




日本語版

iCell® Cardiomyocytes²

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 Cardiomyocytes2² 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 anyway.

CDI does not in any way guarantee or represent that you will obtain satisfactory results from using iCell Cardiomyocytes2² as described herein. You assume all risk in connection with your use of iCell Cardiomyocytes2².

Conditions of Use

iCell Cardiomyocytes2² 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 Cardiomyocytes2².

Origin

iCell Cardiomyocytes2² are manufactured in the United States of America.

Copyright Notice

©2015 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: September 2015 — 日本語版 version 1.0

Version 0.2: July 2015

Version 0.1: March 2015

目次

使用を始める前に.....	ii
第1章. はじめに.....	1
Cellular Dynamicsが供給するコンポーネント.....	2
必要な機器及び消耗品	2
技術サポート	3
作業の概略図	4
第2章. 取り扱いおよび保管	5
iCell心筋細胞2.0の取り扱い	5
iCell心筋細胞培地の取り扱い	5
第3章. プレートのコーティング	6
0.1% (w/v) ゼラチン溶液の調製	6
ゼラチンでコーティングされた細胞培養容器の準備	6
第4章. 培地の解凍	7
第5章. iCell心筋細胞2.0の解凍.....	8
第6章. iCell心筋細胞2.0の播種.....	10
第7章. iCell心筋細胞2.0の維持.....	11
Appendices.....	12
Appendix A. 知的所有権, 使用の制限, 及び 制限付きライセンス.....	12
Appendix B. プロトタイプ品に対する保証の不存在	12
Appendix C. 有限責任.....	13

使用を始める前に

- 凍結バイアルは速やかに液体窒素保存容器(気相)に移して下さい。.
- iCell Cardiomyocytes2² (iCell心筋細胞2.0)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心筋細胞2.0は、研究用試薬です。詳細の使用条件につきましては、Appendix A をご覧ください。
- iCell心筋細胞2.0が凍結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/ に掲載されています。
DMSO及びヒト生物資材の取り扱い経験のある技術者のみが、iCell心筋細胞2.0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 Cardiomyocytes² (iCell 心筋細胞 2.0) 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、高純度のヒト心筋細胞です。その細胞組成は自発的な電氣的活動性を有する心房、結節、および心室様心筋細胞で、心筋細胞としての典型的な生化学的特性、電気生理学的特性、および機械的特性を有するとともに、薬剤の添加に対しても予測どおりの反応を示します。従って、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、信頼性の高いヒト心筋細胞を提供いたします。

iCell 心筋細胞 2.0 は、本ユーザーズガイドの記載に従って、iCell Cardiomyocyte Plating Medium (心筋細胞用解凍用培地) を用いて解凍・播種し、iCell Cardiomyocyte Maintenance Medium (心筋細胞用維持用培地) で維持すると、24 時間で自発的に拍動を始めます。適切な密度で播種すれば、電氣的に繋がった合胞体層を形成し、同調して拍動します。また、解凍後 4 日で微小電極アレイやインピーダンス測定などの電気生理学的な評価に使用できます。

iCell 心筋細胞用維持用培地は抗生物質不含であり、心筋細胞を健康的かつ機能的に維持する一方で、わずかに存在する非心筋細胞の増殖を制限するために特別に調製されています。そのため、iCell 心筋細胞 2.0 は維持用培地内で 14 日以上、純度を大きく損なうことなく維持することができ、長期の試験が可能です。CDI による純化工程と、このユーザーズガイドに記載されている手順の遵守が、抗生物質の追加使用を不要としています。

