

# 幹細胞分画回収キット

VIVANT-CELL<sup>®</sup>-Pot with *UpCell*<sup>®</sup> Plate

## 取扱説明書

製品番号 : CS9012/CS9013

本製品は厳密な製品管理の下に出荷していますが、ご使用に際し、不備な点、不明な点がございましたら、ご遠慮なくお問い合わせ下さい。本説明書に基づき使用されたにも関わらず製品に関するクレームが生じた場合は、製品到着後 2 週間以内にご連絡下さい。

但し、使用回数に関する事項や、取り扱い注意事項に従わないで使用した場合は、保証の責は負いかねますので御了承願います。

本製品は医療機器ではなく、研究用に限定しております。医薬品の製造、品質管理、各種診断、治療および研究など、その他使用目的にかかわらず、この製品で回収した細胞を人体に適用しないで下さい。

取扱説明書の一部または全部を無断転載、複製することを禁止します。



ネッパジーン株式会社



## Table of Contents

はじめに	P3
VIVANT-CELL <sup>®</sup> -Pot with <i>UpCell</i> <sup>®</sup> Plate 概要	P3
保管条件	P3
品質保証	P3
細胞膜分取原理	P4
本キット以外に必要な材料および機器	P5
手順（例：接着細胞）  1. 細胞の準備  2. VIVANT-CELL <sup>®</sup> -Pot with <i>UpCell</i> <sup>®</sup> Plate の準備  3. 細胞の添加  4. 細胞分取の終了	P6
<i>UpCell</i> <sup>®</sup> Plate 細胞回収方法	P7
使用例	P7
トラブルシューティングガイド	P8

## はじめに

今日の急速な再生医療の発展に伴い、体性(組織)幹細胞は移植治療や創薬研究等の様々な局面での応用が期待され、数多くの研究が進められています。

幹細胞移植治療の実用化のために乗り越えなければならないハードルの一つとして、患者由来組織からの幹細胞分離の効率化、更には分離した幹細胞の拡大培養手法の確立が挙げられます。近年、遊走因子および  $8\mu\text{m}$  の開孔を持つ膜を使用し、細胞の遊走能を利用して歯髄、骨髄、脂肪組織から組織再生誘導能力の高い細胞集団を効率よく分離・濃縮する方法が報告されました<sup>1)2)</sup>。

VIVANT-CELL<sup>®</sup>-Pot はこの遊走因子膜分取法を応用して開発され、ヘテロな細胞集団の中から効率よく機能的な細胞を分離するために設計された細胞分離・培養用カルチャーインサートです。VIVANT-CELL<sup>®</sup>-Pot を UpCell<sup>®</sup> Plate と組み合わせて使用することにより、遊走能を利用して機能性の高い細胞を分離してそのまま培養し、細胞に障害を与えるトリプシン等の細胞剥離酵素を使用せず、温度制御で簡便に回収することが可能となります。

1) Iohara, K., et al., *Stem Cells Transl Med* 2013; 2(7):521-33.

2) Hirose, Y., et al., *J Stem Cell Res Transplant* 2014; 1(2):1006.

## VIVANT-CELL<sup>®</sup>-Pot with UpCell<sup>®</sup> Plate 概要

VIVANT-CELL <sup>®</sup> -Pot 概要	UpCell <sup>®</sup> Plate 概要
孔径 : $8\mu\text{m}$ 開孔密度 : $1 \times 10^5$ pores / $\text{cm}^2$ 膜厚 : $17\mu\text{m}$ 膜面積 : $78.5\text{mm}^2$ 材質 : ポリカーボネート 滅菌 : EOG 滅菌 フォーマット : 12 ウェルプレート用	フォーマット : 12 ウェルプレート プレートサイズ : $86\text{mm(L)} \times 128\text{mm(W)}$ ウェル表面積 : $3.8\text{cm}^2$ / ウェル 容量 : 2.0 ml / ウェル 材質 : ポリスチレン 滅菌 : EO 滅菌

