

# 2025/11/12 VIA Extractor と Enzyme mix Dのトライアル

藤田医科大学医学部腎臓内科学  
伊藤 辰将

※掲載している内容はあくまでご使用いただいたお客さまのサンプル・実験条件に基づくものであり、製品の品質を保証するものではないことをご了承ください。また、投稿いただいた内容のうち、実験手法に関する箇所は弊社推奨の使用方法を個別に検討・改善された結果を含んでいる場合があります。ご参考にされる場合は、お客さま各位の責任において実施していただきますようお願い申し上げます。

<https://www.cytivalifesciences.co.jp/technologies/tissue-dissociation/voc/dissociation-enzyme/index.html>

## 背景

糸球体炎症の評価は、糸球体腎炎症候群の病態を理解する上で重要であるが、糸球体は腎全体の一部の領域に過ぎず、主に血管で構成されるため、尿細管間質領域と比較して、実質的なタンパク質量やmRNA, DNA量が極めて少ない。さらに、糸球体はメサンギウム領域やコラーゲンなどの細胞外マトリックスが血管内皮細胞, メサンギウム細胞, タコ足細胞をつなぎ構成されているため、生細胞のまま単細胞化することは不可能とされている。

## 主目的

1. Enzyme Dにより、糸球体構成細胞を単細胞化できるか？
2. Enzyme Dにより、糸球体精製が可能か？
3. VIA extractorはmanualでの方法と比較して、効率よく腎細胞の採取が可能となるか？

## 副目的

1. Enzyme DおよびVIA extractorはリンパ節に使用可能か？
2. Enzyme DおよびVIA extractorは脾臓に使用可能か？

※掲載している内容はあくまでご使用いただいたお客さまのサンプル・実験条件に基づくものであり、製品の品質を保証するものではないことをご了承ください。また、投稿いただいた内容のうち、実験手法に関する箇所は弊社推奨の使用方法を個別に検討・改善された結果を含んでいる場合があります。ご参考にされる場合は、お客さま各位の責任において実施していただきますようお願い申し上げます。

**サンプル (C57BL/6J 雄, 25 weeks of age (two siblings), 単細胞化の方法-酵素-臓器)**

1. VIA-0.1% Collagenase IV-Kidney
2. VIA-Enzyme D-Kidney
3. VIA-0.1% Collagenase IV-Inguinal lymph node
4. VIA-Enzyme D-Inguinal lymph node
5. VIA-1 mM EDTA/1% FBS/PBS-Spleen
6. VIA-Enzyme D-Spleen
7. Manual-0.1% Collagenase IV-Kidney
8. Manual-Enzyme D-Kidney
9. Manual-0.1% Collagenase IV-Inguinal lymph node
10. Manual-Enzyme D-Inguinal lymph node

全てのSampleはつぶした後，70  $\mu$ m meshを通し，適切な量の1 mM EDTA/1% FBS/PBSに再懸濁した。  
再懸濁したものをトリパングルーを使って細胞数および生存率をTC20（全自動セルカウンター，Bio-Rad）を用いて計測した。生存率の妥当性は目視で判断した。

70  $\mu$ m mesh上の糸球体はmesh上の残りを1 mM EDTA/1% FBS/PBSで洗い，顕微鏡で確認した。

組織分散用酵素：Dissociation Enzyme Mix お客様の声：ご投稿画像・データ  
お客様の声No.015 藤田医科大学 医学部腎臓内科学 伊藤 辰将様



200rpm, 37°C  
Mouse kidney

Left	Right
Dissociation enzyme D (Cytiva)	0.1% Collagenase type IV

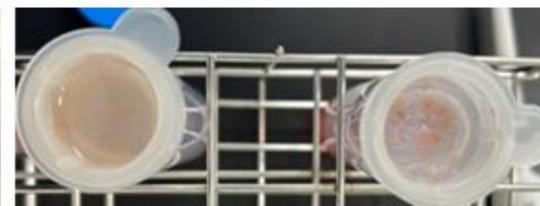
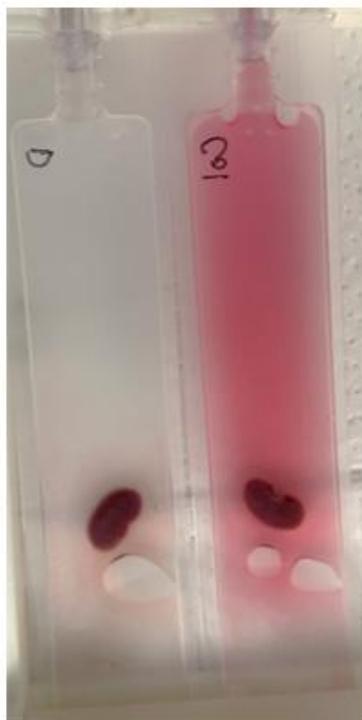


0 min

5 min

10 min

15 min



※掲載している内容はあくまでご使用いただいたお客さまのサンプル・実験条件に基づくものであり、製品の品質を保証するものではないことをご了承ください。また、投稿いただいた内容のうち、実験手法に関する箇所は弊社推奨の使用方法を個別に検討・改善された結果を含んでいる場合があります。ご参考にされる場合は、お客さま各位の責任において実施していただきますようお願い申し上げます。

<https://www.cytivalifesciences.co.jp/technologies/tissue-dissociation/voc/dissociation-enzyme/index.html>

組織分散用酵素：Dissociation Enzyme Mix お客様の声：ご投稿画像・データ  
お客様の声No. 015 藤田医科大学 医学部腎臓内科学 伊藤 辰将様



