

## 幹細胞抽出培養シートを用いた幹細胞の抽出と培養

### 本製品(幹細胞抽出培養シート)について

幹細胞抽出培養シート(以下“シート”)にヒトの組織または細胞を播種すると、幹細胞がシートを構成する繊維を足場として迅速に増殖する。増殖した幹細胞は、トリプシン処理によってシートから剥離・回収することができる。また、幹細胞シートとしてそのまま動物に移植することができる。さらに、このシートは生分解性の素材で出来ており、生体内に長期的に埋め込んで徐々に生分解することも実証済みである。すでに、このシートは**脂肪・歯髄・骨髄**などの幹細胞の抽出と培養に応用されている。

### …目次…

<b>1. 実験準備</b>	<b>2</b>
1-1 使用する試薬・器具類.....	2
1-2 シートサイズと培養ツール (ウェルプレートやテフロン目皿など)の選択について.....	3
1-3 シートの脱気.....	4
<b>2. 組織の播種</b>	<b>5</b>
2-1 基本的な培養方法の選択.....	5
2-2 シートの構造上の特徴と細胞増殖の関係について.....	5
2-3 組織播種の手順.....	7
[1] シート1枚で培養の場合.....	7
[2] シート2枚で培養の場合.....	8
<b>3. 細胞の播種</b>	<b>9</b>
3-1 基本的な培養方法の選択.....	9
3-2 細胞播種の手順.....	9
<b>4. 培養したシートの観察と評価</b>	<b>11</b>
4-1 顕微鏡でのシートの観察.....	11
4-2 シート上の細胞増殖能の評価(WST-1 アッセイ).....	13

## 1. 実験準備

### 1-1 使用する試薬・器具類

- ・幹細胞抽出培養シート(本製品:  $\phi$  14 mm,  $\phi$  20 mm,  $\phi$  23 mm,  $\phi$  32 mm)
  - ・専用培地(無血清培地を用いる場合は接着因子のコートが必要になることがある)
  - ・テフロン目皿やガラスリングなど(培養時やシートの脱気時に重しとして使用) 図 1・図 2 参照  
クローニングリング(外径 12 mm, 内径 10 mm, 高さ 10 mm) AGC テクノグラス(株) 品番 RING-12,  
テフロン目皿  $\phi$  15 mm(厚さ 3 mm, 穴径 2 mm) 榊東新理興, テフロン目皿  $\phi$  20 mm(厚さ 3 mm, 穴径 2 mm) 榊東新理興,  
テフロン目皿  $\phi$  30 mm(厚さ 3 mm, 穴径 2 mm) 榊東新理興
- ※ テフロン目皿やガラスリング等の重しは培地の液量を減らすなどの工夫により、不要となる場合あり
- ・細胞低接着性のウェルプレート  
超低接着表面プレート 6 ウェル コーニング 品番 3471, 超低接着表面プレート 24 ウェル コーニング 品番 3473,  
Nunclon Sphera 12 ウェル サーモフィッシャー 品番 174931

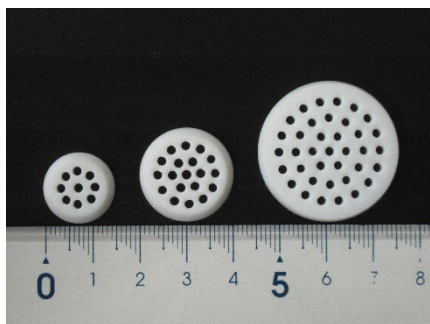


図 1 テフロン目皿  
(左から  $\phi$  15 mm,  $\phi$  20 mm,  $\phi$  30 mm)



図 2 クローニングリング, RING-12

## 1-2 シートサイズと培養ツール(ウェルプレートやテフロン目皿など)の選択について

組織を播種する場合: 表 1

細胞を播種する場合: 表 2

ウェルプレートとシートの組み合わせのイメージ: 図 3

表 1 シートサイズや培養ツールなどの選択(組織播種)

培養容器	シートサイズ	播種する組織量 (推奨)	目皿サイズ (推奨)	培地量(推奨)
細胞低接着性 6 ウェルプレート (ウェル底直径: 約 34 mm)	φ 32 mm	0.15 g	φ 30 mm	4.5 mL
	φ 23 mm	0.05 g		
細胞低接着性 12 ウェルプレート (ウェル底直径: 約 22 mm)	φ 20 mm	0.05 g	φ 20 mm	2.5 mL
細胞低接着性 24 ウェルプレート (ウェル底直径: 約 15 mm)	φ 14 mm	0.05 g	φ 15 mm	1.0~1.2 mL

