

---

# Takara

## MiraCell<sup>®</sup> Cardiomyocytes (from ChiPSC12) Kit

---

Application Note #2

### MED64 装置を用いた毒性評価試験プロトコール (凍結バイアルからの MED プローブ直接播種)

**！注意**

- 本プロトコールは、MiraCell Cardiomyocytes(from ChiPSC12) Kit (製品コード Y50015)専用  
に作成されたものです。
- 解凍日に直接 MED プローブへ播種する場合は、本プロトコールに記載の方法に従って細胞を調製して下  
さい。
- 本プロトコールを利用される前に、必ず、MiraCell Cardiomyocytes(from ChiPSC12) Kit (製品コ  
ード Y50015)の取扱説明書ご覧いただき、心筋細胞の解凍、培養、操作方法についてご確認下さい。

---

# 目次

1. はじめに.....	3
2. 必要な試薬・器具類.....	3
3. 試験スケジュール.....	4
4. 操作.....	4
4-1. 心筋細胞の解凍と MED プローブへの播種 (Day 0).....	4
4-1-1. MED プローブのフィブロネクチンコート.....	4
4-1-2. 心筋細胞の解凍.....	5
4-1-3. 心筋細胞の MED プローブへの播種.....	6
4-2. MED プローブ播種 2 日目以降 (Day2-).....	8
5. 注意.....	8

---

## 1. はじめに

MEA (Multi-electrode array) システムによる心筋細胞の電気生理学的解析は、比較的簡便な操作で、*in vivo* ECG (Electrocardiography) の QT 間隔に相当する FPD (Field Potential Duration) を算出することが出来るため、種々の薬剤による心筋細胞の電気生理学的な応答性を解析することが可能である。

本プロトコールでは、MiraCell Cardiomyocytes(from ChiPSC12) Kit (製品コード Y50015)を対象に MEA システム MED64 装置 (アルファメッドサイエンティフィック社製) による心毒性評価法を紹介する。

なお、MiraCell Cardiomyocytes は、前培養することなく直接 MED プローブへ播種することも出来るため、より簡便な操作で作業者毎の手技の差を最小限にしつつデータを取得することが可能である。

本プロトコールでは、解凍後に心筋細胞を直接 MED プローブへ播種する方法について記載する。

## 2. 必要な試薬・器具類

- MiraCell Cardiomyocytes(from ChiPSC12) Kit (製品コード Y50015)
  - MiraCell Cardiomyocytes (from ChiPSC12)
  - MiraCell CM Thawing Medium
  - MiraCell CM Culture Medium
- 37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベータ
- 遠心機
- クリーンベンチまたは安全キャビネット
- 電動ピペッター、及びプラスチックピペット
- ピペットマン、及び (フィルター付き) 滅菌チップ
- 50 ml チューブ
- 15 ml チューブ
- 1.5 ml チューブ
- ダルベッコ PBS Ca & Mg 含有 (D-PBS(+/+))  
例) Dulbecco's PBS (製品コード C-40230)
- 細胞培養容器 (6 well tissue culture plate、など)
- 1 mg/ml フィブロネクチン溶液
- トリパンブルー溶液
- 血球計算盤
- MED プローブ
- 細胞培養用 10 cm シャーレ
- 滅菌水
- 細胞外電位測定装置 MED64

### 3. 試験スケジュール



### 4. 操作

#### 4-1. 心筋細胞の解凍とMEDプローブへの播種 (Day 0)

- ・ MiraCell CM Culture Medium は予め室温に戻しておく。
- ・ MiraCell CM Thawing Medium 20 ml を 50 ml チューブに分注し、37℃に加温しておく。
- ・ 解凍までにウォーターバスを 37℃に設定しておく。
- ・ 凍結心筋細胞バイアルを液体窒素タンクから液体窒素あるいはドライアイスを含む容器に移す。
- ・ MED プローブは予め 70%エタノールで消毒後、殺菌灯で両面を一時間照射して滅菌しておく。
- ・ 解凍の 1 時間前までに 4-1-1 の手順にしたがって、MED プローブのフィブロネクチンコートを実施しておく。

##### 4-1-1. MED プローブのフィブロネクチンコート

1. MED プローブ 1 枚を細胞培養用 10 cm シャーレ内に移し、細胞培養用 10 cm シャーレに滅菌水 7 ml を添加する<sup>※1</sup>  
  
※1：使用する MED プローブすべてについて、同様の操作を行って下さい。また、MED プローブ内に滅菌水を添加しないで下さい（乾燥した状態にしておく）。
2. 1 mg/ml フィブロネクチン溶液を D-PBS(+ / +)で 20 倍希釈する（終濃度 50 μg/ml）。
3. MED プローブ中央の電極へ希釈したフィブロネクチン溶液を 2 μL スポットする<sup>※2</sup>。  
  
※2：チップの先端で電極を傷つけないようにして下さい。
4. 37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベータ内で 1～2 時間インキュベートする。