200rpm, 37°C  
Mouse リンパ節

Left	Right
Dissociation enzyme D (Cytiva)	0.1% Collagenase type IV

0 min

10 min



※掲載している内容はあくまでご使用いただいたお客さまのサンプル・実験条件に基づくものであり、製品の品質を保証するものではないことをご了承ください。また、投稿いただいた内容のうち、実験手法に関する箇所は弊社推奨の使用方法を個別に検討・改善された結果を含んでいる場合があります。ご参考にされる場合は、お客さま各位の責任において実施していただきますようお願い申し上げます。

<https://www.cytivalifesciences.co.jp/technologies/tissue-dissociation/voc/dissociation-enzyme/index.html>

組織分散用酵素：Dissociation Enzyme Mix お客様の声：ご投稿画像・データ  
お客様の声No. 015 藤田医科大学 医学部腎臓内科学 伊藤 辰将様



200rpm, 37°C  
Mouse spleen

Left	Right
Dissociation enzyme D (Cytiva)	EDTA (no enzyme)

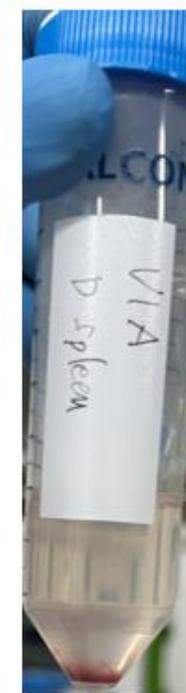


0 min

5 min

10 min

20 min



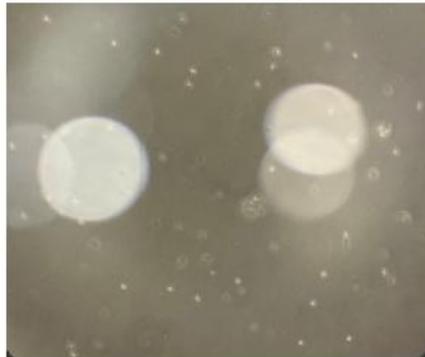
※掲載している内容はあくまでご使用いただいたお客さまのサンプル・実験条件に基づくものであり、製品の品質を保証するものではないことをご了承ください。また、投稿いただいた内容のうち、実験手法に関する箇所は弊社推奨の使用方法を個別に検討・改善された結果を含んでいる場合があります。ご参考にされる場合は、お客さま各位の責任において実施していただきますようお願い申し上げます。

<https://www.cytivalifesciences.co.jp/technologies/tissue-dissociation/voc/dissociation-enzyme/index.html>

1. Enzyme Dにより, 糸球体構成細胞を単細胞化できるか?
2. Enzyme Dにより, 糸球体精製が可能か?

糸球体は精製されていなかった

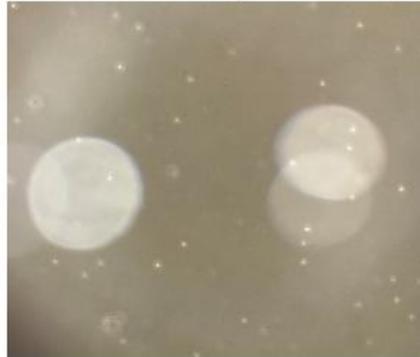
VIA-0.1% collagenase



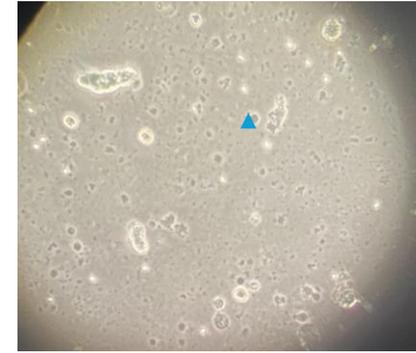
Manual-0.1% collagenase

糸球体が50%以上の割合で精製されているように見えた  
(複数のmeshを組合せる方法ではよくて50%程度)

