

## 凍結保存肝細胞の融解・使用方法



## はじめに

---

本プロトコールには、代謝安定性（内因性クリアランス）、代謝物の識別およびプロファイリング、酵素誘導、肝毒性、トランスポーターの取り込みと排出、環境生物濃縮および肝臓疾患研究を含む様々なアプリケーションに使用するための、凍結保存肝細胞の融解および調製方法が含まれています。

本プロトコールの最初の部分は浮遊型のロット用に最適であり、続くプロトコール全体はプレート培養可能な肝細胞のプレート培養および重層のために最適です。

ハンズフリーによる利便性に加え、マニュアル法よりも感度および再現性に優れたデータが得られます。

弊社がご提供するすべての凍結保存肝細胞のリストに関しては、[www.thermofisher.com/hepatocytes](http://www.thermofisher.com/hepatocytes) をご参照ください。

プロトコールの 1 ～ 7 までは浮遊細胞、接着細胞両方に共通しています。

8 以降は接着細胞用となっています。

## 推奨試薬

---

### ヒト浮遊細胞

#### →融解用培地

	サイズ	製品番号
・ Hepatocyte Thawing Medium (HTM)	45 mL	CM7500
または		
・ Cryopreserved Hepatocytes Recovery Medium (CHRM)	50 mL	CM7000

#### →インキュベーション用培地

・ William's Medium E (1x, no phenol red)	500 mL	A1217601
・ Hepatocyte Maintenance Supplement Pack (Serum Free)	1 pack	CM4000

### ヒト接着細胞

#### →融解用培地

・ Hepatocyte Thawing Medium (HTM)	45 mL	CM7500
または		
・ Cryopreserved Hepatocytes Recovery Medium (CHRM)	50 mL	CM7000

#### →プレート培養用培地

・ William's Medium E (1x, no phenol red)	500 mL	A1217601
・ Hepatocyte Plating Supplement Pack (Serum containing)	1 pack	CM3000

#### →インキュベーション用培地

・ William's Medium E (1x, no phenol red)	500 mL	A1217601
・ Hepatocyte Maintenance Supplement Pack (Serum Free)	1 pack	CM4000
・ Collagen I, Coated Plates	1 plate	CM1024
・ Geltrex LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix	5 mL	A1413202

### 動物浮遊細胞

#### →融解用培地

・ Hepatocyte Thawing Medium (HTM)	45 mL	CM7500
または		
・ William's Medium E (1x, no phenol red)	500 mL	A1217601
・ Hepatocyte Plating Supplement Pack (Serum-containing)	1 pack	CM3000

#### →インキュベーション用培地

・ William's Medium E (1x, no phenol red)	500 mL	A1217601
・ Hepatocyte Maintenance Supplement Pack (Serum Free)	1 pack	CM4000

---

## 動物接着細胞

### →融解用培地

	サイズ	製品番号
・ Hepatocyte Thawing Medium (HTM)	45 mL	CM7500
または		
・ William's Medium E (1x, no phenol red)	500 mL	A1217601
・ Hepatocyte Plating Supplement Pack (Serum-containing)	1 pack	CM3000

### →プレート培養用培地

・ William's Medium E (1x, no phenol red)	500 mL	A1217601
・ Hepatocyte Plating Supplement Pack (Serum-containing)	1 pack	CM3000

### →インキュベーション用培地

・ William's Medium E (1x, no phenol red)	500 mL	A1217601
・ Hepatocyte Maintenance Supplement Pack (Serum Free)	1 pack	CM4000
・ Collagen I, Coated Plates	1 plate	CM1024
・ Geltrex LDEV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix	5 mL	A1413202

★ 融解用培地はヒト肝細胞の場合 HTM 培地もしくは CHRM™ 培地、動物肝細胞の場合は HTM 培地もしくは Gibco™ Hepatocyte Plating Supplement Pack (製品番号 CM3000) を加えた William's E 培地のどちらかをお選びください。

