

目次

【1】はじめに

1-1 使用前の注意事項-----	2
保管方法	
対応する 24well プレート	

【2】基本的な使用・評価方法

2-1 細胞培養-----	2
細胞播種	
培地交換	
2-2 培養後の評価-----	3
細胞回収	
RNA 抽出	
位相差顕微鏡観察・蛍光顕微鏡観察	
フレームからのメンブレンの回収および細胞観察	
凍結ブロック作製	
凍結切片作製	
免疫蛍光染色	

【3】表皮モデルの作製・評価方法

3-1 表皮モデルの作製-----	6
正常ヒト表皮角化細胞に関する注意事項	
分化誘導培地の調製	
FibColl への細胞播種および分化誘導	
表皮成熟化培地の調製	
気液界面培養による表皮分化促進	
3-2 表皮モデルの評価-----	8
表皮モデル・メンブレンの回収	
RNA 抽出	
Reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR)	
タンパク質抽出	
凍結ブロック作製	
凍結切片作製	
HE 染色	
免疫蛍光染色	

【4】製品情報----- 11

FibColl® 高透過性アテロコラーゲンインサートラインナップ	
関連製品	
よくある Q&A (Web サイト)	

【1】はじめに

1-1 使用前の注意事項

保管方法

一度開封した未使用のFibCollは、密封できる容器に入れ、高温多湿を避けて保管する。^{注1}

注1 加湿後に再乾燥するとアテロコラーゲンの線維構造が変化し、透過性が低下するため、乾燥状態を保つ。

対応する24wellプレート

FibCollは製品添付の24wellプレート（IWAKI、製品番号：3820024）に最適化されているが、各社から市販されている24wellプレートにも使用可能である。^{注2}

注2 一部の海外製の24wellプレートはwellにバリがあり、FibCollをセットするとFibCollの傾きが生じることやプレートの蓋が閉まらないこともあり得る。

当社にて検証済みの製品は、以下の通り。

メーカー名	型番
Corning	353047
Greiner BioOne	662160
Sarstedt	83.3922.300
TPP	92024
TrueLine	TR5002

【2】基本的な使用・評価方法

2-1 細胞培養

細胞播種

- (1) Well内に600μL インサート内に100μLの培地を加え、CO₂インキュベーター内に30分以上静置してインサートを平衡化する。
- (2) Well内とインサート内の培地を除く。^{注1,2}
 - 注1 Well内の培地はアスピレーターで除き、インサート内の培地はマイクロピペットを使用して慎重に除くなどして、培地を除くときに膜を破かないように注意する。
 - 注2 フレームに培地交換用の孔が2つあり、FibCollを取り外さなくても孔を通してwell内の培地にアクセスして除去できる。
- (3) Well内に新しい培地を600μL加える。^{注3}
 - 注3 共培養する場合は、well内に1種類目の細胞懸濁液600μLを入れる。
- (4) インサート内に細胞懸濁液を100μL加える。

膜への播種細胞数目安： 1×10^4 cells^{注4}（培養面積0.33cm²）

 - 注4 一例として線維芽細胞を用いた場合の数値で、最適な播種細胞数は細胞種や実験の目的によって調整する。
- (5) CO₂インキュベーターに入れて培養する。

培地交換

- (1) Well内とインサート内の培地を除く。
- (2) インサート内に新しい培地を100 μ L加える。
- (3) 続いてwell内に新しい培地を600 μ L加える。
- (4) CO₂インキュベーターに入れて培養する。

2-2 培養後の評価

細胞回収

必要な試薬

- ① PBS (-)
- ② トリプシン溶液 (0.05% トリプシン/EDTAなど)

手順

- (1) Well内とインサート内の培地を除去する。
- (2) Caを含まないPBS (-) などの緩衝液を添加し、洗浄後除去する。
- (3) トリプシン溶液を100 μ L添加し、2分間程度インキュベートする。^{注1}
注1 使用する細胞によって、酵素液や処理時間を検討する。
- (4) 緩衝液などでピペッティングして細胞を回収する。

