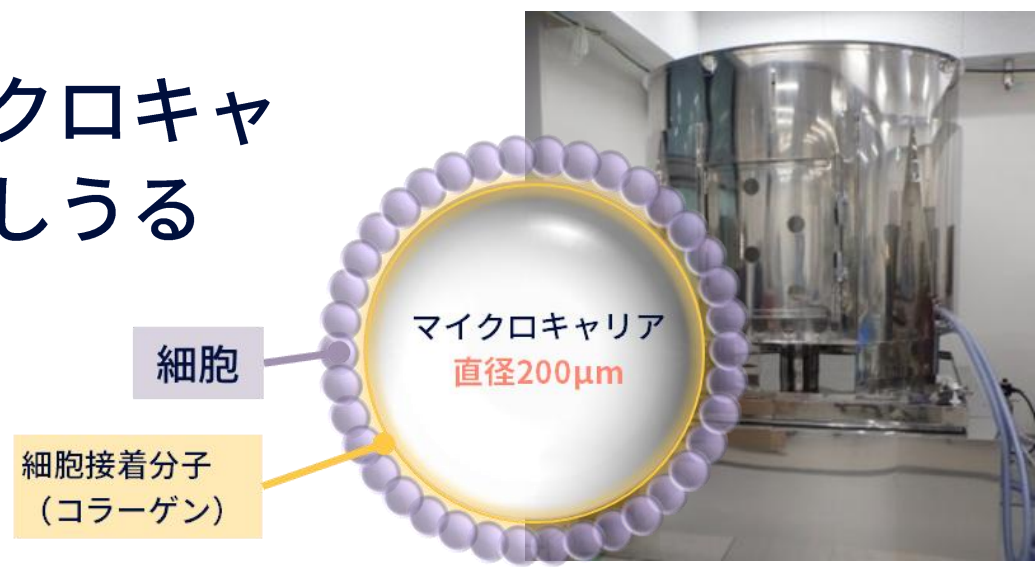


〈スキャポバ®〉CLを用いた間葉系間質細胞のBead-to-Bead cell transferによる継代培養
○狩野 有花、板垣 亮、三輪 達明

Introduction

背景

- ビーズ状の細胞培養足場であるマイクロキャリアは大量培養における課題を解決しうる
- ✓ 省スペース
- ✓ 培養工程の自動化が簡便
- ✓ 工数削減による低コスト化



➢ 再生医療で1人分の患者に必要なとされる細胞（10⁸~10⁹ cells）を得るには

□ 既存の平面培養



指数関数的に培養スペースと作業工数が増加

□ マイクロキャリア培養

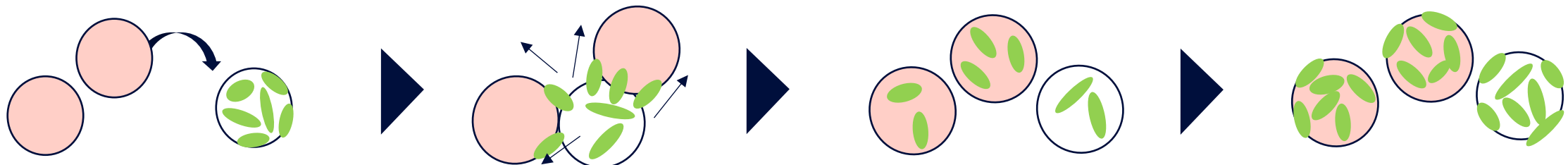


マイクロキャリアを用いて効率的にB to Bでの継代ができれば
大量培養時のスペースと作業工数が大幅に削減

マイクロキャリアを用いた拡大培養の利点

Bead-to-bead cell transfer (B to B)

