hiPSC/hESC 培地-ncEpic
取扱説明書

一、製品概要

ncEpic hPSC Medium は、**フィーダーフリー**、**化学成分明確**、**動物由来タンパク質を含まない**ヒト多能性幹細胞（hESC/hiPSC）に適した完全培地です。本培地ではhESC/hiPSCが迅速に増殖する一方、分化した細胞の増殖が抑制されるため、選択的に高純度のヒト多能性幹細胞を増幅します。

二、製品情報

表一：ncEpic ヒト多能性幹細胞培地製品詳細

製品情報	品番	規格	保存条件
ncEpic hPSC Mediumの内容物：	**RP01001**	**1 Kit**	**2℃～8℃***
ncEpic hPSC Basal Medium	RP01001-1	496 mL	2℃～8℃
ncEpic hPSC Supplement（125×）	RP01001-2	4 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：推奨試薬&材料

試薬&材料	ブランド（e.g.）	品番（e.g.）
ncEpic hPSC Medium	Shownin	RP01001
Vitronectin	Shownin	RP01002
hPSC Cryopreservation Medium	Shownin	RP01003
hPSC Dissociation buffer	Shownin	RP01007
Blebbistatin（10mM）	Shownin	RP01008
DMEM/F12培地	Thermo Sci.	11330
6ウェルプレート	Thermo Sci.	140685
1 mL/5 mL/10 mL/25 mLピペット	Thermo Sci.	N/A
15 mL/50 mL遠心管	Thermo Sci.	N/A
1.5/2 mL凍結保存管	Thermo Sci.	N/A
プログラム凍結ボックス	Thermo Sci.	5100-0001

四、試薬の準備

（一）ncEpic hPSC 完全培地の調製（500 mL）

1. ncEpic Supplementは4℃ で解凍します。**37℃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、500 mLの完全培地を調製します。

   ncEpic Basal Medium : 496 mL

   ncEpic Supplement : 4 mL
3. 完全培地は 4℃ 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、ncEpic Supplement を分注して凍結保存することが可能です。100 mL の完全培地を調製する場合、Supplement を 0.8 mL×5本 に分注します。使用前に、 0.8 mLの解凍したSupplement と 99.2 mLのBasal Medium を混和します。 Supplement の凍結・融解は合計で2回までとします。

（二）Vitronectin を用いた培養プレートコーティング（VTNコートタンパク質を用いた6ウェルプレートコーティングを例とする。操作手順は他の培養容器にも適用可能）

1. Vitronectinを用いたプレートコーティングは、完全な無菌条件下で行います。
2. 室温（15～25℃）でVitronectinを解凍します。

   TIPS : 解凍後のVitronectinは、4℃で最大2週間保存可能です。分注する場合は、-20℃または-80℃で保存し、有効期限内に使用可能です。凍結融解の繰り返しは避けてください。
3. Vitronectin分注：推奨コーティング濃度は 1 μg/cm² です。6 ウェルプレートのウェル面積は 10 cm²/ウェル であるため、1 枚（6 ウェル）のコーティングには 60 μg の VTN コートタンパク質（500 μg/mL 溶液で 120 μL）が必要です。VTN コートタンパク質を 120 μL（60 μg）/管 に分注し、-20℃ または -80℃ で保存することを推奨します。1 管を使用することで、6 ウェルプレート 1 枚分 をコーティングできます。
4. VTN コートタンパク質1管（120 μL、60 μg）を取り、9 mLのDMEM/F12を加えて緩やかに混和し希釈します。ボルテックスはしないでください。
5. 1.5 mL/ウェルで6ウェルプレートに分注し、静かに振り混ぜます。希釈したVitronectin溶液がプレートの底面に均一に広がるようにします。
6. 室温（15～25℃）で1時間以上静置します。使用時に、プレートを傾け、ピペットまたはチップでコーティング液を完全に除去します。コーティングしたプレート底面に傷がないように注意し、また追加の溶液での洗浄も不要です。

   TIPS : 即時使用しない場合は、Vitronectin溶液の蒸発防止にプレートを密封し、コーティングしたプレートは4℃で保存し、1週間以内に使用することを推奨します。使用の際には、室温（15～25℃）でプレートを10～30分間平衡化させてから実験の次のステップに進んでください。Vitronectin溶液蒸発によるプレート表面乾燥の場合、hESCおよびhiPSCの接着に深刻に影響します。

