

# 幹細胞抽出培養シートを用いた脂肪幹細胞の抽出と培養

## 幹細胞抽出培養シートについて

幹細胞抽出培養シート(以下“シート”と記載)にヒトの脂肪または脂肪幹細胞を播種すると、脂肪幹細胞がシートを構成する繊維を足場として迅速に増殖する。増殖した脂肪幹細胞は、トリプシン処理によってシートから剥離・回収することができる。また、脂肪幹細胞シートとしてそのまま動物に移植することができる。幹細胞抽出培養シートは、生分解性の素材で出来ているため、生体内に長期的に埋め込むことが可能である。この幹細胞抽出培養シートは脂肪幹細胞だけでなく、さまざまな幹細胞の抽出と培養に応用できる。

## 準備するもの

- ・幹細胞抽出培養シート(本製品)
- ・ヒト脂肪由来幹細胞専用培地(②血清入りのものが望ましい)
- ・セルストレーナー
  - (例)サーモフィッシャーサイエンティフィック(株) 型番 22-363-549
- ・ガラス目皿やガラスリング(脱気時およびセルストレーナーなしの培養時に使用を推奨)
  - (例)ガラス目皿 20(厚さ 3 mm、穴径 2 mm)(株)東新理興
  - (例)クローニングリング AGC テクノグラス(株) 型番 RING-12
- ・培養容器(6 ウェルプレート、10 cm ディッシュ、15 cm ディッシュなど)
  - (例)6 ウェルマルチウェルプレート コーニング 型番 3516
  - (例)細胞培養ディッシュ 100 mm ビーエム機器(株) 型番 93100
  - (例)接着細胞培養用シャーレ 150 住友ベークライト(株) 型番 MS-10150

## 基本的な培養方法の選択

セルストレーナーの中に脂肪を播種したシートを入れて培養を行う。シート 1 枚で培養する方法(脂肪の上にシートをのせる)とシート 2 枚で培養する方法(脂肪を上下からシートで挟む)がある。更に多くのシートを積層して培養することも可能である。

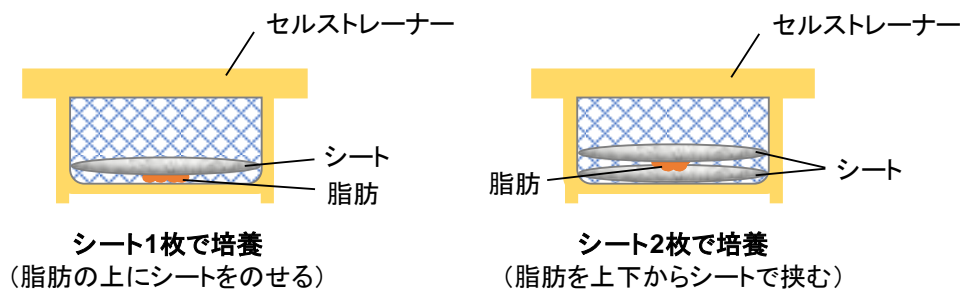


図 1 二種類の培養方法

## 培養容器の選択

6 ウェルプレート、10 cm ディッシュ、15 cm ディッシュなどから培養容器を選択する。

(図 2~4 および表 1 参照)

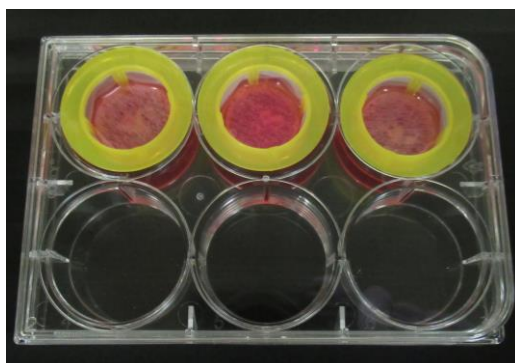


図 2 6 ウェルプレートで培養している様子

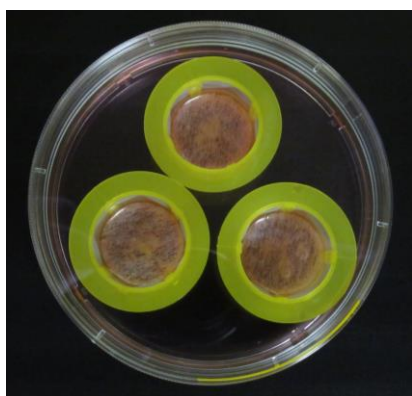


図 3 10 cm ディッシュで培養している様子  
(セルストレーナーは最大 3 個入る)

