凍結初代細胞製品

マウス骨髄細胞

【 Mouse Bone Marrow Cell , Code No. BMC12C 】

本製品は研究目的にのみご使用になれます。

2017 年 8 月 18 日作成

I. 製品概要

骨髄細胞は造血細胞と骨髄間質細胞に分けることができます。骨髄間質細胞の一部には未分化間葉系細胞（Mesenchymal Stem Cell）が含まれており、骨や軟骨、脂肪、筋肉、腱、心筋等様々な細胞に分化誘導することができます。この細胞は上記のように多分化能を有していることから「再生医療」の分野で様々な研究が進められています。

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）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
マウス骨髄細胞 （凍結細胞）	成熟 ICR マウス 大腿骨 2 本分 ／バイアル	1 本	液体窒素保存	6 ヶ月

※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

マウス大腿骨骨髄由来（ICR adult）

VI. 専用メディウム(別売)

品名	品番	容量	保存方法	使用期限
骨髄細胞用メディウム	BMCM	500 mL	－20℃保存 (解凍後は 4℃保存)	ボトル記載(-20℃保存) 解凍後 3 か月(4℃保存)

培地の主成分：α-MEM、血清、抗生剤、その他

VII. 操作方法

※本製品は【継代不可】です。

細胞解凍・播種

※下記は、細胞培養用の 24well プレートで培養する場合のプロトコールになります。

【準備するもの】
・骨髄細胞用メディウム（品番：BMCM）
・24well プレート
・滅菌済ピペット、遠心チューブなどの培養器具

1. 50 mL 遠心管に、あらかじめ 37℃に温めた骨髄細胞培養メディウムを 9mL 入れて下さい。
2. 凍結細胞のバイアルを液体窒素から取出し 37℃温水で、かるく振りながら小さな氷塊が残る程度（約 110 秒前後ほど）まで、すばやく解凍して下さい。
3. 解凍した細胞懸濁液を、先に用意した 50 mL 遠沈管に移して下さい。50 mL 遠沈管内の培養メディウムを 1 mL 分取し、バイアルを共洗いして細胞液を回収して下さい。細胞を混和した後、室温、600×g で 5 分間遠心して下さい。
4. 遠心後、上清を吸引除去して下さい。すぐに 37℃に温めた骨髄細胞培養メディウムを 6.5 mL 加え、ゆっくりピペッティングを行い細胞を分散させ、100μm のセルストレーナーに通して下さい。
5. 細胞培養用の 24well プレートに 1well あたり 0.5mL ずつ播種して下さい。（24well プレート 12well に播種）
6. 細胞を播種した培養容器を 5%CO_2、37℃のインキュベータで培養して下さい。接着に時間のかかる細胞のため播種後、3 日間は、絶対に培養容器を動かさないで下さい。（この間は観察も行わないで下さい）
7. 3 日間静置培養した後、接着しなかった細胞(写真 1) を取り除くため培地で洗浄を数回行って下さい。
   洗浄後(写真 2) 0.5mL/well で培地交換行い 5%CO_2、37℃のインキュベータで培養して下さい。
8. 以降は 2～3 日ごとに 0.5mL/well で培地交換を行って下さい。
9. 播種後 3～6 日目に 100%コンフルエントに達します。接着後は非常に剥がれにくいですので継代・凍結はできません。