（三）Matrigel を用いた培養プレートコーティング（Corning® Matrigel®を用いた6ウェルプレートの

コーティングを例とする）

A. Matrigelの分注

1. 受領したMatrigelのロット番号から濃度を確認し、使用濃度（0.013 mg/cm²）とコーティング面積に基づき分注量と数を計算します。

   例：hPSC培養用の場合、Matrigelの推奨コーティング濃度は0.013 mg/cm²であり、6ウェルプレート1枚あたり0.75 mgを使用します。Matrigel濃度が11.3 mg/mL（10 mL）である場合、3 mg/管（6ウェルプレート4枚分をコーティング可能）に分注します。分注量（管あたり）= 3 mg / 11.3 mg/mL = 0.265 mL。分注数 = 10 mL / 0.265 mL = 37.74本。

2. 滅菌済み1.5mL EP管38本（Matrigelのロット番号・濃度・日付・作業者IDを明記）、1000μl滅菌済みピペットチップとEP管スタンドを準備し、-20℃フリーザーで1時間予冷します。

   TIPS：品番354277のMatrigel（hESC-Qualified Matrigel）は、取り扱い説明書にタンパク質濃度ではなくDilution Factorが記載されている。例えば、あるロットの推奨Dilution Factorが238μLであれば、238μLで6ウェルプレート4枚をコーティングできることを示し、分注数が5 mL ÷ 0.238 = 21.01となります。

3. Matrigelを4℃の冷蔵庫で一晩解凍し、Matrigelが完全に解凍したら分注を開始します。

   TIPS：Matrigelは4℃条件下でのみ液体になります。冷蔵庫の温度変動が頻繁な場合、Matrigelが液体状態にならない可能性があります。

4. 砕氷を入れたアイスボックス準備し、解凍したMatrigel、予冷した1.5 mL EP管とEP管スタンド、1000 μlチップをアイスボックス上に置きます。
5. Matrigelをよく混和し、無菌条件で各1.5 mL EP管に分注し、氷上に置きます。チップが詰まって分注容量が正確でなくなる場合はチップを交換します。
6. 分注したMatrigelは-20℃のフリーザーで保存します。

B. プレーティング

1. 冷蔵したDMEM/F12 36 mLを50 mL遠心管に入れ、6ウェルプレート4枚を準備します。Matrigel、ロット番号、日付、作業者IDを記入します。
2. 滅菌済み1000 μlチップを-20℃のフリーザーで1時間予冷し、冷凍したMatrigel（3 mg）を1本取り出し、4℃の冷蔵庫で完全解凍まで静置します。
3. 砕氷を入れたアイスボックスを準備し、解凍したMatrigelと予冷した1000 μlチップをアイスボックス上に置く。
4. 予冷したチップで解凍したMatrigel（3 mg）を1 mLの冷えたDMEM/F12に加え、ピペッティングを繰り返して解凍・混和します。
5. 解凍・混和したMatrigelを吸引し、遠心管に残っているDMEM/F12に加え、10 mLピペットで再びピペッティングを繰り返して混和します。
6. 6ウェルプレート4枚に1.5 mL/ウェルで分注し、静かに振り混ぜます。
7. 培養プレートを室温で1時間静置後に使用可能です。または4℃で一晩冷蔵保存し、2週間以内に使用します。

五、 hPSCの解凍（6ウェルプレートを例とする。操作手順は他の培養容器にも適用可能）

1. ウォーターバスを37℃に予熱します。
2. Vitronectin でコーティングした6ウェルプレートをバイオセーフティキャビネット内で約1時間静置し、室温（15～30℃）に戻しておきます。
3. **ncEpic完全培地** 4 mLを準備し、1 μLの**Blebbistatin**（10 mM）を1:4000で添加し、室温（15～30℃）に戻します。

   TIPS：培地を37℃のウォーターバスで予温しないでください。
4. 凍結した細胞1本を取り出して37℃ウォーターバスで軽く振りながら1分以内に解凍します。肉眼で細胞懸濁液内の氷晶がほぼ消失した時点で取り出します。
5. 凍結管の表面を75%エタノール無塵紙で拭浄後、バイオセーフティキャビネットに移します。細胞懸濁液を予め準備した15 mL遠心管に移し、DMEM/F12 10 mLを滴下しながら穏やかに振り混ぜて細胞を均一に分散させます。160×gで5分間遠心します。
6. 上清を吸引除去し、予温したBlebbistatin+ ncEpic完全培地 4 mLを加え、よく混和して細胞を均一に分散させます。ピペッティングはしないようにします。
7. 6ウェルプレートの2ウェルからVitronectin コーティング液を除去し、混和した細胞を2 mL/ウェルで播種します。
8. 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、再度水平方向に十字振りを3回行い、培養します。
9. 18～24時間後に新鮮なncEpic完全培地に交換し、以降は毎日培地を交換します。

表3：hPSC継代・培養操作における試薬の推奨使用量

培養容器	底面積	DPBS(mL)	EDTA継代使用液	ncEpic完全培地*
6 ウェルプレート	9.6 cm^2/ウェル	2 mL/ウェル	2 mL/ウェル	2 mL/ウェル
12ウェルプレート	4.5 cm^2/ウェル	1 mL/ウェル	1 mL/ウェル	1 mL/ウェル
24ウェルプレート	2 cm^2/ウェル	0.5 mL/ウェル	0.5 mL/ウェル	0.5 mL/ウェル
35mmディッシュ	8 cm^2	2 mL	2 mL	2 mL
60mmディッシュ	21 cm^2	4 mL	4 mL	4 mL
100mmディッシュ	55 cm^2	10 mL	10 mL	10 mL

***hPSC通常培養において、細胞コンフルエンシーが50%を超えた場合、培地交換時に培地を50%追加することを推奨します。6ウェルプレートを例とすると、培地交換時に各ウェルに3 mLの培地を添加します。他の培養容器も同様**

の比率で調整してください。

六、 hPSCの継代（6ウェルプレート、EDTAでの消化を例とする。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：

1.1、細胞が約85%コンフルエンシーに達した場合（図1）、一般的に4日ごとに継代を行います。クローンコロニーが小さくコンフルエンシーが不足している場合でも、連続培養は5日を超えないように推奨します。

1.2、細胞コンフルエンシーが低いが、幹細胞コロニーが大きくなり過ぎ、中心部の細胞の増殖不良が生じている場合。

1.3、上記いずれかの条件を満たす場合、iPSCの継代が必要です。

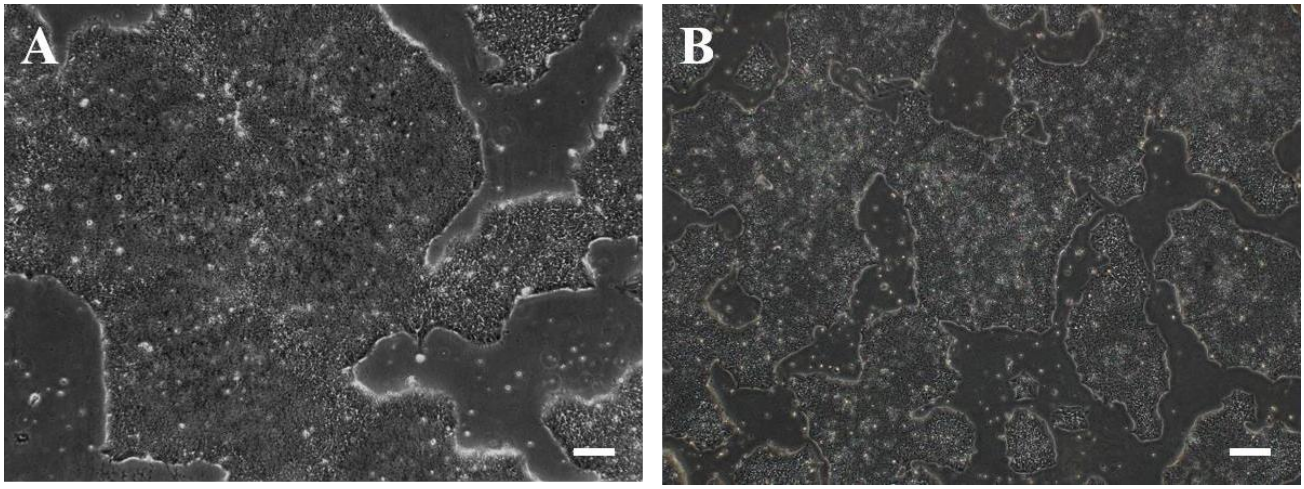

図1：hiPSCクローンは約85%コンフルエンシー。A-Matrigel Plate ; B-Vitronectin Plate スケールバー：200μm

2. 継代比率：

細胞の成長状態および実験目的に応じて、1:5～1:20で継代を行います。細胞状態が正常で、クローンコロニーは85%コンフルエンシー、大きさが均一な場合（図1）、1:10で継代することを推奨します。密度が低い場合は継代比率を低下させ、高い場合は比率を増加させます。

