

間葉系幹細胞用 無血清培地
STK[®] シリーズ

培地操作ガイドブック

目次

- 1. はじめに 1
- 2. 製品特長 1
- 3. 製品情報 2
- 4. 初代培養方法 2
- 5. 拡大培養方法 6
- 6. よくあるご質問 8
- 7. 参考文献 10

1. はじめに

この度は、「STK® シリーズ」をご購入頂き誠にありがとうございます。

本製品は、広島大学、JST（独立行政法人 科学技術振興機構）および株式会社ツースールの共同研究により開発された製品で、関東化学株式会社にて販売をしております。



■ 使用上の注意

- ・この培地操作ガイドブックをよくお読みのうえ、ご使用ください。
- ・本製品は**試験研究用**です。ヒトや動物を対象にした医療や臨床診断の目的では使用しないでください。

■ 目次

製品特長	1
製品情報	2
初代培養方法	2 – 5
拡大培養方法	6 – 8
よくあるご質問	8 – 10
参考文献	10

■ 本書の表記について

記号	内容
	注意事項
	ワンポイントアドバイス

2. 製品特長

体性幹細胞のひとつであるヒト間葉系幹細胞（hMSC）は、軟骨・骨・靭帯・脂肪・筋肉・血管などへの分化能あるいは分化転換能を持ち、骨髄などの生体組織から大きな苦痛を伴わず分離することができるため、再生医療の移植用幹細胞として注目されています。

従来、MSCの体外増幅や分化誘導には、ウシ胎児血清（FBS）あるいは自家ヒト血清が必要でしたが、STK® シリーズはMSCの無血清培養が可能で、化学的に組成が明らかな培地であるため、これからのMSC研究に有用なツールです。

3. 製品情報

製品番号	製品名	容量	保管温度
37414-23	STK [®] 1 (初代間葉系幹細胞用 無血清培地)	100 mL	冷凍 (-20℃)
37415-08	STK [®] 2 (間葉系幹細胞用 無血清培地)	500 mL	冷凍 (-20℃)
37416-23	STK [®] 3 (間葉系幹細胞 骨分化用 無血清培地)	100 mL	冷凍 (-20℃)



本書では、STK[®] 1およびSTK[®] 2を使用した場合の、初代培養方法・拡大培養方法についてご紹介いたします。

4. 初代培養方法

準備するもの

■ 組織

- ・ ヒト由来組織 (脂肪、臍帯、滑膜、骨髄 など)

■ 試薬

- ・ STK[®] 1 ※ 3ページ「培地の使用方法」に従ってご使用ください。
- ・ MEM α
- ・ DMEM
- ・ Collagenase-A溶液 (0.2%となるようにMEM αで溶解する)
- ・ 抗生物質 (ペニシリン/ストレプトマイシン、ゲンタマイシン など)
- ・ PBS (-)
- ・ TrypLE Select (メーカー : ThermoFisher、メーカーコード : A12859-01)

■ その他

- ・ ウォーターバス
- ・ 滅菌済み解剖ハサミ
- ・ 150 mmディッシュ もしくは 滅菌済み100 mLビーカー
- ・ 50 mL遠沈管
- ・ ピペット
- ・ ピペットチップ

培地の使用方法

- ・ STK® 1（凍結品）を使用する**1日前**に4℃の冷蔵庫へ移して解凍してください。
- ・ STK® 1を解凍後は、冷蔵（4℃）にて保存し、**1ヶ月以内**にご使用ください。
- ・ STK® 1を解凍後は、攪拌して濃度を均一化し、固形物を溶解してからご使用ください。
- ・ 温度変化による培地性能の劣化を最小限にするためにも、STK® 1を解凍後は必要量を小分け分注しておくことを推奨します。
- ・ 実験開始前に、STK® 1およびMEM αを室温に戻してからお使いください。