生細胞数測定

市販の生細胞数測定キット (WST-8など) を使用して、測定可能。

RNA抽出

必要な試薬

- ① PBS (-)
- ② 市販のRNA抽出試薬もしくはキット

手順

- (1) 培地を除去してからPBS(-)をインサート内に100 μ L、well内に600 μ L加えてリンスし、除去する。
- (2) (1)の作業もう一度繰り返す。
- (3) 以降は、市販のRNA抽出試薬やキットを取扱説明書通りに使用する。

位相差顕微鏡観察・蛍光顕微鏡観察

注1 膜が透明ではないため通常の平面培養ほど明瞭ではないが、位相差顕微鏡を用いて細胞を観察することは可能である。

注2 細胞培養中の蛍光観察は膜の影響で細胞がぼやけて観察が困難である。そのため、蛍光を観察する場合は後述の方法でフレームからメンブレンを切り離した後に観察すると良い。

フレームからのメンブレンの回収および細胞観察

必要な機器および試薬

- ① 固定液（4%パラホルムアルデヒドなど）
- ② PBS
- ③ ピンセット
- ④ 市販のディスポーザブルメス（貝印社製ディスポメスNo.11など）
- ⑤ スライドガラスおよびカバーガラス
- ⑥ 封入剤

手順

- (1) 培地を除き、PBS で洗浄した後に固定液で適宜固定し、固定液除去後に PBS で洗浄する。^{注1}
注1 細胞層がメンブレンから剥がれる可能性があるため、PBS は穏やかに注ぐ。
- (2) FibColl をピンセットで取り出し、メンブレン裏の残液を滅菌済みのコットンや綿棒などで吸水する。
- (3) FibColl を上下逆さまにして持ち、市販のディスポーザブルメスなどを用いて缶切りの要領でメスを上下に小刻みに動かしながら、フレームに沿ってメンブレンの周縁部を切り取る(図1)。^{注2,3,4}



図1.メンブレンの切り出しの様子

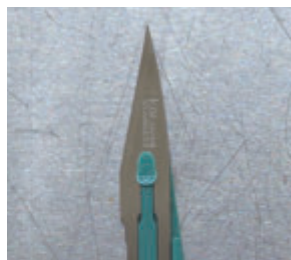


図2.切り出しに適したメスの刃先形状

注2 ディスポーザブルメスなどは、先端が細く尖っているとメンブレンを切り出しやすい(図2)。尚、必要に応じて、FibColl をプレートのフタなどの上に置いて作業しても良い。

注3 細胞層がメンブレンから剥離する原因になるので、慎重に操作する。この時、細胞層が乾燥しないように注意する。

注4 メンブレンを扱うピンセットは、細胞層を傷つけないように鉤や溝のないものが望ましい。

- (4) ピンセットでメンブレンを回収する(図3)。免疫染色などを行い、組織学的評価をする場合は、次項「凍結切片作製」もしくは「免疫蛍光染色」に進む。
- (5) 免疫染色などの処理をせずにそのまま細胞を観察する場合、メンブレンをスライドガラスに載せて必要に応じてPBSまたは封入剤等を添加し、カバーガラスで覆ってから観察する(図4)。^{注5}
- 注5 細胞播種面がレンズ側になるように向けて封入する。

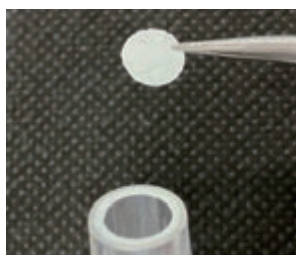


図3.切り出したメンブレン



図4.メンブレンにカバーガラスをかけた様子

凍結ブロック作製

- (1) 一般的な手法で凍結包埋剤を用いて凍結ブロックを作製する。^{注1,2}
- 注1 目的に応じてパラフィン包埋を選択しても良い。
- 注2 メンブレンの折れ曲がりや傾き、氷晶による損傷を防ぐため、一度少量の凍結包埋剤に馴染ませてから凍結ブロックを作製すると良い。

