

---

# TAKARA

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

---

Application Note #1

### MED64 装置を用いた毒性評価試験プロトコール

**! 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。
- 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。
- 解凍日に直接MEDプローブへ播種する場合は、Application #2 をご覧下さい。

---

# 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 (Day0).....	4
4-2. 心筋細胞の MED プローブへの播種 (Day2).....	4
4-2-1. MED プローブのフィブロネクチンコート.....	4
4-2-2. 心筋細胞の調製.....	5
4-2-3. MED プローブへの播種 .....	6
4-3. MED プローブ播種 2 日目以降(Day4-) .....	7
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。

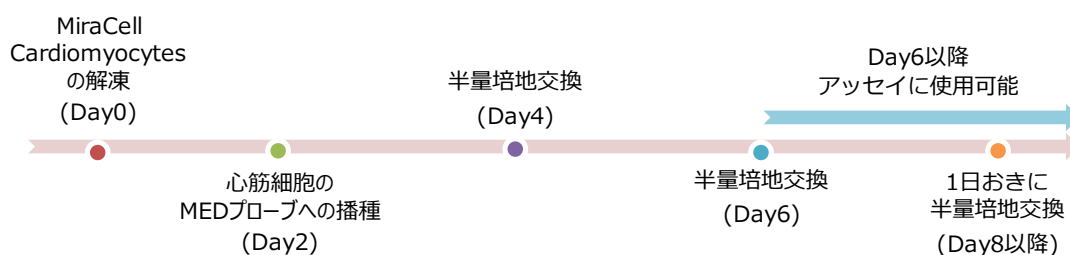
本プロトコールでは、MiraCell Cardiomyocytes(from ChiPSC12) Kit (製品コード Y50015)を対象に MEA システム MED64 装置 (アルファメッドサイエンティフィック社製) による心毒性評価法を紹介する。

なお、MiraCell Cardiomyocytes は、解凍して 2-5 日経過後から様々な試験に用いることが可能である。

## 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
- グ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)
- ダルベッコ PBS Ca & Mg 不含 (D-PBS(-/-))  
例) Dulbecco's PBS, w/o Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup> (製品コード C40232)
- 0.25% トリプシン-EDTA 溶液
- 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
- トリパンプルー溶液
- 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 (Day0)

MiraCell Cardiomyocytes(from ChiPSC12) Kit (製品コード Y50015)の説明書をご確認下さい。

#### 4-2. 心筋細胞のMEDプローブへの播種 (Day2)

解凍 2 日後より MED プローブへと継代することが可能となる。ここでは、6 ウェルプレートで解凍した心筋細胞を例に、継代方法を記載する。

- 必要な試薬 (D-PBS(-/-)、MiraCell CM Culture Medium、0.25%トリプシン-EDTA 溶液) は予め室温に戻しておく。
- 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。

##### 4-2-1. MEDプローブのフィブロネクチンコート

- 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)。

- 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)。
- 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。

- 
- 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。

#### 4-2-2. 心筋細胞の調製

- アスピレーターで 6 ウェルプレート内の解凍用培地を吸引する。
- 室温の D-PBS(-/-) 2 ml をウェルに加える。
- ウェルに添加した D-PBS(-/-)をアスピレーターで吸引後、再度 D-PBS(-/-) 2 ml をウェルに加える。
- ウェルに添加した D-PBS(-/-)を吸引除去し、室温に温めた 0.25% トリプシン-EDTA 溶液を 1ml 添加し、37℃で 4 分間インキュベートする<sup>※1</sup>。

※1：長時間のトリプシン処理は心筋細胞の生着率等を低下させるため、時間を厳守して下さい。

- プレートを手前から強くたたき、心筋細胞を可能な限り剥離させる<sup>※2</sup>。

※2：剥離しない場合は、さらに 37℃で 1 分間インキュベートを行なった後、再度プレートを叩いて下さい。

- 1 ml の MiraCell CM Culture Medium を添加し、1 ml ピペットマンを用いてウェル内の細胞懸濁液を 50 ml チューブに移す<sup>※3</sup>。

※3：この段階でのピペッティングは不要です。また、細胞懸濁液の吸引・排出の各工程は、1 ml 当たり 3 秒以上かけてゆっくと行って下さい。

- 1 mL の MiraCell CM Culture Medium を細胞回収後のウェルに添加後、プレートを手前に傾けウェルの上半分を 2 回ピペッティングして残存細胞を剥離させる。さらに、プレートを反転後、同様の操作を行い、残存細胞を剥離させる。
- 7.のウェル内の溶液を、6.の 50 ml チューブへ移す。
- 5 ml ピペットを用いてゆっくと細胞懸濁液を 1 回のみピペッティングした後、20 μl をサンプリングして細胞数をカウントする<sup>※4</sup>。

#### セルカウント

- トリパンブルー溶液を 20 μl 添加し、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、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。

$\begin{aligned} \text{カウント数} \times 10^4 \text{ cells} \div 4 \times 2 &= \text{細胞濃度 (cells/ml)} \\ \text{細胞濃度} \times 3 \text{ ml} &= \text{総細胞数 (cells)} \end{aligned}$
--

---

※4：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。

#### 4-2-3. 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るため、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 $3 \times 10^4$ 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に15 mlチューブ(チューブ1)へ移し、室温で200 xg、2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 Culture 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.で計算した必要細胞数 (cells)  $\div 3 \times 10^4$  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、 $6 \times 10^5$ 個の細胞( $3 \times 10^4$ 個 /  $2 \mu$ l / プローブ  $\times 20$  プローブ)が必要となり、総液量が40  $\mu$ lとなります。本操作ではその半量の20  $\mu$ lを加えます。

※3：ピペティングは行わないで下さい。

6. 5.で加えた容量と同量の細胞懸濁液を、ピペットマンを用いて1.5 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  $\mu$ lの場合、20  $\mu$ lを1.5 mlチューブ(チューブ2)へ移します。

7. チューブ1に残った細胞懸濁液に適量のMiraCell CM Culture Mediumを加え、5.で加えた細胞培養液量と同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  $\mu$ lの場合、15  $\mu$ lを加えて総量を

---

20  $\mu$ 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 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 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  $\mu$ l スポットする<sup>※6</sup>。

※6：プローブ 1 枚に対し、3  $\times$  10<sup>4</sup> 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 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> インキュベータ内で 3-5 時間培養を行う<sup>※8</sup>。

※8：時間を厳守して下さい。

13. 3-5 時間培養後、MED プローブを 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> インキュベータ内から取り出し、MED プローブ中央の電極の周囲からゆっくりと 1 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 $^{\circ}$ C、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。

#### 4-3. MED プローブ播種 2 日目以降 (Day4-)

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 $^{\circ}$ C、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 4-5 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 10cm 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 10cm 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。