

二光子レーザー顕微鏡を用いた GFP マウスにおける DSS

誘発性大腸粘膜障害のリアルタイムイメージング

Intravital imaging of DSS-induced cecal mucosal damage in GFP-transgenic mice using two-photon microscopy

田中光司¹⁾、問山裕二¹⁾、溝口 明²⁾、楠 正人¹⁾

Koji Tanaka, Yuji Toiyama, Akira Mizoguchi, Masato Kusunoki

Key words: two-photon laser scanning microscopy, green fluorescent protein (GFP), dextran sodium sulfate (DSS), bacterial translocation

1. はじめに

二光子レーザー顕微鏡（以下 TPLSM; two-photon laser scanning microscopy）は、エネルギーが低い長波長レーザーを光源として用いるため、組織侵襲性が低く、組織透過性が高い。すなわち、生きたままの組織や細胞の観察が可能（低光毒性）で、組織表面から数百マイクロメートルといった深部の観察が可能（高透過性）である。

これまでは、脳神経領域において神経活動依存性のシナプスの形態変化の研究に用いられ画期的な進歩をもたらしてきた(1, 2)。一方、我々の専門領域である腹腔内臓器の二光子レーザー顕微鏡を用いた観察の報告はほとんどない(3, 4)。その理由の一つとして、マウスの呼吸運動、心臓の拍動による画像への影響が挙げられる。そこで我々は神経再生医学教室との

共同開発により、呼吸、心拍による動きを最小限にする腹腔内臓器固定法を確立し(patent number: 2007-129723)、TPLSMによる腹腔内臓器、とくに消化管の高倍率、高分解能な生体内リアルタイム画像を得ることに成功した(5)。

さらに、TPLSMは数百マイクロメートルまでの深部観察可能であることから、マウス大腸壁を漿膜から管腔側の粘膜まで観察する方法（漿膜アプローチ法）を確立した。これにより、大腸を切開することなく粘膜から漿膜までの各層の細胞レベルの観察が可能となった(3次元断層イメージング)。

漿膜アプローチ法に加え、開腹、大腸の創外脱転、固定、閉腹の各ステップの工夫による手術侵襲の最小限化と、癒着防止フィルムを用いることで同一マウスにおける大腸を経時的に

1) 三重大学医学部 消化管・小児外科学
2) 三重大学医学部 神経再生医学

TPLSM で観察できるようになった。つまり、同一マウスの大腸を生理学的、機能的に‘生きた細胞’の状態の数日後、数ヵ月後も繰り返し観察でき、病理組織標本画像に勝るとも劣らない形態学的評価を可能にした。

本研究では、TPLSM を用いた腹腔内臓器の生体内リアルタイム画像の実際を紹介し、GFP-アクチン-トランスジェニックマウスを用いた、デキストラン硫酸ナトリウム(DSS; Dextran Sulfate Sodium)誘発大腸炎における大腸菌の bacterial translocation の生体内リアルタイム画像を報告する。

2. 方法

2-1. 実験動物

C57BL/6 GFP-アクチン-トランスジェニックマウス (以下、GFP マウス) を用いた (Okabe, M., et al., FEBS Lett (1997) 407:315-319)。

2-2. 腹腔内臓器固定法

GFP マウスを開腹し、標的臓器を創外に脱転させ、平座金(平ワッシャー)に固定する(patent number: 2007-129723)。必要に応じて接着剤を用いる。

2-3. TPLSM セットアップ

TPLSM は Spectra Physics 製の Mai Tai Ti: サファイアレーザーと Olympus 社製の BX61WI と FV1000-2P を用いてセットアップした。

2-4. DSS 誘発大腸炎

2% (w/v) の DSS (MP Biomedicals, Solon, OH; MW 36,000–50,000) を GFP マウスに 7 日間自由飲水させることで作成した。

