




日本語版

# **iCell® Astrocytes Prototype User's Guide**



## Trademarks

iCell is a registered trademark, and Cellular Dynamics and the  logo are trademarks of Cellular Dynamics International, Inc. and may not be used without the express written permission of Cellular Dynamics International, Inc. (CDI).

All other brands, product names, company names, trademarks, and service marks are the properties of their respective owners.

## Restrictions and Liabilities

This document is provided “as is.” CDI assumes no responsibility for any typographical, technical, or other inaccuracies in this document. CDI reserves the right to periodically change information that is contained in this document; however, CDI makes no commitment to provide any such changes, updates, enhancements, or other additions to this document to you in a timely manner or at all.

THE iCELL ASTROCYTES ARE PROVIDED “AS IS” TO YOU. TO THE FULLEST EXTENT PERMITTED BY APPLICABLE LAW, CDI MAKES NO, AND DISCLAIMS ALL, REPRESENTATIONS, WARRANTIES, CONDITIONS OR COVENANTS, EXPRESS OR IMPLIED, WITH RESPECT TO ANY PRODUCT REFERENCED HEREIN OR PERFORMANCE OF ANY SERVICES REFERENCED HEREIN, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO, ANY EXPRESS OR IMPLIED WARRANTIES OR CONDITIONS OF FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, NON-INFRINGEMENT, MERCHANTABILITY, DURABILITY, TITLE, OR RELATED TO THE PERFORMANCE OR NON-PERFORMANCE OF ANY PRODUCT REFERENCED HEREIN OR PERFORMANCE OF ANY SERVICES REFERENCED HEREIN).

This document might contain references to third-party sources of information, hardware or software, products or services and/or third-party websites (collectively the “Third-Party Information”). CDI does not control, and is not responsible for, any Third-Party Information, including, without limitation the content, accuracy, copyright compliance, compatibility, performance, trustworthiness, legality, decency, links, or any other aspect of Third-Party Information. The inclusion of Third-Party Information in this document does not imply endorsement by CDI of the Third-Party Information or the third party in any way.

CDI does not in any way guarantee or represent that you will obtain satisfactory results from using iCell Astrocytes as described herein. You assume all risk in connection with your use of iCell Astrocytes.

## Conditions of Use

iCell Astrocytes are for life science research use only and subject to the use restrictions as contained in Appendix A. You are responsible for understanding and performing the protocols described within. CDI does not guarantee any results you may achieve. These protocols are provided as CDI's recommendations based on its use and experience with iCell Astrocytes.

## Origin

iCell Astrocytes are manufactured in the United States of America.

## Copyright Notice

© 2014 Cellular Dynamics International, Inc. All rights reserved. This document may not be reproduced, distributed, modified or publicly displayed without the express written permission of Cellular Dynamics International, Inc.

## Revision History

Version 0.3: October 2014—日本語版version1.0

Version 0.2: August 2014

Version 0.1: March 2013

## 目次

<b>使用を始める前に</b> .....	4
<b>第1章 はじめに</b> .....	1
Cellular Dynamicsが供給するコンポーネント .....	2
必要な機器および消耗品 .....	2
テクニカルサポートとトレーニング .....	3
作業の概略図 .....	4
<b>第3章 プレートのコーティング</b> .....	6
<b>第4章 培地の調製</b> .....	7
<b>第5章 iCellアストロサイトの解凍</b> .....	8
<b>第6章 iCellアストロサイトの播種</b> .....	10
<b>第7章 iCellアストロサイトの維持</b> .....	11
<b>Appendices</b> .....	12
Appendix A. Intellectual Property Rights, Use Restrictions, and Limited License .....	12
Appendix B. Product Provided “AS IS” .....	12
Appendix C. Limited Liability .....	13

## 使用を始める前に

- 凍結バイアルをお受け取りになりましたら、速やかに液体窒素保存容器(気相)に移して保管して下さい。
- iCell Astrocytes (iCellアストロサイト)を取り扱う前に本ユーザーガイドを全てお読みください。
- iCellアストロサイトは研究用試薬です。使用条件の詳細につきましては、Appendix A をご覧ください。
- iCellアストロサイトの凍結保存に使用されているジメチルスルホキシド (DMSO)の製品安全データシート(SDS) は、ウェブサイト [www.cellulardynamics.com/lit/](http://www.cellulardynamics.com/lit/) に掲載されています。

