

〈資料〉

動物臨床検査学実習へのImageJソフトウェアの導入 —タンパク質・リポタンパク質分画—

岡崎登志夫^{1)*}、山村拓也²⁾、宮井紗弥香¹⁾

Use of ImageJ in animal clinical laboratory training: Fractionation of plasma protein and lipoprotein by electrophoresis

Toshio Okazaki^{1)*}, Takuya Yamamura²⁾ and Sayaka Miyai¹⁾

Summary ImageJ, a free software, was introduced into electrophoresis training for the fractionation of plasma protein and lipoprotein in animal clinical laboratory training. Students self-performed electrophoresis and fractionated the electrophoretogram of plasma protein using ImageJ. While calculating the fraction ratio of plasma protein or lipoprotein, they could understand the aim of this analysis and obtain a high comprehension. The use of ImageJ in electrophoresis training was considered extremely useful for teaching animal clinical laboratory examinations.

Key words: animal, clinical examination, training, ImageJ, electrophoresis

I. 緒言

臨床検査は動物看護師の重要な仕事の一つで、実施される検査項目は、血液検査、尿検査、糞便検査、細胞診検査、病理検査、遺伝子検査、心電図検査、X線検査、超音波検査、内視鏡検査などである^{1,2)}。特に、多くの動物病院にはドライケムの検査装置が備えられ、血清・血漿や

尿のさまざまな臨床化学検査が可能である。ドライケムを用いて、血清総タンパク質濃度や尿タンパク質濃度の検査は盛んに行われるが、これ以外の特別な装置が必要な項目、例えばタンパク質分画などは、特殊検査として外注になり、病院では実施されていない。タンパク質分画はさまざまな疾患の病態を反映する重要な検査である。血漿（血清）中にはさまざまなタンパク

¹⁾ ヤマザキ動物看護大学

〒192-0364 東京都八王子市南大沢4-7-2

TEL 042-653-0901

*E-mail t_okazaki@yamazaki.ac.jp

²⁾ ヤマザキ動物看護専門職短期大学

〒150-0046 東京都渋谷区松涛2-3-10

¹⁾ Yamazaki University of Animal Health Technology

4-7-2 Minami-osawa, Hachioji, Tokyo 192-0364

TEL 042-653-0901

*E-mail t_okazaki@yamazaki.ac.jp

²⁾ Yamazaki Professional Collage of Animal Health Technology

2-3-10 Shoto, Shibuya-ku, Tokyo 150-0046

受付日：2019年7月11日

採択日：2019年10月20日

質やリポタンパク質が溶け込んでいて、疾病ごとにその濃度や各分画に含まれるさまざまなタンパク質の割合が変動することを学ぶことは動物看護教育においては、きわめて重要と考えられる。タンパク質分画の主たる目的のひとつに、M-タンパク質の検出があり、ヒトでは、さらに多発性骨髄腫の診断のために免疫電気泳動や免疫固定法でM-タンパク質の型別が行なわれている^{3,4)}。イヌでも多発性骨髄腫が散見され⁵⁾、その確定や治療のためにもタンパク質分画やM-タンパク質の型別は重要である。実際の臨床現場では、電気泳動の支持体としては、主にセルロースアセテート膜が使われ、自動電気泳動装置のデンストメーターで分画され⁶⁾、その結果が医師や獣医師に提供される。しかし、動物臨床検査実習で、学生ひとりひとりにデンストメーターの原理や操作法まで指導することは、時間や機器設備に限界があり困難であるため、止むを得ず学生が泳動した泳動像を、後日教員がデンストメーターで配布するという極めて不十分な実習にならざるを得なかった。そこで今回、実習にフリーソフトImageJを用いたタンパク質・リポタンパク質分画操作を導入することとした。まず、操作手順書を作成し、学生用のパーソナルコンピュータ(PC)にフリーソフトImageJをダウンロードした。これを用いて、学生自らが、タンパク質・リポタンパク質の電気泳動像を分画する実習を行なったところ、分画の意味や分画する際の問題点を考えながら実習に取り組むことができ、学習効果も高いと考えられたので報告する。

II. 材料と方法

1. サンプル及び実習器具の準備

市販のウシEDTA全血液(株式会社 日本バイオテスト研究所、朝霞、埼玉)を各グループに2 mLずつ分配し、実習に供した。電気泳動は定法に従ったが、それに必要な器具、試薬等は次のようであり、これらを学生の人数に合わせて準備した。

