1P2-A4 グルコースポリマー透析液が腹膜中皮細胞に与える影響

Effect of glucose polymer dialysis solution for human peritoneal mesothelial cells

○前田 尚悟、宮本 啓一、堀内 孝

三重大学 大学院 工学研究科 分子素材工学専攻 生体材料研究室

Shogo Maeda, Keiichi Miyamoto, Takashi Horiuchi

Dept. of Chemistry for Materials, Fac. of Eng., Mie University

1. はじめに

平均分子量 16000 (Da) の多分散系であるグルコースポリマーは、分子量 180 (Da) の D-グルコースに比べて長時間の除水が可能な浸透圧剤である。しかし、腹膜中皮細胞の表面積が透析期間に比例して有意に増大すること、および多核化、小核化などの核の形質異常を引き起こすとの報告があり、生体への安全面が危惧されている。

そこで、培養ヒト腹膜中皮細胞に対するグルコースポリマーの生体適合性を、細胞の酵素活性、及び細胞増殖能の変化によって評価した。

2. 方法

ヒト腹膜中皮細胞に対して、pH7.4 に調整した 1.5% D-グルコース透析液(diancal, Baxter 社)、7.5% グルコースポリマー透析液(extracal, Baxter 社)それぞれを Medium199 と 10:0、8:2、6:4、4:6、2:8、0:10 の割合で混合した溶液を 30 分、3 時間、6 時間曝露後の細胞活性変化を MTT 法を用いて評価した。両者の電解質濃度は同じとした。

グルコースポリマーは平均分子量が約 16000 (Da)、分散度は 1.74 (Mw/Mn) と多分散系であるため、細胞に最も寄与する分子量範囲を調べるためにゲル濾過クロマトグラフィーを用いて分子量分画した。Sephadex G-75 ゲル(Pharmacia 社)を用いて、透析中のグルコースポリマーと電解質を分離した後、Sephadex G-25 ゲル(Pharmacia 社)により、それを 5 分画した。

フローサイトメトリー (FACS Calibur, Becton Dickinson 社)を用いて、それぞれの分子量分画が 1.5% 濃度になるように調整し、細胞に 24 時間の刺激を与えたときの細胞増殖能の変化を測定した。細胞周期において分裂前の細胞は G0/G1 期、合成中の細胞は S 期、分裂後の細胞は G2/M 期に分類される。この G2/M 期細胞数を増殖細胞数として評価し、蛍光色素には propidium iodide (PI) (SIGMA 社)を用いた。

3. 結果・考察

D-グルコース、グルコースポリマー透析液それぞれが与える細胞活性の変化を MTT 法により比較したところ、透析液と培地の混合比が 6:4 から 4:6 (透析濃度は 4.5%~3.0%) においてグルコースポリマー透析液の方が高い細胞活性を示した。このことから、グルコースポリマーには中皮細胞の細胞増殖もしくは酵素活性の促進を促す効果があるのではないかと考えた。(Fig1)

Fig.1 MTT assay for cell viability of human peritoneal mesothelial cells (a)Glucose polymer dialysis solution (b)D-glucose dialysis solution

グルコースポリマーを分子量で 5 分画したときのそれぞれの平均分子量は分画 1: 43476 (Da)、分画 2: 20442 (Da)、分画 3: 8761 (Da)、分画 4: 3952 (Da)、分画 5: 2141 (Da)、であった。これら各分画分子量体の影響による細胞周期の変化を比較した結果、有意な差はみられなかったことから、グルコースポリマーに細胞増殖能を変化させるような効果はないといえる。(Fig.2)

Fig.2 Flow cytometry analysis for cell-cycle distribution

4. 結論

以上の結果から、グルコースポリマー透析液はヒト腹膜中皮細胞の酵素活性を増加させる傾向があると考えられる。今後、このミトコンドリア内の酵素活性に影響を与える要因の追求とともに、活性への透析濃度の依存性を確認し、グルコースポリマーの腹膜中皮細胞への影響をさらに詳しく研究していく必要があると考えている。