*DMSO及びヒト生物試料の取り扱い経験のある技術者のみが、iCellアストロサイトを取り扱うようにしてください。*

## 第1章 はじめに

Cellular Dynamics International (CDI) のiCellアストロサイトは、CDI独自の分化・純化プロトコルに従って人工多能性幹 (iPS) 細胞から作製した、高純度なポピュレーションのヒトアストロサイトです。生理的な特性と反応性を示すことから、本製品は分子標的薬の研究や毒性試験、その他のライフサイエンス分野での研究に適した、信頼性の高いヒトアストロサイトを提供いたします。

## Cellular Dynamicsが供給するコンポーネント

注記

品目	カタログ番号
iCell Astrocytes Prototype <sup>1</sup>	ASC-100-020-001-PT
iCell Astrocytes Prototype User's Guide <sup>1</sup>	
Certificate of Testing <sup>2</sup>	
Certificate of Origin	
出荷のために必要な場合に限って添付されます。	

1 安全性データシートおよびユーザーズガイドはオンラインでもご入手頂けます: [www.cellulardynamics.com/lit/](http://www.cellulardynamics.com/lit/)

2 Eメールまたはお電話でのお問い合わせはこちら: [tech@cdi-j.com](mailto:tech@cdi-j.com)または03-6271-1105

## 必要な機器および消耗品

品目	指定供給元	カタログ番号
<b>機器</b>		
37°Cウォーターバス	-	
UVランプ付き安全キャビネット	-	
細胞培養インキュベーター	-	
血球計数器あるいは自動セルカウンター	-	
液体窒素細胞保存容器	-	
ピペッター	-	
卓上遠心分離機	-	
<b>消耗品</b>		
15 mLおよび50 mL遠心チューブ	-	
6ウェル細胞培養プレート	Nunc	140675
アストロサイト培地*	-	
DMEM	ライフテクノロジーズ	10569
マトリゲル基底膜マトリックス グロースファクターリデュースト(マトリゲル)	Corning	354230
ピペット	-	

\*推奨されるアストロサイト培地: DMEM、High Glucose、GlutaMAX、Pyruvate(ライフテクノロジーズ、カタログ番号10569)、1X N-2 Supplement(ライフテクノロジーズ、カタログ番号17502048)および10% FBS(Hyclone、カタログ番号SH30396.03)または市販されている同等のアストロサイト用培地

## テクニカルサポートとトレーニング

<米国>

**Telephone** (877) 320-6688 (US toll-free) / (608) 310-5100 x5  
Monday - Friday, 8:30 am - 5:00 pm US Central Time

**Fax** (608) 310-5101

**Email** support@cellulardynamics.com

<日本>

### テクニカルサポート

**電話** 03-6271-1105

**Email** [tech@cdi-j.com](mailto:tech@cdi-j.com)

### コラボレーションラボラトリー

専門のスタッフによる標準的な使用方法・アプリケーションプロトコールなどのハンズオントレーニングを行っています。

**電話** 044-280-3351

## 作業の概略図





## 第2章 取り扱いと保管

iCellアストロサイトは、凍結保存された単一細胞化懸濁液として、1.5 mLのクライオバイアルで提供されます。受け取りの時点ではiCellアストロサイトのバイアルは取り出さず、速やかにクライオボックスごと液体窒素保存容器の気相に移してください。CD11は、バイアルを個々に移すという操作を避けるため、クライオボックスごと液体窒素保存容器のラックに移すことを強く推奨いたします。



凍結保存されたiCellアストロサイトを安定した温度で維持することは極めて重要です。液体窒素保管用容器にバイアルを移送する場合には、凍結保存されたiCellアストロサイトの室温への曝露を最低限に抑えてください。

