

日本語簡易ユーザーマニュアル

Cellartis® DEF-CS 500 Culture System を用いたヒト iPS/ES 細胞の培養

【内容】

1. 製品内容	2
2. 本品以外に必要な試薬・器具類	2
3. Cellartis DEF-CS 培地の調製	2
4. Cellartis DEF-CS COAT-1 を用いた培養器材のコーティング	3
5. 細胞解凍（凍結バイアル[3.0×10^6 cells]を解凍後、6 well plate に播種）	3
6. 培地交換	4
7. 継代（6 well plate → T25 flask）	4
8. 細胞凍結保存（T75 flaskの場合）	5
9. 他の培養環境から Cellartis DEF-CS 培養系への移行	6

（注意）本マニュアルは、Cellartis® DEF-CS™ Culture System User Manual Cat. No. Y30010 and Y30020 (220416)を基にした日本語簡易プロトコールです。ご使用前には必ず英文本書をお読みの上、実験を実施してください。

1. 製品内容

Cellartis DEF-CS 500 Basal Medium	500 mL	
Cellartis DEF-CS 500 COAT-1	4 mL ...	プレートコーティング剤
Cellartis DEF-CS 500 Additives		
・ DEF-CS GF-1	750 μ L \times 2	} 培地添加剤
・ DEF-CS GF-2	500 μ L	
・ DEF-CS GF-3	200 μ L	

DEF-CS 培地 500 mL で、最終回収時の細胞密度 ($1.5 - 3.0 \times 10^5$ cells/cm²) で約 600 cm² の面積まで細胞を拡大培養でき、T25 flask なら 24 本分、T75 flask なら 8 本分、T150 flask なら 4 本分の培養が可能です。

保存

Cellartis DEF-CS Basal medium、Cellartis DEF-CS COAT-1 : 4°Cで冷蔵保存(使用期限まで)。
Cellartis DEF-CS Additives (DEF-CS GF-1、-2、-3) : -20°Cで凍結保存(使用期限まで)。最初の融解後、使用する量に小分け分注し、1 回のみ凍結が可能。融解後は再凍結せず、2-8°Cで保存し、1 週間以内に使用する。

2. 本品以外に必要な試薬・器具類

- ・ ダルベッコ PBS Ca & Mg 含有 (D-PBS +/+) (PromoCell、Cat. No. C-40230 等)
- ・ ダルベッコ PBS Ca & Mg 不含 (D-PBS +/-) (PromoCell、Cat. No. C-40232 等)
- ・ 細胞剥離液 : TrypLE Select (Life Technologies、Cat. No. 12563-029)
- ・ 凍結保存液 : STEM-CELLBANKER (日本全薬工業株式会社、Cat. No. CB045)
- ・ 細胞培養容器 (6 well tissue culture plate、T25 及び T75 tissue culture flask 等)
- ・ プラスチックピペット
- ・ ピペットマン 及びフィルター付き滅菌チップ
- ・ 遠心管

3. Cellartis DEF-CS 培地の調製

用時調製を推奨。使用直前に Cellartis DEF-CS Basal Medium に添加剤(GF-1、GF-2、GF-3)を加え、37°Cに保温後、使用する。

※「細胞の解凍時」や「細胞の継代時」の培地には GF-1、GF-2、GF-3 の 3 種を添加する。

※「培地交換時」の培地には GF-1、GF-2 の 2 種を添加する。

※Cellartis DEF-CS Basal Medium は抗生物質ペニシリン/ストレプトマイシンを含む。

○解凍・継代用 Cellartis DEF-CS 培地の調製

下記組成を参考に必要量を用時調製後、37°Cに温めてから使用（加温は30分程度。時間が長いと培地の劣化をおこす）。

DEF-CS Basal Medium	10 mL	30 mL	100 mL
DEF-CS GF-1 (1/333 量添加)	30 µL	90 µL	300 µL
DEF-CS GF-2 (1/1000 量添加)	10 µL	30 µL	100 µL
DEF-CS GF-3 (1/1000 量添加)	10 µL	30 µL	100 µL

