

Genocel® Advance ϕ 4mm 取扱説明書

<製品の特長>

- ・ゼラチンのみで構成された、不織布状の繊維足場材です。
- ・特殊な繊維構造のため、膨潤した状態でも強度を有し、ピンセット等で容易にハンドリングできます。
- ・膨潤時の透明性が良好なため、光学顕微鏡、位相差顕微鏡、共焦点顕微鏡で細胞を観察できます。
- ・細胞培養足場材として使用することができます。

<保存条件>

- ☐ 保管は直射日光を避けて常温で保管してください。使用期限は製品パッケージに記載しています。
- ☐ 本製品はガンマ線滅菌済みです。再滅菌、再使用はできません。

<使用条件>

- ☐ 本製品は研究用です。臨床用途には使用できません。

<開封前に>

- ☐ 滅菌袋開封前に破れ等の損傷が無いか必ずご確認ください。
- ☐ 開封後は使い切りとしてください。
- ☐ *Genocel*® Advance ϕ 4mm は、1.5 ml チューブに入れた状態で、包装されています。
- ☐ *Genocel*® Advance ϕ 4mm が飛び出さないよう、穏やかに開封してください。

<播種前に>

- ☐ *Genocel*® Advance ϕ 4mm は静電気を帯びやすくなっております。1.5 ml チューブから移動させる場合には静電気で飛び出しやすくなっておりますので、ご注意ください。
- ☐ 細胞種、その後の実験により適切な播種条件が異なります。細胞濃度と播種方法を変え、適切な播種条件を設定いただくことを推奨します。

<培養実績のある細胞種>

- ☐ ヒト間葉系幹細胞 (hMSC)、マウス線維芽細胞 (MC3T3-E1、3T3-L1、L929)、マウス間葉系幹細胞様細胞 (KUM6)、ラット骨髄より採取した MSC、ヒト乳腺上皮細胞 (EpH4V)、ヒト胎児腎細胞 (HEK293)、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞、ヒト脂肪由来幹細胞 (ADSC)、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)、チャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞 (V79)、HeLa 細胞での培養を確認しております。
- EpH4V、HUVEC では *Genocel*® Advance ϕ 4mm との接着性は他の細胞と比較して低い傾向があります。

《Genocel® Advance φ4mm を用いた高効率播種と3次元培養》

- * 3次元構造体を早期に構築するためにも、細胞を高効率に播種することは重要です。
- * 細胞懸濁液を高濃度にする事で、Genocel® Advance φ4mm へ細胞が接着する確率が上がります。
- * 非増殖性細胞の場合でも、本播種方法を実施することにより、高密度に細胞を播種可能です。

QRコードから高効率播種の
操作動画をご覧になれます。

<https://nikkemedical.com/product/spec.html>



I. 必要な消耗品および備品

- ・ Genocel® Advance φ4mm
- ・ 20 μl ピペット
- ・ 1000 μl ピペット (Genocel® Advance φ4mm を誤って吸引してしまうことを防ぐため、アスピレーティングピペットは使用しないでください)
- ・ 先端がとがっていない滅菌済みピンセット 2本
(先端がとがったピンセットを使用すると、Genocel® Advance φ4mm を把持する際に裂ける恐れがあります)
- ・ 細胞接着処理未処理 6 ウェルプレート
(細胞接着処理未処理の培養皿を用いることで、細胞懸濁液が Genocel® Advance φ4mm に留まり、播種効率が高くなります。例：IWAKI 浮遊培養用マイクロプレート 1810-006)
- ・ 滅菌リン酸緩衝液
- ・ 15 ml 遠心チューブ

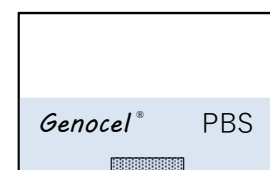
※基本的な細胞培養操作を行う上で必要な備品、消耗品は割愛して記載しております。

II. Genocel® Advance φ4mm への細胞播種

※6 個以下の Genocel® Advance φ4mm への細胞播種を想定した手順です。

7 個以上の Genocel® Advance φ4mm に細胞播種する場合は、V. テクニカルノートをご参照ください。

1. Genocel® Advance φ4mm を培養皿に設置し、滅菌リン酸緩衝液を添加して、10 分以上静置し、半透明になるまで膨潤させます。(右図参照)*¹



Genocel® の膨潤
(手順 1)