表 2 シートサイズや培養ツールなどの選択(細胞播種)

培養容器	シートサイズ	播種する細胞数 <sup>※1</sup>	ガラスリングの 使用 <sup>※2</sup>	培地量(推奨)
細胞低接着性 6 ウェルプレート (ウェル底直径: 約 34 mm)	φ 32 mm	8.0 万 cells	-	4.5 mL
	φ 23 mm	4.2 万 cells	使用推奨	
細胞低接着性 12 ウェルプレート (ウェル底直径: 約 22 mm)	φ 20 mm	3.1 万 cells	-	2.5 mL
細胞低接着性 24 ウェルプレート (ウェル底直径: 約 15 mm)	φ 14 mm	1.5 万 cells	-	1.0~1.2 mL

※1 播種する細胞数は、1 万 cells/cm<sup>2</sup> になるように算出した値を示したが、ユーザーが目的に応じて変更可能

※2 シートサイズ φ 32 mm、φ 20 mm、φ 14 mm は各ウェル底との直径サイズが近いので、ガラスリングを使用せずに細胞を滴下して播種しても問題ないが、6 ウェルプレート(ウェル底直径約 34 mm)にシートサイズ φ 23 mm を入れて細胞を播種する場合は、ガラスリングの使用を推奨

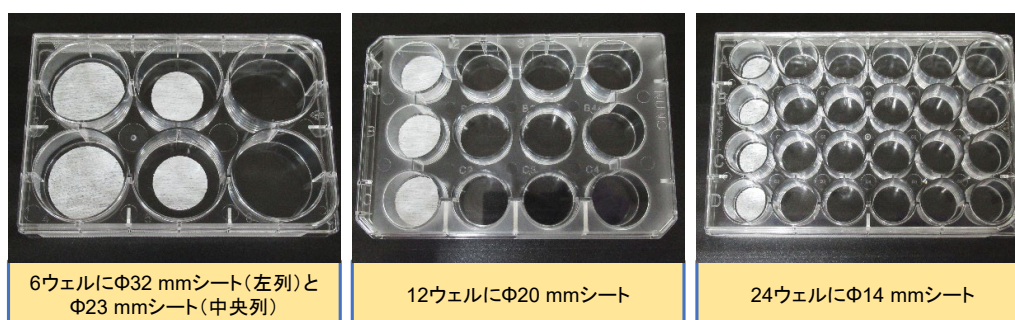


図 3 低接着ウェルプレートにシートを入れた様子(Dry の状態)

### 1-3 シートの脱気

シートを使用前に脱気する。

- 1) 10 cm ディッシュに培地を 8~10 mL 加える。
- 2) シートを滅菌済みのピンセットで必要枚数取り出し、培地が入っているディッシュへ入れる。
- 3) シートの上から重しとして滅菌済みのテフロン目皿やガラスリングをのせてシートを完全に沈める(図 4)。  
✓ポイント シートは撥水性なので図 5 のように沈みにくい場合は、揺らしたり重しの位置などを工夫する。



図 4 φ23 mm シートの脱気例  
(テフロン目皿 30 を重しとして使用)

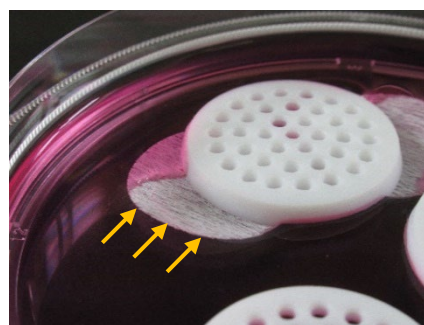


図 5 シートが培地に沈んでいない状態  
(矢印部分)

- 4) -0.09 MPa で 1 min 程度脱気する。気圧計がない場合は、水流アスピレーターで 10 min 程度脱気する。  
✓ポイント 脱気中はときどきデシケーターをかるく揺らすと、シートの繊維から気泡が抜けやすくなる。

