

PXB-cells 培養用培地組成

PXB-cells 培養用培地組成について説明いたします。

<ご用意いただくもの>

試薬：

品名	終濃度	メーカー
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) Low-glucose	-	Sigma-Aldrich
N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethane sulfonic acid (HEPES)	20 mM	Thermo Fisher Scientific (Gibco)
NaHCO ₃	44 mM	富士フイルム和光純薬株式会社
Penicillin G, Streptomycin (PEN/STREP)	100 U/mL (Penicillin) 100 µg/mL (Streptomycin)	Thermo Fisher Scientific (Gibco)
L-proline	15 µg/mL	富士フイルム和光純薬株式会社
Insulin	0.25 µg/mL	Sigma-Aldrich
Dexamethasone	50 nM	Sigma-Aldrich
Epidermal growth factor (EGF)	5 ng/mL	Sigma-Aldrich
L-ascorbic acid 2-phosphate (Asc-2P)	0.1 mM	富士フイルム和光純薬株式会社
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	2%	Sigma-Aldrich
FBS	10%	*

*FBS は当社にて PXB-cells での評価を行い、良好な培養成績が得られた製品ロットを使用しております。

機材：

- ・分析天秤
- ・マイクロピペット

<手順>

1. MilliQ 水に DMEM 及び NaHCO₃ を加え、攪拌・溶解します。
2. フィルトレーション滅菌します。
3. HEPES, PEN/STREP を加えます。
4. FBS を加えます。
5. L-Proline, Insulin, Dexamethasone, EGF, 及び Asc-2P の各サプリメントストック溶液を調製します。
6. 1~4 で調製した培養液に DMSO 以外の各サプリメントストック溶液を添加します。
7. 最後に DMSO を加えます。
 - ・調製後の培地は 4°C で約 1 ヶ月保存いただけます。
 - ・L-proline 及び Asc-2P ストック溶液は、4°C で保存可能です。
 - ・Dexamethasone, Insulin, 及び EGF ストック溶液は、-20°C で保存可能です。
 - ・DMSO や Dexamethasone の添加により、一部の CYP 発現や活性が上昇することが確認されています。また、DMSO は肝細胞以外の細胞（非実質細胞）の増殖を抑えることも知られています。

