

クラレの PVA マイクロキャリアを用いた細胞培養プロトコール

内容

はじめに	1
クラレの PVA マイクロキャリアの特長	2
必要な試薬と器材	3
ヒト間葉系幹細胞の培養実施例.....	4
PVA マイクロキャリアの準備	5
細胞播種	6
細胞の観察.....	7
細胞数の測定	7
細胞の回収.....	8
オプション：Bead to bead cell transfer による拡大培養.....	9

はじめに

本プロトコールは小スケールでの研究目的での使用を意図したものです。間葉系幹細胞（MSC）などの産業スケールでの大量培養をご検討の場合は弊社までご相談ください。また、本プロトコールは基本的な培養条件を記載しております。細胞の種類や培養条件によって最適化することを推奨します。

クラレの PVA マイクロキャリアの特長

- 表面にコラーゲン Type I がコートされているため、様々な細胞の接着と増殖に適しています。
- 弾力性の高い PVA ハイドロゲルで作られているため、攪拌培養中に壊れにくいです。
- 透明性が高く、接着細胞の様子を顕微鏡で容易に観察可能です。

表 1. クラレの PVA マイクロキャリアの特長

粒径（直径）	約 200-250 μm *1
表面積	約 2600 $\text{cm}^2/\text{g dry weight}$ *2
表面処理	コラーゲン Type I コート
比重	1.03 g/cm^3 *1
膨潤度	約 10 g wet weight / g dry weight *3

*1. 粒径と比重は PBS 中で膨潤させた PVA マイクロキャリアの値です。

*2. 表面積は乾燥状態の PVA マイクロキャリア 1g を PBS 中で膨潤させた際の値です。

*3. 膨潤度は乾燥状態の PVA マイクロキャリアを PBS で膨潤させた際の重量の増加率です。

必要な試薬と器材

PVA マイクロキャリアには様々なタイプの振とう・攪拌培養が適用可能です。



図 1. PVA マイクロキャリアを用いた細胞培養のイメージ

表 2. 必要な試薬および器材

試薬および器材	例
振とう・攪拌培養の容器および装置	30 mL シングルユースバイオリアクター + 6 チャンネルマグネチックスターラー
	ベントキャップ付き三角フラスコ + 振とう装置
細胞	間葉系幹細胞、線維芽細胞など 様々な接着細胞
培地	細胞種や培養条件に応じて選択
細胞剥離液	0.05% or 0.25% Trypsin-EDTA
	Accutase™
セルストレーナー	φ70 μm セルストレーナー
	φ100 μm セルストレーナー

ヒト間葉系幹細胞の培養実施例

PVA マイクロキャリアを用いたヒト骨髄由来間葉系幹細胞の試薬・器材と培養条件を記載します。

表 3. 試薬・器材

品名	品番	メーカー
30 mL シングルユースバイオリアクター	BWV-S03A	エイブル株式会社
6 チャンネルマグネチックスターラー	BWS-S03N0S-6	エイブル株式会社
ヒト間葉系幹細胞	PT-2501	ロンザ株式会社
MSCGM™ Mesenchymal Stem Cell Growth Medium BulletKit™	PT-3001	ロンザ株式会社
セルストレーナー 70 μm クリア	SPL-93070	SPL Life Sciences Co., Ltd
Accutase™	AT104	Innovative Cell Technologies, Inc.

表 4. 培養条件

培地量	30 mL /bioreactor
PVA マイクロキャリアのサイズ	標準サイズ
PVA マイクロキャリアの投入量	37 mg/bioreactor (108 cm ² / bioreactor)
細胞数	5.4×10 ⁵ cells/bioreactor
回転数（播種後 24 時間）	15 rpm
回転数（播種後 24 時間以降）	55 rpm
Bead to bead cell transfer	細胞接着 PVA マイクロキャリア：新しい PVA マイクロキャリア=1:1

<参考文献>

[Kaneko M, et al., Expansion of human mesenchymal stem cells on poly\(vinyl alcohol\) microcarriers. J Biosci Bioeng. 2023 Nov;136\(5\):407-414.](#)

