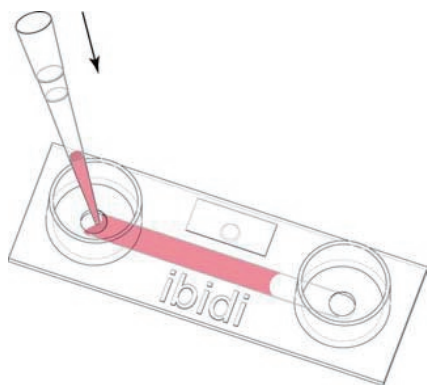


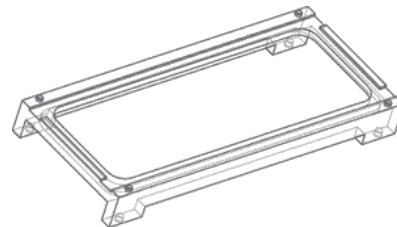
μ (マイクロ) -チャンネル内での細胞培養法

このアプリケーションノートでは、細胞培養用のμ-チャンネル内で細胞を培養する方法について説明します。細胞の播種、培地交換および光学的性質について示します。さらに、細胞培養用チャンネルと標準的なオープンウェルフォーマットの主な違いも示します。

細胞の播種および μ-Slide の取り扱い方法は、μ-Slide I を用いて説明します。開封後のスライドの取り扱いを容易にするために μ-Slide 専用ラックの使用をおすすめします。細胞懸濁液（例えば 3×10^5 cells/ml）を調製し、100 μl をチャンネル内に注入します。ピペットチップをチャンネルのインレットの真上に配置して、下の図のようにチャンネルに向けます。速やかに注入し、チャンネル全体を満たします。



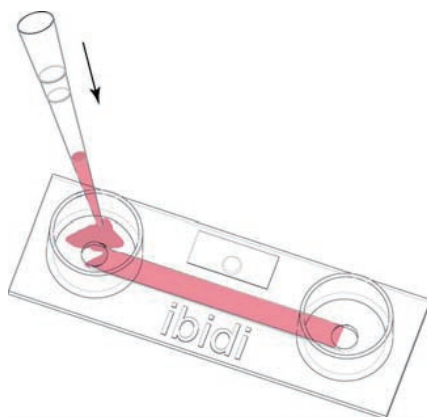
μ-Slide I の細胞培養用チャンネルに細胞懸濁液を注入します。



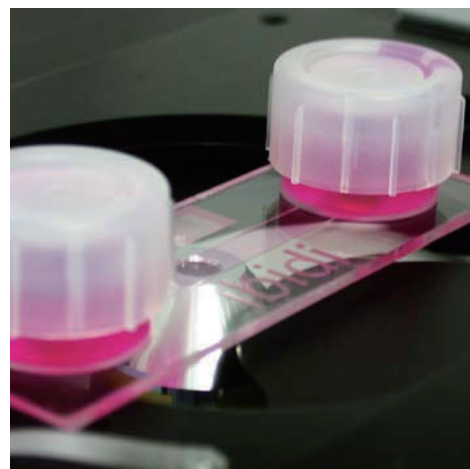
μ-Slide 専用ラックは8枚の μ-Slide I の並列処理に対応しています。

チャンネルが細胞懸濁液で完全に満たされない場合には、スライドを少し傾けます。

ウェルを満たす場合は（1ウェルあたり600 μl）、ピペットチップをチャンネルのインレット上から注入せず、下の図のように、600 μl を各ウェルに入れます。気泡を入れないようにしてください。注入のステップを十分に細胞が接着した後に行う場合には、細胞がチャンネルの外に流されることはありません。細胞の播種直後にウェルを満たしたい場合には、細胞が剥離しないようゆるやかに培地を注入してください。



