




日本語版

iCell® Cardiomyocytes 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.

OTHER THAN THE EXPRESS LIMITED WARRANTY SET FORTH IN THIS USER’S GUIDE, CDI MAKES NO REPRESENTATIONS, WARRANTIES, CONDITIONS OR COVENANTS, EITHER EXPRESS OR IMPLIED (INCLUDING WITHOUT LIMITATION, 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 Cardiomyocytes as described herein. The only warranties provided to you are included in the Limited Warranty enclosed with this guide. You assume all risk in connection with your use of iCell Cardiomyocytes.

Conditions of Use

iCell Cardiomyocytes 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 Cardiomyocytes.

Origin

iCell Cardiomyocytes 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 1.8: July 2015 — 日本語版version1.0
Version 1.7: August 2014
Version 1.6.1: November 2013
Version 1.6: October 2013
Version 1.5.1: November 2012
Version 1.5: September 2011
Version 1.0: December 2009

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. 培地とiCell心筋細胞の解凍.....	7
iCell 心筋細胞解凍用培地の解凍.....	7
iCell 心筋細胞の解凍.....	7
第5章. iCell 心筋細胞の播種.....	9
生細胞密度の測定	10
iCell 心筋細胞の播種.....	10
第6章. iCell心筋細胞の維持.....	13
Appendices.....	14
Appendix A. 知的所有権, 使用の制限, 及び 制限付きライセンス.....	14
Appendix B. 限定保証	14
Appendix C. 有限責任.....	16

使用を始める前に

注記

- 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 Cardiomyocytes (iCell 心筋細胞)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 Cardiomyocytes (iCell 心筋細胞) 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、24-48 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。播種後 48 時間で行う維持用培地での洗浄ステップで非接着細胞が取り除かれ、電氣的および機械的に活動性のある心筋細胞だけが、直ちに使用可能な状態で培養容器に残ります。

iCell 心筋細胞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 心筋細胞は維持用培地内で 2 週間以上、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。

Cellular Dynamicsが供給するコンポーネント

品目	カタログ番号
iCell Cardiomyocytes1	CMC-100-110-001 (1ユニット)+ CMC-100-110-005 (5ユニット)+ CMC-100-010-000.5 (0.5ユニット)# CMC-100-010-001 (1ユニット)# CMC-100-010-005 (5ユニット)#
iCell Cardiomyocytes Plating Medium1	CMM-100-110-001 (1ユニット) CMM-100-110-005 (5ユニット)
iCell Cardiomyocytes Maintenance Medium 1	CMM-100-120-001 (1ユニット) CMM-100-120-005 (5ユニット)
iCell Cardiomyocytes User's Guide2	
Certificate of Analysis3	
Certificate of Origin4	

+ : 内在性のMyh6プロモータの制御下で発現するモノマーの赤色蛍光タンパク質 (RFP) を含む

: RFPの発現なし

1 安全性データシートはオンラインでご参照ください: www.cellulardynamics.com/lit/

2 ユーザーズガイドはオンラインでもご購入いただけます: www.cellulardynamics.com/lit/

3 分析保証書はオンラインでご参照ください: www.cellulardynamics.com/coa/

4 出荷のために必要な場合に限って添付されます

必要な機器および消耗品

品目	指定供給元	カタログ番号
機器		
37℃ 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 (CO2濃度7%で使用)	-	
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	-	
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	-	
滅菌済み蒸留水	-	
ゼラチン、タイプA、細胞培養テスト済み	シグマ アルドリッチ	G1890
ピペット	-	
トリパンブルー	Gibco	15250

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 (Cellular Dynamics International Japan Co.,Ltd.)

