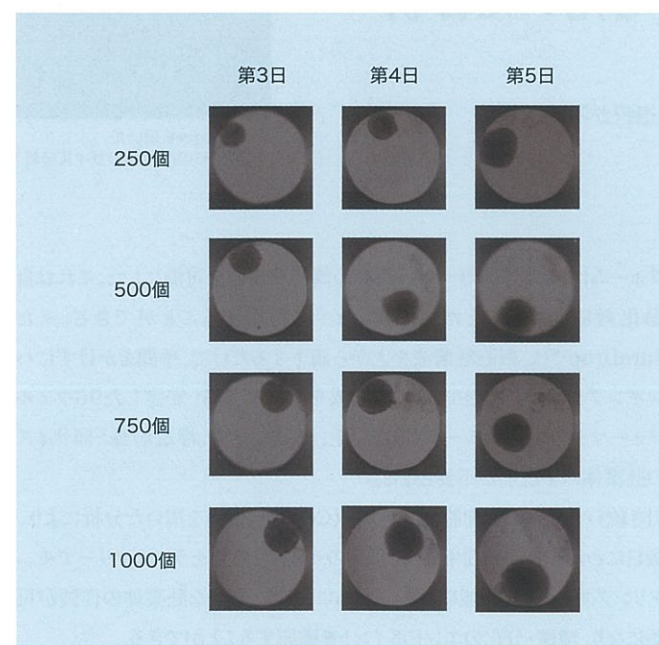
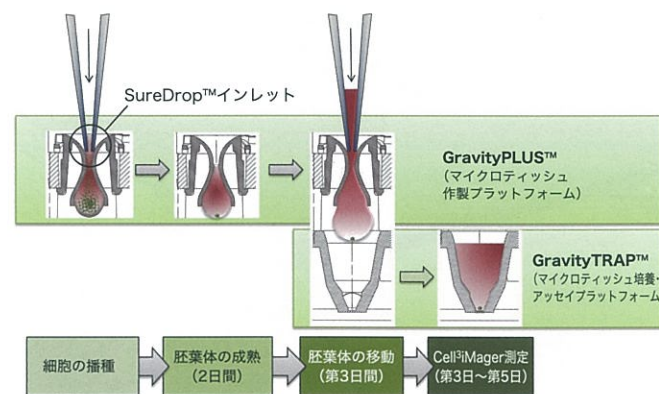


胚葉体の迅速作製、わずらわしさを解消!



GravityPLUS™ハンギングドロッププレートによる胚葉体形成の簡便化

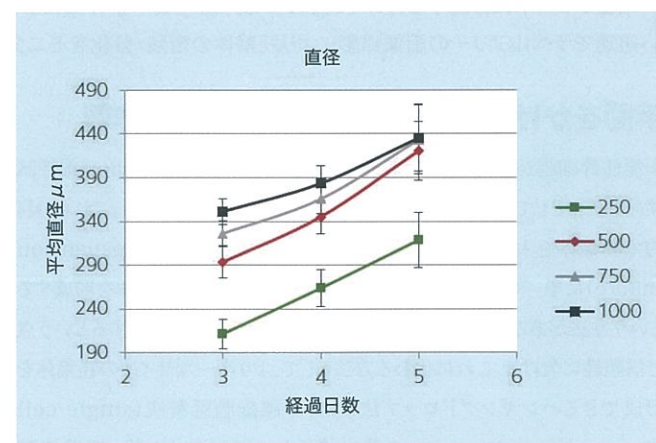
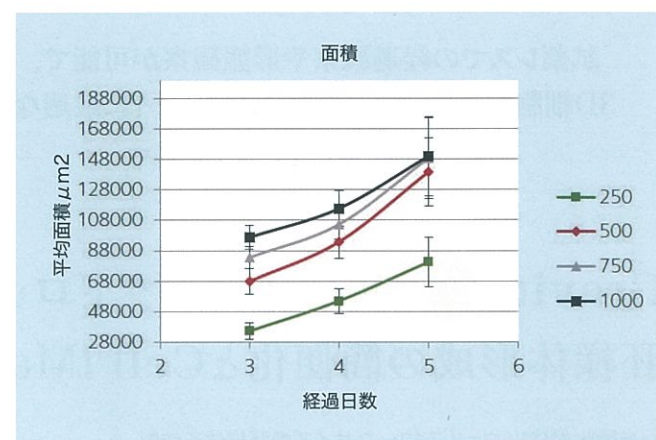
LIFを添加した幹細胞用血清含有培地を入れたゼラチンコート済みフラスコで、ESD3[D3] (ATCC® CRL 1934™)を成長させた。その後、ESD3細胞をトリプシン処理して回収し、播種密度250、500、750、1000cells/well (1密度当たり24ウェル)で、96ウェルGravityPLUS™に再播種した。細胞は、胚葉体を形成させるため、細胞分化用血清含有培地で再凝集させた。



上段: GravityPLUS™ハンギングドロッププラットフォームでの胚葉体形成と、その後のCell³iMagerによるサイズ計測のためのGravityTRAP™プレートへの移動の概要。下段: 96ウェルGravityTRAP™プレートへの移動、培養後の胚葉体を示す代表的な画像 (第3日=移動日、ウェルの直径=1 mm)。

