

ヒト iPS 細胞由来腸管上皮細胞

# F-hiSIEC™

FUJIFILM human iPS cell-derived  
Small Intestinal Epithelial like Cell

## 取扱説明書

本製品は日本国内でのみ、ご使用ください。

取扱説明の動画を以下の QR コード及び URL からご覧いただけます



<https://www.fujifilm.com/jp/ja/business/materials/rm/f-hisiec/manu>

1. 製品特徴 ..... P2

2. 培養に必要な製品 ..... P2

3. 製品操作説明 ..... P2

4. 使用例 (CYP3A4 代謝活性測定方法) ..... P8

補償について ..... P11

この度は富士フイルム株式会社ヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞「F-hiSIEC™」をご購入いただき、誠にありがとうございます。ご使用前に本取扱説明書をご一読いただき、ご使用ください。

## 1. 製品特徴

F-hiSIEC™ は、iPS細胞から分化誘導したヒト腸管上皮様細胞です。解凍後、9日間培養いただいたのちにご使用いただけます。

## 2. 培養に必要な製品

- ・凍結細胞：F-hiSIEC™
- ・凍結培地：F-hiSIEC™ Seeding Medium 1個  
F-hiSIEC™ Culture Medium 5個

※輸送温度が異なるため、凍結細胞と凍結培地は別々に輸送しております。  
※凍結細胞と各培地は別売です。



- ・取扱説明書(本冊子)

## 3. 製品操作説明

### 3.1 保管方法

#### F-hiSIEC™

到着後、ただちに開梱いただき、-150℃に設定したディープフリーザー、もしくは液体窒素中に保存してください。⚠️ドライアイスによる凍傷、窒息にご注意ください。

#### F-hiSIEC™ Seeding Medium

#### F-hiSIEC™ Culture Medium

到着後、ただちに開梱いただき、-20℃にて保存してください。

⚠️ドライアイスによる凍傷、窒息にご注意ください。

### 3.2 細胞の解凍および播種

#### 3.2.1 解凍前にご準備いただくもの

- 器材、特に Cell Culture Insert は Corning 社製品を推奨します。

※用途に応じて Plate あるいは Cell Culture Insert をご準備ください。

- ・ T-issue Culture Plate
- ・ Cell Culture Insert : 24 well plate
  - ① Corning 製トランズウェル(プレートとインサートのセット : # 3413)
  - ② Greiner Bio-One 製(プレート : #662-160、インサート : #662-640)

### - 試薬

- Matrigel Matrix Growth Factor Reduced (CORNING #354230)
- DMEM / F12(1:1) (Gibco #11330-032)
- F-hiSIEC™ Seeding Medium

### - 解凍前に行う作業

- マトリゲルのコーティング  
(細胞を解凍する前日～1週間前に使用する容器にマトリゲルをコートする)

下の表から必要なコート量を計算する

容器	コート量 (mL)/well
24 well plate	0.57
48 well plate	0.29
96 well plate	0.1
Cell Culture Insert	0.1



マトリゲルをDMEM / F12で30倍希釈し、コート液をつくる



容器をコーティングし、4℃で静置保存する

## 3.2.2 解凍および播種方法

### - 使用するもの

- 事前にマトリゲルコートされた Plate や Cell Culture Insert (Cell Culture Insertは、24 well plate 上にセットしたまま使用)
- F-hiSIEC™ Seeding Medium (解凍後当日のみ使用可能)
- F-hiSIEC™
- ウォーターバス
- 安全キャビネット
- 操作に使用する電動ピペッターやマイクロピペット
- 遠心機
- 細胞数をカウントするもの  
血球計算板はC-Chip Burker-Turk (Nano EnTeck DHC-B02) をご使用ください
- CO<sub>2</sub> インキュベーター
- Cell Culture Insert をつまむ、精密作業に適したピンセット等
- 10 mL / 2 mL のピペット (電動ピペッター用)
- 1,000 μL / 200 μL のチップ (マイクロピペット用)
- 15 mL の遠沈管

## 解凍および播種

※ 安全キャビネット内で作業してください。

### i) Plateの場合

マトリゲルコートをしたPlateを30分以上室温に静置



37°Cに設定したウォーターバスにてF-hiSIEC™ Seeding Mediumを融解  
(融けたら10分以内に取り出す)



電動ピペッターと10 mLのピペットを用いてよく混ぜる  
15 mLの遠沈管に9 mLを移す



マトリゲルを抜き取り、乾燥を防ぐため、F-hiSIEC™ Seeding Mediumを  
下記の量を添加する

容器	培地量(μL)/well
24 well plate	300
48 well plate	150
96 well plate	50



バイアルを37°Cに設定したウォーターバスにて融解  
(約2~3分。小さい氷塊が残る程度に加温する)



電動ピペッターと2 mLのピペットを用いて細胞懸濁液を回収し  
すぐに、9 mLのF-hiSIEC™ Seeding Mediumを入れた遠沈管に全量添加  
バイアルを共洗いし、すべての細胞を移す



