

ステムセルテクノロジーズ社

---

# MethoCult を用いた マウス造血幹細胞のコロニーアッセイ



## 目次

<b>1.0</b>	<b>はじめに</b> .....	<b>1</b>
<b>2.0</b>	<b>StemCell Technologies が提供するマウス CFC アッセイ用製品</b> .....	<b>1</b>
<b>3.0</b>	<b>MethoCult®培地の保管および取り扱い</b> .....	<b>3</b>
3.1	完全 MethoCult®培地の解凍および分注 .....	3
3.2	不完全 MethoCult®培地の解凍および分注 .....	4
<b>4.0</b>	<b>MethoCult®培地を用いたマウス造血 CFC アッセイ</b> .....	<b>5</b>
4.1	処理手順 .....	5
4.2	必要な装置および試薬 .....	6
4.3	マウス細胞の分離手順 .....	6
4.3.1	骨髄細胞 .....	6
4.3.2	脾臓細胞 .....	8
4.3.3	末梢血 .....	8
4.3.4	胎児肝、交配後 10~16 日齢 .....	8
4.4	細胞計数 .....	9
4.5	MethoCult®培地を用いた CFC アッセイの一般的なセットアップ方法 .....	10
4.6	マウス CFU-E および成熟 BFU-E アッセイ .....	11
4.7	マウス BFU-E、CFU-GM および CFU-GEMM アッセイおよび CFU-GM アッセイ .....	11
4.8	マウス CFU Pre-B アッセイ .....	12
<b>5.0</b>	<b>マウス造血 CFC の説明と写真</b> .....	<b>13</b>
<b>6.0</b>	<b>よくある質問と役に立つヒント集</b> .....	<b>16</b>
6.1	MethoCult®培地および試薬 .....	16
6.2	細胞サンプルの調製 .....	16
6.3	セットアップおよび培養 .....	16
6.4	マウス CFC アッセイの計数 .....	18
<b>7.0</b>	<b>付録</b> .....	<b>19</b>
7.1	MethoCult®の組成 .....	19
7.2	BFU-E、CFU-GM および CFU-GEMM アッセイ用の PWM-SCCM 添加メチルセルロース培地の調製 .....	19
7.3	メチルセルロース培地を用いた細胞系のクローニング .....	21

## 1.0 はじめに

成体マウス骨髄 (BM) 中では、少数の造血幹細胞 (HSC) から、盛んに分裂する造血前駆細胞の不均質な集団が生じる。これらの造血前駆細胞が増殖・分化することにより、1日に何百万個もの成熟血液細胞が生成する。赤血球経路、顆粒球経路、単球マクロファージ経路および巨核球骨髄造血経路やマウス B リンパ球前駆細胞のサブセットといった多分化能前駆細胞および系統制限前駆細胞を定量するための *in vitro* アッセイ系が開発された。コロニー形成細胞 (CFC) と呼ばれる各前駆細胞を適切な半固体マトリックス内で培養すると、これらが増殖してコロニーと呼ばれる個別の細胞集合が生じる。CFC アッセイでは栄養素およびサイトカインを添加した半固体培地 (メチルセルロース培地など) に細胞懸濁液を入れ、37°C で数日から数週間インキュベートする。当該コロニー内にみられる 1 つ以上の造血系統細胞の種類を形態学的に識別することで CFC を分類・計数する。形態学的な識別に基づく CFC の分類・計数は、光学顕微鏡を用いて *in situ* で行なうか、細胞化学的・免疫細胞化学的手法によって細胞を染色してから行うことができる。

CFC アッセイには寒天、アガロース、メチルセルロース、コラーゲンおよびフィブリンクロットなどの多様なゲル化剤が利用されてきた。メチルセルロースは比較的不活性なポリマーであり、十分な光学的透明性を有する安定なゲルを形成する。メチルセルロースは一般にウシ胎児血清 (FBS)、ウシ血清アルブミン (BSA)、2-メルカプトエタノール、インシュリン、トランスフェリンおよび組換えサイトカイン類などの化合物やコロニー刺激因子源として条件培地を添加した培地中において、終濃度 0.9~1.2% で利用される。メチルセルロースを含む培地中ではその他の半固体マトリックスを含む培地中よりも赤血球系細胞がよく増殖することから、同一培地中における赤血球、顆粒球、単球および多分化能 CFC のアッセイが可能となる。

## 2.0 StemCell Technologies が提供するマウス CFC アッセイ用製品

### MethoCult®メチルセルロース培地

MethoCult®製品の製造に利用する成分は、StemCell Technologies (StemCell) が厳密に検討し選択したものである。メチルセルロース、ウシ胎児血清 (FBS) およびウシ血清アルブミン (BSA) のバッチが異なると、CFC 増殖促進能が大きく異なることが知られている。StemCell が提供するスクリーニング済みの培地成分を使用しない場合には、各成分を別個におよび組み合わせて CFC 増殖促進能を試験し、造血細胞の増殖・分化に最適化することが重要である。

MethoCult®培地はいずれのバッチでも試験済みの成分を用いて製造されている。いずれのバッチについても正常マウス BM を用いた性能試験を実施して実験室標準と比較する。また、各バッチに対し、USP 標準法に基づいて無菌試験を行なう。

M3434、M3534 および M3630 などの完全 MethoCult®培地は、ボトル 1 本あたり 100 mL で提供されている (カタログ番号 03434、03534、03630)。MethoCult®M3434 については、1 本あたり 3 mL のチューブを 1 ラック 24 本セットにして提供する (カタログ番号 03444)。各研究者のニーズに合わせて組換え増殖因子非添加培地などの特殊培地 (カタログ番号 03231、03334、03234、03236、03134 [表 1 ならびに付録 7.1 および 7.2 を参照のこと]) も提供するほか、カスタム培地も提供している。詳細については、StemCell Technologies に問い合わせられたい。

表1 MethoCult®製品および用途

Catalog #	Contains	Applications
03434 03444	rm SCF、rm IL-3、 rh IL-6、rh Epo	BM、脾臓、PBおよび胎児肝に含まれるBFU-E、CFU-GM、 CFU-GEMMの検出
03534	rm SCF、rm IL-3、rh IL-6	BM、脾臓、PBおよび胎児肝に含まれるCFU-GMの検出
03630	rh IL-7	BM中のCFU-pre-Bの検出
03334	rh Epo	CFU-E、成熟BFU-Eの検出
03234	サイトカイン類非添加	以下の用途において必要なサイトカインを添加可能
03231	サイトカイン類非添加	<ul style="list-style-type: none"> <li>－ 薬剤毒性試験</li> <li>－ 特異的造血前駆細胞（rm SCFを有するCFU-Mastなど）の検出</li> <li>－ 新規因子の作用の検討</li> <li>－ 他種における造血コロニーアッセイ</li> <li>－ 形質導入された造血前駆細胞のセレクション</li> <li>－ 非接着細胞系のクローニングおよびセレクション</li> </ul>
03236	血清非添加、サイトカイン類非添加	血清非添加メチルセルロース合成培地に必要なサイトカインを添加可能
03134	メチルセルロース培地	特殊な用途に利用するメチルセルロース培地の調製
MegaCult®-C	コラーゲン培地、サイトカイン類非添加	BMおよびその他の造血組織に含まれるCFU-Mkの検出 ウェブサイトを参照または問い合わせられたい

BM：骨髄      PB：末梢血

表2 マウス造血細胞培養用組換えサイトカイン

Catalog #	Description
02715、02915	rm G-CSF（顆粒球前駆細胞増殖用）
02732、02932	rm GM-CSF（顆粒球・単球前駆細胞増殖用）
02733、02903	rm IL-3（全系統の初期骨髄前駆細胞の増殖を促進する目的でその他のサイトカインと組み合わせて使用）
02751、02951	rm M-CSF（単球前駆細胞増殖用）
02731、02931	rm SCF（マスト細胞増殖用、骨髄前駆細胞・リンパ球前駆細胞の増殖を促進する目的でその他のサイトカインと組み合わせて使用）
02720、02920 02620、02820	rm TPOまたはrh TPO（巨核球前駆細胞の増殖を促進する目的でその他のサイトカインと組み合わせて使用）
02625	rh EPO（赤血球前駆細胞を増殖させる目的でその他のサイトカインと組み合わせて使用）
02100	PWM-SCCM: Pokeweed Mitogen Spleen Cell Conditioned Medium（ヨウシュヤマゴボウ分裂促進因子脾臓細胞条件培地、コロニー刺激因子源として使用）
その他のサイトカイン類	入手可能なサイトカインの一覧については、StemCell Technologiesのカタログ、ウェブサイトを参照または問い合わせられたい。

