

## Corning® BioCoat™ マトリゲル™ インベーションチャンバー 使用説明

### 用途

BioCoat マトリゲル インベーションチャンバーは悪性腫瘍細胞ならびに正常細胞の細胞浸潤の研究に有用です。具体的な応用例には腫瘍細胞転移能<sup>1</sup>、細胞外基質 (ECM) 成分<sup>2</sup> または抗腫瘍剤 (タキソール)<sup>3</sup> による転移阻害、転移細胞における細胞表面タンパク質<sup>4</sup> またはメタロプロテアーゼ<sup>5</sup> の発現変化、および胚性幹細胞、細胞栄養芽層<sup>7</sup> や線維芽細胞<sup>8</sup> のような正常細胞の浸潤などの評価があります。

浸潤研究はメラノーマ、膠芽細胞、星状細胞腫、骨肉腫、線維肉腫、肺、乳房、卵巣や腎臓の腺癌および様々な腫瘍細胞(細胞株や初代癌細胞)で成功しています。

本製品は研究以外の目的には使用しないでください。

### 要約

BioCoat マトリゲル インベーションチャンバーは細胞の浸潤特性を *in vitro* で評価できる環境を提供します。BioCoat マトリゲル インベーションチャンバーは、Falcon® セルカルチャーインサートとFalcon コンパニオンプレートから構成されています。このセルカルチャーインサートは、マトリゲル基底膜マトリックスの薄層でコートされた8μmのポアサイズのPETメンブレンからなっています。マトリゲル基底膜マトリックスは *in vitro* において再構成基底膜として機能します。この層がメンブレンのポアを覆うことで、非浸潤性細胞の移動を阻止します。一方浸潤細胞 (悪性および非悪性細胞) はマトリゲル基底膜マトリックスと8μmのメンブレンポアを浸潤することができます。メンブレンは光学顕微鏡および電子顕微鏡観察にも利用できるよう、染色後に容易に取りはずすことができます。マトリゲルインベーションチャンバーは *in vitro* での細胞浸潤研究に適した、便利かつ操作性に優れたシステムです。

### 製品内容

- インベーションチャンバー (各24インサート)
- カタログ番号 : 354480の製品には、2枚の24ウェル Falcon 細胞培養コンパニオンプレートと、プレート1枚につき12個のインサートが含まれています。
- カタログ番号 : 354481の製品には、4枚の6ウェル Falcon 細胞培養コンパニオンプレートと、プレート1枚につき6個のインサートが含まれています。

### 本製品に含まれていない必要材料

- DMEM (無血清) のような重炭酸をベースにした培地
- コントロールインサート  
(24ウェル、カタログ番号 : 354578または6ウェル、カタログ番号 : 354576)
- 5%ウシ胎児血清のような化学誘引物質
- コンパニオンプレート  
(24ウェル、カタログ番号 : 353504または6ウェル、カタログ番号 : 353502)
- 加湿培養インキュベータ、37°C、5%CO<sub>2</sub>
- Diff-Quik染色キット (シスメックス株式会社より販売 カタログ番号 : 16920) または適当な固定液と染色試薬
- クリーンベンチ
- メス (No.11ブレードを推奨)
- カメラ付き (オプション) 顕微鏡
- スライドとカバーガラス
- 綿棒
- 滅菌済みピンセット
- 封入剤

### 注意事項

- 以下説明の操作手順はHT-1080ヒト線維肉腫細胞の利用に合わせ最適化されたものです。結果は、実際に使用した細胞や条件、特に培地、インキュベーション時間、細胞接種密度、化学誘引物質によって変わることがあります。使用するシステムに合わせて条件を最適化する必要があります。
- 保存 : 本セットはオリジナル包装のまま-20°Cに保管してください。
- すべての操作は無菌条件下で実施してください。

## 使用方法

注意: BioCoat™ マトリゲル インベージョンチャンバー上にコーティングされたマトリゲル マトリックスの外観は従来のものと異なっています。新しい外観は、改良の結果光沢を持っており、製品性能および品質が向上しています。

### 1.0 調製

注意: BioCoat マトリゲル インベージョンチャンバーの24ウェル型 (カタログ番号: 354480) または6ウェル型 (カタログ番号: 354481) に使用する溶液量については表1を参照ください。

- 1.1 -20°Cの保管場所よりパッケージを取り出し、室温にします。
- 1.2 温めておいた (37°C) 重炭酸ベースの培地をインサートおよびウェルの底に加えます。37°C、5%CO<sub>2</sub>環境の加湿培養インキュベータ内で2時間水和します。
- 1.3 水和後、メンブレン上のマトリゲル基底膜マトリックスの層を乱さないように培地を注意深く取り除きます。