2. 凍結細胞、または、対数増殖期まで増殖させた細胞を計数した後、15 ml 遠心チューブ中で、高濃度の細胞懸濁液 (推奨 1.0×10^7 - 2.0×10^7 cells/ml) に再懸濁してください。*²
足場内に低濃度で細胞播種する場合は、 1.0×10^6 - 2.0×10^6 cells/ml を目安としてください。
3. Genocel® Advance φ4mm を設置した培養皿中のリン酸緩衝液を除去します。
ピペットが Genocel® Advance φ4mm に触れないようにご注意ください。

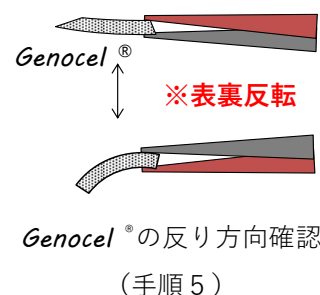
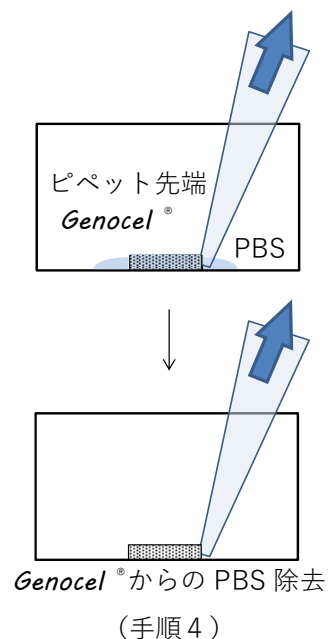
4. 1000 μ l ピпетットの先端を **Genocel[®] Advance ϕ 4mm** の端部にあて、
 ※端部 1 箇所から 1-2 回吸い、**Genocel[®] Advance ϕ 4mm** 内部のリン酸緩衝液を除去します。(右図参照) *3

下記写真のように、白濁しない程度を目安としてください。
 黒い卓上にてご確認くださいと容易にご判断いただけます。*4



5. 滅菌済みのピンセットで、**Genocel[®] Advance ϕ 4mm** の端部が破れないように優しく把持し、左図のように目視確認することで、**Genocel[®] Advance ϕ 4mm** に反りがあるかを確認します。(右図参照)
 ※必ず反転し、両方から反り方向を確認してください。反り方向を確認しやすくなります。

※**Genocel[®] Advance ϕ 4mm** をピンセットで把持する際、強く摘まみすぎると破れやすくなります。ピンセット端部に乗せるように優しく扱ってください。



6. 反りが見られた際は、凸面が上になるように、新しい細胞接着処理未処理の 6 ウェルプレートの中に設置してください。(右図参照) *5
 反りが見られない場合は、表裏いずれかを上にして設置します。
 設置後、**Genocel[®] Advance ϕ 4mm** をピンセットで軽く抑えてください。



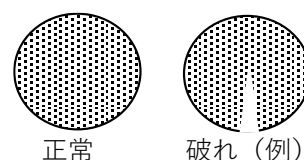
※反りがある場合に、反りの方向を誤って設置すると、細胞播種時に細胞が脱落し、播種効率が下がります。

※**Genocel[®] Advance ϕ 4mm** がピンセットから離れにくい場合には、予備のピンセットをご使用ください

7. 設置した **Genocel[®] Advance ϕ 4mm** が破れていないことを確認してください。(右図参照) *6

8. **Genocel[®] Advance ϕ 4mm** に含まれていた水分が、周りに漏れていないことを確認してください。
 ※漏れている場合は、水分を 1000 μ l ピпетットで吸引し、新たな乾燥状態のウェルに再設置してください。

細胞接着処理未処理の培養皿への
Genocel[®] の設置方向
 (手順 6)



