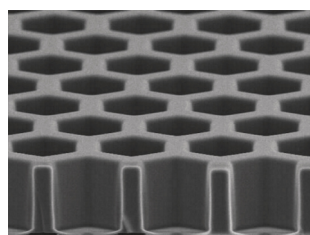
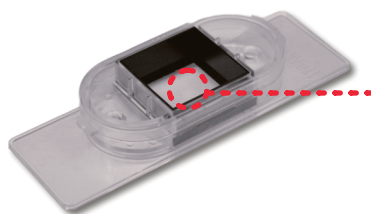




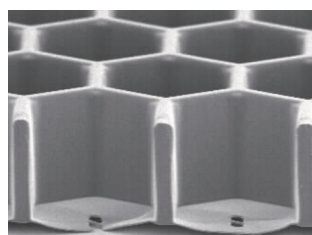
SIEVEWELL

High Density Cell Arraying Device

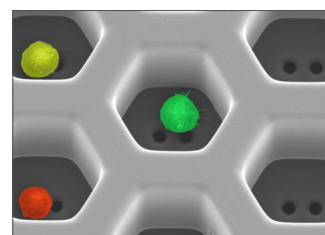
- シングルセルサイズの微細ウェル構造のフィルター
- ナノウェル数 370,000個 (20 μm タイプ)、90,000個 (50 μm タイプ)
- 透明、低自家蛍光素材、生体適合性素材
- デバイス内でダイレクトに免疫染色、イメージング
- 細胞の培養、各種アッセイも



20 μm nanowell



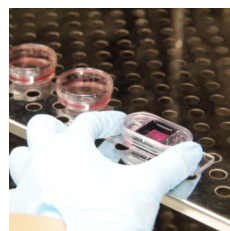
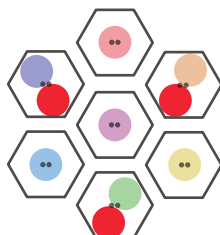
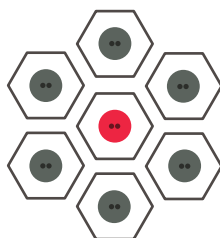
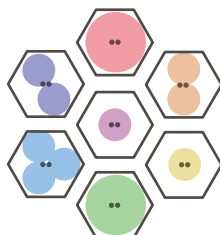
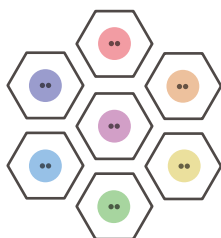
50 μm nanowell



20 μm nanowell, MCF-7

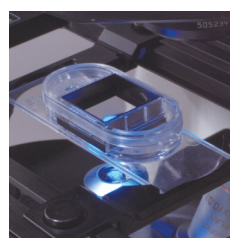
SIEVEWELLは細胞サイズのナノウェル構造をもつスライドガラスサイズのデバイスで、特殊な装置は不要、ピペット操作のみで、細胞の位置を維持、培養、アッセイ、シングルセル回収の補助などに利用できます。

