

取扱説明書番号: BMMN-832-03-22019-01

ヒト間葉系幹細胞 HMSC(AD)を用いた 脂質細胞分化試験 関連製品と使用方法

お願い: 「総合取扱説明書」および「ヒト間葉系幹細胞の製品情報」と合わせて、
使用前に必ずお読みください。

1. ヒト間葉系幹細胞用脂質細胞分化用培地 LIFELINE 製培地

クラホウ		LIFELINE		仕 様
製品番号	製品名	製品番号	製品名	
LWC-LL0050	AdipoLife Comp kit	LL-0050	AdipoLife Adipogenesis Medium Complete kit	ヒト間葉系幹細胞用脂質細胞分化培地(液体) 下記 LWB-LM0021 と LWR-LS1074 と LWR-LS-1075 のセット
LWB-LM0021	AdipoLife BM	LM-0021	AdipoLife Basal Medium	ヒト間葉系幹細胞脂質細胞分化基礎培地 容量: 100mL
LWR-LS1074	DiffFactor 1	LS-1074	DiffFactor 1	ヒト間葉系幹細胞脂質細胞分化添加剤 1 容量: 1mL
LWR-LS1075	DiffFactor 2	LS-1075	DiffFactor 2	ヒト間葉系幹細胞脂質細胞分化添加剤 2 容量: 5mL

AdipoLife BM は、フェノールレッド、抗菌剤が含まれておりません。これらの試薬をご使用の方は、別途ご購入ください。

2. オイルレッド O 染色に必要な調製試薬

以下の試薬および器材はキットに含まれておりませんのでご準備ください。

1. PBS(-) : ダルベッコ リン酸緩衝液
2. 4% パラホルムアルデヒド溶液 : 4% (v/v) パラホルムアルデヒド
市販の 4% ホルマリン溶液もしくは、ホルマリン溶液(37%)を PBS(-)で 10 倍希釈して作製。
3. 脱水溶液 : 100% 1,2-propanediol
4. オイルレッド O 溶液 : 1,2-propanediol 中に溶解した 0.5% (w/v) Oil Red O (Sigma 社: 型番 O0625)
一晩室温で攪拌もしくは加温(60°C)し溶解。不溶物が残るため使用直前にフィルターろ過。
5. オイルレッド O 洗浄溶液 : 85% (v/v) 1,2 propanediol (ナカライ: 型番 29218-35)
超純水で希釈調製。
6. 濾過用フィルターとシリンジ : 0.45 μm フィルター(推奨: クラホウ製ステラディスク 型番 S-2504)、10 mL シリンジ

3. 脂質合成のための分化培養

3.1 プレートへの植え込み

「総合取扱説明書」および「ヒト間葉系幹細胞の製品情報」中の「4. 細胞培養」に従い培養・継代したヒト間葉系幹細胞を、必要な数の 6 ウェルプレートへウェル当たり 2 ml の StemLife MSC 培地を用いて 18,000 個/cm² の細胞密度で播種します。

例： 継代培養での細胞浮遊液調製例

トリプシン処理で得られた培養細胞の生細胞数：900,000 個

細胞浮遊液量：5 ml

6 ウェルプレートのウェル当たりの面積：10 cm² の場合

- ・ 1 ウェルの植え込みに必要な細胞数：18,000 個/cm² × 10cm² = 180,000 個
- ・ 調製すべき細胞浮遊液濃度 180,000 個 ÷ 2ml = 90,000 個/ml
- ・ 細胞浮遊液の細胞密度 900,000 個 ÷ 5ml = 180,000 個/ml
- ・ 細胞浮遊液の希釈率 180,000 個 / 90,000 個 = 2 倍
- ・ 細胞浮遊液を培地で 2 倍希釈して、6 ウェルプレートへウェル当たり 2 ml ずつ播種。

- (1) プレートへ播種する前に、デイスホピペットを用いて調製した細胞浮遊液をよく分散させます。
- (2) 細胞浮遊液をウェルにゆっくりと添加します。勢いよく入れると細胞が不均一に接着することがあります。
- (3) 細胞が不均一な状態で接着しないように、添加後はプレートを左右に振ったり、回したりしないで下さい。播種後は速やかに細胞を播種したプレートを揺らさないようにしてインキュベーター(37℃、5% CO₂、加湿)に入れ、48 時間培養します。継代培養の操作は 30 分程度で完了させることをお勧めします。

