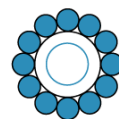




# クイックスタートガイド



**FiberCell Systems Inc.**  
a better way to grow cells



注: この説明書は、英文 Quick Start Guide (Revision 2.0)の日本語訳です。英文も必ずご確認ください。

## 目次:

はじめに.....	2
培養の基本的なガイドライン .....	3
リザーバーボトル/キャップアセンブリーの滅菌.....	4
前培養 .....	5
細胞播種 .....	8
日常管理 .....	9
日常管理スケジュール.....	12

**重要！** 当システムを有効に活用するには、優れた無菌操作技術が求められます。

本ガイドは FiberCell Systems のカートリッジ操作の基本的なことをお伝えする簡略版の操作マニュアルです。詳しい情報については、完全版 FiberCell Systems User's Manual を含む FiberCell ビデオ CD 操作マニュアルを参照してください。このマニュアルをまだお持ちでない場合は、株式会社ベリタス 技術グループ 03-5776-0040、[techservice@veritastk.co.jp](mailto:techservice@veritastk.co.jp) までお問い合わせください。

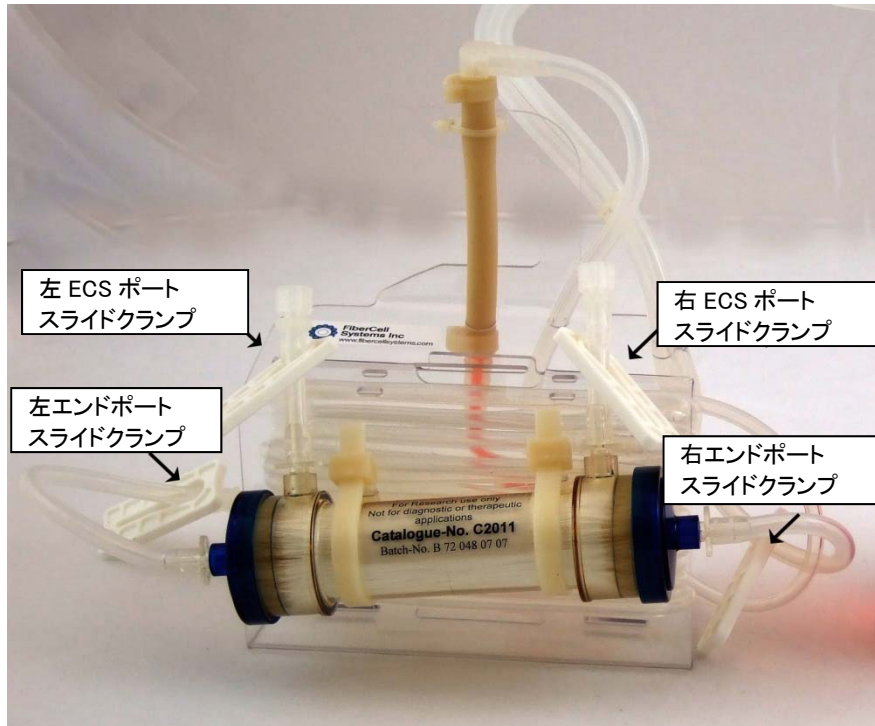


写真: FiberCell® Systems カートリッジの各ポートの識別

## はじめに

FiberCell® Systems の中空系バイオリアクターシステムをお買い求めいただき、ありがとうございます。中空系バイオリアクターカートリッジでは、より高い濃度で、他の培養方法では望めないより小さなスペースにおいて、より多くの細胞を培養し、より多くのタンパクや抗体を製造することができます。細胞は他の操作技術より 100 倍高い濃度で増殖するので、細胞培養の方法も従来では考えられなかったものになります。

これらの製品は研究用です。診断または治療目的でヒトまたは動物に使用するものではありません。

### FiberCell Systems のテクニカルサポート

このクイックスタートガイドは、システムの理解や操作の助けとなる重要な視覚的手がかりを提供してくれる FiberCell® Systems ビデオ CD 操作マニュアルと合わせてご利用ください。

FiberCell® Systems ビデオ CD 操作マニュアルには、完全版 FiberCell® Systems ユーザーズマニュアルが含まれます。FiberCell® Systems のすべての応用及び実用例に関する詳細な説明はこのマニュアルをご参考ください。

