

NcMission™ hMSC Medium V3.0

目次 # RP02010 1 Kit (2 L)

製品説明

NcMission™ hMSC Medium V3.0 は、初代のヒト間葉系幹細胞 (Human Mesenchymal Stem Cell、 hMSC) に適した無血清、動物由来成分を含まない完全培地です。hMSC は本培地の中で安定的に増殖し、細胞表面マーカーが正常に発現し (CD73+/CD90+/CD105+、 CD14-/CD34-/CD45-/CD79a-/HLA-DR-) 、硬骨・脂肪・軟骨への三系統分化能を保持しています。

製品情報

表 1： NcMission™ hMSC Medium V3.0 製品詳細

製品情報	品番	規格	保存条件
NcMission™ hMSC Medium V3.0 の内容物：	RP02010	1 Kit	2-8 °C*
NcMission™ hMSC Medium V3.0 Basal Medium	RP02010-1	500 mL	2-8 °C
NcMission™ hMSC Medium V3.0 Supplement	RP02010-2	25 mL	-80 °Cまたは -20 °C

*基礎培地と添加物をよく混和して完全培地を調製します。調製後は2-8 °Cで保存し、2週間以内に使用可能です。

試薬と材料

表 2：試薬&材料

試薬&材料	ブランド (e.g.)	品番 (e.g.)
NcMission™ hMSC Medium V3.0	Shownin	RP02010
hMSC Cryopreservation Medium	Shownin	SN-06-1310
TrypLE Express Enzyme (1X), no phenol red	Thermo Sci.	12604013

T75/T175/T225 培養フラスコ	Thermo Sci.	156499 /159910/159934
15 mL/50 mL 遠心管	Thermo Sci.	N/A
1.5/2 mL 凍結保存管	Thermo Sci.	N/A
10 μL/200 μL/1000 μL ピペットチップ	Rainin .	N/A

完全培地の調製

1. NcMission™ hMSC Medium V3.0 Supplementは4 °Cで解凍します。37 °Cで解凍しないでください。
2. バイオセーフティキャビネット内で、滅菌済みピペットを用いて以下の2成分を混和し、完全培地を調製します。

NcMission™ hMSC Medium V3.0 Basal Medium : 500 mL

NcMission™ hMSC Medium V3.0 Supplement : 25 mL

3. 完全培地は 2-8 °C で保存し、2週間以内に使用可能です。

Tips : 実際の使用量に応じて Supplement を分注して冷凍保存することが可能ですが（例：5 mL × 5 本）。使用前に 5 mL の Supplement を解凍し、100 mL の Basal Medium と混和して完全培地を調製し、2週間以内に使用してください。凍結・融解は合計で 2 回までとします。

初代 MSC の分離培養（脂肪組織法を例とする）

1. 脂肪採取：クリニックの指示に従い脂肪組織を採取し、4 °Cで輸送し、24時間以内に処理します。
2. 無菌条件下で脂肪抽出物を吸引し、DPBS（または生理食塩水）で数回洗浄し、脂肪吸引手術用薬剤及び血球を完全に除去（無色化）します。眼科用滅菌ハサミとピンセットで組織を整えた後、約1-2 mm³の大きさに切断します。
3. 0.1% タイプIIコラーゲナーゼを用い、37 °Cで45-60分間振盪消化し、800 × gで10分間遠心処理します。上層は未消化脂肪組織と油脂です。ピペットで下層を慎重に挿入して細胞含有消化液を吸引し、70 μM 細胞フィルターで濾過し、濾液を600 × gで8分間遠心処理後、上清を廃棄します。細胞沈殿を2倍

量のDPBS（または生理食塩水）で懸濁し、 $600 \times g$ で5分間遠心処理します。同条件でもう1回遠心洗浄を繰り返します。

4. NcMission hMSC完全培地を添加し、細胞密度を 2×10^4 cells/mLに調整後、T25 cm² フラスコに播種します。37 °C・5% CO₂インキュベーターで培養を開始します。
5. 48時間後に新培地に交換し、以降3日毎に培地更新を行います。成長状況を観察・記録し、コンフルエンシー90%に達した時点で継代培養を行います。
6. 細胞消化：培養上清と組織塊を除去し、生理食塩水で1回洗浄後、吸引除去します。37 °Cに温めたTrypLEを添加し（消化液の使用量は表4を参照）、37 °Cで5-7 分間消化します（消化中は移動しないでください）。その後、同等量のNcMission hMSC 完全培地（または生理食塩水）を加えて消化を停止し、細胞を回収して遠心します（ $200 \times g$ 、5分間）。
7. 細胞数計測：5~10 mLの生理食塩水を加えて細胞を再懸濁し、100 μMの細胞フィルターで一回濾過後、サンプリングして細胞数を計測します（細胞生存率は90%以上であること）。遠心（ $200 \times g$ 、5分間）して細胞を回収します。
8. 細胞播種：5 mLの NcMission hMSC 完全培地を加えて細胞を再懸濁します。適切な密度（6000-8000 / cm²）で培養容器に播種し、適量（表3参照）の予温した新鮮NcMission hMSC完全培地を添加します。水平方向に十字振りを3回行った後、37 °C・5% CO₂・飽和湿度のインキュベーターに入れ、再び水平方向に十字振りを3回行い、培養します。連続培養3日後、細胞が80~85%コンフルエンシーに達した時点で継代可能です。
9. 細胞凍結保存：細胞を凍結保存する必要がある場合、ステップ5.6 の遠心後に凍結保存液を加えて細胞を一定の密度で再懸濁し（例： 2×10^6 / 管）、プログラム凍結ボックスに移し、-80 °Cで一晩保存し、翌日液体窒素に移して長期保存します。