○培地交換用 Cellartis DEF-CS 培地の調製

下記組成を参考に必要量を用時調製後、37°Cに温めてから使用する（加温は30分程度。時間が長いと培地の劣化をおこす）。

DEF-CS Basal Medium	10 mL	30 mL	100 mL
DEF-CS GF-1 (1/333 量添加)	30 µL	90 µL	300 µL
DEF-CS GF-2 (1/1000 量添加)	10 µL	30 µL	100 µL

4. Cellartis DEF-CS COAT-1 を用いた培養器材のコーティング

※必ずカルシウム及びマグネシウム含有の D-PBS (++) で DEF-CS COAT-1 を希釈すること。

1) DEF-CS COAT-1 を 20 倍希釈する（下記参照）。

D-PBS (++)	1 mL	3 mL	9 mL
DEF-CS COAT-1 (1/20 量添加)	50 µL	150 µL	450 µL

2) ピペッティングにより混合する。

3) 培養容器の培養面全体を覆うようにコーティング溶液を添加 (0.1 mL/cm²) する（下記参照）。

培養容器	DEF-CS COAT-1 in D-PBS (++)溶液	培養容器	DEF-CS COAT-1 in D-PBS (++)溶液
48 well plate	0.1 mL/well	100 mm dish	6.0 mL
24 well plate	0.2 mL/well	T25 flask	2.5 mL
12 well plate	0.4 mL/well	T75 flask	7.5 mL
6 well plate (35 mm dish)	1.0 mL/well	T225 flask	22.5 mL

4) 37°Cで少なくとも20分以上静置する(あるいは、室温で30分~3時間静置)。

5) 使用直前にコーティング溶液を除去する。そのまま培養可能 (D-PBS 等での洗浄不要)。

5. 細胞解凍 (凍結バイアル[3.0 x 10⁶ cells]を解凍後、6 well plate の 1well に播種)

・自家調製保存液、あるいは市販の STEM-CELLBANKER で凍結保存された細胞(2.5 - 3.5 x 10⁶ cells/vial)を液体窒素あるいはドライアイス中で移送し、解凍に備える。

・ Cellartis DEF-CS Basal Medium に添加剤(GF-1、GF-2、GF-3) を加えて、Cellartis DEF-CS 培地 10 mL を調製後、解凍用：5 mL/15 mL チューブ（室温保存）、リンス用：1 mL/15 mL チューブ（室温保存）、培養用：4 mL/15 mL チューブ（37°C加温）の3本に分注しておく。

- 1) ピンセットを用いて凍結バイアルを 37°C恒温槽で、氷が完全に溶けない程度に融解する(目安 約1分30秒)。
- 2) 70%エタノールでバイアル表面を清拭後、安全キャビネットに移す。
- 3) ピペットを用いてバイアルの内容物を解凍用 DEF-CS 培地 5 mL/15 mL チューブ（室温）に移す*1。
- 4) リンス用 DEF-CS 培地 1 mL をバイアルに加え、リンスし、3) のチューブに加える。
- 5) 遠心する [300 x g、1 分間]。
- 6) 上清を除去し、タッピングにより細胞をほぐした後、培養用 DEF-CS 培地 4 mL (37°C)を添加し、穏やかにピペティングして再浮遊する。
- 7) 6 well plate のコーティング剤を直前に除去し、細胞全量を 1 well に播種する(1.0 - 3.0 x 10⁵ cells/cm²)
- 8) 翌日、GF-3 不含の DEF-CS 培地に交換する。

*1細胞へのストレスを軽減するために、凍結バイアルの内容物を解凍用 DEF-CS 培地 5 mL/15 mL チューブ（室温）に、直接デカントで氷塊ごと注いでもよい。

