NcMission™ hMSC Medium V3.0-取扱説明書

一、製品概要

NcMission™ hMSC Medium V3.0は、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™ hMSC Medium V3.0 製品詳細

製品情報	品番	規格	保存条件
NcMission™ hMSC Medium V3.0の内容物：	**RP02010**	**1 Kit**	**2℃～8℃***
NcMission™ hMSC Medium V3.0 Basal Medium	RP02010-1	500 mL	2℃～8℃
NcMission™ hMSC Medium V3.0 Supplement	RP02010-2	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™ hMSC Medium V3.0	Shownin	RP02010
MSC Cryopreservation Medium	Shownin	SN-06-1310
TrypLE Express Enzyme (1X), no phenol red	Thermo Sci.	12604013
T75/T175/T225細胞培養フラスコ	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

四、完全培地の調製

4.1　NcMission™ hMSC Medium V3.0 Supplement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™ hMSC Medium V3.0 Basal Medium : 500 mL

NcMission™ hMSC Medium V3.0 Supplement : 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Supplement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Supplementを解凍し、100 mLのBasal Medium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（臍帯組織塊法を例とする）

5.1　脂肪採取：クリニックの指示に従い脂肪組織を採取し、4℃で輸送し、24時間以内に処理します。

5.2　無菌条件下で脂肪抽出物を吸引し、DPBS（または生理食塩水）で数回洗浄し、脂肪吸引手術用薬剤及び血球を完全に除去（無色化）します。眼科用滅菌ハサミとピンセットで組織を整えた後、約1-2 mm^3の大きさに切断します。

5.3　0.1% タイプIIコラーゲナーゼを用い、37℃で45-60分間振盪消化し、800×gで10分間遠心処理します。上層は未消化脂肪組織と油脂です。ピペットで下層を慎重に挿入して細胞含有消化液を吸引し、70μm細胞フィルターで濾過し、濾液を600×gで8分間遠心処理後、上清を廃棄します。細胞沈殿を2倍量のDPBS（または生理食塩水）で懸濁し、600×gで5分間遠心処理します。同条件でもう 1回遠心洗浄を繰り返します。

5.4　**NcMission hMSC完全培地**を添加し、細胞密度を2×10^4 cells/mlに調整後、T25 cm^2フラスコに播種します。37℃・5% CO_2インキュベーターで培養を開始します。

5.5　48時間後に新培地に交換し、以降3日毎に培地更新を行います。成長状況を観察・記録し、コンフルエンシー90%に達した時点で継代培養を行います。

5.6　細胞消化：培養上清と組織塊を除去し、生理食塩水で1回洗浄後、吸引除去します。37℃に温めた**TrypLE**を添加し（消化液の使用量は表4を参照）、37℃で5-7 分間消化します（**消化中は移動しないでください**）。その後、同等量の**NcMission hMSC 完全培地（または生理食塩水）**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）。

5.7　細胞数計測：5～10 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。

5.8　細胞播種：5 mLの **NcMission hMSC 完全培地**を加えて細胞を再懸濁します。適切な密度（**6000-**

8000/cm²）で培養容器に播種し、適量（**表4参照**）の予温した新鮮**NcMission hMSC完全培地**を添加します。水平方向に十字振りを3回行った後、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達した時点で継代可能です。

5.9　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5.6** 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/管）、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。

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 hMSC完全培地**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 hMSC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、**NcMission hMSC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。

6.4 適切な播種密度（**6000-8000/cm²**）で細胞を培養容器に播種し、適量（**表3参照**）の室温に戻した新鮮**NcMission hMSC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℃・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達した時点で継代可能です。

表 3：hMSC 継代&培養試薬の推奨使用量

培養容器	底面積	ncMission完全培地	TrypLE
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　30分前に**NcMission hMSC完全培地**と細胞消化液（**研究用：トリプシン溶液＋トリプシン阻害剤／臨床用：TrypLE**）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、37℃に予温した**TrypLE**を添加します（消化液の使用量は**表4**を参照）。37℃で5-7分間消化します（**消化中は移動しないでください**）。その後、同等量の**NcMission hMSC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**）。

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）。遠心して細胞を回収します（**200×g、5分間**）。

7.5　**NcMission hMSC完全培地**5 mLを加えて細胞を再懸濁します。適切な密度（**6000-8000/cm^2**）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 hMSC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℃・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達した時点で継代可能です。

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™ hMSC Medium V3.0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™ hMSC Medium V3.0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。