Genocel[®] の破れ有無の確認 (手順 7)

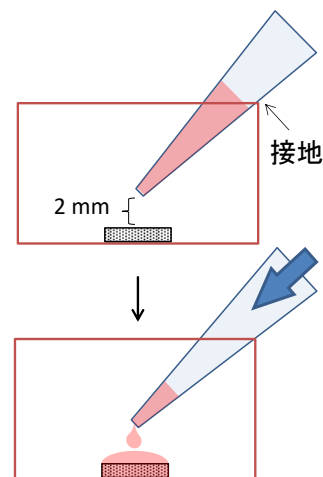
9. 20 μ l のピペットを用い、細胞懸濁液を 3～5 回ピペッティングした後、所定量の細胞懸濁液を保持します。

細胞懸濁液の保持量
<i>Genocel</i> [®] Advance ϕ 4mm
10～12 μ l

10. ピペットのチップをウェルプレート壁面に接地し*7、チップの先端を *Genocel*[®] Advance ϕ 4mm の中心部に、触れない程度まで近づけ、細胞懸濁液を慎重に滴下します。
(右図参照)

滴下後、*Genocel*[®] Advance ϕ 4mm の表面にドーム状の液滴が形成されます。*8

チップの先端で、*Genocel*[®] Advance ϕ 4mm に触れないようにご注意ください。



細胞懸濁液の滴下
(手順 10)



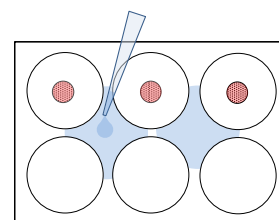
液滴の形成 (手順 10)

11. 細胞懸濁液の蒸散を防ぐため、ウェル間隙に滅菌リン酸緩衝液、または滅菌水を 2～4 ml 添加してください。(右図参照)

12. 37°C、5%CO₂ のインキュベーターの中で、3 時間静置します。*9

13. 3 時間培養後、1000 μ l ピペットを用いて、液体培地を添加します。
最初の 500 μ l は *Genocel*[®] Advance ϕ 4mm の周囲 5 mm に数点滴下してください。

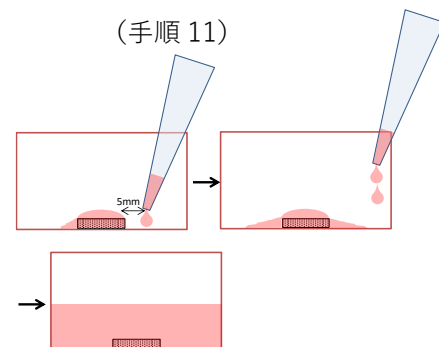
培養皿上の液滴が繋がり、*Genocel*[®] Advance ϕ 4mm が培養液でおおわれることを確認してください。(右図参照)



細胞懸濁液の蒸散防止
(手順 11)

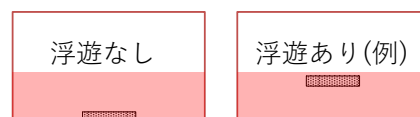
14. 培養液を追加で 1.5～2.5 ml 添加し、
1 ウェル内に計 2～3 ml としてください。

Genocel[®] Advance ϕ 4mm に直接当たらないように添加してください。
(右図参照)



培養液の添加 (手順 13、14)

15. *Genocel*[®] Advance ϕ 4mm がウェルプレート底面に接着され、浮遊していないことをご確認ください。(右図参照)
浮遊していると細胞が脱落し、播種効率が低くなります。



培養液添加後の *Genocel*[®] の
浮遊確認 (手順 15)

16. *Genocel*[®] Advance ϕ 4mm がウェルプレート底面に接着した状態で培養します。

III. *Genocel*® Advance φ4mmでの3次元培養の維持

17. 培地交換は、3～4日に1回、全量を交換してください。

培地交換の際には、1000 μl ピペットを用いて培地を除去し、
新たな培養液を添加してください。

吸引する時は、*Genocel*® Advance φ4mm にチップの先端があたらないようにしてください。

IV. *Genocel*® Advance φ4mmの反転および観察

18. *Genocel*® Advance φ4mm の上面に、より多くの細胞が留まります。

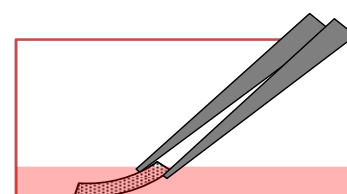
播種の翌々日以降に、*Genocel*® Advance φ4mm の上下を反転することで、より多くの細胞がいる面を
観察することができます。（右図参照）

