

# ShellPa 培養細胞伸展システム

## FAQ

Japanese version  
Updated: Oct. 25, 2018

### 1. ShellPa 培養細胞伸展システム「NNMS002」の特徴は？

本システムは、コンプレッサーを用いた空気圧を駆動源とし、簡便に細胞に伸展によるメカニカルストレスを加えながら細胞を培養することで、より生体系に近い、静置培養では得られなかった細胞の変化・応答を確認することができるシステムです。

### 2. ShellPa 培養細胞伸展システム「NNMS002」の伸展パターンのバリエーションは？

「NNMS002」では、空気圧により一軸方向に伸展往復運動を繰り返すもので、伸展周期は1～120回／分、伸展波形は矩形波(三角波、台形波)、伸展率は、2、4、5、6、8、10、12、15、20%です。

別途、使用方法により、所望量伸展させた後、そのまま所望時間、伸展したままで培養して変化を見る実験も可能です(別途、「11. 様々な使用方法(オプション) ①伸展ホールド」参照)。

また、タイマー機能により、12 時間までの設定で、途中伸展動作を一定時間休止したり、10分単位で、伸展時間ー静止時間およびその繰り返し運転回数(1～100回)を設定できます。

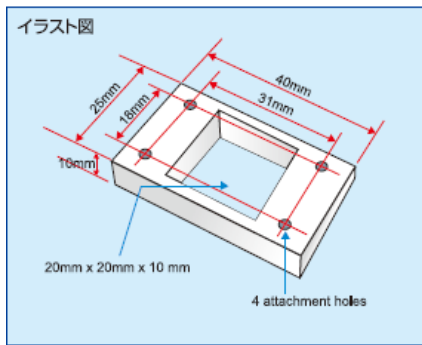
### 3. 適用するストレッチチャンパーについて

#### 3-1 ストレッチチャンパーのバリエーション

##### A PDMS製ストレッチチャンパー標準品「SC4Dea」

SC4Dea :培養面厚さ0.4mm

長期伸展培養試験に使用できる、PDMS(Poly-diMethylSiloxane)を主成分としたシリコーンエラストマー製です。寸法安定性の高いゴム弾性を有し、伸展を繰り返しても破損もなく、高い形状維持性を有します。一方、材質表面の撥水性が非常に強いため、予め表面親水化処理を施してありますが、お使いの細胞が当該チャンパーへの接着性が悪い場合には、適宜所望の細胞外マトリックス(フィブロネクチン、コラーゲン、ポリリシン、ラミニン等の各種コーティング材)をコーティングしてお使いください。コーティング前には、オートクレーブなどの滅菌処理をしてご使用ください。単回使用品(ディスポーザブル)です。



**SC4Dea** (培養面積4cm<sup>2</sup>)

### 3-2 コーティング例

#### ■フィブロネクチンでのコーティング例

- ① フィブロネクチンをPBSで濃度2~20  $\mu\text{g/mL}$  になるように希釈する。
- ② ストレッチチャンバーを培養角滅菌シャーレ内に置き、チャンバーの底面が完全に覆われるように①で調製したフィブロネクチン希釈液を、チャンバー1枚あたり1乃至1.5mL程注ぐ。
- ③ 滅菌角シャーレに蓋をして、その状態で37°Cのインキュベーター内に30分間~4時間静止する。(コーティング具合が悪い場合は、もう少し長めにコーティングします。)
- ④ 次いでシャーレをインキュベーターから取り出し、ストレッチチャンバー内のフィブロネクチン希釈液をピペットで取り除く。
- ⑤ その後、余分なフィブロネクチン取り除くため、無血清培養液もしくはPBSで2回程すすいだ後、細胞懸濁液を加えて、細胞培養を開始する。

#### ■コラーゲンでのコーティング例

- ① 希塩酸pH3、1mMを調製し、オートクレーブ処理する。
- ② コラーゲン(タイプ1、またはタイプ4)を上記希塩酸で希釈する。
- ③ チャンバー底面が完全に覆われるように、上記コラーゲン希釈液を、チャンバー1枚あたり1乃至1.5mL程注ぐ。
- ④ 滅菌角シャーレに蓋をして、その状態で37°Cのインキュベーター内に30分間~4時間静止する。
- ⑤ 次いでシャーレをインキュベーターから取り出し、ストレッチチャンバー内のコラーゲン溶液をピペットで取り除く。
- ⑥ 余分なコラーゲン溶液を取り除くため、無血清培養液もしくはPBSで2回程すすいだ後、細胞懸濁液を加えて、細胞培養を開始する。

