

製品コード Y50210

研究用

Takara

**Cellartis[®] MSC Xeno-Free
GMP Grade Culture Medium**

説明書

v202203

目次

I.	製品説明.....	3
II.	内容.....	3
III.	保存.....	3
IV.	操作上の注意.....	3
V.	本製品以外に必要な試薬、器具（主なもの）.....	4
VI.	使用法.....	4
	VI-1. Cellartis MSC Xeno-Free Culture Medium の調製法.....	4
	VI-2. 細胞の解凍.....	5
	VI-3. 培地交換.....	6
	VI-4. 継代.....	6
	VI-5. 細胞の凍結.....	7
VII.	関連製品.....	8
VIII.	注意.....	8

I. 製品説明

ヒト間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells : MSC) は様々な種類の細胞に分化することができる自己複製能をもつ多能性細胞です。MSC は *in vitro* や *in vivo* において脂肪細胞、軟骨細胞および骨芽細胞のほか、神経細胞、肝細胞および膵島細胞へも分化することが報告されています。その一方、MSC の自己複製能や多分化能は長期培養や過培養により容易に失われ易く、これら細胞機能を安定に維持するためには、最適化された環境下で培養維持する必要があります。

本製品は、BSA などの非ヒト由来成分を含まない Xeno-Free のヒト MSC 培養用培地であり、コート剤を用いることなく、良好な増殖と未分化状態を維持した培養が可能です*。また、Cellartis MSC Xeno-Free GMP Grade Culture Medium は、GMP グレードのヒト MSC 培養用培地であり、PIC/S (医薬品査察協定及び医薬品査察共同スキーム) の GMP ガイドラインに準拠した施設で、製造および品質管理されています。

* : RetroNectin® または、フィブロネクチン (ヒト) で培養基材をコートすることで、増殖性などを高く維持できる場合があります。

II. 内容

Cellartis MSC Xeno-Free GMP Grade Basal Medium	475 ml
Cellartis MSC Xeno-Free GMP Grade Supplement	25 ml

III. 保存

Cellartis MSC Xeno-Free GMP Grade Basal Medium : 到着後 2 ~ 8°C で保存
(凍結保存はしないでください)

Cellartis MSC Xeno-Free GMP Grade Supplement : 使用前まで -30°C 以下で保存
(再凍結はしないでください)

IV. 操作上の注意

1. 高温多湿、紫外線や直射日光は避けてください。
2. Cellartis MSC Xeno-Free GMP Grade Supplement は解凍後少し濁りが出ますが、性能に影響はありません。よく懸濁してそのままご使用ください。
3. 調製後の Cellartis MSC Xeno-Free Culture Medium は 4°C で保管し、長時間室温下で放置しないでください。性能劣化の原因となります。
4. 調製後は 1 ヶ月を目途に使用してください。
5. Cellartis MSC Xeno-Free Culture Medium を使用する場合は、全量を直接加温することは避け、必要量を分注して室温 ~ 37°C で加温してからご使用ください。また、凍結保存はしないでください。
6. 抗生物質不含培地です。抗生物質の添加は推奨しませんが、添加される際はあらかじめ添加条件を検討されることを推奨します。
7. 本製品はコート剤がなくても培養が可能です。RetroNectin または、フィブロネクチン (ヒト) で培養基材をコートすることで増殖性などを高く維持できる場合があります。ご使用の目的に応じてコート剤の必要性について検討を行うことを推奨します。

V. 本製品以外に必要な試薬、器具（主なもの）

- ・37℃、5% CO₂ インキュベーター
- ・クリーンベンチまたは安全キャビネット
- ・遠心機
- ・顕微鏡
- ・恒温槽
- ・-80℃ディープフリーザー
- ・液体窒素保管容器または-150℃ディープフリーザー
- ・凍結処理容器（バイセル、Mr. フロステイ等）
- ・氷、保冷容器
- ・電動ピペッターおよびプラスチックピペット
- ・ピペットマンおよび（フィルター付き）滅菌チップ
- ・遠沈管
- ・細胞培養容器
 - <参考> ※弊社使用実績あり
 - 12 ウェル 透明 細胞培養処理 マルチウェルプレート (Costar : Code. 3513)
 - 6 ウェル 透明 細胞培養処理 マルチウェルプレート (Costar : Code. 3516)
 - 25 cm² 長方形型カントネック細胞培養用フラスコ, ベントキャップ付き (Corning : Code. 430639)
 - 75 cm² U-Shaped Canted Neck Cell Culture Flask with Vent Cap (Corning : Code. 430641U)
- ・クライオバイアル
- ・ヒト由来間葉系幹細胞
- ・PBS
- ・剥離剤
 - <推奨> Accumax (Innovative Cell Technologies, Inc : Code. AM105)
- ・コート剤 ※培養容器をコーティングしない場合は不要
 - <推奨> RetroNectin GMP grade (製品コード T202)
 - RetroNectin (Recombinant Human Fibronectin Fragment) (製品コード T100A/B)
 - フィブロネクチン (ヒト)
- ・凍結保存液
 - <推奨> STEM-CELLBANKER® GMP grade (製品コード CB045/CB047)
- ・トリパンブルー溶液
- ・血球計算盤
- ・消毒用エタノール

