

製品コード WK552S

研究用

Takara

**LymphoONE™ T-Cell Expansion
Xeno-Free Medium, 1L Bottle**

説明書

v201901

LymphoONE T-Cell Expansion Xeno-Free Medium は、ヒト T リンパ球 (T 細胞) の拡大培養や、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターを用いた T リンパ球への遺伝子導入に適した培地です。培地中にはヒト血清アルブミン (医薬品グレード) と組換え型ヒトインスリン以外のタンパク質や成長因子は添加していません。本培地では、培地成分の最適化により、従来品 GT-T551 Culture medium (製品コード WK551S) と比較し、血清や血漿を添加しない場合の T 細胞増殖率が向上しています。

LymphoONE T-Cell Expansion Xeno-Free Medium は、すべての製造ロットで無菌、マイコプラズマ、エンドトキシン、リンパ球増殖などの各種試験が行われ、また、pH 及び浸透圧についても基準値内であることが確認されています。

T 細胞を拡大培養する際の出発材料としては、通常、末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) を使用でき、特に T 細胞を単離する必要はありません。PBMCs は、市販細胞を使用するか、あるいは末梢血から密度勾配遠心等により得ることができます。

I. 内容

LymphoONE T-Cell Expansion Xeno-Free Medium, 1L Bottle 1,000 ml

II. 保存 2 ~ 8°C

III. 使用方法

LymphoONE T-Cell Expansion Xeno-Free Medium には、ヒト血清アルブミン、ヒトインスリン、L- グルタミンおよびストレプトマイシンが添加されており、T 細胞の培養にそのまま使用することができます。LymphoONE T-Cell Expansion Xeno-Free Medium は、血清や血漿を添加しなくても、T 細胞の拡大培養に使用可能ですが、添加することで細胞増殖率がより向上することがあります。

T 細胞は、anti-CD3 mAb (抗 CD3 抗体) で刺激後、サイトカイン (IL-2 や IL-15 等) を含む LymphoONE T-Cell Expansion Xeno-Free Medium を用いて培養することで、増殖させることができます¹⁻³⁾。この anti-CD3 mAb による刺激の際に、RetroNectin® を用いて同時に刺激することで、T 細胞の増殖を増強することができます。また、その増殖した細胞集団中には、anti-CD3 mAb 単独で刺激した時と比較して、より多くのナイーブ T 細胞が含まれます⁴⁻⁸⁾。

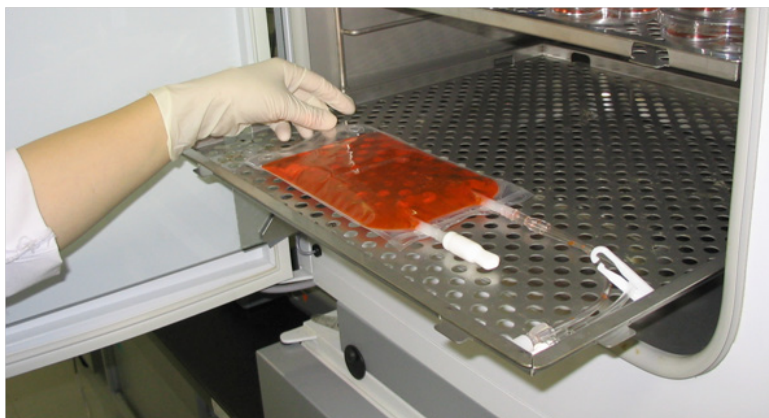
IV. 応用例：RetroNectin 共刺激による T 細胞の拡大培養

LymphoONE T-Cell Expansion Xeno-Free Medium とガス透過性培養用バッグを用いて、RetroNectin 共刺激により T 細胞を拡大培養した。