## 2. 組織の播種

### 2-1 基本的な培養方法の選択

細胞低接着性のウェルプレートで培養を行う。幹細胞抽出培養シート(以下“シート”)1枚で培養する方法(組織の上にシートをのせる)とシート2枚で培養する方法(組織を上下からシートで挟む)がある。さらに多くのシートを積層して培養することも可能である。また、シートは4種類( $\phi$  14 mm,  $\phi$  20 mm,  $\phi$  23 mm,  $\phi$  32 mm)あり、目的に応じて最適なシートを選択する。シート毎に推奨の組織播種量や目皿のサイズ、ウェルプレートの種類が異なる(表1)。

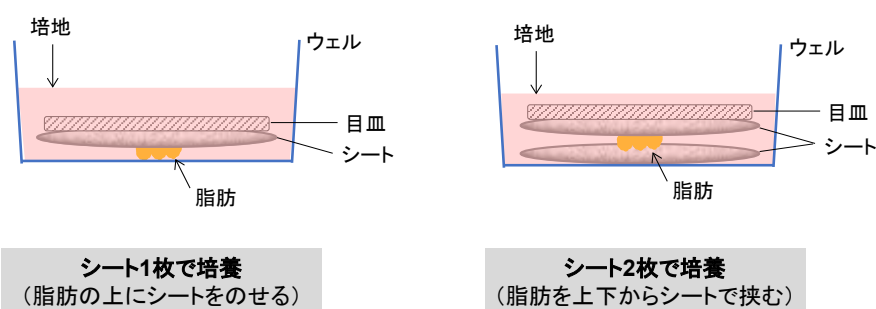


図6 基本的な培養方法

### 2-2 シートの構造上の特徴と細胞増殖の関係について

シートの特徴として、繊維に配向性があるという点があげられる。

特徴と細胞増殖の関係について以下に述べる。

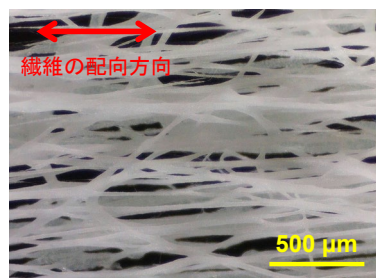


図7 繊維の配向性

#### 繊維の配向性について

図7のようにシートの繊維には配向性があり、これまでの研究で組織から這い出した細胞は配向方向に沿って遊走しながら増殖することが分かっている。

この細胞の特性を利用して、シート全体に細胞を効率よく増殖させる組織の播種方法を以下に紹介する(図8・9参照)。なお、シート2枚で培養する場合は、2枚のシートの繊維の配向方向を揃えた方が細胞増殖速度の向上を期待できる。

