

線維性コラーゲン表面上に培養された細胞の剥離

剥離酵素に関する一般注意事項：様々な剥離酵素を用いてコラーゲン表面から細胞を剥離することが可能です。コラーゲン膜およびコラーゲンチューブは酵素処理後に再利用しないでください。

最も一般的に使用される細胞剥離酵素の特性（メリット／デメリット）について、以下に要約します。コラーゲン細胞キャリア上で培養した細胞を剥離させる際には、EDTA 併用および非併用でのトリプシン（以下、トリプシンと呼びます）、TrypLE Select[®]、または Accutase[®]の使用が可能です。

トリプシン：ブタ膵臓から精製されます。タンパク質分解酵素の混合物で、主にトリプシンで構成されますが、エラスターゼおよびキモトリプシンも含有します。そのため、ロットごとに剥離性能にばらつきがあります。トリプシンによる細胞の処理時間が長過ぎる場合、不可逆的な細胞損傷が生じます。剥離処理中に、大半の細胞表面タンパク質はトリプシンによって破壊されます。トリプシンの反応を停止させるためには、不活性化処理が必要です。不活性化は、血清、血清含有培地または大豆トリプシン阻害剤（TNS（トリプシン中和液）と呼ばれる）を用いて行います。

Accutase[®]：カニから抽出される、タンパク質分解活性およびコラーゲン分解活性を有する酵素の混合物です。哺乳動物由来の混在成分は含まれておりません。Accutase[®]は、トリプシンを直接置き換えて使用でき、細胞にきわめて優しい剥離酵素です（37°C で 15 分間処理した場合と 50 分間処理した場合を比較して、処理後の細胞生存に著明な差は認められません）。細胞表面タンパク質の大半を傷つけることなく細胞が剥離します。Accutase[®]は 37°C の場合 1 時間後に自然に不活性化するため、4°C で保存する必要があります。また、繰り返し凍結／融解を行うことは避けてください。Accutase[®]では反応を停止させるための不活性化処理は不要です。

TrypLE Select[®]：遺伝子組換え技術によって合成されたトリプシンで、トリプシンと直接置き換えて使用できます。TrypLE Select[®]は、動物およびヒト由来ではないため、ウイルスおよびプリオンタンパク質の混在がありません。室温での保存が可能であり、最長 6 ヶ月間安定です。トリプシンと比較して細胞へのダメージが少なく継代後の細胞生存は良好です。反応を停止させるのに必要な処理は、バッファーや培地を用いた TrypLE Select[®]の希釈のみです。

Viscofan BioEngineering

Naturin Viscofan GmbH の事業部門
Badeniastraße 13
69469 Weinheim
Germany

電話：+49 (0)6201 86-358
ファックス：+49 (0) 6201 86-226
Eメール：sales@bio.viscofan.com
www.viscofan-bioengineering.com

注意：剥離プロトコルは細胞のタイプごとに最適化する必要があります。

1. 培地をウェルから吸引除去します。この際コラーゲン表面を傷つけないように常に注意が必要です。
2. 室温以上の温度に加温済みの PBS (Ca^{2+} と Mg^{2+} を含まない) $100 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ を添加して細胞を洗浄します。細胞培養容器を慎重に回転させ、上清を吸引除去して、細胞をリンスします。細胞のすぐ上ではピペティングせず、壁に沿って液体を穏やかに添加します。
3. 選択した剥離酵素を $50 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ 添加します。
4. 細胞が円形になり、剥離し始める（円形になった細胞は光学顕微鏡で判別できます）まで 37°C で培養します。細胞の剥離は顕微鏡観察で判断する必要があります。
5. 細胞培養容器を軽くたたき、細胞の剥離を促します。
6. 使用する酵素に応じた方法で、剥離反応を停止させる必要があります。

トリプシン： 同量のトリプシン阻害剤を添加します（一般注意事項を参照）。

Accutase®： 1～2 容量の培地を細胞に添加します（培地を節約したい場合には、PBS (Ca^{2+} と Mg^{2+} を含まない) を使用することもできます)。

TrypLE Select®： 1～2 容量の培地を細胞に添加します（培地を節約したい場合には、PBS (Ca^{2+} と Mg^{2+} を含まない) を使用することもできます)。

1. CCCから細胞をすべて回収し、単細胞からなる懸濁液にするために、細胞懸濁液で CCC を 2～3 回すすぎます。
2. 細胞懸濁液を遠心チューブに移します。
3. 細胞を室温 $200 \times g$ で 5 分間遠心します。
4. 上清を吸引し、あらかじめ加温した適量の培地で細胞ペレットを再懸濁します。
5. 細胞を再播種する場合には、細胞を計数し、所定の播種密度で生細胞を播種します。

すべてのデータおよび推奨事項は、現時点での弊社の知識に基づくものであり、結果を保証するものではありません。技術開発に伴い、弊社は今後予告なく追加、変更を行う権利を留保します。弊社製品がお客様の技術的要件に適合するかどうかにつきましては、お客様ご自身で確認していただきますようお願いいたします。ご質問がございましたら、お気軽にお問い合わせください。

2015年3月24日版