



アッセイプロトコル

トランスウェルプレートへの再播種及び TEER 測定

創薬研究用ヒト腎細胞
3D-RPTEC[®]

日機装株式会社

はじめに

このたびは、3D-RPTEC[®]をお買い上げいただきありがとうございます。本稿は3D-RPTECを用いたトランズウェルプレートへの再播種のプロトコル例を示したものになります。3D-RPTECを用いた評価のご参考になれば幸いです。

目次

1. 使用機器・試薬類	- 3 -
2. 実施方法	- 3 -
2-1. 事前準備	- 3 -
2-2. TW プレートへの再播種	- 4 -
2-3. TEER 測定	- 6 -
3. 問い合わせ先	- 6 -

1. 使用機器・試薬類

以下にトランズウェルプレート（セルカルチャーインサート）への再播種に必要な機器や試薬の一例を示しています。各施設での使用に合わせて適宜改変ください。

測定機器

- ・ Millicell® ERS 3.0 デジタル電圧抵抗計（Merck Millipore 社）

必要機材

製品名	製造販売	カタログ番号	規格/容量
細胞培養インサート	Greiner	662-641	24 well plate 用
細胞培養マルチウェルプレート	Greiner	662-160	24 well plate
細胞回収用遠沈管ステムフル*	住友ベークライト	MS-90150	15mL

*：スフェロイドの紛失防止のため、細胞回収時は低吸着遠沈管の使用を推奨しています。

試薬類

製品名	製造販売	カタログ番号	規格/容量
iMatrix-511 (silk)	富士フイルム和光 純薬（ニッピ）	387-10131	350 µg
Accumax	Innovative Cell Technologies	AM105	100 mL

2. 実施方法

2-1. 事前準備

以下にラミニンを用いたインサートのコート例を示します。**実験目的や使用される培養基材に応じて最適な条件でご使用ください。**

細胞播種前日にラミニン（iMatrix-511）でコーティング

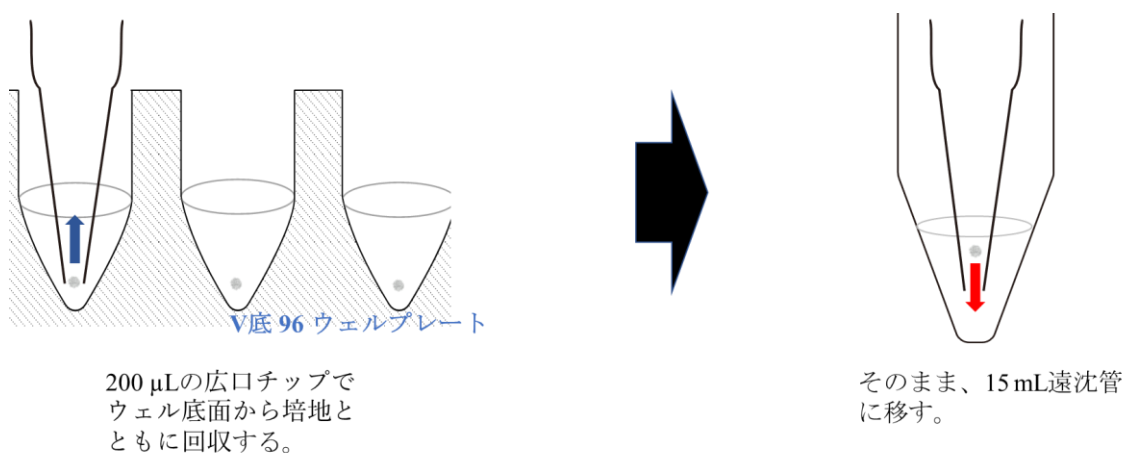
1. PBS(-)を 100 µL に対し、iMatrix-511 (0.5 µg/µL)を 1.1～3.3 µL の割合で混合して調製し、コーティング溶液とする（1 ウェルあたり 100 µL の分量で調製する）。
2. 必要数のインサートをマルチウェルプレートに設置する（TW プレート）。
3. コーティング溶液をインサートに 100 µL ずつ添加する。
4. コーティング液を添加した TW プレートを冷蔵庫（4℃）で一晩静置する。

2-2. TW プレートへの再播種

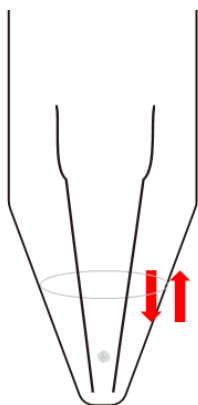
以下に、Greiner 製のプレートとインサートに再播種する例を示します。実験目的に応じて適宜改変してください。

