

MethoCult™ 培地を使用した CFU アッセイ

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。

MethoCult™ は、メチルセルロースを含有する造血前駆細胞コロニー測定用の半固形培地です。この培地を使用したヒトまたはマウスの造血コロニー形成単位 (CFU) アッセイの方法 (**Figure 1** に概要を図示) を、以下のステップごとに説明します。

1. 必要な物品
2. 培地の解凍と分注
3. 細胞サンプルの調製
4. 細胞数のカウント
5. CFU アッセイの準備・培養
6. コロニー観察

以下の動画でも CFU アッセイの操作手順を紹介しています。

https://www.veritastk.co.jp/products/reference_detail/Movie_2_69.html

1. 必要な物品

1.1 試薬

- MethoCult™ 培地
- 塩化アンモニウム溶液 (商品コード: ST-07800)
- IMDM + 2% FBS (ST-07700)
- IMDM + 25 mM HEPES (ST-36150、無血清条件用)
- Lymphoprep™ (ST-07801)
- メチレンブルー + 3% 酢酸 (ST-07060)
- トリパンプルー (ST-07050)

1.2 機器

- バイオセーフティーレベル2の封じ込めが必要な試料を扱える安全キャビネット
※ 細胞処理およびCFUアッセイのセットアップは、無菌操作のもとで実施してください。
- 37°C (または33°C)、5% CO₂、湿度 95%以上に設定したインキュベーター
※ ウォータージャケット付きCO₂インキュベーターを推奨します。CO₂ガスに存在する有毒物質によりコロニーの成長が抑制されるとの報告があるため、医療用のCO₂ガスを使用してください。
- コロニー算定用の倒立顕微鏡
※ 10倍または12.5倍の接眼レンズ、2倍・4倍・10倍の平面対物レンズ、および青色フィルターを備えた倒立顕微鏡を推奨します。
- 細胞数カウント用の光学顕微鏡
- ラボ用遠心分離機
- ボルテックスミキサー
- ピペッター
- 自動セルカウンター、またはノイバウエル血球計算盤

1.3 器具

- 滅菌血清ピペット: 2 mL (ST-38002)、5 mL (ST-38003)
- 滅菌ポリスチレンチューブ: 5 mL (12 x 75 mm; ST-38007)、14 mL (17 x 95 mm; ST-38008)
- コニカルチューブ: 15 mL (ST-38009)、50 mL (ST-38010)
- 滅菌ピペットチップ
- ルアーロック型シリンジ: 3 mL (ST-28230)、または6 mL
- 16ゲージ平滑末端針/Blunt-End Needles (ST-28110)
- 35 mmペトリ皿 (ST-27100)、またはSmartDish™ 6-well culture plates (ST-27370)
- 100 mmペトリ皿 (例: Tissue Culture-Treated Dishes; ST-27125)、または245 mm角皿 (例: Corning® 245 mm Square Dish, Non-Treated; ST-38020)
- 60 mm グリッド付きスコアリング用皿 (ST-100-0085)、またはSTEMgrid™-6 Counting Grid (ST-27000)
- 油性細字マーカー