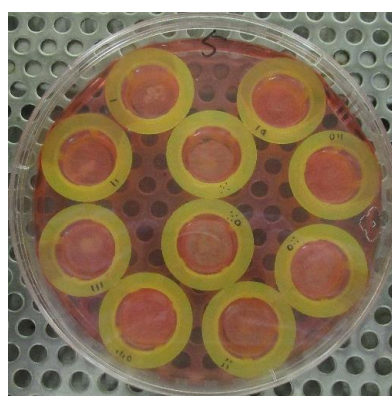


図 4 15 cm ディッシュで培養している様子  
(セルストレーナーは最大 10 個入る)

表 1 培養容器ごとの最大サンプル数と培地量(推奨)

培養容器	一度に培養できる 最大サンプル数	培養時の培地量(推奨)
6ウェルプレート	6個	サンプル1個(1ウェル)あたり8 mL ※サンプル6個で48 mL
10 cmディッシュ	3個	25 mL
15 cmディッシュ	10個	60 mL

## シートの脱気

- 1) 10 cm ディッシュに培地を 8~10 mL 加える。
- 2) 幹細胞抽出培養シートを滅菌済みのピンセットで必要枚数取り出し、培地が入っているディッシュへ入れる。
- 3) シートの上から重しとして滅菌済みのガラス目皿またはガラスリングをのせてシートを完全に沈める。(図 4)
- 4) -0.09 MPa で 1 min 程度脱気する。気圧計がない場合は、水流アスピレーターで 10 min 程度脱気する。

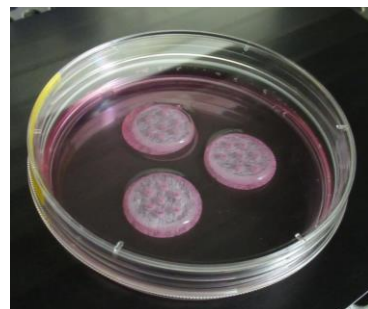


図 5 シートの脱気  
(ガラス目皿を使用)

## シートへの脂肪播種および培養の概要

シートへの脂肪播種の流れを紹介する。セルストレーナーを用いて培養する場合は、以下の図で示すような手順で播種する。播種後はインキュベーター(37°C, 5%CO<sub>2</sub>)に入れて培養を開始する。なお、培地交換は 2~4 日おきに全量または半量程度を交換する。

