

Rat hepatocyte perfusion 【ラット肝臓 collagenase 灌流法】

<material>肝摘出時

- ・ イソフルラン(麻醉用)
- ・ 酒性綿
- ・ 塩酸メデトミジン + ミダゾラム + 酒石酸ブトルファノール 混合溶液
- ・ 27G 針付き 2ml シリンジ

- ・ 滅菌灌流管
- ・ 灌流管固定台
- ・ 恒温槽 (39°C設定)
- ・ 手術台を載せるトレイ(キムタオルとペットシートを敷き、箕の子を載せる)
 - キムタオル
 - ペットシート
 - 箕の子 (手術台)
- ・ 滅菌手術器具 (70%Ethanol をトレイに注ぎ器具を浸す)

ハサミ	1 丁 (片鋭片鈍タイプ)
小ハサミ	1 丁
ペアン	2 本
小セッシ (ピンセット)	1 本
小鉤ピン (ピンセット)	1 本
大鉤ピン (ピンセット)	1 本
クレンメ (ブルドッグタイプ 30mm 程の大きさの物)	1 本
器具トレイ	1 個
- ・ 絹糸 2 号 (結紫用) 2 本
- ・ 滅菌シリコンチューブ 2 本
 - air チューブ; O₂ ボンベに接続
 - 灌流チューブ; air トラップ付き先端に翼状針を接続
- ・ Peristaltic pump
- ・ 滅菌18G 翼状針 (門脈の太さに合わせて 19G や 21G を使用) 1 個
- ・ O₂ ボンベ (O₂95% CO₂5%)
- ・ 滅菌テープ 6 枚
 - 2 枚はチューブのトラップ部を恒温槽手前に固定するため
 - 4 枚はラットの四肢を手術台に固定するため
- ・ 滅菌ガラスシャーレ(摘出したラット肝臓を載せる) 1 組

<material>クリーンベンチ内操作時

- ・ 氷 (発泡スチロールの箱に入れ、培養液を冷やすために使用)
- ・ 滅菌100ml ビーカー 2 個
- ・ 滅菌250um ナイロンメッシュ 2 枚

- ・滅菌 70um セルストレーナー（フィルター） 1 個
- ・ 50ml Test tube ディスポーザブル（遠心可能なタイプ） 40 本程使用
- ・滅菌 25ml ピペット
- ・ オートピペッター
アスピレーター（チューブ先に滅菌パスツールを付けて使用）
- ・ 廃液瓶（アスピレーターで吸った廃液を貯める）
- ・ ガスバーナー（各瓶の口やピペットの先を火炎滅菌する）
- ・ Bio-hazard ゴミ袋

<material>生細胞カウント時

- ・ ピペット（0.1%trypanblue を 1.5ml 分注時に使用）
- ・ 小試験管（0.1%trypanblue を 1.5ml 入れ、用意）
- ・ パスツールピペット（計算板に流し込む時に使用）
- ・ 血球計算板（改良ノイバウエル血球計算板 使用）
- ・ カバーグラス
- ・ ガーゼ（計算板は傷つきやすいのでガーゼを使って拭く）
- ・ 細胞カウント用 0.1%Trypanblue 1.5ml

<material>試薬

塩酸メデトミジン 0.15 mg/kg + ミダゾラム 2 mg/kg + 酒石酸ブトルファノール 2.5 mg/kg 混合溶液

原液濃度 塩酸メデトミジン 1mg/ml
ミダゾラム 5mg/ml (2mlAp)
酒石酸ブトルファノール 5mg/ml

	メデトミジン	ミダゾラム	ブトルファノール	注射用水
必要原液量	0.75 ml	2 ml	2.5ml	44.75 ml

ラット体重 10g 当たり 0.1ml を腹腔内注射する。

□ 0.5mM EGTA 150ml (200ml 滅菌瓶に用意)

