GMP Grade Msc Serum Free Medium

間葉系幹細胞無血清培地（GMP グレード）セット

DMF 番号
040590

【商品名】
間葉系幹細胞無血清培地（GMP グレード）セット
【仕様と保存】

製品名	商品番号	パッケージ仕様	保存条件	賞味期限
間葉系幹細胞無血清基礎培地（GMP グレード）	NC0106	500mL/瓶	2～8℃、遮光	12 ヶ月
間葉系幹細胞無血清培地添加剤（GMP グレード）	NC0106.S	5mL/バイアル	-20℃、遮光	12 ヶ月
GMP グレード幹細胞穏やかな消化酵素	NC1004.1	500mL/瓶	2～8℃、遮光	12 ヶ月

【用途と説明】
本培地は、骨髄（BM-hMSC）、臍帯（UCM-hMSC）など、様々な由来のヒト間葉系幹細胞の一次細胞分離やシードバンクの構築、連続的な副培養に使用できます。本製品は血清や血清代替物を添加する必要はありません。
化学成分には、動物由来やヒト由来成分を含みません。また、プロダクトバッチ間の差も最小限に抑えているため、GMP 基準に準拠した臨床研究に適しています。
【主な構成成分】
アミノ酸、ビタミン、無機塩、組換えヒトアルブミン、組換えヒトトランスフェリン、組換えヒトインスリン、微量元素等。
【製品設計原理】
DMEM、MEM、M199 などの基礎培地にアミノ酸、ビタミン、無機塩、組換えヒトアルブミン、トランスフェリン、インスリン、微量元素を加え、原代（初代か初期）MSC および後期 MSC の培養に使用できます。また、血清や血清代替物中に含まれる幹細胞分化を促進する成分が入っていないため、幹細胞の未分化状態を維持します。
【製品性能指標】
1. ヒト臍帯から一次細胞を分離する期間（ブロック法）

細胞成長するまでの期間: 5-9 日
細胞を継代までの期間: 12-15 日

※浮腫または凍結保存された臍帯では細胞成長期間が 14 日、採取まで 21 日かかります。また、細胞を単離できないこともあります。

2. 細胞のパスに必要な時間: 3-4 日（種密度: 10,000-20,000 セル/cm²）
3. 細胞表現型: CD14, CD19, CD34, CD45, HLA-DR は陰性（<2%）、CD44, CD73, CD90, CD105 は陽性（>95%）
4. 細胞形態:　紡糸形の細胞が指紋状または渦状に成長します。
5. 培地の指標:
    - 浸透圧: 280-350 mOsm/Kg
    - エンドトキシン: <0.25EU/mL
    - 無菌性: 細菌・真菌は検出されない
    - マイコプラズマ: 検出されない
    - pH: 6.8～7.8
    - 外観: 淡い黄色の透明液体
    - 容量: 500mL/瓶

【使用前の特別なヒント】

1. 製品の使用方法
   本製品の使用方法は、血清培地および血清代替培地と異なります。必ず取扱説明書をよく確認し、操作してください。特に、培養瓶やシャーレに培養液を添加する際の操作手法など、いくつかの操作に厳格な要求があります。
2. 膵臓酵素の阻害剤の不使用
   本製品には膵臓酵素の阻害剤が含まれていません。そのため、膵臓酵素の消化を停止するために使用することはできません。
   本製品を使用する際には、GMP グレードの幹細胞温和消化酵素（商品番号: NC1004.1）を使用することを推奨します。この方法では、膵臓酵素阻害剤を必要とせず、培養上清を懸濁した後に遠心除去するだけで消化を停止できます。
   消化時間が 10 分以内であれば、細胞に対する損傷は少なく、回収された細胞の活性率が高い状態を維持できます。また、継代後の増幅倍数も高いレベルを維持し、細胞消化後の膵臓酵素残留の問題も回避できます。

