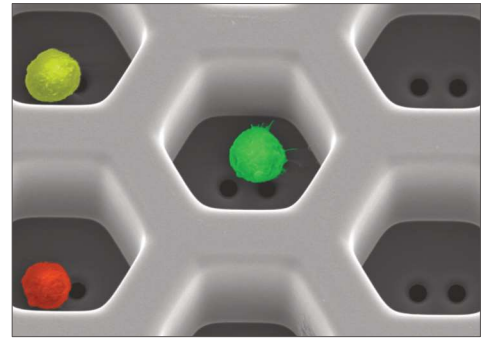
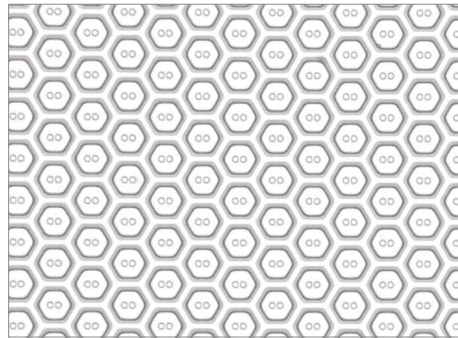
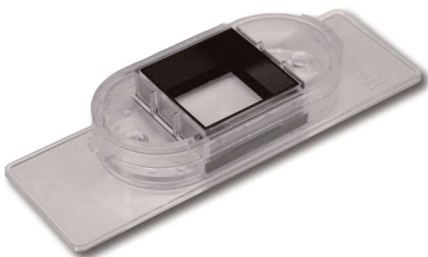




# SIEVEWELL™

## Cell capture 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  $\mu\text{m}$ タイプ）、90,000個（50  $\mu\text{m}$ 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



## ピペットだけで使える簡単操作

入れるときは中央部へ



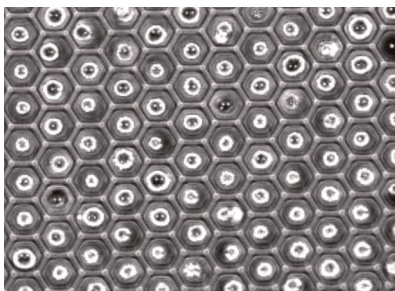
抜くときはサイドから



8連ピペットに対応



ピペッティングだけで細胞が配列



スライドガラスと同サイズ  
一般的な顕微鏡観察が可能



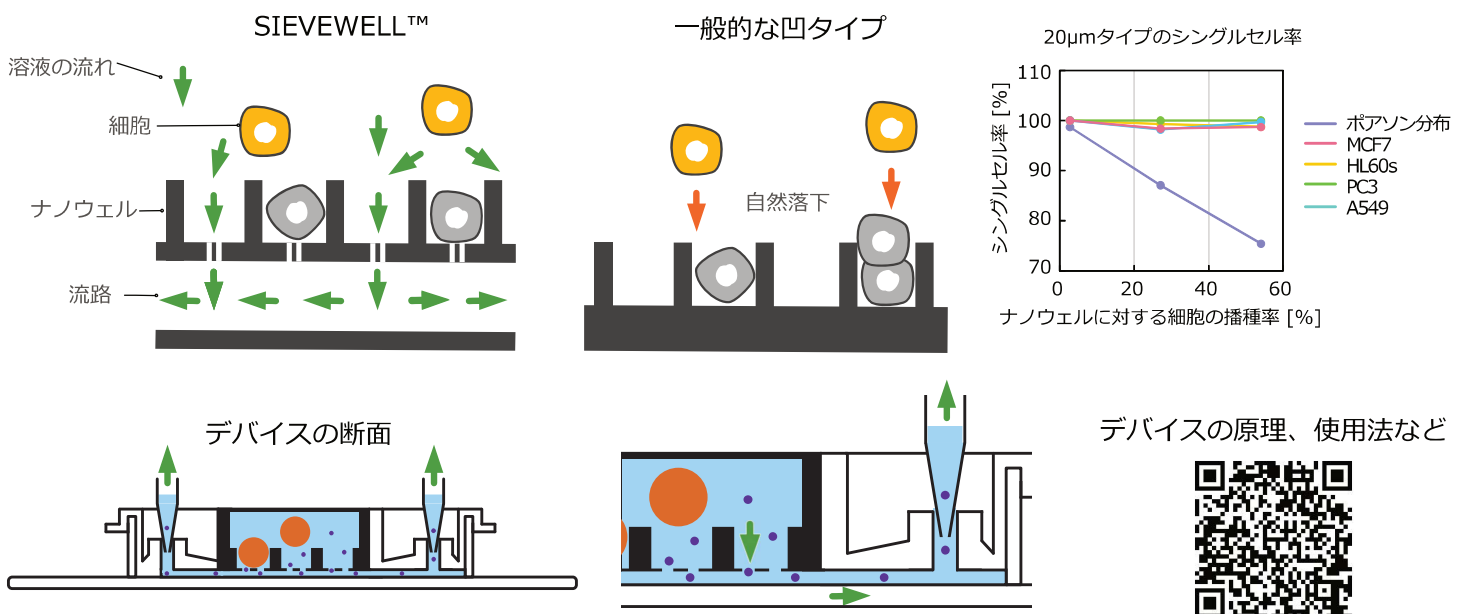
[www.sievewell.com](http://www.sievewell.com)

