

Corning® ハイパーフラスコ M セルカルチャー容器

使用説明書

CORNING

はじめに

Corning ハイパーフラスコ M (High Yield **PER**formance Flask **M**anual) はマニュアル使用を想定して特別にデザインされた細胞培養容器です。この新しい多層型フラスコでは、フラスコ内の細胞と培地は、ガス透過性フィルムを通してフラスコ外の環境大気とガス交換をおこないます。この仕組みによって従来の T-フラスコと同じスペースでより広い表面積での培養を可能にします。ハイパーフラスコ M は容器を培地で完全に満たし、ガス交換性のないソリッドキャップで密閉して使用します。フラスコの 10 層にはガス透過性フィルムが使用されており、それぞれの間には空気層があるので、ガス交換のためにキャップを緩めたりフィルター付きのベントキャップを使用する必要はありません。ハイパーフラスコ M は従来の T175 フラスコの約 10 倍の培養面積、1,720 cm² を有しています。下記に示したプロトコールは、標準的な細胞培養用の汎用プロトコールで、ハイパーフラスコ M およびオートメーション用ハイパーフラスコ両方でお使いいただけます。マニュアル用、オートメーション用それぞれのハイパーフラスコで細胞の増殖（接着性及び浮遊性）、タンパク質生産、ウィルス生産、トランスフェクションの実績が確認されています。

細胞播種

ハイパーフラスコ M は通常の T-フラスコ内で見られる培地の上の空気層を作らず、培地を完全に満たして培養するように設計されています。そのため、1 つのハイパーフラスコ M につき 560 ~ 565 mL の培地が必要です。一般的な細胞では 5.0×10^6 個 ~ 1.72×10^7 個/フラスコ ($0.3 \sim 1 \times 10^4$ 個/cm²) の細胞を播種することをお勧めします。播種濃度は細胞のタイプ、培地、培養期間によって調節してください。播種濃度、培地のタイプ、培養期間は、従来の T-フラスコやディッシュでその細胞を培養する条件から始めてください。

1. 目的とする細胞数/cm² の細胞を 500 mL の培地に懸濁した細胞懸濁液を準備します。
2. フラスコのキャップを外して、底側の角を 60° ほど傾けます。注意深く、ゆっくりと細胞懸濁液を全て注ぎ込みます。その際、ネック内側の上部についているエアダムを避け、ネックを伝ってマニフォールドに液が流れるように注意します（図 1）。注ぎ込む際、ネックの内側に液をできるだけ伝わらせるようにします。より広く培地を伝わらせるほど、泡立ちを軽減できます。ハイパーフラスコ M は、メディウムグリッドによって、液体と空気の通り道を分離します。これによって培地の出し入れの際に傾けることで泡立ちを抑えることが可能になります。注いでいる途中で泡立ちがひどくなった場合は、一旦注ぎ込むのをやめて泡を吸引してください。泡が生じない角度に微調節しながら注いでください。

- ▶ ハイパーフラスコ M への培地の出し入れにピペットを使用することもできます。
- ▶ 細胞を播種する前に空の容器をプレウォームしたり、プロトコールの過程でトリプシン処理やトランスフェクションなど少量の液体を使用して 1 時間以上インキュベーションする場合には、キャップをベンチングポジション（図 2）にして、容器内の空気を抜いてください。これにより適切な通気が保たれ、フラスコ内の空気が暖められることによる内圧の上昇を抑えます。**NOTE:** ハイパーフラスコ M を 60 分間以上、Sartorius Stedim 社の自動セルカルチャーシステム Select™ および Compact Select™ のインキュベーター内に保存する際も同様です。



図 1. 泡立ちと泡をさけるように気をつけて注ぎます。フラスコを傾けることで泡立ちを抑えます。



図 2. 容器が空または少量の溶液を入れた状態で長時間（60 分以上）プレウォームする場合は、キャップをベンチングポジションにします。



図 3. キャップを締める前に、1 番下のねじ山まで培地を追加します。



図 4. キャップは、18 lb-in/2 nm のトルクで締める必要があります。すべてのねじ山をキャップで覆う必要があります。フラスコの底部をインキュベーターに置き、ゆっくりと倒していくと、キャップ部分に気泡が集まります。

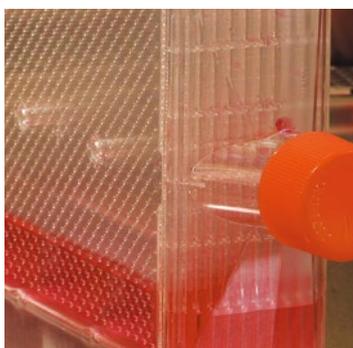


図 5. このようにフラスコを横に置いたときに、フラスコの内側の液体は各々の層に均一に分配されます。

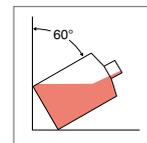
- フラスコが培地で満たされるにつれ、ゆっくりとフラスコの角度を垂直に戻します。その際、勢いで気泡と一緒に培地が逆流しないように注意してください。
- 気泡が培養層に閉じ込められた場合、フラスコをたたいて気泡を除いてください。
- 培地の液面をフラスコのネックの一番下のねじ山と同じ高さになるまで (図 3)、培地を追加 (約 60 mL) してください。泡が大量に生じた場合はアスピレーションまたはピペットで泡を吸って除いてください。最終的に一番下のねじ山まで培地が来るように培地を追加します。
- フラスコのキャップをしっかりと締めます。キャップは、すべてのねじ山を覆うために 18 lb-in/2 nm のトルクで締める必要があります。アングルネックが下を向く方向で、フラスコを水平に置きます。すべての気泡がネック内に収まっていることを確認します (図 4)。