【MSC 完全培地の準備】

1. 培地添加剤を室温で溶かし、基礎培地に 1:100 の割合で加えることで MSC 完全培地が完成します。使用前に室温で 10～30 分予熱する必要があ

りますが、時間が長すぎないように注意し、強い光や紫外線の照射は避けてください。

2. 完全培地は2～8℃で30日間保存可能です。保存中、少量の白色綿状の析出が発生する場合がありますが、これは正常であり、製品性能に影響はありません。培地成分は、溶液中で分解しやすいので2週間以内に使い切ることが望ましく、完全培地の調合後は何度も予温を繰り返さないように注意してください（予温は最大5回まで）。予温の際は必要量のみを取り出し、30日を過ぎた完全培地の使用は避けてください。
3. 科学研究で少量を何度も使用する場合、添加物が溶けた後に分装することを推奨します（添加物は出荷後、凍結融解は1回のみ許可されています）。

注意喚起:

- 添加物の分装に関して
  添加物を分装する場合、分装後の全体積が5mL未満になることがあります。これは、包装瓶の壁やキャップ、またはピペットの先端に添加物が残留するためです。最後に残った添加物は元の瓶に戻すことが推奨されます。添加物が不足する可能性を考慮し、特別な場合を除いて分装は推奨されません。また、37℃の水浴で添加剤を溶融することは避けてください。そうすることで添加剤の活性が低下し、製品の性能が低下する恐れがあります。

【使用環境1: MSC一次細胞分離(ヒト臍帯)】

ブロックプラント法の概要

1. PBSで臍帯を洗浄し、血色がなくなるまで臍帯静脈内膜と動脈を除去します。
2. メスや手術はさみを使って臍帯ゼリーを小さなブロックに切り、培養瓶やシャーレに接種します。組織ブロックを均等に配置し、以下の表を参照して適切な培養液量を添加します。その後、培養器を37℃、5% CO2、95%湿度の二酸化炭素インキュベーターに置きます。
3. 7日目に培地交換を行います。
4. 10日目に再度培地交換を行います。
5. 10-15日後にMSC細胞を回収します。

培養器型式	近似底面積（cm²）	0日目の添加量（mL）	2日目の添加量（mL）	組織ブロック数(ブロック)
60mm皿	21	2	3	7
100mm皿	55	5	7	15

培養器型式	近似底面積（cm²）	0日目の添加量（mL）	2日目の添加量（mL）	組織ブロック数（ブロック）
150mm皿	150	15	15	35
T-25	25	2	3	8
T-75	75	7	8	20
T-175	175	15	20	45
T-225	225	20	25	55

【使用環境2: MSC細胞の連続培養（T-75バイアル例）】

1. 培養72時間後、顕微鏡でMSC細胞を観察し、細胞密度が90%に達したら継代培養を行います。

   特別なヒント: 細胞密度は100%を超えないようにしてください。局部が密になりすぎると、積層成長や凝集を引き起こし、細胞の深刻な老化や分化を招く恐れがあります。セグメント（単離）前に細胞の密度が100%以上（細胞密度が高すぎる）だと、細胞消化異常（細胞全体あるいは片状に脱落）や過剰な細胞剥離操作が起こりやすく、機械的損傷による細胞死を引き起こすことがあります。特に凍結保存後に再利用する場合、注意が必要です。
2. クリーンベンチで培養フラスコの培養液を捨て、10mLのPBSを加えて細胞を洗浄し、その後洗浄液を捨てます。
3. 2mLの幹細胞温和消化酵素を常温（25℃）で添加し、細胞を消化します。
4. 3～5分後、細胞が収縮し丸くなり底から剥がれやすくなり、細胞が流動し始めたら、直ちに温和酵素使用量の2倍の体積（4mL）の完全培地を加え、細胞懸濁液を希釈します。

特別なヒント:

完全培地を用いて温和消化酵素（品番: NC1004.1）を希釈することは、細胞に対して優れた保護作用を持ち、DPBSなどの緩衝液を用いた場合に比べて10～30%多くの細胞を回収できます。

さらに、培養上清または完全培地は細胞活性を保持し常に高い増幅倍数を維持することができます。

室温と温和酵素の温度は消化時間に大きな影響を与えます。夏場室温が高い場合、消化時間は約3分ですが、冬の室温が低い場合は相対的に2～3分延長します。25℃での消化時間は3～5分とします。

