



住友ベークライトより発売致します！

細胞アレイ3次元培養システム

Cell-able[®]

 TOYO GOSEI

目次

1) Cell-Able®の特性・用途・特長

2) 肝細胞研究

2-1) 肝細胞研究 参考資料

2-2) 薬物動態でのアプリケーション

2-3) 肝毒性でのアプリケーション

2-4) 肝炎研究でのアプリケーション

3) 心毒性評価研究

4) 抗がん剤研究

抗がん剤研究でのアプリケーション(HCS: High Content Screening)

5) 幹細胞研究



Cell-able® の特性・用途・特長

肝細胞での薬物動態，毒性研究に！

抗がん剤，初代がん細胞・株化がん細胞の研究に！

1 ウェルに数百個のスフェロイド (ウェル間差が小さい)

スフェロイドのサイズが制御可能

各種間質細胞との共培養が可能

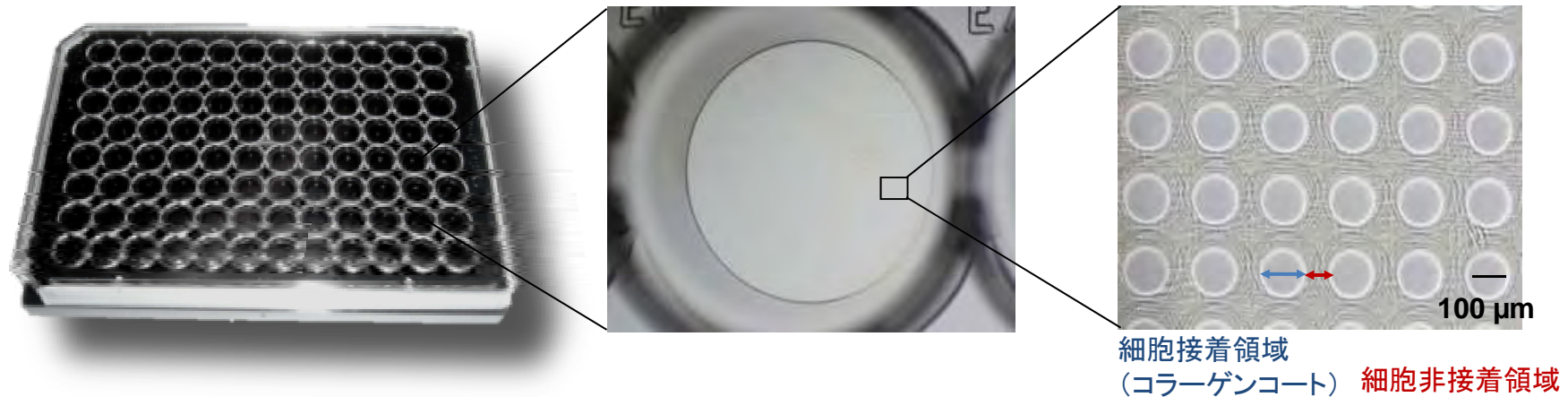
スフェロイドのサイズが制御可能

豊富な薬物動態の研究アプリケーション & 論文

肝細胞専用の培地 (RM-101) があり，長期培養が可能

スフェロイドが底面に接着しているため，蛍光プローブ染色，免疫染色などが容易

Cell-able® 外観と培養表面



一般的な培養操作で
直径 約100 μ m, 高さ 20~40 μ mの3Dスフェロイドを形成
96well plate : 800circles/well
384well plate: 250circles/well

目次

1) Cell-Able®の特性・用途・特長

2) 肝細胞研究

2-1) 肝細胞研究 参考資料

2-2) 薬物動態でのアプリケーション

2-3) 肝毒性でのアプリケーション

2-4) 肝炎研究でのアプリケーション

3) 心毒性評価研究

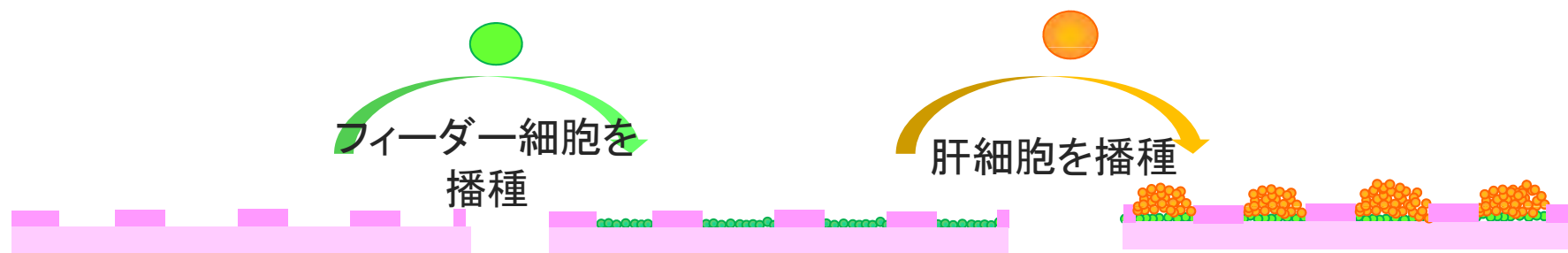
4) 抗がん剤研究

抗がん剤研究でのアプリケーション(HCS: High Content Screening)

5) 幹細胞研究



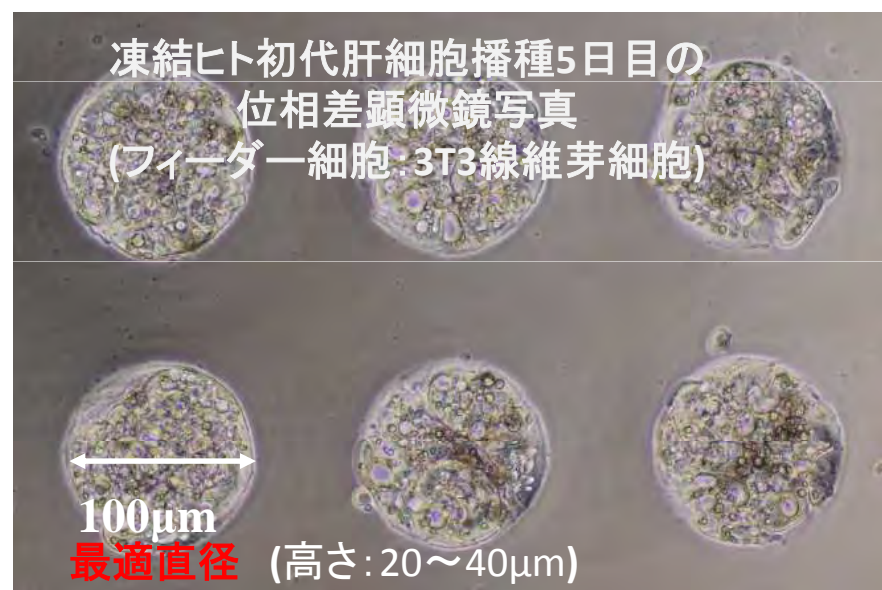
Cell-able[®]における肝細胞とフィーダー細胞の共培養



フィーダー細胞 : 8×10^3 cells/well

肝細胞 : $2-4 \times 10^4$ cells/well (96ウェルプレートの場合) 注)

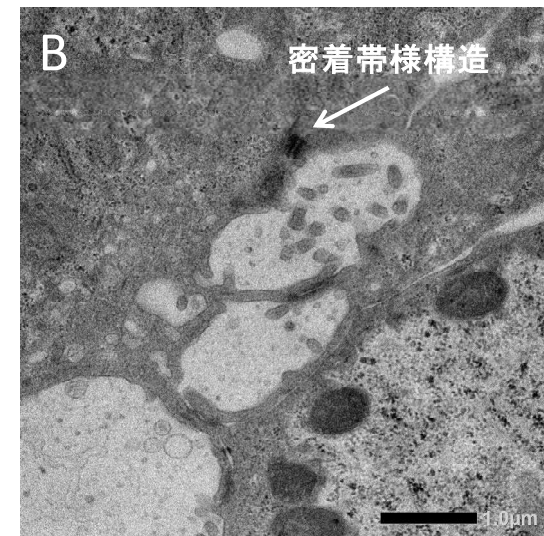
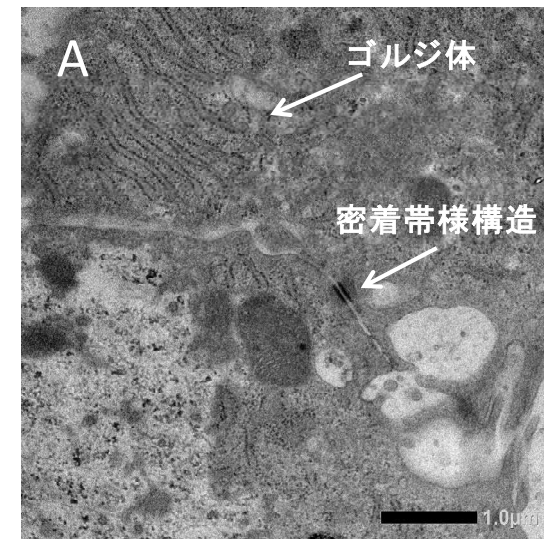
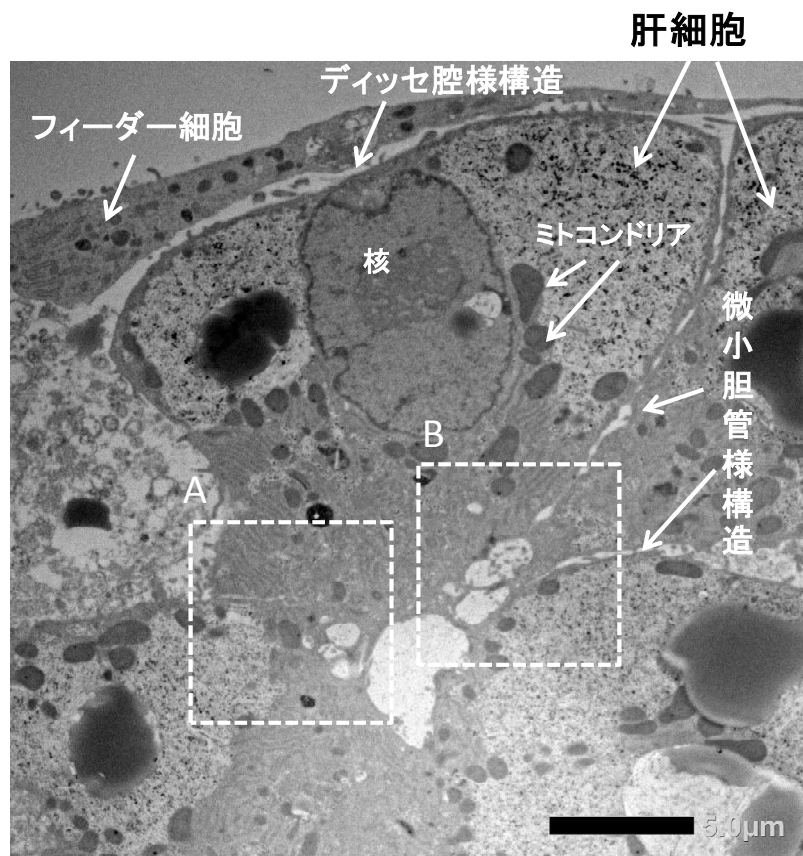
注) 単層培養と比べてCell-able[®]では播種数が1/2.5 程度ですので、
ヒト凍結肝細胞を使った実験では、**実験コストを低減できます!** (Appendix 3ご参照ください)



Cell-able®上で培養した新鮮ヒト肝細胞スフェロイド (3T3 Swiss albino との共培養)

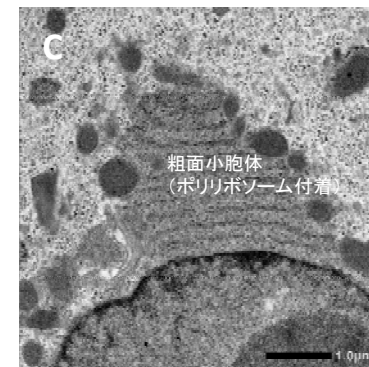
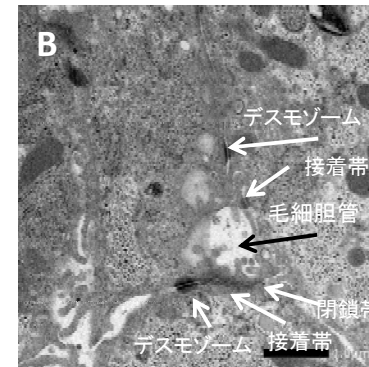
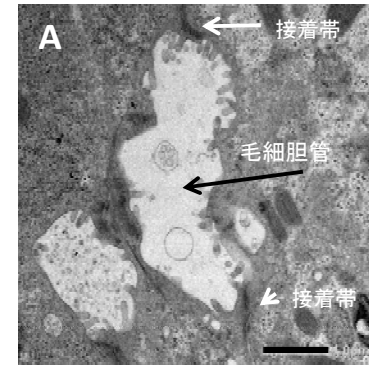
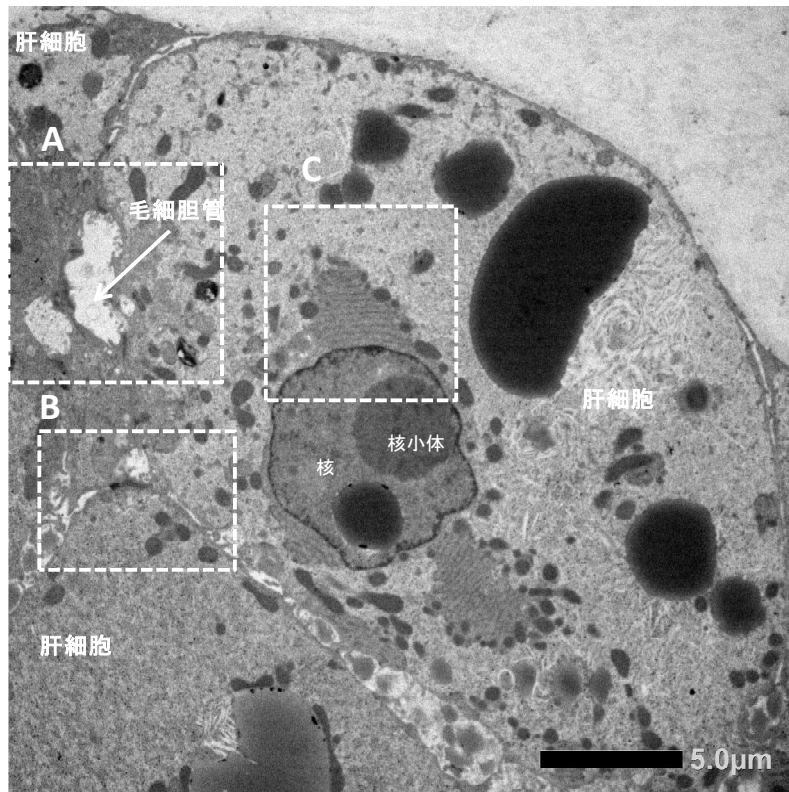
キメラマウス由来ヒト新鮮肝細胞 (PXB-cells®, フェニックスバイオ) を Cell-able® に播種後10日目の電子顕微鏡写真。肝微小構造の再構築が観察された。

(データ監修: 旭川医科大学 医学部 病理学講座 腫瘍病理分野 西川祐司教授)

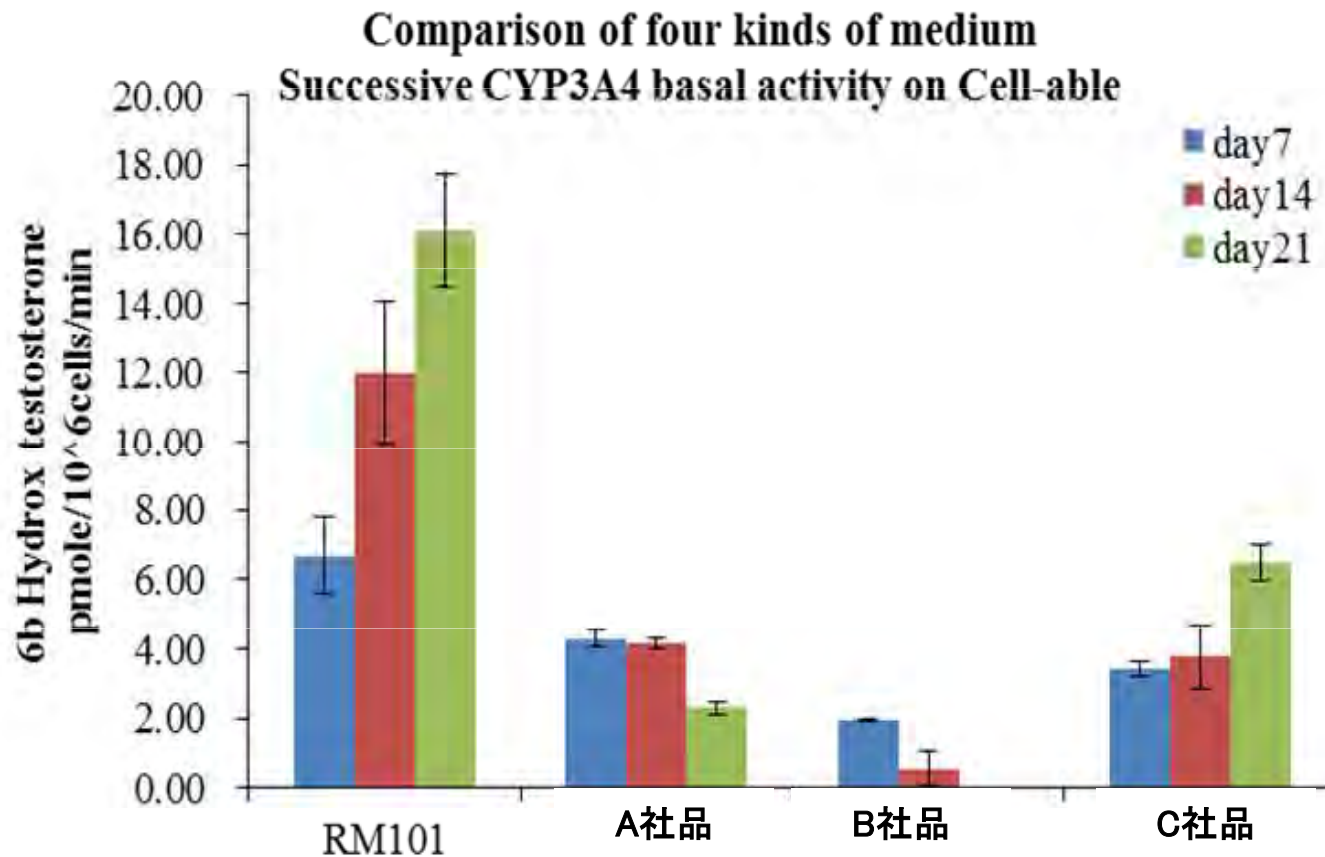


Cell-able®上で培養した新鮮ヒト肝細胞スフェロイド(フィーダレス培養)

キメラマウス由来ヒト新鮮肝細胞(PXB-cells®, フェニックスバイオ)をCell-able®に播種後10日目の電子顕微鏡写真。肝微小構造の再構築が観察された。



Cell-able[®]肝細胞 培地RM101 と市販培地との比較

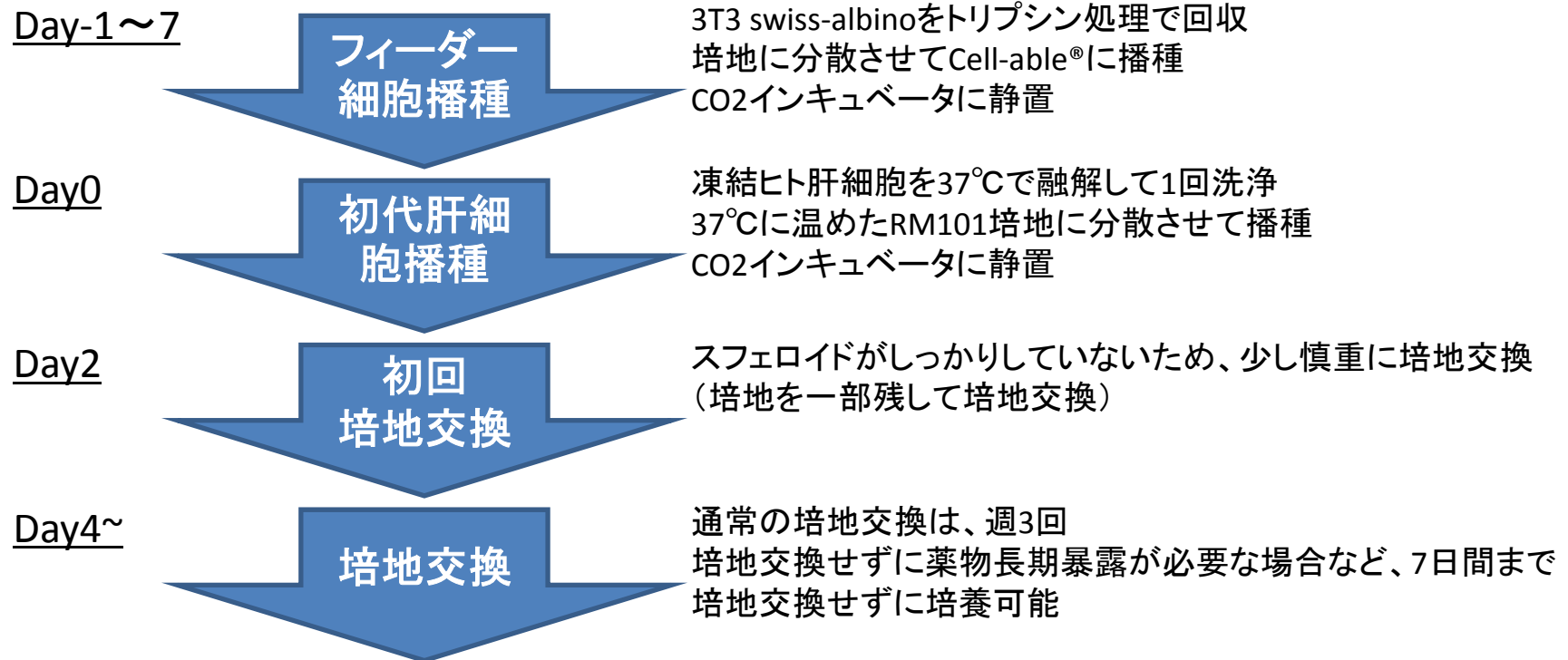


Cell-able 96 well プレート上で、RM101培地及び3種類の市販培地を用いてヒト初代肝細胞の共培養を行った。フィーダー細胞播種数は 8,000 cells/well, 肝細胞播種数は 20,000cells/wellとして21日間培養し、CYP3A4の基礎活性を比較した。その結果、RM101では他の市販培地に比べ高い活性が21日間維持された。



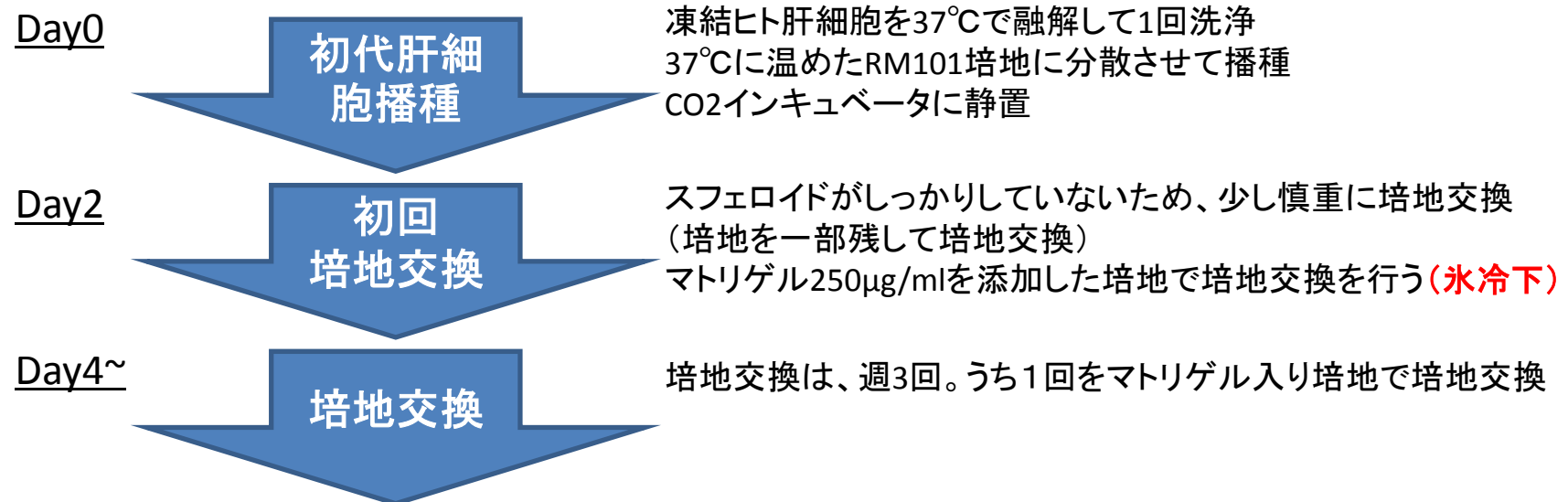
RM-101は、FBS 1.0%を含む初代肝細胞培養用培地。組成は非開示

Cell-able[®]を用いた 凍結ヒト初代肝細胞 3次元培養操作方法 (フィーダー細胞 “あり” の場合)



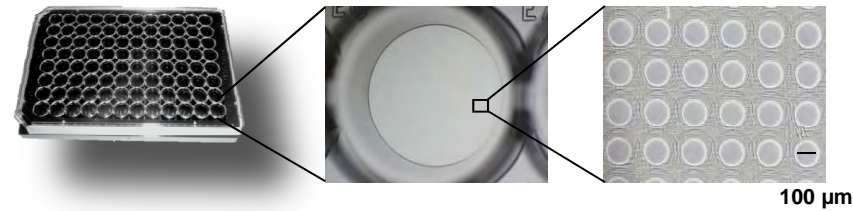
取り扱いに特別な技術は不要で、
通常の細胞培養と同様な操作で3次元培養が可能

Cell-able[®]を用いた 凍結ヒト初代肝細胞 3次元培養操作方法 (フィーダー細胞 “なし” の場合)

