

組織解離効率及び細胞生存率の比較分析(肝臓組織)

本研究は、TDzyme® (CONNEXT)と商用化されたcollagenase(Liberase™ TM (Roche)、Collagenase type IV-S(Sigma-Aldrich))を対象に、哺乳動物組織の解離効率と、解離した細胞の生存率を比較するために実施された。

材料及び方法

対象組織

ICR mouse (5~7週齢、3匹)の肝臓組織

組織の採取

肝臓組織を採取するために、3匹のマウスを1g/kg urethaneにより麻酔させた。麻酔させたマウスの腹腔を露出させ、小腸を右側に捲り、肝臓、腎臓、下大静脈及び肝門脈を露出させ、27-gauge needleを利用して下大静脈から肝門脈にPBS(抗生物質滅菌溶液)を注入し血液灌流を実施した。このとき、肝臓が十分に膨らむことを確認した上で肝門脈を切開し、血液が抜けたことによる肝臓の色の変化を確認した。肝臓組織を採取し、滅菌したPBS(抗生物質を含む、4℃)に移し、肝実質組織を除く結合組織、胆嚢及び胆嚢管を除去した。滅菌した剃刀の刃を利用して切り刻んだ1匹の肝臓組織に滅菌したDMEM 9 mLを株分けし、電動ピペットを利用して懸濁した後、9本(n=3)の5mLチューブに1mLずつつけて入れた。同一の過程を経て、ICRマウス3匹の肝臓組織3つから27の組織(n=9)を得た。

各酵素溶液の準備

組織	TDzyme® C, T (Connext)	Liberase™ TM (Roche)	Collagenase Type IV-S (Sigma-Aldrich)
脂肪組織	Diluent: Ice-cold Milli-Q water Concentration: 40 µg/mL Incubation: 30 min, 37°C	Diluent: Injection quality-sterile water or tissue-dissociation buffer Concentration: 40 µg/mL Incubation: 30 min, 37°C	Diluent: Krebs Ringer buffer with calcium and BSA Concentration: 40 µg/mL Incubation: 30 min, 37°C

Collagenase (TDzyme®, Liberase™ TM及びCollagenase type IV-S, n=9)を40µg/mLの濃度で用いて組織溶液5mLを製造し、27本のチューブを37°Cで30分間チューブローラーに載せて酵素を作用させた。酵素を作用させた組織溶液を70µmサイズのセルストレーナー(cell strainer)を用いて濾過した後、15mLチューブに入れて遠心分離(4°C、2分、50G(485rpm、190mm(rotor)))し、上清液は捨て、残りの溶液はRBC lysis bufferを1分間適用して赤血球を除去した。残りの溶液に5mLのDMEMを添加してRBC lysis bufferを中和した後、再び遠心分離(4°C、2分、50G (485rpm、190mm(rotor)))を実施した。遠心分離した溶液の上清液を除去した後、残りの溶液の10µlを取って10µLのtrypan blueで染色した上で、セルカウンターで細胞生存率を評価し、残りの溶液を細胞培養用プレートに分配して培養した(5% CO2、37.6°C)。

組織解離効率評価

セルカウンターを用いてcollagenase処理して解離した細胞の数を計算するためにtrypan blue 染色法を用い、mL当たりの生きている細胞と死んだ細胞を定量的に比較した。

一次培養及び細胞生存率評価

解離した細胞を培養培地で24時間及び72時間培養し、細胞増殖分析(MTT assay)を実施した。

Tissue type	Culture Conditions
Liver tissue	Advanced DMEM, 10mM HEPES, 10% FBS, 37°C CO ₂ incubator

結果

組織解離効率

3種類の異なるcollagenaseを肝臓組織に処理した後、肝臓組織から解離した細胞の数を数えて、各collagenaseにおける解離率を評価した。肝実質組織から解離した平均細胞数は、TDzyme®の場合 0.29×10^6 、Liberase™ TMの場合 0.33×10^6 で、Liberase™ TMの総細胞数はTDzyme®の総細胞数に比べて多いという結果が出たが、その差は統計的に有意なものでなかった($p > 0.05$)。Collagenase type IV-Sにより解離した平均細胞数は 0.51×10^6 で、TDzyme®及びLiberase™ TMに比べて相当多かった($p < 0.05$)。