組織の播種



脂肪組織から間葉系幹細胞（MSC）を樹立する際の一般的な方法をお示しいたします。使用する組織などに合わせて事前に最適な培養条件を検討することをお勧めします。

- ① 組織を適量取り、MEM αで洗浄する。※必要に応じてMEM αに抗生物質を加える。
- ② 1,500 rpmで5分間遠心し、上清を除く。
- ③ 組織を150 mmディッシュもしくは滅菌済み100 mLビーカーへ移す。
- ④ 滅菌済み解剖ハサミで組織を細かく裁断する。
- ⑤ 組織を50 mL遠沈管に回収する。回収時はCollagenase-A溶液を加え、ピペット等で回収する。
- ⑥ 37℃のCollagenase-A溶液中で、90分間処理する。
- ⑦ 1,500 rpmで5分間遠心し、上清を除く。
- ⑧ 抗生物質を加えたMEM αを20 mL加え、1,500 rpmで5分間遠心し、上清を除く。
- ⑨ STK® 1を加えて細胞を懸濁液にし、セルカウントを実施する。
- ⑩ 5,000 cells/cm²となるように播種する。
- ⑪ 下記培養スケジュール例に従って、培地交換または細胞回収・継代を行う。

<培養スケジュール例>

Day	0	1-4	5	6-7	8	9-10	11	12-13	14
	播種	—	培地交換	—	培地交換	—	培地交換	—	回収継代



手順④：組織の裁断時は、ディスポーザブルピペットで目詰まりしない程度まで細かくすることを推奨します。

手順⑦：無血清培地は酵素等の働きを阻害できないため、可能な限り上清を取り除き、必要に応じて遠心工程を追加してください。

培地交換

- ・ 培地交換は全量行い、ディッシュ等の壁面を伝わして、ゆっくりと培地を加えてください。
- ・ 1回目の培地交換は5日目に行うことを推奨します。STK® 1でMSCを樹立する場合、培養初期（10日目頃まで）は比較的ゆっくりと増殖します。図1の赤丸で示す細胞塊はSTK® 1で培養したMSCの一例です。

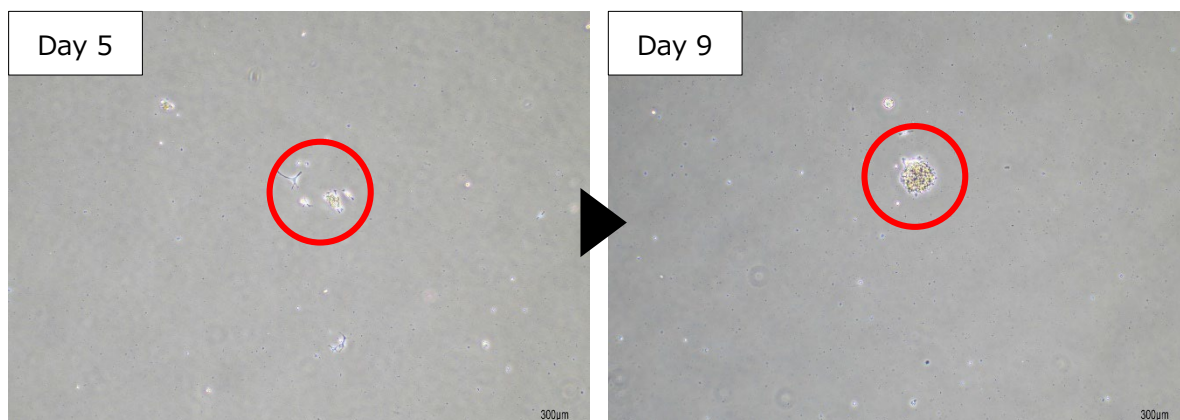


図1 STK® 1で培養したMSCの例
(左：播種後5日目、右：播種後9日目)

- ・ 播種後14日目の細胞形態を下図に示します。**図2左のような細胞**が見られたら、細胞回収・継代を実施してください。次のページに示す細胞形態（図3）も、STK® 1で樹立した際に見られるMSCの代表的な例です。

