20200405S005

Genocel®（シートタイプ） 取扱説明書

＜製品の特長＞

・ゼラチンのみで構成された、不織布状の繊維足場材です。
・特殊な繊維構造を持つため、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ができます。
・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。
・細胞シートを確実・簡単に回収できる支持体です。そのまま積層体の足場にもなるハイブリッドな材料です。
・細胞培養足場材としても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 EOG 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*®は、35mm ディッシュ内に入れた状態で、包装されています。
パッケージ開封時に、35mm ディッシュの蓋がはずれ、*Genocel*®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＞

□ 容器のディッシュは培養に使用できませんが、膨潤には使用いただけます。
Well プレートに移して膨潤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。

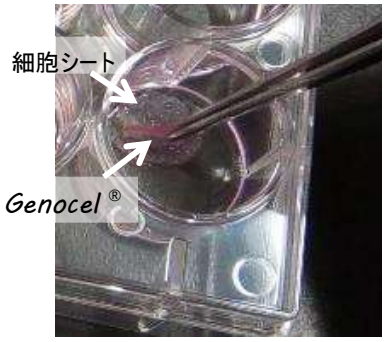
＜培養実績のある細胞種＞

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）での培養を確認しております。EpH4V では *Genocel*® との接着性は他の細胞と比較して低い傾向があります。

NIKKE Group
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

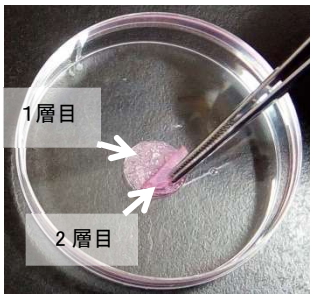
≪hMSC 細胞シートと *Genocel* ® の交互積層方法≫（実験例）

細胞種　：ヒト間葉系幹細胞
細胞数　：$1x10^5$ cells /well　サイズ 12 well
培養日数：約 10 日間（オーバーコンフルエントになるまで）



細胞シートに *Genocel* ® を重ねる(手順5)

細胞シートの回収（手順7）



積層体の作製（手順9）

1. hMSC を 12well プレートに 0.1×10^6 cells /well 播種し、
   オーバーコンフルエントになるまで 10 日間培養します。
2. *Genocel* ® 直径 8 mm タイプを 1 枚当たり 20 μl の培地で膨潤させます。
   膨潤させると直径が約 12 mm になります。
3. 通常の培養皿の場合はピペッティングによる液流などにより、
   または温度感応性培養皿の場合は温度降下により、
   細胞シートを well プレートから剥離します。
4. 培養皿の培地を除去します。
5. 細胞シートに、膨潤させた *Genocel* ® をピンセットで重ねます。
6. 細胞シートと *Genocel* ® の間に気泡がある場合は、
   ピンセットで追い出します。
7. *Genocel* ® の端からピンセットでゆっくりめくり
   細胞シートを well プレートから回収します。
8. *Genocel* ® と細胞シートを、*Genocel* ® を下にして、
   新しい 35 mm ディッシュの上に静置します。
9. 手順 5 – 7 を繰り返して得た *Genocel* ® と細胞シートが
   交互になるように、手順 8 のシートの上に静置します。
10. 積層体を 37℃、 5% CO_2 で 30 分間インキュベートし、細胞シートと
    Genocel ®を接着させます
    ※インキュベートは積層作業後に一括で行います。1 層ごとのインキュベートは不要です。
11. 35 mm ディッシュに培地を 2 ml 加えて積層体を培養します。
    ※撹拌培養、旋回培養などを行う場合は、接着力を向上させるために、
    静置培養を 1 日程度行った後に用いてください。

＊全ての播種方法、培養を保証するものではありません。

≪*Genocel*® シートタイプ 5 ㎜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ことで、*Genocel*®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。

Ⅰ. 必要な消耗品および備品

・*Genocel*® シートタイプ5mm

・20μl ピペット

・1000μl ピペット（*Genocel*®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（※先端極細のピンセットを使用すると *Genocel*®を把持する際に、*Genocel*®が裂ける恐れがあります）