注：RetroNectin を用いた T 細胞拡大培養は、研究目的以外での使用の場合、タカラバイオとのライセンス契約の締結が必要です。

【方法】

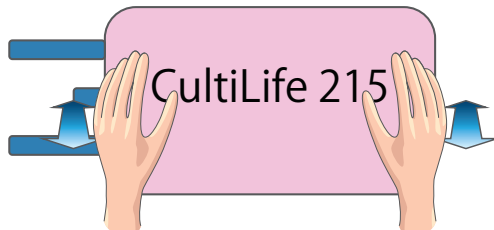
- 1) Cultilife™ 215 Culture bag (製品コード FU0005) への Anti-CD3 mAb (製品コード T210) と RetroNectin (製品コード T100A/B、T202) のコーティング (セットアップ; Day 0)
 1. Anti-CD3 mAb (5 μ g/ml) と RetroNectin (25 μ g/ml) を含む PBS を 30 ml 調製する。
 2. Cultilife 215 Culture bag 内に全量添加する。
 3. 37℃、5% CO₂ インキュベーター内で 2～5 時間保温し、コーティングする。
 4. bag 内の溶液を全量除去する。
 5. PBS 30 ml を用いて bag 内を 3 回洗浄する。
※ 最後の洗浄液は、PBMCs を播種する直前に除去する。
- 2) PBMCs の播種
 1. PBMCs 約 3×10^7 細胞を、0～1% のヒト血清あるいは血漿を含む 30～50 ml の LymphoONE T-Cell Expansion Xeno-Free Medium に懸濁する。
 2. 方法 -1) でコーティング処理した Cultilife 215 Culture bag 内に、PBMC 懸濁液を全量添加する。
 3. bag 内に 0～1% のヒト血清あるいは血漿を含む LymphoONE T-Cell Expansion Xeno-Free Medium を、液量が 200～300 ml になるまで添加し、さらに IL-2 を終濃度 200～1,000 U/ml となるように添加する。
 4. 37℃、5% CO₂ インキュベーター内で培養する。



3) 継代 (Day 4)

1. CultiLife 215 Culture bag 内の細胞を以下に示す方法により懸濁後回収し、新しい GT-T610 (CultiLife Eva) Culture bag (製品コード FU0010) 内に移す。

[懸濁方法] RetroNectin がコーティングされた bag で培養した細胞は、bag に強く接着しているため、図に示すように両手で 50 回程度交互に押さえて培養液を揺らすことにより懸濁することができる。



2. 顕微鏡下、CultiLife 215 Culture bag 内に細胞がほとんど残っていないことを確認する。
※ もし、細胞が残っているようであれば適当量の培地を bag 内に添加し、上記と同様の操作により回収することが可能である。
3. 適当量の LymphoONE T-Cell Expansion Xeno-Free Medium、及び IL-2 (終濃度 200 ~ 1,000 U/ml 培養液量) を添加する。
※ この時点で、必要に応じて GT-T610 Culture bag のバッグ枚数を増やすことができる (表 1 参照)。GT-T610 の最大液量は 1,000 ml である。
4. 37℃、5% CO₂ インキュベーター内で培養継続する。
※ 以降、細胞増殖にあわせて、適宜希釈しながら 10 ~ 14 日間培養を継続する (表 1 参照)。

4) 細胞回収 (Day 10 ~ 14)

1. 方法 -3) と同様の操作により、GT-T610 Culture bag 内の培養液を 20 ~ 30 回程度揺らすことにより細胞を懸濁する。
2. 細胞懸濁液を bag より回収する。
3. 細胞を遠心あるいは適当な細胞洗浄装置を用いて洗浄する。
※ 0.1% ヒト血清アルブミンを含む PBS あるいは生理食塩水が洗浄溶液として使用可能である。

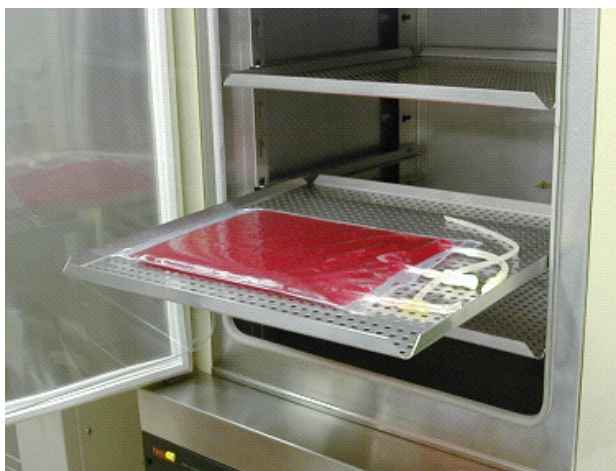


表 1. 培養例

	Day 0	Day 4	Day 7	Day 10
細胞数	3×10^7 cells			
培養液量	300 ml	$500 \text{ ml} \times 5^{*3}$	$1,000 \text{ ml} \times 5^{*4}$	
培養面積	215 cm^2^{*1}	$640 \text{ cm}^2^{*2} \times 5$		
	CultiLife 215 \times 1	GT-T610 \times 5		細胞回収