※シートやセルストレーナー、脂肪を扱うときはコンタミネーションを防ぐために、滅菌済みのピンセットやピペット等を使用すること。

※脂肪や脱気済みのシートを乾燥させないように気をつける。

※セルストレーナー中で脂肪播種しづらい場合は、10 cm ディッシュなどでシートに播種した後にセルストレーナーに移しても良い。

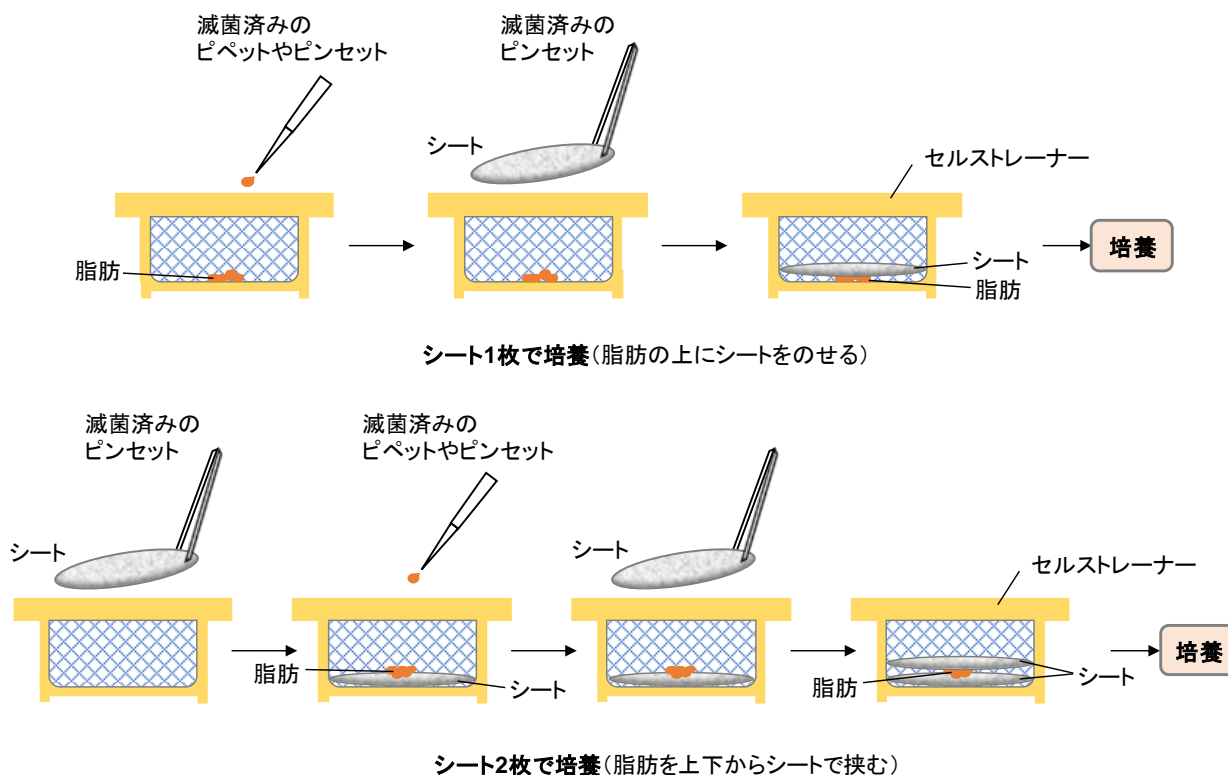


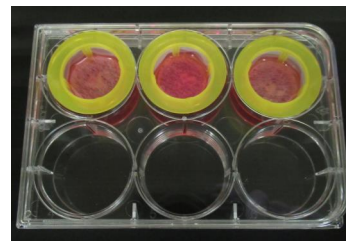
図 6 シートへの脂肪播種の流れ

## 各培養容器への脂肪播種と培養

### <6 ウェルプレート>

#### シート1枚で培養

- 1) ウェルに培地を約 5 mL 加えてセルストレーナーをセットする。
- 2) セルストレーナーの底の中央部分(メッシュ部分)に脂肪を約 0.05 g のせる。  
✓ポイント 播種しやすいようにピンセット等でセルストレーナーの底をかるく押して面を平らにする。  
✓ポイント セルストレーナーの底に脂肪をのせたときに脂肪が浮いて分散してしまう場合は、培地量を減らして液面を低くし、分散を防ぐ。
- 3) 脂肪の上から脱気済みのシートを 1 枚のせる。  
✓ポイント シートと脂肪を接着させるように、シートの上からピンセットやピペットの先端で軽く押さえる。
- 4) ウェルに培地を 3 mL 加えてウェルの培地量が 8 mL になるようにする。
- 5) 6 ウェルプレートの蓋が浮かないように蓋の上からテープを貼って押さえる。(図 5 及び図 6 参照)
- 6) インキュベーター(37°C, 5%CO<sub>2</sub>)に入れて培養を開始する。



#### シート2枚で培養

- 1) ウェルに培地を約 6 mL 加えてセルストレーナーをセットする。
- 2) セルストレーナーに脱気済みのシートを 1 枚入れる。  
✓ポイント 播種しやすいようにピンセット等でセルストレーナーの底をかるく押して面を平らにする。
- 3) シートの中央部分に脂肪を約 0.05 g のせる。  
✓ポイント シートの上に脂肪をのせたときに脂肪が浮いて分散してしまう場合は、培地量を減らして液面を低くし、分散を防ぐ。
- 4) 脂肪の上から脱気済みのシートを 1 枚のせる。  
✓ポイント シートと脂肪を接着させるように、シートの上からピンセットやピペットの先端で軽く押さえる。
- 5) ウェルに培地を 2 mL 加えてウェルの培地量が 8 mL になるようにする。
- 6) 6 ウェルプレートの蓋が浮かないように蓋の上からテープを貼って押さえる。(図 5 及び図 6 参照)
- 7) インキュベーター(37°C, 5%CO<sub>2</sub>)に入れて培養を開始する。