1. 前日からコーティングした TW プレートを事前に 37°C インキュベーター内で 30 分以上静置する。
2. 3D-RPTEC を 15 mL 遠沈管（低吸着タイプを推奨）に回収する。

96well plate の場合の回収方法を下図に示す。6well plate の場合は培地交換時と同様にスフェロイドを手前のウェル底に沈めてから回収する。なお、納入直後に作業する際はウェル内の培地量が多いため、事前にウェル上層の培地を除去すると良い（納入時はウェル内の培地量が 8 mL のため、6 mL を除去するとウェル内の培地量が約 2 mL になる）。



3. PBS(-)で 1~2 回洗浄する。洗浄作業は回収したスフェロイドの入った 15 mL 遠沈管を遠心（160g×1 分間）し、培地を吸引除去してから PBS(-)を 10 mL 添加する。この洗浄作業を 2 回繰り返す。
4. PBS で洗浄後、遠沈管内に沈んだ細胞に Accumax を 1~2 mL 添加して 37°C（恒温槽）でインキュベートする。目安として、スフェロイドが 2000 個以上の場合 Accumax を 2 mL 反応させる。
5. 37°Cで 10 分間インキュベーションした後に、均一に反応させるため P1000 ピペットで軽くピペッティングを行う。さらに約 5 分間インキュベーションする。再度ピペッティングを行うことで多くの凝集塊がシングルセルに分散する。2 回目のピペッティングの際は P1000 ピペットでチップ先端をチューブ底に近づけてピペッティングする。

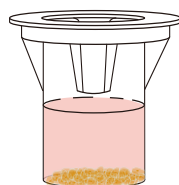
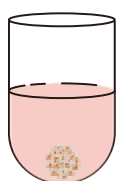


※細胞の塊が見えなくなり、均一な懸濁液状態になるまで繰り返しピペッティングを行う。

6. 目視にてスフェロイド（粒状）から懸濁液状態になっていることを確認する。懸濁液状態になっていない場合はインキュベーションおよびピペッティングを適宜追加する。
7. Accumax 添加量の 4 倍量以上の専用培地を混和して中和する。
8. 中和した細胞懸濁液を遠心（160g×5 分間）し、専用培地 1～2 mL で再懸濁する。セルカウントして必要細胞数分を分取する。ピペット誤差を考慮して再播種するウェル数+1 ウェル程度の分量を分取することを推奨する。24well プレーットのインサートへ再播種する場合、 2×10^4 cells/well 付近の細胞数を播種することでインサートの膜上に単層で培養できる。

※播種密度はインサートの形状・型式や培養条件によって異なります。

9. 再播種に必要な容量になるように専用培地を追加添加する。インサートは 1 ウェルあたり 200 μ L/well とする。
10. TW プレーットのインサート内にあるラミニンコート液を吸引除去して細胞懸濁液を播種する。インサートに 200 μ L/well の細胞懸濁液を、ウェル底に 700 μ L/well の専用培地を添加し、インキュベーター内で培養する。
 ※上記のインサート及びウェル底の容量は Greiner 製のプレートとインサートに再播種し、Millicell® ERS 3.0 で TEER を測定する際の推奨容量です。使用する実験器具に応じて適宜改変して下さい。
11. 再播種した TW プレートは翌日（再播種後 12 時間以降）に実験に使用する。



2-3. TEER 測定

弊社では以下の機器を用いて TEER を測定しています。

Millicell® ERS 3.0 デジタル電圧抵抗計 (Merck Millipore 社)

1. TEER 測定機器をクリーンベンチ内に持ち込む。
2. 24well plate に洗浄用の 70%エタノール（水で調製）及び滅菌水を用意する。電極を 70%エタノールで消毒した後、滅菌水に浸す。
3. 電極を風乾させた後、インサートとウェル底に電極を設置して TEER を測定する。
4. 測定後は 70%エタノールで消毒して滅菌水に浸して風乾させる。
5. 一連の測定が終了した後は定期的に電極を 1% Tergazyme 溶液に 5 分間浸したのち、滅菌水で洗って風乾してから電極を保管する。

3. 問い合わせ先

日機装株式会社

創薬研究用ヒト腎細胞お問い合わせアドレス

Mail: 3D-RPTEC@nikkiso.co.jp

HP: <https://www.nikkiso.co.jp/products/medical/3drptec/>

