

I. コラーゲンのコーティング方法

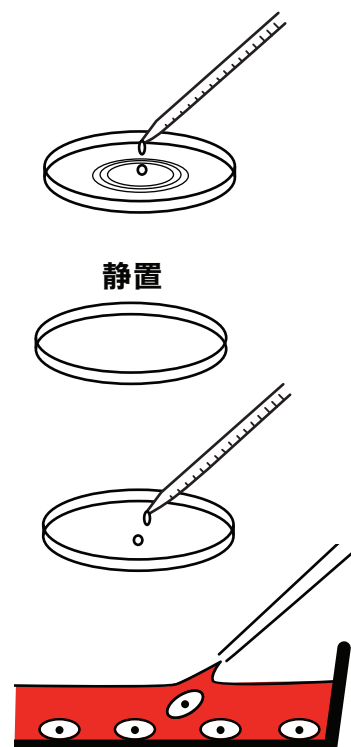
試薬

1. コラーゲン酸性溶液I-AC、I-PC (0.3%溶液、0.5%溶液)
2. 1mM HCl
3. PBS (150mM NaCl、20mM Na₂HPO₄、pH 7.4)

- (1) コラーゲン酸性溶液を1mM HClで10倍程度に希釈する^{※1}。
- (2) 培養器材の培養面に希釈したコラーゲン溶液を適量加え、培養面全体に均一に伸ばす^{※2}。
- (3) 室温で1時間以上静置した後、培養器材からコラーゲン溶液を除去する。
- (4) PBSで数回洗浄し、中和する。
- (5) 細胞懸濁液を加えて培養を行う。

※1 培養器材の表面構造や、使用する細胞の接着力に応じてコラーゲン濃度の検討が必要であるが、当社調べでは0.001-0.1%の希釈溶液を用いている事例が多い。

※2 35mmディッシュの場合、1~2ml程度使用する。コラーゲン溶液は粘性が高いため、添加量が少ないと培養面全体に伸ばしにくくなる。

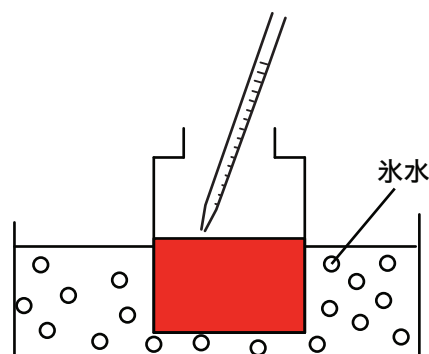


II. コラーゲン含有培地の調整方法

A. コラーゲン酸性溶液I-AC、I-PCを用いる場合

試薬

1. 培地(10倍濃度^{※3}) 1mL
2. HEPES pH7.4(100倍濃度) 0.1mL
3. NaHCO₃(100倍濃度) 0.1mL
4. 蒸留水 0.8mL
5. コラーゲン酸性溶液I-ACまたはI-PC
(0.5%溶液、0.3%溶液のいずれも可) 8mL



試薬詳細

1. 培地 (10倍濃度: 粉体の培地で通常使用する濃度の10倍 ^{※3})	1 mL
2. HEPES pH7.4 (1~5. 混合時の最終濃度が10mMになるようにする。従ってこの溶液の濃度は 10mM×100 = 1,000mM	0.1 mL
3. NaHCO ₃ (1~5. 混合時の最終濃度が10mMになるようにする。従ってこの溶液の濃度は 10mM×100 = 1,000mM	0.1 mL
4. 蒸留水	0.8 mL
5. コラーゲン酸性溶液I-ACまたはI-PC (0.5%溶液、0.3%溶液のいずれも可 ^{※4})	8 mL

(1) 氷水浴中にて1.2.3.4の順で加え、最後に5を加える。コラーゲン溶液は、粘度が高く器壁に付着したものを無視できないので、ピペティングにより洗浄洗い込みが必要となる。ピペティングの際、気泡を溶液中に入れてしまうと消泡しにくいので、気泡をいれないように注意する。

(2) 血清が必要な場合は、この混合液に2~4°Cで加える。

※3 ハンクス培地、イーグルMEMなどは、通常の濃度の10倍液を作ることが可能であるが、DMEMのような、“rich”な培地は10倍濃度で完全に溶解しないことがある。その場合は3~5倍濃度として調製し、コラーゲン、または蒸留水の量で調節する。

※4 この方法での最終コラーゲン濃度は、0.5%溶液を使用した場合は約0.4%、0.3%溶液を使用した場合は約0.24%となる。尚、コラーゲンゲルの硬さはコラーゲン濃度に依存するため、柔らかいゲルを作る場合は、5.のコラーゲン溶液の量を減らし、その分蒸留水で補う(最終コラーゲン濃度0.1%まではゲル化する)。

