

ロンザジャパン株式会社

バイオサイエンス事業部

〒104-6591 東京都中央区明石町8-1
聖路加タワー39階

テクニカルサポート TEL: 03-6264-0663

E-mail:

bioscience.technicalsupport.jp@Lonza.com

Poietics™ ヒト間葉系幹細胞

操作手順マニュアル/2019年5月改訂

Poietics™ ヒト間葉系幹細胞 操作手順マニュアル

製品開封および保存方法

当製品は研究用途に限定されています。ヒトおよび動物に対する診断や治療用途には使用することはできません。

注意事項：Clonetics™ と Poietics™ 細胞製品はヒト由来成分が含有されており、潜在的な感染リスクがあります。FDA（米国食品医薬品局）が承認する試験方法により、各細胞ドナーに対するHIV-1ウイルス、Hepatitis Bウイルス、Hepatitis Cウイルス陰性は確認されていますが、ドナーに対するウイルス試験が不可能なケースでは細胞製品に対してウイルス核酸の有無がテストされています。試験による完全なHIV-1ウイルス、Hepatitis Bウイルス、Hepatitis Cウイルス陰性の保証はしていません。全てのヒト原料を含む製品はバイオセーフティレベル2施設での取扱いをお願いします。

製品開封および保存方法

1. 関連製品の容器の破損や液漏れがないかを確認下さい。
2. 凍結細胞製品 – 製品到着後、直ちに輸送容器（ドライアイス冷却）から液体窒素タンクに移して下さい。もしくは、融解ステップに移り、細胞製品の使用を開始して下さい。製品到着時に保冷用のドライアイスが消失しているような場合は、弊社カスタマーサポートまでお問合せ下さい。
3. BulletKit™ 製品 – 到着後、基本培地は冷蔵、添加因子キット（SingleQuot™）は冷凍で保存下さい。添加因子キットを基本培地に添加後は、1か月以内にご利用下さい。再凍結は推奨できません。推奨培地キット以外の培地や試薬を使用された場合の細胞製品の保証は致しかねます。
4. 冷蔵状態ではトリプシン活性は徐々に減少します。トリプシン/EDTA溶液は、チューブへ小分け分注して冷凍保存することをお奨めします。

培地の調製

1. コンタミネーションを防ぐために、MSCGM™ 添加因子各バイアルの外部表面を70%エタノールで除菌して下さい。
2. クリーンベンチ内で、Mesenchymal cell growth supplement (MCGS) ボトルを開封し融解後、全量をMSC基本培地440 mLに添加して下さい。
3. 融解後のL-グルタミン溶液およびGA-1000溶液全量をMSC基本培地に添加して下さい。
4. 各添加因子バイアルを培地でリンスして回収して下さい。
5. この添加因子を加えた培地のみを間葉系幹細胞の培養に使用して下さい。

細胞の融解と培養の開始

1. ヒト間葉系幹細胞の推奨播種密度は5,000~6,000 cells/cm²です。
2. 1の推奨播種密度となるように、適切な培養容器を選定し、培地を培養容器に添加して下さい(0.2~0.4 mL/cm²)。その後、CO₂インキュベータ内で少なくとも30分間は平衡化するようにして下さい。
3. 凍結バイアルの開封前にエタノールで拭き取って下さい。圧を逃すために軽く1/4回転ほどキャップを捻り、その後すぐにキャップを締め、37℃ウォーターバス上で融解します。
4. 凍結バイアルを目視して、細胞溶液中の氷片がわずかに残った状態になったらバイアルをウォーターバスから取り出し、余熱で完全に融かして下さい。90秒以上の融解は避けるようにして下さい。
5. バイアル表面の水分を拭き取った後、2の平衡化されたフラスコと共にクリーンベンチに移し、バイアルは70%エタノールで拭き取って下さい。
6. バイアル中の細胞懸濁液を、ピペットを使って5 mLの平衡化培地を加えた15 mLチューブにゆっくりと移して下さい。
7. 500 gで5分間 室温で遠心して下さい。
8. 培地上清を除去後、残った最小限の培地と細胞ペレットをピペットで穏やかに懸濁して下さい。懸濁後、セルカウントを実施して下さい。
9. 必要量の細胞懸濁液を準備しておいたフラスコに移して下さい。フラスコ底面全体に細胞懸濁液が行き渡るように穏やかにフラスコを揺らして下さい。
10. CO₂インキュベータで培養して下さい。