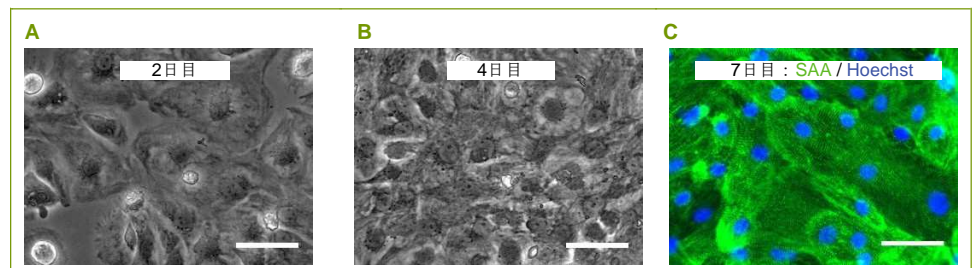


図1: ヒト心筋細胞の高純度集団であるiCell心筋細胞2.0

これらの画像は、播種から2日、4日および7日後のiCell心筋細胞2.0を示します。iCell心筋細胞2.0は、播種から4日後の培養中に合胞体層を形成し、免疫染色により実証されている適切な心臓マーカーである筋節の α アクチニン(SAA、緑)およびHoechst(青)を示します。スケールバー = 50 μ m

Cellular Dynamicsが供給するコンポーネント

品目	カタログ番号
iCell Cardiomyocytes 2	CMC-100-012-000.5 (0.5ユニット) CMC-100-012-001 (1ユニット)
iCell Cardiomyocytes2 Plating Medium	CMM-100-110-001 (1ユニット) CMM-100-110-005 (5ユニット)
iCell Cardiomyocytes2 Maintenance Medium	CMM-100-120-001 (1ユニット) CMM-100-120-005 (5ユニット)
iCell Cardiomyocytes2 User's Guide	
Certificate of Testing	
Certificate of Origin	

出荷のために必要な場合

† 安全性データシートおよびユーザーズガイドのオンラインアドレスはこちら: www.cellulardynamics.com/lit/

#: オンラインでの参照アドレスはこちら: www.cellulardynamics.com/cot/

必要な機器および消耗品

品目	ベンダー	カタログ番号
機器		
37°C ウォーターバス		
UVランプ付き安全キャビネット		
細胞培養用インキュベーター		
血球計数器あるいは自動セルカウンタ		
液体窒素細胞保存容器		
位相差顕微鏡		
ピペッター		
卓上遠心分離機		
消耗品		
50 mL遠心チューブ		
細胞培養容器、滅菌済み、TCグレード		
ゼラチン、タイプA、細胞培養テスト済み		
ピペット		
滅菌済み蒸留水		
トリパンプルー	Gibco	15250

