

組織解離効率及び細胞生存率の比較分析(皮膚組織)

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

8週齢ICR mouse 3匹の皮膚組織

皮膚の採取 (Removing the skin)

皮膚組織を採取するために、3匹のマウスを1g/kgのウレタンで麻酔させた。脇腹から皮膚組織を採取する前に、除毛剤を柔らかいブラシで塗布し、3分後に除毛を毛と共に拭き取った。毛を除去した部位にポビドンを塗布した後、アルコールを3回塗布して皮膚を消毒し、頸椎脱臼により安楽死させ、脇腹の両側の皮膚を採取した。

組織の採取

4mm punch biopsyを用いて均一の大きさに皮膚組織を採取した。1匹のマウスから最大60の皮膚biopsy組織を採取し、3匹のマウスから180の組織を採取した。得られた皮膚組織をポビドン(5分)及び滅菌リン酸緩衝生理食塩水(PBS、抗生物質を含む、5分)を用いて2回滅菌した。次に、ポビドン(PBS(抗生物質を含む、10分))を用いて皮膚から洗い落とし、trypsin前処理(30分、37°C、shaking)により皮膚組織を軟化させた。次に、皮膚組織から脂肪組織を除去した。それぞれの皮膚組織片は、滅菌ハサミを用いて小さなサイズ(<1 mm³)に切り、10の皮膚組織片を切り刻んで2mLチューブに入れた。180の皮膚片を無作為に分けて2mLチューブ18本に分けて入れ、チューブは1グループ当たり6本のチューブとして3つのグループに分け、各グループはそれぞれ異なるcollagenase(n=6)で処理された。

各酵素溶液の準備

組織	TDzyme® C, T (Connext)	Liberase™ TM (Roche)	Collagenase Type IV-S (Sigma-Aldrich)
皮膚組織	Diluent: Ice-cold Milli-Q water Concentration: 200 µg/mL Incubation: 90 min, 37°C	Diluent: Injection quality- sterile water or tissue-dissociation buffer Concentration: 200 µg/mL Incubation: 90 min, 37°C	Diluent: Krebs Ringer buffer with calcium and BSA Concentration: 200 µg/mL Incubation: 90 min, 37°C

Collagenase (TDzyme®, Liberase™ TM及びCollagenase type IV-S, n=6)を200µg/mLの濃度で用いて皮膚組織を入れたチューブにcollagenase溶液1mLを添加し、18本のチューブを37°Cで90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チューブに入れて滅菌DMEM 4mLを添加して遠心分離(20°C、1200rpmで5分、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DMEM 5 mLを添加してRBC lysis bufferを中和した後、再び遠心分離(20°C、1200rpmで5分、190mm(rotor))を実施した。遠心分離した溶液の上清液を除去し、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、1mL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。

Tissues	Culture Conditions
Skin tissue	Advanced DMEM, 10mM HEPES, 10% FBS 37°C CO2 incubator

結果

組織解離効率

3種類の異なるcollagenaseを皮膚組織に処理した後、皮膚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。皮膚組織から解離した平均細胞数は、TDzyme®の場合 0.28×10^6 、Liberase™ TMの場合 0.24×10^6 だったが、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 0.11×10^6 で、TDzyme®及びLiberase™ TMよりも有意に低かった($p < 0.05$)。皮膚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。TDzyme®, Liberase™ TM及びCollagenase type IV-Sの生きている平均細胞数は、それぞれ 0.14×10^6 、 0.11×10^6 及び 0.01×10^6 で、TDzyme®と比べて、他の2つの酵素の結果は有意に低かった($P < 0.05$)。

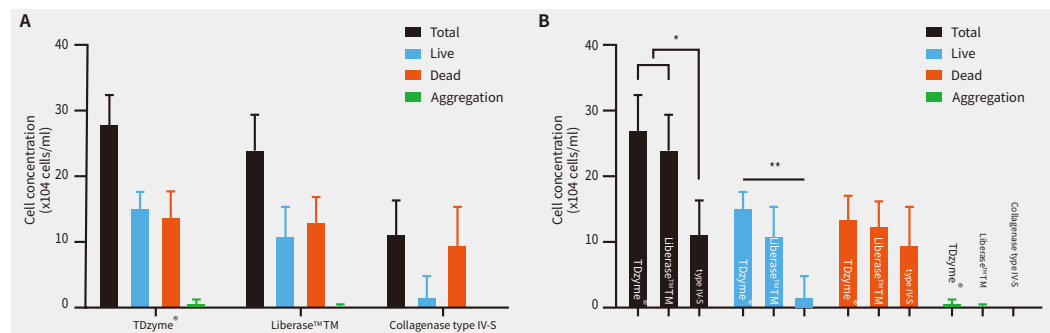


Fig 1. 酵素別の解離効率の比較

TDzyme®, Liberase™ TM及びCollagenase type IV-Sの皮膚組織から解離した細胞の細胞生存率は、それぞれ51.40%、45.50%及び10.21%だった。Liberase™ TMとTDzyme®との間に統計的に有意な差はなかったが、細胞生存率はCollagenase type IV-Sが他の2つのグループより有意に低かった($p < 0.05$)。