継代

1. クリーンベンチ内で、フラスコ中の培地を除去して下さい。
2. 接着細胞層をPBS溶液〔カタログ番号: 17-512F〕で洗浄します。溶液は細胞表面に直接添加せず、フラスコの反対側に加えた後、フラスコを傾けて溶液を細胞に浸して下さい。フラスコを数回揺らして細胞をリンスした後、PBS溶液を除いて下さい。
3. 十分量のトリプシン/EDTA [間葉系幹細胞用] (カタログ番号: CC-3232) を添加し、細胞がトリプシン溶液に浸るようにフラスコを前後にゆっくりと揺らして下さい。室温で5分間のインキュベーションを行って下さい。顕微鏡下で90%以上の細胞が剥がれていない場合はインキュベーションを続け、細胞剥離を3分間おきに確認して下さい。フラスコのタッピングにより細胞剥離が早まります。15分以上のインキュベーションは避けるようにして下さい。

- 90%以上の細胞剥離が確認されたら、フラスコを立て、トリプシン/EDTA溶液と同量のMSCGM™ 培地をフラスコに添加します。ピペットを使って培養表面を溶液で洗い、細胞懸濁液を遠心チューブに移して下さい。
- トリプシンを除去するために、600 gで5分間 室温で遠心し、上清を除いて下さい。
- 細胞ペレットを少量のMSC培地で懸濁して下さい。
- 細胞懸濁液の一部を回収し、血球計算版やセルカウンターでセルカウントを行って下さい。全体の細胞数を算出し、収量を記録して下さい。
- 必要に応じて、細胞懸濁液をMSCGM™ 培地で希釈し、濃度調整を行って下さい。再度セルカウントを実施して下さい。
- トリパンブルーで細胞生存率を調べて下さい。
- 以下の計算式で全生細胞数を算出して下さい。

$$\text{全生細胞数} = \frac{\text{細胞カウント数} \times \text{細胞生存率} (\%)}{100}$$

- 以下の計算式で使用するフラスコ数を算出して下さい。

$$\text{フラスコ数} = \frac{\text{全生細胞数}}{\text{フラスコ面積} \times \text{播種密度} (5,000 \sim 6,000 \text{ cells})}$$

- 以下の計算式でフラスコに播種する細胞懸濁液量を算出して下さい。また追加するMSCGM™ 培地量を決め、フラスコの全培地量が0.2~0.4 mL/cm²になるようにして下さい。

$$\text{播種量} = \frac{\text{細胞懸濁液 全量}}{11 \text{ で決定したフラスコ数}}$$

- 各フラスコに、細胞名、ロット番号、継代数、継代日を記載するようにして下さい。
- 12で算出したMSCGM™ 培地を追加して下さい。
- CO₂インキュベータで培養して下さい。
- 播種後、3~4日で培地を完全にに取り除き、同量のMSCGM™ 培地で入れ替えて下さい。継代後、6~7日でコンフルエントに近づき、次回継代のタイミングとなります。

細胞の維持

- ヒト間葉系幹細胞は播種/継代後3~4日で培地交換を行って下さい。
- 培地交換時は穏やかに、また完全にMSCGM™ 培地を培養容器から取り除いて下さい。
- 平衡化した同量のMSCGM™ 培地と交換し、CO₂インキュベータに戻して下さい。
- 5,000~6,000 cells/cm²の播種密度で播種/継代した場合、6~7日でコンフルエントに近づきます。ヒト間葉系幹細胞は接触阻害されるため、サブコンフルエント(90%コンフルエント)に達したら、継代するようにして下さい。細胞は第二継代で凍結保存されています。第五継代までに使用するようにして下さい。