# 高いシングルセル格納率

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。

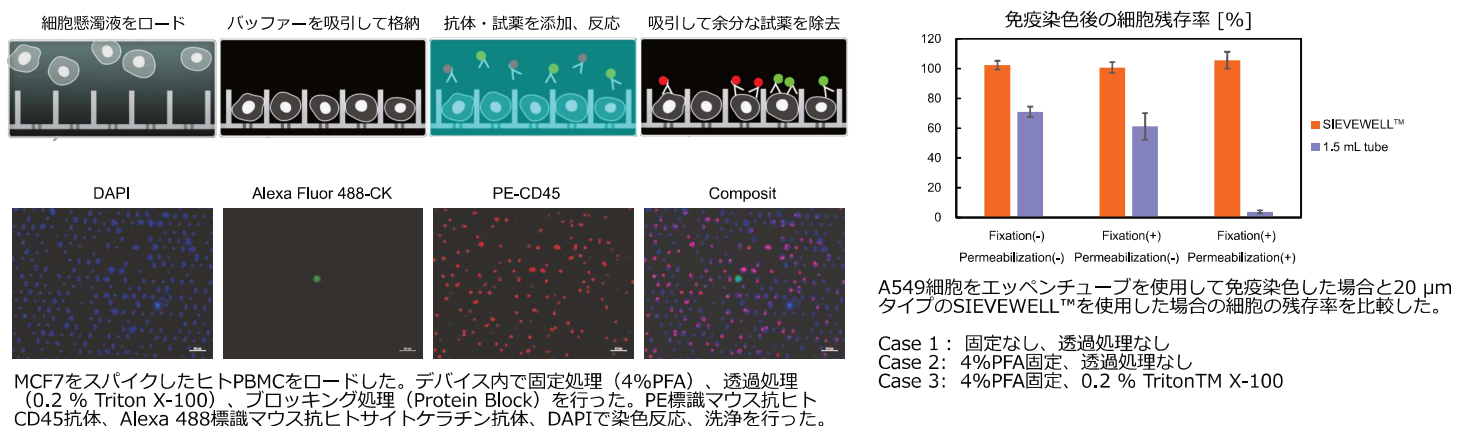
## 細胞格納の原理

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。



## デバイス内での染色

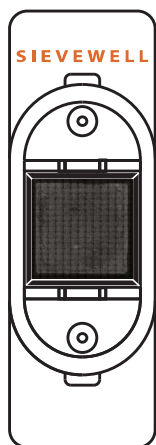
免疫染色は、細胞の固定、透過処理、ブロッキング、抗体反応、洗浄といった複数のステップが必要ですが、染色操作の過程で細胞が失われることがあります。SIEVEWELL™を使用すると、デバイス内ですべてのステップを行うことができます。染色時の試薬は貫通孔を通過しますが、細胞はフィルター上に残るため、免疫染色時の細胞のロスを最小限にすることができます。