3.2 AdipoLife の調製

AdipoLife BM 100 ml を 2 つに分け、それぞれに DifFactor 1 と DifFactor 2 を添加して、ヒト間葉系幹細胞の分化開始培地および分化維持培地を調製します。

- (1) 凍結状態の AdipoLife BM と DifFactor 1、DifFactor 2 を 37℃ のウォーターバスで温めて解凍します。
- (2) 解凍した 3 つの容器を 70% エタノールで消毒した後、クリーンベンチ内に入れます。
- (3) 以下の要領で 2 種の培地を調製します。

AdipoLife 分化開始培地：AdipoLife BM 100 ml から 15 ml を無菌的に 50 ml の遠沈管に抜き取り、そこへ DifFactor 1 を 1 ml 加え、穏やかに攪拌します。

AdipoLife 分化維持培地：残りの AdipoLife BM 85 ml へ DifFactor 2 を 5 ml 加え、穏やかに攪拌します。

いずれの培地も抗菌剤が含まれておりませんので、抗菌剤を添加されることを推奨します。

(推奨：クラボウ製 型番 HK-3510)

3.3 Adipogenesis の開始

「3.1 プレートへの植え込み」で 6 ウェルプレートにヒト間葉系幹細胞を植え込んだ 48 時間後に以下の要領で培地交換を行います。

- (1) StemLife MSC 培地を吸引し、ウェルあたり 2 ml の PBS を加えます。
- (2) PBS を吸引し、ウェルあたり 2 ml の AdipoLife 分化開始培地を加えます。
- (3) 6 ウェルプレートをインキュベーターに戻します。
- (4) 48 時間後に 2 ml のデイスホピペットを用いてウェルあたり 1 ml の培地を抜き取り、2 ml の AdipoLife 分化維持培地を加えます。(培地量は 3ml となります)。

注意：プレートを傾けないで下さい。分化培養を開始してからは、培地を完全には吸引せず単層の細胞を空気に触れさせないで下さい。培地を加える際はウエル壁面を沿わすようにしてゆっくりと添加して下さい。細胞層が空気に触れ乾くと脂質小胞が壊れる原因となります。

- (5) 培地交換は 3-4 日毎に 1 回、2 ml のディスプレイベツトを用いて 2ml の培地を抜き取り、2 ml の AdipoLife 分化維持培地を加えます。
- (6) 6 ウエルプレートへ播種してから 17 日間培養を行うことで脂質合成が十分に行われ、固定およびオイルレッド O による脂質染色が可能となります。

4. 脂質細胞の固定および染色

- (1) オイルレッド O 溶液を 37°C で 30 分以上加温した後、0.45 μ m のフィルターでろ過をし、37°C に加温しておきます。
- (2) 上記(1)の 37°C に加温したオイルレッド O 溶液を、もう一度 0.45 μ m のフィルターでろ過をし、再度 37°C に加温しておきます。
- (3) 染色する 6 ウエルプレート、PBS(-)、4% パラホルムアルデヒド溶液をクリーンベンチ内に入れます。
- (4) **6 ウエルプレートは傾けずに**、各ウエルに培地を少し(約 0.5ml)残すようにして培地を吸引します。(この際、細胞層が空気に触れないようにご注意ください。)
- (5) 2ml の PBS(-) をウエル壁面に沿わすようにしてゆっくりと添加します。
- (6) (4) と同様に PBS(-) を少し残すようにして吸引します。
- (7) 2ml の 4% パラホルムアルデヒド溶液をウエル壁面に沿わすようにしてゆっくりと添加します。
- (8) (4) と同様に 4% パラホルムアルデヒド溶液を少し残すようにして吸引します。
- (9) もう一度、2ml の 4% パラホルムアルデヒド溶液をウエル壁面に沿わすようにしてゆっくりと添加します。
- (10) 少なくとも 20 分間室温で静置します。
- (11) (4) と同様に 4% パラホルムアルデヒド溶液を少し残すようにして吸引します。
- (12) 2ml の超純水をウエル壁面に沿わすようにしてゆっくりと添加します。
- (13) (4) と同様に超純水を少し残すようにして吸引します。
- (14) もう一度(12)-(13)の操作を繰り返します。
- (15) 脱水溶液として 2ml の 100% 1,2-propanediol をウエル壁面に沿わすようにしてゆっくりと添加します。2,3 回ゆっくりと傾けて溶液をウエル内で混合します。
- (16) (4) と同様に 100% 1,2-propanediol を少し残すようにして吸引します。
- (17) 2ml のオイルレッド O 溶液をウエル壁面に沿わすようにしてゆっくりと添加します。
- (18) 少なくとも 30 分間 37°C で静置します。静止している間に、2,3 回ゆっくりと傾けて溶液をウエル内で混合します。
- (19) オイルレッド O 溶液を完全に除去して、2ml のオイルレッド O 洗浄溶液である 85% 1,2-propanediol をウエル壁面に沿わすようにしてゆっくりと添加します。
- (20) 1 分間室温で静置します。(この際、ウエル内の溶液を決して混ぜないでください)
- (21) 2ml の超純水をウエル壁面に沿わすようにしてゆっくりと添加します。
- (22) 超純水を吸引します。
- (23) もう一度 2ml の超純水をウエル壁面に沿わすようにしてゆっくりと添加します。(この状態で脂質の染色が完了します)

