

株式会社バイオベルデ ステムセルキープ

詳細はこちら <http://www.funakoshi.co.jp/contents/4472>

DMSO-free **Serum-free** **Protein-free** **Xeno-free**

ステムセルキープは、ガラス化能を高く維持したまま細胞毒性を低く抑えるように最適化された、霊長類 ES / iPS 細胞用のガラス化凍結保存液です。



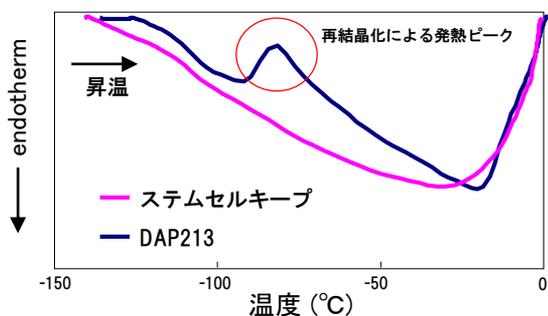
MEMO

DAP213などDMSOを含む保存液の問題点について

DMSOは一般的に細胞凍結保護成分として保存液に添加されていますが、人体に有害な成分として知られており、特に皮膚からの吸収性が高くなっています。細胞毒性を示すだけでなく、細胞の分化にも影響を及ぼす因子の一つであることが明らかになっています。従ってES / iPS細胞の保存にDMSOを使用することは望ましくありません。既存のガラス化凍結保存液であるDAP213は、高濃度のDMSOに加えて発がん性が指摘されているアセトアミドも含まれています。また高い溶質濃度を有するため、浸透圧による毒性も指摘されています。また、DAP213の場合は15秒以内に保存しなければ凍結後の生存率が大幅に低下しますが、**ステムセルキープは1分以内が目安のため操作がしやすくなっています。** 熟練した技術は必要ありません。

ガラス化凍結法とは

ガラス化凍結法は、細胞を液体窒素に直接急速浸漬するなどして水の結晶化を防ぎ、非晶質のガラス状態で凍結する方法です。水の体積膨張がないため、細胞へのダメージが少ないという利点があります。霊長類のES / iPS細胞は、通常の凍結法では凍結後の生存率が非常に低いため、ガラス化凍結法が推奨されています。しかしながら、ガラス化には高い溶質濃度を必要とするため、溶質による細胞毒性が高くなりやすいという問題があり、ステムセルキープのような毒性の低い凍結保存液の登場が待ち望まれていました。



液体窒素で一旦凍結した液体を50°C/分で昇温した。**ステムセルキープではガラス化液は昇温時に再結晶化が起こらない。**

特長

- 細胞の分化に影響を与えられるDMSOや、動物性タンパク質成分を含んでいません。
- ガラス化法での保存によりコロニーのまま凍結保存できます。
- 幹細胞の多分化能(未分化状態)を維持したまま凍結保存できます。
- 安全性が高い新規凍結保護物質(特許出願中)の、高い細胞保護作用とガラス状態維持作用により、さらに効率よくES / iPS細胞のコロニーを凍結保存できるようになりました。
- プロトコルに従って使用した場合、100バイアル分の保存が可能です。
- 無菌試験により細菌、真菌、マイコプラズマの混入がないことを確認しています。
- 本製品は4°Cで長期間安定に保存できます(有効期間2年)。

品名	メーカー	商品コード	包装 / 価格(¥)
StemCell Keep	BVD	VPL-A1	20 ml / 19,000

サンプル品あります！

本製品は、小包装のサンプル品(5 ml)をご用意しています。ご希望の方は当社テクニカルサポート(試薬担当)までお問い合わせ下さい。

霊長類ES / iPS細胞の保存とガラス化凍結法について

霊長類ES / iPS細胞は凍結に弱い

- ・通常の10%DMSO保存液を使用した緩慢凍結(-80°C放置)では生存率が極めて低い。
- ・コロニーで凍結した場合はわずか0.1~1%の生存率しかない。

ガラス化凍結法による保存が推奨されている

- ・液体窒素に直接浸漬するなどして水の結晶化を防ぎ、非晶質のガラス状態で凍結する方法。
- ・細胞をガラス化液に懸濁し、素早く液体窒素中にバイアルごと浸漬し、ガラス化させる。
- ・水の体積膨張がないため、細胞へのダメージが少ないという利点がある。