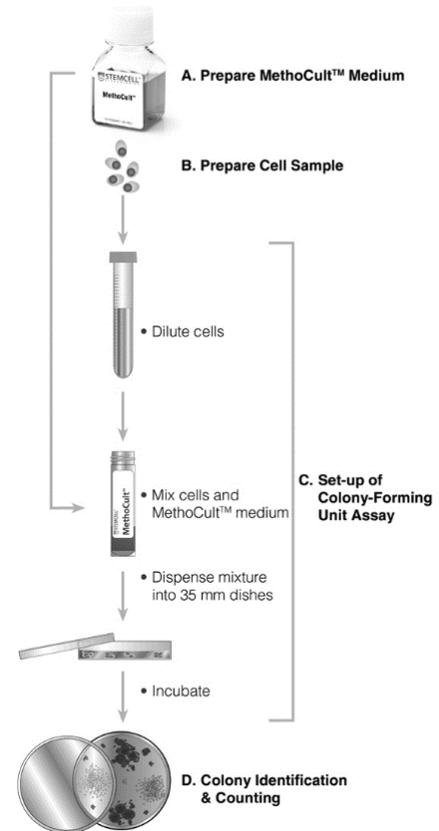


Figure 1 CFU アッセイの概要

2. 培地の解凍と分注

MethoCult™培地の解凍と分注について説明します。

細胞懸濁液とMethoCult™培地を1:10 (v/v) の比で混合すると最適な粘度を保つように調製されています。

- ◇ MethoCult™培地は粘性があるため、ピペットで分注しないでください。分注量が不正確になります。正確に分注し、また針刺し損傷を防ぐために、シリンジと大口径のBlunt-End Needlesを使用してください。

- (1) MethoCult™ 培地のボトルを室温 (15~25℃) で解凍します。または2~8℃で一晩かけて解凍します。
※ MethoCult™培地を37℃で解凍しないでください。
- (2) ボトルを1~2分間激しく振ってから5分以上放置します。液面に気泡が上がったことを確認してから分注します。
- (3) 16ゲージのBlunt-End Needleを取り付けた3 mLまたは6 mLのルアーロック型シリンジで、MethoCult™培地を14 mL (17 x 95 mm) の滅菌チューブに分注します。
※ シリンジから空気を取り除くため、培地液面に針を刺して約1 mL吸引します。プランジャーをゆっくり押し下げ、培地を完全に排出します。空気が見えなくなるまでこれを繰り返します。
- (4) デュプリケートでの培養はチューブ1本あたり3 mL、トリプリケートでの培養は4 mLを分注します。
※ 分注時はシリンジの「0」印まで培地を排出しないでください。たとえば、目盛の位置が3.0 mLから0 mLではなく、3.5 mLから0.5 mLまで排出します。
※ 凍結解凍の繰り返しを避けるため、ボトルの全量をチューブに分注してください。
- (5) チューブをボルテックスミキサーでよく攪拌します。すぐに使用しない場合は2~8℃で最大1か月間、または-20℃で保存できます。冷凍保存したチューブは解凍後によく攪拌し、直ちに使用してください。再凍結はしないでください。

3. 細胞サンプルの調製

別紙【補足資料】を参照

4. 細胞数のカウント

有核細胞数および生細胞数を手動でカウントする方法です。調製時に生存率の低下が予想される細胞サンプル (例: 凍結保存した細胞) の場合、トリパンブルーなどで生細胞数をカウントします。

詳細は以下のプロトコール&動画もご確認ください。

<https://www.stemcell.com/technical-resources/how-to-count-cells-with-a-hemocytometer.html>

4.1 メチレンブルー + 3% 酢酸による有核細胞数のカウント

- (1) 細胞懸濁液を完全に混合し、100 μ Lを別のチューブに分取します。
- (2) 細胞サンプルをメチレンブルー + 3% 酢酸で希釈します。骨髓細胞では 50~100 倍希釈から検討してください。有核細胞の数が多ければさらに希釈します。
※ 50倍に希釈するときは、20 μ Lの細胞懸濁液を980 μ Lのメチレンブルー + 3%酢酸溶液に加えます。
※ 3%酢酸溶液は細胞核を傷つけずに細胞膜を破壊します。メチレンブルー色素は核を可視化させます。
※ 細胞を酢酸溶液に添加してから10分以内に有核細胞の数をカウントしてください。
- (3) 希釈した細胞サンプルをよく混合します。
- (4) 血球計算盤を準備します。まずチャンバーとカバースリップをアルコールで洗浄し、毛羽立ちの出ないティッシュで拭いて乾かします。
- (5) カバースリップをチャンバー上に注意深く配置します。
- (6) マイクロピペッターまたはキャピラリーチューブで (3) のサンプルを分取します。
- (7) チャンバーとカバースリップの間にサンプルを満たします。過充填または過少充填しないでください。
- (8) 血球計算盤上の一方のチャンバーから細胞数をカウントします。手動計数器または類似の装置で、四隅のうち少なくとも2つにある1 mm四方の正方形内のすべての有核細胞を数えます。他方のチャンバーも同様に数えます。細胞の総数を記録し、正方形あたりの平均細胞数を決定します。正方形1つあたりの細胞数が10個未満の場合は、より濃縮した細胞懸濁液を用意してください。
- (9) カバースリップを配置した血球計算盤の9つの大きな正方形は、それぞれ0.1 mm³ (10⁻⁴ cm³、10⁻⁴ mLに相当)の容積を表します。次の計算式から細胞の濃度と総数を決定します。
$$1 \text{ mL あたりの細胞数} = 1 \text{ mm 四方の正方形あたりの平均細胞数} \times \text{希釈倍率} \times 10^4$$
$$\text{総細胞数} = 1 \text{ mL あたりの細胞数} \times \text{細胞懸濁液の容量 (mL)}$$