T-75 フラスコからの肝細胞トリプシン処理・回収方法

T-75 フラスコからお好みの培養器に再播種する方法について説明いたします。

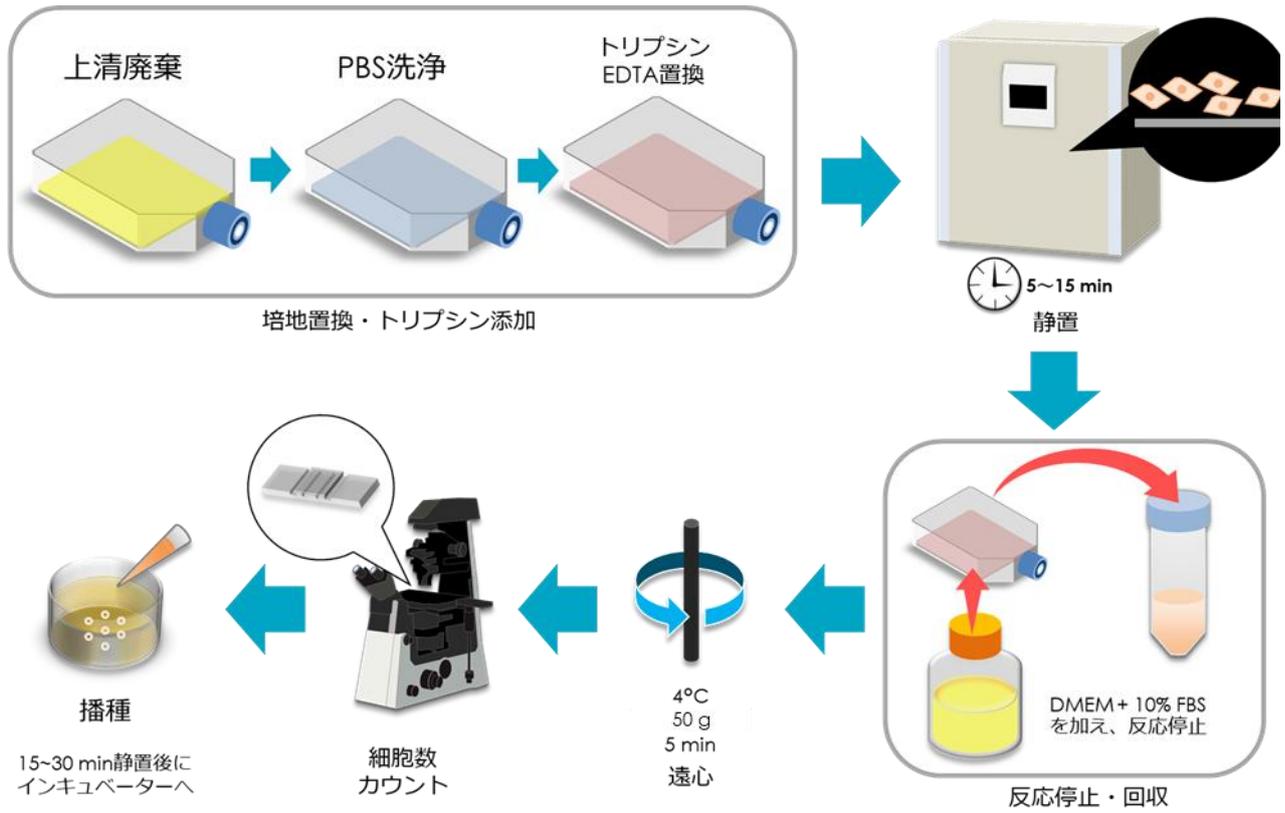
<ご用意いただくもの>

- ・PBS(-)
- ・トリプシン溶液：Trypsin-EDTA (0.25%) , phenol red
- ・DMEM+10% FBS：Dulbecco's modified eagle medium に終濃度 10%となるよう FBS を加えたもの
- ・PXB-cells 培養用培地または、各種肝細胞培養用培地など
- ・トリパンプルー溶液
- ・倒立顕微鏡
- ・セルカウンター
- ・血球計算盤
- ・遠心機
- ・マイクロピペット

<手順>

1. PBS(-), トリプシン溶液, および DMEM+10% FBS を 37°C に加温します。
2. CO₂ インキュベーターから T-75 フラスコを取り出します。
3. T-75 フラスコから古い培養上清を除去し、PBS(-)を加え洗浄します。
4. PBS(-)を除去し、8 mL のトリプシン溶液を添加します。
5. CO₂ インキュベーターで 5~15 分静置します (PXB-cells が丸くなり、表面から剥がれ始めます)。
6. T-75 フラスコに約 10 mL の DMEM+10% FBS を緩やかに添加し、軽く数回ピペッティングしながら、PXB-cells を回収します (2~3 回繰り返します)。
7. 回収した細胞懸濁液を遠心分離します (4°C, 50 x g, 5 分)。
8. 上清を除き、5 mL 程度の新しい DMEM+10% FBS を緩やかに添加し、軽く数回ピペッティングしながら懸濁します (細胞ペレットの量に応じて調整してください)。
9. 細胞の一部をトリパンプルーで希釈し、生細胞数をカウントします。
10. 所定の播種密度に DMEM+10% FBS で調整した後、各培養器に播種してください。
11. 細胞密度が偏らないよう、15~30 分程度静置した後、CO₂ インキュベーターに入れ、一晚培養してください。
12. 培地を除去し、PXB-cells 培養用培地または、各種肝細胞培養用培地などに交換してください。
13. 以降の培養操作は、別紙 PXB-cells_取扱説明書をご参照ください。