ウェル内の培養液を除去して 500 μl にし、ピンセットをウェルプレートと

Genocel® Advance φ4mm の間に挿入することで、*Genocel*® Advance φ4mm
を浮遊させます。^{*10}

19. *Genocel*® Advance φ4mm の端部を先端がとがっていないピンセットで
把持し、上下反転します。^{*11*12}

20. 観察後に培養を維持する場合は、培養液を添加し、1 ウェルあたりに
総量 2～3 ml としてください。



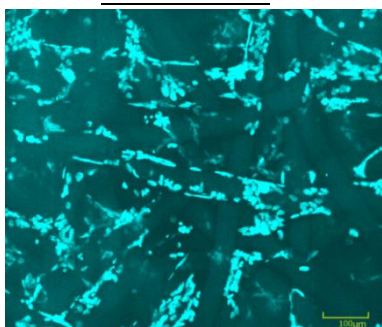
Genocel® の把持

（手順 18、19）

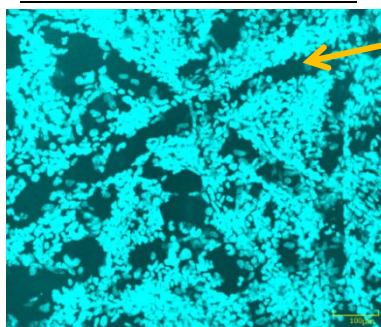
<<播種後の細胞分布例>>

- ・ HEK293 細胞 (2.0×10^7 cells/ml, 20 μl 播種)、培養 3 日目
- ・ 共焦点イメージングシステム (CQ1、横河電機) で生細胞観察 (Hoechst 染色)

培養皿接着面



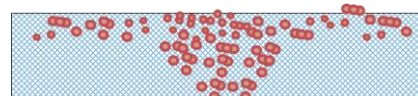
上下反転後 懸濁液滴下面



ゼラチン繊維

懸濁液滴下面：

細胞が空隙を満たすように密に存在



培養皿接着面：細胞が繊維表面に存在

（イメージ図）

* 全ての播種方法、培養を保証するものではありません。

V. テクニカルノート

A. 7個以上の *Genocel*[®] *Advance* ϕ 4mm への細胞播種

※併せて II. *Genocel*[®] *Advance* ϕ 4mm への細胞播種をご参照ください。

1. *Genocel*[®] *Advance* ϕ 4mm を培養皿に設置し、滅菌リン酸緩衝液を添加して、10分以上静置し、半透明になるまで膨潤させます。
2. II. *Genocel*[®] *Advance* ϕ 4mm への細胞播種 3～8 の手順に従い、*Genocel*[®] *Advance* ϕ 4mm を細胞処理未接着の培養皿上に接地します。

3. 20 μ l のピペットを用い、所定量の培養液を保持します。

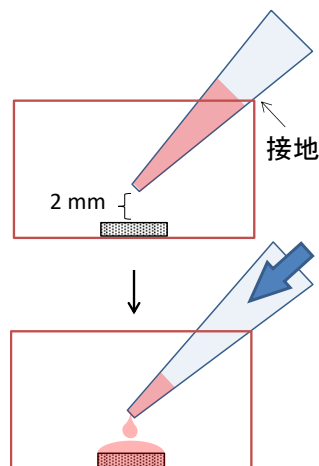
培養液の保持量
<i>Genocel</i> [®] <i>Advance</i> ϕ 4mm
10～12 μ l

4. ピペットのチップをウェルプレート壁面に接地し、チップの先端を *Genocel*[®] *Advance* ϕ 4mm の中心部に、触れない程度まで近づけ、培養液を慎重に滴下します。

