

DSS 誘導大腸炎モデルマウスの
形態計測学的解析法の確立
～間葉系幹細胞による大腸炎抑制効果の検討～

生命工学技術科

再生医療・バイオ医薬品専攻 1 班

宇野 隼平

田中 達也

武藤 拓実

山口 秦司

目 次

| | |
|-----------------------|----|
| I. 背景 | 1 |
| II. 目的 | 2 |
| III. 材料・機器・器具・試薬 | 2 |
| III-i 材料 | 2 |
| III-ii 機器 | 2 |
| III-iii 器具 | 2 |
| III-iv 試薬 | 3 |
| IV. 方法・操作 | 4 |
| IV-i 試薬の調製 | 4 |
| IV-ii 実験計画 | 8 |
| IV-iii bMSC 調製法及び投与方法 | 8 |
| IV-iv 大腸摘出・前処理・固定 | 10 |
| IV-v パラフィン切片作製 | 10 |
| IV-vi HE 染色 | 11 |
| IV-vii 免疫組織化学染色 | 12 |
| IV-viii 顕微鏡での撮影・病理解析 | 13 |
| V. 結果 | 15 |
| V-i 顕微鏡における観察結果 | 15 |
| V-ii 形態計測学的解析による解析結果 | 17 |
| VI. 考察 | 20 |
| VII. 結論 | 20 |
| VIII. 謝辞 | 20 |
| IX. 参考文献 | 20 |
| X. 要約 | 21 |

I. 背景

炎症性腸疾患 (IBD) の一つである潰瘍性大腸炎は大腸の粘膜に糜爛や潰瘍が生じ、腹痛、ときに下血を伴う下痢、体重減少などの症状を呈する慢性炎症疾患である。残念ながら、未だ原因不明で根治療法が確立しておらず、IBD で苦しんでいる患者にとっては根治療法の確立は急務である。内視鏡観察において、正常大腸では粘膜表面は滑らかで、上皮を透かして粘膜内の血管が観察できる (Fig. 1 左) が、潰瘍性大腸炎となると粘膜上皮の剥離と細胞浸潤によってその形態は著しく変化し (Fig. 1 右)、病理組織像では、粘膜上皮の消失とともに腸腺構造も全く認められなくなる。現在、潰瘍性大腸炎の病態の解析やその治療法研究のため、正常 C57BL/6N マウスにデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を投与して作製した DSS 誘導大腸炎モデルが広く用いられている。DSS による大腸炎発症には、遺伝背景と組織修復機構が深く関わっていると考えられる。

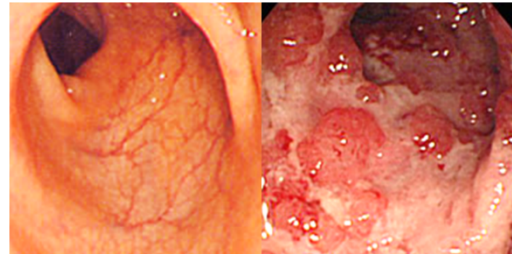


Fig. 1 ヒト大腸の内視鏡像
左：正常、 右：潰瘍性大腸炎

近年、このような難治性疾患に対し、再生医療技術を応用した間葉系幹細胞による治療法が提唱されている。間葉系幹細胞 (MSC) は、自己複製能力及び多分化能を持った細胞で、組織障害部位、及び炎症部位に集積する特性があり、免疫抑制作用、及び抗炎症作用を持っていると考えられており、近年、再生医療領域においては、本細胞による IBD の細胞治療の可能性が検討されている。採取元として脂肪組織及び骨髄が挙げられている。

骨髄由来 MSC (bMSC) はヒトにおいては採取することが困難で回収率も悪く、免疫系細胞に分化することが多く維持管理が難しいとされている。それに対して、脂肪組織由来 MSC (aMSC) は採取が容易で回収率も高く、多くの細胞に分化することが可能であるといわれている。本研究では aMSC を用いて大腸炎抑制効果を検討しようと考え、aMSC の調製を試みてきたが、その生産性が安定せず、大腸炎モデルへの投与が困難であった。しかしながら、bMSC に関しては培養することに成功したので、これを用いて大腸炎抑制効果を検討した。

ところで、マウスに DSS を投与すると大腸炎が生じるが、大腸の障害は均一に生じるわけではなく、部位によって障害の現れ方や程度が異なっている。そのため、治療法などを検討する場合は、どこを観察するかによって判定が異なってしまう、正確に評価することが困難であった。そこで、本研究では DSS で誘発した大腸炎モデルマウスに同系マウスの bMSC を投与する事で、bMSC に大腸炎の障害に対する治療効果があるのかどうかを、組織切片上での形態計測学的解析によって評価可能かどうかを検討することとした。

II. 目的

本実験の目的は、DSS 誘導大腸炎モデルマウスを作製し、MSC を投与することによって期待される大腸炎抑制効果を客観的に評価するため、DSS 誘導大腸炎に bMSC を投与して、その治癒効果の形態計測学的評価法を確立する事である。

III. 材料・機器・器具・試薬

III-i. 材料

動物は東京医薬専門学校 2 号館 6 階の動物舎にて飼育し、固形試料（日本農業工業株式会社）を与えた。本動物実験は、東京医薬専門学校の動物実験指針に従って実施した。

- C57BL/6N（体重 20g 以上の雄）：DSS への感受性が高いため大腸炎モデルマウスに使用。
C57BL/6N^{-CSA}（20 週齢以上の雄）：bMSC を採取するために使用。

III-ii. 機器

インキュベーター(JUJIFIELD, BL-163D)、振盪培養器(TAITEC, BR-30)、遠心分離器(株式会社久保田製作所, KUBOTA5100)、振盪器(EYELA, MMS)、冷蔵庫(日本フリーザー株式会社)、ディープフリーザー(日本フリーザー株式会社)、製氷機(HOSHIZAKI)、滑走式マイクロトーム(SAKURA, IVS-410)、ホットプレート(株式会社高島商店, OMROM-E5L)、オートクレーブ(SANYO, MLS-3020)(TOMY, KS323)、倒立顕微鏡(カールツァイス株式会社, Axiovert T-200122)、顕微鏡撮影カメラ(カールツァイス株式会社, MRc)、双眼実体顕微鏡(OLYMPUS, SZX12)、生物顕微鏡(OLYMPUS, BX50)、生物及び実体顕微鏡撮影カメラ(OLYMPUS, DP70)、クリーンベンチ(TELSTAR, EN-12469)、電子天秤(エーアンドデイ, 5200202)、オートピペッター(FALKON, 56898)、アスピレーター(柴田科学器械工業株式会社, 1543835)、マグネティックスターラー(EYELA, RCN-7R)、ホットスターラー(ADVANTEC, SR350)、マップメーター(株式会社小泉測機製作所, 13252)、吸入麻酔器(株式会社バイオマシナリー, TK-36)、MILLIPORE 純水装置(日本ミリポア株式会社, F3MN993084)、ボルテックス(IWAKI, TM・152)、全自動セルカウンター(BIO RAD, TC20)、プレートリーダー(Amersham Biosciences, Biotrak II)

III-iii. 器具

メディウム瓶(500 ml, 1000 ml)(IWAKI GLASS)、メスシリンダー(100 ml, 200 ml, 500 ml, 1000 ml) (IWAKI GLASS)、三角フラスコ(200 ml, 300 ml, 500 ml, 1000 ml) (IWAKI GLASS)、ビーカー(100 ml, 200 ml, 500 ml, 1000 ml) (IWAKI

