

Genocel[®] (ブロックタイプ) 取扱説明書

<製品の特長>

- ・ゼラチンのみで構成された、不織布状の繊維状細胞培養足場材です。
- ・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。

<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、35 mm 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、35 mm 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>

- Genocel[®] を細胞播種前に 30 分以上、十分量の培地で膨潤させ、泡がなくなったことを確認してください。完全に膨潤すると基材が透明になります。
 - 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。
- ウェル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)、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)、チャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞(V79)、HeLa 細胞での培養を確認しております。



株式会社ニッケ・メディカル

〒541-0048 大阪府中央区瓦町3丁目3-10

TEL 06-6205-6651 nrdc@nikke.co.jp

《 Genocel[®] ブロックタイプへの播種・培養方法 》 (実験例)

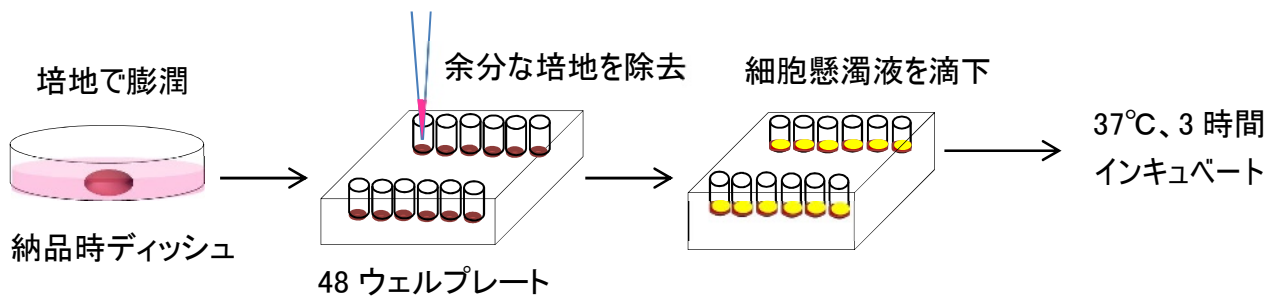
- 細胞種 : マウス間葉系幹細胞様細胞 (KUM6)
- 細胞数 : 2×10^6 cells/ml , 50 μ l 細胞懸濁液 / Genocel[®] ブロックタイプ

I. 必要な消耗品および備品

- ・ Genocel[®] ブロックタイプ
- ・ 100 μ l ピペット
- ・ 1000 μ l ピペット
- ・ アスピレーティングピペット
- ・ 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)
- ・ 細胞接着処理済 48 ウェルプレート
- ・ 滅菌リン酸緩衝液

II. 操作方法

1. 膨潤済の Genocel[®] を 48 ウェルプレートに移し、
ウェルプレートにこぼれた余分な培地をアスピレートピペットにて吸引除去します。
※この際、ピペットの先端が Genocel[®] に触れないよう、ご注意ください。Genocel[®] が誤吸引されることがあります。
2. 2×10^6 cells/ml の細胞懸濁液 50 μ l を Genocel[®] の中央にゆっくり滴下します。
3. 37°C、5% CO₂ のインキュベーターで、3 時間静置します。
※基材と細胞の接着性が悪い場合には、静置時間をのばすことで、改善する場合があります。



4. 細胞播種後の Genocel[®] を新たな 48 ウェルプレートに移し、500 - 1,000 μ l の培地をゆっくり加え
37°C、5% CO₂ 環境下で培養します。
5. 2 - 3 日毎に、培地交換を行い、任意の期間培養後、実験に使用します。

《 Genocel[®] ブロックタイプへの種々の播種・培養方法と特徴 》

上記、実験例の方法をお試しいただき、Genocel[®]内の細胞の分布や細胞増殖速度にご満足いただけない場合、以下の播種・培養方法をお試しください。また高効率播種、高密度培養が可能な Genocel[®]シートタイプ、Genocel[®] Advance φ4mm のご使用も併せてご検討ください。