テクニカルサポート

電話 03-6271-1105

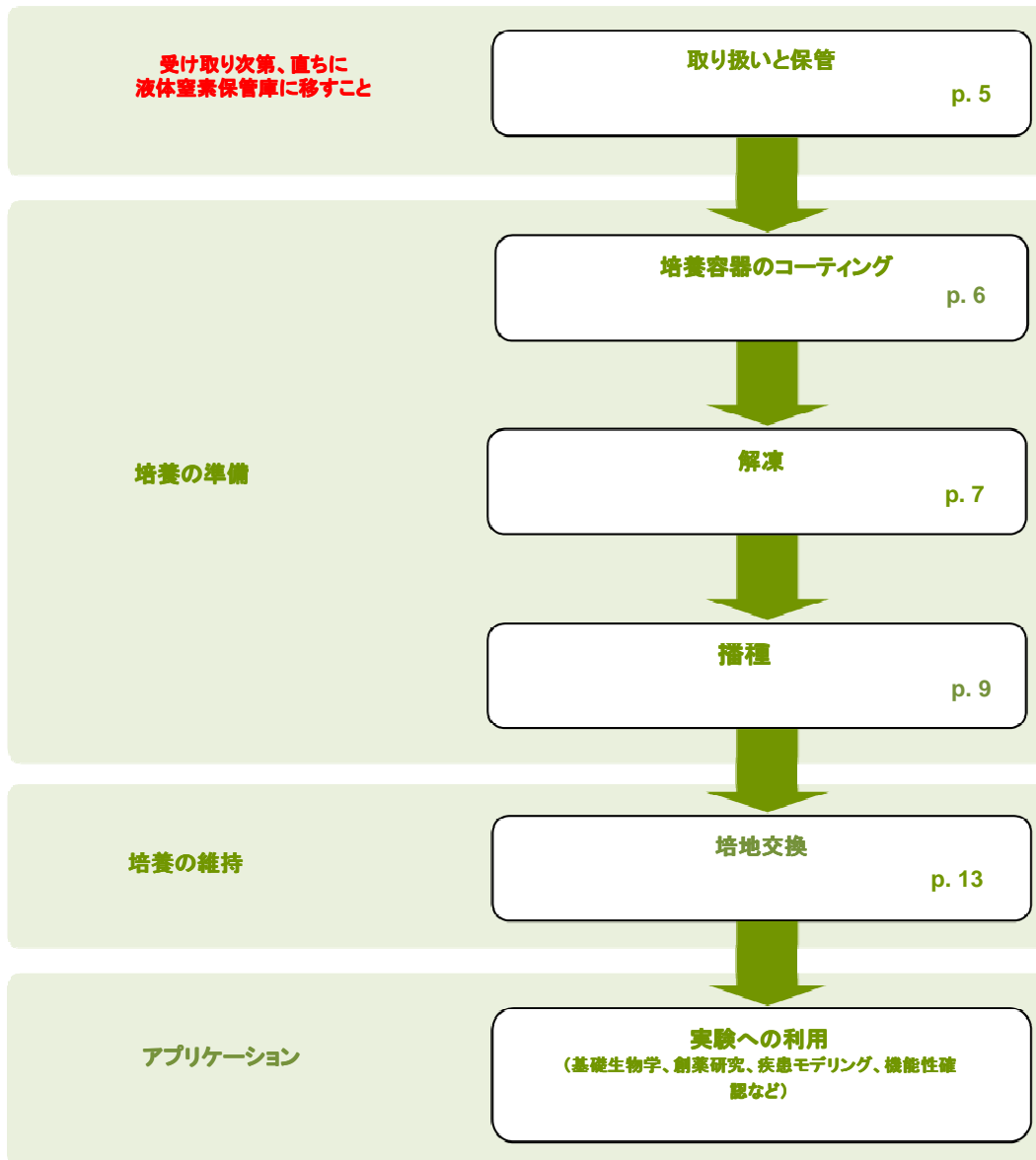
Email tech@cdi-j.com

コラボレーションラボラトリー(川崎市殿町)

