

取扱説明書

ciKIC[®] IEC Maturation Medium
(ヒトiPS細胞由来腸管上皮モデル作製用培地)

1. 製品特長
2. 製品形態
3. 調製方法
4. 準備
5. プロトコール
6. よくあるご質問

はじめに

この度は、関東化学の「ciKIC® IEC Maturation Medium」をご購入頂き誠にありがとうございます。

本製品は、東京工業大学 生命理工学院 桑教授との共同研究により開発されました。

ご使用前にこの取扱説明書をよくお読みのうえ、ご使用ください。

当社HP上の製品ページには、プロトコール動画を掲載しておりますので合わせてご参照ください。

製品ページはこちらから→



本製品は試験研究用です。ヒトや動物を対象にした医療や臨床診断の目的では使用しないでください。

略語一覧

略語	名称
MM	ciKIC® IEC Maturation Medium
TM	Entero Thawing Medium
TM+Y	10 µM Y-27632 in Entero Thawing Medium
Y	Y-27632
ビトリゲル	ad-MED ビトリゲル®2 (24well)
	注意事項
	ワンポイントアドバイス

1. 製品特長

ciKIC® IEC Maturation Medium（以下略称：MM）は、ad-MED ビトリゲル®2上でヒトiPS細胞由来腸管上皮モデルを作製するための培地です。MMを使用してヒトiPS細胞由来腸管上皮細胞を培養することで、細胞播種後13～20日間において被験物質の吸収・代謝試験などが可能な腸管上皮モデルを作製することができます。

2. 製品形態

製品番号：08374-67	製品名：ciKIC® IEC Maturation Medium
---------------	----------------------------------

構成	容量	保管温度
basal medium	125 mL×1	冷蔵（2～8℃）
Supplement 1	2.5 mL×1	冷凍（-20℃）
Supplement 2	625 µL×1	冷凍（-20℃）



冷蔵で届いたアルミ袋にbasal medium, 冷凍で届いたアルミ袋にSupplement 1, 2が入っております。ご使用直前までアルミ袋に入れたまま上記保管温度で保管下さい。

3. 調製方法

上記MMについてはご使用日（Day 5）に各構成試薬を室温で解凍させ、無菌環境の下、以下の手順で調製してください。

- ① Penicillin-Streptomycinなどの抗生物質をbasal mediumへ添加（必須ではない）。
- ② Supplement 1を全量（2.5 mL）取ってbasal mediumへ添加後、培地を転倒混和。
- ③ ②の培地を使用して、Supplement 1を洗いこむ。
- ④ Supplement 2を全量（625 µL）取って②の培地へ添加後、培地を転倒混和。
- ⑤ ④の培地を使用して、Supplement 2を洗いこむ。
- ⑥ 調製した培地は使い切るまで、アルミ袋に入れて冷蔵で保管する。