以下に凍結ブロック作製時のポイントとなる工程のみを、抜粋して紹介する。

- (1) 24wellプレートの蓋など、平らな容器に凍結包埋剤を少量注ぐ。
 - (2) (1)の凍結包埋剤の上に、回収したメンブレンの細胞面が上になるよう置いた後、全体が十分に覆われるよう凍結包埋剤を加え、約10分間静置して馴染ませる。
 - (3) 包埋皿にメンブレンを移して新しい凍結包埋剤で覆い、凍結させる。^{注3}
- 注3 ピンセット等でメンブレンを底面に沈め、メンブレンが水平になっていた方が綺麗な切片を作製し易い。
- (4) 深めの容器に凍結包埋剤を充填し、(3)で凍結させたメンブレンを容器の底面と垂直になるように入れ、再度凍結させる。

凍結切片作製

- (1) 凍結ブロックをクライオスタット庫内で約30分静置した後、一般的な手法で面出し後に薄切する。^{注1}
- 注1 当社ではクライオスタットの庫内を20℃、試料台を25℃に設定し、粘着フィルム法(川本法)を用いて厚さ7μmの切片を作製している。^{注2}
- 注2 川本法は切片を粘着フィルムで支持できるため、短時間の訓練で凍結切片を綺麗に作製できる。

免疫蛍光染色

必要な機器および試薬

- ① 固定液 (4%パラホルムアルデヒドなど)
- ② TBS-T(Tris Buffered Saline + 0.05% Tween20)

- ③ 市販のブロッキング剤など
- ④ PBS
- ⑤ 各種一次抗体、二次抗体
- ⑥ 核染色液^{注1}

注1 コラーゲン自体に青色の自家蛍光があるので、DAPI ではなく DRAQ5 などの核染色液を使用すると観察しやすい。

手順

- (1) 前ページのフレームからのメンブレンの回収に従い、細胞を固定液で固定した後にメンブレンを切り出す。
- (2) 必要に応じて切り出したメンブレンを成形すると、表裏が判別しやすい (図5)。

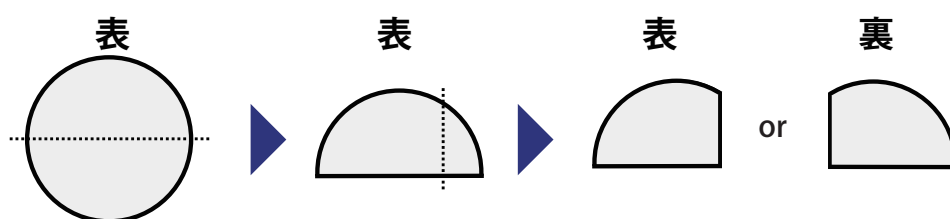


図5.切り出したメンブレンの成形例

- (3) 成形したメンブレンにTBS-Tを加えて15分間静置する。
- (4) TBS-Tを除去し、ブロッキング剤を入れ、室温で1時間静置する。
- (5) ブロッキング剤を含むTBS-Tで希釈した一次抗体液を添加して4°Cで一晩インキュベートする。
- (6) 一次抗体液を除去し、TBS-Tで3回洗浄する。
- (7) ブロッキング剤を含むTBS-Tで希釈した二次抗体液を添加し、遮光して室温で3時間インキュベートする。
- (8) 二次抗体液を除去し、TBS-Tで3回洗浄したのちに、PBSに置換する。
- (9) 核染色液をPBSで希釈した溶液を添加し、遮光して室温で15分間インキュベートする。
- (10) 核染色液を除去し、PBSで1回洗浄する。
- (11) スライドガラスに封入剤を用いて封入後、細胞播種面がレンズ側になるように向けて観察する。