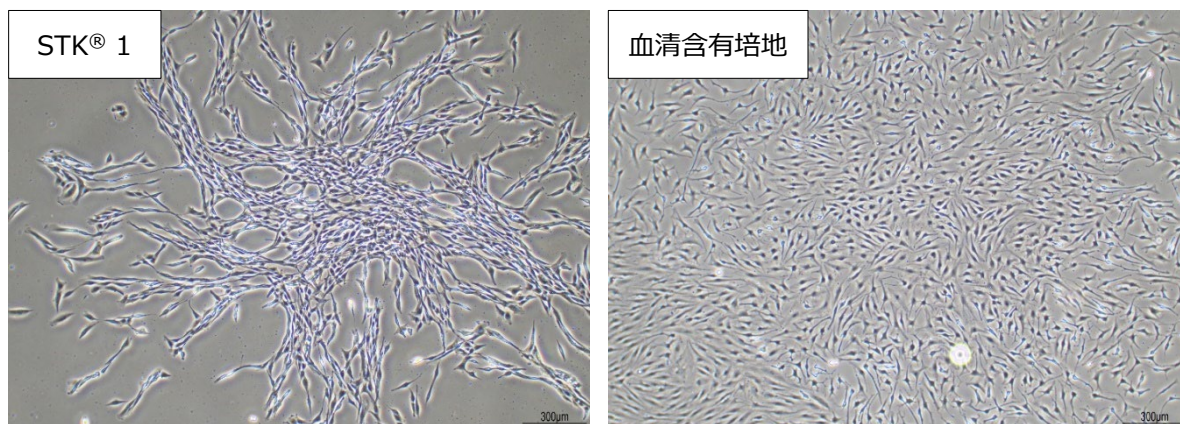


図2 播種後14日目のMSCの比較
(左：STK® 1で樹立したMSC、右：血清含有培地で樹立したMSC)

