

NcMission™ M30 hMSC Medium (Phenol Red-free)

目次 # SN-02-0030 1 Kit (2 L)

製品説明

NcMission™ M30 hMSC Medium (Phenol Red-free)は、Showninバイオテクノロジー有限会社が独自に開発した、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・軟骨の3系列への分化能を備えています。

製品情報

表 1 : NcMission™ M30 hMSC Medium (Phenol Red-free) 製品詳細

製品情報	品番	規格	保存条件
NcMission™ M30 hMSC Medium (Phenol Red-free) の内容物 :	SN-02-0030	1 Kit	2-8 °C*
NcMission™ M30 hMSC Medium Basal Medium (Phenol Red-free)	SN-00-0003	500 mL	2-8 °C
NcMission™ M30 hMSC Medium Supplement	SN-02-0031	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™ M30 hMSC Medium (Phenol Red-free)	Shownin	SN-02-0030
hMSC 高効率凍結保存液	Shownin	SN-06-1310
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
プログラム凍結ボックス	Thermo Sci.	5100-0001

完全培地の調製

- 無血清添加物（21 × ）は4 °Cで解凍します。37 °Cで解凍しないでください。
- 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™ M30 hMSC Medium Basal Medium (Phenol Red-free) : 500 mL

NcMission™ M30 hMSC Medium Supplement : 25 mL

- 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 MSC 無血清添加物を分注して冷凍保存することが可能で（例：5 mL × 5 本）。使用前に 5 mL の MSC 無血清添加物を解凍し、100 mL の MSC 基礎培地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（臍帯組織塊法による初代 MSC 分離操作を例にする）

- 臍帯採取：臍帯を採取後、臍帯保存液（Basal Medium）に入れ、4 °Cで輸送します。24時間以内に処理します。
- 材料準備：新鮮に調製した完全培地、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、取り戻した臍帯（臍帯保存液に入れておく）とともにバイオセーフティキャビネットに移します。
- 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。
- 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. 脘帯切断：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。
6. 脘帯分離：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。
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。
8. 播種：細かく切断したワルトンゼリーに**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 °C、5% CO₂、飽和湿度）に入れ、培養します。
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**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。
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、積層成長を開始した時点で、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**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。
11. 繼代タイミング：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。
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（消化液の使用量は表4を参照）、37 °Cで4~5分間消化します。その後、同等量の**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）。
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%以上であること）。遠心（200 × g、5分間）

して細胞を回収します。

14. 細胞播種：5 mLの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）の予温した新鮮な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。連続培養3日後、細胞が80～85%コンフルエンシーになると継代可能です。

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 °C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	0.5 g	1 g	1.5 g
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

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、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（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なると継代可能です。

表 4 : hMSC 繰代&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. 繰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. 予め完全培地とhMSC 温和消化液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、復温したhMSC温和消化液を添加します（消化液の使用量は表4を参照）。37 °Cで4-5分間消化した後、同等量の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）。
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）。

5. 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**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**になると継代可能です。

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™ M30 hMSC Medium (Phenol Red-free)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™ M30 hMSC Medium (Phenol Red-free)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。