調製後の培地は、調製後28日間まで安定した性能を示します。

調製後の培地ラベルに調製日から4週間後の使用期限を記載することを推奨します。

4. 準備

ご使用前に下記の試薬などを準備してください。

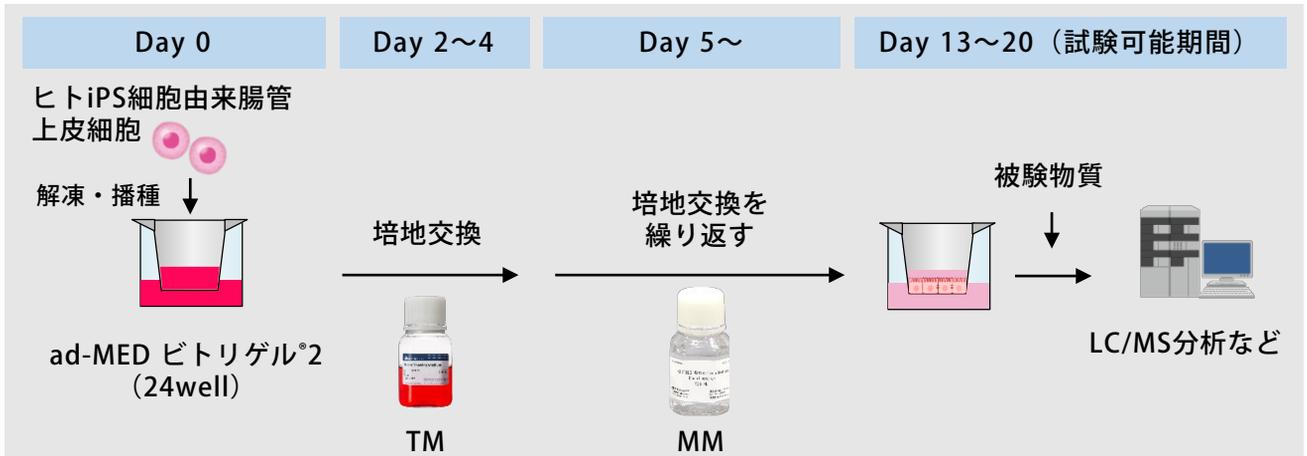
製品	メーカー	製品番号	容量	保管温度
StemRNA Entero (iPS細胞由来腸管上皮細胞)	REPROCELL	49033-00 (メ-カ-コード : RCDE001N)	1.8×10 ⁶ cells/vial ×2 vial	液体窒素
Entero Thawing Medium (以下略称 : TM)			80 mL×1	冷凍 (-20℃)
10 mM Y-27632水溶液 (以下略称 : Y)	APExBIO	49030-06 (メ-カ-コード : A3008-10)	10 mg	4℃以下
	上記のような市販のY-27632 二塩酸塩と滅菌水を用いて調製し、 分注して冷凍ストックしておくことを推奨します。			
ad-MED ビトリゲル®2 (24well) (以下略称 : ビトリゲル)	関東化学	08364-96	24個/ プレート	冷蔵 (0~6℃)
ペニシリン/ストレプトマイシン (10,000 IU/10,000 µg) ※必須ではない	BioConcept	49432-97 (メ-カ-コード : 4-01F00-H)	100 mL	冷凍 (-20℃)

■その他

- ・遠心管 (15 mL, 50 mL)
- ・マイクロピペッター、チップ
- ・電動ピペッター、ピペット
- ・安全キャビネット
- ・37℃インキュベーター (5% CO₂)
- ・耐凍性手袋 (凍結細胞バイアル操作用)
- ・遠心機
- ・ウォーターバス
- ・セルカウンターまたは血球計算盤
- ・PBS (-) または滅菌水 (必要に応じて)
- ・市販の24ウェルプレート (必要に応じて)
- ・経上皮電気抵抗値 (TEER) 測定装置 (必要に応じて。Millicell ERS-2を推奨)
- ・5%FBS入りHBSS buffer pH6.0, pH7.4 (必要に応じて)

5. プロトコール

概略



スケジュール

! 試験（アッセイ）前日は、必ずMMで培地交換（B）を行ってください。

下記2つの培養スケジュールが選択可能です。

◆スケジュール（1） 1日おきの培地交換

Day	0	2	4	5	7	9	11	13	15	17	19
操作	細胞解凍播種	培地交換 (A)	培地交換 (B)	培地交換 (A)	培地交換 (B)						
使用培地	TM+Y	TM		MM							

◆スケジュール（2） 水曜播種、土日スキップ

Day	0	2	5	7	9	12	14	16	19
曜日	水	金	月	水	金	月	水	金	月
操作	細胞解凍播種	培地交換 (A)	培地交換 (A)	培地交換 (B)					
使用培地	TM+Y	TM	MM						

