

組織解離効率及び細胞生存率の比較分析(脂肪組織)

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

SD rat (8週齢、2匹)の生殖腺及び後腹膜の脂肪組織

組織の採取

心臓灌流

SD ratの血液循環を利用して脂肪組織から血液を除去し、脂肪組織の採取のために2匹のratを1g/kgのウレタンで麻酔させた。麻酔させたratの胸部内を露見させ、左心室(left ventricle)端部にextension lineが接続された針を刺した上で、右心耳(right auricle)を切開した。extension lineを通じて滅菌食塩水(0.9%)を10-12mL/分の速度で灌流ポンプにより入れることで、ratの血液を抜いた。

肝臓及び腎臓組織の色を観察しながら、ratの血液が完全に抜け出たことを確認した。大部分の臓器から血液が抜け出たことが確認されると、心臓に接続されたextension lineと針を除去し、滅菌されたハサミとピンセットを用いて腎臓の尾側表面にある生殖腺脂肪組織と後腹膜脂肪組織を採取した。採取した脂肪組織を滅菌リン酸緩衝生理食塩水(PBS、抗生物質を含む、4°C)に移し、滅菌PBSを用いて20分ずつ3回洗浄した。次に洗浄した脂肪組織から血液残留物、結合組織、その他の組織を切除し、脂肪組織のみを得た。得られた脂肪組織に12mLの滅菌DMEMを添加し、homogenizer(12,000rpm、60秒)で小片に切った上で、電子ピペットを利用して懸濁した。この懸濁した組織溶液を5mLのチューブに12本に分けて入れた(n=4)。同一の過程により、2匹のSD ratの脂肪組織から24の組織(n=8)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: 100 µg/mL Incubation: 30 min, 37°C | Diluent: Injection quality-sterile water or tissue-dissociation buffer Concentration: 100 µg/mL Incubation: 30 min, 37°C | Diluent: Krebs Ringer buffer with calcium and BSA Concentration: 100 µg/mL Incubation: 30 min, 37°C |

Collagenase(TDzyme®, Liberase™ TM及びCollagenase type IV-S、n=8)を100µg/mLの濃度で用いて組織溶液5mLを製造し、24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大のセルストレーナー(cell strainer)を用いて濾過した後、50mLチューブに入れて滅菌DMEM 15mLを添加した上で遠心分離(20°C、5分、250G (1084rpm、190mm (rotor)))させ、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 20 mLを添加してRBC lysis bufferを中和した後、再び遠心分離(20°C、5分、250G (1084rpm、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10µlを取り、10µlのtrypanblue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。

| Tissues | Culture Conditions |
|-----------------|--|
| Adipose tissues | 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を脂肪組織に処理した後、脂肪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。脂肪組織から解離した平均細胞数は、TDzyme®の場合 0.13×10^6 、Liberase™ TMの場合 0.11×10^6 で、統計的に有意な差はなかった($p > 0.05$)。Collagenase type IV-Sで解離した平均細胞数は 0.07×10^6 で、TDzyme®及びLiberase™ TMよりも有意に低かった($p < 0.05$)。

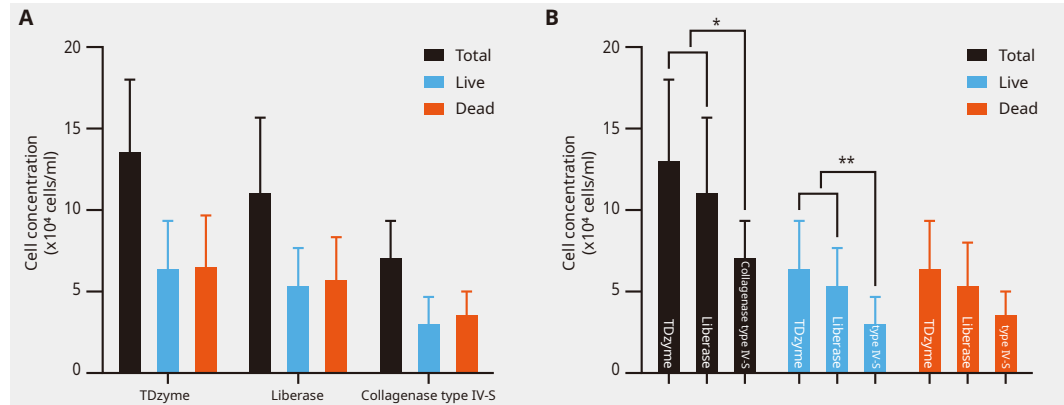


Fig 1. 酵素別の解離効率の比較

解離した脂肪組織の総細胞数における生きている細胞の数と生存率を調査した。生きている細胞の平均数は、TDzyme®の場合 0.065×10^6 、Liberase™ TMの場合 0.053×10^6 で、統計的に有意な差はなかった($P > 0.05$)。Collagenase type IV-Sにより解離して得られた細胞の数は 0.03×10^6 で、TDzyme®及びLiberase™ TMに比べて有意に低かった($p < 0.05$)。TDzyme®、Liberase™ TM及びCollagenase type IV-Sの細胞生存率を比較するとそれぞれ48.83%、49.32%、43.27%となり、統計的に有意な差はなかった($P > 0.05$)。

