

## 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&amp;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 $\mu$ L/200 $\mu$ L/1000 $\mu$ L 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

1. 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。
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™ M30 hMSC Medium Basal Medium (Phenol Red-free) : 500 mL

NcMission™ M30 hMSC Medium 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 MSC 無血清添加物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 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）

1. 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。
2. 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。
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。
4. 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. 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。
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。
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 mm<sup>3</sup>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% CO<sub>2</sub>、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. 継代タイミング：12日目頃に継代可能です。約2～3 × 10<sup>6</sup> 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/cm<sup>2</sup>、推奨は6000 cells/cm<sup>2</sup>）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% 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 × 10<sup>6</sup>/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）

- 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。
- 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。
- 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 / cm<sup>2</sup>、推奨は6000 / cm<sup>2</sup>）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% 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 <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）

- 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。
- 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。
- 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**）。
- 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 / cm<sup>2</sup>、推奨は6000 / cm<sup>2</sup>）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% 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 × 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™ 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。