

## 保管方法

冷蔵（2～10℃）【冷凍禁止】

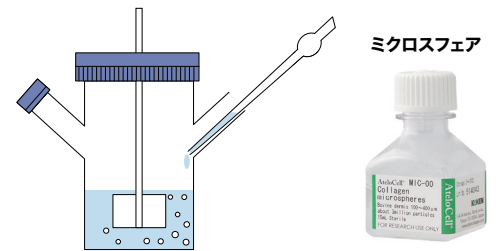
## スピナーフラスコを使用した培養

### 必要な器具

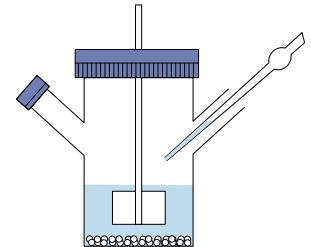
- ① スピナーフラスコ

### 1. 事前準備

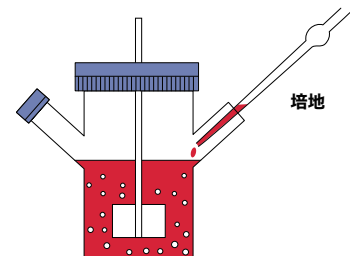
- (1) 製品全量(15mL)をスピナーフラスコに入れる。



- (2) ミクロスフェアが沈むのを待って上清を抜き取る。



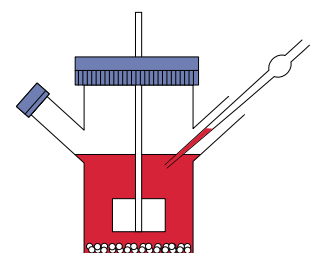
- (3) 培地 25～50mL を入れる。



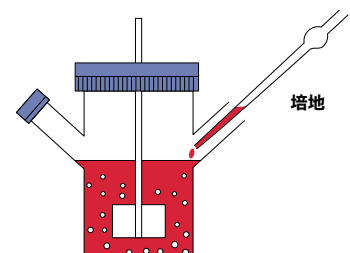
- (4) ミクロスフェアが沈むのを待って上清を抜き取る。

- (3)～(4)の操作を3～5回繰り返す。

使用するミクロスフェアが15mLよりも多い場合は十分に培地に置き換わるまで、(3)～(4)の操作回数を増やす。



- (5) 培地 25～50mL を入れる。

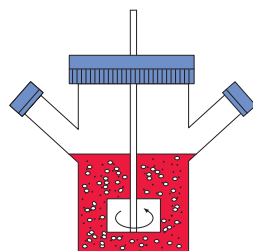


## スピナーフラスコを使用した培養 (続き)

### II. 細胞播種および培養

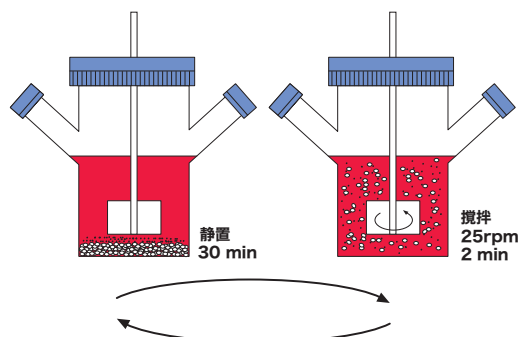
- (1) 37°Cに温めた培地に細胞懸濁液を加え、すぐにミクロスフェアと細胞が一様に分散するように攪拌する。

播種細胞数目安： $1 \times 10^7$  cells / 15 mL- ミクロスフェア (製品 1 本)



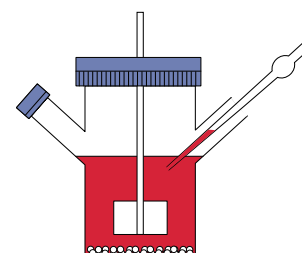
- (2) 30分静置後、25rpm で2分攪拌し、再び30分間静置する。この操作を6時間繰り返し、その後は25rpm で攪拌し続け、培養する。

フラスコ内の細胞数が増すに従って攪拌速度を徐々に上げる。細胞によるミクロスフェア間のブリッジ形成を抑制し、細胞の増殖が阻害されることを防ぐ。ただし、攪拌速度が速すぎると細胞に対するダメージが高くなるため、注意する。



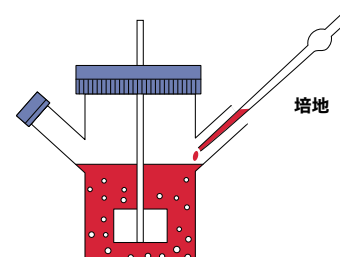
### III. 培地交換

- (1) 攪拌を止め、ミクロスフェアを沈めた後に上清を抜き取る。



- (2) 新しい培地を加える。

培地の交換は通常2~3回/週で行なう。フラスコ内の細胞数が増すに従って培地交換の回数を増やす(pH指示薬の色の変化も参考にする)。



## 小スケールでの培養

### 必要な機器および試薬

- ① 低接着表面の細胞培養用ディッシュ
- ② 卓上小型振とう機（波動型揺動タイプ）

### 手順

- (1) ミクロスフェアを均一に分散させた製品から300  $\mu$ Lをマイクロチューブに分取し、遠心して上清を除去する。
- (2) PBSを添加して洗浄し、再び遠心して上清を除去する。
- (3) 培地300 $\mu$ Lに懸濁し、浸漬する。例) 4℃で一晩浸漬する。
- (4) 低接着表面の35 mmディッシュに培地に懸濁したミクロスフェア300 $\mu$ L、および細胞懸濁液300 $\mu$ Lを添加して軽く混合後、インキュベーター内で30分間静置する。

