

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。
- ・特殊な繊維構造のため、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（エチレンオキサイドガス）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>

- 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、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）、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞、ヒト脂肪由来幹細胞（ADSC）、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）、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、HUVEC では Genocel® シートタイプ との接着性は他の細胞と比較して低い傾向があります。

《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 : 1×10^5 cells/well、12 ウェルプレート

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 12 ウェルプレートに 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*® $\phi 8\text{mm}$ 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、細胞シートをウェル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ウェル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°C 、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。
※攪拌培養、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 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事で、Genocel® シートタイプ 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。
- * 本手順は Genocel® Advance φ4mm でもお使いいただけます。

QRコードから高効率播種の
操作動画をご覧になれます。

(動画では Genocel® Sheet φ8mm を使用)

<https://www.kyoto-mp.co.jp/product/genocel/>



I. 必要な消耗品および備品

- ・ Genocel® シートタイプ
- ・ 20 μL ピペット
- ・ 200 μL ピペット
- ・ 1000 μL ピペット (Genocel® シートタイプ 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 2本
(先端がとがったピンセットを使用すると、Genocel® シートタイプ を把持する際に裂ける恐れがあります)
- ・ 細胞接着処理未処理 6 ウェルプレート
(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® シートタイプ 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)
- ・ 3.0 mg/mL 以上の濃度のコラーゲン溶液 (新田ゼラチン Cellmatrix® シリーズなどをご検討ください)
- ・ 滅菌水
- ・ 15 mL 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、消耗品は割愛して記載しております。

II. Genocel® シートタイプ への細胞播種

※1週間程度の培養期間を想定しております。

1週間以上の長期的な培養を実施する場合は、Q&A をご参照ください。

1. Genocel® シートタイプ を培養皿に設置し、滅菌水を添加して、10分以上静置し、半透明になるまで膨潤させます。(右図参照)^{*1}

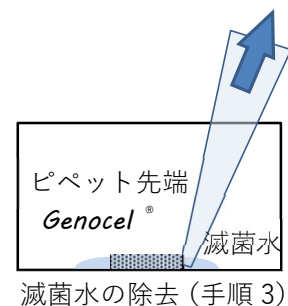


Genocel® の膨潤
(手順1)

2. 膨潤した Geocell® シートタイプ を乾いた培養皿やシャーレに移します。

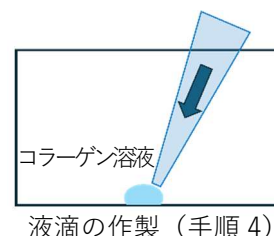
- 1000 μL ピペットの先端を **Genocel**[®] シートタイプの端部にあて、端部 1 箇所から 1 回のみ吸い、**Genocel**[®] シートタイプ 内部の滅菌水を除去します。(右図参照) *²

※この時シート内部にチップを刺して吸引したり、複数箇所から吸引をしないでください。過剰に水を吸引することでシートの剥離につながります。



滅菌水の除去 (手順 3)

- 20 μL ピペットを用いて 3 mg/mL 以上の濃度に調製したコラーゲン溶液 20 μL とり、培養を実施したいウェル上に滴下して小さな液滴を作ってください。(右図参照) *^{3*4}



液滴の作製 (手順 4)

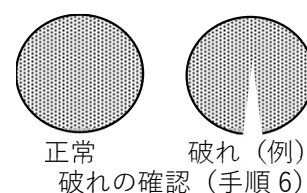
- 滅菌済みのピンセットで、**Genocel**[®] シートタイプの端部が破れないように優しく把持し、コラーゲン溶液の液滴に被せるようにして培養ウェルに設置します。(右図参照)

※**Genocel**[®] シートタイプ がピンセットから離れにくい場合には、予備のピンセットをご使用ください



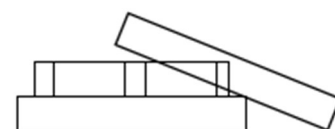
Genocel[®] の設置 (手順 5)

- 設置した **Genocel**[®] シートタイプ が破れていないことを確認してください。(右図参照) *⁵



破れの確認 (手順 6)

- クリーンベンチ内で **Genocel**[®] を完全に乾燥させてください。*⁶
※クリーンベンチのファンをつけたまま Well プレーートの蓋をずらしてオーバーナイトで **Genocel**[®] を乾燥させてください。(右図参照)