遠心：200×g、5分間、室温



上清を吸い取り、軽くタッピングして cell pellet を崩す。マイクロピペットと 1,000  $\mu$ L のチップを用いて 1 mL の F-hiSIEC™ Seeding Medium を添加しゆっくり 2~3 回ピペッティングする



### セルカウント

※お客様ご自身で生細胞数をカウントいただいた結果、出荷検査表の弊社測定結果よりも多い場合は、弊社測定結果の数値を元に播種量を計算いただくよう、お願いいたします。



事前に F-hiSIEC™ Seeding Medium を添加した well に下記細胞数になるように調製し、マイクロピペットを用いて播種する細胞を均一に播種するため一度だけゆっくりピペッティングを行う

容器	細胞数 ( $3.09 \times 10^5$ cells/cm <sup>2</sup> )/well
24 well plate	$5.9 \times 10^5$
48 well plate	$3.0 \times 10^5$
96 well plate	$1.0 \times 10^5$



37°C 5% CO<sub>2</sub> に設定した CO<sub>2</sub> インキュベーターへ入れる

## ii) Cell Culture Insertの場合

※ 化合物の細胞膜透過性評価などの際は、Insertをお使いください。

マトリゲルコートをした Cell Culture Insert を30分以上室温に静置

37°Cに設定したウォーターバスにてF-hiSIEC™ Seeding Mediumを融解  
(融けたら10分以内に取り出す)

安全キャビネットに入れ、電動ピペッターと10 mLのピペットを用いてよく混ぜる  
15 mLの遠沈管に9 mLを移す

マトリゲルを抜き取り、F-hiSIEC™ Seeding Mediumを、マイクロピペットを用いて  
Cell Culture Insertに75  $\mu$ L/well、24 well plate側に600  $\mu$ L/well添加する

※ Cell Culture Insert側への添加には200  $\mu$ Lのチップ、  
24 well plate側には1,000  $\mu$ Lのチップをご使用ください。

バイアルを37°Cに設定したウォーターバスにて融解  
(約2~3分。小さい氷塊が残る程度に加温する)

電動ピペッターと2 mLのピペットを用いて細胞懸濁液を回収し  
すぐに、9 mLのF-hiSIEC™ Seeding Mediumを入れた遠沈管に全量添加  
バイアルを共洗いし、すべての細胞を移す

遠心：200 $\times$ g、5分間、室温

上清を吸い取り、軽くタッピングしてcell pelletを崩す。マイクロピペットと  
1,000  $\mu$ Lのチップを用いて1 mLのF-hiSIEC™ Seeding Mediumを  
添加しゆっくり2~3回ピペッティングする

### セルカウント

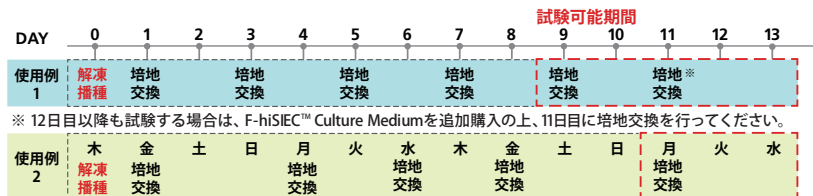
※ お客様ご自身で生細胞数をカウントいただいた結果、出荷検査表の弊社測定結果よりも  
多い場合は、弊社測定結果の数値を元に播種量を計算いただくよう、お願いいたします。

事前にF-hiSIEC™ Seeding Mediumを75  $\mu$ L添加したwellに  
 $1.0 \times 10^5$  cells/well播種する。細胞を均一に播種するため  
一度だけゆっくりピペッティングを行う

37°C 5% CO<sub>2</sub> に設定したCO<sub>2</sub> インキュベーターへ入れる

### 3.2.3 培地交換

- ・本製品は細胞を解凍・播種した翌日から、使用例1の通り、一日おきに培地交換を行ってください。培養9日目～13日目の間で試験実施可能ですが、12日目以降の試験にはF-hiSIEC™ Culture Mediumの追加購入が必要です。
- ・土曜日及び日曜日の培地交換を避ける場合は、使用例2の通り、木曜日に解凍・播種し、培養を開始してください。この場合、11日日月曜日から13日目水曜日まで試験実施可能です。



- ・初日の播種の際はF-hiSIEC™ Seeding Mediumをご使用ください。
- ・培養期間中の培地交換の際はF-hiSIEC™ Culture Mediumをご使用ください。

#### - 使用するもの

- ・ F-hiSIEC™ Culture Medium (解凍後当日のみ使用可能)
- ・ ウォーターバス
- ・ 操作に使用する電動ピペッターやマイクロピペット
- ・ 安全キャビネット
- ・ CO<sub>2</sub> インキュベーター
- ・ Cell Culture Insert をつまむ、精密作業に適したピンセット等
- ・ 10 mLのピペット(電動ピペッター用)
- ・ 1,000 μL / 200 μLのチップ(マイクロピペット用)

### 培地交換方法

※安全キャビネット内で作業してください。

#### i) Plateの場合

F-hiSIEC™ Culture Mediumを37℃に設定したウォーターバスにて融解  
(融けたら10分以内に取り出す)

