

製品コード Y50025

研究用

Takara

**MiraCell® Cardiomyocytes v2
(from ChiPSC12) Kit**

説明書

v202008

目次

I.	製品説明.....	3
II.	内容.....	4
III.	保存.....	4
IV.	操作上の注意.....	4
V.	操作.....	5
	V-1. 細胞培養スケジュール.....	5
	V-2. 培養容器のフィブロネクチンコーティング.....	5
	V-3. 心筋細胞の解凍と維持培養.....	6
	V-4. 心筋細胞の継代.....	8
VI.	関連製品.....	10
VII.	注意.....	10

I. 製品説明

ヒト初代心筋細胞は、心毒性試験や薬効探索試験に対する有用性が期待されている一方、脂肪細胞や皮膚線維芽細胞等と比較して採取が困難であることに加え、成人の心筋細胞は増殖能を欠損しているため、その安定供給は非常に困難となっています。このような状況の中、ヒト iPS (Induced Pluripotent Stem) 細胞から分化誘導した心筋細胞は、ヒト初代心筋細胞に替わる新たな毒性・創薬研究ツールとして注目を浴びています。

MiraCell Cardiomyocytes v2 (from ChiPSC12) は、ヒト iPS 細胞から誘導した高純度心筋細胞であり、心筋細胞の生理機能の解析や、MEA (Micro-electrode array) システム等を用いた種々の薬剤による心毒性試験に使用することが出来ます。

MEA (Multi-electrode array) システム等を用いた種々の薬剤による心毒性試験などでは、測定時の拍動数の変動が少ないことに加えて、Fridericia の補正式による FPD (Field potential duration) の補正が必要であるために一定数以上の拍動数が必要とされています。本製品は、従来製品 (MiraCell Cardiomyocytes (from ChiPSC12)) の基本性状 (心筋純度、生存率、プレーティング効率、E-4031 応答性、等) はそのままに、拍動数を増加させた製品となります。また、MiraCell CM Culture medium v2 (製品コード Y50023) とあわせて使用することで、心毒性試験時の拍動数の変動を最小限に抑えることが可能となります。

本製品は、京都大学 iPS 細胞研究所の山下潤教授によって研究開発されたヒト心筋細胞の作製技術を、タカラバイオが iHeart Japan 株式会社から 2014 年 6 月に導入し、以降、共同で開発を行った製品です。本心筋細胞作製技術では、心筋特異的プロモーター (α -MHC 等) を用いた薬剤 (ピューロマイシン等) による純化を一切行うことなく、高純度の心筋細胞を調製するため、長期間の培養に伴って通常生じる純度の低下が起きにくく、90 日間の培養期間経過後においても純度の低下が認められないことが報告されています (論文投稿中)。

なお、本製品の製造には、Cellartis® DEF-CS™ 500 Culture System (製品コード Y30010) を用いてフィーダーフリーで培養された Cellartis human iPS cell line 12 (ChiPSC12) Kit (製品コード Y00285) * を使用しています。

* : iPS 細胞株 ChiPSC12 の詳細は下記ウェブページをご参照ください。

https://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100009146

本製品の特長

- ・心筋細胞の純度 95%以上 (cTnT 陽性率)
- ・薬剤選択による純化工程無し
- ・自律拍動能を保持
- ・各種イオンチャネル遺伝子を発現 (SCN5A、KCNQ1、CACNA1C、KCNH2 等)
- ・各種イオンチャネル阻害剤 (E-4031、Chromanol 293B、Verapamil、Mexiletine) に対する電気生理学的応答性
- ・従来製品 (MiraCell Cardiomyocytes (from ChiPSC12)) の基本性状はそのままに、解析時の拍動数が増加 / 安定化

II. 内容

MiraCell Cardiomyocytes v2 (from ChiPSC12)	凍結バイアル 1 本	$> 3 \times 10^6$ cells
MiraCell CM Thawing Medium	凍結培地 1 ボトル	20 ml
MiraCell CM Culture Medium v2	凍結培地 1 ボトル	100 ml