## 高密度に細胞を配列

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。

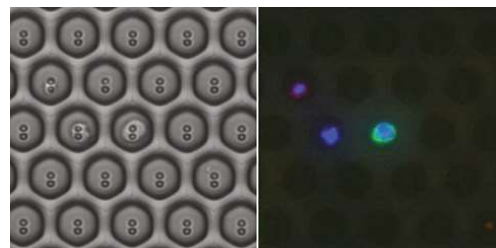


ウェル数  
370,000 (20 μm)  
90,000 (50 μm)



20μmタイプ

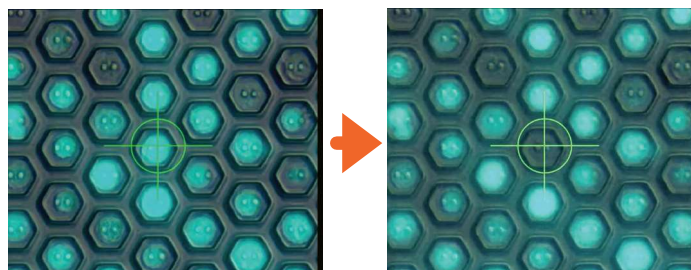
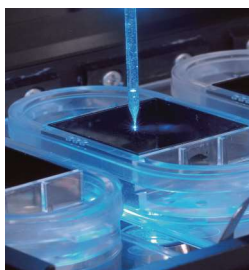
がん患者血液中の循環腫瘍細胞の検出



Data provided by Professor Hans Neubauer  
Department of Obstetrics and Gynaecology, University  
Hospital and Medical Faculty of the Heinrich Heine  
University Düsseldorf, Düsseldorf, Germany  
20μmタイプ

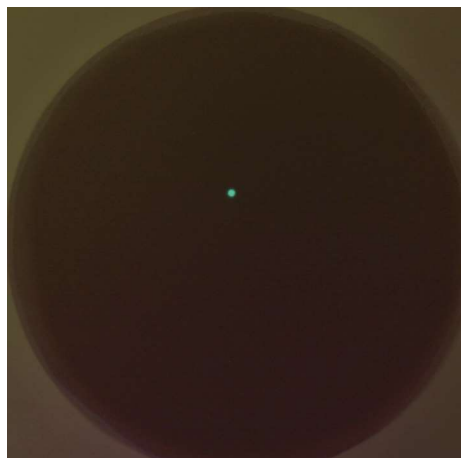
## シングルセルを回収、遺伝子解析や培養に

ウェルに格納された細胞は、ガラスキャピラリーなどを用いて回収が可能です。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。