GLASS)、ピペットマン(P1000, P200, P20:GILSON, P10:ependorf)、チップ(ビーエム機器株式会社)、チューブ(15 ml, 50 ml)(エル・エム・エス株式会社)、ディスプレイポータブルピペット(25 ml)(greiner bio-one)、ディスプレイポータブルピペット(5 ml, 10 ml)(エル・エム・エス株式会社)、パストツールピペット(Fisher Scientific)、替え刃式マイクロトーム刃(フェザー)、カバーガラス(MATSUNAMI)、スライドガラス(MATSUNAMI)、パラフィルム(PECHUNEY)、エッペンチューブ(GILSON)、セラムチューブ(住友ベークライト株式会社)、70 μ m セルストレイナー(FALCON)、0.22 μ m フィルター(Sartorius stedim)、シリンジ(1 ml, 10 ml, 50 ml)(テルモ株式会社)、注射針(24G)(テルモ株式会社)、インシュリンシリンジ(日本ベクソン・デイツキンソン株式会社)、解剖バサミ(両鋭大直剪刀、両鋭小直剪刀、マイクロ剪刀)、ピンセット(有鉤、先細)、モスキート鉗子、モールド(SAKURA)、染色ドーゼ、染色コップリンジャー、プラスチックゾンデ、縫合糸、リザーバー、微針(志賀昆虫普及社)、シリコンパッド、金属パッド、コルク板、ろ紙、キムタオル、プロワイプ、ヘモサイトメーター、スターラーバー、乳棒、乳鉢、シャーレ(CORNING)、飼育用ケージ(日本クレア株式会社)、給水ビン(日本クレア株式会社)

III・iv. 試薬

リン酸水素 2 ナトリウム 12 水和物($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)(SIGMA)、リン酸 2 水素ナトリウム 2 水和物($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)(SIGMA)、リン酸水素 2 カリウム(K_2HPO_4)(関東化学株式会社)、塩化ナトリウム(NaCl)(SIGMA)、塩化カリウム(KCl)(和光純薬工業株式会社)、クエン酸ナトリウム(和光純薬工業株式会社)、クエン酸(キシダ化学株式会社)、特級エタノール($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)(関東化学株式会社)、特級キシレン($\text{C}_6\text{H}_4\text{C}_2\text{H}_6$)(関東化学株式会社)、濃塩酸(HCl)(SIGMA)、パラホルムアルデヒド($(\text{HCHO})_n$)(PFA, 和光純薬工業株式会社)、エオジン Y(和光純薬工業株式会社)、ヘマトキシリン(SIGMA)、ヨウ素酸ナトリウム(キシダ化学株式会社)、グリセリン($\text{C}_3\text{H}_7\text{O}_2$)(関東化学株式会社)、酢酸(CH_3COOH)(関東化学株式会社)、メタノール(CH_3OH)(関東化学株式会社)、過酸化水素水(H_2O_2)(和光純薬工業株式会社)、アジ化ナトリウム(NaN_3)(SIGMA)、牛血清アルブミン(以下 BSA)(和光純薬工業株式会社)、正常ヤギ血清(以下 NGS)(和光純薬工業株式会社)、チメロサール(SIGMA)、ビオチン化ヤギ抗ラット IgG 抗体、ラット抗 BrdU 抗体、ラット抗ヒトテネイシン C 抗体(PassII)、DAB(SIGMA)、Avidin/Biotin Blocking Kit(Vector Labs.)、VECTASTAIN ABC KIT(VECTOR Labs.)、酢酸ナトリウム(CH_3COONa)(SIGMA)、メチルグリーン(SIGMA)、ブタノール($\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$)(関東化学株式会社)、DMEM(日水製薬株式会社)、7.5 %炭酸水素ナトリウム溶液(NaHCO_3)(Life Technologies Corporation)、L-グルタミン(日水製薬株式会社)、ストレプトマイシン(明治製薬株式会社)、ファンギソン(GIBCO)、ペニシリン

(MeijiSeika ファルマ株式会社)、FBS(三光純薬株式会社)、DNase(2.0×10^5 U)(和光純薬工業株式会社)、コラゲナーゼ(和光純薬工業株式会社)、トリプシン、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS, MP Biomedicals)、イソフルラン(マイラン製薬株式会社)、水酸化ナトリウム(NaOH)(SIGMA)、ヒストプレップ 568(和光純薬工業株式会社)、0.4 %トリパンブルー水溶液(和光純薬工業株式会社)、BrdU(SIGMA)、マリノール(武藤化学株式会社)、Cell Counting Kit-8(同仁化学研究所)

IV. 方法・操作

IV-i 試薬の調製

【エタノール溶液】

各濃度になるように調製した(70%,80%,90%,95%)。1000 ml メスシリンダーに特級エタノールを入れ、超純水で全量が 1000 ml になるようにメスアップし、メスシリンダーの口をパラフィルムでふたをし、転倒混和した。その後プラスチック容器に入れて保存した。

【1 M NaOH 溶液】

2 g の NaOH を 50 ml チューブに入れ、超純水で全量が 50 ml になるようにメスアップし、転倒混和した。溶解後、室温で保存した。

【0.2 M リン酸水素 2 ナトリウム溶液(Stock A)】

1000 ml 三角フラスコの中でリン酸水素 2 ナトリウム 12 水和物を 71.6 g はかり、800 ml 程度の超純水を加えスターラーで攪拌し、完全に溶解させた。その後、1000 ml メスシリンダーに移し、超純水で 2~3 回洗いこんだ後、全量が 1000 ml になるようにメスアップし、パラフィルムでふたをし、転倒混和した。その後、1000 ml メディウム瓶に移し、高圧蒸気滅菌(121 °C,15 分、以下同様に)をかけて室温で保存した。

【0.2 M リン酸 2 水素ナトリウム溶液(Stock B)】

1000 ml 三角フラスコの中でリン酸 2 水素ナトリウム 2 水和物を 31.2 g はかり、800 ml 程度の超純水を加えスターラーで攪拌し、完全に溶解させた。その後、1000 ml メスシリンダーに移し、超純水で 2~3 回洗いこんだ後、全量が 1000 ml になるようにメスアップし、パラフィルムでふたをし、転倒混和した。その後 1000 ml メディウム瓶に移し、高圧蒸気滅菌をかけて室温で保存した。

【0.1M リン酸緩衝 4 %パラホルムアルデヒド溶液】

500 ml 三角フラスコの中で PFA を 40 g はかり、350 ml 程度の超純水を加え、ドラフト内でホットスターラーを用いて、加温しながら攪拌した。白濁してきたら 1 M NaOH 溶液をパスツールピペットで 10 滴下し、透明になるまで完全に溶解させた。その後

氷冷し、500 ml メスシリンダーに移し、超純水で全量が 500 ml になるようにメスアップし、スターラーで攪拌し、プラスチック容器に入れて 4 °C で保存した(これを 8%PFA とした)。

使用時に Stock A、Stock B、8 %PFA をそれぞれ 4:1:5 の割合になるようにメスシリンダーではかり、スターラーで攪拌し、プラスチック容器に移した。

