

マウスへの Corning® マトリゲル 基底膜マトリックス移植と組織の固定方法

はじめに

Corning マトリゲル基底膜マトリックスは Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) マウス肉腫から抽出された、基底膜調製品です。主成分はラミニンで、続いてコラーゲンIV、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクチン、ナイドジェンなどを成分としています。マトリゲル基底膜マトリックスは上皮様細胞などの基質依存性細胞の接着や分化に有効で、細胞の3次元培養、浸潤アッセイ、肝細胞を用いた代謝・毒性研究、血管新生、腫瘍細胞の移植などいろいろなアプリケーションに利用されています。今回は、マトリゲル基底膜マトリックスをマウスの体内に注入して用いる、血管新生や腫瘍細胞の移植に役立つ情報をまとめてみました。

マトリゲル基底膜マトリックスの種類

- ① 腫瘍細胞などの生着を助ける足場としては通常のマトリゲル基底膜マトリックス（カタログ番号：354234、356234）をご使用下さい。マトリゲル基底膜マトリックス中に含有されるグロースファクターの量を減少させたい場合には、グロースファクターリデュースト マトリゲル基底膜マトリックス（カタログ番号：354230、356230）もあります。
- ② 血管新生のアプリケーションで、最終的にヘモグロビン量をシアンメトヘモグロビン法（赤褐色の吸光）で測定する場合には、マトリゲル フェノールレッド フリー（カタログ番号：356237）やグロースファクター リデュースト マトリゲル基底膜マトリックス フェノールレッド フリー（カタログ番号：356231）を使用するのが一般的です。なお、経験的に血管新生のアプリケーションではタンパク濃度の高いマトリゲル基底膜マトリックスで行なうと血管新生量が多くなるようです。

手順

マウス皮下へのマトリゲル基底膜マトリックス注射：

- 1, 注射のために使用する全ての器具や試薬（注射器、針、マトリゲル基底膜マトリックス溶液等）を氷上に静置し、十分冷やしておきます。マトリゲル基底膜マトリックスは 10℃以上でゲル化し始めるので、液体のまま注入するためにはマトリゲル基底膜マトリックスに触れるもの全てについて低温を保つことに細心の注意を払って下さい。
- 2, マトリゲル基底膜マトリックスと細胞懸濁液を混合した^{注1)}後、注射器（注射針は 21-25G：細胞の大きさに応じて細胞が壊れないサイズを選択します）で溶液を皮下に注射^{注2)}します（写真1）。このとき、針を動かさずに注入した場合にはマトリゲル基底膜マトリックスは一ヶ所で塊状にとどまります。皮下組織との接触面積を増やしたい（球状ですと、細胞集団の中央に栄養が届かず、その部分の細胞の生存率が悪くなる場合があります。）ときには、通常の皮下注射と同様に皮下に針を刺し、その後に針先を左右に動かしてスペースを確保し、そこにマトリゲル基底膜マトリックスを注入して下さい。

CORNING

注 1) 今回の実験ではマトリゲル基底膜マトリックスを原液で注入しており、細胞は接種しておりません。腫瘍細胞などの生着の場合には細胞濃度を 2×10^7 cells/ml 程度に調製してください。実際の細胞接種量は 10^6 オーダーになります。また、ゲル化しにくくなるので、マトリゲル基底膜マトリックスを 1:3 以上には希釈しないで下さい。

注 2) 一連の写真では 0.7 ml のマトリゲル基底膜マトリックス溶液を注入しています。後にマトリゲル基底膜マトリックスを含む組織を取り出すために、生体内での若干の吸収も考慮して、扱いやすいように大きめにしています。腫瘍細胞の生着の場合には 0.1 ml 程度しか注入しないこともあります。血管新生は 0.5 ml を目安にして下さい。



写真 1 : 皮下注射部位

マウスからのマトリゲル基底膜マトリックスの切除 :

3, 適当な期間^{注 3)} が経過したのち (写真 2)、マウスを麻酔し、マトリゲル基底膜マトリックスの周囲をマトリゲル基底膜マトリックスから約 5 mm 離して、はさみで四角に切り取ります。ゲルの形状をきれいに保つためには、皮下だけではなく、皮膚から腹膜までを含めた組織を切り取り、固定します。参考までに、腹膜側より見たマトリゲル基底膜マトリックスの写真を載せます (写真 3)。マトリゲル基底膜マトリックスは生体に吸収・分解され、注入した体積よりも小さくなっています。皮膚から取り出したマトリゲル基底膜マトリックスはやや黄色がかった透明で、血管などが入り込んでいると赤くなります (写真 4)。

注 3) この実験では 1 週間経過したマトリゲル基底膜マトリックスを取り出しています。血管構築の評価をヘモグロビン量で行なう場合には、VEGF とヘパリンをマトリゲル基底膜マトリックスに添加し、血管新生が亢進した状態において 3 日程度でマトリゲル基底膜マトリックスのみを摘出できます。



