

凍結初代細胞製品

# マウス皮下脂肪由来間葉系幹（間質）細胞

【Mouse adipose tissue-derived mesenchymal stem/stromal cell, Code No. MSA11C】

本製品は研究目的にのみご使用になれます。

2021年12月17日作成

## I. 製品概要

体性幹細胞の一種である間葉系幹細胞（MSC：Mesenchymal Stem Cells）は、脂肪組織、骨髄、臍帯、歯髄などから分離することが可能です。2006年に Dominici らは、ヒトの間葉系幹細胞について、①プラスチック培養容器に接着する、②CD105、CD73、CD90 を陽性マーカーとする、CD45、CD34、HLA-ClassII（DR）、CD14 または CD11b、CD79a、CD19 を陰性マーカーとする、③骨細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化能を有する、の3条件を満たす細胞と定義しました<sup>1)</sup>。

脂肪組織由来の間葉系幹（間質）細胞（AMSC / ASC：Adipose Delivered Mesenchymal Stromal(Stem) Cells / Adipose Delivered Stromal(Stem) Cells）は、脂肪吸引など比較的低侵襲な方法で多量に得ることが可能であり<sup>2)</sup>、優れた自己増殖性に加え、骨、軟骨、脂肪のみならず肝などへの多分化能力を持ち<sup>3)5)</sup>、MHC Class-II を発現せず<sup>3)</sup>、免疫調整機能を持つ<sup>4)</sup>、疾患部位に集積し様々なサイトカインや増殖因子を分泌して<sup>5)</sup>、組織再生・修復を促進する効果がある、などの優れた特徴が知られております。

本製品は、ICR マウスの皮下脂肪組織から分離させた細胞群から、骨細胞、脂肪細胞および軟骨細胞への分化能を有している AMSC 画分を採取後、凍結保存した間葉系幹（間質）細胞です。

## II. 使用前注意事項

本マニュアルを使用前に必ずご確認ください。

本製品はすべて【無菌操作】で実施して下さい。バイオセーフティーレベルは【レベル1】です。

本製品の培養には別売の専用メディアウムをご使用下さい。

## III. 製品の保証について

細胞を液体窒素にて正しく保存し、専用メディアウム及び試薬を用いてマニュアル通りに培養された場合のみ、培養開始後の増殖不良に関して保証致します。

当社、製品サポート（メール：[primarycell@cosmobio.co.jp](mailto:primarycell@cosmobio.co.jp)）までご連絡下さい。

保証期限は【製品お受け取りから6ヶ月以内】です。

メディアウムや使用方法に変更を加えられた場合や、再凍結した細胞を使用された場合は、保証の対象になりませんのでご注意ください。

#### IV. 製品構成

構成	容量	本数	保存方法	有効期限
マウス皮下脂肪由来 間葉系幹（間質）細胞 （凍結細胞）	1×10 <sup>6</sup> cells/バイアル	1本	液体窒素保存	6ヶ月

※本細胞は、ドライアイス梱包で発送しています。

受け取り後、直ちにご使用にならない場合は、凍結細胞を液体窒素にて保存してください。

#### V. 細胞の由来

マウス胴回り皮下白色脂肪組織由来（ICR マウス、成獣・オス）

#### VI. 専用メディアウム(別売)

品名	製品コード	構成	容量	本数	保存方法	有効期限
ラット/マウス 皮下脂肪由来 間葉系幹細胞 増殖用メディア ウムセット	MSA-GM	増殖用 メディアウム	200 mL	1本	-20℃保存 (解凍後は 4℃保存)	ボトルに記載 (-20℃保存) 解凍後は3ヶ月 (4℃保存) ※サプリメントは2週 間(4℃保存)
		サプリメント	50 µL	2本		

培地の主成分：DMEM、血清、抗生剤、その他

#### VII. 関連製品

コラーゲンコート用溶液（増殖、分化時に使用します。）

品名	製品コード	容量
コラーゲンコート用溶液	SCO	100 mL

(メーカー略号：PMC)

#### 0.05%トリプシン-EDTA 溶液

品名	製品コード	容量
Trypsin EDTA Solution C(0.05%),EDTA(0.02%)	03-053-1B	100 mL

(Biological Industries Ltd. メーカー略号：BLG)

#### 培養細胞凍結保存液

品名	製品コード	容量
COS banker	COS-CFM01	120 mL

(メーカー略号：KOJ)

### 脂肪染色キット

品名	製品コード	構成品	容量
リピットアッセイキット	AK09F	オイルレッド O 原液	150 mL 2本
		抽出液	200 mL 2本

(メーカー略号：PMC)