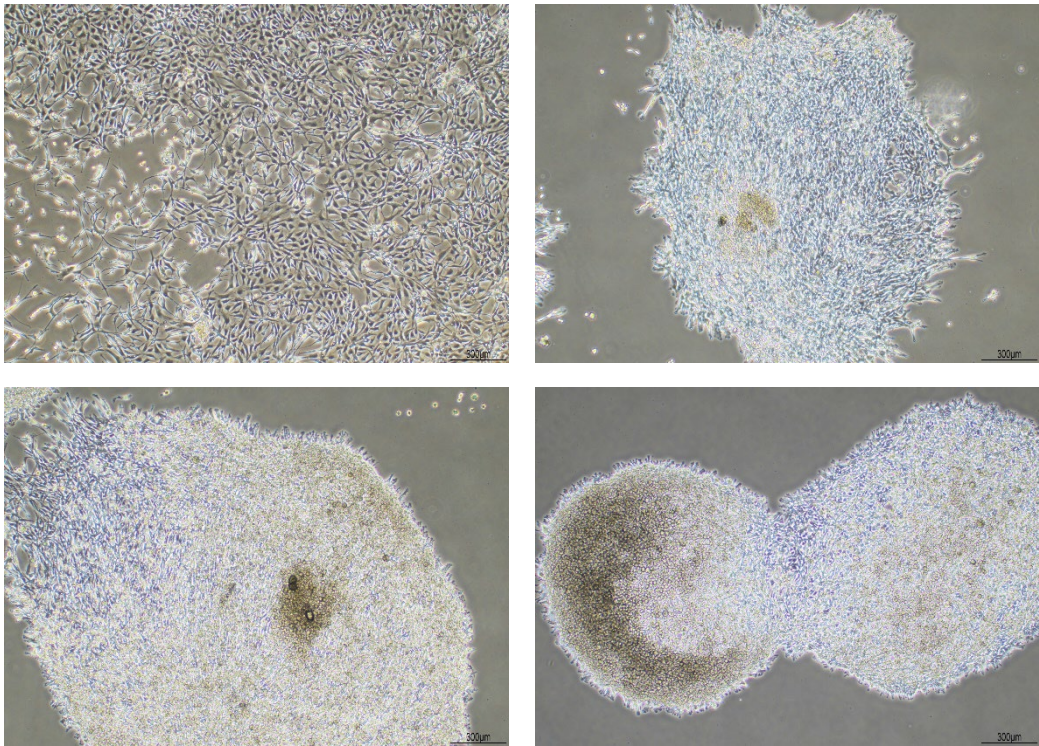


図3 STK[®] 1で樹立したMSCの細胞形態の例

細胞の回収・継代

- ① 細胞層をPBS (-) 10 mL で洗浄する。
- ② TrypLE Selectを3 mL 添加する。
- ③ 37°C, 5% CO₂のインキュベーターにて2～5分程度静置し、細胞の剥離を確認のうえ遠心管に細胞浮遊液を移す。
- ④ 培養容器に PBS (-) またはDMEMを7 mL添加し、容器底面をリンスする。
- ⑤ ③の遠心管に④の溶液を移し、1,500 rpm (400×g) で5分間遠心する。
- ⑥ 継代の場合は、上清を除き約5,000 cells/cm²以上の細胞濃度で播種する。
凍結保存する場合は、上清を除き1×10⁶ cells/mLの細胞濃度になるようにCELLBANKER[®] シリーズ (ゼンジェンファーマ株式会社) で調製し、クライオジェニックバイアルに封入する。



手順②：トリプシンなどの一般的な細胞剥離用試薬も使用可能ですが、酵素活性を不活化するために別途トリプシンインヒビターが必要になります。

手順③：遠心後の上清除去を行いやすいため、細胞浮遊液の回収には50 mL遠沈管を推奨します。

手順⑥：継代時の培地は、**STK[®] 2**を0.1～0.2 mL/cm²で使用することを推奨します。

5. 拡大培養方法

準備するもの

■細胞

- ・樹立した間葉系幹細胞（脂肪、臍帯、滑膜、骨髄由来 など）

■試薬

- ・STK[®] 2 ※ 下記「培地の使用方法」に従ってご使用ください。
- ・DMEM
- ・PBS (-)
- ・TrypLE Select（メーカー：ThermoFisher, メーカーコード：A12859-01）

■その他

- ・ウォーターバス
- ・50 mL遠沈管
- ・ピペット
- ・ピペットチップ

培地の使用方法

- ・STK[®] 2（凍結品）を使用する**2日前**に4℃の冷蔵庫へ移して解凍してください。
- ・STK[®] 2を解凍後は、冷蔵（4℃）にて保存し、**1ヶ月以内**にご使用ください。
- ・STK[®] 2を解凍後は、攪拌して濃度を均一化し、固形物を溶解してからご使用ください。
- ・温度変化による培地性能の劣化を最小限にするためにも、STK[®] 2を解凍後は必要量を小分け分注しておくことを推奨します。
- ・実験開始前に、STK[®] 2およびDMEMを室温に戻してからお使いください。

細胞の播種



細胞の凍結ストックを使用する際の一般的な方法をお示しいたします。

使用する細胞などに合わせて事前に最適な培養条件を検討することを推奨します。

- ① 凍結ストック細胞を37℃ウォーターバス等で解凍する。
- ② DMEMを加えて遠心し、上清を除いて洗浄する。細胞樹立時の組織片が見られる場合は100 μmセルストレーナー等で除去する。
- ③ DMEMを加えて細胞を懸濁液にし、セルカウントを実施する。
- ④ 細胞を約5,000 cells/cm²以上の細胞濃度で、STK[®] 2に播種する。
- ⑤ 下記培養スケジュール例に従って、培地交換または細胞回収・継代を行う。

