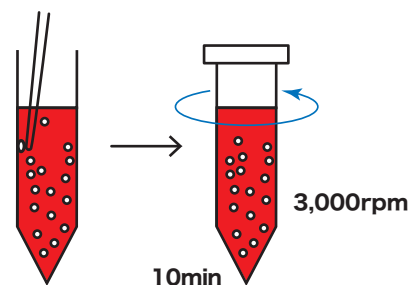


I. コラーゲンスポンジ ハニカムの脱泡^{※1}

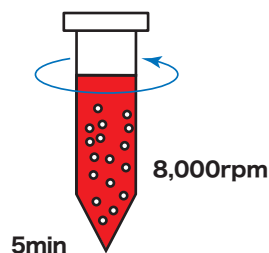
A. 脱泡方法1

- (1) ハニカムを培地またはPBSに浸し、ピンセットやピペットを用いてハニカムを軽く潰す。
- (2) 3,000 rpm×10分にて遠心脱泡する。



B. 脱泡方法2

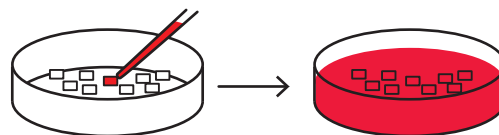
- (1) ハニカムを培地またはPBSに浸す。
- (2) 8,000 rpm×5分にて遠心脱泡する。



※1 脱泡が完全に行われない場合、細胞がポア内部に入り難くなるため、十分に脱泡した上で細胞播種を行う。

II. コラーゲンスポンジ ハニカムへの細胞播種

- (1) 脱泡したハニカムを96wellプレート等に入れる。
- (2) ピペットで軽くハニカムを押しながら、ハニカム上部よりゆっくりと細胞懸濁液を滴下する。^{※2}
- (3) ハニカムが十分に浸るよう培地を加える。



※2 細胞接着率を向上させるためには、高濃度のコラーゲン含有培地を使用すると良い。コラーゲン含有培地は、培地とコラーゲン酸性溶液 (IPC-50あるいはIAC-50) を混合して調整する。詳しくはコラーゲン酸性溶液の取扱説明書を参照。

Ⅲ．コラーゲンスポンジ ハニカムを用いた大量培養

1. 脱泡

方法1.

- (1) 容器にハニカムを入れた状態で10mLの培地またはPBS⁽⁻⁾を加える。
- (2) ハニカムは内部に含んでいる空気により大部分が浮くが、そのまま90mLの培地またはPBS⁽⁻⁾の入った100mL容量のスピナーフラスコへ移す。
- (3) 40rpmぐらいの回転速度で低温室で1日攪拌することで脱泡する。

方法2.

- (1) 培地もしくはPBS⁽⁻⁾の入った無菌遠沈管にハニカムを入れる。
- (2) 遠心分離器に1,000rpmで10分間かけると脱泡できる。

方法3.

- (1) 容器にハニカムを入れた状態で15mLの培地またはPBS⁽⁻⁾を加える。
- (2) ガラス棒でハニカムを押し付けて気泡を抜く。

2. 細胞の播き込み

- (1) 脱泡終了後、方法1,3の場合スピナーフラスコ内の培地またはPBS⁽⁻⁾を新しく使用する培地に交換する。
培地100mLに対しハニカムは、100~200mg用いる。膨潤した状態でハニカムの体積は15~30mL位となる。
- (2) 細胞の播き込み数は、 10^6 細胞/100mL培地程度。
- (3) 10~15rpmで1分間攪拌、その後静置する。30分毎に30秒攪拌する(15~30rpm)。この操作を2時間程度行うことにより細胞がハニカムに接着する。

3. 細胞培養

細胞接着確認後、ハニカムが穏やかに動く程度に攪拌し、培養する。

実際の増殖曲線を次頁に示す。約2週間の培養により $7 \times 10^6 \sim 10^7$ 個/mLの細胞密度まで増殖可能である。

細胞の接着方法

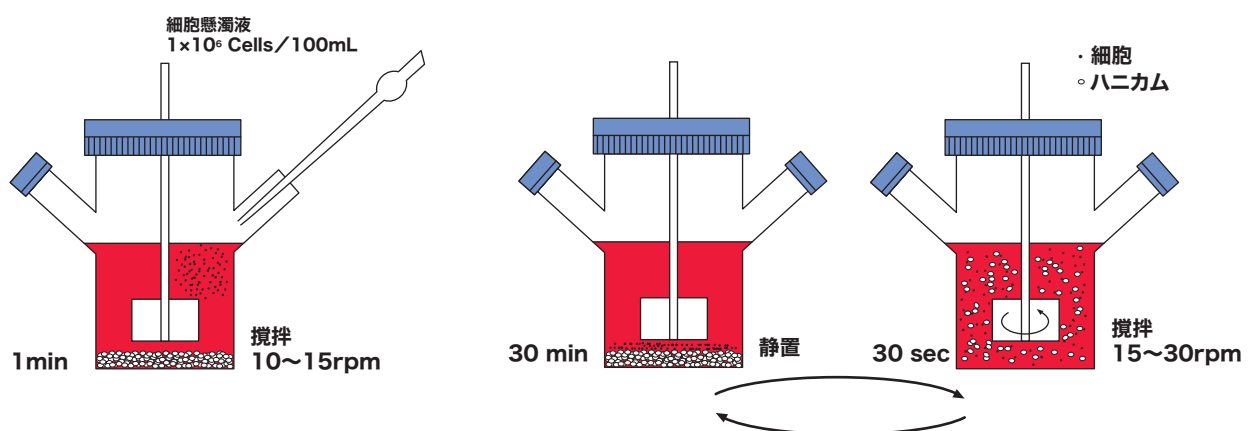


図 ハニカム上でのF-7000細胞(ヒト繊維芽細胞株)の増殖曲線

実際の増殖曲線を次に示す。この細胞でも約2週間の培養により $7 \times 10^6 \sim 10^7$ 個/mLの細胞密度まで増殖可能である。