2-5. RFP 標識大腸菌

E.coli DH5 α Competent Cells と pDsRed2 (Clontech, Mountain View, CA)を用いて作成した。

3. 結果

図1

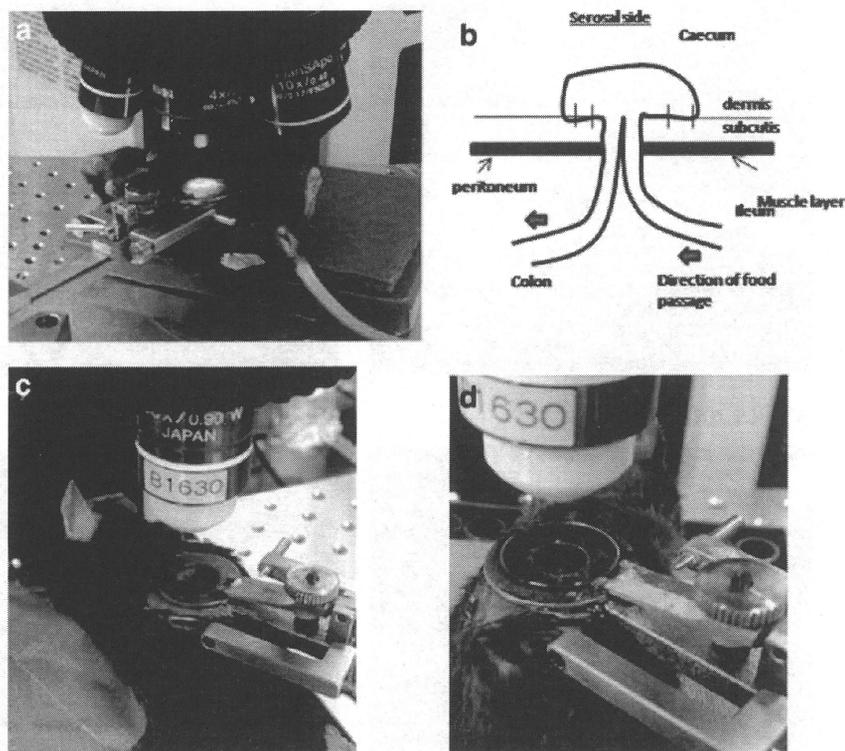


図2

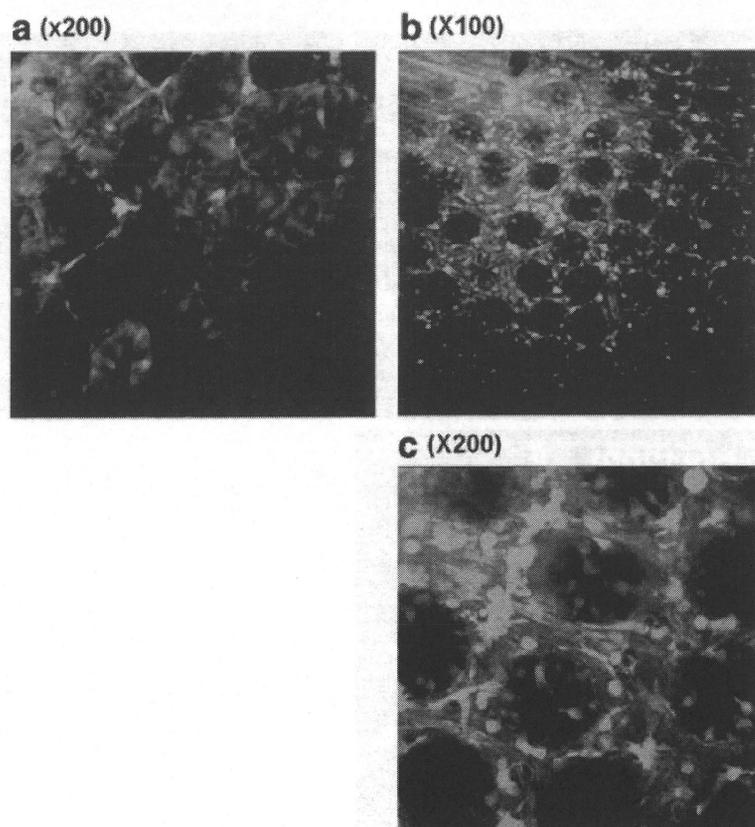
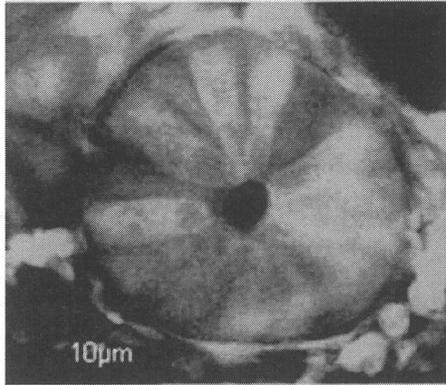
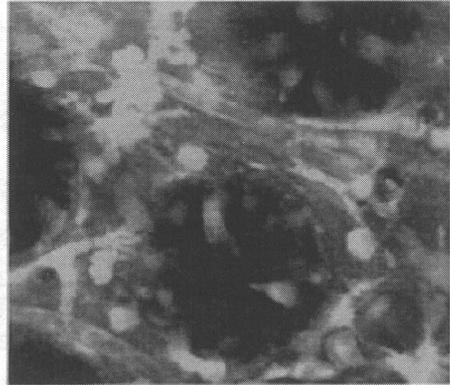