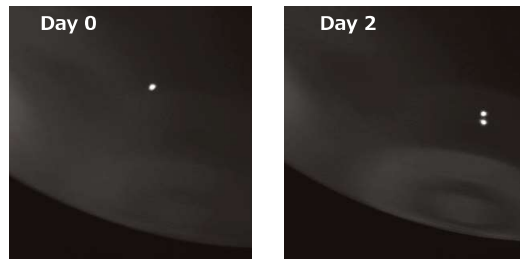


20μmタイプ

A549細胞のシングルセル回収例



回収したA549細胞シングルセル培養



回収したA549細胞の1細胞RT-PCR

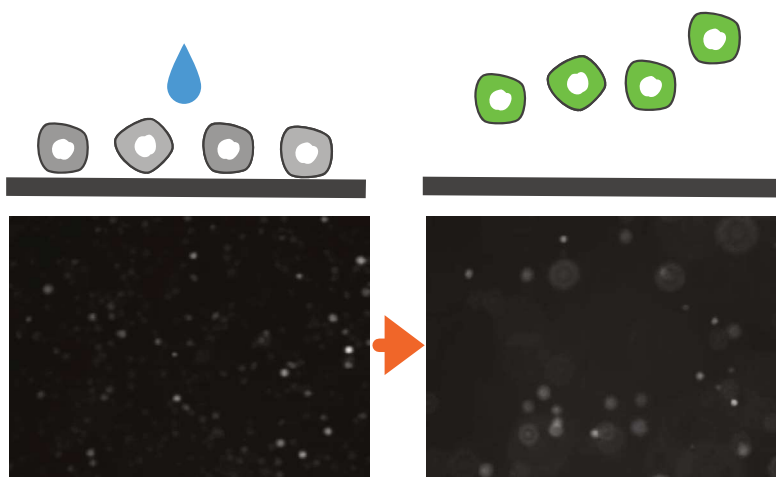


PC (Positive Control) : total RNA from A549 (1x10<sup>6</sup> cells) with RT reaction. NC (Negative Control) : total RNA from A549 (1x10<sup>6</sup> cells) without RT reaction.

## 浮遊細胞をウェルに格納、アッセイ中の位置を保持

浮遊細胞のアッセイ、イメージングでは、試薬の添加によって溶液が舞い上がり、細胞の位置ずれが発生します。

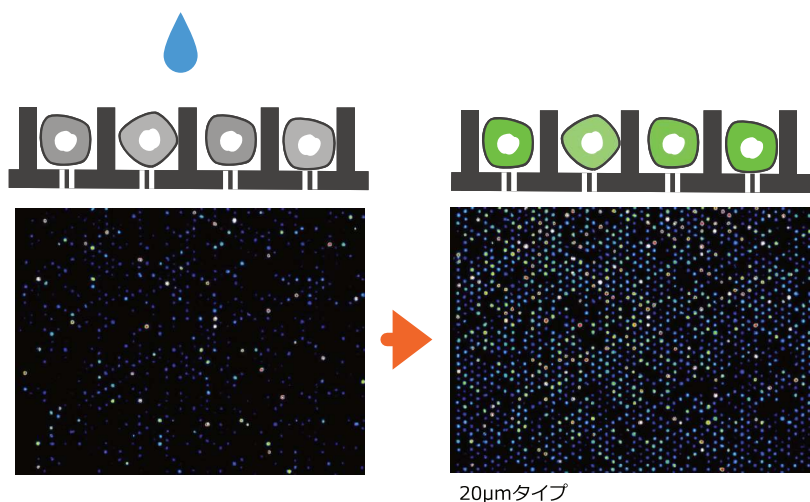
右のように、一般的な96ウェルプレートを用いた場合、ウェル底面の細胞は試薬の添加によって舞い上がってしまいます。カルシウムイメージングのように応答が極めて速いアッセイの場合は、刺激による蛍光強度の変化をモニタリングするのは非常に困難です。



### 白血病細胞株K562細胞のカルシウムイメージングの例

SIEVEWELL™を用いた場合、細胞はウェルに格納されているため、試薬の添加などによる位置ずれを抑制します。そのため、浮遊細胞においてもカルシウムイメージングのような応答の速いアッセイが可能です。また、高密度に集積されているため、ひとつの視野で1,000細胞以上の蛍光強度の変化をモニタリングできます。