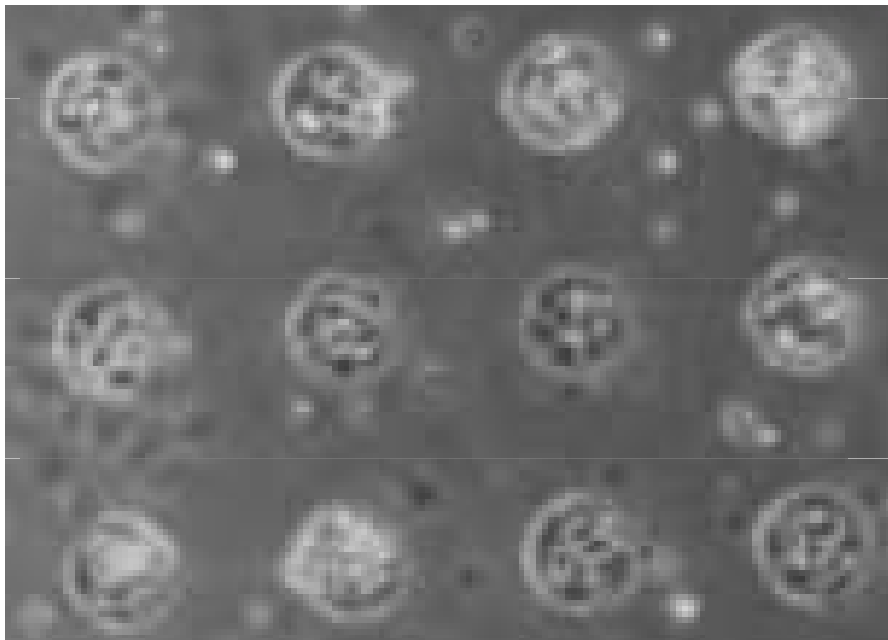


肝特異的機能を保ったまま、3週間程度の培養が可能

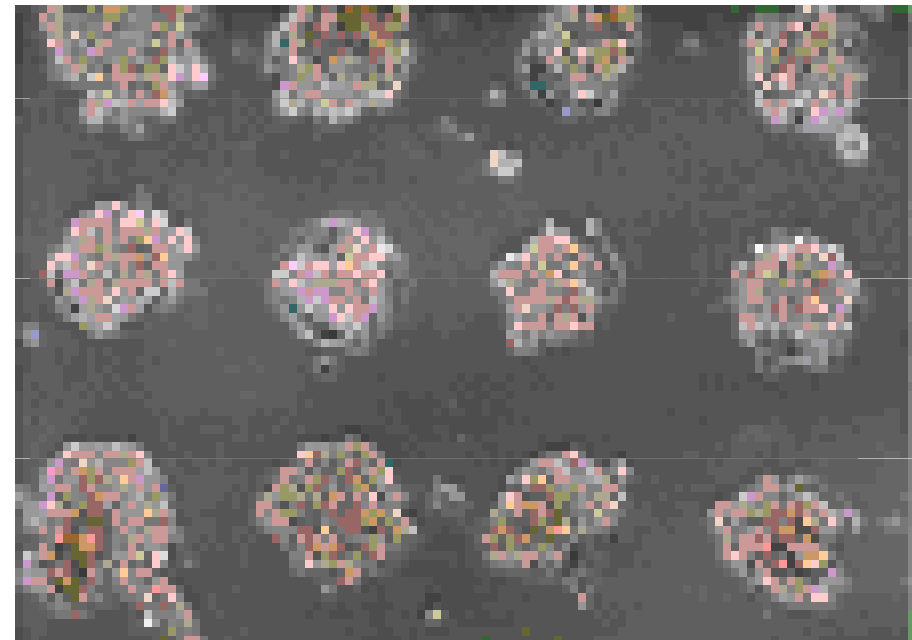
Cell-able® 外観と培養表面



頸動脈正常血管内皮細胞(HH)
播種から24時間の動画



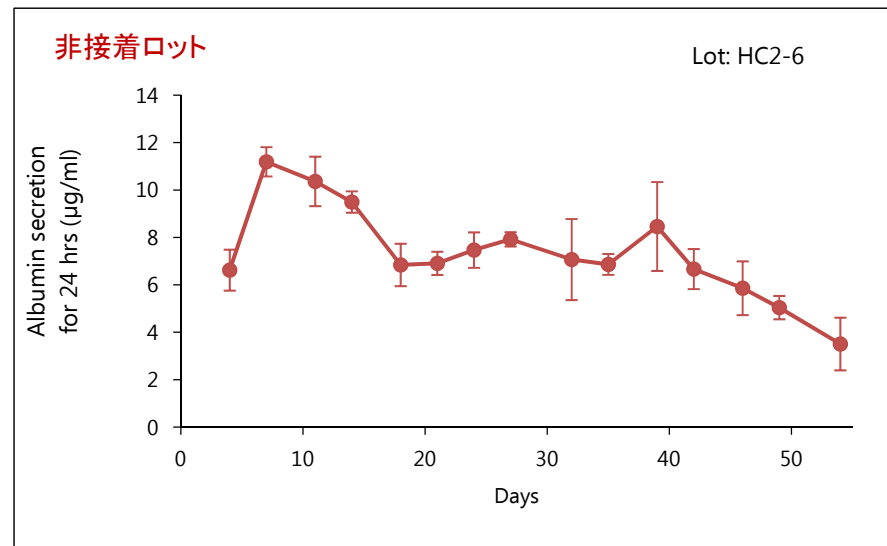
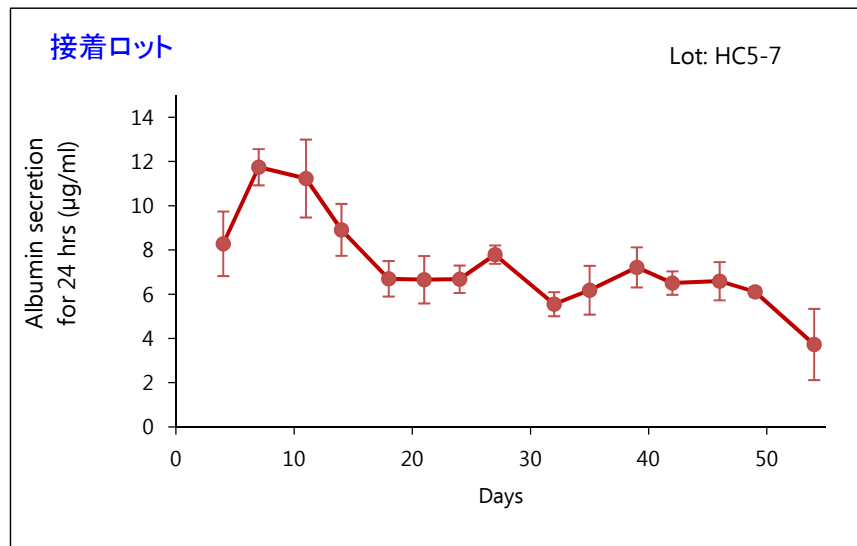
ラット初代肝細胞
播種から48時間の動画



一般的な培養操作で
直径約100μm, 厚み20~40μmの3次元スフェロイドを形成

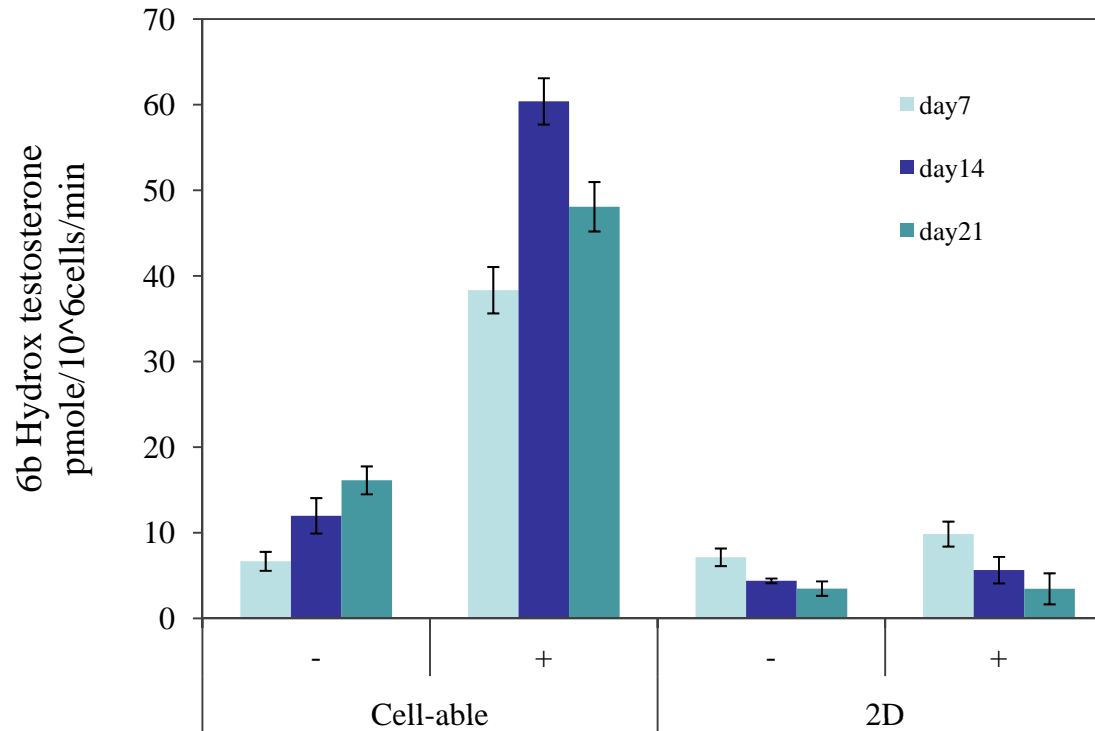
Cell-able®上で培養した初代肝細胞の形態と肝特異的機能維持

ヒト初代肝細胞アルブミン産生能経時変化



ヒト初代肝細胞のCYP3A4ベース活性およびRifampicinによる誘導活性 — Cell-able[®] vs 2D —

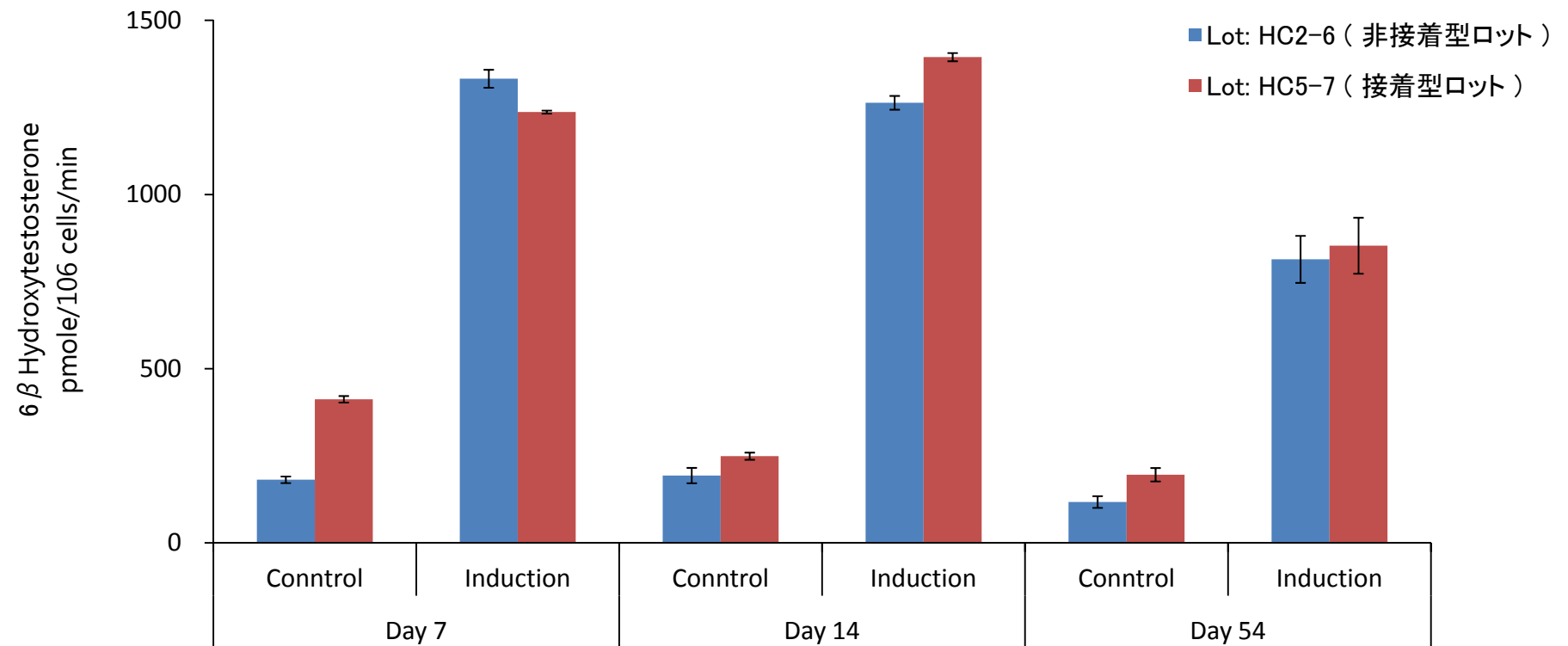
Assay summary	Culture plate	Cell able 96well plate for spheroid Conventional 96well plate for mono layer
	Feeder cell	HH
	Hepatocyte	Cryo-Human Hepatocyte cell (Xenotech suspension type, Lot.799) 2 × 10 ⁴ cells/well
	Medium	RM-101
	Inducer	Rifampicin (+)
	Activity measurement	Testosterone ⇒ 6βHydroxy testosterone measured by UPLC
		Initial activity(day0) 311.4 pmole/10 ⁶ cells/min (STDEV:20.7)



肝臓の代謝物量の定量測定の場合、培養上澄中の代謝物の量が多い
→ 微量代謝物の分析が高いS/Nで可能



Cell-able®上で培養した初代肝細胞の肝特異的機能維持



ヒト初代肝細胞CYP3A4 活性(基礎活性と誘導活性)
誘導剤: Rifampicin

Cell-able®で培養したヒト初代肝細胞スフェロイドで 1週間以上維持が確認された代謝/トランスポーター活性

Phase I		
	Substrate	Metabolite
CYP3A4	Testosterone Midazolam	6β-hydroxy testosterone 1'-hydroxy midazolam
CYP1A2	Phenacetin	Acetaminophen
CYP2C9	Tolbutamide	Hydroxy tolbutamide
CYP2A6	Coumarin	7-hydroxy coumarin
CYP2D6, CYP2C19, CYP2B6(←Appendix 2)		
Phase II		
UDP- Glucuronosyltransferase	Testosterone Acetaminophen	Testosterone glucronide Acetaminophen glucronide
Sulfotransferase	Acetaminophen	Acetaminophen sulfate
Phase III		
MRP2	5 (and 6)-Carboxy-2',7'- Dichlorofluorescein	Efflux transporter
NTCP	taurocholic acid	Up take transporter

目次

1) Cell-Able®の特性・用途・特長

2) 肝細胞研究

2-1) 肝細胞研究 参考資料

2-2) 薬物動態でのアプリケーション

2-3) 肝毒性でのアプリケーション

2-4) 肝炎研究でのアプリケーション

3) 心毒性評価研究

4) 抗がん剤研究

抗がん剤研究でのアプリケーション(HCS: High Content Screening)

5) 幹細胞研究



2-2) 肝細胞の薬物動態分野でのアプリケーション

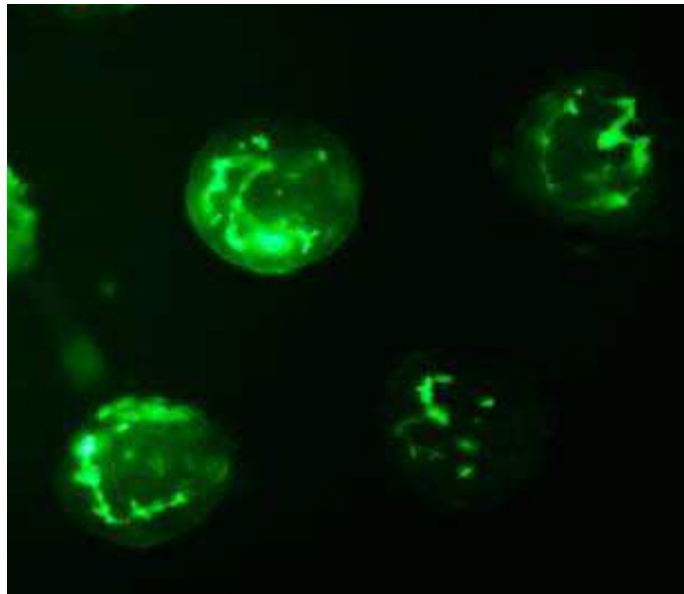
2-2-1) 薬物動態

- 第21回HAB研究機構学術年会
シンポジウム I 細胞、組織培養技術の発展と実用化
凍結ヒト肝細胞を創薬薬物動態試験に活用するための新規培養法の構築と応用
田辺三菱製薬株式会社 薬物動態研究所 創薬動態Cグループ 山田泰弘先生

2-2-2) 薬物代謝

- 安全性評価研究会 スフェロイド分科会
(第38回日本トキシコロジー学会、2011年ポスター)
Cell-able®で培養したヒト初代肝細胞に薬物を暴露しその代謝物を継時的に分析する方法で、グルクロン酸抱合及び硫酸抱合の第2相代謝物の検出が可能であった。これまでin vitroでの検出が難しいとされてきた**Lamotrigine**と**Sulbtamol**の**ヒト特異的代謝物**が検出できた。⇒論文化
Evaluation of human hepatocytes cultured by three-dimensional spheroid systems for drug metabolism. Ohkura T, Ohta K, Nagao T, et al. Drug metabolism and pharmacokinetics, , 29(5), 373-378, (2014)
- 10th ISSX Meeting (International Society for the Study of Xenobiotics), 2013
Prediction of clinical CYP3A4 induction using pooled human hepatocytes on cell array 3D-culture plate for drug-metabolizing enzyme induction studies in drug discovery
Jiro Kuze , Discovery Drug Metabolism & Pharmacokinetics, Taiho pharmaceutical co., ltd, Tsukuba, Japan

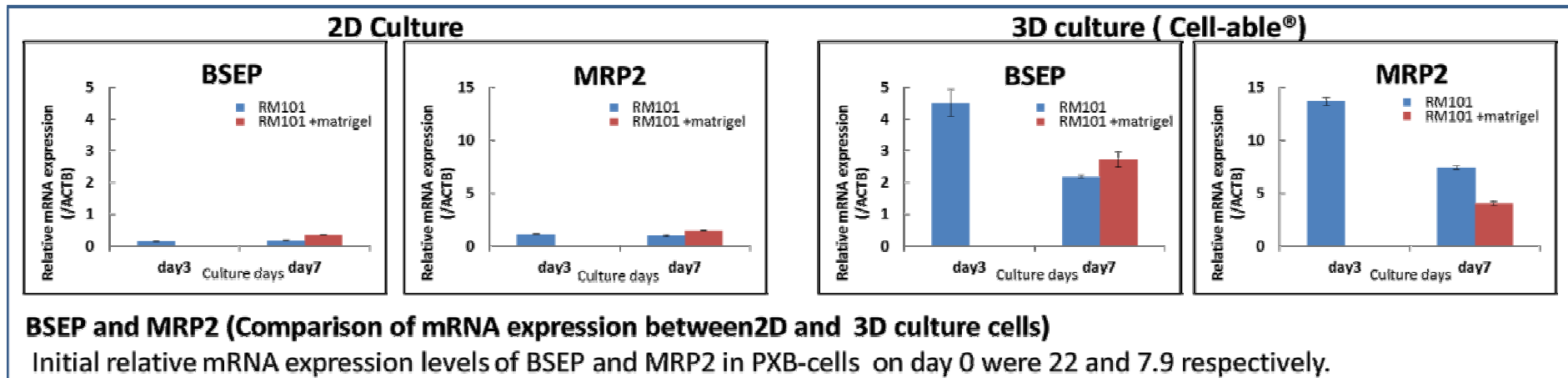
2-2-3) トランスポーター



排泄トランスポーター機能 (CDFを用いた胆汁排泄の確認)

CDFDAは肝細胞に取り込まれた後、蛍光物質であるCDFに加水分解され、ABCトランスポーターによって胆汁管へ排泄される。図は、Cell-able®で培養7日目のヒト初代肝細胞スフェロイドにCDFDA添加10分後の顕微鏡写真。

CDFDA; Carboxydichlorofluorescein diacetate
CDF; Carboxydichlorofluorescein



排泄トランスポーター 遺伝子発現
2DとCell-able®培養の比較

1) Cell-Able®の製品特性

2) 肝細胞研究

2-1) 肝細胞研究 参考資料

2-2) 薬物動態でのアプリケーション

2-3) 肝毒性でのアプリケーション

2-4) 肝炎研究でのアプリケーション

3) 抗がん剤研究

抗がん剤研究でのアプリケーション(HCS: High Content Screening)

4) 幹細胞研究



2-3) 肝毒性分野でのアプリケーション

2-3-1) 逸脱酵素・アルブミン産生能のモニタリングによる薬物性肝障害評価

ポスター紹介

2011年第38回日本トキシコロジー学会

P159 肝毒性評価におけるヒト肝細胞スフェロイド培養法の有用性検討(1)

Diclofenac , Flutamide , Benzbromarone, Chlorpromazine, Troglitazone, Tacrine

P160: 肝毒性評価におけるヒト肝細胞スフェロイド培養法の有用性検討(2)

Acetaminophen, Amiodarone, Imipramine, Ticlopidine , Isoniazid, Cyclosporin A

P161: ヒト肝細胞スフェロイド培養法を用いた反応性代謝物アシルグルクロニドあるいはミトコンドリアDNAポリメラーゼ γ 阻害剤による肝障害の検出

Fialuridine , Ibufenac , Fenclofenac

DNA polymerase γ 阻害作用を示す Fialuridineは、*Day7まで変化が認められなかったが、Day9以降、臨床Cmaxより濃度に応じたAST量増加および形態変化が認められた。*長期間の培養可能なヒト肝細胞スフェロイドを用いることにより、*長期間の化合物曝露によって初めて肝毒性が発生する薬物の毒性検出が可能であり、有用な評価系と考えられた。*

2-3-2) 逸脱酵素・アルブミン産生能のモニタリングによる薬物性肝障害評価

安全性評価研究会 スフェロイド分科会(第38回日本トキシコロジー学会、2011年)

ポスター発表3題

Cell-able®で培養したヒト初代肝細胞に薬物を濃度を振って21日間暴露し、逸脱酵素、アルブミン産生能、細胞の形態変化などを継時的にモニタリングした。この結果、長期暴露によって初めて毒性が確認される薬物があり、長期培養の有用性が示された。

⇒論文化

Utility of human hepatocyte spheroids for evaluation of hepatotoxicity., OGIHARA,Takuo, et al., *Fundamental Toxicological Sciences*, 2015, 2. 1: 41-48.

2-3-3) 排泄トランスポーター阻害試験

PXB-cells™をCell-able®上で培養し17種類の薬物を暴露した後、CDFDA入りバッファー中でCDFの胆汁排泄への影響を観察した。この結果、Cyclosporine A, Pravastatin, Benzbromarone, TroglitazoneでCDF排泄の阻害が確認された。

2-3-4) イメージングによる薬物性肝障害(DILI)予測

凍結ヒト初代肝細胞又はヒト化肝臓キメラマウスから採取した新鮮ヒト肝細胞PXB-cells™をCell-able®384well plate上で培養し薬物を2週間暴露した後、蛍光プローブを用いて複数のバイオマーカーを染色し、High content screening assay systemによる画像解析によってDILIの予測を行った。この結果、これまでに報告のあった論文値と比較して、同等以上の結果を示した。

2-3-4) イメージングによる薬物性肝障害(DILI)予測

Cell-able®上で培養したヒト新鮮肝細胞(PXB-cells™)とHCS によるDILI予測

【試験概要】

Cell-able®で培養したキメラマウス由来ヒト新鮮肝細胞フェロイドに32 薬物を14日間曝露し、薬物によって引き起こされる肝障害(DILI)を、ImageXpress Micro (Molecular Devices) によるイメージング解析により予測した。

この結果を、サンドイッチ培養24時間薬物曝露(Xu et al.,2008)、2次元共培養16日間薬物曝露(Khetani, et al.,2013) による結果と比較した。薬物のDILI判定は、FDAのLTKB (Liver Toxicity Knowledge Base)を基に行った。

各試験方法の概要比較

	Xu, 2008 ¹⁾	Khetani, 2013 ²⁾	TOYOGOSEI Cell-able®
Cell	Cryo-human hepatocyte	Cryo-human hepatocyte+3T3 J-2	Fresh-human hepatocyte+3T3 Swiss albino
Culture	2D /Matrigel Overlay	HepatoPac™ co-culture	Cell-able® 3D Co-culture
播種細胞数	60,000 Cells/well (96well plate)	65,000 Cells/well (96well plate)	8,000 Cells/well (384well plate)
薬物暴露濃度	100 × Cmax	1,30,60,100 × Cmax	1,10,30,60 × Cmax
薬物曝露時間	24時間	16日間	14日間
検出マーカー	核 ミトコンドリア 細胞内グルタチオン 活性酸素、油滴	ATP 細胞内グルタチオン アルブミン産生 尿素産生	核 ミトコンドリア 細胞内グルタチオン 活性酸素, 油滴
検出方法	蛍光イメージング 1ウェルで全てのマーカーを検出	CellTiter-Glo® assay GSH-Glo™ assay ELISA 呈色反応	蛍光イメージング 1ウェルで全てのマーカーを検出

References

- 1) Xu et al., *Toxicological Sciences*, 105, 97-105 (2008)
- 2) Khetani et al., *Toxicological Sciences*, 132, 107-117(2013)
- 3) Chen et al., *Drug Discovery Today*, 16, 697-703 (2011)



薬物のDILI 判定基準

LTKB³⁾を参考に判定基準を決定

Status/ label	DILI Severity score		
	2,3	4,5	6-8
NM	N		
AR	+/-		
WP	+/-	P	P
D	P		
BW	P		
WD	P		

N : Drugs of no concern for DILI
+/- : Drugs of less concern for DILI
P : Drugs of most concern for DILI

Liver Toxicity Knowledge Base

FDA で承認されている、薬物がDILIを引き起こす度合いを示す指標の知識基盤

<http://www.fda.gov/ScienceResearch/BioinformaticsTools/LiverToxicityKnowledgeBase/ucm226811.htm>