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. 取り扱いおよび保管

iCell心筋細胞の取り扱い

iCell心筋細胞は、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心筋細胞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心筋細胞解凍用培地およびiCell心筋細胞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-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には、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。なかでも0.1%ゼラチン溶液によるコーティングは、経済的で簡便であり、iCell心筋細胞培養用のプレートコーティングの方法として推奨されています。

CDIは、アッセイ特異的な基質を推奨した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心筋細胞の解凍前に実施しておいてください。

0.1%(w/v)ゼラチン溶液の調製

- 0.1%ゼラチン溶液を調製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%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。

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)
6ウェル細胞培養プレート	9.5	2
12ウェル細胞培養プレート	3.8	1
24ウェル細胞培養プレート	1.9	0.6
96ウェル細胞培養プレート	0.32	0.1
384ウェル細胞培養プレート	0.06	0.025
T25フラスコ	25	8

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)

- 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。

第4章. 培地とiCell心筋細胞の解凍

iCell心筋細胞解凍用培地の解凍

実験を行う前日に、iCell心筋細胞解凍用培地（解凍用培地）を4℃で一晩かけて解凍します。未使用の解凍用培地は、4℃で2週間保存することができます。

4℃環境から解凍用培地を取り出し、iCell心筋細胞を解凍する前に室温に戻します。実験に必要な解凍用培地が十分量解凍されていることを確認してください。心筋細胞の各ユニットで解凍に必要な解凍用培地の分量は、次の要領で算出できます：

$$\text{解凍する解凍用培地 (mL)} = \frac{\text{生細胞数/バイアル} \times \text{生着効率}}{\text{目的播種密度 (cells/ml)}}$$

生細胞数/バイアルおよび生着効率は、ロットごとに異なっており、分析保証書に記載されています。生着効率および目的播種密度は、「第5章 iCell心筋細胞の播種」に詳しく定義されています。

iCell心筋細胞の解凍

細胞の性能を最大限に維持するために、iCell心筋細胞は解凍直前まで液体窒素内で保管しておいてください。iCell心筋細胞の生存率および性能を確保する為には、次の解凍手順の各ステップを効率良く実施してください。

注記: 1度に解凍するiCell心筋細胞はバイアル3本までとしてください。

1. 液体窒素保管庫からiCell心筋細胞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分間以内としてください。

2. キャップ部分まで沈めないよう注意しながらクライオバイアルを37℃のウォーターバスに浸し、4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。

3. クライオバイアルをウォーター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。
4. 1 mLピペッターを用いて、iCell心筋細胞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心筋細胞懸濁液を何度もピペティングしないでください。

- 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心筋細胞クライオバイアルに室温の解凍用培地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ピペッターを用いてクライオバイアルから回収し、先にiCell心筋細胞懸濁液を入れた50 mL遠心チューブに90秒かけて滴下します(4~5秒毎に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/

- 室温の解凍用培地8 mL(心筋細胞0.5ユニットサイズ用では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50 mL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/

- 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、生存能力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4および6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5章. iCell心筋細胞の播種

iCell心筋細胞は、高純度の心筋細胞を単一細胞懸濁液として凍結保存した状態で提供されています。本ユーザーズガイドに記載のプロトコルに従うと、分析保証書でPlating Efficiency (生着効率)と呼ぶ指標、すなわち播種された生心筋細胞が細胞培養プレートに接着する割合と同じものが得られます。生着効率は、解凍されたiCell心筋細胞の単一細胞懸濁液の以下の特性から算出されています:

生細胞数	解凍直後に、単一細胞懸濁液の細胞数分析から得た生細胞の総数
生細胞密度	解凍直後に、単一細胞懸濁液の細胞数分析から得た1 mLあたりの生細胞数
播種細胞数	細胞培養容器に添加された生細胞の総数
生着細胞数	播種後48時間の時点で、細胞培養容器に十分に接着された生細胞数
生着効率	$\text{生着効率} = \frac{\text{生着細胞数}}{\text{播種細胞数}} \times 100$ <p>例:60万個の細胞が播種され、35万個の生着細胞が、培養から48時間後に回収された場合、細胞の該当ロットの生着効率は以下のとおり算出されます:</p> $58.3\% = \frac{\text{生着細胞: } 350,000\text{個}}{\text{播種細胞: } 600,000\text{個}} \times 100$