表3 マウス細胞用サポート製品

Catalog #	Description
06200、06250	ウシ胎児血清 (懸濁液またはメチルセルロース培地中のマウス造血細胞増殖用としてスクリーニングおよびセレクション済み)
07050	トリパンブルー (生細胞数測定用)
07060	メチレンブルー添加3%酢酸 (有核細胞数測定用)
07700	2%FBS添加Iscove's MDM (細胞洗浄用)
07800、07850	塩化アンモニウム (赤血球溶解用)
09300	解毒済み10%BSA溶液 (Iscove's MDM中に溶解)
09500	BIT 9500 (BSA、トランスフェリンおよびインシュリンを含む5倍希釈用培地溶液) (懸濁培養液またはメチルセルロース培地中でのマウス造血細胞増殖用としてスクリーニングおよびセレクション済み)
09600、09650	StemSpan® SFEM (懸濁培養液中での造血細胞増殖用)
27100、27150	試験済み35 mmシャーレ
27305	40 µmセルストレーナ (単個細胞浮遊液調製用)
27500	グリッド付きスコアリングディッシュ
28110、28120	ブランド針 (メチルセルロース培地分注用)

### 3.0 MethoCult®培地の保管および取り扱い

MethoCult®培地は-20°Cで保管する。2~8°Cで1か月間保管できる。凍結解凍の繰り返しは避けること。

#### 3.1 完全 MethoCult®培地の解凍および分注

完全 MethoCult®培地 (カタログ番号 03434、03534、03630) は、ボトル1本あたり100 mLで提供されている。本製品は細胞を1:10 (v/v) の比率で添加できるように調製されている。

- MethoCult®培地を冷蔵状態で一晩かけて解凍するか室温で解凍する。
- ボトルを30~60秒間勢いよく振盪し、内容物を混合する。
- ボトルを立てた状態で5分間放置し、気泡を上昇させる。
- 16ゲージのブランド針**を装着した6または12 mLの滅菌済みルアーロックシリンジを用いてMethoCult®培地をチューブに分注する。  
安全上の理由からブランド針を利用してメチルセルロース培地を正確に分注すること。16ゲージのブランド針を利用することで、穿刺による損傷を予防できる。メチルセルロースは粘性の高い溶液であり、ピペットを用いるとピペット内部に培地が付着するために正確に分注することができない。
- シリンジから空気を除去するには、MethoCult®培地の液面より下に注射針を入れて約1 mLを吸引し、プランジャーをゆっくりと押し下げて培地を完全に放出する。シリンジ内に空気がみられなくなるまでこの操作を繰り返すこと。
- シリンジ内にメチルセルロース培地を吸引し、適量を14 mL滅菌済み培養チューブに分注する。完全 MethoCult®培地 (カタログ番号 03434、03534、03630) は細胞を1:10 (v/v) の比率で添加できるように調製されている。
  - チューブ1本に3 mLを分注すると、培地1.1 mLを2回分調製できる。
  - チューブ1本に4 mLを分注すると、培地1.1 mLを3回分調製できる。
 ボトルの凍結解凍の繰り返しを避けるため、ボトル内の液体全量を適量ずつ複数のチューブに分注することが望ましい。
- チューブのふたをしっかりと締めて、-20°Cで保存するか、1か月以内に使用する場合は2~8°Cで保存する。

### 3.2 不完全 MethoCult®培地の解凍および分注

「不完全」MethoCult®培地（カタログ番号 03134、03231、03234、03236、03334 [付録 7.1、表 8 を参照のこと]）では、必要な成分を添加して、特殊な細胞培養要件に合った培地を調製できる。MethoCult®培地のボトルに成分を添加し、全量を 100 mL とした後にチューブに分注する。または、適量をチューブに分注して凍結し、使用時に必要な成分を添加してもよい。最適なメチルセルロース培地の粘度を維持するためには、指示通りに MethoCult®培地を希釈することが重要である。

1. MethoCult®培地を冷蔵状態で一晩かけて解凍するか室温で解凍する。
2. 必要に応じて成分を添加する（表 4 を参照のこと）。ボトルを 30～60 秒間勢いよく振盪し、内容物を混合する。
3. ボトルを立てた状態で 5 分間放置し、気泡を上昇させる。
4. 16 ゲージのプラント針を装着した 3、6 または 12 mL の滅菌済みルーアロックシリンジを用いて MethoCult®培地をチューブに分注する（詳細についてはセクション 3.1 を参照のこと）。
5. チューブのふたをしっかりと締めて、-20°C で保存するか、1 か月以内に使用する場合は 2～8°C で保存する。

表 4 MethoCult®培地の調製

	MethoCult® Catalog #			
	03434、03534、03630	03334	03234、03231、03236	03134
ボトルあたりのMethoCult®液量	100 mL	90 mL	80 mL	40 mL
全量を 100 mL とするために必要な液量	0 mL	10 mL	20 mL	60 mL
* 培地 1.1 mL を 2 回分得るためにチューブ 1 本あたりに分注する液量 (追加する液体の容量)	3.0 mL (0 mL)	2.7 mL (0.3 mL)**	2.4 mL (0.6 mL)**	1.2 mL (1.8 mL)***
* 培地 1.1 mL を 3 回分得るためにチューブ 1 本あたりに分注する液量 (追加する液体の容量)	4.0 mL (0 mL)	3.6 mL (0.4 mL)**	3.2 mL (0.8 mL)**	1.6 mL (2.4 mL)***

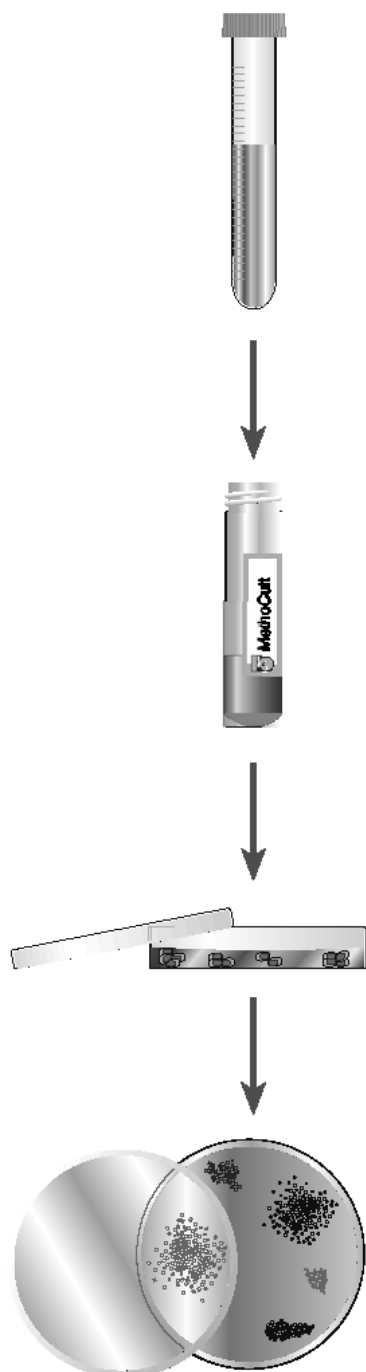
\* 細胞 0.3 mL を 3.0 mL の MethoCult®培地に添加すると 2 回分の培地が、0.4 mL を 4.0 mL の MethoCult®培地に添加すると 3 回分の培地が得られる。

\*\* (サイトカイン類、IMDM を指す)

\*\*\* (FBS、BSA、サイトカイン類、IMDM を指す)

## 4.0 MethoCult<sup>®</sup>培地を用いたマウス造血 CFC アッセイ

### 4.1 処理手順



#### ステップ(1)

##### 細胞の調製

以下により、マウス細胞を調製する。

- ・塩化アンモニウムによる溶解
- ・密度勾配による分離
- ・EasySep<sup>®</sup>、StemSep<sup>®</sup>、SpinSep<sup>®</sup>または FACS による前駆細胞の濃縮

細胞を洗浄 (2%FBS 添加 Iscove's MDM を使用) 後に計数し、細胞濃度を調整する。

#### ステップ(2)

##### MethoCult<sup>®</sup>に細胞を添加する

MethoCult<sup>®</sup>に細胞を添加してボルテックスする。チューブを立てて気泡を除去する。

#### ステップ(3)

##### プレーティングおよびインキュベート

ブランド針を装着したシリンジを用いて、マウス細胞を試験済みシャーレに分注する。加湿インキュベータ内、37°C、5%CO<sub>2</sub> 下で7~14日間インキュベートする。

#### ステップ(4)

##### コロニー計数

倒立顕微鏡およびグリッド付きスコアリングディッシュを用いて、コロニーの種類を計数および評価する。または各コロニーを選び出し、普段行っている染色、PCR または細胞遺伝学的解析に使用してもよい。