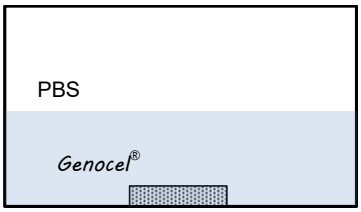
・細胞接着処理未処理 6well プレート （※重要です。細胞接着処理未処理の培養皿を用いることで、細胞懸濁液が *Genocel*®に留まり、播種効率が高くなります。例 IWAKI 浮遊培養用マイクロプレート 1810－006）

・滅菌リン酸緩衝液

・15ml 遠心チューブ

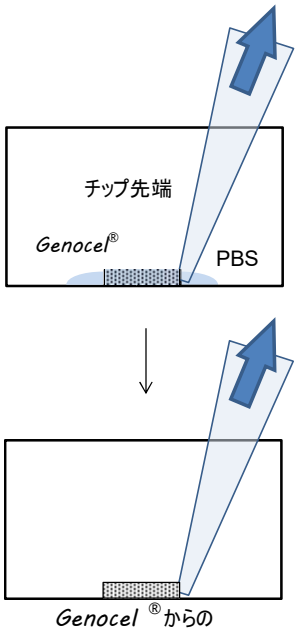
※基本的な細胞培養操作を行う上で必要な備品、消耗品は割愛させていただいております。

Ⅱ. *Genocel*® シートタイプ 5 ㎜への細胞播種



Genocel®の膨潤（手順1）

1. *Genocel*® シートタイプ 5 ㎜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。*1

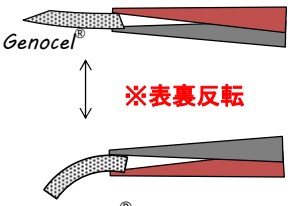


Genocel®からの PBS 除去（手順3、4）

2. 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、15ml 遠心チューブ中で、高濃度の細胞懸濁液（推奨 1.0 x10^7 － 2.0 x10^7 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 x10^6 −2.0 x10^6 cells/ ml を目安としてください。

3. あらかじめ膨潤された *Genocel*® シートタイプ 5 ㎜から、1000 μl ピペットの先端を用いて、リン酸緩衝液を除去します。

4. 1000 μl ピペットの先端を *Genocel*® シートタイプ の端部にあて、水分が吸えなくなるまで、*Genocel*® シートタイプ内部のリン酸緩衝液を吸引し、除去します。*3



Genocel®の反り方向確認（手順5）

5. 滅菌済みのピンセットで、*Genocel*® シートタイプ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*® シートタイプに反りがあるかを確認します。

※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。

新しい細胞接着未処理の

6 well プレート

細胞接着処理未処理の培養皿への

Genocel ®の設置方向（手順 6）

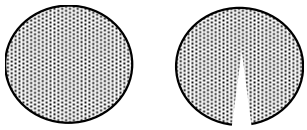
6．反りが見られた際は、凸面が上になるように、

新しい細胞接着処理未処理の 6well プレートの中心に設置してください。*4

反りがみられない場合は、表裏いずれかを上にして設置します。

※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 ®の破れ有無の確認

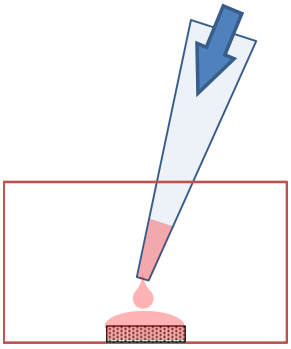
（手順7）

7．設置した *Genocel* ® シートタイプが破れていないことを目視で確認してください。*5

8．*Genocel* ® シートタイプ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 1000μl ピペットで吸引し、

新たな乾燥状態の well に再設置してください。



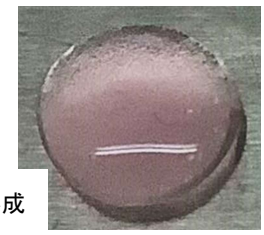
Genocel ®の細胞懸濁液の

滴下（手順9）

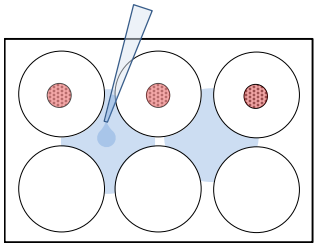
9．20μl のピペットを用い、細胞懸濁液を3－5回ピペッティングした後、細胞懸濁液 20μl を *Genocel* ® シートタイプの中心部に、チップの先端を触れない程度まで近づけて、慎重に滴下します。