## 凍結肝細胞を溶かす前の準備

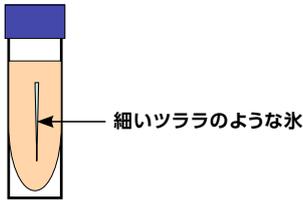
---

### 事前調製

- 重層を使用して肝細胞をプレート培養する場合には、Gibco™ Geltrex™ LEDV-Free Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix（製品番号 A1413201）の仕様書を参照し、ロットの濃度および技術的な参考事項を確認してください。Geltrex Matrix は、アプリケーションの前に氷上で 2 ～ 3 時間融解するか、または 4°C で一晩融解した後に氷冷しておき、ゲル化を防ぎます。
- [Hepatocyte Maintenance and Plating Supplement Packs](#)（製品番号 CM4000 および CM3000）に添付された説明書を参照し、William's E 培地を使用して Maintenance and Plating Media を調製してください。
- 方法を開始する前に、本プロトコルを熟読して、必要な試薬および装置がすべて揃っていることを確認してください。一度融解されると、凍結保存肝細胞は直ちに使用される必要があり、再凍結すると代謝活性は維持されません。
- すべての凍結保存肝細胞がプレート培養に適している訳ではありません。本プロトコルを肝細胞のプレート培養に使用する場合には、使用するロットがプレート培養可能なものであることを確認してください。  
(注意：初代肝細胞を取り扱う場合には、一般的な安全措置をとり、適切なバイオセーフティーキャビネットを使用してください。)

# 凍結肝細胞の融解プロトコール

## 融解→遠心分離→再懸濁

1. Water Bath を使って培地を 37°C に温めます。  
ヒト肝細胞を使用→ CHRM™ 培地または HTM 培地  
動物肝細胞を使用→ HTM 培地または Gibco™ Hepatocyte Plating Supplement Pack (製品番号 CM3000) を加えた William's E 培地  
接着細胞を使用→プレート培養用培地 Hepatocyte Plating Supplement Pack (製品番号 CM3000) を加えた William's E 培地  
浮遊細胞を使用→インキュベーション用培地 Hepatocyte Maintenance Supplement Pack (製品番号 CM4000) を加えた William's E 培地
2. 凍結保存肝細胞を 37°C の Water Bath で 2 分以内で融解します。  
肝細胞はとてもデリケートな細胞です。液体窒素（気相）で保存されている状態から直ちに 37°C の状態に戻す必要があります。バイアルを Water Bath に入れてからも液体が融解するまで Water Bath から室温へ取り出さないでください。細いツララのような氷がバイアルの中で浮遊している状態まで融解してから取り出してください。
3. バイアルを 70% のアルコールスプレーで消毒してクリーンベンチの中で拭きます。CHRM 培地または HTM 培地、Hepatocyte Plating Supplement Pack (製品番号 CM3000) を加えた William's E 培地の中に融解した肝細胞をデカントしてください（ピペットを使用しても大丈夫ですが、チップの先が広く開いているタイプを使用してください）。
4. 室温で遠心分離します。

### CHRM (CM7000) を使用する場合

	G-force	時間 (分)
ヒト	100	10
イヌ、サル	65	4
ラット、マウス	55	3

### HTM (CM7500) を使用する場合

	G-force	時間 (分)
ヒト	100	10
イヌ、サル	86	6
ラット、マウス	86	6

5. 遠心分離後、上清をデカントして、 $1 \times 10^6$  の細胞に対して 1 mL の培地を加えます。再懸濁はピペットは使用せず、ゆっくりとした転倒混和を行ってください。  
→接着細胞の場合はプレート培養用培地を使用  
→浮遊細胞の場合は事前に温めてあるインキュベーション用培地を使用

## カウント→プレート→インキュベーション

6. 生細胞数と収量を計算します。  
→計算式が記載された「肝細胞セルカウンティングシート」（14 ページご参照ください）を使用  
(注意：肝細胞は非常に壊れやすく、自動セルカウンティング装置では多くの場合、正しくない生存率および収量が表示されます。正確なプレート培養密度は良好な結果のために極めて重要ですので、より高い精度を得るために弊社では手動によるカウンティングを推奨しています。)
7. 浮遊状態で肝細胞を使用する場合には、培地を追加して必要な細胞濃度 ( $1 \times 10^6$  細胞/mL など) にしてください。浮遊状態で肝細胞を使用する場合はこの時点で終了となります。