- 新しいマイクロキャリアを追加するだけで、細胞が移動し、細胞を拡大培養する面積が増加する



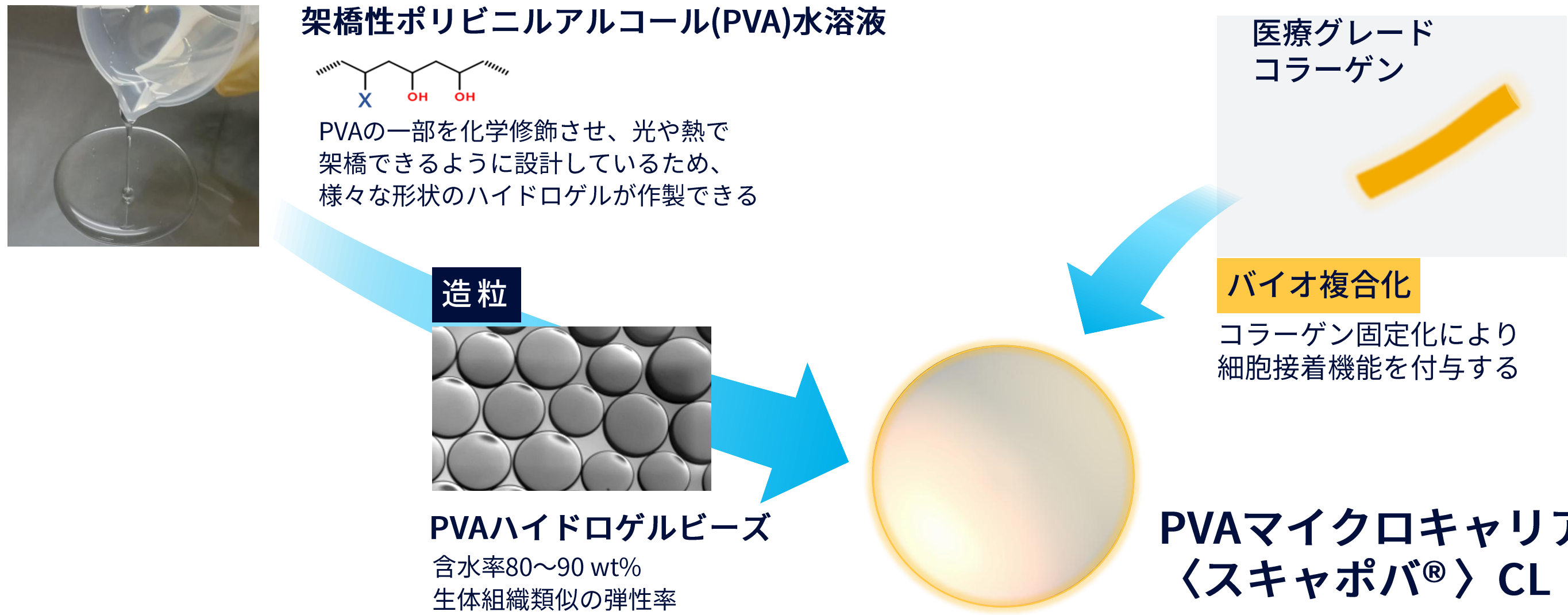
➢ この現象を活用することで酵素による剥離作業なしで継代が可能

研究目的

- マイクロキャリアにおけるB to Bを応用した効率的な拡大培養を実現すべく、B to B継代での間葉系間質細胞（MSC）の維持培養の可否を検証した

Method

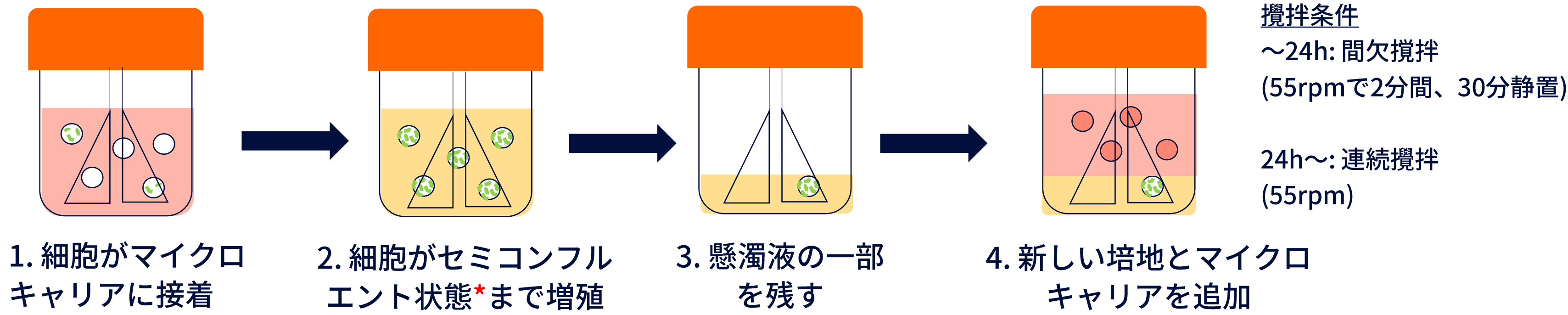
〈スキャポバ®〉CLとは



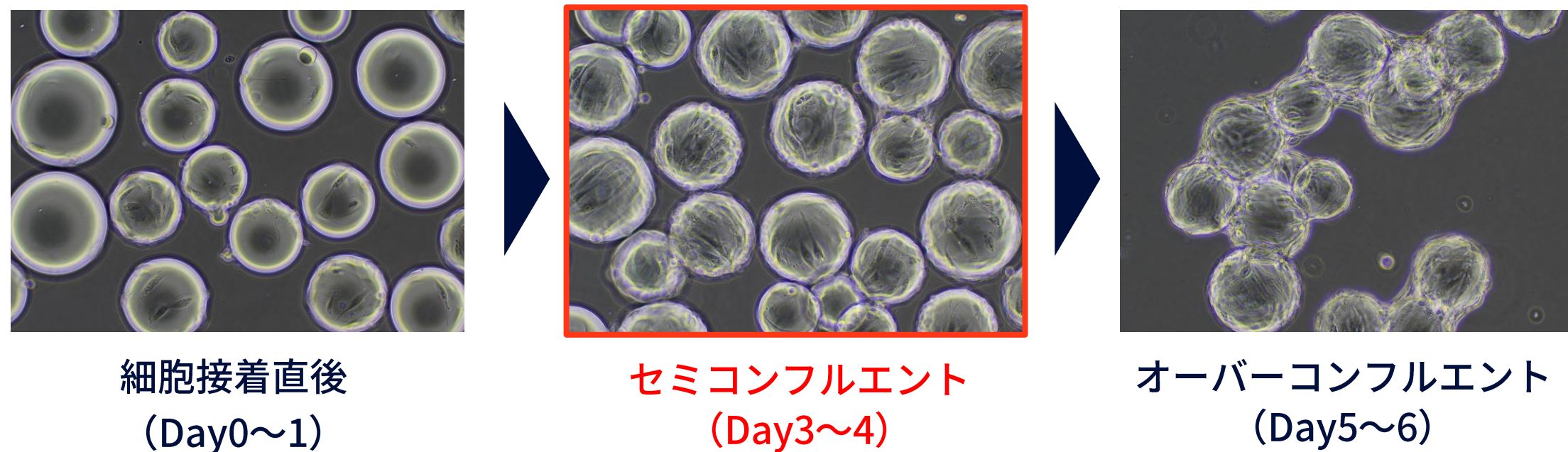
細胞培養条件

バイオリアクター	30 mL single use bioreactor (ABLE Corp.)
〈スキャポバ®〉CLの添加量	6.9 cm ² /mL (208 cm ² /reactor)
細胞種	HADSC – Human Adipose-Derived Stem Cells (LONZA K. K.)
細胞播種密度	5×10 ³ cells/cm ² (1.0×10 ⁶ cells/reactor)
培地	ADSC-1 (KBM) +1% Penicillin / streptomycin
細胞数測定方法	NucleoCounter® NC-202™ Count & Viability of Cells Grown on Microcarriers
染色試薬	Microcarrier : iFluor® 594 succinimidyl ester Cells : Calcein AM