<器具>

電気泳動装置一式(電気泳動槽、電源装置)、マイクロデスペンサー、プレート、ろ紙、染色バット、マイクロピペット、50 mLピーカ

一、キムワイプ。

<試薬>

バルビタール・バルビタールナトリウム緩衝液(pH8.6)、支持体:タイタンジェル ユニバーサルプレートキット(株式会社 ヘレナ研究所、さいたま、埼玉)、ボンソーSタンパク分画染色液、ファットレッド7Bリポタンパク分画染色液(株式会社 ヘレナ研究所、さいたま、埼玉)、脱色用5%酢酸水溶液。

2. 電気泳動実習授業の実施

学生約40名を6-7名の小グループに分けて、動物臨床検査実習2コマ(180分)の中で、電気泳動によるウシ血漿のタンパク質及びリポタンパク質分画の実習授業を実施した。当該実習の前の回の実習では、遠心分離によってウシEDTA全血液を血球成分と血漿成分に分け、ビレット法や屈折計を用いて血漿中の総タンパク質濃度を測定するよう指導した。今回の授業では、電気泳動の原理やその目的、実施方法・手順等について説明した後、先の実習で得られたウシ血漿を材料として、グループごとに電気泳動によるタンパク質及びリポタンパク質の分画実習を指導した。今回のフリーソフトImageJを用いた分画との比較のために、教員資料としてあらかじめヘレナ研究所の電気泳動像スキャンニング装置クイックスキャン(QuickScan)を用いて、ウシ血漿タンパク質分画像を準備したが(Fig. 1)、血清と異なり、フィブリノーゲ

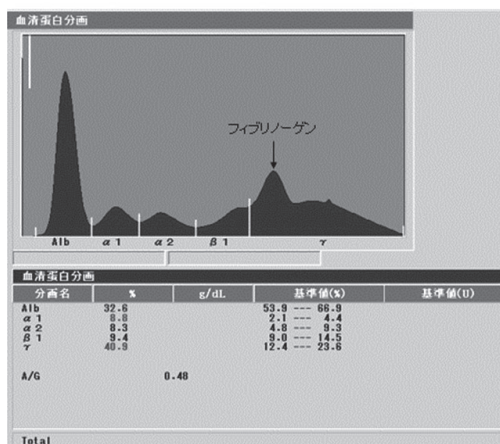


Fig. 1 Scanning pattern of bovine plasma protein electrophoretogram by QuickScan.

The arrow indicates the fibrinogen peak.

ンピークが顕著であった。

3. コンピュータソフトウェアImageJを用いた分画

次のダウンロード先 <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html> からフリーソフトImageJ (Windows 32ビット版) を本学コンピュータ室の12台のPC (Windows7・32ビット版) にダウンロードした。その操作手順については別途手順書を用意し、それに従って、教卓のPCで実演し、説明した。

4. 学生による電気泳動像の解析と考察

学生には、事前の説明に従って、実習後、コンピュータに保存された電気泳動像を、それぞれImageJで分画後、各分画のパーセントをソフトウェアで算出するよう指導した。その結果をプリントアウトし、提出用のレポートノートに添付し、考察等を加えて提出するよう指導した。

Ⅲ. 結果と考察

1. PCへのタンパク質・リポタンパク質電気泳動像の保存

各実習グループから提出された電気泳動像を、教員が写真撮影し、そのデジタル画像を学生共通のPCホルダーに保存した。各グループともFig. 2のような概ね良好なタンパク質及び

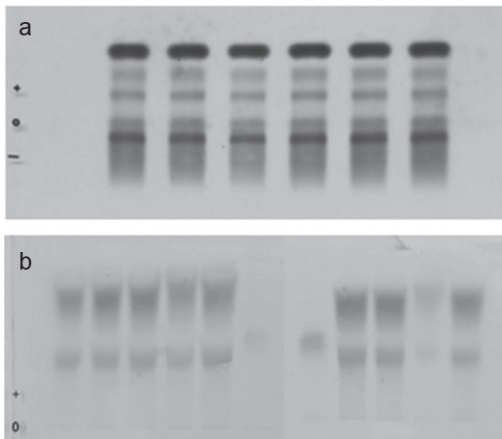


Fig. 2 Bovine plasma protein and lipoprotein agarose gel electrophoretogram
a: protein electrophoretogram stained with Ponceau S; b: lipoprotein electrophoretogram stained with Fat Red 7B.