PVA マイクロキャリアの準備

クラレの PVA マイクロキャリアは培地にいれるとすぐに膨潤します。また、ガンマ線滅菌済みです。そのため、特別な前処理は必要ありません。2 通り（手順 A または B）の PVA マイクロキャリアの準備方法をご案内します。

手順 A. 乾燥状態のまま PVA マイクロキャリアを電子天秤で秤量する方法

1. 電子天秤で 50 mL チューブの空重量を計測します。
2. 滅菌したスパチュラで PVA マイクロキャリアをすくい取り、50 mL チューブに必要量を測り取ります。
Note: PVA マイクロキャリアは気流や静電気により飛散することがありますので、取り扱いにご注意ください。
3. 培地を PVA マイクロキャリアに加え、培養容器に培地ごと PVA マイクロキャリアを移します。

手順 B PBS に PVA マイクロキャリアを懸濁する方法

1. PVA マイクロキャリア 1 g に対し 30~50 mL の PBS を容器に直接加えて懸濁します。
2. PVA マイクロキャリアが均一に分散するようにピペッティングし、PBS ごと必要量の PVA マイクロキャリアを 15 mL チューブ等に測り取ります。
Note: PBS 中では PVA マイクロキャリアがポリスチレン製のピペットの内側に吸着やすくなります。吸着を防ぐため、ポリスチレン製ピペットの内側を FBS 入り培地でコート（2、3 回ピペッティング）してからお使いください。もしくは、ガラス製のピペットをお使いください。
3. 5 分程度静置または遠心（300×g、5 分、減速設定を最低にセット）して、PVA マイクロキャリアを沈降させ、PBS 上清を取り除きます。
4. 培地を加え、培地ごと PVA マイクロキャリアを培養容器に移します。
5. PBS に懸濁した残りの PVA マイクロキャリアは冷蔵で 6 カ月保存可能です。

細胞播種

ここでは、シングルユースバイオリアクターを用いて培養する場合の方法を記載します。

1. PVA マイクロキャリアの準備の項目で記述した方法で、表面積が 100~200 cm²/ 30 mL-bioreactor となるように PVA マイクロキャリアをバイオリアクターに加えます。

Note: 例えば、表面積 108 cm²/30 mL-bioreactor となるように PVA マイクロキャリアを加えます。後のステップで、細胞と一緒に培地も加えるため、培地の量はファイナルボリュームよりも少なくしておきます（ファイナルボリューム 30 mL に対して 20 mL など）。

2. 適切な方法でシングルセル分散させた細胞を準備し、通常／例えば 4×10⁴ から 1.2×10⁵ cells/mL となるように細胞を播種します。
3. バイオリアクターを攪拌装置にセットして、37°C、5% CO₂、飽和水蒸気下で培養を開始します。
4. 細胞を PVA マイクロキャリアに接着させるため、播種後 24 時間は静置培養もしくは 15 rpm の低速で攪拌培養します。
5. 24 時間経過後は、50 rpm 程度で攪拌培養します。

Note: 攪拌速度は遅すぎても速すぎても細胞増殖数が減少してしまいます。培養条件に応じた培養条件の最適化を推奨します。

6. 播種後 3 日目または 4 日目に半分量の培地をフレッシュな培地に交換します。
 - (1) バイオリアクターを 5 分程度静置し、PVA マイクロキャリアを底に沈ませます。
 - (2) PVA マイクロキャリアを吸わないように培養上清を除去し、新しい培地を加えてます。

細胞の観察

バイオリアクターから PVA マイクロキャリアを 500 μ L~1 mL サンプルングし、マイクロプレートなどの適切な培養容器に移します。位相差顕微鏡で細胞接着の様子が観察できます。

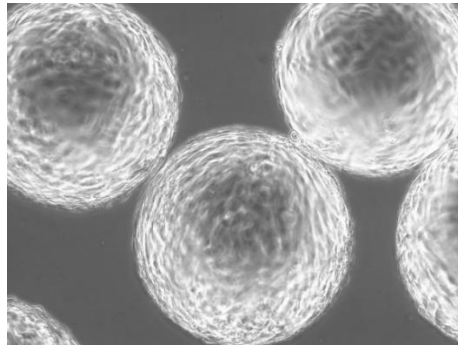


図 2. 3 日間培養後の線維芽細胞の位相差顕微鏡イメージ
(開発段階の画像です、実際の製品とは仕様が異なります)

