

# Nunc キャリアプレートシステムにおけるヒト皮膚組織の確立

## Abstract

Thermo Scientific™ Nunc™ セルカルチャーインサートは、対応する Thermo Scientific™ Nunc™ キャリアプレートと併せて使用することにより、気相-液相境界における細胞増殖・分化システムとして有用です。キャリアプレートはインサートを異なる高さで保持することができるため、インサートの取り扱いが容易で、コンタミネーションリスクを低減できます。インサートの保持の位置を調整できるため、培地量を増量させて、細胞培養中に必要な培地交換の間隔を延長することができます。本アプリケーションノートでは、3次元培養表皮モデル作成における、Nunc キャリアプレートシステム (セルカルチャーインサート) の有効性を検討しています。

## Key words

表皮、三次元培養、ヒト表皮モデル、セルカルチャーインサート、キャリアプレート、気相-液相境界、培地交換間隔、TEER

## Introduction

Nunc セルカルチャーインサートは、小スケールでの3次元皮膚増殖のために、一般的に使用される多孔性膜デバイスです。細胞をセルカルチャーインサート内に播種し、インサートをマルチウェルプレート中の培地に浸漬させます。インサートの多孔性膜上に細胞層が形成されたら、メンブレン上の培地を除去し、細胞の上表面を空気に曝露させます。

このシステムの弱点は、インサートメンブレンの下の空間が制限されるため、気相-液相界面培養中の細胞増殖を維持させるのに必要な培地を、各ウェルに少量しか添

加できないことです。このため細胞の分化および増殖に必要な長期培養では、短い間隔で培地を交換する必要があります。しかし、インサートがウェル内にしっかりと固定されていないため、セルカルチャーインサートの培地交換は煩雑になります。ピペット操作中にインサートをウェル内で少し移動させるか、ウェルから取り除くことが必要なため、3次元モデルや多孔性膜のコンタミネーションや損傷のリスクが高くなります。Nunc キャリアプレートシステムは、ウェル内でセルカルチャーインサートを望ましい高さに調整することで、こうしたリスクを回避することができます。キャリアプレートにより、気相-液相界面培養におけるウェル内の培地量を増加させ、培地交換の間隔を長くすることが可能になります。また、キャリアプレートに設置したすべてのインサートを同時にウェルから取り出すことができるため、ピペット操作による培地交換が簡単です。キャリアプレート全体をカバーするフタにより、インサートおよび細胞をコンタミネーションリスクから守ります。

ここに示す試験では、Nunc セルカルチャーインサートと Gibco™ EpiLife™ 増殖培地を使用して、3次元表皮組織の *in vitro* 培養のための効果的なシステムを確立しました。さらに、キャリアプレートの高さ調節機能を使用して実験プロトコルを簡略化させ、培地交換の間隔を長くすることで、操作性を向上させました。

## Materials

Materials	Cat. No.
Nunc Cell Culture Inserts in Carrier Plate Systems, 24-well, 0.4 μm pore size	141002*
Human Epidermal Keratinocytes, adult (HEKa)	C-005-5C
EpiLife Medium, with 60 μM calcium	M-EPI-500-CA
Human Keratinocyte Growth Supplement (HKGS)	S-001-5
Antibiotic-Antimycotic (100X)	15240-062
Coating Matrix Kit Protein	R-011-K
FGF7 (KGF) Recombinant Human Protein	PHG0094
Vybrant MTT Cell Proliferation Assay Kit	V-13154
Ascorbic Acid	A4544-25G

\*詳細は右記 Web サイトを参照ください。thermofisher.com/cellcultureplastics

### インサート上での気相-液相界面培養

EpiLife 増殖培地は、ヒトケラチノサイト増殖用培地サプリメント (HKGS)、10 ng/mL の KGF、1X 抗菌-抗真菌溶液および 140 μM の塩化カルシウムを添加して調製します。培地の使用直前に、50 μg/mL のアスコルビン酸を添加しました。セルカルチャーインサートは、Gibco™ Coating Matrix Kit のタンパク質をメーカーのプロトコルに従って 1 : 100 に希釈したもので予めコーティングしました。