8. プレート培養用培地で、それぞれの播種密度で細胞を調整します（表 1 と表 2 をご参照ください）。

**表1 凍結保存肝細胞用の一般的な播種密度ガイド** 1プレートあたり12 mLの培地を使用。

**注意:** 至適化された単層を形成するためには、播種密度を各ロットによりわずかに調整する必要があります。

Species	6-well	12-well	24-well	48-well	96-well
ヒト	0.9-1.1 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.8-1.0 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.7-0.9 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.6-0.8 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.5-0.7 x 10 <sup>6</sup> cells/mL
ラット	0.9-1.1 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.8-1.0 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.7-0.9 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.6-0.8 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.5-0.7 x 10 <sup>6</sup> cells/mL
イヌ	0.9-1.1 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.8-1.0 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.7-0.9 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.6-0.8 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.5-0.7 x 10 <sup>6</sup> cells/mL
サル	1.1-1.3 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	1.0-1.2 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.9-1.1 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.8-1.0 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.7-0.9 x 10 <sup>6</sup> cells/mL
マウス	0.5-0.7 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.4-0.6 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.3-0.5 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.2-0.4 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.1-0.3 x 10 <sup>6</sup> cells/mL

**表2 1プレートあたりの適切な細胞数** 1プレートあたり12 mLの培地。

Species	6-well	12-well	24-well	48-well	96-well
ヒト	0.9-1.1 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.8-1.0 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.7-0.9 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.6-0.8 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.5-0.7 x 10 <sup>6</sup> cells/mL
ラット	0.9-1.1 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.8-1.0 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.7-0.9 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.6-0.8 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.5-0.7 x 10 <sup>6</sup> cells/mL
イヌ	0.9-1.1 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.8-1.0 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.7-0.9 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.6-0.8 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.5-0.7 x 10 <sup>6</sup> cells/mL
サル	1.1-1.3 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	1.0-1.2 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.9-1.1 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.8-1.0 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.7-0.9 x 10 <sup>6</sup> cells/mL
マウス	0.5-0.7 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.4-0.6 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.3-0.5 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.2-0.4 x 10 <sup>6</sup> cells/mL	0.1-0.3 x 10 <sup>6</sup> cells/mL

9. マルチウェルプレートにピペットで分注します。懸濁する際に細胞を傷つけないよう、ピペットチップの先が広く開いているタイプを使用してください。肝細胞は通常の細胞と比べて大きいので3～4ウェル分注する度に肝細胞のストックを再懸濁させて、均一性を保つようにしてください。

10. 6, 12, 24, 48 ウェルの場合、プレートをインキュベーターの中に入れて底面を下につけた状態で、縦・横に軽くプレートを動かしウェル上で細胞が均一になるようにしてください。

96 ウェルの場合、播種後プレートは揺らさずインキュベーターに移してください。

11. 4時間から6時間、37°Cでプレートをインキュベートします。

→このインキュベーションで細胞は Monolayer (単層) を形成します。プレートを動かさないようにしてください。

★ Overlay (重層) 法を行わない場合は、4～6時間後に培地交換をする際に使用するインキュベーション用培地 (Hepatocyte Maintenance Supplement Pack (製品番号 CM4000) 添加済み William's E 培地) を温めておいてください。

★ Overlay 法を使用する場合は、インキュベーション用培地を氷冷した状態にしておいてください。

12. インキュベーション後、クリーンベンチの中で軽くプレートを揺らして、デブリス (接着しなかった細胞断片) を浮かせてから培地を吸い取ってください。

13. Overlay 法を行わない場合は、培地をあらかじめ加温しておいたインキュベーション用培地と交換するか、またはアプリケーションによってはその他の培地と交換してください。肝細胞が乾燥しないように、培地の交換は速やかに行ってください。

Overlay 法を行う場合は次のステップに進んでください。

## Overlay 法

---

**(重要注意事項：**ここに示す希釈に使用される Geltrex Matrix およびインキュベーション用培地は早期ゲル化を防ぐために、氷冷保存してください。Geltrex Matrix およびインキュベーション用培地は氷上に保持し、可能であれば混合には冷却したピペットを使用してください。)