滴下後、*Genocel*[®] *Advance* ϕ 4mm の表面にドーム状の液滴が形成されます。

(右図参照)

※ チップの先端で、*Genocel*[®] *Advance* ϕ 4mm に触れないようにご注意ください。



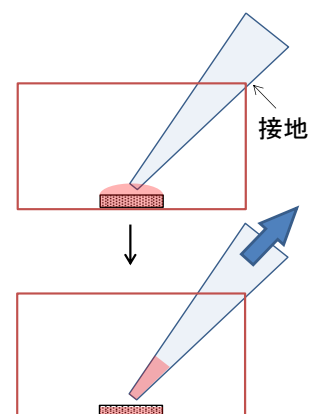
Genocel[®] への
培養液の滴下 (手順 4)

5. 培養液の蒸散を防ぐため、ウェル間隙に滅菌リン酸緩衝液、または滅菌水を 2～4 ml 添加してください。
6. 2枚目以降の 6 ウェルプレートに対しても、2～4 の操作を行い、実験に使用する *Genocel*[®] *Advance* ϕ 4mm すべての処理を完了します。
この状態で数時間保持することが可能です。
7. 細胞懸濁液を準備します。凍結細胞、または、あらかじめ対数増殖期まで増殖させた細胞を計数した後、15 ml 遠心チューブ中で、高濃度の細胞懸濁液 (推奨 1.0×10^7 - 2.0×10^7 cells/ml) に再懸濁してください。

8. ピペットのチップをウェルプレート壁面に接地し、チップの先端を *Genocel*[®] *Advance* $\phi 4\text{mm}$ 上のドーム状の液滴にあて、1回吸引し、ウェル間の隙間に培養液を除去します。（右図参照）

※ チップの先端が *Genocel*[®] *Advance* $\phi 4\text{mm}$ に触れないよう、ご注意ください。

吸引時のピペット目盛設定
<i>Genocel</i> [®] <i>Advance</i> $\phi 4\text{mm}$
12 μl



Genocel[®] 上の
培養液の除去（手順8）

9. 3、4と同様の操作で、所定の量の細胞懸濁液を慎重に滴下します。

細胞懸濁液の保持量
<i>Genocel</i> [®] <i>Advance</i> $\phi 4\text{mm}$
10～12 μl

10. II. *Genocel*[®] *Advance* $\phi 4\text{mm}$ への細胞播種 11～16 の手順に従い培養します。

B. *Genocel*[®] *Advance* $\phi 4\text{mm}$ からの生細胞の回収

Genocel[®] *Advance* $\phi 4\text{mm}$ からの細胞抽出は下記をご参考ください。

1. 培養液を 1000 μl ピペットで吸引します。^{*13}
2. 37°Cに温めた滅菌リン酸緩衝液を培養皿に添加し、37°Cのインキュベーター内で5分間静置します。
3. リン酸緩衝液を 1000 μl ピペットで吸引します。
4. ピンセットで、*Genocel*[®] *Advance* $\phi 4\text{mm}$ の端部を把持し、15 ml 遠心チューブ内に移します。
5. 2.5 g/l-トリプシン/1mmol/l-EDTA 溶液を 1 ml 添加し、*Genocel*[®] *Advance* $\phi 4\text{mm}$ が溶液中に沈んでいることを確認します。
6. 37°C、10分間静置後、ボルテックスで振とうし、ふたたび 37°C、10分間で静置します。
このとき、ゼラチンが崩壊し、溶けていることを確認してください。^{*14}
7. 37°Cに温めた培養液を遠心チューブに 1 ml 追加します。
8. 1000 rpm、3分間、遠心し、細胞を沈殿させ、上清を 1000 μl ピペットで除去します。
9. 500 μl の培養液で再懸濁します。このとき、沈殿物がある場合は、十分にピペッティングしてください。
10. 一部の細胞懸濁液から、トリパンブルーで細胞数測定が可能です。