【1×リン酸緩衝生理食塩水(以下 PBS(-))】

1000 ml 三角フラスコの中で塩化ナトリウム 80 g、塩化カリウム 2 g、リン酸水素 2 ナトリウム 12 水和物 29 g、リン酸水素 2 カリウム 2 g はかり、800 ml 程度の超純水を加えスターラーで攪拌し、完全に溶解させた。その後、1000 ml メスシリンダーに移し、超純水で 2~3 回洗いこみ、全量が 1000 ml になるようにメスアップし、パラフィルムでふたをし転倒混和した。その後、1000 ml メディウム瓶に移し、高圧蒸気滅菌をかけ、室温で保存した(これを 10×PBS とした)。

1000 ml メスシリンダーで 10×PBS(-)を 100 ml はかり、超純水で全量が 1000 ml になるようにメスアップし、パラフィルムでふたをし転倒混和した。その後 1000 ml メディウム瓶に移し、高圧蒸気滅菌をかけ、室温で保存した(細胞培養用は、4 °C で保存した)。

【0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液(以下 SPB)】

Stock A、Stock B、超純水をそれぞれ 4:1:5 の割合になるようにメスシリンダーではかり、パラフィルムでふたをし転倒混和した。その後メディウム瓶に移し、高圧蒸気滅菌をかけ、室温で保存した。

【リリー・マイヤーのヘマトキシリン液】

200 ml 三角フラスコにヘマトキシリンを 1.0 g 量り、超純水 40 ml 加えて、ホットスターラーで加熱しながら攪拌して溶かした。溶けたら、超純水を 100 ml 加え、この中にヨウ素酸ナトリウム 0.1 g、アンモニウム・ミョウバン 10 g を入れてスターラーで攪拌して溶かした。溶けたら、グリセリン 60 ml、酢酸 4 ml 加えてスターラーで攪拌し、よく混ぜた。よく混ぜたらドーゼに移し、室温で保存した。使用時に酸化被膜が形成されたときは、ろ紙でろ過してから使用した。

【1 %塩酸アルコール】

ドラフト内で 200 ml メスシリンダーに 70 %エタノールを 100 ml 程度加え、濃塩酸を 2 ml 加え、70 %エタノールで 200 ml にメスアップした。スターラーで攪拌した後、ドーゼに移し、室温で保存した。

【1.0 %エオシン・アルコール溶液】

エオジン Y を 0.5 g 量り、95 %エタノール 40 ml に溶かし、超純水 10 ml を加えた(貯蔵液として保存した)。使用時に貯蔵液と 80 %エタノールを 1:3 の割合で混ぜ、染色液として使用した。

【メチルグリーン溶液】

超純水 200 ml に酢酸ナトリウム 0.34 g、酢酸 450 μ l 加え、スターラーで攪拌して溶かした(溶液 a)。超純水 100 ml にメチルグリーン 0.2 g 加え、スターラーで攪拌して溶かし、この液と溶液 a を混合し、スターラーで攪拌してよく混ぜた。混ざったら、ろ紙でろ過し、ドーズに移し、室温で保存した。余った液はプラスチック容器に移し室温で保存した。

【1次抗体用希釈液(ブロッキング液)】

BSA を 0.5 g 量り、50 ml チューブに入れ、そこに NGS2.5 ml、5 %チメロサル水溶液(チメロサル 5 g 量り、1×PBS で 100 ml にメスアップした)0.5 ml 加え、1×PBS で全量が 50 ml になるようにメスアップした。ふたを閉めて攪拌させて溶解し、4 °C で保存した。

【ブロッキング A 液】

ブロッキング液 1 ml に対して Avidin soln.を 2 滴加えて、転倒混和した。

【ブロッキング B 液】

ブロッキング液 1 ml に対して Biotin soln.を 2 滴加えて、転倒混和した。

【2次抗体・ABC 用希釈液】

BSA を 0.5 g 量り、50 ml チューブに入れ、そこに 5 %チメロサル水溶液 0.5 ml を加え、さらに 1×PBS で全量が 50 ml になるようにメスアップした。ふたを閉めて攪拌して溶解し、4 °C で保存した。

【Avidin-Biotin-HRP complex(ABC)】

2次抗体・ABC 用希釈液 5 ml に VECTASTAIN ABC KIT(SIGMA)の A 液と B 液を 1 滴ずつ加えて転倒混和し、4 °C で保存した。

【ジアミノベンジジン水溶液(DAB)】

使用時に 15 ml チューブに超純水 5 ml 加え、そこに DAB(SIGMA)の金と銀の袋に入った錠剤を 1 粒ずつ加え、蓋を閉めて攪拌し溶解し、使用した。

【MSC 調製用培地】

DMEM 培地を 9.5 g 量り 800 ml 程度の超純水を加え攪拌、溶解させ、超純水で 1000 ml にメスアップし、500 ml メディウムビン 2 本に 500 ml ずつ分注し高压蒸気滅菌にかけた。その後、室温に戻したら、クリーンベンチ内で 500 ml あたりグルタミン 0.3 g(1 バイアル)、0.1 %ストレプトマイシン、0.1 %ペニシリン、0.1 %ファンギソン各 500 μ l、7.5 %炭酸水素ナトリウム適量、血清入り培地の調製の場合 FBS50 ml を加えて 4 °C で保存した。なお、グルタミンは 0.22 μ m フィルターでろ過滅菌して加えた。

【DNase 溶液(1000 U)】

DNase100 mg(2.0×10^5 U)の入った小瓶にクリーンベンチ内で滅菌水 10 ml 加え、振り混ぜて溶解した後、この液 1 ml を 0.22 μ m フィルターでろ過滅菌した後、1×PBS19 ml 加え混ぜた。その後、1 ml ずつ分注して-20 °C で冷凍保存した。

【4 %コラゲナーゼ溶液】

コラゲナーゼ 0.1 g 入った小瓶 2 本に無血清 DMEM 培地を 2.5 ml ずつ加え、蓋を閉めて振り混ぜて溶解した。その後 0.22 μ m フィルターでろ過滅菌し、1 ml ずつ分注して-20 °C で冷凍保存した。

【0.2 %コラゲナーゼ溶液】

MSC 採取時に 4 %コラゲナーゼ溶液 1 ml に DNase 溶液(1000 U)1 ml、無血清 DMEM 培地 18 ml 加えて混ぜた後、37 °C に保温して使用した。

【1.5 %DSS 溶液】

DSS を 3 g 量り、180 ml 程度の水道水を加えて溶解させ、水道水で 200 ml にメスアップして給水ビンに移し、マウスに自由飲水させた。

【1×トリプシン溶液】

使用時にクリーンベンチ内で解凍した 10×トリプシンに 1×PBS を 9 ml 加え穏やかに攪拌し、37 °C に保温した。余ったら、4 °C で保存した。

【BrdU 溶液(10 mg/ml)】

BrdU の粉末を 100 mg 量り、15 ml チューブに加え、1×PBS を 10 ml 加え、ボルテックスで攪拌し、溶かした。溶けたら-80 °C で凍結保存し、使用時に解凍して BrdU がすべて溶けているのを確認してから使用した。

【10mM クエン酸バッファー】

1000ml メスシリンダーに 0.1M クエン酸を 19ml、0.1M クエン酸ナトリウムを 81ml 加え、超純水でメスアップした。メスアップ後、1000ml メディウムビンに移し、121°C

