



肝細胞スフェロイドアレイ

～培養方法～

ご注意：

本製品は研究用として開発されたものです。ヒトまたは動物への適用および臨床診断への使用はできませんのでご注意ください。

ご使用前に本説明書を必ずお読みください。

1. はじめに

Cell-able® プレートを用いることにより、肝細胞をスフェロイド化した状態で培養することが可能となります。これにより、肝細胞の機能を維持したまま、長期にわたり培養することが期待できます。培養には、弊社で販売しております肝細胞スフェロイド培養用培地 (RM-101) を使用することをお勧めいたします。

(使用する肝細胞の状態などにより、培養状態、実験結果は変動する可能性があり、弊社では保証いたしませんので予めご了承ください)

操作時は実験着、使い捨て手袋、実験用ゴーグル等をご使用ください。

2. 製品ラインナップ

- ・ Cell-able® プレート

96 ウェルパターンプレート、24 ウェルパターンプレート、12 ウェルプレート

- ・ RM-101 肝細胞スフェロイド培養用培地

3. ご準備いただく細胞

- ・ フィーダー細胞 (プレート1枚につき約 1×10^6 個)

3T3-Swiss albino マウス線維芽細胞 (推奨: JCRB9019*)

* JCRB 細胞バンク ホームページにてご確認ください。

: <http://cellbank.nibio.go.jp/>

- ・ 初代肝細胞 (プレート1枚につき約 3×10^6 個)

生細胞率が80%以上を推奨いたします。

4. ご準備いただく装置・器具

(装置)

- ・ CO₂ インキュベータ
- ・ クリーンベンチ
- ・ 遠心機

(器具) 滅菌品をお使いください。

- ・ 培養用シャーレ、フラスコなど (フィーダー細胞培養用)
- ・ Cell-able® プレート

そのほか必要に応じてピペット、マイクロピペット（チップ）、遠心管などをご用意ください。

5. ご準備いただく試薬（培養用グレードをお使いください）

- ・PBS（－）
- ・トリプシン EDTA（通常使用の2倍濃度）
例）GIBCO 15400-054 Trypsin-EDTA（×10）をPBS（－）にて5倍希釈したもの（×2濃度）。
原液を小分け分注・凍結保存し、使用時に5倍に希釈調製したものをお勧めします。
- ・フィーダー細胞培養用培地（巻末の「フィーダー細胞継代方法」をご参照ください。）
- ・RM-101（肝細胞スフェロイド培養用培地）

6. Cell-able® プレート保存条件

- ・培養用パターンプレート；4℃保存

7. 操作方法

以下の操作は、クリーンベンチ内で行ってください。

（1）フィーダー細胞の準備

フィーダー細胞をパターンプレートに播種する約1週間前に、フィーダー細胞を凍結から起こします*。フィーダー細胞培養用培地にて培養を行い、セミコンフレント状態にします。パターンプレート1枚に約 1×10^6 個の細胞が必要です。

*フィーダー細胞入手時の添付文書または巻末の「フィーダー細胞継代方法」をご参照ください。

（2）フィーダー細胞の播種

肝細胞播種の1日～1週間前にフィーダー細胞の播種を行います。

・操作方法

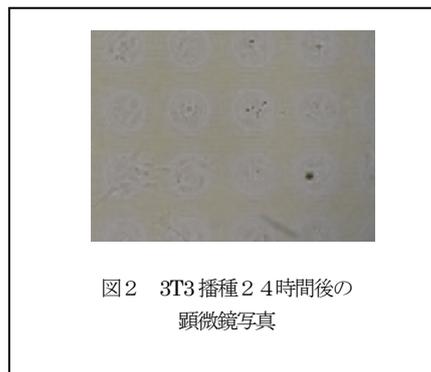
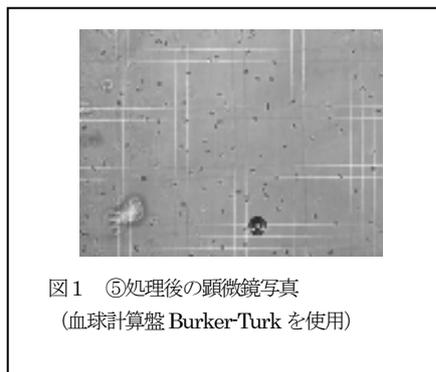
- ①（1）で準備したフィーダー細胞を培養したシャーレの培地を取り除き、PBS（－）で2回洗います。
- ②トリプシン EDTA 溶液（2×濃度）2～3ml をシャーレに加え、37℃のインキュベータ内で5分間静置します。
- ③フィーダー細胞培養用培地 2ml をシャーレに加え、ピペッティングにて細胞をばらばらにし、遠心管に移します。
- ④160×g 3分間遠心し、上清を吸引除去してください。