NOTE: 泡が一番上の層に入り込んだ場合、フラスコを立てて叩き、全ての泡をネックに移動させてください。培地の液面がネックの一番下のねじ山に達するように培地を足して、ステップ 6 を繰り返してください。一番上の培養層やマニフォールド内の少量の小さい気泡は細胞の収量に影響しません。

- フラスコのキャップと培地が直接接触するので、長期間の培養の場合やキャップを繰り返し開け閉めする場合にはキャップを交換することをお勧めします。新しいキャップに交換することでコンタミネーションのリスクを下げ、キャップの密閉をより確実にします。交換用のキャップ (カタログ番号 10035) が入手可能です。

細胞播種の代替手法

- 小容量の培地に、ハイパーフラスコ M の容量 (566 mL) にメスアップしたときに目的の細胞濃度になるように細胞数を調整した細胞懸濁液を用意します。播種用の細胞懸濁液は 50 mL を下回らないようにしてください。
- キャップを外し、フラスコを約 60° 傾けます (右図参照)。注意深く、ゆっくりと細胞懸濁液をネックの傾斜のある側を伝わってフラスコに注ぎ込みます。ネックの上側にあるエアダムを避けて注いでください (図 1)。
- キャップをしっかりと閉めてからフラスコの側面で立てて各層の懸濁液が均一になるようにします。この操作でフラスコの各層に同量の液体が入ります (図 5)。
- フラスコを再びキャップを上にして立て、細胞播種のステップ 2 からステップ 6 と同様に培地で満たします。



細胞の観察

ハイパーフラスコ M で培養した細胞は通常の倒立顕微鏡で観察することができます。4 倍の対物レンズ (トータル 40 倍) を使用して、一番下と下から二番目の層を観察することができます。さらに、フラスコの上の層と下の層を逆に置き換えることで一番上と上から二番目も同様に観察できます。10 倍や 20 倍の高倍率の対物レンズを用いた場合は一番下 (と一番上) の層のみ観察可能です。

培地の除去

ハイパーフラスコ M は特にデカンテーションによって内容液を素早く、効率的に出せるように特別にデザインされています。これは最も簡単で迅速な方法ですが、液体はピペットやアスピレーターによっても除去できます。

- キャップを外し、フラスコをエアダム側に傾けて、廃液容器に培地を廃棄します (図 6)。フラスコは始めバーコードが張ってある側を上にして傾けます。排出しながらゆっくりと 180° 回転させ、最終的にアングルネック側から廃液します。泡立ちを抑えるために慎重に廃液角度を調節してください。



図 6. 最初にこの位置で注ぎ出すと、培地がエアダムの上を流れ、泡立ちを減らすことができます。

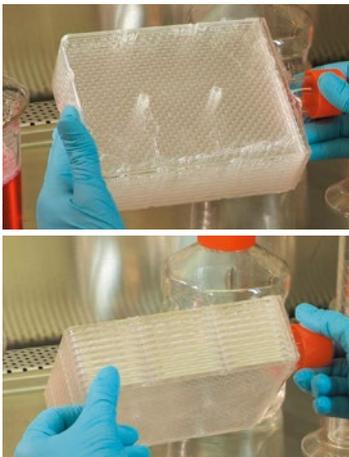


図 7. フラスコを前後に何度か回転させることにより、細胞をリンス液や剥離液に完全にさらすことができます。

2. フラスコを前後にそっと揺らして、ネック底部のリキッドガイドを利用して残っている液体を取り除きます。

- ▶ ネックの口に培地の水滴が残っている場合、滅菌ガーゼやアルコールワイプで簡単に取り除けます。

NOTE: HEK293 などの接着の弱い細胞では、細胞が剥がれないように注意が必要です。もし培地の排出や PBS での洗浄の過程で細胞が剥離すると、回収が必要になる場合があります。

細胞の回収

ハイパーフラスコ M からの細胞の回収には幾つかの注意点がありますが、T-フラスコとそれほど変わりません。注意点について以下のステップと NOTE をご覧ください。細胞を剥す際には Accutase[®] と HyQtase[®] などのコラゲナーゼベースの試薬の使用を強くお勧めします。これらの試薬は、細胞へのストレスが少なく、細胞の生存率と細胞表面受容体を維持しながら、長時間のインキュベーションを可能にします。下に概要を示したステップは CHO, HeLa, Vero などの細胞に適するように一般化したものです。接着が弱い細胞または接着が強い細胞ではいくつかの特別な取り扱いが必要であり、以下に概説します。