0.5mM EGTA 1000 ml 作成概要

【Ca, Mg -free Hanks' Balanced Salt Solution Supplemented with 05mM EGTA】

- ・ EGTA 190 mg (total 1000 ml に対し)
(Ethylene Glycol-bis(β-amino ethyl ether)-N,N,N',N'-Tetra Acetic acid)
(C₁₄H₂₄N₂O₁₆)
- ・ Antibiotics 4ml (total 1000ml に対し)
(Penicilin-Streptomycin solution stabilised)
- ・ ×10 Ca, Mg-free Hanks' Balanced Salt Solution 100 ml (total 1000ml に対し)
- ・ Insulin solution 1 ml (total 1000 ml に対し)
- ・ 1M NaHCO₃ 7 ml (total 1000 ml に対し)
- ・ DW 888 ml

Total 1000ml にし、スターラーバーで攪拌しながら 4°Cにて overnight させる
* 1N NaOH (pH 調製剤 adjust pH7.6)

0.22um Millipore filter にて Filtration

保存する場合 4°C保存

□ 本灌流用 Hanks' collagenase 用 solution 200 ml (200 ml 滅菌瓶用意)

本灌流用 Hanks' balanced salt solution (HBSS) 500 ml 作製概要

- ・ Ca, Mg-free Hanks' Balanced Salt Solution 500ml
- ・ Antibiotics 2ml
(Penicillin-Streptomycin solution stabilized)
- ・ Insulin solution 0.5ml
- * 0.5N NaOH 0.35~0.4ml

クリーンベンチ内で Hanks' 500ml bottle に他の solutions を直接加えていく

保存する場合 4°C保存

* (HBSS 自体は弱アルカリ性だが、1% HCl で溶解した insulin solution を使用している事、灌流時に O₂ にてバブリングする事による acidic をさけるために、事前に NaOH にて pH を弱アルカリに調製している。肝細胞は酸性状態(pH7.2 以下)には弱い、アルカリ状態には比較的強い細胞であるからだ。)

□ **collagenase 細胞分散用 (-20°C保存)**

基本使用 units 130units/ml (使用 HBSS 溶液 1 ml に対し)

【コラゲナーゼ wako の場合】 130mg 使用
collagenase activity 200units / mg

【コラゲナーゼヤクルトの場合】 50mg 使用
source: Streptomyces sp. C-51
collagenase activity 500units / mg

上記以外の他社であっても、collagenase の units の条件から使用単位を算出

□ 細胞採取用灌流液

灌流液のベースは Hanks' balanced salt solution であるが、目的別に各種 Antibiotics などを加え作製。

<methods>

- 1 前灌流液 EGTA 150ml、本灌流液 Hanks'coll 200ml を恒温槽 39°Cで温める。
- 2 シリコンチューブ 2 本をつなぎ灌流管を恒温槽の中に入れ、水平になるようにしっかり固定。
- 3 前灌流液 EGTA を灌流管に流し入れ、シリコンチューブに接続した翼状針をリキャップせずに灌流管注ぎ口に入れる。再び注ぎ口にアルミホイルを覆いかぶせる。
- 4 O₂ で静かにバブリング、PeristalticPump のスイッチを ON ; REV。
- 5 流速 20~21 ; 30ml/min 恒温槽 39°Cで循環。
- 6 EGTA にフェノールレッドが入っているため、O₂ バブリングによりサーモンレッドに変色したら、O₂バブリングを止める。
- 7 Tube 内に発生した air による塞栓をふせぐために air 抜きを行い、air トラップを滅菌テープで恒温槽手前に固定。
- 8 ラットを透明ケース（濾紙にイソフルランを注いだケース）に入れイソフルラン麻酔。
- 9 首がぐったりしたら、ラットの体重測定。
- 10 塩酸メドミジン 0.15 mg/kg + ミダゾラム 2 mg/kg + 酒石酸ブトルファンール 2.5 mg/kg 混合溶液（ラット体重 10g 当たり 0.1ml）を 2ml シリンジに用意。
- 11 70% ethanol でラット腹部を消毒、仰向けに寝かせ腹腔内に注射。皮と一緒に皮下の肉もつかみ上げ、まっすぐ縦に針を刺す。