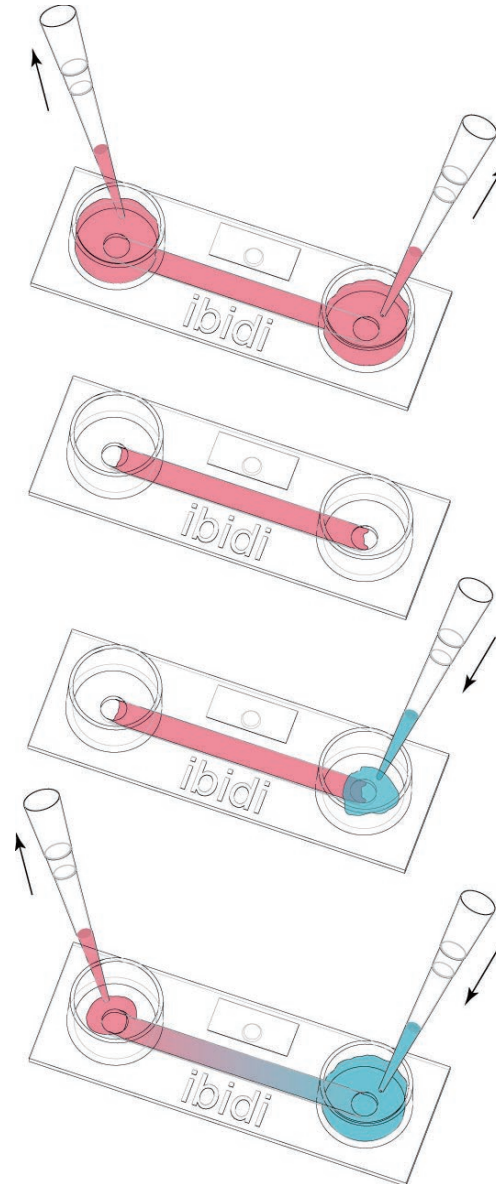
μ-Slide I のウェルに溶液を注入します。



顕微鏡のステージ上に置いた状態の μ-Slide I

キャップを閉じて準備は完了です。

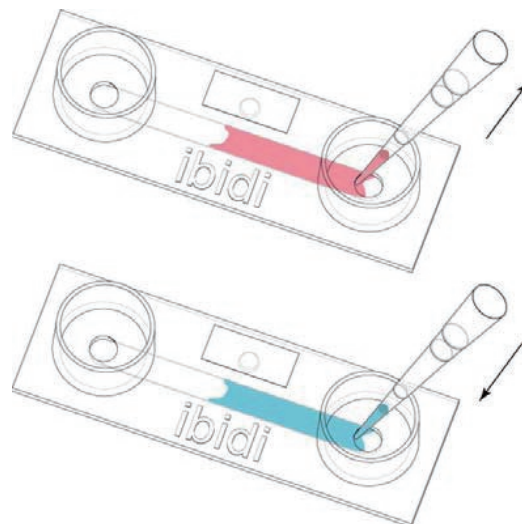
連続的に培地交換を行う場合には、最初にウェルから古い培地を除去することをおすすめします。1つのウェルに新しい培地を添加しながら、もう一方のウェルから吸引します。アスピレーターを使用することも可能です。



赤：古い培地
青：新しい培地

連続的な培地交換

チャンネル内に含まれる液体のみを交換する場合には、上で述べた方法にしたがって最初にウェルを空にします。その後、ピペットチップをチャンネルのインレットの真上に配置して、チャンネル内から液体を慎重に吸引します。接着細胞がチャンネル外に流されないように注意しながら吸引してください。