B to B継代の方法

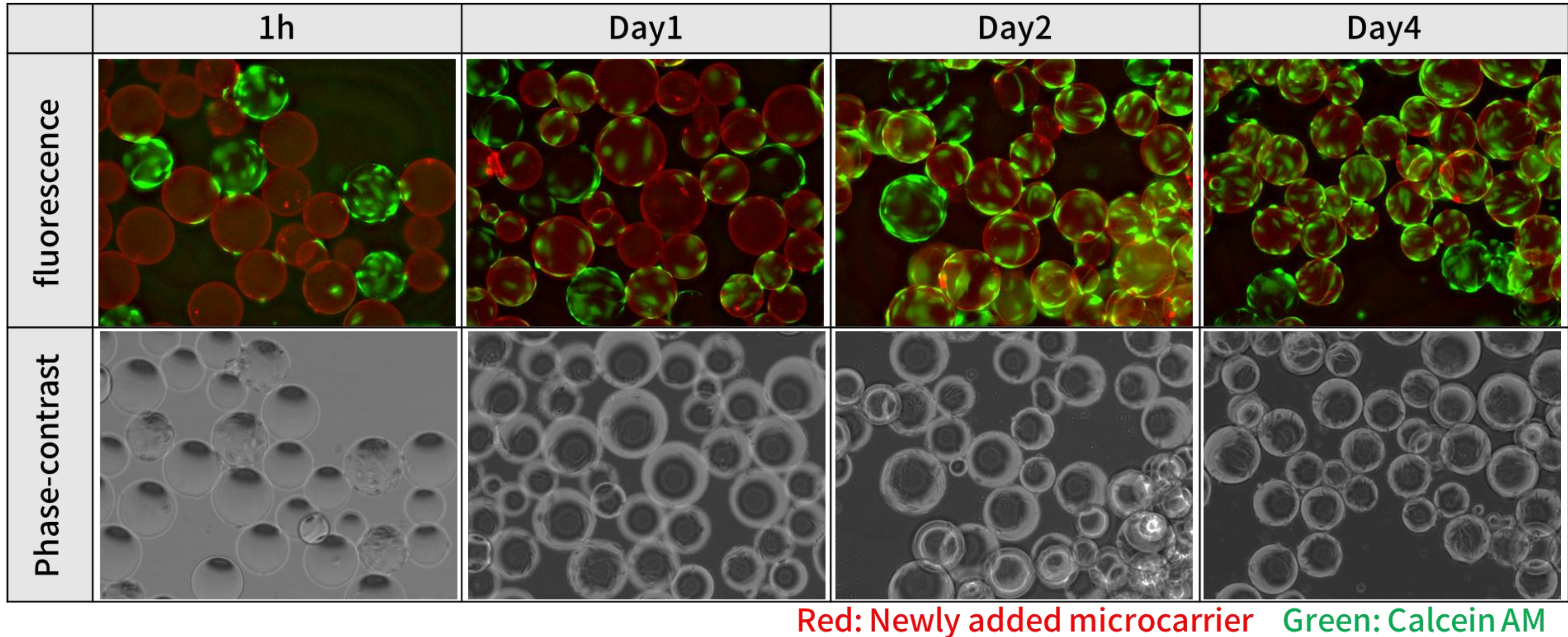


*コンフルエントに達すると細胞の移動、増殖が進行しにくくなることから、B to Bはセミコンフルエント状態で実施した



Result

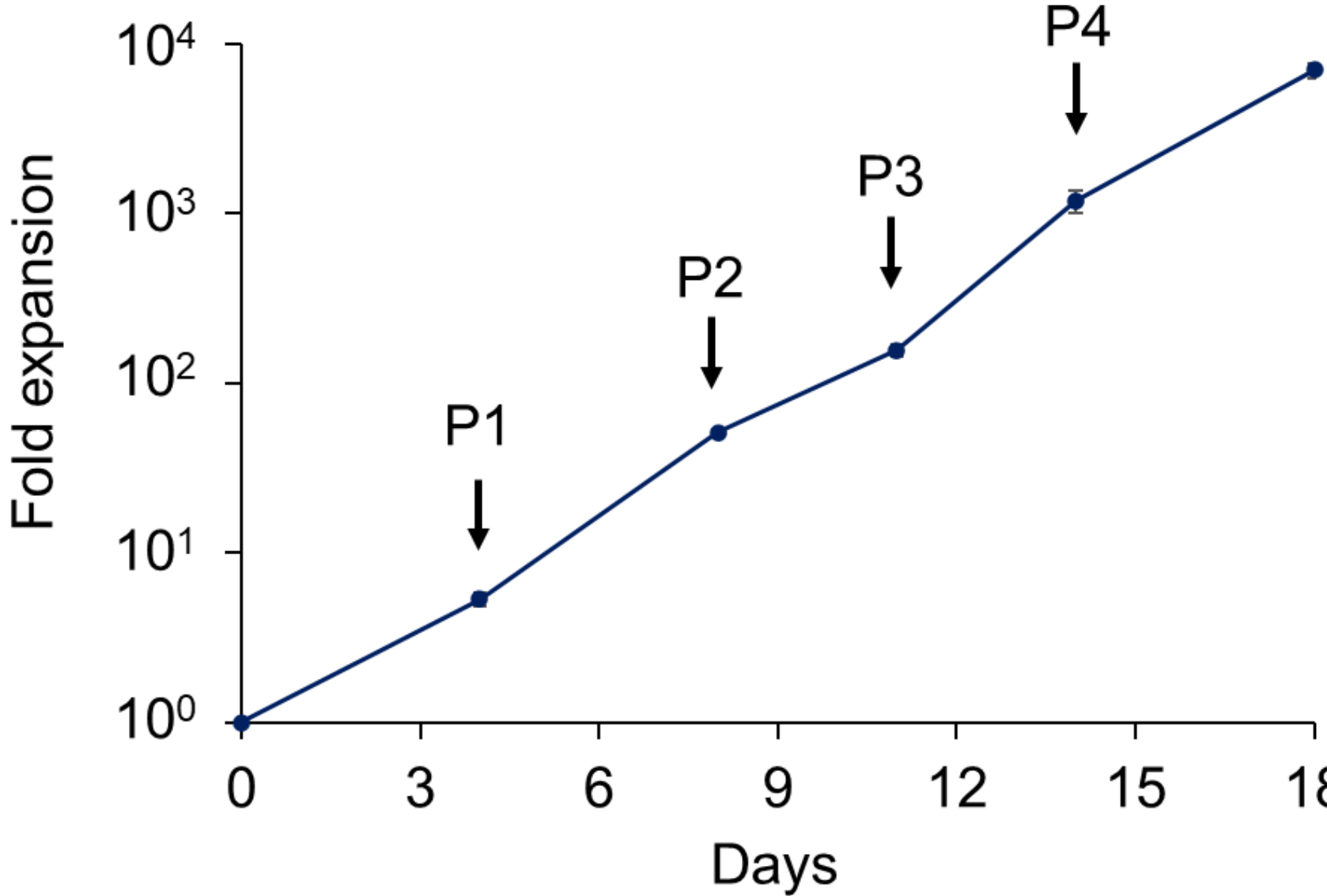
① B to Bの経時変化観察



- MSCを培養したマイクロキャリアに新しくマイクロキャリアを追加して4日間培養した
- MSCが移動してマイクロキャリア全体に均一に接着、増殖した

③ B to B継代によるMSCの18日間培養

MSC増殖曲線



MSC表面マーカー (n=2)

MSC Markers	Positive cells (%)
CD73	100.0
CD90	99.9
CD105	99.3
CD45, CD34, CD11b, CD19 HLA-DR	0.4