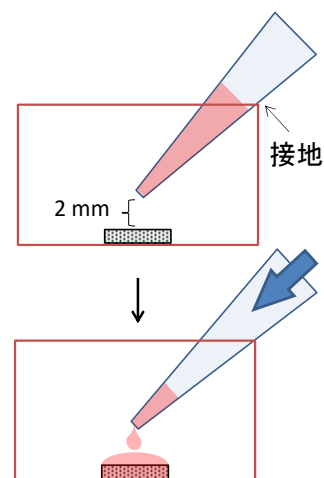
Genocel[®] の風乾 (手順 7)

- 凍結細胞、または、対数増殖期まで増殖させた細胞を計数した後、15 mL 遠心チューブ中で、高濃度の細胞懸濁液 (推奨 $1.0 \times 10^7 - 2.0 \times 10^7$ cells/mL) になるよう再懸濁してください。*⁷
足場内に低濃度で細胞播種する場合は、 $1.0 \times 10^6 - 2.0 \times 10^6$ cells/mL を目安としてください。

9. 200 μ L 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、所定量の細胞懸濁液を保持します。^{*8}

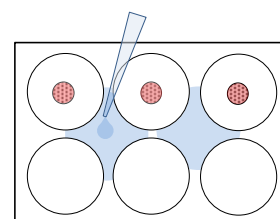
細胞懸濁液の保持量	
<i>Genocel</i> [®] シートタイプ $\phi 8\text{mm}$	
40~50 μ L	

10. ピペットのチップをウェルプレート壁面に接地し^{*9}、チップの先端を *Genocel*[®] シートタイプ の中心部に、触れない程度まで近づけ、細胞懸濁液を慎重に滴下します。
(右図参照)
滴下後、*Genocel*[®] シートタイプ に液滴が吸引されます。
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。



細胞懸濁液の滴下
(手順 10)

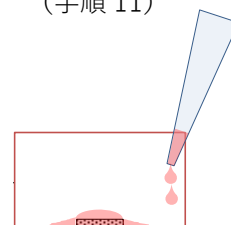
11. 細胞懸濁液の蒸散を防ぐため、ウェル間隙に滅菌リン酸緩衝液、または滅菌水を 2~4 mL 添加してください。(右図参照)



細胞懸濁液の蒸散防止
(手順 11)

12. 37°C、5%CO₂ のインキュベーターの中で、30 分静置します。
13. 30 分培養後、1000 μ L ピペットを用いて、ゆっくりと液体培地を添加します。
1 ウェル内に計 2~3 mL 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。
(右図参照)



培養液の添加 (手順 13)

14. *Genocel*[®] シートタイプ がウェル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。(右図参照)
浮遊していると細胞が脱落し、播種効率が低くなります。



培養液添加後の *Genocel*[®] の
浮遊確認 (手順 14)

15. *Genocel*[®] シートタイプ がウェルプレート底面に接着した状態で培養します。

III. *Genocel*® シートタイプでの3次元培養の維持

15. 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、1000 µL 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*® シートタイプの反転および観察

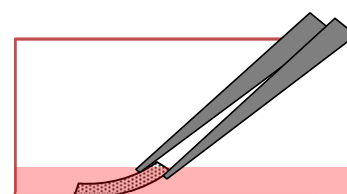
16. *Genocel*® シートタイプの上面に、より多くの細胞が留まります。

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。

ウェル内の培養液を除去して 500 µL にし、ピンセットをウェルプレートと

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。^{*10}

17. *Genocel*® シートタイプの端部を先端がとがっていないピンセットで把持し、上下反転します。^{*11*12} (右図参照)



Genocel® の把持

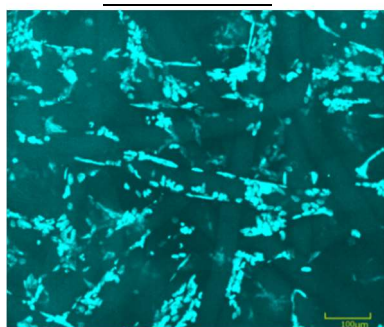
(手順 16、17)

