

Rat perfusion 【ラット肝臓 PBS 灌流法】

<material>肝摘出時

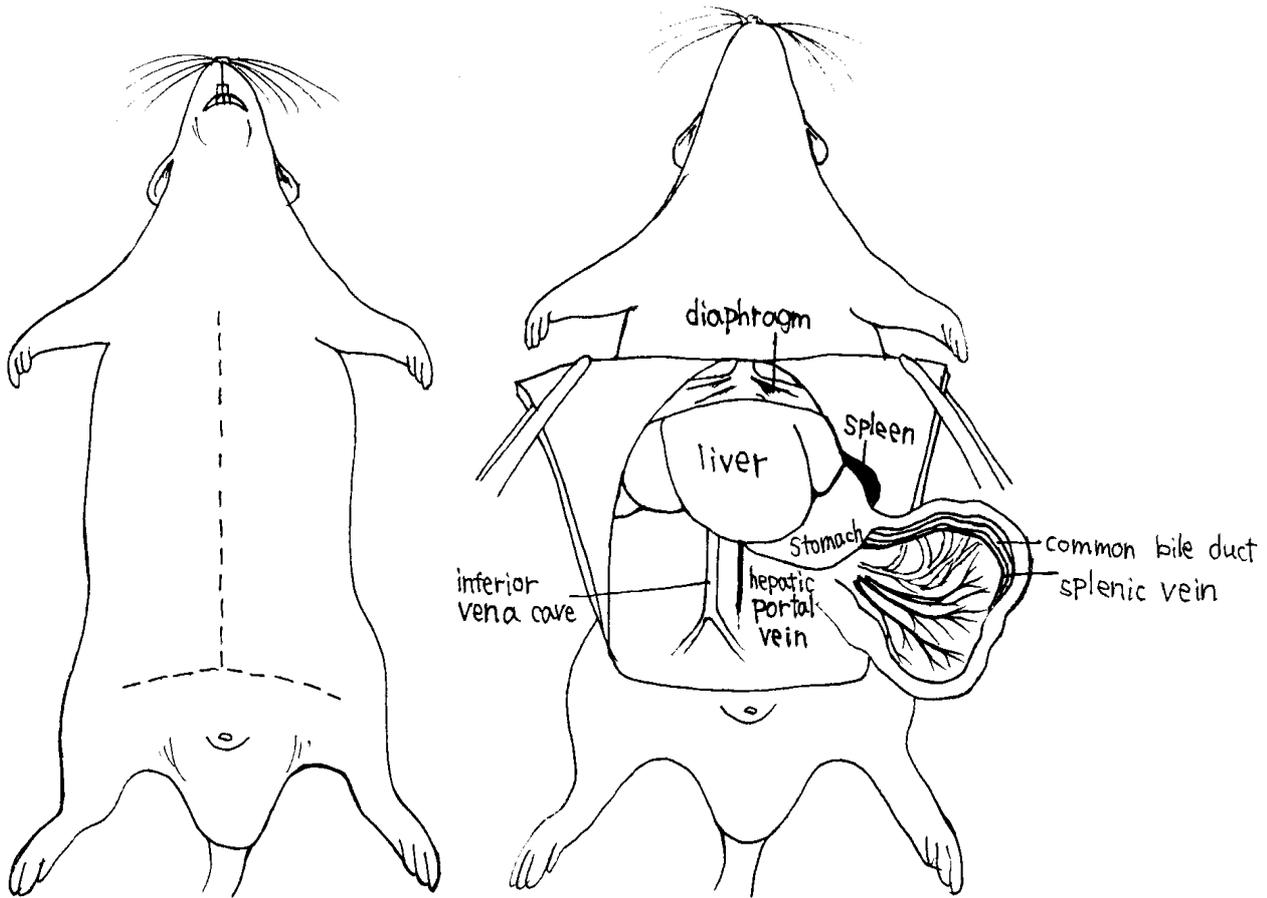
- ・イソフルラン (麻酔用)
- ・酒性綿
- ・ツベルクリン 1ml シリンジ針付き 27G

- ・PBS (チューブ付き瓶 1本 滅菌瓶 2本)
- ・サンプルカップ (大 4個 小 2個)
- ・OCT コンパウンド剤
- ・4号濾紙 (PBS にて湿らせておく)
- ・プラスチックシャーレ (20 cm大 濾紙を置く台とする)
- ・片刃 (2体につき 1枚使用)
- ・エタノールジャー (100%エタノール 1/5位)
- ・イソペンタンカップ (イソペンタン 100ml)
- ・ドライアイス
- ・氷
- ・黒ビニール袋
- ・恒温槽 (氷を入れて使用)
- ・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、簧の子を載せる)
 - キムタオル
 - ペットシート
 - 簧の子 (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
- ・**滅菌**シリコンチューブ 1本
 - 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
- ・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