VIA-Enzyme D

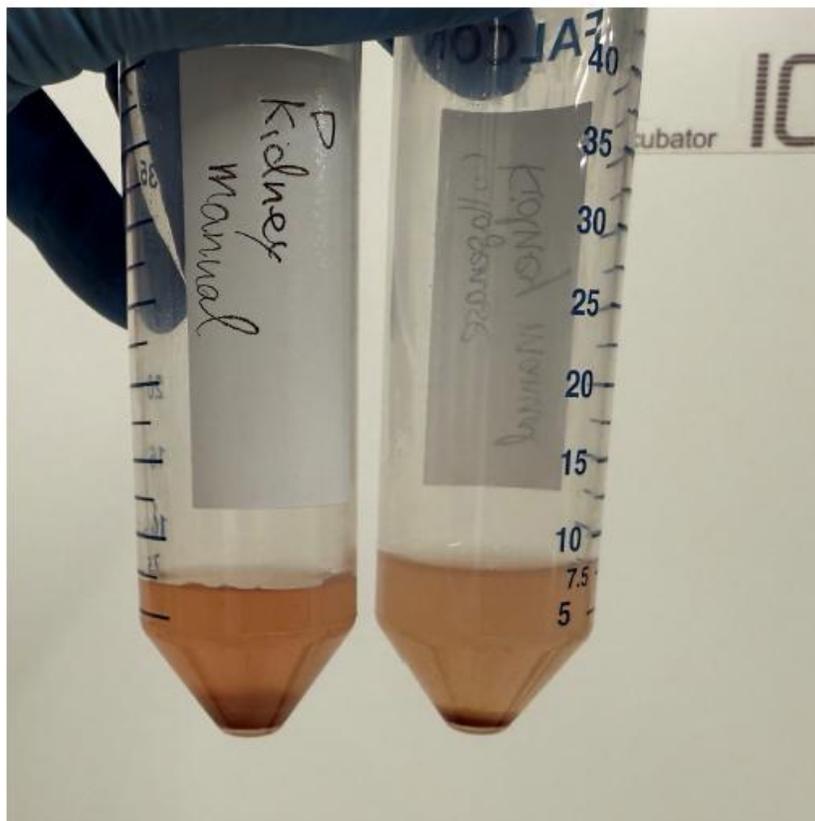


Manual-Enzyme D

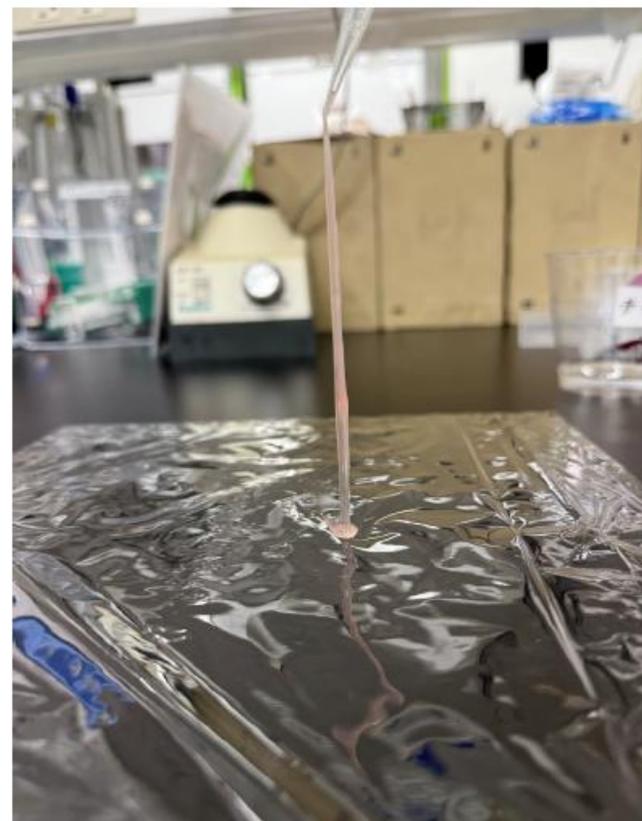


糸球体はEnzyme Dでは破壊されなかった.  
Enzyme DとVIA extractorを使った時のみ  
糸球体を精製することができた.

組織分散用酵素：Dissociation Enzyme Mix お客様の声：ご投稿画像・データ  
お客様の声No. 015 藤田医科大学 医学部腎臓内科学 伊藤 辰将様



Manual-0.1% Collagenase IV-Kidney  
Manual-Enzyme D-Kidney  
ではペレットのでき方が異なっていた



VIA-Enzyme D-Spleen  
は時間がたってからゲル化した

※掲載している内容はあくまでご使用いただいたお客さまのサンプル・実験条件に基づくものであり、製品の品質を保証するものではないことをご了承ください。また、投稿いただいた内容のうち、実験手法に関する箇所は弊社推奨の使用方法を個別に検討・改善された結果を含んでいる場合があります。ご参考にされる場合は、お客さま各位の責任において実施していただきますようお願い申し上げます。

<https://www.cytivalifesciences.co.jp/technologies/tissue-dissociation/voc/dissociation-enzyme/index.html>

組織分散用酵素：Dissociation Enzyme Mix お客様の声：ご投稿画像・データ  
お客様の声No.015 藤田医科大学 医学部腎臓内科学 伊藤 辰将様