* 自動セルカウンタが使用前に適切にキャリブレーションされていることを確認してください。

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

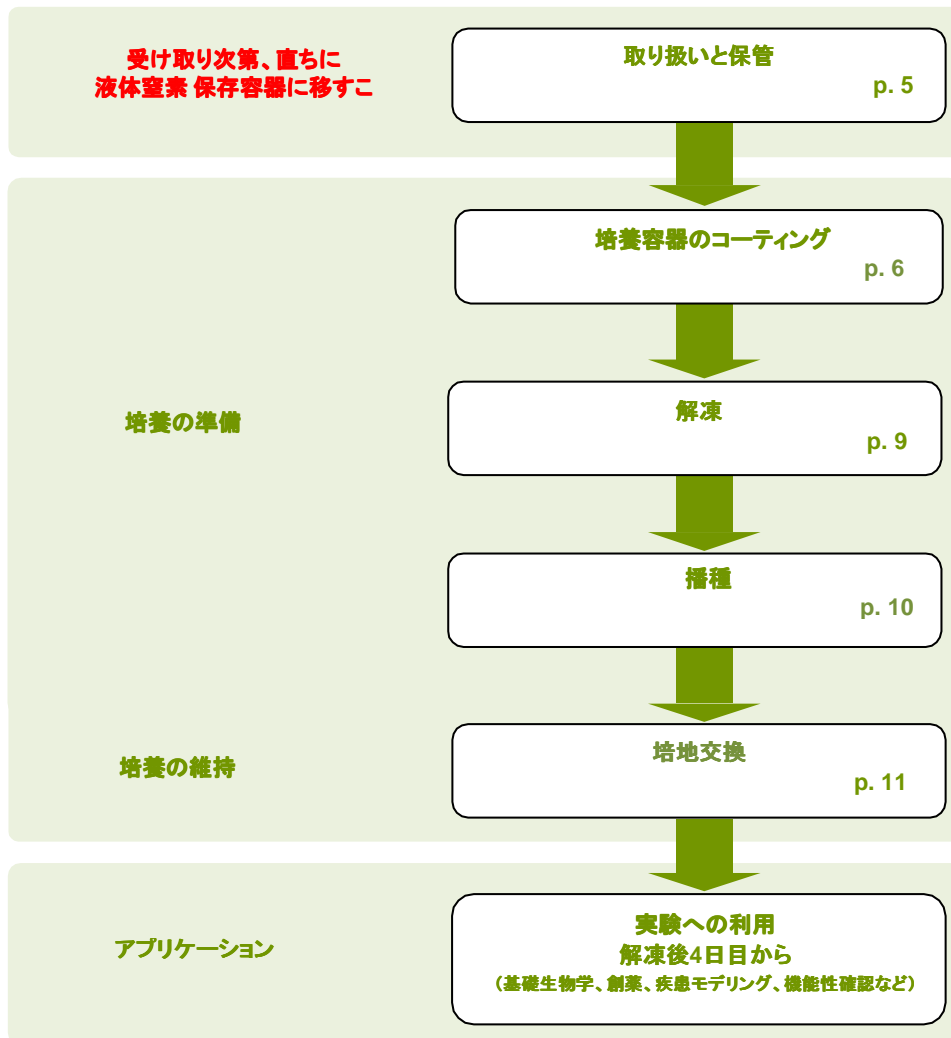
Email tech@cdi-j.com

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

ワークフロー図



第2章. 取り扱いおよび保管

iCell心筋細胞2.0の取り扱い

iCell心筋細胞2.0は、凍結保存された単一細胞懸濁液として、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心筋細胞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。CDI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心筋細胞2.0を安定した温度で維持することは極めて重要です。液体窒素保存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心筋細胞2.0の室温への曝露を最低限に抑えてください。

iCell心筋細胞培地の取り扱い

iCell心筋細胞用解凍用培地およびiCell心筋細胞用維持用培地は凍結状態でドライアイス梱包にて出荷されます。受け取り次第、iCell心筋細胞培地は使用開始までは-20℃で保管してください。解凍後は4℃で最大2週間まで保管できます。培地を2週間以上にわたって使用する場合は、初回解凍後に分注して再凍結してください。培地の再凍結および解凍のサイクルは1回のみとしてください。

第3章.プレートのコーティング

iCell心筋細胞2.0は、用時調製されたゼラチンおよびフィブロネクチンを含む様々な培養基質に接着して機能します。これらの基質はiCell心筋細胞2.0の接着性、生存率、および機能性に対して同様の効果があることが示されています。

CDIはアッセイ特異的なアプリケーションプロトコルおよび注意事項を提供しています。iCell心筋細胞2.0で利用可能なアプリケーションプロトコルおよび注意事項のリストについては、www.cellulardynamics.com/lit/をご覧ください。培養基質の種類にかかわらず、プレートのコーティングはiCell心筋細胞2.0の解凍前に実施しておいてください。

0.1% (w/v) のゼラチン溶液の調製

- 0.1%のゼラチン溶液を調整するためのガラスボトルを準備します。
 - 界面活性剤の入っていた容器や、界面活性剤に接触したボトルは使用しないでください。
 - 新品のガラスボトルは使用前に酸洗浄を行ってください。
 - ボトルの洗浄には、滅菌した超純水(18 MΩ)のみを使用してください。
- 滅菌水500 mLが入ったボトルにゼラチン500 mg(タイプA、粉末、細胞培養テスト済み)を溶かし、0.1%のゼラチン溶液を調製します。
- オートクレーブを用い、液体滅菌用の設定でゼラチン溶液を滅菌します。上述のとおり調製された滅菌済みの0.1%ゼラチン溶液は、室温で3ヵ月間安定です。