- ・遠心のアクセル/ブレーキ設定については、『アクセル：15 秒程度で設定回転数に達する』、『ブレーキ：2 分程度で回転が止まる』を推奨します。
- ・培養期間によって、トリプシン溶液の処理条件をご検討頂く必要がございます。また細胞の回収率は 50%以下となるためご注意ください。
- ・トリプシン溶液処理中、約 5 分間隔で細胞状態を観察し、細胞のほとんどが剥離していたら、15 分経っていなくても DMEM+10% FBS を添加し、反応を止めてください。
- ・トリプシン処理中は、フラスコを揺らさないでください (揺ると、細胞塊が形成され回収率が低下します)
- ・PXB-cells をフラスコから回収する際に行うピペッティングは 2~3 回に留めてください (激しいピペッティングにより、細胞塊が形成され回収率が低下します)。
- ・細胞塊が形成された場合は、セルストレーナー (40 μm) でフィルトレーションし、除去してください (塊が混入した状態で播種すると、塊と一緒に、接着した PXB-cells も剥がれてしまいます)。
- ・T-25 フラスコの場合は、全ての液量を 1/3 にして実施してください。



作業手順概要

HBV 感染試験（スケジュール例）

PXB-cells は B 型肝炎ウイルス（HBV）に持続感染します。また、抗ウイルス薬を添加した培地を利用することで、薬効評価が可能です（Ishida et. al. 2015）。

また記載の製品番号については、推奨品となります。

<ご用意いただくもの>

- ・ PBS(-)
- ・ 40%PEG8000 溶液

40%PEG8000 40 mL調製手順

PEGは清浄度の高いエリアで秤量下さい
※弊社では調製後にフィルトレーション等を行いません

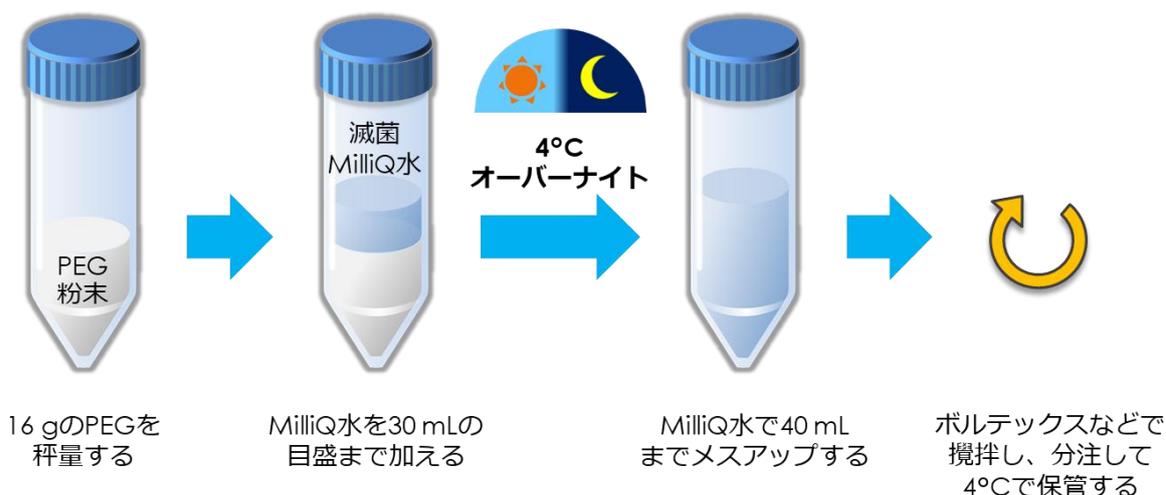


図 1：40%PEG8000 調製例

- ・ HBV 感染キメラマウス血清（Cat No.：PPC-BC）
- ・ PXB-cells 培養用培地（Cat No.：PPC-M100 または PPC-M200）

<試験手順>

1. 接種までの細胞培養：

1) 細胞受領日に、別紙 PXB-cells_取扱説明書の内容に従って培地を交換します。

なお、受領日から次回の培地交換までの間隔は、**4日以内**となるようご注意ください。

例 1 木曜日受領・培地交換 ⇒ 翌週の月曜日・培地交換：○（4日間）

例 2 木曜日受領・培地交換 ⇒ 翌週の火曜日・培地交換：×（5日間）

2) 細胞受領後、4～10 日間の培養期間を設けた後に HBV を接種してください。

※現在提供中の PXB-cells ドナーロットにおいては、受領直後に HBV を接種した場合、感染効率が著しく低下する傾向があります。このため、細胞の安定化期間（4～10 日）を設けることを推奨しており、本推奨は PXB-cells の品質向上に伴う最適化の一環です。

