

PRIME-XV MSC XSFM MDF1

FISI, Catalog ID 991333

FFWK, Catalog ID 552-37463 or 556-37461

使用説明書

この製品に関して

本培地は、間葉系幹細胞の増殖に最適化された、serum-free、xeno-free 培地になります。FUJIFILM Irvine Scientific (FISI) が開発した培地をベースとし、日本の生物由来原料基準を満たすよう、一部組成を変更したものになります。国内での販売・サポートは富士フイルム和光純薬 (FFWK) が行います。本培地は、解凍後、速やかに使用が可能で、骨髄由来、脂肪由来、臍帯由来の間葉系幹細胞を培養することができます。本製品にはフェノールレッドと抗生物質は含まれておりません。必要に応じて添加してご使用ください。

保管、解凍および使用期限に関して

本製品は、ドライアイスが同梱された凍結状態にて出荷されます。お受け取りいただきましたら -10 °C 以下の暗所で保管し、使用期限内に使用してください。未開封の製品は、適切な保存で製造日から 9 か月は安定です。解凍、分注を実施し、再度凍結させたものは、-10 °C 以下で 3 か月間安定です。繰り返しの凍結融解は避けてください。解凍は、2-8°C の暗所にて 1 晩かけて実施してください。25°C を上回る温度では、培地の一部成分が変性します。ウォーターバスなどを用いて 37°C で融解させることは避けてください。解凍した培地は、2-8°C の暗所にて保管し、1 週間以内に使い切ってください。融解時に析出物が生じることがありますが、培養は問題なく実施できます。場合によっては遠心にて除去したうえでご使用ください。

コーティングに関して

CORNING 社製の CellBIND® 表面処理がされた培養容器を使用する場合は、コーティングをすることなく培養が可能であることが確認できております。それ以外の培養容器を用いる場合には何かしらのコーティングを実施してください。Fibronectin (FISI, Catalog ID 31002)、Cellnest (FISI, Catalog ID 1063967)、iMatrix 511 (Matrixome, Catalog ID 892 011) などを組み合わせて培養した実績があります。使用例では、CellBIND® 表面処理がされた培養容器を用いることを想定しております。

使用例

ここに記載しますのは、使用例となります。細胞の由来等によって至適条件は異なりますので、必ず条件の最適化を行ってください。

1. BM-MNCs から BM-MSCs の分離

- 1.1. 凍結された BM-MNCs を解凍し、9 倍量の本培地に懸濁する。
- 1.2. 遠心後、上清を除去し、再度本培地に懸濁する。
- 1.3. 懸濁したものをフラスコに播種する。
- 1.4. 37°C、5% CO₂ 存在下にて培養を行う。
- 1.5. 播種翌日、フラスコ底面にゲル状の凝固物が生じる場合があるが、その場合はピペットを通すなどしてほぐす。
- 1.6. 7 日間程度置いたのち(*1、2)、培養上清とそこに含まれる非接着細胞を遠沈管に回収する。遠心で細胞を集め、上清を除いたのち、本培地にて再度懸濁する。
- 1.7. 懸濁した細胞を新しいフラスコ(*3)に播種する。
- 1.8. 翌日、接着細胞が現れる。適宜培地交換を実施し、コンフルエントになるまで培養を行う。
- 1.9. 剥離剤を用いて細胞を回収する。

*1 この段階で、接着細胞はほとんど現れません。播種後に生じた凝固物がほとんど消失する、あるいは培養上清中に 50 μm 程度の細胞塊が確認できる、などがフラスコ交換を実施するタイミングの目安になります。

*2 培地交換を実施する必要は特にありません。もし実施するなら、培養上清中に含まれる非接着細胞を必ず回収するようにしてください。

*3 新しいフラスコを Corning 社 SyntheMax® II でコーティングしておく、細胞の回収効率が上がりますが、剥離が困難になります。必要に応じてご検討ください。

2. 凍結した MSCs の起眠

- 2.1. 凍結された MSCs を解凍し、9 倍量の本培地に懸濁する。
- 2.2. 遠心後、上清を除去し、再度本培地に懸濁する。
- 2.3. 懸濁したものをフラスコに播種する。
- 2.4. 37°C、5% CO₂ 存在下にて培養を行う。

3. 継代

- 3.1. 培養容器に本培地を分注し、37°C、5% CO₂ 設定のインキュベーターにて平衡化する。
(平衡化は、使用する分のみ止め、最小限の時間で実施すること。)
- 3.2. 細胞が 70-80%コンフルエントになった培養容器内の培地を除去する。
- 3.3. PBS w/o Ca²⁺ Mg²⁺を加え、容器を軽くゆすって洗浄した後、PBS を除去する。
- 3.4. 剥離剤(*4)を加え、約 5-10 分、37°Cの CO₂インキュベーター内に静置する。(顕微鏡で細胞が剥離したことを確認すること。剥離が不十分な場合はフラスコ側面をたたくなどする。)
- 3.5. 細胞剥離後、本培地を加え、細胞接着面を洗い流すように懸濁し、全量を遠沈管へ移し入れる。
- 3.6. 5 分間遠心分離し、上清を除去した後、適量の本培地に再懸濁する。(細胞数測定に適した濃度に適宜調整すること。)
- 3.7. 細胞数測定に必要な量の細胞懸濁液をとり、生細胞数を測定する。
- 3.8. 播種密度が 4,000~6,000 cells/cm²(お使いの細胞の推奨播種密度による)となるように、平衡化した培養容器に播種する。
- 3.9. 37°C、5% CO₂ 設定のインキュベーターで静置培養する。
- 3.10. 細胞が 70-80%コンフルエントになるまで静置培養する。(およそ 3-4 日間培養*5)

*4 弊社では剥離剤に、TrypLE Select (1X) no Phenol Red (Thermo Fisher, Catalog ID 12563029) を使用しています。

*5 培養が 4 日を超える、あるいは細胞密度が高すぎるなどすると剥離が困難になります。

その他

マイクロキャリアを用いた大量培養に用いた実績もあります。詳細に関しては富士フイルム和光純薬までお問い合わせください。

表 1. 剥離処理時の試薬使用量目安

	PBS	TrypLE Select	XSFM MDF1
6-well plate	2 mL	1 mL	2 mL
T-25 flask	5 mL	2.5 mL	5 mL
T-75 flask	10 mL	5 mL	10 mL

表 2. 培地使用量目安

	表面積(cm ²)	XSFM MDF1
6-well plate	9.6	2 mL/well
T-25 flask	25	5 mL/flask
T-75 flask	75	15 mL/flask

【本製品に関するお問い合わせ先】

富士フイルム和光純薬株式会社

〒335-0026

埼玉県戸田市新曾南三丁目 17 番 35 号

TEL: (048)433-2011

FAX: (048)433-2112