B. コラーゲン中性溶液を使用する場合

(1) 冷凍保管品を25°Cの温水浴で攪拌しながら解凍する
(攪拌しないと一部ゲル化することがある)。^{※5}

(2) 解凍が終了したら直ちに氷水浴へ入れる。

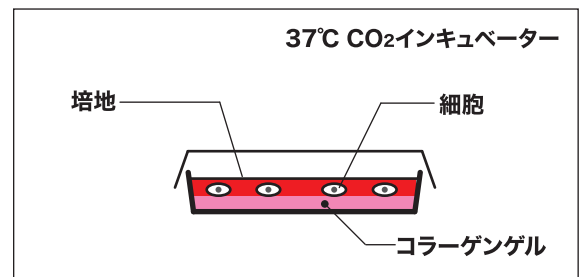
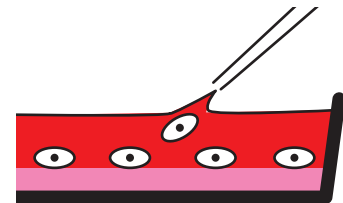
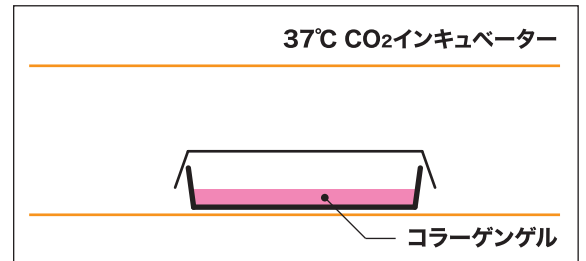
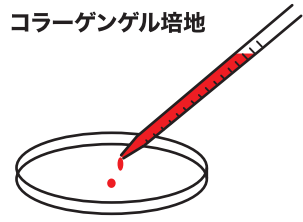
(3) 血清が必要な場合はこの溶液に2~4°Cで加える。

※5 複数回に分けて使用する場合は、凍結、融解の繰り返しを避けるため、1回の実験に必要なコラーゲン溶液使用量を試薬瓶に小分けして冷凍保存し、必要な分を解凍して使用すると良い。

Ⅲ. コラーゲンゲル上培養

- (1) コラーゲン含有培地AまたはBを、培養器材に適量(35mmディッシュで0.5mL~1mL、50mmディッシュで1mL~3mL)加える。
- (2) 培養器材を37°C CO₂インキュベーターにて加温し、30分~1時間静置してコラーゲンをゲル化させる。
- (3) 細胞懸濁液を加えて通常の培養を行なう。

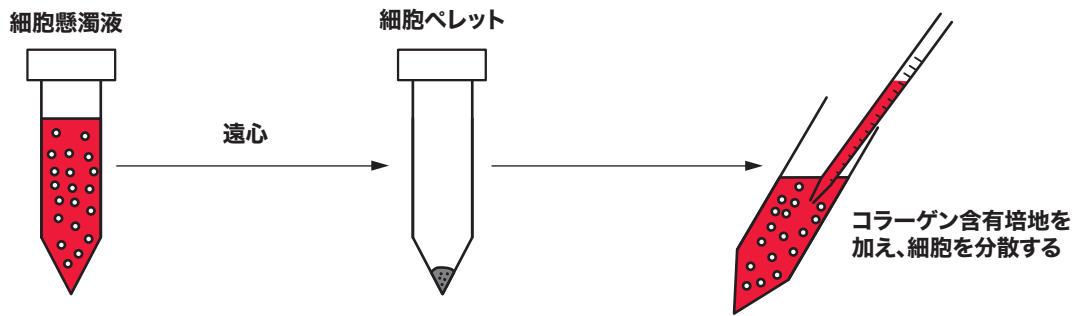
コラーゲンゲル培地



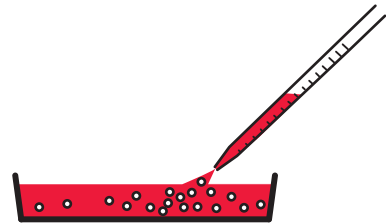
IV. コラーゲングル内培養

(1) 細胞懸濁液を遠心し、上清をぬく。

細胞のペレットに、コラーゲン含有培地を加え、気泡を巻込まない様にピペッティングして、細胞を分散する。

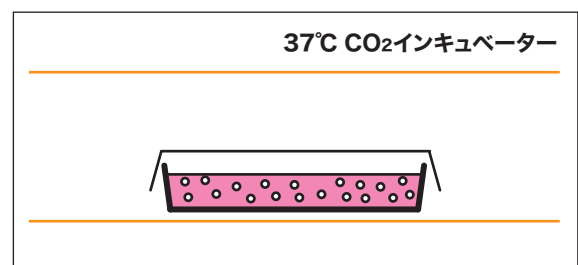


(2) 細胞を懸濁したコラーゲン含有培地を培養器材へ加える。



(3) 培養器材を37°C CO₂インキュベーター内に移し、コラーゲンをゲル化させる。^{※6}

※6 コラーゲン濃度が高いほど、ゲル化速度は速くなるため、ゲル形成中に細胞が沈むのを避けるには、コラーゲン濃度を0.4%以上にすると良い。



(4) 培地を重層し、培養する。培養期間が長い場合は、重層した培地を適宜交換する。

