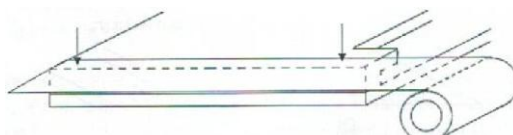
<操作>

- ① 泳動用プレートを 99%エタノールで拭き、乾拭きしてプレートを綺麗にする。
- ② スペーサーが内側に来るように泳動用プレートを合わせる。

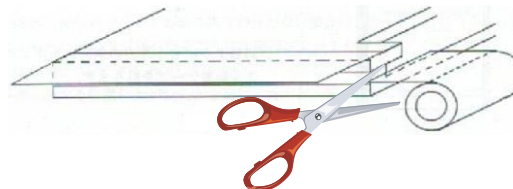
- ③ 側面の片側をクリップなどで留め、ズレないように固定し、台の上に寝かせて置く。



- ④ 泳動用プレートの両端(矢印の部分)にポリエステル粘着テープをあて、その後シワの無いように貼り付ける。



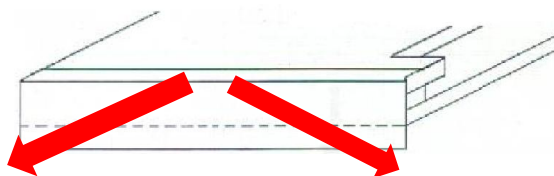
- ⑤ 泳動用プレートの端に合わせてポリエステル粘着テープを切断する。



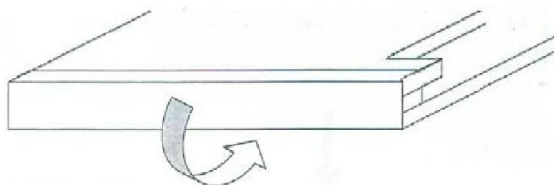
- ⑥ ポリエステル粘着テープを角の所でしっかりと折り目をつける。



- ⑦ 泳動用プレートの側面にテープを当て、真ん中から外側に向けて順に貼っていく。(この時、空気が入らないように貼る。)



- ⑧ 同じように角にしっかりと折り目をつけて、同様に貼り付ける。



- ⑨ 同様にもう片方の側面にもポリエステル粘着テープを貼る。

- ⑩ ゲルメーカーに泳動用プレートをセットする。

この時に、泳動プレートがゲルメーカー本体の高さと、同一もしくは0.5mm程度高いことを確認する。もし、低い場合にはセパレーターをもう一枚追加する。

- ⑪ 前述のアクリルアミド溶液に開始剤の TEMED を入れ、少し混ぜたのちにゲルメーカーにアクリルアミド溶液を流し込む。

*アクリルアミド溶液は TEMED 以外をいれて、脱気させておく。(ゲル中に気泡が入るのを防ぐため。)

*ガラス板の間にはスペーサーを挟むことを忘れない。(忘れるとガラス板同士がくっつき、剥がれない。)

*ゲルは 30 分で固まるが、一晩室温で重合させた方が綺麗なスポットが得られる。

<補足>

12.5%アクリルアミド溶液作製の場合

ゲル枚数	1 枚	2 枚	4 枚
ゲルメーカーの使用	無	有	有
全体量	40mL	160mL	240mL
30% Acrylamide, 0.8% Bis	16.7mL	66.7mL	100mL
1.5M Tris-HCl pH8.8	10mL	40mL	60mL
Water	12.5mL	50.0mL	74.9mL
10% SDS	0.4mL	1.6mL	2.4mL
10% APS	175 μ L	0.7mL	1.1mL
TEMED(直前)	30 μ L	120 μ L	180 μ L

※約 1 時間程度脱気させる(TEMED を加える前)。

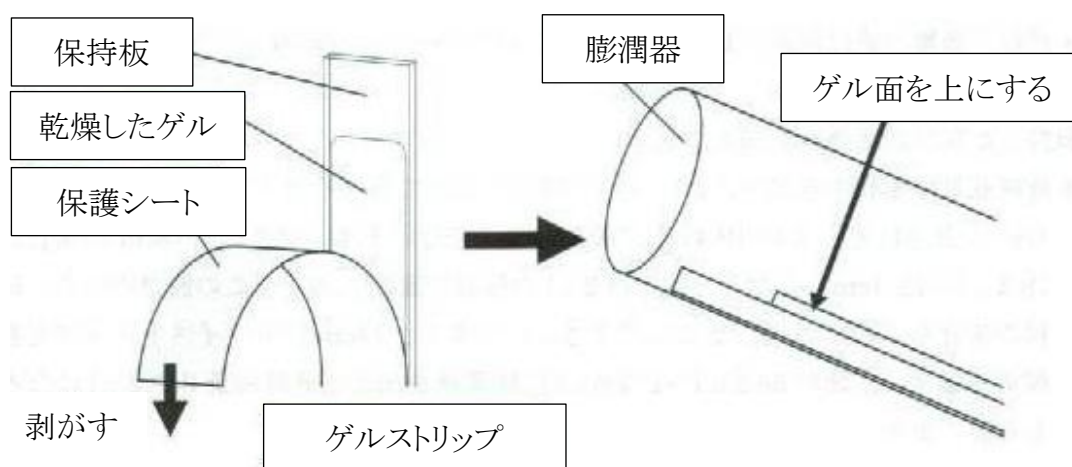
A-5-2 ゲルストリップの膨潤

<使用器具・試薬>

- 膨潤液
- Immobiline DryStrip pH4-7NL, 18cm (17-1233-01/GE)
- ピンセット
- ゲルストリップ膨潤器 (3600-14/anatech)
- シリコン栓 (3600-14/anatech)
- クールホレスターIPG-IEF Type-PX (3650-01/anatech)

<操作>

- ① ゲルストリップ膨潤器の片側にシリコン栓をし、膨潤液を1本につき約5mL入れる。
- ② ゲルストリップの保護シートをゆっくり剥がし、ゲル面を上にしてゲルストリップ膨潤器に入れ、シリコン栓で封をする。この時にゲル面に傷をつけないように注意する。傷をつけると電気泳動パターンへの乱れになる。



- ③ クールホレスターIPG-IEF Type-PX のプレートの上にクールシートを敷き、ゲルストリップの入ったゲルストリップ膨潤器を置く。ゲルストリップが膨潤液に完全に浸かっている事を確認し、ゲルストリップ膨潤器が転がらないように注意する。
*クールホレスターIPG-IEF Type-PX で電気泳動を行っている場合は、インキュベーター内などを使用して 20℃ の条件下で膨潤させる。
- ④ クールホレスターIPG-IEF Type-PX の電源を入れる。
- ⑤ 温度入力キーを使い、設定温度を 20℃ に設定する。

*温度コントローラーの上部はプレートの現在温度を表し、下部は設定温度を表す。プレートが設定温度になるまでには数分かかる。

*室温は設定値温度の $\pm 10^{\circ}\text{C}$ の範囲になるように空調する。

- ⑥ 設定温度を 20°C 一定のままにし、ゲルスリップの膨潤が十分になるまで一晩静置する。

*膨潤時間は最短で 8 時間、最長で 24 時間にする。

*膨潤したゲルスリップは保存ができないため、用事調整すること。

<補足>

濃度の薄い試料液を泳動する場合、またはアプライする試料の量を増やしたい場合には、ゲルスウェリングチャンバー(購入が必要;商品番号:3070-00)を使用して、膨潤と同時に試料を添加する方法が存在する。

ただし、プロテアーゼを含む試料などには試料塗布用ろ紙によるアプライ方法の方が良い。また、SDS を含んだ抽出液で調整したサンプルでは以下の方法ではできない。

- ① 膨潤液を調整する。
- ② 試料を調整する。(試料調整方法は後述)
- ③ 調整した試料に膨潤液を加える。

*最終液量はゲルスリップの長さにより異なる。

1cm の長さに対して約 $19.4\mu\text{L}$ の液量で膨潤を行う。例えば、18cm の場合では、 $19.4\mu\text{L}\times 18(\text{cm})$ となり、約 $349.2\mu\text{L}$ の溶液で膨潤させる。この液量のうち、試料の割合を $1/6$ から $1/2$ にする。つまり、18cm のドライストリップを膨潤する場合は、試料 $58.2\mu\text{L} \sim 174.6\mu\text{L}$ に膨潤液を加えて最終液量 $349.2\mu\text{L}$ になるようにする。

- ④ 膨潤液を加えた試料をゲルスウェリングチャンバーに入れる。
- ⑤ ゲルスリップの保護シートを剥がし、ゲル面を下にしてその上に置く。
- ⑥ ゲルスリップの両端からシリコンオイル 1.5mL ほどゆっくり注ぎ、空気から完全に遮断する。
- ⑦ 蓋をしてゲルスウェリングチャンバーをインキュベーターの中に置き(設定温度 20°C)、静置する。
- ⑧ 設置値温度を 20°C 一定のままにして、ゲルスリップの膨潤が十分になされるまで一晩静置する。膨潤時間は最短で 8 時間、最長で 24 時間にする。

*膨潤時に使用したシリコンオイルは再利用不可。

A-5-3 細胞からのタンパク抽出方法

<使用器具・試薬>

- アシストチューブ
- 超音波粉碎機
- 超速遠心機
- Ice

<操作>

- ① 空のアシストチューブの重量を測定する。
- ② 培地を除いて、氷冷した PBS 1mL で 1 回容器内壁を洗浄する。
- ③ 洗浄した PBS を捨て、新たに PBS を 1mL 入れた状態で、氷上でセルスクレーパーなどを用いて細胞を掻き集め、アシストチューブへ移す。
- ④ 5000rpm、4℃、5 分間遠心する。
- ⑤ 遠心後、出来るだけ完全に上澄みの PBS を除き、細胞の質重量を量る。(この時点で一回限り凍結保存してもよい。)
- ⑥ 細胞の湿重量に対して 4 倍量のタンパク抽出液を加えて、氷冷下で超音波破碎する。
- ⑦ 15000rpm、4℃、20 分間遠心を行い、上清を採取し、これを試料とする。

<試料の調整の注意点>

*試料を調整したら 1 時間以内に等電点電気泳動を行う方が良い。

*タンパク定量を行う場合は、等電点電気泳動を行った後に残った試料で定量を行うと良い。

*試料によっては抽出物の状態で保存したものを使用すると、超低温条件下で保存した場合でも再現性が得られない場合がある。保存するときは、組織、細胞など破碎をする前の状態で凍結保存すると良い。

A-5-4 等電点電気泳動(一次元目)

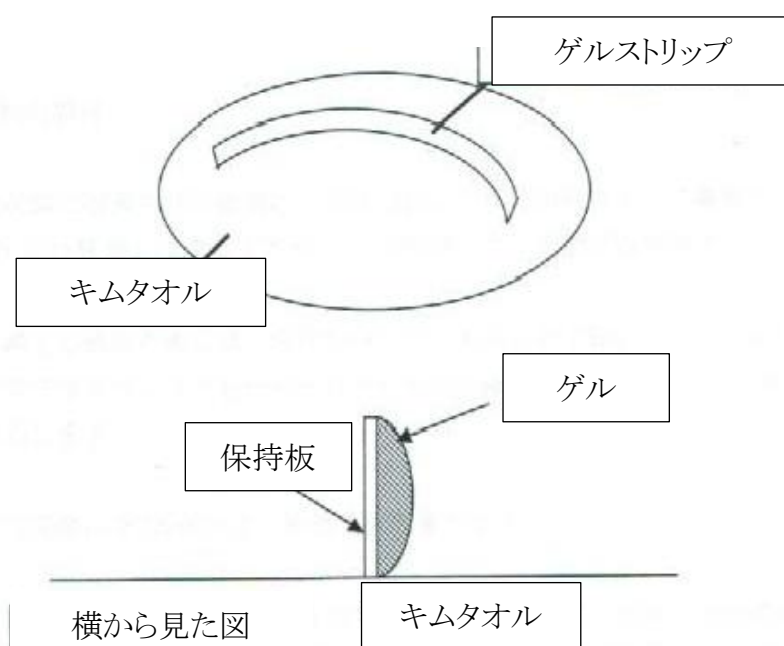
<使用器具・試薬>

- クールホレスターIPG-IEF Type-PX (3650-01/anatech)
- クールシート (3650-08/anatech)
- トレイ (3650-03/anatech)
- 電極 (2 個) (3650-04/anatech)
- ゲルストリップ保持版板 (3650-10/anatech)
- 低粘度シリコンオイル (3600-11/anatech)
- 電極用ろ紙 (3600-12/anatech)
- 試料用ろ紙 (3600-13/anatech)
- 試料ろ紙押え用アタッチメント (3650-18/anatech)
- 高電圧用セフティカバー付きコード (赤・黒) (3202-05/anatech)
- パワーホレスター Pro3900 (3900-01/anatech)
- Immobiline DryStrip pH4-7NL, 18cm (17-1233-01/GE)
- ゲルストリップ膨潤器 (3600-14/anatech)
- ピンセット