## 4.2 必要な装置および試薬

- レベル II の生体物質取り扱い用に承認されたバイオハザード安全キャビネット
- 37°C、5%CO<sub>2</sub>、湿度 95%以上に設定したインキュベータ  
チャンバー内にウォーターパンが設置されているウォータージャケット式インキュベータの使用を推奨
- 倒立顕微鏡  
10 倍または 12.5 倍の接眼レンズならびに 2 倍、4 倍および 10 倍の対物レンズが付属した高品質な倒立顕微鏡の使用を推奨
- 実験室用遠心機
- ボルテックス
- 滅菌済みピペットチップを装着したマイクロピペッタ
- 自動細胞計数器または Neubauer 血球計数板
- 滅菌済みピペット
- 滅菌済み試験管
- 滅菌済みの鋭利な形成剪刀およびピンセット（マウス解剖用）

## 4.3 マウス細胞の分離手順

通常は 6~12 週齢のハツカネズミを使用する。若齢または高齢のマウス、トランスジェニックマウスおよび化合物処理を行なったマウスを用いる場合には、系統および年齢をマッチさせたコントロールを用いることが重要である。研究施設で承認されているプロトコールおよび手順にしたがってマウスを飼育および屠殺する。骨髄および脾臓から分離される有核細胞数はマウスの年齢によって異なる可能性がある。マウスを個別に評価する場合を除き、2 匹以上のマウスから採取した細胞をプールすること。

### 4.3.1 骨髄細胞

研究施設が推奨する手順にしたがってマウスを屠殺する。

1. マウスを仰向けに置き、毛皮全体を 70%イソプロピルアルコールで湿らせる。この手順により、細胞標本が毛皮で汚染される可能性が低下する。
2. 胸郭直下の毛皮に切り込みを入れる。このとき腹膜を切らないようにする。この手順には、滅菌していない剪刀を使用してもよい。
3. 皮膚をしっかりとつかんで背を剥離し、後肢を露出させる。
4. 滅菌済みの鋭利な切開剪刀を用いて膝関節の中心を切開する。靭帯および余分な組織を切開する。  
鋭利な剪刀を用いることで、硬骨の分裂を予防できる。
5. ピンセットで大腿骨をつかみ、股関節付近で大腿骨を切断する。
6. 足関節付近を切断して、脛骨を遊離させる。
7. 長骨端部を切断して、内側の骨幹を露出させる。骨を滅菌済みシャーレまたは滅菌済み培地に入れ、氷上に置く。骨は複数のマウスから採取してもよい。
8. 21 ゲージ (g) の注射針を装着した 3 cc のシリンジを用いて、2%FBS を含む冷却した培地を 1~3 mL 吸引する。脛骨から細胞を除去するためには、これよりも小さい注射針 (22g または 23g) を使用する必要がある。  
マウスを屠殺後は、できる限り早く細胞を分離すること。
9. 注射針の斜面を骨幹の骨髄に挿入し、骨髄を 14 mL の滅菌済み培養試験管に流し込む。骨髄を取り除いた後の硬骨は白色となっているはずである。すべての硬骨について、同様の手順を繰り返す。同じ培地を用いて 1~3 匹のマウスから骨を分離することができる。  
培地としては、Iscove's MDM、Alpha MEM や PBS などが適している。細胞は少量の培地で分離すること。



10. 21 g の注射針を装着した 3 cc シリンジで培地と細胞をゆっくりと吸引・吐出し、単個細胞浮遊液を調製する。注射針を培地の液面より下に入れた状態で、この操作を 3~4 回繰り返す。
11. 細胞を含む培地は、使用時まで氷上で保管すること。

### 4.3.2 脾臓細胞

研究施設が推奨する手順にしたがってマウスを屠殺する。

1. マウスを右下にして置き、毛皮全体を 70%イソプロピルアルコールで湿らせる。
2. 胸郭直下の毛皮に切り込み（～1 cm 程度）を入れる。腹膜を切らないよう注意すること。
3. 背の皮膚を剥離して腹膜を露出させると、脾臓（暗赤色の臓器）が見えるはずである。
4. 滅菌済みの切開剪刀を用いて腹膜を切開する。
5. 脾臓の破碎および開裂を避けるため、先端が平らなピンセットで脾臓に付着している脂肪組織をつかみ、ゆっくりと上へ引き上げる。脾臓血管を切断し、脾臓を引き離す。氷上に置いた滅菌シャーレまたは冷却した滅菌培地に脾臓を入れる。  
培地としては、*Iscove's MDM*、*Alpha MEM* や *PBS* などが適している。
6. 脾臓 1～3 個を 35 mm シャーレに入れたナイロンメッシュ（細胞用ストレーナ；カタログ番号 27305）上に置き、単個細胞浮遊液を調製する。
7. 滅菌済みの形成剪刀で脾臓を細かく切り刻む。
8. 2%FBS を添加した培地 2～3 mL を含む 50 mL ファルコンチューブにナイロンメッシュを入れるか、35 mm シャーレに培地 2～3 mL を加える。3 mL シリンジから滅菌済みプランジャーを取り出して端部を培地中に入れ、組織にゆっくりと圧をかけてろ過する。
9. 少量の培地を加えて、ストレーナ内の細胞をリンスする。
10. 必要に応じて 21 g の注射針を装着した 3 cc シリンジで細胞懸濁液の吸引・吐出を 3～4 回繰り返すことで、細胞塊を破碎できる。
11. 細胞を 14 mL の滅菌済み培養試験管に入れて 3～5 分間静置して組織断片を沈殿させ、細胞懸濁液を新しい滅菌済み培養試験管に移す。
12. 必要に応じて細胞懸濁液を 2 回洗浄し、少量の培地で再懸濁する。

### 4.3.3 末梢血

研究施設が推奨する手順にしたがってマウスを屠殺する。末梢血単離方法は各研究施設が承認したプロトコールにより異なる。CO<sub>2</sub> 処理により屠殺したマウスからの末梢血単離方法を以下に示す。

1. 21 g の注射針を滅菌済み 1 cc シリンジに装着し、少量の血液凝固阻止剤溶液（すなわち、100 IU/mL ヘパリン溶液）を吸引してシリンジ内部を湿らせた後で溶液を吐出する。注射針付きシリンジ内に血液凝固阻止剤溶液 20～50 μL が残るようにする。
2. マウスを CO<sub>2</sub> で窒息させて屠殺し、できる限り速やかに胸部腔を切開する。
3. 注射針を心室に挿入し、血液をシリンジ内にゆっくり吸引する。通常はこの手法で 0.5～1 mL を採血できる。
4. 十分な量（終濃度 15～20 IU/mL）のヘパリンを入れた 14 mL の滅菌済み培養試験管に末梢血を入れ、10 倍容の塩化アンモニウム溶液（カタログ番号 07800、07850）を添加した後でしっかりとふたを締め、3～4 回反転させて混合する。
5. 途中で数回混合しながら、氷上で 5～15 分間インキュベートする。
6. 1200 rpm (400×g) で 7 分間遠心し、塩化アンモニウム溶液を慎重にデカントまたは吸引する。
7. 滅菌済みピペットを用いて細胞を少量の培地で再懸濁する。  
培地としては、*Iscove's MDM*、*Alpha MEM* や *PBS* などが適している。
8. 2%FBS 添加 *Iscove's MDM* で細胞を 2 回洗浄し、少量の培地で再懸濁する。

### 4.3.4 胎児肝、交配後10～16日齢

研究施設が推奨する手順にしたがって妊娠雌マウスを屠殺する。

1. 毛皮を 70%イソプロピルアルコールで湿らせ、腹膜を切らないように注意して毛皮に 1 cm 程度の切り込みを入れる。背の皮膚を剥離する。

2. マウスから胎盤と胎児を取り出し、氷上に置いた滅菌シャーレに入れる。すぐに細胞を採取しない場合は、胎盤と胎児を培地入りの滅菌済み 50 mL チューブに入れておく。  
培地としては、*Iscove's MDM*、*Alpha MEM* や *PBS* などが適している。
3. 冷却した 2%FBS 添加 *Iscove's MDM* を 5 mL 入れた 100 mm シャーレに胎盤と胎児を入れる。滅菌済みの形成剪刀およびピンセットで胎児を分離し、培地入りの新しいシャーレに入れる。
4. 胎児を新しい 60 mm シャーレ（培地なし）に入れて胎児肝を分離し、培地約 1 mL 入りの新しい 60 mm シャーレに移す。
5. 剪刀で胎児肝を細かく切り刻み、培地 1~2 mL を添加する。21 g の注射針を装着した 3 cc シリンジで細胞懸濁液の吸引・吐出を 3~4 回繰り返すことで、細胞塊を破碎できる。
6. 細胞を 14 mL の滅菌済み培養試験管に入れ、3~5 分間静置して組織断片を沈殿させ、細胞懸濁液を新しい滅菌済み培養試験管に移す。培地を加えて 1200 rpm (400×g) で 7~10 分間遠心する。細胞を少量の培地で再懸濁し、滅菌済みピペットで混合する。  
正常な 14.5 日齢の胎児肝では、細胞の 80%以上が有核の赤血球前駆細胞（塩化アンモニウムによる溶解で除去されない）である。
7. 2%FBS 添加 *Iscove's MDM* で細胞を 2 回洗浄し、少量の培地で再懸濁する。