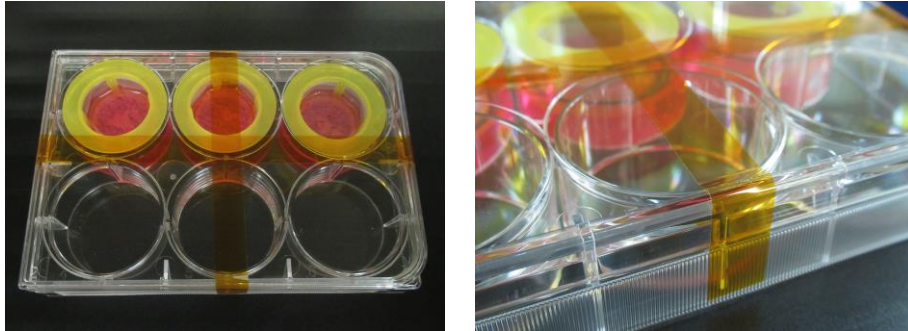


図7 テープを貼って固定している6ウェルプレート

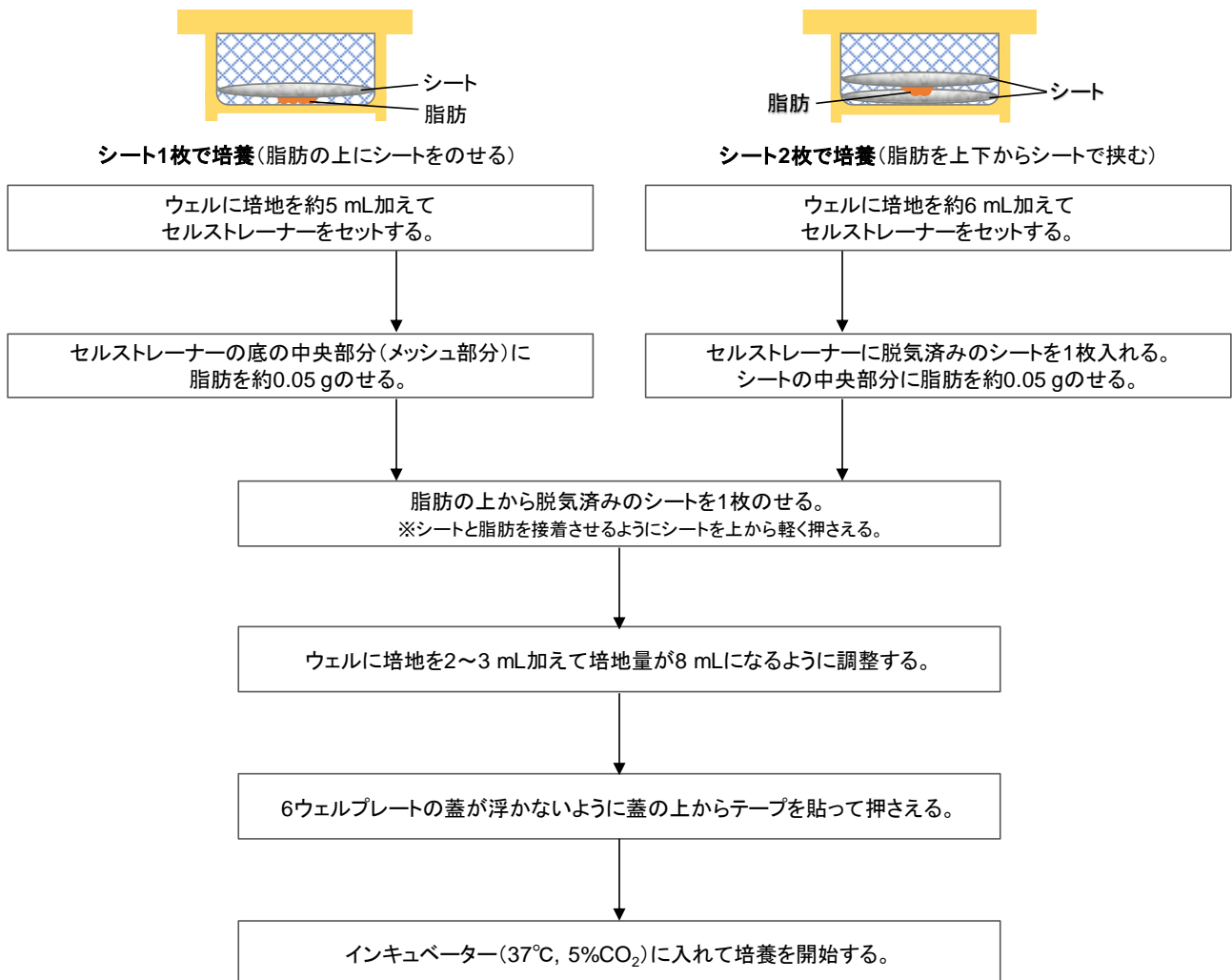


図8 6ウェルプレートでの脂肪播種の流れ

## <10 cm ディッシュ>

### シート1枚で培養

1) 培地を約 5 mL 加えた 10 cm ディッシュにセルストレーナーを置く。  
セルストレーナーは最大 3 個入れることができる。

2) セルストレーナーの底の中央部分(メッシュ部分)に脂肪を約 0.05 g のせる。

✓ポイント 播種しやすいようにピンセット等でセルストレーナーの底をかるく押して面を平らにする。

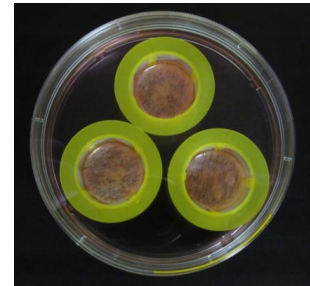
✓ポイント セルストレーナーの底に脂肪をのせたときに脂肪が浮いて分散してしまう場合は、培地量を減らして液面を低くし、分散を防ぐ。

3) 脂肪の上から脱気済みのシートを 1 枚のせる

✓ポイント シートと脂肪を接着させるように、シートの上からピンセットやピペットの先端で軽く押さえる。

4) ディッシュに培地を 20 mL 加えてディッシュの培地量が 25 mL になるようにする。

5) インキュベーター(37°C, 5%CO<sub>2</sub>)に入れて培養を開始する。



### シート2枚で培養

1) 10 cm ディッシュに培地を約 10 mL 加えて液面をディッシュ全体に広げた後セルストレーナーを置く。セルストレーナーは最大 3 個入れることができる。

2) セルストレーナーに脱気済みのシートを 1 枚入れる。

✓ポイント 播種しやすいようにピンセット等でセルストレーナーの底をかるく押して面を平らにする。

3) シートの中央部分に脂肪を約 0.05 g のせる。(図 7 参照)