6. 培地交換

使用直前、必要量の Cellartis DEF-CS Basal Medium に添加剤 (GF-1、GF-2) を加え、37°Cに温めてから培地交換（目安 0.25 - 0.40 mL/cm² *2）に使用する。毎日の培地交換を推奨。細胞密度が低い場合は一日おきの培地交換も可能であるが、継代前日には必ず培地交換を実施する。

※細胞種毎に条件検討必要。継代翌日に培地が黄色い場合は培地量を増やし毎日の交換を推奨。

培養容器	DEF-CS 完全培地	培養容器	DEF-CS 完全培地
48 well plate	0.25 - (0.2) mL	100 mm dish	15.0 - (12.0) mL
24 well plate	0.5 - (0.4) mL	T25 flask	7.0 - (5.0) mL
12 well plate	1.0 - (0.8) mL	T75 flask	20.0 - (15.0) mL
6 well plate (35mm dish)	2.5 - (2.0) mL	T225 flask	60.0 - (45.0) mL

*2 培地交換の最少量は 0.2 mL/cm² の実績があり、上記表で () の液量となる。

7. 継代 (6 well plate → T25 flask)

継代のタイミングとして細胞密度 1.5 - 3.0 x 10⁵ cells/cm² を推奨。

- 1) T25 flaskを Cellartis DEF-CS COAT-1を用いてコートしておく。
- 2) 6 well plate培養中の1 wellについて培地を除去する。

3) 1 mL D-PBS (-/-)を用いて細胞表面を1回洗浄する。

4) D-PBS (-/-)を除去後、TrypLE selectを200 μ L添加 (目安 20 μ L/cm²)、細胞表面全体を覆うように溶液を広げる。

培養容器	TrypLE select	培養容器	TrypLE select
48 well plate	20 μ L/well	100 mm dish	1.2 mL
24 well plate	40 μ L/well	T25 flask	0.5 mL
12 well plate	80 μ L/well	T75 flask	1.5 mL
6 well plate (35mm dish)	200 μ L/well	T225 flask	4.5 mL

5) 37°C、4 - 5分間静置。顕微鏡下で細胞の剥離具合を確認する。

6) タッピングにより細胞を剥離する。

7) Cellartis DEF-CS培地(GF-1、GF-2、GF-3含有) を1.8 mL添加(合計2.0 mL) し、細胞を浮遊させる。

※TrypLE selectを10倍以上希釈する場合は、TrypLE select液を除去せずにstep 8へ進む。

(TrypLE selectを除去する場合は、細胞浮遊液を200 x g、2 - 5分間遠心し、上清を除く。)

8) トリパンブルー染色後、細胞数をカウントする。

9) T25 flask より Cellartis DEF-CS COAT-1 を除去後、Cellartis DEF-CS 培地 (GF-1、GF-2、GF-3 含有) を 4 mL 添加し、細胞密度 4.0 - 5.0 x 10⁴ cells/cm² となるように細胞を播種する。

※継代時の培地量は 0.15 - 0.25 mL/cm²。播種する細胞密度は細胞株により異なる。

※標準的な 1 週間の培養作業スケジュールは以下の通り。

月曜日	火曜日	水曜日	木曜日	金曜日	土曜日	日曜日
継代	培地交換	培地交換	継代	培地交換	—	培地交換

<参考> Cellartis human iPS cell line 4 (ChiPSC4)の場合

- ・細胞密度 5.0 x 10⁴ cells/cm² で播種した場合、培地交換は毎日実施し、継代 3 日目でコンフルエント(細胞密度 1.5 - 3.0 x 10⁵ cells/cm²)になる。
- ・細胞密度 4.0 x 10⁴ cells/cm² で播種した場合、培地交換は継代 1 日目と 3 日目に実施し、4 日目でコンフルエント(細胞密度 1.5 - 3.0 x 10⁵ cells/cm²)になる。
- ・細胞密度 2.0 x 10⁴ cells/cm² で播種した場合、培地交換は継代 1、3、5 日目に実施し、6 - 7 日目でコンフルエント(細胞密度 1.5 - 3.0 x 10⁵ cells/cm²)になる。