<methods>

1. 恒温槽容器に氷を7分目まで入れ、PBS 瓶と予備用の PBS 瓶を冷やす。
2. シリコンチューブを入れ Peristaltic Pump を通し翼状針をリキャップせず注ぎ口に入れる。
3. Peristaltic Pump のスイッチを ON ; REV。流速 20~21 ; 30ml/min
4. 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。
5. クライオスタット庫内を-20℃に設定、サンプル分のファルコンチューブを冷やしておく。
6. 100%エタノールが 1/5 程度入ったエタノールジャーにドライアイスを入れ冷やし、イソペンタン 100ml が入ったカップを静かに入れる。(この時ドライアイスがグツグツとなるが、イソペンタンにエタノールが混入すると OCT コンパウンドが変性するので注意する。)
7. 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。
 - ・ 首がぐったりしたら、ラットの体重測定。
 - ・ ファルコンチューブに脱脂綿を入れ、イソフルランを浸し、ラットの鼻に嗅がせ、麻酔を維持。
8. 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、しっぽは篋の子の隙間におく。
9. 70%ethanol で腹部全体を浸すように消毒。
10. 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。



11. 一度 peristaltic pump を OFF。翼状針を PBS 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

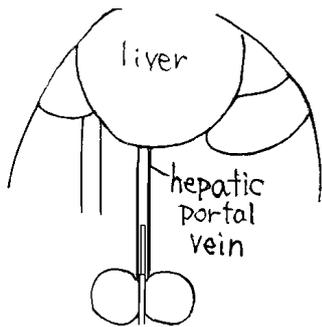
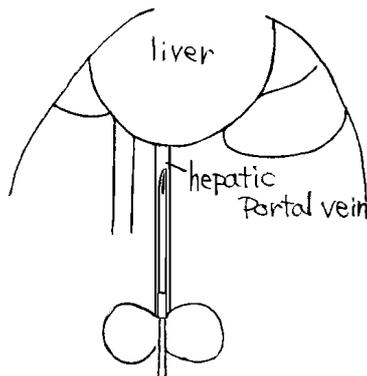


図 B



薄く透明な血管壁をすくう様にすべりこませ、カニキュレーション。

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キュレーションを行い鉗子で止める。

12. 鉗子（クレンメ）を脾静脈と胆管の結紮部位から、針と直角に挿入し固定。

Peristaltic Pump を ON ; REV（流速 20~21 ; 30 ml/min）

* 流速は動物の体重による。

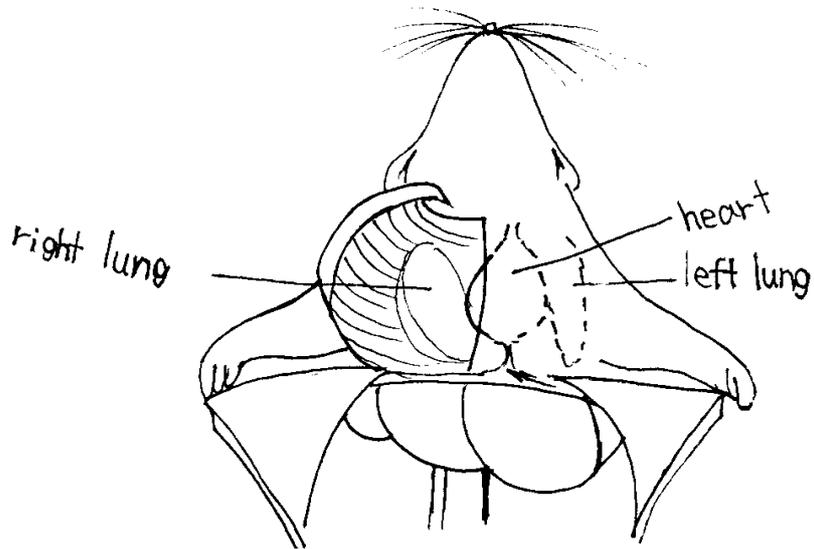
体重	200 g 以下	30 ml/min	より遅くする
	200~300g	30 ml/min	
	350g	40 ml/min	

うまくカニキュ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、腹空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。



13. 流速は 20~21 のまま灌流

- PBS 液が無くなる前に、予備用 PBS を注ぎ入れる。
- 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。

14. ナンバリングしたサンプルカップに OCT コンパウンドを気泡が入らないように薄く入れ切り出ししたサンプルを置きその上から OCT コンパウンドを充填する。

- サンプル内に気泡がない事を確認してサンプルカップを鉗子でつまみ、
- イソペンタンの中に入れ温度を下げ固める。

15. 固まったサンプルをクライオスタット庫内 CRIO BAR に置きイソペンタンを飛ばし、予め -20°C においてあったファルコンチューブにサンプル毎に入れ、薄切・染色する。すぐに薄切しない場合は -80°C にて保存する。