

製品コード Y50035

研究用

Takara

**Cellartis® Intestinal Epithelial
Cells (from ChiPSC18) Kit**

説明書

v201908

目次

I.	製品説明.....	3
II.	内容.....	4
III.	保存.....	4
IV.	操作上の注意.....	5
V.	使用法.....	6
	V-1. 事前準備.....	6
	V-2. 培養容器のコーティング.....	6
	V-3. 細胞解凍.....	7
	V-4. 培養 1 日目 培地交換.....	8
	V-5. 培地交換.....	9
VI.	関連製品.....	10
VII.	注意.....	10

I. 製品説明

Cellartis Intestinal Epithelial Cells (from ChiPSC18) は、ヒト iPS 細胞由来の小腸型腸管上皮細胞です。本細胞は、微絨毛構成タンパク質 Villin、腸管上皮の転写因子 CDX2 等の各種腸管上皮マーカーの遺伝子発現やタイトジャンクション形成能等の腸管上皮細胞様の特長を有しています。また、従来の薬剤透過吸収試験で使用されているヒト結腸癌由来細胞株 Caco-2 細胞と比較し、代謝酵素 CYP3A4 やトランスポーター PEPT1 等を高発現しています。したがって、Cellartis Intestinal Epithelial Cells (from ChiPSC18) を用いた薬剤透過吸収試験では、Caco-2 細胞を用いた従来法と比較し、より生体に近い代謝吸収や薬物相互作用の評価が可能です。

Cellartis Intestinal Epithelial Cells (from ChiPSC18) Kitには、Cellartis Intestinal Epithelial Cells (from ChiPSC18) の凍結バイアルと、本細胞の成熟化に必要な基礎培地およびサプリメントからなる Cellartis IEC Maturation Kit が含まれており、解凍した Cellartis Intestinal Epithelial Cells (from ChiPSC18) は、Cellartis IEC Maturation Kit を用いた 5 日間の予備培養後に各種試験に使用します。

*：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下で培養されたヒト iPS 細胞株 ChiPSC18 (製品コード Y00305) を使用しています。

<その他、本製品の特長>

短期間でのタイトジャンクション形成

解凍から 5 日間の培養で細胞間のタイトジャンクションが形成されるため、通常 20 日間の培養期間が必要な Caco-2 細胞に対し、試験期間の短縮や作業効率の向上が可能。

安定した品質

無限増殖が可能なヒト iPS 細胞より再現性の高い分化誘導法を用いて作製できるため、ロット間で遺伝的背景の違いや品質のバラつきが大きい初代のヒト腸管上皮細胞と比較し、安定した試験結果が期待できる。

※ 本製品は、大阪大学大学院薬学研究科教授、国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 招へいプロジェクトリーダー 水口裕之博士、同大学助教 高山和雄博士によって研究開発されたヒト iPS 細胞由来小腸型腸管上皮細胞の分化誘導法をタカラバイオが技術移管を受け、共同で開発した製品です。

II. 内容

Cellartis Intestinal Epithelial Cells (from ChiPSC18)	凍結細胞 1 本	> 4.8×10 ⁶ cells
Cellartis IEC Maturation Kit		
Cellartis IEC Maturation Basal Medium	凍結培地 1 ボトル	100 ml
Cellartis IEC Supplement A	凍結添加剤 1 本	100 μl
Cellartis IEC Supplement B	凍結添加剤 1 本	100 μl
Cellartis IEC Supplement C	凍結添加剤 1 本	50 μl
Cellartis IEC Supplement D	凍結添加剤 1 本	40 μl

必要な試薬、器具 (主なもの)

- 37℃、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
- 遠心機
- 顕微鏡
- ウォーターバス
- 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
- 遠沈管
- 細胞培養容器
 - Tissue Culture Plates
 - Cell Culture Inserts and Companion Plates ※ 気液界面培養を行う場合
 - <推奨> Falcon Cell Culture Inserts and Companion Plates (Corning)
 - 6-well の場合 (Insert : Code. 353090、Plate : Code. 353502)
 - 12-well の場合 (Insert : Code. 353180、Plate : Code. 353503)
- PBS
- コート剤
 - Corning Matrigel Growth Factor Reduced (GFR) Basement Membrane Matrix, *LDEV-Free, 10 ml (Corning, Code. 354230)
- DMEM (コート剤希釈用)
- トリパンブルー溶液
- 血球計算盤
- 消毒用エタノール