图3

a (x1200)



c (X600)



b (X1200)



d (X1200)

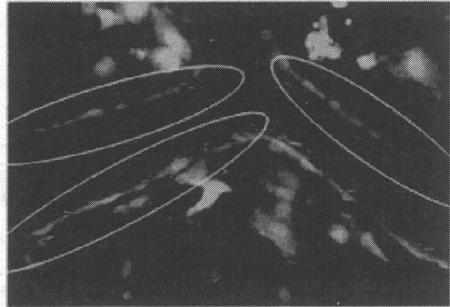
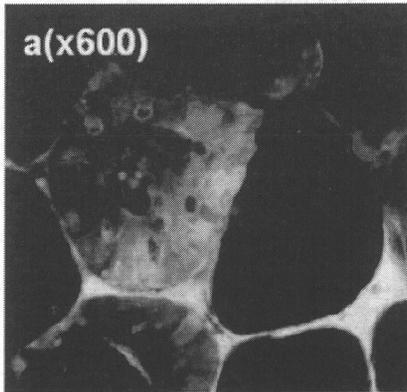
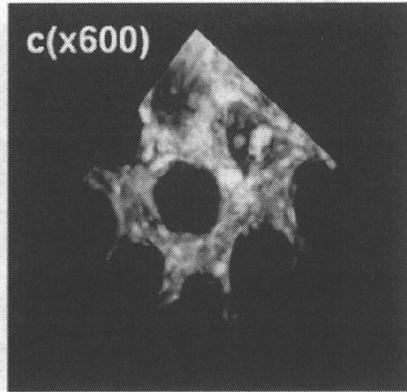


图4

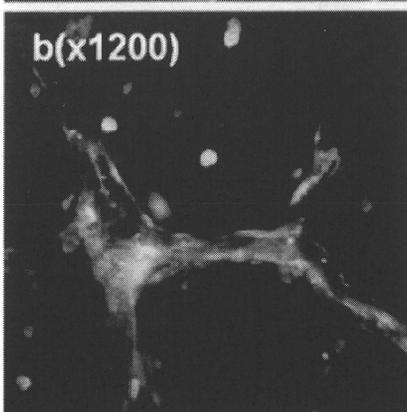
a(x600)



c(x600)



b(x1200)