* 1 : CultiLife 215 Culture bag の培養面積は 215 cm^2 です。

* 2 : GT-T610 (CultiLife Eva) Culture bag の培養面積は 640 cm^2 です。

* 3 : Day 4 での細胞濃度が 4×10^5 cells/ml 未満の場合は、さらに 1 日そのまま培養することをお勧めします。Day 4 は 5×10^4 cells/ml 以上の細胞濃度になるように継代してください。

* 4 : この時点では、 5×10^5 cells/ml 以上の細胞濃度になるように継代してください。

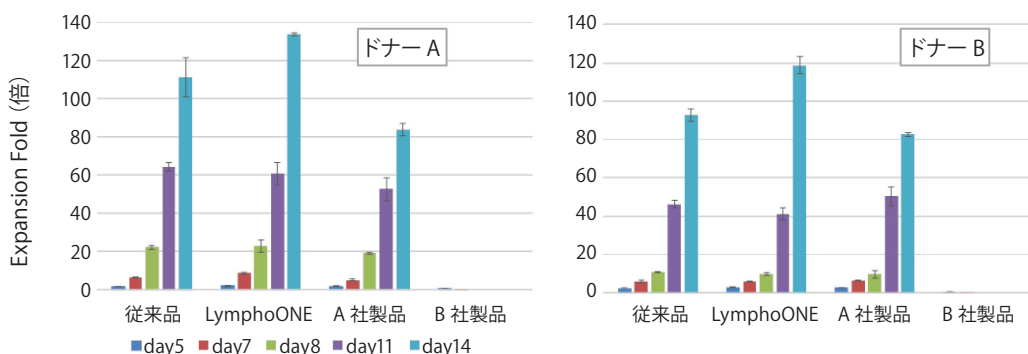
【Tリンパ球の拡大培養における培地性能の比較】

方法

インフォームドコンセントを得た健康人ドナー 2 名より採取した血液から、末梢血単核球 (PBMC) および血漿を単離した。

PBMC を CultiLife215 Culture bag 固定化 Anti-CD3 mAb 刺激下で 4 日間培養後、IL-2 を含むリンパ球培養用培地で適宜希釈しながらさらに 10 日間培養した。

結果



LymphoONE T-Cell Expansion Xeno-Free Medium は血清 (human AB serum) 無添加でも高い拡大培養率が観察され、従来品より増殖能が優れていることが確認された。

【 RetroNectin 共刺激による T リンパ球拡大培養例 】

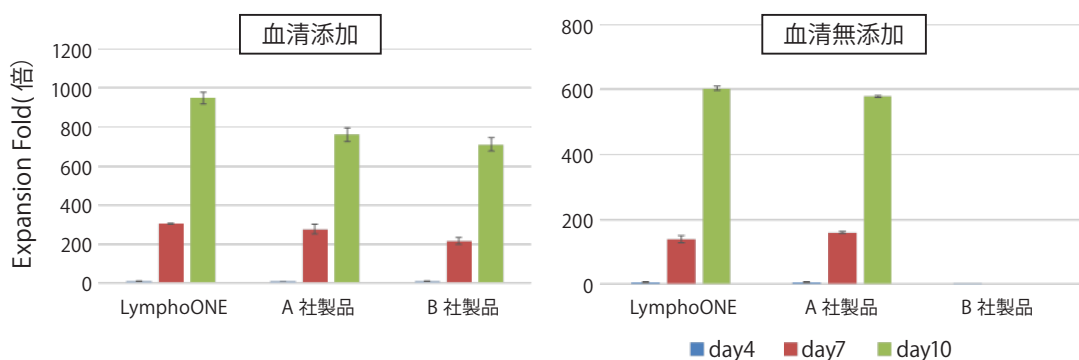
方法

ヒト末梢血単核球 (PBMC) を CultiLife215 Culture bag 固定化 Anti-CD3 mAb と RetroNectin の共刺激下で 4 日間培養後、IL-2 を含むリンパ球培養用培地を用い、血清 (human AB serum) の有無の条件で 10 日間培養を行った。