#### ■ラミニンでのコーティング例

※Natural Mouse Laminin (Gibco #23017-015)

<http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/23017015>

(Final concentration: 1 $\mu\text{g/mL}$  in PBS)を使用した場合

- ① チャンバー底面が完全に覆われるように上記ラミニン溶液を、チャンバー1枚あたり1乃至1.5mL程注ぐ。
- ② 滅菌角シャーレに蓋をして、その状態で37°Cのインキュベーター内に30分間~4時間静止する。
- ③ 次いでシャーレをインキュベーターから取り出し、ストレッチチャンバー内のラミニン溶液を

ピペットで取り除く。

- ④ 余分なラミニン溶液を取り除くため、無血清培養液もしくは PBS で2回程すすいだ後、細胞懸濁液を加えて、細胞培養を開始する。

#### ■ポリリシン(PDL)でのコーティング例

※Poly-D-Lysine Hydrobromide, High Molecular Weight(BD 品番 354210)を推奨。

- ① PDL 20mg を 5mL の培地(血清無添加 DMEM)または蒸留水(滅菌水)で溶解し、100  $\mu$ L ずつエツペンチューブ(1.5mL)に分注して凍結保存する。(−20℃)
- ② 用時に 8mL の培地(血清無添加 DMEM)で希釈する。
- ③ チャンバー底面が完全に覆われるように上記PDL希釈液をチャンバー1枚あたり 1乃至 1.5mL 注ぐ。
- ④ 滅菌角シャーレに蓋をして、その状態で、37℃のインキュベーター内で1時間(乃至4時間)静置する。
- ⑤ 次いでシャーレをインキュベーターから取り出し、ストレッチチャンバー内の余分な PDL 溶液をピペットで取り除く。
- ⑥ 余分なPDL溶液を取り除くため、無血清培養液もしくは PBS で2回程すすいだ後、細胞懸濁液を加えて、細胞培養を開始する。

※滅菌角シャーレへストレッチチャンバーを設置する予備操作例

- ① 滅菌角シャーレ底面をエタノールで湿らす。
- ② チャンバーを上記シャーレに貼り付け、空気を丁寧に抜く。
- ③ UV 照射を3時間程度行う。

#### 4. ストレッチチャンバーによって細胞が上手く接着する場合としない場合がありますが、原因は？

ストレッチチャンバー材質にもよりますが、その底面は厚さ0.2mmと非常に薄いため、シワがよったり気泡が混入する場合があります。そのような状態では均一に接着しませんので、細胞を播く際、注意が必要です。ストレッチチャンバーをディッシュ内においておく際、先ずディッシュ上にエタノールを少量垂らして湿らせ、ストレッチチャンバーとディッシュの間に空気が入らないように傾けながら置きます。暫く放置してエタノールを蒸発させた後、最適な状態で細胞を播くことができます。

#### 5. ストレッチチャンバーに細胞が接着していることを顕微鏡で確認後伸展させました。ところが、伸展後直ぐに細胞が剥がれてしまいました。

以下の5点が原因として考えられます。

- ① 細胞濃度が高すぎる場合  
細胞がオーバーコンフルエントになると細胞間接着力が細胞-基質間接着力を上回り、細胞がチャンバーから剥がれてしまう場合があります。その場合は、細胞播種濃度を低めに設定することで、細胞の剥離が改善できる場合があります。
- ② 伸展率が大きい場合  
伸展率を少し下げてもう一度お試しください。細胞のストレッチチャンバーへの接着力よりも伸展により引張られる強度が大きければ、剥がれます。そのあたりをよく観察しながら、

最適な伸展率を決めてください。

- ③ ストレッチチャンバーをチャンバーホルダーへ設置するとき、もしくは設置された状態から取り外すときにストレッチチャンバーが大きくたわんだり、ねじれたりする等の力が加わるようなことがあれば、初期培養時には接着していたとしても、チャンバーホルダーへ設置する時やチャンバーホルダーから取り出す時に剥がれてしまうことがあります。
- ④ コーティングが不十分である場合が考えられます。コーティング後、コーティング溶液を吸引した時にストレッチチャンバー表面が液をすぐはじく場合は、親水化が上手く行われていません。コーティング条件を変えて(濃度を高めに、コーティング時間を長めに)再度ご確認ください。
- ⑤ 用いている細胞が、継代培養細胞の場合、その採取に際しての酵素処理による細胞ダメージはないでしょうか？トリプシン処理などは細胞にダメージを与えますが、通常のディッシュでは非特異的結合があるため、一見接着しているように見えますが、ストレッチチャンバーの場合は、コーティングした細胞外マトリックスのみを介した接着であるため、細胞にダメージがある場合、接着性が悪くなります。酵素処理条件(処理時間、濃度、温度)を最適化ください。基本的には、トリプシン濃度は最小に、処理時間は短く(数十秒)で、細胞が変形したのを顕微鏡で確認次第、シャーレを壁などに打ち付けて振動を与えて機械的に剥がします。トリプシン反応を停止させるために氷冷します。  
次いで、培養液を即座に入れ、ピペッティングにより細胞を分散させます。以上の手順で、細胞にもよりますが、ストレッチチャンバー上に細胞をまいてから10~30分で伸展接着することが確認できています。