初期の細胞接着および増殖においては、すべてのインサートを、ウェル中のキャリアプレートの最も低い位置に設置します。24 ウェルインサートの培養面積は 0.47 cm<sup>2</sup> で、あらかじめコーティングされたインサート中に 7.5×10<sup>5</sup> 細胞/cm<sup>2</sup> の密度になるように細胞を播種しました。セルインサートへの播種は、上部コンパートメントには 0.5 mL の細胞懸濁液、下部コンパートメントには 0.5 mL の増殖培地を添加した状態で行います。5% CO<sub>2</sub> 下で 37°C 環境において 2 日間インキュベーション後、ウェルおよびセルカルチャーインサート内部から全ての培地を吸引します。適切な容量の増殖培地を下部コンパートメントに添加し、インサートを 24 ウェルプレート内の望ましい高さに設置することで、気相-液相界面を確立しました (図 1)。上部コンパートメントのセルカルチャーインサート内は空の状態にしておき、次の培地交換では、下部コンパートメントから培地を吸引し、1.5 mM 塩化カルシウムを添加した (最終濃度 1.7 mM) 増殖培地で適切な間隔で培地交換します (表 1)。

表 1. 適切な培地交換間隔とインサートの設置位置および培地容量

インサート設置位置	培地交換時の培地量 (24 ウェルプレート*のウェルコンポーネント)	培地交換期間
Low	0.5 mL/ ウェル	2 日間
Middle	1.0 mL/ ウェル	3 日間
High	1.5 mL/ ウェル I	4 日間

\* 12 ウェルプレートの場合は、24 ウェルプレートの倍量使用を推奨。

### 生存率アッセイ

細胞の生存率および代謝測定は、培養 23 日後に Invitrogen™ Vybrant™ MTT Cell Proliferation Assay Kit を使用しました。MTT 試薬をインサートの上部コンパートメント内に添加し、1 時間インキュベーション後、MTT 溶液を吸引し細胞を洗浄しました。ホルマゼン色素は、100% イソプロピルアルコールで一晩処理したのち、細胞層から抽出しました。抽出物を 96 ウェルクリアプレートに移し、Thermo Scientific™ Varioskan™ Flash プレートリーダーを使用して吸光度を測定しました。生存率は、6 つのインサート (n=6) について評価しました。

### 経上皮電気抵抗 (TEER) 測定

増殖中の皮膚組織の TEER は、播種後 11 日目および 23 日目の 2 ポイントで測定します。測定には、EVOM2™ Epithelial Volt/Ohm (TEER) Meter およびプローブ (World Precision Instruments) を使用します。上部および下部の両方のコンパートメントから細胞増殖用培地を吸引し、0.5 mL リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で置換後、測定します。プローブは、一方の電極を上部コンパートメントに、もう一方の電極を下部コンパートメントにそれぞれ浸漬させ、各時点において、6 つのインサートについて測定します。

### 顕微鏡観察

皮膚組織インサートは、播種後 12 日間増殖させた後、4% パラホルムアルデヒドで 4°C で一晩インキュベーションし固定します。インサートをパラフィン包埋して切片化し、ヘマトキシリンエオシン (HE) 染色します。組織片の 400 倍の倍率の写真を取得し、細胞の層化を調べました。

## Results

細胞の接着および増殖の初期実験から、Nunc セルカルチャーインサートがヒト表皮角化細胞の優れた増殖基質となることが示唆されました。2週間の気相-液相界面培養後のMTTアッセイでは、試験を行ったすべてのウェル中で良好な生存率が示されました(図1)。