5. 細胞を分散させるためにピペットを使用して、ボトルの壁に残っている

細胞を軽くペッティングするし、。

特別なヒント:

この操作を行う際は、動作を必ず穏やかに行うことが重要です。細胞消化過程における細胞損傷は、激しいピペット操作や遠心分離などの機械的損傷によって引き起こされることが多いため、注意が必要です。

6. 細胞懸濁液を 15 mL 遠心チューブに移し、1300 rpm（300 xg）で 5 分間遠心分離します。上清を捨て、2 mL の完全培地を加えて細胞を再懸濁させます。その後、トリパンブルー染色やフローサイトメトリーなどの方法で細胞を計数します。
7. T-75 ボトルに 15 mL の完全培地をアクセスし、細胞を 10000 cells/cm² の密度で接種します。

具体的な方法:

1）培地は培養びんの上面（細胞成長面と反対側）または側面に沿って添加し、培養びんの底面に流れないように注意します。

2）次に、細胞培養瓶を軽く立て、細胞懸濁液が直接フラスコの底に当たらないよう培地に加え、ゆっくりと平らにします。

特別なヒント:

a）培地を培養びんに添加する方法に特に注意してください。適切に行わないと、培地が底面に流れ込み、細胞成長の空白領域が生じやすくなります。（詳細は取扱説明書の「お客様に関するよくある質問」を参照）

b）遠心分離工程は除去できず、幹細胞の穏やかな消化酵素は短時間で細胞に損傷を与えませんが、10 分を超えてはなりません。

8. 37℃、5% CO2、飽和湿度の条件下で培養します。

【使用環境 3：凍結保存した MSC 細胞の蘇生培養(T-75 バイアル例)】

1. 冷蔵庫から完全培地を取り出し、安全キャビネットまたは超清浄台の中で、適量（例: T-75 瓶に 15mL）を分取し、上面に沿って細胞培養瓶に加えます。培養瓶の底面（細胞成長面）に流し込まないように注意します。その後、培養瓶をゆっくりと平らにし、室温で 10～30 分間培地を温めます。

特別なヒント:

この手順に従わないと、培養びん内に成長空洞が発生する可能性があります。多くのユーザーが通常の TC 処理(TissueCultured)の培養瓶やシャーレを使用していますが、培養瓶とその表面の親

水性基が強固に結合していないため、液体の洗浄下で親水性基が失われやすくなります。これにより、細胞が壁に付着して成長しにくくなります。新世代の無血清培地に特化した培養びんでは、親水性基とびん表面の結合が強固です。高価な次世代培養瓶を使用する代わりに、「フラッシング回避」の培養液添加方式を用いることで、同様の培養効果を得ることができます。

2. 液体窒素から凍結保存したMSC細胞を取り出し、速やかに凍結保存管を37℃の水浴に入れて溶解します。

特別なヒント:

迅速な溶解が必要な理由は、一般的な凍結液にDMSOが含まれており、常温環境下ではDMSOが細胞に対して毒性を持つためです。この工程は時間が短いほど良いです。

3. バイオセーフティキャビネットまたは超クリーンテーブルで、10mLの冷たい完全培地に溶解した細胞懸濁液の1mLを加えます。
4. この混合液を1000rpm（180g）で5分間遠心分離し、上清を捨てます。次に、2mLの完全培地を加えて細胞を再懸濁させてトリパンブルー染色で計数し、密度10000 cells/cm²で細胞を工程の培養びんに接種します。この際、培養びんを立てて直接底に加え、底面に流さないように注意します。
5. 混合後、培養フラスコを二酸化炭素インキュベーターに置き、37℃、5% CO2の条件で培養します。
6. 24時間後、新鮮で室温で予め温められた完全培地に交換します。使用している凍結保存液が友康無血清細胞凍結保存液（商品番号NC1001.1）またはGMP級ガラス化細胞凍結保存液（商品番号NC1011）の場合、交換の必要はありません。

特別なヒント:

1)凍結保存前に使用した培地（血清培地、血清代替培地、無血清培地にかかわらず）に関わらず、凍結保存後の細胞は、深刻に損傷した細胞を除き、無血清培地で正常に培養できます。

2)細胞接種密度とは、生きている細胞の密度を指します。

3)ユーザーは、細胞接種前に細胞カウントを行うことをお勧めします。細胞カウントを行わずに接種後に大量の細胞が浮遊している場合、24時間後に培養液を交換し、培養時間を延長する必要があります。特に細胞密度が5000 cells/cm²未満の場合、細胞が成長しない可能性があります。

【使用環境 4：MSC 凍結保存】

1. 凍結保存する細胞を幹細胞温和消化酵素を使用して消化し、遠心分離後に再懸濁し、細胞計数を行います。

特別なヒント:

凍結保存の前に細胞を 1 日培養する（合計 4 日間培養することで）と、蘇生時の細胞回収率と生存率が大幅に向上します。そうしないと、蘇生時に 20～50%の細胞死亡が発生する可能性があります。

2. 1300rpm（300g）で 5 分間遠心分離し、上清を除去します。
3. 細胞計数に応じて、適量の冷たい無血清凍結保存液（取ってすぐに使用するか、氷袋に置いて準備する）をゆっくりと加え、細胞密度を 1 × 10^6～2.5 × 10^7 cells/mL に調整します。
4. 細胞を軽く再懸濁し、均一に再懸濁した細胞を無菌の凍結保存管に等分に加え、蓋をしっかりとねじ込みます。
5. プログラムの冷却ボックスにクリオチューブを速やかに置き、その後クリオボックスを-80℃の冷凍庫に移します。

注:友康無血清細胞凍結保存液（商品番号 NC1001.1）は 2～8℃で保存し、GMP 級ガラス化細胞凍結保存液（商品番号 NC1011）は常温で保存できます。この場合、プログラムの冷却ステップは必要ありません。従来の凍結保存プログラムを使用することも可能で、直接-80℃に置くよりもやや効果が高い場合があります。

6. 12 時間後、細胞を-80℃の冷凍庫から液体窒素に移し、長期保存します。

【ユーザーからよく質問される問題と解決策】

Q: 培養瓶の中に長い川状や湖状の細胞成長空白領域が見られるのは、どのような原因ですか？どう解決すればいいのか？

A: 原因は、既存の TC 処理培養瓶の表面親水性基がしっかり結合していないからです。この問題は一部のブランドの培養瓶で際立っており、他のブランドではあまり見られません。

解決方法: 培養液の添加方法を変えることで、この問題を解決できます。

Q: 私は今多くの凍結保存細胞を持っていて、これらの細胞はもともと別の培地で培養していました。無血清培地に直接移行できますか？

A: 直接無血清培地に移行して培養できますが、元の培地を使用して消化を終了する必要があります。ただし、血清培地で培養された MSC

細胞は壁に密着しやすく、膵臓酵素の消化時間が長くなるため、細胞損傷が深刻な問題になることがあります。接種前に細胞カウントを行い、生細胞数に応じて接種してください。

Q: 私は今血清でMSC細胞を培養していますが、無血清培地に切り替えた場合、接種密度はどうなりますか？

A: 無血清培地の接種密度は、P5前は10,000 cells/cm²、P5後は12,000 cells/cm²、P10後は15,000 cells/cm²、P16後は20,000 cells/cm²です。

Q: なぜあなたの培地は添加物を加えた後、30日間だけ使用できるのですか？

A: 培地添加剤中の主要成分は組換えタンパク質であり、-20℃でのみ長期安定保存が可能です。そのため、基礎液に添加した後は2週間以内に使い切ることをお勧めします。常に4℃保存環境下では2週間を超えて使用できますが、性能が低下する可能性があります。4週間を超えると使用禁止となります。また、予温（室温または37℃）を繰り返すことで、完全培地の性能が急激に低下します。

Q: 無血清培地で凍結保存された臍帯組織から一次細胞を分離することができますか？

A: はい、可能です。ただし、培養周期は新鮮な臍帯組織よりも約7日長く、通常21日かかります。また、14日目に新鮮な培養液を交換することが必要です。これを怠ると、細胞の壁付着効果が低下し、成長効果が悪くなることがあります。この原因は、培地中の多くの成分が熱不安定であり、高温環境（37° C）に長時間置くことでタンパク質活性が低下するためです。