iCell心筋細胞は非増殖性であるため、増殖性の細胞の培養と同じ外観を得るためには多くの心筋細胞を播種する必要がある場合があります。

iCell心筋細胞はほぼ100%の純度であり、iCell心筋細胞維持用培地 (維持用培地) で培養された場合、心筋細胞以外の細胞の増殖が最低限に抑えられるため、高純度の培養を2週間以上維持できます。

生細胞密度の測定

1. 解凍後のiCell心筋細胞懸濁液を2～3回転倒混和して、細胞数の計測を行う前に心筋細胞懸濁液を確実に均一化してください。
2. 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。
3. 解凍されたiCell心筋細胞浮遊液の生細胞密度(cells/mL)を測定します。生細胞密度および生細胞数は次の方程式によって関連づけられます:

$$\text{生細胞密度} = \frac{\text{生細胞数}}{\text{細胞懸濁液量 (mL)}}$$

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心筋細胞を180 x gで5分間遠心し、目的とする密度を達成するために適切な量の解凍用培地を取り除き、沈殿したiCell心筋細胞を穏やかに懸濁します。過剰にピペティングすると、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。

iCell心筋細胞の播種

iCell心筋細胞は、ヒトの心筋細胞の本来の生理学的特性および機能を再現するものであり、多くのセルベースアッセイに適しています。表面積1ユニットあたりに播種する心筋細胞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。しかし、1 cm²あたり約6万3千個の心筋細胞密度はシート層の拍動をもたらす、ほとんどのセルベースアッセイで推奨される開始密度です。下表に、いくつかの一般的な細胞培養容器用に必要な細胞数および播種量を示します。

注記: この表は、シート層形成のみに関するガイドです。様々なセルベースアッセイ用の推奨密度および播種量、ならびにパッチクランプ、多電極アレイ(MEA)などの電気生理学的手技への対応については、www.cellulardynamics.com/lit/に記載されているアプリケーションプロトコルおよび注記を参照してください。

培養容器	表面積 (cm ²)	播種量 (mL)	細胞数細胞数 (約6.3 x 10 ⁴ cells/cm ²)
6ウェル細胞培養プレート	9.5	3	600 x 10 ³
12ウェル細胞培養プレート	3.8	1.2	240 x 10 ³
24ウェル細胞培養プレート	1.9	0.6	120 x 10 ³
96ウェル細胞培養プレート	0.32	0.1	20 x 10 ³
384ウェル細胞培養プレート	0.06	0.025	5 x 10 ³
T25フラスコ	25	8	1.6 x 10 ⁶

表2: 有用な推奨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)

接着する生心筋細胞数は該当ロットの生着効率に依存します。生着効率はiCell心筋細胞のロットごとに測定され、ロット/出荷単位に提供される分析保証書に記載されます。

また分析保証書は、www.cellulardynamics.com/coa/にてロット番号検索を行うと、分析保証書を参照することができます。

セルベースアッセイ用の96ウェル細胞培養プレートでのiCell心筋細胞の播種

iCell心筋細胞を用いて、96ウェル細胞培養プレート中のセルベースアッセイを行うための推奨播種密度は、1ウェルあたり2万細胞です。しかし、前セクションに記載のとおり、最適な播種密度は生物学的観点やアッセイ感度にも依存するため、経験的な判断が必要です。

以下に記載の手順は96ウェル細胞培養プレートで20,000 cells/wellを播種する方法を示しており、ここでは播種量を100 μL/well、生着効率を45%、解凍後の生細胞密度を 0.49×10^6 cells/mL、および実際の細胞懸濁液量が9.5 mL (0.5 mLは生細胞密度のために使用)であることを前提としています。