<操作>

- ① クールホレスターIPG-IEF Type-PX の電源を入れ、設定値温度を 20℃に設定する。
*温度コントローラーの上部はプレートの現在値温度を示し、下部は設定値温度を示す。温度が設定温度になるまでには数分かかる。
- ② クールホレスターIPG-IEF Type-PX のプレートの上にクールシートを敷き、トレイを置く。トレイのつまみが赤色の方が左側に来るようにし、黒色が右側に来るように置く。
- ③ トレイに少量のシリコンオイル(大気と遮断目的)を入れ、ゲルストリップ保存板をセットする。
*この時、ゲルストリップ保存板とトレイ底面の間には空気を残さない。

- ④ 膨潤済みのゲルストリップを膨潤器からピンセットで取り出し、平らなる紙またはキムタオルなどの上にゲル面が横を向くように弧を描くように立てる。この状態で、必ず 60~90 秒静置し、余分な膨潤液を取り除く。
- *ゲルと取り出す時にはゲル面が膨潤器に触れないように注意する。
- *余分な水気があると電気泳動パターンの乱れの原因となる。



- ⑤ ゲルストリップをゲルストリップ保持板の溝にゲル面が上向きになるように置く。
- *ゲルストリップには向きがあるので、+と印字されている方が左側(陽極側)に来るようにする。
- *トレイにはドライストリップの長さに合わせた印があるので、目安にする。
- *2本の場合はゲルストリップ間を1本分空けておき、左ゲル端を揃えて置く。
- ⑥ 電極用ろ紙を2枚用意し、Milli-Qをたっぷり均一に染み込ませた後、キムワイプなどに電極用ろ紙を挟み、上から軽く押さえてMilli-Qを取り除く。キムワイプ内の電極用ろ紙の位置を変えて、同じ作業を4~5回繰り返す。
- *水気が多いと、電気泳動パターンの乱れの原因となる。
- ⑦ 電極用ろ紙をゲルストリップのゲル部分の両端にセットする。
- *電極用ろ紙はゲルが半分かかる状態でセットする。
- *ゲルストリップが2本と少ないときは、電極用ろ紙を半分に切り使用することが可能。
- ⑧ 試料をパラフィルムの上に置いた試料塗布用ろ紙に染み込ませる。この時に全ての試料が染み込むように1度試料塗布用ろ紙をひっくり返す。

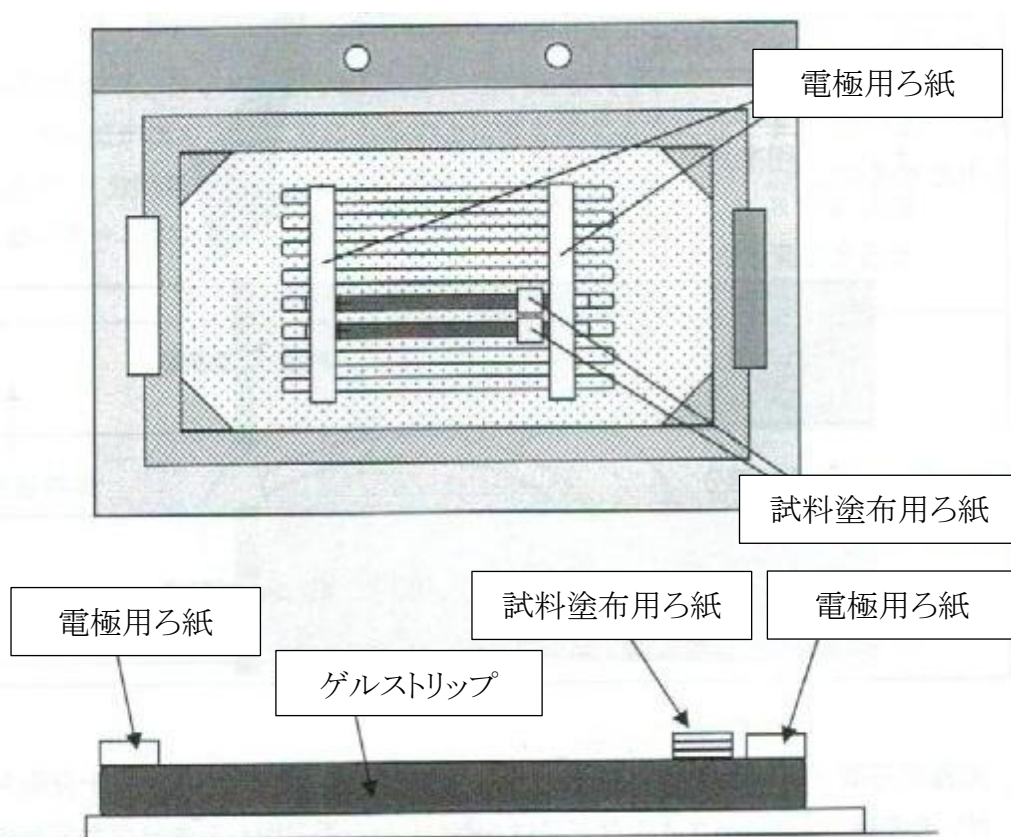
試料塗布用ろ紙 1 枚あたり $18\mu\text{L}$ の試料を染み込ませることができる。

*アプライしたい液量が少量で試料塗布用ろ紙が乾きすぎている場合は、膨潤液か抽出液を加えて、試料塗布用ろ紙 1 枚あたり $18\mu\text{L}$ になるようにする。

- ⑨ ピンセットで右側(陰極側)の電極用ろ紙から 1mm ほど離れたゲルストリップの上に載せる。

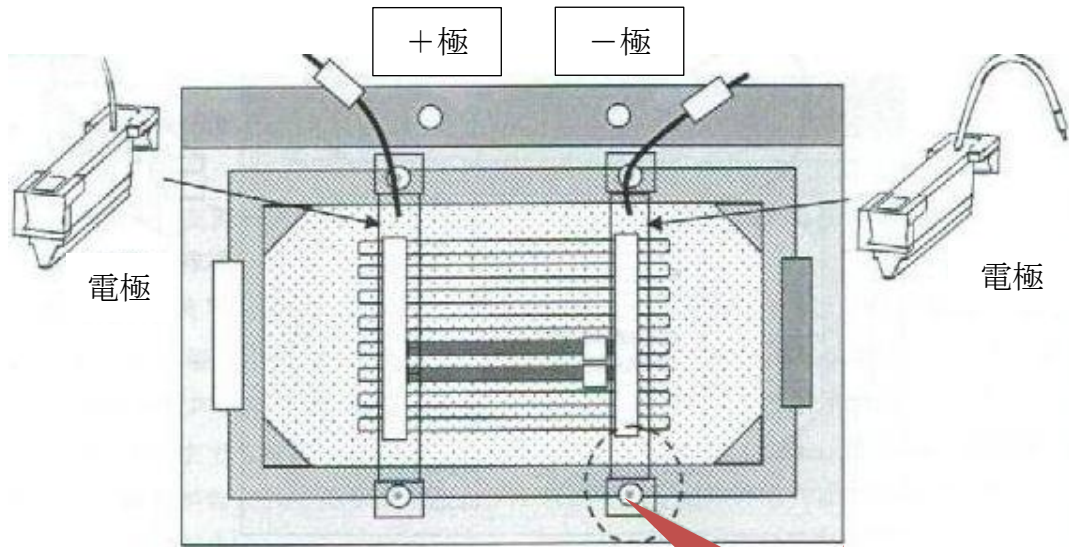
*試料が $18\mu\text{L}$ を超える場合は試料塗布用ろ紙を同じ位置に最大 3 枚重ねて使用することが可能。この場合は最大 $54\mu\text{L}$ アプライできる。

*複数の試料をアプライした場合には、どのゲルストリップにアプライしたかが分かるようにトレイの側面や装置の蓋などにラベルを張る。

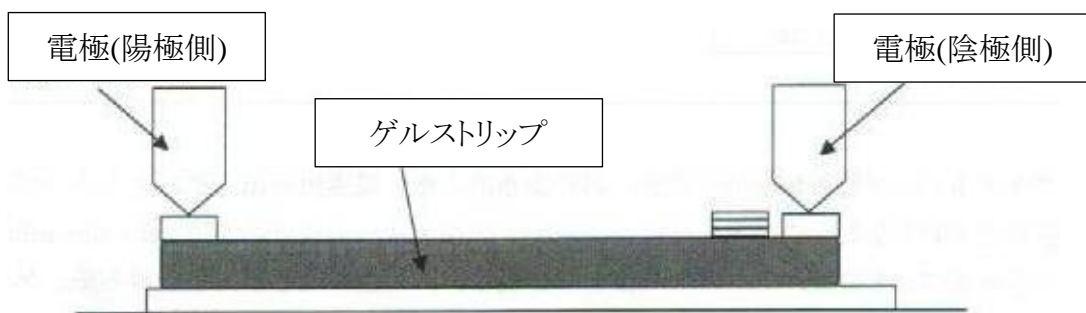
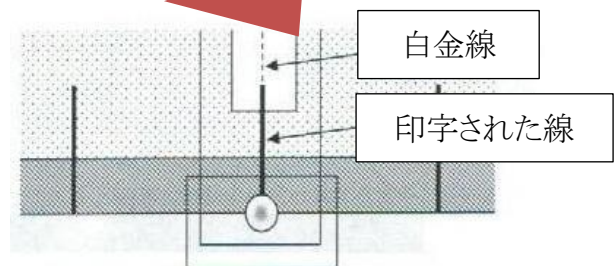


横から見た図

- ⑩ 電極を取り付ける。電極は両手で持ち、電極用紙の真ん中に電極が来るようにゆっくりトレイに取り付ける。電極を軽く押さえ、密着させる。
 *上から電極を見て、中央に電極がセットされていることを確認する。



*電極をまっすぐにする。トレイに印字された線と電極下部についている白金線の位置をそろえると、大体電極用紙の真ん中に来る。



横から見た図

- ⑪ 左の電極リード線を泳動槽本体の“+(赤)”差込口に、右の電極リード線を泳動槽本体の“- (黒)”差込口にそれぞれ差し込む。
- ⑫ 試料塗付用ろ紙が浮き上がるのを防ぐため、試料をアプライした側の電極に試料塗布用ろ紙押え用アタッチメントを載せる。試料塗布用ろ紙押え用アタッチメントが試料塗布用ろ紙をしっかりと押えるようにするために、ピンセットで試料塗布用ろ紙と接している部分を軽く押さえる。
- ⑬ トレイにシリコンオイルを約 150mL ~ 200mL 流し込む。この時に側面から見て、試料塗布用ろ紙、電極用ろ紙、ゲルストリップがシリコンオイルに浸かっていることを確認。
*ゲルストリップの乾燥を防ぐため、また試料塗布用ろ紙、電極用ろ紙、ゲルストリップを空気から遮断するため。これを怠ると、3500V の電圧がかかるためゲルが蒸発し、過電流が流れるので、危険である。
- ⑭ 泳動装置の蓋を閉じ、パワーホレスター Pro3900 を高電圧用セフティカバー付きコードで接続する。
*蓋が開いていると通電しない。
- ⑮ パワーホレスター Pro3900 の電源を入れ、ゲルストリップに合ったプログラムを確認する。
プログラムにない場合は、Menu → Opt → S-G → 18cm → 3-10 → 3500V → プログラムの保存先(1-9 までである)からプログラムを組む。プログラムは以下に記す。
- ⑯ パワーホレスター Pro3900 の Run ボタンを押して、等電点電気泳動を開始する。

