

Genocel® (パウダータイプ) 取扱説明書

<製品の特長>

- ・ゼラチンのみで構成されたマイクロ纖維の足場材です。
- ・細胞凝集体(スフェロイドや細胞シート)の作製時に細胞と一緒に播種することで、パウダーが凝集体内に取り込まれます。
- ・スフェロイドのサイズ増大や、細胞活性の向上を行うことができます。
- ・細胞シート剥離時の収縮を抑制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 γ 線滅菌済みです。再滅菌、再使用はできません。

<使用条件>

- 本製品は医療機器ではなく、研究用です。臨床用には使用できません。

<開封前に>

- 本品は外袋、チューブの二重包装です。外袋の開封前に破れ等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®* が飛び出さないよう、チューブ内壁のパウダーを振り落とした後、静かに開封してください。

<細胞との混合前に>

- 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。細胞濃度とパウダー添加量を変え、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>

- スフェロイド形成…ヒト間葉系幹細胞(hMSC)、マウス線維芽細胞(MC3T3-E1)、マウス間葉系幹細胞様細胞(KUM6)
- 細胞シート形成…ヒト間葉系幹細胞(hMSC)、マウス線維芽細胞(MC3T3-E1)



株式会社ニッケ・メディカル

〒541-0048 大阪市中央区瓦町3丁目3-10 TEL 06-6205-6651

«*Genocel*® パウダーを用いたスフェロイドの作製»(実験例)

使用材料

- I. 細胞 マウス線維芽細胞 (MC3T3-E1)
- II. 培地 MEM-α (FBS 10%, ペニシリン・ストレプトマイシン 1%)
- III. 試薬 *Genocel*®パウダー、ポリビニルアルコール (PVA : 例として日本酢ビ・ポバール社製JP-18、VP-18)
- IV. 機材 精密天秤、ミクロスパーテル、チューブ、(マイクロチューブやコニカルチューブ)
U底 96 well プレート、オートクレーブ

スフェロイド作製手順

I. 96 well プレートの細胞非接着コート処理

1. PVA を蒸留水に溶かし、1 wt% PVA 水溶液を調製します。
2. PVA 水溶液をオートクレーブで滅菌します。未溶解の PVA はオートクレーブすることで溶解します。
3. 96 well プレートに PVA 水溶液を 1 well 当たり 0.2 ml 加えて 37°Cで一晩インキュベートします。
4. 96 well プレートから PVA 水溶液を除去し、常温の PBS で 1 回洗浄します。
5. 常温の PBS を 0.2 ml 加えて細胞播種まで静置します。コート処理した 96 well プレートはその日のうちに細胞播種に使用してください。

*細胞非接着性の well プレートを用いる場合、この操作は必要ありません。

例として Corning®製スフェロイドマイクロプレート 96 well、住友ベークライト製 PrimeSurface®96U で、PVA コート無しでスフェロイド形成を確認しています。一方で、一般的な浮遊培養用 96 well プレートではスフェロイドは形成しませんでしたので、PVA などのコーティングが必要です。

*マイクロパターニングされた well プレートは、パウダーがマイクロパターンに入らないため使用できません。

II. パウダーの分取

1. 滅菌済みのチューブ (マイクロチューブやコニカルチューブ) の重量を測定し記録します。
 2. 清潔操作でミクロスパーテルを用いてパウダーをパウダー容器からチューブに取り分けます。
 3. パウダーを入れたチューブの重量を測定し、取り分けたパウダーの重量を記録します。
- *パウダーは静電気を帯びやすいです。帯電防止チューブ (イナ・オプティカ製 AS-0150R など) や帯電防止スパーテル (イナ・オプティカ製 AS-1800S など) を用いると、チューブへの付着が抑えられ作業性が向上します。
- *クリーンベンチの風によって飛ばないよう注意ください。