細胞数の測定

培地ごと PVA マイクロキャリアを 1mL~2mL サンプルングし、細胞数を測定します（次項の細胞の回収を参照）。その他の方法として、細胞計数装置 NucleoCounter NC-200 / NC-202 (ChemoMetec 社)を用いることで、PVA マイクロキャリア上の接着細胞数を簡便に測定可能です。

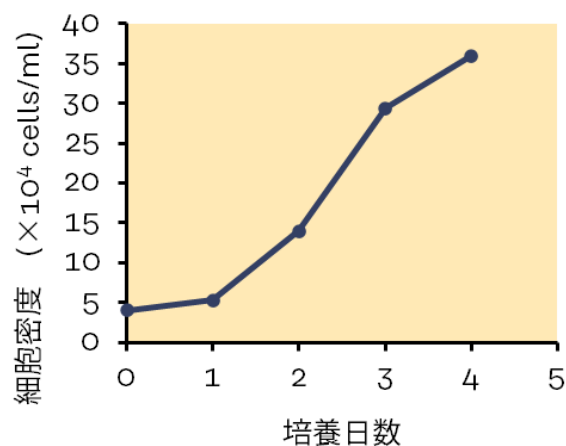


図 3. PVA マイクロキャリアで培養した線維芽細胞の細胞増殖曲線
(開発段階のデータです、実際の製品とは仕様が異なります)

細胞の回収

ここでは、Trypsin-EDTA 溶液を用いた方法を記載します。実験条件に応じて Accutase™ 等、その他の細胞剥離酵素をご使用ください。

1. 70 μm もしくは 100 μm のセルストレーナーを、50 mL チューブにセットして、細胞接着 PVA マイクロキャリアを回収します。
2. 10 mL の PBS で、PVA マイクロキャリアを洗浄します。
3. セルストレーナーを逆さにして、新しい 50 mL チューブや 60 mm ディッシュにセットして、5 mL の 0.05 % Trypsin-EDTA 溶液を流しかけて、チューブに PVA マイクロキャリアを落とします。

Note: 細胞の種類や PVA マイクロキャリアの量に応じて、Trypsin-EDTA 溶液の濃度や量を調整してください。

4. 37°C のインキュベータ内で、チューブを寝かして、5~10 分間、85 rpm で振とうし、トリプシン処理します。

Note: バイオリアクター等で攪拌しながら Trypsin-EDTA 処理することも可能です。

5. 等量 (5 mL) の培地を加え Trypsin-EDTA 処理を停止します。
6. PVA マイクロキャリアから細胞を剥離するため、2~20 回、ピペッティングします。
7. 70 μm もしくは 100 μm のセルストレーナーに手順 6 の溶液を移し、細胞と PVA マイクロキャリアを分離します。
8. 10 mL の培地で、セルストレーナー内の PVA マイクロキャリアを洗浄します。
9. 細胞を遠心 (300 \times g、5 分間) し、上清を除去し、新しい培地に細胞を懸濁します。
10. セルストレーナーを逆さにして、35 mm ディッシュなどに移し、1~2 mL の PBS を洗いかけて、PVA マイクロキャリアをディッシュに移します。位相差顕微鏡で観察し、細胞が剥がれていることを確認してください。細胞が PVA マイクロキャリアに残っている場合は、手順 3~9 を繰り返してください。

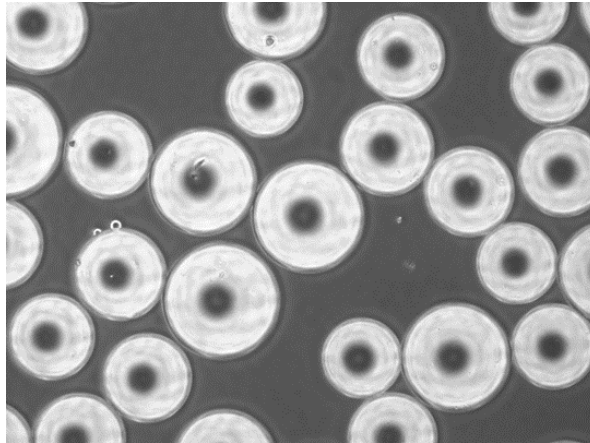


図 4. Trypsin-EDTA 処理した後の PVA マイクロキャリア
(開発段階の画像です、実際の製品とは仕様が異なります)

