CellSeed
Regenerate the Future

細胞培養器材 研究用

製品カタログ

再生医療に希望の種をまこう

日本初の再生医療基盤技術「細胞シート工学」を世界へ

セルシードは、日本発の「細胞シート工学」を基盤技術とし、
この技術に基づいて作成される「細胞シート」を用いて
従来の治療では治癒できなかった疾患や障害を治す再生医療アプローチである
「細胞シート再生医療」の世界普及を目指しています。

細胞シート工学とは

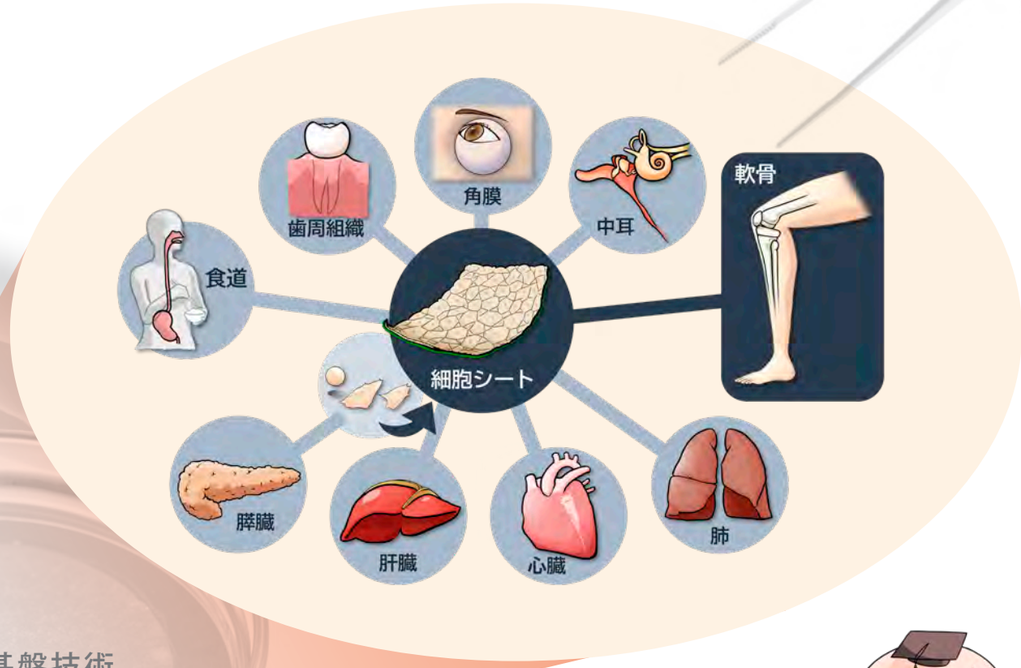
温度応答性細胞培養器材を用いて細胞をシート状に回収する技術です。

この技術を用いて作製された細胞シートは、従来の医療では治療困難であった疾患の治療を可能にすることが期待されます。

また、この技術は生体内のさまざまな組織、臓器の細胞を使用して細胞シートを作製することができ、複数枚の細胞シートを積層化して厚みのある組織・臓器を作製する研究も進んでいます。

細胞シートの特徴

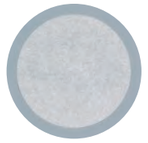
セルシード製品である *UpCell*® は温度応答性ポリマーがナノメートルレベルで固定化された表面（ナノバイオインターフェイス）を持っています。この表面で従来技術のように酵素処理を必要とせず、培養温度を変えるだけで培養細胞を回収することができ、さらに細胞と細胞の間にあるタンパク質を壊さないまま一枚のシートとして回収が可能です。



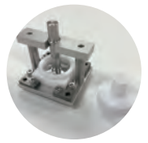
再生医療基盤技術

細胞培養器材

温度応答性細胞培養器材
UpCell®



UpCell® 専用 細胞シート回収用支持体
CellShifter™



UpCell® 専用 細胞シート積層化デバイス
CellStamp for UpCell®

温度応答性細胞培養器材
RepCell®

超低付着性細胞培養器材
HydroCell®

幹細胞分画回収キット
VIVANT-CELL®-POT with *UpCell*® Plate

自己軟骨細胞シート

同種軟骨細胞シート

再生医療周辺機器

TER 自動測定装置

エントリーモデル
cellZscope E

スタンダードモデル
cellZscope +

高頻度測定モデル
cellZscope 2

高速測定モデル
cellZscope 3

UpCell®/*RepCell*® 専用 ガラスヒーター

ThermoPlate® III

再生医療受託サービス

細胞シート製造受託サービス

弊社の CPC は、特定細胞加工物製造許可（施設番号：FA3160008）及び再生医療等製品製造業許可（許可番号 :13FZ110001号）を取得し、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」、「再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令（GCTP）」に準拠した製造・品質管理体制を構築し、安全で高品質な細胞シートの受託開発、製造サービスを提供いたします。

細胞培養技術者教育

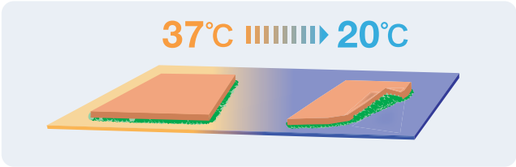
細胞シートの培養や剥離手順など、これまで細胞シートに触れた経験がない培養技術者などに対する教育を実施いたします。

UpCell®

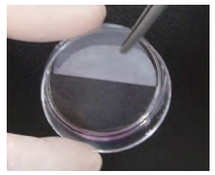
温度応答性細胞培養器材

コンフルエントになった細胞を細胞外マトリックスを保持した「細胞シート」として簡単に回収！

細胞シート回収イメージ図

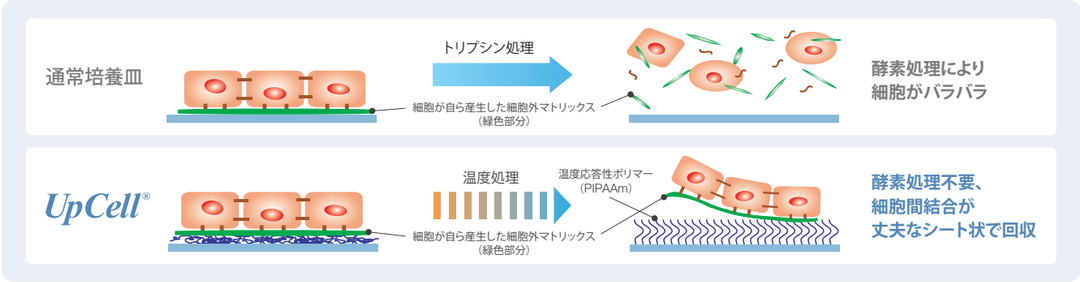


温度処理のみで細胞シートを回収



NIH/3T3 細胞を 1 週間培養。
コンフルエント確認後、吸水性膜（写真は ***CellShifter***™ 使用）を細胞シート支持体として用い、回収。

UpCell® と通常培養皿との細胞回収比較



処理方法の違いによる E- カドヘリンイムノブロット比較

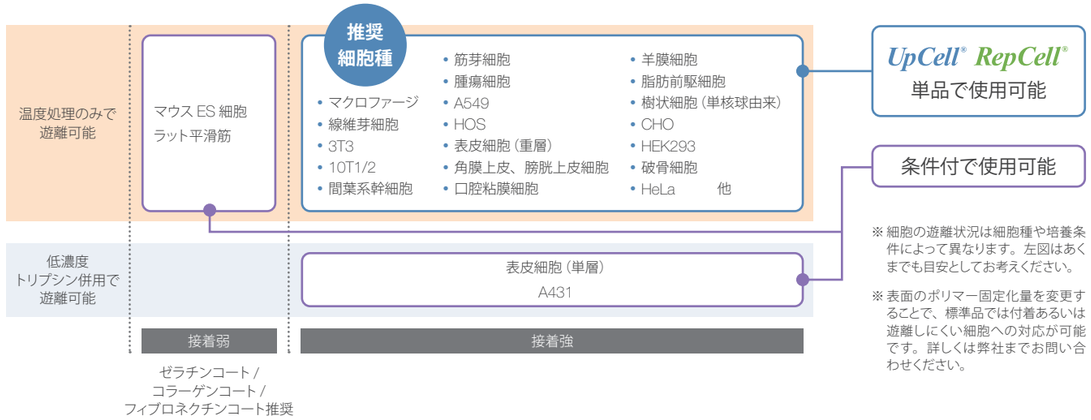
温度処理により回収した細胞の蛋白質は、タンパク質分解酵素処理の場合に比べ、全く無傷。

ヒト角膜上皮細胞　ヒト皮膚表皮細胞

D：ディスパーゼ処理　**T**：温度処理（***UpCell***® を使用）
S：スクレーピング

- 独自のナノ表面設計により温度応答性ポリマー（PIPAAm）を器材表面に固定化しました。
- これにより器材表面は 32℃を境に可逆的に疎水性（細胞接着表面）⇔親水性（細胞遊離表面）に変化。トリプシン等、細胞に損傷を与える酵素を一切用いることなく、温度を 20 ～ 25℃にして 10 ～ 30 分程度待つだけで無傷な細胞がシート状に回収できます。
- 回収した細胞シートは細胞外マトリックスを保持しているため、移植の際に縫合が一切不要です。また、細胞外に発現しているタンパク質なども低損傷な為、細胞シート同士を重ねた 3D 培養も容易です。
- なお、温度応答性ポリマーは器材表面に共有結合されていますので、細胞回収とともに剥がれることは一切ありません。

適用細胞種



※ 細胞の遊離状況は細胞種や培養条件によって異なります。左図はあくまでも目安としてお考えください。

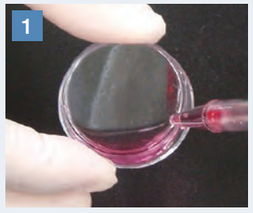
※ 表面のポリマー固定化量を変更することで、標準品では付着あるいは遊離しにくい細胞への対応が可能です。詳しくは弊社までお問い合わせください。

細胞シートのアプリケーション

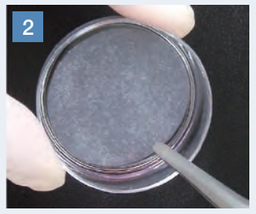
細胞外マトリックスを保持した細胞シートが回収できるから、以下の用途に最適です。

- 再生医療研究に用いる組織の培養
- ホモ / ヘテロな細胞シートを重ねる 3D 培養

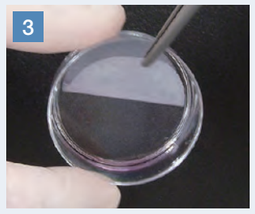
細胞シートの回収方法



細胞が十分コンフルエントになったら細胞が浸る程度に培地量を調整する。



温度処理を行った後、細胞シート支持体として吸水性のある支持体（品番 CSD001：***CellShifter***™ や親水性 PVDF 膜など推奨）を細胞表面にやさしく静置し、10 ～ 30 分程度温度処理を行います。



支持体と細胞シートを、ゆっくりとディッシュより剥がします。

※ 詳しくは P28 ～ 29 をご覧ください。

縫合不要の細胞シート

角膜上皮疾患モデル移植例

ご提供：くにたち動物病院　遠藤雅則先生

角膜上皮疾患モデルに角膜細胞シートを移植。上皮損傷のため、移植前は重度の角膜上皮混濁が認められる。縫合不要の角膜細胞シートの移植により角膜上皮の再建及び透明性の維持が確認できる。

参考文献

"Transplantation of canine corneal epithelial cell sheets cultured on temperature-responsive culture dishes." M. Endoh, I. Endoh, K. Nishida, M. Yamato, A. Masuda, Y. Tano and T. Okano, *ACVO 34th annual conference*, **Proceeding notes**, p.6 (2003)

"Functional Bioengineered Corneal Epithelial Sheet Grafts From Corneal Stem Cells Expanded *Ex Vivo* On A Temperature-Responsive Cell Cultureware Surface." K.Nishida, M.Yamato, Y.Hayashida, K.Watanabe, N.Maeda, H.Watanabe, K.Yamamoto, S.Nagai, A.Kikuchi, Y.Tano and T.Okano, *Transplantation*., **77**,379-385 (2004)

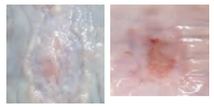
細胞シート移植

食道がん切除モデル移植例

内視鏡を用いた細胞シート移植

口腔粘膜細胞シート＋
支持体

がん切除後 4 週間



細胞シート
移植モデル　コントロール

ご提供：東京女子医科大学　先端生命医科学研究所　岡野光夫教授

食道がん切除モデルに口腔粘膜細胞シートを内視鏡にて移植。コントロールと比べ、細胞シート移植モデルでは治癒が大幅に促進。

参考文献

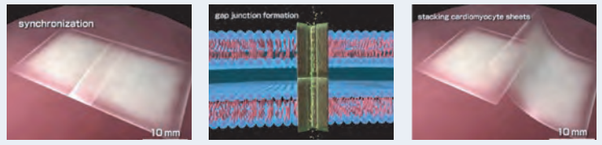
"Treatment of oesophageal ulcerations using endoscopic transplantation of tissue engineered autologous oral mucosal epithelial cell sheets in a canine model." T.Ohki, M.Yamato, D.Murakami, R. Takagi, J.Yang, H.Namiki, T.Okano and K.Takasaki, *GUT*., **55**, 1704-1710 (2006)

UpCell®

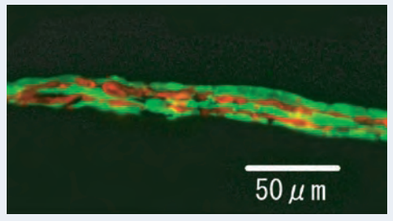
温度応答性細胞培養器材

細胞シートの積層化（3D 培養）により、力強い組織を構築

積層化心筋細胞シート



心筋細胞シート同士を重ねる。　表面のタンパク質が保持されているのでギャップジャンクションも容易に形成。　3D心筋細胞シートのできあがり。



筋芽細胞シート 5 枚を赤あるいは緑の蛍光標識試薬で染色後、交互に重ねて積層化。

- 細胞外マトリックスが保持されているから積層化したシート同士の接着が良好です。
- 積層化したシート同士は電気的に結合します。
- 細胞シート間結合は 30 分で完了します。

参考文献

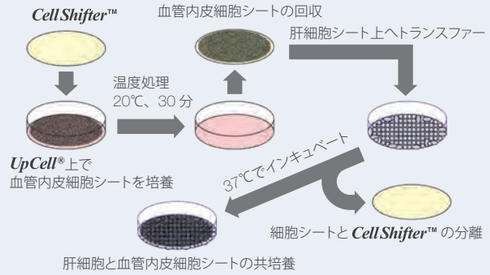
"Electrical coupling of cardiomyocyte sheets occurs rapidly via functional gap junction formation." Y.Haraguchi, T.Shimizu, M.Yamato, A.Kikuchi, T. Okano, *Biomaterials*., **27**,4765-4774 (2006).

"Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces." T.Shimizu, M. Yamato, Y. Isoi, T.Akutsu, T. Setomaru, K.Abe, A.Kikuchi, M.Umezu, T.Okano, *Circ. Res*., **90**,640-e48 (2002)

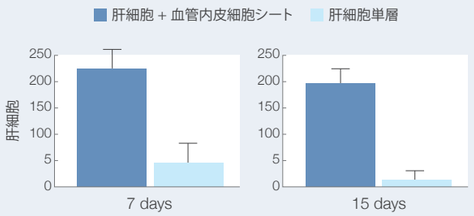
ヘテロな細胞シートの積層化（3D 培養）により、生体内環境を限りなく再現

肝細胞と血管内皮細胞の積層化で新しい肝細胞培養世界を構築

細胞シートの積層化

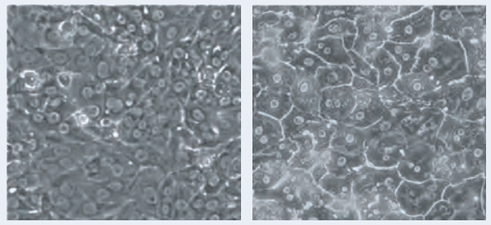


共培養でアルブミン産生を長期間維持



ご提供：東京女子医科大学　先端生命医科学研究所　岡野光夫教授

肝細胞 + 血管内皮細胞シート積層化で胆管形成



肝細胞培養単独（左）と血管内皮細胞シートを積層化した肝細胞（右）

血管内皮細胞シートの積層により、肝細胞の形態が良好に保て、細胞間に多数の毛細胆管が形成されることがわかる。

ご提供：東京女子医科大学　先端生命医科学研究所　岡野光夫教授

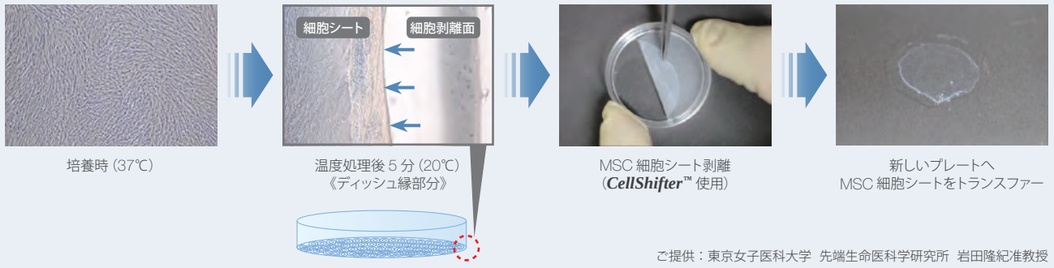
参考文献

"Engineering functional two- and three- dimensional liver system *in vivo* using hepatic tissue sheets." K.Ohashi, T. Yokoyama, M.Yamato, H. Kuge, H. Kanehiro, M.Tsutsumi, T. Amanuma, H.Iwata, J.Yang, T.Okano and Y. Nakajima, *Nat. Med*., **13**, 880-885 (2007)

"Novel approach for achieving double-layered cell sheet co-culture: overlaying endothelial cell sheets onto monolayer hepatocytes utilizing temperature-responsive culture dishes." M.Harimoto, M.Yamato, M.Hirose, C.Takahashi, Y. Isoi, A. Kikuchi, T. Okano, J. Biomed. *Mater. Res*., **62**, 464-470 (2002)

間葉系幹細胞シートの作製例

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞　細胞シートの場合※



培養時（37℃）　温度処理後 5 分（20℃）《ディッシュ縁部分》　MSC 細胞シート剥離（*CellShifter*™ 使用）　新しいプレートへ MSC 細胞シートをトランスファー