4.2 トリパンブルー色素排除法による生細胞数のカウント

- (1) 細胞懸濁液を完全に混合し、100 μ Lを別のチューブに分取します。
- (2) トリパンブルー色素排除法では、細胞サンプルを等量のトリパンブルーで希釈 (2倍希釈) します。さらに希釈する必要がある場合は、分取した細胞懸濁液を細胞培養液で希釈してからトリパンブルーで混合してください。
※ 40倍希釈液を調製するには、950 μ LのIMDM + 2% FBSに50 μ Lの細胞懸濁液を加え (20倍希釈)、よく混合します。さらにこの希釈した100 μ Lの細胞懸濁液を、100 μ Lのトリパンブルーに加えます (2倍希釈、最終40倍希釈)。
- (3) 希釈したサンプルをよく混合します。
- (4) (3) のサンプルを5~15分間静置します。

- ※ 細胞をトリパンブルーで 15 分以上インキュベートすると毒性作用が発生し、生細胞数が不正確になります (すべての細胞が青色に見えます)。
- (5) 血球計算盤を準備します。まずチャンバーとカバースリップをアルコールで洗浄し、毛羽立ちの出ないティッシュで拭いて乾かします。
 - (6) カバースリップをチャンバー上に注意深く配置します。
 - (7) マイクロピペッターまたはキャピラリーチューブで (4) のサンプルを分取します。
 - (8) チャンバーとカバースリップの間にサンプルを満たします。過充填または過少充填しないでください。
 - (9) 4 つの大きな正方形内の細胞または 100 個以上の細胞をカウントし、死細胞と生細胞に分けて集計します。トリパンブルーが取り込まれて青く染色されるのが死細胞です。染色されていないものが生細胞です。
 - (10) 次のように生細胞数を計算します。

$$1 \text{ mL あたりの生細胞数} = \text{正方形あたりの平均生細胞数} \times \text{希釈倍率} \times 10^4$$
 - (11) 生存率は次のように計算します。

$$\% \text{ 生存率} = \frac{\text{総生細胞数}}{\text{総生細胞数} + \text{非生細胞数}} \times 100\%$$