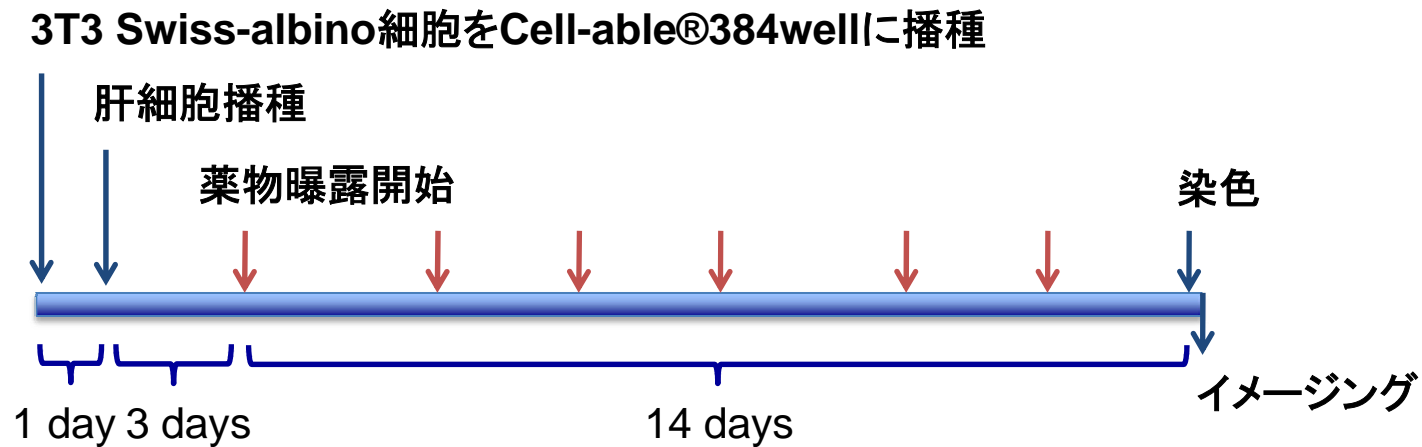
LTKBに記載が無い薬物については、2008年Xuらの論文のClinical DILIの判定に従った。

各試験のDILI 陽性判定基準

試験	DILI 陽性判定基準
<p>Xu, 2008 2D plate Matrigel overlay 100 × Cmax 24時間暴露</p>	<p>イメージングによる検出 コントロールに対する比が 核:面積値 <0.4 ミトコンドリア膜電位:輝度値 <0.4 GSH:面積値 <0.65, 総輝度値 <0.4 ROS:総輝度値 >2.5 陽性判定:少なくとも1項目が陽性</p>
<p>TOYO GOSEI Cell-able® PXB-cells™ 1-60 × Cmax 14日間曝露</p>	<p>イメージングによる検出 コントロールに対する比が ミトコンドリア膜電位:面積値 <0.7 GSH:面積値 <0.7 Oil droplet > 1.3</p>
<p>TOYO GOSEI Cell-able® Human hepatocyte 1-60 × Cmax 14日間曝露</p>	<p>イメージングによる検出 コントロールに対する比が 核:総輝度値(△フィーダー細胞) <0.4 ミトコンドリア膜電位:面積値 <0.4 GSH:面積値 <0.4</p>

イメージングによるDILI予測試験

✓ 実験スケジュール



↓ 薬物を含む培地で培地交換

● 染色方法 (2 steps)

Step-1 培養上清を除去し、すべてのプローブを含む染色液を添加して45分間インキュベーション

Step-2 染色液を除去して1回洗浄後、TMRM, mBCIを含む染色液を添加

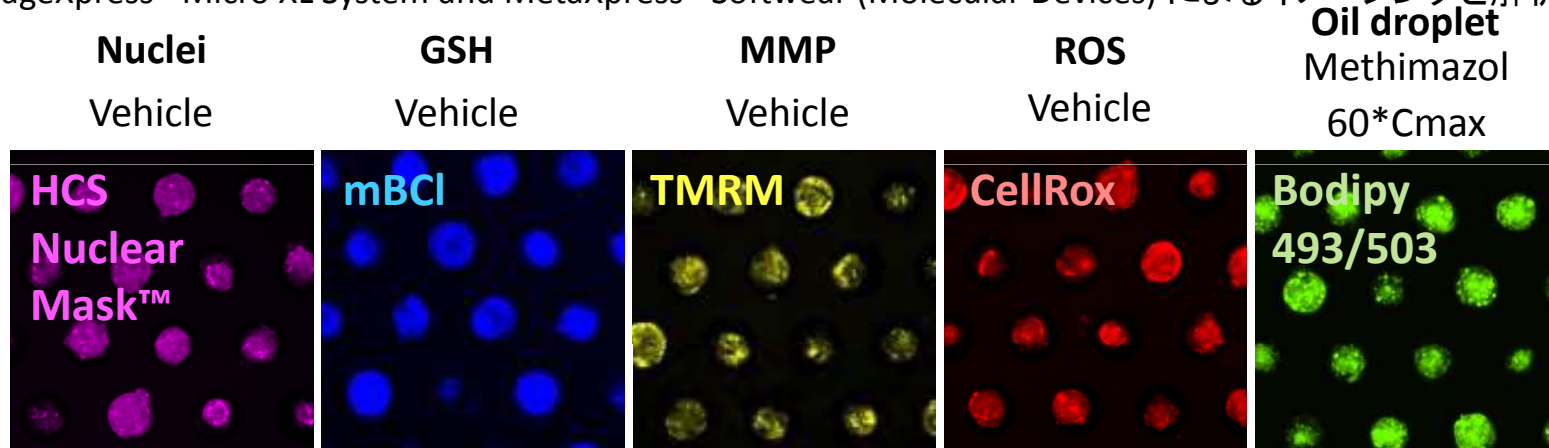


測定、解析

High Content Screening: **ImageXpress MICRO (Molecular Devices)**
384plate、5プローブ 約1時間

● 各バイオマーカーの蛍光染色イメージングと解析

ImageXpress® Micro XL System and MetaXpress® Softwear (Molecular Devices) によるイメージングと解析

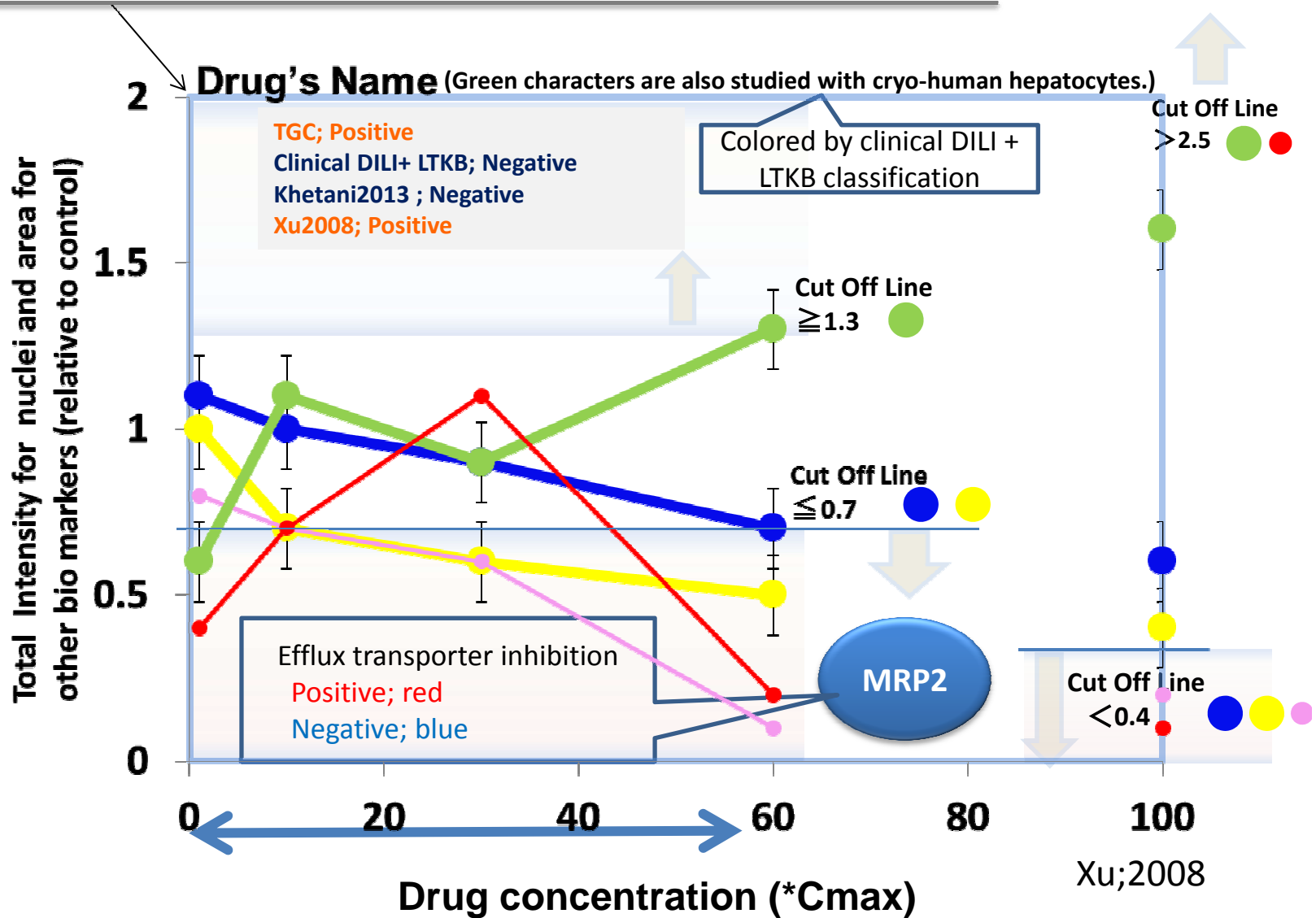


【 以下のグラフの読み方 】

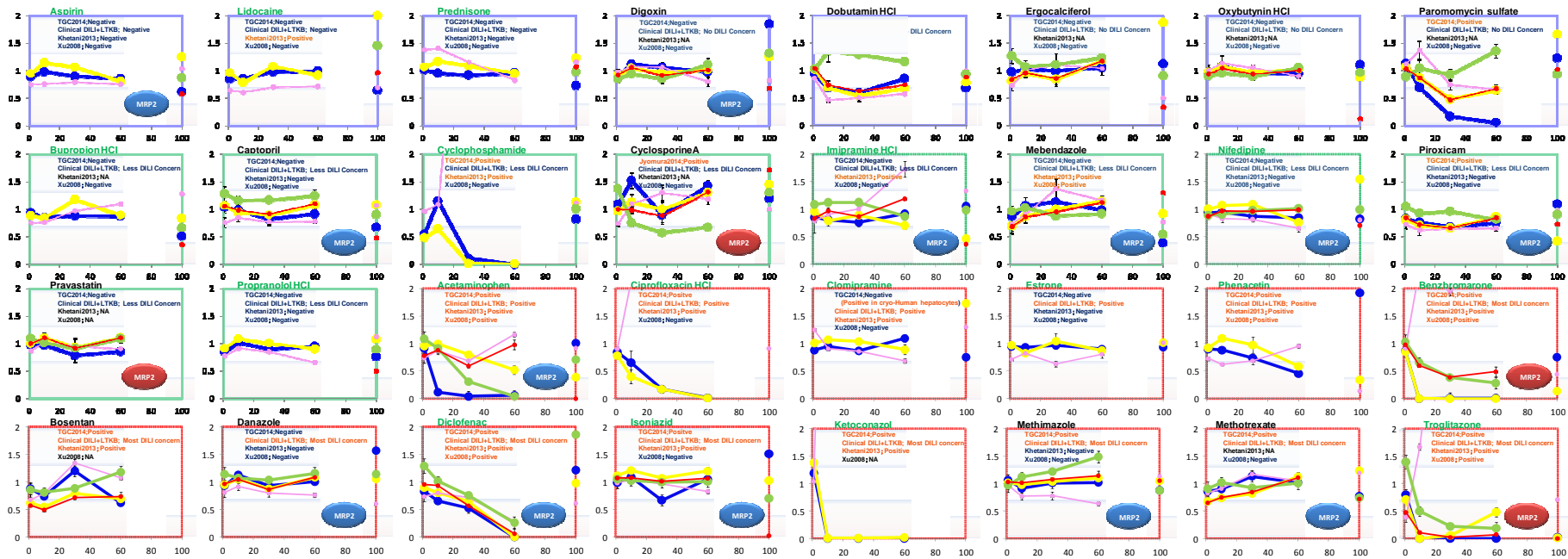
グラフの枠線の色の意味: 青: 完全陰性, 緑: 赤: 完全陽性

Note

- GSH
- MMP
- Oil droplet
- Nuclei
- ROS



解析結果



Classification LTKB+Clinical DILI: **No-DILI-concern, Negative**

	Classification LTKB+ Clinical DILI	PXB-cells™, 14-d, co-culture Cell-able®, 1-60x Cmax, Imaging		Human hepatocyte, 14-d, co-culture Cell-able®, 1-30x Cmax, Imaging		Xu, 2008, 24hrs, 100 × Cmax
Aspirin	Negative	Negative		Negative		Negative
Digoxin	No-DILI-concern	Negative		NT		Negative
Dobutamin	No-DILI-concern	Positive	GSH, MMP, Oil	NT		Negative
Ergocalciferol	No-DILI-concern	Negative		NT		Negative
Lidocaine	Negative	Negative		Negative		Negative
Oxybutynin	No-DILI-concern	Negative		NT		Negative
Paromomycin	No-DILI-concern	Positive	GSH, MMP, Oil	NT		Negative
Prednisone	Negative	Negative		Negative		Negative

NT: Not Tested



Classification LTKB+Clinical DILI: **Less-DILI-concern**

	PXB-cells™, 14-d, co-culture Cell-able®, 1-60x Cmax, Imaging		Human hepatocyte, 14-d, co-culture Cell-able®, 1-30x Cmax, Imaging		Xu, 2008, 24hrs, 100 × Cmax
Bupropion HCl	Negative		Negative		Negative
Captopril	Negative		NT		Negative
Cyclophosphamide	Positive	GSH, MMP	Positive	GSH, MMP	Negative
Cyclosporine	Positive	Oil	NT		Negative
Imipramine HCl	Negative		Negative		Negative
Mebendazole	Negative		NT		Positive
Nifedipine	Negative		Negative		Negative
Piroxicam	Positive	GSH, MMP	NT		Negative
Pravastatin	Negative		NT		NT
Propranolol HCl	Negative		Negative		Negative

NT: Not Tested



Classification LTKB+Clinical DILI: **Most DILI-concern**

	PXB-cells™, 14-d, co-culture Cell-able®, 1-60x Cmax, Imaging		Human hepatocyte, 14-d, co-culture Cell-able®, 1-30x Cmax, Imaging		Xu, 2008, 24hrs, 100 × Cmax
Acetaminophen	Positive	GSH, MMP	Positive	GSH, MMP	Positive
Benzbromarone	Positive	GSH, MMP	Positive	GSH, MMP	Positive
Bosentan	Positive	MMP	NT		NT
Ciprofloxacin HCl	Positive	GSH, MMP	Positive	GSH, MMP	Negative
Clomiplamine	Negative		Positive	GSH, MMP	Negative
Danazol	Negative		NT		Negative
Diclofenac Na	Positive	GSH, MMP	Positive	GSH, MMP	Positive
Estrone	Negative		Negative		Negative
Isoniazid	Positive	GSH	Positive	GSH, MMP	Negative
Ketoconazol	Positive	GSH, MMP	Positive	GSH, MMP	NT
Phenacetin	Positive	GSH, MMP	Positive	GSH, MMP	Positive
Methimazole	Positive	Oil	NT		Negative
Methotrexate	Positive	MMP	NT		Negative
Troglitazone	Positive	GSH,MMP,Oil	Positive	GSH, MMP	Positive

各試験結果とLTKB+Clinical DILIとの相関

		Cell-able® PXB-cells™		Cell-able® Primary		Xu, 2008	
		negative	positive	negative	positive	negative	positive
LTKB*+Clinical DILI	negative	6	2	3	0	8	0
	+/-	3	7	4	1	8	1
	positive	4	11	1	9	7	5

Table 1. Specificity and Sensitivity of each models

	Cell-able® PXB-cells™	Cryo-Human hepatocytes	Xu, 2008 Cryo-Human hepatocytes	Khetani, 2013 Cryo-Human hepatocytes
Specificity	75% (6/8)	100% (3/3)	100% (8/8)	67% (2/3)
Sensitivity	79% (11/14)	90% (9/10)	42% (5/12)	77% (10/13)

References

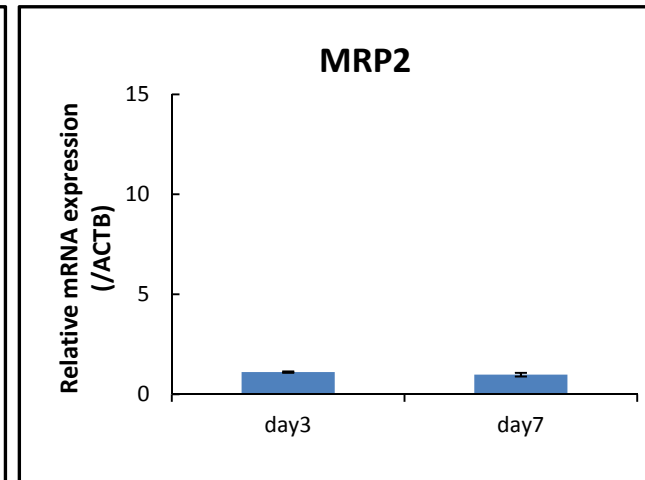
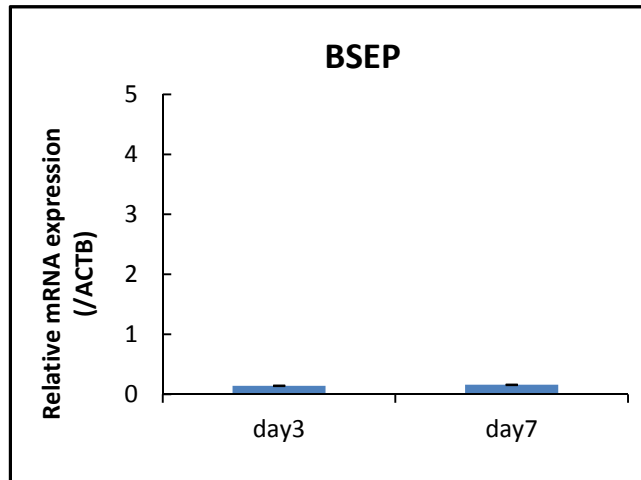
- 1) Xu et al., *Toxicological Sciences* 105, 97-105 (2008)
- 2) Khetani et al., *Toxicological Sciences* 132, 107-117 (2013)
- 3) Chen et al., *Drug Discovery Today* 16, 697-703 (2011)



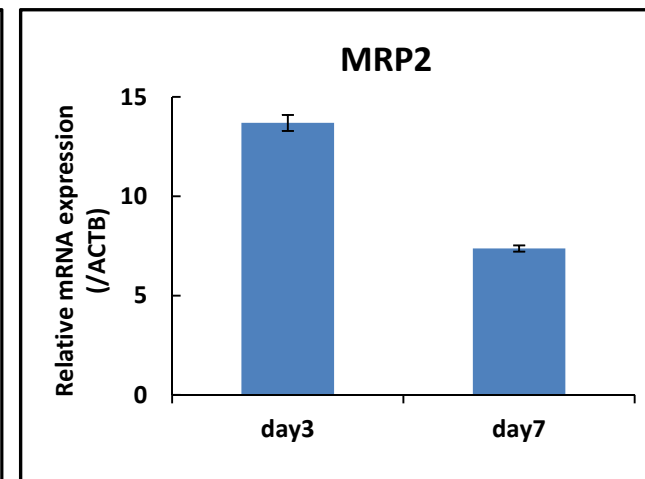
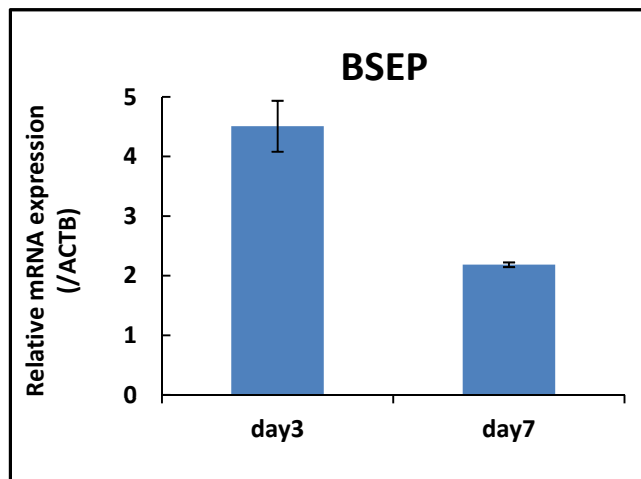
PXB-cells™ MRP2, BSEP Transporter 遺伝子発現 比較

2D vs Cell-able®

2D Culture



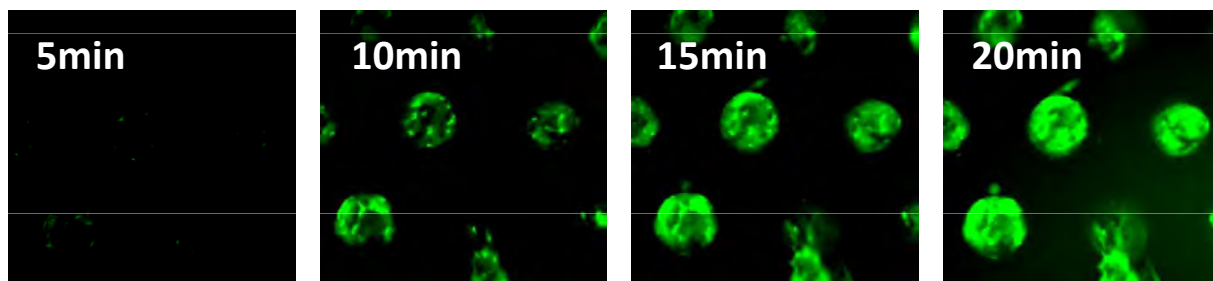
Cell-able Culture



排泄トランスポーター阻害試験

試験した17薬物のうち、Cyclosporine A, Pravastatin, Benzbromarone, TroglitazoneでCDF排泄の阻害が確認された。

Time-lapse images of vehicle (0.1% DMSO)



Drug concentration

1*Cmax

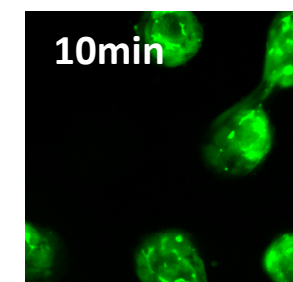
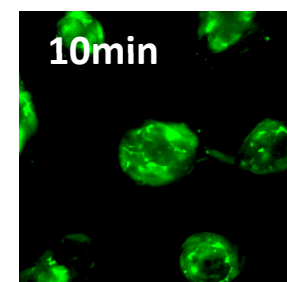
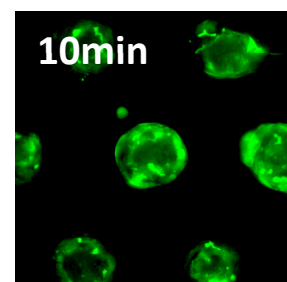
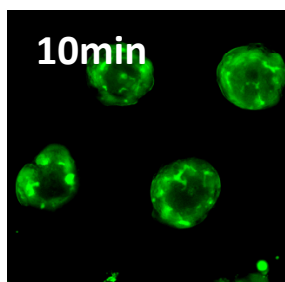
10*Cmax

30*Cmax

60*Cmax

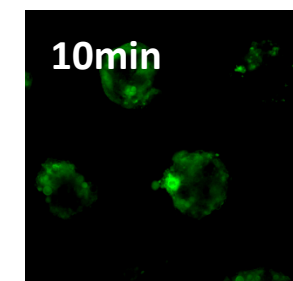
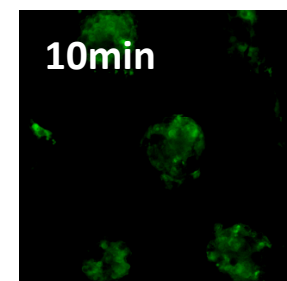
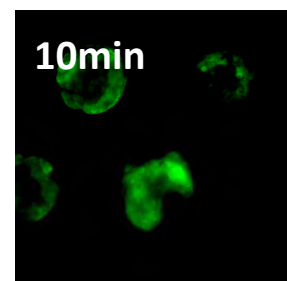
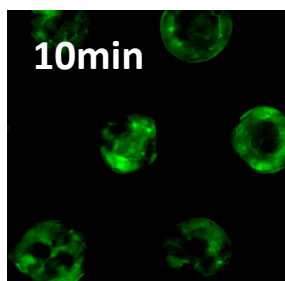
MRP2

Aspirin



MRP2

CyclosporinA



【MRP2活性確認】

上段：培地を除去したウェルにCDFDA溶液を添加し、CDFがMRP2によって微小胆管へ排泄されて蓄積する様子を観察。

下段：細胞をAspirin又はCyclosporin Aで処置した後CDFDAを添加し、10分後の写真。

1) Cell-Able®の製品特性

2) 肝細胞研究

2-1) 肝細胞の薬物動態分野でのアプリケーション

2-2) 肝毒性 //

2-3) 肝炎研究

3) 抗がん剤研究

抗がん剤研究でのアプリケーション(HCS: High Content Screening)

4) 幹細胞研究



Cell-able[®]を用いた肝代謝・毒性評価まとめ

- I. 一般的な培養と同じようにプレートに細胞を播種するだけで、初代培養肝細胞(接着型, 非接着型)のスフェロイドが簡単に形成される
- II. 形成されるスフェロイドサイズはほぼ均一であるため、良好な試験再現性が得られる
 - i) 多数のスフェロイドによって、平均化されるため測定値のウェル間差が小さい
 - ii) 肝臓の代謝物量の定量測定の場合、培養上澄中の代謝物の量が多い
- III. ヒト凍結肝細胞を使った実験では、単層培養と比べて、播種数が1/2.5 程度であるので、実験コストを低減できる。
- IV. 初代肝細胞培養には、専用の培地(RM-101)があり、長期培養が可能である