✓ポイント シートの上に脂肪をのせたときに脂肪が浮いて分散してしまう場合は、培地量を減らして液面を低くし、分散を防ぐ。

4) 脂肪の上から脱気済みのシートを 1 枚のせる。

✓ポイント シートと脂肪を接着させるように、シートの上からピンセットやピペットの先端で軽く押さえる。

5) ディッシュに培地を 15 mL 加えてディッシュの培地量が 25 mL になるようにする。

6) インキュベーター(37°C, 5%CO<sub>2</sub>)に入れて培養を開始する。

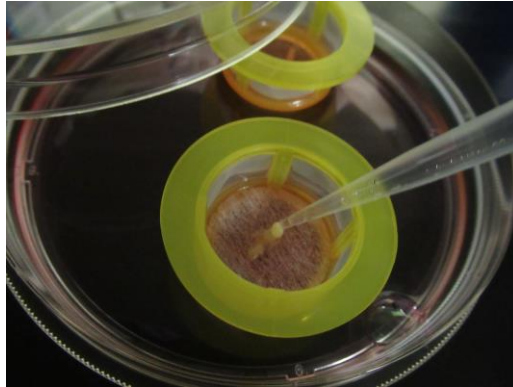


図9 シートに脂肪を播種している様子

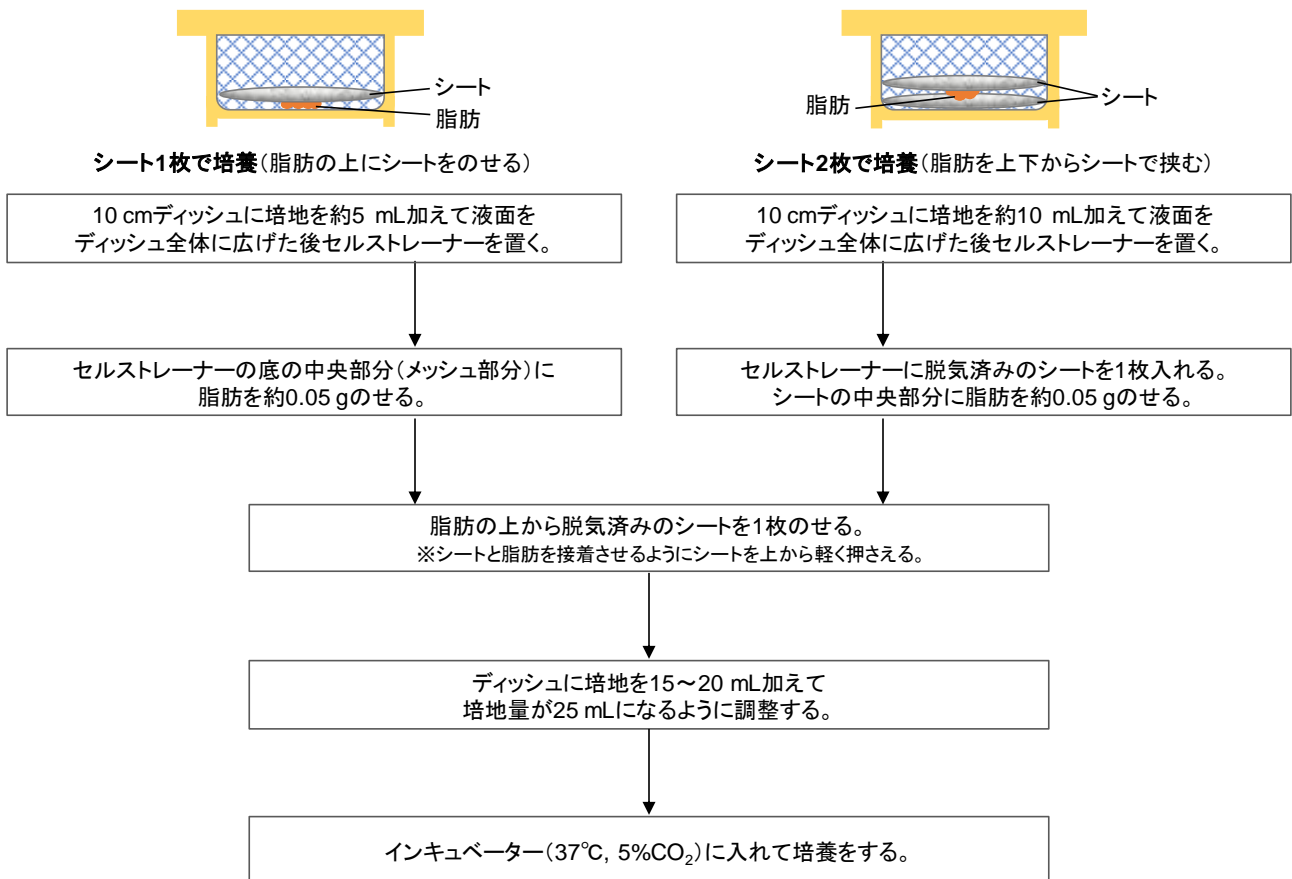
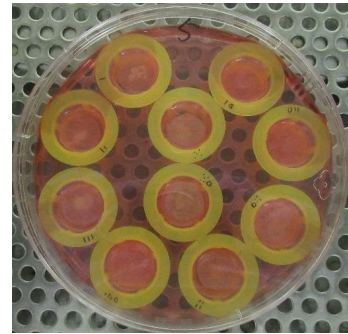


図10 10 cm ディッシュでの脂肪播種の流れ

## <15 cm ディッシュ>

### シート1枚で培養

- 1) 10 cm ディッシュに培地を約 5 mL を加えて液面をディッシュ全体に広げた後セルストレーナーを置く。播種はサンプル 1 個ずつ 10 cm ディッシュ中で行った方が操作しやすい。培養を行う 15 cm ディッシュには培地を 60 mL 加えておく。