5. 培地・添加剤の保存安定性と品質管理

表1 分化培地・添加剤の保存安定性

	0℃未満	4℃冷蔵	37℃以上
AdipoLife BM	-20℃:ラベルに記載の期日まで	3週間	不可
DiffFactor 1	-20℃:ラベルに記載の期日まで	3週間	不可
DiffFactor 2	-20℃:ラベルに記載の期日まで	3週間	不可
AdipoLife Comp kit	-20℃:ラベルに記載の期日まで	3週間	不可

品質管理

基礎培地と分化添加剤のロット毎の組み合わせにおいて、脂質合成確認試験と無菌試験を行っています。

6. 毒劇物・危険物について

該当物はありません。

7. 免責事項

- (1) 使用期限を経過した製品の使用、弊社指定外の培地等を用いた製品の使用、日本国外での製品の使用、製品を改変・改造しての使用、その他本取扱説明書または各製品情報の記載に従わない製品を使用された場合、および本取扱説明書または各製品情報に記載の取扱い方法以外の方法で製品を取り扱われた場合に起因するいかなる損害につきましても、弊社は一切の責任を負いません。
- (2) 洪水、豪雪、豪雨、地すべり、地震、津波、突風、竜巻等の天災地変、火災、停電、労働紛争、原材料の入手手段の停止その他の不可抗力によって生じた製品に関連するいかなる損害につきましても、弊社は一切の責任を負いません。
- (3) 製品に関連して生じた逸失利益を含む結果的損害、派生的損害、間接損害、特別損害および第三者からの請求に基づくいかなる損害につきましても、弊社は一切の責任を負いません。
- (4) 購入された製品に関して弊社が責任を負う場合においても、弊社の責任はその製品の販売金額を超えないものとします。
- (5) 購入された製品に関して、弊社への返品はお受けできません。

輸入・販売元



倉敷紡績株式会社 環境メカトロニクス事業部 バイオメディカル部

・大阪

〒572-0823 大阪府寝屋川市下木田町 14-30 クラボウ先進技術センター2F

TEL.072-820-3079 FAX.072-820-3095

・東京

〒105-0004 東京都港区新橋 6丁目 19-15 東京美術倶楽部ビルディング 6F

TEL.03-6371-1390 FAX.03-6371-1396

URL: <https://www.kurabo.co.jp/bio/>

取扱説明書番号: BMMN-832-03-22018-01

ヒト間葉系幹細胞 HMSC(AD)を用いた 骨細胞分化試験 関連製品と使用方法

お願い: 「総合取扱説明書」および「ヒト間葉系幹細胞の製品情報」と合わせて、
使用前に必ずお読みください。

1. ヒト間葉系幹細胞用骨細胞分化用培地 LIFELINE 製培地

クラボウ		LIFELINE		仕 様
製品番号	製品名	製品番号	製品名	
LWC-LM0023	OsteoLife Comp Medium	LM-0023	OsteoLife Complete Osteogenesis Medium	ヒト間葉系幹細胞用骨細胞分化培地(液体)