ご不明な点がございましたら、いつでもお気軽に株式会社ベリタス 技術推進部 03-5776-0040、techservice@veritastk.co.jp までお問い合わせください。

# 培養の基本的なガイドライン

## 手法

- 正しい無菌手法が中空糸モジュールの長くそして生産的な寿命を確実にします。手間を省いたり、疑わしい培地を使ったり、無菌手法が十分でなかったりすると、結果的に汚染が生じます。
- 液は針を使ってシリンジに引き入れてください。シリンジやサイドポートの接続部に培地の液滴が付着すると、汚染を招きます。
- 充填が終わったら、シリンジから針を外し、シリンジを ECS ポートに直接取り付けます。これは、細菌性生物を取り扱うときにはとくに重要です。
- 操作はすべて層流フード内で行います。フードを清潔にしておいてください。急激な動きやサンプルに直接作業することは避けてください。
- 実験用白衣と手袋または無菌スリーブは常に着用してください。常に最良の無菌手法を守ってください。

## モジュール

PBS フラッシング後、必ず細胞播種に先立って、3 日以上、培地を 2 回変えながら前培養を行ってください。

## 細胞

- FiberCell® Systems 親水性ポリサルフォン中空糸が接着細胞ラインの培養にも浮遊細胞ラインの培養にも適しています。
- 細胞は生存率 90%以上のものを使用してください。細胞採取からカートリッジへの播種までの時間はできるだけ短くしてください。

## 培地

- 選択した細胞のフラスコ培養には、同じ培地を使用してください。高グルコース (4.5g/L) の培地の使用が強く推奨され、したがって、低グルコース RPMI の使用はできるだけ避けてください。
- 無血清培地が希望であれば、細胞が中空糸モジュールの中で高濃度に達してから適応を行います。FiberCell® Systems ユーザーズマニュアルの適応プロトコルに従ってください。ハイブリドーマ、CHO、リコンビナント 293 細胞ラインなど、多くの細胞ラインでは、良好な結果は CDM-HD (FiberCell® Systems の血清代替品) を用いたときに得られます。その際には適応過程は必要ありません。CDM-HD の詳細については、株式会社ベリタス 技術推進部 03-5776-0040、techservice@veritastk.co.jp までお問い合わせください。細胞を無血清培地に適応させるのは、フラスコまたはスピナー培養で行うより、細胞がカートリッジの中で高

い濃度に達してから行うほうがはるかに容易です。

- 培地と試薬は 37°C 水槽で温めます。ボトルは層流フードに取り付ける前にアルコールでしっかり拭いてください。培地の低温のボトルを開けると、陰圧により空気が引き込まれます。
- 培地や試薬はピペットで移し、決してそのまま流し込まないでください。

## リザーバーボトル/キャップアセンブリーの滅菌



各カートリッジには、アウターバッグに短いチューブが2本付いています。インナーバッグを破らないように注意しながら、この2本のチューブを取り外します。これらはオートクレーブの前にキャップに接続します。

1. リザーバーキャップを前培養用のボトルまで持ち上げます。培地がカートリッジの中を一定の速度で流れるように、ステンレスのチューブをボトルの底から1インチ以内まで下ろします。チューブの位置が高すぎる場合は、キャップの周囲のチューブをDI水で濡らすと、それらが容易に上下に動くようになります。適切な高さに調整してください。45mm キャップを使用している場合は、チューブを調整することができません。

2. 各カートリッジに付属の2本のリザーバーキャップチューブを、リザーバーキャップのホースバンプ継手に取り付け、アルミ фольで覆います。リザーバーキャップのチューブの下端をアルミ фольで覆い、オートクレーブテープで固定します。
3. リザーバーキャップアセンブリーをオートクレーブバッグの中に入れます。
4. リザーバーキャップを120~130°Cで45~60分間オートクレーブにかけます。
5. お使いのオートクレーブにドライサイクルがない場合は、オートクレーブから取り出したオートクレーブバッグをただちに層流フードに入れます。オートクレーブバッグの濡れたペーパーサイドは汚染のバリアにはなりません。