- 2) セルストレーナーの底の中央部分(メッシュ部分)に脂肪を約 0.05 g のせる。

✓ポイント 播種しやすいようにピンセット等でセルストレーナーの底をかるく押して面を平らにする。

✓ポイント セルストレーナーの底に脂肪をのせたときに脂肪が浮いて分散してしまう場合は、培地量を減らして液面を低くし、分散を防ぐ。

✓ポイント シートと脂肪を接着させるように、シートの上からピンセットやピペットの先端で軽く押さえる。

- 3) 脂肪の上から脱気済みのシートを 1 枚のせる。
- 4) 培地が 60 mL 入っている 15 cm ディッシュにセルストレーナーごと移す。セルストレーナーは最大 10 個入れることができる。
- 5) インキュベーター(37°C, 5%CO<sub>2</sub>)に入れて培養を開始する。

### シート2枚で培養

- 1) 10 cm ディッシュに培地を約 10 mL 加えて液面をディッシュ全体に広げた後セルストレーナーを置く。播種はサンプル 1 個ずつ 10 cm ディッシュ中で行った方が操作しやすい。培養を行う 15 cm ディッシュには培地を 60 mL 加えておく。

- 2) セルストレーナーに脱気済みのシートを 1 枚入れる。

✓ポイント 播種しやすいようにピンセット等でセルストレーナーの底をかるく押して面を平らにする。

- 3) シートの中央部分に脂肪を約 0.05 g のせる。(図 7 参照)

✓ポイント シートの上に脂肪をのせたときに脂肪が浮いて分散してしまう場合は、培地量を減らして液面を低くし、分散を防ぐ。

- 4) 脂肪の上から脱気済みのシートを 1 枚のせる。

✓ポイント シートと脂肪を接着させるように、シートの上からピンセットやピペットの先端で軽く押さえる。

- 5) 培地が 60 mL 入っている 15 cm ディッシュにセルストレーナーごと移す。セルストレーナーは最大 10 個入れることができる。



5) インキュベーター(37°C, 5%CO<sub>2</sub>)に入れて培養を開始する。

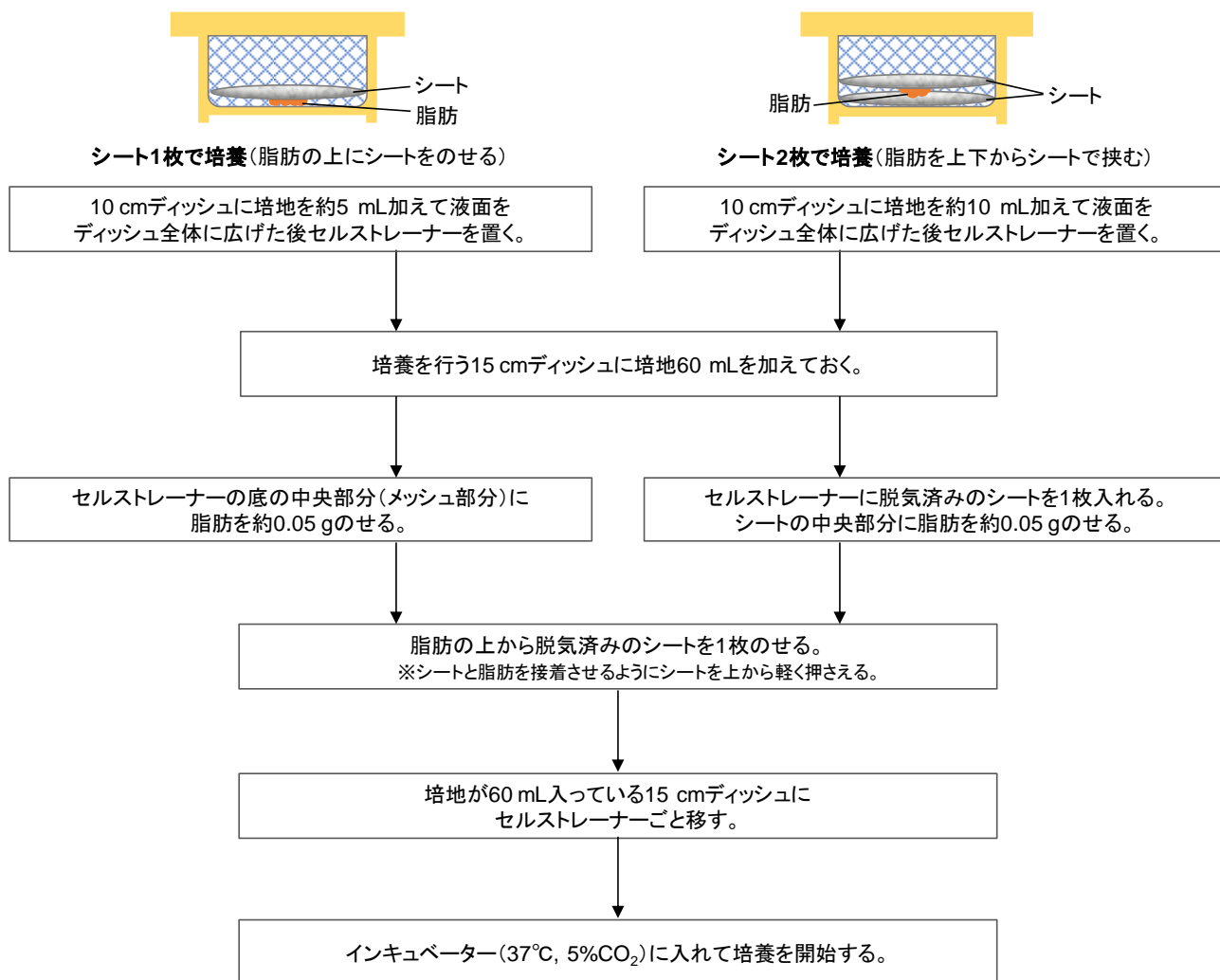
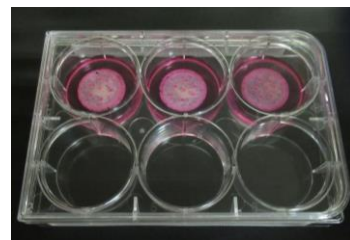