14. プレート培養した肝細胞をフィードするのに必要なインキュベーション用培地の量を算出し、算出した容量の培地を氷上に設置してください。  
→一般的に、1枚のプレートに 12 mL の培地が必要です。わずかに過剰な溶液として 1～2 mL を追加することを考慮に入れてください。
15. Geltrex Matrix の仕様書に記載されている、タンパク質濃度を確認してください。タンパク質濃度は各ロット間でわずかに異なります。
16. インキュベーション用培地の容量に、Geltrex Matrix の最終濃度として推奨されている 0.35 mg/mL を掛け合わせ、Geltrex のタンパク質濃度で割ることにより、インキュベーション用培地に添加すべき Geltrex Matrix の容量を算出してください：  
→[インキュベーション用培地の容量(mL)] x [0.35 mg/mL] / [Geltrexのタンパク質濃度] = [添加すべき Geltrex Matrixの容量(mL)]
17. 氷上で冷却されたインキュベーション用培地に Geltrex Matrix を添加して良く混ぜてください。
18. プレート培養した肝細胞に Geltrex を重層し、使用前に少なくとも 2 時間または最長 24 時間までインキュベートしてください。  
→ゲル層は培地から肝細胞の上をコーティングします。
19. インキュベーション用培地は毎日新しいものに交換してください。  
**(注意：**イヌ肝細胞で Overlay 法を行う場合は、Matrigel™ (BD) または ECM (Sigma) の使用を推奨しています。)

## Media Supplement Guide (CM3000, CM4000 使用方法)

Hepatocyte Plating Supplement Pack (製品番号 CM3000)、Hepatocyte Maintenance Supplement Pack (製品番号 CM4000) には、それぞれ William's E 培地 500 mL に対する必要量が入っており、William's E 培地に添加した後は、1 カ月以内でご使用いただくことを推奨しております。ただし、リスクを避けるうえで少量ずつ分注し、ご使用前に添加することをお勧めします。

そこで効率的にお使いいただくため各サプリメントをはじめに必要量ずつ小分けして保存し、試験当日に William's E 培地に添加いただくことをお勧めしております (Dex は少量のため小分けしていただかなくても問題ございません)。Coctail と Dex は 4℃、FBS は -20℃で保存してください。

なお、William's E 培地への添加量は表 3、表 4 をご覧ください。

### CM3000-Thawing/Plating Supplement Pack

William's E 培地 (製品番号 A1217601)

**アプリケーション:** 凍結保存肝細胞の融解およびプレート培養・新鮮な肝細胞のプレート培養

構成成分:	最終濃度
→ Fetal Bovine Serum	(5%)
→ Dexamethasone in DMSO (10 mM)	(1 μM)
→ Thawing/Plating Cocktail A, containing (18 mL total volume):	
• 5 mL Penicillin/Streptomycin (10,000 U/mL / (10,000 μg/mL))	(1%)
• 500 μL Human Recombinant Insulin (4 mg/mL)	(4 μg/mL)
• 5 mL GultaMax (200 mM/100 X)	(2 mM)
• 7.5 mL HEPES, pH 7.4 (1M)	(15 mM)

#### 調整方法:

- 500 mL の培地を調整する場合
  - Fetal Bovine Serum (25 mL)
  - 50 μL Dexamethasone in DMSO
  - Thawing/Plating Cocktail A (18 mL)

### CM4000-Cell Maintenance Supplement Pack

William's E 培地 (製品番号 A1217601)

**アプリケーション:** 細胞の懸濁、肝細胞培養のメンテナンス用のインキュベーション培地

構成成分:	最終濃度
→ Dexamethasone in DMSO (10 mM)	(0.1 μM)
→ Cell Maintenance Cocktail B, containing (20 mL total volume):	
• 2.5 mL Penicillin/Streptomycin (10,000 U/mL / (10,000 μg/mL))	(0.5%)
• 5 mL ITS+	
○ human recombinant insulin (0.625 mg/mL)	(6.25 μg/mL)
○ human transferrin (0.625 mg/mL)	(6.25 μg/mL)
○ selenous acid (0.625 μg/mL)	(6.25 ng/mL)
○ bovine serum albumin (BSA)-(0.125 g/mL)	(1.25 mg/mL)
○ linoleic acid (0.535 mg/mL)	(5.35 μg/mL)
• 5 mL GultaMax (200 mM/100 X)	(2 mM)
• 7.5 mL HEPES, pH 7.4 (1M)	(15 mM)

