

研究グレード hMSC 細胞株

取扱説明書

一、製品概要

独自開発した初代ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) と間葉系幹細胞-蛍光標識は、遺伝子編集技術を利用して特定の遺伝子断片を標的ゲノムに挿入することにより、細胞が蛍光タンパク質またはルシフェラーゼを高効率で発現します。全ての細胞は染色体核型が正常で、表面因子の発現も正常 (CD73+/ CD90+/ CD105+, CD14-/ CD34-/ CD45-/ CD79α-/ HLA-DR-) です。また、細胞移植後に動物体内で生体イメージングができます。これらにより、様々なin vitro実験、薬物スクリーニングおよび安全性評価、さらには疾患動物モデルでの細胞移植医療などの研究および応用に適しています。

二、製品情報

表1：研究グレード hiPSC 細胞株* 製品詳細

製品情報	品番	規格	説明
研究グレードhMSC細胞	RC02003	1×10 ⁶ /本	臍帯由来MSC細胞、安定増殖
iMSC-luc-GFP(P2)	RC02011	1×10 ⁶ /本	ROSA26ロークラスにLucとGFP遺伝子断片を挿入し、核内が緑色蛍光を発し、Luciferaseを発現する
iMSC-Anterased2 (P2)	RC02012	1×10 ⁶ /本	ROSA26ロークラスにAnterased2遺伝子断片を挿入し、Anterased2を高効率で発現する
ucMSC-luc-GFP(P3)	RC02013	1×10 ⁶ /本	臍帯MSC細胞、ランダムにLucとGFP遺伝子断片を挿入し、核内で緑色蛍光を発し、さらにLuciferaseを発現する
ucMSC-Anterased2(P3)	RC02014	1×10 ⁶ /本	臍帯MSC細胞、ランダムにLucとGFP遺伝子断片を挿入し、核内で緑色蛍光を発し、さらにLuciferaseを発現する

*本製品は科学研究専用であり、診断・治療等の医療用途には使用できません。

三、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	Shownin	RP02010
MSC Cryopreservation Medium	Shownin	RP02004
TrypLE Express Enzyme (1X), no phenol red	Thermo Sci.	12604013
T75/T175/T225 細胞培養フラスコ	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
プログラム凍結ボックス	Thermo Sci.	5100-0001

四、完全培地の調製

- 4.1 ncMission Supplement (21×)は4℃で解凍します。**37℃で解凍しないでください。**
- 4.2 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 Basal Medium : 500 mL

ncMission Supplement (21×) : 25 mL

- 4.3 完全培地は 2-8℃ 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週間以内に使用可能です。凍結・融解は合計で2回までとします。

五、初代MSCの分離培養（臍帯組織塊法による初代MSC分離操作を例にする）

- 5.1 臍帯採取：臍帯を採取後、臍帯保存液（**ncMission Basal Medium**）に入れ、4℃で輸送します。24時間以内に処理します。
- 5.2 材料準備：新鮮に調製した**ncMission hMSC完全培地**、滅菌済み培養ディッシュ（6～10個）、医療用消毒アルコール1本、生理食塩水1本、工具セット（ハサミ2本、ピンセット2本）を準備し、臍帯保存液に入れた臍帯とともにバイオセーフティキャビネットに移します。
- 5.3 臍帯消毒：臍帯保存瓶内の臍帯保存液を吸引除去し、医療用消毒アルコール（75%）を加えて臍帯を完全に浸し、2分間浸漬消毒します。
- 5.4 5臍帯洗浄：臍帯を取り出して滅菌済み培養ディッシュに移し、生理食塩水で2～3回洗浄し、残留する臍帯血清を除去します。