図 11 15 cm ディッシュでの脂肪播種の流れ

#### <セルストレーナーを使わない場合(6 ウェルプレート)>

セルストレーナーを使用せず、脂肪播種済みのシートを培養することが可能である。セルストレーナーを使わない場合、シートがずれる危険がある。そのため、ガラス目皿またはガラスリングなどで押さえつけて培養することが望ましい。また、この場合、ウェルプレートの底に接着し増殖する脂肪幹細胞の割合が大きくなること



も考慮する必要がある。

#### シート 1 枚で培養

- 1) ウェルに培地を約 1 mL 加える。
- 2) 脱気済みのシートを 1 枚入れる。
- 3) シートの中央部分に脂肪を約 0.05 g のせる。
- 4) 脂肪とウェル底が接地するように、シートをひっくり返す。  
✓ポイント シートと脂肪を接着させるように、シートの上からピンセットやピペットの先端で軽く押さえる。
- 5) シートの上から重しとして滅菌済みのガラス目皿またはガラスリングをのせる。
- 6) ウェルに培地を 2~2.5 mL 加えてウェルの培地量が 3~3.5 mL になるようにする。
- 7) インキュベーター(37°C, 5%CO<sub>2</sub>)に入れて培養を開始する。

#### シート 2 枚で培養

- 1) ウェルに培地を約 1 mL 加える。
- 2) 脱気済みのシートを 1 枚入れる。
- 3) シートの中央部分に脂肪を約 0.05 g のせる。
- 4) 脂肪の上から脱気済みのシートを 1 枚のせる。  
✓ポイント シートと脂肪を接着させるように、シートの上からピンセットやピペットの先端で軽く押さえる。
- 5) シートの上から重しとして滅菌済みのガラス目皿またはガラスリングをのせる。
- 5) ウェルに培地を 2~2.5 mL 加えてウェルの培地量が 3~3.5 mL になるようにする。
- 7) インキュベーター(37°C, 5%CO<sub>2</sub>)に入れて培養を開始する。

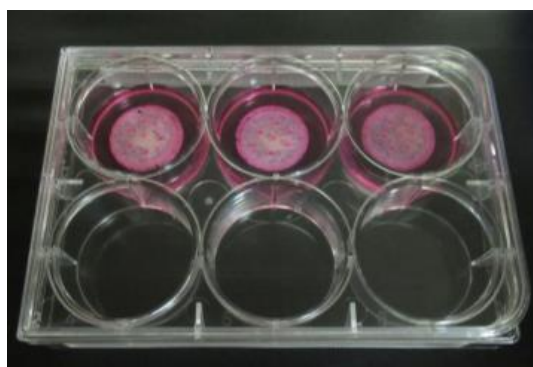


図 12 6 ウェルプレートでセルストレーナーなしで培養している様子