

R:STEM Medium for hMSC High Growth

注意事項および使用説明書

概要

R:STEM Medium for hMSC High Growth（本培地）はロート製薬株式会社（当社）が日本で治験を実施したノウハウを活用して作られた培地です。当社が治験で使用している培地と同等の原料グレード、製造環境そして品質管理下で製造されています。本培地は二次原料までさかのぼり血清等の動物由来およびヒト由来原料が使用されていない無血清培地であり、化学的に定義された（Chemically defined）成分で構成されています。そのため、ロットチェックなどの手間を省略することができ、再現性の良いデータが得られるように設計されています。また、動物由来およびヒト由来原料をしていないためウイルス等の汚染リスクが低いことも特徴です。本培地は間葉系間質細胞（hMSC）の分離、初代培養および拡大培養に適した培地です。指定したフラスコを使用すればコーティング剤や血清代替物などの添加は不要で、この培地ひとつで培養が可能です。臍帯由来 hMSC、脂肪由来 hMSC および骨髄由来 hMSC での培養実績があります。

保管方法

マイナス30℃以下の暗所で保管し、使用期限内に使用して下さい。
一度解凍したものは劣化につながりますので再凍結を避けて下さい。

解凍および使用方法

室温下（15-25℃）で解凍して下さい。

解凍後は優しく混和してすぐに2-6℃付近の暗所で保管して下さい。

解凍後は1か月以内に使用して下さい。

少量ずつ使用する場合は必要量を無菌的に分取し、室温に戻したのち細胞に添加して下さい。

解凍後に培地成分の一部が白い析出物として確認される場合がございますが、品質には問題ないことを確認しております。

注意！ 解凍時などにヒーターなどで室温以上に加熱しないで下さい。培地成分の変性の原因になります。

推奨フラスコ

Corning® CellBIND 表面のフラスコであれば接着因子などのコーティングをしなくても培養が可能です。

推奨使用方法

I. hMSC の分離および初代培養

1. コラゲナーゼなどの組織分散液で脂肪組織などを処理し hMSC を含む分散液を取得する
2. 本培地を分散液の倍量以上加えたのち 50mL の遠沈管に回収し遠心分離（常温、800 G、5 分間以上）する
3. 上清を注意深く除去したのち本培地を 45 mL 添加してよく懸濁する（1 回目）
4. 遠心分離（室温、400 G、5 分間以上）ののち注意深く上清を除く
5. 再び 30 mL の本培地を添加してよく懸濁する（2 回目）
6. 遠心分離（室温、400 G、5 分間以上）ののち上清を注意深く取り除く
7. 適量の培地を添加してよく攪拌して均一にしたのち Corning® CellBIND 表面（推奨フラスコ）に播種する
（推奨培地量：播種面積 75 cm² あたり 10 mL 以上）
8. 37 °C、5% CO₂ 雰囲気下で培養する
9. 毎日細胞を観察し 70-90%コンフルエントまで培養したのち経代培養を行う
10. 4 日以上培養する場合は 3 日毎に培地を交換する

注意！ 組織等によって至適な条件は異なります。一例としてご参照下さい。また、本培地には抗生物質は含まれておりません。必要に応じて抗生物質を添加して下さい。

II. 経代および拡大培養

1. Corning® CellBIND 表面で 70-90%コンフルエントまで培養した細胞を PBS などで洗浄する
2. 洗浄液を注意深く除いたのちトリプシンなどの細胞剥離液で細胞を剥離する
3. 剥離液全量を遠沈管に分取する
4. フラスコに剥離液と同量の本培地を加えてフラスコ全体を洗浄する
5. 全量を 3 の遠沈管に添加する
6. 細胞剥離液を遠心分離（室温、400 G、5 分間）したのち、注意深くすべての上清を除く
7. 10 mL 以上の本培地を加えてよく混和させる
8. 再び遠心分離したのち上清を注意深く除く

9. $1.0 \times 10^5 \sim 10^6$ cells/mL 付近となるように本培地を添加して細胞数をカウントする
5000~10000 cells/cm²の播種密度となるように本培地を添加する
10. よく攪拌して均一にしたのち Corning® CellBIND 表面に播種する
11. 37 °C、5% CO₂ 雰囲気下で培養する
12. 毎日細胞を観察し 70-90% コンフルエントまで培養したのち経代培養を行う
13. 4 日以上培養する場合は 3 日毎に培地を交換する

注意！ オーバーコンフルエントにならないように注意して下さい。

特に臍帯由来 hMSC では剥離しにくくなることがあるので 4 日以内に経代することを強くお勧めします。

本培地は無血清培地でありトリプシン阻害剤を含まないため、剥離剤が培養液に残ると培養性能に影響を与えてしまいます。剥離剤が残らないように洗浄操作に注意して下さい。

III. 凍結細胞の播種

1. 細胞保存液の 9 倍量の本培地を遠沈管に準備する
2. 凍結細胞を上記遠沈管の本培地で洗いこみながら上記遠沈管に回収する
3. 遠心分離（室温、400 G、5 分間）したのち上清を注意深く取り除く
4. $1.0 \times 10^5 \sim 10^6$ cells/mL 付近となるように本培地を添加して細胞数をカウントする
5. 5000~7500 cells/cm²の播種密度で Corning® CellBind® 表面に播種する
6. 37 °C、5% CO₂ 雰囲気下で培養する

注意！ 市販の細胞保存液を使用する場合は保存液の使用方法を優先して下さい。

以上