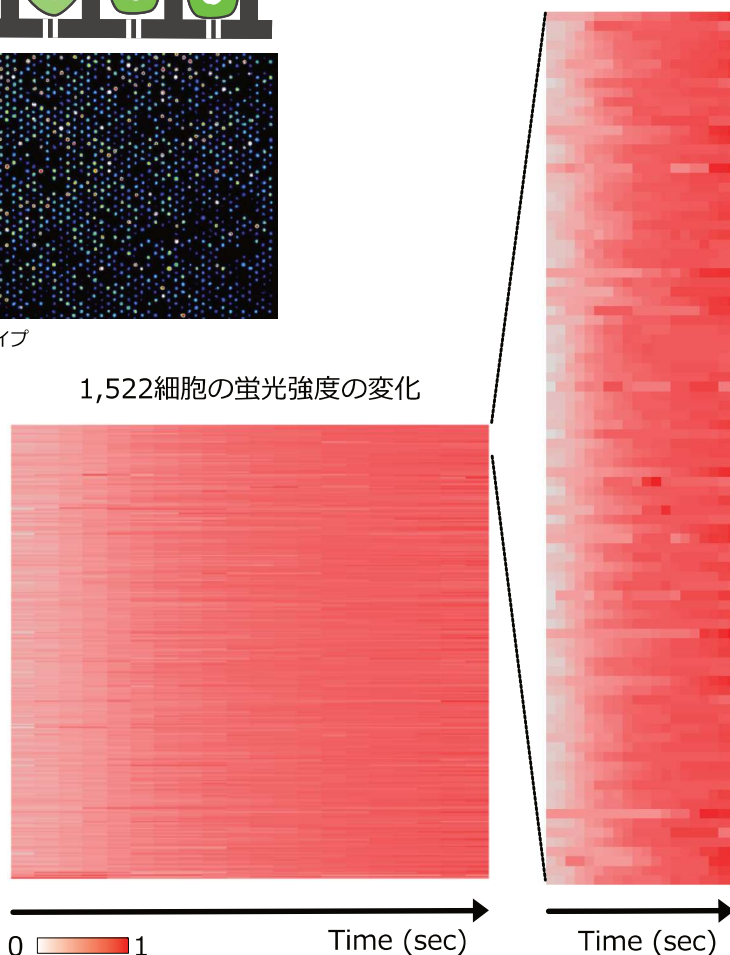
Ca<sup>2+</sup>イメージング



20μmタイプ

100細胞の蛍光強度の変化

1,522細胞の蛍光強度の変化



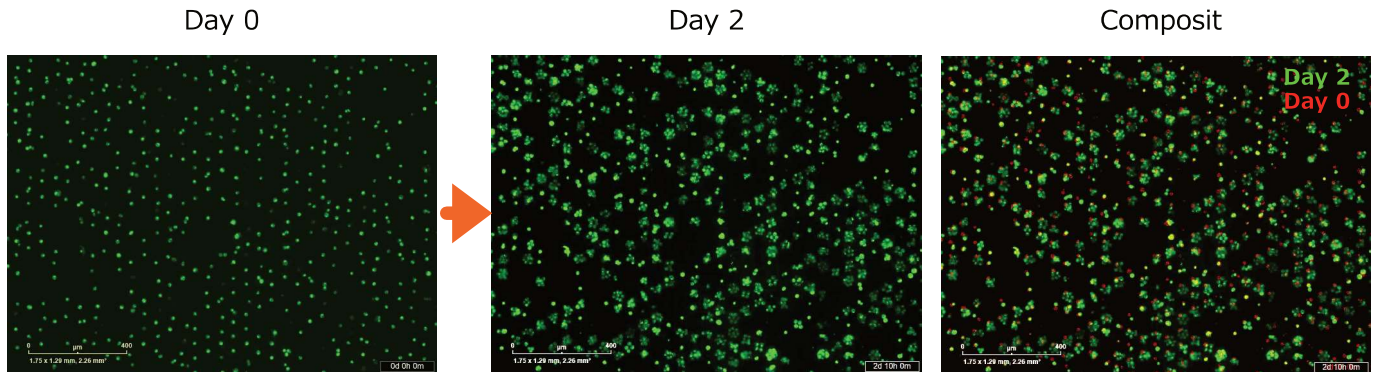
Fluo 4 -AMを5μMとなるよう添加したMEMdにて、慢性骨髄性白血病由来K562細胞を1時間培養した。PBS(-)で3回洗浄した後、SIEVEWELL™に播種し、上層の培地を除去した。5 μMのIonomycinを滴下し、蛍光倒立顕微鏡 (Keyence BZ-9000) で蛍光強度の変化を録画した。CALciumIMagingAnalyser (CALIMA)\*を用いて個々の細胞の蛍光強度の変化量を抽出した。変化量を正規化し、ヒートマップを作成した。

\* <https://aethelraed.nl/calciumimaginganalyser/index.html>  
 Comput Methods Programs Biomed 2019 Oct;179:104991.  
 doi: 10.1016/j.cmpb.2019.104991.