8. 細胞凍結保存 (T75 flaskの場合)

T75 flaskで拡大培養後、STEM-CELLBANKERを用いて下記操作手順に従って凍結保存する。

1) 培地を除去する。

2) 10 - 15 mL D-PBS (-/-)で細胞表面を 1 回洗浄する。

- 3) D-PBS (-/-)を除去後、TrypLE selectを1.5 mL添加 (目安 20 μ L/cm²)、細胞表面全体を覆うように溶液を広げる。
- 4) 37°C、4 - 5 分間静置。顕微鏡下で細胞の剥離具合を確認する。
- 5) タッピングにより細胞を剥離する。
- 6) Cellartis DEF-CS 培地(GF-1、GF-2、GF-3 含有)を 8.5 mL 添加(合計 10 mL) し、ピペッティングによりシングルセルに分散する。
- 7) トリパンブルー染色後、細胞数をカウントする。
- 8) 細胞浮遊液を 4 °Cまたは室温で、200 x g、2 - 5 分間遠心する。
- 9) 上清を除去し、タッピングにより細胞をほぐした後、適量の STEM-CELLBANKER を添加して細胞を再浮遊させる(目安 2.5 - 3.5 x 10⁶ cells/mL/vial)。
- 10) 予め 4°Cに保冷した細胞凍結バイアルに分注し、緩慢凍結後、液体窒素保管容器で保存する。

<参考> 緩慢凍結法の例

バイアルを緩慢凍結用容器(日本フリーザー社製 BICELL など)に挿入し、ディープフリーザーにて凍結後(一晚以上)、液体窒素保管容器に移す。

9. 他の培養環境からCellartis DEF-CS 培養系への移行

On Feeder または Feeder Free など他の培養系より回収した細胞、あるいは、凍結 hiPS/hES 細胞より直接 DEF-CS 培養系への移行が可能です。

[A] 他培養系で培養中の hiPS/hES 細胞を移行する場合

- 1) 移行に使用する細胞は他の培養系で用いていた方法(継代時期や剥離方法)に従って回収する。
- 2) 回収細胞は Cellartis DEF-CS 培地(GF-1、GF-2、GF-3 含有)に培地交換して、Cellartis DEF-CS COAT-1 でコーティングした培養容器へ全量を播種する。この時、同じ培養面積の培養容器へ植え継ぐ (例 6 well plate の 1well \Rightarrow 6 well plate の 1well へ移行)。
 ※移行に用いる細胞はコロニー、クラスター、シングルセルのいずれの形態も利用可能。
 ※DEF-CS 培養系の標準密度 (4.0 - 5.0 x 10⁴ cells/cm²) にて播種することで良好な結果が得られる場合がある。
- 3) 次の継代から、本プロトコールに従って培養を継続する。

[B] hiPS/hES 凍結細胞から移行する場合

解凍工程から、本プロトコールに従って細胞を解凍し、培養を実施する。

<移行時の注意点>

※移行時の継代は、Cellartis DEF-CS COAT-1 の濃度を通常より高くして生着率を高める (通常 1:20 \Rightarrow 1:5)。

※移行時の継代は、細胞密度を高くして植え継ぐ（同じ培養面積に全量植え継ぐ、または 8.0×10^4 cells/cm² で播種など）。

※移行直後は、細胞増殖が遅くなることがあるので、次回継代に最適な細胞密度（ $1.5 - 2.0 \times 10^5$ cells/cm²）に到達するまで、培養期間を 3-7 日間の間で調整する。但し 7 日間培養後も最適な細胞密度に到達しない場合には、培養 7 日目での継代の実施を推奨する。

以上