### 骨染色キット

品名	製品コード	構成品	容量
石灰化染色キット	AK21	緩衝液 (100 倍濃縮)	60 mL 1本
		染色基質	10 mL 用 10本

(メーカー略号：PMC)

## VIII. 操作方法

※本製品は【1回のみ継代可能】であることを確認しています。

(2回以上の継代は増殖速度や分化効率に影響を及ぼす可能性があります。)

### 増殖用メディウム調製

- ① 増殖用メディウムを室温等で解凍し、100 mL を新しいメディウムボトルに移します。残りの増殖用メディウムは、4℃で3ヶ月間保存可能です。
- ② 増殖用メディウム 100 mL に対して、サプリメント 1 本 (50  $\mu$ L) を解凍し添加してください。サプリメント添加後の増殖用メディウムは、4℃で2週間保存可能です。

### コラーゲンコート方法

#### 【準備するもの】

- ・ご使用になる培養容器
- ・コラーゲンコート用溶液 (製品コード：SCO)
- ・PBS (-) または HBSS (-)

- ① 使用する培養容器にコラーゲンコート用溶液 (製品コード：SCO) が覆われる程度加え (100 mm ディッシュで 5 mL 程度)、1 時間以上 (ガラス底の場合は一晩) 静置後に除去します。
- ② PBS (-) または HBSS (-) で 2 回洗浄後、PBS (-) または HBSS (-) を加えて、1 時間以上静置してからご使用してください。  
ただちに使用しない場合は PBS (-) または HBSS (-) を満たして室温で数日間保存可能です。

### 細胞の解凍・播種

※100 mm ディッシュで培養する場合のプロトコールです。

#### 【準備するもの】

- ・ラット/マウス皮下脂肪由来間葉系幹細胞増殖用メディウム (品番：MSA-GM)
- ・コラーゲンコート済みの細胞培養用 100 mm ディッシュ 5 枚
- ・滅菌済ピペット、遠心チューブなどの培養器具

- ① 凍結細胞を 37℃温水にて 90～120 秒間解凍してください。(数 mm の氷塊が残る程度)
- ② 解凍した細胞液を、予め室温に戻した増殖用メディウム 10 mL が入っている 15 mL コニカルチューブに移します。穏やかに混和した後、室温、100xg で 5 分間遠心してください。
- ③ 上清を吸引除去し、10 mL の増殖用メディウムを加え、細胞を懸濁させてください。
- ④ コラーゲンコート済みの 100 mm ディッシュ 5 枚に、細胞懸濁液を 2 mL ずつ、増殖用メディウムを 8 mL ずつ加え、5%CO<sub>2</sub> 存在下の 37℃インキュベーターで培養してください。
- ⑤ 播種した翌日 (培養 1 日目)、37℃に保温した増殖用メディウムで培地交換してください。
- ⑥ 70～80%コンフルエント (培養 2～3 日目) で継代・分化誘導実験等を行ってください。

### 細胞の継代 (100 mm ディッシュから継代の場合)

#### 【準備するもの】

- ・ 70～80%コンフルエントになった細胞
- ・ 調製済みのラット/マウス皮下脂肪由来間葉系幹細胞増殖用メディウム
- ・ PBS (－) または HBSS (－)
- ・ 0.05%トリプシン-EDTA 溶液 (製品コード : 03-053-1B)
- ・ コラーゲンコート済みの細胞培養用容器

- ① 70～80%コンフルエント (培養 2～3 日目) になった細胞の培養容器から、古い増殖用メディウムを除去し、PBS (－) または HBSS (－) で 1～2 回洗浄します。
- ② 0.05%トリプシン-EDTA 溶液 (製品コード : 03-053-1B) を 3 mL 入れ、観察しながら 37℃で 1～2 分間インキュベートします。
- ③ 培養容器を水平に軽くたたいた後、顕微鏡で細胞が剥がれた事を確認します。剥がれていない時は、さらに 37℃で 1 分間インキュベートします。
- ④ 増殖用メディウムを 10 mL 加え、トリプシンの活性を止め、ピペッティングして細胞を遠心チューブに回収します。
- ⑤ 室温、100xg、5 分間遠心後、上清を除去し、増殖用メディウムを適量加えて懸濁し、細胞を分散させます。
- ⑥ 細胞数をカウント後、目的の実験に必要な細胞密度に調整し、播種、分化誘導実験等を行ってください。