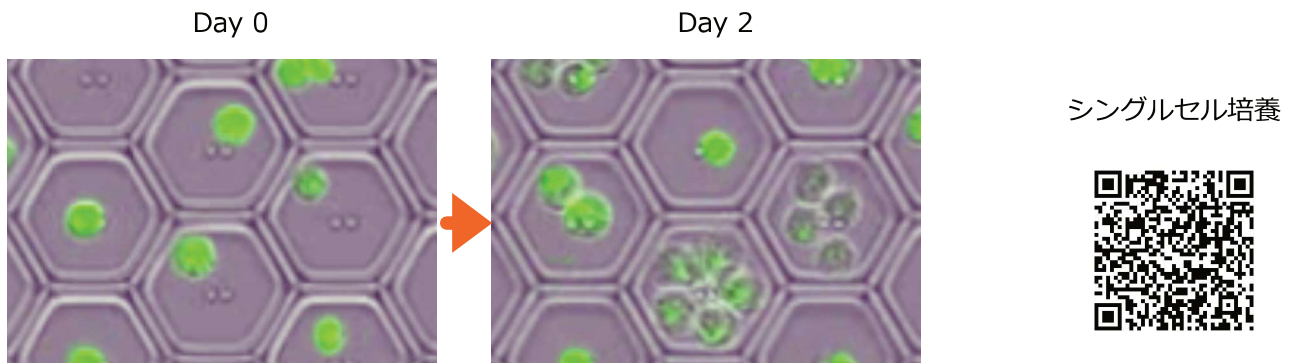
## シングルセル培養、モニタリング

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。

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  $\mu\text{m}$ 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。



CellBrite™ Greenで染色したK562細胞の増殖をIncuCyte® S3 Live-Cell Analysis Systemにより経時的に撮影した。

取り外し可能なふたが付属



# 細胞間相互作用アッセイ

ナノウェルに1つ以上の細胞を播種することで、細胞同士の相互作用のアッセイをシングルセルレベルでモニタリングすることができます。

## NK細胞によるガン細胞殺傷のモニタリング

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細胞をナノウェ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。