オートクレーブ後は、層流フード内で、無菌手法を用いて、(ビデオ CD 操作マニュアルを参照しながら)以下の操作を行います。

1. リザーバーキャップをオートクレーブバッグから取り、無菌ボトルの中に入れるか、直接 PBS の無菌ボトルに取り付けます。
2. (流路付きの)FiberCell® Systemsモジュールを無菌パッケージから取り出します。開口端はすべてルアーキャップでシールしておきます。
3. モジュールのインレットおよびアウトレットチューブをリザーバーボトルキャップの2つのルアー継手につなぎます。

注:ステンレスチューブには、決まった方向性はありません。インレットおよびアウトレットチューブはリザーバーキャップのどちらのルアー継手に接続してもかまいません。

## 前培養

これで細胞培養播種に備えてカートリッジの条件を整える準備ができました。

### 材料

細胞は数日後まで播種しません。開始に先立って、フード内に以下の材料をそろえてください。

- ✓ 無菌 PBS
- ✓ FiberCell® Systems 培養モジュール
- ✓ オートクレーブし、チューブを取り付けた FiberCell® Systems リザーバーキャップ
- ✓ 20cc 無菌シリンジ(ルアーロック)(より大型のカートリッジの場合は 60mL)
- ✓ アルコールパッド
- ✓ 70%エタノール入りスプレーボトル
- ✓ 短太針
- ✓ 50mL コニカル遠心分離管
- ✓ 25mL または 50mL ピペット
- ✓ 無菌 250mL プラスチック Nalgene ボトル(38mm キャップ)または黒フェノールキャップ(33mm)付き無菌 250mL ガラスボトル
- ✓ 500mL 入り Gibco PBS を使用する場合は、45mm リザーバーキャップが必要

本システムは、インキュベーター内で500mLのPBSを用い、細胞培養培地を3回変えながら24時間以上(72時間推奨)前培養しておく必要があります。この前培養の目的は以下の点にあります。

- 中空糸から湿潤剤を取り除く
- システムを増殖培地および血清タンパクと平衡させる
- システムに漏れがないことを確認する
- 無菌性を確認する

## カートリッジへのPBSの導入と充填

1. 左右のエンドポートのスライドクランプが「開」のポジションになっていて、左右のECSポートが閉じていることを確認します。
2. リザーバーボトル内のステンレスチューブから気泡が出てこないように圧縮チューブを指でポンピングし、流路に培地を引き入れ、満たします。
3. カートリッジを、右側を持ち上げて傾け、中空系の中、あるいはバイオリアクターの隅にたまっている気泡を除去します。

## ECSをPBSで満たす

1. カートリッジの左右のエンドポートのスライドクランプを閉じ、バイオリアクターを流路から切り離します。
2. 1本目の無菌シリンジ(バイオリアクターのサイズに応じて20~60mL)を一方のECSサイドポートに取り付けます。
3. 最大50mLまでのPBSを50mLコニカル遠心分離管に加えます。
4. 2本目のシリンジを、短太針を用いてPBSで満たし、もう一方のECSサイドポートに接続します。
5. 左右のECSスライドクランプを開きます。
6. PBSをECSに注入し、空気を他のシリンジに追い出します。ECSが完全に培地で満たされていない場合は、繰り返し、気泡をすべて除去します。
7. ECSポートクランプを閉じ、空気をシリンジから除去し、シリンジをキャップとして使用します。以後の操作では、必ずシリンジを取り替えることを忘れないでください。
8. 左右のエンドポートのスライドクランプを開きます。
9. カートリッジを Duet pump の上に置き、24 時間以上、システム内に PBS を 15~20 の流速で流します。この段階で、必要ならカートリッジに PBS を数週間流してもかまいません。

ルアー継手やカートリッジの表面の培地は忘れずにアルコールパッドできれいに拭いておいてください。ECSサイドポートにシリンジまたはキャップが付いていない場合は、必ずスライドクランプを閉めておいてください。これにより、継手や漏れ部分に余分な培地が出てくるのを防げます。

ECSの空気を抜く場合は(前培養中はひと晩でECSに空気がたまります)、リザーバー内の培地のほうがECSより高くなるように、リザーバーボトルの高さを上げます。これにより十分な静水圧が生じ、ECSは培地で満たされたままになります。また、ECSポートのスライドクランプが閉まっていて、ルアーキャップまたはシリンジがしっかりと取り付けられていることも確認しておいてください。