15分高圧蒸気滅菌にかけた。オートクレーブ後、室温で保存した。

IV-ii. 実験計画

MSC 投与実験ではマウスを 9 匹用意し、MSC 投与群 5 匹、MSC 非投与群 4 匹とした。次の表のように計画した(Table 1)。両群ともに 1.5 %DSS 及び水道水を給水ビンによる自由飲水とした。連日、決まった時間に体重を測定し、肛門周囲の汚れと血便の有無の観察を行った。この方法で大腸炎モデルを作製し、MSC 投与群には DSS 投与開始から 72 時間後に MSC を投与した。

Table 1 実験スケジュール

| | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 | 168 | 時間 |
|---------|---|----|---------|----|----|-----|-----|----|
| MSC投与群 | | | 1.5%DSS | | | | 水道水 | |
| MSC非投与群 | | | | | | | | |

72時間後にbMSCを投与

DSS 投与開始(0 時間)から 168 時間後に大腸を摘出し、4%PFA で固定し、脱水、透徹しパラフィン包埋し、4 μ m の厚さで薄切し、切片を作製し、HE 染色した。

HE 染色後、全体像を実体顕微鏡で撮影し、A4 サイズで印刷し、マップメーターで粘膜筋板の長さを測定し、各目的組織の長さを測定し、それぞれの割合を求めた。

IV-iii. bMSC 調製法及び投与方法

i. bMSC の調製法

C57BL/6N^{CSA} を 5 匹使用し、以下の手順に従って細胞を回収しマウスに投与した。

- ① マウスを頸椎脱臼にて安楽死させ、70 %エタノールの入ったビーカーに浸漬した。以下の操作はクリーンベンチ内で行った。
- ② クリーンベンチに入れ、直尖刀で腹部中央の皮膚に切れ込みを入れ、皮膚をつまみ、指で皮膚を掴んで、皮膚を夫々頭部と尾部方向に引き裂いた。
- ③ 小直尖刀の刃先を大腿部付け根の皮膚と筋の間に入れ、鈍性剥離した。
- ④ 小直尖刀で大腿部及び下腿部の皮膚を切開し、筋を露出させた。
- ⑤ 直尖刀を骨と筋の間に入れ、鈍性剥離した。
- ⑥ 骨尖刀で足関節を切断し、膝関節を過伸展させ、脱臼し、脛骨を外した。
- ⑦ 骨周囲の筋を丁寧に除去し、1×PBS の入ったシャーレに入れた。
- ⑧ 骨尖刀を大腿骨付け根に入れ、切断した。
- ⑨ 骨周囲の筋をハサミで大まかに除去し、プロワイプで骨を包み、骨を回して骨周囲の密着している筋組織を拭き落とした後、1×PBS の入ったシャーレに入れた。

- ⑩ 骨尖刀で骨端部を切断し、27Gの針をつけた1mlシリンジにPBS吸い上げこれを髄腔に刺し、骨髄をフラッシングした。
- ⑪ フラッシング後、骨を1×PBSの入った乳鉢に移し、骨尖刀で骨を細かく切り、乳棒でヒビが入る程度に優しく砕いた。
- ⑫ 1×PBSをアスピレーターで除去し、新しい1×PBSを加えて洗浄した。これを2~3回繰り返した。
- ⑬ 1×PBSをアスピレーターで除去し、無血清培地を加え、洗浄した。
- ⑭ 洗浄後、骨片を0.2%コラゲナーゼ溶液20mlの入ったチューブに移し、振盪培養器で37℃、110rpm、30分消化した。
- ⑮ 消化反応後、血清入り培地を20ml加え、酵素反応を停止させた。
- ⑯ 骨片内のMSCを分散させるために良くピペティングした後、70µmセルストレイナーをつけたチューブに回収し、1500rpm、4℃、5分間遠心分離した。
- ⑰ 遠心分離後、上清をアスピレーターで除去し、細胞塊をタッピングしてほぐした。
- ⑱ 血清入り培地を5ml加え、再懸濁した。細胞懸濁液を50 µlとり、エッペンチューブに移し、トリパンブルーを50 µl加えてピペティングし、ヘモサイトメーターに10 µlのせ細胞数を計測した。
- ⑲ 残りの細胞懸濁液は、血清入り培地の入った10cmシャーレに播種し、CO₂インキュベーターに入れた。1時間後、未接着の細胞が存在する培養上清をアスピレーターで除去し、新たに血清入り培地を加え、CO₂インキュベーターに入れ、コンフルエント(約96時間)に達するまで培養した(2日に1度培地交換を行った)。

ii. bMSC投与方法

- ① コンフルエントに達したら、培養上清をアスピレーターで除去し、1×PBSで洗浄した。これを2回繰り返した。
- ② 1×トリプシンを3ml加え、顕微鏡下で細胞辺縁部が収縮し始めたら、1×トリプシンをアスピレーターで少し残るように除去し、残ったトリプシンで消化反応を続けた。
- ③ 全体的に細胞が剥がれかけたらシャーレをタッピングし、細胞を剥がした。
- ④ 剥がれたのを確認後、血清入り培地を5ml加え酵素反応を停止させて、懸濁した。細胞懸濁液を50 µlとり、エッペンチューブに移し、トリパンブルーを50 µl加えてピペティングし、ヘモサイトメーターに10 µlのせ細胞数を計測した。
- ⑤ 細胞懸濁液は15mlチューブに回収し、1200rpm、4℃、10分間遠心分離した。
- ⑥ 遠心分離後、上清をアスピレーターで除去し、細胞塊をタッピングしてほぐした後、1×10⁵ cells/200µlの濃度になるように無血清培地を加え、再懸濁した。

- ⑦ エッペンチューブに細胞懸濁液を 200 μ l ずつ分注した。
- ⑧ マウスをイソフルラン麻酔で麻酔した後、インシュリンシリンジで細胞懸濁液を 200 μ l とり、眼窩静脈叢より投与した。

IV-iv. 大腸摘出・前処理・固定

- ① 摘出 1 時間前にマウス一匹当たり BrdU 溶液(10 mg/ml)を 0.1 ml 腹腔内投与した。
- ② 投与 1 時間後、体重を記録し、マウスを頸椎脱臼にて安楽死させた。
- ③ 腹部皮膚を直剪刀で切開し、腹筋を露出させた。
- ④ 腹筋を白線に沿って小直剪刀で胸骨剣状突起まで切開し、肋骨下縁に沿って腹筋を小直剪刀で切開し、腹腔内臓器を露出させた。
- ⑤ 恥骨周囲の筋群を除去し、恥骨結合部を露出させた。
- ⑥ 恥骨結合を直尖刀で切り、骨盤を開き、肛門周囲の筋をピンセットでつかみ、骨盤と肛門をつなぐ組織を小直尖刀で切り、肛門を切り離した。
- ⑦ 大腸の間膜を切りながら大腸を、腸が切断されないよう注意しながら切り出した。
- ⑧ 盲腸まで確認できたら、回腸と盲腸がつながる部位で、小腸と切り離し、大腸を紙の上に置いてまっすぐにし、ノギスで肛門から盲腸と近位結腸(盲結口)までの長さを測定した。
- ⑨ 肛門周囲の筋組織や結合組織を丁寧に除去し、盲腸を切り離した後、マウスゾンデ(プラスチック製ラット用胃ゾンデ)を近位結腸から挿入し、縫合糸でしばった。
- ⑩ 0.1MSPB の入った 50ml シリンジをプラスチックゾンデにつけ、腸管内の内容物を洗い流した。
- ⑪ 4%PFA 溶液の入ったリザーバーに大腸を浸漬し、4%PFA 溶液の入った 5ml シリンジをプラスチックゾンデにつけ腸管内に流した後、10 分間浸漬した。
- ⑫ 10 分後、0.1MSPB の入った 50ml シリンジをプラスチックゾンデにつけ、腸管内を洗浄した。その後 4%PFA の入ったシリコンパッドに移した。
- ⑬ 縫合糸をマイクロ尖刀で切りプラスチックゾンデを外し、肛門側から腸間膜附着部に沿って腸管を切開した。
- ⑭ 微針を断端に刺して、腸管を開いた状態に固定した。
- ⑮ 4%PFA で 1 日固定した。この時、粘膜をピンセットで傷つけないようにできる限り断端をつまんで操作した。