滴下後、*Genocel* ® シートタイプの表面にドーム状の液滴が形成されます。*6

※チップの先端で、*Genocel* ® シートタイプに触れないようにご注意ください。



液滴の形成

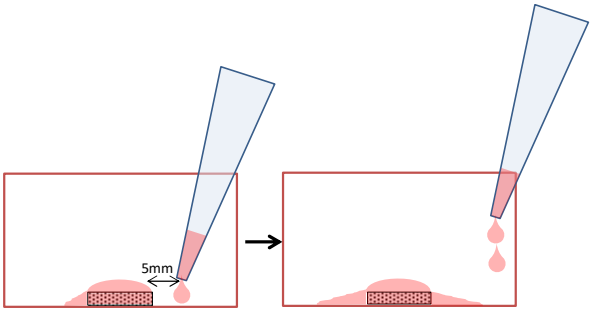


細胞懸濁液の蒸散防止（手順 10）

10．細胞懸濁液の蒸散を防ぐため、well 間の間隙に滅菌リン酸緩衝液、または滅菌水を

2－4ml 添加してください。

11．37℃5%CO_2 のインキュベーターの中で、3 時間静置します。*7



培養液の添加

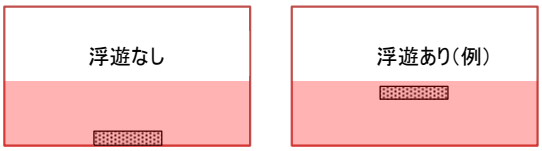
（手順12，13）

12．3時間培養後、1000μl ピペットを用いて、液体培地を添加します。最初の500μl は *Genocel* ® シートタイプの周囲 5 ㎜に数点滴下してください。

培養皿上の液滴が繋がり、*Genocel* ® シートタイプが培養液でおおわれることを確認してください。

13．培養液を追加で1．5－2．5ml添加し、well 内に計2－3mlとしてください。

Genocel ® シートタイプに直接当たらないように添加してください。



培養液添加後の *Genocel*®の浮遊確認(手順14)

14. *Genocel* ® シートタイプが、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。浮遊していると、細胞が脱落し、播種効率が低くなります。

15. Genocel が well 底面に接着した状態で培養します。

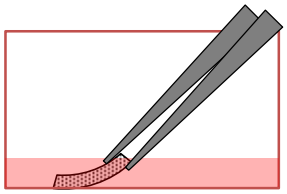
Ⅲ. *Genocel* ® シートタイプ 5 ㎜での3次元培養の維持

16. 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、1000μl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* ® シートタイプにチップの先端があたらないようにしてください。

Ⅳ. *Genocel* ® シートタイプ 5 ㎜の反転および観察



ピンセットを用いた *Genocel* ®の反転(手順17, 18)

17. *Genocel* ® シートタイプの上面に、より多くの細胞が留まります。播種の翌々日以降に、*Genocel* ® シートタイプ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。well 内の培養液を除去して 500μl にし、ピンセットをプレートと *Genocel* ® シートタイプの間に挿入することで、*Genocel* ® シートタイプを浮遊させます。*8

18. *Genocel* ® シートタイプの端部を先端が極細でないピンセットで把持し、上下反転します。*9*10

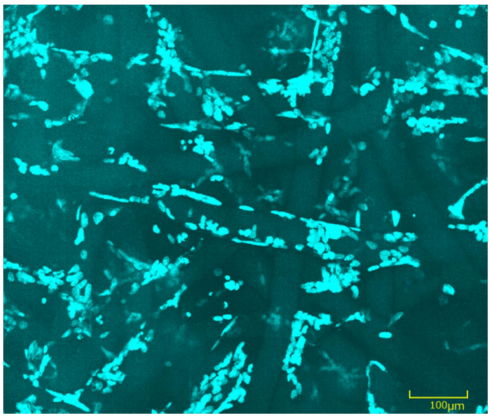
19. 観察後、培養を維持する場合は、培養液を添加し、1well あたりに総量 2－3ml としてください。