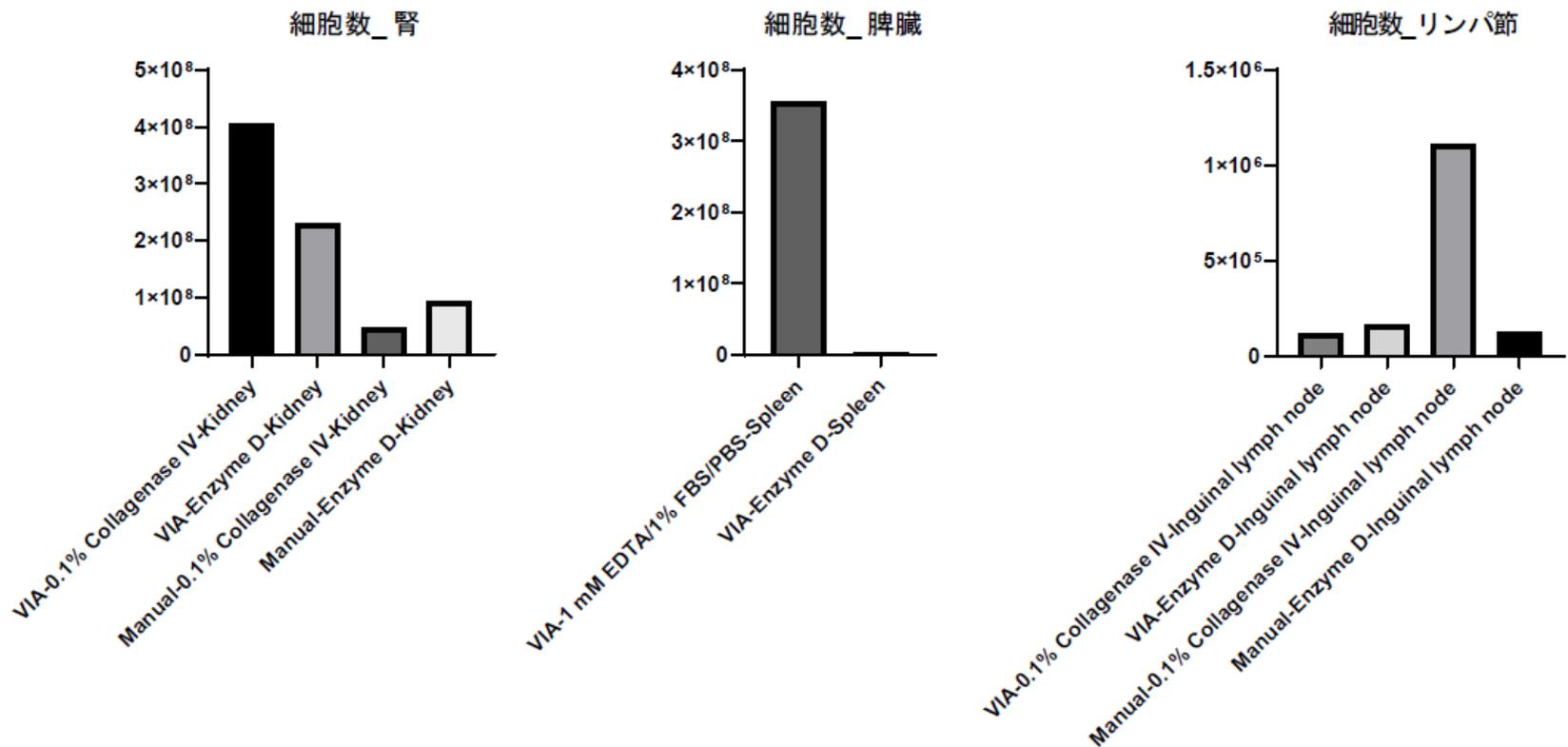
	Sample	細胞数 (10 <sup>6</sup> )	生存率	生細胞数(10 <sup>6</sup> cells)
1	VIA-0.1% Collagenase IV-Kidney	405.6	0.29	117.624
2	VIA-Enzyme D-Kidney	229.2	0.31	71.052
3	VIA-0.1% Collagenase IV-Inguinal lymph node	0.1128	0.75	0.0846
4	VIA-Enzyme D-Inguinal lymph node	0.1624	0.91	0.147784
5	VIA-1 mM EDTA/1% FBS/PBS-Spleen	355.2	0.55	195.36
6	VIA-Enzyme D-Spleen	3.648	0.18	0.65664
7	Manual-0.1% Collagenase IV-Kidney	48.18	0.42	20.2356
8	Manual-Enzyme D-Kidney	92.52	0.58	53.6616
9	Manual-0.1% Collagenase IV-Inguinal lymph node	1.11	0.5	0.555
10	Manual-Enzyme D-Inguinal lymph node	0.122	0.98	0.11956

※掲載している内容はあくまでご使用いただいたお客さまのサンプル・実験条件に基づくものであり、製品の品質を保証するものではないことをご了承ください。また、投稿いただいた内容のうち、実験手法に関する箇所は弊社推奨の使用方法を個別に検討・改善された結果を含んでいる場合があります。ご参考にされる場合は、お客さま各位の責任において実施していただきますようお願い申し上げます。

<https://www.cytivalifesciences.co.jp/technologies/tissue-dissociation/voc/dissociation-enzyme/index.html>