IV-v. パラフィン切片作製

- ① 4%PFA を捨て、0.1MSPB に 1 日浸漬した。

- ② 0.1MSPB を捨て、エタノール系列で脱水した(4~5 日間)。
- ③ 100%エタノールに変えるとき、腸管の微針を外した。
- ④ カミソリと 3mm 幅のろ紙を用いて肛門側から近位結腸と遠位結腸の境目までを 3mm 幅に切り、連続した結腸片を作製した。
- ⑤ 微針を肛門側の結腸片の両端に刺し、肛門側が上になるように切った順番に結腸片を重ねて刺し、串刺しにした。
- ⑥ 串刺しにしたら、カセットに入れ 100%エタノールで 1 日脱水した。100%エタノールから、キシレン I、II、III を夫々 30 分ずつ通して透徹した。
- ⑦ キシレンをよく切り、65°C で溶かした溶融パラフィン I、II、III にそれぞれ 30 分ずつ浸漬した。
- ⑧ 65°C のホットプレート上でカセットから大腸の串刺しを取り出し、パラフィンを入れたモールドに移し、微針を片方はずしてからモールドをテーブルに移動させ、モールドの底を冷やした。
- ⑨ 底部のみが固まって、結腸片がしっかり底部に固定していることを確認してもう片方の微針を外し、カセットを載せ、パラフィンを流し、氷冷したアルミパッド上で冷やし、パラフィンブロックを作製した。
- ⑩ パラフィンブロックをマイクロトームに設置し、4 μ m の厚さで薄切し、パラフィン切片を作製した。
- ⑪ 薄切した切片は、スライドグラスに掬い取って、50°C 程度のお湯で伸展後乾燥させて使用時まで保管した。

IV-vi. HE 染色

- ① パラフィン切片をキシレン I、II にそれぞれ 5 分程度つけ、脱パラした。
- ② エタノールに 100%、90%、80%、70%の順でそれぞれ 5 分程度つけ、水和した。
- ③ 超純水にて洗浄後、ヘマトキシリン液に 2~5 分程度(染色具合を確かめて時間を決める)浸漬して染色した。
- ④ 切片を、流水で 1~2 分水洗して染色具合を確認した。過染の場合は、1%塩酸アルコールにつけ、適度の染色程度になるまで脱色を行った。(1%塩酸アルコールにつけすぎるとすべて脱色されてしまうので注意すること)
- ⑤ 切片を流水で 10~20 分水洗し、色だしを行った。超純水につけよく洗った後、エオシン液に 1 時間浸漬して染色した。
- ⑥ 切片をエタノールに 70%、80%、90%、95%、100% I、100% II の順につけ、脱水した。(70%でエオシンの染色程度を判断し、適当に染色されているときは、90~100%を通して脱水)
- ⑦ 切片をキシレン I、II にそれぞれ 5 分程度つけ、透徹を行った。
- ⑧ 切片を取り出し、マリノールで封入した。

IV-vii. 免疫組織化学染色

i. テネイシン C(TnC)の免疫染色

HE 染色と同様に、切片を脱パラして超純水で洗浄後

- ① 過酸化水素・アザイド入りメタノール(3ml,3ml,150ml)に 30 分つけ、内因性ペルオキシダーゼを失活させた。
- ② 超純水にて十分洗浄した後、1×PBS で 3 回洗浄した。
- ③ 5%NGS+avidin を切片に載せ、1 時間内在性ビオチンをブロッキングした。
- ④ スライドの裏から切片を 1×PBS で洗い、1×PBS に 3 回通し洗浄した。
- ⑤ 一次抗体(抗ヒトテネイシン C 抗体 ; Pass II)+biotin を切片に載せ、1 晩反応させた。
- ⑥ スライドの裏から切片を 1×PBS で洗い、1×PBS に 3 回通し洗浄した。
- ⑦ ビオチン化 Goat 抗 Rat IgG 抗体(200 倍希釈)を載せ、2 時間反応させた。
- ⑧ スライドの裏から切片を 1×PBS で洗い、1×PBS に 3 回通し洗浄した。
- ⑨ Avidin Biotin HRP Complex(以下 ABC)を載せ、1 時間反応させた。
- ⑩ スライドの裏から切片を 1×PBS で洗い、1×PBS に 3 回通し洗浄した。
- ⑪ DAB 溶液を載せて発色させ、顕微鏡下で染色程度を観察しながら適当な反応が得られたところで、スライドの裏から超純水で洗浄し、DAB 反応を停止させた。
- ⑫ 超純水に 3 回通し洗浄後、メチルグリーン液にて、1 晩染色した
- ⑬ ブタノールにて、適度の染色まで脱色した後、100%エタノール I、II にて脱水した。
- ⑭ キシレン I、II につけ、透徹後、マリノールで封入した。

ii. BrdU の免疫染色

- ① HE 染色と同様に、切片を脱パラ操作後、水和した。
- ② スライドを 10mM クエン酸バッファーに入れ、105°C10min オートクレーブにてリトリブした。
- ③ オートクレーブ終了後、急冷した。
- ④ 超純水で洗浄後、過酸化水素・アザイド入りメタノール(3ml,3ml,150ml)に 30 分つけ内因性ペルオキシダーゼを失活させた。
- ⑤ 1×PBS を 3 回通して緩衝した。
- ⑥ 5%NGS+avidin を切片に載せ、1 時間ブロッキングした。
- ⑦ スライドの裏から切片を 1×PBS で洗い、1×PBS に 3 回洗浄した。
- ⑧ Rat 抗 BrdU 抗体(200 倍希釈)+biotin を切片に載せ、1 晩反応させた。
- ⑨ スライドの裏から切片を 1×PBS で洗い、1×PBS に 3 回洗浄した。
- ⑩ ビオチン化 Goat 抗 Rat IgG 抗体を載せ、2 時間反応させた。

- ⑩ スライドの裏から切片を1×PBSで洗い、1×PBSに3回洗浄した。
- ⑪ Avidin Biotin HRP Complex(ABC)を載せ、1時間反応させた。
- ⑫ スライドの裏から切片を1×PBSで洗い、1×PBSに3回洗浄した。
- ⑬ DAB溶液を載せて発色させ、顕微鏡下で染色程度を観察しながら適当な反応が得られたところでスライドの裏から超純水で洗浄し、DAB反応を停止させた。
- ⑭ 超純水に3回通し洗浄後、メチルグリーン液にて、1晩染色した。
- ⑮ ブタノールについで適度の染色まで脱色した後、100%エタノールⅠ、Ⅱにて脱水した。
- ⑯ キシレンⅠ、Ⅱについで、透徹後、マリノールで封入した。

