

## 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&amp;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（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 mm<sup>3</sup>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 $2 \times 10^4$  cells/mLに調整後、T25 cm<sup>2</sup>フラスコに播種します。37 °C・5% CO<sub>2</sub>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、コンフルエンスー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 / cm<sup>2</sup>）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% CO<sub>2</sub>・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%**コンフルエンス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： $2 \times 10^6$  / 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 / cm<sup>2</sup>）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% CO<sub>2</sub>・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%コンフルエンスに達した時点で継代可能です。

表 3：hMSC 継代&amp;培養試薬の推奨使用量

培養容器	底面積	NcMission 完全培地	TrypLE
6 ウェルプレート	9.6 cm <sup>2</sup> /ウェル	2 mL/ウェル	1 mL/ウェル
T75 フラスコ	75 cm <sup>2</sup>	15 mL	4 mL
T175 フラスコ	175 cm <sup>2</sup>	25 mL	8 mL
T225 フラスコ	225 cm <sup>2</sup>	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、細胞コンフルエンス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。コンフルエンスが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 / cm<sup>2</sup>) 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% CO<sub>2</sub>・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%コンフルエンス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 × 10<sup>6</sup> 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。