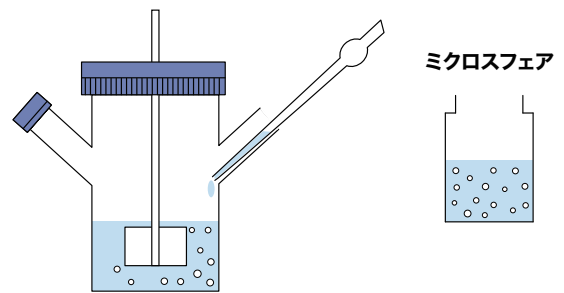
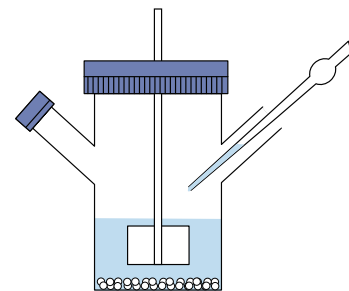


## I. コラーゲンミクロスフェアの準備

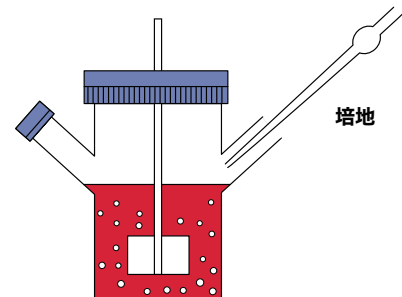
(1) コラーゲンミクロスフェア15mLをスピナーフラスコに入れる。



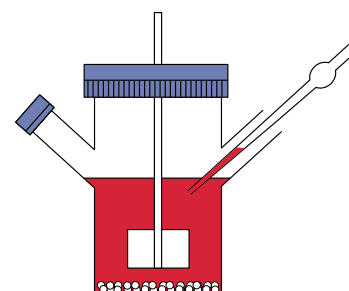
(2) ミクロスフェアが沈むのを待って上清をぬきとる。



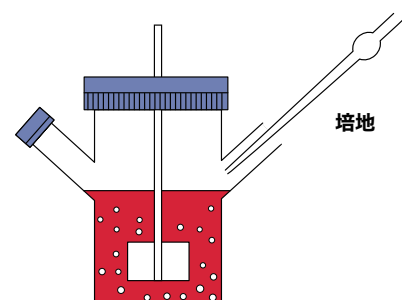
(3) 培養に使用する培地25~50mLを入れる。



(4) (2)と同様にミクロスフェアが沈むのを待って上清をぬきとる。(2)~(4)の操作を3~5回くり返す。(ミクロスフェアを多くするに従って、この回数を多くする)



(5) 培地25~50mLを入れる。

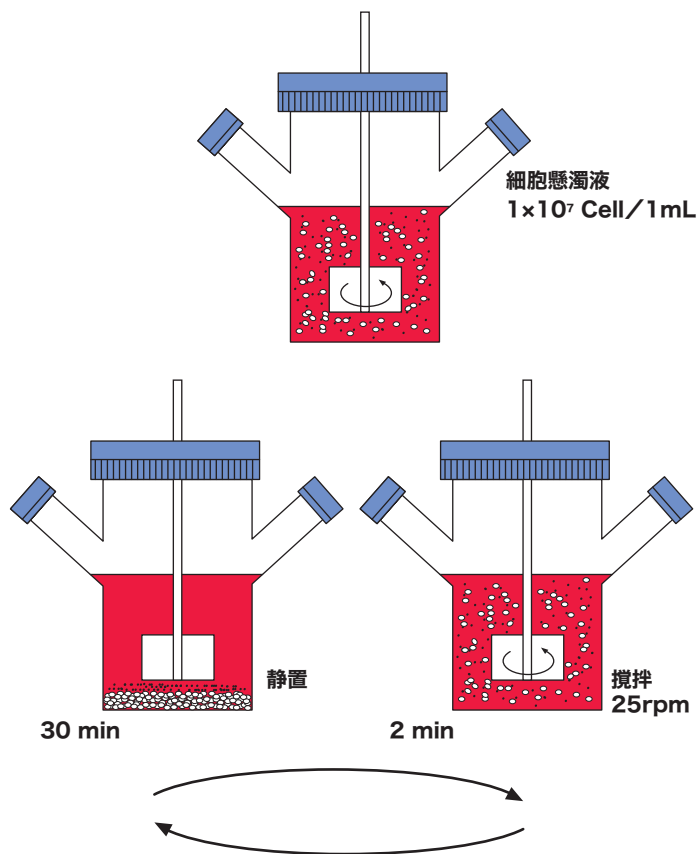


## II. コラーゲン ミクロスフェアへの細胞播種

- (1) 細胞懸濁液 (通常  $1 \times 10^7$  cells/1mL) を加えて 37°C 水浴中ですぐに攪拌する。

- (2) 30分放置後25rpmで2分攪拌し再び30分間放置する。この操作を6時間行い、こののちは25rpmで攪拌し続ける。<sup>※1</sup>

※1 フラスコ内の細胞数が増すにしたがって攪拌速度を徐々に上げる。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。また遅すぎると、ミクロスフェア間に細胞によるブリッジが形成され、細胞の増殖が阻害される。



## III. 培地交換

- (1) 攪拌を止め、ミクロスフェアを沈めた後上清をぬきとる。

- (2) 新しい培地を加える。<sup>※2</sup>

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