施行後、腹部を軽くもみ、ラットをケージに戻す。麻酔が効くまで 5 分ほど待つ。

1. 心拍と筋肉の弛緩の具合から、十分に麻酔が効いていることを確認。

ラットを手術台に固定。四肢は滅菌テープで固定し、しっぽは箕の子の隙間におく。

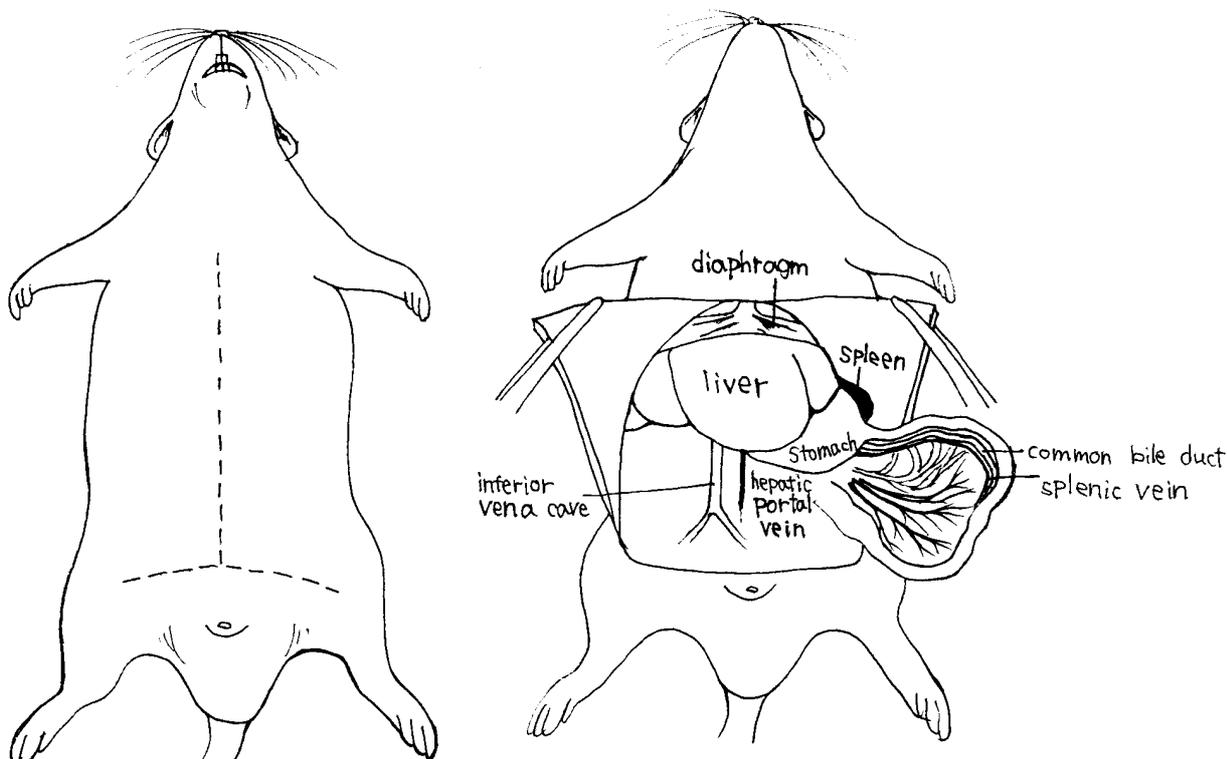
2. 70% ethanol で腹部全体を浸すように消毒。

3. 腹部正中切開にて開腹。

- はさみで皮に切れ込みを入れる。切れ込みからハサミで皮を縦方向に切る。
- 筋肉が露出したら、正中の白筋にそって開腹。ペアンで肉を掴み、左右に開

腹。

- 腸や胃を横側にどけて、PV や IVC が見えるようにする。



肝右下から走る総胆管と脾静脈を小セッシで一部切離し、絹糸を下からくぐらせて結紫。

9. 一度 peristaltic pump を OFF。翼状針を灌流管注ぎ口から出し、針先に液滴がのっているのを確認。PV（門脈）が見え始めた部分から穿刺。

図 A

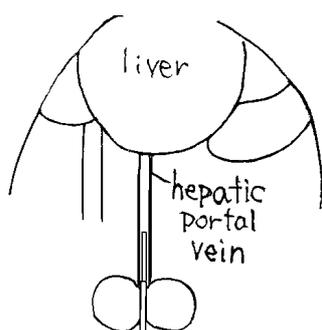
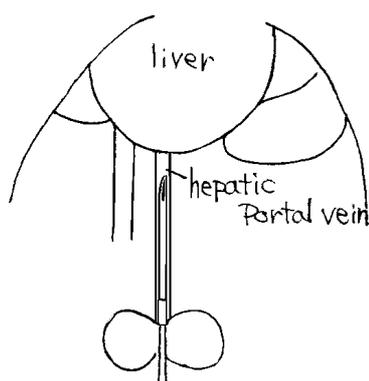


図 B



薄く透明な血管壁をすくう様にすべりこませ、カニューレーション。