VI. 注释

- *1. 6 ウェルプレートを用いて膨潤させる場合は、1 ウェルあたり 5~6 個まで、同時に膨潤させることができます。
- *2. この濃度であれば、播種直後から足場の表層および内部に高密度に細胞が留まるため、非増殖性の細胞においても 3 次元培養が可能です。
- *3. リン酸緩衝液の除去時に、アスピレーティングピペットを用いると、**Genocel® Advance ϕ 4mm** が誤吸引されることや、過剰に水分を吸引し、乾燥することがありますので、推奨いたしません。
過剰に水分を吸引した場合、**Genocel® Advance ϕ 4mm** をウェルプレートに接着した後と、培地滴下後に **Genocel® Advance ϕ 4mm** が浮遊し細胞が **Genocel® Advance ϕ 4mm** から脱落するなど、失敗の可能性が高くなりますのでご注意ください。



- *4. 白濁が確認しにくい場合は黒い卓上にてご確認ください。(下記写真：黒い卓上で確認した場合)
- *5. 24 ウェル、48 ウェルの細胞接着処理未処理のウェルプレートでは、視野の確保および、操作が難しくなるため、推奨いたしません。
- *6. 破れている場合は、細胞が脱落し、播種効率が下がります。
- *7. チップの先端を固定することで、安定して **Genocel® Advance** $\phi 4\text{mm}$ に細胞懸濁液の滴下できます。
- *8. **Genocel® Advance** $\phi 4\text{mm}$ に添加する細胞懸濁液量は、10 μl まで減らすことができますが、細胞が **Genocel® Advance** $\phi 4\text{mm}$ の中心部に集中します。
- *9. HEK293 細胞を用いた場合、培養時間 3 時間と 6 時間で大きな差がないことを確認しております。
- *10. 播種翌日にも反転が可能です。が、細胞接着が弱く、脱落が見られます。
- *11. ピンセットで把持した部位は、細胞が一部脱落します。
- *12. ウェル内の培養液を 500 μl に減らすことで、顕微鏡観察時 **Genocel® Advance** $\phi 4\text{mm}$ の移動を抑制することができます。
- *13. このとき、**Genocel® Advance** $\phi 4\text{mm}$ をピペットで吸引しないよう、ご注意ください。
- *14. 1 週間以上培養を行った **Genocel® Advance** $\phi 4\text{mm}$ は、溶解しきらないことがございます。

《本製品が使用されている論文》

1. Nakamura, K.; Saotome, T.; Shimada, N.; Matsuno, K.; Tabata, Y., *Tissue Engineering Part C*, **2019**, 25, 344-352
2. Matsuno, K.; Saotome, T.; Shimada, N.; Nakamura, K.; Tabata, Y., *Regenerative Therapy*, **2020**, 14, 160-164 * Open access
3. Saotome, T.; Shimada, N.; Matsuno, K.; Nakamura, K.; Tabata, Y., *Regenerative Therapy*, **2021**, 18, 418-429 * Open access

* 全ての播種方法、培養を保証するものではありません。

■お問い合わせ

株式会社 京都医療設計

〒607-8035 京都市山科区四ノ宮神田町 4 番地 古橋山科ビル

TEL.(075)594-5595 FAX.(075)594-7858

nrdc@nikke.co.jp

Genocel® Advance ϕ 4mm Q&A

1. *Genocel*® Advance ϕ 4mm の原材料、基礎特性について

【Q-01】原材料は何ですか？

- ・材料は牛骨由来ゼラチンと水のみです。架橋剤は使っていません。

【Q-02】動物成分は入っていますか？

- ・牛骨由来のゼラチンを使用しております。ゼラチンはアルカリ、高温処理で抽出、精製されており、高度精製品に分類されるため、厚労省の生物由来原料基準の対象外となっています。

【Q-03】細胞毒性はありますか？

- ・コロニー形成阻害試験で陰性であり、細胞毒性作用なしとなっております。

【Q-04】分解期間はどのくらいですか？

- ・細胞なしの液体培地中で、55 日以上、形状維持することを確認しております。細胞培養により、細胞が増えてくると細胞が産生する分解酵素（マトリクスメタロプロテアーゼ：MMP）で分解されていくと考えられます。