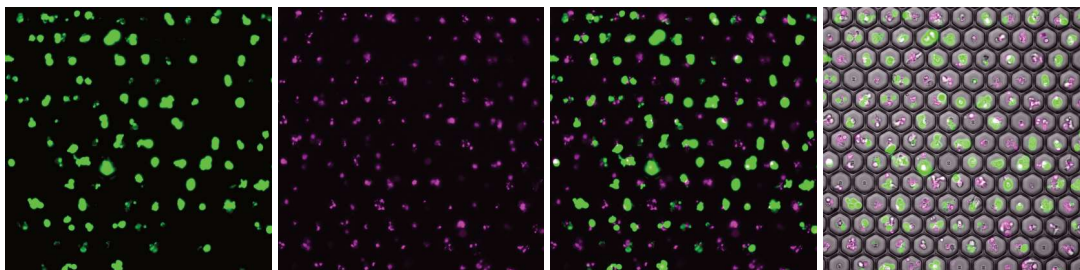
NK細胞によるK562のアポトーシス誘導



50 μmタイプ

Target: K562

Effector: KHYG-1



細胞傷害アッセイ

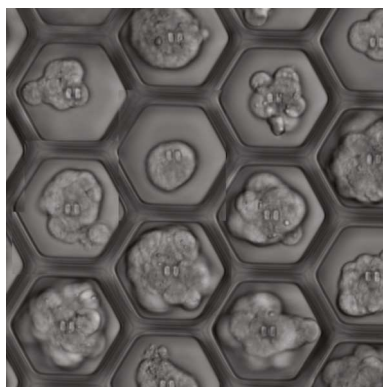


## スフェロイドの形成、培養

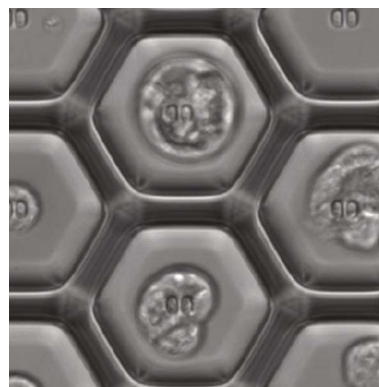
50μmタイプを使用することで、スフェロイドの培養が可能です。分散した細胞懸濁液をロードし、シングルセルを格納してスフェロイド形成をモニタリング、複数の細胞が入るように高濃度に播種して多数のスフェロイドを同時に形成するなど、実験によって様々な使い方が可能です。ウェルの底部には貫通孔が形成されているため、容易に培地の交換ができます。