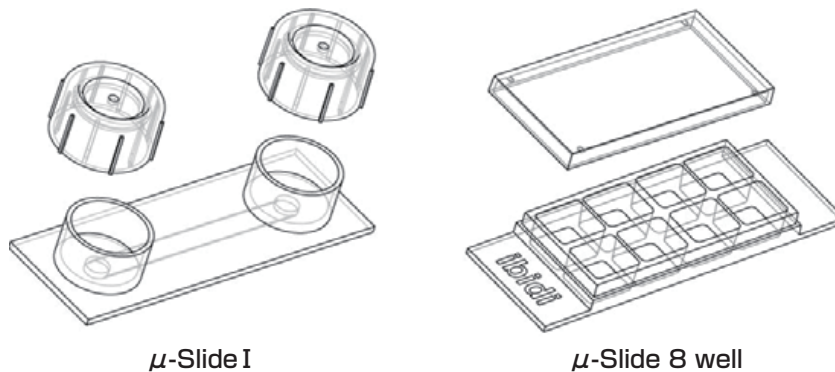
アスピレーターを用いてチャンネルから液体を除去します

チャンネルに新鮮な培地を注入します。

非連続的な培地交換

チャンネルおよびウェルを再び満たすためには、新鮮な培地をチャンネルに直接添加してください。気泡が入らないように慎重に操作してください。

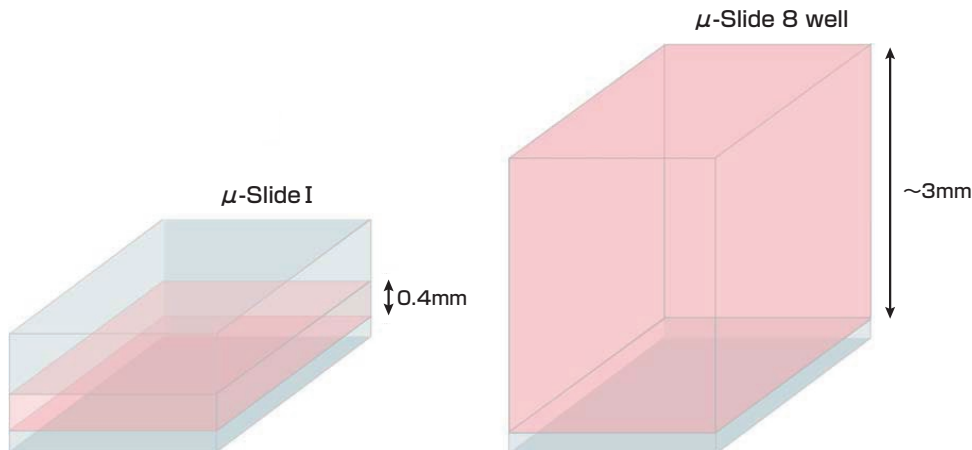
ここでは、μ-Slide I (細胞培養用チャンネル) の特徴をμ-Slide 8 well (オープンな細胞培養フォーマット) と比較します。



μ-Slide I

μ-Slide 8 well

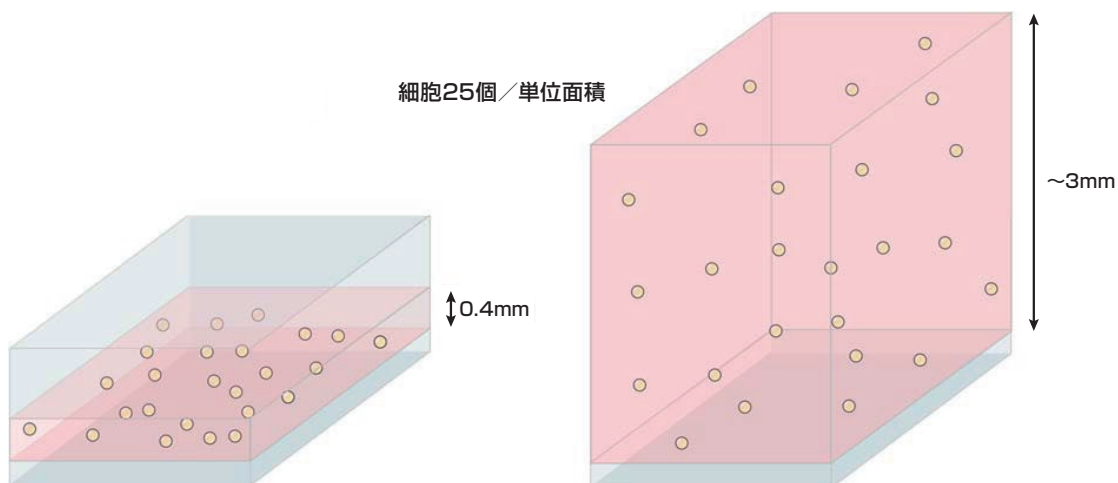
細胞の播種に関しては、内部の液体の高さが主な違いとなります。それぞれのスライドの培養エリアを以下に示します。