HBV感染モデル

東京都医学総合研究所 感染制御プロジェクトPL 小原道則先生

Cell-able®上で、ヒト化肝臓を持つキメラマウスより採取したヒト新鮮肝細胞(PXB-cells™)を3D培養し、HVB感染のモデル系を確立した。



別資料

Appendix 1

Use of Low Attaching Hepatocytes Experimental Design

from Drs. Yamada & Enosawa in 24th JSSX, Kyoto, 2009

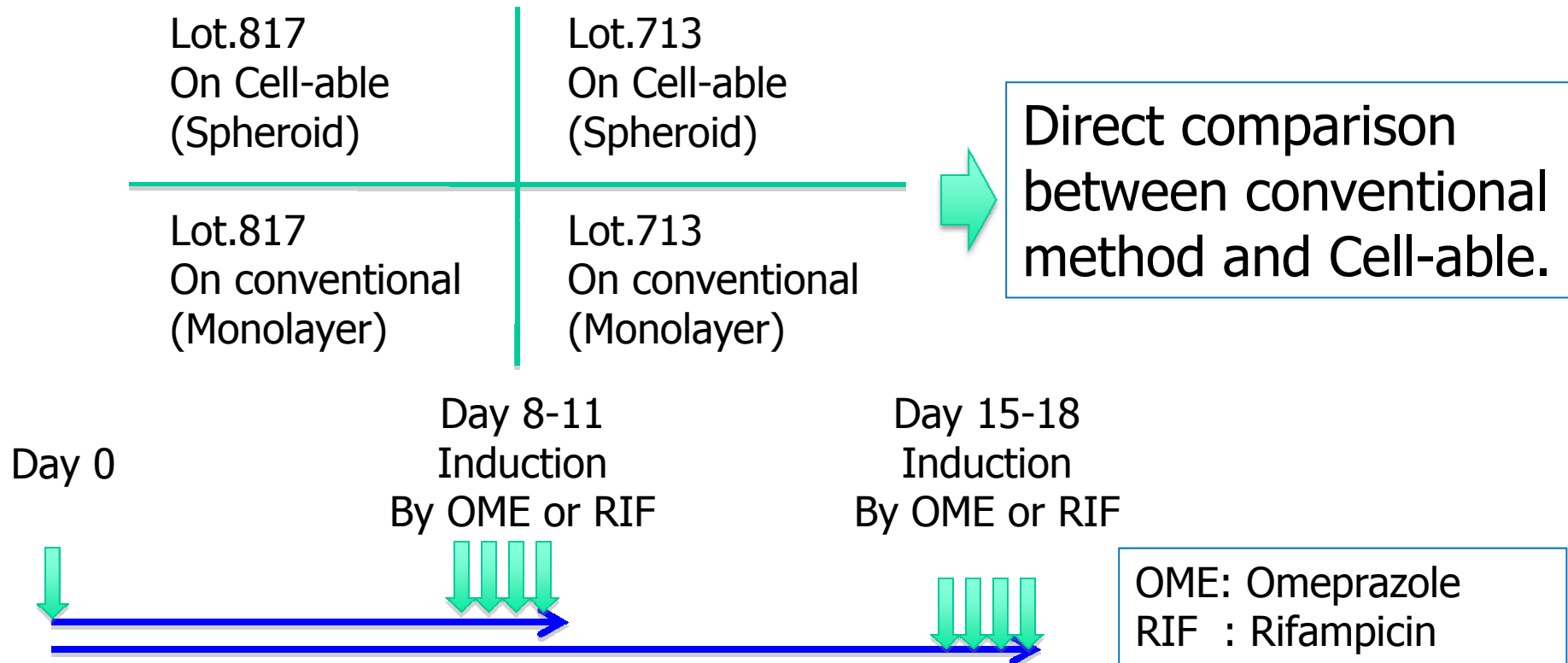
Use of Low Attaching Hepatocytes

Experimental Design from Drs. Yamada & Enosawa in 24th JSSX, Kyoto, 20

Hepatocytes;

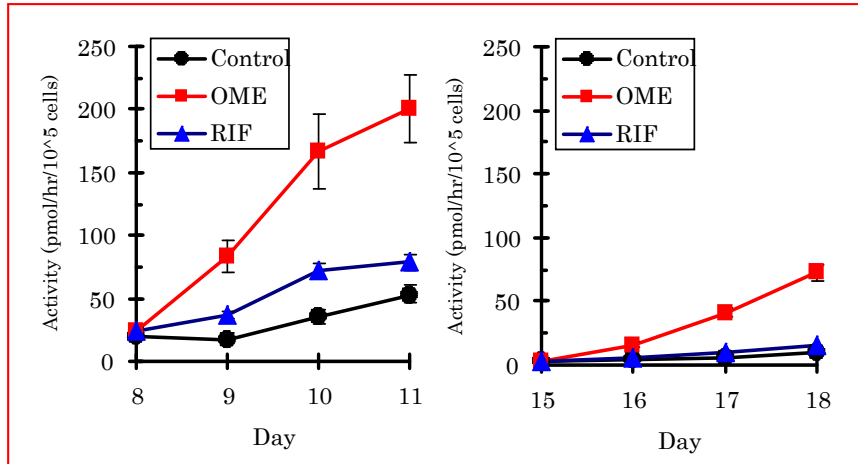
Lot 817, for primary culture from XENOTECH (Attaching lot)

Lot 713, for suspension culture from XENOTECH (Low-attaching lot)

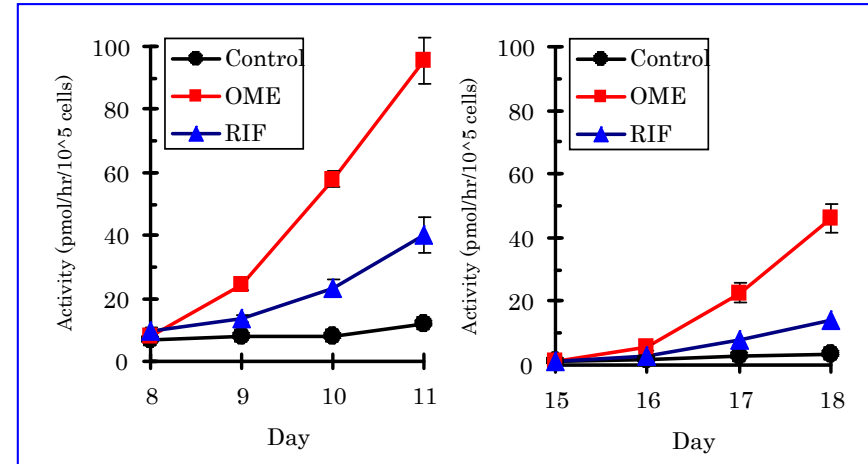


CYP1A2 Activity from Drs. Yamada & Enosawa in 24th JSSX, Kyoto, 2009

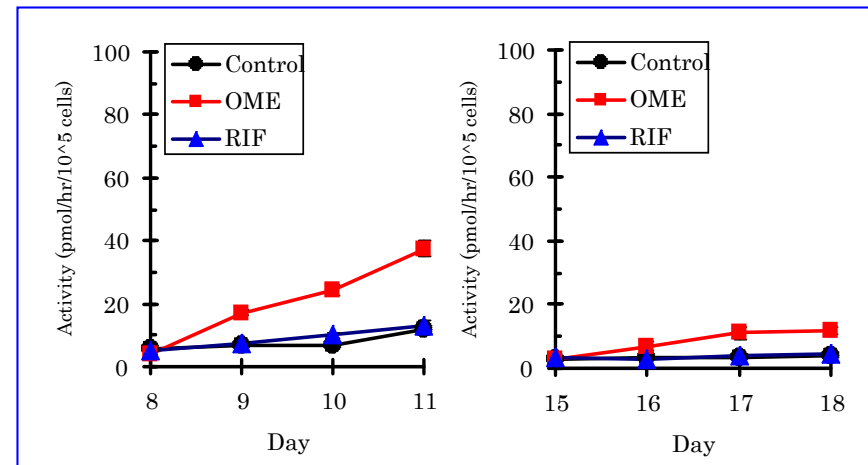
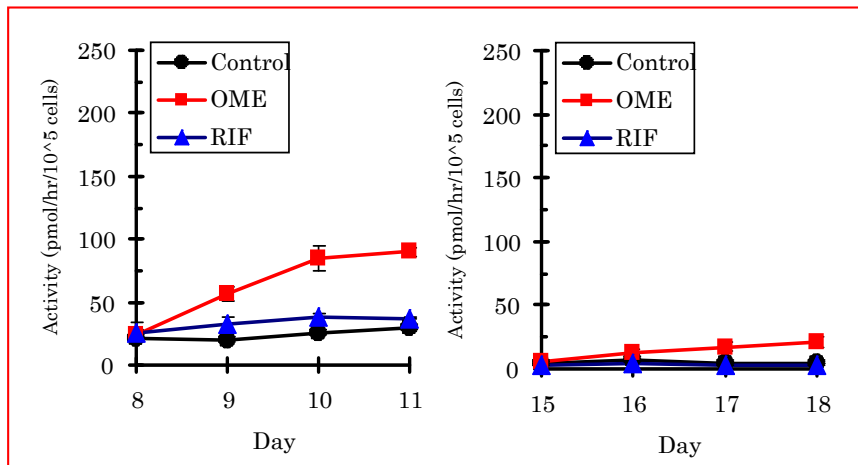
Lot 817 in Cell-able, Spheroid (Attaching)



Lot 713 in Cell-able, Spheroid (Low-attaching)

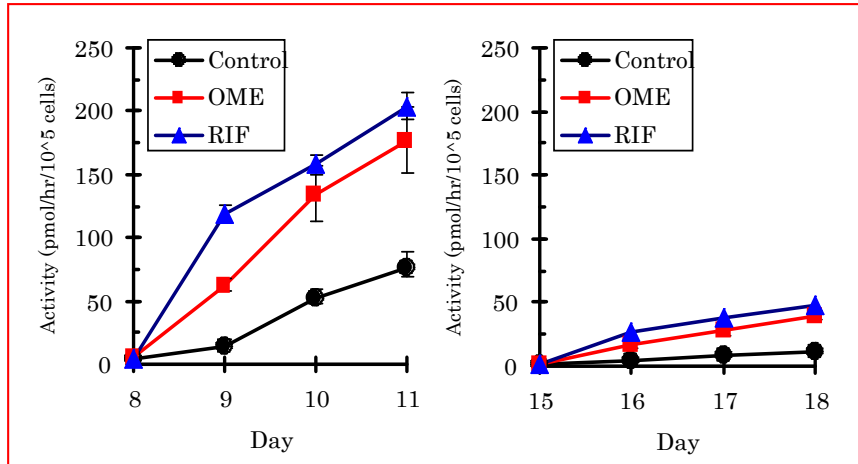


Lot 817 in conventional, Monolayer (Attaching) Lot 713 in conventional, Monolayer (Low-attaching)

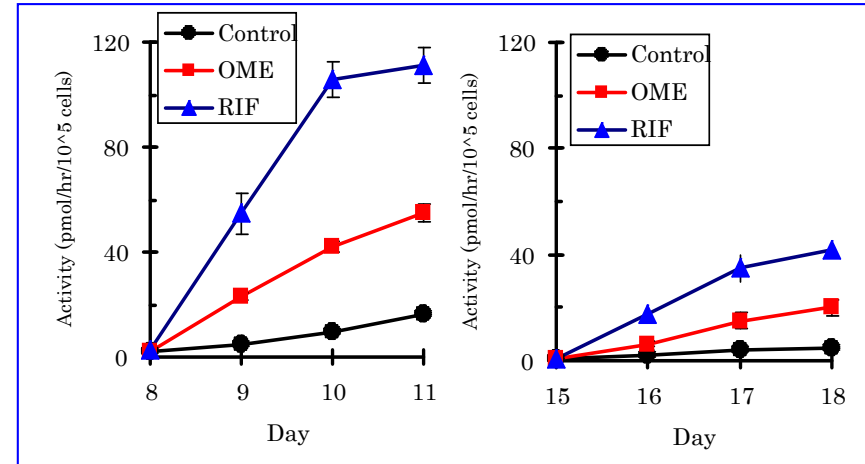


CYP2B6 Activity from Drs. Yamada & Enosawa in 24th JSSX, Kyoto, 2009

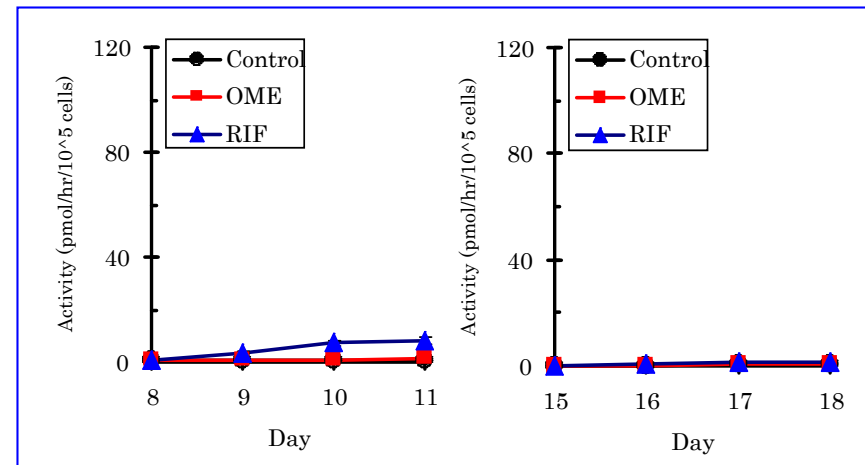
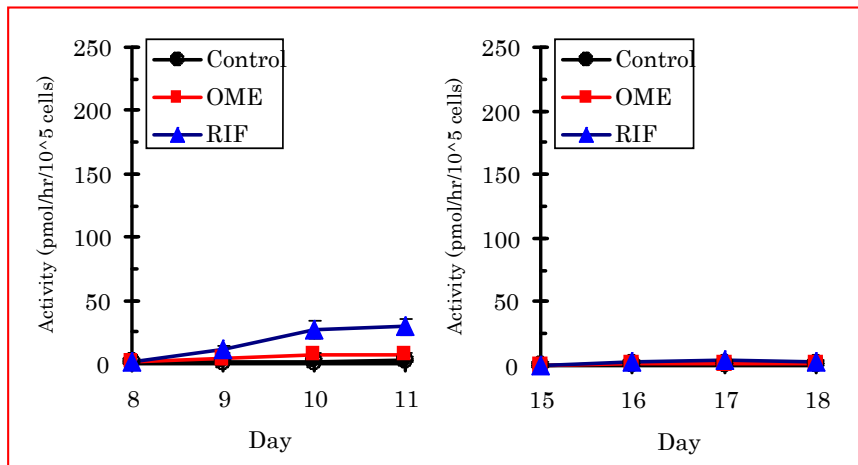
Lot 817 in Cell-able, Spheroid (Attaching)



Lot 713 in Cell-able, Spheroid (Low-attaching)

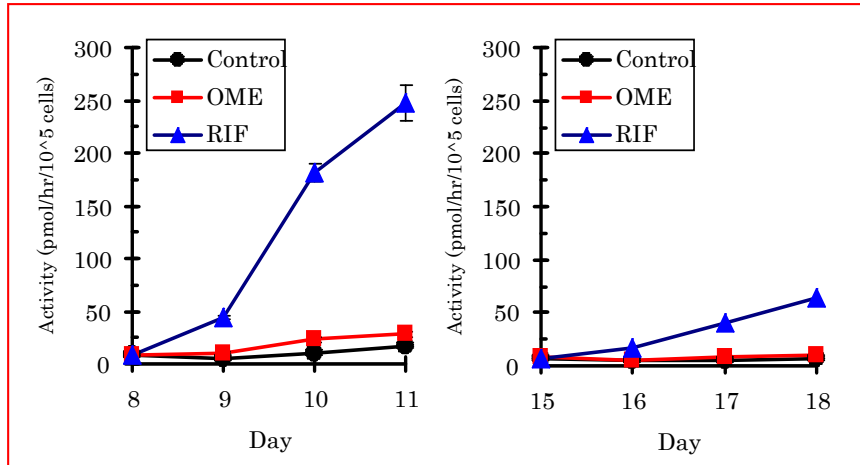


Lot 817 in conventional, Monolayer (Attaching) Lot 713 in conventional, Monolayer (Low-attaching)

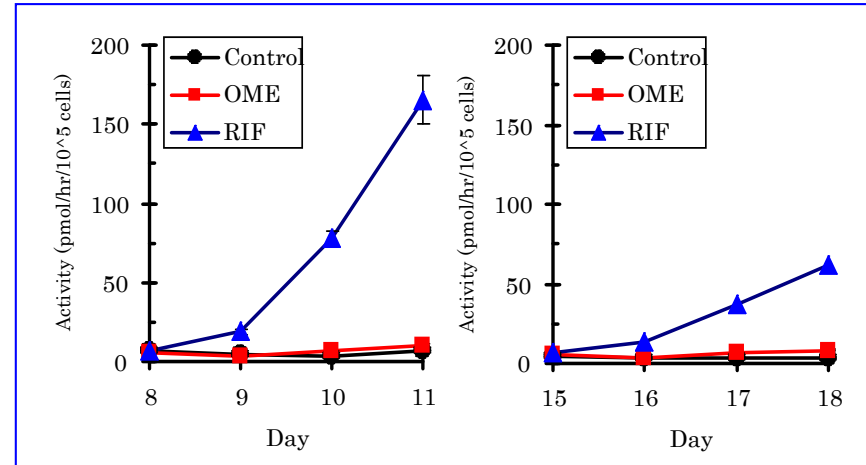


CYP3A Activity from Drs. Yamada & Enosawa in 24th JSSX, Kyoto, 2009

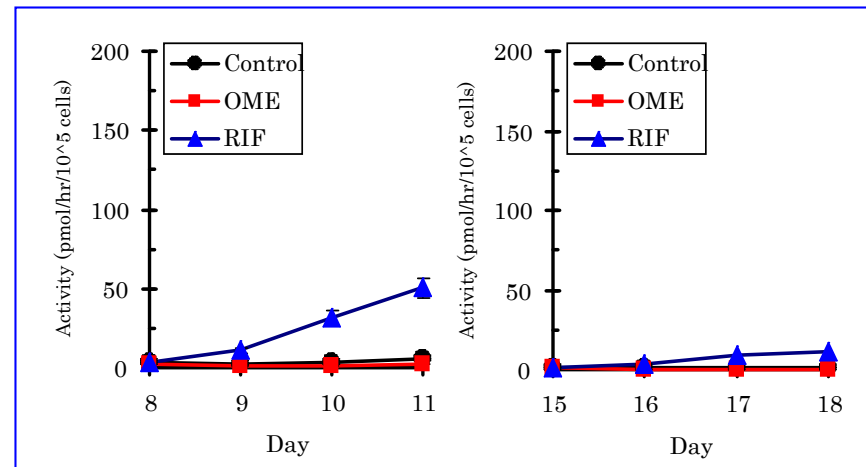
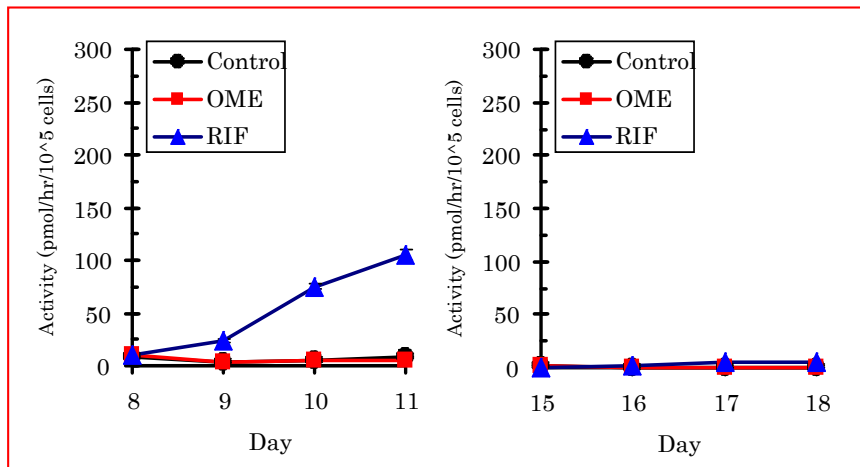
Lot 817 in Cell-able , Spheroid (Attaching)



Lot 713 in Cell-able, Spheroid (Low-attaching)



Lot 817 in conventional, Monolayer (Attaching) Lot 713 in conventional , Monolayer (Low-attaching)



Appendix 2

Benefit of Pooled Human Hepatocytes on Cell-able[®] Experimental Design

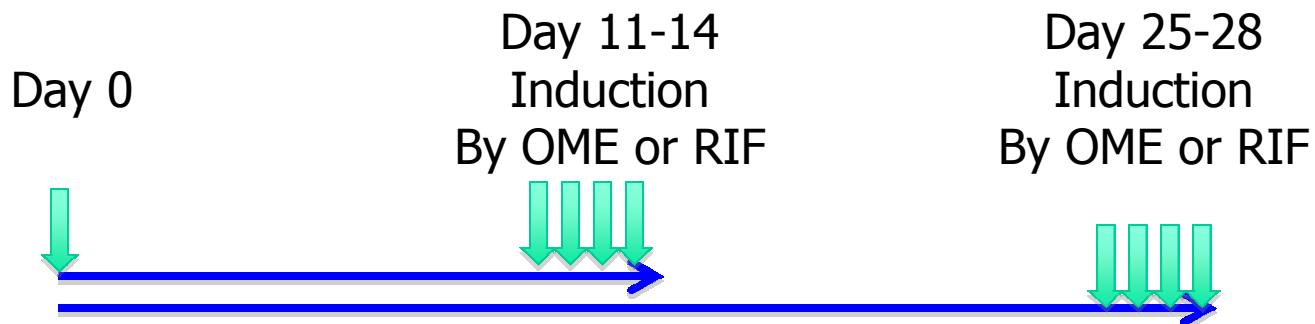
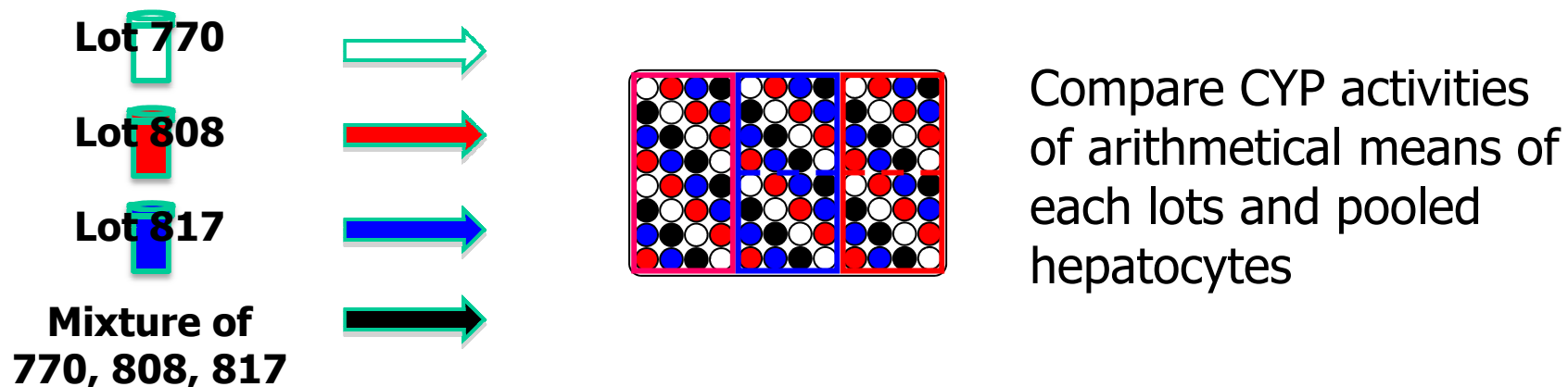
from Drs. Yamada & Enosawa in 24th JSSX, Kyoto, 2009

Benefit of Pooled Human Hepatocytes on Cell-able Experimental Design

from Drs. Yamada & Enosawa in 24th JSSX, Kyoto, 2009

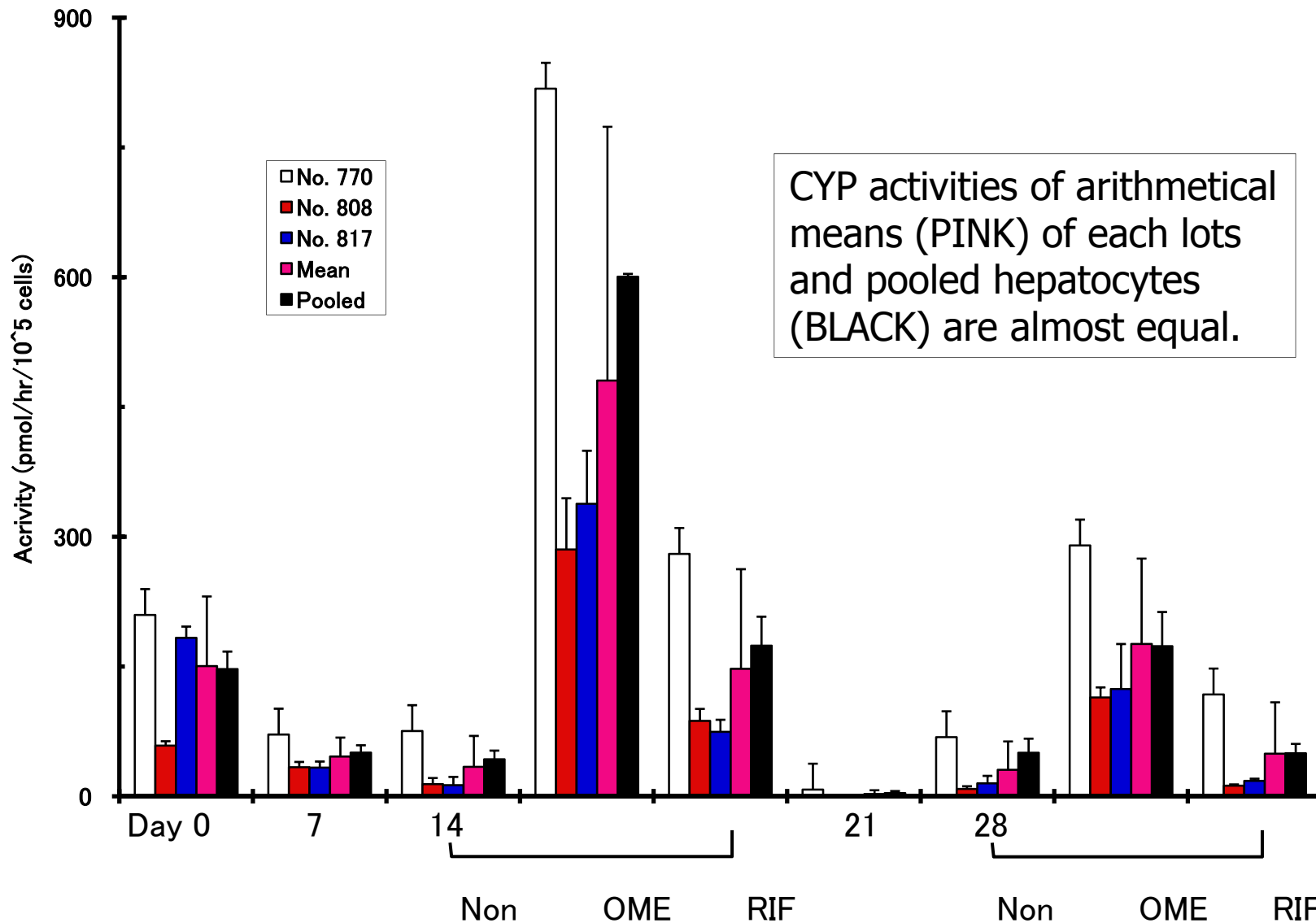
Hepatocytes;

Lot 770, 808, 817, for primary culture from XENOTECH



CYP1A2 Activity from Drs. Yamada & Enosawa in 24th JSSX, Kyoto, 2009

CYP1A2 Activity

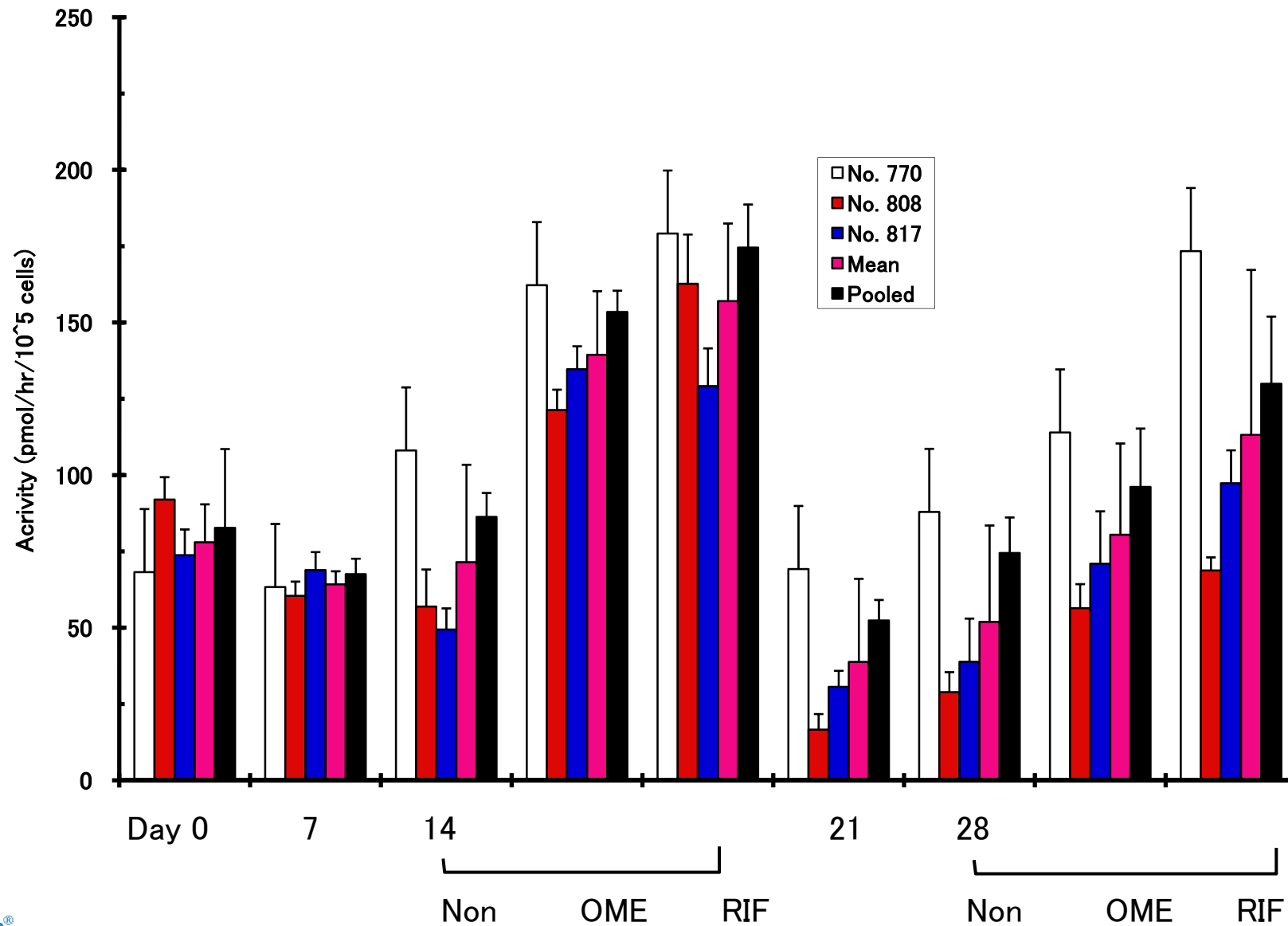


CYP activities of arithmetical means (PINK) of each lots and pooled hepatocytes (BLACK) are almost equal.