細胞の格納



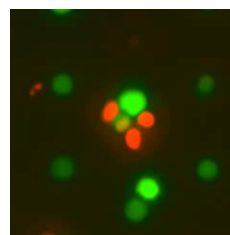
細胞培養

浮遊状態での培養
スフェロイド形成



イメージング

デバイス内での染色
希少細胞の検出・同定



各種アッセイ

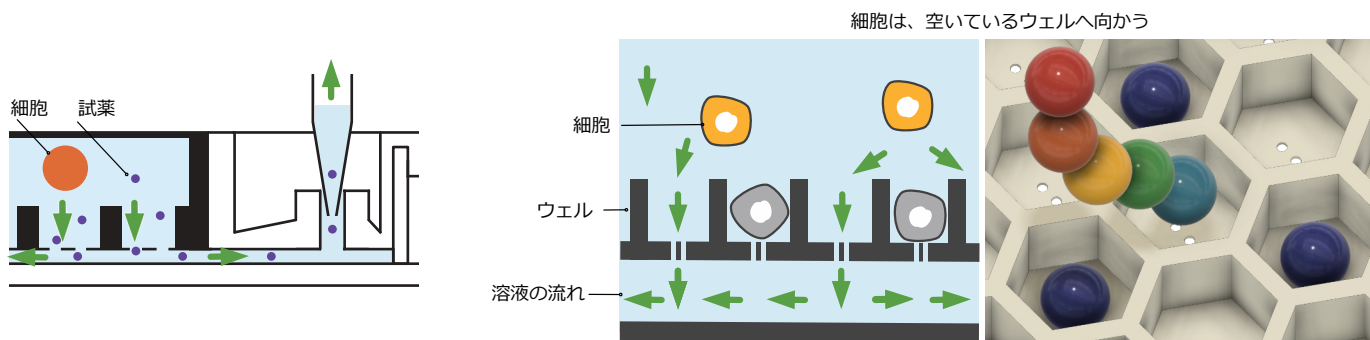
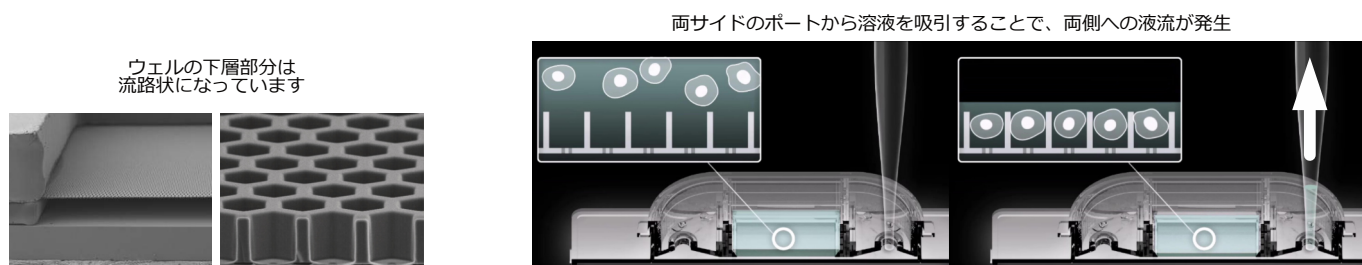
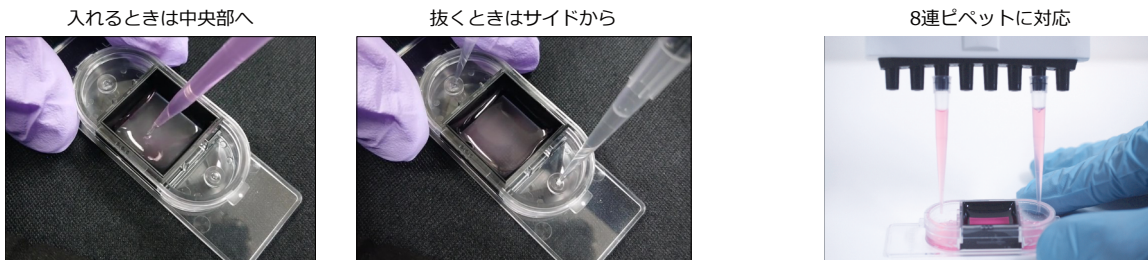
細胞間相互作用
免疫細胞キリングアッセイ

高いシングルセル格納率をもたらす仕組み

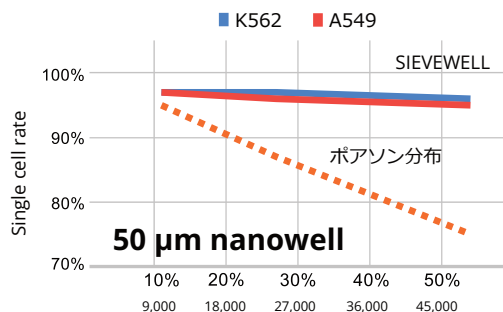
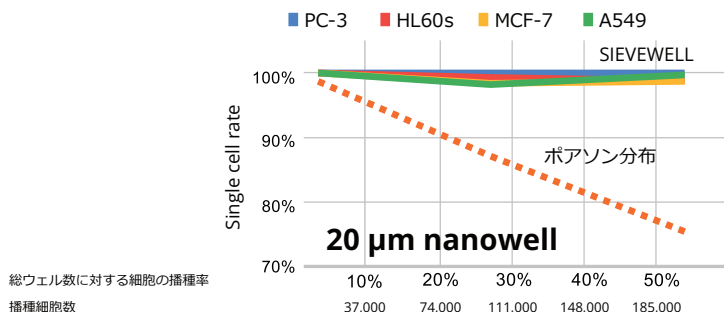
多様な細胞の機能解析のためにシングルセルのイメージングや細胞を回収して分析が行われています。存在数の少ない細胞のイメージングやガラスキャピラリーなどを利用してシングルセルを回収する場合、回収対象となる細胞が他の細胞と重なり合っていると解析や回収が困難です。SIEVEWELLは高いシングルセル率で細胞を1つのナノウェルに格納、配列できるデバイスです。

SIEVEWELLはナノウェルの底面に貫通孔を有しており、底部の流路とつながっています。サイドポートから吸引することで細胞播種エリアから両側へ溶液の流れが発生します。サイドポートから溶液を吸引する際、細胞はこの溶液の流れに乗ってナノウェルに格納されます。細胞が格納されたナノウェルは溶液の流れが抑えられ、格納されていない細胞は流れのあるウェルに向かいます。このメカニズムによって、ポアソン分布よりも高いシングルセル格納率を達成しています。