オプション：Bead to bead cell transfer による拡大培養

クラレの PVA マイクロキャリアは細胞を剥がすことなく、新しい PVA マイクロキャリアを加えることで拡大培養が可能です。このとき、細胞が接着している PVA マイクロキャリアから新しい PVA マイクロキャリアに細胞が移ります (bead to bead cell transfer)。バイオリアクターを用いた場合の手順を以下に記載します。

1. 細胞被覆率が 80%以上になるまで、PVA マイクロキャリアで細胞を接着培養します。
2. 1/6 から 1/2 量の細胞接着 PVA マイクロキャリアを回収し、新しいバイオリアクターに移します。
3. 1 倍量になるように、新しい PVA マイクロキャリアおよび培地を添加します。
4. 24 時間、静置培養もしくは 15 rpm の低速で攪拌培養します。
5. 24 時間経過後は通常の培養法と同様に 50 rpm で攪拌培養し、3~4 日の間隔で、半量の培地を交換します。

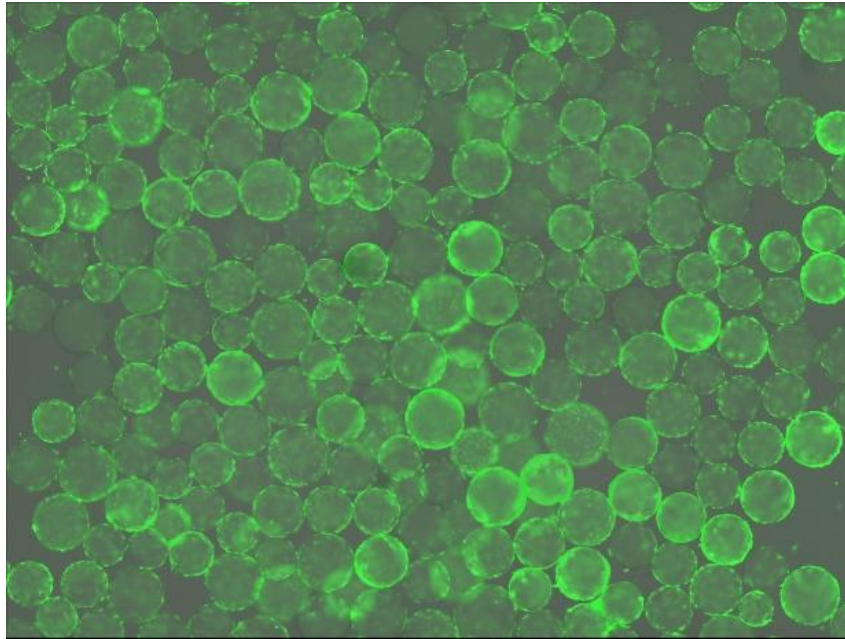


図 5. Bead to bead cell transfer による繊維芽細胞の拡大培養の顕微鏡画像
線維芽細胞培養開始から 4 日目に新しい PVA マイクロキャリアを添加し、
bead to bead cell transfer を行いました。PVA マイクロキャリア添加後 10
日目に、生細胞を緑色に染色し、蛍光顕微鏡で観察した結果、ほぼ全ての
PVA マイクロキャリアに細胞が接着しており、bead to bead cell transfer に
よる拡大培養が可能でした。（開発段階の画像です、実際の製品とは仕様が
異なります）

製品情報お問い合わせ先

株式会社クラレ 研究開発本部 ライフイノベーション推進グループ

〒100-0004 東京都千代田区大手町 2-6-4 常盤橋タワー

E-mail Contact.LIPG@kuraray.com

2024 年 3 月 29 日改定