表 1: マトリゲル インベージョンチャンバーの使用液量

	24 ウェル	6 ウェル
インサートとウェルの水和	0.5 mL (インサート) と 0.5 mL (ウェル)	2.0 mL (インサート) と 2.0 mL (ウェル)
ウェル (化学誘引物質)	0.750 mL	2.5 mL
細胞	0.50 mL	2.0 mL
染色液	0.50 mL	2.5 mL
リンス溶液	150 mL	250 mL

### 2.0 浸潤研究

- 2.1 上記に従って使用予定数のマトリゲル コートインサートを水和します。無菌ピンセットを使って同数のコントロールインサートを調製し、Falcon® コンパニオンプレートの空ウェルに移します。
- 2.2 24ウェルチャンバーの場合には5×10<sup>4</sup> 細胞/mLを含み、6ウェルチャンバーの場合には1.25×10<sup>5</sup> 細胞/mLを含むHT-1080細胞懸濁液を調製します。使用細胞に合わせて多孔性メンブレン表面上に播種する最適細胞密度を決定するために、フラスコ、ディッシュ、プレートなどの非多孔性表面に使用している播種密度 (細胞/cm<sup>2</sup>) 域を利用することをお勧めします。例えば現在10<sup>5</sup> 細胞/cm<sup>2</sup>で播種している場合、0.5×10<sup>5</sup> と5×10<sup>5</sup> 細胞/cm<sup>2</sup>で播種し最適の初期播種密度を決定します。
- 2.3 Falcon 細胞培養コンパニオンプレートのウェルに化学誘引物質を加えます。
- 2.4 無菌ピンセットを使ってチャンバーとコントロールインサートを化学誘引物質を含むウェルに移します。メンブレンの下に気泡が残らないように注意してください。インサートまたはチャンバーを液に入れる時に若干斜めにしながら軽く叩くことで、気泡の入り込みを防ぐことができます。
- 2.5 すぐにHT-1080 細胞懸濁液または実験に使用する細胞で調製した細胞懸濁液を24ウェルチャンバーに0.5mL (2.5 × 10<sup>4</sup> 細胞) を加えるか、あるいは6ウェルチャンバーに2.0mL (2.5 × 10<sup>5</sup> 細胞) を加えます。

- 2.6 BioCoat マトリゲル インベージョンチャンバーを37°C、5%CO<sub>2</sub>の条件下、加湿培養インキュベータ内に22時間インキュベーションします。

### 3.0 細胞浸潤の測定

#### 3.1 非浸潤細胞の除去

注意: インキュベーション後、綿棒で非浸潤細胞を“こすって”メンブレン上側の面から取り除きます。インサートハウジングへのメンブレンの取り付けは丈夫なので、こすっても抜け落ちたり、また細胞がメンブレンの下側の面から剥がれることはありません。こすり取り作業は、マトリゲル基底膜マトリックスを取り除くことや膜の上側表面から非浸潤細胞の除去に非常に効果的です。こすり取り作業は、メンブレン下面に接着した細胞が乾燥しないように迅速に行なわなければなりません。

- a. BioCoat マトリゲル コートインサート内に綿棒を入れ、その先端を穏やかに、かつしっかりと当てながらメンブレン表面上を動かします。
- b. 培地で湿らせた別の綿棒を使ってこする作業を繰り返します。

#### 3.2 細胞の染色

注意: メンブレン下側の面の細胞はDiff-Quik染色液を使い染色します。Diff-Quikキットは固定液と2種類の染色液を含みます。染色するには、インサートをこの3種類の液体に浸し、2回水でリンスします。外観はギムザ (Wright-Giemsa) 染色に似ています。細胞核は紫に染色され、細胞質はピンクに染色されます。別の染色方法としては、固定後ヘマトキシリンとエオジン染色またはクリスタルバイオレットによる染色もあります。染色するためにメンブレンをインサートハウジングから取り外す必要はありません。

- a. 3列のFalcon 細胞培養コンパニオンプレートそれぞれにDiff-Quik液を加えます。2個のビーカーに蒸留水を加えます。
- b. インサートを各染色液と水の入った2個のビーカーに次々に浸していきます。各液に約2分以上置きます。
- c. インサートを風乾します。

他の方法として、細胞を100%メタノールと1%トルイジンブルーで、それぞれ固定と染色をしてもよいでしょう。

- a. Falcon 細胞培養コンパニオンプレートの適当な数のウェルに100%メタノールを加えます。別プレートの適当な数のウェルに1%トルイジンブルーを含む1%ホウ酸ナトリウム溶液を加えます。2個のビーカーに蒸留水を加えます。
- b. メタノール内にインサートを移し、2分間固定します。
- c. インサートをトルイジン染色液に移し、2分間染色します。
- d. インサートを2個の蒸留水入りビーカー内でリンスし、余分な染色液を除きます。
- e. インサートを風乾します。