Application Note 3

2. HBV の接種手順 :

2-1. 接種 0 日目 :

- 1) HBV を接種する日に、以下の要領で感染源培地を調製します。
 - a. 40% PEG8000 溶液 (終濃度 : 4%)
 - b. PXB-cells 培養用培地
 - c. HBV 感染キメラマウス血清 (終濃度 : 5 genome equivalent/cell)
 a および b をよく混合した後、c を加えて再混合します。
- 2) 培地を除去し、感染源培地を添加します。
- 3) CO₂ インキュベーターで 20~28 時間静置します。

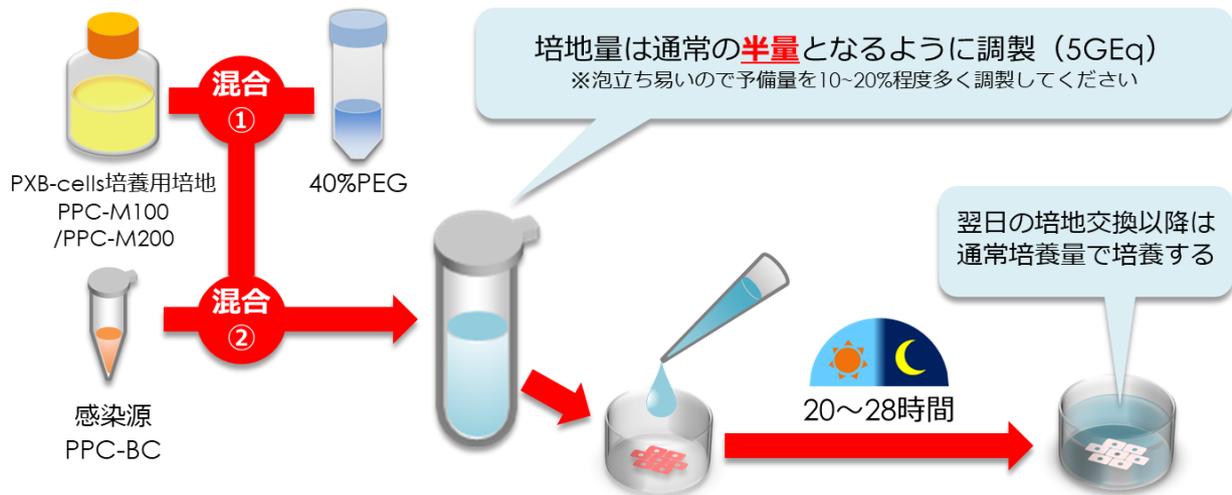


図 2 : 接種手順

表 1 : 接種培地調製例 (予備量含む) : 3.7×10⁸ copies/mL の HBV 感染源を使用した場合

試薬	24 well Plate (4×10 ⁵ cells/well)		96 well Plate (7×10 ⁴ cells/well)	
	1 well あたり	1 Plate あたり (24+4 well)	1 well あたり	1 Plate あたり (96+24 well)
PXB-cells 培養用培地	219.6	6148.8	37.30	4476.0
40%PEG	25.0	700.0	4.25	510.0
感染源	5.4	151.2	0.95	114.0
Total	250.0	7000.0	42.50	5100.0

(μL)

2-2. 接種 1 日目 :

- 1) 感染源培地を除去し、PXB-cells 培養用培地もしくは PBS(-) で well を一度洗浄します。
- 2) PXB-cells 培養用培地を加え、CO₂ インキュベーターで培養します。

2-3. 培養 2 日目 :

- 1) 培地を除去し、PXB-cells 培養用培地もしくは PBS(-) で well を一度洗浄します。
- 2) PXB-cells 培養用培地を加え、CO₂ インキュベーターで培養します。