Cell³iMagerを用いたGravityTRAP™プレート中の胚葉体サイズ評価

3日後、SureDrop™から新鮮な培地を添加して、形成された胚葉体をGravityTRAP™細胞非接着性平底プレートに移した。胚葉体の成長は、高速3D細胞スキャナー (Cell³iMager)を用いた解像度4800dpiでのスキャンにより、3回 (第3、4、5日) モニターした。取り込んだ画像から、専用のアルゴリズムを用いて胚葉体の平均面積 (上のグラフ参照) と直径 (下のグラフ参照) ならびにOD (Optical Density: データは非提示) を算出した。



※ GravityTRAP™プレート
InSpheroが開発した3D細胞培養プレート。96穴の SBS 標準準拠のプレートで、他のプレートから3D細胞の形態などに影響を与えずにウェル内に3D細胞を受け止める機能や、細胞の壁面への接着を防ぐ機能、不注意による溶媒交換時の吸い込みの防止の機能などをもち、欧米を中心に多くの3D細胞培養研究で採用されている。

株式会社 SCREEN ホールディングス

京都(本社) / 〒602-8585 京都市上京区堀川通寺之内上る四丁目天神北町1番地の1
ライフサイエンス事業室
京都(洛西) / 〒612-8486 京都市伏見区羽東師古川町322
Tel: 075-931-7824 Fax: 075-931-7826
東京 / 〒135-0044 東京都江東区越中島1-2-21 ヤマタネビル7階
Tel: 03-4334-7977 Fax: 03-4334-7978

SCREEN

高速3D細胞スキャナー アプリケーションノート

迅速な胚様体(EB)の作製とサイズ評価



試薬レスでの経過観察や形態観察が可能で、3D細胞培養でのラベルフリーアッセイに最適な明視野スフェロイドカウンター



GravityPLUS™ハンギングドロッププレートによる胚様体形成の簡便化とCell³iMagerを用いた分析

- ・自動化対応96ウェルで均一なサイズの胚様体を作製
- ・培養プレートに移動するだけで、胚様体の浮遊培養や手作業による煩雑な選択が不要
- ・迅速でラベルフリーの画像撮影により胚様体の増殖・分化をモニター

手間をかけずに均一サイズの胚葉体を作製

多能性幹細胞からの3次元胚様体の形成は、再生医療やin-vitro毒性試験のツールとして、また、胚発生研究のモデルとして有望である。これらの目的で胚葉体を大量に作製する方法として、回転浮遊培養 (suspension culture) に単一の胚性幹細胞 (ESC) を播種し、多数の胚葉体を形成するという方法があるが、この方法は均一サイズの胚葉体を作製するという点で信頼性に欠ける。これに代わる方法として、より均一なサイズの胚葉体形成できるハンギングドロップ法では、分離細胞懸濁液 (single-cell suspensions) をシャーレの蓋に播種して増殖させた後、浮遊培養 (suspension culture) に移し、その後、ハイスルーブット培養プレートでの分析のために手選別する。しかし、この煩雑で熟練を要するプロセスでも、浮遊培養での胚葉体の融合によりサイズが不均一になってしまうことがある。

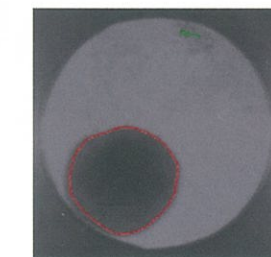
InSphero社のGravityPLUS™ (特許取得)ハンギングドロッププラットフォーム

フォームは、サイズが均一な胚葉体の簡便な作製を可能にした。それは自動化対応可能で、ただちにアッセイに利用することができる。またSureDrop™は、細胞懸濁液を上から滴下するだけで、手間をかけずにハンギングドロップ状態で胚葉体形成を可能にする。安定した96ウェルフォーマットによりスルーブットの向上、廃棄物減少、浮遊培養と同サイズの胚葉体の手選別が不要となる。

引き続き、高速3D細胞スキャナー (Cell³iMager)を用いた分析により、数日にわたる培養期間中に、胚葉体のサイズと形態をラベルフリーでモニタリングすることが可能になる。これらによって、均一な胚葉体の作製が可能になり、増殖・分化のエンドポイントを確認することができる。

アプリケーション

- 胚毒性・催奇形性のスクリーニング
- 分化パスウェイ分析
- 品質管理



Cell³iMagerを用いた培養後5日の胚様体のサイズ分析

■InSphero AG社

創業研究を高い予測性でサポートする、生体外3D細胞培養分野のリーディングカンパニー。器官型、生物学上の3D細胞を提供している。スイス・チューリッヒ本社の他、米国、ドイツに拠点をもち、製薬・化粧品分野で世界のトップ10社に入る大手企業全てを顧客に持つ。InSpheroの「3D Insight™ Microtissues」は、生物学的薬剤の効能や毒性の臨床応用に活用されている。チューリッヒのSwiss Federal Institute of Technology (ETH)とチューリッヒ大学が共同で設立した会社で、科学的・商業的な成功により、数々のスイス国内の賞および国際的な賞を受賞している。また、品質管理システムISO9001:2008認証を取得している。URL: www.insphero.com 日本での輸入販売代理店は、株式会社 ビジコムジャパンです。URL: www.bizcomjapan.com

InSphero is ISO 9001:2008 certified All rights reserved. 2013 InSphero AG. 3D InSight and GravityPLUS are trademarks of InSphero AG. For life science research only. Not for use in diagnostic procedures.

資料作成: 2014年8月