**組織を縦に並べる方法**

シートの中心を通り、配向方向に対して垂直なラインに組織を播種する

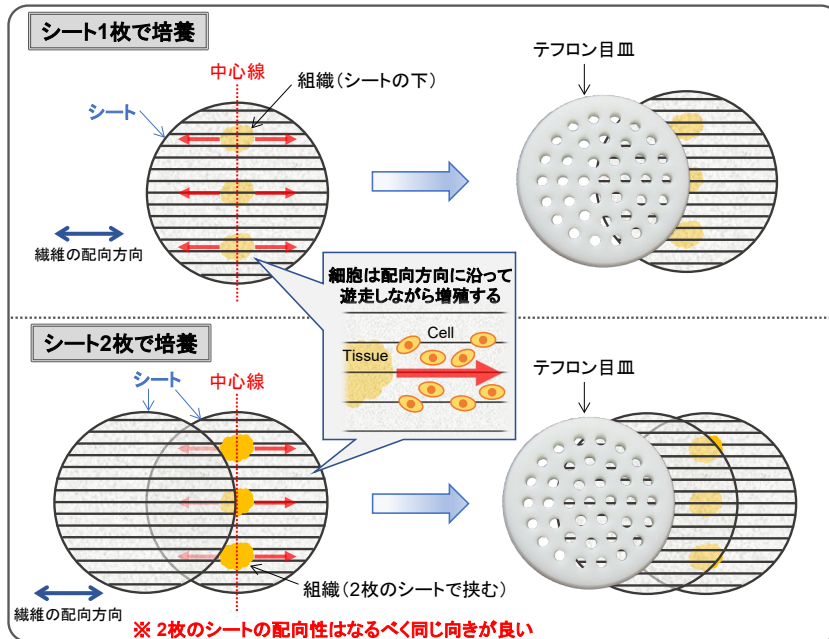


図 8 組織を縦に並べる播種方法

**組織をバラバラに置く方法**

細かくカットした組織をシートの全面に播種する

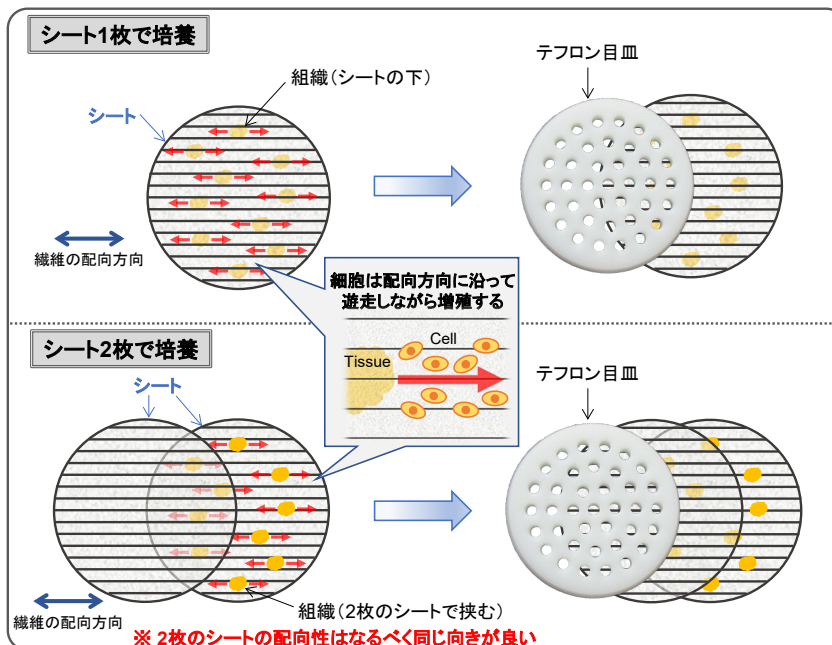


図 9 組織をバラバラに置く播種方法

## 2-3 組織播種の手順

組織播種の手順を以下に紹介する。播種後はインキュベーター(37℃, 5%CO<sub>2</sub>)に入れて培養を開始する。なお、培地交換は2~4日おきに全量を交換する。

- ※ シートや目皿、組織を扱うときはコンタミネーションを防ぐために、滅菌済みのピンセットやピペット等を使用
- ※ 作業中、組織や脱気済みのシートは乾燥を防ぐため、なるべく培地中に浸しておく(長時間空気に曝さない)

## [1] シート1枚で培養の場合(図10参照)

- 1) 適切なシートと適切なウェルプレートを選択し(表1参照)、ウェル底にうすく液膜が張る程度の量の培地を加える。
- 2) ウェル底に組織を置く。  
φ14 mm、φ20 mm、φ23 mm シートで培養する場合は組織量 0.05 g、φ32 mm シートで培養する場合は組織量 0.15 g を推奨する。  
✓ポイント 均一な細胞シートを作製するために、組織を縦に並べる播種方法やバラバラに置く播種方法を推奨する(図9、10参照)。  
✓ポイント ウェルに組織をのせたときに組織が浮遊してしまう場合は、培地量を減らして液面を低くする。
- 3) 組織の上から脱気済みのシートを1枚のせて、さらに重しとして上から滅菌した適切なサイズの見皿をのせる(表1参照)。  
✓ポイント シートと組織を密着させるように、目皿の上からピンセットやピペットの先端で軽く押さえる。
- 4) 目皿が完全に浸る量の培地を加える(表1参照)。  
✓ポイント 一気に培地を加えると目皿やシートが浮くことがあるので、培地は目皿の上から緩やかに加える。
- 5) インキュベーター(37℃, 5%CO<sub>2</sub>)に入れて培養を開始する。