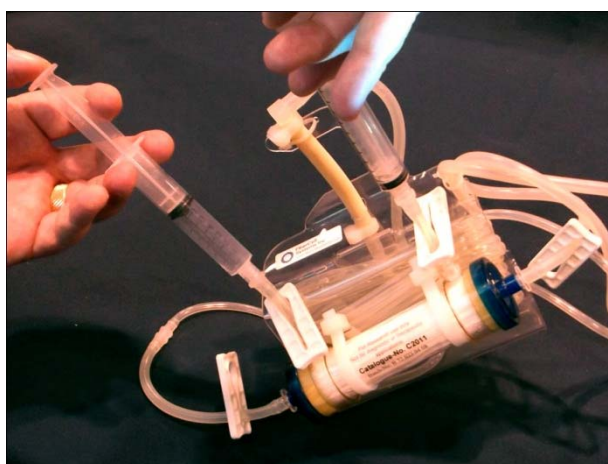
この 24 時間フラッシングのあと、さらに 2 回、システムの培地を交換します。最初は血清または増殖因子を含まない基礎培地(または無血清培地)で、2 回目の交換では、血清、抗生物質などの添加物を含む完全培地に交換します。そして最後に、細胞播種および初期培養用の新しい培地に交換します。細胞が定着し、即ち、1 日に 1g 以上のグルコースが消費されるようになると、無血清培地または CDM-HD への適応を行うことができます。CDM-HD はほとんど、あるいはまったく適応を必要としません。単純に DMEM のウシ胎児血清を 10%CDM-HD と置換するだけです。

## 最初の培地交換

### 手順

1. この最初の液交換では、標準培地/無血清培地を使用します。PBS を 500mL ボトル入りの標準培地と交換します。

2. 左右のエンドポートのスライドクランプを閉めます。左右の ECS ポートのスライドクランプを閉めます。



3. 20mL シリンジを新しい培地で満たし、それを左の ECS サイドポートに取り付けることによって ECS の培地を交換します。空のシリンジを右の ECS サイドポートに取り付けます。

4. ECS ポートのサイドクランプを開きます。
5. カートリッジを、右側を持ち上げて傾け、左のシリンジから新しい培地をゆっくりと押し込んで右の ECS ポートから古い培地を押し出すことによって、ECS 内の培地を交換します。
6. 右のシリンジから PBS を除去し、あらためてそれを ECS ポートに取り付けます。
7. 左右の ECS ポートのクランプを閉じます。左右のエンドポートのスライドクランプを開くのを忘れないでください！
8. 培地を 24 時間以上かけて循環させ、システムをインキュベーターの中へ戻します。

## 2 度目の培地交換

1. 最初の培地交換の手順に従います。
2. 基礎培地を使用している場合は、DMEM を DMEM + 10%ウシ胎児血清及び他の添加物と交換します。これは 24 時間かけて循環させてください。



## 最後の培地交換

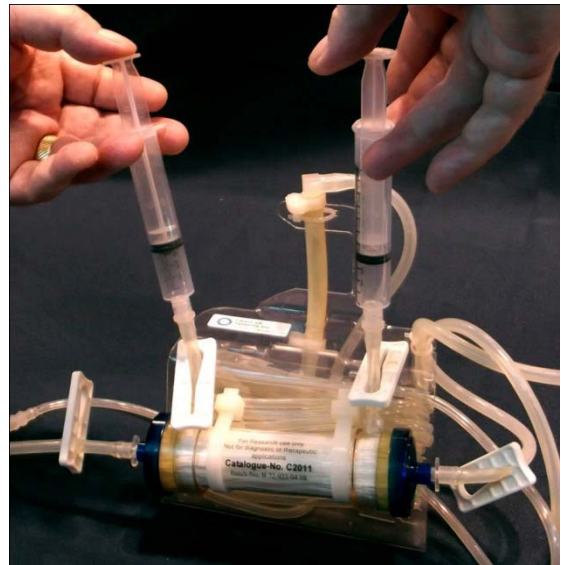
新たに DMEM+10%ウシ胎児血清 125mL と交換します。この段階までは、便宜上、もっと多くの量を使用していますが、初期播種の期間には、体積が 125mL を超えないことが重要です。リザーバーボトル内の培地の体積はカートリッジ内の細胞の数に比例させておく必要があります。