## 保管条件

直射日光のあたる場所は避け、常温で保管して下さい。

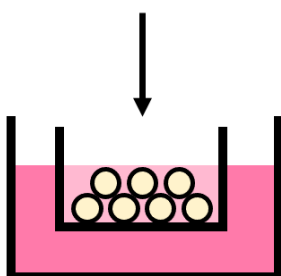
## 品質保証

- ・使用期限内にご使用下さい。
- ・ディスプレイ製品です。再使用はお控え下さい。
- ・改造や分解を行われた場合、製品の品質および性能は保証されません。

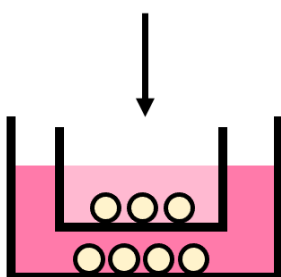
## 細胞膜分取原理



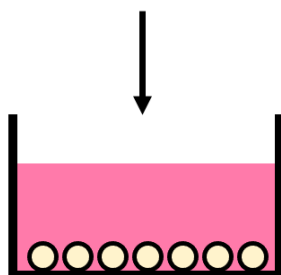
遊走因子等を含む遊走培地を *UpCell*<sup>®</sup> Plate に準備して下さい。



*UpCell*<sup>®</sup> Plate に VIVANT-CELL<sup>®</sup> -Pot をセットして下さい。  
膜上に細胞を加えて培養します。



遊走能によって細胞が膜下に分取されます。



分取された細胞を各種アプリケーションにご使用下さい。  
細胞回収方法については、P7の「*UpCell*<sup>®</sup> Plate 細胞回収方法」をご確認下さい。

## VIVANT-CELL<sup>®</sup>-Pot with *UpCell*<sup>®</sup> Plate 以外に必要な材料および機器

### 細胞

- ・組織より得られた初代培養細胞 等

### 培養器材

- ・細胞培養フラスコ／シャーレ
- ・遠沈管

### 試薬

- ・細胞培養培地
- ・細胞遊走因子 等

### 機器

- ・CO<sub>2</sub> インキュベーター
- ・細胞遠心分離機
- ・アスピレーター
- ・マイクロピペット、チップ
- ・細胞計数盤
- ・倒立顕微鏡

## 手順(例: 接着細胞)

1. 細胞の準備を行います<sup>(注1)</sup>。
  - a. 細胞分離を行う目的の細胞を 80%コンフルエントの状態まで培養します<sup>(注2)</sup>。
  - b. 細胞培養上清を除去して PBS で洗浄後、分散試薬(トリプシン等)を加えてインキュベーターし、細胞を剥離して下さい。
  - c. 顕微鏡観察下で細胞の剥離を確認後、培地等を加えて分散処理を停止して下さい。
  - d. ピペッティングにて細胞を分散し、細胞計数盤等で細胞数を計数して下さい。
  - e. 算出した細胞濃度を元に、 $2.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^5$  個/300  $\mu$ L/ウェルの細胞懸濁液を調製します。細胞の懸濁液には、血清または遊走因子を含まない等の、遊走条件に適合した培地を使用して下さい。

**NOTE : 細胞種により懸濁液の濃度を最適化する必要がある場合があります。**

2. VIVANT-CELL<sup>®</sup>-Pot を準備します。
  - a. 遊走培地<sup>(注3)</sup>を UpCell<sup>®</sup> 12well Plate に 1 ウェル当たり 2.0mL ずつ加えて下さい。
  - b. VIVANT-CELL<sup>®</sup>-Pot の滅菌袋を開封します。ピンセットを使用して VIVANT-CELL<sup>®</sup>-Pot を取り出し、膜面保護材を取り除いて下さい。
  - c. 遊走培地の入ったウェルに VIVANT-CELL<sup>®</sup>-Pot を静かにセットします。



**NOTE : 膜の下面に気泡をトラップしないように注意して下さい。セット時に VIVANT-CELL<sup>®</sup>-Pot 本体を少し傾けることで気泡のトラップを回避できます。**

3. 分離膜上面に細胞を加えます。
  - a. 分離膜の上面に、上記で調製した 300  $\mu$ L の細胞懸濁液を加えて下さい。
  - b. プレートの蓋をして 37°C CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間培養します。
4. 細胞分取を終了します。
  - a. 24 時間の培養後、UpCell<sup>®</sup> 12well Plate から VIVANT-CELL<sup>®</sup>-Pot を静かに取り除き、分取細胞を顕微鏡で確認して下さい。
  - b. 分取された細胞は必要に応じて目的の細胞数まで培養・継代を行い、各種アプリケーションに使用して下さい。

注1: 増殖活性の高い細胞を使用することを推奨します。

注2: 適切な培養細胞の密度は実験系により異なります。適宜ご検討ください。

Sotiropoulou, PA., et al., *Stem Cells*. 2006;24(2):462-71.