III. パウダー懸濁液の作製

1. 0.1 mg/ml (乾燥時重量 [mg]/培地量 [ml]) の懸濁液を用意するため以下の作業を行います。
 2. パウダーを入れたチューブに培地を加えます。
 3. ピペットティングによってパウダーを懸濁させます。
 4. 必要であればパウダー懸濁液を別のチューブに取り分けて、希釀します。懸濁液中のパウダーは沈降しやすいため、転倒混和やピペットティングによってよく混ぜた後、取り分けて下さい。
- *パウダー懸濁液用のピペットチップは 200 µl 以上のものを推奨します。20 µl などの小容量や、先細のチップの場合、パウダーが破断する恐れがあります。
- *パウダー懸濁液は冷蔵や冷凍で保存せず、使いきりとしてください。

IV. スフェロイドの作製

1. I.5で用意した96 wellプレートに入っているPBSを除去します。
2. 細胞懸濁液 $1\times 10^5\text{ cell/ml}$ を 0.1 ml ずつwellに播種します($1\times 10^4\text{ cells/well}$)。
3. パウダー懸濁液 0.1 mg/ml を 0.1 ml ずつwellに添加します(0.01 mg/well)。
- 添加量が実験例の写真と同程度であることを確認してください。
4. 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ でインキュベートします。適宜形成過程を観察します。

実験例のMC3T3-E1の場合、2日間でスフェロイドが形成しました。

5. 培地交換は2日に1回、半量交換で行ってください。

*半量交換：培地量を 0.2 ml とした場合、スフェロイドを吸引しないようにwellの上層の培地 0.1 ml を静かに除去し、新しい培地 0.1 ml を加えてください。

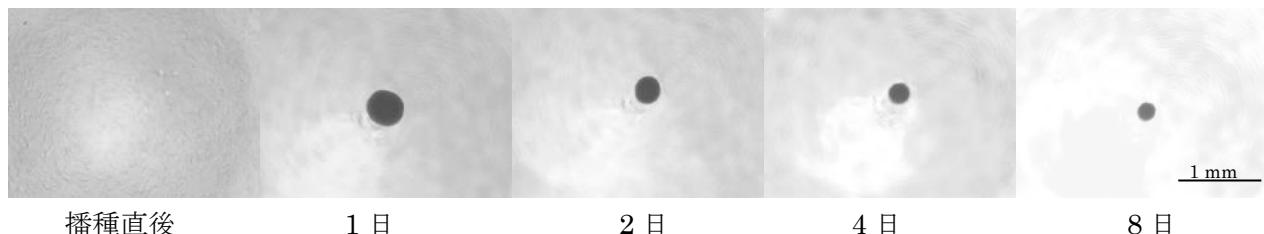
*マルチチャンネルピペットとリザーバーを用いる場合は、ピペッティングによってパウダー懸濁液をよく混ぜてからピペットチップに吸い上げてください。

V. スフェロイドの回収

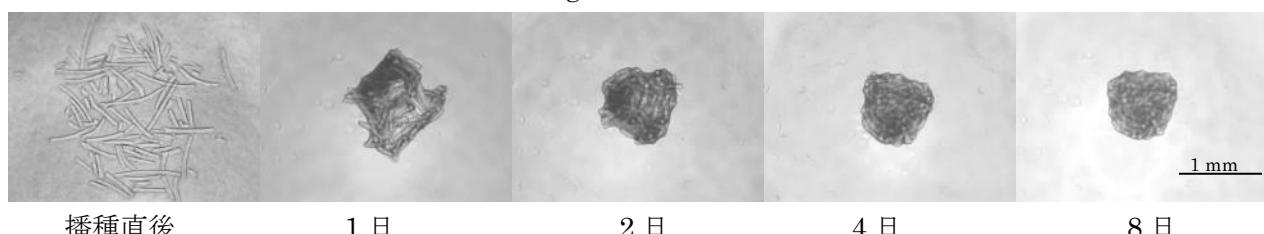
1. 顕微鏡でスフェロイドの直径を確認します。
2. スフェロイドの直径より大きな開口径のピペットチップを使用して、ピペットの吸引によって回収します。