ご提供：東京女子医科大学　先端生命医科学研究所　岡野光夫准教授

準備

1. ***UpCell***® 3.5cm ディッシュ
2. ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（MSC）
3. 使用培地：MEM a Medium（Invitrogen, 32571-036）+ L-Ascorbic acid phosphate magnesium salt n-hydrate 82μg/mL（富士フイルム和光純薬, 013-19641）+ 10% FBS + 1% penicillin/streptomycin
4. ***CellShifter***™（3.5cm ディッシュ用）

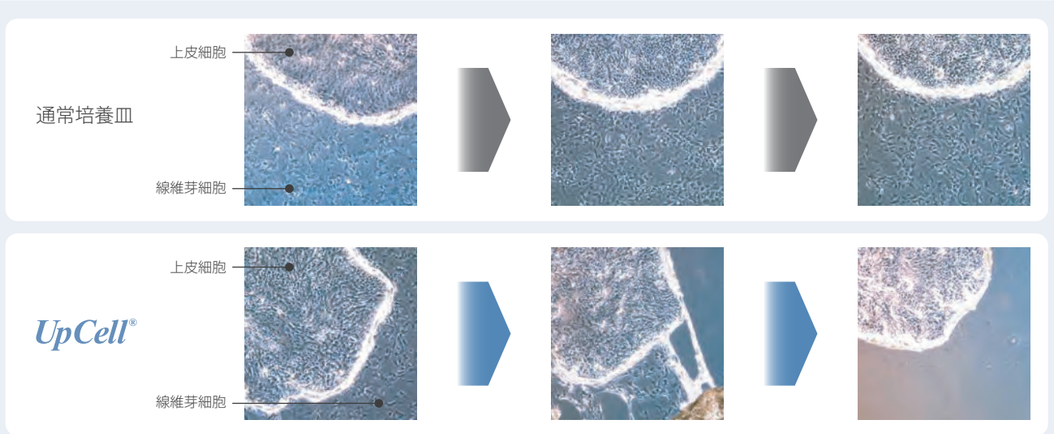
方法

1. MSC を ***UpCell***® に 1.0 × 10^5cells/dish で播種。
2. 37℃で 7 日間オーバーコンフルエントになるまで培養（週 2 回培地交換）。
3. インキュベータから取出し、培地を除去。
4. 細胞の上に ***CellShifter***™ を重ねる。
5. 20℃で 5 分静置。
6. ピンセットを使って剥離。

※ 他の細胞種では各種条件が異なる場合がございます。予めご了承ください。

接着力の違いを利用して簡単に細胞分離が可能

上皮細胞と線維芽細胞の分離※



方法

1. ***UpCell***® 6cm ディッシュに上皮細胞と線維芽細胞を播種し、培養します。
2. 室温（20℃）の培地で培地交換（2mL）を行い、15 ～ 30 分静置します。
3. 遊離した線維芽細胞をピペット等で回収します。

※ 他の細胞種では各種条件が異なる場合がございます。予めご了承ください。

UpCell®

温度応答性細胞培養器材

UpCell® 又は UpCell® 高剥離タイプからの細胞の脱離

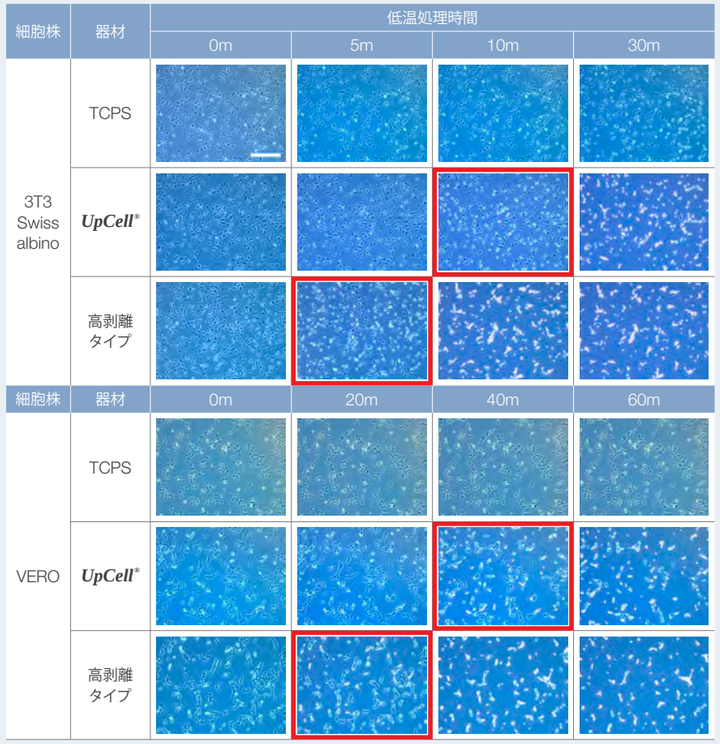
方法

1. 1.0 × 10^5 個の 3T3-Swiss albino 細胞及び VERO 細胞を 10%FBS、1% ペニシリン / ストレプトマイシン含有 DMEM 培地（以下、培地）で φ3.5cm ディッシュの ***UpCell®***、***UpCell®*** 高剥離タイプ及び組織培養用器材（Tissue culture polystyrene：TCPS）にそれぞれ播種し、インキュベーター内で静置した。
2. 翌日、器材をインキュベーターから取り出して光学顕微鏡のステージ上に設置し、同視野の画像を経時的にキャプチャした。

結果

インキュベーターから取り出した直後の各細胞の、各器材表面における形態はいずれも同様の状態であった。3T3-Swiss albino 細胞は顕微鏡のステージ上に静置後 10min、VERO 細胞は 40min で ***UpCell®*** から剥がれ始めた。高剥離タイプでは剥離開始までの時間が半減し、この間、TCPS ではいずれの細胞も剥離しなかった。

3T3-Swiss albino 細胞、VERO 細胞の温度処理による脱離の光学顕微鏡観察（Scale bar：500μm）



UpCell® を用いた細胞の回収

方法

1. 1.5 × 10^4 個の細胞株 8 種（3T3-Swiss albino、C2C12、neuro2a、CHO-K1、HeLa、A549、VERO、SH-SY5Y）を 10%FBS、1% ペニシリン / ストレプトマイシン含有 DMEM 培地（以下、培地）で φ3.5cm ディッシュの ***UpCell®*** にそれぞれ播種し、インキュベーター内で静置した。
2. 翌日、器材をインキュベーターから取り出し、予め 20℃に調温した培地で交換した後、低温インキュベーター内で 20℃、30min 静置した。
3. 静置後、器材を傾けて発生する培地の水流のみで細胞を剥離し、MTS アッセイ用に 96well プレートにサンプリングした。
4. CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay（プロメガ, G3581）を用いて MTS アッセイを行い、回収細胞を計数した。回収細胞はトリパンブルー色素排除法にて生存率を求めた。

※ 記載の温度処理方法はあくまでも一例です。細胞を剥離させる温度と時間は条件検討が必要です。

使用細胞株

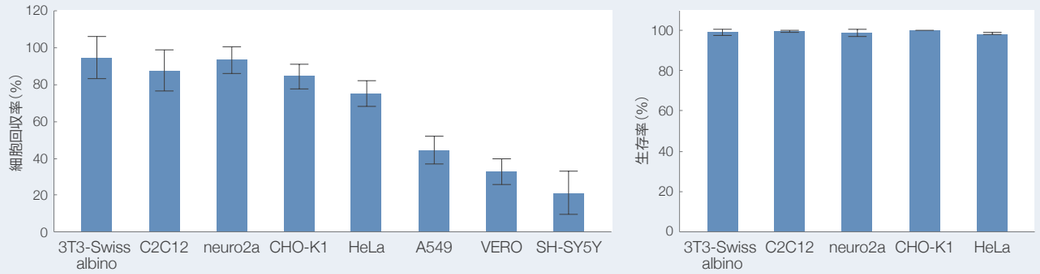
細胞種	由来組織
3T3-Swiss albino	マウス胎仔
C2C12	マウス筋
neuro2a	マウス神経芽細胞腫
CHO-K1	チャイニーズハムスター卵巣
HeLa	ヒト子宮頸癌
A549	ヒト肺腺癌
VERO	アフリカミドリザル腎臓
SH-SY5Y	ヒト神経芽細胞腫

UpCell® を用いた細胞の回収（続き）

結果

UpCell® からの回収率は今回用いた細胞種の中で 3T3-Swiss albino 細胞、C2C12 細胞等 5 種類の細胞種で 80% 以上であった。比較的接着性の強い細胞種である A549 細胞、VERO 細胞、SH-SY5Y 細胞の回収率は 50% に満たなかった（次項に、高剥離タイプで評価した結果を示す）。また、80% 以上の回収率を示した細胞種の生存率はいずれも 95% 以上であった。

UpCell® **による各種細胞の回収率（左）と生存率（右）**



UpCell® 高剥離タイプを用いた細胞の回収

前項に記載した ***UpCell®*** からの回収率が 50% 以下の細胞種について、***UpCell®*** 高剥離タイプを用いて同様に細胞を回収した。

方法

1. 1.5 × 10^4 個の細胞株 3 種（A549、VERO、SH-SY5Y）を 10%FBS、1% ペニシリン / ストレプトマイシン含有 DMEM 培地（以下、培地）で φ3.5cm ディッシュの ***UpCell®*** 高剥離タイプにそれぞれ播種し、インキュベーター内で静置した。
2. 翌日、器材をインキュベーターから取り出し、予め 20℃に調温した培地で交換した後、低温インキュベーター内で 20℃、30min 静置した。
3. 静置後、タッピングと器材を傾けて発生する培地の水流で細胞を剥離し、MTS アッセイ用に 96well プレートにサンプリングした。
4. CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay（プロメガ, G3581）を用いて MTS アッセイを行い、回収細胞を計数した。回収細胞はトリパンブルー色素排除法にて生存率を求めた。

※ 記載の温度処理方法はあくまでも一例です。

結果

いずれの細胞種も回収率が 80% 程度に向上し、比較的接着性の強い細胞種に関しては、高剥離タイプで回収可能であることが示された。また、回収した細胞種の生存率はいずれも 95% 以上であった。

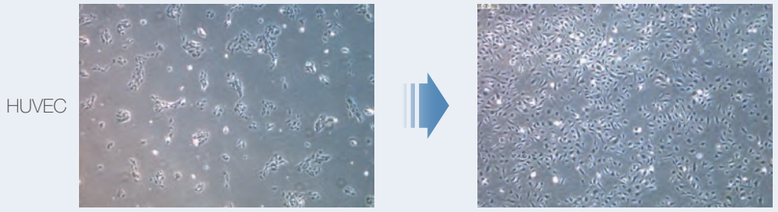
UpCell® **高剥離タイプによる各種細胞の回収率（上）と生存率（下）**

UpCell® 温度応答性細胞培養器材

UpCell® 表面へコーティング処理も行えます！

I 型コラーゲンコーティングの場合※

UpCell® 上に細胞と相性の良いマトリックス（コラーゲンやフィブロネクチン等）をコーティングする事で細胞の初期接着を向上させることができます。



コーティングなし　　コラーゲンコーティング処理

方法

1. 0.02N 酢酸溶液を用いて、500μg/mL の I 型コラーゲン溶液を調製する。
2. ***UpCell®*** 3.5cm ディッシュに 1mL 滴下し、全体に行き渡らす。
3. 37℃、1 時間静置する。
4. コラーゲン溶液を除去し、予め 37℃に加温した 1mL の PBS で洗浄する。
5. コラーゲンコーティングした ***UpCell®*** に HUVEC 細胞 10,000cells/cm² 播種する。
6. 37℃インキュベータで培養する。
7. 2 日後、細胞の接着状態を観察する。《詳細は FAQ 集 P39 をご参照ください》

※ 室温に温度低下させますと、コラーゲンコートは剥離しますのでご注意ください。
他のコーティング剤や細胞種での条件は FAQ 集 P39 をご参照ください。

UpCell® 温度応答性細胞培養器材

品名	96 Multi-well plate		48 Multi-well plate		24 Multi-well plate		12 Multi-well plate		6 Multi-well plate	
サイズ (mm)	86 (L) × 128 (W)		86 (L) × 128 (W)		86 (L) × 128 (W)		86 (L) × 128 (W)		86 (L) × 128 (W)	
表面積	0.33cm²/well		1.1 cm²/well		1.9cm²/well		3.5cm²/well		9.6cm²/well	
容量	0.4mL/well		0.5mL/well		1mL/well		2mL/well		3mL/well	
品番	CS1001	CS1002	CS3001	CS3011	CS3002	CS3012	CS3003	CS3013	CS3004	CS3014
包装	20 枚	5 枚	20 枚	5 枚	20 枚	5 枚	20 枚	5 枚	20 枚	5 枚
希望販売価格（税抜）	¥90,000	¥25,000	¥87,000	¥24,000	¥87,000	¥24,000	¥87,000	¥24,000	¥87,000	¥24,000

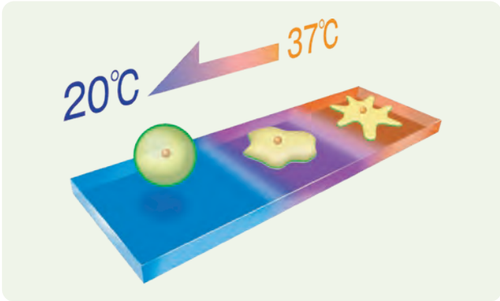
品名	10cm dish		6cm dish		3.5cm dish		High Detachment 3.5cm dish		Low Detachment 3.5cm dish	
サイズ (mm)	92 (D) × 17 (H)		60 (D) × 15 (H)		40 (D) × 12 (H)		40 (D) × 12 (H)		40 (D) × 12 (H)	
表面積	56.7cm²		21.5cm²		8.8cm²		8.8cm²		8.8cm²	
容量	12.5mL		5mL		3mL		3mL		3mL	
品番	CS3005	CS3015	CS3006	CS3016	CS3007	CS3017	CS3101	CS3111	CS3102	CS3112
包装	20 枚	5 枚	20 枚	5 枚	20 枚	5 枚	20 枚	5 枚	20 枚	5 枚
希望販売価格（税抜）	¥125,000	¥35,000	¥63,000	¥18,000	¥50,000	¥14,000	¥89,000	¥25,000	¥89,000	¥25,000

品名	T75 Flask		T175 Flask	6well Cell Culture Insert
サイズ (mm)	81 (W) × 127.3 (L)* * キャップ及びネックを除く		115.6 (W) × 200.2 (L)* * キャップ及びネックを除く	23 (D) × 17 (H)
表面積	75cm²		175cm²	4.2cm²
容量	260mL		550mL	0.4μm * ポアサイズ
品番	CSUF075	CSUF075S	CSUF175	CS3008
包装	20 個	4 個	4 個	12 個
希望販売価格（税抜）	¥100,000	¥22,000	¥40,000	¥40,000

UpCell®/RepCell® 温度応答性細胞培養器材

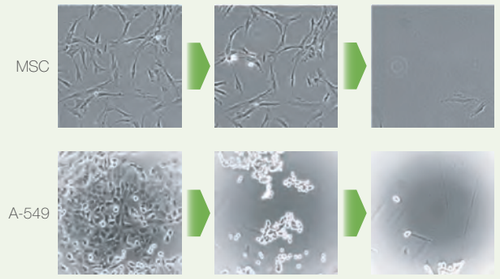
トリプシン不要！ シングル / コロニー状で無傷な細胞が回収可能！

器材表面イメージ図



RepCell® とは、温度応答性培養器材 ***UpCell®*** の表面に「グリッド・ウォール™」を設けたディッシュで、これによりシングルセル / 小コロニー状での細胞の回収が容易になりました。

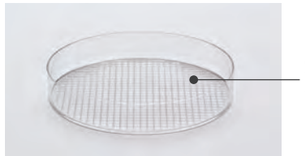
RepCell® による細胞の遊離



培養時（37℃）　温度処理後 30 分（20℃）　ピペッティング後

※ 細胞の遊離状況は細胞種や培養条件によって異なります。

新技術「グリッド・ウォール」とは？



3mm × 3mm
グリッド・ウォール™

- ディッシュ表面に 3mm 間隔で細胞の伸展を阻む特殊な加工溝を配置。
- シングルセルの回収が容易になる為、フローサイトメトリー解析に用いる細胞の回収器材として最適です。

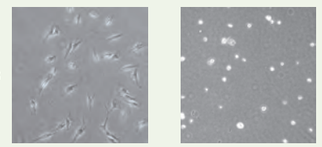
幅広いアプリケーション

細胞を無傷な状態で簡単に回収できるので、以下の用途に最適です。

- フローサイトメトリー用の細胞回収
- マクロファージの回収
- 無傷な細胞懸濁液の回収（下記「***RepCell®*** での細胞懸濁液回収方法」参照）
- 細胞間結合が弱い細胞の継代（下記「***RepCell®*** での細胞継代方法」参照）

RepCell® での細胞懸濁液回収方法

1. シングルセル状態の細胞を ***RepCell®*** に低密度に播種し、24 時間培養。
2. 細胞が再び分裂する前に、温度処理により回収します。

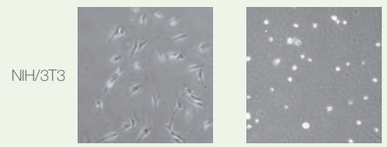


培養時　回収細胞懸濁液

播種数 1 × 10⁴cells 24 時間培養
RepCell® 6cm デッシュ使用

RepCell® での細胞継代方法

細胞の状態が回収したい状況になったら、温度処理により細胞を遊離させ、塊状の細胞を軽く数回ピペッティングしてほぐし、継代します。



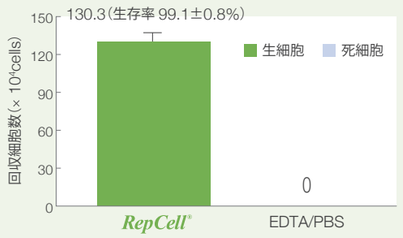
培養時　回収細胞懸濁液

播種数 1 × 10⁵cells 72 時間培養
RepCell® 6cm デッシュ使用

UpCell®/RepCell® 温度応答性細胞培養器材

トリプシンで剥がれにくいマクロファージも簡単に回収！

PMA 刺激した HL-60 の回収



ご提供：東邦大学理学部　小林芳郎教授

方法

1. HL-60 を ***RepCell®*** 及び通常の細胞培養用 100mm ディッシュに 1.7 × 10^5cells/cm^2 で播種。
2. 100nM PMA で 3 日間、分化誘導。
3. PMA を除去して 2 日間、培養。
4. PBS 洗浄して浮遊細胞を除去後、細胞回収
   RepCell®：温度処理（氷冷、5 分※）。
   EDTA/PBS：0.25mM EDTA 処理（氷冷、5 分※）。
5. 細胞数算定、生存率算定。