<プログラム>

ステップ	モード	設定電圧	設定電流	時間
1	V	500V	250mA	2:00M
2	SG	3500V	2mA	6:00M
3	SV	3500V	2mA	10:00M
4	SV	3500V	2mA	∞

定電圧で等電点電気泳動が行われた場合、合計 18 時間 + ホールド時間もしくは

ステップ	モード	設定電圧	設定電流	時間
1	V	500V	250mA	2:00M
2	SV	700V	2mA	1:00M
3	SV	1000V	2mA	1:00M
4	SV	1500V	2mA	1:00M
5	SV	2000V	2mA	1:00M
6	SV	2500V	2mA	1:00M
7	SV	3000V	2mA	1:00M
8	SV	3500V	2mA	1:00M
9	SV	3500V	2mA	∞

定電圧で等電点電気泳動が行われた場合、合計 18 時間＋ホールド時間

*モードの説明

V:定電圧モード。定電圧で泳動を行う場合に選択。

C:定電流モード。定電流で泳動を行う場合に選択。

W:定電力モード。電圧値、電流値、電力値の3つの値の上限を決定し、その上限を越えないように泳動を行う場合に選択。

SV:セフティ定電圧モード。電流値のリミッター値を設定して、“定電圧”で泳動を行う場合に選択。設定した電流のリミッター値に達して5秒が経過すると自動的にPause状態になる。

SC:セフティ定電流モード。電圧値のリミッター値を設定して、“定電流”で泳動を行う場合に選択。設定した電圧のリミッター値に達して5秒が経過すると自動的にPause状態になる。

G:グラジェントモード。電圧値を直線的にあげて、もしくは下げて泳動を行うモード。前のステップで設定した電圧値をスタート点とし、入力した時間内に入力した電圧値まで上昇する。

SG:セフティグラジェントモード。電圧値を直線的にあげ、もしくは下げて電気泳動を行う場合に選択。電圧値を変化させて電気泳動を行うが、何らかの理由で電流値もしくは電力値が設定した値に達して5秒が経過すると、自動的にPause状態になる。

<注意>

等電点電気泳動を開始して、15分ほど経過したら下記の2点を必ず確認すること。

① 電流値の確認。

理想的な電流値は、0~0.2mA である。電流値が高いとサンプルに含まれる塩濃度が高い可能性があり、15分を経過しても1mAを超える場合は電気泳動を続けるとゲルが焦げる可能性がある。(不純物が多くても電流値は高い。)

② ゲルストリップに含まれるBPBが“+(陽極)側”に移動しているかを確認。

移動していない場合はセットに問題があり、電圧がゲルストリップに掛かってない可能性が考えられる。この場合は、電源の出力を止めてから再度ゲルと電極のセット部分をチェックすること。

*同じ試料をアプライしても色素(BPB)の移動の速度が異なることがあるが、これは電気泳動に影響することはない。

<補足>

○シリコンオイルの再利用

一次元目の等電点電気泳動に使用したシリコンオイルは下記の手順で処理し、2回目以降のシリコンオイルとして使用可能である。

1. 使用後のシリコンオイルは透明の容器に移す。

*シリカゲルをいれるため、透明の方がよい。

2. 移したシリコンオイルにシリカゲル(青いビーズ状が良い)を底から1cmほどの高さまで入れて、一晩以上脱水を行う。

*一晩でなくても次回使用するまでこの状態で保存。

3. 次回使用する際にシリコンオイルをろ紙を使用して濾過し、ゲル片や埃などを取り除く。

4. 等電点電気泳動終了後、シリコンオイルは再び、シリカゲル入りの容器へ移す。

*次回の電気泳動に支障がなければ、繰り返し使用可能。繰り返し使用できる目安は約600mL使いまわして、50回ほど使用可能だが、使用状況により異なる。

*不純物が多く混入した場合には使用しない。

A-5-5 ゲルストリップの SDS 処理とアルキル化処理

<目的>

SDS 処理は等電点電気泳動の次に行う SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のための前処理である。タンパク質を SDS 化し、分子量の違いで分離するのを助ける。アルキル化処理はポリアクリルアミドゲル中に含まれるモノマーのアクリルアミドがタンパク質を修飾するのを防ぐ。質量分析やプロテアーゼシーケンサーによるアミノ酸配列決定を行う場合はアルキル化を行う。

<使用器具・試薬>

- ゲルストリップ膨潤器 (3600-14/anatech)
- SDS 処理液
- アルキル化処理液
- ピンセット

<操作>

- ① ゲルストリップの本数分の SDS 処理液、還元アルキル化処理液、Milli-Q のゲルストリップ膨潤器を準備する。
*2 サンプルなら計 6 本必要。
- ② SDS 処理液に DTT を加え、ゲルストリップ膨潤器に約 5mL ずつ入れる。
- ③ Milli-Q をゲルストリップ膨潤器に 9 分目まで入れる。
- ④ 一次元目のプログラムが終了していることを確認して、パワーホレスター Pro3900 の STOP を押して、停止後にパワーホレスター Pro3900 の電源を切り、念のため接続ケーブルも外す。
*都合がつかない場合はホールド状態でしばらく放置。
- ⑤ 電極をトレイから取り外し、ゲルストリップの上に乗っている電極用ろ紙と試料塗布用ろ紙をピンセットで取る。試料塗布用ろ紙がゲルストリップに張りついて剥がれない場合は、付いたまま作業を続ける。SDS 処理を行うことで比較的剥がれやすくなるので、SDS 処理が終了してから剥がす。
- ⑥ ピンセットでトレイからゲルストリップを取り出し、Milli-Q を 9 分目まで入れた膨潤器のなかで 1 秒ほどシリコンオイルを洗い流す。
*トレイからゲルストリップを取り出す際には一度、トレイの淵にゲルストリップを置き、しっかりつかんだ後に膨潤器で洗う。この時にゲルストリップをキムワイプ等に落とし、ゲル面が付くと二次元目の電気泳動の乱れの原因となる。

- ⑦ ろ紙などの上にゲル面が上になるように約 10 秒置き、余分な水気を取る。
- ⑧ 用意しておいた SDS 処理液にゲル面が上になるようにゲルストリップを入れ、シリコン栓をする。この時に、ゲル面を膨潤器に当てて、傷つけないようにする。
*サンプル情報を記したテープをゲルストリップ膨潤器に張り付ける。
- ⑨ ゲル面が上になるように穏やかに 30 分間振とうさせる。
*止める際には、SDS 処理を 15 分行った後に凍結。解凍後は残りの 15 分から再開。凍結させる際には、乾燥しないようにラップなどに包み、-80℃で凍結させる。約 1 ヶ月間凍結可能。
*アルキル化を行わない場合は SDS 処理を 40 分行う。
- ⑩ SDS 処理の間に調整しておいたアルキル化処理液をゲルストリップ 1 本につき約 5mL 膨潤器に入れる。
- ⑪ SDS 処理が終わったらゲルストリップをアルキル化処理液にゲル面が上になるように入れ、シリコン栓をする。
*この時にサンプル情報を記したテープをアルキル化処理のゲルストリップ膨潤器に付け直す。
- ⑫ ゲル面が上になるように穏やかに 15 分振とうさせる。
- ⑬ ゲルストリップをピンセットで取り出し、SDS-電気泳動を行う。

A-5-6 SDS-電気泳動

<使用器具・試薬>

- 電気泳動槽(セフティカバー付き) (3320-01/anatech)
- ゲルストリップ押えシャーケーム 200 (3068-39/anatech)
- 泳動用プレート(プレーン) (3068-34/anatech)
- 泳動用プレート(ノッチ、スペーサー付き) (3068-35/anatech)
- パワーホレスター Pro3900 (3900-01/anatech)
- 高電圧用セフティカバー付きコード (3202-05/anatech)
- スパチュラ

<前準備>

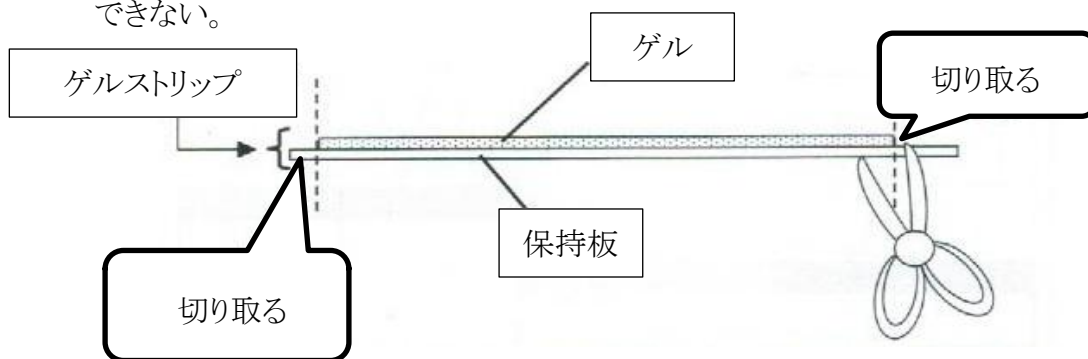
- ① 前述のポリアクリルアミドゲルを作製しておく。
- ② SDS-電気泳動用の泳動バッファーを約 2L 作製しておく。
- ③ 電気泳動槽は泳動バッファーがこぼれるのを防ぐため、トレイまたはバットの上で行う。

<操作>

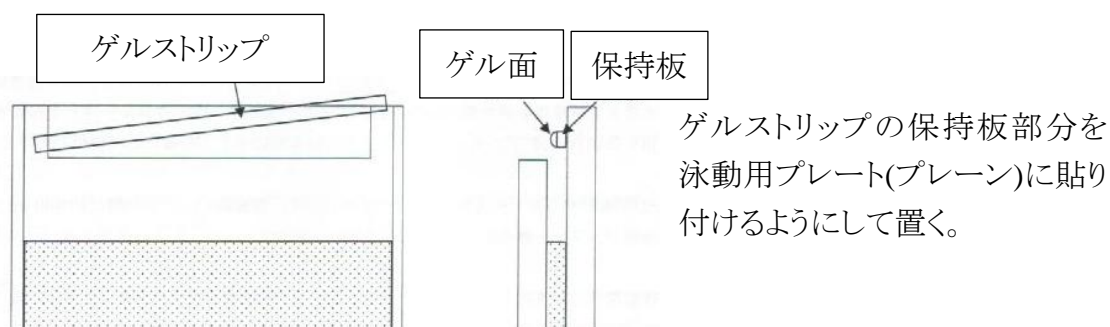
1. 作製しておいたアクリルアミドゲルのガラスプレートについているサージカルテープ(下部の白いテープ)を剥がす。
ポリエステル粘着テープ(黄色)は剥がさない。
*サージカルテープは、ゲルメーカーを使用せず、ゲルを 1 枚で作製した時に必要なテープ。
2. 作製したアクリルアミドゲルを Milli-Q で洗浄する。
*この時にゲル片などが残っているとゲルストリップをうまく密着させて載せることができないので、必ず取り除く。
3. 電気泳動槽にアクリルアミドゲルを差し込む。
この時に、泳動プレートのノッチ側(切り込みの入っているガラス板)が内側にくるようにセットする。
*泳動槽の下部には泳動用プレートを載せる部分があるので、そこに載るようにセットする。