ピペットだけの簡単操作で使用できます。専用の装置などは必要ありません。



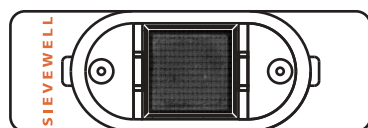
シングルセル格納率



細胞を高密度に配列

細胞が重ならないように低密度で播種すると、必要なプレートやスライドガラス、培地や試薬の必要量が多くなり、撮像に必要な枚数や時間も増え、実験操作に要する手間がかかります。

SIEVEWELLは、17 x 17 mm (スライドガラスの約1/3のエリア) に高密度にナノウェルが形成されており、必要な液量の低減、イメージングに要する時間の短縮が可能です。



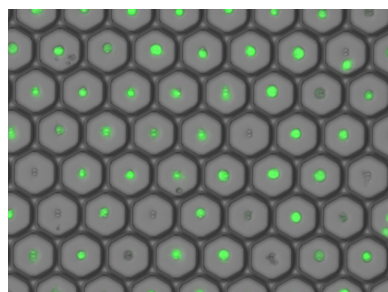
ウェル数

370,000 (20 μm)

90,000 (50 μm)



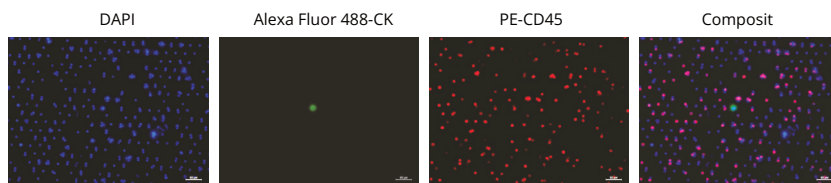
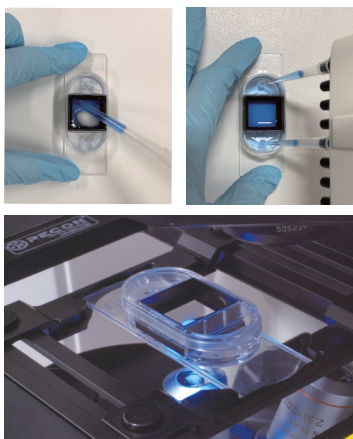
20 μm nanowell



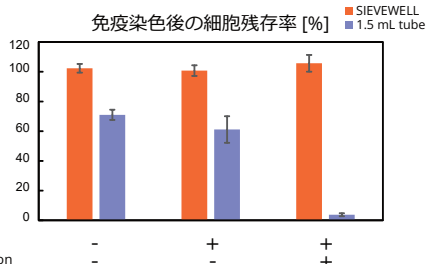
50 μm nanowell

デバイス内での染色

免疫染色は、細胞の固定、透過処理、ブロッキング、抗体反応、洗浄といった複数のステップが必要ですが、染色操作の過程で細胞が失われることがあります。SIEVEWELLを使用すると、デバイス内ですべてのステップを行うことができます。染色時の試薬は貫通孔を通過しますが、細胞はフィルター上に残るため、免疫染色時の細胞のロスを最小限にすることができます。



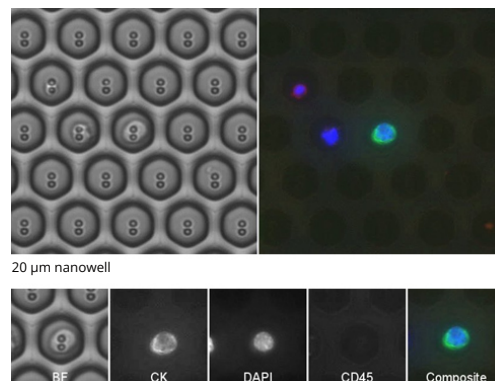
MCF7をスパイクしたヒトPBMCをロードした。デバイス内で固定処理 (4%PFA)、透過処理 (0.2 % Triton X-100)、ブロッキング処理 (Protein Block) を行った。PE標識マウス抗ヒトCD45抗体、Alexa 488標識マウス抗ヒトサイトケラチン抗体、DAPIで染色反応、洗浄を行った。