---

#### 4-1-2. 心筋細胞の解凍

1. 凍結バイアルを37℃のウォーターバスでフロート等を用いて2分30秒間インキュベートし、解凍する<sup>※1</sup>。

※1： 解凍中、バイアルを振らないでください（解凍後の生存率に影響するため）。また、解凍後に関しても、バイアルを転倒混和などしないで下さい。

2. 70% エタノールでバイアルを滅菌消毒後、キムワイブ等で余分なエタノールを拭き取り、安全キャビネット内に移す。

3. 1 ml ピペットマンを用いて、クライオバイアル内の細胞をゆっくりと空の50 ml チューブに移す<sup>※2</sup>。

※2： 細胞懸濁液の吸引・排出は1 mlあたり3秒以上かけてゆっくりと行ってください。

4. 1 ml ピペットマンを用いて、37℃に温めた1 ml のMiraCell CM Thawing Medium を取り、クライオバイアルに添加し、残った細胞を吸引する。ゆっくりと3. の細胞懸濁液を含む50 ml チューブに滴下する<sup>※3</sup>。

※3： 50 ml チューブを斜め約45°に倒してチューブ壁面から1ドロップ添加後、細胞懸濁液を3～5回ゆるやかに前後させて攪拌後、5秒待ってから次の1ドロップを滴下し、再度攪拌します。この操作を1 ml分繰り返し行ってください。

5. 1 ml ピペットマンを用いて、1 ml のMiraCell CM Thawing Medium をゆっくりと細胞懸濁液に滴下する<sup>※4</sup>。

※4： 1ドロップ添加後、溶液を3～5回ゆるやかに前後させて攪拌後、3秒待ってから次の1ドロップを滴下します。この操作を1 ml分繰り返し行ってください。

6. 1 ml ピペットマンを用いて、合計2 ml のMiraCell CM Thawing Medium をゆっくりと細胞懸濁液に滴下する<sup>※5</sup>。

※5： 細胞懸濁液を1ドロップあたり3～5回軽いタッピングにより攪拌しつつ、1秒間に1ドロップずつ添加してください。

7. 5 ml ピペットでMiraCell CM Thawing Medium を5 ml 吸引し、軽く攪拌しながら、1 秒間に1 ドロップずつ細胞懸濁液に添加していく。

8. 10 ml ピペットで細胞懸濁液全量を1回のみピペッティングする<sup>※6</sup>。

---

※6：1 ml あたり2～3秒間かけてゆっくりと吸引・排出を行ってください。

9. 細胞懸濁液20  $\mu$ l を分取し下記の要領でセルカウントを行う<sup>※7</sup>。

#### セルカウント

- 分取した細胞懸濁液 20  $\mu$ l に対し、トリパンブルー溶液を 20  $\mu$ l 添加して 2 倍希釈し、血球計算盤を用いて生細胞をカウントする。
- 4 エリアの合計細胞数を測定後、下記の計算式にて細胞濃度(cells/ml)及び総細胞数を算出する。

$\begin{aligned} \text{総カウント数} \times 10^4 \text{ cells} \div 4 \times 2 &= \text{細胞濃度 (cells/ml)} \\ \text{細胞濃度} \times 10 \text{ ml} &= \text{総細胞数 (cells)} \end{aligned}$
--

※7：心筋細胞は溶液中で沈殿しやすいため、ピペティング後すぐにサンプリングを実施して下さい。

#### 4-1-3. 心筋細胞の MED プローブへの播種

以降の操作では、100-200 $\mu$ L ピペットマンを使用します。細胞の密度が高い場合、これらのピペットマンを用いたピペティングは細胞に対して大きなダメージとなります。操作の際はゆっくりと（50 $\mu$ L の吸引あるいは排出に対し 10 秒程度が目安）行って下さい。また、スポットの際にも 2-10 $\mu$ L ピペットマンを用いますが、その際も同様に操作はゆっくりと（2 $\mu$ L の吸引あるいは排出に対し 2 秒程度が目安）行って下さい。

1. 準備した MED プローブの枚数に応じた必要細胞数を計算する（1プローブ当たり  $3.5 \times 10^4$  個の細胞が必要）。
2. MED プローブの枚数に応じた必要細胞数を、5 ml ピペットで一回のみピペティングした後、15 ml チューブ（チューブ 1）へ移し、室温で 200 xg、3 分間遠心する<sup>※1</sup>。

※1：遠心は心筋細胞にとって大きなダメージとなります。遠心の g や時間は厳守して下さい。

3. 遠心後、上清を 100  $\mu$ L 程度残してアスピレーターで吸引除去する。
4. 200  $\mu$ L ピペットマンを用いて残りの上清をゆっくりと出来る限り除去する。
5. ピペットマンを用いて、下記の計算式で算出した必要培養液量の半量の MiraCell CM Thawing Medium をチューブ 1 の細胞ペレットに加えた後、軽くタッピングを 10 回前後行い、細胞ペレットをほぐす<sup>※2、※3</sup>。

