

## 細胞培養のウィーニングプロトコル

プロトコル#1：培地交換 – 非接着依存性細胞  
(浮遊液)

所要期間：約2～6週間

培養条件:

- 哺乳動物細胞：95% Air、5% CO<sub>2</sub>、35～37℃
  - 無脊椎動物細胞：Air、25～27℃
1. 最大細胞密度の状態での培養を開始します。
  2. 注記：継代培養中にトリプシンに曝露された接着依存性細胞は、プロトコル#2を用いて無血清増殖に切り替える必要があります。
  3. 1:2の比率で細胞を無血清培地で希釈します。
  4. 最大細胞密度に達するまで細胞をインキュベートします。
  5. 非接着依存性細胞の場合は1:5比率もしくは $3.0 \times 10^5$ 細胞/mlに無血清培地で希釈します。接着依存性細胞の場合は30%のコンフルエンスに希釈します。
  6. 最大限の細胞密度に達するまで細胞をインキュベートします。
  7. この時点で生細胞率が>85%であり、また世代時間が血清を含む培地を使用した場合と同等であれば、血清を含む培地用に最適化された希釈のスケジュールにそって無血清培地で培養を維持できます。
  8. 細胞の増殖が進まない場合や生存率が低い場合、希釈する比率を3回連続で1:2または1:5に維持します。この期間中、細胞密度は $3.0 \times 10^5$ 細胞/mlまたは30%のコンフルエンス以上にしてください。
  9. 徐々に希釈する比率を増やし、使用中の細胞型について最大値を得られるようにします。

**注記：**いくつかの細胞は増殖のために少量の血清を必要とする場合があります。細胞が上記のプロトコルを使用しても無血清培養に順応しなかった場合、0.1%～0.5%の血清を培養液に追加するか、技術サポートまでお問い合わせください。

## プロトコル#2：血清希釈液 – 接着依存性細胞用

所要期間：約2～6週間

培養条件:

- 哺乳動物細胞：95% Air、5% CO<sub>2</sub>、35～37℃
  - 無脊椎動物細胞：Air、25～27℃
1. 最大細胞密度の状態での培養を開始します。
  2. 接着依存性培養液をトリプシン処理し、適切な大きさの遠心分離用チューブに移します。接着非依存性細胞は、遠心管に直接移します。
  3. 350 × gで5分間遠心分離機にかけて細胞を沈殿させます。
  4. 無血清培地に5%血清 (v/v) を加え、細胞を再懸濁します。
  5. 血清を添加した無血清培地を使用して、細胞密度が接着依存性細胞のコンフルエンス30%を下回らないよう、細胞濃度を調整します。
  6. 最大限の細胞密度に達するまで細胞をインキュベートします。
  7. 希釈するごとに低い血清濃度を低くして手順2～6を繰り返します。5%の血清から開始し、2%、1%、0.5%、0.1%の順に減らしていき、最終的には培養液から血清を除きます。

**注記：**培養細胞の生存率が80%未満に低下する場合、または血清濃度の低下後に世代時間が顕著に長くなる場合、再度血清レベルを下げる前に血清レベルを元の値に戻し、2回希釈するの間、細胞数を維持するようにします。このような細胞では、さらに血清濃度を下げる必要があるかもしれません。細胞型の中には、増殖のために少量の血清を必要なものもあります。細胞が上記のプロトコルを使用しても無血清培養に順応しなかった場合、0.1%～0.5%の血清を培養液に追加するか、技術サポートまでお問い合わせください。