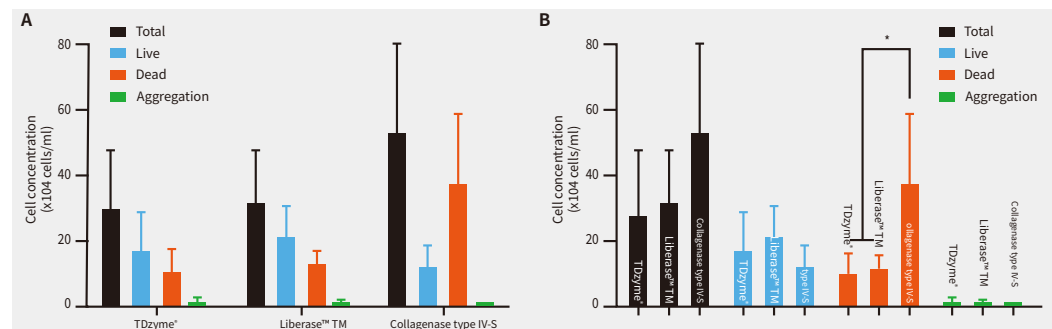


Fig 1. 酵素別の解離効率の比較

肝臓組織から得た総細胞数における生きている細胞の数と割合を調査した。生きている細胞の平均数は、TDzyme®の場合 0.17×10^6 、Liberase™ TMの場合 0.20×10^6 で、生存率はそれぞれ58.08%及び59.35%であった。TDzyme®により解離して得られた生きている細胞の数と生存率は、Liberase™ TMにより解離して得られた結果と大きく違いがなかった($p > 0.05$)。Collagenase type IV-Sを用いて得た生存細胞の数と生存率はそれぞれ 0.13×10^6 及び25.76%で、この数値はTDzyme®及びLiberase™ TMと比べて有意に低かった($p < 0.05$)。

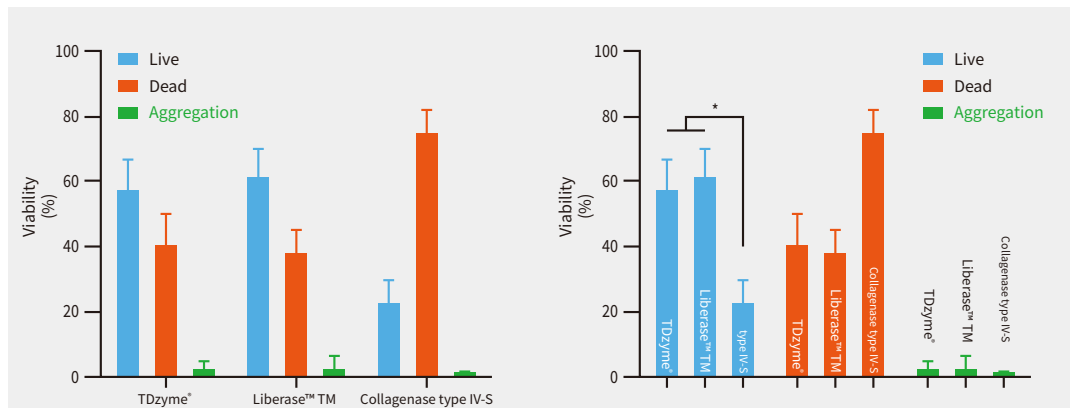


Fig 2. 細胞生存率の比較

培養された細胞における生存率

肝臓組織から得た細胞の様相を観察するために、72時間培養してから顕微鏡で細胞を観察した。TDzyme®及びLiberase™ TMにより解離した場合、多くの細胞が細胞培養用プレートに付着して育っているのがはっきりと確認されたが(赤色の矢印)、Collagenase type IV-Sにより解離した場合、その数値が有意に低かった。MTT分析は、細胞培養用プレートに付着した細胞の生存率を評価するために実施した。TDzyme®を100%と算定してMTT分析の結果を計算すると、Liberase™ TMの平均生存率は154.78%、Collagenase type IV-Sの平均生存率は22.05%であった。TDzyme®及びLiberase™ TMと比べて、Collagenase type IV-Sは統計的に有意に低い値を示した($p < 0.05$)。