針先まで目視出来るよう刺しこむ(B図)。Aの様に見えるのであれば入ってはいない。

出血を伴うが、あわてずにゆっくりとカニューレーションを行い鉗子で止める。

4. 鉗子（クレンメ）を脾静脈と胆管の結紫部位から、針と直角に挿入し固定。

Peristaltic Pump を ON ; REV（流速 30 ml/min）

* 流速は動物の体重による。

体重 200 g 以下

200~300 g

30 ml/min より遅くする

30 ml/min

350 g

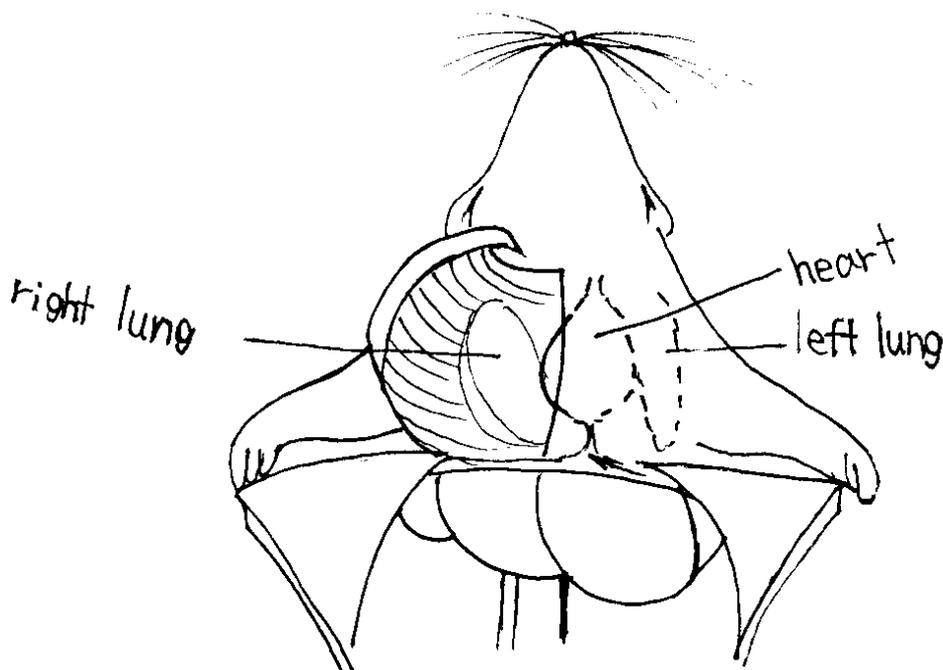
40 ml/min

うまくカニューレレーションされていると、ON;REVした瞬間に肝臓が脱血されスーッと黄褐色になるのが見える。

すぐに下大静脈を切断、脱血ルートの確保を開始。

はじめに、腹腔内に血液や廃液が下に落ちるよう下大静脈横の腹部切断。

横隔膜は出来れば切断せずに、胸空を切開し心臓(右房側)切開。胸空に廃液が溜まらぬように胸部横も切断。



5. 流速は 30 ml/min のまま灌流。

- 冷蔵庫で保存していた collagenase を本灌流液 Hanks'coll に入れ泡立たないように混和。
- 前灌流用 EGTA 液が無くなる直前に、本灌流用 Hanks'coll +collagenase 溶解液を灌流管に注ぎ入れる。

