



取扱説明書

がんオルガノイド培養キット

(Cat#PCK-5)

(培地のみ：がんオルガノイド培養用培地 Cat#NCM-P1)

はじめに

本製品は、がん組織から初代がん細胞の3次元培養を行うキットです。組織から細胞を分散単離する分散試薬と、培養培地及び培養容器を含みます。がん細胞の特性により異なりますが、がん細胞を含むスフェロイド（細胞集合塊）を形成できます。マイクロプレートで培養するため、そのまま、抗がん剤感受性評価が可能です。

使用前に本取扱説明書を熟読し、本製品の特性をご理解の上、ご使用ください。

キットの内容について全て揃っているかご確認ください。

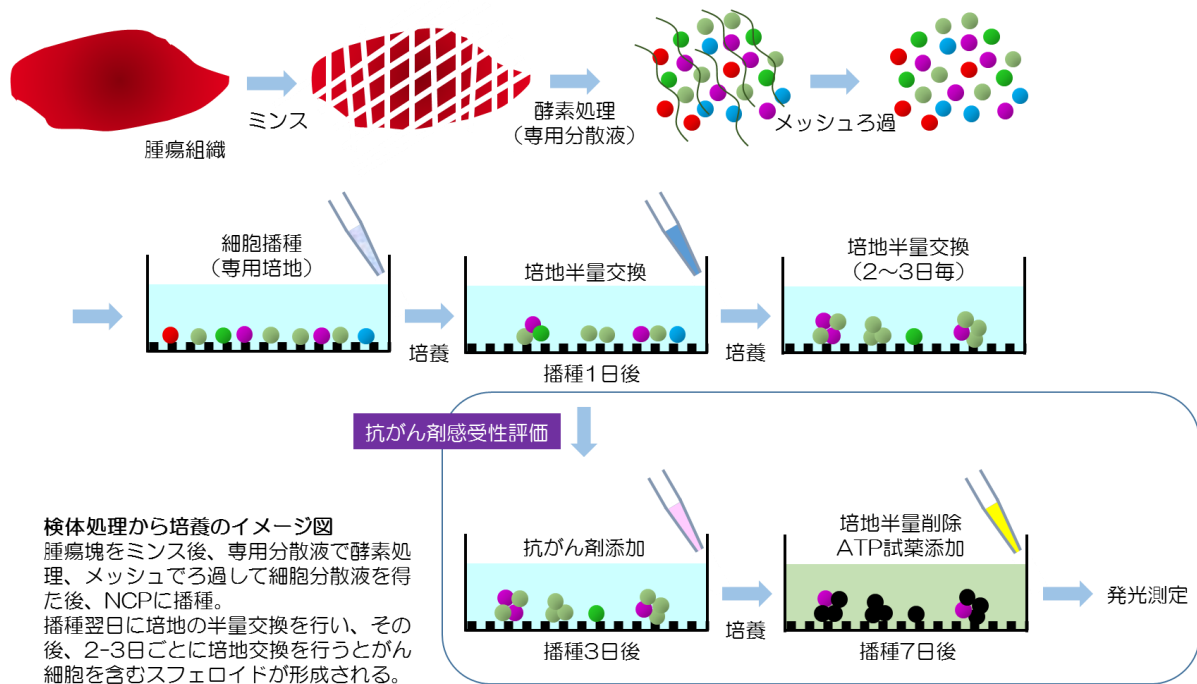
*** 本製品は研究用試薬キットです。診断および治療、人体には使用しないでください。**

キットの内容

項目	品名	Cat#	内容量	数	保管条件
培養プレート	NanoCulture Plate MHパターン, 低接着, 96ウェル	NCP-LH96	-	1枚	室温
培養培地	NanoCulture Medium P type, Basal	NCM-P1	90 mL	1本	-20℃
	NanoCulture Medium P type, FBS		11 mL	1本	
	NanoCulture Medium P type, Supplement A		1.1 mL	1本	
	NanoCulture Medium P type, Supplement B		40 µL	1本	
	NanoCulture Medium P type, Supplement C		110 µL	1本	
	NanoCulture Medium P type, Supplement D		2.4 mL	1本	
分散試薬類 (5検体分)	Dissociation Solution, Basal (10X)	DS-P1	100 mL	1本	室温
	Dissociation Solution, Supplement		12.1 mL	1本	-20℃
	Dissociation Solution, Enzyme A	DS-P2	1.1 mL	5本	-20℃
	Dissociation Solution, Enzyme B	DS-P3	550 µL	5本	-20℃
	Dissociation Solution, RBC Lysis buffer	DS-P4	30 mL	1本	室温
	セルストレーナー	-	-	-	15個
滅菌シール	滅菌プレートシール	-	-	1枚	室温