注記: あるいは、市販の0.1%のゼラチン水溶液を用いてください (Stem Cell Technologies、カタログ番号:07903)。

ゼラチンでコーティングされた細胞培養容器の準備

- 実験の用途にあった細胞培養容器を選択し、下表で指定された分量の0.1%ゼラチン溶液を添加します。他の容器型式についても適宜計量します。

培養容器	表面積 (cm ²)	0.1%のゼラチン溶液の分量 (mL)
12ウェル細胞培養プレート	3.8	1.2
96ウェル細胞培養プレート	0.32	0.1

表1: 有用な分量および寸法の要約

分量および寸法は**ウェル単位**のもので(該当する場合)

注記: 免疫染色または電気生理学的アプリケーション用のカバーガラスについては、www.cellulardynamics.com/lit/に掲載のiCell心筋細胞2.0アプリケーションプロトコルを参照してください。

- 37°C 細胞培養器内で1時間以上、静置する。
- 細胞懸濁液を添加する直前に、0.1%ゼラチン溶液を吸引します。



ゼラチンコーティングされた表面が乾かないようにしてください。

第4章. 培地の解凍

iCell Cardiomyocytes Plating Medium (iCell 心筋細胞用解凍用培地) および iCell Cardiomyocytes Maintenance Medium (iCell 心筋細胞用維持用培地) はそれぞれ、解凍時点で細胞の生存能力と回復力を最大限にし、培養における iCell 心筋細胞 2.0 を正常に保ち、機能を維持するために特別に調製されたものです。以下のとおりに培地を解凍し保管してください:

1. 培地を使用する24時間前に、4℃で一晩かけて解凍してください。
2. 解凍後は、培地を分注してください。4℃で最長2週間まで保管できます。

注記: 分注した培地は-20℃で保管することができますが、解凍と再凍結を繰り返さないでください。

第5章. iCell心筋細胞2.0の解凍

細胞の性能を最大限に維持するため、iCell心筋細胞2.0は解凍直前まで液体窒素内で保管してください。iCell心筋細胞2.0の生存率および性能を確保する為に、次の解凍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心筋細胞2.0はバイアル3本までとしてください。

1. iCell心筋細胞2.0を解凍する前に解凍用培地を室温に戻します。
2. 液体窒素保存容器からiCell心筋細胞2.0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、60分間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℃のウォータースバスに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。



生細胞の回復を最大限に行うには、時間に正確であることが極めて重要です。

4. クライオバイアルをウォータースバスから直ちに取出し、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ピペットを用いて、iCell心筋細胞2.0クライオバイアルの中身を、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、心筋細胞の生存率を高めることができます。



解凍されたiCell心筋細胞2.0の懸濁液を何度もピペティングしないでください。

6. クライオバイアルから細胞を残らず回収するために、空になったiCell心筋細胞2.0クライオバイアルを室温の解凍用培地1 mLを添加して洗います。細胞を含んだ解凍用培地を1 mLピペットを用いてクライオバイアルから回収し、iCell心筋細胞2.0の懸濁液を入れた50 mL遠心チューブに90秒かけて滴下します(4~5秒ごとに1滴)。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。



細胞懸濁液への解凍用培地の滴下は、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。iCell心筋細胞2.0の取り扱いトレーニングビデオの視聴はこちらから: www.cellulardynamics.com/cm_handling/

7. 室温の解凍用培地8 mL(心筋細胞0.5ユニットサイズ用3.5 mL)を50 mL遠心チューブにゆっくりと添加します。最初の1 mLを30~60秒かけて滴下します。その後、残りの分量を次の約30秒で添加します。解凍用培地の添加は遠心チューブを穏やかに回しながら行います。



解凍用培地をゆっくり添加することは、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。iCell心筋細胞2.0の取り扱いトレーニングビデオの視聴はこちらから：
www.cellulardynamics.com/cm_handling/

8. 2~3回転倒混和することにより、50 mL遠心チューブの中身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。細胞懸濁液を激しく振とうしたり、ボルテックスしたりしないでください。

注記:1度に解凍するiCell心筋細胞2.0はバイアル3本までとしてください。各バイアルの中身は解凍した時点でまとめることができ、その後に各バイアルのすすぎ液および最終分量の解凍用培地を添加します。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。例えば、3本のバイアルをまとめる場合は、各バイアルのすすぎ液(1 mL)を90秒ずつかけて添加してください(合計270秒)。