VI. 使用法

培地の調製、培養操作は安全キャビネットまたはクリーンベンチを用いて無菌操作で実施してください。

VI-1. Cellartis MSC Xeno-Free Culture Medium の調製法

1. Cellartis MSC Xeno-Free GMP Grade Supplement を室温もしくは4℃ (O/N 可) で解凍する。
 - [注] 解凍後の Cellartis MSC Xeno-Free GMP Grade Supplement は、長時間室温下に放置せず、すみやかに使用してください。
2. Cellartis MSC Xeno-Free GMP Grade Basal Medium に解凍した Cellartis MSC Xeno-Free GMP Grade Supplement を全量添加し、十分に混合する。
 - [注] 調製後の Cellartis MSC Xeno-Free Culture Medium は4℃で保存し、1ヶ月を目途に使用してください。凍結保存はできません。

VI-2. 細胞の解凍

1. 恒温槽を 37°C に設定する。
2. Cellartis MSC Xeno-Free Culture Medium は使用する分を分注して、室温～37°C にて加温する。
[注] 長時間の加温は避けてください。培地劣化の原因となります。
3. <オプション> ※培養容器をコーティングしない場合は実施不要
培養容器の底面に 10 µg/ml RetroNectin または、フィブロネクチン (ヒト) (PBS で希釈) を均一に広げた後 (表 1 参照)、室温で 30 分以上静置する。
4. 15 ml チューブに 5 ml の Cellartis MSC Xeno-Free Culture Medium を分注する。
5. 凍結細胞を小さな氷塊が残る程度に解凍する。
[注] 1 ml/vial であれば 90～120 秒が目安となります。氷が完全になくなるまで加温しないように注意してください。
6. キムワイプ等で水気を拭い、さらに消毒用エタノールで清拭する。
7. バイアルから準備していた 4. の Cellartis MSC Xeno-Free Culture Medium に細胞を移す。
8. 1 ml の Cellartis MSC Xeno-Free Culture Medium でバイアルを共洗いして回収する。
9. 200 × g、5 分間、室温で遠心する。
10. 上清を 0.2 ml 程残して除去する。軽くタッピングしてペレットをほぐす。
11. バイアルに記載の細胞数に合わせて Cellartis MSC Xeno-Free Culture Medium を添加する。5 × 10⁵ ～ 1 × 10⁶ cells/ml に調製する。
12. 細胞を穏やかに懸濁しサンプリングを行う。細胞カウントを行い、生存率を算出する。
13. 播種密度 4 × 10³ ～ 8 × 10³ cells/cm² に調製する (表 1 参照)。
[注] 細胞の生存率が悪くなければ、4 × 10³ cells/cm² を推奨します。
14. 培養容器に細胞を播種する (コート剤添加の場合は播種前にコート剤を除去する)。
15. 5% CO₂、37°C インキュベーターで培養を開始する。

表 1

培養容器	コート剤 剥離剤	培地量	播種数 4 × 10 ³ ～ 8 × 10 ³ cells/cm ²
12 ウェルプレート	0.4 ml/well	1 ml/well	1.5 × 10 ⁴ ～ 3 × 10 ⁴ cells/well
6 ウェルプレート	1 ml/well	2 ml/well	4 × 10 ⁴ ～ 8 × 10 ⁴ cells/well
T25 フラスコ	2.5 ml/Flask	5 ml/Flask	1 × 10 ⁵ ～ 2 × 10 ⁵ cells/Flask
T75 フラスコ	7.5 ml/Flask	15 ml/Flask	3 × 10 ⁵ ～ 6 × 10 ⁵ cells/Flask

VI-3. 培地交換

細胞播種後の培地交換は1～2日おきに表2を目安に行う。

1. Cellartis MSC Xeno-Free Culture Medium は使用する分を分注して、室温～37℃に加温する。
2. 培養上清をアスピレータ等で除去し、速やかに新しい Cellartis MSC Xeno-Free Culture Medium を添加する（表1参照）。

表2

Day 0	解凍播種・継代日		
Day 1			
Day 2	培地交換		培地交換
Day 3	継代	培地交換	
Day 4		継代	培地交換
Day 5			継代

