ncMission® M30 MSC 増幅培地（フェノールレッドフリー）

取扱説明書

一、製品概要

ncMission® M30 MSC 増幅培地（フェノールレッドフリー）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。

二、製品情報

表 1：ncMission® M30 MSC 増幅培地（フェノールレッドフリー）製品詳細

製品情報	品番	規格	保存条件
ncMission® M30 MSC増幅培地（フェノールレッドフリー）の内容物：	**SN-02-0030**	**1 Kit**	**2℃～8℃***
ncMission® M30 MSC基礎培地	SN-00-0003	500 mL	2℃～8℃
ncMission® M30 MSC無血清添加物	SN-02-0031	25 mL	-20℃または-80℃

***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℃で保存し、2週間以内に使用可能です。**

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®M30MSC増幅培地（フェノールレッドフリー）	Shownin	SN-02-0030
hMSC高効率凍結保存液	Shownin	SN-06-1310
hMSC温和消化液	Shownin	SN-02-0040
T75/T175/T225細胞培養フラスコ	Thermo Sci.	156499 /159910/159934
15mL/50mL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 MSC 無血清添加物（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® M30 MSC 基礎培地：500 mL

ncMission® M30 MSC 無血清添加物：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。

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® M30 MSC 基礎培地）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® M30 MSC増幅培地**、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。

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 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 mm^3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® M30 MSC 増幅培地**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% CO_2、飽和湿度）に入れ、培養します。

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® M30 MSC増幅培地**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**ncMission® M30 MSC増幅培地**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2～3×10^6 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（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**ncMission® M30 MSC増幅培地**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%以上であること）。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® M30 MSC増幅培地**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**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% CO_2・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。

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：2×10^6/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	0.5 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

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℃にウォーターバスを予熱します。予め適量の**ncMission® M30 MSC増幅培地**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® M30 MSC増幅培地**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® M30 MSC増幅培地**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® 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% CO_2・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 cm²/ウェル	2 mL/ウェル	1 mL/ウェル
T75 フラスコ	75 cm²	15 mL	4 mL
T175 フラスコ	175 cm²	25 mL	8 mL
T225 フラスコ	225 cm²	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。

7.2 予め**ncMission® M30 MSC増幅培地**とhMSC 温和消化液を取り出して室温に戻しておきます。

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℃で4-5分間消化した後、同等量の**ncMission® M30 MSC増幅培地**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® M30 MSC増幅培地**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® 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。3日間連続培養し、細胞が**80～85%**コンフルエンシーになると継代可能です。

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® M30 MSC増幅培地**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 MSC増幅培地**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。