#### 調整方法:

- 500 mL の培地を調整する場合
  - 5 μL Dexamethasone in DMSO
  - Cell Maintenance Cocktail B (20 mL)

表3 Cocktail Aに対する各試薬の量

William's E培地	Cocktail A	FBS	Dex
50 mL	1.8 mL	2.5 mL	5 $\mu$ L
100 mL	3.6 mL	5 mL	10 $\mu$ L
200 mL	7.2 mL	10 mL	20 $\mu$ L
300 mL	10.8 mL	15 mL	30 $\mu$ L
400 mL	14.4 mL	20 mL	40 $\mu$ L
500 mL	18 mL	25 mL	50 $\mu$ L

表4 Cocktail Bに対する各試薬の量

William's E培地	Cocktail B	Dex
50 mL	2 mL	0.5 $\mu$ L
100 mL	4 mL	1 $\mu$ L
200 mL	8 mL	2 $\mu$ L
300 mL	12 mL	3 $\mu$ L
400 mL	16 mL	4 $\mu$ L
500 mL	20 mL	5 $\mu$ L

# トリパンブルー色素排除試験法による初代培養肝細胞の計数プロトコール

## 細胞計数用バイアルの準備

1. 1.5 mL のマイクロ遠心チューブに 200  $\mu$ L のバッファー（PBS またはこれに類する溶液）と 50  $\mu$ L の 0.4% トリパンブルー染色液を加えて混合します。細胞の計数に用いる 1.5 mL のバイアル（細胞計数用バイアル）にこのトリパンブルー希釈液を 50  $\mu$ L 加えます。
2. 肝細胞浮遊液を計数用バイアルに加える前に、肝細胞浮遊液が入ったチューブを穏やかに数回転倒混和して溶液を均一にします。細胞を正確に計数するにはこのステップが極めて重要です。
3. ワイドボアチップで 50  $\mu$ L の肝細胞浮遊液を一度だけ吸い上げて測り取り、細胞計数用バイアルに押し出して注入します。この際にチップを洗浄しないでください。細胞浮遊液が 2 倍に希釈されてしまいます。
4. 計数用バイアルを弾く、または穏やかにたたいて混ぜます。細胞が壊死して正確な生存率が決定できなくなるため、激しい振盪や撹拌は避けてください。

## 血球計算盤の準備

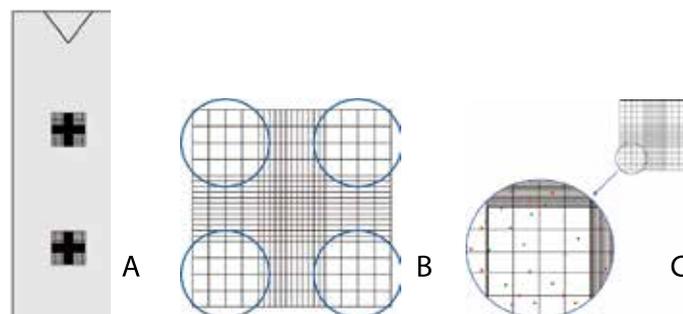
5. 計数用バイアルを 1 分静置し、これを穏やかに弾く、またはたたいて再度混合した後に、ピペットで 10  $\mu$ L の混合液を血球計算盤の片側の V 字型の溝にゆっくり移します。毛管作用によって細胞浮遊液が血球計算盤に吸い込まれます。
6. 計数前に、顕微鏡下で 4 区画を素早く調べて細胞が均等に分布していることを確かめます。血球計算盤に細胞が均等に分布していない場合や泡が入っている場合はやり直します。