A549細胞をエッペンチューブを使用して免疫染色した場合と20 μmタイプのSIEVEWELLを使用した場合の細胞の残存率を比較した。

Case 1: 固定なし、透過処理なし
Case 2: 4%PFA固定、透過処理なし
Case 3: 4%PFA固定、0.2 % Triton X-100

がん患者血液中の循環腫瘍細胞の検出



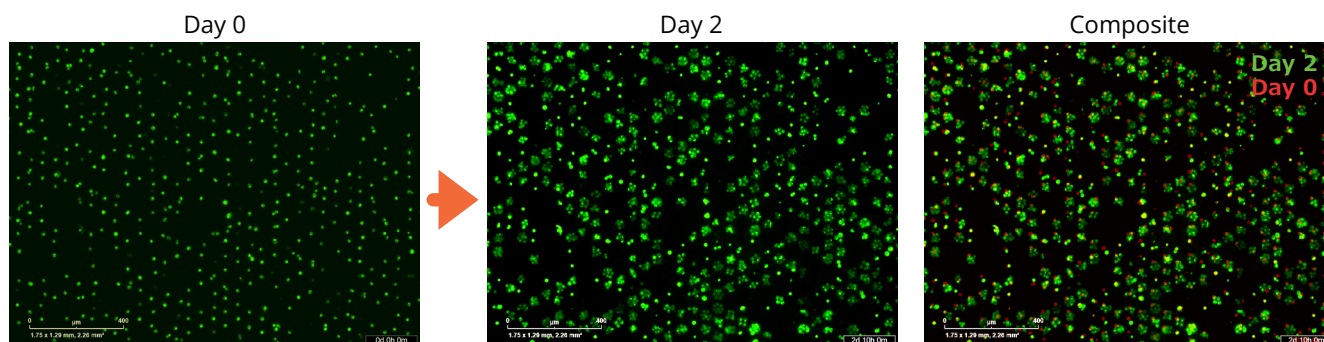
Data provided by Professor Hans Neubauer
Department of Obstetrics and Gynaecology, University Hospital and Medical
Faculty of the Heinrich Heine University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany

シングルセル培養、モニタリング

浮遊細胞のシングルセル培養

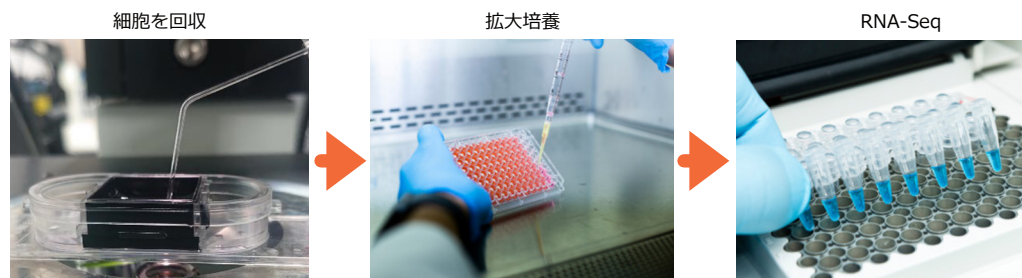
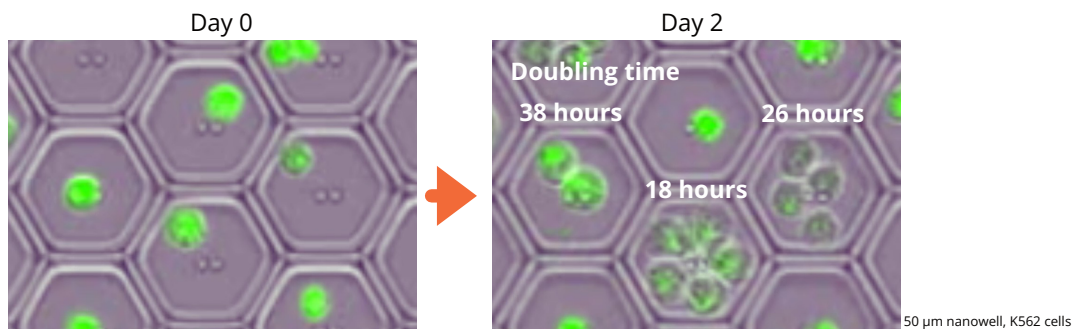
細胞の増殖をシングルセルレベルでモニタリングする場合、通常は隣の細胞と接触しないように低密度に播種するか、セルソーターや限界希釈によって1細胞となるようにマイクロウェルプレートへ播種します。しかし、シングルセルとなるように播種するのは難しく、多数のプレートが必要なため、使用する培地や試薬の量が多くなり、観察に要する時間もかかります。また、浮遊細胞を培養する場合は、細胞が定位置に留まらず、広いエリアを浮遊する1つ細胞を追跡するのは困難です。

このような場合、高密度な微細なナノウェルデバイスを用いると、シングルセルレベルで多数の細胞の増殖を同時にモニタリングすることが容易です。また、細胞はナノウェルに保持され定位置に留まるため、浮遊細胞の場合でも1つの細胞の増殖をモニタリングすることが可能です。

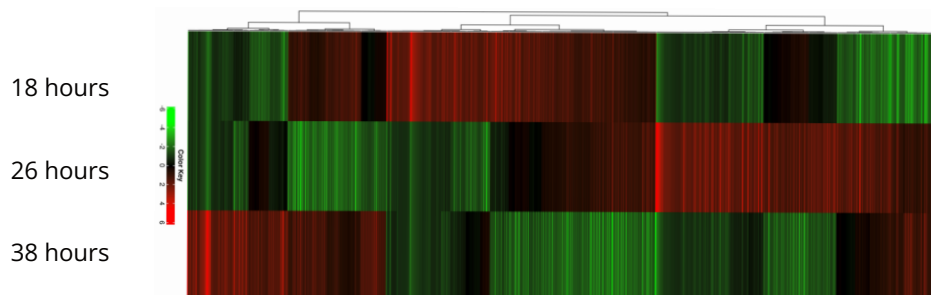


50 μ mタイプを用いたシングルセル培養
CellBrite Greenで染色したK562細胞を播種した。播種直後、培養2日後に撮影した。撮影した画像をImageJにより重ね合わせを行った。