リポタンパク質の電気泳動像が得られていた。

2. ImageJによる分画

学生は、保存されたPCホルダーの泳動像から、自らが塗布したレーンについて、ImageJで各分画に分け、それらの面積と比率を算出した。我々は、次のようなImageJの操作手順書を作成し、実習のはじめに学生に配布した。手順書作成に当たっては、学生が分かりやすいように、ImageJの操作のアプリケーション画面を、スクリーンショットで段階ごとに順を追って保存し、要所ごとに手順書に貼りつけた。

ImageJの操作手順書

<スタート>

- ① ImageJのアプリケーション画面を開く (Fig. 3)。

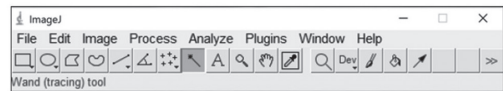


Fig. 3 Application screen of ImageJ.

<ゲルのサンプル画像の読み込とレーンのプロット>

- ② ImageJのアプリケーション画面のFileをクリックし、次にその中のOpenをクリックし、自分たちが泳動して得られた画像データを選択する (Fig. 4)。

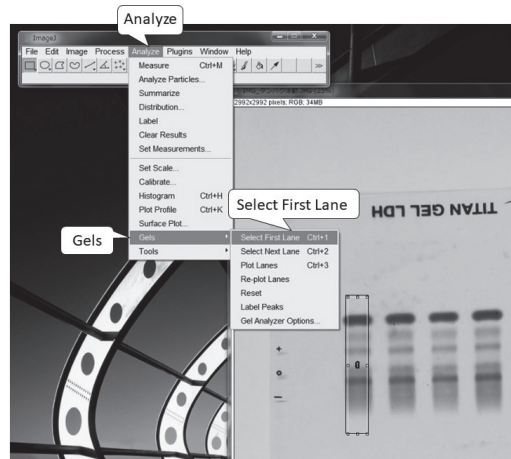


Fig. 4 Electrophoretogram lane selection and profiling.

Of the plasma protein electrophoretogram on the right side of the PC image, the leftmost lane surrounded by a square indicates the selected lane.

③ Fig. 4のアプリケーション画面の左端のFileの下の長方形枠で、自分が泳動したレーンの泳動像を囲ってから次の操作を行なう。

④ まず、Analyzeをクリックし、次にその中のGelのSelect First Laneをクリックする。

⑤ 次に再びAnalyzeをクリックし、次にその中のGelのPlot lanesをクリックし、レーンのプロファイルをプロットする。

<分画>

⑥ Fig. 5のアプリケーション画面の左から5番目の丸で囲まれた直線選択ツールで、ドロップラインを引き、各ピークを分画ごとに分ける。必要に応じてベースラインを引く。

⑦ Fig. 5のアプリケーション画面のAnalyzeの下の方で囲まれたワンドツールをクリック後、各分画をクリックすると、各分画の面積が測定される。蛋白分画は、Alb分画、 α 1分画、 α 2分画、 β 分画、 γ 分画に、リポ蛋白分画は α 分画、 β 分画、pre β 分画、CM分画等に分画される。

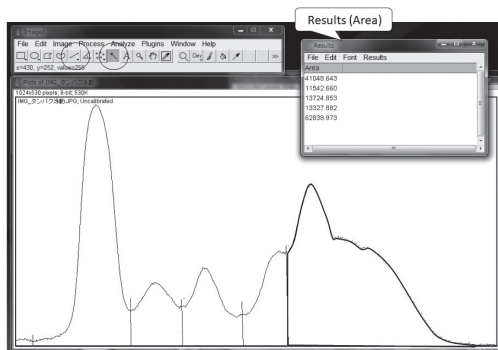


Fig. 5 Fractionation of peaks.

The area of each fraction is displayed in the upper right table.