#### 4.4 細胞計数

1. 手作業で有核細胞数を測定するには、メチレンブルー添加 3%酢酸（カタログ番号 07060）に細胞を希釈する。推奨される希釈率は、骨髄細胞と脾臓細胞が 1/50~1/100、末梢血が 1/20 である。例：1/50 希釈の場合には、滅菌チップを装着したマイクロピペッタを用いて細胞 20  $\mu\text{L}$  を 980  $\mu\text{L}$  のメチレンブルー添加 3%酢酸に加える。
2. 血球計数器を準備する。チャンバーをアルコールで洗浄後、拭いて乾燥させる。
3. カバーガラスを両チャンバー上に慎重に置く。
4. 希釈した細胞をよく混合し、マイクロピペッタまたはキャピラリチューブを用いて血球計数器の両チャンバーを細胞懸濁液で満たす。  
チャンバーに入れる細胞懸濁液の量が多すぎたり、少なすぎたりしないようにすること。
5. 4 個の大きな正方形（1×1×0.1 mm）中または 100 個以上のセル中の総核数を計数する。
6. 以下のようにして細胞数（1 mL あたり）を求める。

正方形中の平均細胞数×希釈率× $10^4$ =1 mL あたりの細胞数

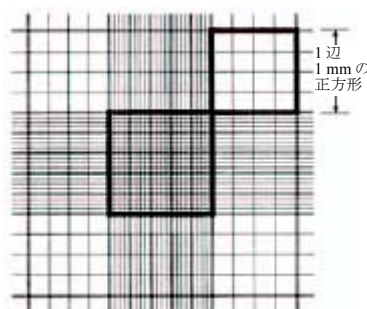


図 1 Neubauer 血球計数器、正方形の大きさを示す（深さ 0.1 mm）

表 5 予測される有核細胞数

Tissue Type	Total Cell
大腿骨	$1\sim 2\times 10^7$
脛骨	$0.6\sim 1\times 10^7$
脾臓	$1\sim 2\times 10^8$
末梢血 (1 mLあたりの有核細胞数)	$3\sim 5\times 10^6$
交配後14.5日齢の胎児肝	$1\times 10^7$

#### 4.5 MethoCult®培地を用いた CFC アッセイの一般的なセットアップ方法

- 35 mm シャーレのふたの縁に細い油性ペンでサンプル情報などを記入する。
- MethoCult®培地のチューブを冷蔵状態で一晩かけて解凍するか室温で解凍する。  
必要に応じて成分を追加する (詳細については、8 ページ、セクション3.2 を参照のこと)。
- チューブをボルテックスし、成分が完全に混ざったことを確認する。
- 必要な終濃度の 10 倍となるように細胞を調製する。  
例：シャーレ1枚あたりの細胞数を  $1\times 10^5$  個とする場合には、 $1\times 10^6$  個/mL の細胞懸濁液を調製する。
- 細胞懸濁液 0.3 mL を MethoCult®培地 3 mL (2 回分の培地を調製する場合) または細胞懸濁液 0.4 mL を MethoCult®培地 4 mL (3 回分の培地を調製する場合) に添加する。
- チューブをボルテックスし、成分が完全に混ざったことを確認する。
- チューブを 5 分間放置し、気泡を上昇させる。
- 3 cc シリンジに 16 ゲージのブラント針を装着して、MethoCult®培地をシャーレに分注する。
- シリンジから空気を除去するには、培地の液面より下に注射針を入れて約 1 mL を吸引し、プランジャーをゆっくりと押し下げて培地を完全に放出する。シリンジ内に空気がみられなくなるまでこの操作を繰り返すこと。
- メチルセルロース培地をシリンジに吸引し、35 mm シャーレ 1 枚につき 1.1 mL を分注する。  
CFC アッセイ用シャーレ (カタログ番号 27100、27150) は、細胞接着が最小限であることをあらかじめ確認している。培養中に細胞が接着すると、コロニー増殖を阻害したりコロニー可視化の妨げとなったりする可能性がある。
- 各シャーレを傾けて回転させ、メチルセルロース培地を均一にのばす。
- 35 mm シャーレ 2 枚を 100 mm シャーレに入れ、もう 1 枚の 35 mm シャーレ (ふたなし、滅菌水 3 mL を注入) を入れる。100 mm シャーレにふたをする。  
100 mm シャーレと水を入れたシャーレを使用することで湿度を維持し、培養時および取り扱い時の汚染を最小限に抑えることができる。
- 37°C、5%CO<sub>2</sub>、湿度 95%以上に設定したインキュベータ内にシャーレを入れる。  
造血細胞コロニーが最適な状態で増殖するには培養条件が重要である。水ジャケット式インキュベータ内に、水を入れた容器 (パン) を置いて使用することを推奨する。微生物の繁殖を抑制するため、パンに適切な添加剤 (硫酸銅結晶など) を添加してもよい。チャンバーに設置した温度計でインキュベータの温度を確認すること。また、Fyrite CO<sub>2</sub> 分析器で CO<sub>2</sub> 濃度を定期的にモニタリングすること。

#### 4.6 マウス CFU-E および成熟 BFU-E アッセイ

1. 2%FBS 添加 Iscove's MDM を M3334 に 1 : 9 の比率で添加する (10 mL を 90 mL のボトルに添加する。2 回分の培地を調製する場合には 0.3 mL を 2.7 mL に、3 回分の培地を調製する場合には 0.4 mL を 3.6 mL に添加する)。
2. セクション 4.3.1 に記載された方法でマウス BM 細胞を分離し、細胞数が  $2 \times 10^6$ /mL となるよう 2%FBS 添加 Iscove's MDM で希釈する。  
マウス BM 細胞懸濁液中の赤血球を溶解する必要はない。
3. セクション 4.5 に記載された方法で CFC アッセイのセットアップを行なう。35 mm シャーレ 1 枚あたりの BM 細胞数は  $2 \times 10^5$  個となる。
4. CFU-E は 37°C、5%CO<sub>2</sub>、湿度 95%以上で 2 日間、成熟 BFU-E は 3~4 日間インキュベートする。
5. セクション 5.0 に記載された方法でコロニーの確認・計数を行なう。

表 6 予測されるマウス BM 中の CFU-E 数および成熟 BFU-E 数

8~12 週齢の C57BL/6 マウスにおける代表的な数値を示す。

Progenitor	Cells per 35 mm Dish (1.1 mL Cultures)	Colonies per Cultures
CFU-E	$2 \times 10^5$	340 ± 80
成熟BFU-E	$2 \times 10^5$	50 ± 12

#### 4.7 マウス BFU-E、CFU-GM および CFU-GEMM アッセイおよび CFU-GM アッセイ

1. MethoCult<sup>®</sup> 培地 M3434 または M3534 (CFU-GM 専用、カタログ番号 03434、03534) のチューブを冷蔵状態 (2~8°C) で一晩かけて解凍するか室温で解凍する。
2. セクション 4.3 に記載された方法でマウス BM 細胞、血球、脾臓細胞または胎児肝細胞を分離する。
3. 細胞を 2%FBS 添加 Iscove's MDM で希釈し、終濃度の 10 倍に調製する (表 7 を参照のこと)。マウス BM 細胞懸濁液中の赤血球を溶解する必要はない。脾臓および血液中の成熟赤血球については、溶解が推奨される。コロニー数が予測できない場合には、2~3 種類の細胞密度で培養を重複して行なう。
4. セクション 4.5 に記載された方法で CFC アッセイのセットアップを行なう。
5. 37°C、5%CO<sub>2</sub>、湿度 95%以上で 12 日間インキュベートする。12 日目に CFC が計数できない場合には 33°C、5%CO<sub>2</sub>、湿度 95%以上に設定したインキュベータに培養液を移した後、できる限り速やかに計数を行なう。必要に応じて、培養 7~10 日目に BFU-E の計数を実施してもよい。
6. セクション 5.0 に記載された方法でコロニーの確認・計数を行なう。