播種細胞数目安： $1 \times 10^5$  cells / 300 $\mu$ L-ミクロスフェア

- (5) 卓上小型振とう機を用いて、ディッシュを2分間振とうした後、30分程度静置する。

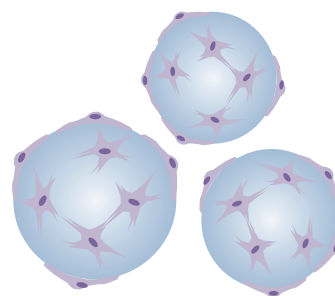
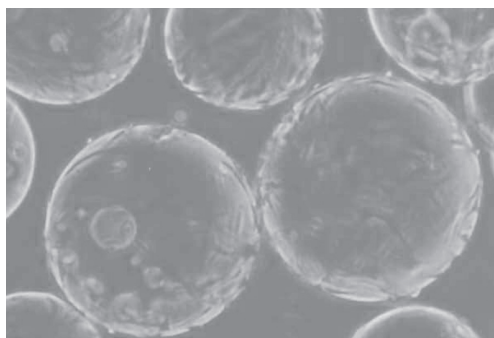
振とう条件目安：傾斜角度 6度、回転数 10rpm

- (6) (5) の操作を8回繰り返し、ミクロスフェアに細胞を接着させる。

- (7) 培地を1.5 mL追加し、ディッシュを振とうしながら培養する。

振とう条件目安：傾斜角度 6度、回転数 15 rpm

- (8) 培地交換は、ディッシュを静置してミクロスフェアを沈降させ、上清の半量を交換する。



ミクロスフェア表面に接着した細胞の位相差顕微鏡写真（左）とイメージ図（右）  
（細胞はミクロスフェア表面に接着し、その様子は位相差顕微鏡で観察できる。）

## 細胞回収

### A. コラゲナーゼを使用する場合

#### 試薬

- ① 0.2%コラゲナーゼ溶液<sup>注</sup>
- ② PBS

注 コラゲナーゼは細胞分散用を推奨する。その他の種類の使用条件は各試薬メーカーのプロトコルを参照。  
コラゲナーゼ溶液を調製する緩衝液は、コラゲナーゼの活性に必要な 2mM Ca<sup>2+</sup> を含むものを使用する。

#### 手順

- (1) ミクロスフェアを含む培養液を遠心チューブに回収する。
- (2) コラゲナーゼの最終濃度が0.1%になるように、同量の0.2%コラゲナーゼ溶液を添加し、37°Cでインキュベートする。  
(コラゲナーゼの種類やロットによって溶解時間は変動するが、30～60分程度で溶解する。)
- (3) ミクロスフェアが溶解したことを確認したのち、遠心し上清を除去する。
- (4) 細胞を十分に懸濁できる程度のPBSを加えて混合し、再度遠心して上清を除去する。
- (5) (4) の作業を3～5回繰り返し、コラゲナーゼを除去する。

### B. トリプシンを使用する場合

#### 試薬

- ① PBS
- ② トリプシン溶液 (0.5%トリプシン溶液など)
- ③ セルストレーナー (メッシュサイズ: 40, 100μm)

#### 手順

- (1) ミクロスフェアを含む培養液を遠心チューブに回収し、遠心して上清を除去する。
- (2) PBSを添加して洗浄し、再び遠心して上清を除去する。
- (3) トリプシン溶液を添加し、37°Cで15分間インキュベートする。  
(ご使用の細胞によって、酵素液や処理時間をご確認ください。)
- (4) 培地を添加して懸濁する。
- (5) 100μmおよび40μmメッシュの順にセルストレーナーでろ過してミクロスフェアを除き、細胞を回収する。

## RNA回収

---

### 必要な試薬

- ① 市販のRNA抽出薬もしくはキット  
(フェノール抽出試薬やスピンカラム法での回収事例がある。)

### 手順

- (1) ミクロスフェアを含む培養液を遠心チューブに回収する。
- (2) 遠心し、上清を除去する。
- (3) 以降は、RNA抽出のプロトコールに従ってRNAを回収する。

## 組織学的評価

---

### 必要な試薬

- ① 4%パラホルムアルデヒド (PFA)
- ② 0.2%TritonX-100
- ③ Bovine serum albumin (BSA)
- ④ PBS
- ⑤ 各種一次抗体、二次抗体
- ⑥ 核染色液<sup>注</sup>

注 コラーゲン自体に青色の自家蛍光があるので、DAPI ではなく DRAQ5 などの核染色液を使用すると観察しやすい。

### 手順

- (1) ミクロスフェアを含む培養液を遠心チューブに回収する。
- (2) 遠心し、上清を除去する。
- (3) ミクロスフェアに4%PFAを添加し、固定する。
- (4) PBSで洗浄後、0.2%TritonX-100を用いて透過処理を行う。
- (5) 0.1%BSAを含む一次抗体液に4℃で16時間浸漬する。
- (6) PBSで洗浄後、二次抗体液に室温で1時間浸漬する。
- (7) PBSで洗浄後、核染色を行う。

## コラーゲン ミクロスフェア製品情報

製品番号	製品	サイズ	包装
MIC-00	コラーゲン ミクロスフェア 無菌 Atelocollagen Microspheres 表面積：約3,800cm <sup>2</sup> / 15mL	大きさ100~400μm 約300万粒	15mL/本

### コラーゲンの種類

ウシ皮由来アテロコラーゲン

### よくあるQ&Aはこちら

<https://atelocollagen.com/atelocell/faq/05>