OsteoLife BM は、フェノールレッド、抗菌剤が含まれておりません。これらの試薬をご使用の方は、別途ご購入ください。

2. アリザリンレッド S 染色に必要な調製試薬

以下の試薬はキットに含まれておりませんのでご準備下さい。

1. PBS(-) : ダルベッコ リン酸緩衝液
2. 0.6% アンモニア溶液 : 28% アンモニア水を超純水で希釈。
3. 2% アリザリンレッド S 溶液 : 下記参照ください。(※)
4. 無水エタノール
5. 超純水

※ 2% アリザリンレッド S 溶液 の作製方法

- (1) 50m容ビーカーに20mlの超純水を入れる。
- (2) 上記ビーカーへ28% アンモニア水を643μl入れ混合する。
- (3) Alizarin Red S 0.6gを加えて、攪拌する。
- (4) pHメーターで測定しながら6N塩酸を用いてpH4.1~4.2に調製すると、Alizarin Redは溶解する。
- (5) ビーカーの溶液をメスフラスコに移して超純水で30mlにフィルアップする。

3. 骨合成のための分化培養

3.1 プレートへの植え込み

「総合取扱説明書」および「ヒト間葉系幹細胞の製品情報」中の「4. 細胞培養」に従い培養・継代したヒト間葉系幹細胞を、必要な数の 6 ウェルプレートへウェル当たり 2 ml の StemLife MSC 培地を用いて 18,000 個/cm² の細胞密度で播種します。

継代培養での細胞浮遊液の調製例

トリプシン処理で得られた培養細胞の生細胞数: 900,000 個

細胞浮遊液量: 5 ml

6 ウェルプレートのウェル当たりの面積: 10 cm² の場合

- ・ 1 ウェルの植え込みに必要な細胞数: 18,000 個/cm² × 10cm² = 180,000 個
- ・ 調製すべき細胞浮遊液濃度 180,000 個 ÷ 2ml = 90,000 個/ml
- ・ 細胞浮遊液の細胞密度 900,000 個 ÷ 5ml = 180,000 個/ml
- ・ 細胞浮遊液の希釈率 180,000 個 / 90,000 個 = 2 倍
- ・ 細胞浮遊液を培地で 2 倍希釈して、6 ウェルプレートへウェル当たり 2 ml ずつ播種。

- (1) プレートへ播種する前に、ティスポピペットを用いて調製した細胞浮遊液をよく分散させます。
- (2) 細胞浮遊液をウェルにゆっくりと添加します。勢いよく入れると細胞が不均一に接着することがあります。
- (3) 細胞が不均一な状態で接着しないように、添加後はプレートを左右に振ったり、回したりしないで下さい。播種後は速やかに細胞を播種したプレートを揺らさないようにしてインキュベーター(37℃、5% CO₂、加湿)に入れ、48 時間培養します。継代培養の操作は 30 分程度で完了させることをお勧めします。

3.2 OsteoLife の調製

凍結状態の OsteoLife Comp Medium を 37℃ のウォーターバスで温めて解凍します。

培地には抗菌剤が含まれておりませんので、抗菌剤を添加されることを推奨します。

3.3 Osteogenesis の開始

「7.1 プレートへの植え込み」で 6 ウェルプレートにヒト間葉系幹細胞を植え込んだ 48 時間後に以下の要領で培地交換を行います。

- (1) StemLife MSC 培地(劇)を吸引し、ウェルあたり 2 ml の PBS(-)を加えます。
- (2) PBS(-)を吸引し、ウェルあたり 2 ml の OsteoLife 培地を加えます。
- (3) 6 ウェルプレートをインキュベーターに戻します。
- (4) 3-4 日後に 2 ml のティスポピペットを用いてウェルあたり 1ml の培地を抜き取り、2 ml の OsteoLife 培地を加えます。(培地量は 3ml となります)。

注意: プレートを傾けないで下さい。分化培養を開始してからは、培地を完全には吸引せず細胞層を空気に触れさせないで下さい。培地を加える際はウェル壁面を沿わずようしてゆっくりと添加してください。

- (5) 培地交換は 3-4 日毎に 1 回、2 ml のティスポピペットを用いて 2ml の培地を抜き取り、2 ml の OsteoLife 培地を加えます。
- (6) 6 ウェルプレートへ播種してから 21 日間培養を行うことで骨合成が十分に行われ、固定およびアリザリンレッド S による骨細胞の染色が可能となります。