### 第3章 プレートのコーティング

iCellアストロサイトは、事前にマトリゲルをコートした細胞培養プレート上に接着して機能します。以下に6ウェル細胞培養プレートへのコート方法の詳細を示します。それ以外の細胞培養プレートについては、適宜、容量を調整してください。

1. マトリゲルを、よく冷やしたDMEMに最終濃度が0.083 mg/mLになるように希釈します。
2. 6ウェル細胞培養プレートの場合は、1ウェル当たり1 mLずつを一気に加えます。
3. マトリゲルコートした細胞培養プレートはiCellアストロサイトを播種する前に少なくとも1時間、室温に静置します。

**注記:** マトリゲルでコートしたプレートは4°Cで最長1週間まで保管できます。使用する前に細胞培養インキュベーター内で37°Cに戻してください。

## 第4章 培地の調製

CDIは、次の培地または市販されている同様のアストロサイト培地にiCellアストロサイトを解凍、播種、維持することを推奨しています。

コンポーネン	最終濃度
DMEM, High Glucose, GlutaMAX、	89%
FBS	10%
N-2 Supplement (100X)	1X

表1:アストロサイト培地のコンポーネン

## 第5章 iCellアストロサイトの解凍

細胞の性能を最大限に維持するために、iCellアストロサイトのクライオバイアルは解凍直前まで液体窒素保存容器内に保管しておいてください。iCellアストロサイトの生存率および性能を確保するためには、次の手順の各ステップを効率よく実行してください。

**注記:**1度に解凍するiCellアストロサイトはバイアル3本までとしてください。

1. iCellアストロサイトを解凍する前にアストロサイト培地を2~4時間かけて室温に戻します。

2. 液体窒素保存容器からiCellアストロサイトのクライオバイアルを取り出します。

**注記:**必要な場合には解凍前のクライオバイアルをドライアイスの上に置くことができますが、10分以内としてください。

3. キャップ部分まで沈めないように注意しながらクライオバイアルを37°Cのウォーターバスに3分間静置します(揺らさないようにしてください)。フローティングタイプの遠心チューブラックの使用をお勧めします。

4. 3分間のインキュベーションの後、クライオバイアルをウォーターバスから直ちに取り出して70%エタノールを噴霧し、安全キャビネットに入れます。

5. 1 mLピペッターを用いて、クライオバイアル内のiCellアストロサイト懸濁液を、滅菌済みの50 mL遠心チューブに静かに移します。

**注記:**50 mL遠心チューブを用いることで、適切に混合しやすくなり、浸透圧ショックを最小化し、細胞の生存率を高めることができます。

6. クライオバイアルから細胞を残らず回収するため、空になったiCellアストロサイトのクライオバイアルに室温のアストロサイト培地1 mLを添加して共洗いをを行います。共洗ったアストロサイト培地を1 mLピペッターを用いてクライオバイアルから回収し、iCellアストロサイトの細胞懸濁液を入れた50 mL遠心チューブに滴下して(約1滴/秒)追加します。チューブを穏やかに回しながら培地を添加することで細胞懸濁液を完全に混合し、解凍された細胞への浸透圧ショックを最小限に抑えます。



細胞懸濁液へのアストロサイト培地の一滴ずつの滴下は、浸透圧ショックを最小化し、細胞の生存能力の最大化とコーティングプレートへの細胞の接着を確実にするために極めて重要です。

7. 室温のアストロサイト培地8 mLを50 mL遠心チューブに一滴ずつ滴下します(約1~2滴/秒)。添加は遠心チューブを穏やかに回しながら行います。



8 mLのアストロサイト培地を一滴ずつ添加することは、細胞の生存能力の最大化とコーティングプレートへの細胞の接着性を確実にするために極めて重要です。

## 注記

- 2~3回回転することにより、50 mL遠心チューブの細胞懸濁液を穏やかに混合します。穏やかに混合することは、生存率を確実に最大化するために極めて重要です。細胞懸濁液の激しい振とうやボルテックスは行わないでください。