<培養スケジュール例>

Day	0	1	2	3	4	5
条件①	播種	—	培地交換	—	継代	—
条件②	播種	—	—	培地交換	—	継代



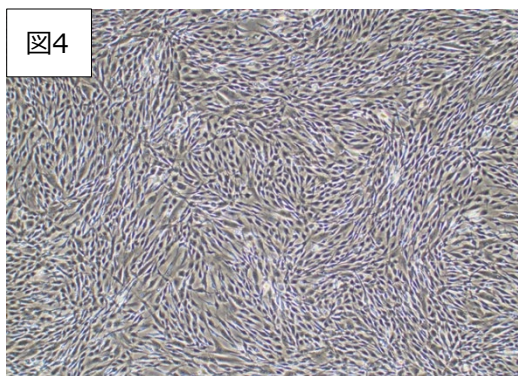
手順④：培地量は、0.1~0.2 mL/cm²で使用することを推奨します。

手順⑤：細胞株に応じて、まずは条件①もしくは条件②の2パターンを検討ください。

培地交換


- ・実験開始前に、STK[®] 2を冷蔵庫から取り出し、必要量を分注してください。分注した培地を室温に戻してからお使いください。
- ・培地交換は全量行い、ディッシュ等の壁面を伝わって、ゆっくりと培地を加えてください。
- ・STK[®] 2で培養した細胞形態の例を右図に示します。継代は図4を目安に実施してください。

図4




従来血清含有培地を用いてMSCを培養している場合、オーバーコンフルエントのように思われる可能性がありますが、STK[®] 2の培養にあたっては図4を目安としてください。

継代

 細胞の剥離方法や播種量はご使用の細胞により異なりますが、以下に一般的な方法を示します。培地、酵素液などの量は T-25 フラスコ（培養面積 25 cm²）を基準にしていますので、培養スケールに合わせて適宜変更ください。

- ① 細胞層を PBS (-) 5 mL で洗浄する。
- ② TrypLE Select を 2 mL 添加する。
- ③ 37°C, 5% CO₂ のインキュベーターにて 2~5 分程度静置し、細胞の剥離を確認のうえ遠心管に細胞浮遊液を移す。
- ④ 培養容器に PBS (-) または DMEM を 7 mL 添加し、容器底面をリンスする。
- ⑤ ③ の遠心管に④ の溶液を移し、1,500 rpm (400×g) で 5 分間遠心する。
- ⑥ 継代の場合は、上清を除き細胞を約 5,000 cells/cm² 以上の細胞濃度で播種する。
凍結保存する場合は、上清を除き 1×10⁶ cells/mL の細胞濃度になるように CELLBANKER[®] シリーズ（ゼノジェンファーマ株式会社）で調製し、クライオジェニックバイアルに封入する。

 手順②：トリプシンなどの一般的な細胞剥離用試薬も使用可能ですが、酵素活性を不活化するために別途トリプシンインヒビターが必要になります。

手順③：遠心後の上清除去を行いやすいため、細胞浮遊液の回収には 50 mL 遠沈管を推奨します。

手順⑥：継代時の培地は 0.1~0.2 mL/cm² で使用することを推奨します。

6. よくあるご質問

■ 培地について

Q1：培地の使用期限は？

A1：未開封の状態では製造後 18 ヶ月です。製品ラベルに使用期限が記載されておりますので、そちらでご確認いただけます。

Q2：培地解凍後の使用期限は？

A2：冷蔵（4°C）にて保管し、1 ヶ月以内にご使用ください。

Q3 : 培地解凍後の再凍結は可能ですか？

A3 : 再凍結により性能が落ちる可能性があるため、推奨しません。

Q4 : 培地は冷蔵庫から取り出してすぐに使えますか？

A4 : 室温に戻してから使用してください。

Q5 : STK® シリーズはカルタヘナ法に該当しますか？

A5 : 該当しません。

Q6 : STK® シリーズは毒劇物指定成分を含みますか？

A6 : 含みません。SDS（安全データシート）も合わせてご確認ください。

■ 培養方法について

Q1 : 推奨の培養器材（フラスコ、ディッシュ等）はありますか？

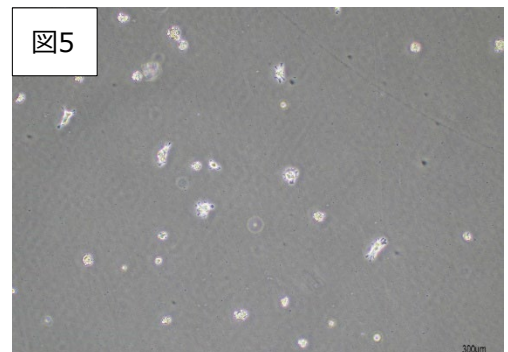
A1 : 住友ベークライト株式会社もしくはコーニング社の培養基材を推奨しています。