## 6. どのくらいの期間伸展培養できますか？

細胞の種類、培養液の組成等によっても変わってくると思いますが、一般に細胞がコンフルエントになり、チャンバーからの剥離が見られない間は伸展培養が可能です。但し、2~3日に一度程度培養液の交換が必要になります。

## 7. ストレッチチャンバーに細胞を播く際、細胞が中央部に集まってしまいます。何か対策はありますか？

インキュベータの振動により、細胞がストレッチチャンバーの中央に集まる場合があります。その場合には、細胞を播いてから15分後にストレッチチャンバーを軽くゆっくりと左右に傾けながら揺すってみてください。

## 8. 培養後、ストレッチチャンバーから細胞のタンパクや、mRNA を採取したいと考えています。どのように採取すれば宜しいでしょうか？

- ① ウェスタンブロッティング: PBS で洗浄後、電気泳動用 sample buffer を直接ストレッチチャンバーに加え、セルスクレーパーにて細胞溶解液を回収することができます。
- ② 免疫沈降: PBS で洗浄後、細胞可溶化液を直接ストレッチチャンバーに加え、セルスクレーパーにて細胞溶解液を回収することができます。

- ③ mRNA:RNA 用 PBS で洗浄後、細胞可溶化液を直接ストレッチチャンバーに加え、セルスクレーパーにて細胞溶解液を回収することができます。

9. 細胞に伸展刺激を加え、染色固定して観察しようと考えているのですが、染色固定で劣化したり、あるいは変色したりする心配はないのでしょうか？

用いる有機溶媒(アセトン、クロロホルム)によってはストレッチチャンバーの表面が若干膨潤して観察に影響する可能性もありますが、ストレッチチャンバーSC4B、SC4Cは、耐溶剤性の高いPDMS製であるため、通常ホルマリン、グルタルアルデヒド、パラホルムアルデヒド、メタノールの使用では特に問題ありません。

10. 伸展後の顕微鏡観察写真を撮影する場合の方法は？

伸展刺激後、ストレッチチャンバーをリラックスさせた状態でチャンバーホルダーより外してそのまま顕微鏡ステージにセットすることで、写真を撮影することができます。さらに、ストレッチチャンバー上で細胞を固定・染色してカバーガラスを用いて封入することで、顕微鏡観察が容易になります。

さらには、サンプル数を多くするため、分割作成法としまして、メス刃でストレッチチャンバー底面を5mm×5mm程度の小片に16分割して取り出し、染色後は封入液を1滴落としたスライドガラスの上に、細胞面を下にして気泡が入らないように乗せ、その上からさらに1枚小さめのカバーガラスを被せサンドイッチにすることで標本化できます。

11. シェルパの様々な使用方法(オプション)

①伸展ホールド

所望の伸展率で運転をスタートさせ、チャンバーが伸びた時に合わせてコントローラーに接続しているコンプレッサーからの圧縮空気をコックを右に回して遮断することで、伸展したまま、所望時間保持できます。

取り外す時には、コックを開き圧縮空気を再び導入することで、伸展していない初期設定状態に戻ります。(伸展ホールド状態のままでは、チャンバーホルダーを本体から外せないため、伸展状態の細胞観察はできません。(別途伸展アダプターをご利用ください。))

②シェルパ本体のエアチューブからの取り外し

チャンバーホルダーの着脱ができる状態で本体のみをインキュベーターから取り出し、クリーンベンチ、顕微鏡観察室等へ移動する場合の方法として、

本体とコントローラー間のエアチューブ青に2方コックを2つ連結することで、上記対応が可能。具体的には、所定の圧縮空気をシェルパ本体に導入後、エアコックを本体に近い方から順に閉じ、エアチューブ赤、青(エアコックが1つ付いた状態)を取り外すことで可能。また戻す場合は、この逆の対応で再セッティングできます。

以上