表 7 予測される BFU-E 数、CFU-GM 数および CFU-GEMM 数

Progenitor	Colonies per Cultures
	Representative values for C57 BL/6 mice at 8-12 weeks of ages and day 14.5 post coitus (PC) fetal liver.
骨髄、35 mmシャーレ1枚あたり $2 \times 10^4$ 個	
BFU-E	8 ± 3
CFU-GM	64 ± 16
CFU-GEMM	3 ± 1
脾臓、35 mmシャーレ1枚あたり $1 \times 10^5$ 個	正常な成体マウス脾臓および血液中では、CFC数が少ないものと予測される*
血液、35 mmシャーレ1枚あたり $1 \times 10^5$ 個	
交配後14.5日齢の胎児肝、35 mmシャーレ1枚あたり $2 \times 10^4$ 個	
BFU-E	9 ± 3
CFU-GM	55 ± 10
CFU-GEMM	3 ± 2

\* コントロールのマウスにおけるCFC数の予備的な測定を実施すべきである。これらの組織（脾臓、血液）の分析は、多くの場合、比較解析（ホモ接合体 (-/-) およびヘテロ接合体 (+/-) トランスジェニックマウスならびにコントロール (+/+) 同腹仔における薬剤またはサイトカインの投与前および投与後のCFC数など）のために実施される。

#### 4.8 マウス CFU Pre-B アッセイ

1. MethoCult®培地 M3630（カタログ番号 03630）のチューブを冷蔵状態（2~8°C）で一晩かけて解凍するか室温で解凍する。
2. セクション 4.3.1 に記載された方法でマウス BM 細胞を分離し、濃度を  $5 \times 10^5$  または  $1 \times 10^6$  個/mL とする。プレーティング濃度は 35 mm シャーレ 1 枚あたり  $5 \times 10^4$  または  $1 \times 10^5$  個である。  
CFU pre-B 数はマウスの系統や年齢により異なる。コロニー数が予測できない場合には、2~3 種類の細胞密度で培養を重複して行なう。
3. セクション 4.5 に記載された方法で CFC アッセイのセットアップを行なう。
4. 37°C、5%CO<sub>2</sub>、湿度 95%以上で 7 日間インキュベートする。
5. セクション 5.0 に記載された方法でコロニーの識別・計数を行なう。

予測される CFU-pre B 数：BM 細胞  $5 \times 10^4$  個あたり  $46 \pm 6$ 。

MethoCult® 03630 に 5~20 ng/mL の組換えマウス SCF を添加すると、検出される CFU-pre-B 数が増加することがある。rm SCF を培地に添加しても骨髄の増殖が促進されるが、CFU-pre-B の増殖は阻害されることがある。また、添加した細胞数が多い場合にも、内因性サイトカインが産生されるため、骨髄 CFC 数が増加する。2~3 種類の細胞密度（すなわち、シャーレ 1 枚あたり 0.5、1 または  $2 \times 10^5$  個）で 10 ng/mL IL-7 を添加し、rm SCF の存在下または非存在下で予備実験を行なって最適な条件を確立することが推奨される。

## 5.0 マウス造血 CFC の説明と写真

マウス造血前駆細胞は、成体の骨髄、脾臓および末梢血の細胞懸濁液ならびに発生中の組織（胎児肝など）中で定量可能である。MethoCult<sup>®</sup>培地を利用すると、以下の種類のマウス造血前駆細胞が検出できる。

**CFU-E**：赤血球コロニー形成単位。これらは成熟赤血球前駆細胞であり、エリスロポエチン (EPO) 存在下で成熟赤芽球のクラスタを 1~2 個形成する。CFU-E は 2~3 日間の培養後に計数する。**説明**：これらのコロニーは非常に小さく、拡大率 40~50 倍で観察される。1 つのクラスタには、少なくとも 8 (約 8~32) 個の赤芽球細胞が含まれる。クラスタ内に含まれる赤芽球細胞の形状はふぞろいで、融合しているように見える。CFU-E の写真はないが、写真 1 の BFU-E コロニー (約 250 個のクラスタが含まれる) の単一クラスタのような外観をしている。

**成熟 BFU-E**：成熟赤芽球バースト形成単位。成熟 BFU-E は、EPO 単独の存在下で、3 個以上の赤芽球クラスタからなるコロニーまたは単一の大きなコロニーを形成する。成熟 BFU-E は 3~4 日間の培養後に計数する。**説明**：写真 1 に示すように、BFU-E コロニー (約 250 個のクラスタが含まれる) のクラスタが 3 つ集まったような外観をしている。

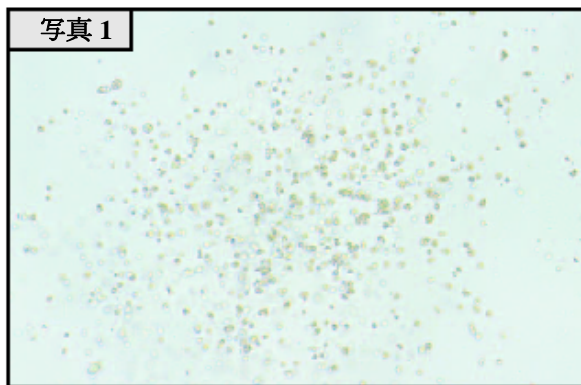
**BFU-E**：赤芽球バースト形成細胞。BFU-E の最適な増殖には、EPO と、バースト形成促進活性を有するインターロイキン 3 (IL-3) や幹細胞因子 (SCF) などのサイトカインを要する。BFU-E は 7~14 日間の培養後に計数する。**説明**：30 個以上の細胞からなる赤血球クラスタにより構成される。各クラスタには、小さくふぞろいで区別しにくい細胞の集団が含まれる。細胞は融合しているように見える。通常は BFU-E に高密度のコアは存在せず、クラスタは比較的分散している。各コロニーに含まれる各クラスタを観察して BFU-E を確認するとよい。写真 1 および 2 を参照のこと。

**CFU-GM**：CFU-GM には、CFU-顆粒球 (CFU-G)、CFU-マクロファージ (CFU-M) および CFU-顆粒球マクロファージ (CFU-GM) が含まれる。各コロニーには、30~数千個の顆粒球 (CFU-G) やマクロファージ (CFU-M) またはこの両方 (CFU-GM) が含まれる。**説明**：各コロニーは 30 以上の細胞で構成される。CFU-GM コロニーには、複数の細胞クラスタ (細胞に囲まれた高密度のコア) が含まれることが多い。単球系細胞は楕円形から円形の大きな細胞であり、中心は粒状または灰色である (写真 4、5、7 および 8 を参照のこと)。顆粒球系細胞は円形で明るく、マクロファージ細胞よりもかなり小さい上に、サイズは均一である (写真 2、3 および 6 を参照のこと)。写真 3 および 6 に示すように、CFU-GM コロニーの各細胞 (特にコロニー周辺部の細胞) は容易に確認できる。

**CFU-GEMM**：CFU-顆粒球、赤血球、マクロファージ、巨核球。CFU-GEMM は多分化能前駆細胞であり、形成コロニー内に含まれる系統制限娘細胞の増殖・分化には EPO および 2 種類以上のサイトカインを必要とする。CFU-GEMM には原始的な性質があるため、500 個以上の細胞からなる大きなコロニー (赤芽球やその他の 2 系統以上の認識可能な細胞を含む) を形成する傾向がある。**説明**：一般に、CFU-GEMM コロニーは大きく (コロニーあたりの細胞数は 500 個以上)、非常に高密度のコアを有するが、コアと周辺部の細胞との境界は不明瞭である。赤芽球クラスタが CFU-GEMM コロニーの周辺部に沿って確認できる。単球および顆粒球 (CFU-GM を参照のこと) は容易に確認でき、通常は大きな巨核球のクラスタがみられる。写真 9 および 10 を参照のこと。

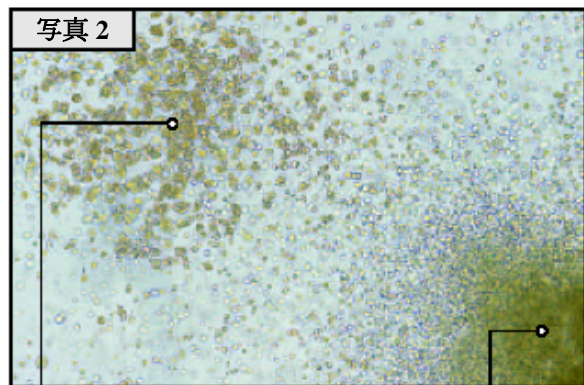
**CFU pre-B**：B リンパ球前駆細胞のサブセットはインターロイキン 7 (IL-7) 存在下で検出できる。**説明**：30 個以上の細胞からなる。CFU pre-B コロニーのサイズおよび形態にはばらつきがあるが、各細胞は小さく、形状はふぞろいから楕円形に見える。CFU pre-B コロニーの中には非常に高密度で周辺部の細胞数が非常に少ないものもあるが、コアが小さく周辺部の細胞数が多いものもある。写真 11 および 12 を参照のこと。