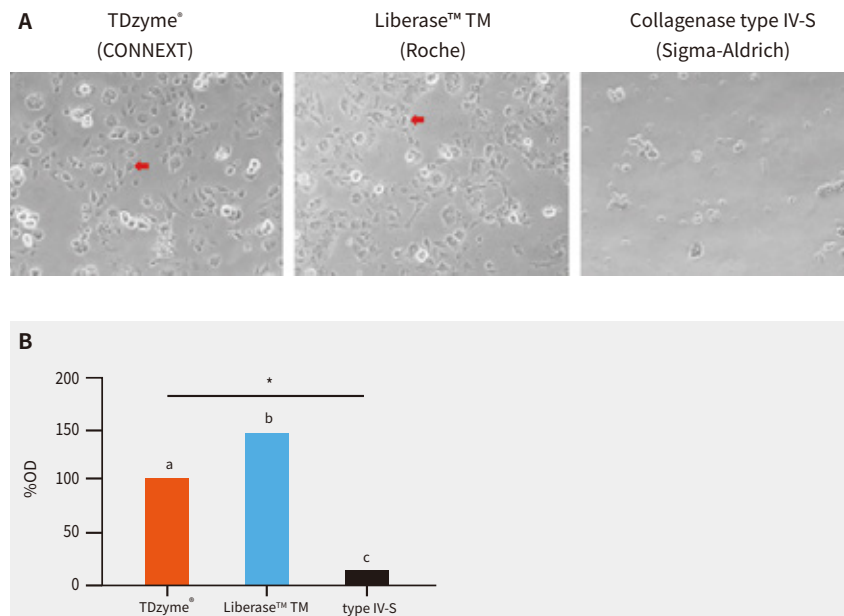


Fig 3. 培養された細胞の様相及び細胞生存率評価

- A. 肝臓組織から得た細胞を12well細胞培養用プレートで72時間培養してから細胞の様相を顕微鏡で観察した。TDzyme®及びLiberase™ TMにより解離した細胞は多くの量がプレート表面に付着して分化中であることを確認したが、Collagenase type IV-Sにより解離した細胞の場合は著しく少ない量がプレート表面に付着しているのが観察された(赤色の矢印)。
- B. 細胞培養用プレートに付着した細胞の生存率を評価するために、MTT分析を実施した。TDzyme®を100%と算定してLiberase™ TM及びCollagenase type IV-Sの値をグラフで示しており、Cは他のものと比べて統計的に有意であった(* $p = 0.0441$)。

ディスカッション

肝臓組織における各酵素の組織解離率を比較した結果、総細胞数はTDzyme®とLiberase™ TMがほぼ同じだったが、Collagenase type IV-Sは他の酵素よりずっと多くの数の細胞が解離した。TDzyme®とLiberase™ TMの場合、生きている細胞の割合はそれぞれ57.08%と59.35%と類似していたが、Collagenase type IV-Sは25.76%と統計的に有意に低い割合をみせた。つまり、Collagenase type IV-Sにより得た細胞の数が多いにもかかわらず、生存細胞の割合は非常に低かった。

培養された細胞の様相と細胞培養用プレートに付着した細胞の生存率を、MTT assayにより分析した。TDzyme®では、Liberase™ TMと似た細胞の様相が見られた。MTT分析の結果においても、統計的に有意な差を示さなかった。しかし、Collagenase type IV-Sの場合、細胞培養用プレートに付着した増殖細胞の数が著しく減少し、MTT assayの結果も他の2つの酵素に比べて統計的に有意な減少をみせた。

TDzyme®により肝臓組織から解離した細胞の生存率は、Liberase™ TMにより解離した細胞の生存率と類似していた。培養された細胞の生存率と培養された細胞の様相において統計的に有意な差がなかったため、TDzyme®の研究結果は、Liberase™ TMの研究結果と類似していた。また、二つの酵素はCollagenase type IV-Sに比べて、解離した細胞の生存率と培養細胞の生存率が有意により高かった。

結論

本比較実験においては、ICRマウスから肝臓組織を採取し、組織サンプルを同一条件において異なるcollagenaseで処理し、TDzyme®の効率性を2種類の商用collagenaseであるLiberase™ TMとCollagenase IV-Sと比較した。TDzyme®は、細胞解離効率、解離した細胞の生存率の面においてLiberase™ TMと類似しており、得られた結果によると、Collagenase type IV-Sより優れていた。結論的に、TDzyme®はin vivo studyにおいて、Liberase™ TMと似た効率を示すが、Collagenase type IV-Sよりずっと高い効率を示すことを確認した。