# 組織分散用酵素：Dissociation Enzyme Mix お客様の声：ご投稿画像・データ

## お客様の声No. 015 藤田医科大学 医学部腎臓内科学 伊藤 辰将様



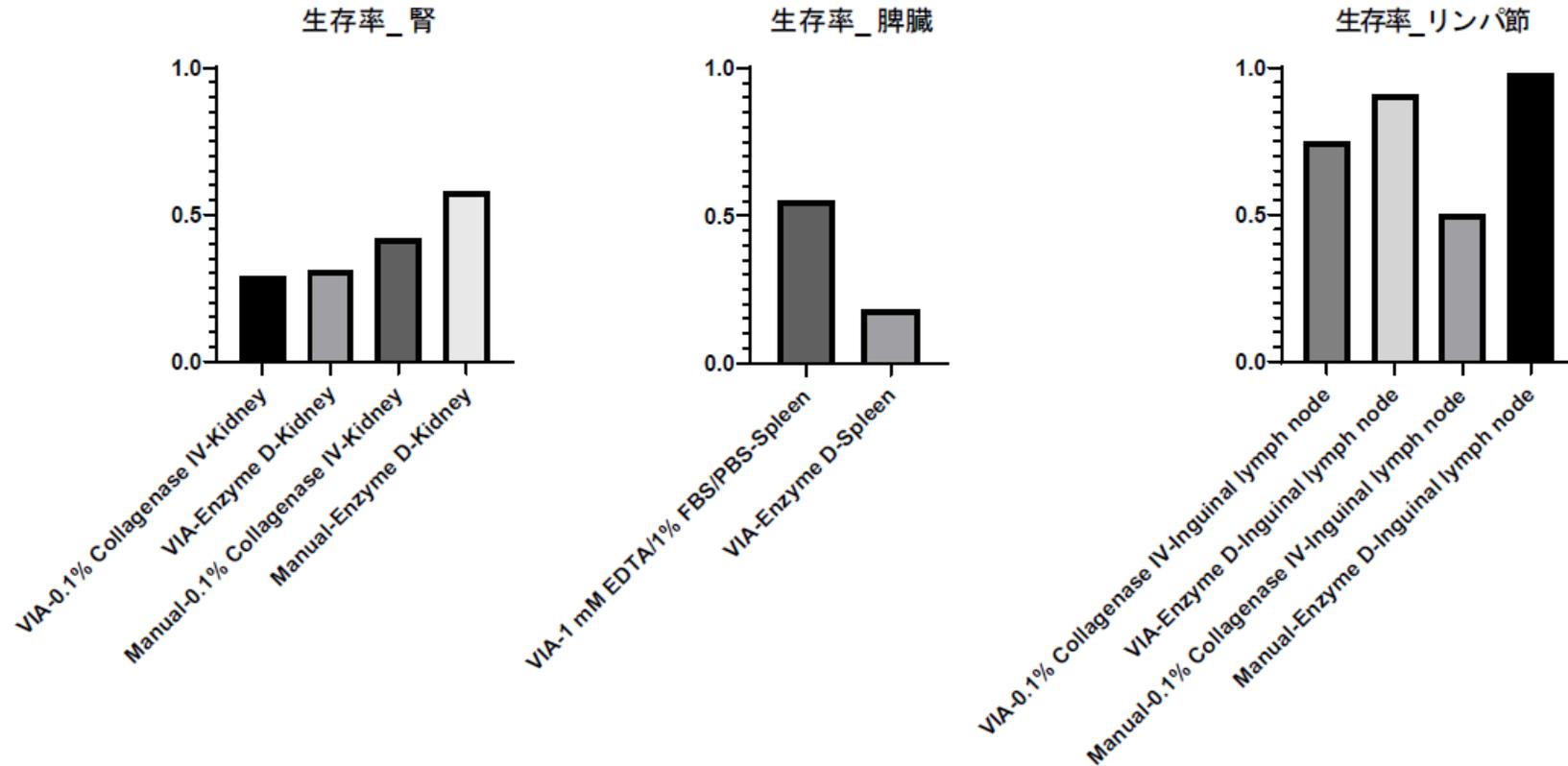
\*腎の細胞数にはゴミ(おそらくECM断片)が含まれているようである。

※掲載している内容はあくまでご使用いただいたお客さまのサンプル・実験条件に基づくものであり、製品の品質を保証するものではないことをご了承ください。また、投稿いただいた内容のうち、実験手法に関する箇所は弊社推奨の使用方法を個別に検討・改善された結果を含んでいる場合があります。ご参考にされる場合は、お客さま各位の責任において実施していただきますようお願い申し上げます。

<https://www.cytivalifesciences.co.jp/technologies/tissue-dissociation/voc/dissociation-enzyme/index.html>

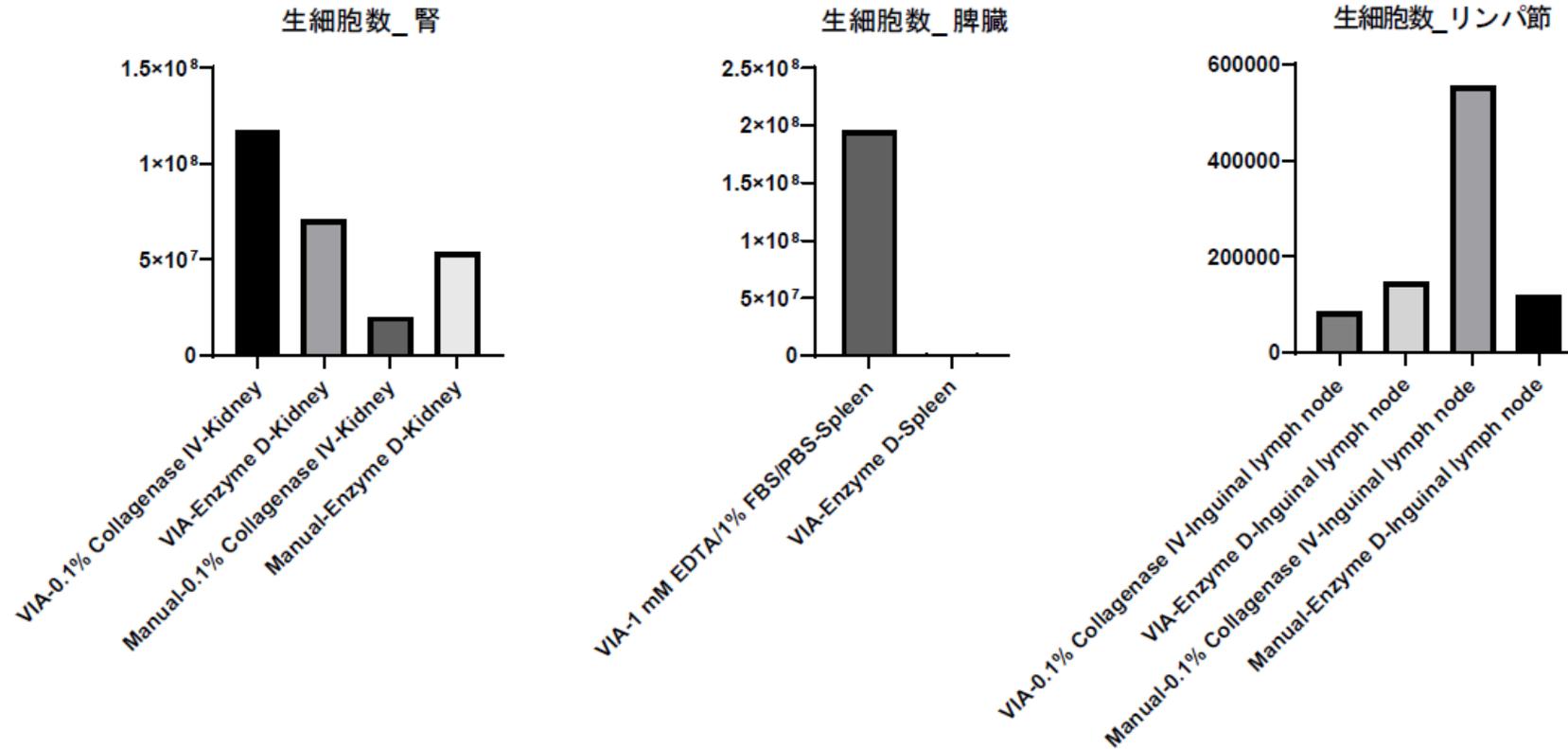
# 組織分散用酵素：Dissociation Enzyme Mix お客様の声：ご投稿画像・データ