従来のガラス化凍結法の問題点

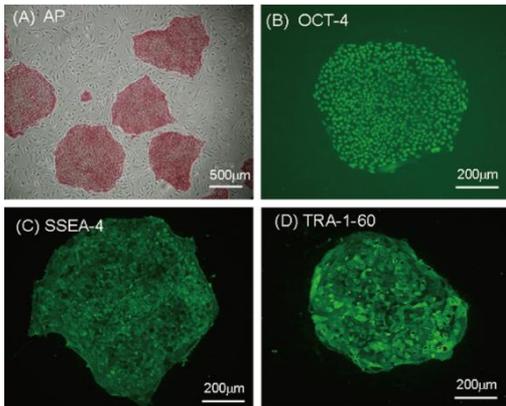
- ・ガラス化には高い溶質濃度が必要なため、溶質による毒性(浸透圧)が高くなりやすい。
- ・水の再結晶化を防ぐために、急速に解凍しなければならない。
- ・熟練した技術が必要とされている。

既存のガラス化凍結液の問題点

- ・マウスの受精卵ガラス化用に開発されたため、少ない液量(数μl)でガラス化することを前提としている。ES / iPS細胞用に液量を増やす(約200μl)と、ガラス化状態が不安定になり、再結晶化が問題となる。
- ・既存のガラス化凍結液に含まれるアセトアミドには発がん性があり、DMSOは分化に影響を与える(Oct4の発現を低下させる)ため、好ましくない。

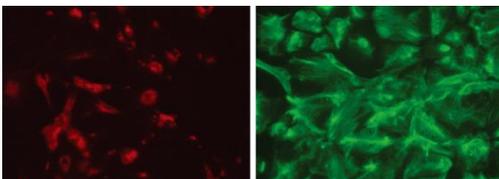
より良いガラス化凍結を可能とするステムセルキープの使用をおすすめします!

実験例

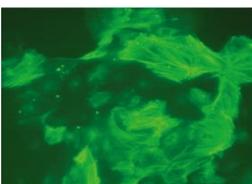


ステムセルキープで凍結したヒトiPS細胞の解凍後の未分化マーカーの発現

(A) アルカリホスファターゼ (AP), (B) OCT-4, (C) SSEA-4, (D) TRA-1-60のいずれも陽性で、未分化状態が維持されていることがわかる。



内胚葉 (α-Fetoprotein) 外胚葉 (Nestin)



中胚葉 (α-SMA)

本製品で凍結したヒトiPS細胞の解凍後の多能性評価

解凍後のiPS細胞を未処理プレート上で培養し、胚様体を作製後、通常の培養プレートにて1週間培養した。三胚葉由来のタンパク質が検出された。

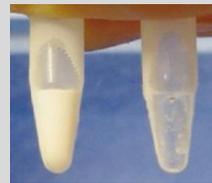
操作方法概略

※目的の細胞で事前に予備試験を実施して下さい。

凍結時

フナコシWebに動画があります。
<http://www.funakoshi.co.jp/contents/4472>

1. 液体窒素をベンチ内に準備する。
2. 霊長類ES / iPS細胞を剥離液 (0.25%トリプシン/1 mg/ml コラーゲナーゼIV/PBS溶液)にてコロニーの状態を剥離する。
※60 mmディッシュでコンフルエントの場合、1~5バイアル程度へ凍結可能。
3. 2. で回収した細胞を遠心し、培地を除去する。ここで複数本凍結する場合は氷冷しておき、1本ずつ以下の操作を行う。
4. 本製品を200μl 加え、よくピペティングし、ふたをして**1分以内**にバイアルごと液体窒素に浸漬する。
※液が透明なままならガラス化がうまくいっている。



右: ガラス化がうまくいっている例
左: 再結晶化が起こり、白濁した例

5. 液体窒素タンクもしくは-130°Cのディープフリーザーで保存する。

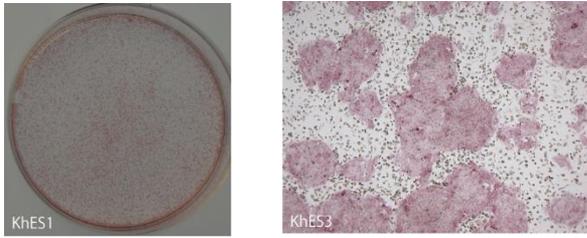
解凍時

1. 37°Cで温めた培地を準備し、9 mlの培地を入れた遠心管を必要本数用意する。
※解凍は1本ずつ行う。
2. 本製品で凍結しておいた細胞のバイアルをデュワー瓶などに入れた液体窒素中でクリーンベンチまで運ぶ。
3. 取り出したバイアルのふたをあげ、温めておいた培地1 mlを素早く添加し、ピペティングして溶解する。
4. 1. で用意した9 mlの培地の入った遠心管に 3. の全量を移し、遠心して洗浄する。
5. フィーダー細胞上に播種し、培養する。