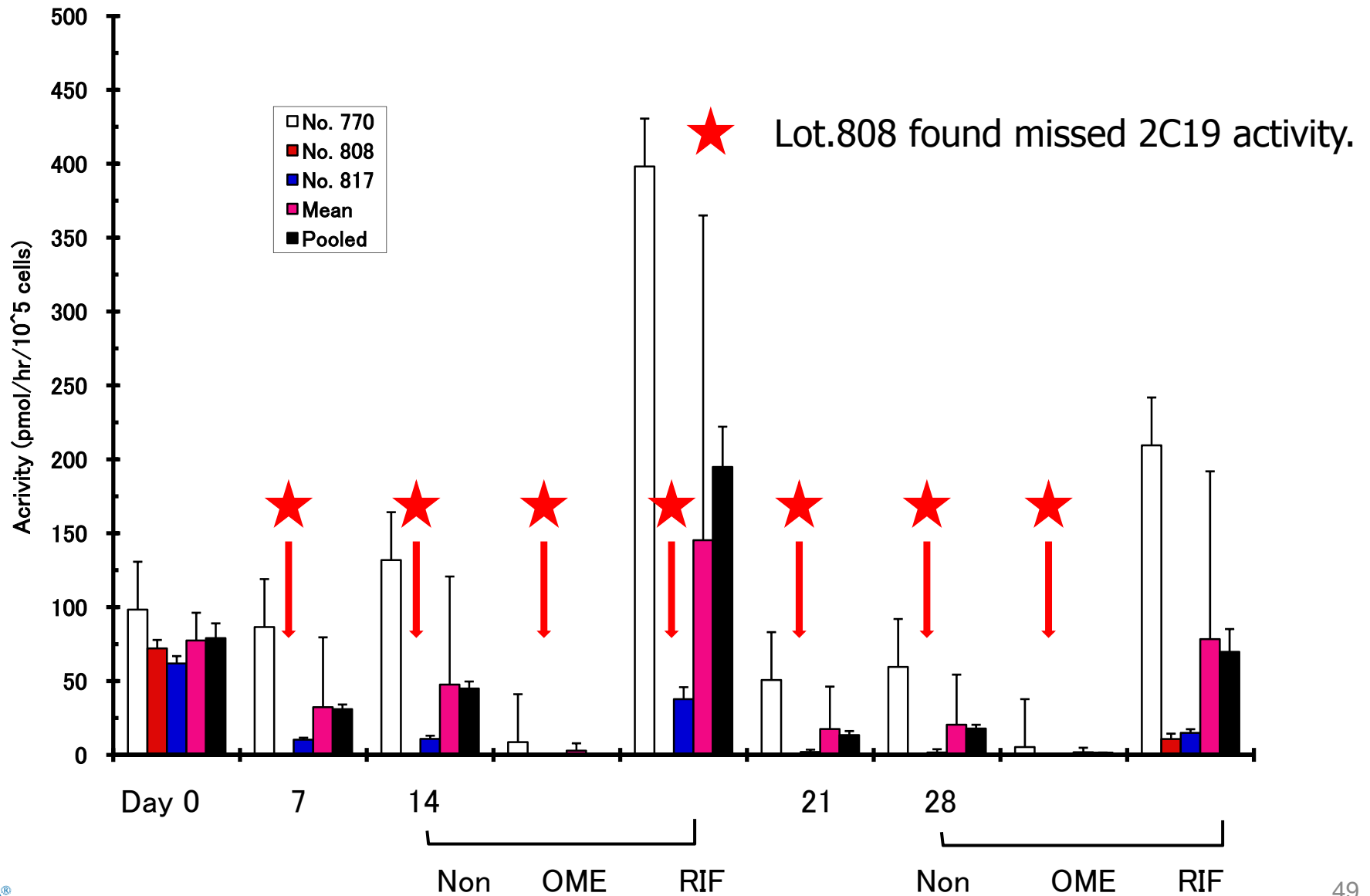
CYP2C9 Activity from Drs. Yamada & Enosawa in 24th JSSX, Kyoto, 2009

CYP2C9 Activity



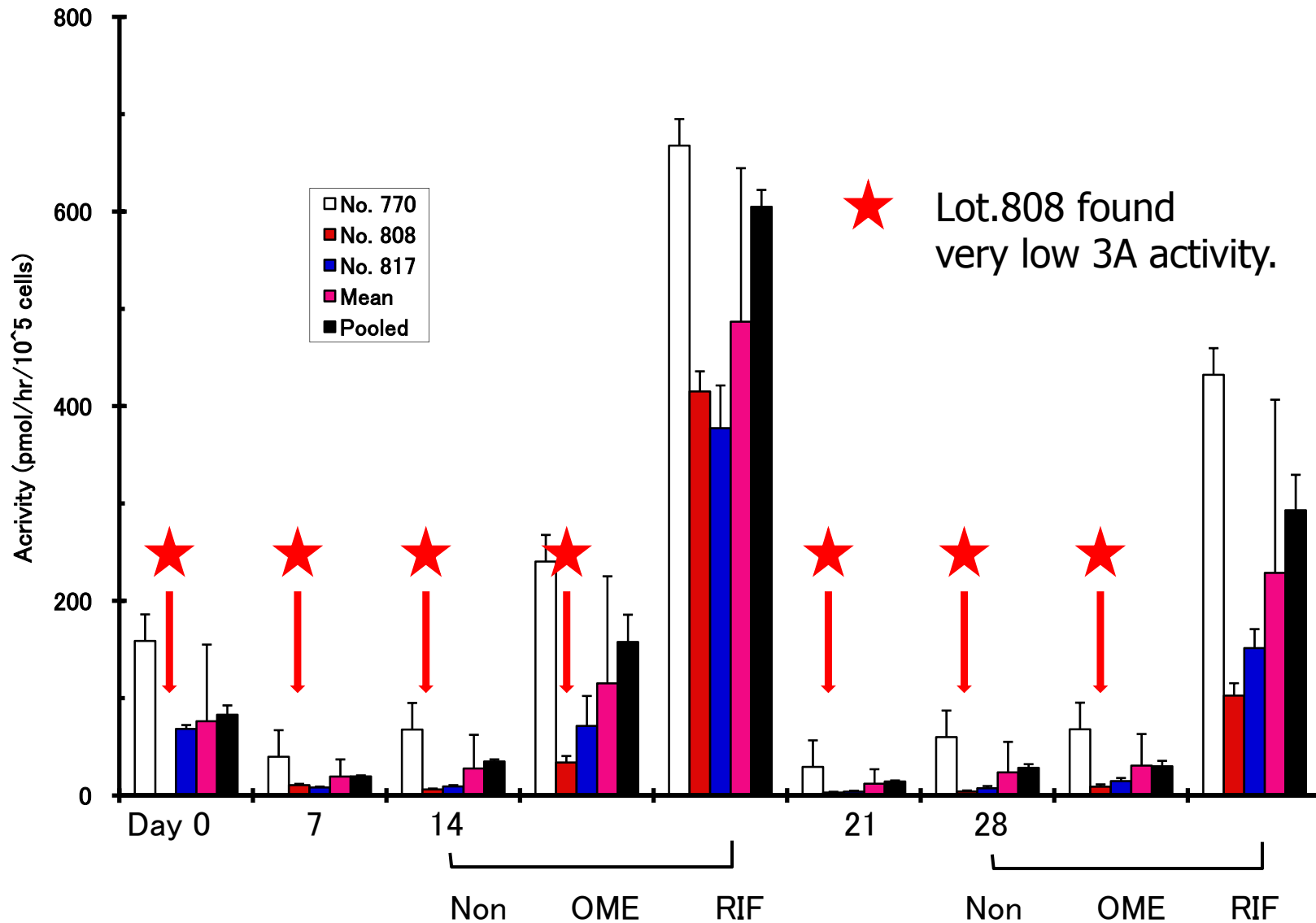
CYP2C19 Activity from Drs. Yamada & Enosawa in 24th JSSX, Kyoto, 2009

CYP2C19 Activity



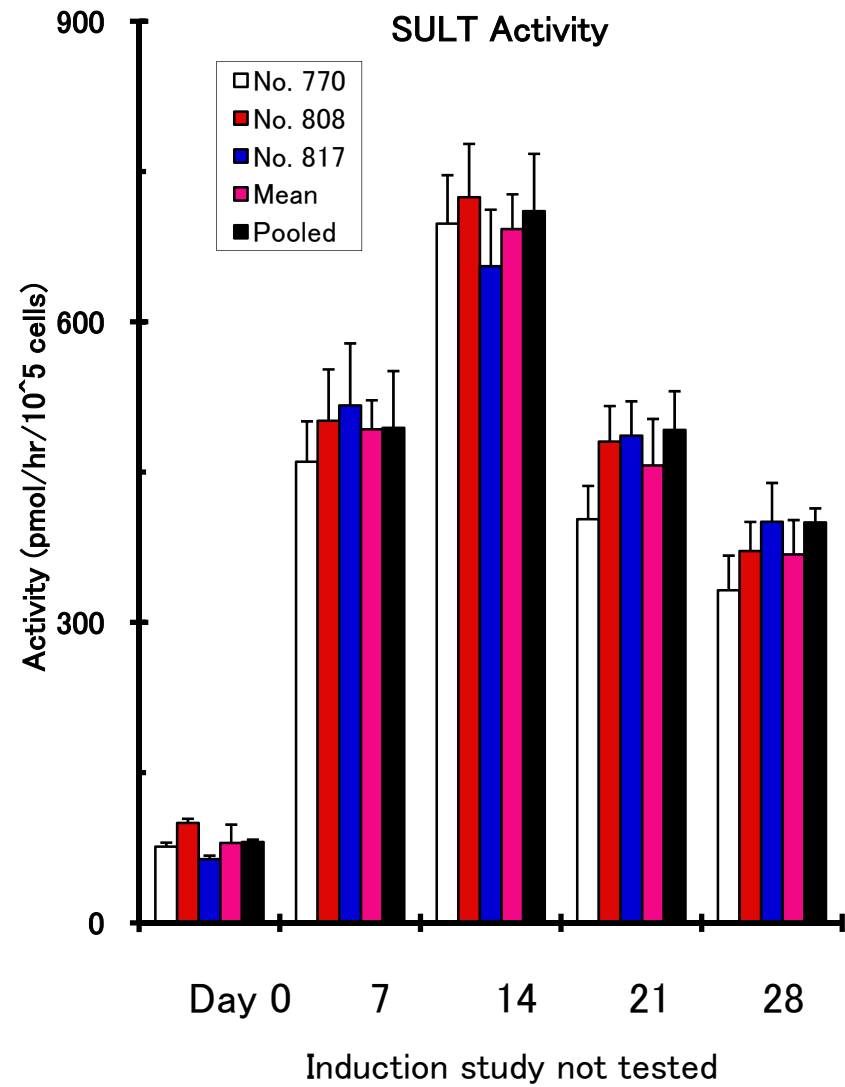
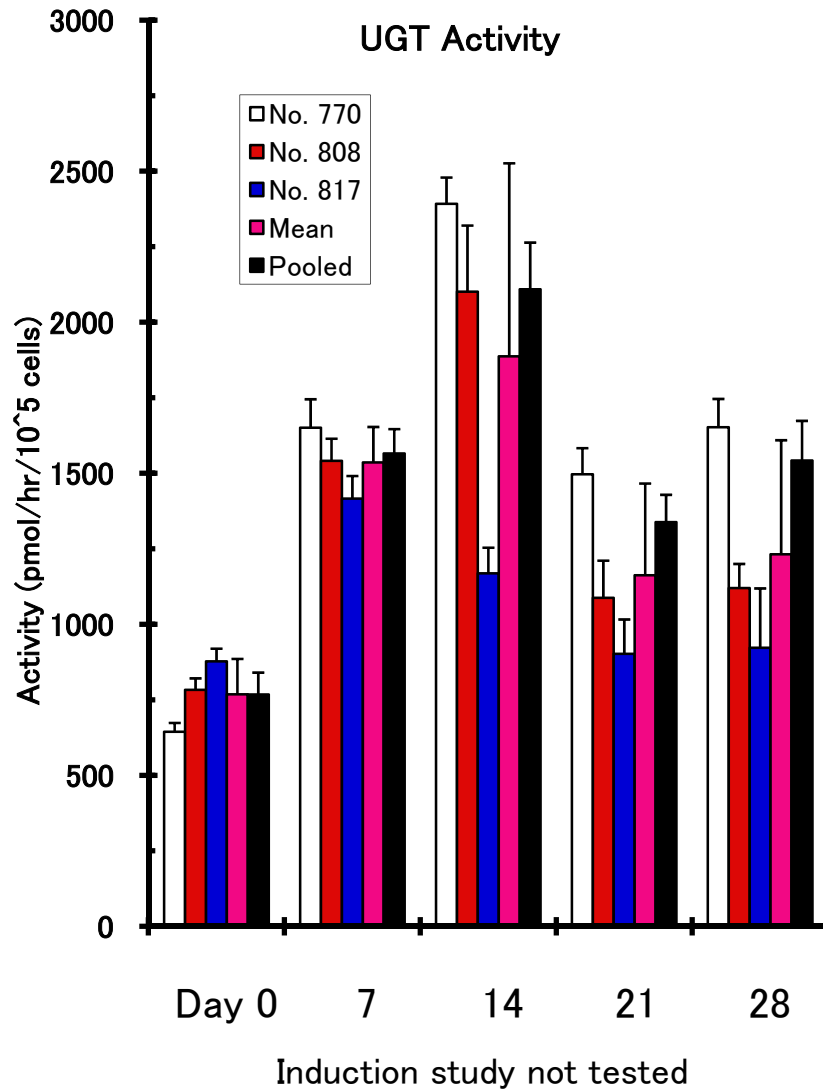
CYP3A Activity from Drs. Yamada & Enosawa in 24th JSSX, Kyoto, 2009

CYP3A Activity



Phase II Enzyme Activities

from Drs. Yamada & Enosawa in 24th JSSX, Kyoto, 2009



Appendix 3

Cell-able[®]培養でのコストメリット (参考試算)



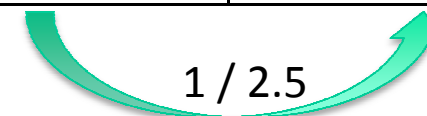
コスト比較表 単層培養vs Cell-able®

	単層培養	Cell-able®
プレート単価 (円/枚)	¥1,000	¥28,000
細胞+プレート代 (円/枚) [接着型ロット]	¥161,000	¥92,000
細胞+プレート代 (円/枚) [非接着型ロット]	-	¥60,000

5×10⁶ cells/本として

接着型ロット (円/本)	¥160,000
非接着型ロット (円/本)	¥80,000

	単層培養	Cell-able®
凍結肝細胞播種密度 (cells/well)	50,000	20,000



目次

1) Cell-Able[®]の特性・用途・特長

2) 肝細胞研究

2-1) 薬物動態でのアプリケーション

2-2) 肝毒性でのアプリケーション

2-3) 肝炎研究でのアプリケーション

3) 心毒性評価研究

4) 抗がん剤研究

抗がん剤研究でのアプリケーション(HCS: High Content Screening)

5) 幹細胞研究



● 第43回 日本毒性学会学術年会(2016)

ヒトiPS心筋を用いたマルチスフェロイドCaイメージングによる化合物催不整脈性HTS評価システム
長倉 廷¹, 松原 孝宜², 澤田 光平¹

1) エーザイ株式会社 筑波研究所 グローバル CV 評価部, 2) 横河電機株式会社 ライフサイエンスセンター

● 第43回 日本毒性学会学術年会(2016)

ヒトiPS由来心筋細胞を用いたマルチスフェロイドイメージング解析による抗がん剤の心毒性評価に関する検討

Evaluation study of cardiotoxicity of anti-cancer drugs using multi-spheroid imaging analysis of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte

近藤卓也, 一ツ町裕子, 一ツ町知明, 蟹江尚平, 平野隆之, 森田文雄, 箱井加津雄,
大鵬薬品工業株式会社

Takuya KONDO, Hiroko HITOTSUMACHI, Tomoaki HITOTSUMACHI, Shohei KANIE,
Takayuki HIRANO, Fumio MORITA, Kazuo HAKOI, Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.

● 15th World Preclinical Congress 2016

Multi-Spheroid Imaging Analysis of Human iPS Cell-Derived Cardiomyocyte as a Assessment Model for the Acute Effects of Cardiotoxicity of Anti-Cancer Drugs

Takuya, Kondo, Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.

● (財)バイオインダストリー協会“未来へのバイオ技術”勉強会(2016)

「ハイコンテンツアナリシス(HCA)技術の進化」iCell心筋細胞を用いたマルチスフェロイドイメージング解析による新たな心毒性評価法の開発」

長倉 廷 (エーザイ(株) バイオフィーマシューティカル・アセスメント機能ユニット グローバルCV評価部)



● 第6回 学術年会 日本安全性薬理研究会 (2015)

Multi-spheroid imaging analysis of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte by Cellvoyager CV7000 system for the assessment of in vitro cardiotoxicity
Tadashi NAGAKURA¹⁾, Takayoshi MATSUBARA²⁾, Ko ZUSHIDA³⁾ and Kohei SAWADA¹⁾

1) Global CV Assessment Unit, Tsukuba Research Laboratory, Eisai Co., Ltd., 2) Engineering Team, Life Science Business HQ, Yokogawa Electric corporation, 3) Product Development & Operations, iPS Portal, Inc.

● 第42回 日本毒性学会学術年会(2015)

ヒトiPS由来心筋細胞を用いたマルチスフェロイドイメージング解析の in vitro心毒性評価系としての最適化検討

長倉 延¹⁾, 松原 孝宜²⁾, 圖子田 康³⁾, 澤田 光平¹⁾

1) エーザイ株式会社 筑波研究所 グローバル CV 評価部, 2) 横河電機株式会社 ライフサイエンスセンター 営業部 営業技術課, 3) 株式会社 iPS ポータル プロダクト開発事業部

● Cellular Dynamics International, iForum 2015

A Novel Method for the Assessment of Cardiotoxicity by Multi-spheroid Imaging Analysis of Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes

Kohei Sawada, PhD, Eisai Co., Ltd.

目次

1) Cell-Able®の特性・用途・特長

2) 肝細胞研究

2-1) 薬物動態でのアプリケーション

2-2) 肝毒性でのアプリケーション

2-3) 肝炎研究でのアプリケーション

3) 心毒性評価研究

4) 抗がん剤研究

抗がん剤研究でのアプリケーション(HCS: High Content Screening)

5) 幹細胞研究

抗がん剤研究でのアプリケーション (HCS: High Content Screening)

4-1) 抗がん剤研究 参考資料

4-2) Cell-able®を用いたHCSの実施例

4-2-1) モレキュラーデバイス株式会社共同データ

PTX曝露により誘導されるアポトシスとネクロシスの同時 継時的画像解析

4-2-2) ユーロフィンパンラボ共同データ

144種類のがん細胞株(Oncopanel) 3D培養を使った受託試験を開始。

<https://www.eurofinspanlabs.com/Marketing/Microsite/cancer-cell-lines-screening/what-is-oncopanel.html>

4-2-3) モレキュラーレスポンス共同データ

凍結保存された初代がん細胞を用いたアプリケーション (2012年AACRでポスター発表):

凍結がん細胞バンクであるモレキュラーレスポンス(米国)では、肝、頭頸部、乳がん、肺がんなどの初代がん細胞で、Cell-able®上でスフェロイド培養が可能であった。

Appendix (社内データ):

Cell-able上で患者由来の初代 卵巣がん細胞(data not shown)、子宮体がん細胞の3次元培養が可能であった(Appendix)。白血病細胞株3株でスフェロイドを形成し培養可能であった(Appendix)。

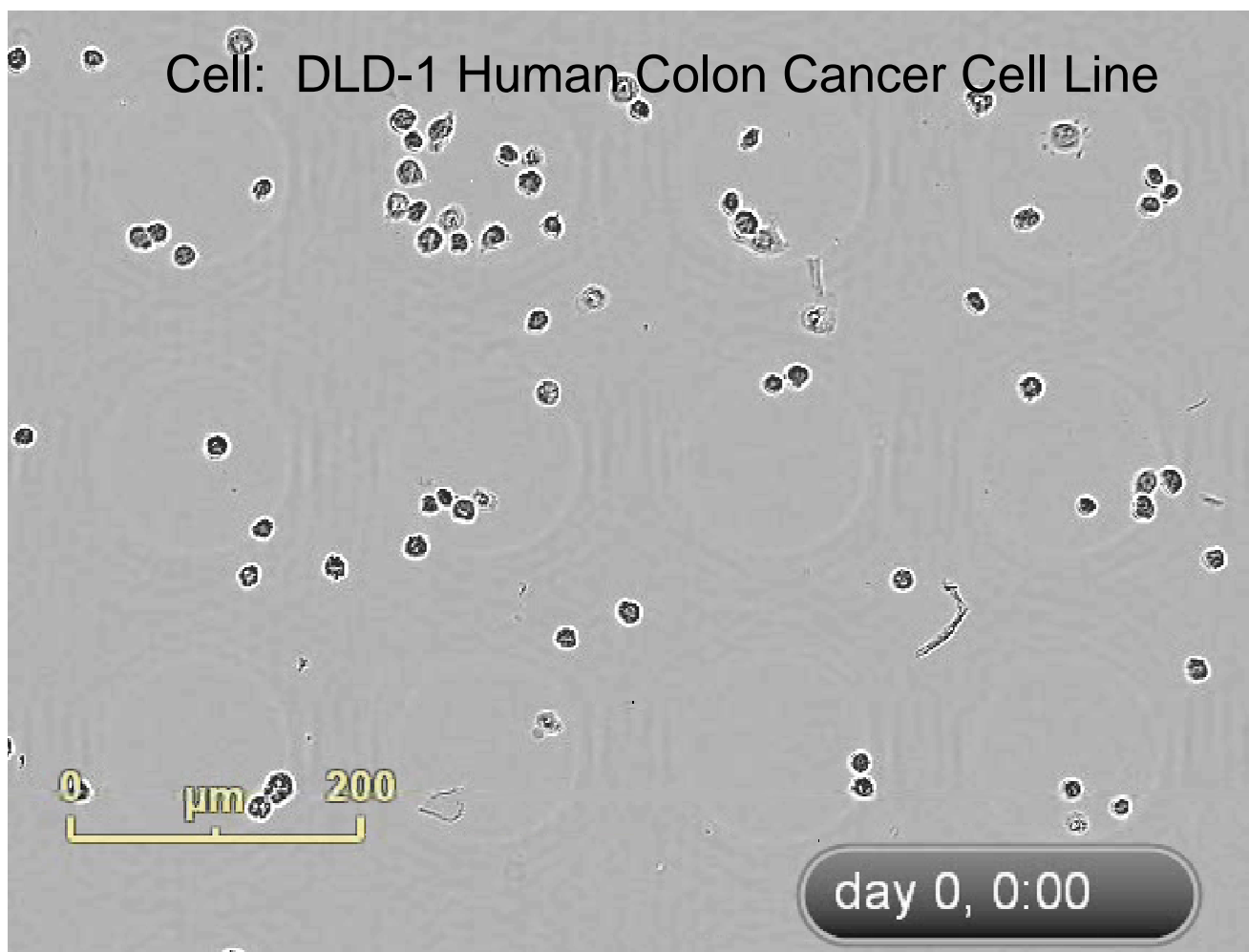
4-3)がん幹細胞 に関するアプリケーション



4-4) 線維芽細胞との共培養

4-1) 抗がん剤研究 参考資料

Cell-able®プレート上で形成されるがん細胞スフェロイド
播種直後から培養5日目までのタイムラプス

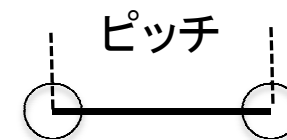


モレキュラーデバイス株式会社 ImageXpressで撮影



©2015 Toyo Gosei Co., Ltd.