## お客様の声No. 015 藤田医科大学 医学部腎臓内科学 伊藤 辰将様



※掲載している内容はあくまでご使用いただいたお客さまのサンプル・実験条件に基づくものであり、製品の品質を保証するものではないことをご了承ください。また、投稿いただいた内容のうち、実験手法に関する箇所は弊社推奨の使用方法を個別に検討・改善された結果を含んでいる場合があります。ご参考にされる場合は、お客さま各位の責任において実施していただきますようお願い申し上げます。

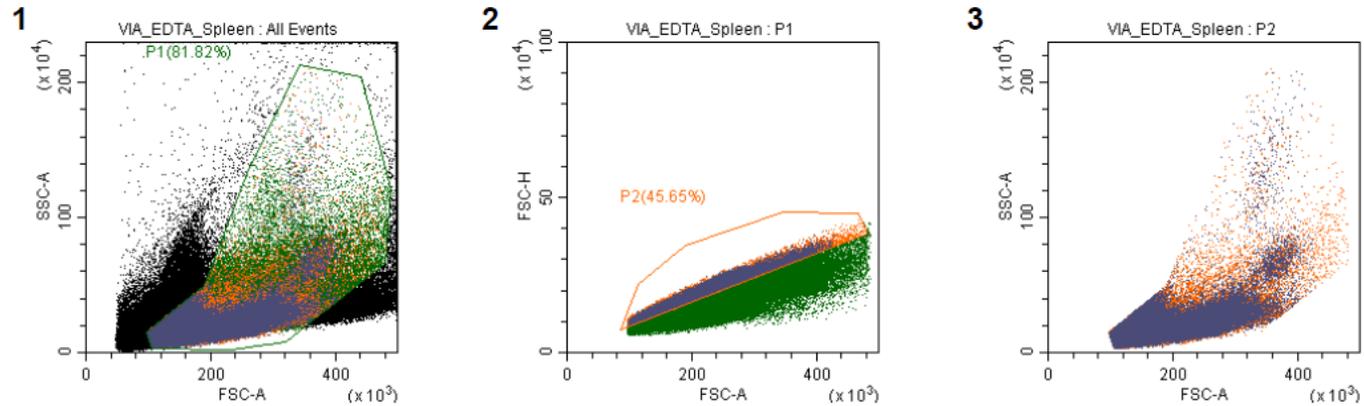
組織分散用酵素：Dissociation Enzyme Mix お客様の声：ご投稿画像・データ  
 お客様の声No. 015 藤田医科大学 医学部腎臓内科学 伊藤 辰将様



\*この比較が最も事実を反映していそうである。

※掲載している内容はあくまでご使用いただいたお客さまのサンプル・実験条件に基づくものであり、製品の品質を保証するものではないことをご了承ください。また、投稿いただいた内容のうち、実験手法に関する箇所は弊社推奨の使用方法を個別に検討・改善された結果を含んでいる場合があります。ご参考にされる場合は、お客さま各位の責任において実施していただきますようお願い申し上げます。

## Gating Strategy (Flow cytometryによる免疫細胞の評価)



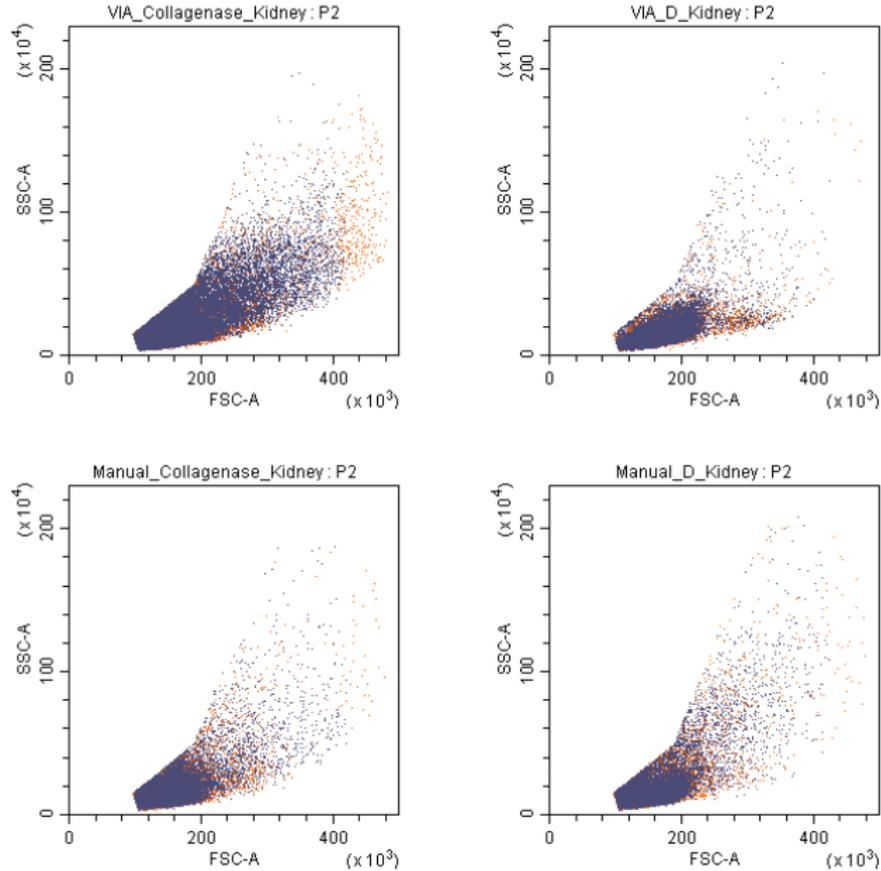
染色なし、形態のみで評価

腎臓、脾臓は臓器ごとにFACSに流す量をだいたい同じにしているため、plotの多さは概ね濃度を反映する。  
リンパ節はmanualをVIAの4倍流してしまった(間違えました)。