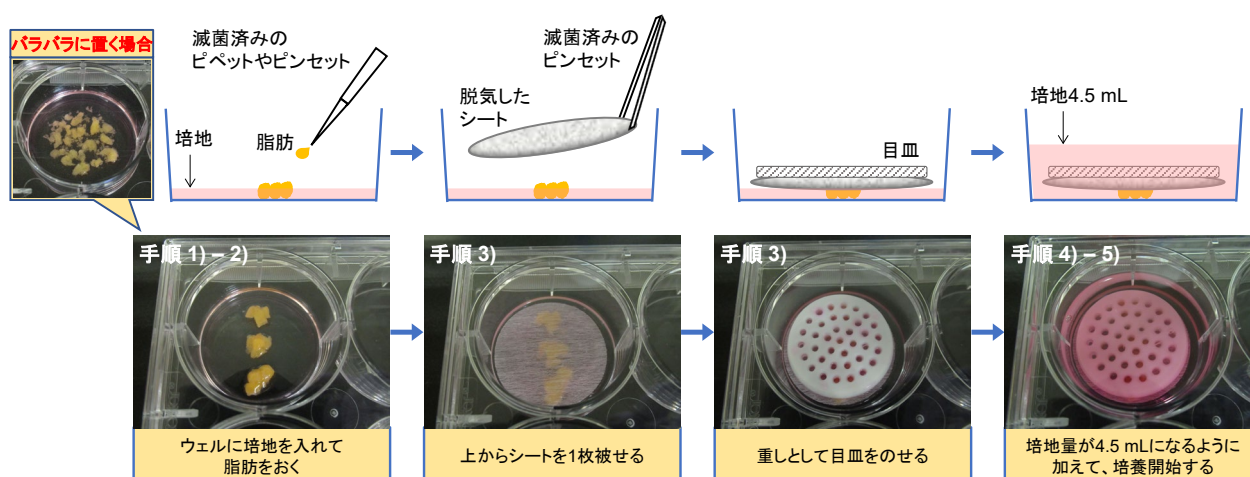
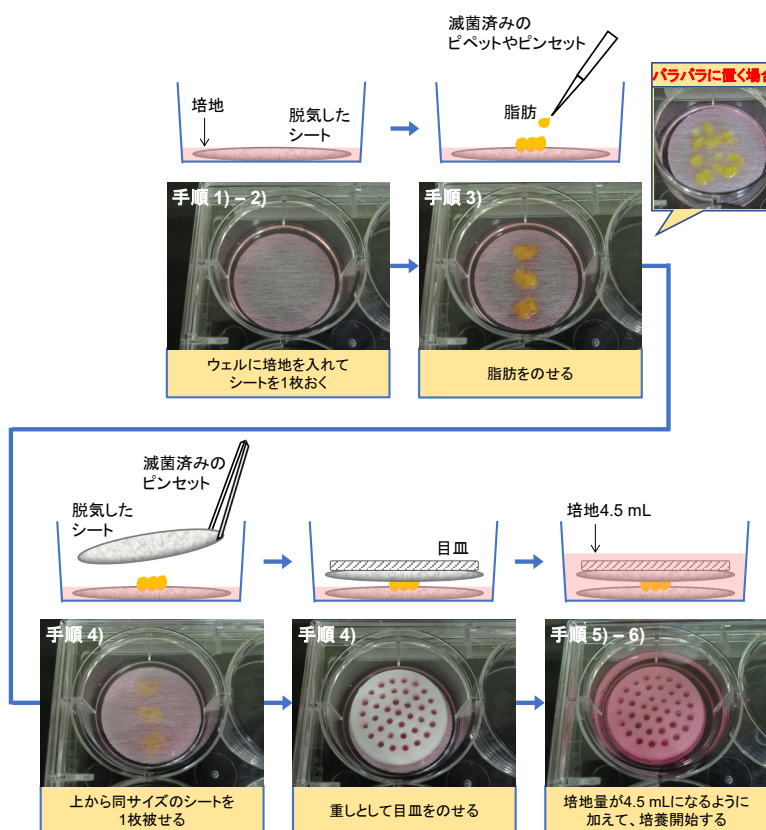


図10 シート1枚で培養時の組織播種の手順(例 φ32 mm シート, 6 ウェルプレート, 脂肪組織播種)