培地交換 (A) : インサート内の古い培地を160 μ L除去
 ウェル内の古い培地を全て除去

→ 新しい培地を200 μ L添加
 → 新しい培地を500 μ L添加

培地交換 (B) : インサート内の古い培地を100 μ L除去
 ウェル内の古い培地を全て除去

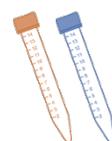
→ 新しい培地を110 μ L添加
 → 新しい培地を500 μ L添加

操作を始める前に

- ◆ 全ての操作は、安全キャビネット内の無菌環境下で行ってください。
- ◆ 凍結細胞の解凍について、操作に慣れていない間は2バイアル同時解凍せず、1バイアルずつ解凍することを推奨します。
- ◆ 細胞の解凍からTM+Yへの移行までは2分以内に行い、播種までは30分以内に行ってください。操作に時間がかかると細胞生存率が著しく低下します。
- ◆ TMは、Day 0の前日に-20℃の冷凍庫から4℃の冷蔵庫に移し、一晩かけて解凍してください。解凍後は4℃で保管、2週間以内に使用してください。2週間以内にご使用ください。凍結細胞1バイアルのみを使用する場合は、半量40 mLを1度だけ再凍結して保存可能です。それ以上の再凍結は行わないでください。

5-1 : Day 0 (TM+Yの準備、ビトリゲルの水和)

- ① 10 mM Y水溶液を調製し、終濃度10 μ M YになるようTMへ添加（以下、TM+Y）。遠心管2本（チューブA, チューブB）を準備し、解凍する細胞バイアル本数に応じ、以下容量でTM+Yを分注する。



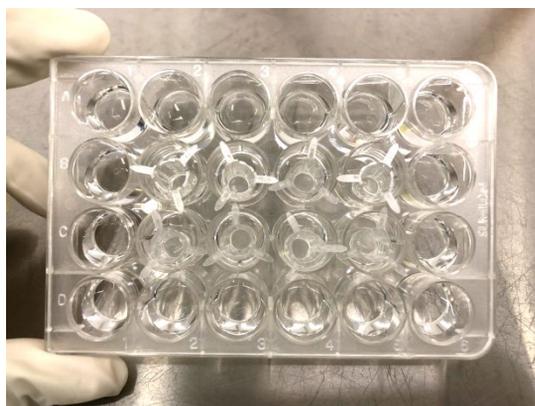
TM+Yの分注量	チューブA	チューブB	合計
凍結細胞バイアル1本を解凍する場合	9 mL	9 mL	18 mL (10mM Y水溶液を18 μ L)
凍結細胞バイアル2本を解凍する場合	18 mL	18 mL	36 mL (10mM Y水溶液を36 μ L)

- ② 分注したチューブA, チューブBを37℃に設定したウォーターバスで15分以上加温する。
- ③ チューブBのTM+Yを取って、ビトリゲルの各ウェルに500 μ L, インサートに100 μ Lを添加する。添加後のプレートを37℃インキュベーターにて10分以上保温する（ビトリゲルの水和）。



使用しないウェルには滅菌水やPBS (-) などを1 mL加えておくことを推奨します。

使用しないインサートは、市販の24 wellプレートに移して4℃の冷蔵庫で保管してください。



左図：8テスト行う場合の使用ウェル例

B2-B5, C2-C5の各ウェルにTM+Y 500 μ L, 各インサートにTM+Y 100 μ Lを入れ、その他のウェルには、滅菌水またはPBS (-) を1 mL入れる。

5-2 : Day 0 (細胞の解凍)

- ① 安全キャビネット内で、チューブA, チューブBのキャップを緩めておく。
- ② 凍結細胞バイアルを安全キャビネット内で蓋を1/4程度開け、バイアル内部の内圧を解放し再び蓋を閉め直す（この一連の操作は1分以内に、時間厳守）。
- ③ 直ちにバイアルをウォーターバスで加温する。バイアルを持って円を描くように揺すりながら90秒間加温し、その後直ちに安全キャビネット内に入れる（時間厳守）。

 90秒間の加温で、半分程度解凍された状態になります。時間超過により細胞が完全に解凍しないよう注意してください。細胞の生存率が著しく低下します。

- ④ バイアルに付着した水滴を直ちに拭き取り、バイアル内の細胞全量をチューブAに直接移す（デカンテーション）。③の加温完了から30秒以内に行う（時間厳守）。
- ⑤ チューブAの培地を1 mL程度取って、空になったバイアルを洗いチューブAに戻す。チューブAの蓋を閉めたら、一度転倒混和しておくことを推奨します。
- ⑥ チューブAを300 × g で5分間（室温）遠心する（遠心条件厳守）。
- ⑦ 遠心後のチューブA内の培地上清をアスピレーターで取り除く。細胞ペレットを吸引しないように注意深く操作する。