## 肝細胞の計数

7. 血球計算盤の 4 区画の生細胞（透明または黄色）と死細胞（青色）を速やかに計数します。その際は、各区画の 2 本の区画線上の細胞数を含めて計数します（図 1）。トリパンブルーへの曝露が長くなると細胞が壊死するおそれがあるため、計数は速やかに行ってください。

## 計算

8. 全肝細胞数のほか、肝細胞の生存率を求めます。肝細胞混合物を目的の最終細胞濃度に希釈する場合は、添加済みの新たな



**図 1 血球計算盤の細胞の計数** 細胞とトリパンブルーとの混合液を血球計算盤の片側にロードし、全 4 区画 (B の円) の細胞数を計数します。区画線上の細胞を計数する際には、2 本の区画線上の細胞数を計数し、残りの 2 本の区画線上の細胞数は計数しません。たとえば図 C の場合、上と左の区画線上にある細胞 (緑の点) は計数しますが、下と右の区画線上にある細胞 (赤の点) は計数しません。

Plating Medium またはこれと同等の培地を使用します。

9. 生細胞率 = (生細胞数 / 全細胞数)  $\times$  100
10. 生細胞の収量 = 1 区画あたりの生細胞の平均数 (全生細胞数  $\div$  4)  $\times$  10,000  $\times$  2  $\times$  最終細胞浮遊液の全量 (mL)
11. 全細胞密度 (細胞数 / mL) = 1 区画あたりの生細胞 + 死細胞の平均数  $\times$  10,000  $\times$  2。ここで、10,000 は 1 区画の体積 (0.1  $\mu$ L) の換算係数であり、2 は細胞希釈倍率です。

# 培養肝細胞の長期培養プロトコール

---

## 培養肝細胞の長期培養用サプリメント

Gibco™ HepExtend™ Supplement (50X) は、凍結保存された初代培養肝細胞の培養寿命を延長させることを目的とした濃縮サプリメントです。このサプリメントは、推奨される肝細胞培養法に従って、William's E 培地（製品番号 A1217601）および肝細胞維持用サプリメントパック（製品番号 CM4000）と共に使用してください。HepExtend サプリメントを添加して培養された初代培養ヒト肝細胞のロットは、細胞のロットやその他のアッセイ条件によりませんが、10 日以上生存し、機能を維持します。HepExtend サプリメントには、増殖因子、サイトカイン、ウシ胎児血清、低分子医薬品は含まれていません。

## 使用および保存に関する注意事項

解凍した HepExtend サプリメント (50X) は適量ずつ分注し、-20℃～-5℃の霜取り機能のない冷凍庫内で保存してください。HepExtend サプリメント (50X) は 3 回以上の凍結融解は避けてください。

## 培地の調製

1. HepExtend サプリメント (50X) を 37℃のウォーターバスで迅速に解凍します (10 分以内に解凍します)。濃縮サプリメントを 37℃で長時間置くことは避けてください。
2. 肝細胞維持用サプリメントパックを William's E 培地に添加して、肝細胞維持用培地を調製します。肝細胞用培地の調製の詳細については、本書 10 ページからの『Media supplement guide』をご参照ください。
3. HepExtend サプリメント (50X) を最終希釈濃度 (1X) になるように肝細胞維持用培地に加えます。たとえば、1X 濃度の完全培地を作るには、HepExtend サプリメント (50X) 10 mL を William's E 培地 500 mL に加えてください。
4. オプション: 0.22 μm フィルターユニットを使って完全培地をろ過します。
5. サプリメント添加後の完全培地は、2～8℃で暗所保管すれば最長 3 週間安定です。
6. 完全培地は、毎日細胞に添加する前に 37℃のウォーターバスで温めます。毎日添加する分だけを分注して温め、残りの培地は 2～8℃で保存しておくことをおすすめします。
7. 凍結保存初代培養肝細胞のプレーティングと培養に関する詳細情報については、本書 6 ページからの『凍結肝細胞の融解プロトコール』をご参照ください。

※ HepExtend サプリメント (50X) には、0.12375 g/mL のウシ血清アルブミン (BSA)、希釈前の肝細胞維持用サプリメント (製品番号 CM4000) には、0.125 g/mL の BSA が含まれています。最終的に得られる HepExtend™ 肝細胞維持用完全培地には、0.003725 g/mL の BSA が含まれます。