3次元初代がん細胞培養および抗がん剤感受性試験の流れ

- ① 摘出がん組織の分散処理
細胞を分離しやすくするためにがん組織をハサミで細かくし、酵素処理でさらに細かくします
- ② 初代がん細胞を含む細胞の回収
酵素処理によって細かくしたがん組織より、線維組織等を除去し、細胞のみ回収します
- ③ NanoCulture Plate への細胞播種と3次元培養
回収した細胞を専用の培地および NanoCulture Plate を用いてがん細胞を効率よく培養します
- ④ 培地交換および抗がん剤添加
培地交換を行い、効率よくスフェロイドを形成させ、感受性の有無を知りたい抗がん剤を添加します
- ⑤ ATP assay
抗がん剤に暴露させた後、細胞の産生するATPを指標に viability を測定し、抗がん剤に対する感受性を評価します



キット以外にご準備いただくもの

1. 試薬材料

品名	グレード又は推奨仕様	備考
滅菌精製水		
2-Mercaptoethanol	GIBCO Cat#21985-023 又は同等品	
検体保存液	10 % FBS 含有 DMEM 又は市販の組織保存液	
ボトル, 1 L	滅菌	
PP 製マイクロチューブ, 1.5 mL	滅菌	
ディスポーザブル遠沈管, 15 mL (15 mL チューブ)	滅菌	
ディスポーザブル遠沈管, 50 mL (50 mL チューブ)	滅菌	
眼科手術用鉏	滅菌済み	
ピンセット	滅菌済み	
ディスポーザブル手袋		
シャーレ, 10 cm	滅菌	
ディスポーザブルピペット, 5 mL	滅菌	
ディスポーザブルピペット, 10 mL	滅菌	
ディスポーザブルピペット, 25 mL	滅菌	
浅型バット		
氷		
Celltiter-Glo	promega G7570~G7574	抗がん剤感受性試験に使用
rATP (ATP 標準液)	Promega P1132	抗がん剤感受性試験に使用

2. 機器

品名	グレード又は推奨仕様	備考
オートピペッター		
マイクロピペット		
振とう恒温槽	TAITEC personal-11 等	
安全キャビネット		
遠心機	遠沈管及びプレート対応	
CO ₂ インキュベーター		
蛍光プレートリーダー	TECAN インフィニット F500 又は同等品	抗がん剤感受性試験に使用

試液の調製

1. 初代培養専用培地

- ① NanoCulture Medium P type Basal を 37℃のウォーターバスで融解した後、室温にて静置する。
- ② 同様に FBS および、Supplement A, B, C, D をすばやく融解し、①に全量を添加する。
- ③ 2-Mercaptoethanol (100 μ L) を添加 (終濃度 55 μ M) し、よく混和する。

➤ 調整後の培地は室温にて取り扱う。保管は 4℃、使用期限は 1 ヶ月とする。

2. 検体処理液

- ① 滅菌精製水 (900 mL) を 1L ボトルに取り、Dissociation Solution Basal (10X) (全量, 100 mL) を添加して混合する。
- ② Dissociation Solution Supplement を 37℃に加熱したウォーターバスですばやく融解した後、①に添加しよく混和する。

➤ 調整後の培地は室温にて取り扱う。保管は 4℃、使用期限は 1 ヶ月とする。

3. 分散溶液 (1 検体分)・・・

- ① 検体処理液 (8.5 mL) を 15mL チューブに取る。
- ② Enzyme A および B を各 1 本ずつ、すばやく融解してチューブに添加し、よく混和する。

➤ 組織分散時の用時調製とする。

➤ 調整した分散溶液は使い切り、未使用分は再利用しない。

がん組織分散処理

1. がん組織検体の取り扱い

- ① 作業施設の安全基準に準拠し、適切に処理、廃棄して下さい。
- ② 無菌的に摘出後、なるべく早く検体保存液 (10% FBS 含有 DMEM 又は市販の組織保存液等) の入った 50 mL チューブに浸し、分散処理を開始するまで冷蔵保存して下さい。