※ 細胞回収時の温度は 20 ～ 25℃を推奨しております。説明本文中の条件は時間短縮を目的に急冷処理を行っています。冷やしすぎにはご注意ください。

参考文献

"A new approach to isolation and culture of human Kupffer cells." E.B. Alabraba, S.M. Curbishley, W.K. Lai, S.J. Wigmore, D.H. Adams, and S.C. Afford, *Journal of Immunological Methods*., **326**, 139-144 (2007)

"Defective antitumor function of monocyte-derived macrophages from epithelial ovarian cancer patients." I.O. Gordon, and R.S. Freedman, *Clinical Cancer Research*., **12**, 1515-1524 (2006)

UpCell® による RAW264.7 細胞の回収

方法

1. 1.0 × 10^6 個の RAW264.7 細胞を 10%FBS、1％ペニシリン / ストレプトマイシン含有 DMEM 培地（以下、培地）で φ10cm ディッシュの ***UpCell®*** または組織培養用器材（Tissue culture polystyrene：TCPS）にそれぞれ播種し、インキュベーター内で静置した。
2. 翌日、器材をインキュベーターから取り出し、***UpCell®*** では温度処理（20 ℃、30min）、TCPS ではトリプシン処理（37℃、5min）またはスクレーパーで細胞を剥離、回収した。
3. トリパンブルー染色法によって回収細胞を計数すると共に生存率を算出した。

結果

UpCell® に播種した RAW264.7 細胞の温度処理前の接着形態は、TCPS に播種した際の接着形態と同等であった（図 1）。播種翌日、***UpCell®***（温度処理）、スクレーパー処理、トリプシン処理いずれも 95%以上の細胞が回収できた。生存率においては ***UpCell®*** およびトリプシン処理では 95%以上である一方、スクレーパー処理は 25%以下であった（図 2）。

図 1. *UpCell®*（左図）及び TCPS（右図）で培養した RAW264.7 細胞の位相差顕微鏡像

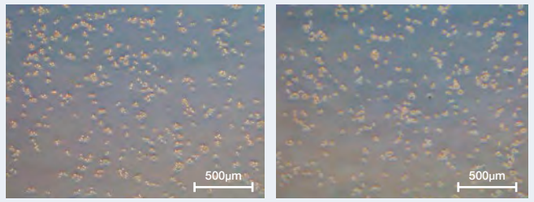
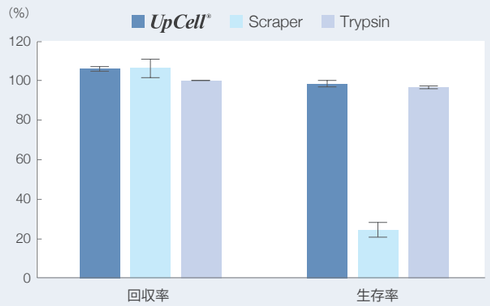


図 2. 種々細胞回収法による細胞の回収率と生存率



UpCell® で回収した RAW264.7 細胞の膜タンパク質保持量評価

方法

1. 9.0 × 10^5 個の細胞を φ 6cm の ***UpCell®*** または TCPS にそれぞれ播種した。
2. 翌日、器材をインキュベーターから取り出し、***UpCell®*** では温度処理（20 ℃、30min）、TCPS ではトリプシン処理（37℃、5min）またはスクレーパーで細胞を剥離、回収した。
3. ウエスタンブロット法を用いて CD11b ならびに F4/80 を標識、検出した。
4. それぞれの全長及び切断された膜タンパク質量をβ-Actin 量及びトリプシンで回収した細胞の全長膜タンパク質量で規格化した。

結果

UpCell® で回収した RAW264.7 細胞の全長 CD11b、F4/80 保持量はトリプシン処理で回収した細胞と比較して各々 13 倍、25 倍以上であり、温度処理で細胞が温和に回収できることが示された（図 3、4）。

図 3. 種々細胞回収法による CD11b のウエスタンブロット評価

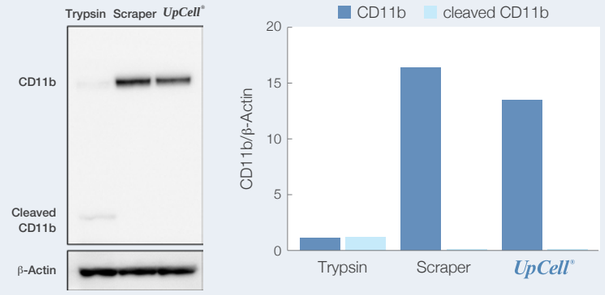
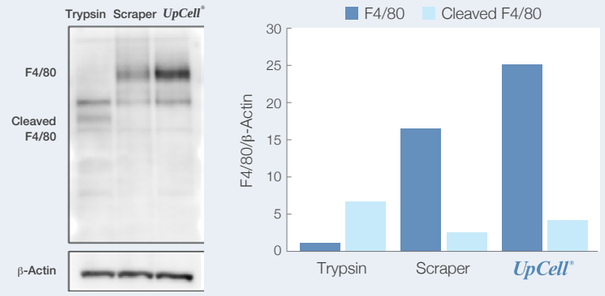


図 4. 種々細胞回収法による F4/80 のウエスタンブロット評価



UpCell® で回収した RAW264.7 細胞の液性因子産生量評価

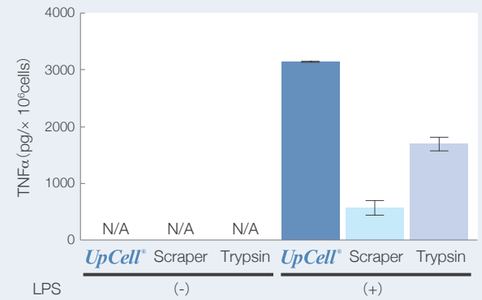
方法

1. 5.0 × 10^5 個の細胞を 12 マルチウェルプレートの ***UpCell®*** 又は TCPS にそれぞれ播種した。
2. 翌日、器材をインキュベーターから取り出し、***UpCell®*** では温度処理（20℃、30min）、TCPS ではトリプシン処理（37℃、5min）またはスクレーパーで細胞を剥離、回収し、新しい TCPS にそれぞれ再度播種した。
3. 翌日、10ng/mL リポ多糖（LPS）含有培地に交換し、細胞を 2h 刺激した後、上清を回収した。
4. ELISA 法を用いて、TNF-αの産生量を測定した。

結果

UpCell® で回収した RAW264.7 細胞の TNF-α産生量はトリプシン処理またはスクレーパーで回収した細胞と比較して各々 2.6 倍、2.1 倍以上であり、温度処理で回収した細胞の活性が高いことが示された（図 5）。

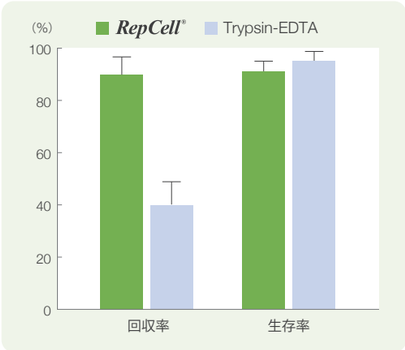
図 5. 種々回収法で回収した細胞の TNF-α の ELISA 評価



UpCell®/RepCell® 温度応答性細胞培養器材

成熟樹状細胞（mDC）も、高回収率・高活性！

剥がれにくい mDC も抜群の回収率



● ***RepCell®*** では生存率の高い mDC が 9 割以上回収可能。

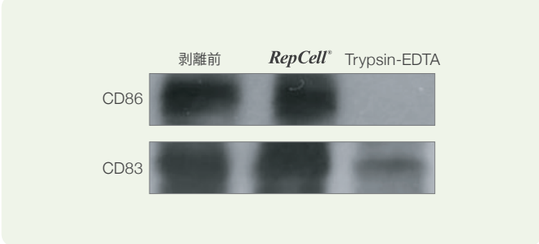
方法

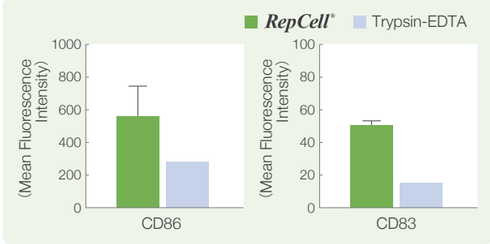
1. ヒトバフィーコートを PBS にて希釈、リンホセパール I に重層させた後、400xg、30 分間遠心。中間層の PBMC 画分を分取し、PBS で 3 回遠心。
2. 分離した PBMC を 24 時間培養、浮遊細胞を吸引除去。GM-CSF 及び IL-4 を加え 5 日間培養。未熟樹状細胞（iDC）へ誘導《プライマリアカルチャーウェア（BD Falcon）使用》。
3. 回収した iDC を ***RepCell®*** に播種。OK-432（ピシバニール）を加え 48 時間培養、iDC を成熟化（mDC）。
4. 細胞回収方法
   RepCell®：4℃※の PBS を加え室温（25℃）で 5 分静置後、ピペッティング。
   Trypsin-EDTA：トリプシン処理（37℃、5 分）。
5. 細胞数算定、生存率算定。

※ 説明本文中の条件は時間短縮を目的に急冷処理を行っています。冷やしすぎにはご注意ください。

CD86 及び CD83 の発現量の比較

● ウェスタンブロッティング（下左）及びフローサイトメトリー（下右）により解析。





方法

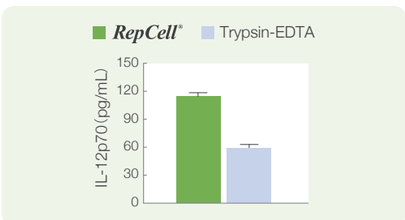
1. 細胞溶解液を加えた後、サンプル調製し SDS 電気泳動及びブロッティング。
2. 抗ヒト CD83 抗体及び抗ヒト CD86 抗体を使用し反応及び検出。

※ シグナルの減弱がフローサイトメトリー解析の場合と比べて、より著しいが、これは分解を受けやすい C 末端付近に結合する抗体を使用しているためである。

方法

1. 1%FBS を含む PBS に抗ヒト CD83 抗体、抗ヒト CD86 抗体、またはアイソタイプコントロール抗体を加え 30 分インキュベート。
2. 1%FBS を含む PBS で 3 回洗浄後、フローサイトメトリー解析。

IL-12 の産生も良好



方法

1. 0.1KE/mL OK-432 を含む培地で 48 時間培養。
2. Human IL-12（p70）ELISA キットを使用して培地を測定。

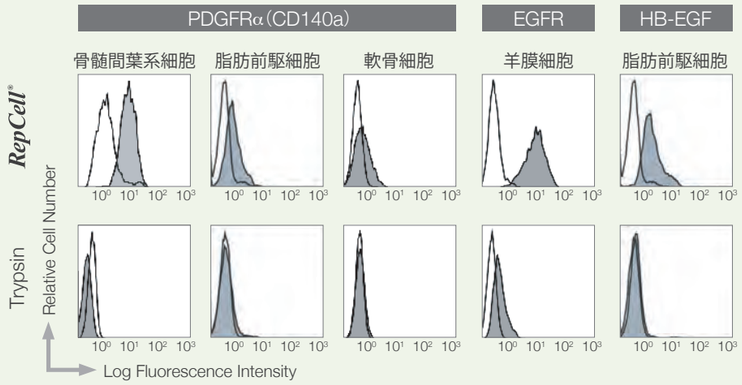
参考文献

" 温度応答性培養皿を用いた OK-432 誘導成熟樹状細胞培養法の確立 " 三好信寛、澤口和弘、増田彰、横見瀬裕保、紺谷桂一、,22,177-181(2008)

"Effects of dexamethasone on rat dendritic cell function." C.L. Butts, S.A. Shukair, K.M. Duncan, C.W. Harris, E. Belyavskaya, and E.M. Sternberg, *Hormone and metabolic research* Hormon- und Stoffwechselforschung, **39**, 404-412 (2007)

"Progesterone inhibits mature rat dendritic cells in a receptor-mediated fashion." C.L. Butts, S.A. Shukair, K.M. Duncan, E. Bowers, C. Horn, E. Belyavskaya, L. Tonelli, and E.M. Sternberg, *International immunology.*, **19**, 287-296 (2007)

フローサイトメトリー用の細胞回収に最適！



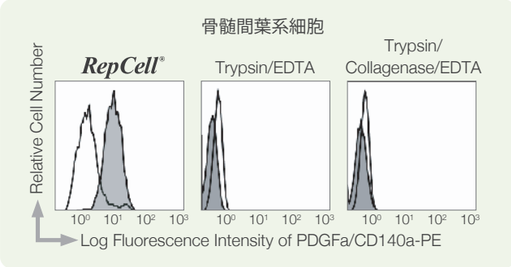
● トリプシンに弱い抗原の検出が可能。

● 幅広い細胞種で利用可能（***UpCell®***「適用細胞種」P4 参照）。

方法

1. ***RepCell®*** 及び通常の細胞培養用ディッシュに上記の細胞を 6 ～ 10 × 10^3cells/cm^2 で播種し、24 時間培養。
2. ***RepCell®***：***RepCell®*** 上の細胞を温度処理（20℃、20 ～ 30 分）により細胞を回収。（細胞種によりピペッティングが必要です）
   Trypsin：通常の細胞培養用ディッシュ上の細胞をトリプシン処理（37℃、3 分）により細胞を回収。
3. 回収した細胞を PE 標識抗体と 4℃、1 時間インキュベート後、フローサイトメトリー解析。

酵素処理の抗原分子に与える影響



● タンパク質分解酵素に弱い抗原を保護。

● 左：***RepCell®*** で温度処理（20℃、30 分）により細胞を回収。

● 中央：トリプシン処理（37℃、3 分）により回収。

● 右：トリプシン / コラゲナーゼ /EDTA 処理（37℃、3 分）により細胞を回収。

● 回収した細胞を PE 標識抗体と 4℃で 1 時間インキュベート後、フローサイトメトリー解析。

RepCell® 温度応答性細胞培養器材

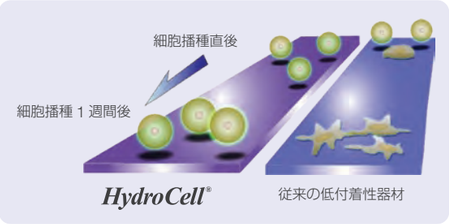
品名	10cm dish		6cm dish		3.5cm dish	
サイズ（mm）	92（D）× 17（H）		60（D）× 15（H）		40（D）× 12（H）	
表面積	56.7cm^2		21.5cm^2		8.8cm^2	
容量	12.5mL		5mL		3mL	
品番	CS1005	CS1015	CS1004	CS1014	CS1003	CS1013
包装	20 枚	5 枚	20 枚	5 枚	20 枚	5 枚
希望販売価格（税抜）	¥135,000	¥38,000	¥70,000	¥20,000	¥55,000	¥16,000

HydroCell®

超低付着性細胞培養器材

細胞培養面で、細胞の付着を完全抑制

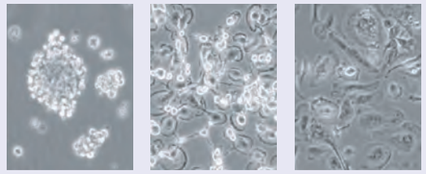
器材表面イメージ図



- 独自のナノ表面設計技術を応用し、超親水性ポリマーを器材表面に固定しました。
- 細胞が全く付着しないから以下の用途に最適です。
  - ES 細胞の胚様体形成
  - マクロファージの培養
  - スフェロイド形成
  - ソフト・アガー・アッセイの代替

その差歴然！ 優れた低付着性能がもたらす確かなアプリケーション

マクロファージの付着も完全抑制



❶ *HydroCell*®　❷ 従来の低付着性器材　❸ 通常培養皿

❶ ***HydroCell***®、❷従来の低付着性器材、❸通常培養皿でマウス腹腔マクロファージを 24 時間培養。

❶ ***HydroCell***® では 99% 超の細胞が浮遊しているのに対し、❷及び❸では細胞が付着（上図参照）。

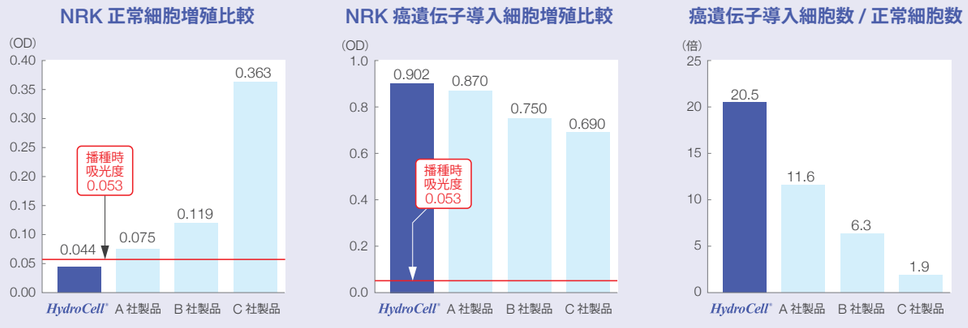
参考文献

"Neurosphere generation from dental pulp of adult rat incisor." R.Sasaki, S. Aoki, M. Yamato, H.Uchiyama, K.Wada, T.Okano and H.Ogiuchi. *The European Journal of neuroscience*., **27**, 538-548 (2008)

"Living cell positioning on the surface of gold film for SPR analysis." Y.Yanase, H.Suzuki, T.Tsutsui, I.Uechi, T. Hiragun, S.Mihara and M.Hide. *Biosensors & bioelectronics*., **23**, 562-567 (2007)

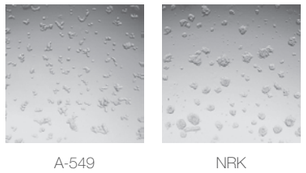
"A new approach to isolation and culture of human Kupffer cells." Edward B. Alabraba, Stuart M. Curbishley, Wai K. Lai, Stephen J. Wigmore, David H. Adams, Simon C. Afford. *Journal of Immunological Methods*., **326**, 139-144 (2007)