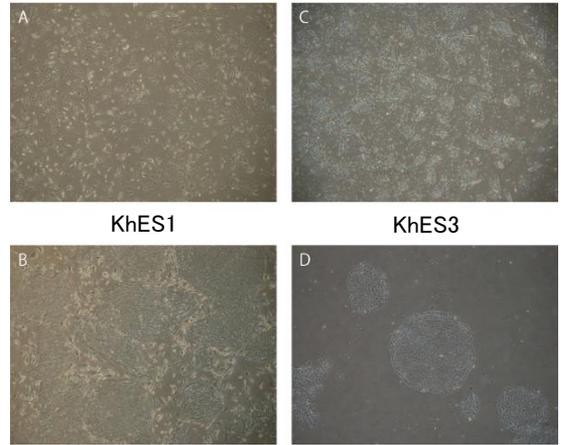
ご注意

高い生存率を得るためには、細胞を保存液に懸濁した後、直ちにバイアルを液体窒素中へ浸漬する必要があります。事前に十分に準備をしてから操作を開始して下さい。また、解凍時もバイアルにあらかじめ温めた培地を添加して、すぐに溶解させた方が生存率は高まります。

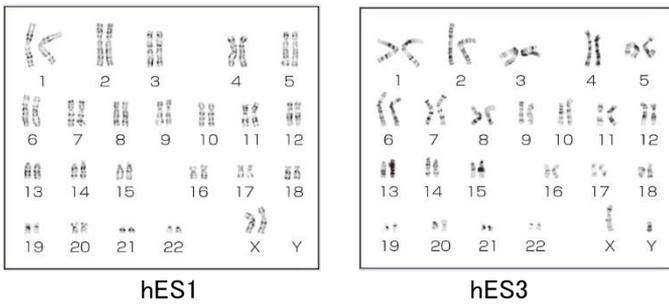
京都大学由来ヒトES 細胞 (KhES1, KhES3)をステムセルキープで保存後の各種バイオマーカー
および表現型の分析



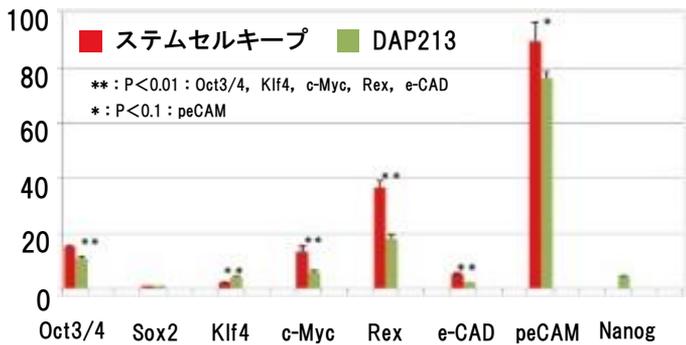
5日間培養後、AP（アルカリホスファターゼ）の発現を確認した。



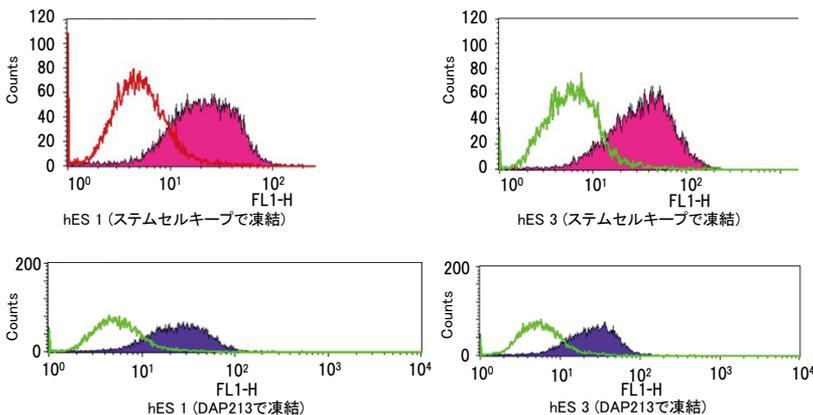
SNLフィーダー細胞上 (A, B) およびMatrigel (BD社製品) をコートしたプレート上 (C, D) で培養した。いずれもES細胞が成長している。