hMSC の解凍（T75 フラスコを例とする。操作手順は他の培養容器にも適用可能）

1. 37 °Cにウォーターバスを予熱します。予め適量の **NcMission hMSC完全培地** を取り出して室温に戻しておきます。
2. 凍結保存した細胞を取り出し、ドライアイスの上に置いて培養室まで運びます。ドライアイスから細胞を取り出し、37 °Cのウォーターバスに入れて軽く振りながら解凍します。肉眼で細胞懸濁液内の氷晶がほぼ完全に消失（緑豆大の氷晶が残る）した時点で取り出します。
3. 直ちに細胞懸濁液を15 mL遠心管に移し、室温に戻した **NcMission hMSC完全培地** 10 mLを滴下しながら、静かに振り混ぜます。遠心（200 × g、5分）して細胞を回収後、上清を吸引除去し、**NcMission hMSC完全培地** 5 mLを加えて細胞を再懸濁し、正確に計数します。
4. 適切な播種密度（6000-8000 / cm²）で細胞を培養容器に播種し、適量（表3参照）の室温に戻した新鮮 **NcMission hMSC完全培地** を添加します。水平方向に十字振りを3回実施後、37 °C・5% CO₂・飽和湿度のインキュベーターに入れ、再び水平方向に十字振りを3回行い、培養します。3日間連続培養し、細胞が80-85%コンフルエンシーに達した時点で継代可能です。

表 3 : hMSC 繼代&培養試薬の推奨使用量

培養容器	底面積	NcMission 完全培地	TrypLE
6 ウエルプレート	9.6 cm ² /ウェル	2 mL/ウェル	1 mL/ウェル
T75 フラスコ	75 cm ²	15 mL	4 mL
T175 フラスコ	175 cm ²	25 mL	8 mL
T225 フラスコ	225 cm ²	35 mL	10 mL

hMSC の継代・凍結保存 (T75 フラスコを例とする。操作手順は他の培養容器にも適用可能)

1. 継代タイミングの選択：hMSCの成長速度は細胞株によって異なるため、細胞コンフルエンシーを基準に適切な継代タイミングを選択することを推奨します。コンフルエンシーが80-85%に達した時点で継代可能です。
2. 30分前にNcMission hMSC完全培地と細胞消化液（研究用：トリプシン溶液+トリプシン阻害剤／臨床

用：TrypLE) を取り出して室温に戻しておきます。

3. 培地を吸引除去し、DPBS（カルシウム・マグネシウム不含）で1回洗浄し、37 °Cに予温したTrypLEを添加します（消化液の使用量は表4を参照）。37 °Cで5-7分間消化します（消化中は移動しないでください）。その後、同等量のNcMission hMSC完全培地を加えて消化を停止し、細胞を回収して遠心します（200 × g、5分間）。
4. 生理食塩水5 mLを加えて細胞を再懸濁し、100 μM の細胞フィルターで1回濾過し、サンプリングして細胞数を計測します（細胞生存率は90%以上であること）。遠心して細胞を回収します（200 × g、5分間）。
5. NcMission hMSC完全培地5 mLを加えて細胞を再懸濁します。適切な密度（6000-8000 / cm²）で細胞を培養容器に播種し、適量（表3参照）の予温した新鮮NcMission hMSC完全培地を添加します。水平方向に十字振りを3回実施後、37 °C・5% CO₂・飽和湿度のインキュベーターに入れ、再び水平方向に十字振りを3回行い、培養します。3日間連續培養し、細胞が80-85%コンフルエンシーに達した時点で継代可能です。
6. 細胞凍結保存：細胞を凍結保存する必要がある場合は、ステップ7.3の後、凍結保存液を加えて一定の密度で細胞を再懸濁し（例：2 × 10⁶ cells/mL）、プログラム凍結ボックスに移し、-80 °Cで一晩保存し、翌日液体窒素に移して長期保存します。

他の培養システムから NcMission 培養条件への hMSC の適応

システムが NcMission™ hMSC Medium V3.0 に変更される場合、元の培地で解凍または継代をした後、1日目に NcMission™ hMSC Medium V3.0 に交換するという手順を推奨します。1世代後には新しいシステムに適応可能です。