足場非依存性細胞の増殖は促進し、足場依存性細胞の増殖は正しく抑制！



※ 5 日間培養後に、それぞれの吸光度を測定。

メチルセルロース添加により
均一なスフェロイドの形成が可能

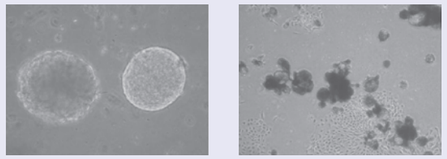


A-549　NRK

※ メチルセルロース (400cps) 濃度 0.6%

ES 細胞の胚様体もきっちり形成

器材表面イメージ図



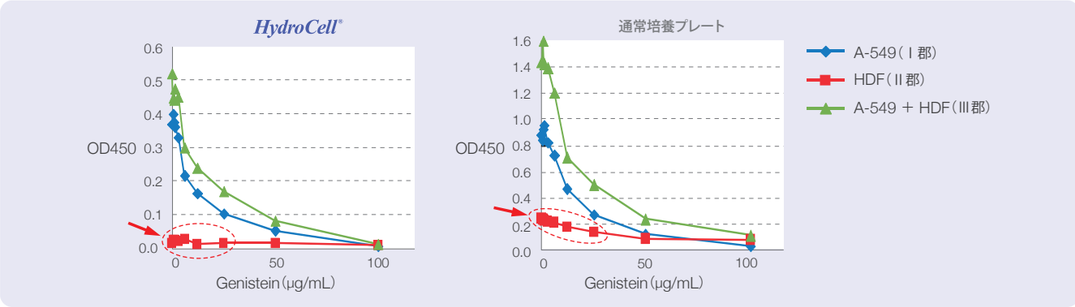
HydroCell®（浮遊・球形・均一）　バクテリア培養ディッシュ（付着・不均一）

- 左：***HydroCell***® では細胞の付着がなく、均一な胚様体の形成が可能。
- 右：バクテリア培養ディッシュでは細胞の付着が見られます。

※ 20%FBS 下で培養

抗がん剤のスクリーニングに最適

がん細胞試料に混在する線維芽細胞の増殖ノイズを抑え、抗がん剤の純粋な作用の測定が可能



方法

❶ ***HydroCell***® 96 穴平底マルチウェル及び 96 穴市販培養プレートに下記細胞を播種。
　Ⅰ群：A-549（2.0×10^3cells）
　Ⅱ群：線維芽細胞（HDF）（2.0×10^3cells）
　Ⅲ群：A-549（2.0×10^3cells）＋線維芽細胞（HDF）（2.0×10^3cells）

❷ 濃度の違う抗ガン剤（Genistein）を各ウェルに添加し 3 日間培養。

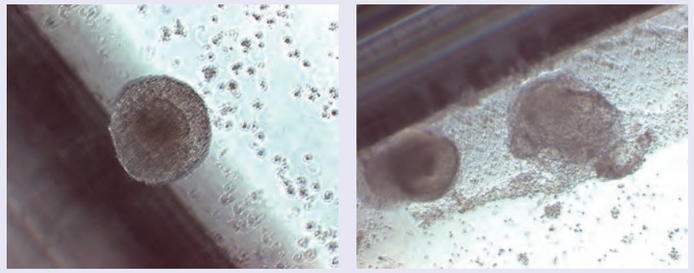
❸ 生細胞測定試薬を各ウェルに 10μL ずつ添加し、4 時間後に吸光度（OD450）を測定。

HydroCell®

超低付着性細胞培養器材

ヒト iPS 細胞 / ヒト ES 細胞でのスフェア形成

iPS 細胞スフェア形成

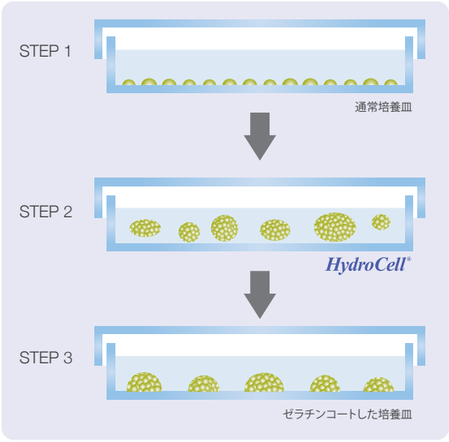


HydroCell®　　他社製低接着細胞培養器材

ヒト iPS 細胞（成育医療研究センター 梅澤明弘先生樹立）でスフェア形成を行ったところ、***HydroCell®*** では確実にスフェア形成されたが（写真左）、他社製品では壁面への接着が見られた（写真右）。

ご提供：成育医療研究センター　梅澤明弘先生

ヒト ES 細胞スフェア形成法



無フィーダーでの分化誘導系では、ES 細胞を短期間浮遊培養して球状の細胞凝集塊（スフェア）を作製する技術が有用。

スフェア形成法では ES 細胞を無フィーダー状態でまず培養し（STEP 1）、次いで ***HydroCell®*** にて浮遊培養を始める（STEP 2）。その後、ゼラチンコーティングされた培養皿に接着させ、培養する（STEP 3）。

ご提供：国立国際医療センター　佐伯久美子先生

参考文献

"High-efficiency production of subculturable vascular endothelial cells from feeder-free human embryonic stem cells without cell-sorting technique." M.Nakahara, N.Nakamura, S.Matsuyama, Y.Yogiashi, K.Yasuda, Y.Kondo, A.Yuo and K.Saeki. *Cloning and Stem Cells.*, **11**,509-522 (2009)

HydroCell® 超低付着性細胞培養器材

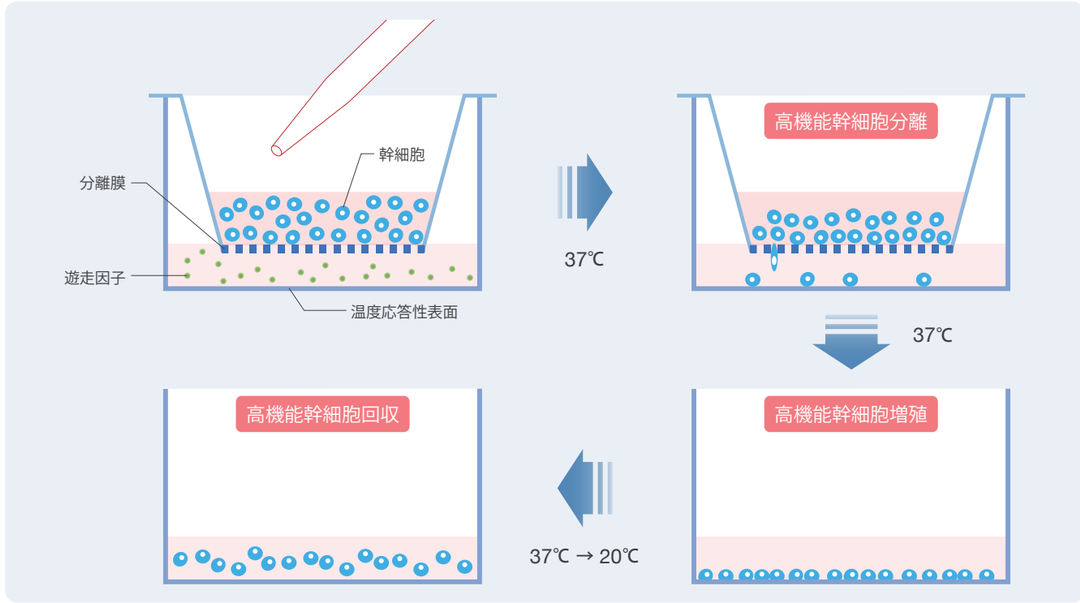
品名	T75 Flask	T25 Flask
サイズ（mm）	81（W）× 127.3（L）* * キャップ及びネックを除く	50（W）× 76（L）* * キャップ及びネックを除く
表面積	75cm²	25cm²
容量	260mL	70mL
品番	CSF075	CSF025
包装	20 個	12 個
希望販売価格（税抜）	¥42,000	¥17,000

VIVANT-CELL®-POT with *UpCell®* Plate

幹細胞分画回収キット

高機能な幹細胞を簡便に分画 + 無傷で細胞回収

- 幹細胞を分離膜上に播種し、遊走因子を添加で高機能幹細胞を分画
- 細胞に障害を与えるトリプシンを使わず、温度制御で簡便に回収
- 安価に高機能な幹細胞を高効率に培養が可能



セルシードの技術

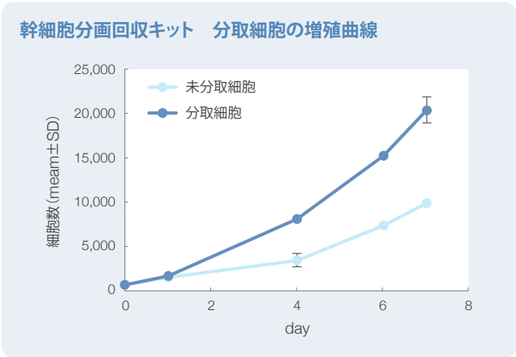
- 器材表面に温度応答性ポリマーを固定化しています。
- 32℃を境に、疎水性（細胞接着表面）⇔ 親水性（細胞遊離表面）へと可逆的に変化します。
- トリプシン等を使用せず、ディッシュ等の温度を室温付近に下げて 10 ～ 30 分程度待つだけで、無傷な細胞を回収できます。

※ 細胞の種類によっては完全に剥がれないものがあります。予めご了承ください。

VIVANT-CELL®-POT with *UpCell*® Plate

幹細胞分画回収キット

幹細胞分画回収キットを用いた増殖能の評価



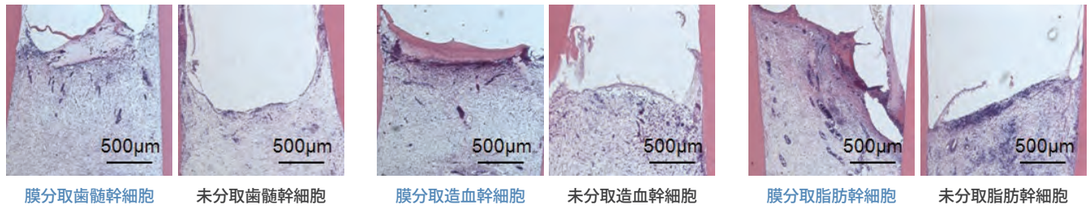
方法

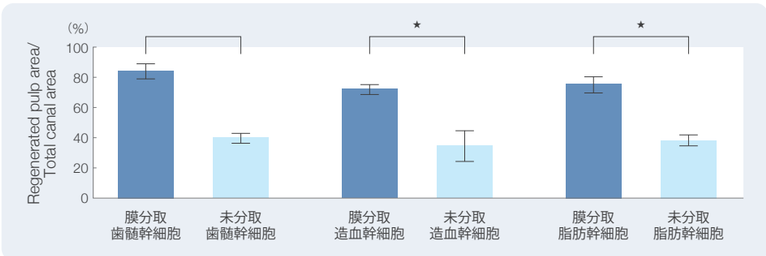
1. ***UpCell***® 12well Plate に 100ng/mL G-CSF 含有培地を添加した後、**VIVANT-CELL®-Pot** をセットした。
2. 分離膜の上面に無血清培地で懸濁したヒト骨髄由来間葉系幹細胞（Lonza）の細胞懸濁液（5.0 × 10^4 個 /Pot）を播種した後、フタを閉め、37℃インキュベーター内で分取した。
3. 膜分取 48 時間後に Pot を除去した後、分取した細胞を拡大培養した。
4. 拡大培養後、***UpCell***® 12well Plate で培養した分取細胞では、あらかじめ 20℃インキュベーターで調温した培地で交換した後、低温インキュベーター内で 20℃、30min 処理、未分取細胞に関しては 0.1% トリプシンで 37℃、5min 処理し、細胞を回収した。
5. それぞれの細胞を 96well plate に 1000 個 /well 播種した後、WST-8 アッセイを行い、播種 0、1、4、6、7 日後の生細胞数を計数した。

結果

未分取細胞と比較して、分取細胞の細胞数は 2.0 倍以上であった。このことから幹細胞分画回収キットを用いて細胞を回収すると、幹細胞分画回収キットを用いない細胞に比べ増殖性の高い細胞を回収することができる。

In vivo における分取膜幹細胞の高い再生能





参考文献

"Augmentation of Regenerative Potential of Mesenchymal Stem Cells by Granulocyte-colony Stimulating Factor (G-CSF) Induced Mobilization." Hirose Y, Murakami M, Hayashi Y, Osako Y, Yamamoto T, Gotoh M and Nakashima M. *J Stem Cell Res Transplant*. 2014; **1**(2): 1006.

幹細胞分画回収キット

品名	VIVANT-CELL-Pot® with *UpCell*® plate	
セット内容	**VIVANT-CELL-Pot® Insert** 12 個 + **Plate** 2 枚	**VIVANT-CELL-Pot® Insert** 24 個 + **Plate** 3 枚
品番	CS9012	CS9013
希望販売価格（税抜）	¥39,000	¥69,500

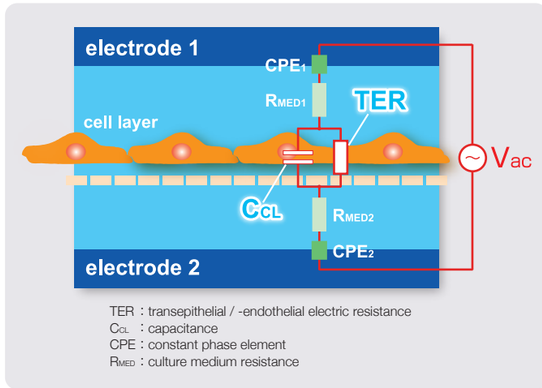
VIVANT-CELL-Pot® はネッパジーン株式会社の登録商標です。

cellZscope™

TER 自動測定装置

細胞層のインピーダンス測定からタイトジャンクションの形成を自動モニタリング

測定イメージ図



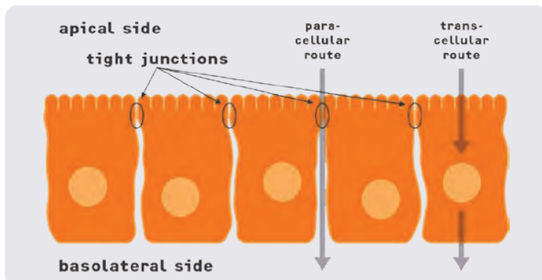
- TER（細胞層の経上皮 / 内皮電気抵抗値）及び C_{CL}（キャパシタンス）をリアルタイムモニタリング。最大 96 検体まで同時に測定可能です。
- 独自の周波数可変測定システムにより、TER とノイズ（CPE、R_{MED}）を分けて測定しますので、高精度です。
- 細胞培養装置（セルモジュール）はインキュベータ内に設置できますので、細胞にインタクトな状態で測定が可能です。
- HUVEC などの 30Ω・cm^2 以下の低 TER にも対応しています。
- 以下のご研究にお勧めします。
  - Blood-brain barrier（BBB）の研究に
  - 医薬品探索での膜透過性の研究に
  - 皮膚バリア機能研究に
  - 細胞シートの研究に

電極は、高品質のステンレススチール製となっており、優れた耐久性と標準的な洗浄や滅菌に適合しています。

上部電極がセットされたバーは、マグネット構造により正確かつ簡単にカバーに装着されます。

バリア形成細胞のインピーダンス測定とは

バリア形成組織



上皮及び内皮細胞層は選択的に分子を透過させるバリア機能を形成します。頂端面（apical side）から基底面（basolateral side）へ（その逆方向も同様に）の分子及びイオンの輸送には、経細胞路（transcellular route）、あるいはタイトジャンクションすなわち細胞間隙経路（paracellular route）が使われます。

上皮 / 内皮細胞バリアの主な構成要素は隣接した細胞間の密着結合（tight junction）です。

細胞内部及び外部からの様々なシグナルに応答しタイトジャンクションが選択的に開閉して分子の通過を調節しています。

細胞層の膜透過と電気抵抗、いわゆる経上皮 / 内皮電気抵抗値（TER）は直接的な相関性が見られます。「緊密な細胞層は高い電気抵抗値を示す」「高い透過性は低い電気抵抗値と関連がある」などの事実は、評価試験方法の基礎として現在活用されています。

従って、細胞層の電気抵抗を測定することはバリア形成組織を定量化する為には最適なパラメータです。これらの数値データを記録し、比較することで、細胞層バリアの形成や変化を測定することが可能になります。

cellZscope™

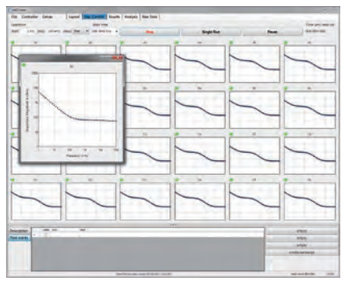
TER 自動測定装置

cellZscope と互換性が確認されているセルカルチャーインサート

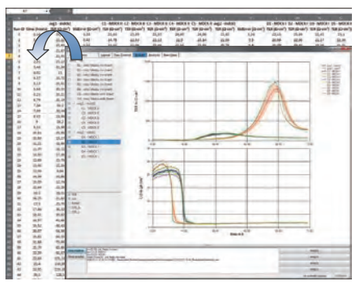
Manufacturer	Item number			Membrane				Insert type
	24 well size	12 well size	6 well size	Material	Pore size	Pore density	Optics	
Corning Transwell	3413	3410	3412	PC	0.4μm	$1.0 \times 10^8/cm^2$	translucent	hanging
	3470	3460	3450	PET	0.4μm	$4.0 \times 10^6/cm^2$	clear	hanging
	3415	3402	3414	PC	3.0μm	$2.0 \times 10^6/cm^2$	translucent	hanging
	3472	3462	3452	PET	3.0μm	$2.0 \times 10^6/cm^2$	clear	hanging
Corning Falcon	353495	353494	353493	PET	0.4μm	$1.6 \times 10^8/cm^2$	translucent	hanging
	353405	353180	353090	PET	0.4μm	$1.6 \times 10^6/cm^2$	clear	hanging
	353104	353103	353102	PET	1.0μm	$1.6 \times 10^6/cm^2$	clear	hanging
	353492	353292	353092	PET	3.0μm	$2.0 \times 10^6/cm^2$	translucent	hanging
	353096	353181	353091	PET	3.0μm	$8.0 \times 10^5/cm^2$	clear	hanging
Greiner Bio-One ThinCert	662 640	665 640	657 640	PET	0.4μm	$1.0 \times 10^8/cm^2$	translucent	hanging
	662 641	665 641	657 641	PET	0.4μm	$2.0 \times 10^6/cm^2$	clear	hanging
	662 610	665 610	667 610	PET	1.0μm	$2.0 \times 10^6/cm^2$	clear	hanging
	662 631	665 631	667 631	PET	3.0μm	$2.0 \times 10^6/cm^2$	translucent	hanging
	662 630	665 630	667 630	PET	3.0μm	$6.0 \times 10^5/cm^2$	clear	hanging
Merck Millipore Millicell	MCHT 24H 48	MCHT 12H 48	MCHT 06H 48	PET	0.4μm	$1.0 \times 10^8/cm^2$	translucent	hanging
	MCRP 24H 48	MCRP 12H 48	MCRP 06H 48	PET	1.0μm	$2.0 \times 10^6/cm^2$	clear	hanging
	MCSP 24H 48	MCSP 12H 48	MCSP 06H 48	PET	3.0μm	$2.0 \times 10^6/cm^2$	translucent	hanging
Brand	7827 00	7827 20	7827 40	PS	0.4μm	$1.0 \times 10^8/cm^2$	translucent	standing
Nunc	140620	140652	140660	PC	0.4μm	$8.5 \times 10^7/cm^2$	translucent	standing
	140627	140654	140663	PC	3.0μm	$1.7 \times 10^7/cm^2$	translucent	standing
Sarstedt	83.3932.040	83.3931.040	83.3930.040	PET	0.4μm	$1.0 \times 10^8/cm^2$	translucent	hanging
	83.3932.041	83.3931.041	83.3930.041	PET	0.4μm	$2.0 \times 10^6/cm^2$	clear	hanging
	83.3932.101	83.3931.101	83.3930.101	PET	1.0μm	$2.0 \times 10^6/cm^2$	clear	hanging
	83.3932.300	83.3931.300	83.3930.300	PET	3.0μm	$2.0 \times 10^6/cm^2$	translucent	hanging
SABEU cellQART	932 04 02	931 04 02	930 04 02	PET	0.4μm	$1.0 \times 10^8/cm^2$	translucent	hanging
	932 10 02	931 10 02	930 10 02	PET	1.0μm	$2.0 \times 10^6/cm^2$	translucent	hanging
	932 30 02	931 30 02	930 30 02	PET	3.0μm	$2.0 \times 10^6/cm^2$	translucent	hanging
	932 04 12	931 04 12	930 04 12	PET	0.4μm	$2.0 \times 10^6/cm^2$	clear	hanging
	932 10 12	931 10 12	930 10 12	PET	1.0μm	$2.0 \times 10^6/cm^2$	clear	hanging
	932 30 12	931 30 12	930 30 12	PET	3.0μm	$6.0 \times 10^5/cm^2$	clear	hanging
Kanto Chemical ad-MED Vitrigel 2	08364-96	08363-96	—	Collagen	—	—	clear	hanging
CELLTREAT	230629	230615	230601	PC	0.4μm			hanging
	230635	230621	230607	PET	0.4μm			hanging
	230631	230617	230603	PC	3.0μm			hanging
	230637	230623	230609	PET	3.0μm			hanging