HepG2のスフェロイド



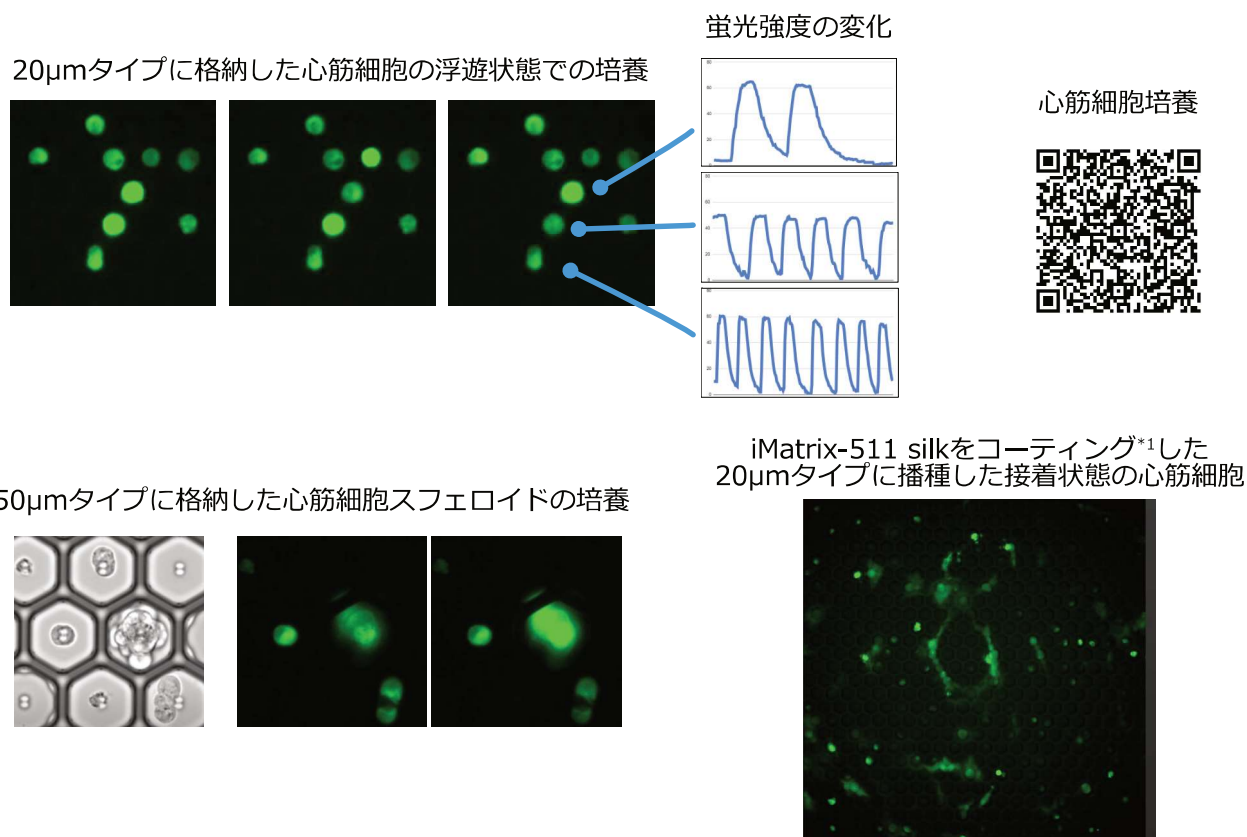
心筋細胞のスフェロイド



# 培養事例

## ヒトiPS細胞由来心筋細胞

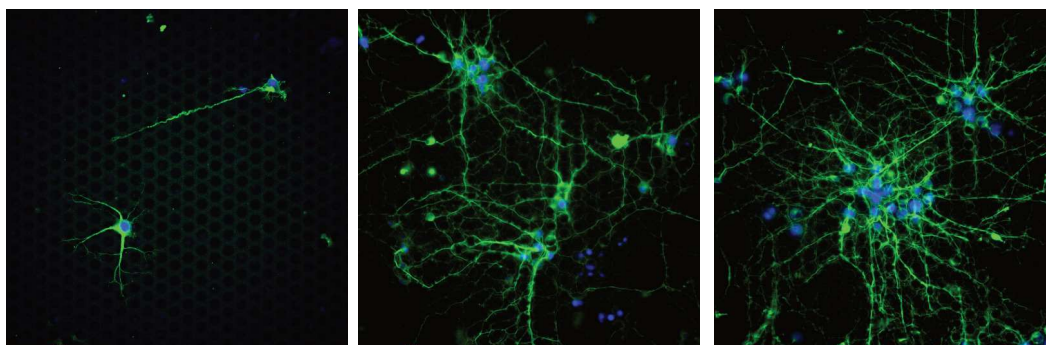
iPS細胞由来心筋細胞CarmyA-GCaMP (マイオリッジ社) の培養、カルシウムイメージングを行いました。CarmyA-GCaMPは、カルシウムセンサーであるGCaMPを恒常的に発現したiPS細胞由来心筋細胞です。浮遊状態のシングルセル、スフェロイド、接着状態でのカルシウムオシレーションのイメージングを行いました。



## 神経細胞のデバイス内分化

Cellmatrix® Type IV (Collagen, Type IV) をコーティング\*2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。

20μmタイプに播種、分化、免疫染色を行ったPC12細胞

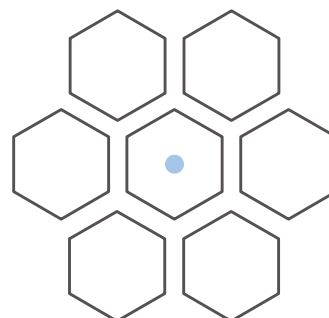
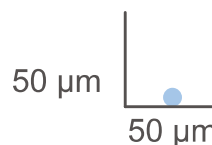


\*1,2 製品は細胞が接着しないよう非接着処理をしております。ECMなどのコーティングが必要な実験には無処理タイプが必要です。別途お問い合わせください。

## 製品仕様

## SIEVEWELL™ Slide

製品コード	SWS 2001-5	SWS 5001-5
ナノウェル寸法	幅 20 $\mu\text{m}$ 、深さ 25 $\mu\text{m}$	幅 50 $\mu\text{m}$ 、深さ 50 $\mu\text{m}$
ナノウェル数	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、細胞接着抑制処理
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

Single-cell multi-omics enabled discovery of alkaloid biosynthetic pathway genes in the medical plant *Catharanthus roseus*.

Bioarchive

doi: <https://doi.org/10.1101/2022.07.04.498697>.

Implementing microwell slides for detection and isolation of single circulating tumor cells from complex cell suspensions

*Cytometry*. 2022;1-11.

<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](mailto: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](http://www.sievewell.com)

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。

For research use only.