**CFU-Mk** : CFU-巨核球。巨核球前駆細胞はメチルセルロース培地中で培養可能であるが、コロニーの形態に基づく CFU-Mk の識別は困難となる可能性があることから、CFU-Mk については脱水ゲル中でのエステラーゼ染色による巨核球染色後に MegaCult®-C コラーゲン培地中での計数が推奨される。MegaCult®-C のテクニカルマニュアルは、弊社ウェブサイト [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com) で入手できる。CFU-Mk の写真はない。



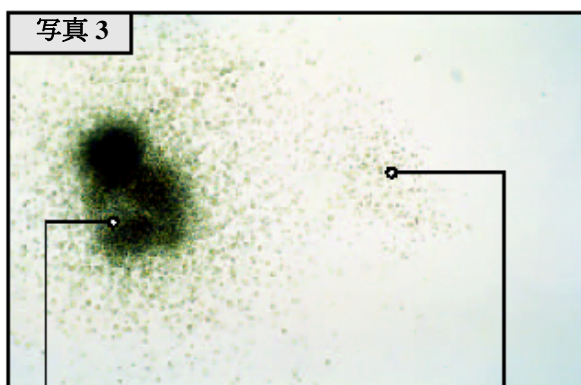
BFU-E

125 倍



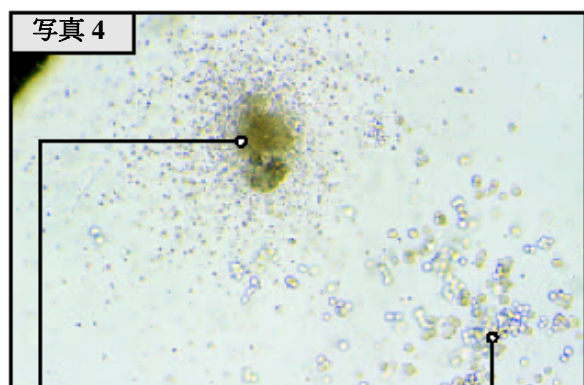
BFU-E

GFU-GM 125 倍



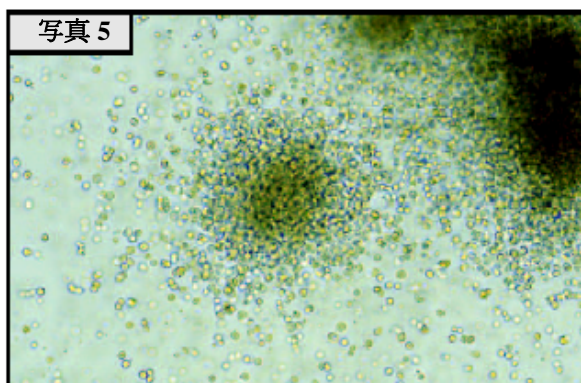
BFU-GM

BFU-E 50 倍



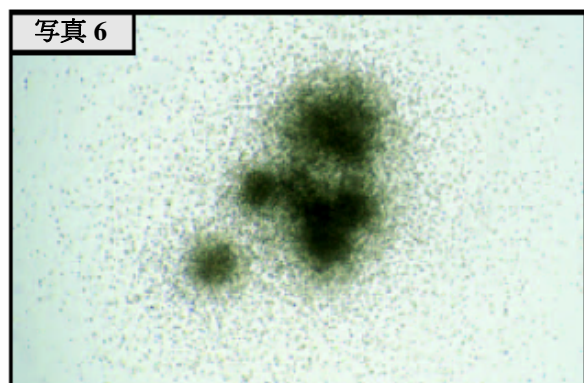
BFU-G

GFU-M 125 倍



BFU-M

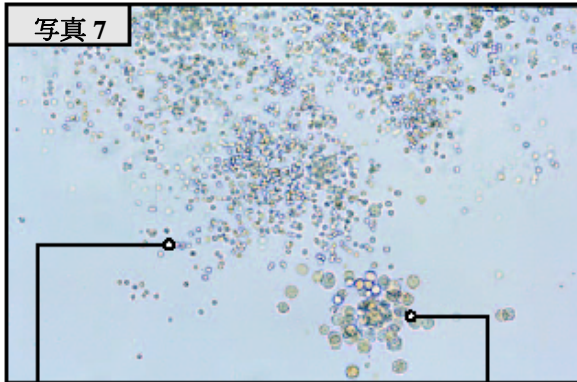
125 倍



BFU-GM

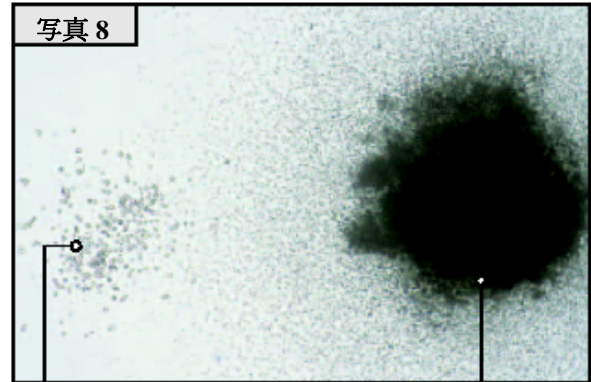
50 倍





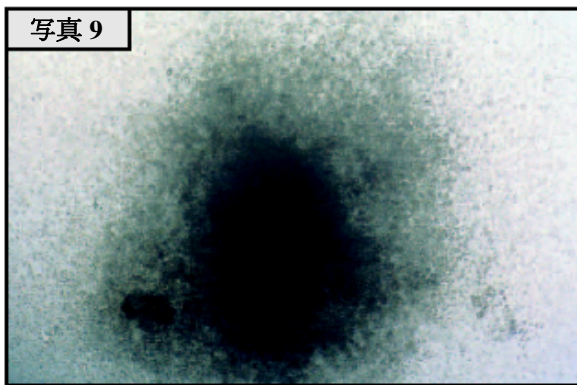
BFU-G

CFU-M 125倍



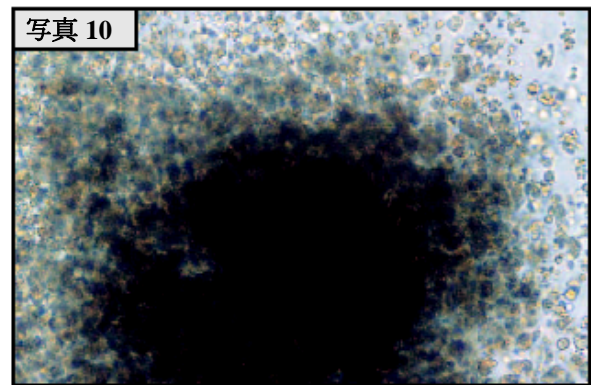
BFU-M

GEMM 50倍



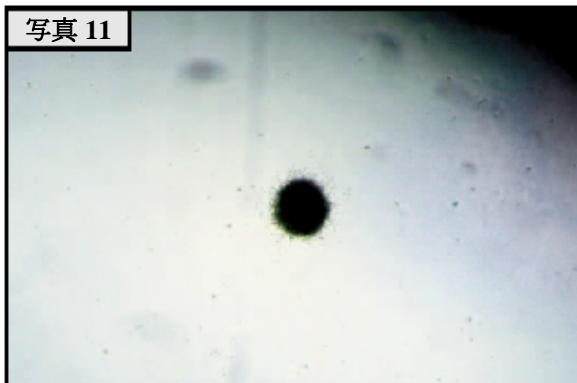
BFU-GEMM

50倍



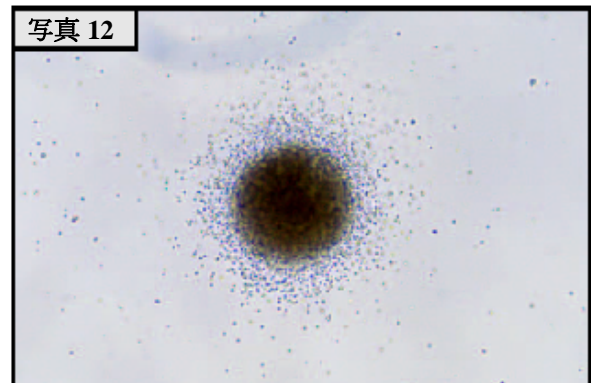
BFU-GEMM

125倍



BFU Pre-B

50倍



BFU Pre-B

125倍

## 6.0 よくある質問と役に立つヒント集

### 6.1 MethoCult®培地および試薬

*MethoCult®メチルセルロース培地を 37°C ではなく室温または冷蔵庫内で解凍するのはなぜか？*

- 凍結状態の MethoCult®培地中ではメチルセルロースが不均質であり、37°C で急速に解凍すると小さな「だま」が生じる可能性がある。不注意により MethoCult®培地を 37°C で解凍した場合には、ボトルを氷上で 1~2 時間または冷蔵庫内で 2~3 時間静置すること（「だま」は 37°C では融解しない！）。ボトルを 30~60 秒間勢いよく振とうしてから分注する。