5. CFUアッセイの準備・培養

MethoCult™培地を使用した CFU アッセイの準備と培養について説明します。

- (1) 「2」で分注した MethoCult™培地のチューブを必要な本数だけ室温 (15~25°C) で解凍、または 2~8°C で一晩かけて解凍します。
 ※ MethoCult™培地を 37°C で解凍しないでください。
- (2) 蓋付きの 100 mm ペトリ皿の中に蓋付きの 35 mm ペトリ皿 2 枚を置きます。水皿として蓋を外した 35 mm 皿を 1 枚置きます。このセットはデュプリケートでのアッセイ 1 回分です。トリプリケートでのアッセイには、蓋付きの 35 mm 皿 3 枚を大きな培養器 (例: 245 mm 角皿) に置き、水皿として蓋を外した 35 mm 皿を 1 枚置きます。
 ※ SmartDish™ 6-well Culture Plate を使用する際は、ウェル間の空きスペースに 4~8 mL の滅菌水を入れます。245 mm 角皿に SmartDish™ を置き、さらに 3~4 mL の滅菌水を入れた 35 mm 培養皿を数枚置きます。最大 3 枚の SmartDish™ を 245 mm 角皿に収められます。
- (3) 細胞サンプルを調製します (詳細は別紙「MethoCult™を使用した CFU アッセイ (細胞サンプルの調製)」を参照)。
- (4) IMDM + 2% FBS (無血清条件では、ヒト: IMDM + 25 mM HEPES、マウス: IMDM + 0.1% BSA) で細胞を希釈し、最終濃度 (播種時) の 10 倍の細胞懸濁液を用意します。播種時の細胞の濃度は英文マニュアルの Table 6, 7 (ヒト)、または Table 6 (マウス) をご参照ください。
 ※ 例えば、培養皿あたり 1×10^4 細胞を播種するには、 1×10^5 細胞/mL の細胞懸濁液を準備します。
 ※ 適した播種細胞数の予測が難しければ、細胞数が 2~3 倍の間で異なる懸濁液 (例: 培養皿あたり 2×10^4 および 1×10^4 細胞) を用意してください。
 ※ マウスでは C57BL/6 と BALB/c 以外の系統や、遺伝子組み換え系統では播種細胞数の予測が難しいことがあります。
- (5) デュプリケートでのアッセイは、0.3 mL の (4) の細胞懸濁液を 3 mL の MethoCult™培地に加えます。また、トリプリケートでのアッセイは、0.4 mL の (4) の細胞懸濁液を 4 mL の MethoCult™培地に加えます。
 ※ 細胞: 培地が 1:10 (v/v) の比は、CFU の成長と形態の維持に適した粘度です。
- (6) チューブをボルテックスミキサーで 4 秒以上激しく攪拌して、内容物を完全に混合します。
- (7) 5 分以上放置し、気泡が上面に上がったことを確認してください。
- (8) (7) の混合液を培養皿に分注する前に、滅菌 3 mL ルアーロック型シリンジに滅菌 16 ゲージ Blunt-End Needle を取り付けます。
 ※ サンプル間の汚染を防ぐため、播種するチューブごとに新しい 16 ゲージ Blunt-End Needle を取り付けられた新しい滅菌 3 mL シリンジを使用してください。
 ※ MethoCult™培地は粘性があるため、ピペットで分注しないでください。分注量が不正確になります。正確に分注し、また針刺し損傷を防ぐために、シリンジと大口径の Blunt-End Needles を使用してください。
- (9) シリンジ内の空気を取り除くため、(7) の混合液の表面下に針を入れて約 1 mL 吸引します。プランジャーをゆっくり押し下げ、中身を完全に排出します。空気が見えなくなるまでこれを繰り返します。
- (10) (7) の混合液をシリンジで吸引し、35 mm 皿に 1.1 mL 分注します。シリンジを片手で持ちながら、反対の手で 35 mm 皿の蓋を開けます。シリンジを皿に触れないように皿の中央で混合液を排出します。分注したら蓋を閉じます。
 ※ 分注時にシリンジの「0」印まで培地を排出しないでください。たとえば、目盛の位置が 3.0 mL から 0 mL ではなく、3.5 mL から 0.5 mL まで排出します。
- (11) 皿をゆっくりと傾けながら回転させ、35 mm 皿の表面全体に培地を均等に分散させます。
 ※ 培地を広げる際に培地が皿の蓋に接触したら、汚染リスクを最小限に抑えるために蓋を交換してください。
- (12) 培養皿を外皿 (例: 100 mm ペトリ皿または 245 mm 角皿) に置きます。蓋を外した 35 mm 皿に約 3 mL の滅菌水を加えます。外皿に蓋を閉めます。
 ※ 蓋付きの 100 mm ペトリ皿 (または蓋がゆるい培養器具) と水皿により湿度を維持し、汚染を最小限に抑えられます。
- (13) ヒト用 MethoCult™培地は 14~16 日間 (MethoCult™ Express は 7 日間)、37°C、5% CO₂、湿度 95% 以上の条件で培養します。マウス用 MethoCult™培地の培養期間は、英文マニュアルの Table 6 をご参照ください。
 ※ 培養条件は CFU の最適な成長に重要です。ウォータージャケット付き CO₂ インキュベーターで培養し、温度および CO₂ 濃度をモニタリングすることをおすすめします。水受けに適切な添加剤を加えることで微生物の増殖を阻害できます (CO₂ インキュベーターの取扱説明書をご確認ください)。
- (14) (13) の培養期間後にコロニーを観察できなければ、必要に応じて水皿に滅菌水を補充し、培養物を 33°C、5% CO₂、