これで細胞播種の準備ができました。

## 細胞播種

細胞の生存率が 90%以上であることを確認します。細胞採取と播種の間の時間をできるだけ短くします。細胞は、廃棄されてはいけない有用な増殖因子を含むように、それまで増殖してきた培地の培養上清に再び浮遊させます。推奨細胞数は以下のとおりです。

- ハイブリドーマと浮遊細胞: 計  $10^8$  以上。
- CHO、HEK 293 などの接着細胞: 中空系表面積の 50%コンフルエンス相当量を使用。これは T-175 フラスコ 6~8 個またはそれに相当する量になる。



画像などについては、*FiberCell Systems* ビデオ CD 操作マニュアルを参照してください。

### 手順

1. カートリッジの左右のサイドポートを閉めます。
2. 両方の ECS ポートのシリンジを取り外します。
3. 1 つは新しいシリンジと交換します。
4. もう 1 つのシリンジには細胞培養浮遊液 20mL を満たします。5kd MWCO 中空系を使用する場合は、この量を 4mL 以下まで減らします。
5. 他方の ECS ポートに細胞を含むシリンジを取り付けます。
6. 細胞を含む培地を空のシリンジに取り出します。気泡が生じないように、そっと押します。
7. ECS 内の細胞浮遊液を 3~4 度、静かに出したり戻したりして、中空系の束全体に細胞を均一に分布させます。細胞浮遊液の 1/2 を各シリンジの中にとどめます。

8. リザーバーキャップを 1/2 回転させます。一方の ECS ポートのスライドクランプを閉じ、中空系を通して浮遊液を他方のシリンジの中へ、さらにリザーバーボトルの中へとそっと押し込みます。細胞はカートリッジの中にとどまりますが、余分な培地はリザーバーボトルの中へ出てきます。
9. ECS のスライドクランプを閉じ、反対側のシリンジについてもこれを繰り返し、細胞浮遊液を排出したあとは忘れずに ECS ポートを閉じておきます。
10. リザーバーキャップを締めます。
11. カートリッジは 1 時間フードの中に入れておき、30 分経過したら 180° 回転させます。
12. これらのシリンジは汚染防止のために付けたままにしておきます。
13. カートリッジをポンプの上に置き、ポンプ速度を 20~25 に設定します。

グルコースが半減したら、250mL ボトルの完全培地と交換します。これは通常、グルコース濃度が 2g/L 以下になったときに相当します。Roche Accu-Check Compact Plus またはそれに相当する測定器を推奨します。

グルコース濃度が半減した場合は、完全培地 500mL ボトルに交換してください。

グルコースが半減したときに、必要なら 1L に交換してください。グルコース消費率が 1.0g/日以上になったら、採取を開始することができます。

## 日常管理

FiberCell® System の保守の要件を忘れないように、日常管理スケジュール(12 ページ参照)を職場に貼っておくとよいでしょう。

ハイブリドーマ培養からの採取は 1 日おきに行い、リコンビナントタンパクを製造する CHO または 293 細胞ラインについては、できれば毎日採取を行います。カートリッジからの採取には 2 つのねらいがあります。1 つはできるだけ高濃度の分泌成分を採取することです。もう 1 つは細胞量を調節し、あまり増えすぎないようにすることにあります。死細胞を取り除くことも重要です。カートリッジ内に細胞が増えすぎると、システムの酸素供給能力が不足する可能性があります。その場合は細胞が嫌気性代謝を起こすことがあります。いったん嫌気性代謝を起こした細胞を正常に戻すのは難しい可能性があります。低グルコース消費の採取では、最大濃度の成分が得られますが、取り出せる細胞の数は多くありません。高グルコース消費の採取では、細胞を取り出して中空系の孔も開いておけますが、成分は希釈されます。グルコース消費が 1.5g/日を超える場合は、必ず低グルコース消費の採取を先に行い、高グルコース消費の採取はそのあとで行ってください。

### 低グルコース消費の採取

グルコース消費が 1000mg/日より低くなると、採取は少数の細胞を取り出すためのものになります。

## 機器および材料

- ✓ FiberCell®カートリッジ
- ✓ 20cc無菌シリンジ(ルアーロック)(より大型のカートリッジの場合は60cc)
- ✓ アルコールパッド
- ✓ 70%エタノールまたはイソプロピルアルコール入りスプレーボトル
- ✓ 選択した細胞培養培地