## [2] シート2枚で培養の場合(図11参照)

- 1) 適切なシートと適切なウェルプレートを選択し(表1参照)、ウェル底に薄く液膜が張る程度の量の培地を加える。
- 2) ウェルに脱気済みのシートを1枚入れる。
- 3) シートに組織を置く。  
 $\phi$ 14 mm、 $\phi$ 20 mm、 $\phi$ 23 mm シートで培養する場合は組織量 0.05 g、 $\phi$ 32 mm シートで培養する場合は組織量 0.15 g を推奨する。  
 ✓ポイント 均一な細胞シートを作製するために、組織を縦に並べる播種方法やバラバラに置く播種方法を推奨する(図9、10参照)。  
 ✓ポイント シートの上に組織をのせたときに組織が浮遊してしまう場合は、培地量を減らして液面を低くする。
- 4) 組織の上から脱気済みのシートを1枚のせて、さらに重しとして上から滅菌した適切なサイズの目皿をのせる(表1参照)。  
 ✓ポイント シートと組織を密着させるように、目皿の上からピンセットやピペットの先端で軽く押さえる。
- 5) 目皿が完全に浸る量の培地を加える(表1参照)。  
 ✓ポイント 一気に培地を加えると目皿やシートが浮くことがあるので、培地は目皿の上から緩やかに加える。
- 6) インキュベーター( $37^{\circ}\text{C}$ ,  $5\%\text{CO}_2$ )に入れて培養を開始する。

図11 シート2枚で培養時の組織播種の手順(例  $\phi$ 32 mm シート, 6 ウェルプレート, 脂肪組織播種)



### 3. 細胞の播種

#### 3-1 基本的な培養方法の選択

細胞低接着性のウェルプレートで培養を行う。幹細胞抽出培養シート（以下“シート”）に細胞（懸濁液）を播種し、細胞シートを作製する手法を以下に紹介する。なお、使用するシートサイズによって推奨の細胞播種量やガラスリングの有無、ウェルプレートの種類が異なる（表 2 参照）。

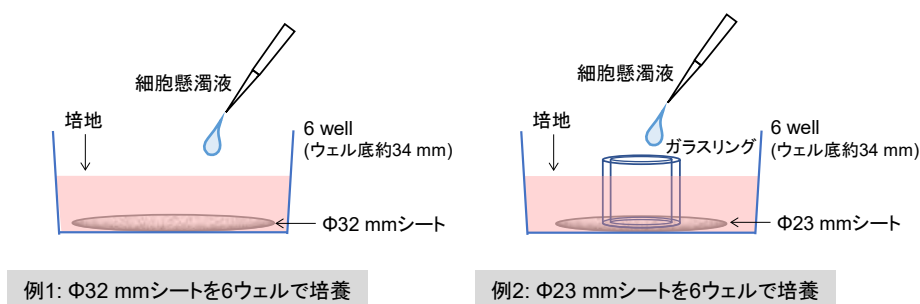


図 12 シートへの細胞の播種方法

#### 3-2 細胞播種の手順

細胞播種の手順を以下に紹介する。播種後はインキュベーター（37℃、5%CO<sub>2</sub>）に入れて培養を開始する。なお、培地交換は 2～4 日おきに全量を交換する。

- ※ シートや目皿、細胞懸濁液を扱うときはコンタミネーションを防ぐために、滅菌済みのピンセットやピペット等を使用
- ※ 作業中、脱気済みのシートは乾燥を防ぐため、なるべく培地中に浸しておく（長時間空気に曝さない）
- ※ 細胞を播種する場合は、組織を播種する場合と異なり、シートの表と裏の区別はそこまで重要ではない。ただし、実験条件の統一の観点から、表もしくは裏を区別することをすすめる

- 1) 適切なシートと適切なウェルプレートを選択し、培地を加える（表 2 参照）。
- 2) ウェルに脱気済みのシートを入れて沈める。
- 3) 必要な場合は、滅菌したガラスリングをシートの中央にのせる（表 2 参照）。
- 4) 細胞懸濁液をシートの上から播種する。ガラスリングを使用する場合は、ガラスリングの内側に播種する。
  - ※ 培地量が多くてガラスリングから播種する細胞懸濁液が溢れるおそれのある場合には、手順 1)での加える培地量を少なめにしておかないように工夫する
  - ※ 播種後に推奨の培地量になるように加える培地量と播種する細胞懸濁液の量を調節する
- 5) インキュベーター（37℃、5%CO<sub>2</sub>）に入れて培養を開始する。なお、播種して 24 時間後にガラスリングを外してシートのみで培養を継続しても問題ない。