写真 2 : マトリゲル基底膜マトリックス注入部位 (矢印)、標本として切除する部位 (四角)



写真 3 : 注入したマトリゲル基底膜マトリックスを腹膜側から見た図 (針先)



写真 4：皮下組織から剥がして取り出したマトリゲル基底膜マトリックス

マトリゲル基底膜マトリックスを含む組織の固定：

4, 切り取った組織がしわにならないように、腹膜側を厚紙（カレンダーなどを利用）に伸ばしてのせ、保護のためにナイロンメッシュの袋に入れます。10%中性緩衝ホルマリン溶液中で1日以上室温^{注4)}で固定する（写真5）と、ナイフで切ったときにも崩れにくくなります（写真6）。ある程度の厚さをもたせて切断しないと、ゲルだけが飛び出してしまうおそれがあります。

注4) マトリゲル基底膜マトリックスを低温（8℃以下）で固定しますと、脱重合する可能性がありますので、室温で固定して下さい。



写真 5：固定した組織（表面は皮膚側）



写真 6：切断面（上：皮膚 中：マトリゲル基底膜マトリックス、透明に見える部分 下：腹膜と筋層）

5, 固定した組織の切片をパラフィンなどに包埋し、組織染色のための薄切片を作製します。HE（ヘマトキシリン・エオジン）染色を行った例を写真7に示します。マトリゲル基底膜マトリックスはこの染色方法により薄い赤色になります。

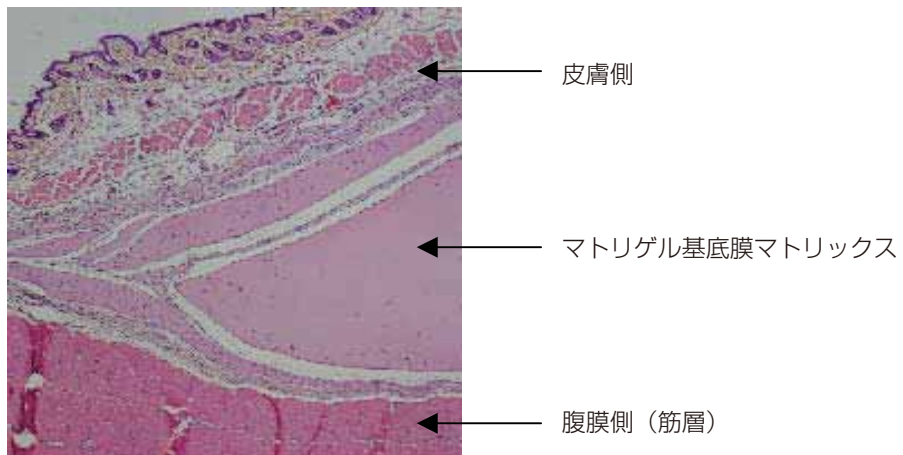


写真 7：HE 染色像

参考文献

- 1) マトリゲル基底膜マトリックスを用いた肝細胞の移植
Ohashi, K et al., Nature Medicine, 6(3):327-331(2000)
Sustained survival of human hepatocytes in mice: A model for in vivo infection with human hepatitis B and hepatitis delta viruses
- 2) マトリゲル基底膜マトリックスを用いた腫瘍細胞の移植
Yue, W et al., J. Steroid Biochem. Molec. Biol., 44(4-6):671-673(1993)
MCF-7 human breast carcinomas in nude mice as a model for evaluating aromatase inhibitors
- 3) ヘモグロビン定量による血管構築の評価
Isaji, M et al., British Journal of Pharmacology, 122:1061-1066(1997)
Tranilast inhibits the proliferation, chemotaxis and tube formation of human microvascular endothelial cells in vitro and angiogenesis in vivo

Corning® は CORNING Incorporated の登録商標です。
商品の外観・仕様は予告無しに変更することがあります。予めご了承下さい。

Corning acquired the Discovery Labware Business including the BioCoat™, FluoroBlok™, and Matrigel® brands. For information, visit www.corning.com/discoverylabware.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic or therapeutic procedures. Not for resale.

For a listing of trademarks, visit us at www.corning.com/lifesciences/trademarks.

All other trademarks are property of their respective owners.

Corning Incorporated, One Riverfront Plaza, Corning, NY 14831-0001

総販売元

コーニングインターナショナル株式会社
ライフサイエンス事業部

〒107-0052 東京都港区赤坂 1-11-44 赤坂インターシティ7階
Tel : 03-3586-1996 Fax : 03-3586-1291
www.corning.com/lifesciences
CLSJP@corning.com

© 2012, 2013 Corning Incorporated
CLS-035-00