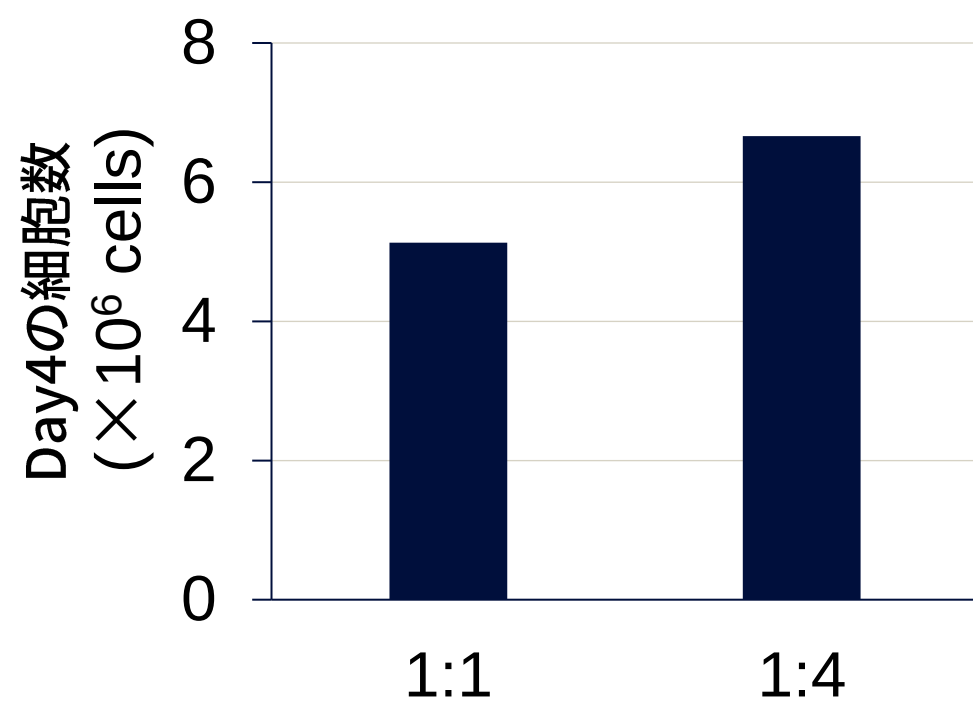
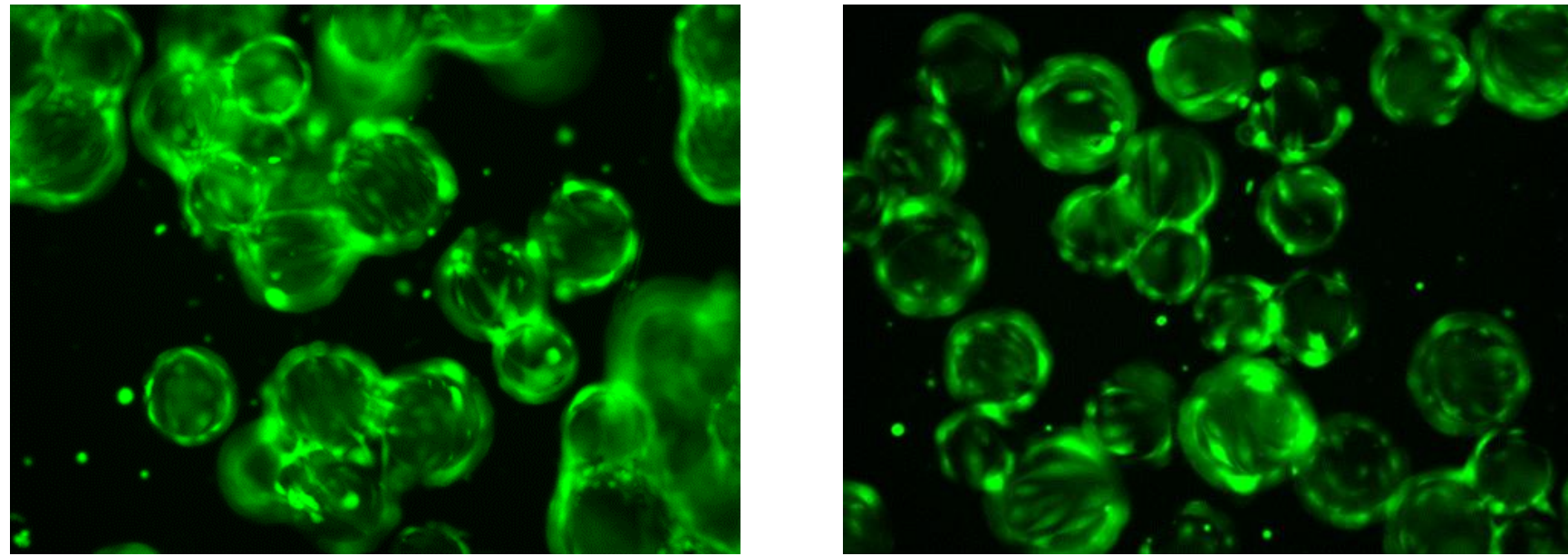
- 18日間の培養でも増殖速度が低下せずMSCは増殖した
- MSCの表面マーカーは維持されていた
- 理論的には18日間でMSCを10000倍まで拡大培養できる

② 追加粒子の割合検討

(MSCが接着している粒子) : (新しく追加する粒子) =

1:1

1:4



- 追加粒子の割合を1:1、1:4としてMSCを培養した
- 1:4では大きな凝集を形成せず、Day4時点でより多くの細胞数に達した

Conclusion

- 〈スキャポバ®〉CLを用いてMSCをB to B継代培養した結果、MSCが移動し、全体に均一に接着・増殖した
- (MSCが接着している粒子) : (新しく追加する粒子) = 1:4 とするとMSCが凝集せずに増殖した
- B to B継代によって、MSCを剥離せずに培養でき、理論的には18日間で10000倍となる細胞数に達した
- 得られたMSCの表面マーカーは維持されていた

株式会社 クラレ

〈スキャポバ®〉製品HP ▶