簡単なソフトウェア操作

付属のソフトウェアで簡単に条件設定・統計分析が可能です（Microsoft Windows® 11 に対応）



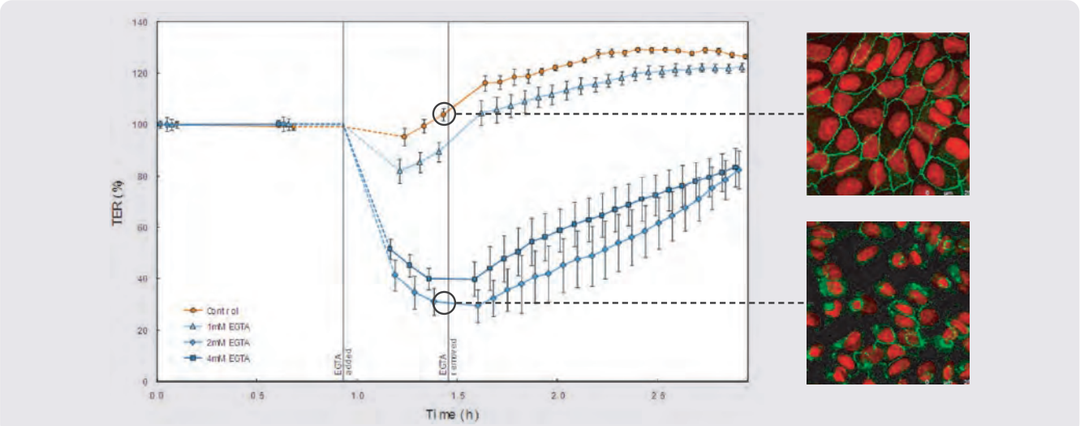
専用ソフトウェアにより、機器のセットアップや操作は直感的に行う事ができます。測定中は、細胞のバリア機能がリアルタイムで確認できます。



測定後のデータは、グラフや生データなどをエクスポートして一般的なソフトウェアで解析をしたり、プレゼンテーションに使用する事も可能です。

タイトジャンクション（TJ）形成過程の解析

EGTA《ethyleneglycol bis（2-aminoethyl-ether）tetraacetic acid》はキレート作用によりCa イオンを枯渇させ細胞間のタイトジャンクション（TJ）を開口させます。ここでは MDCK 細胞をコンフルエントまで培養した後、EGTA を添加し、TER の変化を測定実施。続いて培地交換することで EGTA を除去すると、TER が上昇し TJ が再形成されることがわかります。



画像は TJ の裏打ちタンパク質である ZO-1 の免疫染色による画像解析。画像からも TJ が開口していることが確認できます。**cellZscope** はラベルフリー且つ非侵襲に TJ を解析するのに最適です。

Methyl-β-Cyclodextrin（MBCD）添加によるコレステロール枯渇時のモニタリング

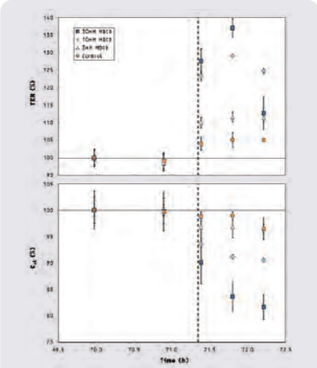
濃度の異なる MBCD を各細胞の頂端側（apical side）に加え、MDCK 細胞の TER 値とキャパシタンス（C_{CL}）をモニタリング。

MBCD 添加直後に観察される TER 値の上昇は既に様々な文献で取り上げられており、生化学的にも種々に説明されています [1, 2]。

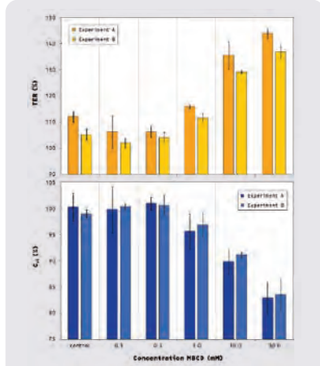
TER 値と同時に得られるキャパシタンス（C_{CL}）は、細胞層の他の特性が薬物量に応じて変化すること、具体的には細胞膜の形態的変化を示しています。MBCD 添加によるキャパシタンスの減少は共焦点顕微鏡での観察結果と一致しています [3]。

細胞膜のコレステロール枯渇は、microvilli（微絨毛）と microridges（隆起構造）の退縮をもたらします。細胞層の電気的なキャパシタンスは細胞膜の形態に影響を受ける為、薬物添加量の増加に伴いキャパシタンスが低下するのです。

今回は microvilli と microridges の隆起の収縮が表面積の減少につながり、キャパシタンスが減少しました。**cellZscope** を使用すればそのような細胞の微細な変化を一切見逃すことなく、細胞膜の変化を実験中、常に確認することができます。



MBCD 添加（点線）に対し、MDCK 細胞の TER と C_{CL} 値は添加量に依存して応答することが示された。データは 3 ウェルの平均値と標準偏差を示す。



MBCD 添加 30 分後、コレステロール減少による MDCK 細胞の TER とキャパシタンス（C_{CL}）の測定結果（実験 2 回分）

[1] Stankewich, M., Francis, S.A., Vu, Q.U., Schneeberger, E.E., Lynch, R.D., Alterations in Cell Cholesterol Content Modulate Ca2+ -Induced Tight Junction Assembly by *MDCK Cells*. Lipids **31**, 817 (1996).

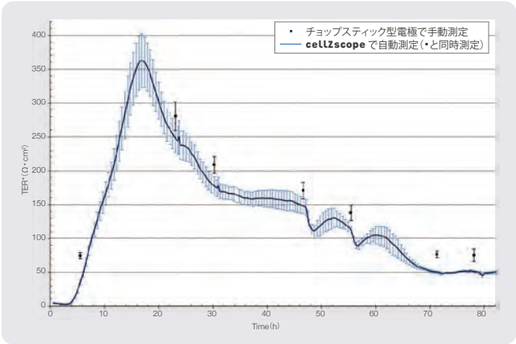
[2] Francis, S.A., Kelly, J.M., McCormack, J., Rogers, R.A., Lai, J., Schneeberger, E.E., Lynch, R.D.: Rapid reduction of MDCK cell cholesterol by methyl-β-cyclodextrin alters steady state transepithelial electrical resistance. *Eur. J. Cell. Biol*. **78** (1999).

[3] Colarusso, P., Spring, K.R.: Reticulated Lipid Probe Fluorescence Reveals MDCK Cell Apical Membrane Topography. *Biophys. J*. **82**, 752 (2002).

cellZscope™ TER 自動測定装置

TER 測定の比較　cellZscope vs. 手動型（チョップスティック型電極）

手動測定 vs. 自動測定

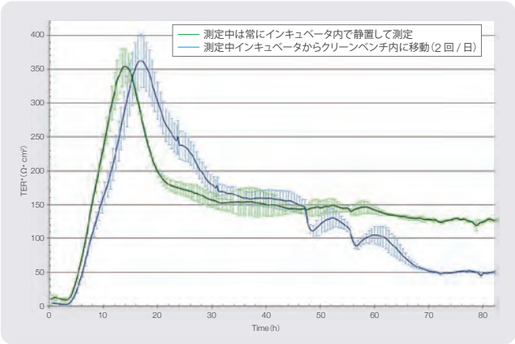


cellZscope 内のインサートを手動のチョップスティック型電極で測定した場合（青色点）、cellZscope で自動モニタリングした場合（青色曲線）、いずれにおいても TER は同様の動きを見せた（培養 22 時間までは上昇し、以後下降トレンド。70 時間を境に安定）。cellZscope 装置での連続測定データでは、チョップスティック型電極と比較して多くの詳細な変化をモニタリングすることができます。

2 つの測定データを見ると、チョップスティック型電極での TER 値がやや高いことがわかります。これはチョップスティック型電極間では電界分布の不均等性の原因から、TER 値を誤って高く測定する傾向があるためです [1]。

[1] Jovov, B., Wills, N.K., Lewis, S.A., A spectroscopic method for assessing confluence of epithelial cell cultures, Am. *J. Physiol. Cell Physiol*. **261**, C1196 (1991) .

インキュベータ内測定 vs. クリーンベンチ測定



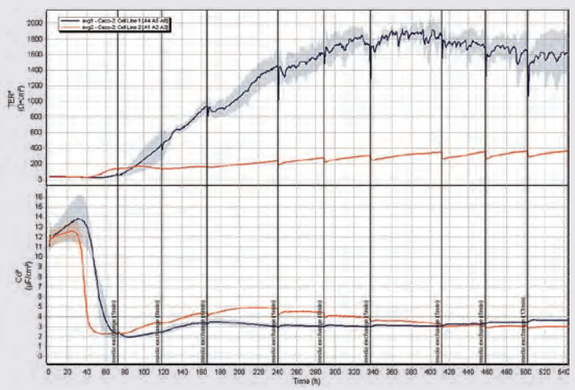
2 台の cellZscope、すなわち 1 台は常にインキュベータ内で静置して測定（緑色曲線）、もう 1 台はクリーンベンチ内へ数回移動させ、チョップスティック型電極を挿して測定（青色曲線）。得られた結果を比較すると、インキュベータ内で静置して培養した方が、経過時間に伴う TER 値はなめらかな曲線を示します。

この事からインサートをインキュベータ外へ持ち出し、チョップスティック型電極を繰り返し挿入することがバリア形成細胞の障害になると考えられます。培養期間が長くなればなる程、TER 値が極度に低下することに なります。

細胞は外界の影響を受けずに安定した状況で培養することが望ましく、培養条件を均一に保つ事が欠かせません。cellZscope システムは非侵襲の測定方式であり、人為的な影響を最小限に抑える画期的な装置です。

細胞の品質管理に

入手元の異なる 2 種類の Caco-2 細胞のバリア特性を評価。バリア特性状況が全く異なることから細胞層の品質管理や薬物透過性試験直前の細胞層の状態の把握に大きな力を発揮します。



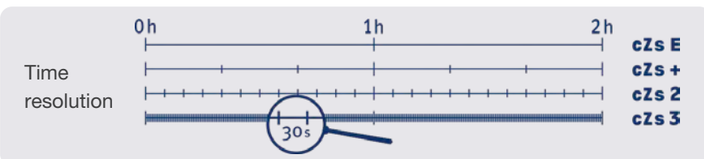
cellZscope E
cellZscope +

TER 自動測定装置

- 細胞培養中に測定が可能
- 同時に 6 サンプルの TER が自動でモニタリング可能
- 各社のセルカルチャーインサートが使用可能
- 簡単操作で信頼性の高いデータ取得が可能
- 電極は取り外し可能のため、洗浄が容易
- 複数のインサートサイズを同時に測定可能
- cellZscope+ へのアップグレード可能
- 1 時間間隔での測定が可能

- 細胞培養中に測定が可能
- 同時に 24 サンプルの TER 及び CCL が自動でモニタリング可能
- 各社のセルカルチャーインサートが使用可能
- 簡単操作で信頼性の高いデータ取得が可能
- 電極は取り外し可能のため、洗浄が容易
- 複数のインサートサイズを同時に測定可能
- 20 分間隔での測定が可能

品名	cellZscopeE	cellZscope+	cellZscope2	cellZscope3
	エントリーモデル	スタンダードモデル	高頻度測定モデル	高速測定モデル
Output parameters	TER	TER, C_{CL}	TER, C_{CL}	TER, C_{CL}
Number of wells	6	24	24	24 (up to 96)
Supported insert sizes	6-/12-/24-well	6-/12-/24-well	6-/12-/24-well	6-/12-/24-well
Different insert sizes combinable	✓	✓	✓	✓
Works with standard cell culture inserts	✓	✓	✓	✓
Wells/Electrodes autoclavable	✓	✓	✓	✓
Measuring interval adjustable		✓	✓	✓
High-speed measurement			✓	✓
Docking Station			✓	✓
Up to 4 Cell Modules per Controller				✓



※ 各モデルにより測定間隔が異なります。

cellZscope 2
cellZscope 3

TER 自動測定装置

- 細胞培養中に測定が可能
- 同時に 24 サンプルの TER 及び CCL が自動でモニタリング可能
- 各社のセルカルチャーインサートが使用可能
- 簡単操作で信頼性の高いデータ取得が可能
- 電極は取り外し可能のため、洗浄が容易
- 複数のインサートサイズを同時に測定可能
- cellZscope+ の 3 分の 1 の測定時間

- 細胞培養中に測定が可能
- 同時に最大 96 サンプルの TER 及び CCL が自動でモニタリング可能
- 各社のセルカルチャーインサートが使用可能
- 簡単操作で信頼性の高いデータ取得が可能
- 電極は取り外し可能のため、洗浄が容易
- 複数のインサートサイズを同時に測定可能

品名	cellZscopeE	cellZscope+	cellZscope2	cellZscope3
内容	• cellZscopeE CELL MODULE • cellZscopeE CONTROLLER • Software：cellZscope™ control/analysis software on USB • Operating Manual • Software manual	• cellZscope+ CELL MODULE • cellZscope+ CONTROLLER • Software：cellZscope™ control/analysis software on USB • Operating Manual • Software manual	• cellZscope2 CELL MODULE • cellZscope2 STATION • cellZscope2 CONTROLLER • Software：cellZscope™ control/analysis software on USB • Operating Manual • Software manual	• cellZscope3 CELL MODULE • cellZscope3 STATION • cellZscope3 CONTROLLER • Software：cellZscope™ control/analysis software on USB • Operating Manual • Software manual **cellZscope3 は最大 96 個の個別ウェルの測定が可能** ※ 測定数を増やしたい場合は cellZscope3 用 CELL MODULE/STATION/ 電極セット 4 セットを追加で購入してください。
品番	CSZ301	CSZ101	CSZ201	CSZ401
希望販売価格（税抜）	¥3,450,000	¥8,000,000	¥11,000,000	¥16,000,000

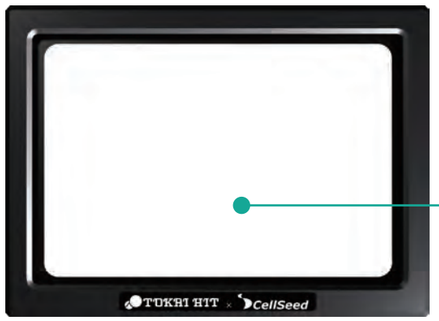
品名	cellZscopeE/+/2/3 共通 Electrode Set（上部電極と下部電極各 6 個）		
	24-well タイプ	12-well タイプ	6-well タイプ
品番	CSZ24107	CSZ12107	CSZ06107
希望販売価格（税抜）	¥250,000	¥250,000	¥250,000

※ 別途電極セット（6well/12well/24well）を 4 セットが必要です（cellZscopeE は 1 セット）。
※ 電極のウェルは組み合わせ自由です（cellZscope+/2/3）。
※ 別途ノートパソコンが必要です。
※ cellZscopeE から cellZscope+ へのアップグレードは可能ですので、別途お問い合わせください。
※「希望小売価格」は参考であり、販売店様からの販売価格ではございません。記載の希望小売価格は 2025 年 1 月 1 日現在の希望小売価格です。

本紙内容は予告なしに変更される場合がございますのでご了承ください。

ThermoPlate® III

UpCell®/RepCell® 専用
ガラスヒーター



マルチウェルプレートが載るサイズです

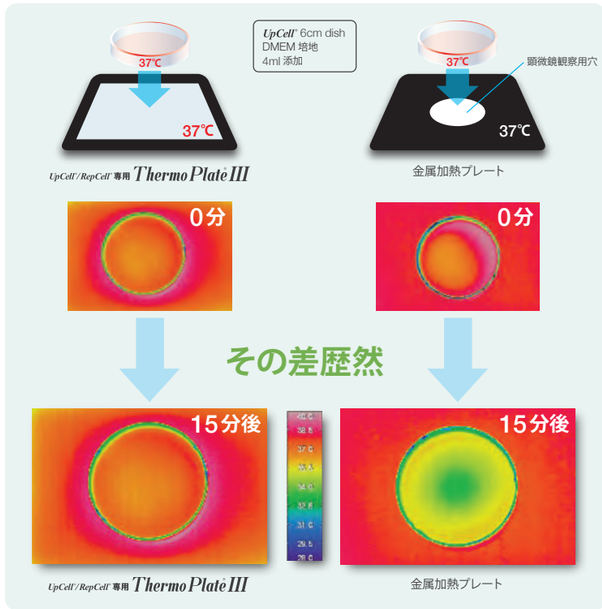
- 培地交換時の温度管理に
- 顕微鏡観察時の温度管理に
- 標準的な XY メカニカルステージに対応

