

mTeSR™ Plus <補足マニュアル> シングルセル継代からクランプ継代へ移行する方法

注：この説明書は、英文添付文書の簡易訳です。製品に添付されている英文マニュアルも必ずご確認ください。

【対象製品】

コード No.	品名	梱包単位	保存温度	輸送温度
ST-100-0276	mTeSR™ Plus-cGMP	1 Kit	冷蔵/冷凍	冷蔵/冷凍

【背景】

PSC（多能性幹細胞、ES/iPS 細胞）の継代方法には、細胞塊（aggregate）の状態に解離して播種する「クランプ継代（clump passaging）」と、単一細胞まで解離して播種する「シングルセル継代（single-cell passaging）」があります。PSC はクランプ継代を好む傾向にあり、細胞増殖速度と生存率に向上が見られます。多くの異なる細胞株において、クランプ継代は正常な核型を維持しつつ長期に増殖できることが示されています。一方、シングルセル継代では細胞集団に望ましくない選択圧がかかり、培養中に遺伝的異常を引き起こす可能性があることが実証されています。

ここでは、シングルセルで継代した細胞をクランプ継代へ移行する方法を紹介します。

【手順】

1. シングルセルの状態に凍結保存した細胞を、通常と同じように 10 μM（最終濃度）ROCK 阻害剤（例：Y-27632、ST-72302）存在下で解凍します。
2. クランプ継代のコロニー内で見られるような密接な細胞間接合を形成するまで細胞を増殖させます（細胞間接合が緩いと、解離時に播種に適した大きさの細胞塊を形成できません）。おそらくこのとき、細胞はほぼ完全にコンフルエントな単層（モノレイヤー）状となり、シングルセル継代に慣れた方には過剰増殖のように見えるかもしれません。
3. クランプ継代へ移行します。マニュアルに従って ReLeSR™（#ST-05872 または #ST-100-0484*）または Gentle Cell Dissociation Reagent（GCDR、#ST-100-0485）で解離し、得られた細胞塊を ROCK 阻害剤なしの mTeSR™ Plus-cGMP に播種します。

* #ST-05872 は研究用、#ST-100-0484 は cGMP 準拠の ReLeSR™ です。

- シングルセル継代からクランプ継代への移行には、馴化などの操作はほとんど必要ありません。高い未分化状態が維持された細胞であれば、最初の継代からクランプ継代へ移行できます。
- 解凍後の細胞を数回シングルセル継代した後でクランプ継代に移行する場合、上記の 2-3 をおこなってください。

【コツ】

マニュアルに加えて以下のコツを押さえて操作すると、1:10 から 1:50 の最適な分割比（split ratio）で継代できるようになります。また、クランプ継代にすることで シングルセル継代より一貫して高品質かつ生存率の高い PSC の培養が可能となります。[]内は英文マニュアルの該当箇所です。

- ReLeSR™、GCDR、または Dispase を使用して細胞塊を解離する際は、細胞塊のサイズを確認し、直径およそ 50~200 μm の均一な細胞塊を作製してください。直径が 50 μm 未満では生存率が低下し、200 μm を超えると過剰増殖につながり自発分化のリスクも高まります。[5.1, Figure 3] 細胞塊が 50 μm 未満の場合は、10 μM（最終濃度）ROCK 阻害剤を添加してください。
- 初めは分割比ではなく、細胞塊のカウント数に基づいて播種してください。[Appendix 1, Table 6]
- 各 PSC 株の解離時間は、サイズを含めて検討し最適化してください。
- ReLeSR™ を添加したら、1 分以内に残さず吸引してください。[5.1, step 4]

- ReLeSR™ および GCDR を用いた長時間のインキュベーションはしないでください。[5.1, step 5] [5.2, step 6]
- GCDR の使用中は、スクレーパーで過度にこすらないでください。[5.2, step 7]
- 細胞塊の崩壊を最小限に抑えるため、ピペットで混和しないでください。[5.1, step 7]
- 細胞塊を移す際には広い口径の血清用ピペットを用いてください。P200 や P1000 ピペットでは細胞塊が細かくなりすぎます。[5.1, step 8] [5.2, step 8]
- 最適な継代日を決定するために、慣れるまでは培養細胞を毎日観察してください。[3.2, Figure 2]

【その他】

- BioLaminin 521 LN (#BLA-LN521-02)
培養基質にBioLaminin 521 LNを用いた場合も、クランプ継代で問題ないことを確認済みです。
コーティングの手順は簡易マニュアル、英文マニュアルをご参照ください。
- 英語版完全マニュアル
<https://cdn.stemcell.com/media/files/manual/10000005507-Maintenance of Human Pluripotent Stem Cells in mTeSR Plus.pdf>

株式会社ベリタス 〒105-0013 東京都港区浜松町 1-18-16 住友浜松町ビル 6 階
 技術的なお問い合わせ TEL 03-5776-0078 FAX 03-5776-0076 URL: <https://www.veritastk.co.jp/>
 E-mail: Tech_support@veritastk.co.jp
 TEL 03-5776-0040 (平日 9 時 - 17 時)