- 5.5 臍帯切断：臍帯を約2～3 cmの小片に切断し、再び生理食塩水で2～3回洗浄し、残留する臍帯血を除去します。
- 5.6 臍帯分離：静脈に沿って臍帯を切り開き、静脈壁を完全に除去します。静脈壁を完全に除去すると臍帯は完全に広がります。その後、2本の動脈を除去し、ワルトンゼリーを慎重に分離し、表皮を傷つけないよう注意します。
- 5.7 秤量：分離したワルトンゼリーを50 mLの遠心管に移し、3～5滴の生理食塩水を加えて湿潤させ、曲がった手術用ハサミでワルトンゼリーを2～3 mm³の大きさに細かく切断し、秤量します。
- 5.8 播種：細かく切断したワルトンゼリーにncMission hMSC完全培地を加えて再懸濁し、表3を参照してフラスコに播種し、インキュベーター（37℃、5% CO₂、飽和湿度）に入れてインキュベートします。
- 5.9 1回目培地交換：播種後5日目に組織塊から細胞の遊走が確認され、フラスコを直立させて30度傾け、組織塊をフラスコの一角に自然に沈降させます。上清を吸引除去し、新鮮に復温したncMission hMSC完全培地をゆっくり加え、静かに振り混ぜ、インキュベーターに戻します。
- 5.10 2回目培地交換：播種後9～10日目に遊走した細胞の状態が良好で、積層成長が開始した時点で、フラスコを直立させて30度傾け、組織塊をフラスコの一角に自然に沈降させます。上清を吸引除去し、予温済みの新鮮なncMission hMSC完全培地をゆっくり加え、静かに振り混ぜ、インキュベーターに戻します。
- 5.11 継代タイミング：12日目頃に継代可能です。約2～3×10⁶ cells/T75（0.5gのワルトンゼリー）を回収可能です。
- 5.12 細胞消化：培養上清と組織塊を除去し、生理食塩水を加えて1回洗浄後、吸引除去します。復温したhMSC温和消化液を添加し（研究用0.125%トリプシン消化液、臨床用TrypLE (0.5×)、消化液の使用量は表4を参照）、37℃で4～5分間消化します。その後、同等量の酵素阻害剤/ 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）。
- 5.13 細胞数計測：5 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%以上でなければならない）。遠心（200×g、5分間）して細胞を回収します。
- 5.14 細胞播種：5 mLのncMission hMSC完全培地を加えて細胞を再懸濁し、適切な密度（5000～7000 cells/cm²、推奨は6000 cells/cm²）で培養容器に播種し、適量（表4参照）の予温した新鮮ncMission® M30 MSC増幅培地を添加します。水平方向に十字振りを3回実施後、37℃・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%コンフルエンスになると継代可能です。
- 5.15 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5.13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：2×10⁶/チューブ）、プログラム凍結ボックスに移し、-80℃で一晩保管し、翌日液体窒素に入れて長期保存します。

表3：組織塊法による初代MSC分離試薬の推奨使用量

操作手順	T75 フラスコ	T175 フラスコ	T225 フラスコ
ワルトンゼリー播種量	0.5g	1g	1.5g
播種時培地使用量	10 mL	15 mL	20 mL
1回目培地交換 (DAY5)	13 mL	20 mL	30 mL
2回目培地交換 (DAY9-10)	15 mL	25 mL	35 mL

六、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）

- 6.1 37℃にウォータースバスを予熱します。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。
- 6.2 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細胞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℃のウォータース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。
- 6.3 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。
- 6.4 適切な播種密度（**5000-7000/cm²、推奨は6000/cm²**）で細胞を培養容器に播種し、適量（**表4参照**）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℃・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%**コンフルエンスになると継代可能です。

表4：hMSC 継代&培養用試薬の推奨使用量

培養容器	底面積	ncMission完全培地	トリプシン/トリプシン阻害剤
6ウェルプレート	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

七、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）

- 7.1 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。
- 7.2 30分前にncMission hMSC完全培地とhMSC 温和消化液（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。

- 7.3 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、復温した消化液（研究用**0.125%トリプシン消化液、臨床用TrypLE（0.5×）**）を添加します（消化液の使用量は**表4**を参照）。37℃で4-5分間消化した後、同等量の**トリプシン阻害剤/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**）。
- 7.4 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、サンプルを採取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**）。
- 7.5 **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（**5000-7000/cm2、推奨は6000/cm2**）で細胞を培養容器に播種し、適量（**表4参照**）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℃・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%**コンフルエンスになると継代可能です。
- 7.6 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℃で一晩保存し、翌日液体窒素に移して長期保存します。

八、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に変更される場合、**元の培地で復活または継代**を行った後、1日目にncMission hMSC Medium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。