6. O₂ バブリングを行いながら、流速 15 ml/min (前灌流時の 1/2 の速さ) にする。

Collagenase 活性は 37°C前後が最も高いため、体温を保持のためにライト (白熱灯) をラットに近づけるなど工夫。

肝全体に液が渡るように、ラットの体勢や臓器の位置をペアン等使って調製。

7. 液が半分に減ったら、流速を 10 ml/min 程度に落とす。(ただし、small cells 分離のみ時) mature cells も同時に分離をする場合は、流速をあまり遅くすると mature はダメージが大きく収量に影響。流速 15ml/min のまま行う。逆に small

cell 採取の場合は液をゆっくりと流すことによって余計な生細胞を減らし、small cells の収量は良くなる。

肝全体に collagenase が効くと、類洞が明瞭になりウニ状に柔らかく、弱冠体積が大きくなる。肝將膜下に明らかに液が貯留している場合、すぐにスイッチを off。

8. 灌流終了後、開放した右胸空の肉をセッシで持ち上げ、肝冠状間膜を小ハサミで次々と切る。胃や腸との接合部を切り離し、肝門から出ている総胆管の根本をセッシでつかみ肝を切り離す。胃の裏側にも一小葉あるので、状態が良ければ忘れずに採取。

肝摘出時は絶対に食道と胃を傷付けてはならない。内容物が付着すると、culture 時に contamination につながる。

ガラスシャーレに肝臓を入れてクリーンベンチ内へ持って行く（一緒に小セッシ、小鉤ピン、小はさみをクリーンベンチ内に持って行く）

9. 肝の入ったシャーレに、氷入りの箱内で冷やしておいた細胞採取用培養液を少量注ぐ。

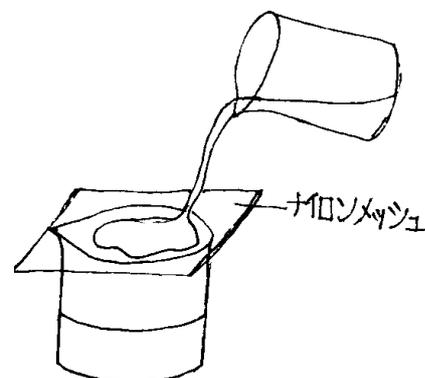
シャーレ内で肝表面の將膜を剥離、血の固まりや汚れも取り除く。

15. 100ml ビーカーに細胞採取用培養液を 50ml 程入れ、肝將膜をセッシで掴み、液中で攪拌し細胞を振り落とす。余計な皮膜は剥離しさらに攪拌、この作業を数回繰り返す。

別の 100 ml ビーカーに 250 μ m ナイロンメッシュを載せ、上記 16. で作製した細胞混濁液を少し高い位置から注ぎ、ナイロンメッシュに通す。

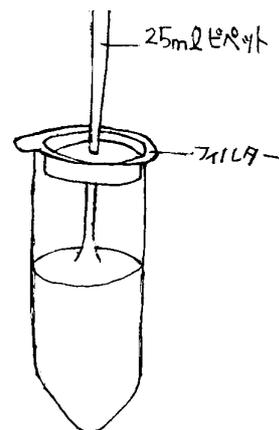
目詰まりするようであれば、新しい 250 μ m ナイロンメッシュに取り替える。