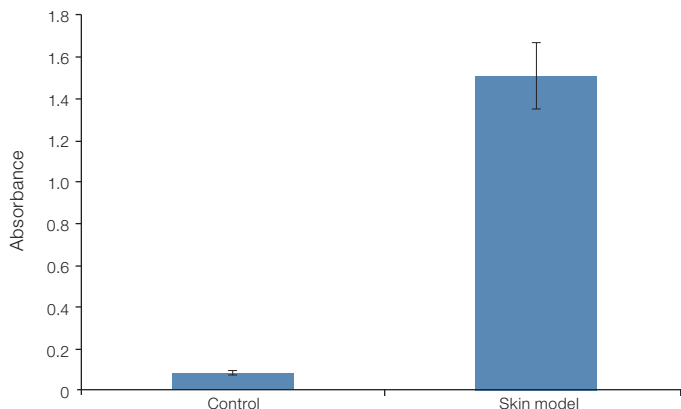


図1. MTTアッセイによる細胞生存率の評価

皮膚モデルサンプル抽出物の平均吸光度と細胞を含まないコントロールの吸光度の比較。エラーバーは標準偏差

TEERを使用して、インサート中に確立された皮膚組織によるバリア強度を評価しました。皮膚組織の成熟層は、多孔性膜を介したイオンの流れを阻害し、高い電気抵抗値を示すことにより評価できます。本試験の11日間および23日間の培養後の測定では高い電気抵抗値が得られ、このことから強固なバリアが11日目にはすでに形成されており、その後23日目まで形成されていました。このことから空気への曝露が3週間後まで維持していることが示唆されました(図2)。

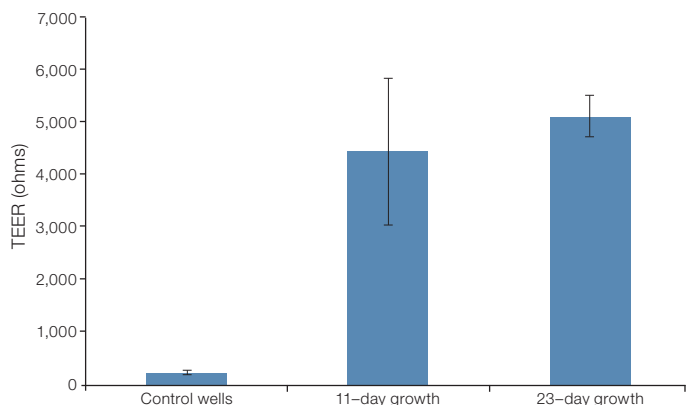


図2. TEER測定を使用した皮膚モデル完全性の評価

インサートへの細胞播種から11日後および23日後のTEER測定値を、細胞を含まない同一サイズのコントロールインサートと比較。エラーバーは標準偏差

12日間の気相-液相界面培養後の人工皮膚組織の固定化切片の顕微鏡観察からは、表皮層が良好に分化していることを確認できました。切片化して染色した組織中では、期待される細胞がすべて可視化されました(図3)。

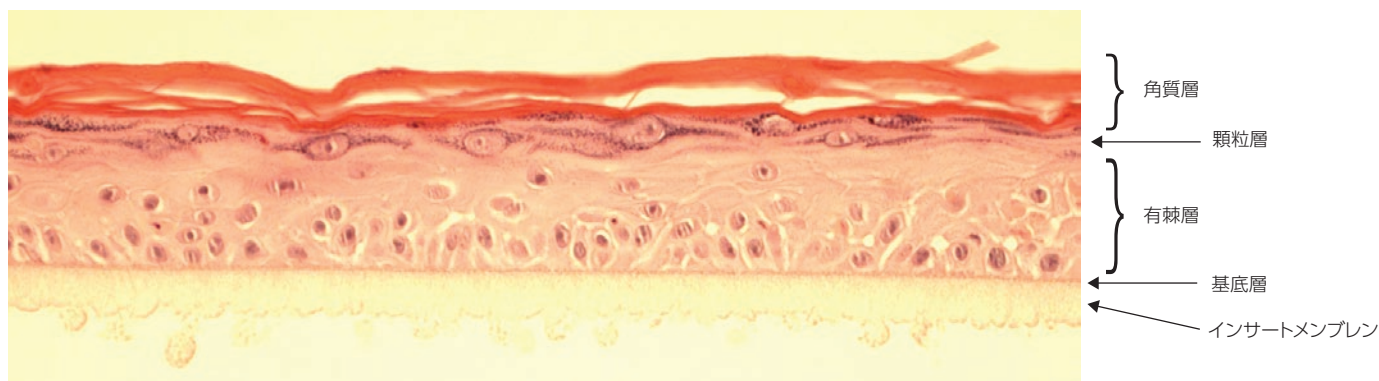


図3. HE染色によるインサートメンブレン上の3次元培養表皮モデルにおける層化

さらに、セルカルチャーインサート内での表皮組織形成への培地交換間隔の有意な影響について検討しました。キャリアプレートの機能を活用して、異なる高さのインサート設置位置で、培地量を変化させることにより培地交換間隔を2日間、3日間または4日間としました(図4)。試験を行ったすべての培地交換間隔において、12日間の気相-液相界面培養後の皮膚組織細胞層が良好に分化していたことから、12日間の培地交換間隔は、2、3または4日間といった短い培地交換間隔と同等に有効であり、長い培地交換間隔により、皮膚組織を確立させるまでの操作時間と労力を低減できることが示されました(図5)。