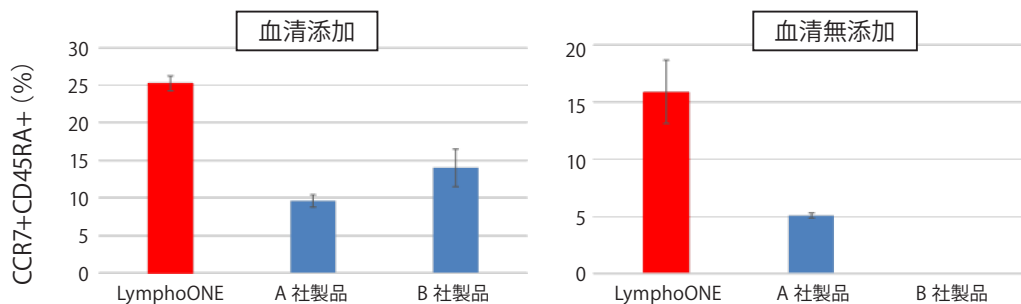
血清添加条件として、Day0 ~ Day7 は 1% 血清を含み、Day7 ~ Day10 は 0.5% 血清を含む条件で培養した。

結果

拡大培養率



ナイーブ T 細胞比率



LymphoONE T-Cell Expansion Xeno-Free Medium は血清 (human AB serum) 無添加でも高い拡大培養率が観察され、得られた細胞集団中には ナイーブ T 細胞が多く含まれていることが確認された。

V. 参考文献

- 1) Wang, Y., *et al.* CIK cells from recurrent or refractory AML patients can be efficiently expanded in vitro and used for reduction of leukemic blasts in vivo. *Exp Hematol.* (2013) **41**(3): 241-252.
- 2) Ai, Y. Q., *et al.* The clinical effects of dendritic cell vaccines combined with cytokine-induced killer cells intraperitoneal injected on patients with malignant ascites. *Int J Clin Exp Med.* (2014) **7**(11): 4272-4281.
- 3) Dodo, K., *et al.* An efficient large-scale retroviral transduction method involving preloading the vector into a RetroNectin-coated bag with low-temperature shaking. *PLoS ONE.* (2014) **9**(1): e86275.
- 4) Yu, S. S., *et al.* In vivo persistence of genetically modified T cells generated ex vivo using the fibronectin CH296 stimulation method. *Cancer Gene Ther.* (2008) **15**(8): 508-516.
- 5) Ishikawa, T., *et al.* Phase I clinical trial of fibronectin CH296-stimulated T cell therapy in patients with advanced cancer. *PLoS ONE.* (2014) **9**(1): e83786.
- 6) Hosoi, H., *et al.* Stimulation through very late antigen-4 and -5 improves the multifunctionality and memory formation of CD8⁺ T cells. *Eur J Immunol.* (2014) **44**(6): 1747-1758.
- 7) Sakamoto, N., *et al.* Phase I clinical trial of autologous NK cell therapy using novel expansion method in patients with advanced digestive cancer. *J Transl Med.* (2015) **13**: 277.
- 8) Li, W., *et al.* Efficacy of RetroNectin-activated cytokine-induced killer cell therapy in metastatic brain tumor patients. *Oncol Res Treat.* (2015) **38**(4): 160-165.

VI. 関連製品

RetroNectin® (Recombinant Human Fibronectin Fragment) (製品コード T100A/B)

RetroNectin® GMP grade Recombinant Human Fibronectin Fragment CH-296

(製品コード T202)

Anti-CD3 mAb GMP grade (Anti-CD3 monoclonal antibody (Clone OKT3)) (製品コード T210)

CultiLife™ 215 Culture bag (製品コード FU0005)

GT-T610 (CultiLife™ Eva) Culture bag (製品コード FU0010)

VII. 注意

- ・本製品は、研究用試薬です。ヒト、動物への医療、臨床診断には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
- ・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
- ・ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
- ・RetroNectin はタカラバイオ株式会社の登録商標です。LymphoONE、CultiLife はタカラバイオ株式会社の商標です、その他、本説明書に記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999 Fax 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社