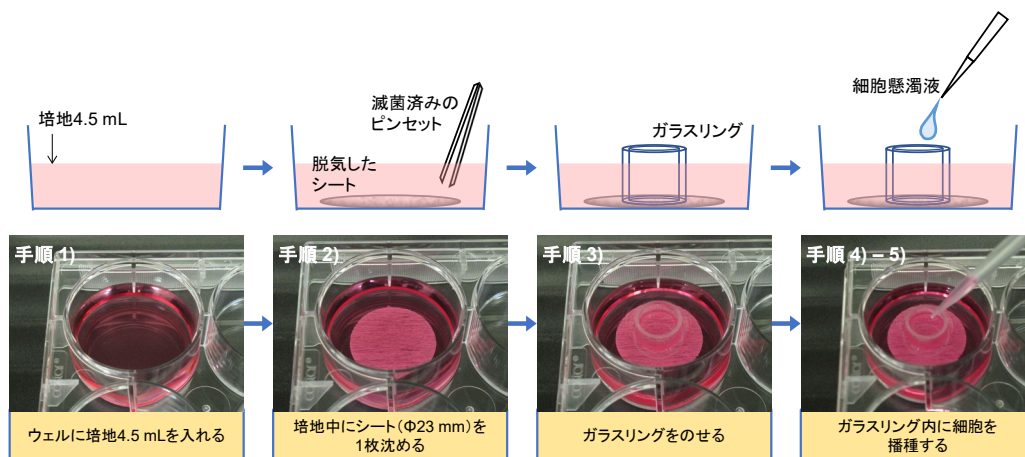


図 13 ガラスリングを使用した場合の細胞播種の手順(φ23 mm シート, 6 ウェルプレート)

## 4. 培養したシートの観察と評価

### 4-1 顕微鏡でのシートの観察

培養したシートを DAPI および Phalloidin 染色し、顕微鏡で蛍光観察をする手順を以下に紹介する。

※ シートに接着している細胞は位相差像などで観察することも可能

#### 準備するもの

- ・培養したシート
- ・4 %パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液(4 %PFA) ナカライテスク 品番 09154-14
- ・D-PBS(1x) ナカライテスク 品番 14249-24
- ・DAPI 和光純薬 品番 34207431
- ・Alexa Fluor 488 Phalloidin サーモフィッシャー 品番 A12379
- ・ガラスベースディッシュ
  - 35 mm ガラスベースディッシュ(ガラス部分 φ27 mm) IWAKI 品番 3910-035
- ・カバーガラス
  - 丸カバーガラス φ32 mm 厚み No.1(特注品) 松浪硝子工業
- ・蛍光顕微鏡

#### 手順

- 1) 培養したシートが入っているウェルから培地を全量抜き取る。
- 2) 十分な量の 4 %PFA を加え、室温で固定化する。
  - ✓ポイント ウェル内に組織由来の浮遊物がある場合は、新しいウェルプレートを用意し、そこに 4 %PFA を加えてシートのみピンセットで移して固定を行ってもよい。
- 3) 固定化後、4 %PFA を全量抜き取り、手順 2)の 4 %PFA と同量の D-PBS(1x)を加えてやさしくプレートを揺する。溶液を全量抜き取って再度フレッシュな D-PBS を同量加える。このように D-PBS の入れ替えを 4~5 回繰り返してシートを洗浄する。
- 4) 洗浄後、溶液を全量抜き取り、ウェルに新たにフレッシュな D-PBS を入れて(液量は表 3 を参照)、200 ~400 倍希釈になるように Alexa Fluor 488 Phalloidin を加える。
  - ✓ポイント シートが完全に浸る液量にする。

表 3 シート染色時の D-PBS 量

シートのサイズ	ウェルプレート	手順 4)の D-PBS 量
φ 32 mm	6 ウェルプレート	1~2 mL
φ 23 mm		
φ 20 mm	12 ウェルプレート	1 mL
φ 14 mm	24 ウェルプレート	0.5 mL

- 5) 室温で 6 時間静置して染色する。
- 6) 6 時間後、400 倍希釈になるように DAPI を加える。  
※ 例えば φ 32 mm シートを染色するとき、D-PBS が 2 mL の場合は DAPI を 5 μg 加える
- 7) 室温で 20 分静置して染色する。
- 8) 染色後、溶液を全量抜き取って手順 4)と同量の D-PBS を加えてかるくプレートを揺する。溶液を全量抜き取って再度フレッシュな D-PBS を同量加える。このように D-PBS の入れ替えを 4~5 回繰り返してシートを洗浄する。
- 9) 染色したシートはガラスベースディッシュに移して蛍光顕微鏡にて蛍光像を観察する。ディッシュに移したシートは乾燥を防ぐために適量の D-PBS で湿潤させ、気泡が入らないように上からカバーガラスをのせてシートを抑える(図 14 参照)。  
※ この方法で観察が可能なのは、φ 14 mm、φ 20 mm、φ 23 mm のシートである。φ 32 mm のシートは、ガラスベースディッシュではガラス部分のサイズ的に対応できない