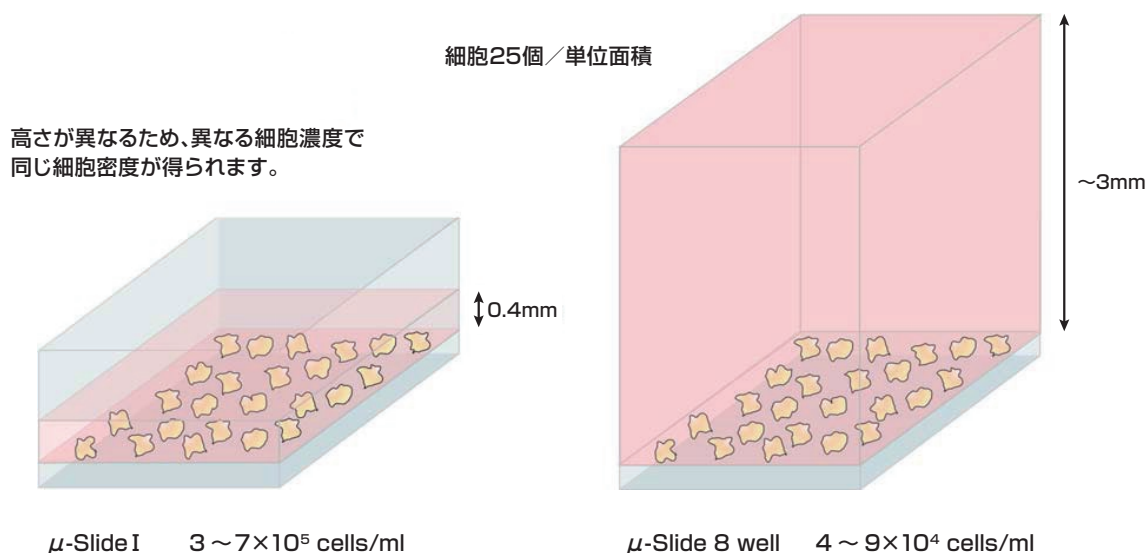
幾何学的に異なるμ-Slide I および μ-Slide 8 well 内部の液体の高さ

μ-Slide Iチャンネルの底面から天上面までの高さは400μmです。一方、μ-Slide 8 well には上面がありません。ここでは、培地の高さは約3mmです。つまり、μ-Slide Iの細胞培養チャンネルの培地の高さはμ-Slide 8 well の1/7.5です。

細胞接着底面に同じ濃度の細胞を得るためには、細胞を播種する際に細胞密度の異なる細胞懸濁液を使用する必要があります。この例では、単位面積あたり25個の細胞の播種を目標としています。μ-Slide 8 well 内部の液体の高さは7.5倍高いため、播種する細胞の密度を7.5分の1に低下する必要があります。細胞の接種後には、下の図のように見えます。