本製品以外に必要な試薬、器具 (主なもの)

- 37°C、5% CO₂ インキュベーター
- 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、およびプラスチックピペット
- ピペットマン、および (フィルター付き) 滅菌チップ
- 50 ml 遠心管
- 15 ml 遠心管
- ダルベッコ PBS Ca & Mg 含有 (D-PBS (+/+))
Dulbecco's PBS (製品コード C-40230)
- ダルベッコ PBS Ca & Mg 不含 (D-PBS (-/-))
Dulbecco's PBS, w/o Ca⁺⁺/Mg⁺⁺ (製品コード C-40232)
- 0.25%トリプシン-EDTA 溶液
- 細胞培養容器 (6 well tissue culture plate 等)
- 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

III. 保存

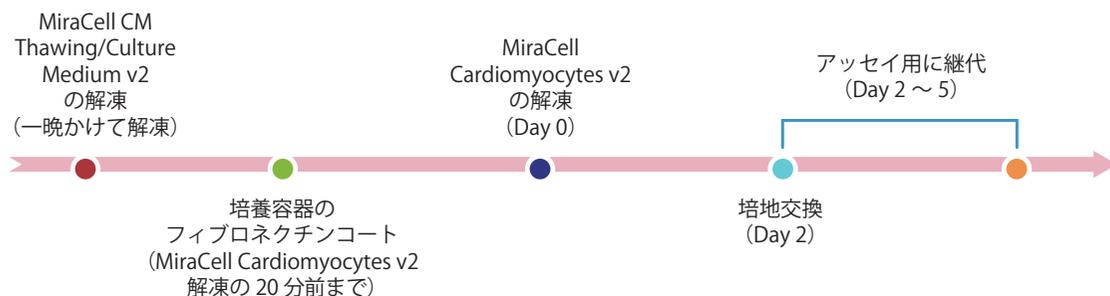
- 凍結心筋細胞 MiraCell Cardiomyocytes v2 (from ChiPSC12) は、到着後、直ちに液体窒素タンクにて保存してください。
- MiraCell CM Thawing Medium は、使用するまで-20°C以下で凍結保存してください。使用前に 4°Cで一晩かけて培地の解凍を行ってください。また、融解後は 4°Cで保存し、1 週間以内に使用してください (再凍結・融解は不可)。
- MiraCell CM Culture Medium v2 は、使用するまで-20°C以下で凍結保存してください。使用前に 4°Cで一晩かけて培地の解凍を行ってください。また、融解後は 4°Cで保存し、1 ヶ月以内を目安に使用してください (再凍結・融解は不可)。

IV. 操作上の注意

1. 心筋細胞は物理的ダメージに弱い細胞です。とりわけ、ピペッティング回数は最小限とし、ピペッティングの際はゆっくりと (1 ml あたり 3 秒以上かけて) 行ってください。
2. 使用する培地は、必ず室温 ~37°Cに戻してからご使用ください。

V. 操作

V-1. 細胞培養スケジュール



V-2. 培養容器のフィブロネクチンコーティング

【凍結バイアル解凍の 20 分前までに実施】

1. D-PBS (+/+) を用いて 1 mg/ml フィブロネクチン溶液を 20 倍希釈し、終濃度 50 μ g/ml のフィブロネクチン溶液を準備する。

D-PBS (+/+)	1.9 ml
1 mg/ml フィブロネクチン溶液	0.1 ml

2. ピペティングにより泡をたてないように混合する。
[注] ボルテックス等による激しい攪拌は、フィブロネクチンの活性に影響しますので避けてください。
3. 培養容器に 50 μ g/ml フィブロネクチン溶液を添加し (0.1 ml/cm²)、表面全体を覆うように溶液を満たす。