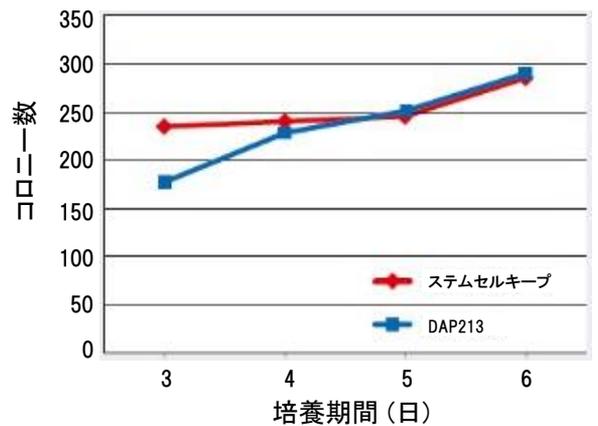
ステムセルキープで保存した細胞の核型（カリオタイプ）に変化がないことを確認した。



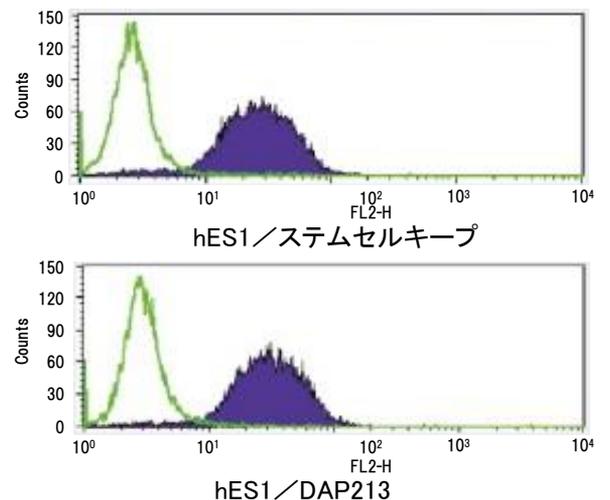
RT-PCRによる各mRNA発現量の解析は $\Delta\Delta Ct$ 法で行った。その結果、SOX2を1とした時、hES細胞の未分化能を示す転写因子や接着因子について、Nanogを除いて本製品はDAP213と同等の発現率を示した。



ステムセルキープまたはDAP213で凍結したES細胞を解冻後、幹細胞マーカーTRA-1-60の発現をフローサイトメトリーにより解析した。



hES1細胞をSNLフィーダー細胞に播種して培養後、3, 4, 5, 6日にAP染色を行い、コロニー数を計測すると、本製品で保存した細胞は3日目からコロニーができ、6日目までそのコロニーが大きくなった。DAP213で保存した細胞は2日目では少なく、その後3日目で本製品で保存した細胞と同じくらいのコロニー数になった。



ステムセルキープで保存した細胞も、Nanogの発現量はDAP213と同程度であった。図の紫色の部分がNanog陽性細胞で、緑色の部分はコントロール細胞。本製品保存分は97.6%が、DAP213保存分は96.2%が陽性であった。

ユーザー様ご使用例

ヒトiPS細胞(201B7株, 理研BRC)の凍結解凍時におけるステムセルキープとDAP213との比較検討
(データ提供: 山梨大学様)

【方法】
ヒトiPS細胞(201B7株, 理研BRC)について, ステムセルキープおよびDAP213を添加後, 液体窒素に浸漬するまでの時間を15, 45, 90秒として, 液体窒素中で6日間培養し, その間のコロニー密度, コロニーの大きさ, コロニー面積率を計測した。
参考文献: 1. Takahashi, K., et al., *Cell*, 131 (5), 861~872 (2007).

【結果1】
コロニー密度
ステムセルキープで凍結したhiPS細胞のコロニー密度は, DAP213添加15秒後に凍結処理を行った場合と同程度の結果であった。DAP213で凍結したhiPS細胞のコロニー形成は, 浸漬までの時間に著しく影響を受けるが, ステムセルキープでは浸漬までの時間が解凍後のコロニー形成に与える影響はほとんどなかった(図1)。

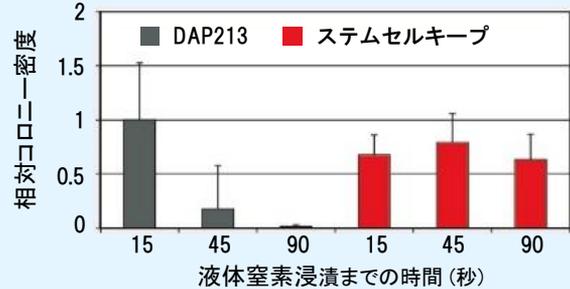


図1: 解凍後6日目におけるコロニーの密度(相対値)

【結果2】
コロニーの大きさ
図2にコロニーの大きさを示した。DAP213で凍結した場合, ステムセルキープで凍結した場合と比較して, コロニーの大きさが若干小さくなる傾向が認められた。粘性の高いステムセルキープではピペッティングによる水勢が抑えられ, 結果としてDAP213よりもコロニーが崩れないと考えられる。