スフェロイド形成例

○細胞数 $1\times 10^4\text{ cells/well}$ 、パウダーなし

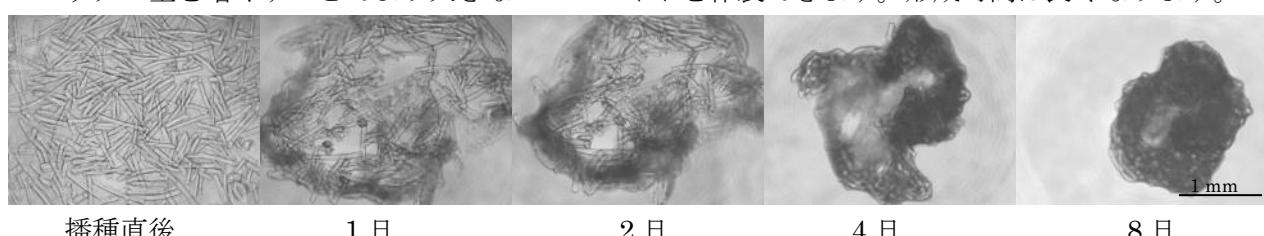


○細胞数 $1\times 10^4\text{ cells/well}$ 、パウダー 0.01 mg/well



○細胞数 $1\times 10^4\text{ cells/well}$ 、パウダー 0.07 mg/well

パウダー量を増やすことでより大きなスフェロイドを作製できます。形成時間は長くなります。



«*Genocel*® パウダーを用いた細胞シートの作製»(実験例)

細胞シートの収縮抑制の例

細胞シートは培養皿から剥離する際に、その直径が収縮することが知られています。本例ではパウダーを添加して作製した細胞シートを培養皿から剥離させました。図1は剥離した細胞シートをピペットで広げて、培地を除去した際の写真です。24 well プレートでは添加量 0.2 mg/well 以上で、細胞シートの収縮が有意に抑制されました。また、パウダー無しの細胞シートは PBS 中で丸まったのに対して、パウダー有りの細胞シートはシート形状を維持しました(図2)。

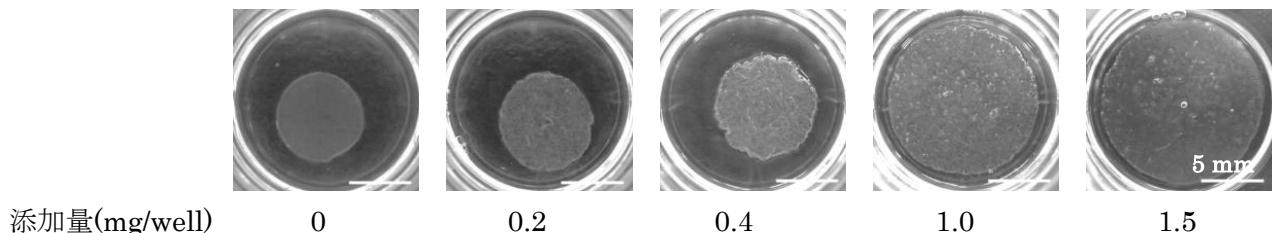


図1 パウダー添加による細胞シート収縮抑制の実験例 (24 well プレート)

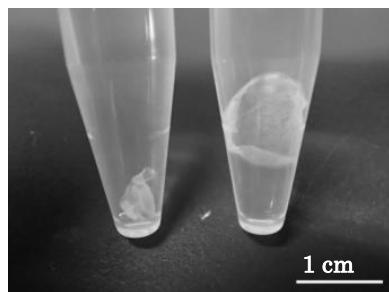


図2 パウダー添加した細胞シートの PBS 中での形態 (24 well プレート)

<参考文献>

K. Nakamura, K. Nobutani, N. Shimada, Y. Tabata,
Gelatin hydrogel-fragmented fibers suppress shrinkage of
cell sheet, Tissue Engineering C, 26 (2020) 216-224