培養容器	フィブロネクチン希釈溶液
48 ウェル	0.1 ml
24 ウェル	0.2 ml
12 ウェル	0.4 ml
6 ウェル (35 mm dish)	1.0 ml

[注] 心筋細胞は、少なくとも 6 ウェルプレート 1 ウェル、12 ウェルプレート 3 ウェル、24 ウェルプレート 6 ウェルに播種することが可能です。

4. 37°C で少なくとも 20 分 ~ 1 時間 (あるいは室温で 30 分 ~ 3 時間) 静置する。

V-3. 心筋細胞の解凍と維持培養

- ・ 解凍までにウォーターバスを 37℃に設定しておく。
- ・ 20 ml の MiraCell CM Thawing Medium を 50 ml チューブに分注し、37℃に加温しておく。
- ・ 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。

【Day 0】

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。
[注] 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)。
2. 70%エタノールでバイアルを滅菌消毒後、キムワイプ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。
[注] 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. 37℃に温めた MiraCell CM Thawing Medium を 1 ml 取ってクライオバイアルに添加し、残った細胞を 1 ml のピペットマンで吸引する。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。
[注] 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 分繰り返して行ってください。
5. 1 ml の MiraCell CM Thawing Medium を、1 ml ピペットマンを用いてゆっくりと細胞懸濁液に滴下する。
[注] 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 分繰り返して行ってください。
6. 1 ml ピペットマンを用い、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。
[注] 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. 200 × g、20℃で 3 分間遠心を行う。
[注] 遠心強度は細胞の回収率および生存率に影響を及ぼすため、厳守してください。
9. 上清をアスピレーターで吸引除去する。
[注] 上清吸引の際、上清を完全に除去すると細胞数や生存率が低下する恐れがあるため、0.2 ml 程度上清を残してください。
10. 10~20 回程度タッピングを行い、ペレットをほぐす。
11. 5 ml ピペットで 3 ml の MiraCell CM Thawing Medium を加え、一回ピペッティングを行う。
[注] 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。ピペッティングを複数回行うと細胞数や生存率が低下する恐れがあるため、ピペッティングは 1 回のみ行ってください。

12. 細胞懸濁液 20 μ l を分取し下記の要領でセルカウントを行う。

[注] 多少の細胞塊が生じて問題ありません。

<セルカウント>

- 1) 分取した細胞懸濁液 20 μ l に対し、トリパンブルー溶液を 20 μ 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。
- 2) 4 エリア (図 1 参照) の合計細胞数を測定後、得られた値から下記の計算式にて細胞濃度 (cells/ml) および総生細胞数を算出する。

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

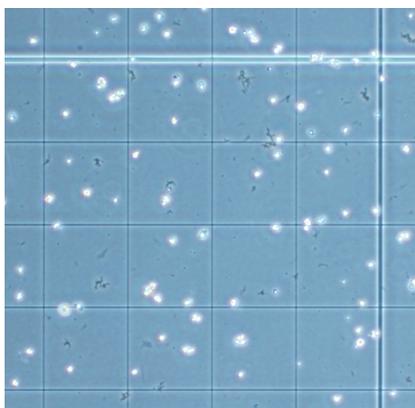


図 1. 解凍後の心筋細胞 (血球計算盤 1 エリア分)

13. 37°C に温めた MiraCell CM Thawing Medium を適量加え、細胞濃度が 8×10^5 cells/ml になるように調整する。
14. V-2.4 で作成したフィブロネクチンコートプレートからフィブロネクチン溶液をアスピレーターで除去後、直ちに 6 ウェルプレート 1 ウェルあたり 2.5 ~ 3.4 ml の細胞懸濁液を添加する (他の培養容器は下記参照)。