**注記:** iCellアストロサイトは解凍時に遠心して濃縮が可能です。細胞懸濁液を15 mL遠心チューブに移し、300 x g、5分間遠心します。遠心チューブの上清を1 mL残して吸引し、アストロサイト培地で細胞ペレットを再懸濁します。

**注記:** 1度に解凍するiCellアストロサイトはバイアル3本までとしてください。各クライオバイアルの細胞懸濁液は解凍した時点でまとめ、その後に各バイアルの共洗い液および目的の容量にするためのアストロサイト培地を添加します。タイミングについては、ステップ6および7の記述に従ってください。

## 第6章 iCellアストロサイトの播種

iCellアストロサイトの推奨播種密度は、生細胞で約 $4.0\sim 5.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>です。

1. 細胞サンプルを採取し、血球計数器（生細胞の特定にトリパンプルー染色法を用います）あるいは自動セルカウンターを用いて細胞数の計測を行います。
2. 室温のアストロサイト培地を使って細胞懸濁液を希釈し、目的の細胞播種密度にします。
3. マトリゲルを事前コートしたプレートから吸引し、直ちに細胞懸濁液を添加します。
4. 37°C、5% CO<sub>2</sub>細胞培養インキュベーターで、iCellアストロサイトを培養します。

### 想定される細胞密度

ほとんどのセルベースアッセイを行うためのiCellアストロサイトの推奨密度は、生細胞密度で約 $4.0\sim 5.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>です。しかし、表面積1ユニットあたりに播種するiCellアストロサイトの最適密度はアッセイごとに異なるため、使用目的を踏まえて経験的に判断する必要があります。下表に、数種類の一般的な細胞培養プレートに必要な細胞数および播種量を示します。

培養プレート	表面積(cm <sup>2</sup> )	播種量(mL)	細胞数 (約 $4.0\sim 5.5 \times 10^4$ cells/cm <sup>2</sup> )
6ウェル細胞培養プレート	9.6	3	$38\sim 52 \times 10^4$
24ウェル細胞培養プレート	1.9	0.6	$7.6\sim 10.4 \times 10^4$
96ウェル細胞培養プレート	0.32	0.2	$1.2\sim 1.7 \times 10^4$

**表2: 推奨容量および細胞数の要約**

容量および細胞数はウェル単位のものであります。

## 第7章 iCellアストロサイトの維持

1. 使用直前に、37°Cウォーターバスでアストロサイト培地を温めてください。
2. iCellアストロサイトを播種した24時間後に、注意しながら培養液をピペットで吸引し、適量のアストロサイト培地に置換します(100%培地交換)。推奨容量を次に示します：
  - 6ウェル細胞培養プレート:2 mL/ウェル
  - 24ウェル細胞培養プレート:0.6 mL/ウェル
  - 96ウェル細胞培養プレート:200  $\mu$ L/ウェル
3. 培地を2~3日ごとに交換します。
4. 37°C、5% CO<sub>2</sub>細胞培養インキュベーターで、iCellアストロサイトを培養します。

## Appendices

---

### Appendix A. Intellectual Property Rights, Use Restrictions, and Limited License

A. **OWNERSHIP.** The Products are covered by pending patents and patents: [www.cellulardynamics.com/patents](http://www.cellulardynamics.com/patents). Customer has a limited license to use the Products for internal research purposes for the sole benefit of the Customer, subject to the use restrictions and third party licenses included in subsections B and C of this Appendix A. Customer acknowledges and agrees that the receipt or purchase of the Products by Customer shall not be construed as a transfer of any title or the grant of any rights in or to the intellectual property embodied in the Products owned or licensed by Cellular Dynamics. In particular, no right or license to make, have made, offer to sell, or sell the Products, to modify or reproduce the Product or any part thereof, or to use the Products in combination with any other product(s), except product(s) provided or expressly licensed to Customer by Cellular Dynamics for such use, is implied or conveyed by the sale or transfer of Products to Customer.