サイズコントロールが可能な3次元培養プレートCell-able®

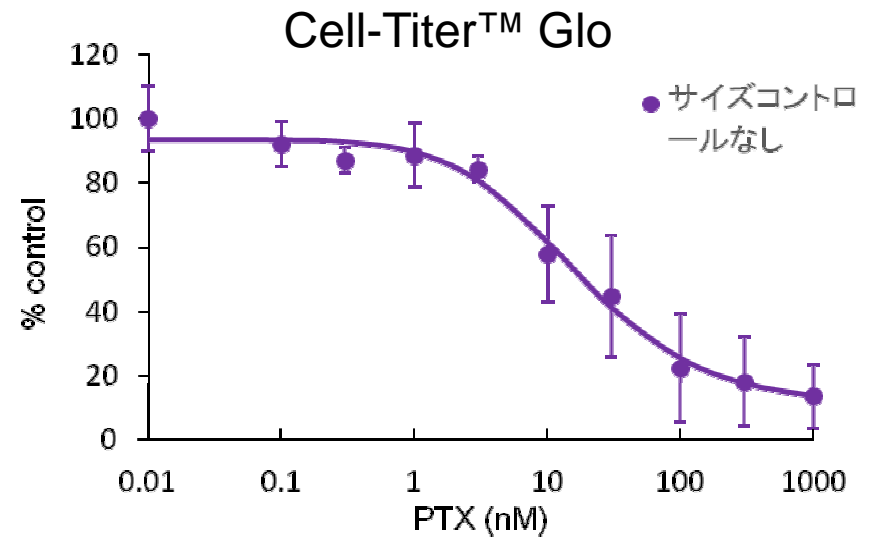
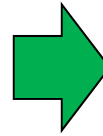
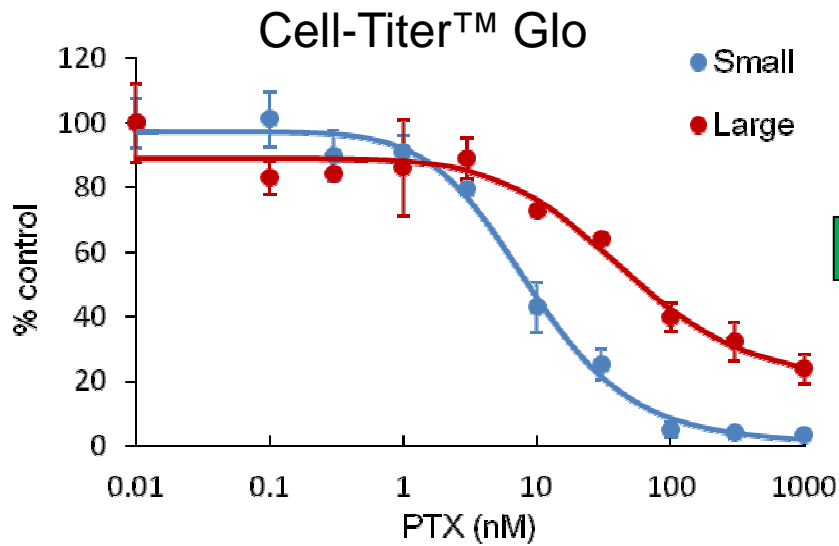
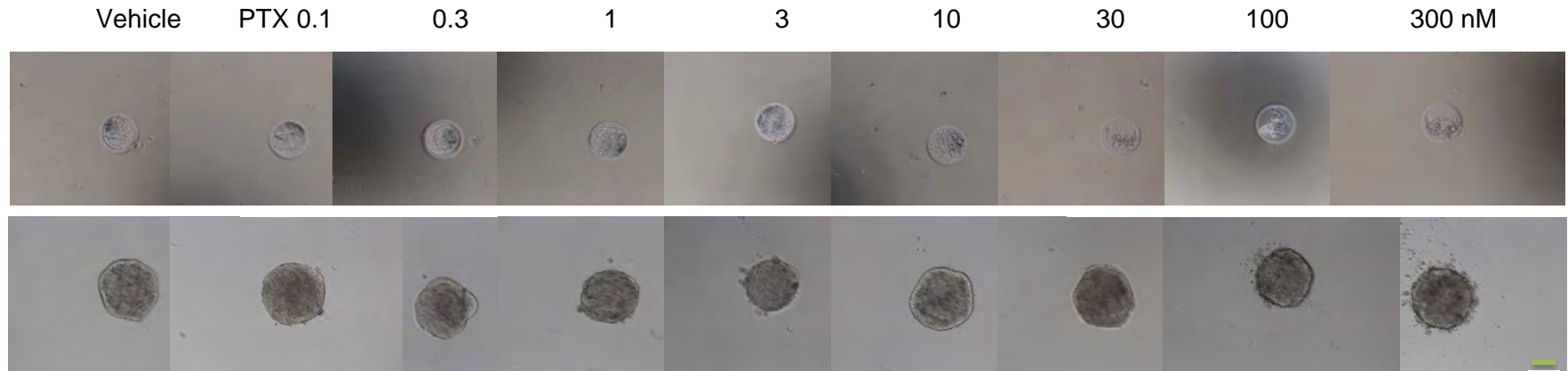


ピッチ (μm)	200	360	800
細胞 DLD-1			
スフェロイド数 384プレート	200	60	13 (/well)
スフェロイドサイズ (μm)	100	160	250

培養開始後5日のスフェロイドサイズ

ピッチサイズを大きくすれば、大きなスフェロイドも作製可能

スフェロイドのサイズと薬物感受性

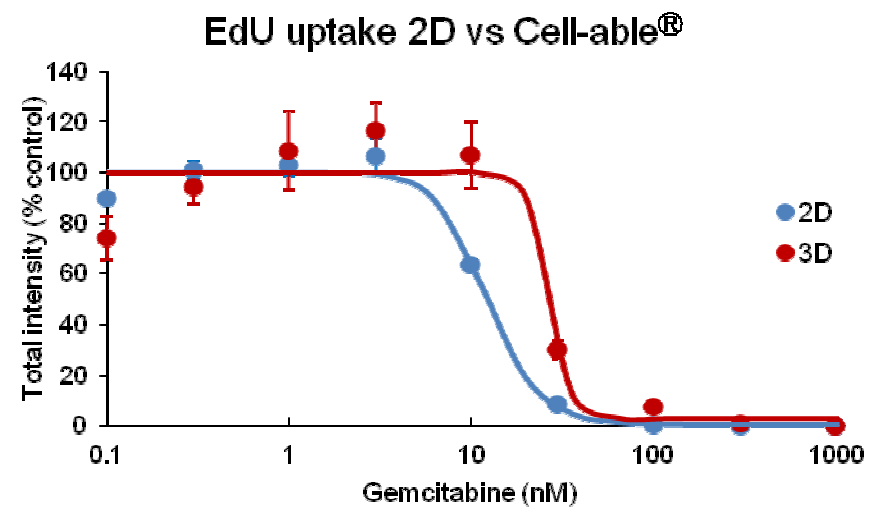
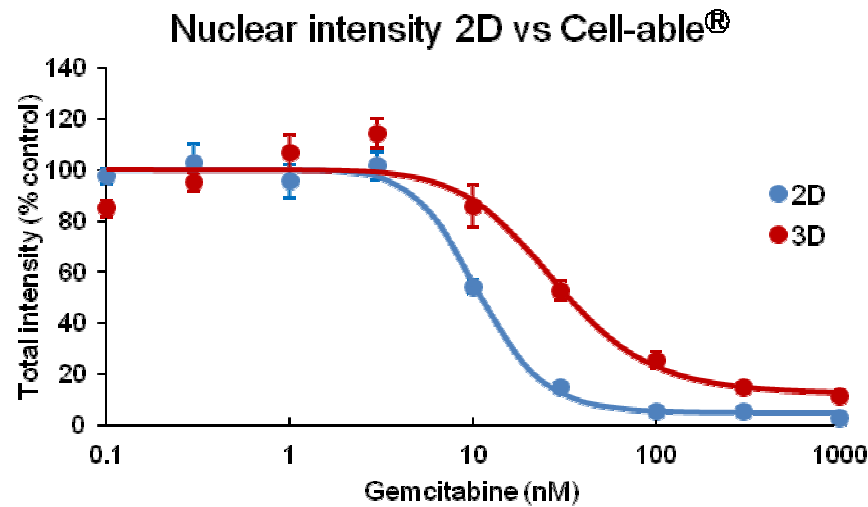
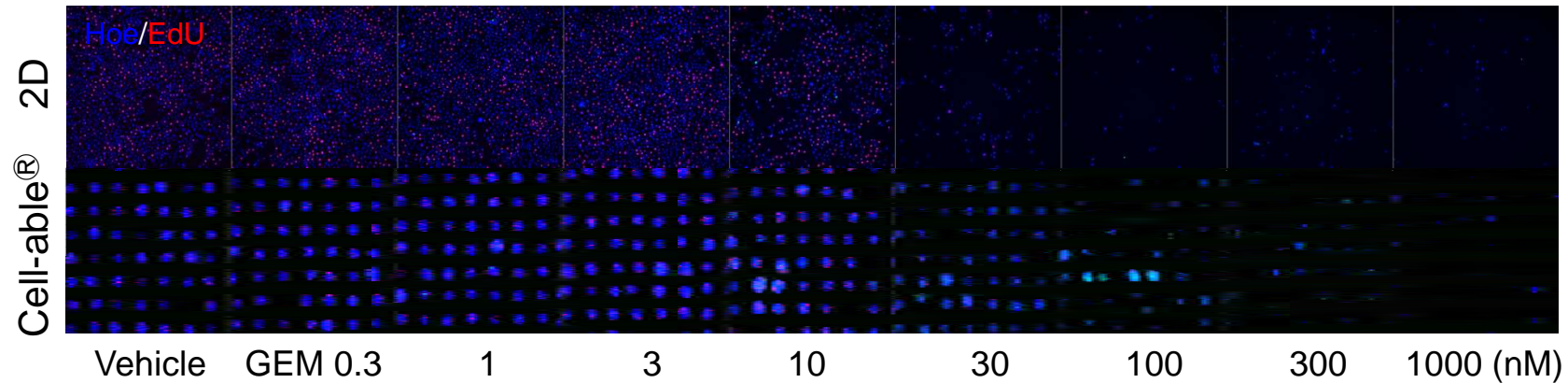


大きいスフェロイドはPTXに対してより抵抗性が高い

→スフェロイドサイズの均一化は感受性試験にとって重要な因子



2次元培養との比較： がん細胞スフェロイドの化学療法剤に対する抵抗性

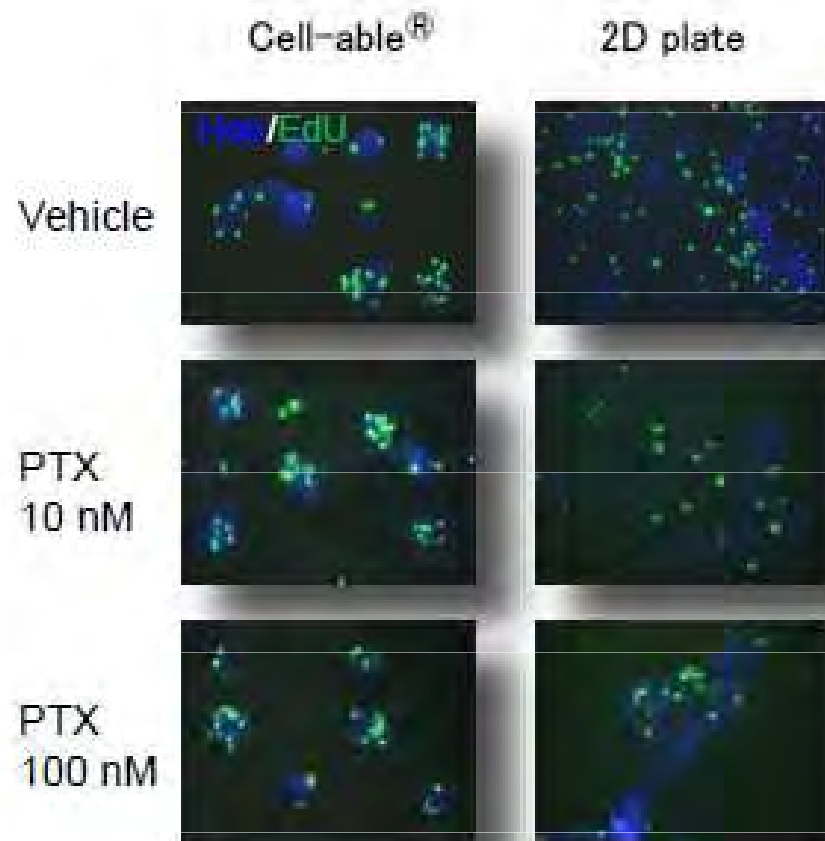


モレキュラーデバイス株式会社 ImageXpressで撮影

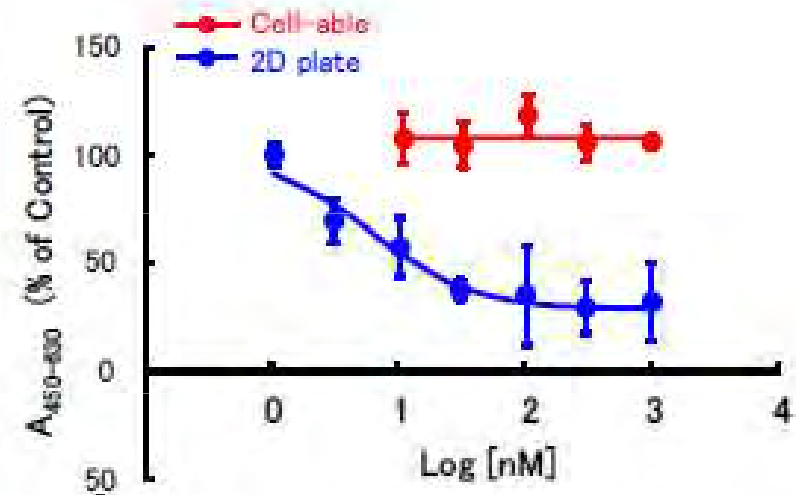


©2015 Toyo Gosei Co., Ltd.

二次元培養と比較：患者由来子宮体がん細胞に対するPTXの抵抗性



患者由来子宮体がん細胞のEdU
取り込みに対するPTXの作用



患者由来子宮体がん細胞の増殖に対するPTXの作用

2Dプレートの単層細胞はPTXによりEdUの取り込みや増殖が抑制されたが、重層化した細胞やスフェロイドは抵抗性を示した

抗がん剤研究でのアプリケーション (HCS: High Content Screening)

4-1) 抗がん剤研究 参考資料

4-2) Cell-able®を用いたHCSの実施例

4-2-1) モレキュラーデバイス株式会社共同データ

PTX曝露により誘導されるアポトシスとネクロシスの同時 継時的画像解析

4-2-2) ユーロフィンパンラボ共同データ

144種類のがん細胞株(Oncopanel) 3D培養を使った受託試験を開始。

<https://www.eurofinspanlabs.com/Marketing/Microsite/cancer-cell-lines-screening/what-is-oncopanel.html>

4-2-3) モレキュラーレスポンス共同データ

凍結保存された初代がん細胞を用いたアプリケーション (2012年AACRでポスター発表):

凍結がん細胞バンクであるモレキュラーレスポンス(米国)では、肝、頭頸部、乳がん、肺がんなどの初代がん細胞で、Cell-able®上でスフェロイド培養が可能であった。

Appendix 1(社内データ):

Cell-able上で患者由来の初代 卵巣がん細胞(data not shown)、子宮体がん細胞の3次元培養が可能であった(Appendix)。白血病細胞株3株でスフェロイドを形成し培養可能であった(Appendix)。

4-2)がん幹細胞 に関するアプリケーション

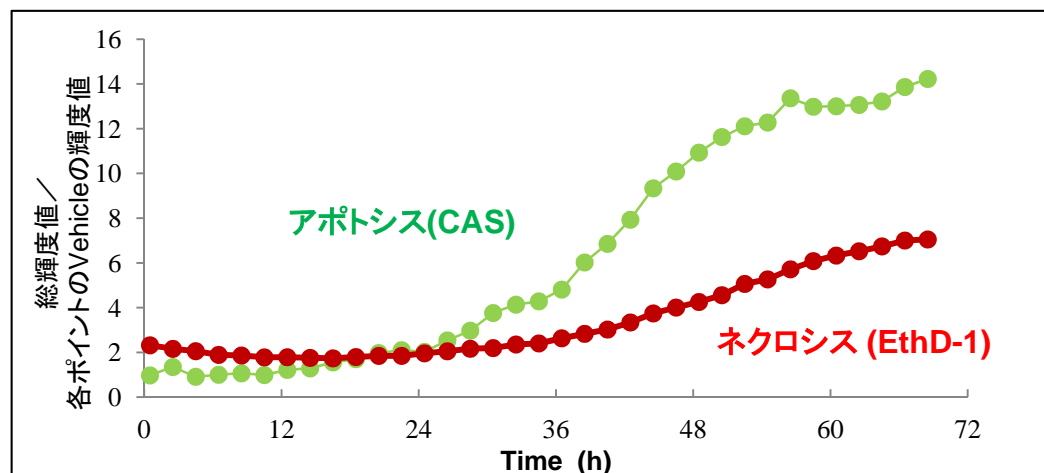
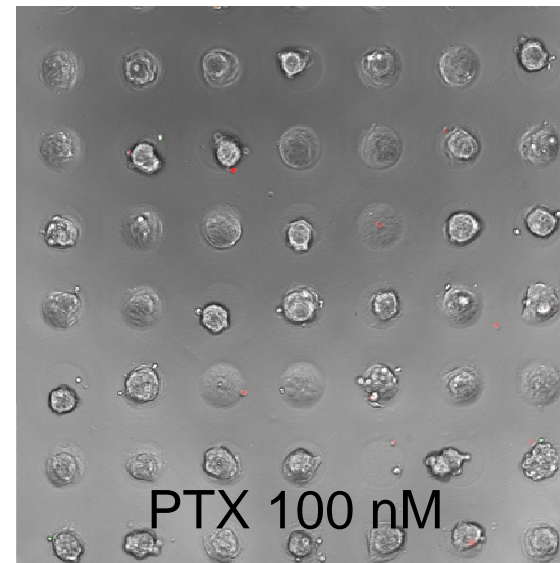
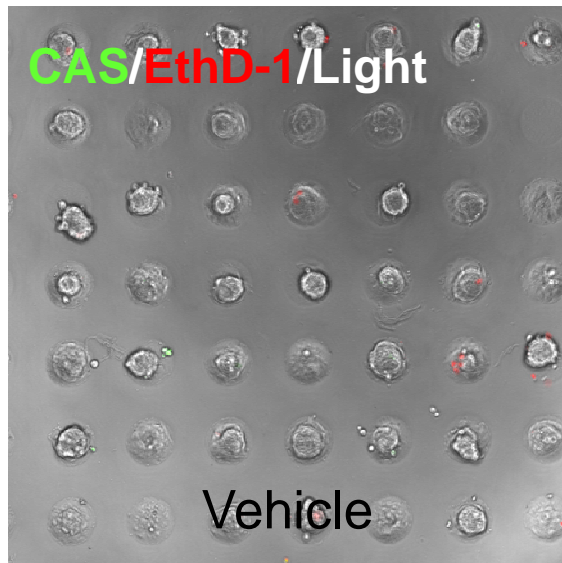
4-3) 線維芽細胞との共培養



4-2) Cell-able®を用いたHCSの実施例

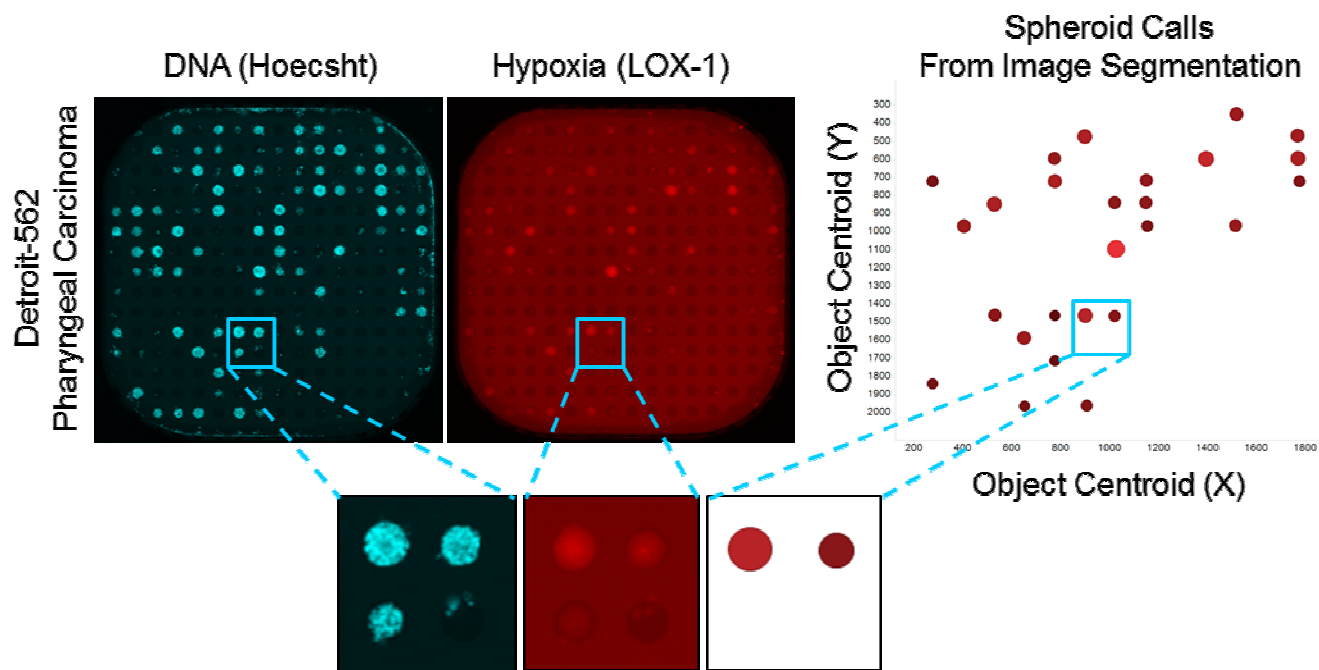
4-2-1) モレキュラーレスポンス共同データ (2012年AACRポスターより抜粋)

PTX曝露により誘導される**アポトシス(CAS)**と**ネクロシス(EthD-1)**の同時 継時的画像解析 (Prostate carcinoma : DU145)



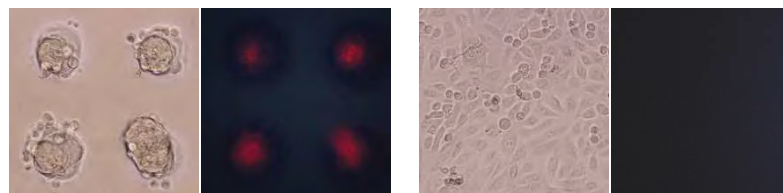
4-2-2) ユーロフィンパンラボテクニカルシート

Hypoxia-Positive Spheroid Calling

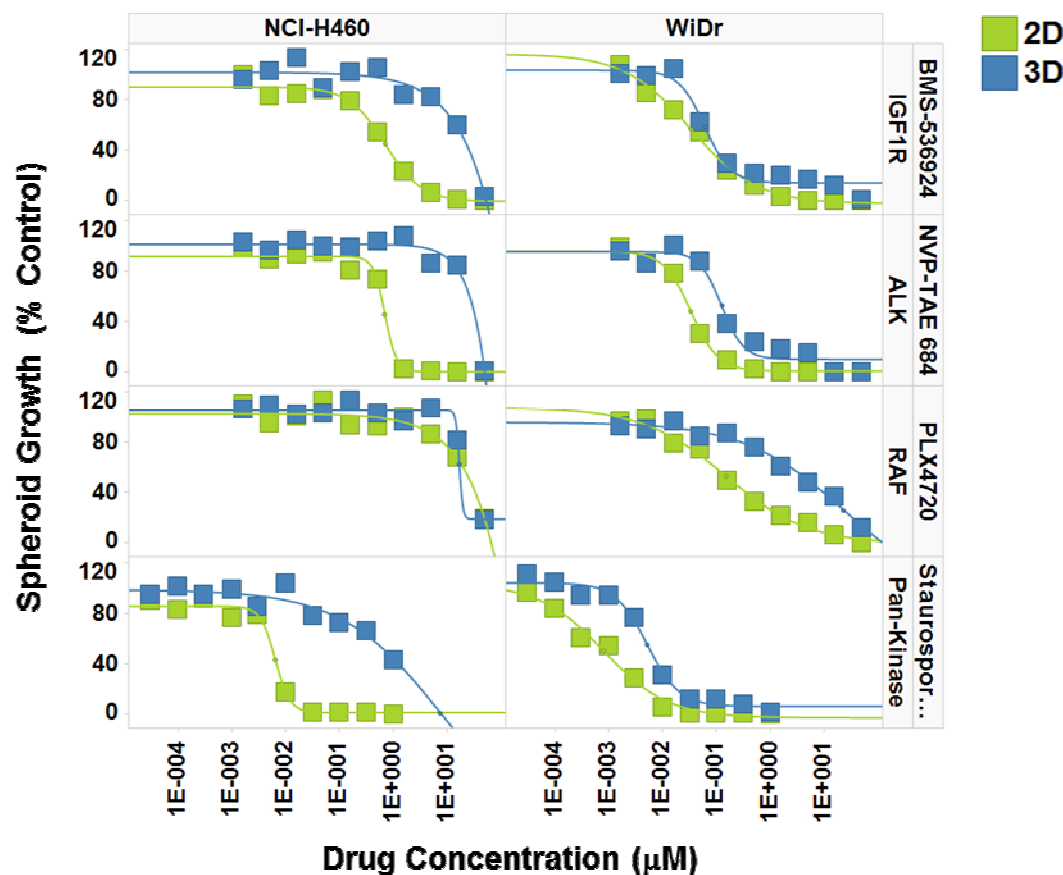
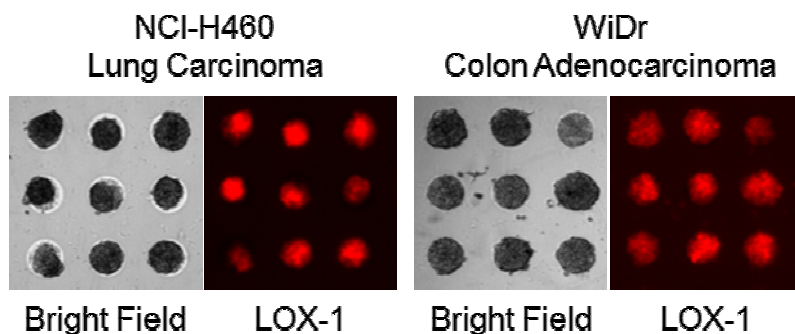


Whole well images of tumor spheroids after 14 days in culture and stained with Hoechst, a cell-permeable DNA stain and LOX-1, which produces phosphorescence in the absence of oxygen. The position of each spheroid in the well is defined by the Cartesian coordinate of its centroid. Spheroid calls after image segmentation are plotted on the right. Size and color of each spheroid is by Hoechst integrated intensity.