<<播種後の細胞分布例>>

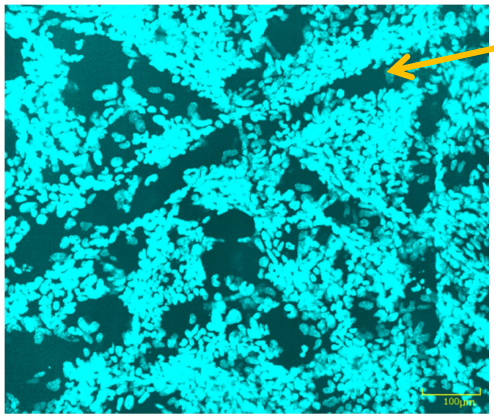
・HEK293 細胞(2.0×10^7 cells/ml, 20μl 播種)、培養 3 日目

・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

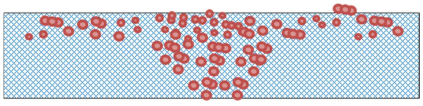


上下反転後 懸濁液滴下面



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. *Genocel* ® シートタイプ からの生細胞の回収

※*Genocel* ® シートタイプ からの細胞抽出をお考えの方は下記をご参考ください。

1. 培養液を1000μlピペットで吸引します。[*11]
2. 37℃に温めた滅菌リン酸緩衝液を、培養皿に添加し、37℃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、1000μlピペットで吸引します。
4. ピンセットで、*Genocel* ® シートタイプの端部を把持し、15ml 遠心チューブ内に移します。
5. 2.5g/L トリプシン/1mmol/L EDTA 溶液を 1ml 添加し、 *Genocel* ® シートタイプが溶液中に沈んでいることを確認します。
6. 37℃10分間静置後、ボルテックスで振とうし、さらに10分間37℃下で静置します。
   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。[*12]
7. 37℃に温めた培養液を遠心チューブに 1ml 追加します。
8. 1000rpm、3分間、遠心し、細胞を沈殿させ、上清を 1000μlピペットで除去します。
9. 500μl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。

[*1] 6well プレートを用いて膨潤させる場合は、1well 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* ® が誤吸引されることや、
過剰に水分を吸引し、乾燥することがございますので、推奨しません。

[*4] 24well、48well の細胞接着処理未処理のプレートでは、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。

[*5] 破れている場合は、細胞が脱落し、播種効率が下がります。

[*6] *Genocel* ® シートタイプに添加する細胞懸濁液量は、10μlまで減らすことができますが、
細胞が *Genocel* ® シートタイプの中心部に集中します。

[*7] 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。

[*8] 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。

[*9] ピンセットで把持した部位は、細胞が一部脱落します。

[*10] Well 内の培養液を 500μlに減らすことで、顕微鏡観察時 *Genocel* ® シートタイプの移動を抑制することができます。

[*11] このとき、*Genocel* ® シートタイプを、ピペットで吸引しないよう、ご注意ください。

[*12] 1週間以上培養を行った *Genocel* ® シートタイプは、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. A Gelatin Hydrogel Nonwoven Fabric Facilitates Metabolic Activity of Multilayered Cell Sheets,
   Tissue Engineering Part C, Volume 25, Number 6, 2019, pp344-352
2. Effect of cell seeding methods on the distribution of cells into the gelatin hydrogel nonwoven fabric,
   Regenerative Therapy, Volume 14, 2020, pp160-164 ＊Open access です。

＊全ての播種方法、培養を保証するものではありません。

Genocel® シートタイプ 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、細胞シート剥離、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】細胞シートの培養皿からの剥離をどのように行いますか？

・ピペッティングによる液流で剥離させるか、温度感応性培養皿をご使用ください。

【Q-08】どのような培養方法を用いますか？

・通常の静置培養に加えて、培養皿をシェイカー上に置いておこなう旋回培養の実施例があります。
静置培養よりも旋回培養の方が、*Genocel* ®内部への細胞侵入、増殖が早くなります。

【Q-09】どのような細胞で培養可能ですか？

・ヒト間葉系幹細胞（hMSC）、マウス繊維芽細胞（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）での培養を確認しております。
EpH4V では *Genocel* ®との接着性は他の細胞と比較して低い傾向があります。

３．観察・評価方法について

【Q-10】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-11】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 － 15μm 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。

【Q-12】*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℃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* ®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* ®のカスタマイズについて

【Q-13】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-14】密度や孔径の異なる *Genocel* ® を製造できますか？

・お問い合わせください。

【Q-15】現行サイズ以外の大きさの *Genocel* ® 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-16】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。