<各分画のパーセント値表示>

⑧ Analyzeをクリック後、Gelの中からLabel Peaksをクリックし、プロット図に全分画に対する各分画の面積比率のパーセント値を表示させる。同時に、表の面積測定値のわきにパーセント値も表示される (Fig. 6)。

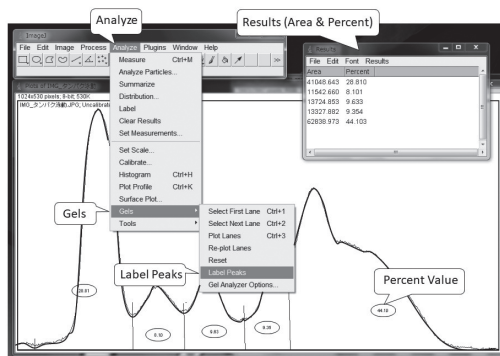


Fig. 6 Calculation and display of fraction area and percentage.

A percentage value is displayed next to the fraction area in the upper right table, and a percentage value is also displayed for each fraction of the scanning image.

3. ImageJ導入の効果と課題

学生はグループごとに協力しあいながら、電気泳動の実習に意欲的に取り組んでいた。得られた電気泳動像はFig. 2のように概ね良好であったが、学生が提出したウシ血漿タンパク質とリポタンパク質分画像は、レーン幅を狭く設定したり、染色が薄すぎたり、脱色しすぎたりしたためにプロットラインが鋸歯状であったり、ドロップラインでベースラインを低くしすぎたり高くしすぎたりして、Fig. 1のQuickScanの見本と比べて必ずしも優れたものではなかった。しかし、ImageJを用いた分画操作を実際に体験することによって、各自が分画についてより深く考察することができた。例えば、今回用いた血漿では、フィブリノーゲンのピークが出現して、M-タンパク質と紛らわしかったり分画がわかりづらかったりすることや、背景の脱色が不十分で染色液がゲルに残っているとベースラインが高くなることや、分画のためのドロップラインの位置によって分画の割合(%)が大きく変化することなどを直に体験することができた。今後の課題としては、分画操作を、実習後の学生の課題にしてしまうのではなく、実習時間の中でリアルタイムに指導できれば、学生の理解が一層深まるものと考えられた。また、近年、写真撮影機能を有する携帯電話が広く普及しており、電気泳動像も学生自ら撮影し、PCに取り込むことができれば、各自がそれを使っ

て即座に分画でき、一層自発的な学修を促すことができるかもしれない。また、ImageJは、タンパク質・リポタンパク質分画に活用できるばかりでなく、その他さまざまな解析機能がある。例えばsurface plotを使って対象を立体的に表現したり、特異染色と画像解析機能を組み合わせて特定の細胞を分画したりすることができ、応用範囲は大変広い。これらの詳細については、ImageJの公式マニュアルサイト等を参照されたい。今後は、我々もImageJのさまざまな機能について熟達し、学生が卒業研究などでも活用できるように指導していきたい。

IV. 謝辞

実習をサポートしてくれたヤマザキ動物看護大学の動物看護助手の方々、特に実習に直接関わってくれた豊泉元心、松本弥優希、勝又夏歩の各氏に深謝いたします。

本論文内容に関連する著者(ら)の利益相反：なし

文献

- 1) 宮井紗弥香, 山川伊津子, 岡崎登志夫, 若尾義人: 動物看護学科における臨床検査学教育. 臨床検査, 59: 195-201, 2015.
- 2) 全国動物保健看護系大学協会 カリキュラム検討委員会編: 専門分野 動物臨床検査. 株式会社インターズー, 東京, (2014)
- 3) 松田重三: 症例から学ぶ血漿蛋白の見方・考え方 第1版第1刷, 医歯薬出版, 東京, (1991)
- 4) 岡崎登志夫, 上遠野延行, 長井辰男, 菅野剛史: IgG型M-蛋白血症患者血清の免疫電気泳動における正常IgG出現の機序. 生物物理化学, 40: 13-18, 1996.
- 5) Matus RE, Leifer CE, MacEwen EG, Hurvitz AI: Prognostic factors for multiple myeloma in the dog. J Am Vet Med Assoc, 188: 1288-1292, 1986.
- 6) 芝紀代子: セルロースアセテート膜による血清蛋白電気泳動法—操作法とそれに関わる二, 三の問題点. 検査と技術, 16: 27-32, 1988.