使用材料

- I. 細胞 マウス線維芽細胞 (MC3T3-E1)
- II. 培地 MEM- α (FBS 10%, ペニシリノ-ストレプトマイシン 1%)
- III. 試薬 *Genocel*® パウダー、L-アスコルビン酸りん酸エステルマグネシウム (ビタミン C) 水溶液 10 mM
- IV. 機材 精密天秤、ミクロスパーテル、チューブ (マイクロチューブやコニカルチューブ)、
温度感応性培養皿 well プレート (CellSeed 製 UpCell® および DIC 製 Cepallet® で確認済)
もしくは接着細胞用培養皿 24 well プレート、ボルテックスミキサー・ジェニー2

細胞シートの作製手順

I. パウダーの分取

1. 清潔な操作台で滅菌済みのチューブ (マイクロチューブやコニカルチューブ) の重量を測定し記録します。
2. 清潔操作でミクロスパーテルを用いてパウダーをパウダー容器からチューブに取り分けます。
3. パウダーを入れたチューブの重量を測定し、取り分けたパウダーの重量を記録します。

*パウダーは静電気を帯びやすいです。帯電防止チューブ (イナ・オプティカ製 AS-0150R など) や帯電防止スパーテル (イナ・オプティカ製 AS-1800S など) を用いると、チューブへの付着が抑えられ作業性が向上します。

*クリーンベンチの風によって飛ばないよう注意ください。

II. パウダー懸濁液の作製

1. パウダー懸濁液の濃度の目安は $1\text{-}4 \text{ mg/ml}$ (乾燥重量 (mg) / 培地量 (ml)) です。
実験例では 2 mg/ml を使用しました。
2. パウダーを入れたチューブに培地を加えます。
3. ピペッティングによってパウダーを懸濁させます。
4. 必要であればパウダー懸濁液を別のチューブに取り分けて希釈します。懸濁液中のパウダーは沈降しやすいため、転倒混和やピペッティングによってよく混ぜた後、取り分けて下さい。
*パウダー懸濁液用のピペットチップは $200 \mu\text{l}$ 以上のものを推奨します。 $20 \mu\text{l}$ などの小容量や、先細のチップの場合、パウダーが破断する恐れがあります。
- *パウダー懸濁液は冷蔵や冷凍で保存せず、使いきりとしてください。

III. 細胞シートの作製

1. パウダー懸濁液を以下の量を目安として添加してください。初回実験時にパウダー添加量を数段階変えて細胞シートを作製し、収縮抑制に適正な添加量をご検討ください。

実験例では 24 well プレートに $0.2\text{-}1.5 \text{ mg/well}$ で添加しました。

表 1 well プレートごとのパウダー添加量、細胞播種量、培地量の目安

well 数	パウダー添加量 (mg/well)	細胞播種量 (cells/well)	培地量 (ml)
6	1-7.5	5×10^5	2
12	0.4-3	2×10^5	1
24	0.2-1.5	1×10^5	0.5
48	0.1-0.75	0.5×10^5	0.2

2. well の培地量を表 1 の培地量以下となるように調整してください。余分な培地を除去する場合は、パウダーを沈降させるため約 2 分静置させた後、静かに上清を吸引してください。

3. 終濃度が $100 \mu\text{M}$ となるように 10 mM ビタミン C 水溶液を添加します (培地量 1 ml の場合、 $10 \mu\text{l}$ 添加)。ビタミン C は細胞シートの形成を早めるために加えています。

4. 細胞を well に播種します。実験例では $1 \times 10^5 \text{ cells}$ ($2 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ を $50 \mu\text{l}$) 播種しました。次のボルテックスの作業のため、最終的な培地量は表 1 を超えないようにしてください。