シングルセルからの増殖をモニタリングすると、細胞株においても分裂時間の異なる細胞が混在していることが分かります。例えばK562細胞の場合、18時間、26時間、38時間の分裂時間の細胞が混在しています。下記は、それぞれのナノウェルからマイクロキャピラリーを用いて細胞を回収し、96ウェルプレートに移して培養した後にRNAを抽出、RNA-Seqによる遺伝子発現の比較を行った例を示します。

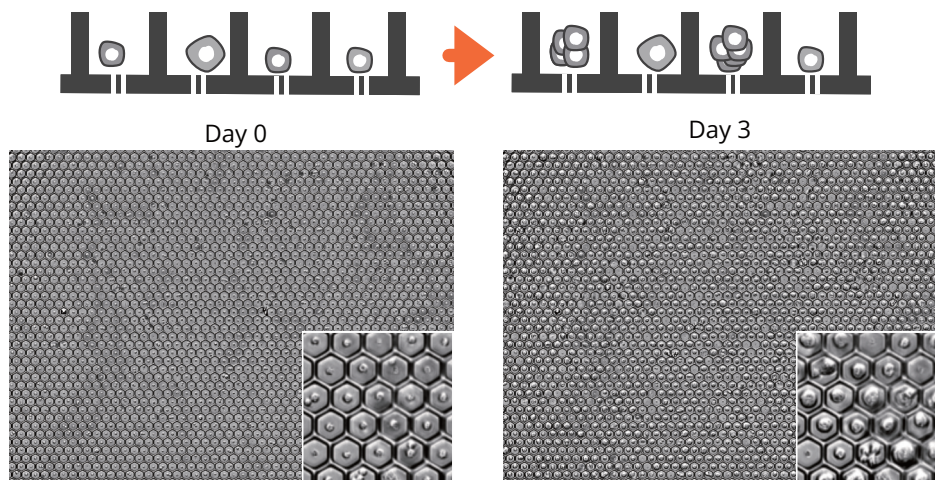


3タイプの細胞のmRNA発現の比較



シングルセルからのスフェロイド形成

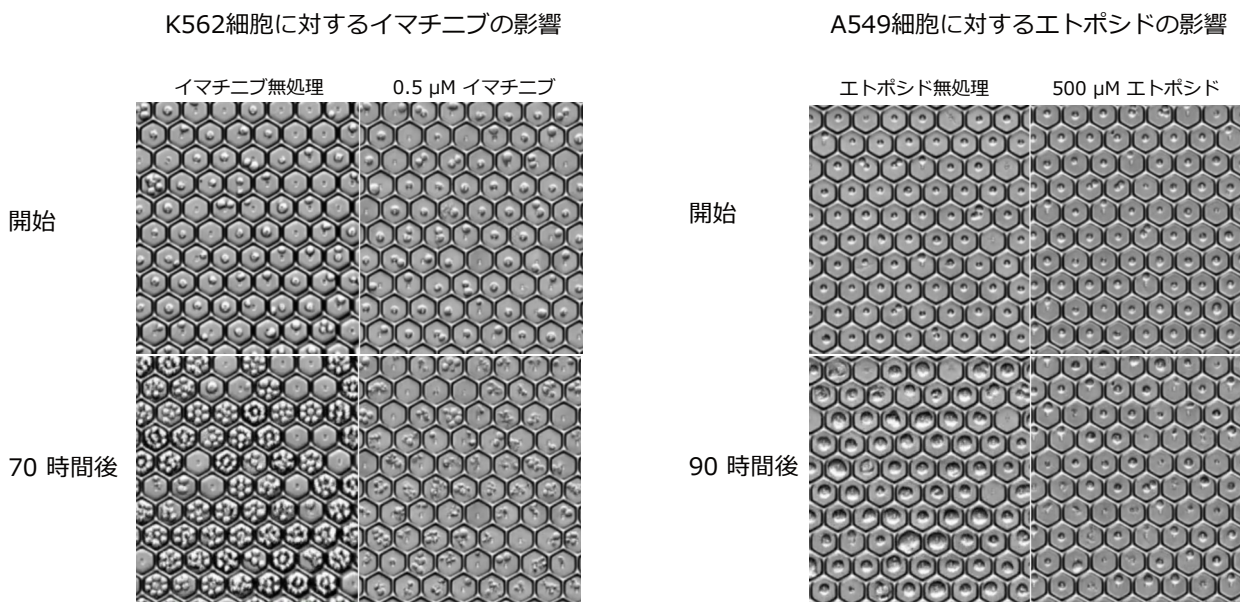
50 μ mタイプを使用することで、シングルセルからのスフェロイド形成をモニタリングすることが可能です。1つのデバイスで50,000個以上のスフェロイドが形成できます。