IV-viii. 顕微鏡での撮影・病理解析

切片を実体顕微鏡で観察し、全体像を撮影した。撮影した画像を同一な拡大率でA4サイズで印刷した。粘膜筋板長をマップメーターを用いて測定し組織片長の基準とした。また各部位の長さは以下の基準で測定した。

i. 腸腺残存率の算出方法

粘膜筋版の長さを全長とした。この長さを基準に腸腺残存率を以下の計算式で算出した。なお、腸腺脱落率は、全長を100%とした時、100%から腸腺残存率を引くことで算出した。

$$\text{腸腺脱落率} = \frac{\text{粘膜筋版の全長(mm)} - \text{腸腺残存部位の全長(mm)}}{\text{粘膜筋版の全長(mm)}} \times 100(\%)$$

ii. BrdU 陽性率の算出

腸腺残存部位の全長を基準に BrdU 陽性率を以下の計算式で算出した。なお、陰性率は、腸腺残存部位の全長を100%とした時、100%から BrdU 陽性率を引くことで算出した。

腸腺残存部位の BrdU 陽性率 =

$$\frac{\text{腸腺残像部位の全長(mm)} - \text{BrdU 陽性部位の全長(mm)}}{\text{腸腺残存部位の全長(mm)}} \times 100(\%)$$

iii. TnC 陽性率の算出

腸腺残存部位を基準に TnC 陽性部位を以下の計算式で算出した。なお、TnC 陽性部位は粘膜上皮直下のみに発現している部位、固有層全体に発現している部位で分けて算出した。陰性率は腸腺残存部位の全長を100%とした時、100%から TnC 陽性率を引くことで算出した。

$$\text{腸腺残存部位の TnC 陽性率} = \frac{\text{TnC 陽性部位の全長(mm)}}{\text{腸腺残存部位の全長(mm)}} \times 100(\%)$$

脱落部位の TnC 陽性率は、腸腺脱落部位の全長を基準に TnC 陽性率を以下の計算式で算出した。なお、TnC 陽性部位は粘膜表層のみに発現している部位、固有層全体に発現している部位で分けて算出した。なお、脱落部位には、陰性部位は見られなかったため、測定できなかった。

$$\text{脱落部位の TnC 陽性率} = \frac{\text{TnC 陽性部位の全長(mm)}}{\text{腸腺脱落部位の全長(mm)}} \times 100\%$$

V. 結果

V-i.顕微鏡における観察結果

① HE 切片を用いた腸腺脱落部の測定

HE 像で腸腺残存部位(Fig.2)と、腸腺脱落部位に分けた。

腸腺があるものには、DSS によるダメージがないものと、ダメージがあるものがあるが、今回はこれらを分けずに腸腺残存部位とした。

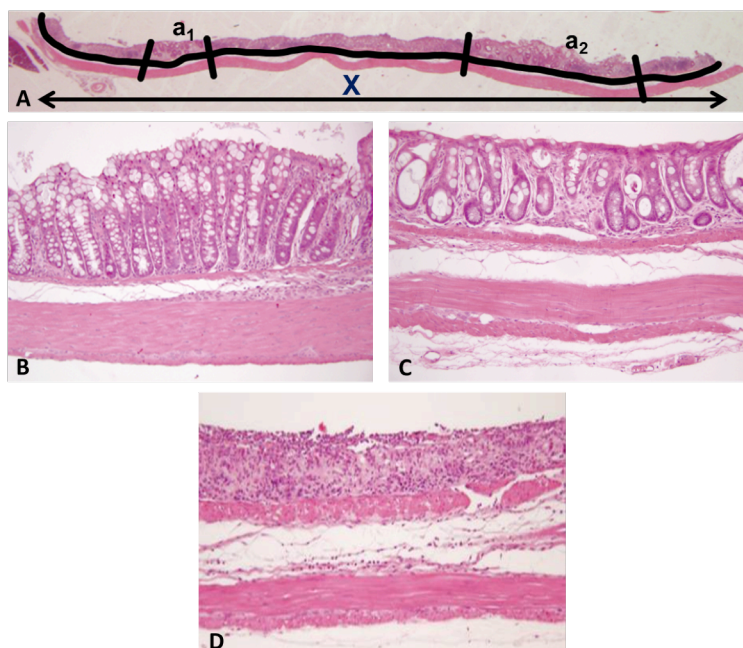


Fig.2 腸腺の指標

A : 大腸短冊全体像

B : 腸腺残存部位 (DSS ダメージなし)

C : 腸腺残存部位 (DSS ダメージあり)

D : 腸腺脱落部位

粘膜筋板の全長を X、腸腺残存部の長さを a1, a2 とし、

腸腺残存率は腸腺残存部の全長/粘膜筋板の全長 $(a1+a2) / X$ で求めた。

腸腺脱落部位の全長は $X \cdot (a1+a2) = Y$ とした。

② BrdU 染色切片による増殖部の測定

BrdU 像では画像(Fig.3)のような部位を BrdU 陽性部位とした。

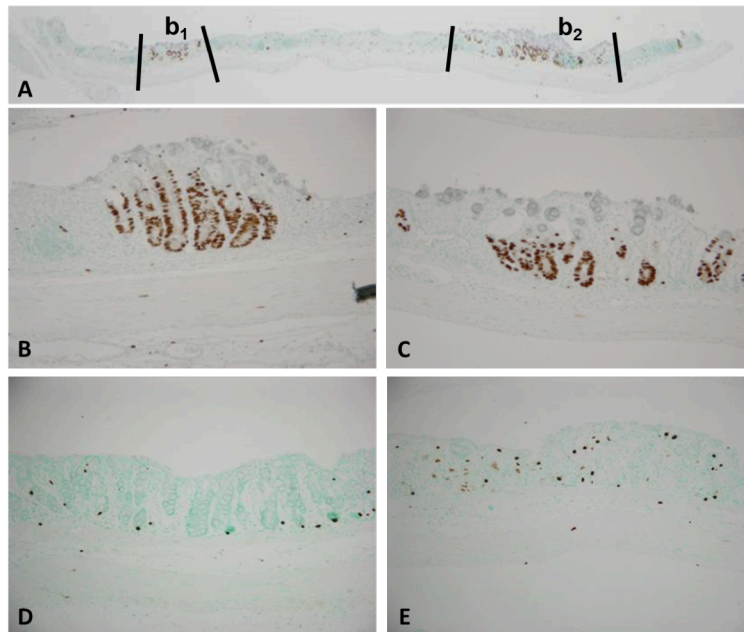


Fig.3 BrdU 陽性部位の指標

A : 大腸短冊全体像

B : 陽性部位 (DSS ダメージなし)

C : 陽性部位 (DSS ダメージあり)

D : 陰性部位 (腸腺残存部位)

E : 陰性部位 (腸腺脱落部位)

BrdU 陽性部位の長さを b_1 , b_2 とした。

BrdU 陽性部位率は BrdU 陽性部位の全長/腸腺残存部の全長を $(b_1+b_2) / (a_1+a_2)$ とした。

③ TnC 染色切片によるテネイシン発現部位測定

TnC 像(Fig.4)では TnC 陽性部位を 4 つに分け、腸腺残存部位において、粘膜上皮直下のみに発現しているもの、腸腺残存部位において、固有層全体に発現しているもの、腸腺脱落部位において、粘膜表層のみに発現しているもの、腸腺脱落部位において、固有層全体に発現しているものとした。