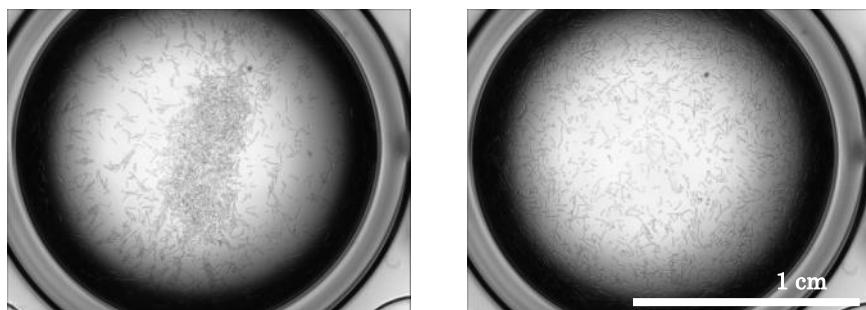
5. well プレートを強さ 3 で設定したボルテックスを用いて 2~3 秒振盪します。図 3 のように well プレート底面の端をボルテックスのゴムの端に載せるようにします。それ以上の強さや、培地量が多いと振盪の際に培地が well プレートの蓋に付着してしまいます。

ボルテックスが無い場合は、well プレートを手で前後、左右に数回振盪してください。旋回するとパウダーが well の中心に集まり逆効果です。



図 3 ボルテックスによる well プレートの振盪

6. 顕微鏡でパウダーが well 内で分散したことを確認します（図 4）。well プレートを揺らすとパウダーが動いてしまうため、顕微鏡まで静かに運んでください。



パウダーが偏った状態

パウダーが分散した状態

図 4 振盪前後でのパウダーの分布（24 well プレート）

7. 37°C、5%CO₂でインキュベートします。

well プレートを静かにインキュベータまで運びます。パウダーは、培養 1~2 日で細胞によって well プレートに固定され、振盪や培地交換によっても動かなくなります。パウダーが動かなくなったのを確認した後、培地交換を 2 日に 1 回行ってください。10 mM ビタミン C 水溶液も終濃度 100 μM となるように添加してください。

実験例の MC3T3-E1 の場合、5 日間で細胞シートが形成しました。

8. 細胞シートを培養皿から剥離します。

剥離は温度感応性培養皿（CellSeed 製 UpCell® や DIC 製 Cepallet®）のプロトコルに従ってください。

通常の培養皿の場合は、細胞シートの縁にピペットで培地の液流を当てるようにして剥離してください。

9. 剥離した細胞シートをさらに培養する場合は、広口のピペット（25 ml ディスポピペットなど）や先端を切った 1000 μl チップで細胞シートと培地を吸い上げた後、新しい培養皿に移してください。細胞シートを広げて、培地が無い状態で 37°C、5%CO₂で 1 時間インキュベートすると細胞シートが培養皿に接着します。その後、培地を加えて培養を行ってください。

Genocel® パウダータイプ Q & A

1. *Genocel®* 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產生する分解酵素（マトリクスマタロプロテアーゼ：MMP）で分解されていくと考えられます。

【Q-05】パウダーのサイズはどの程度ですか。

・膨潤時の纖維径は約 50 μm、纖維長は 200～300 μm を平均として分布があります。

2. 膨潤、培養について

【Q-06】膨潤したサンプルを乾燥して再使用できますか？

・一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-07】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-08】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)、マウス間葉系幹細胞様細胞(KUM6)での培養を確認しております。

3. パウダーのハンドリングについて

【Q-09】乾燥したパウダーを分取するとき、静電気でチューブやスパーテルにくっつきます。

・帯電防止チューブ（イナ・オプティカ製 AS-0150R など）、帯電防止型スパーテル（イナ・オプティカ製 AS-1800S など）を使用するとチューブやスパーテルへのパウダーの付着が抑えられます。製品用のチューブは帯電防止チューブを使用しています。



【Q-10】パウダーを懸濁する際に、ピペットチップやチューブにパウダーが付着します。

・水、PBS、無血清培地で懸濁するとピペットチップやマイクロチューブに付着します。血清入り培地（目安として血清 1%以上）で懸濁させることで付着が抑えられます。血清入り培地を使用できない場合は、血清入り培地や牛血清アルブミン水溶液（目安として 0.5%以上）でピペットチップやチューブを数回リーンスしてください。付着が抑えられます。