培養容器	細胞液量 (8×10^5 cells/ml)	細胞数
48 ウェル	0.25 ~ 0.31 ml	$2.0 \sim 2.5 \times 10^5$
24 ウェル	0.5 ~ 0.63 ml	$4.0 \sim 5.0 \times 10^5$
12 ウェル	1.0 ~ 1.25 ml	$8.0 \sim 10.0 \times 10^5$
6 ウェル (35 mm dish)	2.5 ~ 3.4 ml	$2.0 \sim 2.7 \times 10^6$

15. プレートを上下左右に軽くゆすり細胞を均一にした後、37°C、5% CO₂ インキュベーターにて培養を行う。

[注] 培養容器をインキュベーターに入れた後は、少なくとも 24 時間は培養容器を動かさないでください。細胞の密度むらやプレーティング効率の低下を招くことがあります。なお、解凍翌日には心筋細胞の拍動が観察されます。

【 Day 2 】

16. 解凍から 2 日後、培養容器から培地を吸引除去する。
17. 培地をアスピレーターで吸引除去し、予め 37℃ に加温した MiraCell CM Culture Medium v2 を加える。

培養容器	培地添加量
48 ウェル	0.3 ml
24 ウェル	0.6 ml
12 ウェル	1.2 ml
6 ウェル(35 mm dish)	3.0 ml

18. さらに 2 日間、37℃、5% CO₂ インキュベーターにて培養を継続する。
その後は、1 日おきに古い培地をアスピレーターで全量吸引除去し、予め 37℃ に温めた MiraCell CM Culture Medium v2 を上表の液量を添加することで培地交換を行う。

[注] 培地交換直後、一時的に拍動が停止することがありますが問題ありません。

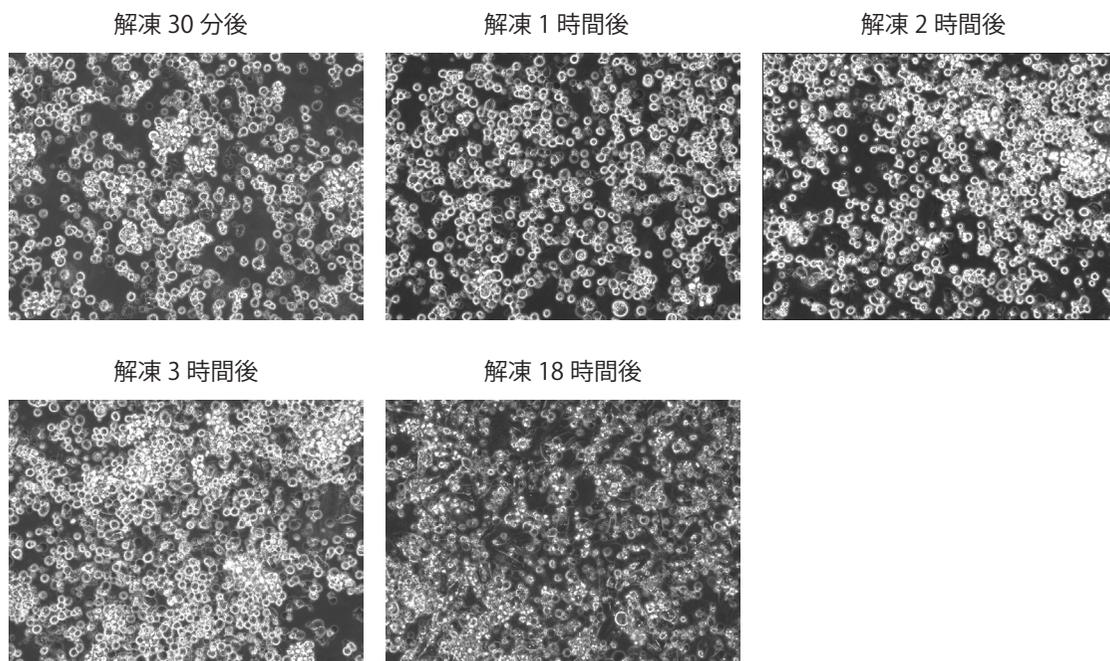


図 2. 心筋細胞の細胞形態

V-4. 心筋細胞の継代

解凍から 2～5 日経過後、各種アッセイ用の培養容器へと継代することが可能となる。ここでは 6 ウェルプレート为例に、様々なアプリケーション用にアッセイ用培養容器へと継代する方法について記載する。