III. 保存

- Cellartis Intestinal Epithelial Cells (from ChiPSC18) は、ただちに液体窒素で保管してください。
- Cellartis IEC Maturation Kit (Basal Medium、Supplement A ~ D) は、使用直前まで -20℃ 以下で保存し、解凍後は 4℃ で保存してください。解凍後は 2 週間以内に使用してください。
- IEC Maturation Basal Medium は 4℃、オーバーナイトで解凍してください (推奨)。室温や常温水で解凍する場合は長時間放置しないようにご注意ください。解凍後はよく混合して使用してください。
- IEC Supplement B と IEC Supplement D は DMSO が含まれるため、4℃ 保管でも凝固する場合があります。室温下 5 ~ 10 分程で融解します。加温による融解は行わないでください。また、長時間室温下に出したままにしないようにご注意ください。

IV. 操作上の注意

1. 高温多湿、紫外線や直射日光は避けてください。
2. 長時間室温下で放置しないでください。性能劣化の原因となります。
3. 用時調製培地です。一括調製は行わないでください。
4. 必要量の培地を分注して室温～37℃で加温してからご使用ください。サプリメントは培地を温めた後に添加してください。
5. 調製した誘導培地の凍結保存及び培地のサプリメントの再凍結（凍結融解）は推奨しません。
6. 抗生物質含有培地です。抗生物質を添加する必要はありません。
7. 本製品には別途コート剤が必要です。
8. 本説明書「V. 使用方法」に従い解凍し播種した Cellartis Intestinal Epithelial Cells (from ChiPSC18) の接着効率はおおよそ 20～30% です。そのため、「V-4. 培養 1 日目 培地交換」の際に、多数の非接着細胞が浮遊していますが、ウェル底面に隙間なく細胞が接着していれば問題はありません。また、「V-3. 細胞解凍、表 2. 細胞播種数」に記載の凍結細胞 1 vial あたりから種々のプレートに播種できるウェル数にも影響はありません。

V. 使用法

培地の調製、培養操作は安全キャビネットまたはクリーンベンチを用いて無菌操作で実施してください。

V-1. 事前準備

- ・コート剤は1回の使用量が少ないので、分注し凍結保管することを推奨します。Matrigelを4℃オーバーナイトで解凍し、必要量(100～200 μl以上)に分注し再凍結する。凍結融解は繰り返し行わないこと。

[注] 加温するとゲル化するので、操作は氷で冷やしながら行う。チップ類も4℃冷蔵庫で冷やしておく。

- ・コート剤の使用分を前日または1～2時間前に4℃に準備しておき冷温で解凍する。
- ・使用前日にIEC Maturation Basal Mediumを4℃オーバーナイトで解凍しておく。解凍後はよく混合して使用してください。

V-2. 培養容器のコーティング

1. 分注したMatrigelを4℃で解凍する。

[注] 加温するとゲル化するので、操作は氷で冷やしながら行う。チップ類も4℃冷蔵庫で冷やしておく、または使用直前に冷えた培地になじませて冷温に保つ。

2. 必要量のコーティング液を調製する。冷温のDMEMでMatrigelを50倍に希釈する。良く混合して、コート液を添加し培養容器の底面を覆うように広げる。(表1参照)

<例> 4 ml 調製する場合、3.92 ml の冷温 DMEM に 80 μl の Matrigel を添加する。
細胞1バイアルに対して必要量は3 ml である。

表1. コート剤添加量

Cell Culture Inserts and Companion Plates の場合

	6-well plate	12-well plate
Growth Area/well	4.2 cm ²	0.9 cm ²
コーティング液 /well	1 ml	0.25 ml

Tissue Culture Plates の場合

	12-well plate	24-well plate	48-well plate	96-well plate
Growth Area/well	3.8 cm ²	1.9 cm ²	1.0 cm ²	0.35 cm ²
コーティング液 /well	1 ml	0.5 ml	0.25 ml	0.1 ml