VI-4. 継代

1. 顕微鏡にて細胞を観察する。継代は70～80%コンフルエントで実施する。
[注] 過密培養に注意してください。隙間がなくなり細胞が密になると細胞同士の接着が強固になりシート状に剥離してしまいます。増殖速度を定期的（1日ごと、午前午後2回等）に観察し、適切なタイミングで継代するようにして下さい。継代前日に培地交換を実施することを推奨します。
2. Cellartis MSC Xeno-Free Culture Medium は使用する分を分注して、室温～37℃に加温する。
3. <オプション> ※培養器材をコーティングしない場合は実施不要
培養容器の底面に10 µg/ml RetroNectin または、フィブロネクチン（ヒト）(PBSで希釈)を均一に広げた後（表1参照）、室温で30分以上静置する。
4. 培養容器から培養液を除去し、すみやかに培地量と等量の洗浄用PBSを添加する。
5. 洗浄用PBSを除去し、100 µl/cm²でAccumax（剥離剤）を添加し均一に広げる（表1参照）。37℃で5～7分インキュベートし、軽く側面を叩いて剥離する。検鏡確認して細胞が十分に剥離していない場合は1～3分インキュベート時間を追加する。
[注] Accumax 以外の剥離剤を使用する場合は、使用する剥離剤の取扱説明書に従ってください。
6. 細胞を遠沈管に回収する。添加した剥離剤と等量の Cellartis MSC Xeno-Free Culture Medium で培養容器を共洗いして同じ遠沈管に細胞を回収する。添加した剥離剤の5～10倍量の Cellartis MSC Xeno-Free Culture Medium で細胞懸濁液を希釈する。
7. 200×g、5分間、室温で遠心する。
8. 上清を0.2 ml 程残して除去する。軽くタッピングしてペレットをほぐす。
9. おおよそで5×10⁵～1×10⁶ cells/ml になるように Cellartis MSC Xeno-Free Culture Medium を添加する。
10. 細胞を穏やかに懸濁しサンプリングと細胞カウントを行う。
11. 播種密度4×10³～8×10³ cells/cm² に調製する（表1参照）。
12. 培養容器に細胞を播種する（コート剤添加の場合は播種前にコート剤を除去する）。
13. 5% CO₂、37℃インキュベーターで培養を開始する。

VI-5. 細胞の凍結

- 顕微鏡にて細胞を観察する。凍結保存は 70 ~ 80%コンフルエントで実施する。
[注] 過密培養に注意してください。隙間がなくなり細胞が密になると細胞同士
の接着が強固になりシート状に剥離してしまいます。増殖速度を定期的
(1日ごと、午前午後2回等)に観察し、適切なタイミングで継代するよう
にしてください。保存前日に培地交換することを推奨します。
- 使用する剥離剤の10倍量の Cellartis MSC Xeno-Free Culture Medium を分注して、
室温~37°Cに加温する。
- 培養容器から培養液を除去し、すみやかに培地量と等量の洗浄用 PBS を添加する。
- 洗浄用 PBS を除去し、100 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ で Accumax を添加し均一に広げる (表 1 参照)。
37°Cで5~7分インキュベートし、軽く側面を叩いて剥離する。検鏡確認して細胞
が十分に剥離していない場合は1~3分インキュベート時間を追加する。
[注] Accumax 以外の剥離剤を使用する場合は、使用する剥離剤の取扱説明書に
従ってください。
- 細胞を遠沈管に回収する。剥離剤と等量の Cellartis MSC Xeno-Free Culture Medium
で培養容器を共洗いして同じ遠沈管に細胞を回収する。残りの回収用培地で細胞懸
濁液を希釈する。
- 細胞を穏やかに懸濁しサンプリングを行う。細胞カウントを行い、細胞密度を算出
する。
[注] 細胞密度が薄い場合は、一度遠心回収し濃縮して細胞カウントを行ってく
ださい。
- 凍結保存細胞数とバイアル数より凍結保存液の液量を決定する。
< STEM-CELLBANKER GMP grade 使用の場合 >
5 × 10⁵ ~ 5 × 10⁶/ml になるように STEM-CELLBANKER GMP grade で調製する。
[注] 保存本数が多い場合は、凍結保存液添加後、加温しないように氷や保冷容
器で細胞を維持してください。
- 200 × g、5 分間、室温で遠心する。遠心中に凍結処理容器、凍結保存液およびクラ
イオバイアルを準備する。
- 上清を 0.2 ml 程残して除去する。軽くタッピングしてペレットをほぐす。
- 凍結保存液を添加し、穏やかに混合する。均一になったところで準備したバイアル
にすみやかに分注する。凍結保存用バイアルを凍結処理容器に入れ、-80°Cのディ
ーフリーザーで3時間以上静置する。
[注] 凍結時間は凍結処理容器の使用法に従ってください。
- 凍結後、液体窒素または-150°Cフリーザーに移す。

VII. 関連製品

[培地]

Cellartis® MSC Xeno-Free Culture Medium (製品コード Y50200)

Cellartis® MSC Xeno-Free Culture Medium (w/o Phenol Red) (製品コード Y50205)

[細胞]

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (製品コード C-12974)

ヒト臍帯マトリックス由来間葉系幹細胞 (製品コード C-12971)

ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞 (製品コード C-12977)

[コート剤]

RetroNectin® GMP grade (製品コード T202)

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

Fibronectin Solution human (1 mg/ml) (製品コード C-43060)

[PBS]

Dulbecco's PBS (製品コード C-40230)

[凍結保存液]

STEM-CELLBANKER® GMP grade (製品コード CB045/CB047)

VIII. 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、CellartisはTakara Bio Europe ABの、CELLBANKERは日本全葉工業株式会社の登録商標です。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。
- ・本製品の使用によって生じたいかなる事故、損害についても、弊社では責任を負いかねますので、ご了承の上で使用ください。

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 <https://www.takara-bio.co.jp>

タカラバイオ株式会社