#### 注意)

- ・ 長時間の 0.05%トリプシン-EDTA 溶液での処理は、細胞の状態を悪化させます。

## 凍結ストックの調製

### 【準備するもの】

- ・ 70～80%コンフルエントになった細胞
- ・ 調製済みのラット/マウス皮下脂肪由来間葉系幹細胞増殖用メディウム
- ・ PBS (－) または HBSS (－)
- ・ 0.05%トリプシン-EDTA 溶液 (製品コード : 03-053-1B)
- ・ 培養細胞凍結保存液 (製品コード : COS-CFM01)
- ・ 凍結保存用チューブ
- ・ 細胞凍結用コンテナ (CoolCell BM 機器 製品コード : BCS-136 など)

- ① 継代方法の①～④を行います。
- ② 室温、100xg、5 分間遠心後、上清を除去し、メディウムを適量加えて再懸濁し細胞をカウントします。
- ③ 再度、室温、100xg、5 分間遠心を行った後、上清を除去し、培養細胞凍結保存液 (製品コード : COS-CFM01) を  $1 \times 10^6$  cells/mL になる様に加えて懸濁します。
- ④ 細胞を凍結保存用チューブに分注し、細胞凍結用コンテナ等を用いて  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結します。
- ⑤ 翌日以降、液体窒素容器に移して保存してください。

## IX. 技術情報

### 細胞形態写真

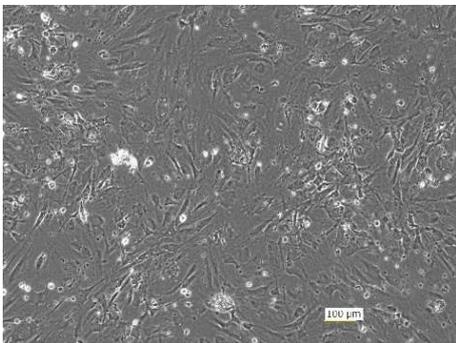


図 1) 培養 4 日目の細胞  
(増殖用メディウムで培養)



図 2) 脂肪分化した細胞  
(リピッドアッセイキットにて染色)

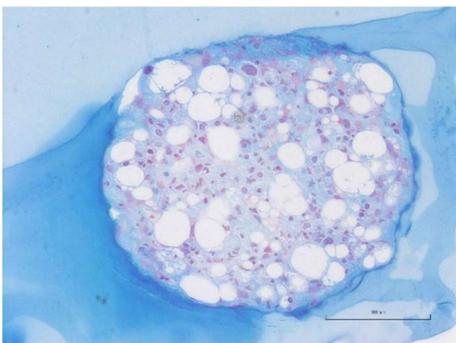


図 3) 軟骨分化した細胞  
(アルシアンブルーにて染色)

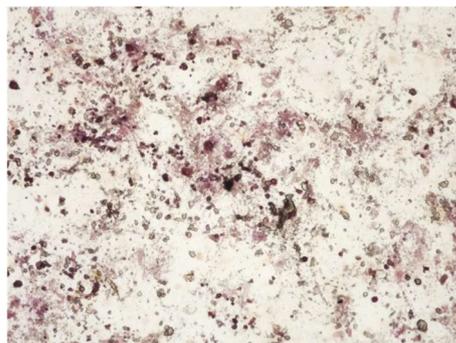


図 4) 骨分化した細胞  
(石灰化染色キットにて染色)

X. 《参考文献》

- 1) Dominici M et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4):315-7.
- 2) John K. F et al. Fat tissue\_an underappreciated source of stem cells for biotechnology, *Trends Biotechnol.* 2006 Apr; 24(4):150-4.
- 3) Le Blanc K. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2005 May; 11(5):321-34.
- 4) Alma J N et al. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood.* 2007 Nov 15; 110(10):3499-506
- 5) Banas A et al. IFATS collection: In vivo therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury. *Stem Cells.* 2008 Oct; 26(10):2705-12.

《本製品をご利用になられた文献、発表データ》

本製品をご利用いただき投稿された論文、学会発表パネルなどを送付いただきましたお客様に粗品を進呈させていただきます。ご提供いただきました論文などは、WEB やカタログ、技術資料を通じて多くの研究者の方への技術情報として利用させていただく場合がございます。是非皆様のご協力をお願いいたします。

送付先：〒047-0261 北海道小樽市銭函3丁目513番2  
コスモ・バイオ株式会社 札幌事業部 あて郵送  
または primarycell@cosmobio.co.jp あてPDFファイル送信



〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル  
URL : <http://www.cosmobio.co.jp/>

● 営業部（お問い合わせ）

TEL : (03) 5632-9610 FAX : (03) 5632-9619  
TEL : (03) 5632-9620

● 札幌事業部（技術的なお問い合わせ）

TEL : (0134) 61-2301 FAX : (0134) 61-2295  
E-mail : primarycell@cosmobio.co.jp