※掲載している内容はあくまでご使用いただいたお客さまのサンプル・実験条件に基づくものであり、製品の品質を保証するものではないことをご了承ください。また、投稿いただいた内容のうち、実験手法に関する箇所は弊社推奨の使用方法を個別に検討・改善された結果を含んでいる場合があります。ご参考にされる場合は、お客さま各位の責任において実施していただきますようお願い申し上げます。

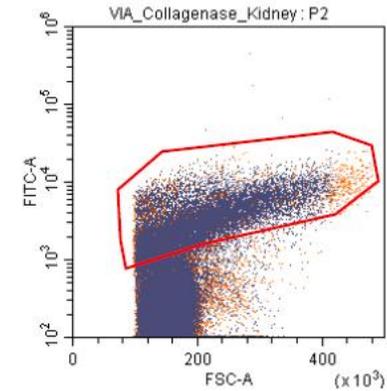
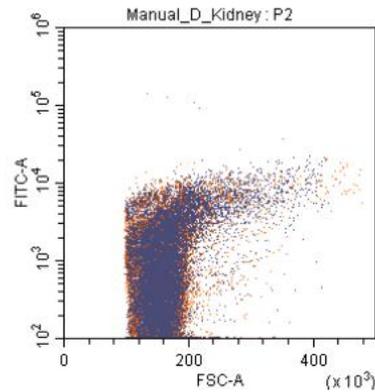
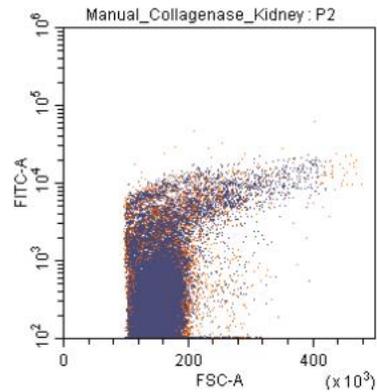
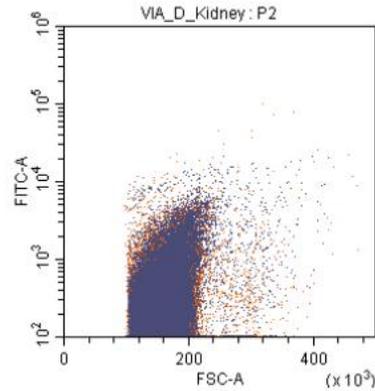
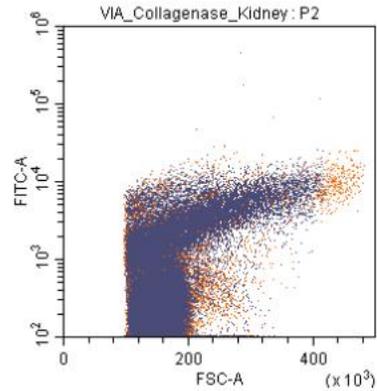
<https://www.cytivalifesciences.co.jp/technologies/tissue-dissociation/voc/dissociation-enzyme/index.html>

腎臓



次のスライドに示す自家発光からVIA-D-Kidney  
で最も腎細胞が単細胞化されていることが示唆さ  
れる。

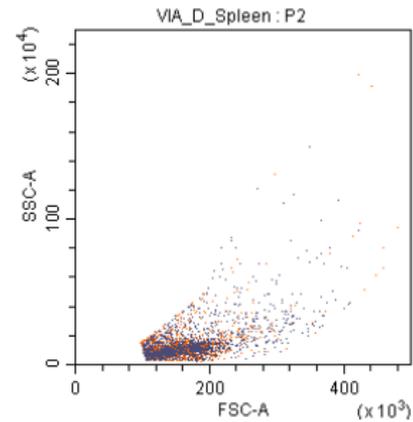
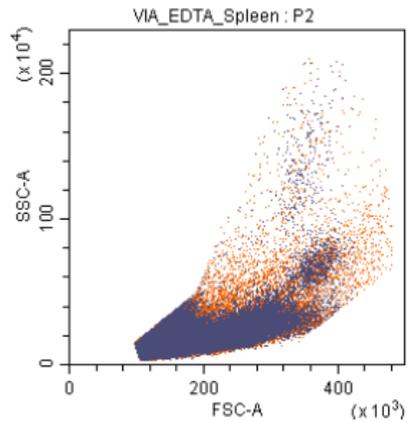
腎臓



赤枠の部分が腎実質細胞

※掲載している内容はあくまでご使用いただいたお客さまのサンプル・実験条件に基づくものであり、製品の品質を保証するものではないことをご了承ください。また、投稿いただいた内容のうち、実験手法に関する箇所は弊社推奨の使用方法を個別に検討・改善された結果を含んでいる場合があります。ご参考にされる場合は、お客さま各位の責任において実施していただきますようお願い申し上げます。

