

Stem cell from Human Exfoliated Deciduous teeth

製品説明書

製品	サイズ	カタログ番号
SHED	凍結細胞数： $\geq 1 \times 10^6$ cells	GCR-010

製品説明

脱落乳歯歯髄幹細胞（SHED：Stem cell from Human Exfoliated Deciduous teeth）とは、ヒト乳歯歯髄組織に存在する間葉系幹細胞（MSC：Mesenchymal Stem Cell）に分類される細胞として発見されました。SHEDは骨、軟骨、脂肪、神経などへ分化する能力と自己複製能を併せ持っています。

本製品は健常ドナーより提供された乳歯歯髄組織より SHED を単離・拡大培養した製品です。

細胞の特徴

組織源：乳歯歯髄

形態：紡錘形、線維芽細胞様

増殖特性：接着性

安全措置

凍結したチューブを取り扱うときは保護手袋、保護服、および保護メガネを使用することを推奨します。培養チューブに液体窒素が混入していた場合、それが気化することにより爆発や飛散する恐れがあります。

HIV-1、HIV-2、HBV、HCV、HTLV、ParvoB19 については陰性であることを確認しています。

しかしながらヒト由来製品のため、すべての感染性病原体を完全に否定することはできません。潜在的な感染性のある製品として取り扱うことをお勧めします。

保管方法

ドライアイスで出荷された細胞は、直ちに液体窒素を用いた気相もしくは液相に保管、または -130°C 以下の超低温フリーザーにて保管してください。 -130°C を超える温度での保管は避けてください。

解凍・播種方法

- 播種密度（ $1,000\sim 1,500\text{cells}/\text{cm}^2$ ）およびCoAに記載の細胞数に従って必要な細胞培養容器を算出します。細胞培養容器へ予め適切な量の推奨培地を加え、インキュベーター（ 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ ）に30分入れます。
- 15mLチューブへ、推奨培地を適切な量（1チューブ当たり少なくとも7mL）を加えておきます。
- 液体窒素タンク等から凍結保存チューブを取り出し、急速解凍法の通法に従って細胞を融解します。
- 融解された細胞懸濁液を1000Eのマイクロピペットでゆっくりとピペッティングし、全量を工程2で準備した15mLチューブにゆっくりと加え、ゆっくりとピペッティングを行います。
- 遠心分離（ $150\times g$ 、室温、5分間）を行った後、上清を除去してタッピングを行い細胞塊を解します。

Stem cell from Human Exfoliated Deciduous teeth

製品説明書

6. 推奨培地を適切な量加えてピペッティングを行い、セルカウントを行います。
工程1に記載の播種密度となるように細胞懸濁液を調製し、工程1で準備した細胞培養容器へ播種します。
7. インキュベーター (37°C, 5%CO₂) で培養を行います。
* 培地交換は2~3日毎に行い、60~70%コンフルエンスで継代操作を実施します。

継代培養方法

1. 細胞培養容器から培地を全量除去します。
2. 培養面積 (cm²) あたり 100μL の DPBS を加え、全体に行き渡らせた後に DPBS を全量除去します。
3. 工程 2 を繰り返します。
4. 培養面積 (cm²) あたり 50μL の TrypLE Select を加え、全体に行き渡らせた後、インキュベーター (37°C) で 4~6 分間、加温を行います。
5. 反応後、細胞培養容器の中でゆっくりと液を循環させ、細胞培養容器の側面を液が跳ねない程度に軽く叩き、細胞を細胞培養容器底面より剥離させます。
6. 培養培地を適切な量を細胞培養容器全体に流すように加えて、TrypLE Select の反応を停止させ、細胞懸濁液を遠心チューブへ回収します。
7. 新たに培養培地を細胞培養容器全体に流すように加え細胞を剥がし、細胞懸濁液を工程 6 の遠心チューブへ回収します。
8. 遠心分離 (300×g、室温、5分間) を行った後、上清を除去してタッピングを行い細胞塊を解します。
9. 推奨培地を適切な量加えてピペッティングを行い、セルカウントを行います。
予め推奨培地を加えて温めておいた細胞培養容器へ播種密度 (1,000~1,500cells/cm²) となるように細胞懸濁液を調製し、播種します。
10. インキュベーター (37°C, 5%CO₂) で培養を行います。
* 培地交換は2~3日毎に行い、60~70%コンフルエンスで継代操作を実施します。

凍結保存方法

1. 細胞培養容器から培地を全量除去します。
2. 培養面積 (cm²) あたり 100μL の DPBS を加え、全体に行き渡らせた後に DPBS を全量除去します。
3. 工程 2 を繰り返します。
4. 培養面積 (cm²) あたり 50μL の TrypLE Select を加え、全体に行き渡らせた後、インキュベーター (37°C) で 4~6 分間、加温を行います。
5. 反応後、細胞培養容器の中でゆっくりと液を循環させ、細胞培養容器の側面を液が跳ねない程度に軽く叩き、細胞を細胞培養容器底面より剥離させます。
6. 培養培地を適切な量を細胞培養容器全体に流すように加えて、TrypLE Select の反応を停止させ、細胞懸濁液を遠心チューブへ回収します。