これと同じ手順を、推奨細胞数および播種量を適切に置き換えることで、他の培養容器の型式で細胞を播種する際に用いることができます。

1. 96ウェル細胞培養プレートに細胞懸濁液を調製します。
 - a. 分析保証書から生着効率を入手してください。あるいは、ロット番号を用いて、オンラインでwww.cellulardynamics.com/coa/にアクセスして、分析保証書を参照してください(この例の場合、生着効率は45%)。
 - b. 本章の初めの「生細胞密度の測定」のセクションから生細胞密度 (cells/mL) を入手してください(この例の場合、生細胞密度は 0.49×10^6 cells/mLです)。
 - c. 目的播種密度を算出します:

$$\text{目的播種密度} = \frac{\text{必要な細胞数/ウェル}}{\text{播種量/ウェル (mL)}}$$

今回の例では、1ウェルあたりに必要な細胞数が2万個であり、推奨播種量は100 μLです。従って、目的播種密度は

$$0.2 \times 10^6 \text{ cells/mL} = \frac{20,000 \text{ cells/well}}{0.1 \text{ mL}}$$

- d. 細胞懸濁液を目的播種密度にするために必要な総播種量を算出します。

$$\text{総播種量} = \frac{\text{実際の分量 (mL)} \times \text{生細胞密度 (cells/mL)} \times \text{生着効率}}{\text{目的播種密度 (cells/mL)}}$$

ここで、「実際の分量」とは細胞計数後の細胞懸濁液量です。ゆえに、総播種量は

$$10.47 \text{ mL} = \frac{9.5 \text{ mL} \times 0.49 \times 10^6 \text{ cells/mL} \times 0.45}{0.2 \times 10^6 \text{ cells/mL}}$$

- e. 算出された総播種量を達成するために十分な量の解凍用培地を細胞懸濁液に添加します。

2. 総播種量を1枚または複数枚の96ウェル細胞培養プレートに分注します。
 - a. ゼラチンコーティングされた96ウェル細胞培養プレートを用意します。詳細については、「第3章 プレートのコーティング」を参照してください。
 - b. ゼラチン溶液をウェルから吸引後、iCell心筋細胞懸濁液を穏やかに混合して、細胞懸濁液の播種量(すなわち、100 μ L)を96ウェル細胞培養プレートの各ウェルに分注します。
 - c. 37 $^{\circ}$ C、7%*のCO₂の細胞培養インキュベータ内でiCell心筋細胞を培養します。

* CO₂は、5%も可

心筋細胞の評価前に行う培地交換手順および推奨洗浄手順は、「第6章 iCell心筋細胞の維持」に記載されています。

想定される細胞密度

図1の画像は、プロトコルに従うことで得られる想定生存率を示します。iCell心筋細胞を最適な播種密度で96ウェル細胞培養プレートに添加しました。この心筋細胞は播種後48時間の時点で、カルセイン - アセトキシメチルエステル(カルセインAM)でラベルしました。カルセインAMは細胞内のエステラーゼによって細胞非透過性の蛍光染料カルセインに変換される、非蛍光性の細胞透過性物質です。ここで、染色は細胞の生存率を示すことに用いられ、その均一な分布を示し、想定される基質に関する形態情報を提供します。画像左側はウェル全体を示し、右側はその拡大図です。心筋細胞は培養中ではシート構造を長期間維持できないことに注意してください。