## Conclusion

- Nunc キャリアプレートシステム(セルカルチャーインサート)は、ヒト皮膚組織の人工モデル培養のための優れたデバイスです。
- キャリアプレートの複数の高さ設定により、気相-液相界面培養における増殖培地容量を増大させることができ、培地交換間隔を延長させて操作を簡略化することができます。

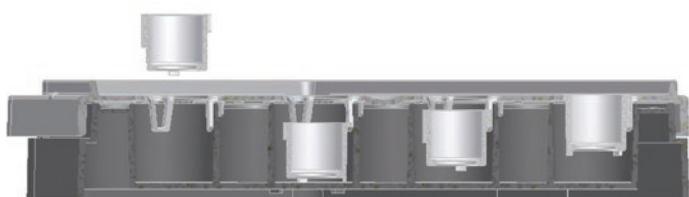


図4. Nunc セルカルチャーインサート設置位置の断面図  
キャリアプレートで3段階の位置調節可能

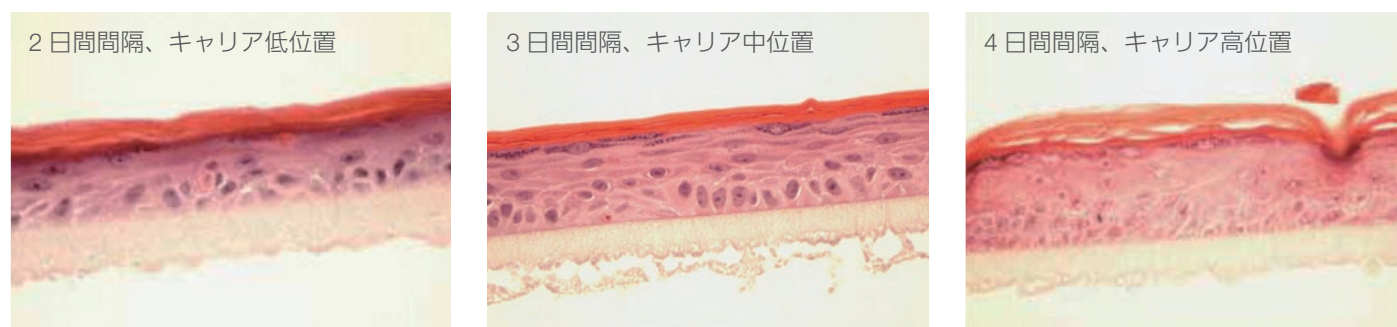


図5. 12日間気相-液相界面培養後の各培地交換間隔、キャリア位置条件での表皮モデル層化のHE染色

キャリアプレートの異なる設置位置、異なる培地量での、気相-液相界面培養結果。表皮組織は、各ウェル当たり0.5 mL、1.0 mLまたは1.5 mLの培地で培養し、それぞれ2日、3日または4日の間隔で培地交換。組織片はx400倍で写真撮影。

Find out more at [thermofisher.com/cellcultureinserts](https://www.thermofisher.com/cellcultureinserts)

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. © 2018 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified. EVOM<sup>2</sup> is a trademark of World Precision Instruments.

研究用のみ使用できます。診断目的およびその手続上での使用はできません。  
記載の社名および製品名は、当社または各社の商標または登録商標です。  
2018年12月現在の内容です。製品の仕様、外観、記載内容は予告なく変更させていただく場合がございます。  
最新情報は当社Webページにてご確認ください。標準販売条件はこちらをご覧ください。www.thermofisher.com/jp-tc  
CCP04\_A1812\_M

サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社

TEL: 0120-477-392 | jptech@thermofisher.com  
 オーダーサポート TEL: 03-6832-9260 FAX: 03-6832-9261  
 営業部 TEL: 03-6832-9270 FAX: 03-6832-9271

facebook.com/ThermoFisherJapan | @ThermoFisherJP

thermofisher.com

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC