hiPSC/hESC 培地-ncTarget
取扱説明書

一、製品概要

ncTarget hPSC Medium は、フィーダーフリー、成分が明らかなヒト多能性幹細胞（hESC/hiPSCに適した無血清培地です。本培地では、hESC/hiPSCは急速に増殖する一方、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 1： ncTarget hPSC Medium 製品詳細

製品情報	品番	規格	保存条件
ncTarget hPSC Medium の内容物：	**RP01020**	**1 Kit**	**2℃～8℃***
ncTarget hPSC Basal Medium	RP01020-1	400 mL	2℃～8℃
ncTarget hPSC Supplement-A	RP01020-A	20 mL	-20℃または-80℃
ncTarget hPSC Supplement-B	RP01020-B	80 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.）
ncTarget hPSC Medium	Shownin	RP01020
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）ncTarget hPSC 完全培地の調製（500 mL）

1. **ncTarget Supplement A/B**は4℃で解凍します。**37℃で解凍しないでください。**
2. 表３を参照し、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組成を混和し、完全培地を調製します。完全培地は 4℃で保存し、2週間以内に使用可能です。

**表 3：ncTarget ヒト多能性幹細胞培地の調製説明*

組成	500 mL 完全培地	100 mL 完全培地	50 mL 完全培地
ncTarget Basal Medium	400 mL	80 mL	40 mL
ncTarget Supplement-A	20 mL	4 mL	2 mL
ncTarget Supplement-B	80 mL	16 mL	8 mL

***実際の使用量に応じてncTarget Supplement A/Bを分注して冷凍保存することが可能です（例：5 mL×5本）。具体的な調製比率は、表3 の調製説明を参照してください。凍結・融解は合計で2回までとします。**

（二）Matrigel を用いた培養プレートのコーティング（Corning® Matrigel®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）

A.　Matrigelの分注

1. 受け取ったMatrigelのロット番号から濃度を確認します。使用濃度とコーティング面積に基づき、分注容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が0.013 mg/cm²で、6ウェルプレート1枚あたり0.75 mgのMatrigelが必要です。Matrigelの濃度が11.3 mg/mL（10 mL）である場合、3 mg/管で分注します（6ウェルプレート4枚分をコーティング可能）。分注容量（1管あたり）＝3 mg / 11.3 mg/mL＝0.265 mL。分注数＝10 mL / 0.265 mL＝37.74。
2. 38本の滅菌済み1.5 mL EP管を準備し、Matrigelのロット番号、濃度、日付、操作者IDを記入します。また、1000μlの滅菌済みピペットチップとEP管スタンドを-20℃の冷蔵庫で1時間予冷します。

   TIPS：品番354277のMatrigel（hESC-Qualified Matrigel）は、取扱説明書にタンパク質濃度ではなくDilution Factorが記載されています。例えば、あるロットの推奨Dilution Factorが238μLであれば、238μLで4枚の6ウェルプレートをコーティングできることを示しし、分注数が5 mL ÷ 0.238 = 21.01となります。
3. Matrigelを4℃の冷蔵庫に一晩保管し解凍します。Matrigelが完全に解凍したら分注を開始します。

   TIPS：Matrigelは4℃でのみ液体になります。冷蔵庫の温度が頻繁に変動すると、Matrigelが液状にならないことがあります。
4. 砕氷を入れた氷ボックスを準備し、解凍したMatrigel・予冷したEP管とEP管スタンド・1000μlピペットチップを氷ボックスの上に置きます。
5. Matrigelをよく混和し、無菌条件下で各1.5 mL EP管に分注し、氷の上に置きます。ピペットチップが詰まって分注容量が正確でなくなる場合は、ピペットチップを交換します。
6. 分注したMatrigelを-20℃の冷蔵庫で保存します。

B. **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. 1000 µl滅菌済みチップを-20℃のフリーザーで1時間予冷し、冷凍したMatrigel（3 mg）1本を取り出し、4℃の冷蔵庫で完全解凍まで静置します。
3. 砕氷を入れたボックスを準備し、解凍したMatrigelと予冷した1000 µlチップを氷上に置きます。
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を遠心管に残っているDMEM/F12に加え、10 mLピペットで再度ピペッティングを繰り返します。
6. 6ウェルプレート4枚に1.5 mL/ウェルで分注し、軽く振り混ぜます。
7. 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. 37℃にウォーターバスを予熱します。
2. 予めMatrigel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に約1時間静置し、室温（15～30℃）に戻しておきます。
3. **ncTarget完全培地**4 mLを準備し、1:4000で**Blebbistatin（10 mM）** 1 µlを添加し、室温（15～30℃）に戻します。

   TIPS：培地を37℃ウォーターバスで予温しないでください。
4. 凍結した細胞を1本取り出し、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結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き、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、10 mLのDMEM/F12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**+** ncTarget完全培地4 mLを加えて細胞を懸濁します。ピペッティングはしないように注意します。
7. 6ウェルプレートの2ウェルからMatrigelコーティング液を吸引除去し、混和した細胞を2 mL/ウェルで2ウェルに播種します。
8. 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時間後に新しいncTarget完全培地に交換し、その後は毎日培地を交換します。

表 4：hPSC 継代&培養用試薬の推奨使用量

培養容器	底面積	DPBS(mL)	EDTA継代使用液	hPSC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	0.5mL/ウェル	0.5mL/ウェル	0.5mL/ウェル
35mm培養皿	8cm^2	2mL	2mL	2mL

***hPSCの常規定法培養において、細胞コンフルエンシーが50%を超える場合、培地交換時に培地量を50%追加することを推奨します。6ウェルプレートを例にすると、培地交換時には各ウェルに3 mLの培地を添加します。他の培養容器の場合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消化を例とする。操作手順は他の培養容器にも適用可能）

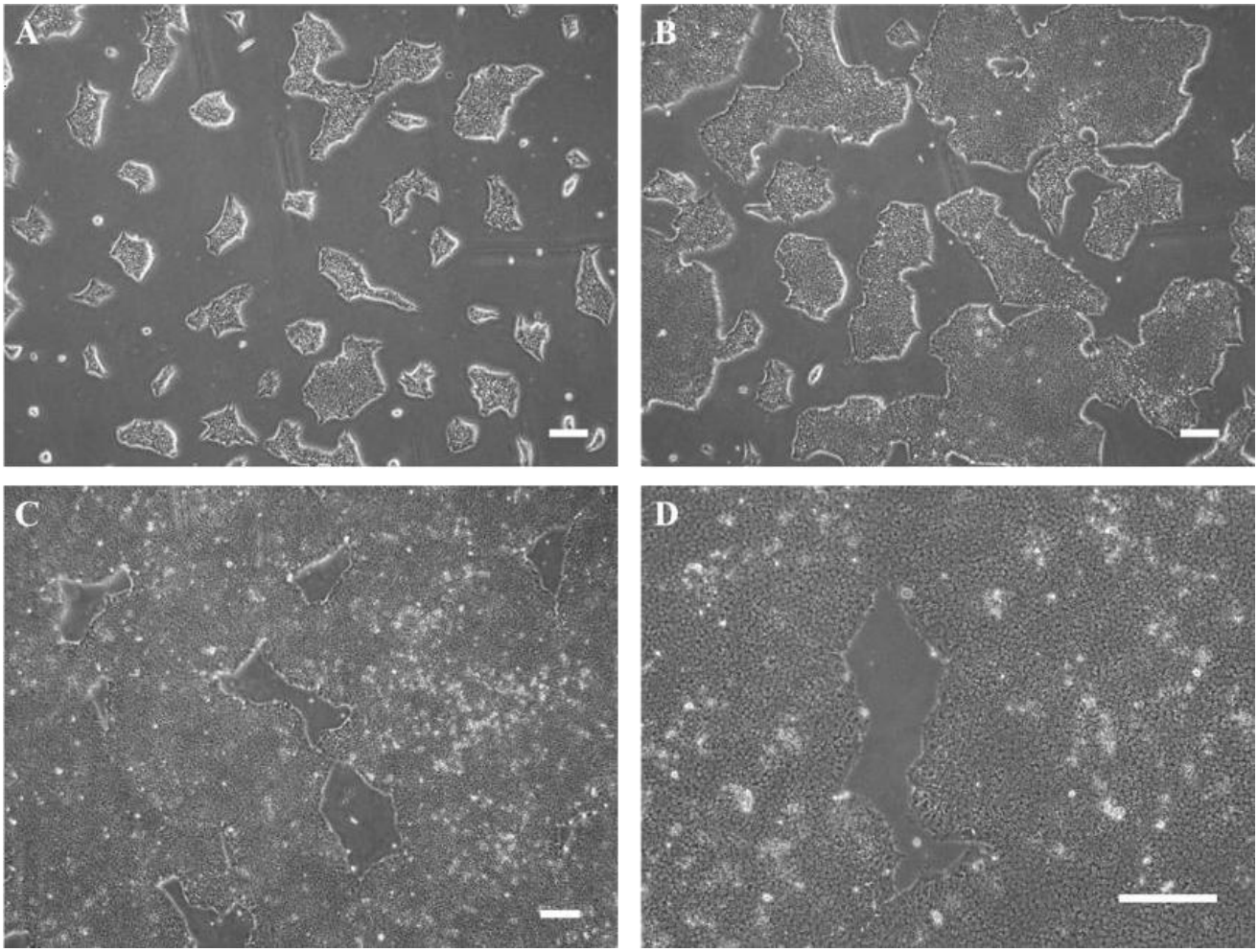

図1： ncTarget ヒト多能性幹細胞培地で連続培養したhiPSCの細胞形態（Matrigel Plate）スケールバー：200 μm
A、B、Cはそれぞれ培養2日目、3日目、4日目のhiPSC形態を示し、Dは培養4日目における拡大細胞図です。

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-C/D参照**）、通常は4日ごとに継代を行います。コロニーが小さくコンフルエンシーが不足しても、培養期間は5日を超えないように推奨します。

   1.2、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、中央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せば、iPSCの継代が必要です。

2. 継代比率：細胞の成長状態や実験目的に応じて 1:5～1:20 で継代を行います。細胞状態が正常で、コロニーが85%コンフルエンシー大きさが均一（**図1-C/D参照**）な場合、1:10 で推奨します。密度が低い場合は継代比率を下げ、高い場合は比率を上げます。

3. Matrigel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に約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ncTarget完全培地 を2 mL/ウェルで準備し、1:4000でBlebbistatin（10mM） を添加し、室温（～25℃）まで戻します。

   TIPS：2mLのncTarget完全培地に0.5 μL のBlebbistatin（10 mM）を添加します。

5. iPSCウェルの培体を吸引除去後、DPBS（Ca^{2+}/Mg^{2+}不含）を2 mL/ウェルで加え、軽く揺らして吸引除去します。

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

7. 37℃のインキュベーターに入れ、7～8分間インキュベートします。

   TIPS：（1）7～8分間消化後、顕微鏡下で細胞の状態を観察します。大部分の細胞が明るく丸くなり、かつ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。もし大部分の細胞がまだ明るくなっていない場合（図2A＆B）、消化時間を延長する必要があります。

   （2）6ウェルプレートを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。

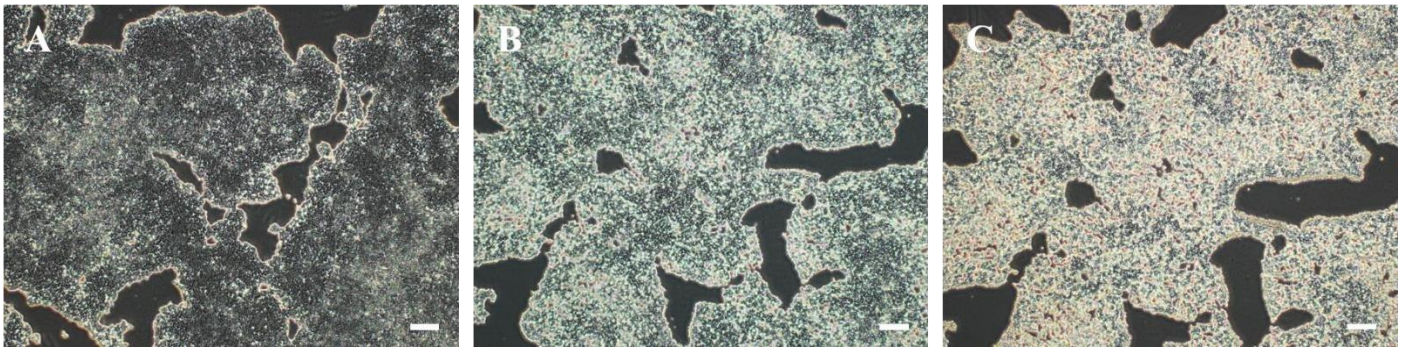

図 2：（A）EDTAで消化4 分後　（B）EDTAで消化6 分後（C）EDTAで消化 8 分後　スケールバー：200 μm

8. 消化処理終了後、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戻し、細胞を振盪しないよう注意します。EDTA継代使用液を傾けて除去します。

9. すぐに温めたBlebbistatin+ncTarget完全培地を2 mL/ウェル添加し、6ウェルプレートを水平方向に十字振り、細胞が基質から剥離するようにします。

TIPS：（1）Blebbistatin+ncTarget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可能です。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、ncTarget培地を添加したらすぐ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ncTarget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Matrigel溶液を吸引除去し、予温した**Blebbistatin+ncTarget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、各プレートの継代に必要な細胞数を算出した後、15 mL遠心管に移し、予温したBlebbistatin+ncTarget完全培地で12 mLに定容し、Matrigel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**ncTarget完全培地**に交換します。以降は毎日培地交換を実施し、4～5日後に継代または凍結保存を行います（図1参照）。

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-C/D参照**）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個の生存細胞を回収し、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、室温まで温めておきます。**使用前によく振り混ぜます。**

   TIPS：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ります。
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凍結管に加えます。

8. 細胞をプログラム凍結ボックスに静置し、-80℃のフリーザーで一晩保管後、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の培地で継代し、24時間後に混和培地（**元培地とncTarget培地を1:1で混和**）に交換します。**2継代**後に完全にncTarget培地に切り替えます。さらに**2-3継代培養することで新しい培養システムに完全適応し**、この時点で細胞凍結処理を行うことが可能です。

九、問題と解決策

➢ **hiPSC培養における分化の発生**
● ncTarget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回以内に優しく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。 ● 観察時はインキュベーターから細胞を15分以上取り出さないでください。 ● 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を与え、分化した細胞の蓄積も起こりやすいです。 ● ncTarget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（例：EDTA）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Matrigelまたは多能性幹細胞用基質で均一に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、細胞が十分に接着していることを確認し、初回の培地交換を行います。 ● 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、再度水平十字振りを行います。