コーニング社製であれば、CellBIND® 表面のものがより効率よく細胞を増殖頂けます。
また、ヒト以外のMSCであればフィブロネクチン等がコートされたディッシュも
ご検討ください。

Q2 : コーティング剤は必要ですか？

A2 : 事前検討いただくことを推奨します。

推奨の培養器材であればコーティング剤は不要である場合が多いですが、接着性が低い場合はフィブロネクチンを5 µg/mLで使用する等をご検討ください。図5に示すような細胞形態の場合は、接着性が低い可能性がございます。



Q3 : マルチプレートでの培養は可能ですか？

A3 : 可能ですが、樹立後の細胞数を十分量確保するには100 mmディッシュ以上の培養面積を推奨します。特に初期検討では6ウェルプレート以上の培養面積を推奨します。

Q4 : 血清含有培養と比較して樹立しにくさがありますか？

A4 : 血清含有培地とは異なる細胞形態を示し、増殖には時間がかかる場合があります。
馴化後は血清含有培地と比較して非常に高い増殖性を示します。

Q5 : 血清含有培地で樹立した細胞との差はありますか？

A5 : STK[®] 1で樹立した間葉系幹細胞は、血清含有培地で樹立した細胞と比較して、細胞が小さく、細胞同士の間隔が極めて狭いことが特徴です。

Q6 : STK[®] 1で樹立した細胞を血清含有培地で培養できますか？

A6 : 可能です。

Q7 : 血清含有培地で樹立した細胞をSTK[®] 2で培養できますか？

A7 : 可能です。

7. 参考文献

- **ヒト間葉系幹細胞用無血清培地 : STK[®] シリーズ (STK[®] 1, STK[®] 2, STK[®] 3) の開発.**
THE CHEMICAL TIMES, 256(2), 17-22. (2020)
- **Enhanced Cell Growth of Adipocyte-Derived Mesenchymal Stem Cells Using Chemically Defined Serum-Free Media**
International journal of molecular sciences, 18(8), 1779. (2017) DOI: 10.3390/ijms18081779
- **Characterization of human dental pulp cells grown in chemically defined serum-free medium**
Biomedical reports, 8(4), 350-358. (2018) DOI: 10.3892/br.2018.1066
- **Dental derived stem cell conditioned media for hair growth stimulation.**
PloS one, 14(5), e0216003. (2019) DOI: 10.1371/journal.pone.0216003
- **新無血清培地 STK2 のヒト間葉系幹細胞増殖における有用性について**
Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 129(3), 381-384. (2009)
DOI: 10.1248/yakushi.129.381
- **Serum-free medium enhances the immunosuppressive and antifibrotic abilities of mesenchymal stem cells utilized in experimental renal fibrosis.**
Stem cells translational medicine, 7(12), 893-905. (2018) DOI: 10.1002/sctm.17-0284
- **Human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells cultured in serum-free media demonstrate enhanced antifibrotic abilities via prolonged survival and robust regulatory T cell induction in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis.**
Stem Cell Research & Therapy, 12(1), 1-16. (2021) DOI: 10.1186/s13287-021-02574-5



STK® シリーズ
製品ページ



STK® シリーズ
リーフレット



▼ その他、ご不明な点などがございましたら下記へお問合せください。

関東化学株式会社
試薬事業本部 バイオケミカル部

〒103-0022

東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

TEL : 03-6214-1090

HP : <https://www.kanto.co.jp>

[製造元]



ツ-セル

[発売元]



関東化学株式会社