硬質ガラスを
特殊加工した透明発熱体

設置例

金属加熱プレートと比較してその差歴然！

培養皿温度分布比較



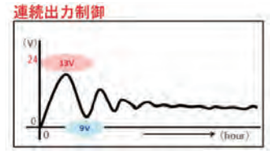
※ 写真の中で一部ディッシュ周辺の温度が高く表示されておりますが、これはディッシュの映り込みによるものであり、ディッシュ内の実温に影響はございません。

コントローラー

付属の滅菌対応センサーを用いて、検体温度の測定や、プレート表面温度の補正が可能です。

温度管理ソフト TEM

センサーで測定した検体温度をパソコンで表示・記録することができます。



従来の ON-OFF 制御方式から連続出力

制御方式コントローラーを採用することでフォーカスドリフトを最小限に抑えます。

品名	UpCell®/RepCell® 専用 ThermoPlate® III-x	UpCell®/RepCell® 専用 ThermoPlate® III-s
構成品目	本体（サーモプレート）1 台、コントローラー 1 台、滅菌対応温度センサー 1 本、センサー線用延長ケーブル 1 本、ソフト TEM（CD-ROM）1 枚、USB ケーブル 1 本	本体（サーモプレート）1 台、コントローラー 1 台
外形寸法（mm）	本体：W150 × D110 × H10 / コントローラー：W85 × D135 × H30	
重量	本体：約 70g / コントローラー：約 160g	
設定範囲 / 温度精度	室温～ 50℃ / ± 0.1℃（at 37℃ / 室温 25℃ / プレート中心部 / 東海ヒット測定条件にて）	
品番	CST007	CST008
希望販売価格（税抜）	¥420,000	¥390,000

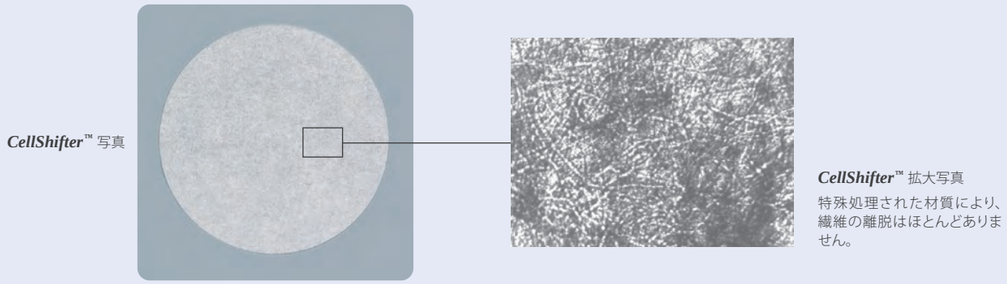
ThermoPlate® III-S は、*III-X* に付属する温度センサー、延長ケーブル、ソフト TEM（CD-ROM）、USB ケーブルを別途個別に購入する事はできませんので予めご了承ください。

ThermoPlate® は株式会社東海ヒットの登録商標です。

CellShifter™

UpCell® 専用
細胞シート回収用支持体

細胞シートが簡単に回収でき、移植できます



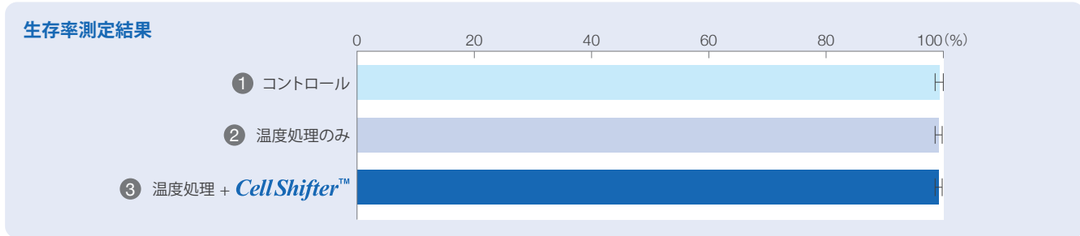
支持体の材質による扱いやすさイメージ図

- ***CellShifter***™ に採用した素材は、親水性 PVDF 膜やニトロセルロース膜では得られなかった、細胞脱着に適した柔軟性と吸水性が特徴。
- これにより ***UpCell***®※で大切に培養したあなたの貴重な細胞シートが、確実・簡単に回収できます。
- 細胞シートが張り付いた ***CellShifter***™ は、そのままホストへ移植する際にも抜群の扱いやすさを誇ります。
- 細胞シート回収用温度応答性細胞培養器材 ***UpCell***® は別売りとなります。

細胞にやさしい材質を使用

- ***CellShifter***™ の材質は食品の包装材としても多用されており、***CellShifter***™ で回収した細胞の生存率はほぼ 100% です（下記「細胞毒性評価」参照）。

CellShifter™ の細胞毒性評価



CellShifter™ の細胞毒性を測定するため、***UpCell***® 3.5cm ディッシュに NIH/3T3 を 3 × 10^5cells 播種、3 日間培養し、細胞の回収方法の違いによる生存率をトリパンブルー染色にて評価。

細胞回収は❶トリプシン処理（コントロール）、❷温度処理（20℃、15 分）のみ、❸温度処理（20℃、15 分）+ ***CellShifter***™ で行った。***CellShifter***™ を使用した場合の細胞の生存率はほぼ 100% であり、コントロールとの間で有意差は見られなかった。

CellShifter™ を使用した細胞シートの回収とトランスファー方法

NIH/3T3 細胞シートの場合※

1. ***UpCell***® NIH/3T3 を ***UpCell***® 3.5cm デッシュに 5 × 10^4cells 播種し、オーバーコンフルエントになるまで 1 週間培養します。
2. 培地を除去 インキュベータから ***UpCell***® を取り出し、培地を除去します。
3. 50μL の培地を添加（乾燥防止） 細胞の乾燥を防ぐため、速やかに 50μL の培地を添加します。
   注：細胞種によっては、シャーレの壁に乗り上げた細胞を、ピンセット先端で切り離すと回収しやすくなります。
4. ***CellShifter***™ 細胞の上に気泡が入らないように ***CellShifter***™ をピンセットで重ねます。
5. 20 ～ 25℃で 5 ～ 6 分静置 20 ～ 25℃で 5 ～ 6 分間、静置します。
6. NIH/3T3 細胞シートの回収 ***CellShifter***™ の端からピンセットでゆっくりめくって、細胞シートを ***UpCell***® より回収します。
   注：細胞種によっては、細胞シートの端を、***CellShifter***™ に引っ掛けた方が、回収しやすい場合がございます。
7. 粘着性ゲルなどのへのトランスファー 細胞シートを移植したい部位や別の細胞シート上に密着させ、静置します。
   上図では生体組織の代わりに表面が粘着質のゲルに 1 分間静置しトランスファーしています。
8. 培地を 250μL 滴下 250μL の培地を ***CellShifter***™ 上に滴下します。
9. ***CellShifter***™ を除去 ***CellShifter***™ のみをピンセットでつまんでゆっくり剥がします。

※ 他の細胞種では各種条件が異なる場合がございます。予めご了承ください。

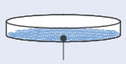
CellShifter™

UpCell® 専用
細胞シート回収用支持体

CellShifter™ を使用した細胞シート積層化の手順

NIH/3T3 細胞シートの場合※

1 *UpCell*®



オーバーコンフルエントになった細胞シート

NIH/3T3 を ***UpCell***® 3.5cm デッシュに 5 × 10^4cells 播種し、オーバーコンフルエントになるまで 1 週間培養します。

2 培地を除去

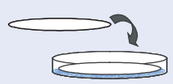
インキュベータから ***UpCell***® を取り出し、培地を除去します。

3 50μL の培地を添加（乾燥防止）

細胞の乾燥を防ぐため、速やかに 50μL の培地を添加します。

注：細胞種によっては、シャーレの壁に乗り上げた細胞を、ピンセット先端で切り離すと回収しやすくなります。

4 *CellShifter*™

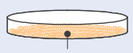


細胞の上に気泡が入らないように ***CellShifter***™ をピンセットで重ねます。

5 20 ～ 25℃で 5 ～ 6 分静置

20 ～ 25℃で 5 ～ 6 分間、静置します。

UpCell®



オーバーコンフルエントになった細胞シート

静置終了時間近くになりましたら、2 枚目の ***UpCell***® から培地を除去します。

6 2 枚目の *UpCell*® から培地を除去

7 NIH/3T3 細胞シートの回収

CellShifter™ の端からピンセットでゆっくりめくって、細胞シートを ***UpCell***® より回収します。

注：細胞種によっては、細胞シートの端を、***CellShifter***™ に引っ掛けた方が、回収しやすい場合がございます。

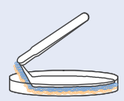
8 2 枚目の *UpCell*® に細胞シートをゆっくり重ねる

回収した細胞シートを、2 枚目の ***UpCell***® の上にゆっくり重ねます。

9 20 ～ 25℃で 5 ～ 6 分静置

20 ～ 25 ℃ で 5 ～ 6 分間、静置します。ピンセットを使って細胞シート同士が接着していることを確認します。

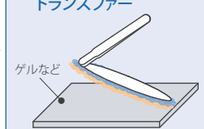
10 積層化した細胞シートの回収



積層化した 2 枚の細胞シートを ⑦ の手順と同じように、ゆっくりめくって細胞シートを回収します。

積層化した細胞シートのトランスファー

11 粘着ゲルなどのへのトランスファー



細胞シートを移植したい部位や別の細胞シートに密着させ、静置します。（上図では生体組織の代わりに表面が粘着質のゲルに 1 分間静置しトランスファーしています。）

その後の手順は P.29 の ⑧ 以降と同じ

※ 他の細胞種では各種条件が異なる場合がございます。予めご了承ください。

CellShifter™ *UpCell*® 専用 細胞シート回収用支持体

品名	48 Multi-well plate	24 Multi-well plate	12 Multi-well plate	10cm dish	6cm dish	3.5cm dish 6 Multi-well plate
サイズ（直径）	8mm φ	11mm φ	17mm φ	81mm φ	48mm φ	30mm φ
品番	CSD006	CSD005	CSD004	CSD003	CSDOO2	CSD001
包装	48 枚	24 枚	12 枚	20 枚	20 枚	20 枚
希望販売価格（税抜）	¥8,400	¥4,300	¥3,900	¥7,300	¥4,800	¥4,000

細胞シート回収用ピンセット（タイプ R / タイプ S）

細胞シート回収用に開発した特殊ピンセット

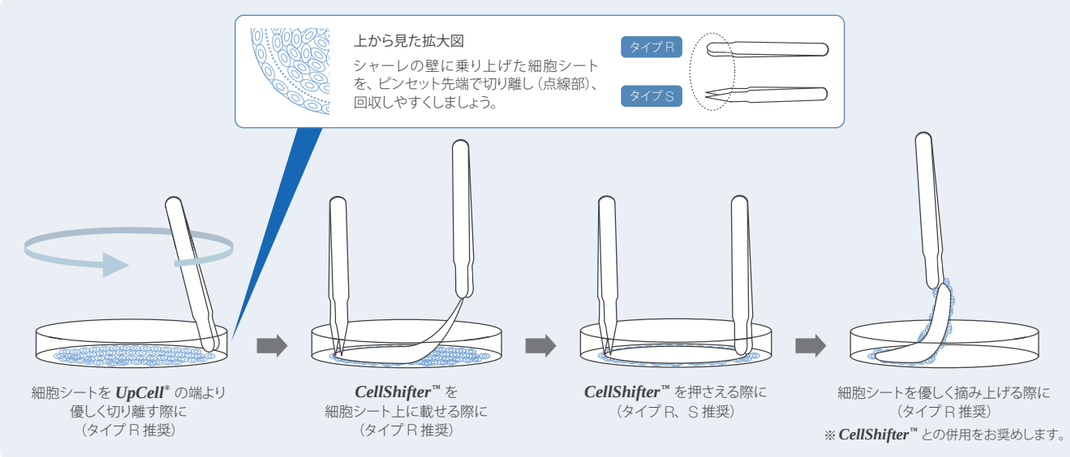
- 細胞シートをつまむ際に圧を分散させる丸みのある特殊設計であなたの大事な細胞シートを破れや穴あけから守ります（R タイプ）。
- ***CellShifter***™ の押さえ用として先端の鋭利な S タイプもご用意。状況に合わせてご自由にお使いいただけます。

UpCell® 専用 細胞シート回収用ピンセット

品名	タイプ R	タイプ S	タイプ R・S セット
材質	SUS304	SUS304	SUS304
長さ	126mm	126mm	126mm
品番	CSP002	CSP001	CSP003
包装 / 箱	1 本	1 本	2 本（各 1 本）
希望販売価格（税抜）	¥8,700	¥2,400	¥9,600

※ 本製品は未滅菌となっております。滅菌してからお使いください。

タイプ別使用例



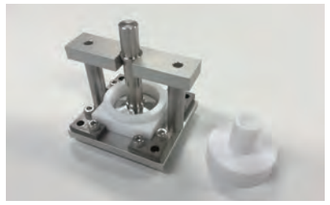
CellStamp for UpCell®

UpCell® 専用
細胞シート積層化デバイス

UpCell® 専用 細胞シート積層化デバイス

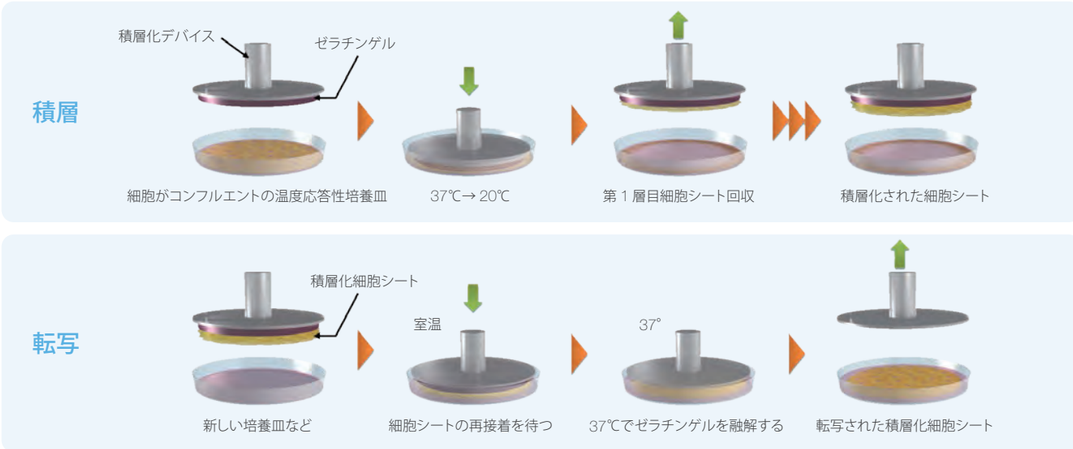
- ゼラチンゲルと細胞シートの接着性を利用して積層化
- オートクレーブ滅菌可能※
- UpCell® 3.5cm ディッシュ & 24 穴マルチウェルに対応

※ CellStamp for UpCell® 24 well plate の積層化用フタを除く



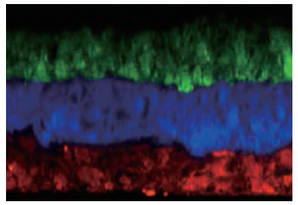
CellStamp for UpCell® 3.5cm dish

CellStamp for UpCell® 24 well plate

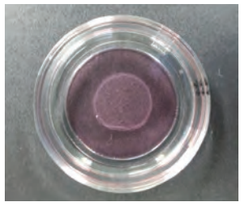


出典：「菊地鉄太郎、和田昌憲、水谷学. 細胞シート自動積層化装置が開く再生医療. 医療機器学. Vol. 81, 452-458. 2011 年 12 月」

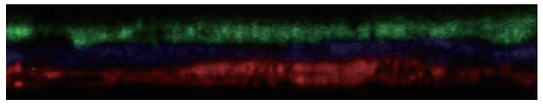
UpCell® & CellStamp を使用した骨髄間葉系幹細胞（BM-MSC）の積層化



積層後剥離して収縮した状態で観察
（播種密度 1 × 10^5cells/cm²）



3 層積層化後、ガラスベースディッシュに転写（播種密度 5 × 10^4cells/cm²）



転写後、ガラスベースディッシュに接着した状態（播種密度 5 × 10^4cells/cm²）

方法

1. 骨髄間葉系幹細胞（BM-MSC）を MSCGM 培地（Mesenchymal Stem Cell Growth Medium, Lonza, PT-3001）で継代培養
2. 0.05%Trypsin/EDTA で回収（室温、10min）
3. 遠心（300g, 4℃, 5min）し、上清を除去
4. 再懸濁し、一晩 FBS コーティングした UpCell® 24 穴マルチウェルに播種
5. 一晩培養
6. CellStamp for UpCell® 24 well plate を使って積層化

ご提供：東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 菊地先生

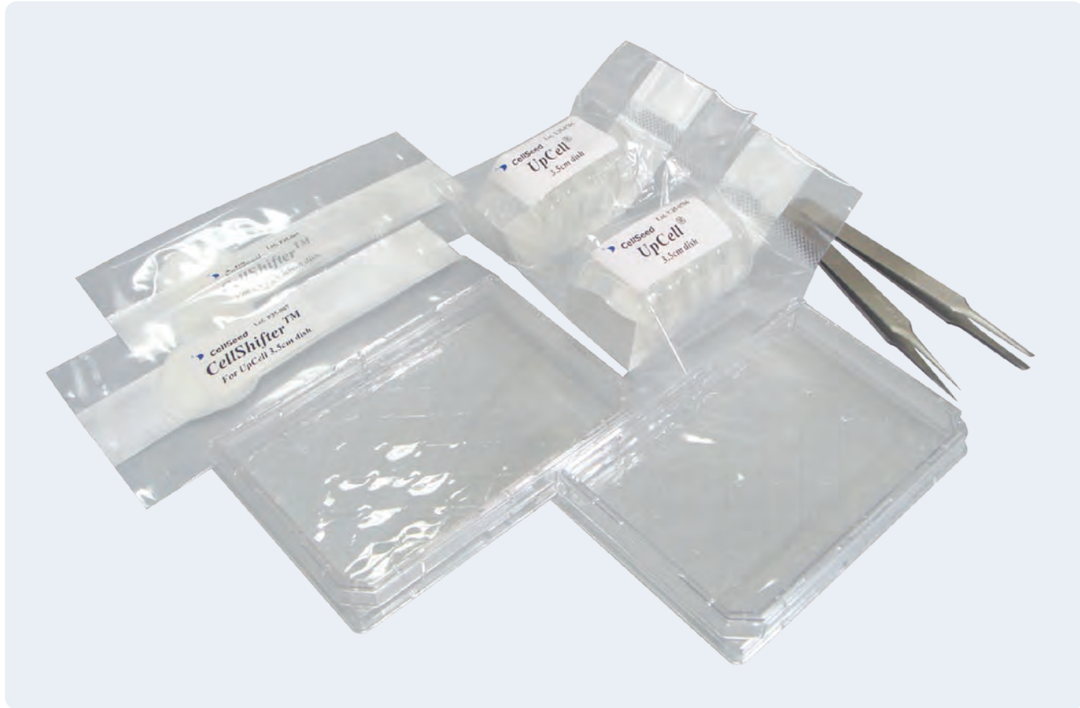
品名	CellStamp for UpCell® 3.5cm dish	CellStamp for UpCell® 24well plate
構成品目	スタンプ 1 個、ストッパー 1 個、モールド台 1 個、モールド 1 個、モールドリング 1 個、スタンプホルダー 1 個、スタンプ用フタ 1 個	スタンプホルダー 1 個、スタンプ 4 個、モールド台 1 個、シリコンゴムモールド 1 個、24 ウェル積層化用フタ 1 個
品番	CSS001	CSS002
希望販売価格（税抜）	¥129,000	¥142,000