3-1. 図 1-a: 腹腔内臓器固定法、b: 漿膜アプローチ法による盲腸壁の観察、c: 肝臓の観察、d: 脾臓の観察

腹腔外に脱転し、平座金による固定により 600 倍の生体内リアルタイム画像が得られる。

3-2. 図 2-a: 正常大腸粘膜断層像 (X200)、b: 3 日目の DSS 誘発大腸炎 (X100)、c: 7 日目の DSS 誘発大腸炎 (X200)

大腸粘膜固有層に白血球浸潤、陰窩の破壊、白血球の rolling、血管壁への接着、陰窩上皮細胞間隔、血管内皮細胞間隔の開大を認めた。

3-3. 図 3-a: 正常大腸陰窩 (X1200)、b: 正常粘膜血管壁 (X1200)、c: DSS 誘発大腸炎の陰窩 (X600)、d: DSS 誘発大腸炎下の血管壁 (X1200)

図 2 の強拡大像

3-4. RFP-*E. coli* を用いた bacterial translocation model : 図 4-a: 正常大腸陰窩 (X600)、b: DSS 誘発大腸炎 (X600)、c: DSS 誘発大腸炎 (X1200)

正常粘膜では、RFP 標識 *E. coli* は陰窩上皮細胞内に存在していたが、DSS 誘発大腸炎では粘膜固有層の血管壁に接着していた。また、RFP 標識 *E. coli* が管腔から炎症により開大した陰窩上皮細胞間隙より血管内へ侵入する像を動画で捕えた。

4. 考察

我々が開発した腹腔内臓器固定 (patent number: 2007-129723) 併用、TPLSM による腹腔内臓器観察法により、高倍率、高分解能な生体内リアルタイム画像を得ることができる。今回、難病の一つである潰瘍性大腸炎の動物モデルである DSS 誘発大腸炎において bacterial translocation のメカニズムの解明に TPLSM を用いた生体内リアルタイム画像が有用であった。すなわち、DSS 誘発大腸炎では炎症により陰窩上皮細胞間隙が開大し大腸管腔内に存在する *E. coli* はその間隙から直接血管内に侵入することを生体内リアルタイム画像として捕えることができた (5)。

今後、潰瘍性大腸炎の治療薬による効果を同一マウスにて、長期間繰り返し観察することにより、生理学的、機能的に‘生きた細胞’の治療反応を形態学的に評価できるが可能性がある。

このシステムを用いることにより、腹腔内臓器疾患の病態の変化や治療過程が‘生体内’で‘リアルタイム’に細胞レベルでの観察が可能となり、疾患の病態解明だけでなく、新規治療薬の生体内リアルタイム評価法に応用できると思われる。

5. 参考文献

1. Pan F, Gan WB. Two-photon imaging of dendritic spine development in the mouse cortex. *Dev Neurobiol.* 68: 771-8 (2008)
2. Bollmann JH, Engert F. Subcellular topography of visually driven dendritic activity in the vertebrate visual system. *Neuron.* 61: 895-905 (2009)
3. Starodub OT, Demitrack ES, Baumgartner HK, Montrose MH. Disruption of the Cox-1 gene slows repair of microscopic lesions in the mouse gastric epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol.* 294: C223-32 (2008)
4. Xue L, Aihara E, Podolsky DK, Wang TC, Montrose MH. In vivo action of trefoil factor 2 (TFF2) to speed gastric repair is independent of cyclooxygenase. *Gut.* 2010 Jun 29. [Epub ahead of print]
5. Toiyama Y, Mizoguchi A, Okugawa Y, Koike Y, Morimoto Y, Araki T, Uchida K, Tanaka K, Nakashima H, Hibi M, Kimura K, Inoue Y, Miki C, Kusunoki M. Intravital imaging of DSS-induced cecal mucosal damage in GFP-transgenic mice using two-photon microscopy. *J Gastroenterol.* 45: 544-53 (2010)