- ⑤適当量 (5ml 程度) のフィーダー細胞培養用培地を加え、ピペッティングにて細胞をばらばらにした後、細胞数を計測します。(図 1 参照)
- ⑥細胞濃度が 8×10^4 個/ml となるように、必要量のフィーダー細胞培養用培地で希釈します。(96 ウェルプレート : 10ml/枚、12 又は 24 ウェルプレート : 12ml/枚)
- ⑦⑥の細胞浮遊液を細胞が均一になるように注意しながら、培養用パターンプレート各ウェルに播種してください。(特に 12 ウェルプレートでは細胞が沈降してしまうと偏りが生じやすいので、播種後はすぐに CO_2 インキュベータへ移してください)
- (96 ウェルプレート : $100 \mu\text{l}/\text{well}$ 、24 ウェルプレート : $500 \mu\text{l}/\text{well}$ 、12 ウェルプレート : $1000 \mu\text{l}/\text{well}$)
- ⑧ CO_2 インキュベータ内にて培養を開始します。フィーダー細胞播種後 24 時間は振動・衝撃を与えないよう、静置してください。

フィーダー細胞を播種した翌日にはパターン上にフィーダー細胞が観察できます。(図 2 参照)

1 日間以上 (~1 週間目**まで使用可能) 培養後、肝細胞の播種を行います。

**長期間培養される場合は、適宜培地交換を行ってください。



(3) 肝細胞の播種

フィーダー細胞播種後 1 日から 1 週間目までの間に肝細胞を播種します。

操作方法

- ①生存率 80%以上 (推奨) の肝細胞を用意します
(パターンプレート 1 枚に約 3×10^6 個の肝細胞が必要です)
- ②スフェロイド培養用培地にて肝細胞を 2×10^5 個/ml*となるように希釈し、必要量の肝細胞浮遊液を調製します。(96 ウェルパターンプレート : 10ml、24 ウェル・12 ウェルパターンプレート : 12ml)

(細胞塊が多いとスフェロイドがうまく形成されないことがありますので、細胞は十分に分散させてください)

③フィーダー細胞を播種して1日以上(～1週間)培養したプレートから培養上清を除去し、②の肝細胞浮遊液を細胞が均一になるように注意しながら播種します。

(96 ウェルプレート : 100 μ l/well、24 ウェルプレート : 500 μ l/well, 12 ウェルプレート : 1000 μ l/well)

*凍結肝細胞は、ロットにより接着し難いものがあります。その場合、 4×10^5 個/ml 程度まで細胞を濃く播種することにより良好なスフェロイド形成が得られることがあります。

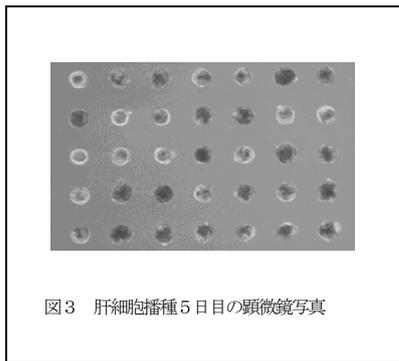
(4×10^4 個/well/ 96well plate、 1×10^4 個/well/24well plate、 4×10^5 個/well/ 12well plate)

④CO₂ インキュベータ内にて培養を開始します。

(12 ウェルプレートは細胞が偏りやすいので、細胞を分散させてから静置してください。)