A549細胞をSIEVEWELL Slide 50 μ mで培養し、CM30（エビデント）にて1時間ごとに撮影した。

シングルセル培養による薬剤への反応のモニタリング

SIEVEWELLでのシングルセル培養によって、個々の細胞に対する薬剤の影響をモニタリングできます。細胞が高密度に配列されているため、ひとつの画像でも多数の細胞の様子が撮影でき、例えば1画像で1,000個以上の細胞の様子が追跡可能です。



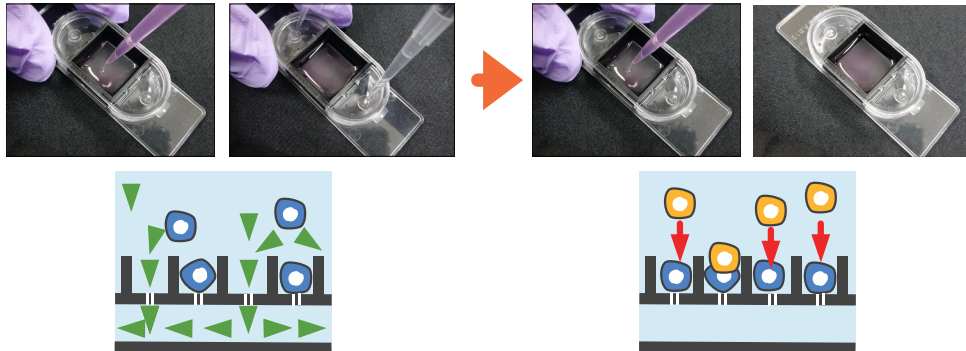
各細胞をSIEVEWELL Slide 50 μ mで培養し、CM30（エビデント）にて1時間ごとに撮影した。

細胞間相互作用アッセイ

SIEVEWELL 50 μmは、2つの細胞を格納してペアにすることで細胞間相互の解析に利用できます。液流による細胞の格納と自然落下による細胞の格納の組み合わせによって、多数の1：1のペアを形成することができます。

ひとつめの細胞の格納
液流ベースの格納方式

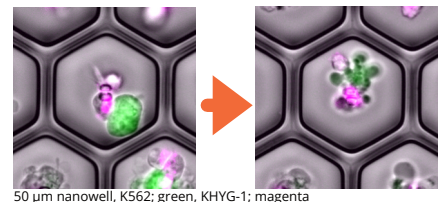
ふたつめの細胞の格納
自然落下による格納方式



免疫細胞による細胞殺傷アッセイ

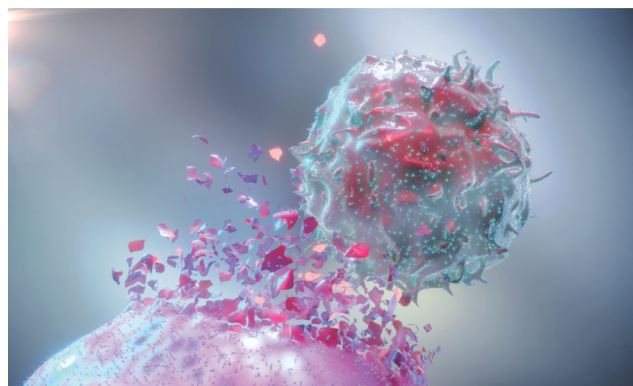
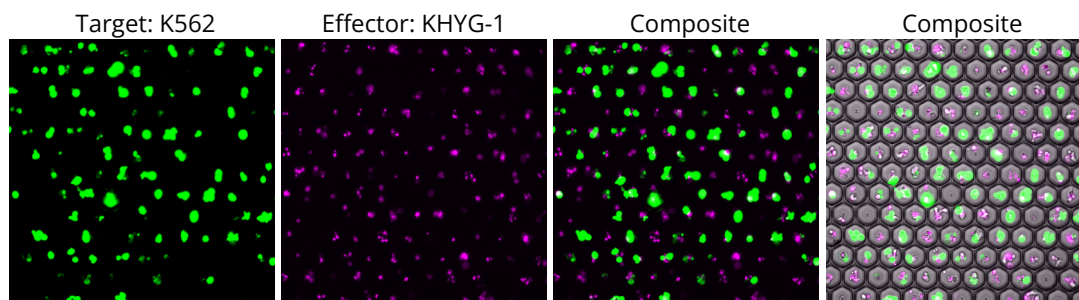
がん免疫研究においては、免疫細胞がターゲットのがん細胞にどのように影響するかを検証することが必要で、細胞傷害性免疫細胞によるがん細胞の殺傷アッセイは、細胞殺傷性を評価する方法のひとつです。SIEVEWELLを用いることで、免疫細胞とがん細胞の相互作用を追跡して評価できます。