脂肪細胞への分化手順

脂肪分化誘導培地の準備

脂肪分化誘導培地は、ヒト間葉系幹細胞が100%コンフルエントに達した時に使用して下さい(継代後5~13日)。分化誘導培地は細胞がコンフルエントに達する前に準備しておくようにして下さい。

- コンタミネーションを防ぐために、脂肪分化誘導培地(PT-3102B) ボトルおよび下記の添加因子キットの外部表面を70%エタノールで除菌して下さい。
 - h-insulin (recombinant)
 - L-glutamine
 - MCGS
 - dexamethasone
 - Indomethacin
 - IBMX (3-isobutyl-methyl-xanthine)
 - GA-1000
- 添加因子キット各バイアルを開封し、脂肪分化誘導培地170mLに添加して下さい。
- 各添加因子バイアルを培地でリンスして回収して下さい。
- この添加因子を加えた誘導培地のみを間葉系幹細胞の脂肪分化誘導に使用するようにして下さい。使用するタイミングまで冷蔵保存して下さい。

脂肪分化メンテナンス培地の準備

- コンタミネーションを防ぐために、脂肪分化メンテナンス培地(PT-3102A) ボトルおよび下記の添加因子キットの外部表面を70%エタノールで除菌して下さい。
 - h-insulin (recombinant)
 - L-glutamine
 - MCGS
 - GA-1000
- 添加因子キット各バイアルを開封し、脂肪分化メンテナンス培地170mLに添加して下さい。
- 各添加因子バイアルを培地でリンスして回収して下さい。
- 使用するタイミングまで冷蔵保存して下さい。

脂肪分化 培養プロトコル

- プレートやシャーレなどの培養容器にヒト間葉系幹細胞を2.1 x 10⁴ cells/cm²の密度で播種して下さい。MSCGM™ 培地は0.2~0.3 mL/cm²を使用して下さい。例:6ウェルプレート(ウェル面積 9.6 cm²)の場合は、ウェル当たり培地2.0 mLを使用し、2 x 10⁵ cellsを播種します。
- 細胞がコンフルエントに達するまで(5~13日)、2~3日おきにMSCGM™ 培地の交換を行って下さい。最適な脂肪分化のためには、細胞はコンフルエントの状態である必要があります。
- 100%コンフルエントになったら、3サイクルの誘導/メンテナンスを実施し、脂肪分化を促進させます。1サイクルにおいて、3日間の脂肪分化誘導培地による培養、その後1~3日間の脂肪分化メンテナンス培地による培養を行います。同じスケジュールで、誘導培地の部分をメンテナンス培地に置き換えた未分化コントロールを取るようにして下さい。
- 誘導/メンテナンスの3サイクル実施後、さらに7日間、メンテナンス培地による培養を行って下さい。メンテナンス培地は2~3日おきに交換して下さい。
- 脂肪分化のレベルは、顕微鏡による脂肪滴の観察により判断することができます。脂肪分化を定量的に記録したい場合は、AdipoRed™ アッセイ試薬(カタログ番号:PT-7009)を使用をお奨めします。未誘導の細胞では脂肪滴はほとんど観察されることはありません。

軟骨細胞への分化手順

軟骨分化誘導不完全培地の準備

1. コンタミネーションを防ぐために、軟骨分化基本培地ボトルおよび下記の添加因子キットの外部表面を70%エタノールで除菌して下さい。
 - i. dexamethasone
 - ii. ascorbate
 - iii. ITS + supplement
 - iv. GA-1000
 - v. sodium pyruvate
 - vi. proline
 - vii. L-glutamine
2. 軟骨分化誘導不完全培地の準備として、添加因子キット各バイアルを開封し、軟骨分化基本培地185 mLに添加して下さい。
3. 各添加因子バイアルを培地でリンスして回収して下さい。
4. 使用するタイミングまで冷蔵保存して下さい。

TGF-β3の準備と小分け分注

1. TGF-β3凍結乾燥品 (PT-4124) を、1 mg/mLのBSAまたはHAS添加した4 mM塩酸で再懸濁し、20 μg/mL濃度に調製して下さい (例: 2 μg TGF-β に対して100 μL溶媒を使用)。調製したTGF-β 溶液1 μLを2 mLの軟骨分化不完全培地に添加し、完全培地とします。
2. TGF-β 溶液をチューブに小分け分注します。-70°C以下で6ヵ月間保存可能です。例えばTGF-β 溶液5 μL毎に凍結保存し、それぞれ 10 mLの軟骨分化不完全培地のサプリメントとして使用します。

軟骨分化誘導完全培地の調製

1. 小分け保存されたTGF-β溶液を融解し、低速で遠心をかけて下さい。
2. 使用する分だけ軟骨分化不完全培地をチューブに移して下さい。
3. TGF-β 製品全量を使用の場合は、100 μLのTGF-β 溶液を200 mLの不完全培地に添加します。
4. 溶液を混合します。TGF-β溶液の添加後、チューブのキャップを締め、数回転倒混和させて下さい。
5. 軟骨分化誘導の完全培地が調製されました。TGF-βの最終濃度は10ng/mLとなります。注意事項: 完全培地は12時間以内に使用するようして下さい。

軟骨分化 培養プロトコル(ペレット培養)

1. 1サンプルの軟骨分化の細胞ペレット形成には、ヒト間葉系幹細胞 2.5 x 10⁵ cellsが必要となります。軟骨分化実験に必要な全細胞量を算出し、チューブに移して下さい。
2. 不完全培地で細胞洗浄:チューブを150 g 室温にて5分間遠心して下さい。遠心後上清を除去し、7.5 x 10⁵ cells/mLになるように不完全培地を加え、細胞を懸濁して下さい。再度、150 g 室温にて5分間遠心し、上清を除去して下さい。
3. 5.0 x 10⁵ cells/mLの濃度になるように完全培地を加え、細胞を懸濁して下さい。
4. 2.5 x 10⁵ cellsを含む0.5 mLの細胞懸濁液を15 mLポリプロピレンチューブに分注し、150 g 室温にて5分間遠心して下さい。今回は上清を除去したり、ペレットを懸濁することはありません。注意事項:このステップでは細胞がチューブに接着しないように、ポリプロピレンチューブを使用して下さい。
5. ガス交換のために、チューブのキャップを半分緩めCO₂インキュベータ内で培養を開始して下さい。ペレットは24時間は崩さないように注意して下さい。
6. 各チューブは2~3日毎に培地交換を行います。アスピレーターでの培地吸引時には、ペレットの吸引を防ぐためにアスピレーター先端に200 μLチップを装着させて下さい。0.5 mLの軟骨分化完全培地を各チューブに添加して下さい。
7. 培地交換後、チューブ底面を軽く弾いてペレットが浮動することを確認して下さい。チューブのキャップを緩め、CO₂インキュベータでの培養を再開させて下さい。
8. 軟骨分化ペレットは14~28日で回収します。ペレットは、組織学的分析のためホルマリン固定パラフィン包埋処理または凍結切片を作製して下さい。切片はスライドにマウントし、II型コラーゲンの免疫染色を行うことも可能です。

骨芽細胞への分化手順

骨芽分化誘導培地の準備

1. コンタミネーションを防ぐために、骨芽分化基本培地ボトルおよび下記の添加因子キットの外部表面を70%エタノールで除菌して下さい。
 - i. Dexamethasone
 - ii. L-glutamine
 - iii. ascorbate
 - iv. penicillin/streptomycin
 - v. MCGS
 - vi. β -glycerophosphate
2. 添加因子キット各バイアルを開封し、骨芽分化基本培地170 mLに添加して下さい。
3. 各添加因子バイアルを培地でリンスして回収して下さい。
4. 使用するタイミングまで冷蔵保存して下さい。

骨芽分化 培養プロトコル

1. プレートやシャーレなどの培養容器にヒト間葉系幹細胞を 3.1×10^3 cells/cm²の密度で播種して下さい。MSCGM™ 培地は0.2~0.3 mL/cm²を使用して下さい。例:6ウェルプレート(ウェル面積 9.6 cm²)の場合は、ウェル当り培地2.0 mLを使用し、 3×10^4 cellsを播種します。分化の過程で細胞が層状に剥離することを防ぐために、コラーゲンコート of 培養容器を推奨します。
2. CO₂インキュベータでの培養を開始します。4~24時間培養し、細胞を接着させて下さい。
3. 骨芽分化誘導のために、MSCGM™ 培地を骨芽分化誘導培地と交換して下さい。
4. 2~3週間の培養期間、2~3日の間隔で新しい骨芽分化誘導培地に置き換えて下さい。同じスケジュールでMSCGM™ 培地と培地交換を行うコントロールサンプルを用意して下さい。
5. 間葉系幹細胞は、骨芽分化と石灰化の進展と共に、紡錘体様の形状から立方体様の形状に形態変化を起こします。ポスト・コンフルエントの細胞層において間隙が形成され、また細胞表層において剥離が始まります。この剥離が観察されたら、すみやかに石灰沈着などを指標とした骨芽分化の解析を実施するようにして下さい。
6. 石灰化アッセイのために細胞の回収をする場合は、細胞をカルシウムフリーのPBS溶液で洗浄後、0.5 M塩酸の存在下で細胞をスクレイブして下さい。骨芽分化誘導サンプルと未処理サンプルの比較を取るようにして下さい。

オーダー情報

カタログ番号	製品名	内容品
PT-2501	hMSC・ヒト間葉系幹細胞	>7.5 x 10 ⁵ cells
PT-3001	MSCGMTM BulletKit™	MSCBM基本培地 440 mL MSCGM™添加因子キット
CC-3232	間葉系幹細胞用 トリプシン/EDTA	100 mL
17-512F	D-PBS	500 mL
PT-3004	hMSC 脂肪分化 BulletKit™	脂肪分化メンテナンス培地 (170 mL) 脂肪分化メンテナンス添加因子キット 脂肪分化誘導培地 (170 mL) 脂肪分化誘導添加因子キット
PT-7009	AdipoRed™ アッセイ試薬	5 x 4 mL
PT-3003	hMSC 軟骨分化 BulletKit™	軟骨分化基本培地 (185 mL) 軟骨分化添加因子キット
PT-4124	TGF- β 3	凍結乾燥品 2 μ g
PT-3002	hMSC 骨芽分化 BulletKit™	骨芽分化基本培地 (170 mL) 骨芽分化添加因子キット

品質保証

当製品は in vitro 細胞培養において、有限寿命の細胞となります。ロンザは、推奨培地およびプロトコルが適切に使用される場合においてのみ細胞製品を保証します。融解、維持手順が適切になされている場合、凍結ヒト間葉系幹細胞は十分な生存性・機能性を保持していることが保証されています。

品質管理

細胞製品全ロットの HIV-1、Hepatitis B、Hepatitis C ウイルス試験は陰性を示しています。同様にマイコプラズマ、細菌、酵母、カビ類に対する試験も陰性を示します。細胞生存性および細胞形態については、凍結融解後の試験に合格しています。各ロットの品質管理試験結果については、試験成績書 (CoA) を参照下さい。