出来るだけ細胞を多く採取できるよう、細胞が付着したビーカーやシャーレを培養液で共洗い、250 μ m ナイロンメッシュに通す。



16. 用意しておいた 50 ml Test tube 6 本に、70 μ m セルストレイナーに越しに細胞混濁液を等量に分注。

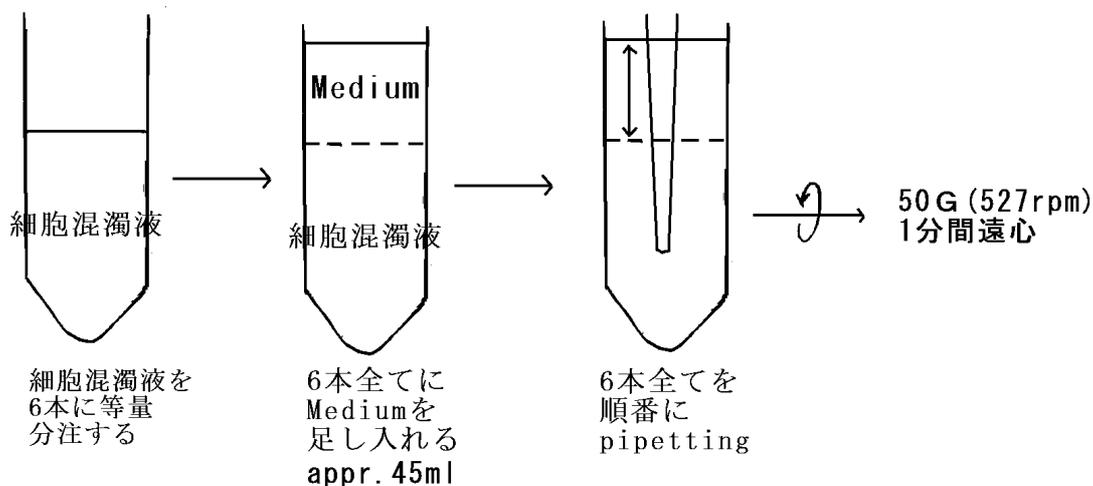
分注時、ピペットは垂直にセルストレイナーに押し当てて入れる。



17. 細胞採取用培養液（small hepatocytes 採取の場合は Hanks'+目的に応じた Antibiotics を、mature hepatocytes 採取の場合は Hanks'+02%BSA+Dexamethasone+Insulin+Gentamicin+Ascorbic acid を）Test tube 6 本に足し入れて、それぞれ 45 ml 程に suspend。

ピペットを使って 2、3 回 Pipetting を行い、混濁液を均一にする。

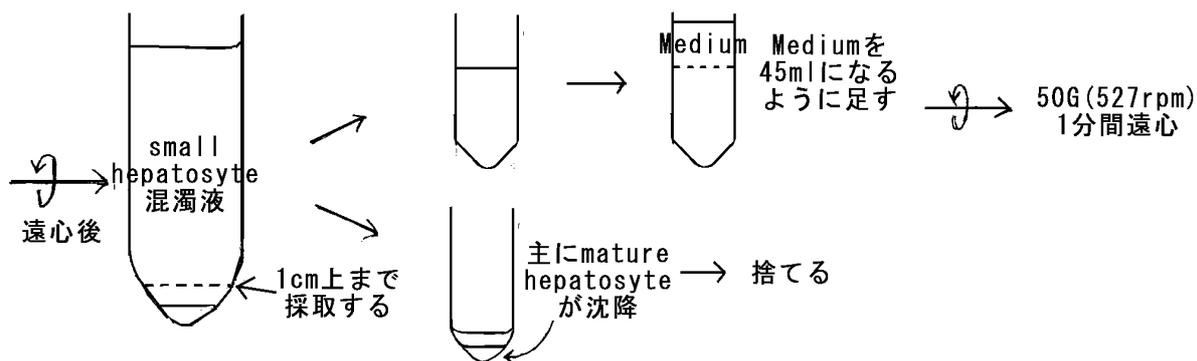
50 G (527 rpm) で 1 分間遠心分離。（使用培養液や遠心に関する別表 A、B 次頁にあり）



18. 遠心後、tube を傾けないよう慎重に取り出し、(mature hepatocyte は沈降し、small は上清に多く浮遊)

*small 採取の場合は、上清を沈殿物の 1 cm 程上まで採取し、新しい tube へ上清を移す。(6 本全て)

