

## 1

## 糸球体単離法

## 用いる検体

マウス，ラット，ウサギなど実験によって異なる。

## 準備するもの

## ① 一般的なもの一器具

- エーテルまたは，ペントバルビタール
- 麻酔びんまたは，シリンジ（1 mL）
- 固定板
- 四肢固定用器具
- ビーカー（20，50，100 mL）
- 70%エタノール
- ガーゼ
- 留置針（検体の大きさに応じたゲージ数）
- シリンジ（5，20，50 mL）
- 鑷子
- 鉗子
- 直剪刃
- ブレード
- 綿棒

## ② Sieving 法に必要なもの

- ステンレス製メッシュ（東京スクリーン社）
- スパーテル
- 洗浄ビン（ポリ容器 500 mL）

## ③ Magnetic beads 法に必要なもの

- Washing buffer: 0.1 M phosphate buffer pH 7.4  
(2.62 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 14.42 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}/\text{DDW}$  1 L)
- Buffer D: PBS pH7.4 with 0.1%BSA
- Buffer E: 0.2 M Tris pH8.5 with 0.2%BSA
- Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)
- Dynabeads (Invitrogen)
- Magnetic particle concentrator (MPC) (DynaL A. S.)
- Hank's Balanced Salt solution (Invitrogen)
- Collagenase A (Roche Applied Science)
- Deoxyribonuclease I (DNase I) (Invitrogen)
- BD Falcon cell strainer 70  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$  (BD)

## 処理方法

腎組織より糸球体を単離する方法には，さまざまな方法があるが，本稿では当科にて実際に行っている Sieving 法と Magnetic beads 法を記載する．実験の目的に応じて，いずれかの方法が選択される．今回はマウスの例をあげる．

**1 Sieving 法**

- ① マウスの頸椎脱臼をする。
- ② 鑷子でマウスの腹壁をつまみ上げ、直剪刃で下腹部を横切開し、正中に沿って胸腔方向に剣状突起の少し手前まで皮膚と腹筋を同時に切開し、さらに左右の垂直方向に腹壁を切開する。
- ③ 綿棒で露出した腸管を右側に排除すると、右腎が現れるので尿管と腎動静脈を鑷子でつまんで切除し、右腎を摘出する。腸管を左側に排除し、同様の手順で左腎も摘出する。
- ④ 被膜を除去する。
- ⑤ ステンレス製メッシュ（ステンレス製篩）の 70 mesh ( $212 \times 212 \mu\text{m}$ )\* 上に乗せ、スパーテル等を用いて PBS を流しながら軽く圧迫し通過させる。
- ⑥ ⑤ と同様の操作により順次 100 mesh ( $100 \times 100 \mu\text{m}$ )\* を通過させ、最終的に 200 mesh ( $75 \times 75 \mu\text{m}$ )\* 上に残った残渣が目的とする糸球体成分であるが、必ず鏡検にて糸球体成分が 90% 以上を占めていることを確認する。

\*マウスは大体がこのメッシュサイズで採取されるが、検体の種類によって採取されるメッシュサイズが異なる。

**2 Magnetic beads 法****a) Magnetic beads の洗浄**

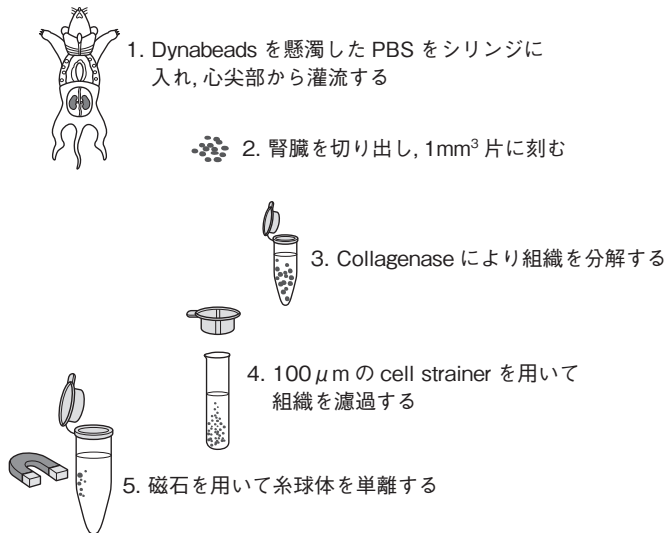
- ① 50 mL tube に必要量の Dynabeads を入れる。（推奨：マウス 1 匹当たり 0.2 mL =  $8.0 \times 10^7$  個）
- ② 必要量（マウス 1 匹当たり 1.5 mL）の washing buffer を入れ、懸濁する。
- ③ Tube を MPC に装着し、1 分間安置すると beads が沈殿してくるため、上清を取り除く。
- ④ ②～③ を繰り返す。

**b) Dynabeads blocking**

- ① 洗浄した Dynabeads に必要量の Buffer D（マウス 1 匹当たり 1.5 mL）を加えて懸濁し、氷上で 5 分間安置する。
- ② MPC に装着し、1 分間安置すると beads が沈殿してくるため、上清を取り除く。
- ③ ①～② を繰り返す。
- ④ 必要量の Buffer E（マウス 1 匹当たり 1.5 mL）を加えて、37°C で一晩安置する。
- ⑤ 翌日上清を取り除く。
- ⑥ ①～② を繰り返す
- ⑦ オートクレーブをかけた必要量の PBS（マウス 1 匹当たり 40 mL）を加え、4°C で保存する（1 週間保存可能）。