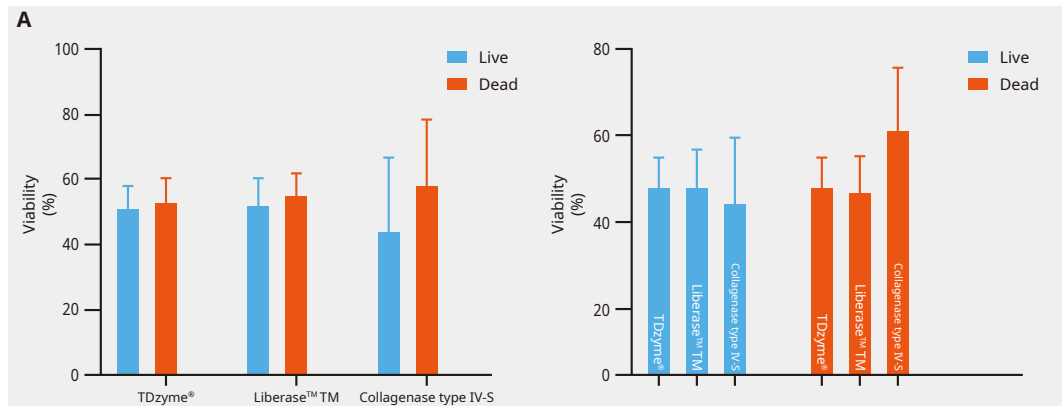


Fig 2. 細胞生存率の比較

培養された細胞における生存率

脂肪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70.37%、Collagenase type IV-Sの平均生存率は5.22%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($p < 0.0001$)。

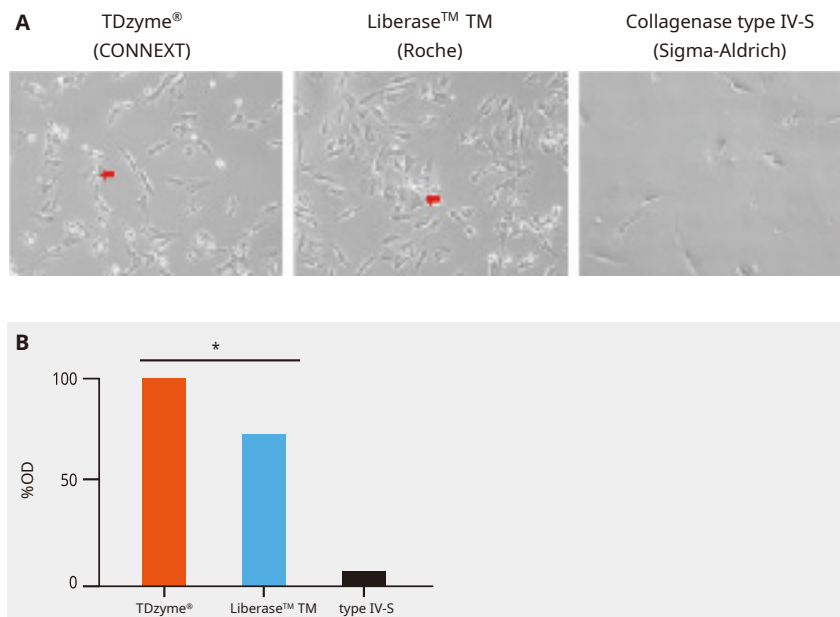


Fig 3. 培養された細胞の様相及び細胞生存率評価

A. 脂肪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、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(* $p < 0.0001$)。

ディスカッション

脂肪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。3種類の酵素共に組織から解離した細胞の細胞生存率は類似するパターンをみせたが、TDzyme®とLiberase™ TMの生きている細胞数はCollagenase type IV-Sの場合よりずっと多かった。

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®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みせた。

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、Collagenase type IV-Sは同一の実験において、他の2つの酵素に比べて解離した細胞数と培養細胞の生存率が著しく低かった。

結論

本比較実験では、SD ratから脂肪組織を採取した後、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及びCollagenase IV-Sと比較した。TDzyme®は、脂肪組織の細胞解離効率、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。v