Q: 細胞周期の基準とは何ですか？

A: 広東省幹細胞と再生医学協会の団体標準「ヒト臍帯間葉系幹細胞品質検定標準」（T/SRA 003-2019）によれば、対数成長期のP5細胞を採取し、10cmシャーレに接種後48時間培養します。細胞融合度が約50%-60%であれば、細胞を収集し、フローサイトメトリーを用いて細胞周期を測定します。S期とG2/M期の比率は40～50%程度であるべきです。また、深セン市細胞治療技術協会の標準「臨床研究ヒト臍帯由来間葉系幹細胞製剤規範」（SZTT/SSCT002-2018）では、製品のG0/G1期細胞含有量は80%を超え90%未満、G2/M期は5%以上でなければなりません。

Q: テロメラーゼ活性検査基準は何ですか？

A: 広東省幹細胞と再生医学協会の団体標準「ヒト臍帯間葉系幹細胞品質検定標準」（T/SRA 003-2019）では、逆転写real-time PCR方法を用

いてテロメラーゼ触媒サブユニット遺伝子 hTERT の発現を検査します。hTERT はテロメラーゼの核心であり、テロメラーゼ陽性細胞にのみ発現します。その mRNA 発現レベルはテロメラーゼの活性程度を直接決定します。リアルタイム定量蛍光 PCR の方法を用いて、臍帯間葉系幹細胞にテロメラーゼ（または非常に弱い）発現がないことを確認します。深セン市細胞治療技術協会の標準「臨床研究ヒト臍帯由来間葉系幹細胞製剤規範」（SZTT/SSCT002-2018）では、製品の 2 世代次細胞のテロメラーゼ活性の差異は 10%以下であるべきです。

MSC 細胞の培養データ

世代	培養器	フローリングドア	1 皿あたりの収穫細胞数	増幅倍数	接種密度（cells/cm²）	培養日数
P0	150mm 皿	73.27%	2.06 E+06 / 35 枚の組織/皿	-	-	14-16 日
P1	-	68.05%	1.50 E+07	10.00	10000	3 日間
P2	-	85.64%	1.38 E+07	9.21	-	-
P3	-	79.40%	1.40 E+07	9.32	-	-
P4	-	80.14%	1.30 E+07	8.65	-	-
P5	-	70.93%	1.22 E+07	8.12	-	-
P6	-	68.88%	1.14 E+07	7.63	12000	3 日間
P7	-	83.66%	1.15 E+07	7.67	-	-
P8	-	75.02%	1.09 E+07	7.27	-	-
P9	-	77.99%	9.86 E+06	6.57	-	-
P10	-	69.33%	8.85 E+06	5.90	-	-
P11	-	67.85%	1.08 E+07	4.82	-	-
P12	-	70.87%	1.59 E+07	7.07	15000	-
P13	-	77.31%	1.37 E+07	6.07	-	-

説明

1. データの出所：すべての連続パスデータはフローサイトメトリー計数に基づいており、接種密度は 10000-15000 cells/cm²です。表中のデータは複数回培養の平均値であり、単回培養の性能はこの表よりも優れている可能性があります。
2. 細胞融合度：細胞収穫時の細胞融合度は 100%を超えないようにします。高すぎる細胞融合は、局部での密着が強くなり、積層成長を引き起こす可能性があります。これにより、細胞の老化や分化が促進され、細胞接触抑制が生じることがあります。
3. 消化手法：細胞の消化時は、必ず説明書に従い、幹細胞の温和な消化酵

素を使用することを強く推奨します。これにより、消化の過度による後続の伝代への影響を避けることができます。

4. 培養瓶の選択：培地メーカーは長期的に無血清培養を行う際に、どのブランドの細胞培養瓶を使用すべきかについてのガイドラインを提供しています。使用する際には、詳細をメーカーに確認し、最適なアドバイスを得ることが重要です。