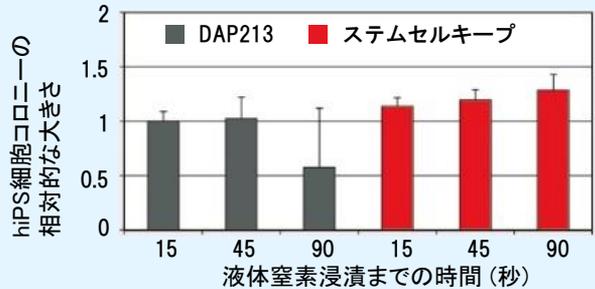


図2: 解凍後6日目におけるコロニーの大きさ(相対値)

【結果3】
コロニーの面積率
hiPS細胞のコロニーは単層で均一な構造を成しているため, コロニーの面積の広さが細胞数をそのまま反映していると考えられる。ステムセルキープで凍結したhiPS細胞のコロニーの占有面積率は, DAP213添加15秒後に凍結処理を行った場合と同程度の結果であった(図3)。その中でも, ステムセルキープで添加45秒および90秒後に凍結処理を行った場合に, ばらつきが少なく, 安定して解凍後の回復を行えた。

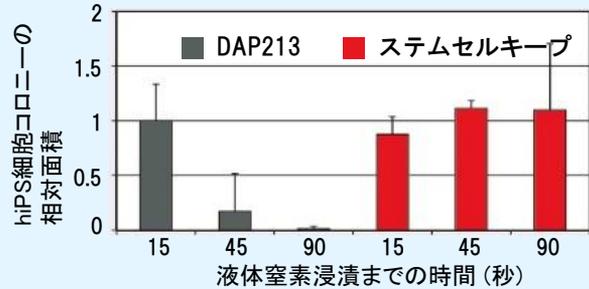


図3: 解凍後6日目におけるコロニーの面積(相対値)

【結論】
DAP213を用いた凍結は, 凍結処理までの時間が短いため熟練した技術を必要とした。しかしながら, ステムセルキープを使用することによって様々な問題が解消される。今回の比較検討では, 45秒という凍結に十分な時間を確保しつつ, hiPS細胞の解凍後の回復を十分に果たすことを確認できた。ステムセルキープは試薬の粘性が高いため, 採取しにくい, 混和しにくいという問題点がある。混和の際には時間をかけても良いので, 緩やかにしっかりと5回程度混和する必要がある。

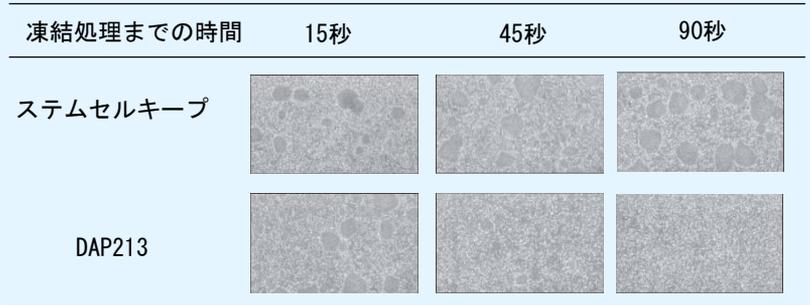


図4: 解凍後6日目における培養状態

培養6日目におけるhiPS細胞のコロニーの様相を示した(40倍)。

NOTE

※ 本紙に掲載されている価格は, 2014年1月1日現在です。
※ 仕様は改善のため, 予告なく変更することがあります。
※ 本紙に掲載されている製品は, すべて研究目的用のみ販売しています。医薬品, 診断用医薬品, 食品, 食品検査等の用途には使用できません。また, 医薬品の製造, 品質管理, 各種診断, 治療等, その使用目的にかかわらず人体には使用しないで下さい。

※ 記載されている会社及び商品名は, 株式会社バイオベルデの商標または登録商標です。
※ 表示価格には消費税等は含まれていません。また価格は予告なく変更される場合がありますので, あらかじめご了承下さい。
※ ご注文の際は, 【品名, メーカー(BVD), 商品コード, 包装, 数量】をお知らせ下さい。

販売店



フナコシ株式会社

〒113-0033 東京都文京区本郷2丁目9番7号
http://www.funakoshi.co.jp/ e-mail: info@funakoshi.co.jp
試薬に関して: Tel. 03-5684-1620 Fax 03-5684-1775
受託に関して: Tel. 03-5684-1645 Fax 03-5684-6539
e-mail: reagent@funakoshi.co.jp