F-hiSIEC™ Culture Mediumを電動ピペッターと  
10 mLのピペットを用いてよく混ぜる

マイクロピペットを用いて培地を抜き取り、下記の培地量で  
F-hiSIEC™ Culture Mediumを壁面に沿って添加する

容器	培地量(mL)/well	
	使用例1	使用例2
24 well plate	0.57	1.14
48 well plate	0.29	0.58
96 well plate	0.1	0.2

37℃ 5% CO<sub>2</sub> に設定したCO<sub>2</sub>インキュベーターに入れ培養



## ii) Cell Culture Insertの場合

F-hiSIEC™ Culture Mediumを37℃に設定したウォーターバスにて融解(融けたら10分以内に取り出す)

F-hiSIEC™ Culture Mediumを電動ピペッターと10 mLのピペットを用いてよく混ぜる

24 well plate 側の培地をマイクロピペットと1,000  $\mu$ Lのチップで抜き取る

Cell Culture Insert内の培地を、細胞に触れないように注意しながらマイクロピペットと200  $\mu$ Lのチップで抜き取り150  $\mu$ L/wellのF-hiSIEC™ Culture Mediumを壁面に沿って添加する

マイクロピペットと1,000  $\mu$ Lのチップを用いて24 well plate側に600  $\mu$ L/wellでF-hiSIEC™ Culture Mediumを添加する

37℃ 5% CO<sub>2</sub>に設定したCO<sub>2</sub>インキュベーターに入れ培養

## 4. 使用例

### CYP3A4 代謝活性測定方法

#### - 使用するもの

- F-hiSIEC™ Assay Medium (別売) (解凍後当日のみ使用可能)
- ウォーターバス
- 操作に使用する電動ピペッター、マイクロピペット
- Cell Culture Insert をつまむ、精密作業に適したピンセット等
- 10 mLのピペット(電動ピペッター用)
- 1,000  $\mu$ L / 200  $\mu$ Lのチップ(マイクロピペット用)

## 活性測定方法

※ CYP3A4 代謝活性を測定される場合は、専用の測定培地 F-hiSIEC™ Assay Medium(別売)の使用をお薦めいたします。

### i) 96 well plateの場合

F-hiSIEC™ Assay Medium を 37°C に設定したウォーターバスにて融解  
(融けたら 10 分以内に取り出す)

F-hiSIEC™ Assay Medium を電動ピペッターと  
10 mL のピペットを用いてよく混ぜる

F-hiSIEC™ Assay Medium を洗浄用と活性測定用に分け  
活性測定用には任意の基質を溶かす

マイクロピペットと 200  $\mu$ L のチップを用いて F-hiSIEC™ Culture Medium を  
抜き取り、100  $\mu$ L / well の F-hiSIEC™ Assay Medium で 1 回洗浄する

マイクロピペットを用いて基質を溶かした F-hiSIEC™ Assay Medium を添加する

所定時間、所定温度で培養し、上清を回収

測定

## ii) Cell Culture Insert の場合

F-hiSIEC™ Assay Medium を 37°C に設定したウォーターバスにて融解  
(融けたら 10 分以内に取り出す)

F-hiSIEC™ Assay Medium を電動ピペッターと  
10 mL のピペットを用いてよく混ぜる

F-hiSIEC™ Assay Medium を洗浄用と活性測定用に分け  
活性測定用には任意の基質を溶かす

マイクロピペットを用いて F-hiSIEC™ Culture Medium を抜き取り  
Cell Culture Insert 内と 24 well plate 側を F-hiSIEC™ Assay Medium で  
1 回洗浄する (Cell Culture Insert 内 : 150  $\mu$ L、24 well plate 側 : 600  $\mu$ L)

※ Cell Culture Insert 側の添加には 200  $\mu$ L のチップ  
24 well plate 側の添加には 1,000  $\mu$ L のチップをご使用ください。

マイクロピペットを用いて基質を融かした F-hiSIEC™ Assay Medium を  
Cell Culture Insert 内と 24 well plate 側に添加する  
(Cell Culture Insert 内 : 150  $\mu$ L、24 well plate 側 : 600  $\mu$ L)

※ Cell Culture Insert 側の添加には 200  $\mu$ L のチップ  
24 well plate 側の添加には 1,000  $\mu$ L のチップをご使用ください。

所定時間、所定温度で培養し、Cell Culture Insert 内と  
24 well plate 側の F-hiSIEC™ Assay Medium を回収する

測定

※ 測定例 CYP3A4 の基質としてミダゾラムを用いる場合

- ・ ミダゾラムの終濃度 5  $\mu$ M
- ・ 反応温度 37°C、2 時間反応させ、1'-ヒドロキシミダゾラムを LC/MS/MS で測定

## 補償について

本製品によって生じたいかなる事故、損害についても、弊社では責任を負いかねますので、ご了承ください。

# FUJIFILM

富士フイルム株式会社 ライフサイエンス事業部

Tel:03-6271-3030

<https://www.fujifilm.com/jp/ja/business/materials/rm/f-hisiec>