- ▶ トリプシンを使用する場合は細胞の剥離を注意深く観察して従来の T-フラスコより 25% から 50% 処理時間を短縮してください。処理時間を短くすることで過処理による細胞溶解や凝集を防ぎます。
- ▶ HEK293 などの接着の弱い細胞ではリンス工程でフラスコをタッピングするだけで大抵は細胞を剥離させることができます。このステップで細胞が剥がれない場合のみ細胞剥離試薬の処理を必要とします。
- ▶ MDCK 細胞など接着の強い細胞はリンスのステップで PBS を入れた状態で 10 から 15 分間インキュベートすることで剥離に要する時間を短縮でき、トリプシンの過処理を予防できます。PBS を取り除いた後、ステップ 5 以下を行います。

1. 先に示した方法で培地を排出します。
2. 100 mL のリンス液 (PBS) を加えます。
3. キャップを閉めてフラスコを横向きに立て、各層に溶液を均等に行き渡らせます。これを行うことで各培養層に同量ずつの液が入ります (図 5)。
4. フラスコを長軸に沿って 180°前後に数回ゆっくりと回転させ、各層の細胞シート全体を完全にすすぎます (図 7)。

NOTE: 確認は難しいですが、4 回以上回転させれば全ての培養面を完全にリンス液でカバーするには十分です。

- ▶ 効率よく全ての培養面をカバーするために、全ての層に行き渡らせる前に、数層ずつに分けて平衡化する方法もあります。まず、フラスコを培養ポジションにし、フラスコのネックの反対側の底を持ち上げます。これによって液はメディウムガイドの角に溜まり、底側の数層に入ります。ステップ 4 で示したようにゆっくりとフラスコを回転させます。フラスコを逆さにしてその上の層も同様に、一番上の層まで平衡化します。

5. リンス液を排出し、50 ~ 100 mL の細胞剥離ソリューションと入れ替えます。

- ▶ 容量を増やすために 50 mL の細胞剥離ソリューションを 50 mL の希釈液 (PBS など) とあわせて使用することも可能です。この方法はトリプシン、HyQtase[®]、Accutase[®] で既に実証済みです。

6. 細胞回収ステップの 3 と 4 を繰り返し、細胞に満遍なく細胞剥離液をふれさせます。必要に応じて、フラスコをインキュベーターに置き、細胞の剥離を促進します。
 - ▶ この状態でフラスコを 60 分以上インキュベートしないでください。60 分以上インキュベートする場合は、細胞剥離液を前もって室温に戻しておくか、温めておく必要があります。
 - ▶ このステップとその後の回収ステップ中に気泡が形成されるのは問題ありません。気泡が回収効率を低下させたり、細胞に影響を与えることはありません。
7. 大半の細胞が丸くなり、培養面から剥がれてきたら、フラスコをしっかりと振るかタッピングして残りの細胞も剥がします。細胞の剥がれ具合は顕微鏡で観察することができます。
 - ▶ 泡立ちを抑えながら丸くなった細胞を剥がすために、細胞剥離液を全ての層に行き渡らせてから、素早い動きでフラスコを下に振って液体をフラスコの反対側へ向かわせ、層全体に液体を広げます。必要に応じて繰り返します。
8. ハイパーフラスコ M に中和液を加えてから平衡化して洗い、250 mL 遠沈管 (カタログ番号 430776) やストレージボトル (カタログ番号 430281) などの適切な容器に回収します。
 - ▶ 泡立ちを軽減するために、前もって回収容器に同容量の血清入り培地などの不活化溶液を入れておくこともできます。細胞懸濁液をこの容器に直接注ぐことで、ハイパーフラスコ M 容器に血清が入るのを防ぐことができます。
9. お好みに応じて 100 mL の PBS などのリンス液でフラスコを洗うことで細胞の回収率が若干改善することがあります。ほとんどの細胞のタイプにおいて、回収率の改善は 1 ~ 2% 程度です。
10. 回収ステップの 3 と 4 を繰り返します。
11. ステップ 8 で使ったものと同じ回収容器に溶液を回収します。細胞塊を崩すためにピペティングが必要な場合もあります。

・商品の外観・仕様は予告無しに変更することがあります。予めご了承ください。
・ For a listing of trademarks, visit www.corning.com/lifesciences/trademarks.
All other trademarks are the property of their respective owners.
・保証・免責事項：特に記載がない限り、記載中の製品は研究用機材および試薬です。診断、または治療用途には使用しないでください。また人体には使用しないでください。
コーニングライフサイエンスは本製品の臨床または診断用途でのいかなるパフォーマンスについても保証しません。

CORNING

総販売元

コーニングインターナショナル株式会社
ライフサイエンス事業部

〒107-0052 東京都港区赤坂 1-11-44 赤坂インターシティ7階
Tel : 03-3586-1996
www.corning.com/jp/lifesciences
CLSJP@corning.com

技術サポートへのお問い合わせは
Tel : 03-3586-1268
ScientificSupportJP@corning.com

© 2025 Corning Incorporated
CLS-390-00
CLS-CC-029 (CPL00005) REV3
RO-2501-B