hMSC 軟骨細胞分化キット-取扱説明書

一、製品概要

hMSC軟骨細胞分化キットは、軟骨細胞への高効率な分化誘導能力を持ち、ヒト間葉系幹細胞の軟骨細胞への分化誘導に使用できます。

二、製品情報

表1：hMSC 軟骨細胞分化キット製品詳細

製品情報	品番	規格	保存条件
hMSC軟骨細胞分化キットの内容物：	**RP02014-B**	**1 Kit**	**2℃～8℃***
Chondrogenesis Differentiation Basal Medium	RP02014-B-01	80 mL	2℃～8℃
Chondrogenesis Differentiation Supplement	RP02014-B-02	20 mL	-20℃～-80℃

***基礎液と添加物をよく混和して完全培地を調製します。調製後は2℃～ 8℃で保存し、2 週間以内に使用可能です。培地は遮光保存・使用してください。**

三、試薬と材料

表２：推奨試薬&材料

試薬&材料	ブランド（e.g.）	品番（e.g.）
ncMission hMSC Medium V3.0	Shownin	RP02010
OriCell アルシアンブルー染色液	OriCell	No.ALCB-10001
4%PFA 溶液	Biosharp	BL539A
1×DPBS w/o Ca^{2+}/Mg^{2+}	Thermo Sci.	14190250
6ウェルプレート	Thermo Sci.	140685
1 mL/5 mL/10 mL/25 mLピペット	Thermo Sci.	N/A
15 mL/50 mL遠心管	Thermo Sci.	N/A
10 µl/200 µl/1000 µlピペットチップ	Rainin .	N/A

四、試薬の準備

（一）hMSC 軟骨細胞分化キットの調製

1. Chondrogenesis differentiation Supplementは4℃で解凍します。**37℃で解凍しないでください**。
2. バイオセーフティキャビネット内で滅菌済みピペットを使用し、下記の成分を均一に混和して100mL

の分化完全培地を調製します。

Chondrogenesis differentiation Basal Medium : 80 mL

Chondrogenesis differentiation Supplement : 20 mL

3. 4℃で完全培地を保存し、3 週間以内に使用可能です（遮光保存・使用）。

TIPS：実際の使用量に応じて、Supplementを分注して凍結保存することが可能です。凍結・解凍は合計で2回までとします。

五、間葉系幹細胞の軟骨細胞分化

（一）間葉系幹細胞の培養

1. **hMSCの培養と準備：**詳細は「**ncMission hMSC Medium V3.0** 取扱説明書」を参照してください。
2. **ncMission hMSC Medium V3.0** を用いて間葉系幹細胞を培養します。間葉系幹細胞を 5000～10000 cells/cm² の密度で6ウェルプレートに播種し、水平方向に十字振りを3回実施後、37℃・5% CO・飽和湿度のインキュベーターに入れ、再度水平方向に十字振りを3回行い、培養します。

（二）間葉系幹細胞の軟骨細胞分化

1、 ペレット形成：hMSCが約80%コンフルエンシーに達した場合：

1) ：細胞が80%コンフルエンシーに達したら、1 mL/ウェルで0.5×TryPLEを加え、37℃で3分間消化します。

2) ：バランスをとり、遠心（250×g、5分間；昇速3、降速7）して細胞を回収します。上清液を除去し、MSC増幅完全培地を加えて懸濁します。細胞数を計測します。

3) ：計測結果に基づき、2×10⁵個の細胞を15 mL遠心管に分注します（各グループ2本）。細胞懸濁液の量が1 mL未満の場合は、MSC増幅完全培地を1 mLに追加し、バランスをとって室温で遠心（300×g、5分間；昇速3、降速7）します。

4) ：上清液を吸引除去し、管底を軽く叩いて細胞ペレットを分散させた後、1 mL/管の完全培地を加えて細胞を懸濁します。バランスをとり、室温で遠心（450×g、10分間）します。

5) ：遠心管の蓋を穏やかに緩め、5% CO_2のインキュベーター内で37℃で16時間（一晩）インキュベートします。

2、 軟骨誘導（1日間）：MSC増幅完全培地を**軟骨細胞分化完全培地**に置き換えます。遠心管から慎重にMSC増幅完全培地を吸引除去し（MSCペレットを吸引しないように注意）、管壁に沿ってゆっくりと軟骨分化培地を2 mL/管で添加します（ペレットを乱さないようにする）。

3、継続培養（10～20日間）：10～20日間培養を継続します。**軟骨細胞分化完全培地**を2 mL/管で2日ごとに交換します。MSCペレットを吸引しないように注意します（14日間の培養で急速な軟骨形成が誘導される）。

4、 固定・脱水・染色・顕微鏡撮影：

1） 固定・脱水：培地を吸引除去し、2 mL/管のDPBSを加えてサンプルペレットを洗浄します。DPBSを吸引除去後、2 mL/管の4% PFA溶液を加え、25℃で10分間固定します。

2） 切片凍結：MSCペレットを包埋剤で包埋し、10 μmの厚さで切片を作成します（サンプルは包埋後に-80℃で2か月間保存可能）。

3）サンプル洗浄：スライドガラスをDPBSに浸し、2回振とう洗浄します（各10分間、速度0）。

4）染色：水分を十分に乾燥させた後、各切片にOriCellアルシアンブルー染色液を滴下し、サンプル全体を覆います（または各切片に50 μLの染色液を滴下）。湿潤ボックスにスライドガラスを入れ、37℃の乾燥箱で30分間染色します。

5）洗浄・撮影：流水でスライドガラスをゆっくり3分間洗浄し、水分を十分に乾燥させた後、顕微鏡で観察・撮影します。注：洗浄時はサンプルの脱落や形状崩れを防ぐために水流を弱くし、サンプルに直接当てないでください。