

## 角化細胞の3次元培養

### 材料

細胞: HaCaT or SCC cell lines, 1/2 x 25 cm<sup>2</sup> flask / well (c.a. 3 x 10<sup>6</sup> cells/ well)

human dermal fibroblasts, 1 x φ10 cm dish / 1~2 x 6 well plates

培地: HaCaT: MCDB153 (Ca<sup>++</sup>=0.1 mM) / Gentamicin (10 μg/ml) / EGF (10 ng/ml)

/ 5% dialyzed FBS

fibroblasts: DMEM / Gentamicin (10 μg/ml) / 10% FBS

collagen gel 作製用: 10 x concentrated MEM

3D culture 用: MCDB153 : DMEM= 1: 1 / Gentamicin (10 μg/ml) / 10% FBS

EGF 10 ng/ml

他に必要に応じて

bovine pituitary extract (Gibco 0.1 mg/ml)

insulin 5 μg/ml

hydrocortisone 1.4 μM

putrescine 60 μM

ethanolamine 0.1 mM

phosphoethanolamine 0.1 mM

sodium selenite 25 nM

### その他の溶液

collagen gel (新田ゼラチン Cellmatrix type IA)

collagen gel neutralizing buffer: 0.05 N NaOH / 2.2% NaHCO<sub>3</sub> / 200 mM HEPES

0.05 N NaOH 100 ml に NaHCO<sub>3</sub> 2.2 g, HEPES 4.77 g を溶解後、ろ過滅菌する。

EDTA-PBS: 0.02% EDTA2Na / PBS, autoclaved

trypsin solution: 0.01% trypsin / 0.02% EDTA2Na / PBS

trypsin (Sigma, type I etc.)をオートクレーブした EDTA-PBS に 0.1g / 10 ml で溶解後、ろ過滅菌し凍結保存(100 x stock sol.)、EDTA-PBS で 10 倍希釈したもの(10 x stock sol.)を再凍結保存し、用時解凍希釈して用いる。

## 培養 flask など

細胞培養フラスコ 25 cm<sup>2</sup>  
細胞培養ディッシュ φ10 cm  
細胞培養マルチウエルプレート (6 well)  
セルストレイナー (Falcon 2350)  
鋏 (滅菌済み)  
ピンセット (滅菌済み)  
注射シリンジ  
注射針 (21 G)

## 方法 (6 well plate, 2枚分)

- 1 クリーンベンチ内に氷を準備し、コラーゲン溶液、10 x MEM、neutralizing buffer、FBS を冷却する。
- 2 φ10 cm ディッシュ1~2枚分の線維芽細胞をトリプシナイズし、1,200 rpm で5分遠心する。
- 3 氷中でコラーゲン溶液 (32 ml)、10 x MEM (4 ml)、neutralizing buffer (4 ml)を 8: 1: 1 の割合で取り、氷中で泡立てないようにピペティングし、均一になるまで混和する。  
注:各 well に 2~3 ml ずつ分注するが、ゲルは粘稠性が高く、tube やピペットに残るので多めにつくる必要がある。各 well に 3 ml ずつ分注する場合、6 well プレート1枚につき最低でも total 22 ml 以上は必要。
- 4 線維芽細胞を 4 ml の氷冷した FBS に浮遊させ、中和コラーゲン溶液に加え、氷中で混和し均一になったら、6 well プレートに 3 ml/well で分注し、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 30 分ゲル化させる。ゲルの上に蒔く上皮細胞(5)が間に合わなかったら 30 分後に DMEM / Gentamicin (10 μg/ml) / 10% FBS を 2 ml ずつ加え、乾燥を防ぐ。
- 5 25 cm<sup>2</sup> Flask 6 枚分(10 cm dish 2枚分)の角化細胞etc.をトリプシナイズし遠心洗浄後、1枚あたり 6 ml の 3D culture mediumに浮遊させ、培養液を吸引除去したコラーゲンゲルの上に 3 ml / well の液量を蒔き込む。数時間~1晩培養する。

- 6 シリンジにつけた注射針 (21 G)の先 1 cm 位を 90 度曲げ、それをコラーゲンゲルと Plate の間に割り込ませるようにして、コラーゲンゲルを Plate から剥がす。
- 7 2日に1度培地交換しながら、ゲルが収縮するのを待つ。培地の量は 3 ml / well にする。約1週間かかる。
- 8 セルストレイナーの取っ手を鉏で切って、新しい 6 well plate の中にひっくり返して置き、ストレイナーの底の網が充分浸るまで 3D culture medium を入れる (約 12 ml)。
- 9 セルストレイナーの網の上に収縮したコラーゲンゲルをのせる。セルストレイナーの外の培養液を2日に1度交換しながら、3日~1週間培養する。培養液の交換のときにはコラーゲンゲルの底面と側面が培養液に充分浸っているが、表面は乾燥するように液量に注意する。細胞を移動する際には、ゲルの表面を濡らさない様に特に注意する。
- 10 コラーゲンゲルを取り出し中性ホルマリン溶液などで固定する。