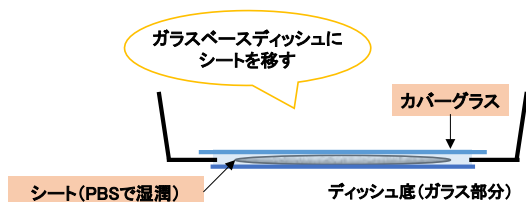
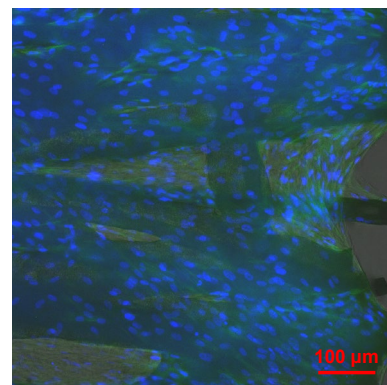


図 14 培養したシートの観察用サンプルの作製



DAPI(核)およびAlexa Fluor 488 Phalloidin(F-アクチン)で染色  
図 15 ヒト歯髄組織を播種して培養したシートの蛍光観察画像

## 4-2 シート上の細胞増殖能の評価(WST-1 アッセイ)

培養したシート上の細胞増殖を、発色測定(WST-1 アッセイ)により調べる。

### 準備するもの

- ・培養したシート
- ・Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System タカラバイオ 品番 MK400
  - ※ 以下“WST-1 試薬”と記載
- ・培養時に使用した培地
- ・反応用ウェルプレート(新品, 細胞培養用に表面処理されたもの)
  - Costar® 6 ウェル 細胞培養処理マルチウェルプレート コーニング 品番 3516,
  - Costar® 12 ウェル 細胞培養処理マルチウェルプレート コーニング 品番 3513,
  - Costar® 24 ウェル 細胞培養処理マルチウェルプレート コーニング 品番 3526
- ・測定用 96 ウェルプレート
  - Corning® 96 ウェル 細胞培養表面処理ポリスチレンマイクロプレート コーニング 品番 3596
- ・マイクロプレートリーダー

### 手順

- 1) 培養したシートのサイズに合わせて、新品の反応用ウェルプレートを用意する(表 4 参照)。
  - ✓ポイント 培養で使用した細胞低接着性のウェルプレートは表面に多少は細胞が接着する可能性があるため、培養したシートのみでのデータを得るためには新品のウェルプレートを使用した方が良い。
- 2) 表 4 記載の通り、ウェルに培地と WST-1 試薬を加え、ピペッティングして十分に混合する。
  - ✓ポイント サンプル数+1 ウェル(Blank)用意する。

表 4 WST-1 測定の培地量と試薬添加量

シートのサイズ	反応用ウェルプレート	培地量	WST-1 試薬添加量※
φ 32 mm	6 ウェルプレート	4 mL	400 μL
φ 23 mm			
φ 20 mm	12 ウェルプレート	2 mL	200 μL
φ 14 mm	24 ウェルプレート	1 mL	100 μL

※ 通常 WST-1 試薬は培地に対して 1/10 量を添加

- 3) 手順 2)の各ウェルに、培養したシートを沈める。シートと溶液をなじませるためプレートをかるく揺する。
- 4) ウェルプレートをインキュベーター(37°C, 5 % CO<sub>2</sub>)に入れて 4 時間反応させる。

- 5) 4 時間後ウェルプレートを取り出して、反応液が均一になるようにプレートをかき混ぜる。
- 6) マイクロピペットで反応液を 100  $\mu$ L 取り、96 ウェルプレートに移す。  
✓ポイント 96 ウェルに気泡が入らないように注意する。もし気泡が入ってしまった場合は針などで突いて除去する。
- 7) マイクロプレートリーダーにて波長 440 nm の吸光度を計測する。
- 8) サンプルの吸光度(実測値)から Blank の吸光度を引いて値を補正する。吸光度と生細胞数は相関するため、シート上で培養された細胞の増殖を評価できる。  
✓ポイント シートに組織(または細胞)を播種して培養する場合、コントロールとしてシートと同サイズの丸カバーグラスを用意しても良い。