参考) DLD-1



Drug Response Comparisons: 2D vs. 3D



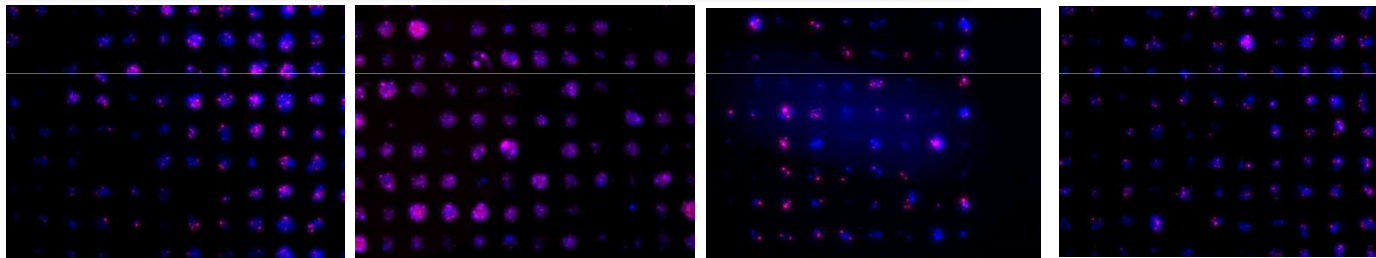
(Top) Representative bright field and LOX-1 fluorescent images of WiDr and NCI-H460 demonstrating that the majority of cells exist in spheroids.

(Bottom) Dose response curves for four inhibitors with distinct mechanisms of action generated after 7 days of treatment either in 2D or 3D cell culture. Note, the difference between these two culture conditions is more pronounced, in general, for NCI-H460 than for WiDr with some, but not all, inhibitors.

4-2-3) モレキュラーレスポンス共同データ (2012年AACRポスターより抜粋)

Cancer Cells **GROW** as Spheroids on Cell-able® Plates

Patient-derived tumor samples from bio-bank



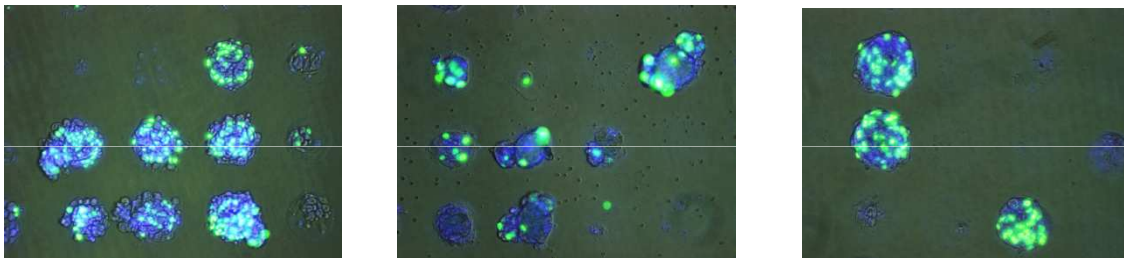
HCC PTC

H&N PTC

MEL PTC

BRE PTC

Fresh (Non-cryopreserved) Tumor samples



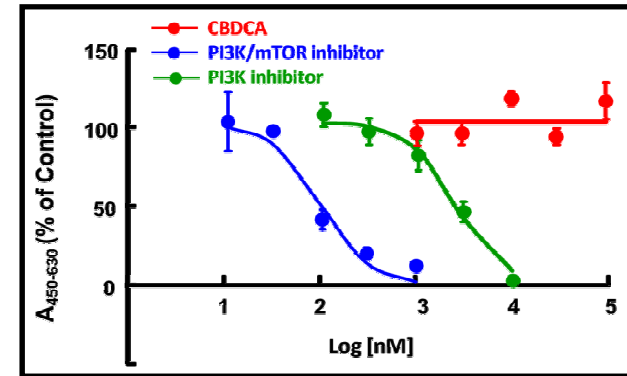
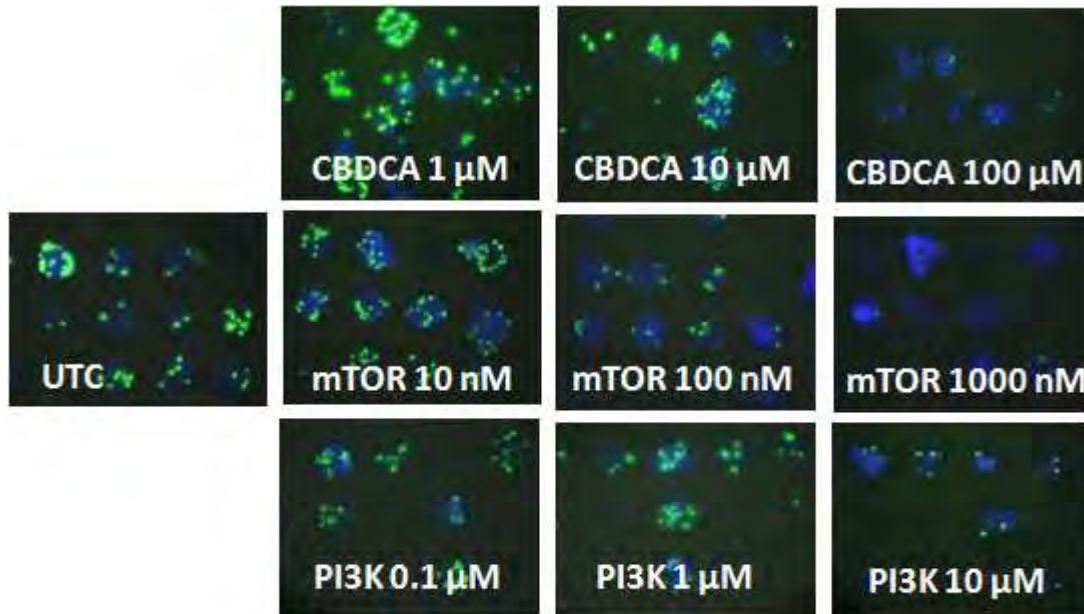
OVA: Serous

OVA: Clear Cell

Endometrial

Cell-able plates as a novel 3D spheroid culture: Patient-derived tumor cells (freshly collected as well as cryopreserved) grow as 3D spheroids on Cell-able® plates. Tumor cell lines also form spheroids on Cell-able®. **Blue: DAPI, Green: EdU**

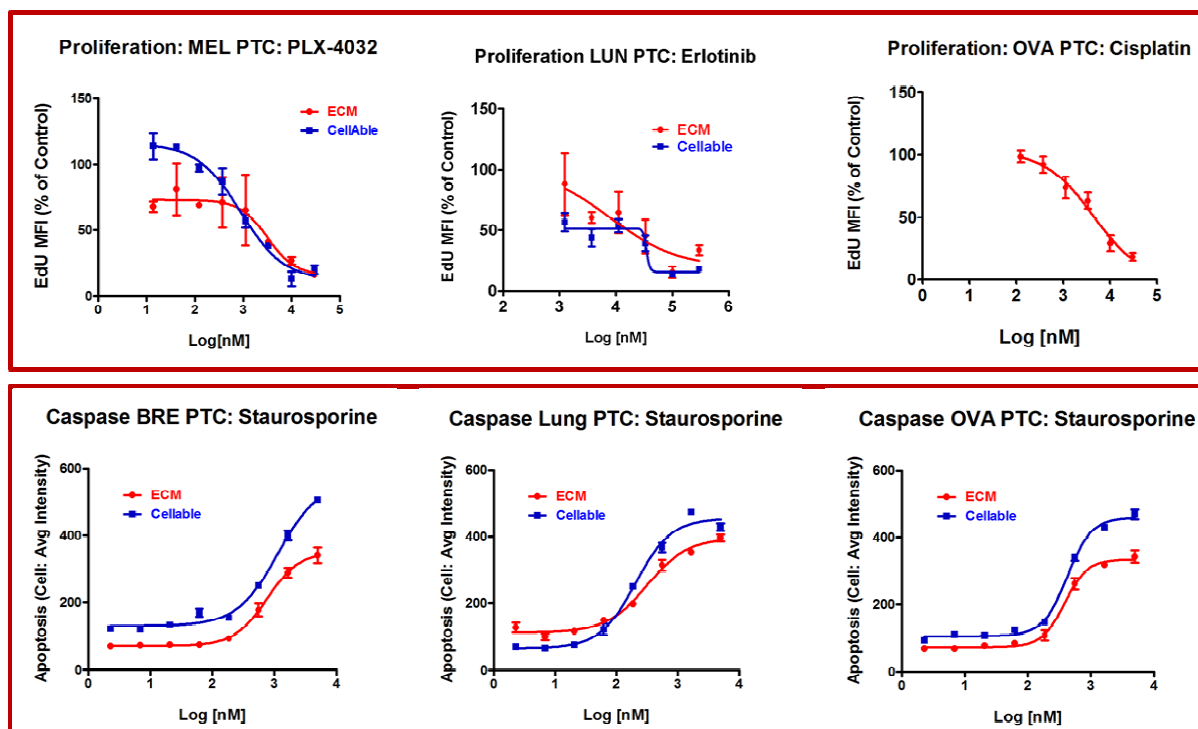
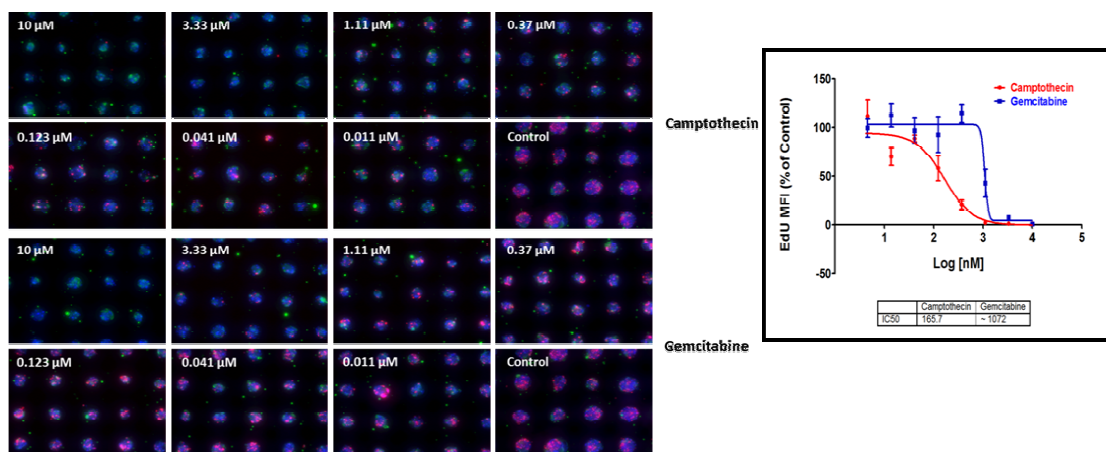
Cell-able[®] as a tool for drug response studies



	CBDCA	PI3K/mTOR inhibitor	PI3K inhibitor
IC50	>100000	85	3000

Use of Cell-able[®] plates for *ex vivo* treatment studies: Patient-derived tumor cells (freshly collected) were grown as 3D spheroids on Cell-able[®] plates and were treated with oncology drug candidates. Change in the proliferation were visualized by EdU uptake and quantified using WST-8 Assay. **Blue: DAPI, Green: EdU**

High-Content Imaging of Tumor Spheroids in Cell-able®



Combining Cell-able® plates with High-Content Imaging Platform: Patient-derived tumor cells (cryopreserved) were grown as 3D spheroids on Cell-able® plates and were treated with oncology drug candidates. Change in the proliferation were visualized by **EdU** uptake, apoptosis by Caspase 3/7 assay. Imaging and analysis were performed using ImageXpress Micro and MetaXpress (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). **Blue: DAPI, Green: EdU**



抗がん剤研究でのアプリケーション (HCS: High Content Screening)

4-1) 抗がん剤研究 参考資料

4-2) Cell-able®を用いたHCSの実施例

4-2-1) モレキュラーデバイス株式会社共同データ

PTX曝露により誘導されるアポトシスとネクロシスの同時 継時的画像解析

4-2-2) ユーロフィンパンラボ共同データ

144種類のがん細胞株(Oncopanel) 3D培養を使った受託試験を開始。
<https://www.eurofinspanlabs.com/Marketing/Microsite/cancer-cell-lines-screening/what-is-oncopanel.html>

4-2-3) モレキュラーレスポンス共同データ

凍結保存された初代がん細胞を用いたアプリケーション (2012年AACRでポスター発表):
凍結がん細胞バンクであるモレキュラーレスポンス(米国)では、肝、頭頸部、乳がん、肺がんなどの初代がん細胞で、Cell-able®上でスフェロイド培養が可能であった。

Appendix (社内データ):

Cell-able上で患者由来の初代 卵巣がん細胞(data not shown)、子宮体がん細胞の3次元培養が可能であった(Appendix)。白血病細胞株3株でスフェロイドを形成し培養可能であった(Appendix)。

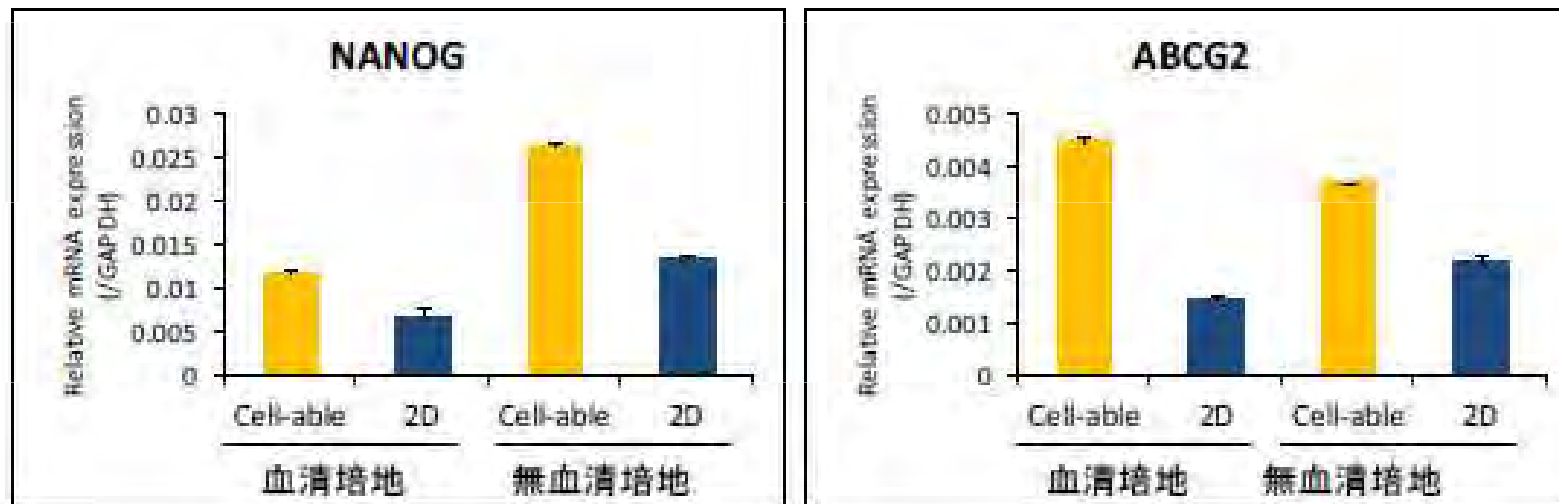
4-2) がん幹細胞 に関するアプリケーション

4-3) 線維芽細胞との共培養



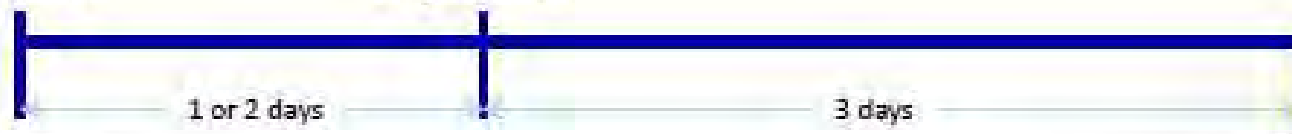
4-3) がん幹細胞 に関するアプリケーション

二次元培養との比較: がん細胞スフェロイドの幹細胞マーカーmRNAの高発現



播種 DU145

Drug treatment



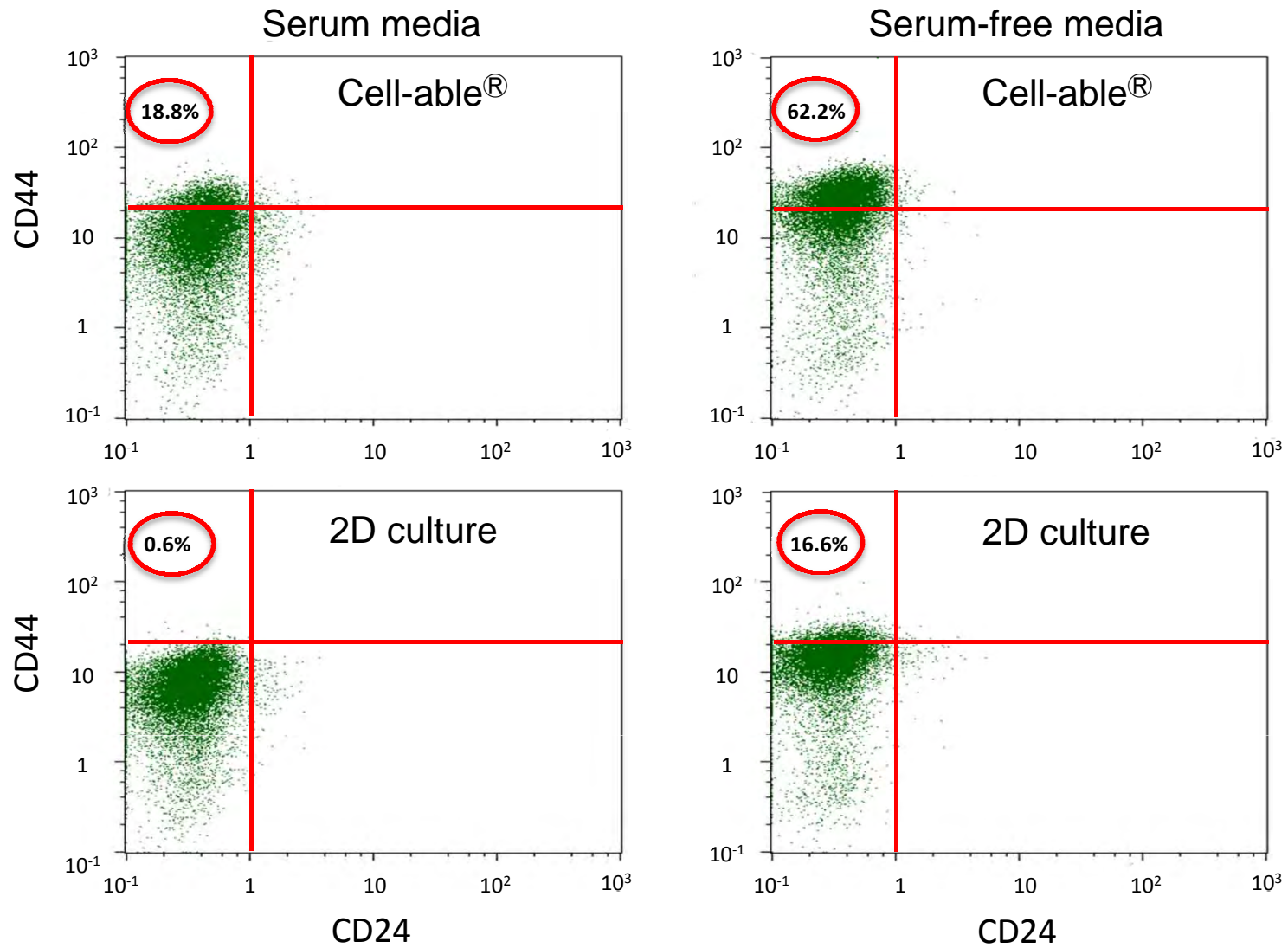
Groups;

1. 血清培地とCell-able
2. 血清培地とcollagen-coated plate (2D)
3. 無血清培地とCell-able
4. 無血清培地とcollagen-coated plate (2D)

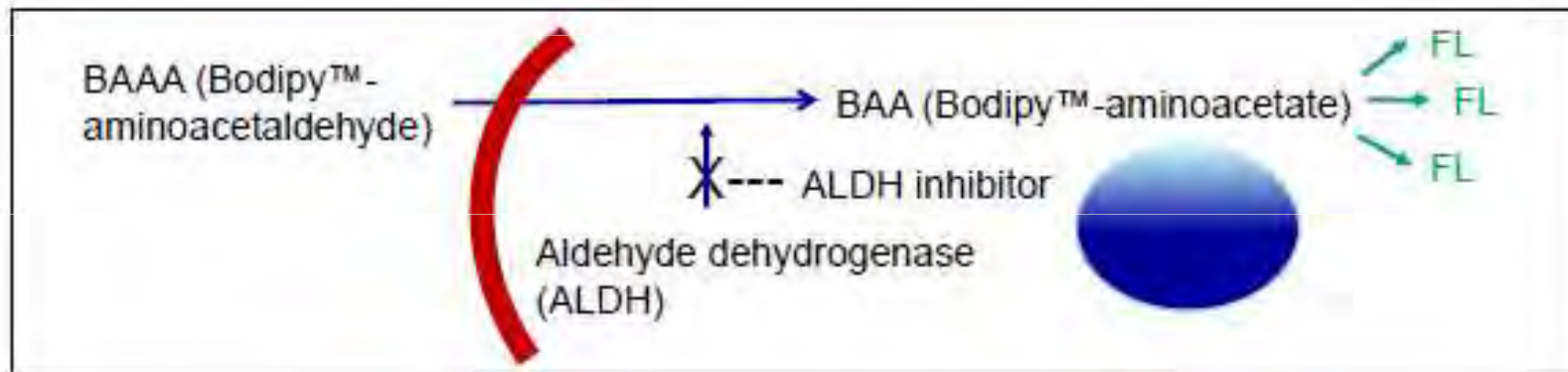
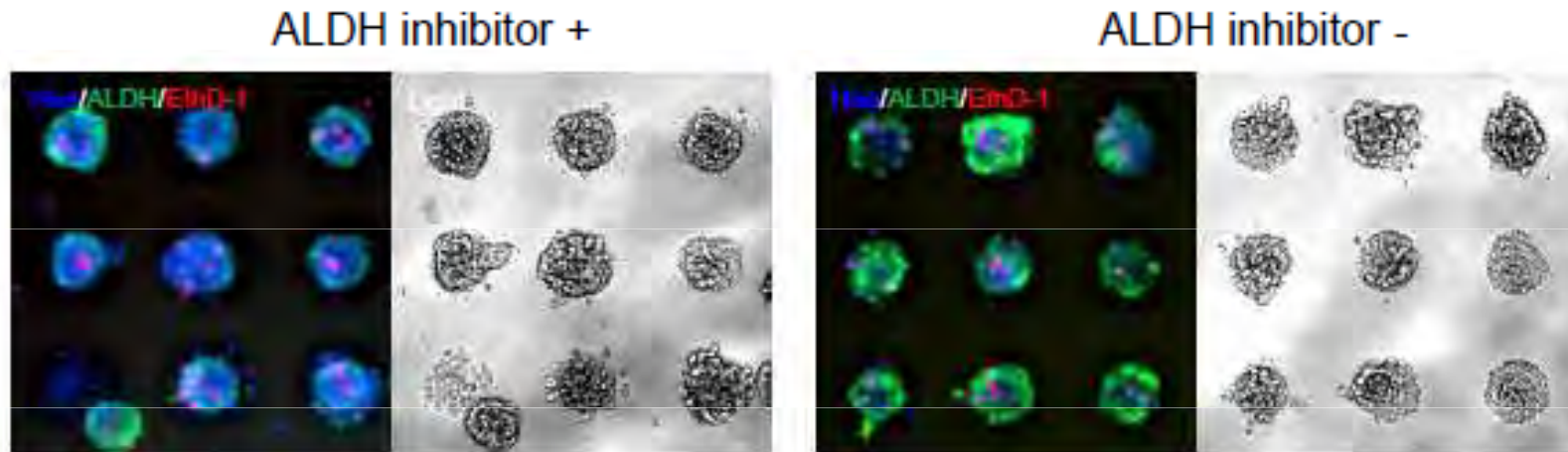
Evaluation;

1. 生存率
(HCS imaging, ATP luciferase)
2. 表面抗原 (FACS)
3. 遺伝子発現 (RT-qPCR)

2次元培養との比較：がん細胞スフェロイド中の幹細胞CD44^{high}/CD24^{low}の増加



二次元培養との比較:がん細胞スフェロイドのALDH高発現幹細胞の可視可



ALDH活性比較の比較

2D vs Cell-able®

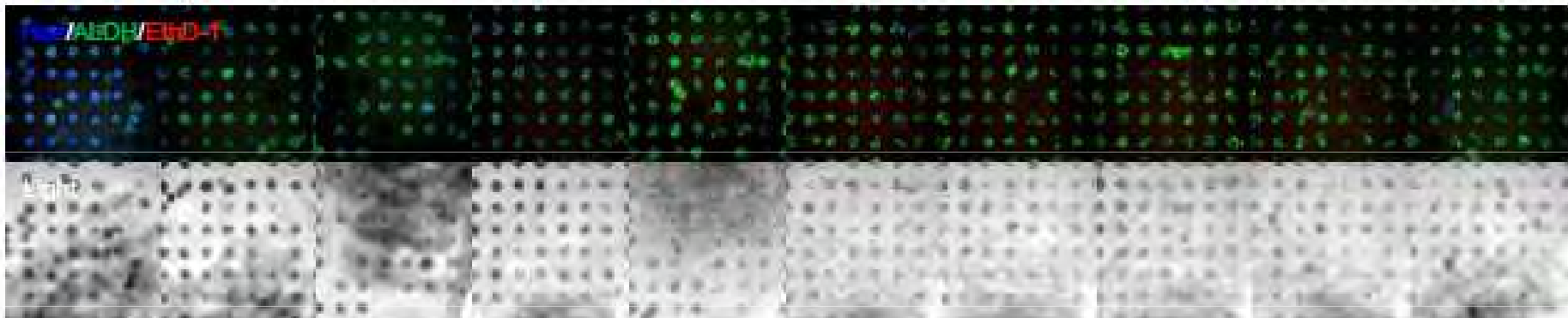
- Plate
 - 2D: 2D collagen coat 96well plate
 - 3D: Cell-able® spheroid
- Cell
 - DU145 : prostate cancer cell line
 - A549 : lung cancer cell line
- ALDH 活性測定: ALDEFLUOR®
 - 細胞のALDH(酵素) + BAAA(基質、Bodipy-aminoacetaldehyde)
 - BAA-(Bodipy-aminoacetate、蛍光発光)
 - ALDH阻害剤: Diethylaminobenzaldehyde (DEAB)
- 方法
 - ①各ウェルから培地を除去し、アッセイバッファー又はDEABを添加したアッセイバッファーを50µl/well添加し、5分間インキュベーション
 - ②BAAA基質溶液50µlを各ウェルに添加し、30分インキュベーション
 - ③蛍光イメージング