B. **USE RESTRICTIONS.** The Products are licensed for internal research purposes only, and may not be used for any other purpose. The Products must be used in accordance with this User's Guide to which Customer, by ordering and accepting the Products, agrees. Customer shall not make, have made, offer to sell, or sell the Products. Customer shall not use the Products (or any modifications Customer makes to the Products or any cells derived, developed or expanded from the Products) in (i) the manufacture of any products, or (ii) any services for a third party. Customer may not transfer the Products (or any modifications Customer makes to the Products or any cells derived, developed or expanded from the Products) to any third party without Cellular Dynamics' prior written consent. Customer shall not reverse engineer the Products. Customer shall not use the Products, components or modifications thereof, or any cells derived, developed or expanded therefrom, in humans, in clinical trials, for diagnostic purposes involving human subjects, or for any investigational or other therapeutic use. Customer shall not use the Products directly or indirectly to derive or make any human gamete or gamete precursor cell. Customer shall use the Products in accordance with all applicable laws and regulations and any applicable institutional review board approved protocol and/or privacy office approval. Customer is not entitled to receive any data or information from Cellular Dynamics that directly identifies the donor of the biological materials from which the Products indirectly are derived or were made. Customer shall not attempt in any way to determine the identity of the donor of the biological materials from which the Products indirectly are derived or was made.

C. **DATA.** Customer agrees that if described on Customer's product quotation from Cellular Dynamics it will provide data and information as described therein to Cellular Dynamics regarding Customer's use of the Products.

---

### Appendix B. Product Provided "AS IS"

A. The Products are sold or provided "AS IS."

B. TO THE FULLEST EXTENT PERMITTED BY APPLICABLE LAW, CELLULAR DYNAMICS DISCLAIMS, ALL REPRESENTATIONS, AND WARRANTIES, EXPRESS OR IMPLIED (INCLUDING BUT NOT LIMITED TO, ANY IMPLIED WARRANTIES OF MERCHANTABILITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE OR NON-INFRINGEMENT), AND ALL LIABILITY, WITH RESPECT TO THE PRODUCTS; AND BY ORDERING AND ACCEPTING THE PRODUCTS CUSTOMER WAIVES ALL RIGHTS AND REMEDIES OTHERWISE AVAILABLE WITH RESPECT TO THE PRODUCTS.

C. Customer will be solely responsible for (i) Customer's use of the Products for a purpose or in a manner other than that for which they were designed or that is permitted or in breach of the Use Restrictions above; (ii) Customer's failure to follow this User's Guide for the use, storage, and handling of the Products however such failure is caused; (iii) Customer's failure to comply with any of the provisions of Appendix A above; and (iv) any abuse, other misuse



or neglect of the Products by Customer or any damage or loss of the Products by events or occurrences beyond a person's (e.g., Cellular Dynamics') control including without limitation, accident, fire, vandalism and natural disasters (acts of God).

D. Customer acknowledges and agrees that Cellular Dynamics may fill Customer's order with any number of units of Products. Such units may be more units than Customer ordered. Customer will not be charged extra for any adjustments made by Cellular Dynamics. Because the number of cells in a unit may vary from lot to lot, Cellular Dynamics reserves the right to fill the order with that number of units which is sufficient to fill Customer's order.

---

## **Appendix C. Limited Liability**

TO THE FULLEST EXTENT PERMITTED UNDER APPLICABLE LAW, CELLULAR DYNAMICS SHALL NOT HAVE ANY LIABILITY FOR INCIDENTAL, COMPENSATORY, PUNITIVE, CONSEQUENTIAL, INDIRECT, SPECIAL OR OTHER SIMILAR DAMAGES, HOWEVER CAUSED AND REGARDLESS OF FORM OF ACTION WHETHER IN CONTRACT, TORT (INCLUDING NEGLIGENCE), STRICT PRODUCT LIABILITY OR OTHERWISE, EVEN IF CELLULAR DYNAMICS HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. NOTWITHSTANDING ANY OTHER TERM OR IMPLICATION TO THE CONTRARY, UNDER NO CIRCUMSTANCES SHALL CELLULAR DYNAMICS' LIABILITY TO CUSTOMER EXCEED THE AMOUNT PAID BY CUSTOMER FOR THE PRODUCTS TO CELLULAR DYNAMICS.

© 2014 Cellular Dynamics International, Inc. All rights reserved.