4. アルキル化処理が終了したゲルストリップの端をゲルストリップ膨潤器から出し、ゲルストリップ保持板の余分な部分をはさみで切り取る。

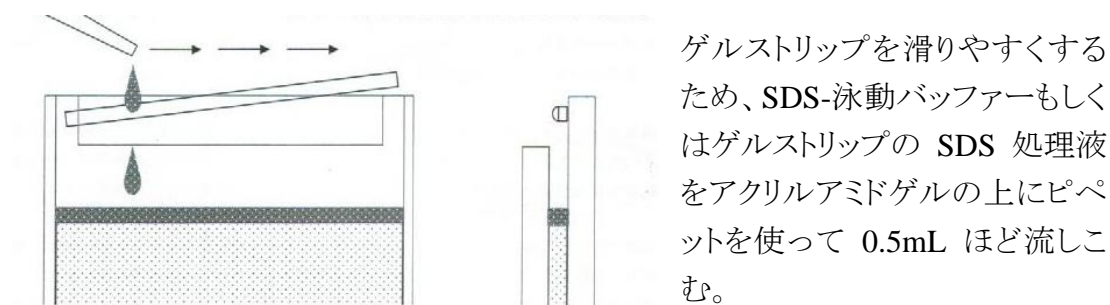
*スラブゲルは 19cm であり、アクリルアミドゲルは 18cm であるため載せることができない。



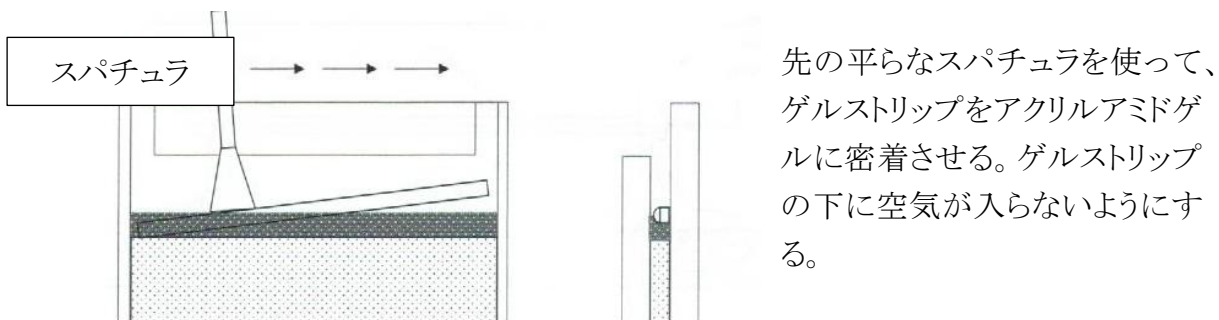
5. アクリルアミドゲルの上にゲルストリップのゲル面が内側になるように載せる。(下図参照。)



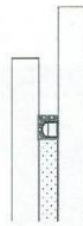
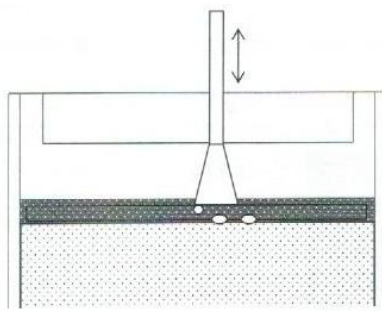
ゲルストリップの保持板部分を泳動用プレート(プレーン)に貼り付けるようにして置く。



ゲルストリップを滑りやすくするため、SDS-泳動バッファーもしくはゲルストリップの SDS 処理液をアクリルアミドゲルの上にピペットを使って 0.5mL ほど流しこむ。

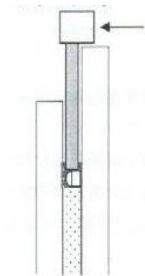
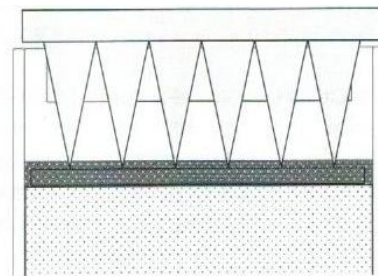


先の平らなスパチュラを使って、ゲルストリップをアクリルアミドゲルに密着させる。ゲルストリップの下に空気が入らないようにする。



ゲルストリップの下に空気が入ってしまった場合は、ゲルストリップの保持板をスパチュラで何度か上から押すことで、空気が浮き上がって抜ける。

6. ゲルストリップ押えシャークコームをゲルストリップの上に軽く載せ、ゲルストリップが浮き上がらないようにする。この時にシャークコームが刺さらないように注意する。ほんの少し刺さった状態であれば大丈夫だが、数ミリ刺さった場合は場所を変え、置き直す。



7. 泳動用プレートを抑え込むために、泳動用プレート押え板を差し込んで固定する。
8. 陽極側バッファー層に 1/3 ほど泳動バッファーを注ぐ。
9. 泳動用プレートをセットした陰極側バッファー層の中にいれる。アクリルアミドゲルの下部に気泡がある場合は陰極バッファー槽ごと軽く上下に動かして、気泡を抜く。
10. 泳動バッファーを陽極側と陰極側の水位が同じ高さになるようにバッファーを満たす。
*同じ高さにすると、水位が下がることがないので、泳動バッファーのリークを防ぐことができる。
11. パワーホレスター Pro3900 と泳動槽を高電圧用セフティカバー付きコードでつなぐ。
12. 定電圧で SDS-電気泳動を開始する。
始めは 20mA / 枚で設定し泳動を行う。
*この時、のちにシャークコームを取り除くことを忘れないように、あえて泳動槽のセフティカバーはしない。
13. 15~30 分経過し、ゲルストリップ中の色素“BPB”がアクリルアミドゲルに完全に移動していることを確認した後、パワーホレスター Pro3900 の Pause ボタンを押して、一時停止させる。
14. 一時停止させたら、“ゲルストリップ押えシャークコーム”を取り除く。

15. パワーホレスター Pro3900 の電流値を 30mA にして SDS-電気泳動を再開する。
サーキュレーターにて冷却しながら泳動を行う場合は定電流 40mA / 枚で泳動が可能。
*泳動中はジュール熱が発生するため、電流値を高く設定しない。最高でも 45mA / 枚で行う。あまり高く電流値を設定すると泳動装置の破損の原因となる。
*泳動時間は室温やゲル濃度により異なるが、3 時間から 5 時間程度。
16. 3 時間から 5 時間後、BPB の青い線が泳動用プレートの下から約 1cm のところに移動したらパワーホレスター Pro3900 の Stop ボタンを押して電気泳動を終了する。
*念のために接続コードを外す。
17. 泳動プレートを取り出す。
*泳動プレートは泳動バッファーで滑りやすくなっているので慎重に行う。また、Milli-Q で洗浄すると滑りが緩和される。
18. ポリエステル粘着テープ(黄色)を剥がし、切り込みの入っている方の泳動用プレート(ノッチ側)を下にして綺麗なキムタオルの上に置く。
19. スパチュラを使い、泳動プレートの上に差し込み、テコの原理を利用し、泳動プレート(プレーン側: 正方形のガラス板)を外す。

*この時にスパチュラを入れる場所が端すぎると切れ込みの入っているガラス板が割れるので、必ず少し中で行う。



20. 塩基性、酸性が分かるようにアクリルアミドゲルの“+側:酸性側”の下を斜めに切り落とす。
*切り落とすところは必ず酸性側の下にすること。
21. 一次元目のゲルストリップをアクリルアミドゲルから外す。

22. 泳動プレート(ノッチ側)にアクリルアミドゲルが張り付いているので、アクリルアミドゲルの左右の部分に丁寧に切り込みを入れる。

*切り込みを入れる際に裂け目ができるとそこからゲルが避けてしまうので、丁寧に扱う。

*押して切って進むというイメージでゲルの両端に切れ込みを入れる。

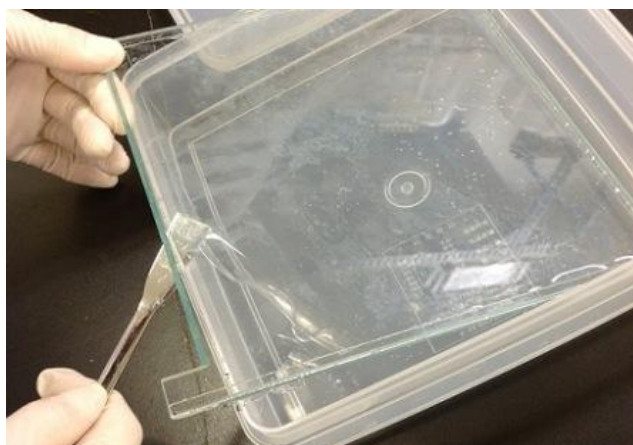


23. 染色・脱色用タッパーに固定液を入れて、慎重にアクリルアミドゲルを移して、染色作業へ移る。

*ゲルをタッパーに移す際にはゲル自身の重みでタッパーへ入れるようにする。

*写真のように少しだけゲルと泳動プレートに空気を入れると、ゲルは自然にタッパーに落ちていく。

*スパチュラの角でゲルを傷つけないよう注意する。



<補足>

○分子量マーカーの使用

<前準備:アガロースゲルの作製>

- ① 0.2g のアガロースに 20mL の Milli-Q を 50mL ビーカーに入れてアガロースを可溶化させる。
*正確に作製する必要はない。
- ② 電子レンジで透明になるまで溶かして、室温まで冷めてから上部にサランラップ等をかけて輪ゴムで止め、4°Cで保存する。(2年間は保存可能)
ふた付き容器でも良いが、ふたを付けたまま電子レンジをかけると容器が破損するので、ビーカーを使用。

<分子量マーカーの作製・アプライ>

- ① パラフィルム上に試料塗布用ろ紙を半分に切って載せる。
- ② 分子量マーカーを 9 μ L、ろ紙に塗布する。
- ③ アガロースを溶かして、1000 μ L ピペットで吸い上げ、1滴滴下する。
- ④ アガロースが固まるまで静置する。
- ⑤ ゲルストリップの両端のゲル部分を 3~5mm 切り落とす。
- ⑥ ゲルストリップをスラブゲル上面にセット後、アガロースを塗布したろ紙を端にセットする。
ろ紙は、側面のスペーサーから 5mm 程離れた位置にセットする。(近過ぎると側面に流れるので注意。)
- ⑦ シャークコームをセットし、電気泳動を開始する。

*アガロースを溶かす際には、吹きこぼれやすいのでこまめに電子レンジを止めてビーカーを攪拌し、温める。

*1000 μ L ピペットで滴下後にチップに残っているアガロースはビーカーに戻す。

*分子量マーカーは、作り置きしない。

作製自体は 5 分程なので、SDS 処理の間で十分間に合う。

*作って時間を置き過ぎるとアガロースの膨らみが小さくなって、バッファー上面に浮き易くなるので注意。

*分子量マーカーは、酸性側・塩基性側のどちら側にセットするかを決めて統一する。

A-5-6 Flamingo による蛍光染色

<使用器具・試薬>

- Flamingo ゲルステイン (Invitrogen/161-0491)
- タッパー
- Methanol (WAKO/137-0183)
- 酢酸
- Milli-Q

<試薬の組成>

固定液

- Methanol 250mL(最終濃度 50%)
- 酢酸 50mL(最終濃度 10%)
- Milli-Q 200mL

染色液

- Flamingo(×10)溶液 40mL
- Milli-Q 360mL

<操作>

- ① 固定液 250mL/ゲル 1 枚の割合で、タッパーに入れ 30 分振とうさせる。
- ② Milli-Q250mL/ゲル 1 枚の割合で、3 回洗浄する。
- ③ 10 倍希釈した染色液を、200mL/ゲル 1 枚の割合で、タッパーに入れ、1 時間振とうさせる。(染色液が遮光性なため、タッパーはアルミホイルで十分に遮光する。)
- ④ 染色液を遮光した容器に回収後、Milli-Q 250mL/ゲル 1 枚の割合で、1 回洗浄する。
- ⑤ ゲルの乾燥を防ぐ為、ゲルをクリアファイルに挟み、挟み口を濡らしたキムワイプで包む。
- ⑥ ジップロックの様なフリーザーバックに入れ、脱イオン水を適量入れて、乾燥しないようにする。(ゲルが数枚ある場合は、各ゲルにサンプル名を記載したテープを張り付ける。)
- ⑦ ゲルの露光を防ぐため、ゲルの入ったフリーザーバックをゲル運搬用の箱へ入れる。
- ⑧ 遺伝子実験施設の蛍光撮影機により、スポットの検出を行う。