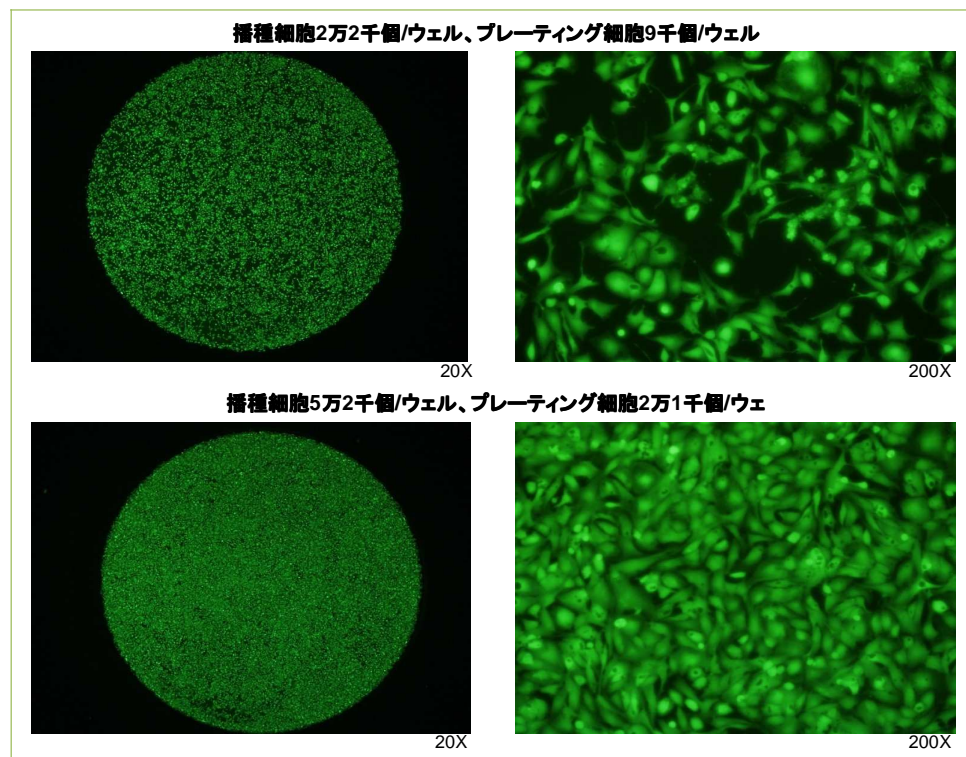


図1: 播種後48時間の細胞密度

これらの画像は、播種後48時間時点のカルセイン陽性の心筋細胞の予測密度を示します。このiCell心筋細胞の生着効率は約40%でした。

第6章. iCell心筋細胞の維持

iCell心筋細胞は高純度の心筋細胞が単一細胞懸濁液として凍結保存された状態で提供されます。心筋細胞は、推奨どおりにiCell心筋細胞解凍用培地(解凍用培地)で播種され、iCell心筋細胞維持用培地(維持用培地)で維持された場合は、解凍から少なくとも2週間は高純度を保つことができます。

使用前に4℃で維持用培地を一晩かけて解凍してください。この培地は4℃で保管された場合、2週間安定です。培地を解凍後に単回使用用の分量に分けた後、十分に密閉された容器に入れ、4℃で保管すれば、pHの変化を最小限に抑えることができます。

1. 使用する24時間前に、4℃で維持用培地を一晩かけて解凍してください。
2. 使用直前に、37℃ウォーターバスで維持用培地を温めてください。
3. iCell心筋細胞を播種後48時間の時点で、静かにプレート表面を洗浄しながら、解凍用培地を5回ほどピペティングして、接着していない細胞や残骸を穏やかに洗い流します。

注記:あるいは、解凍用培地を吸引して非接着細胞を取り除き、適切な量の維持用培地でプレート表面を静かに2回洗浄、培地交換を行ってください。

4. 解凍用培地を吸引して、適切な分量の維持用培地と交換します。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。一般的な様々な細胞培養容器の推奨播種量については、10ページの表2を参照してください。
5. 維持用培地は一日おきに交換します。
6. 37℃、7%のCO₂の細胞培養器内でiCell心筋細胞を培養します。

* CO₂は、5%も可

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. 限定保証

A. 保証期間(以下に定義)中、本補遺BのサブセクションFに従って、Cellular Dynamicsは、本製品がお客様に出荷された製品に関する分析保証書に記載の規格に適合することを保証いたします。何らかの欠陥製品に関するお客様の唯一かつ排他的な救済手段(およびCellular Dynamicsの唯一かつ排他的な責任)は、本補遺Bに準ずるCellular Dynamicsによる欠陥製品の交換であるものとします。