第6章. iCell心筋細胞2.0の播種

iCell心筋細胞2.0の推奨播種濃度は、156,000 cells/cm²です。アプリケーション特有の播種手順については、オンラインでwww.cellulardynamics.com/lit/にアクセスし、アプリケーションプロトコルを参照してください。

1. Certificate of Testing (検査証明書)から1バイアルあたりの生細胞数および生存率の数値を入手してください。
2. 解凍後のiCell心筋細胞2.0懸濁液を2~3回転倒混和して、細胞数の計測を行う前に細胞懸濁液を確実に均一化してください。
3. 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を用いて細胞数の計測を行います。
4. 検査証明書上の1バイアルあたりの生細胞数の数値を用いて、目標の細胞播種密度(すなわち、 5×10^5 cells/mL)を得るために必要な室温プレート培地の最終分量を算出します。下記の表2の例を参照してください。

注記: 対象のアプリケーションに高細胞密度が必要な場合、iCell心筋細胞2.0スクエアを180 x gで5分間遠心します。目的とする密度に適切な量の解凍培地を取り除き、沈殿したiCell心筋細胞2.0を穏やかに懸濁します。過剰にピペッティングすると、細胞生存率を低下させる場合があることに注意してください。

培養容器	表面積(cm ²)	プレーティング量(mL)	細胞数(1.56 x 10 ⁵ cells/cm ²)
12ウェル細胞培養プレート	3.8	1.2	593×10^3
96ウェル細胞培養プレート	0.32	0.1	50×10^3

表2: 推奨分量および寸法の要約

この表の数値は、合胞体形成のためのガイドです。分量および寸法はすべて別途記載のない限り**ウェル単位**です。

5. あらかじめコーティングされた細胞培養容器からゼラチン溶液を吸引してください。
6. 細胞懸濁液を2~3回転倒混和して、あらかじめコーティングされた細胞培養容器に直ちに分注してください。
7. 37℃、5%のCO₂の細胞培養器内でiCell心筋細胞2.0を**4時間**培養します。「第7章. iCell心筋細胞2.0の維持」に直に進んでください。

第7章. iCell心筋細胞2.0の維持

1. 使用直前に、37℃ ウォーターバスでiCell心筋細胞2.0維持用培地を温めてください。
2. 播種後4時間経ったiCell心筋細胞2.0に対して、ピペッターを用いて解凍用培地を吸引し、適切な分量の維持用培地に入れ替えます。接着した心筋細胞に触れたり、剥離したりしないように注意してください。