### 6.2 細胞サンプルの調製

*細胞懸濁液から赤血球 (RBC) を除去する必要はあるか？*

- 通常は、正常骨髄細胞懸濁液中の RBC を溶解または除去する必要はない。CFC 培養液中に存在する RBC が少ないことで、コロニーが見えにくくなったりコロニーの増殖が阻害されたりすることはない。
- 末梢血 (PB) サンプル中の RBC については、PB サンプル中に大量の RBC が含まれるとコロニーが不明瞭となる可能性があり、コロニーが見えにくくなったりコロニーの増殖が阻害されたりすることがあることから、塩化アンモニウム処理によって溶解する必要がある。
- 交配後 10~16 日齢の胎児肝には高い割合で有核赤芽球が含まれる (80%以上)。未分離の胎児肝細胞懸濁液については、BFU-E、CFU-GM、CFU-GEMM の分析が可能である。必要に応じて、密度勾配遠心分離または TER119 陽性細胞の除去を実施して赤芽球を除去してもよい。

*マウス細胞サンプルについて、生細胞数または総有核細胞数の計数を行なうべきか？*

- 新たに分離した細胞懸濁液中では細胞の生育性が高いことから、生細胞数の計数は一般に 3%酢酸 (カタログ番号 07060) を用いて実施する。

### 6.3 セットアップおよび培養

*CFC アッセイに試験済みのシャーレを用いるのはなぜか？*

- 培養用処理済みのシャーレまたは一部のブランドのシャーレを使用すると、骨髄間質細胞、繊維芽細胞および単球の粘着が促進されることがある。これによって、前駆細胞の増殖が阻害されたり、存在する CFC の計数および種類の識別が困難となったりする可能性があることから、StemCell が提供する試験済みのシャーレ (カタログ番号 27100、27150) の使用が推奨される。

*CFC アッセイに使用する細胞数はどのようにして推定すればよいか？*

- CFC アッセイに推奨される細胞数を表 7 に示す。最適なプレATING細胞濃度を推定できない場合 (すなわち、造血機能が乱れている可能性のあるトランスジェニックマウスまたは薬剤投与マウス) には、2~3 種類の細胞濃度 (2~4 倍の範囲とする) でセットアップを行なうとよい。培地 1.1 mL あたりのコロニー数が約 40~120 個となるような細胞濃度を選ぶこと。

### コロニー数が予測値よりも少なくなるのはなぜか？

考えられる理由：

- 細胞計数または細胞希釈を誤り、CFC アッセイでセットアップした細胞数が少なすぎた。
- 細菌、酵母または真菌類による培養液の汚染。細菌による汚染が起こると、培地が白濁したオレンジ色となることが多い。汚染は、不十分な滅菌処理や試薬の汚染によって引き起こされることが多い。汚染が起こった場合には、汚染がみられる培地、細胞の処理に用いた開封済みの培地のボトルをすべて廃棄して、推奨される手順にしたがいインキュベータを衛生的にすること。
- インキュベータの条件が不適切である。培養期間を通じて高湿度（95%以上）が維持されなければ、培地の脱水が起こる可能性がある。小型の水ジャケット式インキュベータの使用、インキュベータのチャンバー内への水を入れた容器（パン）の設置および滅菌水を入れたシャーレの使用が推奨される（セクション 4.5 を参照のこと）。インキュベータ温度および CO<sub>2</sub> 濃度をそれぞれチャンバー内に設置した温度計および Fyrite CO<sub>2</sub> 分析器により定期的にモニタリングすること。CO<sub>2</sub> 濃度がゼロになるまたは低下すると、培地は紫色になる。ガス源に含まれる未知の汚染物によるコロニーの増殖阻害が報告されていることから、インキュベータには医療グレードの CO<sub>2</sub> を使用することが重要である。
- MethoCult<sup>®</sup> 培地の使用期限が切れているまたは MethoCult<sup>®</sup> 培地の保管方法が適切でなかった。
- 細胞懸濁液中に含まれる前駆細胞の損失。保管期間が長くなると前駆細胞が減少する可能性があるため、CFC アッセイのセットアップは、細胞を分離後、できる限り速やかに行なうこと。細胞を低温保存する場合または約 6~8 時間以上保管する場合には、適切なコントロールを実験で検討すること。

### 抗生物質またはその他の薬剤を MethoCult<sup>®</sup> 培地に添加してもよいか？

- 細胞を添加する前に、抗生物質、薬剤およびその他の成分を培地に添加してもよい。いずれの成分も、適切な MethoCult<sup>®</sup> 培地の粘度を維持できる容積内で添加することが重要である。8 ページの表 4 に記載の通り、薬剤、細胞および成分は不完全メチルセルロース培地中に 1 : 10 (v/v) の比率で添加すること。そのまま使用可能な完全培地（M3434、M3534 および M3630 など）に成分を添加する場合には、細胞をより少ない容積で添加する必要がある。

例：比率を正確に 1 : 10 (v/v) にするには、M3434 の 3 mL チューブに必要な成分を 0.1 mL で添加し、ボルテックスにより混合した後で適切な細胞数を 0.2 mL で添加するとよい。

### 抗生物質を培地に添加する必要はあるか？

- 滅菌済みの試薬、認可された生物学用安全キャビネットを使用し、無菌操作技術が十分であれば、抗生物質を添加する必要はない。必要に応じて、ペニシリン（終濃度 100 units/mL）およびストレプトマイシン（終濃度 100 µg/mL）を添加してもよい。また、アムホテリシン B などの抗真菌薬が使用される可能性もあるが、抗真菌薬の存在下・非存在下での対照培地中における CFC の増殖を評価する予備実験を実施して、検討対象である造血 CFC の増殖が抗真菌薬によって阻害されないことを確認しなければならない。

### 「over-plated（オーバープレーティング）」という用語の意味は？

- 培地中のコロニー数が多すぎて、CFC 数がいくつかの理由により正確に決定できないことを意味する。このような培地中では各コロニーの正確な同定が非常に困難であり、必須栄養素または増殖因子の欠乏および代謝副産物の増加によって増殖が阻害される可能性がある。「オーバープレーティング」を避けるには、アッセイでプレーティングする細胞数を減らすか、2~3 種類の細胞濃度でプレーティングを行なって最適な細胞密度の範囲を求めるとよい。

### MethoCult<sup>®</sup> が「水っぽい」、コロニーが浮遊したりスメアとなったりするのはなぜか？

- 解凍した MethoCult<sup>®</sup>培地を分注前に完全に混合しなかった。
- MethoCult<sup>®</sup>培地に添加した成分または細胞の容積を誤った。
- 細胞と MethoCult<sup>®</sup>培地の入ったチューブをプレーティング前に完全に混合しなかった。

#### *MethoCult<sup>®</sup>培地の分注にブランド針を使用するのはなぜか？*

- メチルセルロース培地は粘性の高い溶液であり、ピペットを用いるとピペット内部に培地が付着するため、正確に分注することができない。また、ブランド針を利用すると穿刺による損傷が予防できる。

## 6.4 マウス CFC アッセイの計数

- 推奨されるインキュベーション時間が経過してから CFC 数を評価すること。その時点で計数ができない場合には、33°C、5%CO<sub>2</sub>、湿度 95%以上で培地を保管してもよい。
- 低倍率 (2.5 倍) および高倍率 (4~5 倍、10 倍) の対物レンズを装着した高品質な倒立顕微鏡を使用すること。まずは低倍率で観察して、培地中のコロニーの全体的な密度を確認する。その後、拡大率 40~50 倍 (接眼レンズ 10 倍、対物レンズ 4~5 倍) で総コロニー数および各 CFC クラスを確認できる。必要に応じて、さらに高倍率でコロニーの種類を確認すること。
- 細胞化学的染色用のサイトスピン調製や RNA の単離などの特殊な用途については、多くの場合、コロニー内の生細胞の割合が高くなるよう、より早い時点で各コロニーを培地から単離する必要がある。たとえば、BFU-E、CFU-GM および CFU-GEMM を個別に、または培地全体の細胞を単離する場合は、7~10 日間のインキュベート後から行える。