[3] 表皮モデルの作製・評価方法

3-1 表皮モデルの作製

正常ヒト表皮角化細胞に関する注意事項

- (1) 正常ヒト表皮角化細胞 (以下、表皮角化細胞) は新生児由来のものを推奨する。^{注1,2}
 - 注1 表皮角化細胞の継代数は3継代以内を推奨する。
 - 注2 細胞のロット間差が気になる場合は、ロット間の比較や複数ドナー由来の細胞を検討する。
- (2) 正常な分化誘導には、表皮角化細胞が未分化状態を保つ必要があるため、ピペティングなど刺激を伴う操作は出来る限り穏やかに行うこと。また、均一な表皮層とするため、細胞播種直後は特に慎重に取り扱う。

- (3) 表皮角化細胞の良好な分化能を維持するため、細胞を増殖させる段階では細胞密度が80%コンフルエントを超えないように注意する。^{注3}

注3 細胞が密になり過ぎると、収縮を起こしてしまう可能性があり、以降の表皮モデル作製に支障をきたす。

分化誘導培地の調製 (例：10mLを調製する場合)

必要な試薬

試薬名	容量	終濃度
① 表皮角化細胞増殖用培地 (以下、増殖用培地) ^{注1}	9.85mL	—
② 0.1M塩化カルシウム二水和物 ^{注2}	150 μ L	1.5mM

- ①に②を加え、分化誘導培地を調製する。

注1 細胞の販売元やメーカーが推奨している培地を用いる。

注2 既に含有している培地もあるため、その場合は添加容量を調整し、終濃度を合わせる。

FibCollへの細胞播種および分化誘導

- 分化誘導培地をwell内に600 μ L、インサート内に100 μ Lずつ加え、CO₂インキュベーター内に約30分静置してFibCollのメンブレンを平衡化する。^{注1}

注1 FibCollの向きを揃えたとフレームに2つある培地交換孔の位置も揃うため、以降の培地交換の際の作業性が良い。
- 事前に培養した表皮角化細胞を30mM HEPES Bufferで洗浄する。
- 細胞解離酵素TrypLE試薬を2mL加え、細胞全体に行き渡らせた後、クリーンベンチ内 (室温) で10分間静置する。^{注2}

注2 当社ではTrypsinより細胞への傷害が少ないTrypLE試薬を用いている。
- (3)を増殖用培地18mLで懸濁し、50mL遠心管に移す。
- 血球計算盤などで細胞数をカウントする。
- 1,000rpm、3分、室温の条件で遠心する。
- 上清を取り除いた後、分化誘導培地に懸濁し、細胞濃度 1.0×10^6 cells/mLに調製する。
- (1)で加えたwell内とインサート内の培地をアスピレーターで全て取り除く。^{注3,4}

注3 メンブレンの破損が心配な場合は、マイクロピペットも適宜併用して慎重に除く。

注4 フレームに培地交換孔があるため、FibCollをプレートから取り外さなくてもwell内の培地にアクセス可能である。
- インサート内に(7)で調製した細胞懸濁液を180 μ L播種した後、well内には分化誘導培地を900 μ L加える。
- FibCollのメンブレンの下に気泡が無いかを確認し、気泡がある場合にはプレートを傾けるなどして取り除く。^{注5}

注5 プレートを傾けた際にインサートから懸濁液が漏れないようにし、また、以降の培地操作でも気泡に注意する
- 24wellプレートの蓋をし、CO₂インキュベーターに入れて3日間液内培養する。^{注6,7}

注6 インサートがwellにきちんと収まっていないとプレートの蓋が閉まらないことがあるため、注意する。

注7 培養2日目にwell内の培地を交換することを推奨する。

表皮成熟化培地の調製 (例：10mLを調製する場合)