3. Vitronectinコーティングした6ウェルプレートをバイオセーフティキャビネット内で約1時間静置し、室温（～25℃）に戻しておきます。

4. 継代播種に必要なウェル数に応じて、2 mL/ウェルの ncEpic完全培地 を準備し、1:4000 で Blebbistatin（10 mM） を添加後、室温（～25℃）に戻します。

TIPS：2 mLのncEpic培地には 0.5 μL のBlebbistatin（10 mM）を加えます。

5. iPSC培養ウェル内の培地を吸引除去し、2 mL/ウェル の DPBS（カルシウム・マグネシウム不含） を添加後、軽く揺らして吸引廃棄します。

6. 2 mL/ウェル の EDTA継代使用液 を添加し、溶液がウェル底面を完全に覆うようにします。

7. 37℃インキュベーター で 7～8分間インキュベートします。

TIPS：（1）8分間消化後、顕微鏡下で細胞の状態を確認します。大部分の細胞が明るく丸くなり、細胞が基質から剥離または浮遊していない状態（図2C）で消化を中止します。大部分の細胞がまだ明るくなっていない場合は消化時間を延長する必要がある（図2A&B）。

（2）6ウェルプレート はインキュベーターの金属仕切り板に直接接触させ、均一に加熱されるようにします。積み重ねはしないでください。

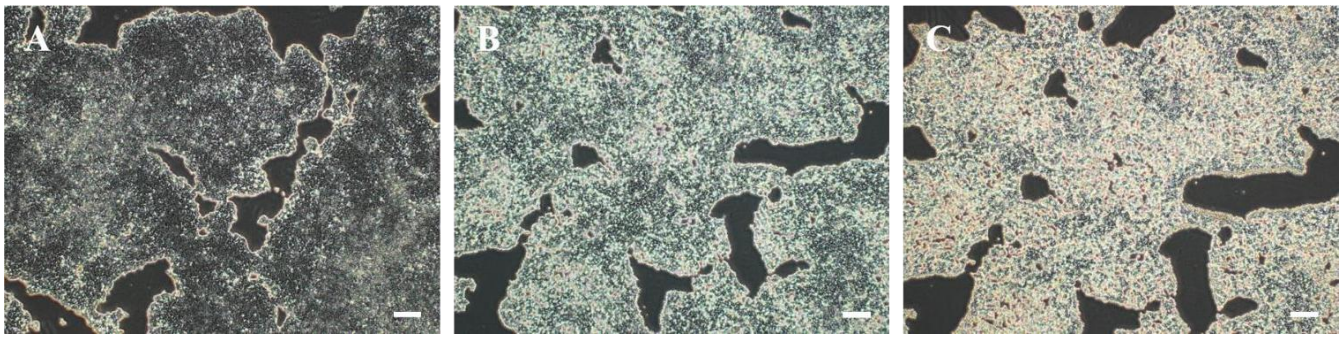

図 2：（A）EDTAで消化4分後（B）EDTAで消化6分後（C）EDTAで消化8分後 スケールバー：200 μm

8. 消化終了後、細胞培養プレートを静かにバイオセーフティキャビネットに移し、細胞を振動しないように注意し、プレートを傾けてEDTA継代使用液を吸引廃棄します。
9. 予温したBlebbistatin+ncEpic完全培地を2 mL/ウェルで速やかに添加し、6ウェルプレートを水平方向に十字振りして細胞を基質から剥離させます。

TIPS：（1）Blebbistatin+ncEpic完全培地を添加する際、細胞を1～2回軽くピペッティングしてください。単細胞になることを防ぐために、2回を超えないようにしてください。

（2）細胞をこすらないように注意します。一部の細胞（10～15%）が基質に残るのは正常です。大量の細胞が剥離しない場合は、消化時間を延長する必要があります。

（3）一度に1枚の6ウェルプレートのみを処理し、ncEpic培地を添加したら速やかに吸引除去してください。EDTA継代使用液の効果はncTarget培地添加後すぐに失活し、またncEpic培地添加後、細胞は再び急速に接着します。hPSCはEDTA継代使用液中に長時間（15分未満）留まることはできないため、細胞の回収と播種は迅速に行う必要があります。

