

ヒト皮下脂肪由来成体幹細胞培養マニュアル

■脂肪細胞への分化誘導方法■

- 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 2mL 添加し細胞懸濁液を調製する。細胞懸濁液を少量とり、トリパンブルーで染色したあと、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、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 インキュベーター内(37°C、5%CO₂)で培養する。
- ⑧ 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、脂肪前駆細胞培養用培地(注文 Cat.No.:F-PM-1)を脂肪細胞分化培地(カタログ番号:F-DM-2)に全量交換し、分化誘導を開始する。

※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こと。

培養容器	F-PM-1 から F-DM-2 への交換	
	取り除く培地量	加える培地量
96well プレート	150 μ L/well	150 μ L/well
48well プレート	500 μ L/well	500 μ L/well
24well プレート	1.0mL/well	1.0mL/well
12well プレート	2.0mL/well	2.0mL/well
6well プレート	3.0mL/well	3.0mL/well
75cm ² フラスコ	20mL/フラスコ	20mL/フラスコ
25cm ² フラスコ	7mL/フラスコ	7mL/フラスコ

- ⑨ 分化誘導開始から7日目に、下記表に従い、脂肪細胞分化培地(注文 Cat.No.: F-DM-2)を適量取り除き、脂肪細胞培養用培地(注文 Cat.No.: F-AM-1)を適量加える。

培養容器	F-DM-2 から F-AM-1 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

- ⑩ 実験まで3日おきに脂肪細胞培養用培地(注文 Cat.No.: F-AM-1)を半量ずつ交換する。

培養容器	F-AM-1 から F-AM-1 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	90 μ L/well
48well プレート	300 μ L/well	300 μ L/well
24well プレート	0.6mL/well	0.6mL/well
12well プレート	1.2mL/well	1.2mL/well
6well プレート	1.8mL/well	1.8mL/well
75cm ² フラスコ	12mL/フラスコ	12mL/フラスコ
25cm ² フラスコ	4.2mL/フラスコ	4.2mL/フラスコ

■ 骨芽細胞への分化誘導方法 ■

- 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 2mL 添加し細胞懸濁液を調整する。細胞懸濁液を少量とり、トリパンブルーで染色したあと、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、次ページ表に示した必要培地量で、細胞濃度を 3×10^4 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 インキュベーター内(37°C、5%CO₂)で培養する。
- ⑧ 24 時間後に、脂肪前駆細胞培養用培地(注文 Cat.No.:F-PM-1)を全量取り除き、骨芽細胞分化培地(注文 Cat.No.:F-OB-1)を下記表に従い交換する。

培養容器	F-PM-1 から F-OB-1 への交換	
	取り除く培地量	加える培地量
96well プレート	150 μ L/well	150 μ L/well
48well プレート	500 μ L/well	500 μ L/well
24well プレート	1.0mL/well	1.0mL/well
12well プレート	2.0mL/well	2.0mL/well
6well プレート	3.0mL/well	3.0mL/well
75cm ² フラスコ	20mL/フラスコ	20mL/フラスコ
25cm ² フラスコ	7mL/フラスコ	7mL/フラスコ

- ⑨ インキュベーター内(37°C、5%CO₂)で培養する。
- ⑩ 3 日おきに骨芽細胞分化培地(注文 Cat.No.:F-OB-1)を交換する。

■ 軟骨細胞への分化誘導方法 ■

- 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 2mL 添加し細胞懸濁液を調製する。細胞懸濁液を少量とり、トリパンブルーで染色したあと、細胞数を計測する。
- ⑥ 遠心管中の細胞懸濁液を脂肪前駆細胞培養用培地(注文 Cat.No.:F-PM-1)10mL で懸濁し、再度 1,500rpm で 1 分間遠心する。
- ⑦ 上清を取り除き、細胞を 1.2%アルギン酸溶液で 4×10^6 cells/mL の濃度になるように調製する。この際、泡立てないように注意する。
- ⑧ 6well プレートに 102mM CaCl₂ 溶液を 3mL 入れる。

- ⑨ 7で調製したアルギン酸懸濁液を10ccシリンジ(22G)で吸い取り、102mM CaCl₂溶液3mLを入れた6wellプレートにゆっくりと丁寧に10-30滴入れる。
- ⑩ 10分間室温で放置する。
- ⑪ ガラス製ピペットを用い、CaCl₂溶液を取り除く。この際、アルギン酸ビーズ(アルギン酸懸濁液)を吸い出さないように注意する。
- ⑫ アルギン酸ビーズ(アルギン酸懸濁液)を150mM NaCl溶液で3回洗浄後、DMEM(high glucose)で1回洗浄する。
- ⑬ 軟骨細胞分化培地(注文 Cat.No.:F-CM-1)を3mL加え、インキュベーター内(37°C、5%CO₂)で培養する。
- ⑭ 3日おきに軟骨細胞分化培地(注文 Cat.No.:F-CM-1)を交換する。

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