➤ ヒト検体を取り扱いには手袋を着用する。

➤ 壊死した部位、脂肪組織がある場合、分散処理前に可能な限り取り除く。

2. 検体重量

- ① 推奨組織検体湿重量：300mg 以上

➤ がん細胞の含有量が少ない組織の場合、300 mg 以上でも必要細胞数を回収できないことがあります。

3. がん組織検体分散処理

[準備]

- ① 発泡スチロールケースにクラッシュアイスをつめる（検体洗浄用）。
- ② 浅型バットにクラッシュアイスを敷き詰め、ペーパータオルを敷き、その上にシャーレを置く（検体ミンス用, サイズ計測のためシャーレの下に予め定規を設置すると便利）。



【氷を敷いた浅型バットにシャーレを置いた様子。 検体は 180 mg】

[検体洗浄：氷上操作]

- ③ 検体処理液（5 mL）を新しい 50 mL チューブに取り、検体保存液に浸しておいた組織片をそのチューブに移す。チューブを軽く振った後、氷上に 5 分間、静置し、検体保存液を除去し、検体処理液を用いて同様に 3 回洗浄する。洗浄後、組織量の湿重量を測定する。
 - 1 回の洗浄に使用する液量は 5 mL 程度。
 - 洗浄後、分散する直前まで氷上に保管。

[検体ミンス：氷上操作]

- ④ 洗浄した組織を氷上のシャーレに置き、検体処理液を数百 μL 滴下し、滅菌済み眼科手術用鉗で 1 mm 角もしくはペースト状になるまでミンスする。
 - 組織量が少ない場合、組織処理液を滴下しなくても良い

[組織片の酵素処理]

- ⑤ ミンスした組織片は検体処理液を用いてシャーレを洗いながら 50 mL チューブに回収する。回収後、300xg 室温で 5 分遠心する。
 - 遠心後の上清が白濁している場合があるが、生細胞を含まないため除去しても回収細胞数に影響はない

⑥ 遠心後、上清を除去し、ペレットを軽くほぐし、検体重量に応じて分散溶液を加え懸濁する。

➤ 分散溶液の目安：

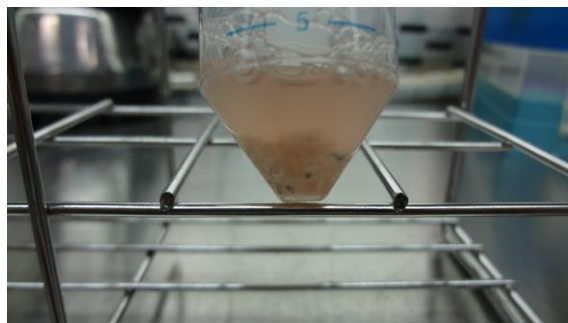
- ◇ 検体重量 < 300 mg ; 5 mL
- ◇ 検体重量 300~600 mg ; 10 mL
- ◇ 検体重量 > 600 mg ; 別途、分散溶液を調製。検体 60 mg につき 1 mL ずつ追加。

⑦ 分散溶液を加えたチューブを 37℃で 30 分振とうしながら反応させる、反応液の 2 倍量の検体処理液を加え、反応を止める。

- 振とう速度は 180~200rpm とする
- 分散完了の目安としては組織塊が半透明になり、繊維状のデブリが生じる
- 反応途中で一部、回収し、トリパンブルー染色し、血球計算盤等で分散状況および生細胞の有無を確認する、ほとんどがシングルセルとなり分散している場合、反応を止める
- 反応時間は分散状況により適宜、短縮、延長する。硬い組織、繊維化部分の多い組織の場合、反応時間を長めにする（最長 1 時間）



【酵素反応前】



【酵素反応後】

⑧ 新しい 50 mL チューブにセルストレーナーをセットし（右図）、⑦の懸濁液をろ過し、繊維等の組織残渣を除去する。

⑨ 懸濁液をろ過した後、セルストレーナーを 5~10 ml の検体処理液で洗い込む。



⑩ 300xg, 室温 5 分間遠心し、上清を除去した後、ペレットをよくほぐす。

⑪ 検体処理液（10 mL）を添加し、よく混和して細胞懸濁液を得る。

⑫ 300xg, 室温 5 分間遠心し、上清を除去した後、ペレットをよくほぐす。

⑬ ペレットが赤く赤血球が多い場合は⑭の操作に。赤血球のコンタミネーションが少なければ、⑯の操作に移る。

（右図は赤血球のコンタミネーションが多い事例）



[赤血球の除去]

