

VIVANT-CELL[®]-Pot

catalog # : VIV-5-P12

ユーザーマニュアル



ネッパジーン株式会社

〒 272-0114 千葉県市川市塩焼 3-1-6
TEL: 047-306-7222, FAX: 047-306-7333
E-mail: info@nepagene.jp
URL: <http://www.nepagene.jp>

Table of Contents

はじめに	P3
VIVANT-CELL®-Pot 概要	P3
保管条件	P3
品質保証	P3
細胞膜分取原理	P4
VIVANT-CELL®-Pot 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®-Pot の準備 3. 細胞の添加 4. 細胞分取の終了	P6
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¹⁾²⁾。

VIVANT-CELL®-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®-Pot を培養用マルチウェルプレートと合わせて使用することで、遊走能を利用して機能性の高い細胞を分離し、そのまま培養を行う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®-Pot 概要

孔径： $8\mu\text{m}$

開孔密度： 1×10^5 pores / cm^2

膜厚： $17\mu\text{m}$

膜面積： 78.5mm^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

保管条件

直射日光の当たる場所は避け、常温で保管して下さい。

品質保証

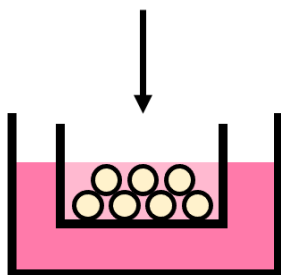
- ・使用期限内にご使用下さい。
- ・ディスプレイ製品です。再使用はお控え下さい。
- ・改造や分解を行われた場合、製品の品質および性能は保証されません。

※本製品は研究用です。臨床用途には使用できません。

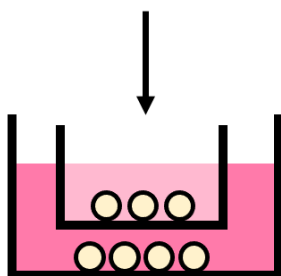
細胞膜分取原理



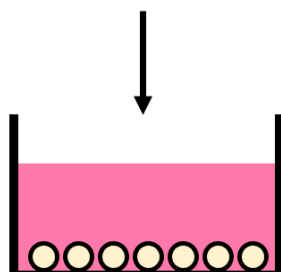
遊走因子等を含む遊走培地を 12 ウェルプレートに準備して下さい。



プレートに VIVANT-CELL®-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。

VIVANT-CELL®-Pot 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

- ・細胞培養用 12 ウェルプレート (以下のプレートに対応)
 - Falcon® セルカルチャー 12 ウェル マルチウェルプレート 平底 (#353043)
 - Costar® マルチプルウェルプレート 12 ウェル 平底 (#3513)
 - CELLSTAR® 細胞培養マルチウェルプレート, 12 ウェル, TC (#665180)
- ・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
- ・細胞分散試薬
- ・PBS

機器

- ・CO₂ 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^{（注1）}。
 - 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^{（注2）}。
 - 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トし、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/ $300 \mu\text{L}$ /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[®]-Pot を準備します。
 - a. 遊走培地^{（注3）}を、12 ウェルプレートに 1 ウェル当たり 2.0mL ずつ加えて下さい。
 - b. VIVANT-CELL[®]-Pot の滅菌袋を開封します。ピンセットを使用して VIVANT-CELL[®]-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[®]-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[®]-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 $300 \mu\text{L}$ 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_2 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、プレートから VIVANT-CELL[®]-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。

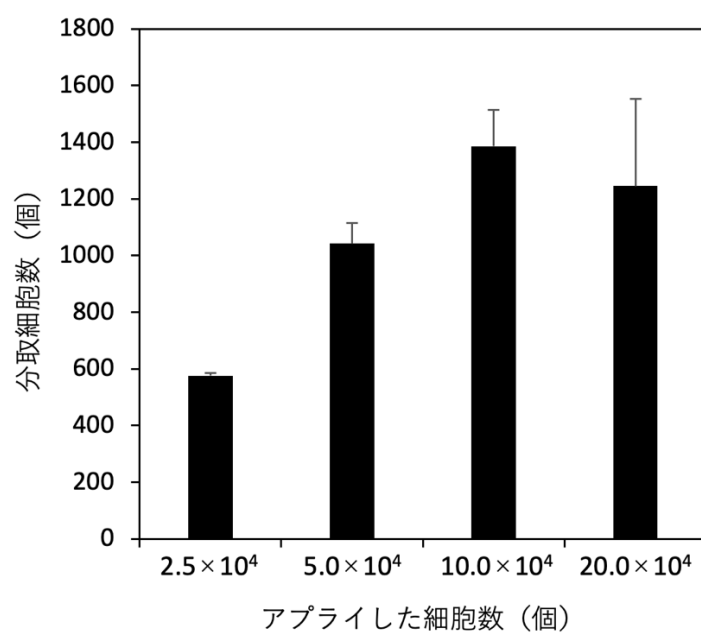
注2：適切な培養細胞の密度は実験系により異なります。適宜ご検討ください。

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 α (SDF1 α) あるいは牛胎児血清 (FBS) 等を用いた報告があります。

使用例

VIVANT-CELL®-Pot を使用して、SDF1 α を含む遊走培地（DMEM, 10%FBS, 100ng/ml SDF1 α ）による初代歯髄幹細胞（Lonza hDPSC-歯髄幹細胞（#PT-5025））の遊走膜分取を行った。VIVANT-CELL®-Pot にアプライした細胞数に依存して、得られた分取細胞数が変化した。



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を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®-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。

- ・取扱説明書は製品の改良や仕様変更および取扱説明書改善のため、予告なく変更することがあります。
- ・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。
- ・本製品は他社製品の性能または使用につきましては対応しておりません。
- ・本書に記載されたデータの使用に起因する、第三者の特許権およびその他の権利の侵害については、弊社では責任を負いかねますのでご了承ください。



ネッパジーン株式会社