必要な試薬

試薬名	容量	終濃度
① 分化誘導培地	9.979mL	—
② 25mg/mL アスコルビン酸2-リン酸セスキマグネシウム塩水和物	20 μ L	50 μ g/mL
③ 100 μ g/mL Keratinocyte Growth Factor(KGF)	1 μ L	10ng/mL

①、②、③の順で加え、表皮成熟化培地を調製する。

気液界面培養による表皮分化促進

- プレートを斜めに傾け、マイクロピペットで培地を概ね取り除く。
- メンブレンの破損に注意し、アスピレーターでインサート内の培地を完全に取り除く。^{注1、2}
 注1 メンブレンの破損が心配な場合は、マイクロピペットも適宜併用して慎重かつ確実に培地を除く。
 注2 正常な表皮の分化に表皮表面の乾燥が重要であるため、培地除去後に残液がないことを目視で入念に確認する。
- FibCollのメンブレンがザラツとした組織に全て覆われていて、組織やメンブレンに穴が空いていないことを確認する。
- アスピレーター等でWell内の培地をすべて取り除く。^{注3}
 注3 インサート内の培地を除去後、表皮成熟化培地を 500 μ L 加えた新しい well に FibColl を移しても良い。
- 表皮成熟化培地500 μ Lをwell内に加え、CO₂インキュベーターで培養する。^{注4}
 注4 気液界面培養から約7日目に、角質層の形成が確認できる。気液界面培養の期間は、目的に応じて適宜調整する。
- Well内の表皮成熟化培地は2日に1回の頻度で交換する。

3-2 表皮モデルの評価

表皮モデル・メンブレンの回収

- Well内の培地をアスピレーターなどで除き、緩衝液で表皮モデル上部及びメンブレン裏を洗浄する。^{注1,2}
 注1 その後の実験系に応じて、適した緩衝液を選択する。
 注2 表皮モデルがメンブレンから剥がれる可能性があるため、緩衝液は穏やかに注ぐ。
- FibCollをピンセットで取り出し、メンブレン裏の残液を滅菌済みのコットンや綿棒などで吸水する。
- FibCollを上下逆さまにして持ち、市販のディスポーザブルメスなどを用いて缶切りの要領でメスを上下に小刻みに動かしながら、フレームに沿ってメンブレンの周縁部を切り取る (図1)。^{注3、4、5}



図1.メンブレンの切り出しの様子

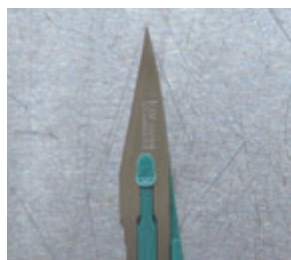


図2.切り出しに適したメスの刃先形状

- 注3 ディスポーザブルメスなどは、先端が細く尖っているとメンブレンを切り出しやすい(図2)。尚、必要に応じて、FibColl をプレートのフタなどの上に置いて作業しても良い。
- 注4 表皮モデルがメンブレンから剥離する原因になるので、慎重に操作する。この時、表皮モデルが乾燥しないように注意する。
- 注5 表皮モデル・メンブレンを扱うピンセットは、表皮モデルを傷つけないように鉤や溝のないものが望ましい。また、ピンセットで掴む際は、表皮モデルだけを掴まず、表皮モデルとメンブレンの両方を掴むように注意する。

RNA抽出

市販のRNA抽出試薬やキットなどを用いた、組織からの抽出プロトコルに従う。^{注1}

- 注1 当社では、回収した表皮モデル・メンブレンをRNA安定化試薬に浸漬して安定化させている。その後、ホモジナイザーで破碎してからAcid Guanidium-Phenol-Chloroform (APGC)法でtotal RNAを抽出し、スピナラムで精製している。

Reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR)