4. スフェロイド培養について

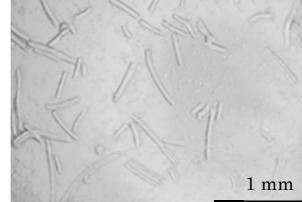
【Q-11】どのような方法でスフェロイドを作製しますか。

・細胞非接着性の U 底の 96 ウエルプレートを用いて作製します。例として Corning® スフェロイドマイクロプレート 96 well、住友ベークライト PrimeSurface® 96U でのスフェロイド形成を確認しています。一方で、一般的な浮遊培養用 96 ウエルプレートではスフェロイドは形成しませんでした。そのようなウェルプレートの場合、PVA のコーティングが必要です。また、マイクロパターンニングの培養皿は、マイクロパターンにパウダーが入らないため、使用できません。

【Q-12】ウェルプレートに加えたパウダーがウェルの U 底に沈降しません。パウダーがウェルの側面に付着します。

・PVA コートしたウェルプレートや、超低接着がうたわれているウェルプレートの場合、ウェルの U 底にパウダーが沈降することを確認しています（例として Corning® スフェロイドマイクロプレート 96 well、住友ベークライト PrimeSurface® 96U）。一方で、一般的な浮遊培養用 96 ウエルプレートではパウダーがウェルの側面に付着し、沈降しませんでした。そのようなウェルプレートの場合、PVA のコーティングが必要です。

・パウダーをタンパク質でコートすると沈降に影響を与えることがあります。例えば、フィプロネクチンコートによって沈降性がやや低下しました。

	PVA コートしたウェルや超低接着ウェルプレート	浮遊培養用ウェルプレート
顕微鏡像	 A microscopic image showing a cluster of small, light-colored, elongated particles (PVA-coated) at the bottom of a well. A scale bar is visible at the bottom.	 A microscopic image showing a similar cluster of particles, but they appear to be more widely distributed and some are attached to the vertical walls of the well. A scale bar is visible at the bottom.
側面から見た模式図	 A schematic diagram showing a U-shaped well containing three blue spheres at the bottom. The text below it reads "底に沈降" (Settling at the bottom).	 A schematic diagram showing a U-shaped well containing three blue spheres attached to the inner curved wall. The text below it reads "側面に付着" (Attached to the side wall).

【Q-13】96 ウエルプレートからスフェロイドを回収できますか。

- ・マイクロピペットを用いて回収できます。その際、スフェロイドのサイズより大きな開口径のピペットチップをご使用ください。
3T3-E1 細胞の例では、ピッティングを行ってもスフェロイドが崩壊しないことを確認しています。

【Q-14】スフェロイドのサイズはどのようにコントロールできますか。

細胞播種密度と、パウダーの添加量を変えることで形成されるスフェロイドのサイズをコントロール可能です。傾向としては、パウダーの添加量を多くするとスフェロイドのサイズが大きくなる、もしくは疎なスフェロイドが形成します。加えてパウダーの添加量を多くするとスフェロイドの形成時間が長くなります。

【Q-15】どのように培地交換をしますか。

- ・培地の半量交換をお勧めします。例えば、96 ウエルプレートで 1 ウエルあたり 200 μL の培地で培養した場合、100 μL の培地を吸引し、100 μL の新しい培地を添加します。そのときスフェロイドの吸引や崩壊を防ぐために、培地交換はウェルの中心を避け、ウェルの端を使って培地の吸引と添加をお勧めします。

5. 観察・評価方法について

【Q-16】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。凍結包埋し、5 – 15 μm 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の場合は脱水によってパウダーが収縮した像が観察されます。水溶性封入剤で封入すると、パウダーの膨潤状態に近い状態で観察できます。

【Q-17】*Genocel* ® 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。処理中にピッティングや、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。

6. *Genocel* ® のカスタマイズについて

【Q-18】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-19】繊維径や繊維長の異なる *Genocel* ® を製造できますか？

- ・お問い合わせください。

7. 応用について

【Q-20】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。