



肝細胞 3次元培養プレート
取扱説明書

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®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。

(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 ウェルプレート、12 ウェルプレート、24 ウェルプレート、384 ウェルプレート

- ・ 培地(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。生存率が70%を下回る場合は、期待した測定結果が得られない場合があります。生存率が低い場合はパーコール処理などで生存率を上げた後、播種して下さい。

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)、遠沈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)。

- ・フィーダー細胞培養用培地
- ・肝細胞スフェロイド培養用培地 (RM-101)

6. Cell-able®プレート保存条件

- ・培養用パターンプレート ; 2-8°C保存
- ・培地 ; -80°C保存、融解後は4°C保存し2週間以内にお使いください。

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

フィーダー細胞はCell-able®プレートに播種する1週間前に、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。Cell-able®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

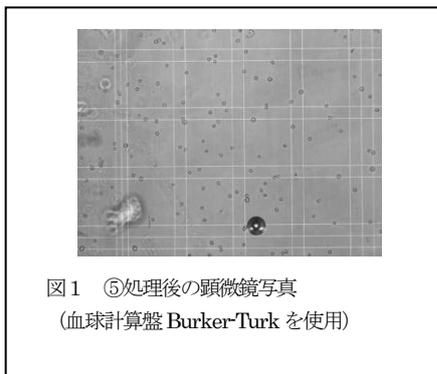
- ①フィーダー細胞を培養したシャーレから培地を取り除き、PBS(-)で2回洗います。
- ②トリプシン EDTA 溶液 (2×濃度) 2~3ml をシャーレに加え、37°Cのインキュベータ内で5分間静置します。
- ③フィーダー細胞培養用培地 2ml をシャーレに加え、ピペッティングにて細胞をばらばらにし、遠沈管に移します。
- ④ 160×g, 3分間遠心し、上清を吸引除去してください。

- 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。
- 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 μl /well、24 ウェルプレート：500 μl /well、12 ウェルプレート：1000 μl /well、384 ウェルプレート：40 μl /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凍結肝細胞のメーカープロトコルにしたがって肝細胞を融解し、肝細胞を用意します。
(Cell-able®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。

(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 : 100μl/well、24 ウェルプレート : 500μl/well、12 ウェルプレート : 1000μl/well、384 ウェルプレート : 40μl/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。

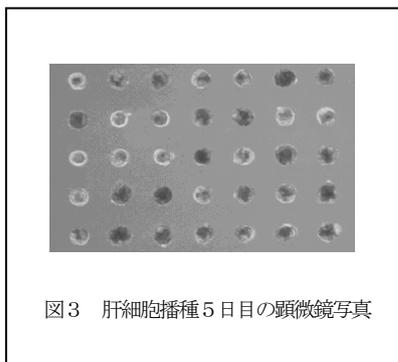
(4×10^4 個/well/ 96well plate、 1×10^4 個/well/24well plate、 4×10^5 個/well/ 12well plate、8,000 個/well/384well plate)

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。)

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。代謝物の蓄積などのために培地交換ができない場合、7日間までは培地交換なしで培養可能です。



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

してしまうことがあります。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、培地交換の際には古い培地を3割程度残し、細胞の乾燥を避けるようご注意ください。

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。

お問い合わせ先

 **住友ベークライト株式会社**

S-バイオ事業部 

E-mail : s-bio@sumibe.co.jp

TEL : 03-5462-4831, FAX: 03-5462-4835

製造元：東洋合成工業株式会社 
〒111-0053 東京都台東区浅草橋1-22-16
ヒューリック浅草橋ビル8階
Tel 03 (5822) 6186, Fax 03 (5822) 6187
Email cell-able@toyogosei.co.jp
URL: www.toyogosei.co.jp

販売元：  住友ベークライト株式会社
S-バイオ事業部 マーケティング・営業部
〒140-0002 東京都品川区東品川2-5-8 天王洲パークサイドビル
Tel: 03 (5462) 4831, Fax: 03 (5462) 4835
E-mail : s-bio@sumibe.co.jp
URL : www.sumibe.co.jp/product/s-bio/