一般的な手法でRTqPCRを行い、表皮分化マーカーなどの発現を確認する。

タンパク質抽出

目的に応じた組織溶解液を用い、タンパク質を抽出する。^{注1、2}

- 注1 当社では、回収した表皮モデル・メンブレンの表皮モデルのみをピンセットで掴み、メンブレンを除いてから組織溶解液150 μ Lに浸漬し、ホモジナイザーで破碎した後、ソニケーターで核酸を破壊している。
- 注2 表皮モデルをメンブレンからピンセットで回収する際、一部がメンブレンに残ることがあるため、注意する。

凍結ブロック作製

一般的な手法で凍結包埋剤を用いて凍結ブロックを作製する。^{注1、2}

- 注1 目的に応じてパラフィン包埋を選択しても良い。
- 注2 表皮モデル・メンブレンの折れ曲がりや傾き、氷晶による損傷を防ぐため、一度少量の凍結包埋剤に馴染ませてから凍結ブロックを作製すると良い。

以下に凍結ブロック作製時のポイントとなる工程のみを、抜粋して紹介する。

- (1) 24wellプレートの蓋など、平らな容器に凍結包埋剤を少量注ぐ。
- (2) (1)の凍結包埋剤の上に、回収した表皮モデル・メンブレンの表皮モデルの面が上になるよう置いた後、全体が十分に覆われるよう凍結包埋剤を加え、約10分間静置して馴染ませる。
- (3) 包埋皿に表皮モデル・メンブレンを移して新しい凍結包埋剤で覆い、凍結させる。^{注3}

注3 ピンセットなどで表皮モデル・メンブレンを底面に沈め、表皮モデル・メンブレンが水平になっていた方が綺麗な切片を作製し易い。
- (4) 深めの容器に凍結包埋剤を充填し、(3)で凍結させた表皮モデル・メンブレンを容器の底面と垂直になるように入れ、再度凍結させる。

凍結切片作製

凍結ブロックをクライオスタット庫内で約30分静置した後、一般的な手法で面出し後に薄切する。^{注1}

注1 当社ではクライオスタットの庫内を 20℃、試料台を 25℃に設定し、粘着フィルム法(川本法)を用いて厚さ 7μm の切片を作製している。^{注2}

注2 川本法は切片を粘着フィルムで支持できるため、短時間の訓練で凍結切片を綺麗に作製できる。

HE染色

一般的な手法で HE 染色を行い、下記のような 4 層構造が形成されているかを確認する(図 1)。^{注1}

注1 複数回の実験で得られた個別の画像を掲載しており、色調が段階的に変化する訳ではない。各画像はあくまでも一例であり、使用する細胞のロットや操作手技などにより観察像は異なる。

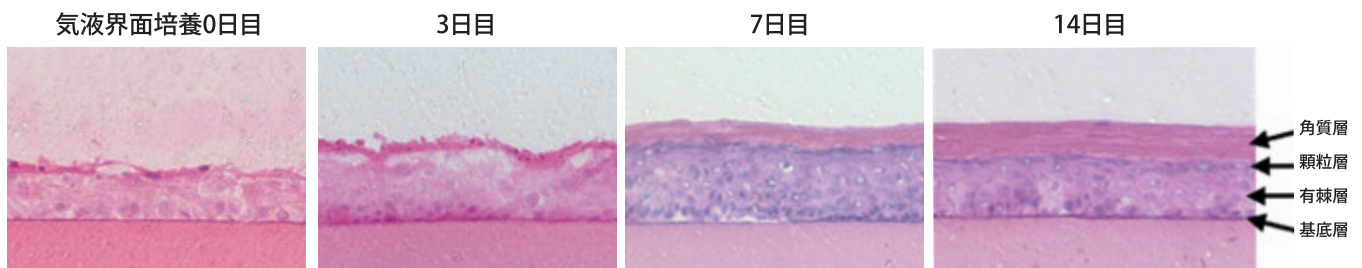


図1. FibCollを用いた気液界面培養0、3、7、14日目の表皮モデルのHE染色像例(断面)