#### 3.3 浸潤細胞数の測定

注意: 細胞数の測定はメンブレンを顕微鏡を通して写真撮影することで容易になります。顕微鏡で細胞を直接測定することも可能です。

- a. インサートを逆さまにしてハウジング壁近くのメンブレンの隅に鋭いメス先端部を挿入して、ハウジングからメンブレンを外します。刃を固定して、インサートハウジングを回転させると缶を開ける様にメンブレンが剥がれます。ハウジングからメンブレンを完全に切り離さず、ごく小さい接着部分を残すようにします。
- b. ピンセットを使って残った接着部分からメンブレンを剥がし、少量の封入剤を落とした顕微鏡スライド上に乗せます。メンブレンの上にも少量の封入剤を落とします。

- c. メンブレンの上に別のスライドまたはカバーガラスを乗せ、軽く押しつけ気泡を完全に抜きます。
- d. 細胞密度に応じて約40~200×の倍率で浸潤細胞を観察、または写真撮影します。3枚のメンブレンについて複数の視野で細胞数を測定します。

注意：細胞は、8μmメンブレンポアを覆ったマトリゲル基底膜マトリックス中を浸潤します。それは、メンブレンに均一に見られたり、中央部や周辺部などの特定部分に偏在したりします。3枚のメンブレンについて細胞数を測定する場合には、メンブレン中央部の視野とメンブレン周縁部の視野を選び、メンブレン全体の細胞数を正しく反映するようにします。

### 3.4 データ計算

注意：データはコントロールメンブレンの通過移動に対するマトリゲル基底膜マトリックスおよびメンブレンの通過浸潤として表されます。“浸潤指数”はまたコントロール細胞の浸潤に対する試験細胞の浸潤の比としても表されます。

#### a) %浸潤の計算式：

$$\% \text{浸潤} = \frac{\text{(マトリゲル インサートメンブレンを浸潤している平均細胞数)}}{\text{(コントロールインサートメンブレンを移動する平均細胞数)}} \times 100$$

#### b) 浸潤指数の計算式：

$$\text{浸潤指数} = \frac{\text{(%浸潤試験細胞)}}{\text{(%浸潤コントロール細胞)}} \times 100$$

### 結果の典型例

以下の結果はBioCoat™ マトリゲル インベーションチャンバー (MIC) (カタログ番号： 354480、24ウェル型) を上記通りに使用し、18-24時間アッセイにてHT-1080線維肉腫試験細胞とNIH 3T3コントロール細胞の浸潤を評価した場合に得られる典型的な結果です。本データは参考例であり、細胞の種類や化学誘引物質、アッセイ時間によって変わります。

	HT-1080 (試験細胞)			NIH-3T3 (コントロール細胞)		
浸潤細胞数 (MIC、3重測定)	78	63	77	6	2	5
平均	72.7			4.3		
移動細胞数 (コントロールインサート)	206	168	182	177	151	175
平均	185.3			167.6		
%浸潤	72.7/185.3×100=39.2%			4.4/167.6×100=2.56%		
浸潤指数	39.3%/2.56%=15.3					

6ウェル型 (カタログ番号： 354481) のBioCoat マトリゲル インベーションチャンバーのメンブレン表面積は大きいため (4.2 cm<sup>2</sup>/インサート)、すべてのタイプの細胞について細胞浸潤を定量分析することができるとはかぎりません。しかし、6ウェル型は化学誘引物質に対する反応において非浸潤性細胞群から“浸潤”型細胞を選択するのに適しています。メンブレン下面から浸潤細胞を取り外して培養し、増殖させます。定量測定の場合には24ウェル型 (カタログ番号： 354480) を使用することをお勧めいたします。

### 保存と安定性

BioCoat マトリゲル インベーションチャンバーは-20℃に保存した場合には、出荷後3ヶ月間安定です。

### 参考文献

- 1 Albin, A. et al., *Cancer Res.* **47**:3239 (1987)
- 2 Kobayshi, H. et al., *Cancer Res.* **52**:3610 (1992)
- 3 Melchiori, A. et al., *Cancer Res.* **52**:2352 (1992)
- 4 Sterns, M. and Want, M., *Cancer Res.* **47**:3776 (1987)
- 5 Sato, H. et al., *Nature* **370**: 61 (1994)
- 6 Alexander, C.M. and Werb, Z., *Cell Biol.* **118**:727 (1992)
- 7 Cross, J.C. et al., *Science* **266**: 1508 (1994)
- 8 Chu, Y-W. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:4261 (1993)