NK細胞によるK562のアポトーシス誘導



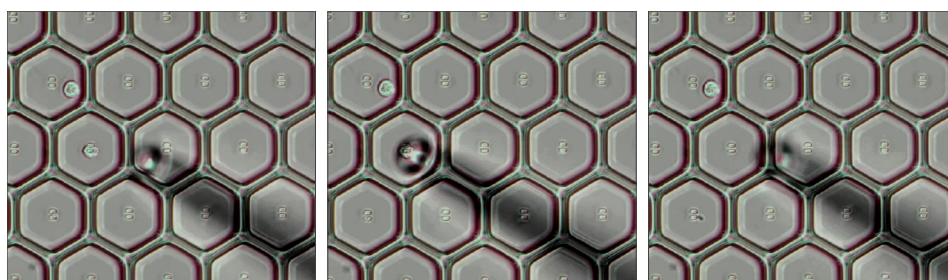
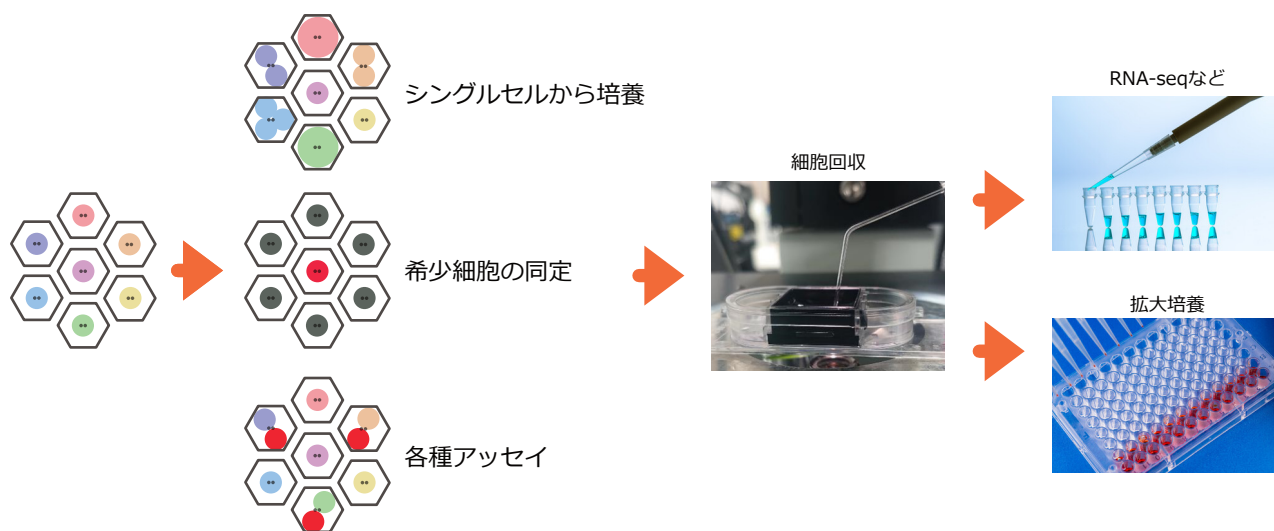
50 μm nanowell, K562; green, KHYG-1; magenta

NK細胞はK562細胞に対する細胞殺傷作用を有することが知られています。Calcein-AMを取り込ませたK562細胞と、CellBrite Redで細胞膜を染色したNK細胞株KHYG-1細胞をナノウエルに共存するように播種し、経時的なモニタリングを行いました。KHYG-1細胞によって傷害を受けたK562細胞がアポトーシスを引き起こし、Calcein-AMが流出して蛍光が消失する様子が観察されました。



シングルセルクローニング、細胞回収のサポート

SIEVEWELLは上部が開放された構造のため、ガラスキャピラリーなどを用いてウェルに格納された細胞の回収が可能
です。ウェルに格納されているため、高密度に配列された状態でも隣の細胞を回収してしまうリスクが低く、確実なシ
ングルセル回収をサポートします。