## 7.0 付録

### 7.1 表 8 MethoCult®の組成

Product Volume	Catalog Number	Components					
		MC	FBS	BSA	Insulin	Transferrin	Cytokines
M3434* 100 mL 24 × 3 mL	03434 03444	1%	15%	1%	10 µg/mL	200 µg/mL	50 ng/mL rm SCF 10 ng/mL rm IL-3 10 ng/mL rh IL-6 3 U/mL rh EPO
M3534* 100 mL	03534	1%	15%	1%	10 µg/mL	200 µg/mL	50 ng/mL rm SCF 10 ng/mL rm IL-3 10 ng/mL rh IL-6
M3630* 100 mL	03630	1%	30%	-	-	-	10 ng/mL rh IL-7
M3334* 90 mL	03334	1%‡	15%	1%	10 µg/mL	200 µg/mL	3 U/mL rh EPO
M3234* 80 mL	03234	1%‡	15%	1%	10 µg/mL	200 µg/mL	-
M3231* 80 mL	03231	1%‡	30%	1%	-	-	-
M3236* 80 mL	03236	1%‡	-	1%	10 µg/mL	200 µg/mL	-
M3134 40 mL	03134	2.5%	-	-	-	-	-

\* 推奨される通りに希釈した場合、これらの製品には $10^{-4}$  Mの2-メルカプトエタノールおよび2 mMのL-グルタミンが含まれる。

‡ Iscove's MDMで全量を100 mLとしたときの終濃度。

### 7.2 BFU-E、CFU-GM および CFU-GEMM アッセイ用の PWM-SCCM 添加メチルセルロース培地の調製

1. BM 細胞を 2%FBS 添加 Iscove's MDM で希釈して、細胞数を  $3.0 \times 10^5$ /mL とする。
2. セクション 3.2 に記載された方法で培地を調製する。この培地 1.1 mL 中に含まれる細胞数は  $3 \times 10^4$  個である。
3. 37°C、5%CO<sub>2</sub>、湿度 95%以上で 12~14 日間インキュベートする。
4. セクション 5.0 に記載された方法で BFU-E、CFU-GM および CFU-GEMM を確認する。  
PWM-SCCM 中に含まれるサイトカインの種類および濃度は決定されていない。03434 中で検出される総 CFC 数は、2~5%PWM-SCCM および 3 U/mL rhEpo 存在下で検出される値よりも約 1.5 倍高い。ほとんどの用途には MethoCult® M3434 (カタログ番号 03434) の使用が推奨される。

表9 MethoCult®を含む PWM-SCCM の調製

Product Volume	Catalog Number	Volume for 100 mL	Final Concentration
メチルセルロース培地	03134*	40 mL	1%
ウシ胎児血清	06200または06250	30 mL	30%
10%ウシ血清アルブミン	09300	10 mL	1%
L-グルタミン	07100	1 mL	2 mM
PWM-SCCM	02100	2~5 mL	2~5%
rhエリスロポエチン	02625		3 U/mL
2-メルカプトエタノール	-	10 <sup>-1</sup> Mを0.1 mL	10 <sup>-4</sup> M
Iscove's MDM	36150	全量を100 mLとする	

\* MethoCult® M3134 (カタログ番号03134) の代わりにMethoCult® M3231 (カタログ番号03231) を使用してもよい。MethoCult® M3231にはウシ胎児血清、ウシ血清アルブミンおよびL-グルタミンおよび2-メルカプトエタノールが含まれており、これらを添加する必要はない。

### 7.3 メチルセルロース培地を用いた細胞系のクローニング

メチルセルロース培地は、いろいろな組織や生物から採取した非粘着細胞系のクローニングに利用可能である。また、遺伝子操作された一次造血細胞や細胞系のクローンの定量およびセレクションにも利用できる。

どの *MethoCult*<sup>®</sup> を利用するとよいか？

- マウス骨髄造血細胞系には、カタログ番号 03234 または 03231 などの *MethoCult*<sup>®</sup> 製品が適している。これらの製品はボトル 1 本あたり 80 mL で提供されており、追加成分を添加することができる。*ClonaCell*<sup>®</sup>-TCS (カタログ番号 03821、03822、03823) は、トランスフェクションした非粘着細胞のクローニング用として特別に調製されたキットである。詳細については、弊社ウェブサイト [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com) を参照のこと。

通常は *Iscove's MDM* を用いて培養しない細胞系に *MethoCult*<sup>®</sup> を利用できるか？

- Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM)、*Minimum Essential Medium* (MEM) や *RPMI 1640* などの細胞培養用培地を添加した *MethoCult*<sup>®</sup> 培地は、多くの細胞系の培養に利用できる。培地、血清およびその他の成分を *MethoCult*<sup>®</sup> 培地に添加し、全量を 100 mL とする。カスタムのメチルセルロース培地の詳細情報および価格については、*StemCell Technologies* に問い合わせられたい。

クローニングの場合、35 mm シャーレ 1 枚あたり何個の細胞を培養できるか？

- MethoCult*<sup>®</sup> 培地に入れるのに最適な細胞数は、細胞系および用途によって異なる。各クローンの単離を容易にし、必須のサイトカインまたは培地の栄養素の欠乏を予防するためには、コロニー数が 35 mm シャーレ 1 枚あたり約 150 個を超えないようにすること。たとえば、予測されるクローニング効率が 50% の場合には、35 mm シャーレ 1 枚にプレATINGする細胞数を 200~300 個とする。

*MethoCult*<sup>®</sup> 培地への選択薬の添加方法は？

- 薬剤またはその他の化合物は、細胞を添加する前に、*MethoCult*<sup>®</sup> 培地にそのまま添加し、よく混合すること。最適なメチルセルロース培地の粘度を維持することが重要である。完全培地に薬剤またはその他の化合物を添加する場合には、適切な個数の細胞をより少ない容積で添加する必要がある (例：3 mL チューブに薬剤溶液 100  $\mu$ L および細胞懸濁液 200  $\mu$ L を添加する)。カタログ番号 03234 または 03231 などの製品を使用する場合には、チューブ 1 本につきメチルセルロース培地 2.4 mL を分注し、必要な成分、増殖因子および薬剤を添加して全量を 3.0 mL とした後でよく混合してから、細胞を添加すること。

#### 手順

メチルセルロース培地を用いた細胞系のクローニングの一般手順

- MethoCult*<sup>®</sup> 培地を冷蔵状態 (2~8°C) で一晩かけて解凍するか室温で解凍する。
- ウシ胎児血清 (FBS)、栄養素、増殖因子、培地などの必要な成分を添加し、全量を 100 mL とする。
- ボトルを 1~2 分間勢いよく振盪し、内容物を混合する。ボトルを立てた状態で 3~5 分間放置し、気泡を上昇させる。
- セクション 3.1 に記載された方法で、16 ゲージのブラント針 (カタログ番号 28110、28210) を装着したシリンジを用いて培地を滅菌済み培養チューブに分注する。
- 細胞をメチルセルロース培地中に 1:10 の比率で添加する (細胞懸濁液 0.3 mL を 3.0 mL の培地に添加すると 2 回分の培地が、0.4 mL を 4.0 mL の培地に添加すると 3 回分の培地が、1.5 mL を 15 mL の培地に添加すると 12~13 回分の培地が得られる)。
- チューブをボルテックスして成分を完全に混合した後、チューブを立てた状態で 5 分間放置して気泡を上昇させる。16 ゲージのブラント針を装着した 3 cc シリンジを用いて 35 mm シャーレ 1 枚につき培地 1.1 mL を分注し、シャーレにふたをする。

7. 6のシャーレを100 mmシャーレまたは四角型シャーレに入れる。滅菌水3~4 mLを添加した35 mmシャーレ1枚以上（ふたなし）を6のシャーレとは別に用意して、100 mmシャーレまたは四角型シャーレに入れる。
8. 倒立顕微鏡または肉眼でコロニーが確認できるようになるまで、加湿インキュベータ内、37°C、5%CO<sub>2</sub>下で7~14日間インキュベートする。
9. 細胞数を増加する場合は、200 µL滅菌ピペットチップを装着したピペッタまたは先端を引き延ばして容積を25~50 µLとしたガラス製パストゥールピペットを用いてコロニーを個別にピックアップして、96または24穴の培養プレートに入れた適切な培地に希釈してもよい。



VERITAS TECHNICAL MANUAL

日本総代理店

株式会社

**ベリタス**

〒105-0013 東京都港区浜松町1丁目10-14  
住友東新橋ビル3号館5階  
TEL.03-5776-0078(代) FAX.03-5776-0076  
E-mail: veritas@veritastk.co.jp  
<http://www.veritastk.co.jp/>