3. 37℃で60分以上インキュベートする。

V-3. 細胞解凍

- Cellartis Intestinal Epithelial Cells (from ChiPSC18) は解凍後すみやかに播種しないと接着効率が下がります。細胞を解凍したら 30 ～ 40 分以内に播種できるよう事前準備を十分に行ってから作業を開始してください。
- Cellartis Intestinal Epithelial Cells (from ChiPSC18) を扱う際の操作 (ピペッティング、タッピング等) は穏やかに行ってください。
- 本使用方法に従い解凍し播種した Cellartis Intestinal Epithelial Cells (from ChiPSC18) の接着効率はおおよそ 20 ～ 30% です。そのため、「V-4. 培養 1 日目 培地交換」の際に、多数の非接着細胞が浮遊していますが、ウェル底面に隙間なく細胞が接着していれば問題ありません。
 1. ウォーターバスを 37℃ に設定する。
 2. 細胞解凍用に IEC Maturation Basal Medium を 9 ml 分注する。室温～37℃で加温する。サプリメントは添加不要。
 3. 誘導培地調製用に IEC Maturation Basal Medium を 4 ml 分注する。室温～37℃で加温する。

[注] 長時間の加温は避けてください。培地劣化の原因となります。
 4. 温めた 3 の培地に IEC Supplement A と IEC Supplement B を各 4 μ l (1/1000 量)、IEC Supplement C を 16 μ l (1/250 量) 加えよく混合する。

[注] 培地を温めた後にサプリメントを添加すること。
 5. 37℃ のウォーターバスで凍結細胞を解凍する。小さな氷塊が残る程度まで融解する。(6 の作業中に溶けてなくなる程度)

[注] 37℃ で 90 ～ 120 秒が目安となります。凍結保護剤に懸濁された状態で加温しすぎないように注意してください。
 6. キムワイブ等で水気を拭い、さらに消毒用エタノールで清拭する。
 7. バイアルの蓋を開け、準備していた 2 の培地に細胞を移す。ピペッティングは行わず、穏やかに培地に添加してください。
 8. 上清の培地 1 ml でバイアルを共洗いして回収する。
 9. 200 × g、5 分間、室温で遠心する。
 10. 上清は 0.2 ml 程残して除去する。軽くタッピングしてペレットをほぐす。
 11. 4 の誘導培地を 2.5 ml 添加する。穏やかに 3 ～ 4 回ピペッティングして培養液量を量る。
 12. 懸濁した後、すみやかに細胞カウント用に 20 μ l サンプルングを行う。トリパンブルー溶液を用いて、希釈率 8 ～ 10 倍で細胞カウントを行う。細胞数と生存率を算出する。
 13. 培地を追加し細胞密度を 1.6×10^6 cells/ml に調製する。
 14. 培養容器のコーティング時間が 60 分以上経過していることを確認し、コート剤を除去する。13 で調製した細胞懸濁液を穏やかに 3 ～ 4 回懸濁し、培養容器に細胞を播種する。(表 2 参照)

[注] Cell Culture Insert and Companion Plate を使用の場合は、インサートは傾かないようにプレートの溝と合わせる。
 15. 5%CO₂、37℃インキュベーターで培養を開始する。翌日の培地交換まで静置してください。

表 2. 細胞播種数

Cell Culture Inserts and Companion Plates の場合

	6-well plate	12-well plate
Growth Area/well	4.2 cm ²	0.9 cm ²
培地量 /well	1 ml	0.25 ml
播種数 /well	1.6 × 10 ⁶	4 × 10 ⁵
1vial あたり	3 wells	12 wells

Tissue Culture Plates の場合

	12-well plate	24-well plate	48-well plate	96-well plate
Growth Area/well	3.8 cm ²	1.9 cm ²	1.0 cm ²	0.35 cm ²
培地量 /well	1 ml	0.5 ml	0.25 ml	0.1 ml
播種数 /well	1.6 × 10 ⁶	8 × 10 ⁵	4 × 10 ⁵	1.6 × 10 ⁵
1vial あたり	3 wells	6 wells	12 wells	30 wells