注記: この段階では、細胞の接着性に影響を与えないように過度に洗浄しないでください。

3. 維持用培地は一日おきに交換します。
4. 37℃、5%のCO₂の細胞培養器内でiCell心筋細胞2.0を培養します。

Appendix

Appendix A. 知的所有権、使用の制限、および制限付きライセンス

- A. **所有権** 本製品は申請中の特許および特許の対象です: www.cellulardynamics.com/patents. お客様は、本補遺AのサブセクションBに記載の使用の制限に従って、お客様を唯一の受益者とする内部的な研究用に本製品を使用するための制限付きライセンスを有します。お客様は本製品の受領または購入により、Cellular Dynamicsが所有または許可する本製品に組み入れられた知的財産の任意の所有権または任意の権利の供与が譲渡されたと解釈してはならないことを認め、かつ同意するものとします。特に、本製品の作製、作製委託、販売提案、もしくは販売に関する、本製品やその一部の修正もしくは模造に関する、またはCellular Dynamicsによりお客様に提供もしくは明示的に許可された製品を除いた他の製品に関連した本製品の使用に関する、権利およびライセンスが、お客様に本製品を販売または譲渡したことにより、黙示的に示される、あるいは移譲されることはありません。
- B. **使用の制限** 本製品は内部的な研究目的の使用のみが許可され、他の目的に使用することはできません。本製品は、お客様が製品を注文し受領したことにより、お客様が同意する本ユーザーズガイドに従って使用されなければなりません。お客様は本製品を作製、作製委託、販売提案、または販売しないものとします。お客様は本製品(またはお客様による本製品への任意の修正もしくは本製品から派生、開発あるいは発展された細胞)を(i)任意の製品の製造のため、または(ii)第三者の任意のサービスのために使用しないものとします。お客様は本製品(またはお客様による本製品への任意の修正もしくは本製品から派生、開発あるいは発展された細胞)をCellular Dynamicsによる書面での事前同意なく、任意の第三者に譲渡できないものとします。お客様は本製品のリバースエンジニアリングを行わないものとします。お客様は本製品、コンポーネントもしくはその修正を、または、それらを基に派生、開発、もしくは発展された任意の細胞を、ヒトに対して、あるいは臨床試験において、ヒト被験者を対象とする診断目的、あるいは任意の臨床検査やその他の治療目的のために用いないものとします。お客様は、任意のヒト配偶子あるいは配偶子前駆細胞を派生、作製するために本製品を直接的または間接的に使用しないものとします。お客様は適用法令すべて、ならびにプロトコルおよび/またはプライバシー規定を承認した、任意の該当する施設内審査委員会に従って本製品を用いるものとします。お客様は本製品が間接的に派生または作製された生体物質のドナーを直接的に特定できる任意のデータや情報をCellular Dynamicsから入手する権利を有しません。お客様は本製品が間接的に派生または作製された生体物質のドナーを特定するためのいかなる試みも行わないものとします。

Appendix B. プロトタイプ品に対する保証の不存在

- A. プロトタイプ品は「現状有姿」により提供されます。
- B. 適用ある法令により最大限認められる限り、CELLULAR DYNAMICSは、プロトタイプ品に関するあらゆる明示または黙示の表明保証(市場適合性、特定の用途への適合性、侵害行為の不存在に関する黙示の保証及び賠償責任を含むが、それらに限られない。)を行わないものとし、また、当社は、プロトタイプ品に関する請求可能なあらゆる権利及び救済を放棄します。
- C. お客様は以下の事項に対して自己責任を負います。(i) お客様が上記制限に記載の事項への違反又はプロトタイプ品を目的及び使用法以外で使用していた場合 (ii) お客様がプロトタイプ品の使用、保管及び取扱いにおいてユーザーガイドを厳守せず、それが原因となった場合 (iii) お客様が前条A項の規定を順守しなかった場合; and (iv) お客様によるプロトタイプ品の濫用、誤用があった場合、若しくは事故、火事、破壊行為及び天災(不可抗力)などのCellularDynamics 等の人知を超えた事由によりプロトタイプ品に損害若しくは損失が生じた場合

D. お客様は、CDI Japan がユニット数(の調整)によって当社の注文を満たすことを了承し、合意します。係るユニット数は、お客様の発注したユニット数よりも多い場合があります。CDI Japan が係るユニット数の調整を行った場合、当社が追加料金を支払うことはありません。ユニット内の細胞数は、市販品のCertificate of Analysisにより決定されます。1ユニットに含まれる細胞数は生存率及びプレーティング効率により算出されます。係る細胞数はロットごとに異なる可能性があるため、CDI Japanは、ユニット数(の調整)によって当社の注文を十分に満たす権利を留保し、係るユニット数の調整は本条に規定する保証違反には該当しません。

Appendix C. 有限責任

準拠法で認められる最大限の範囲において、Cellular Dynamicsは契約内か不法行為(不履行を含む)であるかの行為の形態にかかわらず、厳密な製造物責任または別の方法で引き起こされた、偶発的、代償的、懲罰的、必然的、間接的、特別な、またはその他の類似した損害の責任を、Cellular Dynamicsがそのような損害の可能性を通知されていた場合であっても負わないものとします。その他の規定や暗示の如何にかかわらず、Cellular Dynamicsのお客様に対する責任はいかなる場合においても、お客様がCellular Dynamics製品のために支払った金額を超えないものとします。

©2015 Cellular Dynamics International, Inc. All rights reserved.