細胞接着後の単位面積あたりの細胞数は同一です。



同じ細胞密度を得るためには、以下の使用をおすすめします。

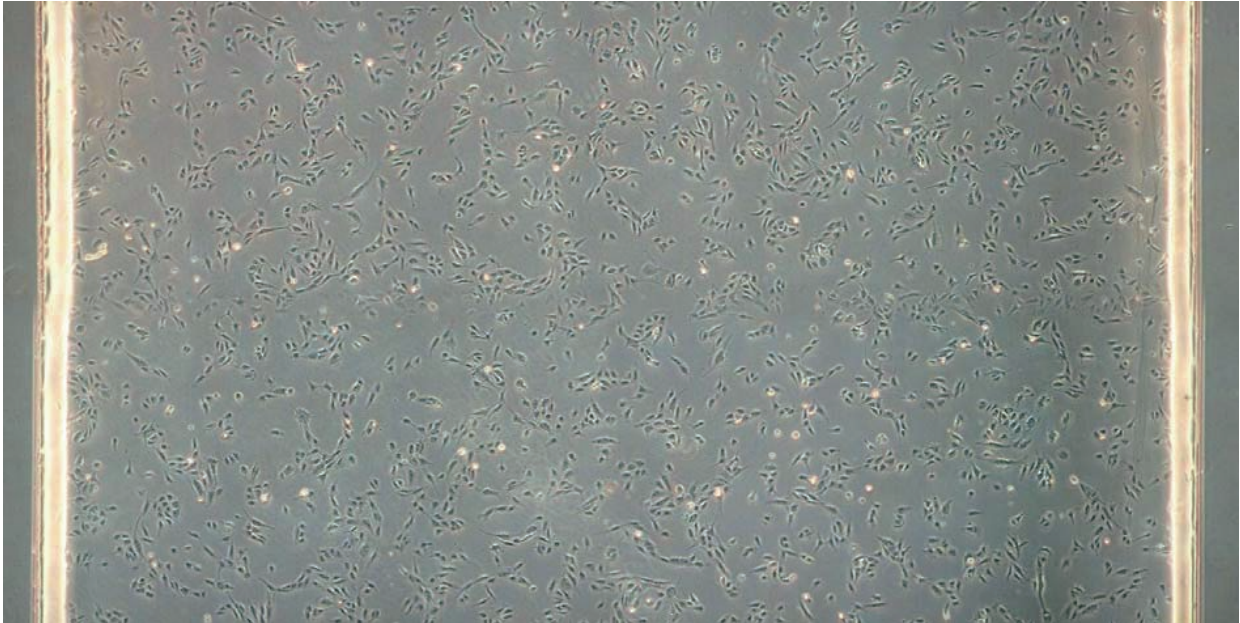
- μ-Slide I 3 ~ 7 × 10⁵ cells/ml
- μ-Slide 8 well 4 ~ 9 × 10⁴ cells/ml

それぞれの推奨細胞濃度は、μ-Slide I および μ-Slide 8 well 間の換算係数~7.5と同じです。

μ-Slide Iのようなチャンネル法には、μ-Slide 8 wellのように標準的な培養法と比較して、以下の様な利点があります。

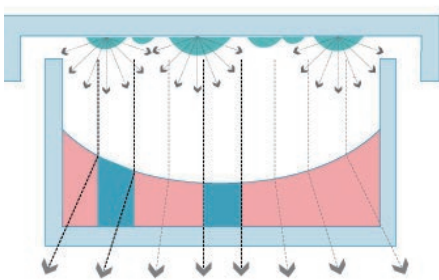
1 細胞培養面どの位置でも位相差顕微鏡観察ができます

チャンネルの形状により、どの位置でも位相差顕微鏡観察が可能となります。細胞培養エリア全体を位相差法により視覚化できます。

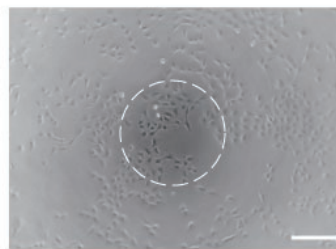


一般的な培養法とは異なり、チャンネル法での培養は位相差顕微鏡の光路を乱しません。

(a)

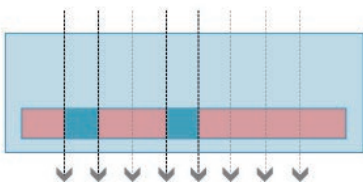


(b)

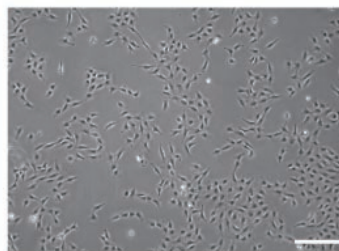


一般的な培養法：
空気／水界面が位相差効果に影響しています。
中央部でしか十分な位相差効果が得られません。

(c)



(d)



チャンネル法での培養：
チャンネルの形状により、光路が常に整列しています。
あらゆる位置で位相差顕微鏡観察が可能です

2 細胞分布が均質です

位相差モード (a) および蛍光モード (b) で撮影された以下の顕微鏡画像は、一般的な培養法における細胞分布の不均質性 (1 ~ 3) とチャンネル法における細胞分布の均質性 (4 ~ 6) を示しています。