Stem cell from Human Exfoliated Deciduous teeth

製品説明書

7. 新たに培養培地を細胞培養容器全体に流すように加え細胞を剥がし、細胞懸濁液を工程 6 の遠心チューブへ回収します。
8. 遠心分離 (300×g、室温、5分間) を行った後、上清を除去してタッピングを行い細胞塊を解します。
9. 推奨凍結保存培地を適切な量加えてピペッティングを行い、セルカウントを行います。
10. セルカウントの結果より $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ cells/mLとなるように細胞懸濁液を調製し、凍結保存チューブへ分注します。
11. 緩慢凍結法にて凍結処理を行い、 -130°C 以下で保存してください。

分化誘導方法

・骨芽細胞分化誘導

1. 培養培地にて前培養を行った細胞を準備します。
2. 細胞培養用 6-well プレートへ 1×10^5 cells/well の播種濃度で培養培地 2 mL を用いて播種します。
3. 100%コンフルエンスに達したところで骨芽細胞分化誘導培地へ培地交換を行います。
4. 週 2 回培地交換を行い、28 日間分化誘導を行います。
5. 分化誘導後、Alizarin red 染色などで分化の確認を行ってください。

・軟骨細胞分化誘導

1. 培養培地にて前培養を行った細胞を準備します。
2. 細胞培養用低吸着 96-well U ボトムプレートへ 2×10^5 cells/well の播種濃度で培養培地 200 μL を用いて播種します。
3. 24 時間培養したところで軟骨細胞分化誘導培地へ培地交換を行います。
4. 週 2 回培地交換を行い、28 日間分化誘導を行います。
5. 分化誘導後、Alcian blue 染色などで分化の確認を行ってください。

・脂肪細胞分化誘導

1. 培養培地にて前培養を行った細胞を準備します。
2. 細胞培養用 6-well プレートへ 1×10^5 cells/well の播種濃度で培養培地 2 mL を用いて播種します。
3. 100%コンフルエンスに達したところで脂肪細胞分化誘導培地へ培地交換を行います。
4. 週 2 回培地交換を行い、28 日間分化誘導を行います。
5. 分化誘導後、Oil red O 染色などで分化の確認を行ってください。

なお、上記の他に神経細胞への分化も報告されている [1]。

バイオセーフティレベル

BSL1

この試料は常に適切な安全手順で使用する必要があります。

Stem cell from Human Exfoliated Deciduous teeth

製品説明書

推奨培地キット

製品名	メーカー	カタログ番号	容量
MesenCult ACF Plus Medium Kit	STEMCELL Technologies	ST-05445	500 mL
Cellartis® MSC Xeno-Free Culture Medium	タカラバイオ	Y50200	500 mL
MSC NutriStem® XF Basal Medium	Biological Industries	05-200-1A	500 mL
MSC NutriStem® XF Supplement Mix		05-201-1U	3 mL

※必要に応じて抗生物質を添加してご使用ください。

推奨凍結保存培地

製品名	メーカー	カタログ番号	容量
STEMCELL BANKER® GMP grade	タカラバイオ	CB045	100 mL

推奨骨芽細胞分化誘導培地（サプリメントについては添加濃度記載）

製品名	メーカー	カタログ番号	容量
MEM α , Nucleosides	Gibco™	12571-063	500 mL
Fetal Bovine Serum	—	—	2%
L-ascorbic acid 2-phosphate	富士フイルム和光純薬	323-44822	50 μ g/mL
Dexamethasone	SIGMA	D8893	10 nM
β -glycerophosphate	SIGMA	G9422	10 mM
Calcitriol	CAYMAN	CAY71820	100 nM

推奨軟骨細胞分化誘導培地

製品名	メーカー	カタログ番号	容量
Mesenchymal Stem Cell Chondrogenic Differentiation Medium (Ready-to-use)	タカラバイオ	C-28012	100 mL

推奨脂肪細胞分化誘導培地（サプリメントについては添加濃度記載）

製品名	メーカー	カタログ番号	容量
MEM α , Nucleosides	Gibco™	12571-063	500 mL
Fetal Bovine Serum	—	—	2%
3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)	SIGMA	I7018	500 μ M
Indomethacin	SIGMA	I7378	50 μ M
Insulin	SIGMA	I9278	5 μ g/mL
Dexamethasone	SIGMA	D8893	1 μ M

Stem cell from Human Exfoliated Deciduous teeth

製品説明書

使用製品一覧

製品名	メーカー	カタログ番号	容量
CTS™ TrypLE™ Select Enzyme	Gibco™	A1285901	100 mL
CTS™ DPBS, without calcium chloride, without magnesium chloride	Gibco™	A1285601	1,000 mL
遠心チューブ 15mL	Thermo Scientific	339650	500 本
遠心チューブ 50mL	Thermo Scientific	339652	500 本
細胞培養用フラスコ (T-75)	CORNING	3290	100 個
細胞培養用フラスコ (T-225)	CORNING	3293	25 個
ディスポピペット 5mL	Fisher Scientific	13-676-10H	200 本
ディスポピペット 10mL	Fisher Scientific	13-676-10J	200 本
ディスポピペット 25mL	Fisher Scientific	13-676-10K	200 本

引用文献

- [1] M. Miura, S. Gronthos, M. Zhao, B. Lu, L. W. Fisher, P. G. Robey and S. Shi, "SHED: Stem cells from human exfoliated," PNAS, vol.100, no.10, 5807–5812, 2003.

製造元：キッズウェル・バイオ株式会社

【お問い合わせ先】

キッズウェル・バイオ株式会社

〒104-0033 東京都中央区新川 1-2-12

Tel: 03-6222-9547

E-mail: shedinfo@kidswellbio.com