二次元培養との比較: がん細胞スフェロイド中の幹細胞のPTXに対する抵抗性

2D plate



Cell-able® plate



Vehicle	Vehicle	PTX								
		1	3	10	30	100	300	1000	3000	nM
ALDH-I +	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Cell-able[®]と“がん幹細胞培養用培地”との組み合わせ

がん幹細胞培養用培地PRIME-XV[®]CIC (Irvine Scientific, CA)^注) を用いて Cell-able[®]プレート及び2次元培養プレートでがん細胞 (DU145: 前立腺がん) の培養を行い、RPMI1640 (10% FBS)培地で培養した場合と比較した。

注)PRMIE-XV[®] Cancer Initiating Cells SF Enrichment medium (PRIME-XV[®]CIC)

【がん幹細胞培養用培地PRIME-XV[®]CICの特長】

- i) 表面マーカーでがん幹細胞の選択的な培養が可能であることを示している
- ii) 培地の粘度を高める組成になっており、Tumorsphereを形成させやすい
- iii) MCF-7, HeLa, A549などでTumorsphere形成を確認しており、広いがん種に対応できる可能性がある
- iv) c-GMP準拠施設で製造しており、データの再現性が得やすい

検討1) aldehyde dehydrogenase (ALDH)活性の比較

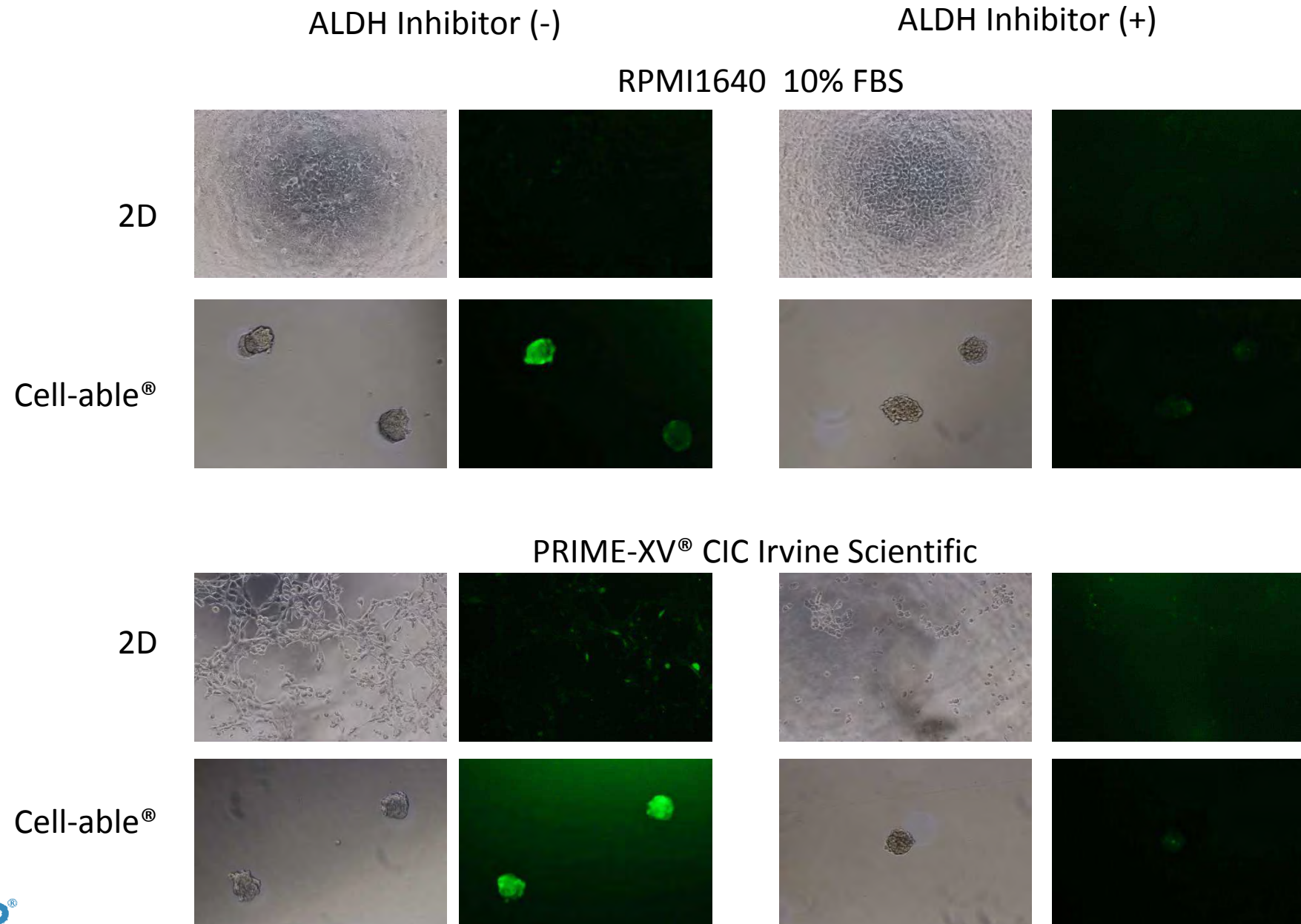
2次元培養の場合、RPMI1640培地では確認できなかったALDH活性がPRIME-XV[®] CIC培地の系では一部の細胞で確認できた。

一方、Cell-able[®]培養では、どちらの培地でも強いALDH活性が認められた。

検討2) 幹細胞遺伝子発現比較 (ALDH1A1, ABCG2)

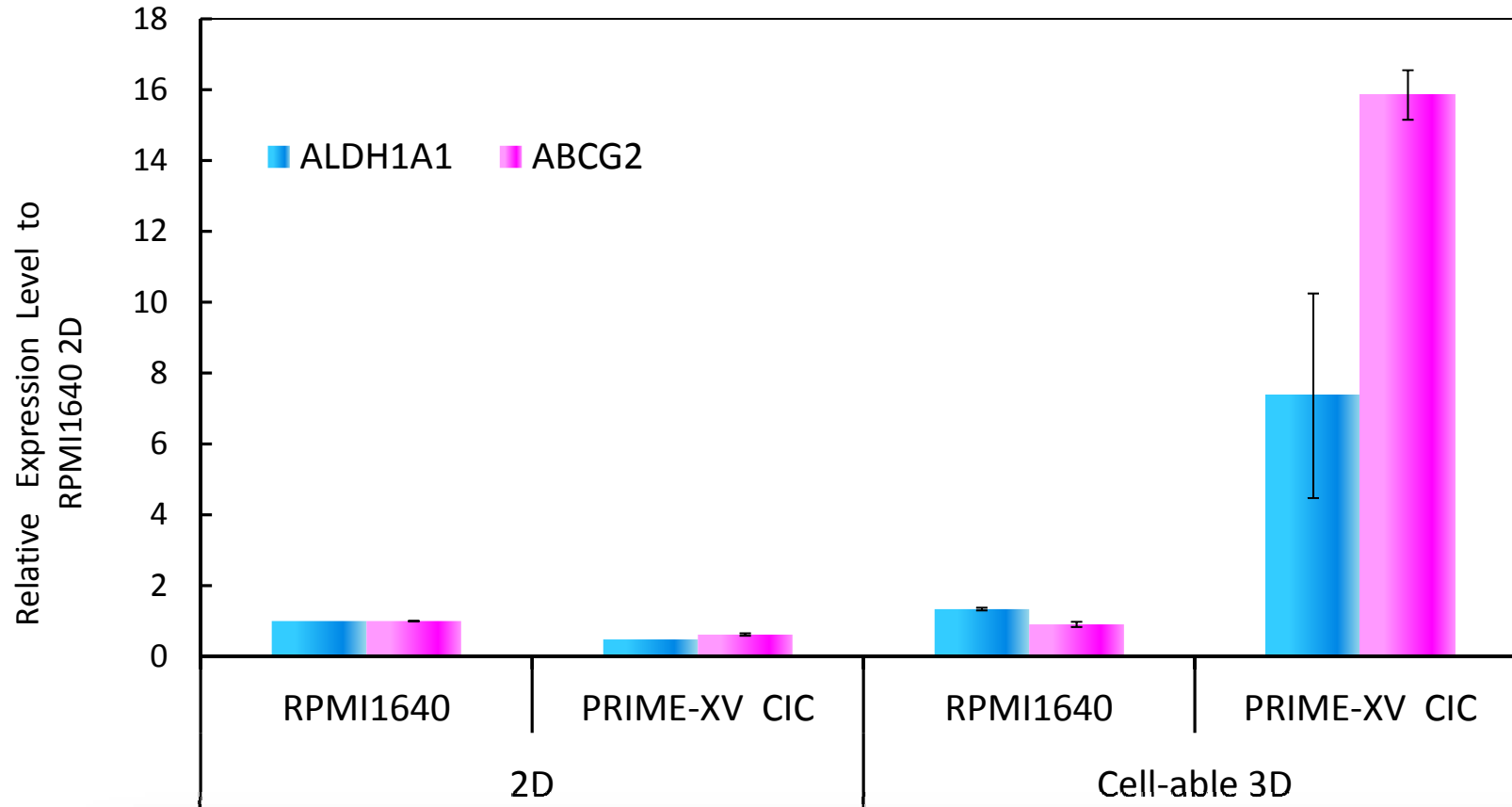
2次元培養の場合、どちらの培地でもステムマーカー遺伝子の発現に差は認められなかった。Cell-able[®]で培養した場合、RPMI1640培地では2次元培養と同等の遺伝子発現であったが、PRIME-XV[®] CICではALDHで約7倍、ABCG2では約16倍の発現上昇が認められた。

検討1) Comparison of ALDH activity (DU145)



検討 2) 幹細胞マーカー遺伝子発現の比較

DU145: 前立腺がん



Cell-able®3次元培養とPRIME-XV®CICの組み合わせで
幹細胞マーカー遺伝子の発現が上昇

抗がん剤研究でのアプリケーション (HCS: High Content Screening)

4-1) 抗がん剤研究 参考資料

4-2) Cell-able®を用いたHCSの実施例

4-2-1) モレキュラーデバイス株式会社共同データ

PTX曝露により誘導されるアポトシスとネクロシスの同時 継時的画像解析

4-2-2) ユーロフィンパンラボ共同データ

144種類のがん細胞株(Oncopanel) 3D培養を使った受託試験を開始。

<https://www.eurofinspanlabs.com/Marketing/Microsite/cancer-cell-lines-screening/what-is-oncopanel.html>

4-2-3) モレキュラーレスポンス共同データ

凍結保存された初代がん細胞を用いたアプリケーション (2012年AACRでポスター発表):

凍結がん細胞バンクであるモレキュラーレスポンス(米国)では、肝、頭頸部、乳がん、肺がんなどの初代がん細胞で、Cell-able®上でスフェロイド培養が可能であった。

Appendix (社内データ):

Cell-able上で患者由来の初代 卵巣がん細胞(data not shown)、子宮体がん細胞の3次元培養が可能であった(Appendix)。白血病細胞株3株でスフェロイドを形成し培養可能であった(Appendix)。

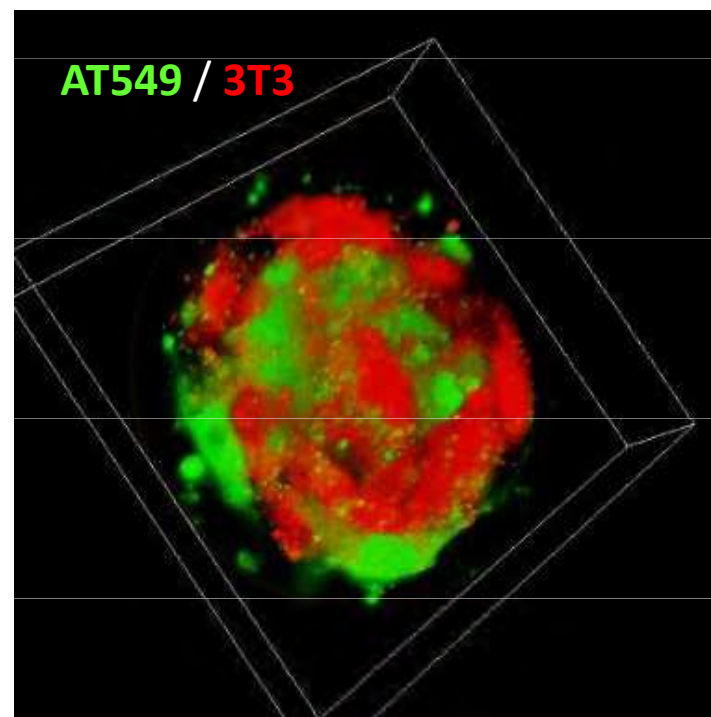
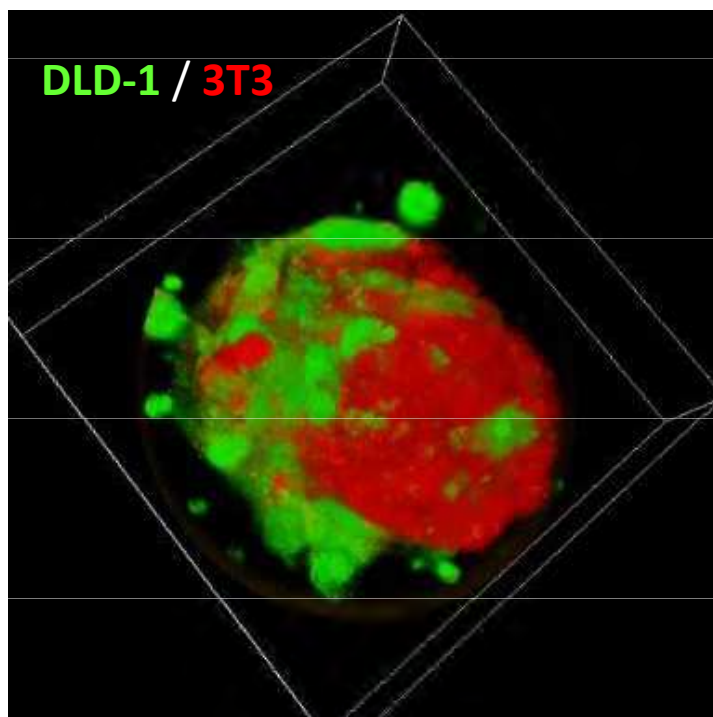
4-2)がん幹細胞 に関するアプリケーション

4-3) 線維芽細胞との共培養



4-4) 線維芽細胞との共培養の例

Cell-able®では, semi in vivo 悪性腫瘍の微小環境を再構築するため, がん細胞と間質細胞を共培養することが可能です。



がん細胞と線維芽細胞との共培養

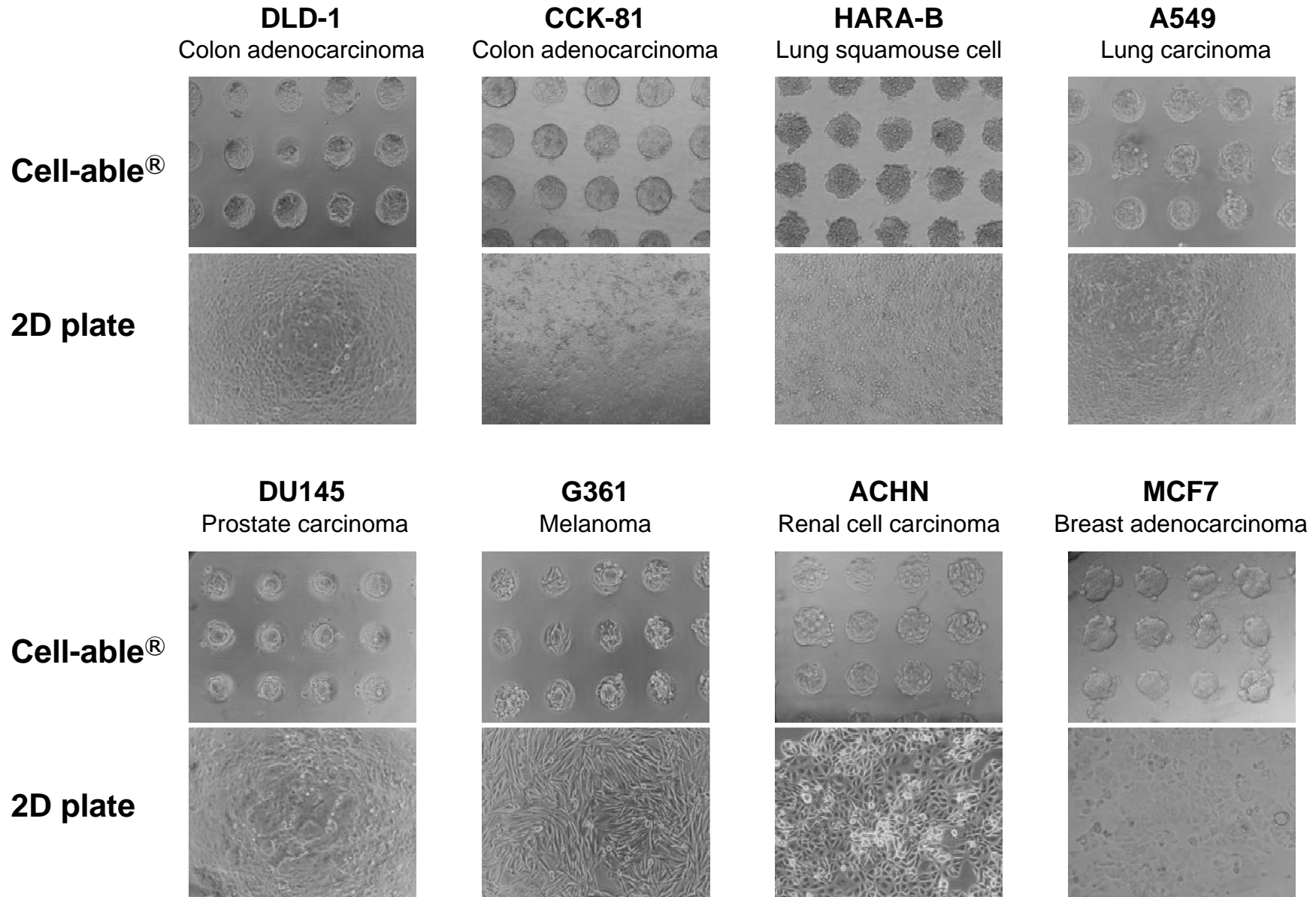
予めCellTracker® Redでラベルした肺がん細胞A549 or 大腸がん細胞DLD-1をCellTracker® Greenでラベルした3T3-Swiss albino マウス線維芽細胞と48Hrs混合培養した(混合比率 がん細胞: 線維芽細胞 = 1: 1)。画像は ImageXpress Micro XLで観察した。

抗がん剤研究でのアプリケーション (HCS: High Content Screening) まとめ

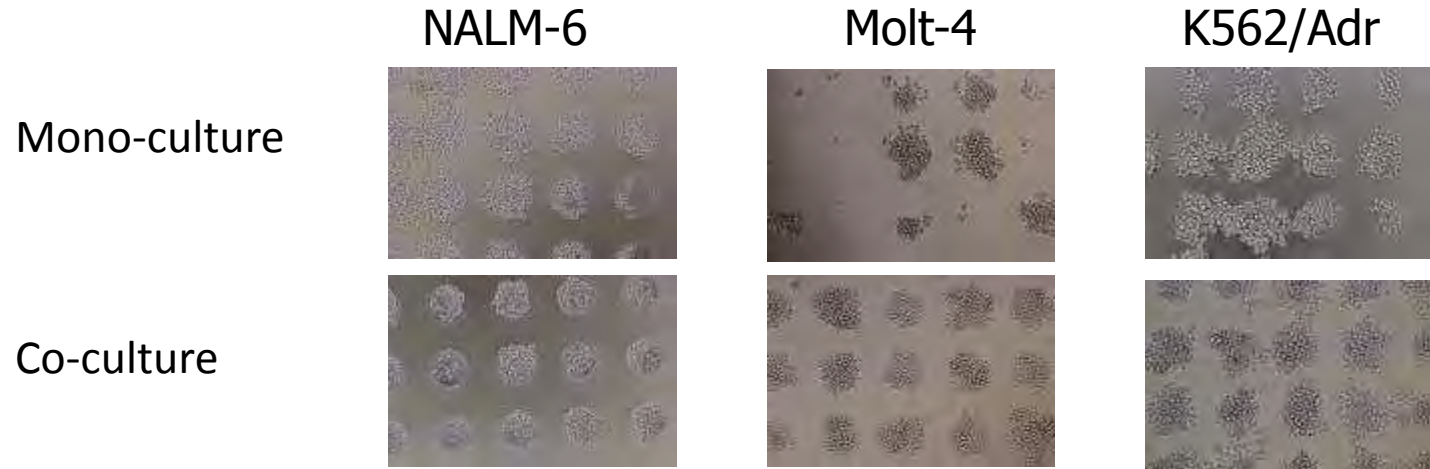
- I. Cell-able®は**スフェロイドサイズをコントロールすることができ**, HSIによる薬剤感受性試験に適しています。
- II. Cell-able®上のスフェロイドはECMを介して, ウェル底面に接着しているため, 免疫染色が容易で**(マルチカラー)イメージング**に適しています。
- III. 2次元培養と比較すると, スフェロイドは**がん幹細胞マーカーの発現**が高く, それらの細胞は化学療法に対して, 抵抗性を示しました。
- IV. 創薬において, Cell-able®はがん幹細胞を標的にした抗がん剤のバイオマーカー検索に寄与できると考えられます。
- V. in vivo のがん組織で認められる**線維芽細胞との共培養**に適しています。
- VI. サークルのサイズとサークルーサークル間距離を変更すれば, **大きなスフェロイドを形成することもできます**。

Appendix

Cell-able® プレートでスフェロイド形成が確認されたがん細胞株は144種類

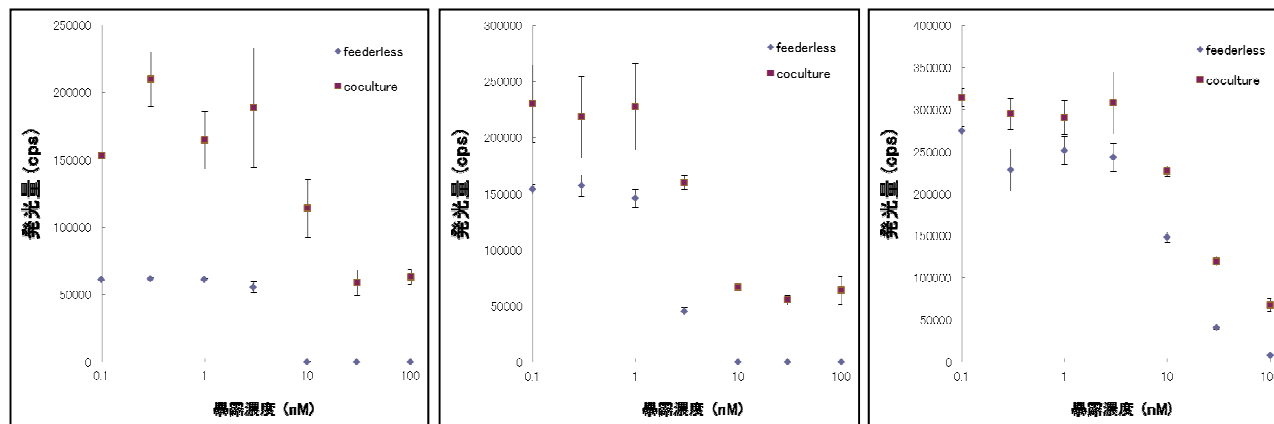


白血病細胞培養



白血病細胞株を用いた薬剤感受性試験

各細胞株を4日間Cell-able®で単培養、共培養し、Bortezomibを48時間暴露し感受性試験を行った。



IC50	Feederless	Co-culture
NALM-6	6.7 nM	9.8 nM
Molt-4	2.2 nM	3.4 nM
K562/Adr	12 nM	16 nM

目次

1) Cell-Able[®]の特性・用途・特長

2) 肝細胞研究

2-1) 薬物動態でのアプリケーション

2-2) 肝毒性でのアプリケーション

2-3) 肝炎研究でのアプリケーション

3) 心毒性評価研究

4) 抗がん剤研究

抗がん剤研究でのアプリケーション(HCS: High Content Screening)

5) 幹細胞研究

4) 幹細胞研究

4-1) iPS心筋細胞培養用プレート

心筋細胞を384プレートの中で1つだけ直径200 μ mで3次元培養したい。
イオンチャンネルのモニタリングのため、平底のプレート中心部にスフェロイド
が接着している必要がある。

希望に応じてプレートを作成 ⇒

イオンチャンネルのモニタリングに加え、
シグナルに呼応する拍動の動画も取得



4-2) 間葉系肝細胞の分化誘導のツールとしてCell-able®を利用

3D spheroid culture system on micropatterned substrates for improved differentiation efficiency of multipotent mesenchymal stem cells, Wenjie Wang , Keiji Itaka , Shinsuke Ohba, Nobuhiro Nishiyama, Ung-il Chung , Yuichi Yamasaki a, Kazunori Kataoka , Biomaterials 30 (2009) 2705–2715

お問い合わせ先

 住友ベークライト株式会社

S-バイオ事業部 

E-mail : s-bio@sumibe.co.jp

TEL : 03-5462-4831, FAX: 03-5462-4835

製造元 : 東洋合成工業株式会社  TOYO GOSEI

〒111-0053 東京都台東区浅草橋1-22-16

ヒューリック浅草橋ビル8階

Tel 03 (5822) 6186, Fax 03 (5822) 6187

Email cell-able@toyogosei.co.jp

URL: www.toyogosei.co.jp

販売元 :  住友ベークライト株式会社

S-バイオ事業部 マーケティング・営業部

〒140-0002 東京都品川区東品川2-5-8 天王洲パークサイドビル

Tel: 03 (5462) 4831, Fax: 03 (5462) 4835

E-mail : s-bio@sumibe.co.jp

URL : www.sumibe.co.jp/product/s-bio/