再び培養液を 45ml まで加え、数回 pipetting 後、50xg (527 rpm) で 1 分間遠心分離。この作業を 3 回繰り返す。



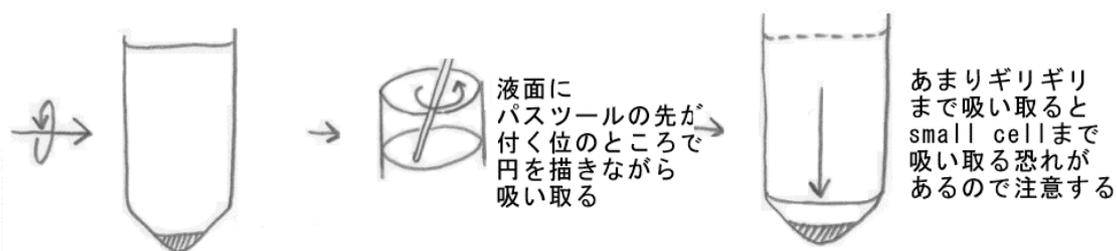
* mature 採取の場合、上清はアスピレーターで円を描く用に吸い捨て、P.12 図-19、20 の様にして pellet へ培養液を加え、pipetting し同様に遠心。

mature 採取時の遠心物は常に pellet であり、回転速度も 500 rpm のままであることから、以下 19 から 25 の説明は small 採取についての詳細説明とする。Mature に使用する溶液や遠心時間等については、別表B参照とする。

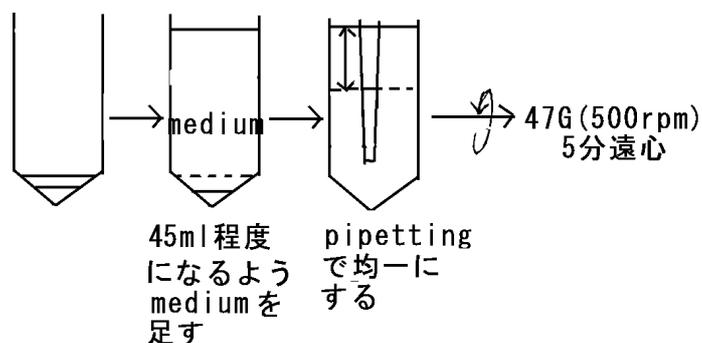
19. 遠心分離計 3 回後、アスピレーターで上清を吸い捨てる。

遠心や pipetting による物理的刺激により壊れた mature hepatocyte は上清部分に浮上している。

アスピレーター先端を液面に付け、円を描くように先を回しながら Pellet の 1 cm 上まで吸い取る。ぎりぎりまで吸い取ると small hepatocyte まで吸い取られるので注意。