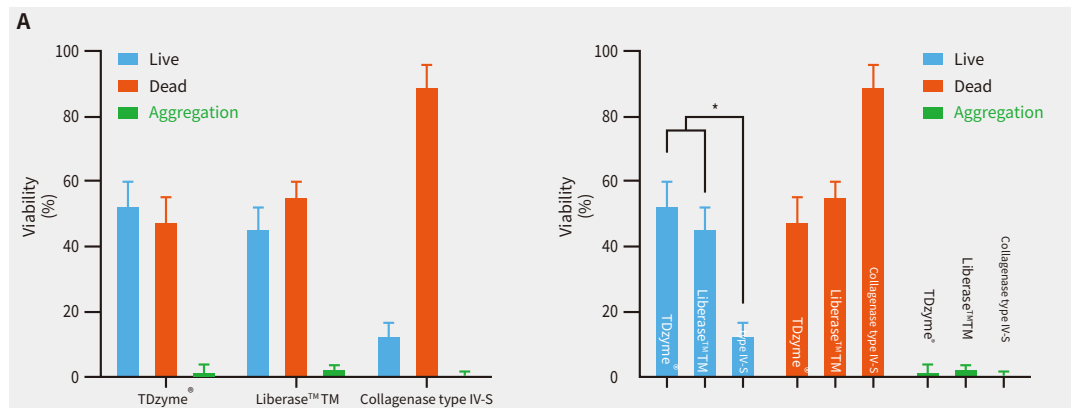


Fig 2. 細胞生存率の比較

培養された細胞における生存率

皮膚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は、細胞がほとんど観察されなかった。MTT分析は、培養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90.17%、Collagenase type IV-Sの平均生存率は7.22%で、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($p < 0.05$)。

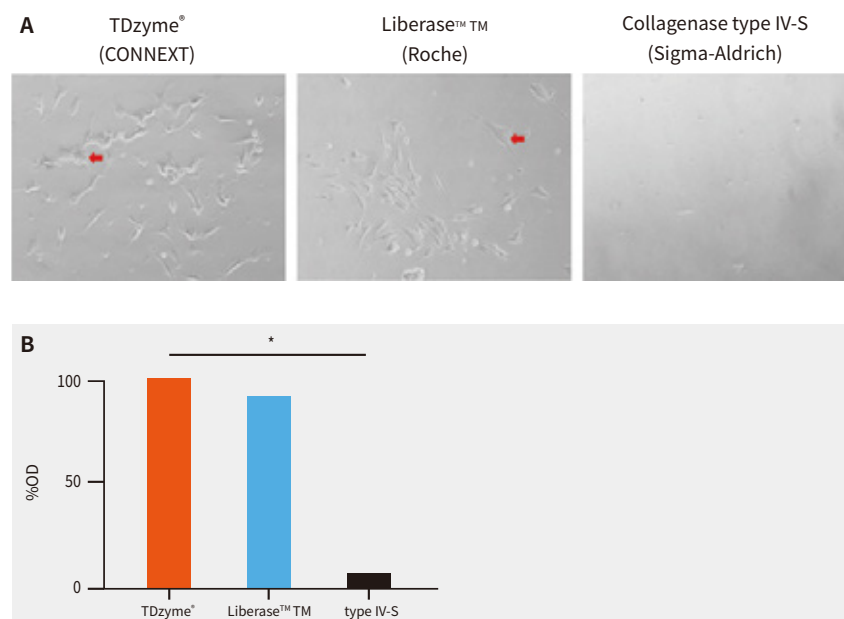


Fig 3. 培養された細胞の様相及び細胞生存率評価

A. 皮膚組織から得た細胞を12 well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、Collagenase type IV-Sの場合、TDzyme®及びLiberase™ TMに比べて統計的に減少した値を得た(* $p < 0.05$)。

イスカッション

皮膚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2つの酵素より著しく少ない数の細胞が解離した。組織から解離した細胞の様相を比較した場合、TDzyme®の生きている細胞数はLiberase™TMよりも有意に多かったが、割合の面において似た様相を示し、Collagenase type IV-Sと比較した場合、生きている細胞数と割合においてどちらも有意に高い結果を示した。要約すると、皮膚組織から解離した細胞の数と細胞の生存率を酵素によって比較した結果、TDzyme®とLiberase™ TMは類似した結果を示したが、Collagenase type IV-Sよりも高い解離効率を示した。

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®は、Liberase™ TMと似た細胞の様相が見られた。MTT assayの結果をみると、TDzyme®がLiberase™ TMより統計的に有意な差はなかったが、より良い結果を示した。しかし、Collagenase type IV-Sの場合、培養プレートに付着した増殖細胞の数が他の2つの酵素に比べて著しく減少し、MTT assayの結果においても他の2つの酵素に比べて統計的に有意な減少を示した。TDzyme®とLiberase™ TMにより解離した細胞の数と生存率は類似するパターンをみせたが、細胞培養の様相及び培養された細胞の生存率を比較した場合、統計的に有意な差がないことから、皮膚組織における細胞解離効率は、TDzyme®とLiberase™TMは似ていることが分かった。Collagenase type IV-Sは、二つの酵素に比べて解離した細胞の数と生存率において有意な減少を示し、解離した細胞の生存率と培養された細胞の生存率も減少した。

結論

本比較実験においては、ICRマウスから皮膚組織を採取した後、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、皮膚組織の細胞解離効率、解離した細胞の生存率、培養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。