VIII. 技術情報

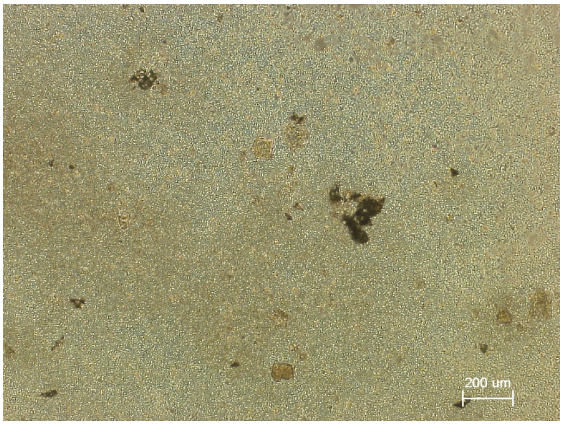

写真 1：マウス骨髄細胞写真（洗浄前）

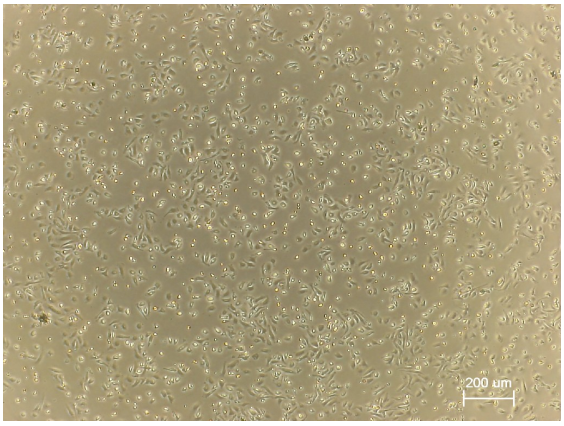

写真 2：マウス骨髄細胞写真（洗浄後）

《 骨髄細胞の分化誘導から染色までの実験例 》
※下記は、細胞培養用の 24well プレートで培養した場合のプロトコール例になります。

例1)　マウス破骨細胞培養用メディウム（Code:OSCMM）で分化誘導を行い、TRAP 染色キット（Code:AK04F）で染色した例。

1. 骨髄細胞を前述の細胞培養方法に従い 100%コンフルエントまで培養して下さい。
2. 骨髄細胞が 100%コンフルエントに達した時点で、上清を室温に戻したマウス破骨細胞培養用メディウム（Code:OSCMM）に 0.5mL/well で交換をして下さい。以降は毎日、室温に戻したマウス破骨細胞培養用メディウム（Code:OSCMM）に 0.5mL/well で交換をして下さい。3～5 日目ごろから破骨細胞が観察されます。
3. 別売の TRAP 染色キット（Code:AK04F）で破骨細胞マーカー酵素である酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを簡便に染色できます（図 1）。

例2)　骨形成メディウム(Code:OGCMO)で分化誘導を行い、石灰化染色キット（Code:AK21）で染色した例。

1. 骨髄細胞を前述の細胞培養方法に従い 100%コンフルエントまで培養して下さい。
2. 骨髄細胞が 100%コンフルエントに達した時点で、上清を室温に戻した骨形成メディウム(Code:OGCMO)に交換をして下さい。以降は 2～3 日ごとに室温に戻した骨形成メディウム(Code:OGCMO) に 0.5mL/well で交換をして下さい。3～6 日目ごろからカルシウムが沈着した骨結節の形成が観察されます。
3. 別売の石灰化染色キット（Code:AK21）は、カルシウムに対し結合する色素・アリザリンレッド S を成分とする染色キットで、簡便に石灰化した骨結節を染色できます（図 2）。

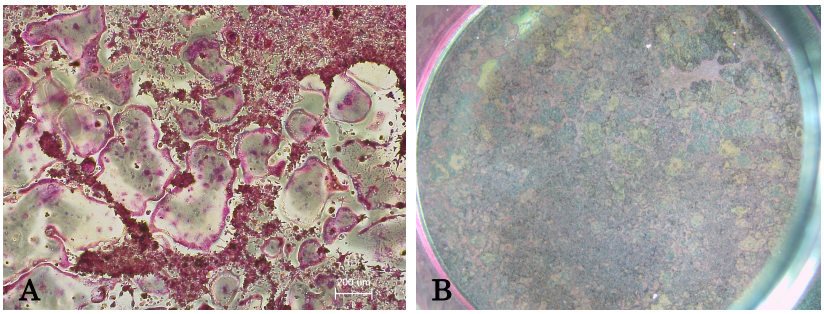

図 1 ：マウス破骨細胞 培養用メディウム(Code:OSCMM)で 7 日間培養した細胞（24well プレートを使用）を TRAP 染色キットで染色した例
A：倍率 4 倍　B：well 全体

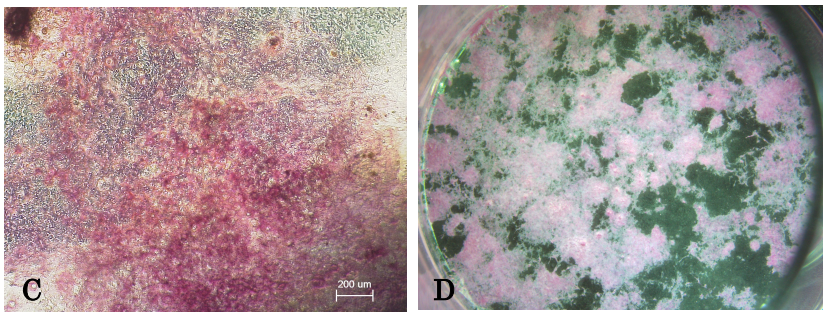

図 2 ：骨形成メディウム(Code:OGCMO)で 21 日間培養した細胞（24well プレートを使用）を石灰化染色キットで染色した例
C：倍率 4 倍　D：well 全体

《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いて投稿された論文、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 番地 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

コスモ・バイオ株式会社
COSMO BIO CO., LTD.

〒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
URL : http://www.primarycell.com/