

## Genocel® Cardio Plate 取扱説明書

### <製品の特長>

- ・心筋細胞用にカスタマイズされたゼラチン繊維不織布（Genocel®）が配置された細胞培養用プレートです。
- ・柔軟なゼラチン繊維上で心筋細胞を培養することで、心筋細胞の収縮力に合わせてゼラチン繊維が大きく動き、簡便に収縮挙動を評価できます。
- ・ゼラチン繊維に沿って心筋細胞が配向し、成熟が促進され、薬剤への応答性が向上します。
- ・ゼラチン繊維に接着した心筋細胞は、長期培養や抗がん剤暴露などの過酷な条件でも剥離せず、様々な定量評価を可能にします。

### <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。

### <使用実績のある心筋細胞>

- ☐ iCell® Caridiomyocyte<sup>2</sup> (FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc.)
- ☐ MyCell® MYH7 R403Q (FUJIFILM Cellular Dynamics, Inc.)
- ☐ CarmyA (株式会社マイオリッジ)
- ☐ Pluricyte® (Ncardia)
- ☐ ラット胎児単離心筋

## I. 必要な消耗品および備品

- ・ Genocel® Cardio Plate
- ・ 1 mg/ml フィブロネクチン溶液 (sigma-aldrich, F1141)
- ・ 20 µl ピペット、1000 µl ピペット
- ・ 滅菌水またはリン酸緩衝液
- ・ 15 ml 遠心チューブ
- ・ 心筋細胞および推奨される細胞培養液

※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. 事前準備

1. **Genocel**®は培養プレートの中央部に配置されています。プレート底面から剥がれて脱落していないことを確認してください。**Genocel**®の端部 1mm 程度がゆがんでいる場合がございますが、使用には問題ございません。
2. 実験に必要な細胞数を計画します。**Genocel**®の面積に対し、2500-3500 cells/mm<sup>2</sup>の範囲で細胞播種濃度をご検討ください。**Genocel**®の面積は 18 mm<sup>2</sup>で、細胞播種液 10μl を播種します。

## III. 播種

1. 細胞播種用の培地を室温に戻してください。
2. 遠心管および 1.5ml チューブをベンチ内に移動してください。
3. セルカウント、遠心機の準備を行ってください。
4. 1.5ml チューブにフィブロネクチン (FB) 混合培地を調整します。  
(48 ウェルすべてを使用する場合、培養液：FB=1140：60 が目安となります。)
5. プレート内の **Genocel**®に FB 混合した培地を 6 μl 滴下します。(プレウェティング)  
ピペットで FB 混合培地 6 μl を保持し、プレートを傾け、**Genocel**®を目視します。**Genocel**®の中心部にチップの先端を当てながら穏やかに吐出し、プレートを元に戻します。"
6. 5 の作業をプレート内の **Genocel**®すべてに行います。
7. 細胞を液体窒素から取り出し、細胞の推奨プロトコルに従い、解凍してください。
8. 細胞数測定してください。
9. 180 x g, 5min で遠心して、細胞を沈殿させてください。
10. 計画した細胞懸濁液濃度となるよう、FB 混合培地で再懸濁し、1.5ml チューブに移してください。  
細胞懸濁液濃度 (cells/ml) = **Genocel**®への播種密度(cells/mm<sup>2</sup>) × 15.9 mm<sup>2</sup>/ 0.01 ml
11. ピペットで細胞懸濁液を 10 μl 保持します。  
**Genocel**®プレートを傾けて、**Genocel**®を視認し、**Genocel**®の中心部に穏やかに吐出してください。  
このとき **Genocel**®をピペットの先端で突かないよう、お気を付けください。
12. **Genocel**®上に細胞懸濁液が留まっていることをご確認ください。  
細胞懸濁液が **Genocel**®から漏れた場合は、プレートマップに記入してください。
13. ウェルの間隙または未使用の well に PBS または滅菌蒸留水を添加し、蒸散を防止します。
14. 37°Cで 3 時間インキュベートしてください。
15. 37°Cに温めた維持培養用の培地 400 μl をピペットで保持し、Well の壁面近傍に滴下してください。  
**Genocel**®に直接吐出しないでください。
16. 必要な場合は、ウェルの間隙または未使用の well の PBS または滅菌蒸留水を除去してください。
17. 37°C 5 %CO<sub>2</sub> のインキュベーターで培養してください。

## IV. 維持

1. 3-4 日毎に全量を培地交換してください。
2. 培養 6 日目以降に、**Genocel**®の中心付近の直径 3mm 以上の範囲で心筋が同期拍動していることをご確認ください。同期拍動していないサンプルは、薬剤応答性評価に適しませんので、細胞播種密度を増やすことをご検討ください。

## **V. 薬剤暴露**

### **■短期暴露**

1. 投与する化合物溶液を準備します。
2. 必要に応じて、Ca<sup>2+</sup>インジケーター等を添加してください。  
添加する場合は、100  $\mu$ l のピペットで 5 回ピペッティングしてください。"
3. 化合物投与前の測定を実施してください。測定はハイコンテンツ共焦点イメージング機器、動画撮影可能な倒立顕微鏡等を用い、20 fps、10-20 秒を目安に測定してください。
4. 培地 400  $\mu$ l に対し、4  $\mu$ l の化合物溶液を添加し、穏やかにピペッティングしてください。
5. 投与 10-20 分後に、3 と同条件で測定を実施してください。

### **■長期暴露**

1. 投与する化合物溶液を準備します。
2. 化合物投与前の測定を実施してください。
3. 培地 200  $\mu$ l を除去し、2 倍濃度の化合物を含んだ培地 200  $\mu$ l を添加してください。
4. 希望の時間に測定を実施してください。  
測定は■短期暴露-3 を参照してください。
5. 72 時間以上の暴露実験を行う場合は、2-3 日毎に培地 200  $\mu$ l の培地を除去し、1 倍濃度の化合物を含んだ培地 200  $\mu$ l を添加し、薬液交換を実施してください。測定は、薬液交換の前、または十分に時間をあけて実施してください。

### **■参考：収縮力の検出**

1. MUSCLEMOTION (ImageJ プラグインツール)等の汎用ソフトウェアにより、撮影した動画やタイムラプス像から収縮量を検出可能です。  
(MUSCLEMOTION <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.312067>)
2. 収縮力測定や特徴量解析、共焦点イメージング機器の操作等の支援が必要な場合は、お問い合わせください。( [nrdc@nikke.co.jp](mailto:nrdc@nikke.co.jp) )

## **V. 固定**

1. 培養液を除去します。
2. 37°C の PBS (+) 400  $\mu$ l で 5 分、3 回洗浄します。
3. PBS を除去し、4%PFA 溶液 200  $\mu$ l を *Genocel*® 上に 1 滴ずつ添加し、50  $\mu$ l で 5 回ピペッティングしてください。その後、15 分室温で固定します。
4. 常温の PBS 400  $\mu$ l で 5 分、3 回洗浄します。
5. 染色等の操作を行うまで、冷蔵保管します。  
長期に保管する場合は、周囲の Well に PBS を添加する等、標本が乾燥しないようお気をつけください。
6. 染色液を添加する際は、抗体や染色液が *Genocel*® にむらなく入るよう、50  $\mu$ l で 5 回ピペッティングしてください。

## VI. プレートマップ

細胞								
播種細胞数								
播種日								
プレートLotNo.								
観察日								
	1	2	3	4	5	6	7	8
A								
B								
C								
D								
E								
F								

### ■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