

はじめに

従来のヒト胚性幹細胞(ヒトES細胞、hESC)培養法は、マウスまたはヒト線維芽細胞によるフィーダー細胞層を用いるか、フィーダー細胞のコンディション培地を使用する必要がありました。これらの培養法は多大な労力を要し、培養スケールの変更が困難な上、hESCを未分化のまま維持することが困難です。弊社が開発したSTEMPRO[®] hESC SFMは、フィーダー細胞を使用せず、血清フリー培地(SFM)でhESCの培養を可能とし、これらの問題に対する画期的な解決策となります。

STEMPRO[®] hESC 添加剤: ヒト由来成分は、抗 HIV 1 抗体、抗 HIV 2 抗体、抗 HCV 抗体、および HBsAg 抗体には反応しません(ドナーレベル)。確立されたバイオセーフティ手法に従ってお取り扱いください。

内容	カタログ番号	内容量	保存	使用期限
STEMPRO [®] hESC SFM には以下の試薬が含まれます。	A10007-01	1 kit	--	--
GlutaMAX [™] 含有 DMEM/F-12	10565-018	500 mL	2~8°C(遮光)	12 ヶ月
STEMPRO [®] hESC 添加剤	A10006-01	10 mL	-5~-20°C(暗所)	12 ヶ月
ウシ血清アルブミン 25%(BSA)	A10008-01	40 mL	2~8°C(遮光)	12 ヶ月

注:STEMPRO[®] hESC SFM はキットとして提供しており、構成成分 A10006-01、A10008-01 の個別販売はしていません。

使用目的

STEMPRO[®] hESC SFM は研究用(RUO)です。

注意:ヒトまたは動物の診断や治療用に使用することはできません。

特徴

STEMPRO[®] hESC SFM は広範囲な試験を行っており、以下の特徴を有することが証明されています。

- 80 継代以上にわたり hESC の増殖を維持し、3 種類の生殖細胞系への分化能も維持され(図 1)、核型異常は見られません。
- 様々な hESC 系の多分化能についても維持しています。現時点のテスト済み細胞はこちらよりご参照いただけます。
www.invitrogen.com/stempro/hesc
- hESC の多分化能を維持しながら細胞数 1×10^9 個以上にスケールアップすることができます(図 2)。
- フィーダー細胞の培養の必要がなく、フィーダーコンディション培地を用意する必要もありません。
- 増殖因子濃度が安定しているため、より再現性の高い結果が得られます。

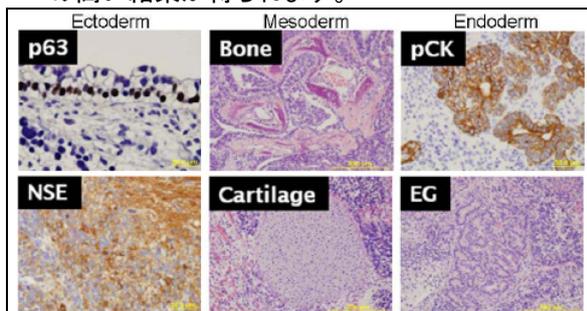
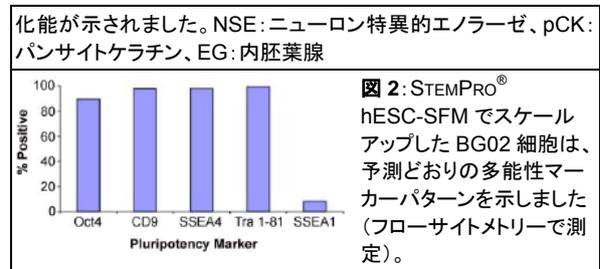


図 1:STEMPRO[®] hESC SFM で培養した BG02 細胞(25 継代目)由来の奇形腫の解析により、外胚葉、中胚葉、内胚葉への多分



保存および取り扱い

- STEMPRO[®] hESC SFM 添加剤は凍結状態で提供されます。使用前に添加剤を解凍し、使用する量に分注して再凍結した後、直ちに-20°C で保存してください。詳細は「培地の調製」の項をご覧ください。
- STEMPRO[®] hESC SFM 添加剤の凍結と解凍の繰り返しは避けてください。
- 解凍したSTEMPRO[®] hESC SFM 添加剤は2~8°C で保存してください(1 週間まで安定)。
- 調整したSTEMPRO[®] hESC SFM 完全培地は、2~8°C で遮光保存して1 週間安定です。2-メルカプトエタノールは保存中毎日添加してください。詳細は「培地の調製」の項をご覧ください。

hESC 培養の重要なガイドライン

STEMPRO[®] hESC SFM による hESC の安定な増殖および、分化の防止のため以下のガイドラインに従ってください。

- 培養の開始:** 本培養は、細胞密度を高く保ち、多くの細胞が未分化の状態を維持している必要があります。細胞は、Matrigel[™]または Geltrex[™]