18. 観察後に培養を維持する場合は、培養液を添加し、1 ウェルあたりに総量 2～3 mL としてください。

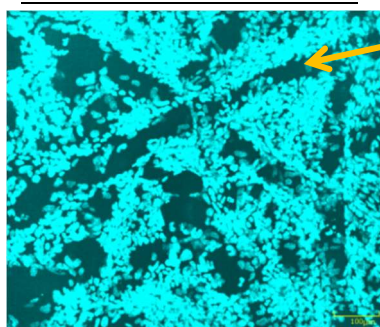
<<播種後の細胞分布例>>

- ・ HEK293 細胞 (2.0×10^7 cells/mL, 20 µL 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

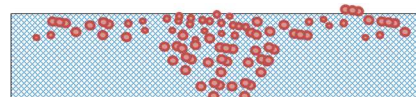


上下反転後 懸濁液滴下面



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. テクニカルノート

Genocel®シートタイプ からの生細胞の回収

Genocel® シートタイプ からの細胞抽出は下記をご参考ください。

1. 培養液を 1000 µL ピペットで吸引します。*13
2. 37°Cに温めた滅菌リン酸緩衝液を培養皿に添加し、37°C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 1000 µL 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、15 mL 遠心チューブ内に移します。
5. 2.5 g/l-トリプシン/1 mmol/l-EDTA 溶液を 1 mL 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°C、10 分間静置後、ボルテックスで振とうし、ふたたび 37°C、10 分間で静置します。
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。*14
7. 37°Cに温めた培養液を遠心チューブに 1 mL 追加します。
8. 1000 rpm、3 分間、遠心し、細胞を沈殿させ、上清を 1000 µL ピペットで除去します。
9. 500 µL 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。

VI. 注釈

- *1. 6 ウェルプレートを用いて膨潤させる場合は、1 ウェルあたり 5～6 個まで、同時に膨潤させることができます。
- *2. 滅菌水除去時に、アスピレーティングピペットを用いると、*Genocel*® シートタイプ が誤吸引されることがや、過剰に水分を吸引し、乾燥することがありますので、推奨いたしません。
過剰に水分を吸引した場合、*Genocel*® シートタイプ をウェルプレートに接着した後と、培地滴下後に *Genocel*® シートタイプ が浮遊し細胞が *Genocel*® シートタイプ から脱落するなど、失敗の可能性が高くなりますのでご注意ください。
- *3. 使用するコラーゲン溶液の例として、新田ゼラチン Cellmatrix®シリーズなどをご検討ください。
- *4. 使用するコラーゲン溶液量は、*Genocel*® シートタイプのサイズに合わせて適宜ご変更ください。
乾燥時の *Genocel*® シートタイプ面積 2.5 mm²あたり 1 μ L が目安です。
- *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 は完全に乾燥させてください。乾燥が不十分になると *Genocel*® シートタイプのプレートへの接着性が低下します。
- *7. 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。
- *8. *Genocel*® シートタイプに添加する細胞懸濁液量は、*Genocel*® シートタイプのサイズに合わせて適宜ご変更ください。乾燥時の *Genocel*® シートタイプ面積 1 mm²あたり 1 μ L が目安です。
- *9. チップの先端を固定することで、安定して *Genocel*® シートタイプ に細胞懸濁液の滴下できます。
- *10. 播種翌日にも反転が可能です。細胞接着が弱く、脱落が見られます。
- *11. ピンセットで把持した部位は、細胞が一部脱落します。
- *12. ウェル内の培養液を 500 μ L 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。
- *13. 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。
- *14. 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. 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

* 全ての播種方法、培養を保証するものではありません。

■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

Genocel® シートタイプ Q&A

1. Genocel® シートタイプ 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)、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞、ヒト脂肪由来幹細胞 (ADSC)、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)、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、HUVEC では *Genocel*® シートタイプ との接着性は他の細胞と比較して低い傾向があります。接着性が低い場合には、フィブロネクチンコーティングを行うことで、細胞接着性が改善する可能性があります。

(例) 1mg/mL フィブロネクチン溶液を、リン酸緩衝液または液体培地中に 1/100 となるように添加してコーティング溶液を作製し、膨潤後の *Genocel*® シートタイプ をコーティング溶液中に浸漬、37°C で 1~2 時間静置します。その後、*Genocel*® シートタイプ からフィブロネクチン溶液を除去し、取扱説明書 II-5 の手順から進めてください。

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*® シートタイプ 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。処理前に *Genocel*® シートタイプ 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® シートタイプ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® シートタイプ 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® シートタイプ 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 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