A-5-7 画像解析

○フルオロホレスター3000 Ver3.1

フルオロホレスター3000 Ver3.1 は蛍光染色された二次元電気泳動ゲルの画像撮影を高感度で行い、その画像データから必要なスポットを選択し、切り出し作業(手動作業)までを行う装置である。

<操作>

- ① フルオロホレスター3000 Ver3.1 の本体側面の電源を入れる。
- ② パソコンのフルオロホレスター3000 のソフトウェア (FL3000 Ver3) を起動する。
 - *接続ステータスが、“未接続”の場合は、“接続”状態にする。
 - *ソフトウェアの上部メニューバーの“設定”から“環境設定”をクリックし、以下のように設定する。
 - *設定した値は保存されるので、再度の設定は必要ない。

CCD カメラの温度設定:撮影には 10℃を推奨。

*室温が高い場合は室内を冷房にする。

撮影台からの距離 :ゲルサポートプレート(透明アクリル板 厚さ 2mm)の上
にゲルを乗せてスポットの切り出しをするために、
2mm に設定する。

- ③ 使用目的に合わせたプレートに蛍光染色したスクラブゲルを乗せる。
 - ・画像解析用の画像を撮影する場合
ゲル撮影用プレート(黒色アクリル板)の上にスクラブゲルを乗せる。泡が画像に写り込まないように、スクラブゲルの下に挟まった泡を押し出す。
 - ・スクラブゲルからの切り出しを行う場合
ゲルサポートプレート(透明アクリル板)の上にスクラブゲルを乗せる。泡が画像に写り込まないように、スクラブゲルの下に挟まった泡を押し出す。
 - *ゲルサポートプレートが反っている場合は新しい物を使用する。
- ④ プレートの上に、マスクシート(黒色口の字型シート)を被せる。
 - *マスクシートは光を反射しない均一にザラザラした方が表。マスクシートはプレートからの反射光を低減し、バックグラウンドを抑えられる。
- ⑤ スクラブゲルを乗せたプレート本体内部の撮影台の上に設置し、奥の左右にあるネジでマスクシート及びプレートを固定する。
- ⑥ 本体内部の左右にあるランプユニットを回転させて、蛍光色素に対応するランプ(LED)をスクラブゲルへ向ける。

- Blue と Green のランプ : SYPRO Ruby、Flamingo ゲルス테인、
Pro-Q Diamond、Pro-Q Emerald
- UV(375nm)のランプ : Phospho QUANTI

*ランプの基盤ユニットを交換する場合は、本体の電源を切ってから交換作業を行う。

⑦ 蛍光色素に対応したフィルターをセットする。

- SYPRO Ruby :ランプはフィルター無
※550nm ショートパスフィルター付きでも撮影は可能
CCD カメラに 580nm ロングパスフィルター
- Flamingo ゲルス테인 :ランプユニットに 550nm ショートパスフィルター
※ランプユニットにフィルターが無くても撮影は可能
CCD カメラに 580nm ロングパスフィルター
- Pro-Q Diaond :ランプユニットに 550nm ショートパスフィルター
CCD カメラに 580nm ロングパスフィルター
- Pro-Q Emerald :ランプユニットに 490nm ショートパスフィルター
CCD カメラに 520nm ロングパスフィルター
- Phospho QUANTI :ランプユニットはフィルター無
CCD カメラに 440nm ロングパスフィルター

⑧ 本体扉を閉めてパソコンのソフトウェアから操作する。

⑨ “蛍光ランプ”エリアから蛍光色素に対応するランプをクリックする。

- SYPRO Ruby、Pro-Q Emerald :Blue のランプ
- Flamingo ゲルス테인 :Blue と Green(2 個)のランプ

※LED ユニットに 550nm のショートパスフィルターがない場合は、Blue のみ点灯

- Pro-Q Diamond :Green(2 個)のランプ
- Phospho QUANTI :UV(375nm)のランプ

⑩ “撮影”エリアの“露光時間”に撮影秒数を入力し、“撮影”ボタンをクリックしてスラブゲルを撮影する。撮影を止める場合は、“中止”をクリックする。

SYPRO Ruby 染色画像の取り込み時間の目安	:5～15 秒
Flamingo ゲルス테인染色画像の取り込み時間の目安	:3～10 秒
Pro-Q Diamond 染色画像の取り込み時間の目安	:60～120 秒
Pro-Q Emerald 染色画像の取り込み時間の目安	:120～240 秒
Phospho QUANTI 染色画像の取り込み時間の目安	:1～5 秒

*サンプル量、蛍光染色液のコンディションにより適切な露光時間は異なる。

*撮影した画像がサチュレーション(Saturation)を起こしているか確認する事ができる。撮影したスラブゲル画像の右上にある“サチュレーション(Saturation)”をクリックすると、サチュレーションを起こしている位置が赤く表示される。

- ⑪ 撮影した画像は、必要に応じて“画像調整”エリアにて編集する。
- ⑫ 保存する画像形式・大きさ等に対応“保存”を選択してスラブゲル画像を保存する。

*ProgenesisPG200 での画像解析には、“8bit TIFF 画像”を推奨。

- 全体画像の保存:上部メインメニューの“ファイル”からの保存方法
保存(○○○○ 撮影画像) :8bit TIFF または 16bit TIFF または(8bit)BMP
フォーマット保存される。

- *保存される画像には、白黒反転、強調処理などは反映されるがポイントの位置情報、画面の拡大縮小は反映されない。
- 保存(BMP 画像イメージ):BMP フォーマットで保存される。
- *保存される画像には、白黒反転、強調処理、ポイント位置情報、画面の拡大縮小までの反映された画像で保存される。
- 範囲指定の保存:スラブゲル画像の左上にある“動作モード”からの保存方法

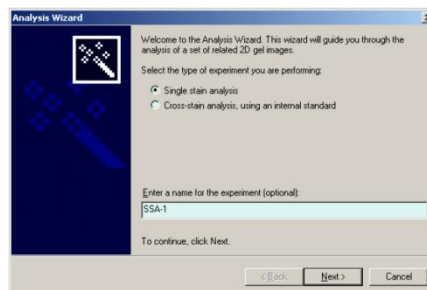
範囲保存 ○○○○ :8bit TIFF または 16bit TIFF または
(8bit)BMP フォーマットで保存される。

○Progenesis PG200/PG220

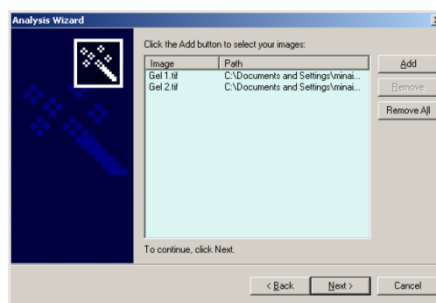
Progenesis は二次元電気泳動ゲル画像を比較して、ディファレンシャルなタンパク質スポットを判定する為の解析ソフトウェアである。

<設定手順>

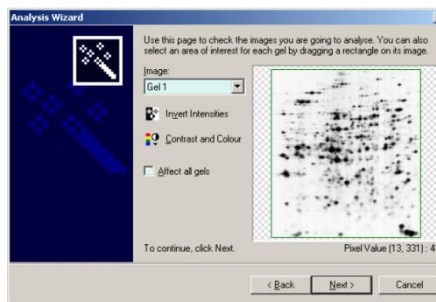
- ① Progenesis PG200/PG220 を起動する。
- ② Single stain analysis 実験を選択し、実験名(日付でも良い)を入力し、Next をクリックする。



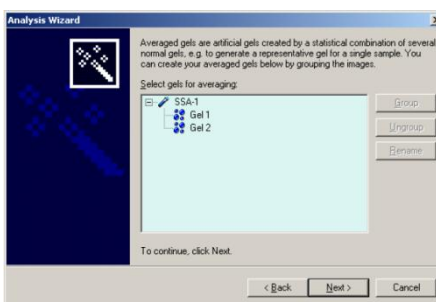
- ③ 画像を選択する。Add ボタンをクリックするとファイル選択画面が開き、必要な画像を選択し、Next をクリックする。



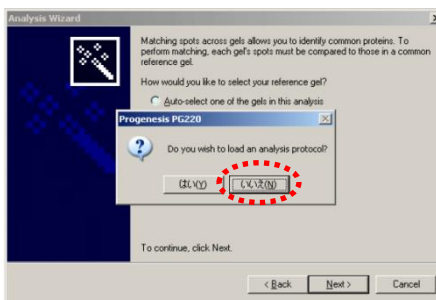
- ④ ゲル画像がプレビューされ、解析する範囲を選択し、Next をクリックする。(2 枚目の画像は Image プルダウンメニューから表示させることができる。)



- ⑤ 平均化画像を作成するウィザードが開かれるが、2 枚の画像比較の場合は何もせずに Next をクリックする。



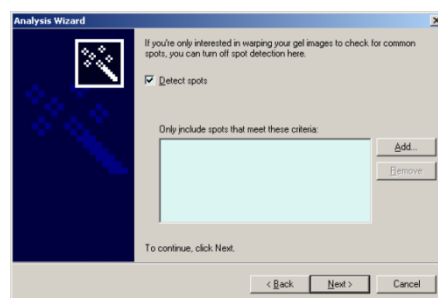
- ⑥ 解析プロトコルをロードするかどうかのアラートが表示されるが、ここではロードせずに No を選択した後、Next をクリックする。



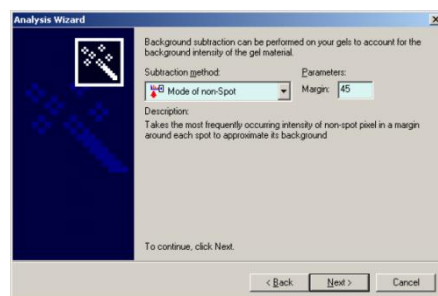
- ⑦ リファレンス画像を選択し、Next をクリックする。



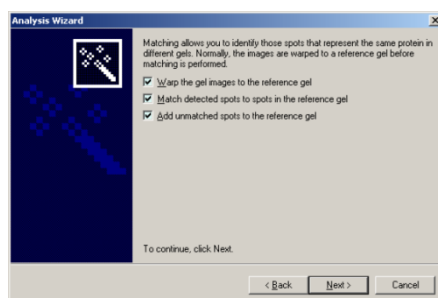
- ⑧ スポット検出にチェックを入れ、Next をクリックする。



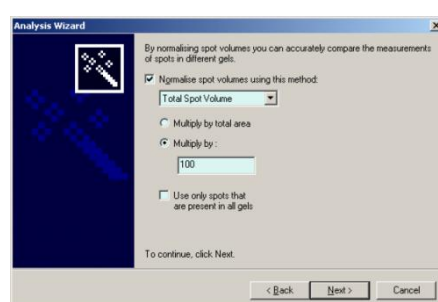
- ⑨ バックグラウンド差分の手法を選択するが、ここではデフォルトで選択されている手法ならびにパラメーターをそのままにし、クリックする。



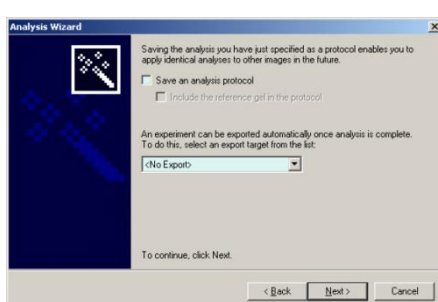
- ⑩ ワーピングとマッチングの確認を行うため、いずれもチェックが入っていることを確認し、Next をクリックする。



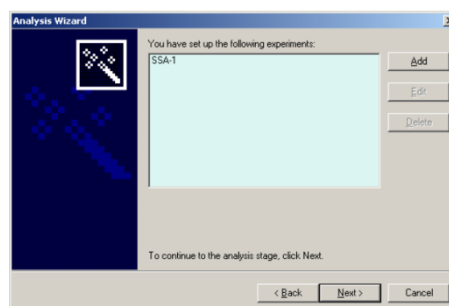
- ⑪ ノーマライゼーションの手法を選択するが、ここではデフォルトで選択されている手法ならびにパラメーターをそのままにし、Next をクリックする。