20. Pellet に培養液を 45ml まで加え、pipetting。細胞懸濁液にするとともに、mature をある程度壊すことが目的。47xg (500rpm) で 5 分間遠心分離する。

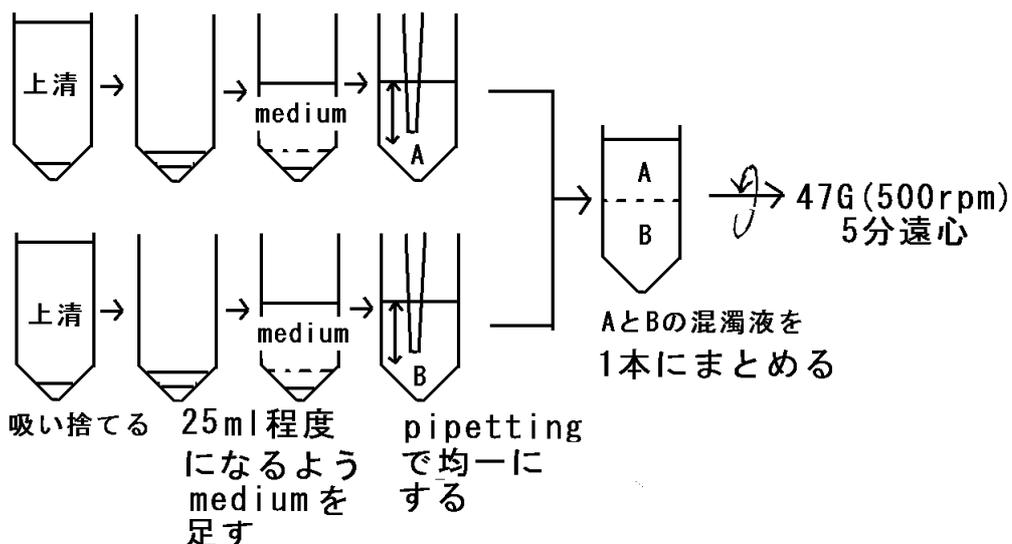


21. 遠心後は、常に tube を傾けないよう慎重に取り出す。

アスピレーターで上清を吸い捨て、pellet 6 本に培養液を 25ml 程加え suspend し、pipetting。

6 本の懸濁液を新しい tube 4 本にまとめてしまう。等量になるよう分注。

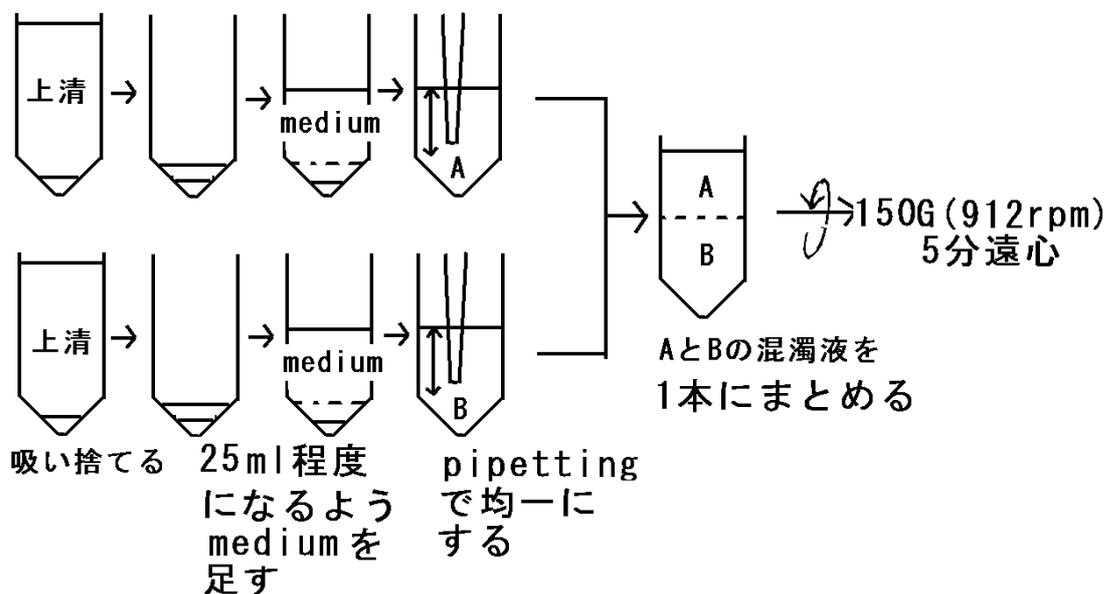
45 ml まで達していなければ、培養液を加える。数回 pipetting 後、47xg (500 rpm) で 5 分間遠心。この作業を 3 回繰り返す。



22. 遠心分離 3 回目後、アスピレーターで上清を吸い捨て、pellet 4 本に培養液を 25ml 程加え suspend し、pipetting する。

4 本の混濁液を、新しい tube 2 本にまとめてしまう。等量になるよう分注。

150xg (912 rpm) 5 分間遠心。



回転数が上がると大きな cell を壊しやすく,壊れた mature hepatocyte は上清にあがってくる。Small hepatocytes は沈む。

23. 遠心後アスピレーターで上清を吸い、tube に培養液を 45ml 加え suspend し、pipetting。再び 150xg (912rpm) で 5 分間遠心分離する。
24. 遠心後、アスピレーターで上清を吸い取り、tube に medium を 20ml suspend、pipetting。新しい tube1 本へまとめる。50xg (527rpm) で 5 分間遠心。
25. 遠心後、アスピレーターで上清をぎりぎりまで吸い取り、細胞培養用培養液 (DMEM/F12) 20ml を加え、懸濁する。
26. 1.5ml トリパンプルーに 0.5ml 上記 25 で出来上がった細胞液を加えて、細胞数を計算板でのカウントによって調べる。細胞数によって、ディッシュに播く量を決める。