4. 骨細胞の固定および染色

- (1) 染色する6ウェルプレート、PBS(-)、無水エタノール、2% アリザリンレッド S をクリーンベンチ内に入れます。
- (2) 培地を吸引します。
- (3) 1mlの PBS(-)をウェル壁面に沿わすようにしてゆっくりと添加します。
- (4) PBS(-)を吸引します。
- (5) 3mlの無水エタノールをウェル壁面に沿わすようにしてゆっくりと添加します。
- (6) 30 分間室温で静置します。
- (7) 無水エタノールを吸引し、フタを外してクリーンベンチの通風位置に逆さまにして約 30 分間、静置、乾燥させます。
- (8) 1mlの 2% アリザリンレッド S 溶液を壁面に沿わすようにしてゆっくりと添加し、ウェル全体を覆います。
- (9) 15 分間室温で静置します。
- (10) 2% アリザリンレッド S 溶液を吸引します。
- (11) 1mlの超純水をウェル壁面に沿わすようにしてゆっくりと添加します。
- (12) 超純水を吸引します。
- (13) (11)、(12)の操作をさらに 2 回行い、洗浄します。
- (14) 乾燥させます。(この状態で骨の染色が完了します)

5. 培地の保存安定性と品質管理

表 1 分化培地・添加剤の保存安定性

	0°C未満	4°C冷蔵	37°C以上
OsteoLife Comp Medium	-20°C:ラベルに記載の期日まで	3 週間	不可

品質管理

基礎培地と分化添加剤のロット毎の組み合わせにおいて、骨合成確認試験と無菌試験を行っています。

6. 毒劇物・危険物

該当物はありません。

7. 免責事項

- (1) 使用期限を経過した製品の使用、弊社指定外の培地等を用いた製品の使用、日本国外での製品の使用、製品を改変・改造しての使用、その他本取扱説明書または各製品情報の記載に従わない製品を使用した場合、および本取扱説明書または各製品情報に記載の取扱い方法以外の方法で製品を取り扱われた場合に起因するいかなる損害につきましても、弊社は一切の責任を負いません。
- (2) 洪水、豪雪、豪雨、地すべり、地震、津波、突風、竜巻等の天災地変、火災、停電、労働紛争、原材料の入手手段の停止その他の不可抗力によって生じた製品に関連するいかなる損害につきましても、弊社は一切の責任を負いません。
- (3) 製品に関連して生じた逸失利益を含む結果的損害、派生的損害、間接損害、特別損害および第三者からの請求に基づくいかなる損害につきましても、弊社は一切の責任を負いません。
- (4) 購入された製品に関して弊社が責任を負う場合においても、弊社の責任はその製品の販売金額を超えないものとします。
- (5) 購入された製品に関して、弊社への返品はお受けできません。

輸入・販売元



倉敷紡績株式会社 環境メカトロニクス事業部 バイオメディカル部

・大阪

〒572-0823 大阪府寝屋川市下木田町 14-30 クラボウ先進技術センター2F
TEL.072-820-3079 FAX.072-820-3095

・東京

〒105-0004 東京都港区新橋 6 丁目 19-15 東京美術倶楽部ビルディング 6F
TEL.03-6371-1390 FAX.03-6371-1396

URL: <https://www.kurabo.co.jp/bio/>

'22.12 ©

取扱説明書番号: BMMN-832-03-22020-01

ヒト間葉系幹細胞 HMSC(AD)を用いた 軟骨細胞分化試験 関連製品と使用方法

お願い: 「総合取扱説明書」および「ヒト間葉系幹細胞の製品情報」と合わせて、
使用前に必ずお読みください。

1. ヒト間葉系幹細胞用軟骨細胞分化用培地 LIFELINE 製培地

クラホウ		LIFELINE		仕 様
製品番号	製品名	製品番号	製品名	
LWC-LM0022	ChondroLife Comp Medium	LM-0022	ChondroLife Complete Chondrogenesis Medium	ヒト間葉系幹細胞用 軟骨細胞分化培地(液体)

ChondroLife BM は、フェノールレッド[®]、抗菌剤が含まれておりません。これらの試薬をご使用の方は、別途ご購入ください。

2. 軟骨細胞分化試験に必要な試薬と調製

軟骨細胞分化には 3 次元に凝集させた細胞培養が必要になります。Micromass culture も実施可能ですが、ここでは軟骨細胞を含むアルギン酸カプセル封入の方法を説明します。この方法によりプロテオグリカンの沈着形成が確認できます。

