



テクニカル レポート 207:

三次元培養系
バイオアーティフィシャル
ティッシュ（BATS）
細胞の免疫化学染色法

Authors: Albert J. Banes, Ph.D., Michelle E. Wall, Ph.D., Jie Qi, Ph.D., Ruwan Sumanasinghe, Ph.D., and Mari Tsuzaki, D.D.S., Ph.D.

Document: BAT Immunochemical Staining Tech Report, Rev 1.1

05-25-2010

Culturing Cells in a Mechanically Active Environment™
Flexcell International Corporation • 437 Dimmocks Mill Road, Suite 28 • Hillsborough, NC 27278
800-728-3714 • (919) 732-1591 • FAX: (919) 732-5196 • www.flexcellint.com

COPYRIGHT © 2009 FLEXCELL® INTERNATIONAL CORPORATION



イントロダクション

Flexcell® のTissue Train® 三次元バイリアクターでは、線状、円状、その他の形状をしたハイドロゲル内に細胞を埋入、培養し、機械的負荷を適用することができます。原理としては、6ウェル型Tissue Train® 培養プレートの各フレキシブルウェル底を、メンブレン下に作られた樋状溝(トラフ、trough)内へ真空吸引して変形し、ここへハイドロゲルを流し込むことにより、各々のトラフの持つ特定の形状(即ち、線状、円状、台形)に成形します。線状トラフの場合、成形時点で25 mm x 3 mm x 3 mmのゲル構築(コンストラクト)が形成されますが、細胞のゲル収縮(コンパクション)とマトリクス再編成に伴い、寸法は縮小します(図1; Garvin et al., 2003; Qi et al., 2009, 2007, 2006; Sumanasinghe et al., 2009; Triantafillopoulos et al., 2004)。

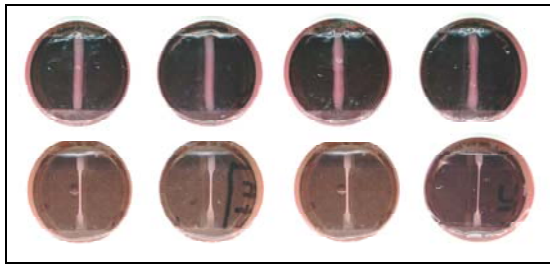


図1. 細胞埋入した線状ハイドロゲルの様子: 初期形成時(上列)と一週間培養後(下例)。

バイオアーティフィシャルコンストラクトの固定法

細胞は70%メタノールあるいは10%中性緩衝ホルマリン液(neutral-buffered formalin(NBF)内4時間、ハイドロゲル内包埋培養したまま固定し(*in situ* 固定)、その後はプレートごとジップロックバッグで包んで蒸発防止した上、4°C保存することができます。固定したBATsは、ヘマトキシリン・エオシン(HE)染色、Malloryの三重染色、ギムザ染色等タルーチンに用いられる組織染色剤、あるいは蛍光顕微鏡用試薬で染めることができます。

組織標本の作製法

BATsは、パラフィン包埋して切片を切り出し染色することも、凍結切片用媒質に包埋することもできます。BATsを連結している両端のナイロンアンカーから切り離してでも、あるいは、ラバーとナイロンアンカーを結合したままの状態で行うことも可能です。後者の方法をとると、BATの線状形、寸法、方向性などを保つのに役立ちます。そのあと、プロトコルに従いBATsのヘマトキシリン・エオシン(HE)染色などを行うことができます(図2)。

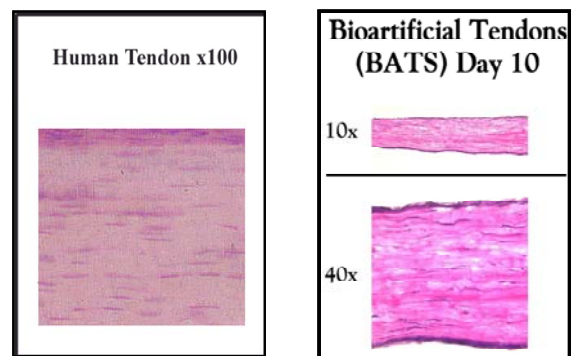


図2. ヒト腱組織(左)とBATコンストラクト(右)の切片縦断面像(ヘマトキシリン・エオシン染色)(Garvin et al., 2003)。

蛍光免疫染色法

上述のようにして固定した後、BATsを一般的プロトコルに従い蛍光免疫染色することができます。緩衝液で3回洗浄後、抗体を用いてその位置で(*in situ* 染色)、あるいはウェルから外して1mlのポリチューブ内で染色します。一次抗体を室温で1時間あるいは4°Cで一晩作用、緩衝液で3回洗浄、二次抗体を室温で30分間作用させます。BAT試料はその後緩衝液で3回洗浄し、濡れたままスライドガラスにマウントして蛍光観察に供することができます。

BATsの蛍光顕微鏡観察

コラーゲンハイドロゲルには低度の蛍光がありますが、自発光波長はフルオレセイン(fluorescein)の範囲内です。従って、ローダミン(rhodamine)とDAPIによる対比染色はBATsの細胞に適しています。



文献

Garvin J, Qi J, Maloney M, Banes AJ. Novel system for engineering bioartificial tendons and application of mechanical load. *Tissue Eng* 9(5):967-979, 2003.

Qi J, Chi L, Faber J, Koller B, Banes AJ. ATP reduces gel compaction in osteoblast-populated collagen gels. *J Appl Physiol* 102(3):1152-60, 2007.

Triantafillopoulos IK, Banes AJ, Bowman KF Jr, Maloney M, Garrett WE Jr, Karas SG. Nandrolone decanoate and load increase remodeling and strength in human supraspinatus bioartificial tendons. *Am J Sports Med* 32(4):934-943, 2004.

Qi J, Chi L, Maloney M, Yang X, Bynum D, Banes AJ. Interleukin-1beta increases elasticity of human bioartificial tendons. *Tissue Eng* 12(10):2913-2925, 2006.

Qi J, Chi L, Wang J, Sumanasinghe R, Wall M, Tsuzaki M, Banes AJ. Modulation of collagen gel compaction by extracellular ATP is MAPK and NF-kappaB pathways dependent. *Exp Cell Res* 315(11):1990-2000, 2009.

Sumanasinghe RD, Osborne JA, Lobo EG. Mesenchymal stem cell-seeded collagen matrices for bone repair: effects of cyclic tensile strain, cell density, and media conditions on matrix contraction *in vitro*. *J Biomed Mater Res A*. 88(3):778-86, 2009.