- 必要な試薬 (D-PBS (-/-)、MiraCell CM Culture Medium v2、0.25% トリプシン -EDTA 溶液) は予め室温に戻しておく。

【Day 2～5】

1. アスピレーターでウェル内の培地を吸引する。
2. 室温に戻した D-PBS (-/-) を 2 ml ウェルに加える。
3. D-PBS (-/-) をアスピレーターで吸引後、再度 D-PBS (-/-) を 2 ml ウェルに加える。
4. D-PBS (-/-) を吸引除去し、室温に戻した 0.25% トリプシン -EDTA 溶液を 1 ml 添加し、37°C で 4 分インキュベートする。
[注] 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、時間を厳守してください。
5. プレートを横から強くたたき、心筋細胞を可能な限り剥離させる。
[注] 剥離しない場合は、さらに 1 分間 37°C でインキュベートを行った後、再度プレートを叩いてください。
6. 1 ml の MiraCell CM Culture Medium v2 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。
[注] 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 あたり 3 秒以上かけてゆっくりと行ってください。
7. 1 ml の MiraCell CM Culture Medium v2 を細胞回収後のウェルに添加後、ウェル上端と下端をゆっくりと 1 ml ピペットマンで各 2 回ピペッティングし、残った細胞を剥離させる。
8. ウェル内の溶液を、6. の 50 ml チューブへ移す。
9. 5 ml ピペットを用いてゆっくりと細胞懸濁液を 1 回ピペッティングした後、20 μ l を分取して細胞数をカウントする。

<セルカウント>

- 1) トリパンブルー溶液を 20 μ l 添加し、血球計算盤を用いて生細胞をカウントする。
- 2) 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) および総生細胞数を算出する。

$$\begin{aligned} \text{総カウント数} \times 10^4 \text{ cells} \div 4 \times 2 &= \text{細胞濃度 (cells/ml)} \\ \text{細胞濃度} \times 5 \text{ ml} &= \text{総生細胞数 (cells)} \end{aligned}$$

10. 細胞懸濁液を室温で 200 $\times g$ 、2 分間遠心する。
[注] 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 や時間は厳守してください。
11. 遠心後、上清を 100 μ l 程度残してアスピレーターで吸引除去する。
12. 10 回前後、軽くタッピングを行い、細胞ペレットをほぐす。
[注] ピペッティングは行わないでください。
13. 必要な細胞濃度となるよう MiraCell CM Culture Medium v2 を適量加え、10 ml ピペットで一回ゆっくりとピペッティングを行う。
14. 必要量の細胞懸濁液を各種アッセイ用培養容器に継代する。

※ MEA (Multi-electrode array) システムを用いた心筋細胞の電気生理学的解析例等は、弊社ウェブサイトにて紹介しています。

<https://www.takara-bio.co.jp>

VI. 関連製品

MiraCell® CM Culture Medium v2 (製品コード Y50023)
MiraCell® Cardiomyocytes (from ChiPSC12) kit (製品コード Y50015)
Dulbecco's PBS (製品コード C-40230)
Dulbecco's PBS, w/o Ca⁺⁺/Mg⁺⁺ (製品コード C-40232)
MiraCell® Endothelial Cells (from ChiPSC12) Kit (製品コード Y50055)

VII. 注意

- 本製品は研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- Cellartis は Takara Bio Europe AB の、MiraCell は iHeart Japan 株式会社の登録商標です。DEF-CS は Takara Bio Europe AB の商標です。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。
- 本製品の使用によって生じたいかなる事故、損害についても、弊社では責任を負いかねますので、ご了承の上で使用ください。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社