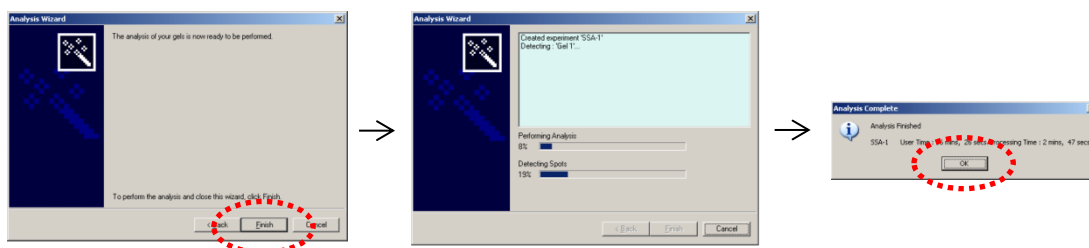
- ⑫ 解析プロトコルの保存を確認するウィザード画面が表示されるが、ここでは保存しないのでチェックを入れずに Next をクリックする。



- ⑬ 設定した実験に加え、必要ならば他の実験も加えることができるが、ここでは設定した実験のみ実施するので選択せずに **Next** をクリックする。



- ⑭ ウィザードの最後の画面が表示され、**Finish** をクリックし、自動解析を実行する。



<画像解析>

ここでは自動解析後の基本的な表示とスポット編集について取り上げる。詳細は「Progenesis PG200/PG220 操作説明書」に記載。

内容

A)ソフトウェアインターフェイスの概要




B)スポット比較(ワーピングの確認)

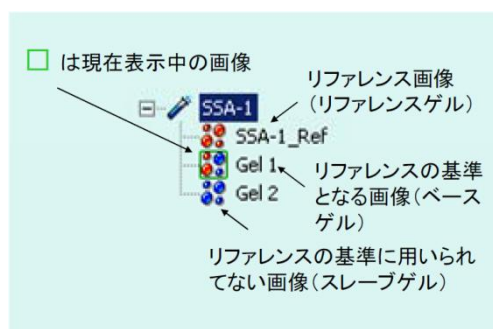


C)スポット編集(スポット数の確認)

操作

A) ソフトウェアインターフェイスの概要

- ✓ 解析ウィザードによる自動解析が終了すると解析が表示され、画像の左側にはナビゲーターがあり、実験ビュータブをクリックすると実験構成を確認できる。
- ✓ 実験ビューに表示されるアイコンを右図に示す。緑色の四角の枠は現在表示している画像を示している。
- ✓ メニューツールバーにはスポット編集ならびにスポット検出のためのツールが用意されている。またプログラムウィンドメニューのセレクトバーはいずれもそれぞれ新しいウインドが開く。
- ✓ イメージウインドにあるズームフィットボタン  をクリックすると、ウインドサイズに画像全体が表示される。



B) スポット比較(ワーピングの確認)

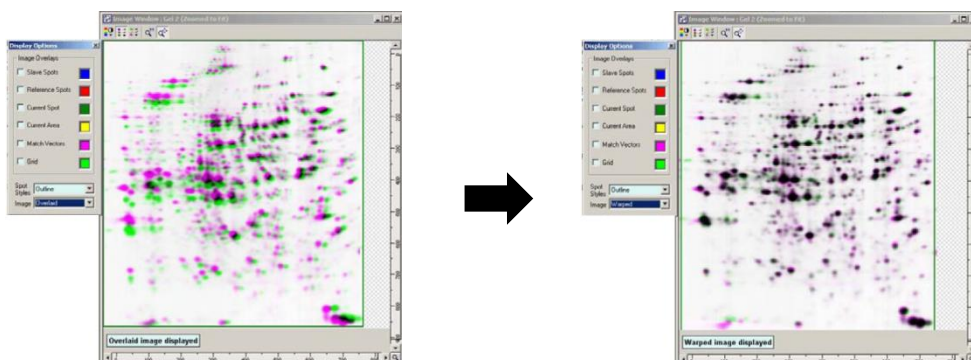
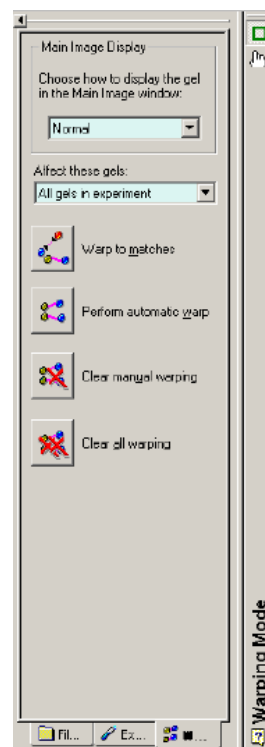
1. メインツールバーのワーブゲルボタンをクリックするとナビゲーターがワーピングモードに変わり、サブモードツールバーを確認することができる。


*メインツールバーのイメージドロップダウンリストから画像表示を Gel 1 から Gel 2 に変更する。

2. 画像のイメージウインドツールバーにあるディスプレイオプションボタンをクリックするとダイアログボックスが表示され、現在表示されている項目にチェックが入っていることが分かる。

3. チェックを全て外し、イメージ表示をドロップダウンリストの Normal から Overlaid に変更すると現在の画像(Gel 2)が緑色に、リファレンス画像(Gel 1)が紫色に表示されるオーバーレイ表示になる。

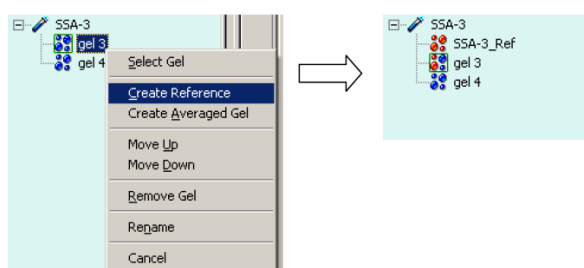
*灰色、もしくは黒になったスポットワーピングが成功したスポット、緑や紫のままのスポットは画像間で違いのあったスポットである。


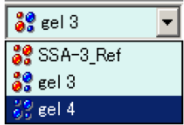



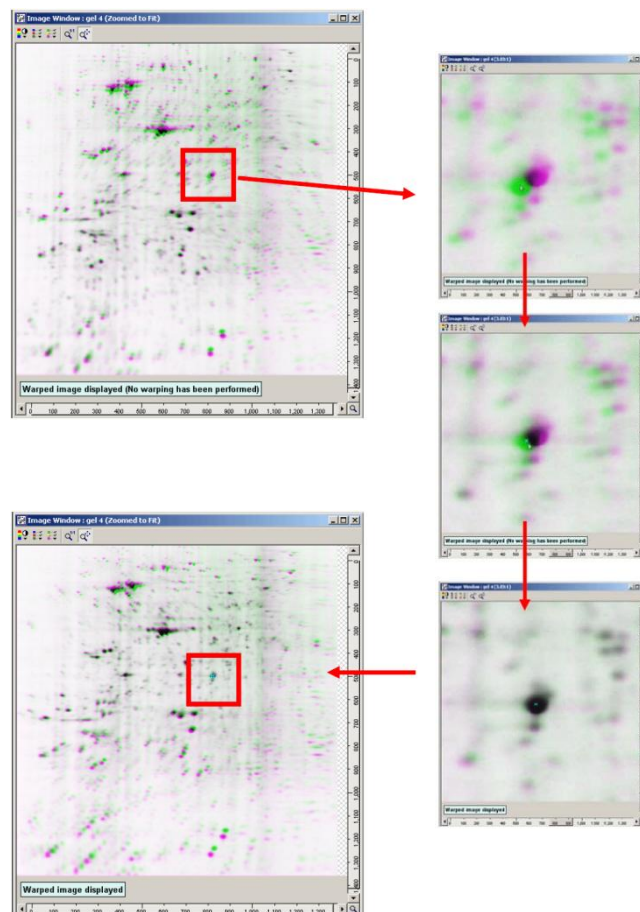
4. オーバーレイ表示およびワーブ表示の色調を変更するには、イメージウインドツールバーにあるコントラスト&カラーボタン  をクリックして調整できる。

<手動によるワーピング最適化>

1. 解析ウィザードによる自動解析を行わない場合はリファレンスが存在しないので、リファレンス画像を作成する。Experiment タグの Gel 3 を右クリックし、Create Reference を選択し、リファレンス画像を作成する。



2. ワーピングボタン  をクリックしワーピングモードに入る。
 3. 表示画像は Gel 4 を選択した後、ナビゲーターの Main Image Display を Warped に変更し、Affect these gels はドロップダウンリストから Current gel を選択する。
- 
4. サブモードツールバーから手動ワーピングボタンを選択する。
 5. カーソルアイコンが緑色の矢印に変わり、ドラッグ&ドロップでランドマークを設定できるようにする。
 6. ズームツールを使用し、選択範囲を拡大表示する。
*緑色が現在のゲル画像で、紫色がリファレンス画像
 7. 緑色のスポットをドラッグし、対象のスポットを少し移動させると、その他の緑色のスポット全てが移動する。目的のリファレンスの位置でマウスボタンを離しドロップすると青い十字(ワープベクター)がランドマークとして表示される。
*Zoom to Fit ボタン  で画像全体を表示することができる。



C) スポット編集(スポット数の確認)

1. 左上の Edit を選択し、Chose reference gel を選択する。
2. ツールバーの Create a new gel を選択し、Next をクリック。
3. Gel の名前にスポット数が表示される。

<補足>

- 本電気泳動装置(Anatech 製品)は 2012 年 6 月に納品されたものである。
- 本プロトコールは Anatech のプロトコールを基に本研究室用にアレンジしたものである。
- 更にプロトコールの詳細を見るときや、変更点がある場合は Anatech のプロトコール(橙色のプロトコール 4 部)を参照のこと。
 - プロトコール 4 部
 - クールホレスター IPG-IEF Type-PX
 - コンスタントパワーサプライ パワーホレスター Pro3900
 - SDS-電気泳動装置 クールホレスター SDS-PAGE Dual-200K
 - SDS-PAGE 用ゲルメーカー 37/200、28/200、36/160
- また、タンパク抽出や画像解析等で分からないことがある場合は Anatech 株式会社の古賀正信に e-mail もしくは HP から(e-mail アドレスは以下)質問をするとよい。

Anatech 株式会社

営業部 古賀 正信

E-mail: koga-m@anatech.co.jp

URL: <http://www.anatech.co.jp>



Tel: 03-3812-8701

Fax: 03-3818-9167

〒113-0034 東京都文京区湯島 2-31-15

A-6. 統計処理

<操作手順>

- ① StatView-J 5.0 のファイル内にある StatView  を起動する。
- ② 新規データシート  をクリックする。
- ③ タイプを“実数”から“文字列”へ変更する。
- ④ 下図の赤枠内にサンプル名(ex. #1, #2, #3)を明記し、右の列 2 にデータを 1 つずつ入れていく。

	入力列		列 1	列 2	入力列
▶ タイプ:	文字列	▶ タイプ:	文字列	実数	実数
▶ ソース:	ユーザ...	▶ ソース:	ユーザ...	ユーザ...	ユーザ...
▶ クラス:	名義変...	▶ クラス:	名義変...	連続変...	連続変...
▶ 表示形式:	.	▶ 表示形式:	.	固定小...	固定小...
▶ 小数点位置:	.	▶ 小数点位置:	.	3	3
		1	#1	100.000	
		2	#1	87.000	
		3	#1	90.000	
		4	#2	20.000	
		5	#2	20.000	
		6	#2	19.000	
		7	#3	90.000	
		8	#3	95.000	
		9	#3	100.000	

- ⑤ “解析”ボタンをクリックし、新規ビューシートを選択する。
- ⑥ 左のメニュー内の分散分析の“ ” → Post-hoc テストの“ ” → Tukey-Kramer の順にクリックする。
- ⑦ 画面右に表示されている変数一覧の列 1 を独立、列 2 を従属と選択し、解析の実行を選択する。



