

実験手順概要

1. 解凍 凍結組織をチューブに密封したまま、4°Cで解凍

2. 細胞分散

[ハサミによる機械的細胞分散+酵素処理 (TTDR, BD)]

- ① 組織片の重量が 50 mg~1g の範囲にする。(実際には 100 mg 以下がほとんど)
 - ② シャーレまたは 50 mL チューブ内でできるだけ細切。0.75 mm 未満に。適宜温めた DMEM 2.5 mL を滴下。
 - ③ 先太ピペットマンで 50 mL チューブに移し (他の検体の細切の間、氷上で保管。)
 - ④ ③で処理した[組織片+DMEM]2.5 mL 温めた TTDR 溶液 2.5 mL を入れる。(total 5 mL)
 - ⑤ 37°C、30 分、water bath
 - ⑥ 12.5 mL [PBS+EDTA]を一気に加え反応停止
 - ⑦ 新しい 50 mL チューブに 100 μ メッシュでろ過→追加 2.5 mL [PBS+EDTA]でメッシュを洗浄 (total 20 mL)
 - ⑧ 1500rpm (半径 10cm)、8 分遠沈、上澄除去、ペレットを vortex
 - ⑨ 1 mL [PBS+EDTA]で混和
 - ⑩ Cell count (1) 1x10⁵⁻⁶/mL 必要
(単離できているか確認)
 - ⑪ 1500rpm (半径 10cm)、8 分遠沈、上澄み除去、ペレットを vortex
 - ⑫ 裸核化 : 0.2% TritonX-100 in PBS 溶液 900 μ L (細胞少なそうなら 100 μ L 単位で調節、細胞数 1x10⁵⁻⁶/mL にする) を加え、数秒間、手で軽く振とう攪拌
 - ⑬ 細胞懸濁液に、RNase A (1 mg/ml in PBS) (sigma R6513)100 μ L を添加、軽く手で振とう攪拌、室温で 10 分インキュベーション (反応条件メーカー確認済) のち、40 μ m メッシュでろか。
- RNase 処理後の細胞懸濁液 950 μ L と、propidium iodide (PI) (1 mg/ml in water) (sigma P4864、遮光保存) 50 μ L 添加して合計 1mL とする。PI 添加後 5 分以上、30 分以内に測定。測定までは氷上保存。測定前に 35 μ m メッシュ付きチューブでろ過し、測定。
- (未染色調製液の残りの一部でセルカウント (2)、TritonX-100 と RNase 処理で細胞数変化するか確認)

細胞数	cells		
組織懸濁液 (DMEM)	2.5 mL		
TTDR (DMEM)	2.5 mL		
PBS+EDTA 洗浄	12.5+2.5		
ろか、カウント、遠沈ボルテックス	遠沈		
濾過細胞混濁液 0.2%TritonX	900 μ L		
RNase A (1 mg/ml in PBS)	100 μ L		
ろか、カウント	ろか液 950 μ L		
PI(1 mg/ml)	50 μ L		

3. FCM 測定

- ① FACS Calibur (BD Biosciences, New Jersey, USA) を用いた。標準蛍光ビーズの CV が 2%前後となるように 光軸, sample 圧, flow rate 等の機器調節を行う。
- ② 一般に非腫瘍細胞の G0/G1 期細胞の相対的 DNA 量は 2C と表記されるが, DNA ヒストグラムの 2C ピークが 1024channel リニアスケール軸の 200channel 付近となるように PMT を調節。
- ③ 測定・保存するパラメータは, PI 蛍光強度 (DNA 量) に関する 2 種のパラメータの FL2-Area と FL2-Width, 及び, 前方散乱光 (FSC) と側方散乱光 (SSC) であり, リストデータで保存した。
- ④ debris や細胞集塊等のノイズデータを除くために FL2-Area / -Width のドットプロット画面で適切なゲートを設け, ゲート内の細胞 (single cell) のみを **10000 個以上**, 測定・保存した。

4. DNA ヒストグラムの解析, 及び DA と PseudoDA の判定

各検体の保存データから DNA ヒストグラムを作成し, 2C ピークの CV, **DA の有無, DA の数, DI, Pseudo-DA の有無**を調べた。CV や DI の計算は Cell Quest Pro Software (BD Biosciences, New Jersey, USA) を用いた。

5. DA の判定

- ① DNA ヒストグラム上, **2C ピークとは明らかに異なる, 深い谷で隔てられた G0/G1 期細胞ピーク (をもつ細胞集団) を DA と判定**。
- ② G0/G1 期細胞ピークが **2C ピーク以外にない細胞集団を DD と判定**した。明瞭な異常ピークはないが, 2C ピークに肩や小さな凹凸 (小ピーク) のあるもの, あるいは 2C ピークが非常に幅広い (CV が 5.0%以上の) ものは DD と判定し, 「肩あり 2C ピーク」や「幅広 2C ピーク」と記録。
- ③ 非腫瘍部に DA が検出された場合は DA とはせず, pseudo-DA と記録。
- ④ 一つ以上の DA を有する DNA ヒストグラムを DA パターン, DD のみの DNA ヒストグラムを DD パターンと呼ぶことにする。
- ⑤ 数個サンプリングした中で一つ以上 DA パターンが検出された症例を DA 症例, 全ての検体で DD パターンであった症例を DD 症例とよぶことにする。