2-1. アルギン酸カプセル封入による軟骨細胞分化実験のための試薬を示します。以下の試薬および器材はキットに含まれておりませんのでご準備下さい。

1. 1.5% (w/v) アルギン酸ナトリウム (※調製方法は下記を参照ください)
2. シリンジ (3ml サイズ)、注射針 (27 ゲージ)
3. 吸引ろ過システム (Millipore 社の Steriflip[®] Cat#SE1M179M6 など)
4. 広口径のピペットチップ
5. 滅菌済み 150mM 塩化ナトリウム溶液
6. 滅菌済み 100mM 塩化カルシウム溶液
7. マグネティックスターラーおよびスターラーバー (サイズ: 25mm ほど)
8. 滅菌済み 250mL ビーカー
9. 滅菌済みピンセット、スターラーバー除去器具

※ 1.5% (w/v) アルギン酸ナトリウムの調製方法

- a. 10mL の 150mM 塩化ナトリウム溶液をスターラーバーで強く攪拌しておく。
- b. 0.15g のアルギン酸ナトリウムを加え室温で少なくとも 2 時間から一晩、アルギン酸ナトリウムが完全に溶解するまで攪拌する。
- c. 溶液を 0.22 μm の滅菌フィルターでろ過し、4℃にて保管する (保存期間は最大 1 週間)。

2-2. Alcian Blue 染色のために必要な試薬および器具

1. 1.0% (w/v) Alcian Blue 溶液 (3% 酢酸溶液に alcian blue 8GX powder (Sigma 社、型番 05500) を溶解)
2. 4% (v/v) ハラホルムアルデヒド溶液
3. 20% (w/v) シュクロース溶液 (超純水に溶解)
4. 3% (v/v) 酢酸溶液 (酢酸を超純水で希釈)
5. クライオスタット、OCT (Optimal Cutting Temperature) コンパウンド、プラスチック製クライオモールド

3. 軟骨合成のための分化培養

3-1. ChondroLife の調製

凍結状態の ChondroLife Comp Medium を 37°C のウォーターバスで温めて解凍します。

培地には抗菌剤が含まれておりませんので、抗菌剤を添加されることを推奨します。

3-2. アルギン酸カプセル封入した細胞 (軟骨形成マイクロビーズ) の調製方法

- (1) 1.0ml のアルギン酸カプセル封入した細胞 (軟骨形成マイクロビーズ) を調製するには、ヒト間葉系幹細胞が最低 2,500 万 個 (T-75 フラスコにして 9-15 個) が必要です。1.5% (w/v) アルギン酸ナトリウム溶液は、細胞浮遊液の添加によりその濃度が 1.2% (w/v) 以下になるとマイクロビーズ形成がうまくできません。このため最低 2,500 万個の細胞を 800 μ l の 1.5% (w/v) アルギン酸ナトリウム溶液で再懸濁します。このときアルギン酸と細胞からなる溶液中に気泡が入らないように注意してゆっくりと混ぜます。
- (2) 滅菌済み 250ml ビーカーに、75ml の滅菌済み 100mM 塩化カルシウム溶液とスターラーバーをいれ、溶液中央部に緩やかな傾斜の渦ができる程度に攪拌しておきます。
- (3) 注射針 (27 ゲージ) を付けたシリンジ (3ml サイズ) に、アルギン酸と細胞からなる溶液を入れます。
- (4) アルギン酸と細胞からなる溶液が注射針の先から 1 本の流れになる程度の速度で素早く塩化カルシウム溶液に向けて注ぎ入れ、軟骨形成マイクロビーズを溶液中に作ります。
- (5) アルギン酸を十分に固めるために、マイクロビーズを含む溶液をさらに 10 分間攪拌します。
- (6) ビーカーをスターラーから下ろし、マイクロビーズを沈めます。
- (7) マイクロビーズの入った溶液を、吸引ろ過システムの円錐管に移し、素早く吸引します。
- (8) マイクロビーズにダメージが出ないように溶液が除去されたらすぐに吸引を止めます。
- (9) 2 ml の ChondroLife Complete Chondrogenesis Medium でマイクロビーズを再懸濁します。
- (10) 48 ウェルプレートの 1 つのウェルに無菌的にウェル底面を覆うように十分な懸濁液を添加します。
- (11) 以上の方法で 48 ウェルプレートのおよそ 4 ウェルに播種することができます。
- (12) ウェル底面にマイクロビーズが沈んだ後、残っているカルシウムを除くために培地を吸引後、0.5 ml の ChondroLife Complete Chondrogenesis Medium を添加します。この操作を 2 回行います。
- (13) インキュベーター (37°C、5% CO₂、加湿) に入れ、培養します。
- (14) 培地交換は 2-3 日毎に 1 回、マイクロビーズ内の細胞を動かしたり、誤って吸引しないように注意して培地を吸引後、0.5 ml の ChondroLife Complete Chondrogenesis Medium を添加し、インキュベーター (37°C、5% CO₂、加湿) に入れ培養します。
- (15) 48 ウェルプレートへ播種してから 21 日間培養を行うことで軟骨合成が十分に行われ、マイクロビーズは固定およびプロテオグリカン沈着の染色が可能となります。硫酸化プロテオグリカンのアッセイにはアルシアンブルーの使用をお勧めします。