Tukey-Kramer : 列 2

効果 : 列 1

有意水準 : 5 %

	平均値の差	棄却値	
#1, #2	72.667	12.247	S
#1, #3	-2.667	12.247	
#2, #3	-75.333	12.247	S

S ⇒ 有意差有り
無印 ⇒ 有意差無し

B-1. 滅菌について

<高圧蒸気滅菌>

高圧蒸気滅菌(オートクレーブ)は、滅菌したい器具を専用の滅菌缶や金属缶、ケースなどに入れ、滅菌テープで封印し、121°C/20 分にて行う。滅菌後は 50 度のオーブンに入れ、乾燥・保管する。

液体の高圧蒸気滅菌は専用の耐圧ビンに入れて行う。但し、液体は全体が均一な温度(121°C)になるまで時間が掛かるため、通常の器具滅菌の場合よりも 1L あたり 20 分程余分に行う。

<乾熱滅菌>

乾熱滅菌も滅菌したい器具を専用の滅菌缶や金属缶に入れて行う。ピペットの場合は吸入口に専用の綿を詰め、滅菌缶に入れて滅菌する。その他のガラス器具などは口にアルミホイルで蓋をし、そのまま滅菌する。乾熱滅菌の温度と時間は以下の通り(Table.B-2-1)。

一般的な滅菌	RNase free にするための滅菌
160~170°C/2~4h もしくは 180~200°C/0.5~1h	180°C/8h 以上(Over Night) もしくは 250°C/0.5h 以上

Table.B-2-1 乾熱滅菌

- ※ 乾熱滅菌は冷めるまでが滅菌なので、必ず冷めるまでまつこと。
- ※ 高圧蒸気滅菌と乾熱滅菌のいずれの場合も、必ず滅菌対象の材質・耐熱温度を確認すること。機器の損傷の恐れもある。

<UV 殺菌>

クリーンベンチは使用後に必ず UV 滅菌灯を点灯し、ベンチ内を殺菌した。その際、ベンチ内のプラスチック製品は全てアルミホイルで巻くこと。

<主要器具の滅菌方法>

○クリーンベンチ内器具一式

- ピンセット×1
- 50ml、100ml ビーカー×各 1
- シャーレ×2

- ① ブラッシングにより洗浄後、水洗いし、蒸留水で軽くリンスした。
- ② 滅菌缶に器具を詰め、滅菌テープで封印し 121℃/20 分にて高圧蒸気滅菌を行った。

○手術器具一式

- ピンセット(拘つき)×1、(拘無し)×3~4
- ハサミ(直、先丸)×各 1
- 鉗子×1
- 滅菌糸(20cm 程度のもの)×20

専用の金属トレイに器具を詰め、滅菌テープで封印し、121℃/20 分にて高圧蒸気滅菌を行った。

○チップ、Reaction Tube with Cap(PCR 専用チューブ)

専用のケース、金属缶に詰め、滅菌テープで封印し、121℃/20 分にて高圧蒸気滅菌を行った。詰める作業は必ず手袋を着用して行った。

○10ml ピペット、パスツールピペット

- ① 20 倍希釈の無リン洗剤に約 24 時間浸漬後、約 24 時間水洗いした(浸漬液は 2 ヶ月毎に交換した)。
- ② 水気を取り、10ml ピペットは吸入口に綿栓をし、滅菌缶につめた。パスツールピペットは綿栓をせずに 3 本毎にアルミホイルで巻いて滅菌缶につめた。
- ③ 180℃で 4 時間乾熱滅菌した。

○ゲル作製用三角フラスコ、メスシリンダー

- ① ブラッシングにより洗浄後、水洗いし、蒸留水で軽くリンスした。
- ② 乾燥後、口に 7cm 四方程度のアルミホイルで蓋をした。
- ④ そのまま 180 度/Over Night にて乾熱滅菌を行った。

B-4. 本研究で使用した試薬について

<FBS の不活化・分注・保存>

- ① -20℃にて凍結保存されている FBS(500ml)を 37℃のウォーターバスに浸け、振り混ぜながら溶かした。
- ② 完全に溶かし終えたら、数回振り混ぜた。
- ③ 55~56℃のウォーターバスで 30 分加熱した。
- ④ STERICUP™にてフィルター滅菌し、50ml 遠心管に 40ml ずつ分注した。作業はクリーンベンチ内、滅菌操作で行った。
- ⑤ -20℃の冷凍庫にて保存した。

<ITS>

ITS(粉末状)の瓶に DEPC 処理水 50ml を入れ、攪拌、溶解させたものを分注した。

<HC>

HC の粉末 2mg を量り取り、無水 EtOH と DEPC 処理水をそれぞれ 1ml ずつ加えて溶解させたものを MILLEX®GP にて濾過、分注した。

<DEPC 処理水の作製>

- ① Milli-Q 水を密閉できるガラス瓶(青蓋の 500ml メディウムビン)に入れた。
- ② 500ml の Milli-Q 水に対し DEPC を 500 μ l(0.1%)加えて、蓋をきっちり閉めてよく振り混ぜた。

※DEPC は発癌性があるため、この作業は全てドラフト内で行うこと。

- ③ そのまま 37℃のオーブン内に入れ、2 時間加温した。30 分に一度振り混ぜた。
※ 振り混ぜることで瓶の蓋や首の部分、液体内に DEPC が均一に広がり、全体の RNase を失活させる。

- ④ 瓶の蓋を十分緩めて、121℃/40 分(1 分あたり 500ml の場合)高圧蒸気滅菌にかけた。

※高圧蒸気滅菌をすることにより DEPC を除去する。滅菌後にも DEPC の臭いが残っている場合は、もう一度高圧蒸気滅菌を行う。

※DEPC は発癌性であるため、むやみに蒸気を吸わないように気を付けること。また、滅菌装置内に溜まった水は、気化して抜けた DEPC が溶け込んでいるため、その排水は責任をもって処理すること(大量の水と共に排水口へ)。

<Random Primers、各 Primer について>

これらの Stock Solution(S.S)は粉末状の試薬に DEPC 処理水を適宜加えて作成した。詳細は添付の取扱説明書に従った。

<滅菌水の作製>

- ① 脱イオン水を密閉できるガラス瓶(赤蓋の 1L メディウムビン)に入れた。
- ② 蓋をきっちり閉めた後、滅菌テープで封印し、121°C/40 分にて高圧蒸気滅菌を行った。

C-1. 腹膜透析排液サンプル結果まとめ (#1~#)

2013/2/6 現在										患者イニシャル... A, B, C, E, H, N, O, Q, R, S, T, U, V, W, X, Y, Z(17人)										C/Eの患者世界		
採取日	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10												
Initial	A(1)	B(1)	C(1)	C(2)	C(3)			E(1)	A(2)	H(1)												
性別	man	man		man				man	man	man												
年齢	82	76		69				62	82	82												
CAPD期間 (month)	39	11		24				4	41	2												
透析液	①	①		①				①	①	①												
腹膜炎(回)	0	0		1				0	0	1												
使用透析液量(ml)	1700	1500		1500				1500	1700	1700												
総重量(g)	2084	1642	1483	1772	1423	1565	1110	1771	2072	1379												
除水量(g)	369	129	-30	259	-90	52	-403	258	357	-336												
細胞総数 (x 10 ⁶ cells)		140	238	65	1776	94	428	57	33	133												
増殖細胞率																						
増殖日数 (days)	24	17	10	10	10	16	9	9		12												
Cytokeratin-18	P0																					
	P1																					
	P2																					
α-SMA	P0																					
	P1																					
	P2																					
TERI値 (Ω・cm ²)	P0																					
	P1																					
	P2																					
タンパク抽出	P0	X	O	O	X	O(P3)	O	O	未	O												
	P1																					
	P2																					
	P3																					
増殖定数K(day ⁻¹)	P0																					
	P1																					
	P2																					
Desmin	P0																					
	P1																					
	P2																					
Vimentin	P0																					
	P1																					
	P2																					
SA-β-Gal	P0																					
	P1																					
	P2																					
透析液	①Baxter ダイアニール N PD-2 1.5										備考											
	②Baxter ダイアニール N PD-2 2.5										#7,#24,#25#32(イコデキストリン)											
	③Baxter エラストニール										#5,12,13,16,21,24,25,27,29,30,31,32,33,34,37,40,41,42,43,45,46(血性排液)											

	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18	#19	#20
採取日	2010/8/3	2010/8/17	2010/8/31	2010/9/28	2010/10/5	2010/10/19	2010/10/26	2010/11/9	2010/11/16	2010/11/30
Initial	A(3)	H(2)	C(4)	A(4)	B(2)	N(1)	A(5)	B(3)	N(2)	A(6)
性別	man	man	man	man	man	man	man	man	man	man
年齢	82	82	69	82	76	49	82	76	49	82
CAPD期間 (month)	42	3	27	43	16	37	45	17	38	46
透析液	①	①	①	①	①	①	①	①	①	①
膈膜炎(回)	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
使用透析液量(ml)	1700	1500	1500	1700	1500	2500	2000	1500	2500	2000
総重量(g)	1929	1790	1775	2412	1475	2759	2131	1603	2924	2465
除水量(g)	214	277	262	697	-38	236	113	90	401	447
細胞総数 (x 10 ⁴ cells)	24	6039	7465	48	106	871	130	363	513	23
接着細胞率				0.76%	0.59%	0.40%	1.53%	0.58%	0.99%	5.34%
増殖日数 (days)	18	12	26	17	10	17	22	20	13	26
Cytokeratin-18										
P0							100%	99%	96%	52%
P1	100%	99%	100%	96%	99%	99%	99%	99%	99%	99%
P2				85%	91%	98%	98%	99%	99%	99%
α-SMA										
P0				28%	27%	16%	9%	25%	9%	18%
P1	70%	72%	37%	2%	22%	20%	48%	41%	9%	9%
P2							不可	14		
TER値(Ω・cm ²)				16	22			22		
P0	21			20	22			23		
P1										
P2										
タンパク抽出	○	○	○	○	○	○	○	○	○	未
P0				0.249	0.442	0.279	0.152	0.302	0.255	0.160
P1		0.162	0.074	0.206	0.221	0.395	0.186	0.270	0.278	0.068
P2				0.034	0.390	0.266	0.006	0.169	0.092	
P3				0.053	0.118		不可	0.088	0.002	
Desmin										
P2										
Vimentin										
P2										
SA-β-Gal										
P0										
増殖日数	φ	35%	ヤール	レガ	コン	シル	イベント	になる	日数	
排液密度	1.009g/ml									

	#21	#22	#23	#24	#25	#26	#27	#28	#29	#30
採取日	2010/12/17	2010/12/14	2011/1/18	2011/1/25	2011/2/8	2011/2/15	2011/2/22	2011/3/15	2011/4/12	2011/4/19
Initial	N(3)	B(4)	A(7)	N(4)	N(5)	A(8)	B(5)	B(6)	A(9)	B(7)
性別	man	man	man	man	man	man	man	man	man	man
年齢	49	76	82	49	49	82	76	76	82	76
CAPD期間 (month)	39	18	48	40	41	49	20	21	51	22
透析液	①	①	①	③	③	①	①	①	①	①
膈膜炎(回)	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1
使用透析液量(ml)	2500	1500	2000	1500	1500	2000	1500	2000	1500	1500
総重量(g)	2618	1535	2305	2983	2790	2426	1612	2601	1646	1507
除水量(g)	95	22	287	1470	1276	408	98	583	132	-6.5
細胞総数 (x 10 ⁶ cell/s)	1863	105	34	1197	2137	67	139	32	397	96
接種細胞率	4.91%	2.45%	0.79%	0.54%	4.00%	1.36%	27.00%	0.97%		1.20%
増殖日数 (days)	3	9	23	6	22	28	8	30	13	21
Cytokeratin-18	P0				98%					100%
	P1		100%	97%	86%	89%	100%	100%	100%	100%
	P2	99%	100%	99%	9%		100%			99%
α-SMA	P0				9%					25%
	P1		54%	43%	33%	35%	9%	59%	18%	20%
	P2	68%	88%	33%	58%		0%			
TER値(Ω・cm ²)	P0									
	P1			23	21					
	P2									
タンパク抽出	P0	○		○(P1)	○(P1,P2)	○	○	○	○(P1,P2)	○(P1)
	P0	0.087	0.384	0.217	0.219	0.185	0.148	0.160		0.266
	P1	0.159		0.216	0.344	0.070		0.177		0.352
	P2	0.122			0.032		0.300	0.001		0.141
増殖定数(k(day ⁻¹))	P1									
	P2									
	P3				-0.016					
Desmin	P2									
Vimentin	P2									
SA-β-Gal	P0									