2. 膨潤、細胞播種、培養について

【Q-05】膨潤したサンプルを再使用できますか？

- ・1 度膨潤させたサンプルは、使い切りとしてください。膨潤後の再使用は推奨いたしません。

【Q-06】開封後、再滅菌することはできますか？

- ・再滅菌後の物性等について保証いたしかねますので、再滅菌はできません。

【Q-07】どのような細胞で培養可能ですか？

- ・ヒト間葉系幹細胞（hMSC）、マウス線維芽細胞（MC3T3-E1、3T3-L1、L929）、マウス間葉系幹細胞様細胞（KUM6）、ラット骨髄より採取した MSC、ヒト乳腺上皮細胞（EpH4V）、ヒト胎児腎細胞（HEK293）、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞、ヒト脂肪由来幹細胞（ADSC）、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）、チャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞（V79）、HeLa 細胞での培養を確認しております。

EpH4V、HUVEC では *Genocel*® Advance ϕ 4mm との接着性は他の細胞と比較して低い傾向があります。接着性が低い場合には、フィブロネクチンコーティングを行うことで、細胞接着性が改善する可能性があります。

（例）1mg/ml フィブロネクチン溶液を、リン酸緩衝液または液体培地中に 1/100 となるように添加してコーティング溶液を作製し、膨潤後の *Genocel*® Advance ϕ 4mm をコーティング溶液中に浸漬、37°C で 1~2 時間静置します。その後、*Genocel*® Advance ϕ 4mm からフィブロネクチン溶液を除去し、取扱説明書 II-5 の手順から進めてください。

3. 観察・評価方法について

【Q-08】培養中の細胞の観察方法は？

- ・明視野、蛍光とも、ディッシュやウェルプレート内で培養中の足場表面を観察可能です。培養液中あるいは、PBS 中で観察してください。尚、明視野観察では、細胞が足場内部まで密に増殖すると、透明性がなくなるため、観察しにくくなります。位相差顕微鏡でも観察可能です。

【Q-09】培養後に切片作製が可能ですか。組織染色に推奨なプロトコルはありますか？

- ・切片作製が可能です。パラフィン切片または凍結切片作製が可能です。凍結切片作製では、凍結包埋し、5 - 15 μ m 厚で切片を作製してください。封入なしもしくは非水溶性封入剤でも観察可能ですが、水溶性封入剤で封入する方が、より膨潤状態に近い状態での観察像が得られます。詳細なプロトコルをご希望の場合は、お問い合わせください。

【Q-10】 *Genocel*® *Advance* ϕ 4mm から細胞を分離できますか？

- ・トリプシン EDTA 溶液または、コラゲナーゼ/PBS+溶液に投入し、37°Cでインキュベートすることで、ゼラチン成分を溶かすことができます。トリプシン EDTA 溶液は、細胞をはがすために一般的に使われている濃度のものをご使用いただけます。トリプシン EDTA 溶液をご使用される場合は、分離後に培地を添加し、反応を止めてください。コラゲナーゼについては、適切な濃度をご検討ください。処理前に *Genocel*® *Advance* ϕ 4mm を細断するか、積極的に攪拌を行うことで、細胞とゼラチンの分離を促進することが可能です。また必要により、上清を除去した後に、PBS で再懸濁することで、洗浄を行ってください。

4. *Genocel*® *Advance* ϕ 4mm のカスタマイズについて

【Q-11】分解期間をコントロールできますか？

- ・お問い合わせください。

【Q-12】密度や孔径の異なる *Genocel*® *Advance* ϕ 4mm を製造できますか？

- ・お問い合わせください。

【Q-13】現行サイズ以外の大きさの *Genocel*® *Advance* ϕ 4mm を製造できますか？

- ・受注対応となります。お問い合わせください。

5. 応用について

【Q-14】臨床に使用できますか？

- ・本品は、研究用として製造しております。臨床用途には使用できません。

■お問い合わせ

株式会社 京都医療設計

〒607-8035 京都市山科区四ノ宮神田町 4 番地 古橋山科ビル

TEL.(075)594-5595 FAX.(075)594-7858

nrdc@nikke.co.jp