湿度 95%以上に維持した CO₂ インキュベーターに移します。コロニーの成長は遅くなりますが、1 週間以内にコロニーを再観察してください。

※ ほとんどの CFU はこの培養期間内に最大のサイズ（コロニーあたりの細胞数）に達します。培養温度を低くすると、増殖阻害や細胞死の抑止はしませんが、コロニー形態の維持に役立ちます。

6. コロニー観察

- (1) 60 mm グリッド付きスコアリング用皿の底に、油性細字マーカーで中心を横切る 2 本の垂直線を引きます。4 つの各半径上で、中心から 8 マス目に半径を横切る約 2 mm の短い線を引きます。

※ これらの線で、観察時に 35 mm 培養皿を中央に配置しやすくなります。このスコアリング用皿は他の培養皿の観察で再度使用できます。一方、SmartDish™ 6-well culture plates で手動算定するには STEMgrid™-6 Counting Grid をご使用ください。なお、こちらは 35 mm 皿の観察にも使用できます。

- (2) コロニーを観察したい培養物を CO₂ インキュベーターから取り出します。1 時間以内に観察できる枚数の皿だけを取り出してください。

- (3) (1)で準備したスコアリング用皿の中央に培養皿を置きます。スコアリング用皿を倒立顕微鏡のステージに置き、コロニーに焦点が合うまで低倍率（2x 対物レンズ、20x～25x 倍率）で焦点を調整します。

- (4) 低倍率で培養皿全体を見渡し、コロニーのおおよその位置を確認します。コロニー観察と評価に役立てるために、培養物の全体的な外観を記録します。

※ 注目点：

- コロニーは互いに近くにあるか、それとも遠く離れているか
- コロニーは均等に分布しているか
- 培養皿上のコロニー数（過剰または過少ではないか）
- バックグラウンドに他の細胞や破片の有無
- コロニーの形態・状態

- (5) 各皿内のすべてのコロニーを観察します。顕微鏡の焦点を継続的に調整しながらすべてのコロニーを識別し、互いに近接していても異なる焦点に位置するコロニーは区別してください。

ヒトの場合：

CFU-E および小さな BFU-E コロニーは中程度の倍率（4x 対物レンズ、40x～50x 倍率）で観察します。大きな BFU-E、CFU-GM、および CFU-GEMM コロニーは低倍率（2x 対物レンズ、20x～25x 倍率）で観察します。必要に応じた倍率でコロニーを同定します。

マウスの場合：

コロニーの大きさによって観察する倍率を調整します。コロニーは容易に観察できますが、見落としがないよう注意してください。

※ 顕鏡時は皿を左から右ではなく上から下に動かすことで、初心者によくある乗り物酔い感覚を最小限に抑えられます。

- (6) 観察後の培養物は必要に応じて 33℃、5% CO₂、湿度 95%以上の条件下でさらに最大 7 日間培養できます。

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

TEL 03-5776-0078 FAX 03-5776-0076 URL: <https://www.veritastk.co.jp/>

技術的なお問い合わせ E-mail: Tech_support@veritastk.co.jp TEL 03-5776-0040 (平日 9 時 - 17 時)