V-4. 培養 1 日目 培地交換

- ・ 播種翌日に培地交換を行う。15 時間以上、24 時間以内に行うことが望ましい。
- ・ 解凍翌日には多数の非接着細胞が浮遊していますが、ウェル底面に隙間なく細胞が接着していれば問題ありません。

1. IEC Maturation Basal Medium 4 ml を分注して、室温～37℃に加温する。
2. 誘導培地を調製する。IEC Supplement A と IEC Supplement B は各 4 μl (1/1000 量)、IEC Supplement D は 2 μl (1/2000 量) 加えよく混合する。
3. 解凍翌日は非接着細胞が多数浮遊しているため、培地交換の際に浮遊細胞をなるべく除去してください。プレートを軽くゆすって浮遊細胞を拡散させてから培養上清をアスピレーター等で除去する。すみやかに新しい誘導培地を添加する。(表 2 参照)。

[注] Cell Culture Insert and Companion Plate を使用の場合は、吸引の際、細胞とインサートの膜を傷つけないよう十分ご注意ください。

4. 5% CO₂、37℃インキュベーターで培養を開始する。

V-5. 培地交換

1 日おきに培地交換を行う。(表 3 参照)

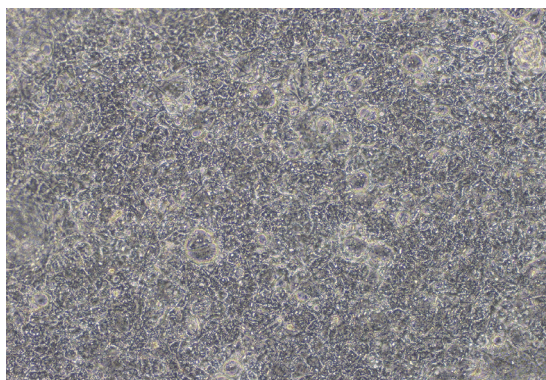
1. IEC Maturation Basal Medium 4 ml を分注して、室温～37℃に加温する。
2. 誘導培地を調製する。IEC Supplement A と IEC Supplement B を各 4 μ l (1/1000 量) 加えよく混合する。
3. 培養上清をアスピレータ等で除去し、速やかに新しい誘導培地を添加する (表 2 参照)。
[注] Cell Culture Insert and Companion Plate を使用の場合は、吸引の際、細胞とインサートの膜を傷つけないよう十分ご注意ください。
4. 5% CO₂、37℃インキュベーターで培養を開始する。次の培地交換まで静置してください。

[注] 試験は培養 5 日目から 8 日目で実施してください。維持培養は培養 8 日目以降も可能ですが試験期間として推奨はできません。

表 3. 誘導培養工程

誘導培養工程		
Day 0	解凍播種 IEC Supplement A + B + C	
Day 1	培地交換 IEC Supplement A + B + D	
Day 2		
Day 3	培地交換 IEC Supplement A + B	
Day 4		
Day 5	培地交換 IEC Supplement A + B	
Day 6	試験可能期間	
Day 7		培地交換 IEC Supplement A + B
Day 8		

写真培養 8 日目



VI. 関連製品

Cellartis® human iPS cell line 18 (ChiPSC18) Kit (製品コード Y00305)
Cellartis® Definitive Endoderm Cells (from ChiPSC18) (製品コード Y10040)
Cellartis® Enhanced hiPS-HEP v2 (from ChiPSC12) Kit (製品コード Y10133)
Cellartis® Enhanced hiPS-HEP v2 (from ChiPSC18) Kit (製品コード Y10134)
Cellartis® Enhanced hiPS-HEP v2 (from ChiPSC22) Kit (製品コード Y10135)
Cellartis® hiPS Beta Cells (from ChiPSC12) Kit (製品コード Y10100)
Cellartis® hiPS Beta Cells (from ChiPSC22) Kit (製品コード Y10106)
MiraCell® Cardiomyocytes v2 (from ChiPSC12) Kit (製品コード Y50025)
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。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 <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社