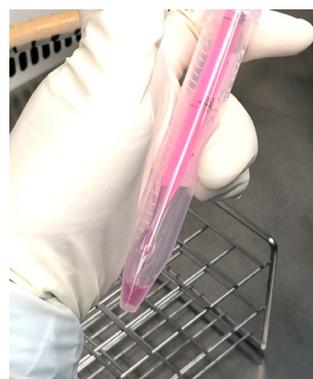
◆1バイアルを解凍播種する場合

チューブBのTM+Yを1.2 mL取って、チューブAに移し、5 mLピペットと電動ピペッターを用いて、3秒に1回で緩やかに5回ピペッティングする。

◆2バイアルを解凍播種する場合

チューブBのTM+Yを2.4 mL取って、チューブAに移し、5 mLピペットと電動ピペッターを用いて、3秒に1回で緩やかに5回ピペッティングする。

 5 mLピペットの先端をチューブ底に押し付けると細胞の生存率が低下する恐れがあります。チューブの壁面に懸濁液を吹き付けるようにして細胞を分散させて下さい（右図参照）。



- ⑧ セルカウントを行い、 1.5×10^6 cells/mLとなるようチューブBのTM+Yでメスアップする。

5-3 : Day 0 (細胞の播種)

- ① 5-1③で37℃インキュベーターに入れたビトリゲルを安全キャビネットに入れる。
- ② 5-2⑧で調製した細胞懸濁液を5 mLピペットと電動ピペッターを用いて4回懸濁する。泡が出ないように1回5秒程度かけてゆっくりピペッティングする。



解凍直後の細胞は繊細です。5 mLピペットを使い、ピペッティング回数は少なくしてください。

- ③ 細胞懸濁液を100 μ L取って、ビトリゲルの1列目の各インサートの中央付近に1滴ずつ滴下しながら添加し、細胞を播種する。
- ④ チューブA内で濃度勾配ができないよう5 mLピペットと電動ピペッターを用いて4回ピペッティングし、2列目以降も③と同様に播種する。
- ⑤ 細胞を播種したプレート可能な限り振動を加えずに、水平のまま37℃インキュベーターへ移し、培養を開始する。

5-4 : Day 2~ (培地交換)

4ページ目に記載のスケジュール (1), (2) から培養スケジュールを選択し、培地交換当日に指定された培地を用いて、培地交換操作 (A) または(B) を行ってください。また、Day 5にMMを使用開始する際は、1ページ目に記載の「3. 調製方法」に従って培地調製してください。

◆培地交換 (A)

- ① 必要量のTMまたはMMを15 mLの遠心管に分注し、予め15分以上37℃で加温する。
- ② インサート内の古い培地を160 μ L抜いた後、ウェル内の古い培地をアスピレーターで全て除去する。
- ③ 37℃で温めておいた新しい培地をウェル内に500 μ L加えた後、インサート内に200 μ L添加し、プレートを37℃インキュベーターへ戻す。

◆培地交換 (B)

- ① 必要量のTMまたはMMを15 mLの遠心管に分注し、予め15分以上37℃で加温する。
- ② インサート内の古い培地を100 μ L抜いた後、ウェル内の古い培地をアスピレーターで全て除去する。
- ③ 37℃で温めておいた新しい培地をウェル内に500 μ L加えた後、インサート内に110 μ L添加し、プレートを37℃インキュベーターへ戻す。

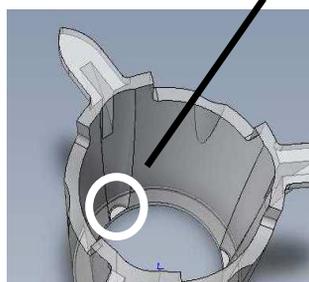


複数のウェルを同時に培地交換する際は、6ウェルまでを限度に各操作を行い、トータル15分以内に培地交換を完了してください。また、ビトリゲル膜は破れやすいため、チップ先端で突き破らないよう注意してください。