## 手順

1. 左右のエンドポートのスライドクランプを閉めます。ECSポートのスライドクランプが閉じていることを確認してください。
2. 20mLシリンジに新しい完全培地を満たします。左ECSポートのシリンジを取り外し、新しい培地の入ったシリンジと交換します。右ECSポートに新しい空のシリンジを取り付けます。左右のECSポートのスライドクランプを開きます。
3. カートリッジを、右側を持ち上げて傾け、左のシリンジから新しい培地をゆっくりと押し込んで右のECSポートシリンジから浮遊物を押し出すことによって、ECS内の培地を交換します。(「最初の培地交換」の写真を参照してください。)これが低グルコース消費の採取になります。
4. 両方のECSポートのスライドクランプを閉じます。回収物を含むシリンジを取り外し、新しい無菌シリンジと交換します。
5. インキュベーターに戻す前に、必ずインレットとアウトレットのエンドポートのスライドクランプは開いておいてください。ECSスライドポートのクランプを閉じておくことも忘れないでください。

## 高グルコース消費の採取

グルコース消費が1000mg/日以上の場合は、この手順を用いてください。細胞量を調節し、細胞の数を減らす必要があります。細胞ペレットは充填細胞1~4mLになります。

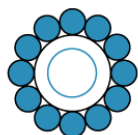
## 機器および材料

- ✓ FiberCell® Systemsカートリッジ
- ✓ 20cc無菌シリンジ(ルアーロック)(より大型のカートリッジの場合は60cc)
- ✓ アルコールパッド
- ✓ 70%エタノールまたはイソプロピルアルコール入りスプレーボトル

## 手順

1. 左エンドポートのスライドクランプを閉じます(右エンドポートは開いたまま)。
2. 2本の新しい20mL シリンジを ECS ポートに取り付けます。
3. リザーバーボトルのキャップを 1/4 回転ほど回します。
4. 右 ECS ポートのスライドクランプを開きます。
5. 右シリンジに 10mL 引き入れます(培地は、リザーバーボトルから中空糸を通してシリンジへ引き入れます)。
6. 右 ECS ポートのスライドクランプを閉じます。
7. 左 ECS ポートのスライドクランプを開きます。
8. 培地を 10mL、シリンジへ引き入れます。
9. 右エンドポートのスライドクランプを閉じます。
10. 両方の ECS ポートのスライドクランプを開きます。
11. 2本のシリンジの間で 2~3 度、静かに培地を行ったり来たりさせます(細胞量を著しく減らしたい場合は、この行ったり来たりをもっと激しく行う必要があります)。
12. すべての培地を一方のシリンジに入れます(どちらのシリンジでもかまいません)。
13. ECS ポートのスライドクランプを閉じます。培地の入ったシリンジを取り外し、その内容物を 50mL コニカルチューブに空けます。
14. シリンジを交換します。
15. 左右のエンドポートのスライドクランプを開きます。

FiberCell® Systems の操作の詳細については、完全版 FiberCell Systems User's Manual を含む FiberCell ビデオ CD 操作マニュアルを参照してください。このマニュアルをまだお持ちでない場合は、株式会社ベリタス 技術グループ 03-5776-0040、[techservice@veritastk.co.jp](mailto:techservice@veritastk.co.jp) までお問い合わせください。



**FiberCell Systems Inc.**  
a better way to grow cells

## 日常管理スケジュール

(( )内の数字は C2003 および C2018 カートリッジの場合です)

<u>経過日数</u>	<u>手順</u>
0	細胞播種 125mL 培地 (250mL 培地)
1	グルコース濃度チェック
2~3	グルコース濃度チェックし、半減していたら培地を 250mL (500mL)に置換します。
4~5	グルコース濃度チェックし、半減していたら培地を 500mL (1L)に置換します。
5~7	グルコース濃度チェックし、半減していたら培地を 1000mL (2L)に置換します。
8~10+	グルコース濃度チェックし、半減していたら培地を交換します。1 日おきに ECS から抗体を採取します。タンパクの場合は毎日採取します。

### 株式会社ベリタス

〒105-0013 東京都港区浜松町 1-10-14 住友東新橋ビル 3 号館 5 階

TEL 03-5776-0078 FAX 03-5776-0076

技術的なお問合せ: TEL 03-5776-0040 E-mail [techservice@veritastk.co.jp](mailto:techservice@veritastk.co.jp)

RFCM-16-0539