Application Note 3

2-4. 以降 3~5 日おきに、培養 2 日目と同じ操作を行います。
必要に応じて上清を回収し、HBV DNA 量や HBsAg 量などを定量頂けます。

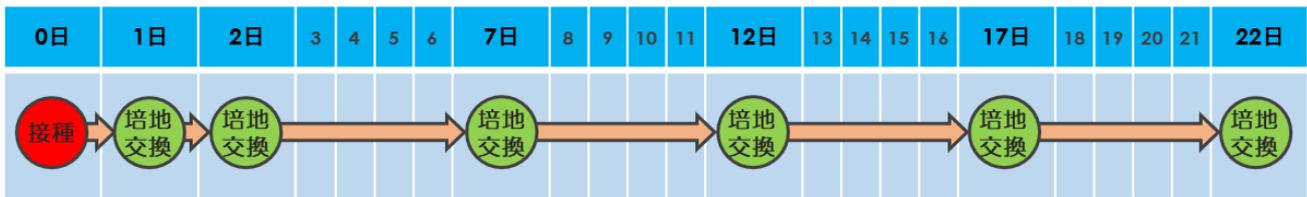


図 3 : HBV 感染試験培養スケジュール例 (5 日毎の培地交換)

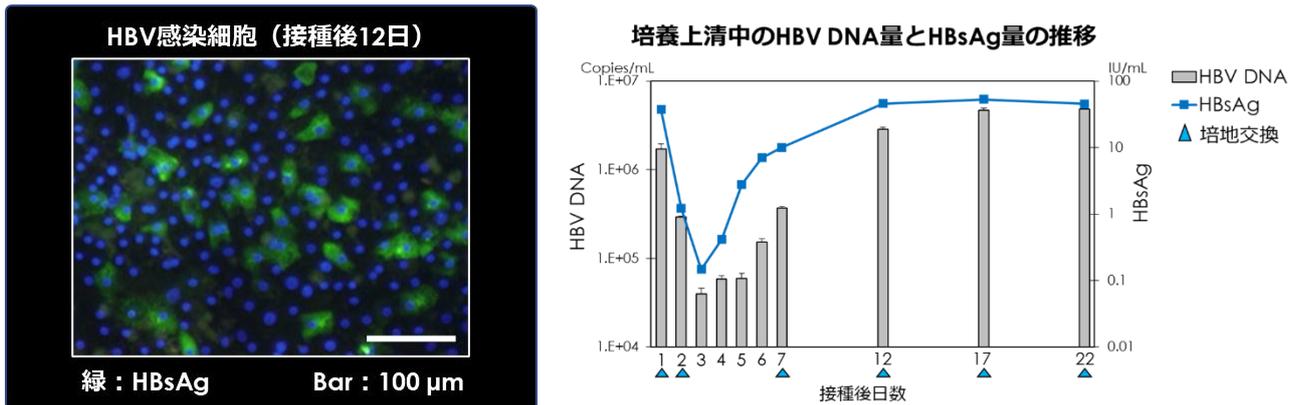


図 4 : HBV 感染試験結果 (例)

- ・感染源培地に PEG8000 溶液を添加することで、細胞への感染効率の増加が可能です。
- ・当社内試験において、抗 HBV 薬である Hebsbulin, Pegasys, Entecavir, Tenofovir, 及び Lamivudine の薬効について確認しております。

<当社別売の感染源をご使用いただいた場合>

- ・接種後 52 日までの継続感染を確認しております。
- ・Extracellular HBsAg, HBeAg, HBcrAg, HBV DNA, および Intracellular HBV DNA, cccDNA などのパラメーターを分析頂く事が可能です。
- ・当社の検討では、2~3 回程度の凍結融解であれば、感染性に大きな影響がない事が確かめられています。必要に応じて、残余の感染源は-80°C で保存して下さい。

参考文献：

Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Fujikawa K, Watashi K, Abe H, Wakita T, Hayes CN, Chayama K, Tateno C. Novel robust in vitro hepatitis B virus infection model using fresh human hepatocytes isolated from humanized mice. Am J Pathol. 2015 May;185(5):1275-85.