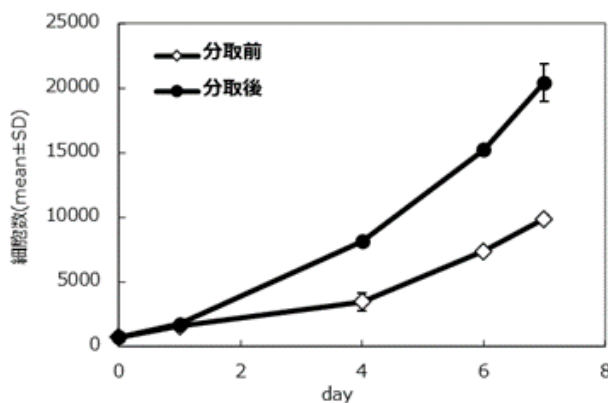
注3: 遊走培地については実験系に応じてご検討ください。stromal cell-derived factor 1  $\alpha$  (SDF1  $\alpha$ ) あるいは牛胎児血清(FBS)等を用いた報告があります。

## UpCell® Plate 細胞回収方法

- ウェル表面は32°Cを境に疎水性となりますので、細胞の培養は必ず32°C以上で行って下さい。  
(推奨培養温度は37°Cです)
- 細胞を回収する時は温度を20°C程度に下げ、30分ほどそのまま静置して下さい。  
細胞の種類によっては自然に剥離します。
- 20°Cに温度低下後、30分程度静置しても細胞が付着したままの場合は、ウェル内の培地を穏やかにピペッティングすると、付着していた細胞が剥がれてきます。  
※細胞の種類によっては完全に剥がれないものがあります。予めご了承ください。
- 細胞がコンフルエントになる前に回収する方が、細胞懸濁液の分散は容易です。
- 本製品はディスポーザブルタイプです。繰り返しの使用はお控え下さい。

## 使用例

- (1) UpCell®12well Plate に 100ng/mL G-CSF 含有培地を添加した後、VIVANT-CELL®-Pot をセットした。
- (2) 分離膜の上面に無血清培地で懸濁したヒト骨髄由来間葉系幹細胞(Lonza)の細胞懸濁液 (5.0x10<sup>4</sup> 個/Pot)を播種した後、フタを閉め、37°Cインキュベーター内で分取した。
- (3) 膜分取48時間後にVIVANT-CELL®-Pot を除去した後、分取した細胞を拡大培養した。
- (4) 拡大培養後、UpCell®12well Plateで培養した分取細胞では、あらかじめ20°Cインキュベーターで調温した培地で交換した後、低温インキュベーター内で20°C、30min処理、未分取細胞に関しては0.1%トリプシンで37°C、5min処理し、細胞を回収した。
- (5) それぞれの細胞を96well plateに1000個/well播種した後、WST-8アッセイを行い、播種0,1,4,6,7日後の生細胞数を計数した。



## トラブルシューティングガイド

問題	原因	対処法
細胞分取されない または 細胞分取数が少ない	アプライする細胞数が多い または少ない	アプライする細胞数を最適化して下さい。
	分離膜が下層の培地に 接していない	十分量の遊走培地(推奨2.0mL)をプレートウェルに加えて下さい。
	細胞遊走条件が適して いない	遊走条件は細胞により異なる可能性があります。遊走条件の最適化を行って下さい。また本手法により細胞分離できないこともあります。
分取細胞が不均一／ 不自然に多い	分離膜が破損している	使用前に破損がないか確認し、細胞添加時に膜面を傷つけないようにご注意下さい。
膜下面に気泡がトラップ された		VIVANT-CELL <sup>®</sup> -Potを一度液面からゆっくり引き上げ、そのままの状態では気泡が消えるまで保持し、消泡後に再度セットして下さい。セット時に本体を少し傾けることで気泡のトラップを回避できます。

### 発売元：株式会社セルシード

〒135-0064

東京都江東区青海2-5-10

テレコムセンタービル東棟15F

URL: <https://www.cellseed.com>

E-mail: [sales.ccw@cellseed.com](mailto:sales.ccw@cellseed.com)

ICC-045-01