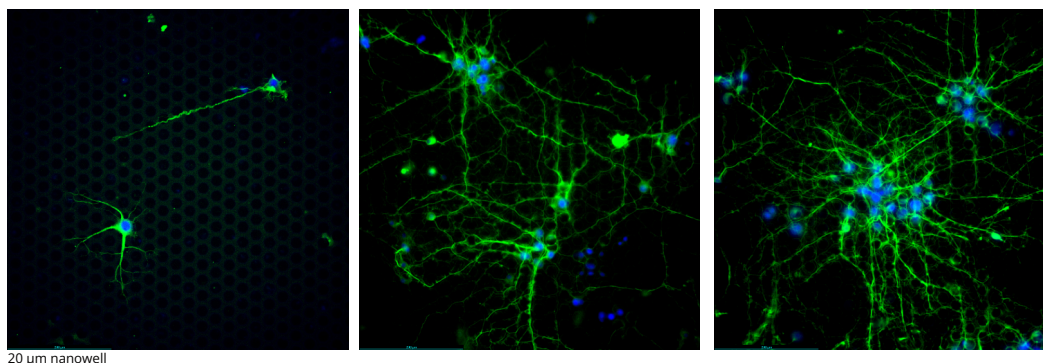


表面処理による接着培養の例

ウェルの表面に細胞が接着しないようポリマーによる非接着処理を行っております。そのため、接着細胞は接着しませ
ん。接着状態での実験には、ECMなどのコーティングが可能なタイプが必要です。別途お問い合わせください。

PC12細胞のデバイス内での神経細胞への分化

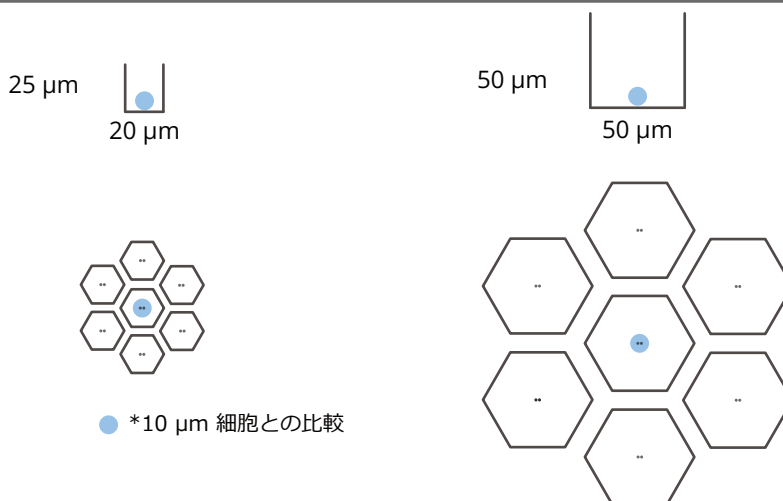
Cellmatrix Type IV (Collagen, Type IV) をコーティングしたSIEVEWELLに、ラット副腎髄質褐色細胞腫由来PC12細
胞を播種し、NGF (10ng/ml) を添加した分化誘導培地で5日間分化誘導を行いました。分化誘導後、デバイス内で固
定、透過処理後、マウス抗TUBB3 (Tubulin Beta 3 Class III) 抗体、Alexa Fluor Plus 488標識抗マウス抗体で免疫染
色を行い、THUNDER Imaging Systems (ライカマイクロシステムズ)で撮影を行いました。



製品仕様

SIEVEWELL Slide

製品コード	SWS 2001-5	SWS 5001-5
ウェルサイズ	幅 20 μm , 深さ 25 μm	幅 50 μm , 深さ 50 μm
ウェル数	370,000	90,000



共通	
外形寸法	25 mm x 75 mm x 12 mm
ウェルエリア	17 mm x 17 mm, 細胞接着抑制ポリマー処理済
溶液量	0.3 - 2 mL
素材	PS, PC, 生体適合性ポリマー
入数	5個入 (滅菌済み)

参考文献

Therapeutic application of human type 2 innate lymphoid cells via induction of granzyme B-mediated tumor cell death
Cell. 2024 Feb 1;187(3):624-641.e23.
doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.12.015>

Single-cell multi-omics enabled discovery of alkaloid biosynthetic pathway genes in the medical plant *Catharanthus roseus*.
Nature Chem Biol. 2023 Aug;19(8):1031-1041.
doi: <https://doi.org/10.1038/s41589-023-01327-0>.

Implementing microwell slides for detection and isolation of single circulating tumor cells from complex cell suspensions
Cytometry A. 2022 Dec;101(12):1057-1067.
doi: <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24660>.

Validation of Cell-Free RNA and Circulating Tumor Cells for Molecular Marker Analysis in Metastatic Prostate Cancer
Biomedicines. 2021 Aug; 9(8): 1004.
doi: <https://doi.org/10.3390/biomedicines9081004>.

Improvement of single circulating tumor cells isolation with sievewell slides
Geburtshilfe Frauenheilkd 2020; 80(10): e212
doi: <https://doi.org/10.1055/s-0040-1718200>.

お問い合わせ

contact@sievewell.com

東京応化工業株式会社 新事業開発本部

〒253-0114
神奈川県高座郡寒川町田端1590

製品紹介、アプリケーション例はウェブサイトをご覧ください。

www.sievewell.com

For research use only. Not for use in diagnostic procedures.
本内容は予告なく変更する場合がありますのでご了承ください。