10. 播種：

10.1 6ウェルプレート内のVitronectin溶液を吸引除去し、予温したBlebbistatin+ncEpic完全培地を2 mL/ウェル添加します。

10.2 6ウェルプレートに、細胞名、継代回数（代次）、継代比率、日付、操作者IDを記入します。ステップ9で得られた細胞懸濁液を軽く振り混ぜ、予め設定した継代比率に従って均等に各ウェルに分配します。

TIPS：必要に応じて、継代に必要な細胞量を計算後、15 mL遠心管に移し、予温したBlebbistatin+ncEpic完全培地で懸濁し12 mLに定容し、Vitronectinコーティングした（溶液除去済み）6ウェルプレートに均等に分配することも可能です。

11. 6ウェルプレートを水平方向に十字振りを3回実施後、37℃・5% CO・飽和湿度のインキュベーターに入れ、 再度水平方向に十字振りを3回行い、一晩培養します。
12. 18～24時間後に新鮮な**ncEpic完全培地**に交換します。以降は毎日培地を交換し、4～5日後に継代または凍結保存を行います（図3-4）。

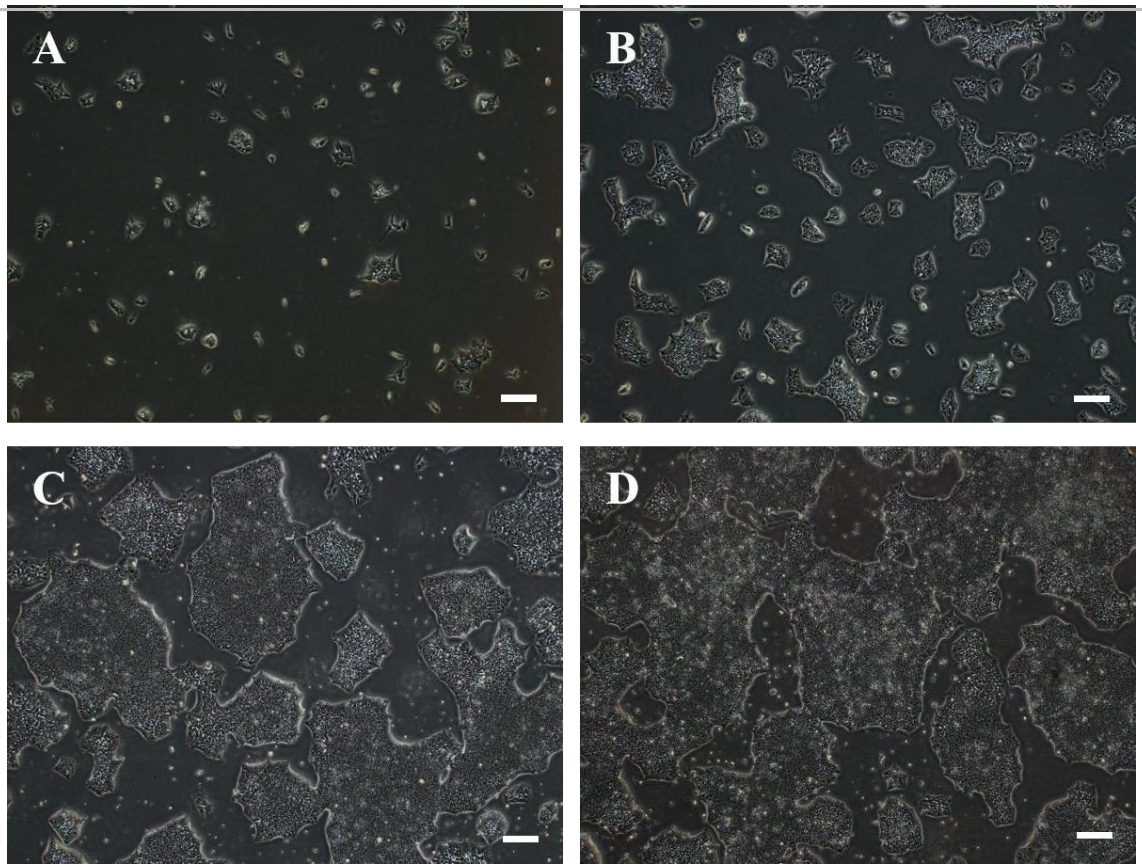