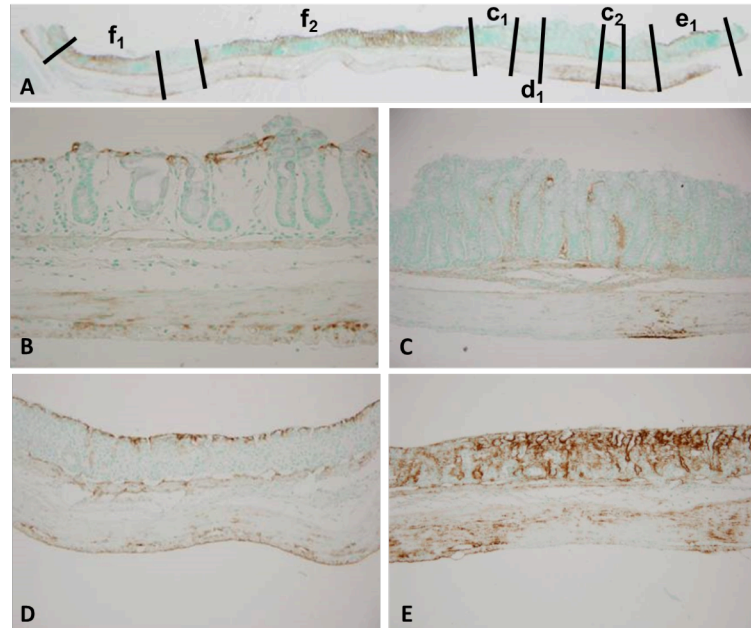


Fig.4 陽性部位の指標

- A : 大腸短冊全体像
- B : 粘膜上皮直下 (腸腺あり)
- C : 固有層全体 (腸腺あり)
- D : 粘膜上皮直下 (腸腺なし)
- E : 固有層全体 (腸腺なし)

腸腺残存部位(a1+a2)における粘膜上皮直下の TnC 陽性部位の長さを c1, c2、固有層全体の TnC 陽性部位の長さを d1 とした。

粘膜上皮直下の TnC 陽性部位率 = $(c1+c2) / (a1+a2)$

固有層全体の TnC 陽性部位率 = $d1 / (a1+a2)$

腸腺脱落部位(Y)における粘膜表層の TnC 陽性部位の長さを e1、固有層全体の TnC 陽性部位の長さを f1, f2 とした。

粘膜表層の TnC 陽性部位率 = $e1 / Y$

固有層全体の TnC 陽性部位率 = $(f1+f2) / Y$

V - ii . 形態測定学的解析による解析結果

以下に各部位の組織変化の割合の測定結果を示す。

Fig.5 は青色の部分が腸腺がある部位の割合を、灰色の部分が腸腺がない部位の

割合を示した。近位側における腸腺残存率は、非投与群においては 33.5%、投与群においては 43%であり、10%程度の増加が見られた。

一方、遠位側では、非投与群においては 17.5%、投与群においては 12.5%であり、5%程度の減少がみられた。

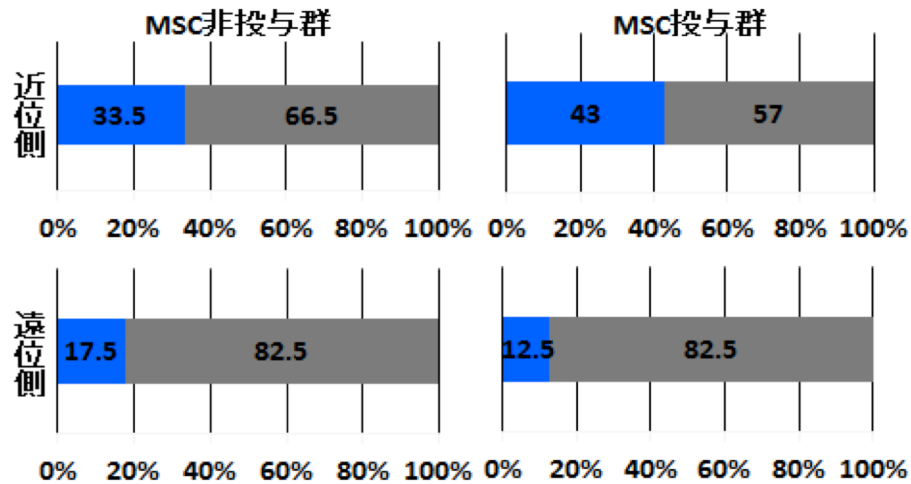


Fig.5 腸腺残存率の比較

■ 腸腺残存部 ■ 腸腺消失部

Fig.6 は、腸腺残存部位における BrdU 陽性部位率のグラフである。円グラフの水色の部分が細胞が増えていた部分を、青灰色の部分は細胞が増えていなかった部分の割合を示した。

BrdU の陽性細胞率は、非投与群の近位側及び遠位側どちらも 30%程度であったが、投与群ではどちらも 51%であり、20%程度の増加がみられた。

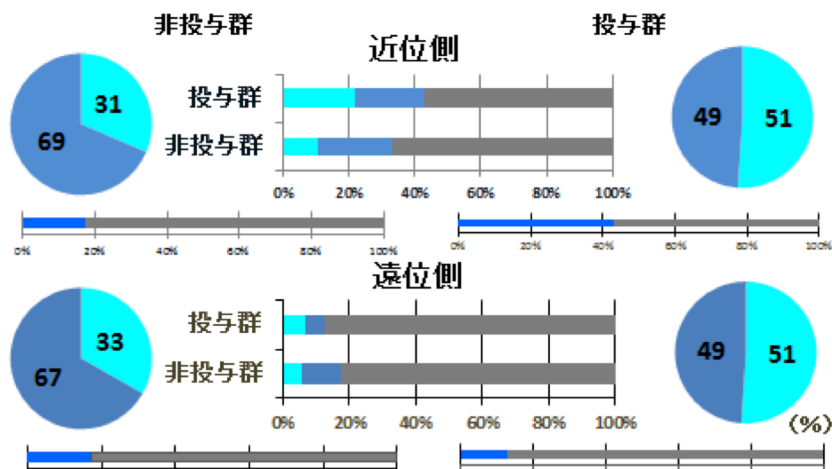


Fig.6 BrdU 陽性腸腺の割合

■ BrdU 陽性部位 ■ BrdU 陰性部位

Fig.7 は、粘膜筋板に対する TnC の分布を表したグラフである。

投与群では、近位側の腸腺残存部において、粘膜上皮直下と固有層全体の TnC 陽性部位の割合が増加していたが、遠位側では減少していた。また、腸腺脱落部位において、TnC 陽性部位は、近位側と遠位側では全く反対の割合であり、陰性部位はみられなかった。