**c) 灌流**

- ① 50 mL シリンジに b)-⑦ で用意した beads 入りの PBS 40 mL を入れる。
- ② ペントバルビタールでマウスに麻酔する。



**図 1** Magnetic beads 法による糸球体単離法の原理  
(Takemoto M, et al. Am J Pathol. 2002; 161: 799-805)<sup>3)</sup>

- ③麻酔がかかったのを確認し、鑷子でマウスの腹壁をつまみ上げ、直剪刃で下腹部を横切開し、正中に沿って胸腔方向に剣状突起の少し手前まで皮膚と腹筋を同時に切開し、さらに左右の垂直方向に腹壁を切開する。
- ④綿棒で露出した腸管を右側に排除すると、下大静脈が現れる。
- ⑤下大静脈を同定し、切開する。
- ⑥すぐに横隔膜に沿ってはさみで胸壁を左右に切開し、正中を切開したのち、ペアンで胸腔を開き、鑷子で心臓を固定して心尖部から beads 入りの PBS 40 mL を注入する。
- ⑦両腎が蒼白になるのを確認し、PBS を注入後、両腎を取り出して、被膜を取り除く。
- ⑧氷上で取り出した腎を細かく切断し、1.5 mL eppendorf tube に入れる。
- ⑨そこに collagenase A (10 mg/mL) 100 μL + DNase I (100 U/mL) 10 μL + HBSS (1X) 900 μL を入れる。
- ⑩37°C water bath で1時間15分間、振とう攪拌する。

#### d) 糸球体の収集

- ①100 μm の cell strainer を置いた 50 mL tube を用意し、cell strainer 上に c)-⑨のサンプルを入れ、5 mL シリンジの柄の裏で強く押し付けないようにして、PBS で洗いながら濾す。
- ②①をもう一度繰り返す。
- ③4°C で 1,600rpm, 5分間遠心する。
- ④ペレットを 1.5 mL PBS で崩し、15 mL tube に移す。
- ⑤15 mL tube を MCP に装着し、氷上で1分間安置する。

- ⑥上清をピペットで取り除き、PBSを加えて再懸濁する。
- ⑦③～⑤を3～4回繰り返す。
- ⑧懸濁液を70  $\mu\text{m}$  の cell strainerに通すと、cell strainer上に糸球体が選別単離される。

#### 保存方法・ 条件

低室温・清潔操作が望ましい。細胞の培養やDNA・RNAのクローニングをする時には、無菌操作にてコンタミネーションを避ける。

#### ピットフォール

- マウスの開腹時、腹腔内臓器を傷つけないために、はさみの鈍側を腹腔側に入れる。
- 糸球体灌流時は、できるだけ均一な速度と圧力で灌流液を注入し、腎臓全体の血色がなくなったところで素早く両腎を摘出する。
- Magnetic beads法の際に、麻酔の深度が浅すぎると術中にマウスが覚醒してうまく灌流できず、深すぎると灌流前に心停止を起こしてしまうので、麻酔の深度には注意する。
- 腎被膜をしっかり剝離しないと、sieving時、ステンレス製メッシュの網目に目詰まりが生じ、目的とする単離物の収量も低下する。

#### ●文献

- 1) Akis N, Madaio MP. Isolation, culture, and characterization of endothelial cells from mouse glomeruli. *Kidney Int.* 2004; 65: 2223-7.
- 2) Rops AL, Vlag J, Jacobs C, et al. Isolation and characterization of conditionally immortalized mouse glomerular endothelial cell lines. *Kidney Int.* 2004; 66: 2193-201.
- 3) Takemoto M, Asker M, Gerhardt H, et al. A new method for large scale isolation of kidney glomeruli from mice. *Am J Pathol.* 2002; 161: 799-805.

<浅尾りん>

## 2

## メサンギウム細胞培養法

## 用いる検体

- 6週以降の mouse, 体重 20~25 g, 5~10 匹

## 準備するもの

## 【試薬, 培養液, その他】

- RPMI1640 培養液

RPMI1640 培地 (SIGMA, R8758) に penicillin G (PG) (Meiji Seika ファルマ) 100 U/mL, streptomycin (SM) (Meiji Seika ファルマ) 100  $\mu$ g/mL を millipore filter (pore size 0.22  $\mu$ m) を通した後に添加する. 培養用には, やはり filter system (pore size 0.22  $\mu$ m) を通したウシ胎仔血清 (Fetus Calf Serum: FCS, GIBCO) を 20% になるように加え調整する.

- 滅菌 PBS
- Collagenase solution

Collagenase (Worthington) を RPMI1640 で 4 mg/mL になるよう調整し, 0.22  $\mu$ m のフィルターを通しておく.

## 【器具】

## 解剖用セット

- 解剖台
- 滅菌解剖はさみ (直大 1, 曲小 2)
- 滅菌ピンセット (有鉤 2, 小 2)
- 滅菌ガーゼ
- 麻酔 (ペントバルビタール, 共立製薬)
- 10 cm dish (IWAKI) (FCS フリーの RPMI1640 あるいは滅菌 PBS 入り)
- 氷

## Sieving セット

- 手袋
- 10 cm dish (type I collagen-coated dish, IWAKI)
- ピンセット (小 2), メス, メス刃, はさみ
- ガーゼ
- ハーバードプレス, スパーテル
- ステンレスメッシュ (200, 106, 70  $\mu$ m)
- 噴射洗浄用プラスチックボトル, PBS
- ゴムあるいは金属ヘラ