培地吸引時のアドバイス

インサート内の培地を除去する際は、プレートを斜めに傾けて持ち、インサート側面のピペット止め構造にチップ先端を沿わせ、1回当たり約4秒のペースで慎重に操作してください（細胞剥離を防ぎます）。インサート内には常に細胞表面を覆う程度の培地を残します。インサートをピンセットで掴んで操作する必要はありません。

ピペット止め構造



インサート内のMMの吸引除去

培地追加時のアドバイス

ウェルに培地を追加する際は、5 mLピペットを使用しても構いません。

インサート内に培地を追加する際は、インサート側面のピペット止め構造の上部にチップ先端を沿わせ、1回当たり約4秒のペースで慎重に操作してください（細胞剥離を防ぎます）。



ウェルへのMMの追加



インサートへのMMの追加

※実際のMMの色は、上記写真とは異なります。

5-5 : Day 13～ (吸収試験方法の例)

◆準備

- ① アッセイ日になるまで取扱説明書の手順通りに培養を行う。アッセイ日の前日に必ず培地交換をしておく。
- ② アッセイ当日、TEER測定装置 (Millicell-ERS2)、5%FBS入りHBSS buffer pH6.0 (以下、buffer pH6.0) と 5%FBS入りHBSS buffer pH7.4 (以下、buffer pH7.4) を用意する。

◆作製モデルの健全性確認

- ① MMが入った状態のまま培地交換せずに Millicell-ERS2 を用いて作製モデルのTEERを測定する。
- ② TEERの測定値が $150 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 以上のウェルをアッセイに使用する。
(ビトリゲルの膜面積は、 0.33 cm^2 です)

◆培地の洗浄

- ① インサート側の MM をマイクロピペットでゆっくり抜いて除去する。
- ② ウェル側の MM を抜いて除去する (マイクロピペットでもアスピレーターでも可)。
- ③ ウェル側に buffer pH7.4 を $700 \mu\text{L}$ 入れる。
- ④ インサート側に buffer pH6.0 を $250 \mu\text{L}$ 入れる。

◆被験物質の暴露

- ① インサート側の buffer pH6.0 をマイクロピペットでゆっくり抜いて除去する。
- ② ウェル側の buffer pH7.4 を抜いて除去する (マイクロピペットでもアスピレーターでも可)。
- ③ ウェル側に buffer pH7.4 を $700 \mu\text{L}$ 入れる。
- ④ インサート側に被験物質入り buffer pH6.0 を $250 \mu\text{L}$ 入れる。
- ⑤ 数時間インキュベーション後、サンプリングしてLC/MSで分析する。

 培地交換操作は8ページ目をご参照ください。複数のウェルを同時に培地交換する際は、6ウェルまでを限度に各操作を行い、トータル15分以内に培地交換を完了してください。また、ビトリゲル膜は破れやすいため、チップ先端で突き破らないよう注意してください。

6. よくあるご質問

Q&A	
1	5-2で細胞バイアルをウォーターバス内で解凍する際、解凍時間が90秒より長くなるとどうなるか？
	ウォーターバス内で細胞が完全に解凍されると生存率および生着率が著しく低下しますのでご注意ください。
2	5-2, 5-3で細胞をピペティングした後、凝集塊が多く認められるが、シングルセルになるまでピペティングを繰り返した方で良いか？
	生存率および生着率が低下するため、ピペティングを繰り返すことは推奨しません。凝集塊が多少残っていても培養可能です。
3	5-4で培地交換時、同時に7ウェル以上培地交換することは可能か。
	扱うウェル数を増やすと培地交換時に細胞が乾いてしまう恐れがあるため推奨しません。

その他、ご不明な点などがございましたら下記へお問合せ下さい。

製品に関する技術的なお問合せ先

関東化学株式会社
試薬事業本部 バイオケミカル部

〒103-0022 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号
TEL : 03-6214-1090
HP : <https://www.kanto.co.jp>