※本製品をご購入の際には【使用目的確認書】を事前にご提供いただく必要がありますので予めご了承ください。

細胞シート練習セット

初めて細胞シートを回収される方に

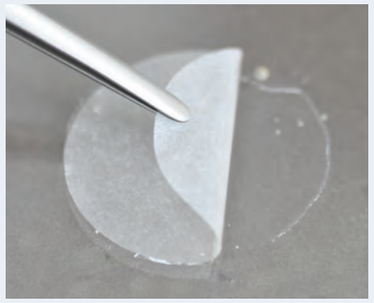
セット内容



- 細胞シートの練習に必要なツールを便利なセットにいたしました※。

※ 細胞と培地はセットに含まれておりません。お客様ご自身でご用意ください。

- 1 セット当り、細胞シート 10 枚分の練習が可能です。



応用例：ヒト間葉系幹細胞シート

セット内容

品名	細胞シート練習セット	
セット内容	CS3017	UpCell® 3.5cm ディッシュ（5 枚入）× 2 packs
	CSG002	練習用ゲル × 2 packs ※
	CSD001	CellShifter™ 3.5cm 用（20 枚入）× 2 packs
	CSP003	ピンセット 2 本（タイプ R・S 各 1 本）× 1 pack
品番	CSG001	
希望販売価格（税抜）	¥52,000	

※ 練習用ゲル（CSG002、希望販売価格 3,400 円（税抜））のみの販売も行っております。

再生医療受託サービス

主なサービス内容

細胞シート製品の製法開発・受託製造

製薬会社・研究機関からの委託を受けて、主に細胞シートの受託開発・製造サービスを提供いたします。

特徴

- 当社製品である *UpCell*® により、細胞シートを作製
- 特定細胞加工物製造の許可を受けた施設で実施（施設番号：FA3160008）
- 日本再生医療学会認定の臨床培養士等、培養の知識・経験豊富なスタッフが多数所属

細胞シート製品製造受託

細胞シート製品製法開発

細胞シートの品質試験

など

施設管理・申請支援

特定細胞加工物の製造の届出や申請資料の作成、運営に必要な文書作成などの支援を行います。また、治験届などの申請で必要となる当局相談に対する相談資料の作成、申請資料の作成等、必要な行政手続きを支援いたします。

特定細胞加工物製造事業者の許可申請・届出の支援

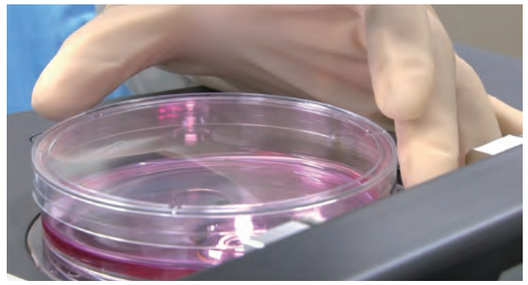
手順書・基準書などの文書作成・コンサルティング

細胞培養加工施設の施設設備、管理体制の維持管理の支援

申請資料等の作成支援

など

細胞培養技術者教育



当社細胞培養施設にて、細胞シートの培養や剥離手順など、これまで細胞シートに触れた経験がない培養技術者などに対する教育を実施いたします。

細胞シート培養トレーニング

細胞シート剥離トレーニング

など

実績

治験製品製造受託

技術移管

細胞シート培養トレーニング受託

再生医療等製品製造業許可を取得

など

FAQ 集

温度応答性ポリマーについて

Q1 このポリマーが剥がれることはないのですか？

温度応答性ポリマーが器材表面に共有結合しているので、通常の培養操作において剥がれることはありません。温度処理によって、細胞だけを無傷に回収できます。

Q2 このポリマーを器材表面に固定すると細胞が付着しやすくなりますか？

いいえ、付着しやすくはなりません。このポリマーは温度処理により無傷に細胞を回収するものなので、このポリマーを固定することにより、通常の培養器材と比べて細胞が付着しやすくなることはありません。

Q3 どうして温度を下げると細胞が剥がれやすくなるのですか？

このポリマーを固定した培養器材の表面は 32℃以下にすることによって、疎水性から親水性へと変化します。器材表面が親水性になることによって、細胞が今まで接着していた足場が消失し、剥がれやすくなります。

Q4 被固定物の材質に制限はありますか？

弊社技術ではプラスチックなどの有機物への固定化に現時点では限定されております。有機物でも固定化が不可能なものとして紙類があります。無機物（ガラス）・金属等への固定は可能ですが、技術開発に時間を要します。

Q5 被固定物の形状に制限はありますか？

被固定物の形状は問いませんが平面の方が固定化はしやすいです。球面へのポリマーの固定化を依頼される場合は、お時間を少々いただきたいと存じます。

Q6 温度応答性ポリマーの下限臨界溶解温度である 32℃は変えられるのでしょうか？

温度応答性ポリマーの下限臨界溶解温度は変えられます。詳しい説明は是非弊社までお問い合わせください。

Q7 温度応答性ポリマーがプラスチック器材にコーティングされているのですか？

コーティングではありません。共有結合によって温度応答性ポリマーは固定されています。コーティングではないので、通常の培養操作でポリマーが剥がれることはありません。

Q8 温度応答性ポリマーが細胞へ毒性やダメージを与えることはありませんか？

細胞への影響は、細胞毒性試験により影響が無い事を確認しています。

Q9 温度応答性ポリマーによって剥離する際に細胞間の結合もバラバラになるのか？

細胞間の結合は維持されます。シングルセルで回収したい場合は細胞を薄く播種していただいて、ピペッティングで回収することも可能です。細胞種によって培養日数、播種量を調整、検討していただく必要はあります。

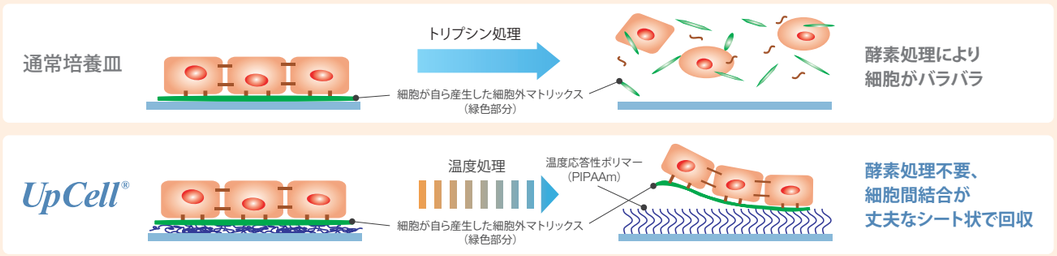
FAQ 集

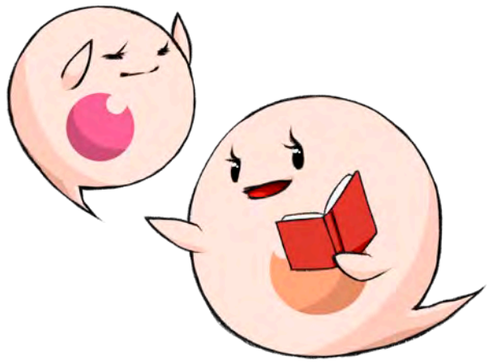
温度応答性ポリマー について（続き）

Q10 細胞を回収する際には温度応答性ポリマーも一緒に剥がれてくるのですか？

ポリマーは剥がれません。細胞と細胞外マトリックスのみ回収されます。（下記図をご確認ください）

UpCell® と通常培養皿との細胞回収比較





FAQ 集

UpCell® について

Q1 培養皿は何℃で保管すればいいのですか？

室温で直射日光を避けて保管してください。

Q2 何度も繰り返し使用可能ですか？

細胞を播種して培養に使用したディッシュ、フラスコ、プレートのウェルは再利用できません。プレートの未使用ウェルは、無菌状態が維持される方法で保管し使用してください。

Q3 温度応答性ポリマーで固定化した培養皿を使用するにあたって、何か注意することはありますか？

細胞播種から翌日まで

培地は必ず 37℃にプレインキュベートしたものをご使用ください。また、培養中は極力 32℃以下にしないようご注意ください。物理的な衝撃も避けてください。剥がれやすくなっておりますので、細胞間接着が形成されるまではインキュベータ内に静置されることをお勧めいたします。

培養中

長時間の顕微鏡観察などは避けるようにし、温度にご注意ください。

培地交換時

37℃にプレインキュベートした培地で交換を行うようにしてください。

Q4 細胞をシート状に回収する手順を教えてください。

UpCell® を使用した細胞シート剥離の基本的推奨使用手順について

1. 細胞をコンフルエント（細胞同士が接着し、100% 培養皿底面を覆っている）になるまで培養します。（細胞種によって条件検討が必要となります）
2. 培地を除去します。細胞が乾かない程度に少量の培地を滴下してふたをします。
3. 室温（20 ～ 25℃）にて 20 ～ 30 分間、静置します※1。
4. 培養皿の周縁部を先端の尖ったピンセットなどを用いて、カットしてから縁の細胞が剥がれることを確認します。
5. ピンセットを用いて ***CellShifter***™ を、細胞の上に密着するように載せます（細胞と ***CellShifter***™ の間に空気が入らないように注意してください）※2。
6. 細胞と ***CellShifter***™ が密着していることを確認し、ピンセットで ***CellShifter***™ と細胞シートを一緒につまみ、ゆっくり端から剥がします。

※1：培地除去後、温度処理する前に細胞の上に ***CellShifter***™ を載せても問題ありません。
※2：***CellShifter***™ は丸まりやすくなっておりますので、取り扱いにご注意ください。

Q5 細胞をシート状に回収する際の留意点を教えてください。

UpCell® を使用した細胞シート剥離の基本的推奨使用手順の留意点について（3 ステップ）

ステップ 1：培養

細胞培養後、細胞がコンフルエント状態（細胞同士が接着し、100% 培養皿底面を覆っている）になっていることです。また、細胞の種類によっては、重層化するとさらに剥がしやすくなるものもございます。

理由：細胞間接着が弱いと、剥離の途中で破けてしまう可能性が高くなります。 そのため、細胞間接着が強く保持されるような状態まで培養していただくことを推奨しています。

UpCell® について（続き）

ステップ 2：剥離

細胞をシート状に剥離する際は、温度と時間にご注意ください。細胞種の違いにより、細胞と ***CellShifter***™ の接着時間室温静置時間が変わります。その際は、ピンセットで ***CellShifter***™ と細胞シートを一緒にゆっくり端から剥がしてください。

温度について：室温で器材を静置する、あるいは、予め室温に調温した培地で交換してください。

時間について：細胞の種類によって培養皿への接着性の強さが異なります。温度処理後、5 分程度で剥がれる場合や、30 分以上を必要とする細胞もございます。

ステップ 3：トランスファー

トランスファー後、***CellShifter***™ のみを剥がすには、細胞シートと ***CellShifter***™ の接着性が、細胞シートとトランスファー先の接着面との接着性より弱くなっている必要があります。そのため、トランスファー先の性質によって所要時間や方法が異なる場合がありますのでご注意ください。十分な接着性を確保するために、接着させる時間を長くしたり、重しとなるようなものをのせたりする工夫が必要となる場合がございます。一般的な留意点は以下のとおりです。

- 細胞シートとトランスファー先の接着面との間に空気が入らないように密着させます。
- ***CellShifter***™ と細胞が乾燥しないよう添加する培地量はできるだけ少量にとどめて、トランスファー先に細胞シートが密着するようにします。
- 細胞シートと接着面が十分接着したことを確認してから 250μL（***UpCell***® 3.5cm dish の場合）の培地を ***CellShifter***™ の上から添加します。ピンセットを用いて ***CellShifter***™ をゆっくり剥がしていきます。十分な接着性を確保するためには、接着させる時間を長くしたり、重しと成るようなものをのせたりする工夫が必要となる場合がございます。
- 粘着性のあるゲル（アクリルアミドゲル等）を用いてトランスファーの練習をされることをお勧めいたします。

Q6 細胞をシート状に回収するには、*UpCell*® と *CellShifter*™ が必須なのでしょうか？

細胞間結合や細胞外マトリックスを保持した状態での細胞シートの回収には ***UpCell***® は必須です。また ***CellShifter***™ は細胞シートの剥離に必須ではありませんが、トランスファーなど剥離後の細胞シートのハンドリングを容易にします。

Q7 *UpCell*® と *CellShifter*™ を使っても、うまく細胞をシート状に回収できない場合はどうしたらいいでしょうか？

細胞の種類・培養密度・培養日数等によって剥離性が異なります。そのため、これらの条件検討が必要になる場合がございます。条件につきましては、P37 ～ 38 の Q4、Q5 をご参照ください。

Q8 *UpCell*® を室温に置いて作業していると細胞が剥がれてきてしまいますか？

すぐには剥がれませんが、***UpCell***® は 32℃以下になると細胞が剥がれやすい表面に変化します。そのため、以下の点に注意してご使用ください。

1. 培地交換する際、培地は 37℃にプレインキュベートしたものを使用し、培地温度が低下しないよう培地交換時間にご注意ください。
2. 顕微鏡下での観察や試薬添加など、室温で操作を行う際にも培地温度の低下にご注意ください。培地交換や顕微鏡観察時の温度管理に ***UpCell***®/***RepCell***® 専用 ***ThermoPlate***® を推奨しております。
3. 物理的な衝撃を与えないでください。特に、細胞間の接着が形成されていないような、播種直後の細胞はわずかな衝撃で剥がれることがございます。

Q9 細胞シートを用いた凍結切片やパラフィン包埋切片の作製方法を教えてください。

細胞シートを用いた凍結切片やパラフィン包埋切片の作製手順について

CellShifter™ に接着させたまま切片を作成しますと培養皿状での形態を維持したまま回収可能です。

一方、***CellShifter***™ を細胞シートより剥がして作成しますと細胞内骨格が縮みますので、培養皿上よりも少々縮んだ大きさの切片となりますのでご注意ください。

A 細細胞シートを用いた凍結切片の作製手順

1. ***UpCell***® を使用した細胞シート剥離の基本的推奨手順を参考に、***CellShifter***™ を用いて細胞シートを回収します※1。
2. カッターを用いて適当な大きさにカットします。
3. 凍結用のカセットに OCT compound を半分ほど入れます。
4. ピンセットを用いて、回収した細胞シートを入れます。
5. ピンセットを用いて、細胞シートから ***CellShifter***™ を外します（付けたままでも問題ありません）。
6. 上からさらに残り半分の OCT compound を入れます。
7. 冷却して固めます。

※ 1：必要があれば、10% ホルマリンの入ったディッシュに一晩、4℃で固定します。

B 細胞シートを用いたパラフィン包埋切片の作製手順

1. ***UpCell***® を使用した細胞シート剥離の基本的推奨使用手順を参考に、***CellShifter***™ を用いて細胞シートを回収します。
2. 10% ホルマリンの入った培養皿で一晩、4℃で固定します。
3. カッターを用いて適当な大きさにカットします。
4. カセットにセットします。
5. 流水でホルマリンを洗い流します。
6. カセットに重しをして自動包埋器にかけます。
7. 作成したパラフィン浸透した細胞シートを用いてパラフィンブロックを作ります※2。

※ 2：自動包埋器の設定は細胞シートと同じ重さで設定してみてください。

Q10 *UpCell*® をコーティングして使用することはできますか？

コラーゲンなど ECM コートをしていただいても問題ございません。

Q11 I 型コラーゲンコーティング方法を教えてください。

UpCell® **のコラーゲンコーティング方法は以下の通りです。（HUVEC 細胞を使用した場合）**

準備

1. ***UpCell***® 3.5cm dish
2. HUVEC（Lonza, C2517A）、培地（Lonza, EGM-2）
3. コラーゲン I（3.34mg/mL, BD Biosciences, 354236）
4. 0.02N 酢酸溶液
5. PBS 溶液

UpCell® について（続き）

コーティング方法

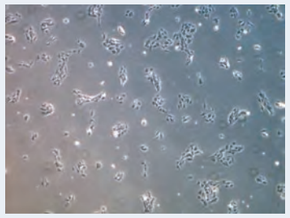
一般的な濃度の 5 ～ 10 倍のコラーゲン溶液を作製し、***UpCell®*** 上に塗布して 37℃で温めます。

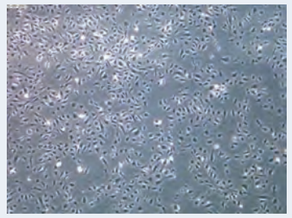
❶ 0.02N 酢酸溶液を用いて、500μg/mL のコラーゲン溶液を作製する。
❷ ***UpCell®*** 3.5cm dish に 1mL 滴下し、全体に行き渡らす。
❸ そのディッシュを 37℃ 1 時間静置する。
❹ コラーゲン溶液を除去し、予め 37℃に加温した 1mL の PBS で洗浄する。

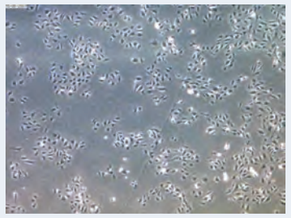
培養条件

❶ コラーゲンコーティングした ***UpCell®*** 3.5cm dish を用意する。
❷ HUVEC 細胞を 10,000cells/cm^2 播種する。
❸ 2 日間以上、37℃インキュベータでオーバーコンフルエントになるまで培養する。
❹ 細胞シート回収方法については、***UpCell®*** を使用した細胞シート剥離の Q4 基本推奨使用手順（P37）をご確認ください。