⑤播種後 **48 時間** は、振動・衝撃を与えないよう、静置してください。

肝細胞播種後、2 日目に培地交換を行ってください。その後は1～2 日おきに培地交換を行ってください。



培地交換日程例

月曜日	火曜日	水曜日	木曜日	金曜日	土曜日	日曜日	月曜日
交換	-----	交換	-----	交換	-----	-----	交換

培地交換時のご注意

肝細胞播種後、数日はスフェロイドの凝集が弱いため、強い衝撃により細胞がパターンプレートから剥離してしまう場合がございます。培地交換の際には、ピペットなどの先端がウェルの底面に触れないように注意しながら、なるべくゆっくり培地を除去し、静かに新しい培地を加えてください。また、特に初回の培地交換の際には細胞間の接着が弱いため、古い培地を3割程度残して除去し、新しい培地を添加してく

ださい。

分析に際して

肝細胞播種後 48 時間は静置が必要となりますので、48 時間目以降に分析を開始されることを推奨いたします。なお、測定項目によって、経時的に活性が変動する場合がありますので、測定に際しては経時変化を測定して、適切な時期に測定されることを推奨いたします。

廃棄など

実験に使用したプレート、チップなどは、オートクレーブ滅菌を行った後、各自治体の決まりに従って廃棄してください。

本製品ご使用に当たっての注意事項

- ・ 本製品は研究用にのみ使用できます。ヒト、動物への適用や臨床診断への転用はできません。
- ・ 本製品の使用によって生じた事故あるいは損害について、弊社は一切の責任を負いませんのでご了承の上ご使用ください。

販売元 東洋合成工業株式会社

〒111-0053

東京都台東区浅草橋 1 丁目 22 番 16 号

ヒューリック浅草橋ビル 8F

TEL : 03-5822-6186 FAX : 03-5822-6189

参考資料

フィーダー細胞継代方法

準備するもの（器具は全て滅菌してあるものを使用）

凍結フィーダー細胞

遠心管

PBS(-)

基本培地（10%FBS DMEM）

トリプシン EDTA 溶液*

培養用プラスチックシャーレ又は培養用フラスコ

5ml, 10ml ロングピペットなど

1. 凍結細胞融解方法

- ①遠心チューブに基本培地 5～10ml を取り置く
- ②凍結細胞が入っているクライオチューブを 37°C に暖めたウォーターバスで融解
(2 分以内)
- ③融解確認後直ちにクライオチューブ内容物を全て①で準備した培地に移す
- ④160×g で 3 分間遠心分離後上清を除去する
- ⑤基本培地に再分散し、シャーレにて培養を行う
(細胞数が少ない場合は 3ml 程度の培地で小さめのシャーレに播種する)
- ⑥培養条件は CO₂ 濃度 5%、37°C、飽和湿度条件とする

2. 培地交換

培地交換は 2～3 日おきとし、培養上清を除去し、新しい基本培地を添加する。

3. Expand 方法

- ①トリプシン EDTA PBS (-) で 10 倍希釈し、トリプシン溶液とする
- ②新しいシャーレ 5～10 枚に基本培地を入れておく (1/5～1/10 にスプリット)
- ③セミコンフレント状態の培養フラスコの培養上清を全て除去する
- ④PBS (-) 2～3ml にて 2 回洗浄する

- ⑤トリプシン溶液 2~3ml を添加し、CO₂インキュベータ内にて 3~5 分間放置
- ⑥基本培地を 2ml 程度加え反応を停止後、細胞をピペッティングにて十分剥離分散させ、
内容物を 15ml の遠心チューブに移す
- ⑦160×g で 3 分間遠心分離後上清を除去する
- ⑧適当量の基本培地を加え細胞を再分散後、②で用意したフラスコに分注する
この際、各シャーレ内の細胞が均一に分散するように注意すること
- ⑨1. 2. と同じ条件で培養を行う

*トリプシン EDTA 例 GIBCO15400 (×10 濃度)

Expand 用 PBS にて 10 倍希釈

Cell-able® 播種用 PBS にて 5 倍希釈