図3：ncEpic ヒト多能性幹細胞培地で連続培養したhiPSCの細胞形態（Vitronectin Plate使用）

A、B、C、Dはそれぞれ培養1日目、2日目、3日目、4日目のhiPSCの形態を示した。スケールバー：200 μm

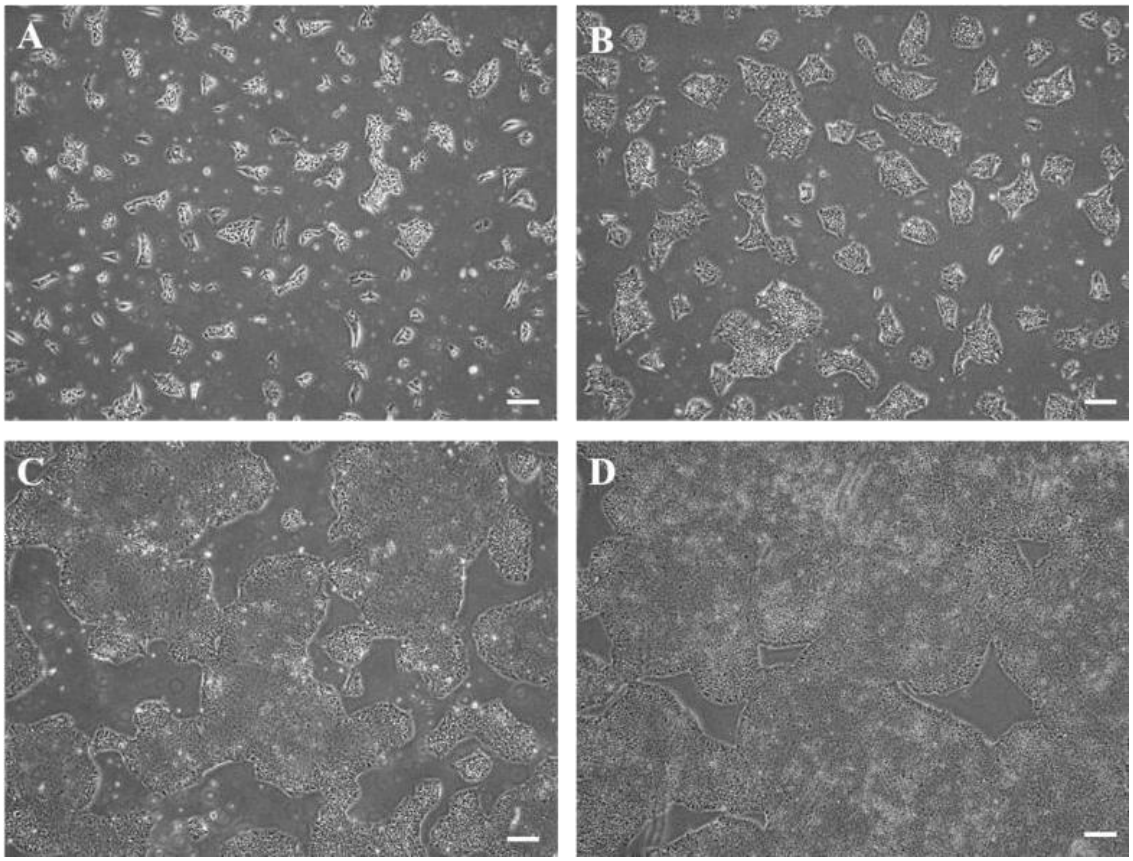

図4：ncEpic ヒト多能性幹細胞培地で連続培養したhiPSCの細胞形態（Matrigel Plate使用）

A、B、C、Dはそれぞれ培養1日目、2日目、3日目、4日目のhiPSCの形態を示した。スケールバー：200 μm

七、hPSCの凍結保存

1. 細胞が約85%コンフルエンシーに達した時点（図1）で回収・凍結可能です。一般的に6ウェルプレートでは1ウェルあたり2-4×10^6個の生細胞を回収し、1本凍結保存することは可能です。
2. 必要数の1.5/2 mL凍結管を準備し、細胞名・継代数（P#）・日付・作業者IDを記入します。
3. 4℃の冷蔵庫から**hPSC凍結保存液**を取り出し、室温で温めておきます。**使用前によく振り混ぜます。**