免疫蛍光染色

一般的な手法で免疫蛍光染色を行い、下記のような表皮分化マーカーなどの発現を確認する(図 1)。^{注1}

注1 各画像はあくまでも一例であり、使用する細胞のロットや操作手技等により観察像は異なる。

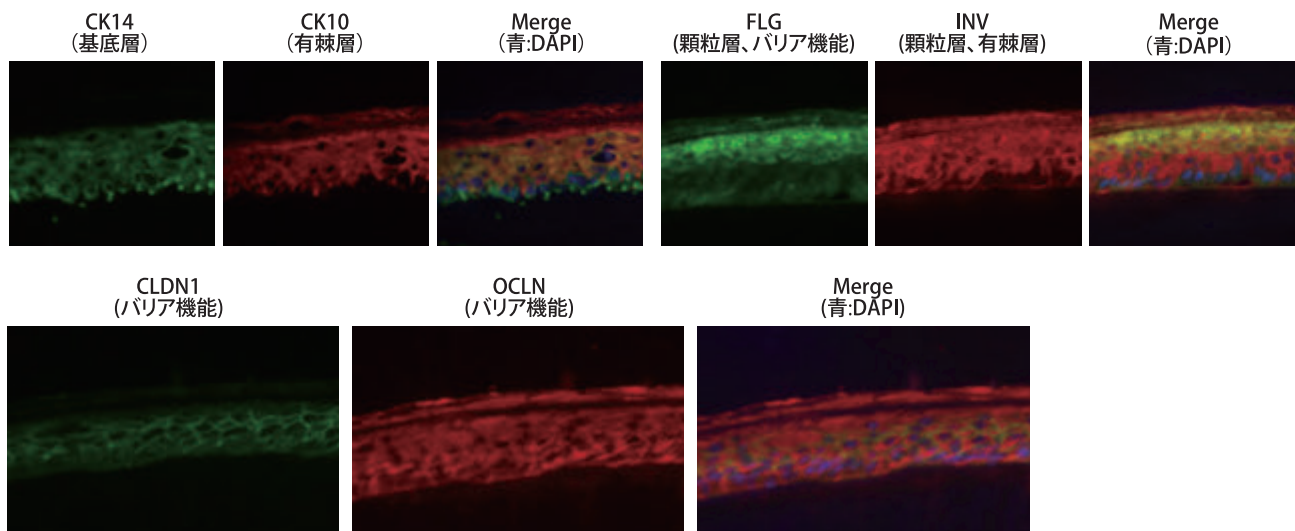


図1. FibCollを用いた気液界面培養7日目の表皮モデルの免疫蛍光染色像例(断面)

【3】製品情報

FibColl®高透過性アテロコラーゲンインサートラインナップ

製品番号	製品	サイズ	包装
FAI-24	FibColl® 高透過性アテロコラーゲンインサート 24well用 無菌 FibColl Atelocollagen Inserts 24	製品:φ19mm×16mm 膜:φ6.4mm 膜厚:約35μm	24個/箱

関連製品

製品番号	製品	サイズ	包装
CM-6	透過性コラーゲン膜6wellプレート用 無菌 Atelocollagen, Permeable Membrane for 6-well Culture Plate	製品:φ31mm×8mm 膜:φ26mm 膜厚:25μm	12個/箱
CM-24	透過性コラーゲン膜24wellプレート用 無菌 Atelocollagen, Permeable Membrane for 24-well Culture Plate	製品:φ14mm×8mm 膜:φ9mm 膜厚:25μm	24個/箱
CLF-01	研究用コラーゲン膜 Atelocollagen Membrane	膜:100mm×90mm 膜厚:35μm	1枚/箱

コラーゲンの種類

ウシ皮由来アテロコラーゲン

よくあるQ&Aはこちら

<https://atelocollagen.com/atelocell/faq/14>