⑭ ⑬の細胞ペレットに Dissociation Solution RBC Lysis buffer（5 mL）を添加し、攪拌後、5～10 分間室温で静置し、赤血球を破砕する。

⑮ 45 mL の検体処理液を加えて反応を停止する。

⑯ 300xg 室温 5 分間遠心し、オートピペッターを用いて上清を除去する。

⑰ ペレットをほぐし、500 μ L の検体処理液で懸濁し、細胞数をカウントする。

- 赤血球破砕中、もしくは洗浄中にデブリが生じた場合、細胞調製液で懸濁後、再度、セルストレーナーを通し、これを除去する
- 赤血球破砕液を希釈して遠心後のペレットは緩いため、上清の除去は注意する、必要に応じて検体処理液（5～10 mL）を加え、再度細胞を洗う

[セルカウント]

⑱ ⑰の細胞懸濁液（10 μ L）を取り、同量のトリパンブルーを添加してよく混和させた後、血球計算板にてがん細胞の生細胞数をカウントする。

- がん細胞の特定が困難な場合、上皮性がん細胞は間質細胞や血球細胞よりも大きいいため、おおよそ直径 15 μ m 以上の球形細胞をがん細胞としてカウントすることを推奨する。
- 生細胞数測定の際に、細胞数が多い場合は適宜希釈して測定を行う。

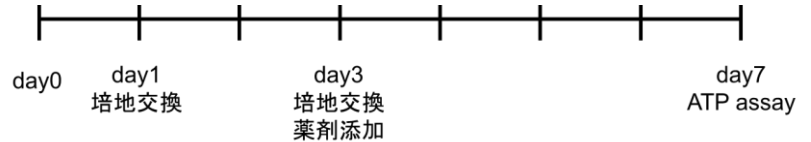
細胞の播種および培養

- ① NCP の使用する well に初代培養専用培地（150 $\mu\text{L}/\text{well}$ ）を加える。
- ② 1000xg 室温 5 分間遠心する（気泡除去のため）。
- ③ 37°C 設定の CO_2 インキュベーター内で 15 - 20 分間静置する（ボトムのマイクロパターン内に発生したマイクロバブルの除去のため）。
- ④ がん細胞を含む細胞懸濁液から必要細胞数を別のチューブに回収し、300xg 室温 5 分間遠心した後、上清を除去する。
- ⑤ 初代培養専用培地を加え、 $1\sim 2\times 10^5$ cells / mL の密度とする。
- ⑥ その 100 μL ($1\sim 2\times 10^4$ cells) を NCP に播種する。
 - トータル培養液量は 250 $\mu\text{L}/\text{well}$ となる。
 - ピペットチップでボトムに傷を付けないように注意すること。その部分だけ単層培養になるなど培養状態に影響する可能性がある。
 - 使用していない well はコンタミネーションしていなければ別の実験に使用できる。
- ⑦ 播種した細胞が沈んでボトムに接着するまで 20 - 30 分間、安全キャビネット内で静置する。
 - コンタミネーションの回避のため滅菌シールを貼ってもよい。
 - エッジ効果を低下させる目的にウェル間隙に滅菌水 約 100 μL を添加してもよい。
- ⑧ 5% CO_2 , 37°C でインキュベートする。
- ⑨ マイクロピペットを用いて培地上清（125 μL ）をできるだけマイルドに抜き取り、マイクロピペットで新たな初代培養専用培地（125 μL ）をできるだけマイルドに加える。
 - 培地をマイルドに添加するコツは、well の器壁をピペットの先端で濡らし（一筋の通り道をつくる）、ここを伝わらせて培地をなるべくゆっくりと添加するようにすること。
 - NCP への細胞の接着性は弱いため、培地交換でスフェロイドが剥がれる可能性がある。
- ⑩ 必要に応じて⑨と同様に培地交換（半量）を行いながら、培養を続ける。
 - 顕微鏡観察して細胞の状態や、スフェロイドの形成を確認する。
 - 早ければ、3 日目に小さなスフェロイドの形成が確認できる。
 - がん細胞の特性により、スフェロイドを形成しない場合もある。
 - 経時的な生存率の評価のためには、ATP 濃度測定（promega CellTiter-Glo 等）を推奨する。