4. 軟骨細胞の固定および染色

48 ウェルプレート中に調製したマイクロピースの固定および染色方法

- (1) 軟骨合成をしたマイクロピースを含む 48 ウェルプレートから完全に培地を吸引除去します。
- (2) 4% グルタルアルデヒド溶液を 0.5 ml 添加し、3 時間固定します。この間光に当たらないようにしてください。
- (3) 固定溶液を吸引除去し、20% シュクロース溶液を 0.5 ml 添加します。
- (4) 室温で一晩おきます。
- (5) ミクロームやクライオスタットで切片作製するため、OCT (Optimal Cutting Temperature) コンパウンド等の材料にマイクロピースを包埋する準備を行うため、4°C で保管します。
- (6) マイクロピースをプラスチック製クライオモールドに移します。
- (7) 余分なシュクロース溶液を除去します。
- (8) マイクロピースの上から OCT コンパウンドで覆い、マイクロピースがクライオモールドの底に固定するようにします。
- (9) ドライアイスの入ったエタノール浴にクライオモールドを入れて瞬間的に凍結します。その後切片作製までは -80°C で保管します。
- (10) ブロックから 5 μm の切片を切り、スライドガラスにマウントします。
- (11) スライドを 3% 酢酸溶液に 3 分間漬けます。
- (12) スライドを 1.0% Alcian Blue 溶液に 30 分間漬けます。
- (13) 水道水中に 1 分間漬け、洗浄します。
- (14) 脱水のため、エタノールに漬けてすぐに取り出し、風乾します。

5. 培地・添加剤の保存安定性と品質管理

表 1 分化培地・添加剤の保存安定性

	0°C 未満	4°C 冷蔵	37°C 以上
ChondroLife Comp Medium	-20°C: ラベルに記載の期日まで	3 週間	不可

品質管理

基礎培地と分化添加剤のロット毎の組み合わせにおいて、骨合成確認試験と無菌試験を行っています。

6. 毒劇物・危険物について

該当物はありません。

7. 免責事項

- (1) 使用期限を経過した製品の使用、弊社指定外の培地等を用いた製品の使用、日本国外での製品の使用、製品を改変・改造しての使用、その他本取扱説明書または各製品情報の記載に従わない製品を使用した場合、および本取扱説明書または各製品情報に記載の取扱い方法以外の方法で製品を取り扱われた場合に起因するいかなる損害につきましても、弊社は一切の責任を負いません。
- (2) 洪水、豪雪、豪雨、地すべり、地震、津波、突風、竜巻等の天災地変、火災、停電、労働紛争、原材料の入手手段の停止その他の不可抗力によって生じた製品に関連するいかなる損害につきましても、弊社は一切の責任を負いません。
- (3) 製品に関連して生じた逸失利益を含む結果的損害、派生的損害、間接損害、特別損害および第三者からの請求に基づくいかなる損害につきましても、弊社は一切の責任を負いません。
- (4) 購入された製品に関して弊社が責任を負う場合においても、弊社の責任はその製品の販売金額を超えないものとします。
- (5) 購入された製品に関して、弊社への返品はお受けできません。

輸入・販売元



倉敷紡績株式会社 環境メカトロニクス事業部 バイオメディカル部

・大阪

〒572-0823 大阪府寝屋川市下木田町 14-30 クラボウ先進技術センター2F
TEL.072-820-3079 FAX.072-820-3095

・東京

〒105-0004 東京都港区新橋 6 丁目 19-15 東京美術倶楽部ビルディング 6F
TEL.03-6371-1390 FAX.03-6371-1396

URL: <https://www.kurabo.co.jp/bio/>

‘22.12 ©