

ヒト内臓由来脂肪前駆細胞・脂肪細胞 培養マニュアル

播種内臓脂肪前駆細胞をご購入された方は、「2. 内臓脂肪前駆細胞から内臓脂肪細胞への分化誘導」から操作を開始してください。

播種内臓脂肪細胞をご購入された方は、「3. 内臓脂肪細胞の維持」から操作を開始してください。

1. 凍結内臓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の遠沈管に内臓脂肪前駆細胞培養用培地(注文 Cat.No.: F-OM-PM)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、内臓脂肪前駆細胞培養用培地(注文 Cat.No.: F-OM-PM)を2mL添加し細胞懸濁液を調製する。細胞懸濁液を少量とり、トリパブルで染色したあと、細胞数を計測する。
- ⑥ 内臓脂肪前駆細胞培養用培地(注文 Cat.No.: F-OM-PM)を用い、下記表に示した必要培地量で、細胞濃度を 4×10^4 cells/cm² に調製し、播種する。

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

⑦ 細胞を上記表に示した培地量ずつ播種し、インキュベーター内(37°C、5%CO₂)で培養して下さい。

⑧ 24時間後に細胞を観察しコンフルエントに達したことを確認したら、分化誘導を開始して下さい。

※コンフルエントが不十分であれば、脂肪細胞への分化率が悪くなりますので、十分コンフルエントになるまで、分化誘導は開始しないで下さい。

2. 内臓脂肪前駆細胞から内臓脂肪細胞への分化誘導

- ① 内臓脂肪前駆細胞を内臓脂肪前駆細胞培養用培地(注文 Cat.No.: F-OM-PM)でコンフルエントまで培養します。
- ② コンフルエントに達したことを確認したら、下記表に従い、内臓脂肪前駆細胞培養用培地(注文 Cat.No.: F-OM-PM)を内臓脂肪分化培地(注文 Cat.No.: F-OM-DM)に全量交換し、分化誘導を開始します。
- ③ 分化誘導開始から7日目に、下記表に従い、内臓脂肪細胞分化培地(注文 Cat.No.: F-OM-DM)を適量取り除き、内臓脂肪細胞培養用培地(注文 Cat.No.: F-OM-AM)を適量加えます。

培養容器	F-OM-DM から F-OM-AM への交換	
	取り除く培地量	加える培地量
96well プレート	90 μ L/well	120 μ L/well
48well プレート	300 μ L/well	400 μ L/well
24well プレート	0.6mL/well	0.8mL/well
12well プレート	1.2mL/well	1.6mL/well
6well プレート	1.8mL/well	2.4mL/well
75cm ² フラスコ	12mL/フラスコ	16mL/フラスコ
25cm ² フラスコ	4.2mL/フラスコ	5.6mL/フラスコ

- ④ 実験まで3日おきに内臓脂肪細胞培養用培地(注文 Cat.No.: F-OM-AM)を半量ずつ交換します。

※ 内臓脂肪細胞は、分化誘導後少なくとも3週間は形態・性質を維持できます。

※ ロットによって、分化効率は異なります。

3. 内臓脂肪細胞の維持

- 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、過剰量の内臓脂肪細胞培養用培地(注文 Cat.No.: F-OM-AM)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日ごとに内臓脂肪培養用培地(注文 Cat.No.: F-OM-AM)で半量ずつ培地交換を行って下さい。

※ 内臓脂肪細胞は、分化誘導後、少なくとも3週間は形態・性質を維持します。

※ 内臓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。

■ 培地交換スケジュール(例)

培養日数	0 日目	1 日目	8 日目	11 日目	15 日目	18 日目	21 日目
培地交換	播種	培地交換	培地交換	培地交換	培地交換	培地交換	培地交換
	F-OM-PM	F-OM-PM ↓ F-OM-DM	F-OM-DM ↓ F-OM-AM	F-OM-AM ↓ F-OM-AM	F-OM-AM ↓ F-OM-AM	F-OM-AM ↓ F-OM-AM	F-OM-AM ↓ F-OM-AM

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/学術のお問い合わせ先)

〒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.dspbio.co.jp>

E-メール: labopro@bio.ds-pharma.co.jp