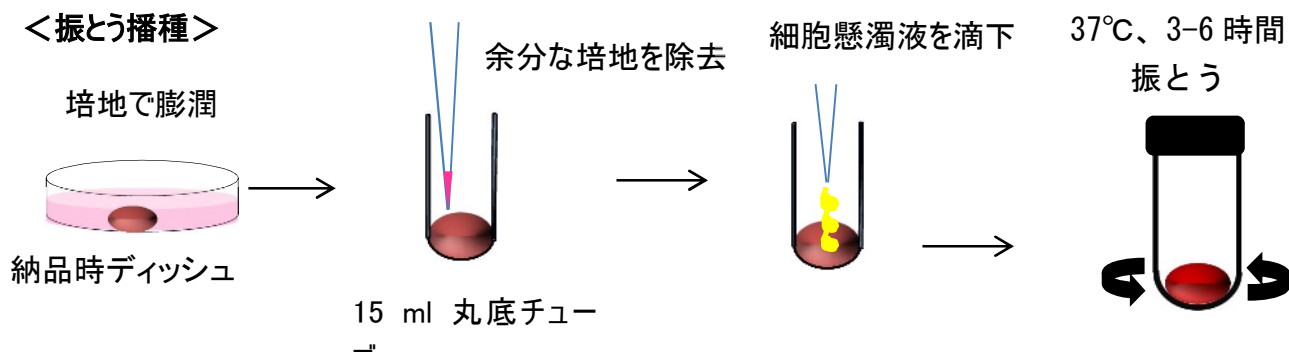
I. 播種

(1) 振とう播種 … 細胞が基材内に均一に分布しやすくなります。

1. 膨潤済の Genocel[®] をポリプロピレン製 15 ml 丸底チューブに入れ、余分な培地を吸引除去します。
2. 各チューブに $5 \times 10^5 - 2 \times 10^6$ cells/ml の細胞懸濁液を 50 - 200 μ l ずつ加えます。
3. 37°C、5% CO₂ のインキュベーター内に設置のオービタルシェイカーを用いて、100 - 300 rpm で 3-6 時間振とうします。

※オービタルシェイカーは、オプティマ 2-1987-01 インキュベーター内用シェイカー OS-762 を使用しています。

ポリプロピレン製チューブの固定には、オプティマ OS-76S Spring Rack を使用しています。



II. 培養

(1) 巡回培養 … 細胞の増殖速度が速くなります。

1. 細胞播種後の Genocel[®] を新たな 48 ウェルプレートに移し、500 - 1,000 μ l の培地をゆっくり加え、37°C、5% CO₂ のインキュベーター内でオービタルシェイカーを用いて 60 - 90 rpm で巡回させて培養します。
2. 2 - 3 日毎に、培地交換を行い、任意の期間培養後、実験に使用します。

(2) 攪拌培養 … 足場内部での細胞増殖を促し、より大きく高密度の凝集体形成が期待できます。

1. 細胞播種後の Genocel[®] をスピナーフラスコに入れ、使用するスピナーフラスコに適した量の培地を加え、37°C、5% CO₂ のインキュベーター内で、スターラーを用いて攪拌します。
※ Genocel[®] がフラスコ底面をゆっくり回る程度に攪拌速度を設定します。
※ Genocel[®] がプロペラ等に接触したり、フラスコ中央に留まって動かないことのないよう、適切な攪拌速度をご検討ください。
2. 2 - 3 日毎に、半分量の培地を除去し、除去した分と同量の新しい培地を加えることで培地交換を行い、任意の期間培養後、実験に使用します。

*** 全ての播種方法、培養を保証するものではありません。**

《本製品が使用されている論文》

1. Nakamura, K.; Saotome, T.; Shimada, N.; Matsuno, K.; Tabata, Y., *Tissue Engineering Part C*, **2019**, *25*, 344-352
2. Matsuno, K.; Saotome, T.; Shimada, N.; Nakamura, K.; Tabata, Y., *Regenerative Therapy*, **2020**, *14*, 160-164 * Open access
3. Saotome, T.; Shimada, N.; Matsuno, K.; Nakamura, K.; Tabata, Y., *Regenerative Therapy*, **2021**, *18*, 418-429 * Open access

■お問い合わせ

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

nrdc@nikke.co.jp

Genocel® ブロックタイプ 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、細胞播種、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】細胞の接着、増殖挙動は？

・細胞の多くが、Genocel®の繊維交点に付着します。培養日時の経過により、繊維に沿った細胞の変形や、繊維に沿った増殖がみられます。

【Q-08】細胞播種方法の違いは？

・静置播種よりも、振盪播種を用いた方が、足場内部に細胞が侵入しやすくなります。増殖細胞では、培養日時の経過により、播種方法による差は少なくなります。

【Q-09】培養方法の違いは？

・静置培養よりも、旋回培養もしくは攪拌培養の方が、Genocel®内部への細胞侵入、増殖が早くなります。

【Q-10】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)、チャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞(V79)、HeLa 細胞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-11】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-12】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。パラフィン切片または凍結切片作製が可能です。凍結切片作製では、凍結包埋し、5 - 15 μ m 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。詳細なプロトコルをご希望の場合は、お問い合わせください。

【Q-13】*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-14】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-15】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-16】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-17】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。

■お問い合わせ

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

nrdc@nikke.co.jp