抗癌剤感受性試験プロトコール

1. スケジュール

- ✓ Day 0：細胞播種
- ✓ Day 1：培地交換
- ✓ Day 3：培地交換および薬剤添加
- ✓ Day 7：ATP assay



2. 抗がん剤感受性評価操作手順

* 播種 1 日後までの工程は前項「細胞の播種および培養」①～⑨を参照。

- ① 播種 3 日後に、マイクロピペットを用いて培地上清(125 μ L)をできるだけマイルドに抜き取り、マイクロピペットで抗がん剤を含む初代培養専用培地(125 μ L)をできるだけマイルドに加える。
 - 抗がん剤は初代培養専用培地で希釈する。
 - 初代培養専用培地に溶解しない抗がん剤の場合は、DMSO で希釈系列を調製した後、初代培養専用培地に DMSO 溶液を添加して調製する。ただし、培養細胞に添加する場合の DMSO 終濃度は 0.5%以下とする。
 - 抗がん剤を含む培地をマイルドに添加するコツは、well の器壁をピペットの先端で濡らし（一筋の通り道をつくる）、ここを伝わらせて培地をなるべくゆっくりと添加するようにすること。
 - NCP への細胞の接着性は弱いいため、抗がん剤添加の際にスフェロイドが剥がれる可能性がある。
- ② 必要に応じて⑨と同様に培地交換（半量）を行いながら、培養を続ける。
 - 顕微鏡観察して細胞の状態や、スフェロイドの形成を確認する。
 - 早ければ、3 日目に小さなスフェロイドの形成が確認できる。
 - がん細胞の特性により、スフェロイドを形成しない場合もある。
- ③ 5%CO₂, 37°Cで 4 日間インキュベートする。
- ④ 播種 7 日後に細胞像を観察した上で、CellTiter-Glo による ATP assay を行い、生存率を評価する。

3. ATP assay 操作手順

【CTG 試薬の調製】

- ⑤ CTG Buffer 及び CTG Substrate を混合した後、小分けして-20 で冷凍保存する。
- ⑥ 使用時に解凍する。

【検量線検体の調製】

- ⑦ ATP 標準液の希釈系列を水で調製する。
- ⑧ 初代培養専用培地 (90 μ L) 及び CTG reagent (100 μ L) を実サンプルの入った NCP の空白ウェルに添加する
 - ✓ ATP assay は環境温度の影響を受けやすく、実サンプルと同じプレートに検量線サンプルをおくことを推奨します。
 - ✓ 培地中の ATPase により ATP が分解することから、培地及び CTG 試薬の混合液を ATP 標準水溶液に添加することを推奨します。
- ⑨ ATP 標準液を⑧に添加する。

【ATP assay】

- ⑩ CTG reagent (100 μ L) を NCP に添加する。
- ⑪ プレートミキサーで 10 分間攪拌後、37°C で 20 分間静置する。
- ⑫ プレートリーダーを用いて発光測定する。
- ⑬ 検量線検体の ATP 濃度に対して発光量をプロットして検量線を作成し、実サンプルの ATP 量を算出する。



96 well プレートレイアウト案

【2 検体、3 剤、3 薬剤濃度、n=3】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ATP Calibration-1											
B	Sample1											
C	Ctrl	Drug-1 Low conc	Drug-1 Mid conc	Drug-1 High conc	Drug-2 Low conc	Drug-2 Mid conc	Drug-2 High conc	Drug-3 Low conc	Drug-3 Mid conc	Drug-3 High conc		
D												
E	Sample2											
F	Ctrl	Drug-1 Low conc	Drug-1 Mid conc	Drug-1 High conc	Drug-2 Low conc	Drug-2 Mid conc	Drug-2 High conc	Drug-3 Low conc	Drug-3 Mid conc	Drug-3 High conc		
G												
H	ATP Calibration-2											

【5 検体、1 剤、2 薬剤濃度、n=3】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ATP Calibration-1									ATP Calibration-3	ATP Calibration-4	ATP Calibration-5
B	Sample1			Sample2			Sample5					
C	Ctrl	Drug-1 Low conc	Drug-1 High conc	Ctrl	Drug-1 Low conc	Drug-1 High conc	Ctrl					
D												
E	Sample3			Sample4								
F	Ctrl	Drug-1 Low conc	Drug-1 High conc	Ctrl	Drug-1 Low conc	Drug-1 High conc	Drug-1 Low conc	Drug-1 High conc				
G												
H	ATP Calibration-2											

問い合わせ先

ORGANOGENIX株式会社

〒212-0032 川崎市幸区新川崎 7-7 KBIC#217

TEL: 044-580-3008, FAX: 044-580-3006

Email: cell@organogenix.com

URL: www.nanocultureplate.jp/

担当 :伊藤、五字