上で、マウス胚性線維芽細胞のコンディション培地(MEF-CM)を用いて培養された hESC を使用するか、または MEF-CM を使用せずに、CELLstart™ 上で培養した hESC を使用してください。

- **細胞の継代**: コロニーの落種率／生存率を高く保つことが重要です。コロニーは、Matrigel™ または Geltrex™ / MEF-CM で増殖した一般的なコラゲナーゼによる継代よりも若干小さくなります。
- 継代培養中にある程度の細胞死は起こります。しかし、大規模な細胞死(生存率 20%未満)が起こる場合は、培養状態が良好でないことを示しています。
- **継代培養の時期**: 非常に重要です。細胞はほぼコンフルエントまで増殖させる必要があります。コロニー同士が接触した状態になって 1 日もしくは 2 日後に回収してください。これにより、通常、回収時の細胞濃度は $2.5 \sim 4 \times 10^5$ 細胞/cm² となります。
- 細胞は長時間コラゲナーゼ処理をしないでください。コラゲナーゼ量が少ない場合でも、推奨処理時間は最長で 3 分間です。
- **密度**: 細胞は高密度の状態(60 mm ペトリディッシュに 200 個強のコロニー)を維持してください。
- 培養している hESC は常に**分化が起こりうる状態にあります**。培地は毎日加え、培地中の栄養因子が枯渇しないようご注意ください。明らかな分化が認められる部分は 21 1/2 ゲージ針を使用して除いてください。
- 細胞は、MEF-CM から STEMPro® hESC SFM に直接移すことができます。事前に順化させる必要はありません。

品質管理

製品の試験成績書(CofA)を発行しております。CofA は下記 URL よりロット番号を記入いただくことによりダウンロードできます。

www.invitrogen.com/cofa

hESC の培養環境

培地: STEMPro® hESC SFM

細胞株: ヒト胚性幹細胞(hESC)

インキュベーター: 36~38°C、CO₂ 濃度 4~6%

培養条件: 接着; 適切なエアレーション条件と遮光下の培養を保ってください。

推奨される培養: 60 mm ディッシュ。

必要製品

いくつかの製品はキットに付属しておりません。以下の製品は別途ご用意ください。

製品	内容量	カタログ番号
bFGF(完全長) REC HU	100 µg	PHG0261
2-メルカプトエタノール	50 mL	21985-023
コラゲナーゼ タイプ IV	1 g	17104-019
Geltrex™	5 mL	12760-021
D-PBS	500 mL	14190-144

1. bFGF: 0.1% BSA 含有 DMEM/F-12 に 10 µg/mL になるように bFGF を調製します。チューブ 1 本あたり 80 µL ずつ分注し、-20°C で凍結保存します。
2. コラゲナーゼ: DMEM/F-12 にコラゲナーゼタイプ IV を 10 mg/mL の濃度になるように溶解します。フィルター滅菌し、分注して凍結保存します。
3. Geltrex™ ボトルを 2~8°C で解凍した後、50mL コニカルチューブに 1mL ずつ分注して、-20°C で保存します。

Geltrex™ によるプレートのコーティング

1. Geltrex™(上記 1mL 分注分)を 2~8°C で解凍してください。
2. 冷やした DMEM/F-12 29mL を 1mL の Geltrex™ に加えて、穏やかに混合してください。
3. ディッシュ全面に行きわたるように Geltrex™ 溶液を加えてください(35 mm ディッシュでは 1 mL、60 mm ディッシュでは 1.5 mL 加えてください)。
4. 乾燥しないようディッシュをパラフィルムで密封し 37°C で 1 時間インキュベートしてください
5. ディッシュを取り出し、室温で約 1 時間静置してください。
6. コーティングしたディッシュは 2~8°C で 1 週間保存可能です。
7. 使用時は Geltrex™ 溶液を除き、完全培地で速やかに細胞を落種してください。

CELLstart™ によるプレートのコーティング

CELLstart™ による詳細なプロトコールは以下の URL よりダウンロードできます。

www.invitrogen.com/cellstart

培地の調製

洗浄用培地: 最終濃度が 0.1% になるように、25% BSA を D-MEM/F-12 に添加します。

完全培地: 37°C の恒温槽で STEMPro® hESC SFM 添加剤を解凍し(迅速に解凍)、次頁の表に従って調製します。