1. で計算の必要細胞数 (cells)  $\div 3.5 \times 10^4$  cells  $\times 2 \mu$ L = 必要培養液量

- 
- ※2：例として、MED プローブ 20 枚に播種する場合、 $7 \times 10^5$  個の細胞( $3.5 \times 10^4$  個 /  $2 \mu\text{L}$  / プローブ  $\times$  20 プローブ)が必要となり、総培養液量を  $40 \mu\text{L}$  に調整する必要があります。本操作ではその半量の  $20 \mu\text{L}$  を加えます。
- ※3：ピペッティングは行わないで下さい。
6. 5.で加えた培地量と同量の細胞懸濁液を、ピペットマンを用いてチューブ 1 から  $1.5 \text{ ml}$  チューブ(チューブ 2)に全量移す<sup>※4</sup>。
- ※4：例として、5.で加えた量が  $20 \mu\text{L}$  の場合、 $20 \mu\text{L}$  を  $1.5 \text{ ml}$  チューブへ移します。
7. チューブ 1 に残った細胞懸濁液量をピペットマンで定量し、適量の MiraCell CM Thawing Medium を加え、5.で計算した必要培養液量の半量になるように調整する<sup>※5</sup>。
- ※5：例として、残った細胞懸濁液の量が  $5 \mu\text{L}$  の場合、 $15 \mu\text{L}$  を加えて総量を  $20 \mu\text{L}$  に調整します。播種する細胞数が少ないと、適切な波形を得られないことがあります。濃度の調整は正確に行ってください。
8. 7.で調製したチューブ 1 の細胞懸濁液全量を、6.のチューブ 2 へ移し、3-5 回タッピングで細胞を混合する。
9.  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  インキュベータから MED プローブを取り出す。
10. 8.で調製したチューブ 2 の細胞懸濁液を 3-5 回タッピングした後、MED プローブに  $2 \mu\text{L}$  スポットする<sup>※6</sup>。
- ※6：プローブ 1 枚に対し、 $3.5 \times 10^4$  個の細胞をスポットすることになります。なお、フィブロネクチン溶液が蒸発しないよう、操作は素早く行ってください。
11. 必要枚数分の MED プローブに対し 10.の操作を行う<sup>※7</sup>。
- ※7：細胞がチューブの底に沈むため、1 プローブ毎に 3-5 回タッピングを行い、細胞を混合してからスポットして下さい。また、ピペッティングによる混合は避けてください。
12.  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  インキュベータ内で 4-5 時間培養を行う<sup>※8</sup>。
- ※8：時間を厳守して下さい。
13. 4-5 時間培養後、MED プローブを  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  インキュベータ内から取り出し、MED プローブの壁面からゆっくりと  $1 \text{ ml}$  の MiraCell CM Culture Medium を添加する<sup>※9</sup>。
- ※9：培地が直接細胞にあたらないよう注意して、プローブの淵沿いに円を描くように培地を滴下して下さい。
-

---

14. 37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベータにてインキュベートを継続する<sup>※10</sup>。

※10: MED プローブへ播種しなかった残りの細胞は、フィブロネクチンコートプレートに播種し後日使用することも出来ます。MiraCell Cardiomyocytes(from ChiPSC12) Kit (製品コード Y50015)の説明書にしたがって、操作を行って下さい。

#### 4-2. MED プローブ播種 2 日目以降 (Day2-)

1. 播種から 2 日後、1 ml ピペットマンで MED プローブ内の培地を 0.5 ml 除去し、新しい MiraCell CM Culture Medium をプローブの壁面に添わせながら 0.5 ml 添加する。
2. それ以降、1-2 日おきに培地の半量(0.5 ml)を、1 ml ピペットマンを用いて除去し、新しい培地を半量(0.5 ml)加え、37℃、5% CO<sub>2</sub> インキュベータにて培養を継続する。MED プローブへ播種してから、おおむね 5-7 日目から測定が可能となる。
3. 測定に用いる日の前日もしくは当日に、MED プローブ内の培養液全量を除去し、新しい MiraCell CM Culture Medium を 2 ml 添加する<sup>※1, 2</sup>。

※1：培養液が直接細胞にあたらないよう、壁面からゆっくりと添加して下さい。

※2：細胞培養用 10 cm シャーレ内の滅菌水が蒸発等により少なくなると、MED プローブ内の培地が蒸発しやすくなります。滅菌水は適宜追加するようにして下さい（滅菌水が細胞培養用 10 cm シャーレ表面を完全に覆う程度）。

4. 適宜、MED64 にて解析を行う。

解析方法については、下記 HP の 3.Data Acquisition, 4. Data Analysis の項目を参照。

[http://www.med64.com/support/Application\\_Note\\_Cellartis\\_hPSC-CM.pdf](http://www.med64.com/support/Application_Note_Cellartis_hPSC-CM.pdf)

#### 5. 注意

MiraCell は iHeart Japan 株式会社の登録商標です。その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。