KURABO

研究専用試薬

取扱説明書番号:BMMN-832-03-22019-02

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

クラボウ		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	DifFactor 1	LS-1074	DifFactor 1	ヒト間葉系幹細胞脂質細胞分化添加剤 1 容量:1mℓ
LWR-LS1075	DifFactor 2	LS-1075	DifFactor 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、ﾌｪﾉｰﾙﾚｯﾄﾞ、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(−) : ﾀﾞﾙﾍﾞｯｺ ﾘﾝ酸緩衝液
2. 4% ﾊﾟﾗﾎﾙﾑｱﾙﾃﾞﾋﾄﾞ溶液 : 4% (v/v) ﾊﾟﾗﾎﾙﾑｱﾙﾃﾞﾋﾄﾞ
   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. ｵｲﾙﾚｯﾄﾞ 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℃)し溶解。不溶物が残るため使用直前にﾌｨﾙﾀｰろ過。
5. ｵｲﾙﾚｯﾄﾞ 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ｼﾞ : 0.45μm ﾌｨﾙﾀｰ(推奨:ｸﾗﾎﾞｳ製ｽﾃﾗﾃﾞｨｽｸ 型番S-2504)、10 mℓｼﾘﾝｼﾞ

3. 脂質合成のための分化培養

3.1 ﾌﾟ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 ｳｴﾙﾌﾟﾚｰﾄへｳｴﾙ当り 2 mℓの StemLife MSC 培地を用いて 18,000 個/cm^2 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

ﾄﾘﾌﾟ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 ｳｴﾙﾌﾟﾚｰﾄのｳｴﾙ当りの面積:10 cm^2 の場合

- 1 ｳｴﾙの植え込みに必要な細胞数:18,000 個/cm^2 x10cm^2=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 ｳｴﾙﾌﾟﾚｰﾄへｳｴﾙ当り 2 mℓずつ播種。

(1) ﾌﾟﾚｰﾄへ播種する前に、ﾃﾞｨｽﾎﾟﾋﾟﾍﾟ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) 細胞浮遊液をｳｴ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、添加後はﾌﾟ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ﾌﾟﾚｰﾄを揺らさないようにしてｲﾝｷｭﾍﾞｰﾀｰ(37℃、5% CO_2、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℃のｳｵｰﾀｰﾊﾞ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、ｸﾘｰﾝﾍﾞﾝﾁ内に入れます。
(3) 以下の要領で 2 種の培地を調製します。

<u>AdipoLife 分化開始培地</u>: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。

<u>AdipoLife 分化維持培地</u>: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 ﾌﾟﾚｰﾄへの植え込み」で 6 ｳｴﾙﾌﾟ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、ｳｴﾙあたり 2 mℓの PBS を加えます。
(2) PBS を吸引し、ｳｴﾙあたり 2 mℓの AdipoLife 分化開始培地を加えます。
(3) 6 ｳｴﾙﾌﾟﾚｰﾄをｲﾝｷｭﾍﾞｰﾀに戻します。
(4) 48 時間後に 2 mℓのﾃﾞｨｽﾎﾟﾋﾟﾍﾟｯﾄを用いてｳｴﾙあたり 1mℓの培地を抜き取り、2 mℓ の AdipoLife 分化開始培地を加えます。(培地量は 3mℓとなります)。

注意： ﾌﾟ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ください。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のﾃﾞｨｽﾎﾟﾋﾟﾍﾟｯﾄを用いて 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 ｳｴﾙﾌﾟ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ﾄﾞ 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) ｵｲﾙﾚｯﾄﾞ O 溶液を 37℃で 30 分以上加温した後、0.45μm のﾌｨﾙﾀｰでろ過をし、37℃に加温しておきます。

(2) 上記(1)の 37℃に加温したｵｲﾙﾚｯﾄﾞ O 溶液を、もう一度 0.45μm のﾌｨﾙﾀｰでろ過をし、再度 37℃に加温しておきます。

(3) 染色する 6 ｳｴﾙﾌﾟﾚｰﾄ、PBS(-)、4% ﾊﾟﾗﾎﾙﾑｱﾙﾃﾞﾋﾄﾞ溶液をｸﾘｰﾝﾍﾞﾝﾁ内に入れます。

(4) **6 ｳｴﾙﾌﾟﾚｰﾄは傾けずに**、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% ﾊﾟﾗﾎﾙﾑｱﾙﾃﾞﾋﾄﾞ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% ﾊﾟﾗﾎﾙﾑｱﾙﾃﾞﾋﾄﾞ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% ﾊﾟﾗﾎﾙﾑｱﾙﾃﾞﾋﾄﾞ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% ﾊﾟﾗﾎﾙﾑｱﾙﾃﾞﾋﾄﾞ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のｵｲﾙﾚｯﾄﾞ 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℃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) ｵｲﾙﾚｯﾄﾞ O 溶液を完全に除去して、2mℓ のｵｲﾙﾚｯﾄﾞ 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℃:ﾗﾍﾞﾙに記載の期日まで	3 週間	不可
DifFactor 1	−20℃:ﾗﾍﾞﾙに記載の期日まで	3 週間	不可
DifFactor 2	−20℃:ﾗﾍﾞﾙに記載の期日まで	3 週間	不可
AdipoLife Comp kit	−20℃:ﾗﾍﾞ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

クラボウ

倉敷紡績株式会社 環境メカトロニクス事業部 ライフサイエンス部

･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/

'25.04 Ⓟ