脾臓

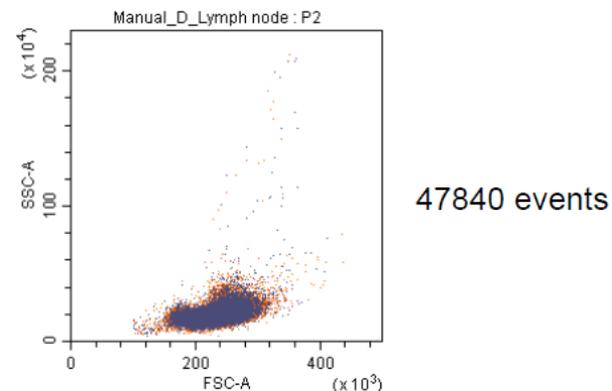
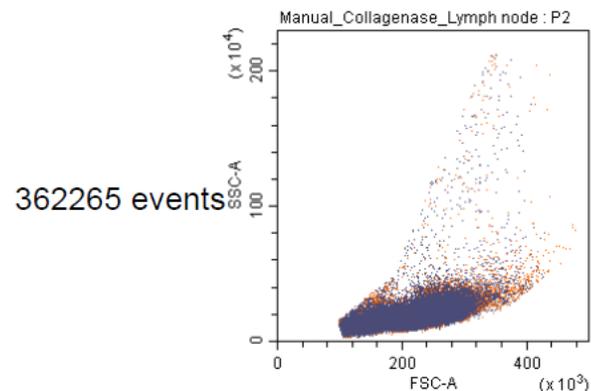
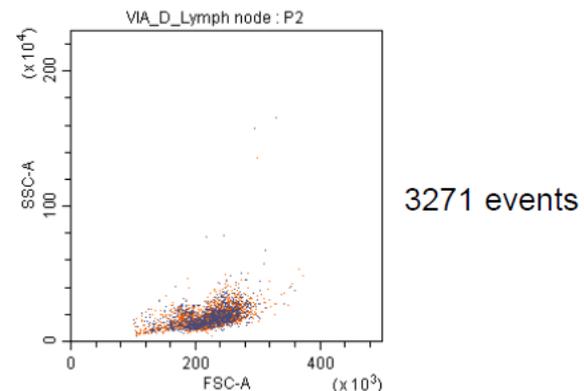
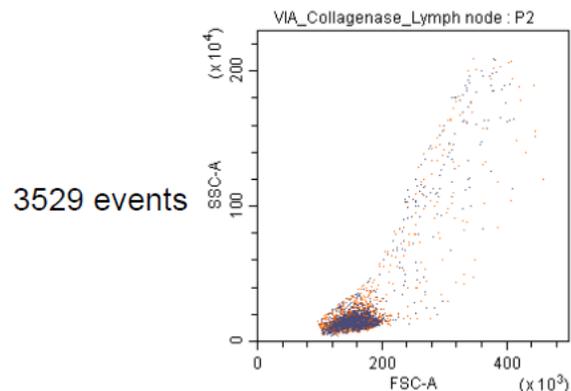


VIA-D-Spleenではほぼ免疫細胞が消滅している

※掲載している内容はあくまでご使用いただいたお客さまのサンプル・実験条件に基づくものであり、製品の品質を保証するものではないことをご了承ください。また、投稿いただいた内容のうち、実験手法に関する箇所は弊社推奨の使用方法を個別に検討・改善された結果を含んでいる場合があります。ご参考にされる場合は、お客さま各位の責任において実施していただきますようお願い申し上げます。

<https://www.cytivalifesciences.co.jp/technologies/tissue-dissociation/voc/dissociation-enzyme/index.html>

リンパ節



※掲載している内容はあくまでご使用いただいたお客様のサンプル・実験条件に基づくものであり、製品の品質を保証するものではないことをご了承ください。また、投稿いただいた内容のうち、実験手法に関する箇所は弊社推奨の使用方法を個別に検討・改善された結果を含んでいる場合があります。ご参考にされる場合は、お客様各位の責任において実施していただきますようお願い申し上げます。

## 結果

### 主目的

1. Enzyme Dにより、糸球体構成細胞を単細胞化できるか？  
→できない。
2. Enzyme Dにより、糸球体精製が可能か？  
→VIA extractorと組み合わせることで可能。ただし、免疫細胞が破壊される程度の酵素処理なので下流の実験に使用できるかは実験ごとに検討・確認が必要。
3. VIA extractorはmanualでの方法に比較して、効率よく腎細胞の採取が可能となるか？  
→可能。細胞数の観点からは酵素の影響よりもVIA extractorの影響が大きい。

### 副目的

1. Enzyme DおよびVIA extractorはリンパ節に使用可能か？  
→ともに向かない。
2. Enzyme DおよびVIA extractorは脾臓に使用可能か？  
→Enzyme Dは向かない。(経験との比較になるが,) VIA extractorはManualと同等。  
VIA extractorの方が腎を細かくできることから、樹状細胞やマクロファージを多く検出できる可能性がある。一方、好中球は減少するかもしれない。

## Limitation

1. 同胞マウスを使用しているとはいえ、n=1の実験
2. VIA extractorとManualでは数時間の時間差がある

従って、大きく異なっているものは異なるのであろうが、大きく科学的に定義できない。

## 結論

VIA extractorとEnzyme Dを組み合わせることで精製糸球体を得られる可能性がある。

※掲載している内容はあくまでご使用いただいたお客さまのサンプル・実験条件に基づくものであり、製品の品質を保証するものではないことをご了承ください。また、投稿いただいた内容のうち、実験手法に関する箇所は弊社推奨の使用方法を個別に検討・改善された結果を含んでいる場合があります。ご参考にされる場合は、お客さま各位の責任において実施していただきますようお願い申し上げます。

<https://www.cytivalifesciences.co.jp/technologies/tissue-dissociation/voc/dissociation-enzyme/index.html>