

ヒト皮下由来脂肪前駆細胞・脂肪細胞 培養マニュアル

播種皮下脂肪前駆細胞をご購入された方は、「3. 皮下脂肪細胞への分化誘導」から操作を開始してください。

播種皮下脂肪細胞をご購入された方は、「4. 皮下脂肪細胞の維持」から操作を開始してください。

1. 凍結皮下脂肪前駆細胞の播種

- ① 液体窒素から凍結アンプルを取り出し、37°Cの湯浴で、内容物(細胞)が約半分程度融解するまで攪拌する。この際、アンプルが暴発する恐れがあるので、プロテクターや手袋を装着して作業することが望ましい。
- ② 約半分程度融解したことを確認したら、湯浴から取り出し、アンプルを攪拌させながら、余熱ですべて融解する。
- ③ 15mL の遠沈管に脂肪前駆細胞培養用培地(注文 Cat.No.:F-PM-1)を 10mL 入れる。
- ④ 遠心管にアンプル中の細胞浮遊液を全量移し、数回ピペッティングしたのち 1,500rpm で 1 分間遠心する。
- ⑤ 上清を取り除き、脂肪前駆細胞培養用培地(注文 Cat.No.:F-PM-1)を適当量添加し細胞懸濁液を調製する。細胞懸濁液を少量とり、トリパンプルで染色したあと、細胞数を計測する。
- ⑥ 脂肪前駆細胞培養用培地(注文 Cat.No.:F-PM-1)を用い、細胞濃度を 6,400 cells/cm²に調製し、播種する。
※ 分化誘導を行う場合は、「3. 皮下脂肪細胞への分化誘導」を参照のこと。
- ⑦ 85-90%コンフルエントになるまで、37°C、5%CO₂ 下で培養する。この間、3 日おきに培地を全量交換する。
- ⑧ 85-90%コンフルエントになれば、継代・凍結を行う。
※ 細胞はコンフルエントになると、著しく増殖能が低下するので、継代培養を行う場合には、コンフルエントにならないように注意すること。
※ 皮下脂肪前駆細胞は数回の継代培養が可能であるが、4 継代目以降は増殖能・分化能ともに低下するので、3 継代目までで使用する。

2. 皮下脂肪前駆細胞の継代

- ① 培養液を除き、PBS(-)を加える。
- ② PBS(-)を除き、0.025%トリプシン/0.02%EDTA 溶液を加える。
- ③ 細胞が円球化しつつあれば、脂肪前駆細胞培養用培地(注文 Cat.No.:F-PM-1)を加えてトリプシンを中和する。
- ④ タッピングやピペッティングで、細胞を培養基質から剥離させ、得られた細胞浮遊液を遠心管へ移す。
- ⑤ 1,200rpm で 5 分間、20°C(室温)で遠心する。
- ⑥ 上清を除き、沈査に脂肪前駆細胞培養用培地(注文 Cat.No.:F-PM-1)を加えてよく混和し、得られた細胞浮遊液の細胞数を計測する。
- ⑦ 更に継代培養を続ける場合には、以下の細胞数を播種する。(6,400 cells/cm²)
分化誘導を行う際には、以下の細胞数を播種する。(40,000cells/cm²) 培地量は次ページを参照のこと。
細胞を凍結するには、脂肪前駆細胞培養用培地(注文 Cat.No.:F-PM-1)に 10%になるように DMSO を添加した凍結用培地を調整し、定法通りに凍結する。

培養容器	培地量/well	必要培地量
96well プレート	150 μ L	14.4mL
48well プレート	500 μ L	24.0mL
24well プレート	1.0mL	24.0mL
12well プレート	2.0mL	24.0mL
6well プレート	3.0mL	18.0mL
75cm ² フラスコ	20mL	20.0mL
25cm ² フラスコ	7mL	7.0mL

3. 皮下脂肪細胞への分化誘導

- ① 皮下脂肪前駆細胞をコンフルエントまで培養する。
- ② 細胞がコンフルエントに達したら、脂肪細胞分化培地(注文 Cat.No.: F-DM-2)に培地を交換する。
※ 分化誘導を行う場合には、細胞がコンフルエントに達していることが重要である。コンフルエント以前の細胞を誘導しても、十分な脂肪細胞への分化が得られない。
- ③ 6日間、37°C、5%CO₂ 下で培養する。
※ 分化用培地は、6日間より長くても短くても十分な分化誘導が起らないので、この期間は厳守すること。
- ④ 6日後、脂肪細胞培養用培地(注文 Cat.No.: F-AM-1)に全量を交換する。
※ この際、細胞が剥離しやすいので丁寧に行うこと。
- ⑤ 3日おきに、脂肪細胞用培地(注文 Cat.No.: F-AM-1)を半量交換する。
※ 皮下脂肪細胞は、分化誘導後、少なくとも3週間は形態・性質を維持します。

4. 皮下脂肪細胞の維持

- ① 顕微鏡で細胞を観察します。
- ② 輸送時は、pHの変動を抑えるために、過剰量の脂肪細胞培養用培地(注文 Cat.No.: F-AM-1)でお送りしています。インキュベーター(5%CO₂、37°C)内に静置する前に、培地を適量取り除いて下さい。
- ③ 培地を適量取り除いたら、インキュベーター(37°C、5%CO₂)内に静置して下さい。
- ④ 実験を行うまで3日ごとに脂肪細胞培養用培地(注文 Cat.No.: F-AM-1)で培地交換を行って下さい。培地は半量ずつ交換されることをお勧めいたします。

- ※ 皮下脂肪細胞は、分化誘導後、少なくとも3週間は形態・性質を維持します。
※ 皮下脂肪細胞は継代すると分化効率が著しく悪くなりますので、ご注意下さい。

CEL-1/0807D

【お問い合わせ先】

大日本住友製薬グループ

DSファーマバイオメディカル株式会社

(受注・発注/学術的お問い合わせ先)

〒564-0053 大阪府吹田市江の木町33-94

TEL 06-6386-2164 FAX 06-6337-1606

URL : <http://www.dsphbio.co.jp>

E-メール : labopro@bio.ds-pharma.co.jp