播種後 2 日目の比較写真


コーティングなしの場合


コラーゲンでコーティングした場合


培養液でコーティングした場合

（細胞播種前に、37℃ 1h プレインキュベーションしたもの）

Q12 *UpCell®* を用いた ECM コーティング推奨濃度を教えてください。

各 ECM コーティングの推奨濃度は下記の通りです。

ECM	推奨濃度範囲
Laminin	10 ～ 100μg/mL（1 ～ 10μg/cm^2）
Collagen Ⅰ	30 ～ 300μg/mL（3 ～ 30μg/cm^2）
Collagen Ⅳ	3 ～ 100μg/mL（0.3 ～ 10μg/cm^2）
Poly-D-Lysine	30 ～ 100μg/mL（3 ～ 10μg/cm^2）

方法

比較的接着しにくい PC12HS 細胞を用いて、以下の条件で推奨濃度範囲を求めました。

条件

❶ 細胞：PC12HS 細胞（JCRB0266）
❷ 培地：RPMI1640 + 10% HorseSerum + 5% FBS
❸ ECM：Laminin（BD354232）、Collagen Ⅰ（BD354236）、Collagen Ⅳ（BD354233）、Poly-D-Lysine（BD354210）
❹ 培養容器：***UpCell®*** 3.5cm ディッシュ
❺ 比較対象：NUNC Tissue culture 35mm dish
❻ コーティング条件：37℃、1 時間、1mL/dish
❼ 播種密度：2 ～ 6 × 10^{5}cells/dish
❽ 培養期間：5 日間

Q13 細胞をシート状に回収する際、トランスファーの練習用として推奨するゲルを教えてください。

練習用ゲル（P33 参照、CSG002、希望販売価格 3,400 円（税抜））は細胞シートをトランスファーする練習に最適です。
練習に必要な材料が全て揃った練習セット（P33 参照、CSG001、希望販売価格 41,000 円（税抜））も合わせてご検討ください。

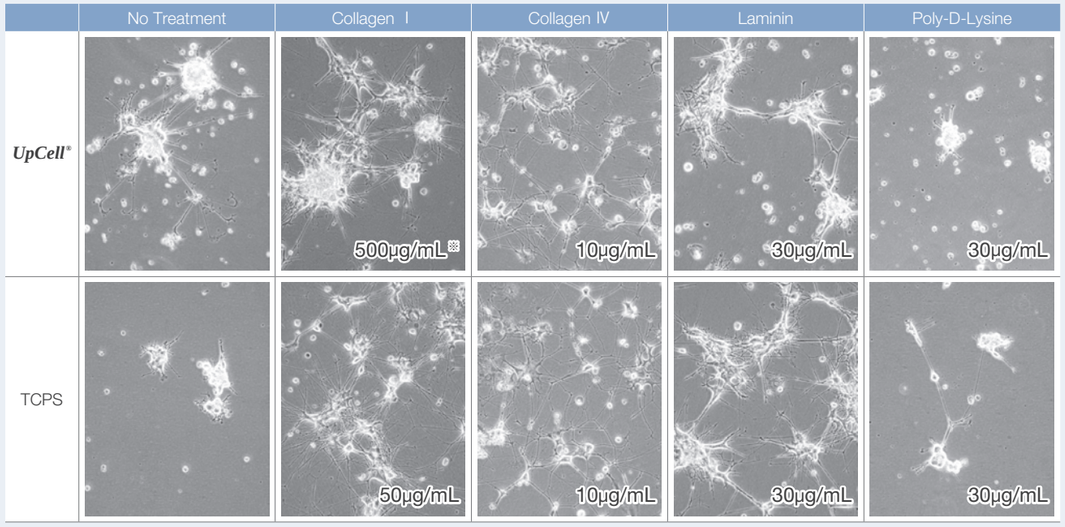
Q14 *UpCell®* を用いた分化誘導実験実績があれば教えてください。

様々な ECM コーティングした ***UpCell®*** 上で、PC12HS 細胞を NGF により分化誘導し、神経突起の伸長の程度を通常の培養皿と比較しました。

条件

❶ 細胞：PC12HS 細胞（JCRB0266）
❷ 培地：RPMI1640 + 10% HorseSerum + 5% FBS
❸ 分化誘導培地：RPMI1640 + 0.1%HorseSerum + 0.05%FBS + 50ng/mL NGF
❹ ECM：Laminin（BD354232）、Collagen Ⅰ（BD354236）、Collagen Ⅳ（BD354233）、Poly-D-Lysine（BD354210）
❺ 培養容器：***UpCell®*** 3.5cm ディッシュ
❻ 比較対象：NUNC Tissue culture 35mm dish（以下 TCPS）
❼ コーティング条件：37℃、1 時間、1mL/dish、（濃度はメーカーの推奨濃度を参考にしました。下図右下参照）
播種密度：6 × 10^{4}cells/dish
培養期間：播種後 1 日で分化誘導培地に交換し、3 日おきに培地交換しながら 9 日間培養

分化誘導後 9 日目の比較写真



※ Collagen Ⅰ については血清濃度が低いため、***UpCell®*** では TCPS よりコーティング濃度を高くした。

UpCell® について（続き）

Q15 温度応答性培養器材を用いた細胞シートの培養に関して講習会などは開催していないのですか？

温度応答性培養器材を用いた細胞シートの培養に関する基礎的な説明会を定期的に開催しております。
また、希望される方には有償で、細胞シートの培養トレーニングを実施いたします。詳しくは弊社までお問い合わせください。
（お問い合わせ先：jutaku@cellseed.com）

Q16 研究用途以外で使用できる器材の取り扱いはありますか？

個別契約を締結させていただく事により特注品として製造可能な場合がございますので、まずは弊社までお問い合わせください。
（お問い合わせ先：sales.ccw@cellseed.com）

Q17 どんな細胞での回収実績がありますか？

繊維芽細胞、A549、マクロファージなど様々な細胞で使用可能となります。（下記図をご確認ください）

適用細胞種

Q18 どんな細胞でも回収、剥離ができますか？

剥がれにくい細胞種もあります。細胞種によっては *UpCell®* 高剥離タイプをお勧めする場合もございます。また高剥離タイプでも難しい場合は低濃度トリプシン併用で回収は可能です。

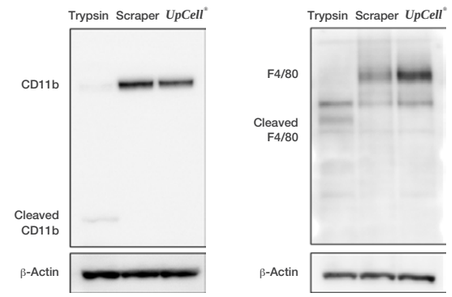
Q19 温度を下げて数分から数十分待って細胞を回収しますが、細胞へのダメージや影響はありませんか？

細胞にストレスはかかるかと思いますが、酵素処理で回収するよりはダメージは少ないです。（下記図をご確認ください）

温和に砂防回収が可能なため生体本来に近い状態が維持

UpCell® を低温インキュベーター内で 20℃、30min 静置、または組織培養用器材（Tissue culture polystyrene：TCPS）を 0.25% トリプシンで 37℃、5min 処理し、細胞を回収した後、Westernblot 法、ELISA 法を用いて細胞表面マーカーの保持性とサイトカインの産生量を評価した。

細胞表面マーカーの保持

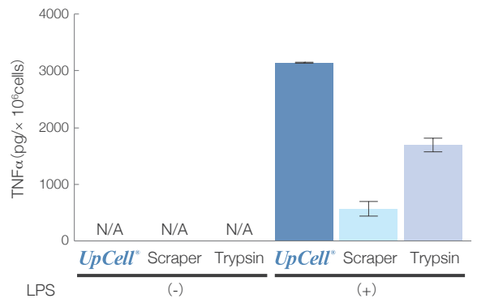


RAW264.7

結果

UpCell® で回収した RAW264.7 細胞の全長 CD11b、F4/80 保持量はトリプシン処理で回収した細胞と比較して各々 13 倍、25 倍以上であり、温度処理で細胞が温和に回収できることが示された。

活性の高い状態で細胞の回収が可能



RAW264.7

結果

UpCell® で回収した RAW264.7 細胞の TNF-α 産生量はトリプシン処理またはスクレーパーで回収した細胞と比較して各々 2.6 倍、2.1 倍以上であり、温度処理で回収した細胞の活性が高いことが示された。

Q20 細胞回収方法として温度を 20 から 25℃にして 10 から 30 分と記載ありますが、20℃より低い温度だと早く細胞が回収できますか？

温度を 20℃以下にしても回収時間が短くなることはありません。

FAQ 集

UpCell® について（続き）

Q21 各種細胞でのシート作製のプロトコールはあるのか？

数種類の細胞でシート作製と剥離についてのデータはあります。社内での培養条件などのご案内をさせていただくことは可能です。
各種細胞シートの培養条件（社内データより）下記図参照

細胞種	使用器材	培養条件			
		培地等	播種細胞数	培養日数	培地交換
293T	***UpCell®***	10%FBS DMEM	2×10^5	4	0 回
3T3-Swiss albino	***UpCell®***	10%FBS DMEM	1×10^5	4	0 回
A431	高剥離	10%FBS DMEM	2×10^5	3	0 回
A549	***UpCell®***	10%FBS DMEM	5×10^5	7	2 回
hMSC-AT	***UpCell®***	メーカー推奨培地	2×10^5	3	0 回
hMSC-BM	***UpCell®***	メーカー推奨培地	2×10^5	3	0 回
HepG2	***UpCell®***	10%FBS DMEM コラーゲンコート	2.5×10^6	2	0 回
MDCK	***UpCell®***	10%FBS DMEM	1×10^5	4	0 回
NIH/3T3	***UpCell®***	10%FBS DMEM	1×10^5	4	0 回
VERO	高剥離	10%FBS DMEM	2×10^5	10	3 回

※ 使用器材サイズは全て φ 3.5cm ディッシュを使用しています。高剥離は ***UpCell®*** 高剥離タイプを指します。
※ 社内で実績のある培養条件を記載しており、細胞シートが作製できる条件は下記に限ったものではございません。
※ 下記のコラーゲンコート方法は一例です。
Collagen Type Ⅰ（コーニング, 354236）の 0.5mg/mL 水溶液を調製し、ディッシュ当たり 2mL を添加して室温、30min 静置した。
溶液を除去して 2h 乾燥させた後、1mL の PBS で洗浄した。

FAQ 集

RepCell® について

Q1 *UpCell®* と *RepCell®* の違いを教えてください。

どちらも温度応答性ポリマーを培養器材の底面に固定化してあります。しかし、***RepCell®*** のみ、その底面表面に「グリッド・ウォール」加工を 3mm 間隔で配置しています。これにより細胞シート小片として回収が可能です。

Q2 剥離した細胞はバラバラ（シングル細胞）になるのですか？

細胞種や細胞密度によりますが、細胞間の結合が弱い場合は、ピペッティングすることによってバラバラ（シングル細胞）で回収することが可能です。

Q3 20℃の恒温器がないと剥がれませんか？

20 ～ 25℃の室温に静置することによって、細胞を剥がすことができます。温度が低ければ低いほど剥離の効率が良いというわけではございませんので、ご注意ください。

Q4 ゼラチンやコラーゲンコートすることは可能ですか？

可能です。その際には 37℃でのコーティングをお勧めしております。また、コーティングすることによって、細胞によっては培養速度が遅くなる場合はございますのでご注意ください（P39 ～ 40 参照）。

Q5 どんな細胞をターゲットにしているのですか？

NIH/3T3・Swiss/3T3 等の線維芽細胞、間葉系幹細胞、筋芽細胞、腫瘍細胞等のほとんどの細胞で使用できます。強い接着性を持った一部の細胞は使用できない可能性があります。予めご了承ください。

Q6 剥がれにくい細胞はどうやって剥がしたらいいですか？

まずはピペッティングやタッピングなどの物理的な刺激を加えてみてください。それでも剥がれないような、強い接着性をもった細胞に関しましては、希釈したトリプシンや EDTA などと温度処理の併用をお勧めいたします。または ***UpCell®*** 高剥離タイプをご使用いただくと改善される場合もございます。

Q7 シングルセルで回収したい場合は *RepCell®* で大丈夫ですか？

UpCell® でも回収は可能です。

どちらも温度応答性ポリマーを培養器材底面に固定化してありますので、***UpCell®*** でも細胞を薄く播種し、培養日数を調整することにより、ピペッティングなどでシングルセルとして回収可能です。

（***UpCell®*** を勧めた場合のメリットは Plate、Flask、高剥離、低剥離タイプなどラインナップが豊富なこと。***RepCell®*** は dish のみ）

FAQ 集

HydroCell® について

Q1　マクロファージなどの培養以外に、どんな使い道がありますか？

付着性の高い免疫系の細胞培養以外に以下の用途を提案しています。

❶ ES 細胞や iPS 細胞の胚様体形成

❷ 神経幹細胞、ガン細胞などのスフェロイド形成

❸ スフェロイド培養等

Q2　細胞が *HydroCell*® に付着してしまうのですが…

コラーゲンなどの接着タンパク質の分泌が盛んな細胞は接着してしまう場合はございます。物理的な刺激を与えるなど試してみてください。

Q3　*HydroCell*® を用いた軟寒天コロニーアッセイ代替法について教えてください。

メチルセルロースを用いたコロニーアッセイについて

（製品カタログ P16 ～ 17 掲載：NRK 細胞、A549 細胞を用いた抗ガン剤スクリーニング例）

増粘剤としてメチルセルロースを添加しています。0.6% 程度の低濃度ではハンドリングに影響が少なく、培養が安定化し、細胞同士が浮遊中に接着し合い大きな塊をつくることを防ぐことができます。これにより、中心部の栄養不足によるネクローシスや接着による増殖阻害を起こさず、本来の増殖能を反映した精度の高い測定が可能となります。

❶ ガン細胞またはガン細胞を含む組織分散懸濁液を 0.6% メチルセルロースを含む培養液に懸濁する。

❷ 細胞密度が 10,000 個 /cm^2 以下になるよう *HydroCell*® に播種する。（3,000 個 /cm^2 が好ましい）

❸ 3 日間、5% 炭酸ガスインキュベータにて培養する。

❹ 培養像を写真にとり、生細胞測定試薬を添加し、数時間後に OD 測定を行う。

メチルセルロース調製方法

使用するもの：メチルセルロース 400cps（Wako. Lot#138-05052）
2 倍濃縮した培地

0.6% メチルセルロース溶液の調製手順　概要

（2.6% メチルセルロース溶液を調製し、その後 0.6% へ希釈する。）

❶ 2.6% メチルセルロース溶液の調製

① メチルセルロース（2.6g）を 80 ～ 90℃の精製水（25ml）に徐々に添加し、激しく振とうして十分に溶解させる。

② この溶液に 4℃の精製水（75mL）を加え激しく振とうした後、4℃以下で 3 時間以上、液が半透明になるまでマグネチックスターラーで攪拌する。

③ 液を、121℃、10 分オートクレーブ滅菌する。滅菌済液を 4℃以下、24 時間以上保存し、透明な状態にする。

❷ 1.3% メチルセルロース－培地混液

2.6% メチルセルロース溶液に、2 倍濃縮（× 2）MEM（必要ならば、FCS 等、血清とともに）を等量添加する。使用前、この混液を室温下で数時間、マグネチックスターラーを用いて攪拌する。

❷ の溶液と細胞組織懸濁液を用いて、最終濃度 0.6% メチルセルロース－細胞混液を調製し、播種します。
培地につきましては御参考とし、お客様の培地に合わせて手順内容をご調整ください。

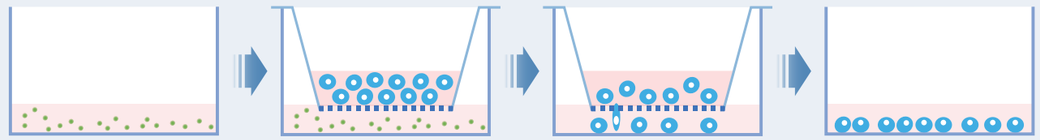
FAQ 集

幹細胞分画回収キット VIVANT-CELL®-POT について with *UpCell*® Plate

Q1　幹細胞分画回収キットとは

ネッパジーン株式会社の製品で高機能な細胞を高効率、簡便に分画できる分離膜「**VIVANT-Cell®-Pot**」と、培養細胞の回収にトリプシンなどのプロテアーゼやスクレーパーなどの物理刺激などを必要とせず、温度を下げるだけで細胞が有する生物機能を保持したまま細胞を剥離することが可能である ***UpCell***® を組み合わせたキットとなります。

Q2　細胞膜分取原理について



遊走因子等を含む遊走培地を ***UpCell***® Plate に準備してください。

UpCell® Plate に **VIVANT-CELL®-Pot** をセットしてください。膜上に細胞を加えて培養します。

遊走能によって細胞が膜下に分取されます。

分取された細胞を各種アプリケーションにご使用ください。細胞を回収する時は温度を 20℃程度に下げ、30 分ほどそのまま静置してください。20℃に温度低下後、30 分程度静置しても細胞が付着したままの場合は、ウェル内の培地を穏やかにピペッティングすると、付着した細胞が剥がれます。

Q3　細胞分取されない、または細胞分取数が少ない

原　因：アプライする細胞数が多いまたは少ない。
対処法：アプライする細胞数を最適化してください。

原　因：分離膜が下層培地に接していない。
対処法：十分量の遊走培地（推奨 2.0mL）をプレートウェルに加えてください。

原　因：細胞遊走条件が適していない。
対処法：遊走条件は細胞により異なる可能性があります。遊走条件の最適化を行ってください。また本手法により細胞分離できないこともあります。

Q4　分取細胞が不均一、不自然に多い

原　因：分離膜が破損している。
対処法：使用前に損傷がないか確認し、細胞添加時に膜面を傷つけないようにご注意ください。

Q5　膜下面に気泡がトラップされた

対処法：**VIVANT-CELL®-Pot** を一度液面からゆっくり引き上げ、そのままの状態で気泡が消えるまで保持し、消泡後に再度セットしてください。セット時に本体を少し傾けることで気泡のトラップを回避できます。

製品に関するお問い合わせ　　：**info@cellseed.com**
検証済み細胞に関する最新データ：**www.cellseed.com/product/data/index.html**

お願い　および　注意事項

- EOG 滅菌済みです（細胞培養器材のみ）。
- 仕様は改良のため予告なく変更することがあります。予めご了承ください。
- 本製品は医療機器ではなく、研究用に限定しております。
  医薬品の製造、品質管理、各種診断、治療および研究など、その使用目的にかかわらず、人体には使用しないでください。
- 希望販売価格
  記載の希望販売価格は 2024 年 12 月 1 日現在の希望販売価格です。
  予告なしに改定される場合がありますので、ご注文の際にご確認ください。
  消費税は含まれておりません。

販売代理店

CellSeed
Regenerate the Future

株式会社セルシード
〒135-0064　東京都江東区青海 2-5-10　テレコムセンタービル東棟 15F
Email：sales.ccw@cellseed.com　URL：www.cellseed.com

TIC24-001-02