   TIPS： hPSC 凍結液に含まれるDMSOは溶液下部に沈殿しやすいため、混和が不十分だと初期使用時のDMSO濃度が不足し、後半で濃度が過剰になり、凍結細胞が不安定になることがある。
4. hPSC培養上清を吸引除去後、DPBS（カルシウム・マグネシウム不含）を2 mL/ウェル添加し、数回軽く揺らしてから吸引除去します。
5. hPSC継代使用液を2 mL/ウェル添加し、37℃インキュベーターで7-8分間静置します（**「六、hPSCの継代」第7項参照**）。
6. 消化処理終了後、培養プレートを静かに取り出し、EDTAを吸引除去します。
7. 予温した**hPSC凍結保存液**をよく振り混ぜ、1 mL/ウェル添加します。穏やかにピペッティング後、水平方向に3回十字振りした後、細胞懸濁液を吸引し1.5/2 mL凍結管に加える。
8. 細胞をプログラム凍結ボックスに入れ、-80℃のフリーザーで一晩保管し、翌日液体窒素タンクに移して長期保存します。またはプログラム凍結装置を使用して-80℃以下に冷却し、そのまま液態窒素に移行します。

八、他の培養システムからncTarget培養条件へのhPSCの適応

フィーダーフリー条件で培養しているhPSCは、細胞状態が良好な時に元培地とncEpic完全培地を1:1で交換します。2回培地交換後、ncEpic完全培地で2-3継代培養することでncEpic多能性幹細胞培地に適応可能です。

九、問題と解決策

➢ **hPSC培養における分化の発生**
● ncEpic完全培地は4℃で保存し、2週間以内に使用してください。実験ごとに必要な量のみを予温し、培地の温度変化を最小限に抑えることで、培地中の因子の効力低下を防ぎます。 ● hPSCクローンの全体形態が良好で、周辺に散在する分化細胞（<1%）が見られる場合は、EDTAによる継代で除去可能です。 ● 継代するhPSCの細胞塊は均一な大きさを確保し、約20個細胞程度が理想的です。細胞塊が大きい場合は、5 mLピペットで3回以内に静かにピペッティングします。力加減は軽くかつ均一にします。力が強すぎると細胞損傷や分化を引き起こすおそれがあります。 ● 観察時は細胞がインキュベーター外にある時間は15分を超えないようにします。 ● hPSCクローンは内部が緩く、辺縁が不整で、分化率が20%を超える場合は、廃棄を推奨します。
➢ **Dispaseまたはコラーゲナーゼを用いたhPSC継代の可否**
● Dispaseまたはコラーゲナーゼでの継代は可能だが、細胞消化効率が低く、継代後の細胞生存率に影響し、分化した細胞の蓄積も起こりやすいです。 ● ncEpic培養システムにおけるhPSC継代は、非酵素的で温和な消化法を推奨します。 ● 実験上hPSCを単細胞に消化する必要がある場合は、Accutase酵素を用いて5～10分間消化することを推奨します。
➢ **hPSC継代後の接着不良または低接着率**
● 継代比率が高すぎないようにします（1:20以下）。 ● EDTA消化時間は長すぎないようにします。一部の細胞系では8分を超える消化時間が必要な場合があるが、15分を超えないようにします。 ● 過剰なピペッティング（3回以上）は細胞塊の崩壊や細胞損傷の原因となるため避けてください。 ● 培養プレートがVitronectin/Matrigelまたは他の多能性幹細胞用基質でコーティングされていることを確認します。 ● 培地にROCKiが添加されていることを確認します。
➢ **培地交換後の細胞浮遊**
● 播種後18-24時間経過し、初回の培地交換を行い、細胞が十分に接着していることを確認します。 ● 培地交換時は操作を穏やかにし、細胞塊が基質から剥離しないようにします。 ● 低密度播種の場合（例：クローン実験）は、2-3日間培地交換を省略可能です。ただし培地中にROCKiが含まれる必要があります。
➢ **ウェル内hiPSCクローン分布の不均一**
● 基質が容器の底面に均一に広がることを確認します。 ● 継代播種時には細胞を均一に分散させ、水平十字振りした後にプレートを動かすとウェル中央に細胞が集積するため避けてください。 ● プレートをインキュベーターに入れる際に、再度水平十字振りを行なう必要があります。