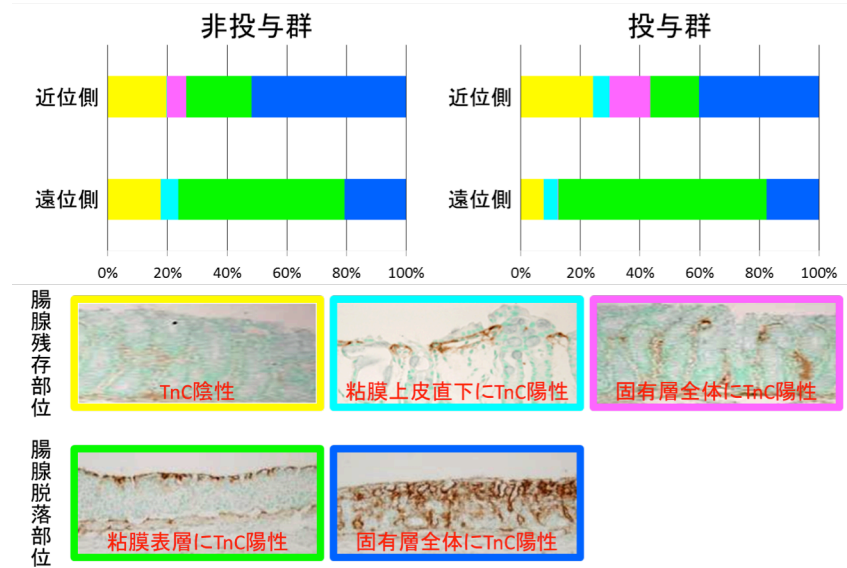


Fig.7 腸腺の残存と TnC の分布

VI. 考察

MSC 投与群において、今回の実験では、腸腺の残存率は近位側では高く、遠位側では低くなっていた。DSS は水に溶解してマウスに投与するのだが、DSS の分子量が水と比べて極めて大きく、大腸では水分のみが吸収され、DSS は吸収されない。このことより、肛門に向かうほど、水中に含まれる DSS の濃度が高くなり、遠位側のダメージが増した為、このような結果になったと考えられる。

BrdU 陽性部位は近位側、遠位側共に投与群の方が多くなっていた。これは、MSC が細胞増殖になんらかの刺激を与えた可能性があると考えられる。

投与群の腸腺残存部位における TnC 陽性部位の広がり認められた。これは、MSC が組織修復になんらかの刺激を与えた可能性があると考えられる。また、投与群、非投与群共に腸腺脱落部位において、近位側と遠位側では、粘膜表層のみと固有層全体に及ぶ TnC 陽性部位の割合が全く反対の割合であり、陰性部位はみられなかった。陰性部位が見られなかったのは、腸腺が脱落すると、直ぐに TnC による組織修復が行われる為と考えられる。TnC は組織の修復に関与しており、固有層全体に及ぶ TnC 発現が確認される部位の方が修復力が強いと考えられ、固有層全体に及ぶ TnC 発現が近位側に多く確認できたことから、組織の修復は近位側より行なわれるものと考えられる。

VII. 結論

大腸の粘膜筋板の長さを基準とし、腸腺残存部位の割合、BrdU 及び TnC の陽性部位の割合を数値化し MSC による大腸炎抑制効果を形態計測学的に解析することは可能であるとされる。

近い将来、MSC による治療法が普及することは間違いないだろう。しかし、MSC にはまだ解明されていないことも多く、この治療法が普及されるまでには多くの時間がかかるだろう。

VIII. 謝辞

本研究にあたり、1年間ご指導いただきました日下部 守昭 先生、橋本 尚詞 先生、河邊 友範 先生に御礼申し上げます。

IX. 参考文献

1. 田中良哉, 園本格士朗, 近藤真弘, 尾下浩一, 張 香梅, 福與俊介, 山岡邦宏: 間葉系幹細胞を用いた炎症性関節炎の治療と再生、Jpn. J. Clin. Immunol., 38(2) 86~92, 2015
2. 小島弘子, 植村寿公: 間葉系幹細胞を用いた硬組織再生技術と新しい培養法の応用、再生歯誌 2 (1) : 9-19, 2004

X. 要約

【背景】潰瘍性大腸炎は、大腸の粘膜にびらんや潰瘍が生じる炎症性疾患である。時に下血を伴う下痢と腹痛を生じ、重症になると発熱、体重減少、貧血などの全身症状を呈する。原因不明で有効な根治治療法は確立していないが、近年、再生医療技術を応用した治療法が注目され、特に、多分化能、免疫抑制作用、及び抗炎症作用を有する間葉系幹細胞 (MSC) による治療法が提唱されている。また、実験的にはマウスにデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を投与することによって誘導される大腸炎がモデルとして使用され、原因解明や治療法の検討が行われている。

【目的】マウスに DSS を投与することで生じる大腸炎は遠位結腸に均等に生じるのではなく、炎症部位に局在性が見られることから、より正確に大腸炎の炎症程度、及び間葉系幹細胞による組織修復の程度を評価するため、本研究では DSS 誘導大腸炎の形態計測学的解析を行うとともに、脛骨、及び大腿骨の骨髓から分離調製した MSC の投与による DSS 誘導大腸炎に対する炎症抑制効果を形態計測学的に解析する技法の確立を目的とした。

【方法】マウスに DSS 水溶液を 5 日間自由飲水させ、その後 2 日間、水道水を自由飲水させた。MSC はマウス的大腿骨、及び脛骨を摘出して調製し、10%FBS を含む DMEM 培地にて十分増殖させてから用いた。調製した MSC を DSS 投与 3 日目に静脈内投与した。7 日目に大腸を採取する際に、屠殺 1 時間前に BrdU (増殖細胞標識) を腹腔内投与した。採取した大腸は全長を測定後に腸間膜付着部で切開して展開して固定し、脱水後に 3 mm 幅で横断して包埋し、切片を作製後、HE 染色、BrdU、及びテネイシン C (TnC : 炎症組織部位の確認) の免疫染色を行った。HE 染色で大腸組織を、また BrdU、TnC の陽性部位を確認後、炎症部位の検討、及び増殖細胞の分布を計測した。計測においては、HE、BrdU、TnC 染色の拡大写真を撮影して印刷し、粘膜筋板の長さを基準として線を引き、各組織部位の長さをデジタルメーターで測定した。測定では HE 像で腸腺の有無に分け、BrdU 像で腸腺に陽性細胞がある部位を、TnC 像で腸腺ありの粘膜上皮直下と固有層全体、腸腺なしの粘膜表層と固有層全体に分けた。計測結果は遠位結腸の近位側、及び遠位側でそれぞれ平均の長さの割合を数値化した。

【結果】MSC 非投与群の遠位結腸近位側における腸腺残存率は 33%であり、遠位側では 17.5%であり、近位側の方が残存率が高かった。一方、投与群では非投与群に比べ近位側では 10%程度残存率が高くなっていたものの、遠位側では 5%程度減少していた。BrdU 陽性部位は、非投与群の近位側、及び遠位側共に 30%であったが、投与群では、近位側、及び遠位側共に 20%程度増加していた。TnC 陽性部位は、非投与群の近位側、遠位側共に 25%であったが、遠位側では粘膜上皮直下に限定され、近位側では、固有層全体に広がっており、分布域の違いが見られた。一方、投与群では近位側、遠位側共に TnC 陽性部位が、それぞれ 20%、15%と増加していた。また、遠位側では、固有層全体に広がった部位も 2%程度みられ、近位側では、粘膜上皮直下での発現が観察されるようになった。更に、腸腺脱落部位の TnC 陽性部位 (粘膜表層と固有層全体) は、近位側と遠位側では全く反対の割合であった。また投与群では、遠位側においてのみ 7%程度の粘膜表層陽性部位の増加を認めた。

【考察】大腸の障害の程度を腸腺や上皮の有無、BrdU 陽性細胞の分布、TnC 発現の状況をパラメーターとして数値化して比較検討する事によって、遠位結腸における障害の状況を評価することができた。この方法によって MSC による大腸炎抑制効果を解析・評価することが可能となった。