B. いかなる場合においても、Cellular Dynamicsのお客様に対する責任はお客様が本製品のために支払った金額を超えないものとします。本製品が本保証に従って交換される場合は、Cellular Dynamicsは妥当な全運送費を負担いたします。明確化するために、本保証は次の場合には自動的に無効になり、その下での任意の請求も無効とします。(i)お客様が本製品の使用にあたり、本ユーザーズガイドおよびCellular Dynamicsの契約条件(または本製品がお客様に販売もしくは譲渡された際のCellular Dynamicsとお客様との間のその他の書面による合意)に記載されている以外の方法を用いたか、本製品の設計意図とは異なる目的または方法を用いた場合、(ii)お客様が本製品の使用、保管、および取り扱いに関して、本ユーザーズガイドに従わない場合、

注記

(iii)お客様が本ユーザーズガイドの補遺Aの条項のいずれにも準拠しない場合、あるいは(iv)お客様によって、または事故、火災、破壊行為および自然災害(天災)など(これらに限定されない)の人的(例: Cellular Dynamics)制御を超える事象や出来事による本製品の任意の損害または損失の限りにおいて、本製品の何らかの乱用、その他の誤用もしくは不履行があった場合、本保証はお客様にのみ適用され、第三者には適用されません。本保証は譲渡できません。

C. 準拠法で認められる最大限の範囲において、Cellular Dynamicsは明示もしくは暗示を問わず、本製品に関する一切の責任および保証を放棄します。この責任および保証には、商品性、特別目的への適合性あるいは非侵害の任意の黙示的保証を含みますが、これらに限定されません。また、お客様は、上記補遺Bに記載の明示的な保証および救済手段以外の任意の欠陥製品に関する一切の権利および救済手段を放棄するものとします。

D. 本製品の解凍から5営業日以内で、かつ分析保証書および/または製品ラベル(「保証期間」)に記載の本製品の有効期限前に、製品に何らかの不適合が認められた場合、お客様はその不適合について詳細に記述し、Cellular Dynamicsに書面にて通知しなければなりません。お客様が保証期間内にCellular Dynamicsに適切に通知しなかった場合、本補遺Bに上述された限定保証は無効となります。

E. 保証請求を行う必要のあるお客様は、テクニカルサポートライン、電話番号03-6271-1105あるいはEメールアドレスtech@cdi-j.comに連絡して、本補遺Bに上述された限定保証の違反に基づいて交換製品を要求してください。Cellular Dynamicsの本限定保証の違反に対して、お客様は保証期間内に、あるいは補遺Bに従って適宜、適切に通知を行い、当該違反の発生日から18ヵ月以内に対応を開始しなければなりません。

F. Cellular Dynamicsが製造していない製品(例: 製品の付属品やキット製品の個別品)と共に販売された任意の製品またはその一部に関する、明示的や暗示的を問わず、いかなる種類、性質を保証いたしません。本製品の任意の当該付属品がある場合は、他の当該付属品または構成製品の付属品の製造者によって保証が(お客様にも)提供されることがあります。

G. お客様は、Cellular Dynamicsがお客様の注文する製品ユニット数を任意の数で充足する場合があることを認め、合意するものとします。その場合、ユニット数はお客様の注文数より多くなる場合があります。お客様はCellular Dynamicsが何らかの調整を行ったことにより、費用を請求されることはありません。1ユニットの細胞数は製品の分析保証書に定められています。1ユニットに含まれる細胞数は生存率および生着効率の双方を説明するものです。これはロットごとに異なる場合があるため、Cellular Dynamicsはお客様の注文を充足するために十分なユニット数量で当該注文を充足する権利を留保します。また、そのような調整は、ここに記載した限定保証を違反したことに伴うものではありません。

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.