	#31	#32	#33	#34	#35	#36	#37	#38	#39	#40
採取日	2011/5/17	2011/5/17	2011/5/24	2011/5/24	2011/6/7	2011/6/14	2011/6/14	2011/6/21	2011/6/28	2011/7/12
Initial	O(1)	O(2)	B(8)	N(6)	A(10)	H(3)	N(7)	B(9)	A(11)	N(8)
性別	woman	woman	man	man	man	man	man	man	man	man
年齢	68	68	76	49	82	83	49	76	82	49
CAPD期間 (month)	20	20	23	44	53	13	45	24	53	46
透析液	①	③	①	①	①	①	①	①	①	①
腫瘍炎(回)	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1
使用透析液量(ml)	1500	1500	1500	2500	1500	1500	1500	1500	1500	2500
総重量(g)	1524	1413	1617	3288	1701	1367	2464	1494	1948	2694
除水量(g)	10	-100	104	766	188	-146	950	-20	434	172
細胞総数 (x 10 ⁶ cells)	217	126	31	2297	52	95	1605	56	8	1498
接着細胞率	0.33%			0.02%	0.59%	11.73%		8.12%	33.97%	0.07%
増殖日数 (days)	13					8	8	13	27	9
Cytokeratin-18										
	P0									
	P1	100%		100%	100%	100%	100%	100%	100%	
	P2			100%	100%	100%	100%	100%	100%	
α-SMA										
	P0									
	P1	30%			7%	9%	23%	9%		
	P2				36%	17%	6%	3%	19%	
TER値(Ω・cm ²)										
	P0									
	P1	27		26	19	21	19	29		
	P2	25		23	25	24	20	22	16	22
タンパク抽出										
	P0	0.306		0.525	0.167	0.1439		0.151	0.059	0.396
増殖定数(k(day ⁻¹))										
	P1			0.254	0.22	0.4	0.439	0.367	0.181	0.33
	P2					0.1439	0.289	-0.032	0.146	0.0235
	P3					0.225	0.118	0.244	0.053	
Desmin										
	P2									
Vimentin										
	P2									
SA-β-Gal					16%	9%	5%			1%
	P0									

	#41	#42	#43	#44	#45	#46	#47	#48	#49	#50
採取日	2011/7/19	2011/8/9	2011/8/30	2011/9/13	2011/9/27	2011/10/4	2011/10/11	2011/10/25	2011/11/1	2011/11/8
Initial	H(4)	N(9)	N(10)	H(5)	B(10)	N(11)	A(12)	B(11)	N(12)	A(13)
性別	man	man	woman	man	man	man	man	man	man	man
年齢	83	49	50	83	76	50	83	77	50	83
CAPD期間 (month)	14	47	?	16	27	49	57	28	50	58
透析液	③	①	①	①	①	?	①	①	①	①
腫瘍炎(回)	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1
使用透析液量(ml)	1500	2500	2500	1500	1500	?	1500	1500	2500	1500
総重量(g)	1141	2924	2768	1801	1621	2454	1760	1595	2392	1670
除水量(g)	-373	402	246	288	108	?	247	81.5	-130.5	156.5
細胞総数 (x 10 ⁶ cells)	157	1498	1923	18	159	572	17	100	1730	33
接着細胞率	3.85%									
増殖日数 (days)	12	14	15	21	13	14	16			
Cytokeratin-18	P0									
	P1	100%			100%	99%	98%	100%	100%	
	P2	99%		99%	100%		100%			
α-SMA	P0									
	P1	5%			22%		0%	34%		
	P2	2%		44%	18%		37%		20%	
TER値(Ω・cm ²)	P0									
	P1	21	22	21	19					
	P2	19								
タンパク抽出	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
増殖定数(k(day ⁻¹))	P0	0.248								
	P1									
	P2	0.14								
	P3	0.332								
Desmin	P2									
Vimentin	P2									
SA-β-Gal	P0	20%	47%		16%	27%	89%	57%	28%	50%

EVOM故障により測定不可

	#51	#52	#53	#54	#55	#56	#57	#58	#59	#60
採取日	2011/11/22	2011/11/29	2011/11/29	2011/12/6	2011/12/20	2012/1/17	2012/1/24	2012/4/24	2012/5/8	2012/5/25
Initial	B(12)	N(13)	N(14)	A(14)	B(13)	不明	B(14)	B(15)	A(15)	Q(1)
性別	man	man	woman	man	man	不明	man	man	man	woman
年齢	77	50	50	83	77	不明	77	77	83	68
CAPD期間(month)	29	50	50	59	30	不明	31	34	64	1
透析液	①	①	①	①	①	①	①	①	①	
腹膜炎(回)	1	1	1	1	1	不明	1	1	不明	
使用透析液量(ml)	1500	2500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	500
総重量(g)	1573	2684	2751	1748	1558	1802	1520	1572	1761	405
除水量(g)	59.5	161.5	1237.5	234.5	44.5	288.5	6.5	58.5	247.5	-99.5
細胞総数(x 10 ⁶ cells)	44	2558	659	20	50	19	45	40	69	4221
接着細胞率										
増殖日数(days)								2.04%	2.79%	
	P0									
Cyokeratin-18	P1	98%	100%	99%	100%	100%		100%	85%	78%
	P2		100%							
α-SMA	P0									
	P1	32%		20%	16%			38%	36%	
	P2	18%			35%					8%
	P0									
TER値(Ω・cm ²)	P1		EVOM故障により測定不可		24.3	20		18.3		
	P2									
タンパク抽出		○	×	○	○					
	P0									
増殖定数k(day ⁻¹)	P1									
	P2									
	P3									
Desmin	P2									
Vimentin	P2									
SA-β-Gal	P0	29%	51%	27%	69%	41%		23%	7%	2%

		#61	#62	#63	#64	#65	#66	#67	#68	#69	#70									
採取日		2012/5/28		2012/5/29			2012/6/5		2012/6/12	2012/6/13	2012/6/19									
Initial	R(1)	man	B(16)	man	Q(2)	woman	R(2)	man	S(1)	man	Q(3)	woman	R(3)	man	A(16)	man	R(4)	man	Q(4)	woman
性別																				
年齢	71	77	68	71	75	68	71	83	71	83	71	68	71	83	71	71	71	71	83	68
CAPD期間(month)	1	35	1	1	36	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
透析液		①				①		①		①		①		①		①		①		①
腹膜炎(回)	1																			
使用透析液量(ml)	500	1500	750	500	1500	1000	1500	1500	1500	1500	1000	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1000	1000
総重量(g)	509	1563	767	668	1395	948	1632	1759	1272	1272	948	1632	1759	1272	1272	948	1632	1759	936	936
除水量(g)	4.5	49.5	10.25	163.5	-118.5	-61	118.5	245.5	-241.5	-241.5	-61	118.5	245.5	-241.5	-241.5	-61	118.5	245.5	-73	-73
細胞総数(x 10 ⁴ cells)	6116	92	746	1185	251	746	187	69	491	491	187	69	491	491	187	69	491	491	2100	2100
接着細胞率		0.30%	1.15%	0.65%																
増殖日数(days)	P0																			
Cytokeratin-18	P1	100%	89%	98%	93%	100%														
	P2	93%																		
	P0																			
α-SMA	P1	12%	5%	10%	13%	7%														
	P2	4%																		
	P0																			
TER値(Ω・cm ²)	P1																			
	P2																			
	P0																			
タンパク抽出																				
増殖定数K(day ⁻¹)	P0																			
	P1																			
	P2																			
	P3																			
Desmin	P2																			
	P2																			
	P2																			
Vimentin	P2																			
	P2																			
	P2																			
SA-β-Gal	P0	10%	9%	7%	11%	8%	6%	10%												
	P0																			
	P0																			

	#71	#72	#73	#74	#75	#76	#77	#78	#79	#80
採取日	2012/6/19	2012/6/26		2012/7/6	2012/7/10		2012/8/7	2012/8/28	2011/9/11	
Initial	R(5)	R(6)	B(17)	T(1)	A(17)	T(2)	A(18)	B(18)	A(19)	R(7)
性別	man	man	man	man	man	man	man	man	man	man
年齢	71	71	77	71	84	71	84	77	84	71
CAPD期間 (month)	2	2	36	1	66	1	67	38	68	5
透析液									①	①
腹膜炎(回)				0	0	0	0			
使用透析液量(ml)					1500	1500	1500		1500	1500
総重量(g)	1212	1538	1597	616	1826	1427	1790		1796	1484
除水量(g)					312.5	-86.5	276		282	-30
細胞総数 (× 10 ⁴ cells)	3706	2806	45						33	176
接着細胞率										
増殖日数 (days)										
Cytokeratin-18	P0									
	P1									
α-SMA	P2									
	P0									
	P1									
TER値(Ω・cm ²)	P2									
	P1									
タンパク抽出	P2									
	P0									
	P1									
	P2									
増殖定数k(day ⁻¹)	P3									
	P2									
	P1									
Desmin	P2									
Vimentin	P2									
SA-β-Gal	P0									

	#81	#82	#83	#84	#85	#86	#87	#88	#89	#90
採取日	2011/9/18	2012/9/25	2012/10/9	2012/10/9	2012/10/10	2012/10/30	2012/10/30	2012/11/6	2012/11/6	2012/11/13
Initial	U(1)	B(19)	A(20)	U(2)	R(8)	V(1)	B(20)	B(21)	A(21)	U(3)
性別	man	man	man	man	man	man	man	man	man	man
年齢	41	77	83	42	71	73	78	78	84	41
CAPD期間 (month)	1	39	69	2	5	1	40	41	70	3
透析液										
腹膜炎(回)										
使用透析液量(ml)	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500	1500
総重量(g)	1629	1562	1752	1781	1400	1280	1350	1626	1698	1699
除水量(g)	116	49	239	268	-114	-234	-164	113	185	186
細胞総数 (x 10 ⁶ cells)	60	79	40	55	271	78	42	639	106	73
接着細胞率										
増殖日数 (days)										
	P0									
Cyokeratin-18										
	P1									
	P2									
α-SMA										
	P0									
	P1									
	P2									
TER値(Ω・cm ²)										
	P1									
	P2									
タンパク抽出										
	P0									
増殖定数K(day ⁻¹)										
	P1									
	P2									
	P3									
Desmin										
	P2									
Vimentin										
	P2									
SA-β-Gal										
	P0									

採取日	#91	#92	#93	#94	#95	#96	#97	#98	#99	#100	#101	#102	#103
	2012/11/14		2012/11/27	2012/12/11	2012/12/25		2013/1/23		2013/1/29			2013/2/5	
Initial	T or R	B(22)	B(23)	A(22)	B(24)	W(1)	A(23)	U(4)	B(25)	W(2)	X(1)	Y(1)	Z(1)
性別	mean	man	man	man	man	man	man	man	man	man	man	man	man
年齢	71	78	78	84	78	59	84	41	78	59	34	77	76
CAPP期間 (month)		41	41	71	42	12	72	5	43	13	1	1	1
透析液								②			①		
腹膜炎(回)													
使用透析液量(ml)	1500	1500	1500	1500	1500		1500	2000	1500		2000		
総重量(g)	1528	1636	1547	1718	1564	1902	1493	1890	1519	2058	2151	1434	1546
除水量(g)	15	122	33	205	50		-21	-128	6		133		
細胞総数 (x10 ⁶ cells)	230	209	133	83	579	245	195	280	263	219	2	308	41
接種細胞率													
増殖日数 (days)													
Cytokeratin-18	P0												
	P1												
	P2												
α-SMA	P0												
	P1												
	P2												
TER値(Ω・cm ²)	P0												
	P1												
	P2												
タンパク抽出													
	P0												
増殖定数(day ⁻¹)	P1												
	P2												
	P3												
Desmin	P2												
Vimentin	P2												
SA-β-Gal	P0												