# 肝細胞セルカウティングシート

日付

担当者

ロット番号

## トリパンブルー染色カウント結果

4 回計測	生細胞数	+	死細胞数	=	細胞数合計
結果 1		+		=	
結果 2		+		=	
結果 3		+		=	
結果 4		+		=	
合計		+		=	

## 生存計算率

生細胞 / 細胞数合計 = 生存率 %

\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ = \_\_\_\_\_

## 合計収量計算

細胞数合計 / 4 回計測細胞数 x 希釈率 x 10,000 x 現在の容量(mL) = 細胞収量合計

\_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ x \_\_\_\_\_ x 2 x 10,000 x \_\_\_\_\_ = \_\_\_\_\_ x 10<sup>6</sup> cells

## 細胞形態記録

- 明確な細胞質                       丸みを帯びた形状                       明確な細胞膜                       最小限のデブリス(細胞残渣)
- 腫れたオルガネラ                       脂肪滴                       膜の小胞化

コメント

## 播種細胞密度計算

細胞合計収量 / 希望の細胞密度\*1 = 必要な合計容量

\_\_\_\_\_ x 10<sup>6</sup> cells / \_\_\_\_\_ x \_\_\_\_\_ x 10<sup>6</sup> cells/mL = \_\_\_\_\_ mL

必要な合計容量 -- 現在の容量 = 細胞ストックに加える容量

\_\_\_\_\_ mL -- \_\_\_\_\_ mL = \_\_\_\_\_ mL

※1 メーカーの推奨に従ってください。ヒト肝細胞プレート培養に使用される細胞密度は一般的に 0.75x10<sup>6</sup> cells/mL、0.8x 10<sup>6</sup> cells/mL、または 0.9x10<sup>6</sup> cells/mL が 24well プレートで使用されます。浮遊培養および他動物種の培養に適する密度はそれぞれ異なります。

## オーバーレイ計算法

必要な 4°C 培地の合計容量\*2 x 最終ゲル濃度 / 最初のタンパク濃度\*3 = 4°C 培地に加えるべきゲルストック容量

\_\_\_\_\_ mL x 0.35 mg/mL / \_\_\_\_\_ mL = \_\_\_\_\_ mL

※2 培地は氷上で 4°C に保ってください。  
serum-free Maintenance Supplement Pack (製品番号: CM4000) と調整したウィリアムズ E 培地 (製品番号: A1217601) のご使用を推奨します。

※3 仕様書をご参照ください。  
Geltrex™ Reduced Growth Factor Basement Membrane Matrix (製品番号: 12760-021) を 0.35 mg/mL 濃度でのご使用を推奨します。



詳細はこちらをご覧ください。 [www.thermofisher.com/hepatocytes](http://www.thermofisher.com/hepatocytes)

研究用에만使用できます。診断目的およびその手続上での使用はできません。  
記載の社名および製品名は、弊社または各社の商標または登録商標です。  
For Research Use only. Not for use in diagnostic procedures. © 2016 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved.  
All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified.  
記載の価格は2016年9月現在のメーカー希望小売価格です。消費税は含まれておりません。  
価格、製品の仕様、外観、記載内容は予告なしに変更する場合がありますので予めご了承ください。  
標準販売条件はこちらをご覧ください。 [www.thermofisher.com/jp-tc](http://www.thermofisher.com/jp-tc)

販売店

GIB072-B1708IH

## サーモフィッシャーサイエンティフィック ライフテクノロジーズジャパン株式会社

本社：〒108-0023 東京都港区芝浦 4-2-8

テクニカルサポート ☎ 0120-477-392 ✉ [jptech@thermofisher.com](mailto:jptech@thermofisher.com)  
オーダーサポート TEL：03-6832-6980 FAX：03-6832-9584  
営業部 TEL：03-6832-9300 FAX：03-6832-9580

[facebook.com/ThermoFisherJapan](https://www.facebook.com/ThermoFisherJapan) [@ThermoFisherJP](https://twitter.com/ThermoFisherJP)

[www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC