



# Bone Marrow-derived mesenchymal stem cell

(Rat Bone Marrow-derived)

Catalog No. MSB01C

August 26, 2020

## Principle

Mesenchymal Stem Cells (MSC), being one kind of somatic stem cells, can be isolated from adipose tissue, bone marrow, umbilical cord, dental pulp or the like. In 2006, Dominici et al. have defined, as Mesenchymal Stem Cells, the cells satisfying the following three criteria: (1) MSC must be adherent to plastic culture vessels; (2) MSC must express CD105, CD73 and CD90 as positive markers and lack expression of CD45, CD34, CD11b, CD79a or CD19 and HLA-Class II(DR) as negative markers; and (3) MSC must have differentiation potency to osteoblasts, adipocytes and chondroblasts<sup>1)</sup>. Mesenchymal Stem Cells are known to have excellent characteristics of, in addition to excellent autologous growth, having pluripotency not only to bone, cartilage, and fat but also to liver or the like<sup>2)3)5)7)</sup>, lacking the expression of MHC Class II<sup>3)</sup>, having immunomodulatory capabilities<sup>4)</sup>, collecting on a diseased region to secrete various cytokines and growth factors<sup>5)</sup>, being effective in promoting tissue regeneration and repair<sup>6)7)</sup>, and the like.

This product is Mesenchymal Stem Cells (BMSC / BSC: Bone Marrow Delivered Mesenchymal Stem Cells / Bone Marrow Delivered Stromal Cells) and is prepared by collecting, from the cell groups (product name: Bone Marrow Cell Culture Kit BMC01) isolated from bone marrow of adult SD rats, the MSC fractions being positive in CD44, CD73, CD90 and CD105 and negative in CD14, CD31 and CD45, and then cryopreserving the resultant material.

## Warranty

**Cosmo Bio warrants that product (cells) will be viable until the expiration date, and is valid only if the product is stored and cultured according to the information indicated in this product data sheet. Cosmo Bio has optimized the cell culture media formulation which is ideal for the product. While other, unspecified cell culture media may also produce satisfactory results, a change in cell culture media or the absence of an additive(s) from the recommended cell culture media may affect recovery, growth and/or function of the product. If an alternative cell culture medium formulation is used to culture the product, the Cosmo Bio warranty for cell viability is no longer valid.**

## Kit Components

Components	Size	Quantity	Storage	Expiration date
Rat Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cell (frozen cells)	$0.5 \times 10^6$ cells/vial	1	Liquid nitrogen vapor phase	6 months

※This product is delivered with dry ice package. Immediately store the received cells in liquid nitrogen.

## Optimized Culture Medium (selling separately)

Catalog No.	Product Name	Size	Quantity	Storage Conditions	Expiration date
MSB-GM	Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cell (BMSC) Growth Medium	500 mL	1	-20°C (4°C after thawing)	- Written on the bottle (stored at -20°C) 3months after thawing (stored at 4°C)
		250 µL	2	-20°C (4°C after thawing)	- Written on the bottle (stored at -20°C) 2weeks after thawing (stored at 4°C)

(Manufacturer Abbreviation: PMC)

## Other Items Not Packaged

### Trypsin

Product Name	Code No.	Size
Trypsin EDTA Solution C (0.05%), EDTA (0.02%)	03-053-1B	100 mL

(Biological Industries Ltd. Manufacturer Abbreviation: BLG)

### Cell Freezing Medium

Product Name	Code No.	Size
COS banker	COS-CFM01	120 mL

(Manufacturer Abbreviation: KOJ)

**Collagen Coating Solution** to be used during differentiation. Unnecessary upon amplifying MSC in the growth medium

Product Name	Code No.	Size
Collagen Coating Solution	SCO	100 mL

(Manufacturer Abbreviation: PMC)

## Adipocytes Staining Kit

Product Name	Code No.	Components	Volume
Lipid Assay Kit	AK09F	Oil Red O Solution Solvent for Oil Red O Extraction	150 mL × 2 200 mL × 2

(Manufacturer Abbreviation: PMC)

## Related Products

### List of Single Articles for Adipogenic Differentiation Medium (Serum-Containing Medium)

Product Name	Size	Quantity	Code No.	Storage	Shelf Life
Mesenchymal Stem Cell (MSC) Adipogenic Differentiation Medium Set	MSC-ADGM 125 mL MSC-ADDM 100 mL MSC-ADMM 125 mL	1 set	MSC- ADM	-20°C (4°C after thawing)	- Written on the bottle (stored at - 20°C) 3months after thawing (stored at 4°C)
Growth Medium (Mesenchymal Stem Cell (MSC) Adipogenic Differentiation Medium Set)	500 mL	1	MSC- ADGM		
Differentiation Medium (Mesenchymal Stem Cell (MSC) Adipogenic Differentiation Medium Set)	500 mL	1	MSC- ADDM		
Maintenance Medium (Mesenchymal Stem Cell (MSC) Adipogenic Differentiation Medium Set)	500 mL	1	MSC- ADMM		

(Manufacturer Abbreviation: PMC)

## Bone-marrow Derived Mesenchymal Stem Cell (BMSC)

### Chondrogenic Differentiation Medium

Components	Size	Quantity	Code No.	Storage	Shelf Life
Chondrogenic Differentiation Medium	50 mL	1	MSC-CHB	-20°C (4°C after thawing)	- Written on the bottle (stored at -20°C) 3months after thawing (stored at 4°C)
Supplement	250 µL	1			- Written on the bottle (stored at -20°C) 1months after thawing (stored at 4°C)

(Manufacturer Abbreviation: PMC)

**Other Mesenchymal Stem Cell** Products are partially listed in the Table. Refer to the web site for details.

Product Name	Code No.	Size	Quantity	Storage	Expiration date
Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell	MSA01C	$1 \times 10^6$ cells/vial	1	Liquid nitrogen vapor phase	6 months

(Manufacturer Abbreviation: PMC)

### Cell Culture Method, cultured in 10 cm dish

#### Preparation of Growth Medium

1. Thaw the growth medium at room temperature and transfer 100 mL thereof to a new medium bottle. The remaining medium can be stored for 3 months at 4°C.
2. Thaw the supplement when used, and add it to the growth medium. Then, 100 mL of growth medium can be prepared by one tube of 250 µL supplement. The medium after addition of the supplement can be stored for two weeks at 4°C.

#### Thawing and Seeding of Cells

1. Thaw the frozen cells in warm water at 37°C for 80 to 90 seconds (to a degree at which about 1 mm of ice lump remains.).  
※ The frozen cells in this kit are delivered in dry ice packaging. When the culture is not made immediately, immediately keep the cells at -80°C or in a liquid nitrogen container. When the cells are stored for a long time of six months or more, store the cells in liquid nitrogen.
2. For contamination prevention, wipe off moisture attached outside the vial with an alcohol swab, and then open the vial, and transfer the thawed cell liquid to a 15 mL conical tube having 10 mL of growth medium returned to room temperature therein. Gently mix the liquid, and then centrifuge it at  $100 \times g$  for five minutes.
3. Remove the supernatant by suction, add 9 mL of growth medium thereto and disperse the cells thereinto ( $0.55 \times 10^5$  cells/mL).

4. Put 3 mL of cell suspension and 7 mL of growth medium in a 10 cm dish, and gently shake the resultant mixture to uniformly disperse the cells thereinto. Incubate the cells in the presence of 5% CO<sub>2</sub> in an incubator at 37°C (one vial of frozen cells corresponds to three 10 cm dishes.).
5. Replace the medium with the growth medium kept warm at 37°C on the following day from seeding (the first day of culture).
6. Conduct subculture and differentiation experiments on the cells or cryopreserve the cells at a 70 to 80% confluent state (the 2<sup>nd</sup> to 4<sup>th</sup> day of culture).

#### **Cell Collection and Subculture (in the case of 10 cm dish)**

1. Remove the old medium from the cell culture vessel at the 70 to 80% of confluent state (the 2<sup>nd</sup> to 4<sup>th</sup> day of culture), and rinse the cells using HBSS or PBS (-) once or twice.
2. Put 3 mL of 0.05% trypsin-EDTA in the dish and leave it at 37°C for one to two minutes while observing the state.
3. Gently tap the culture vessel horizontally, and then confirm peeling thereof with a microscope. If not, leave it at 37°C further for one minute.
4. Add 10 mL of growth medium thereto, deactivate trypsin, and collect the cells into the centrifugal tubes by pipetting.
5. Centrifuge the tubes at 100 × g for five minutes, and then remove the supernatant, and add a suitable amount of medium to suspend the cells thereinto to disperse the cells.
6. Count the number of cells, and then adjust the cell density necessary to a level for the objective experiments to conduct seeding and differentiation induction experiments.

#### **Precautions:**

- Subculture twice or more is not recommended because growth rate or differentiation efficiency is significantly reduced.
- Trypsin-EDTA processing for 10 minutes or more causes deterioration of the state of cells.

### **Preparation of Frozen Stock**

1. Perform the steps 1 to 4 in the method of cell collection and subculture.
2. Centrifuge the tubes at  $100 \times g$  for 5 minutes at room temperature, and then remove the supernatant, and add COS banker (KOJ, Code No. OCS-CFM01) thereto to be  $1 \times 10^6$  cells/mL, and suspend the cells thereinto.
3. Put the resultant suspension in a cell freezing tube at 1 mL/tube, freeze the suspension at  $-80^\circ\text{C}$  by using a cell freezing container (BM Equipment Co, Ltd., Code No.: BCS-136 or equivalent), and store the tubes.
4. Leave the tubes to stand at  $-80^\circ\text{C}$  for one day or more, and transfer the tubes into liquid nitrogen.

### **Differentiation into Adipocytes by Adipogenic Differentiation Medium**

Precaution: After adipogenic differentiation, the cells are significantly easily peeled. In such a case, collagen coating is recommended.

#### **Collagen Coating.**

1. Put the collagen coating solution (PMC, Code No.: SCO) in a culture vessel to be used at a degree of being covered, leave the resulting material to stand for one hour or more (overnight for the glass bottom), and then remove the solution.
2. Rinse the vessel with PBS twice, and then put PBS therein, and leave the resultant material to stand for one or more hours, and then use the resultant material. If the material is not used immediately, fill the vessel with PBS, which can be kept for several days at room temperature.

#### **Adipogenic Differentiation**

1. Incubate the cells in the growth medium in advance to a 70 to 80% confluent state according to the method of thawing and seeding of cells (cell density:  $1.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>).
  2. Replace the medium with the growth medium of the adipogenic differentiation set, kept warm at  $37^\circ\text{C}$ , and incubate the cells for one to two days until the cells reach a 100% confluent state.
  3. Replace the medium with the differentiation medium of the adipogenic differentiation set, kept warm at  $37^\circ\text{C}$ , and incubate the cells for three days.
  4. Replace the medium with the maintenance medium of the adipogenic differentiation set, kept warm at  $37^\circ\text{C}$ , and incubate the cells for two days.
  5. Repeat the step 3 again. In this stage, small fat globules begin to emerge.
  6. Replace the medium with the maintenance medium, and observe the growth of the fat globules.
- × Accumulated adipocyte can be stained with the Lipid Assay Kit (Fig. 2).

## Differentiation into Chondrocytes by Chondrogenic Differentiation Medium

### Preparation of Medium

Thaw the chondrogenic differentiation medium (50 mL) at room temperature before use, and add one vial of thawed supplement.

### Chondrogenic Differentiation

1. Seed the cells in a 10 cm dish or the like in advance according to the method of Cell Collection and Subculture, collect the cells which reached the 70 to 80% confluent state, and count the number of cells.
2. Centrifuge the tubes at  $100 \times g$  for five minutes at room temperature, remove the supernatant, suspend the remaining solid with the chondrogenic differentiation medium, and adjust the cell density to be  $5.0 \times 10^5$  cells/mL. Dispense the resultant material by 0.5 mL for each 15 mL tube. ( $2.5 \times 10^5$  cells per tube).
3. Centrifuge the tubes at  $100 \times g$  for five minutes at room temperature, and then lightly loosen the cap of each tube in a clean bench so as to exchange gases, and incubate the cells in the presence of 5%  $\text{CO}_2$  in the incubator at  $37^\circ\text{C}$ . On that occasion, do neither suck the supernatant nor re-suspend the pellets.
4. Leave the pellets to stand for 24 hours, and replace the medium with the chondrogenic differentiation medium to which the supplement is added, every 2 to 3 days. When the pellets are attached to the tube during medium exchange, gently tap the tube to drop the pellets.
5. Chondrocytic cell mass is formed in two to four weeks.
6. The formed chondrocytic cell aggregates are fixed by formalin, embedded with paraffin, and then can be stained with Alcian Blue or the like (Fig. 3).

### Cell Morphology

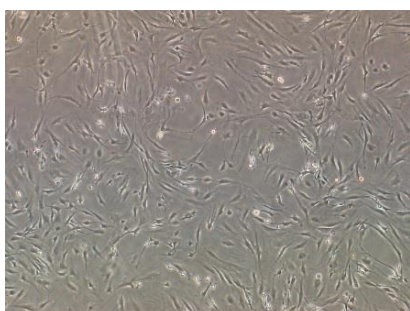


Fig. 1 Cells on the third day of culture (Culturing in BMSC growth medium)

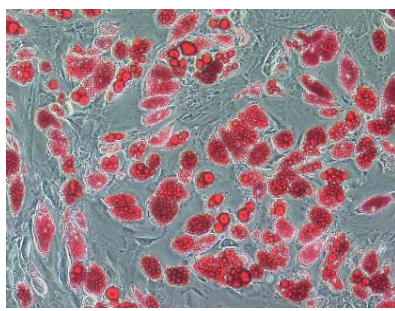


Fig. 2 Adipogenically differentiated cells (Staining with Lipid Assay Kit)



Fig. 3 Chondrogenically differentiated cells (Staining with Alcian Blue)

## References

1. Dominici M et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4):315-7.
2. Uccelli A et al. Mesenchymal stem cells in health and disease, *Nat. Rev. Immunol.*, 8, 726, 2008.
3. Le Blanc K. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005 May; 11(5):321-34.
4. Alma J N et al. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007 Nov 15; 110(10): 3499-506
5. Banas A et al. IFATS collection: In vivo therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury. *Stem Cells*. 2008 Oct; 26(10): 2705-12.
6. Wollert.K.C. et al. *Lancet*, 364: 141, 2004
7. Sato.Y.et al. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood*, 106, 756, 2005



**COSMO BIO Co., LTD.**

**【JAPAN】**

TOYO EKIMAE BLDG. 2-20, TOYO 2-CHOME,  
KOTO-KU. TOKYO 135-0016, JAPAN  
Phone: +81-3-5632-9610  
FAX: +81-3-5632-9619  
URL: <https://www.cosmobio.co.jp/>



**COSMO BIO USA**

**【Outside Japan】**

2792 Loker Ave West, Suite 101  
Carlsbad, CA 92010, USA  
email: [info@cosmobioussa.com](mailto:info@cosmobioussa.com)  
Phone/FAX: (+1) 760-431-4600  
URL: [www.cosmobioussa.com](http://www.cosmobioussa.com)

**For research use only. Not for clinical diagnosis.**



凍結初代細胞製品

# ラット骨髄由来間葉系幹細胞

## 【Rat Bone Marrow-derived mesenchymal stem cell, Code No. MSB01C】

本製品は研究目的にのみご使用になれます。

2020年8月26日改訂

### I. 製品概要

体性幹細胞の一種である間葉系幹細胞 (MSC: Mesenchymal Stem Cells) は、脂肪組織、骨髄、臍帯、歯髄などから分離することが可能です。2006年 Dominici らは、①プラスチック培養容器に接着する、②CD105, CD73, CD90を陽性マーカー、CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19, HLA-ClassII (DR) を陰性マーカーとする、③骨、脂肪、軟骨への分化能を有する、の3条件を満たすものを間葉系幹細胞と定義しました<sup>1)</sup>。

間葉系幹細胞は優れた自己増殖性に加え、骨、軟骨、脂肪のみならず肝などへの多分化能力を持ち<sup>2) 3) 5) 7)</sup>、MHC Class-II を発現せず<sup>3)</sup>、免疫調整機能を持つ<sup>4)</sup>、疾患部位に集積し様々なサイトカインや増殖因子を分泌して<sup>5)</sup>、組織再生・修復を促進する効果がある<sup>6) 7)</sup>、などの優れた特徴が知られております。

本製品はSDラット成獣の骨髄から分離した細胞群から、CD44, CD73, CD90, CD105が陽性、CD14, CD31, CD45が陰性であるMSC画分を採取後凍結保存した間葉系幹細胞 BMSC / BSC (Bone Marrow Delivered Mesenchymal Stem Cells / Bone Marrow Delivered Stromal Cells) です。

### 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](mailto: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
ラット骨髄由来 間葉系幹細胞 (凍結細胞)	0.5×10 <sup>6</sup> cells/バイアル	1本	液体窒素保存	6ヶ月

※本細胞は、ドライアイス梱包で発送しています。

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

ラット骨髄由来(SD ラット)

## VI. 専用メディアウム(別売)

品名	製品コード	構成	容量	本数	保存方法	有効期限
ラット 骨髄由来 間葉系幹細胞 増殖用メディア ウムセット	MSB-GM	増殖用 メディアウム	200 mL	1 本	-20℃保存 (解凍後は 4℃保存)	ボトルに記載 (-20℃保存) 解凍後は3ヶ月 (4℃保存) ※サプリメントは2週間 (4℃保存)
		サプリメント	250 μL	2 本		

培地の主成分：DMEM、血清、抗生剤、その他

## 各種分化誘導用培地

### 脂肪分化用培地

品名	製品コード	構成	容量	本数	保存方法	有効期限
脂肪分化用メディアウムセット (MSC-ADGM, ADDM, ADMM)	MSC-ADM	増殖用	125mL	一式	-20℃保存 (解凍後は 4℃保存)	ボトルに記載 (-20℃保存) 解凍後は3ヶ月 (4℃保存)
		分化用	100mL			
		維持用	125mL			
脂肪分化用増殖メディアウム	MSC-ADGM	500 mL		1 本		
脂肪分化誘導用メディアウム	MSC-ADDM	500 mL		1 本		
脂肪細胞維持用メディアウム	MSC-ADMM	500 mL		1 本		

(メーカー略号：PMC)

### 軟骨分化用メディアウムセット(BMSC用)

品名	製品コード	構成	容量	本数	保存方法	有効期限
軟骨分化用メディアウム セット(BMSC用)	MSC-CHB	軟骨分化用 メディアウム	50mL	1 本	-20℃保存 (解凍後は 4℃保存)	ボトルに記載 (-20℃保存) 解凍後は3ヶ月 (4℃保存) ※サプリメントは1ヶ月(4℃保 存)
		サプリメント	500 μL	1 本		

(メーカー略：PMC)

## VII. 関連製品

**コラーゲンコート用溶液** 分化時に使用します。AMSC を増殖用メディウムで増幅させる時は不要です。

品名	製品コード	容量
コラーゲンコート用溶液	SCO	100 mL

(メーカー略号：PMC)

### トリプシン溶液

品名	製品コード	容量
Trypsin EDTA Solution C(0.05%),EDTA(0.02%)	03-053-1B	100 mL

(Biological Industries Ltd. メーカー略号：BLG)

### 培養細胞凍結保存液

品名	製品コード	容量
COS banker	COS-CFM01	120 mL

(メーカー略号：KOJ)

### 脂肪染色キット

品名	製品コード	構成品	容量
リピットアッセイキット	AK09F	オイルレッド O 原液 抽出液	150 mL 2本 200 mL 2本

(メーカー略号：PMC)

表に記載した関連製品は一部になります。詳しくは web からご覧ください。

## VIII. 本製品は【継代可能】です。

※本製品は【1回のみ継代可能】です。

(2回以上の継代は増殖速度や分化効率が著しく低下する為お勧めいたしません。)

### 増殖用メディウム調製

- ①増殖用メディウムを室温にて溶解し、100 mL を新しいメディウムボトルに移します。残った培地は 4℃で 3ヶ月間保存可能です。
- ②使用時にサプリメントを溶解し、増殖用メディウムに加えて下さい。サプリメント 250μL チューブ 1本で 100 mL の増殖用メディウムが調整可能です。サプリメント添加後のメディウムは 4℃で 2週間保存可能です。

### 細胞の解凍・播種

※下記は、100mm ディッシュで培養する場合のプロトコールです。

#### 【準備するもの】

- ・調製済みのラット骨髄由来間葉系幹細胞(BMSC) 増殖用メディウム
- ・コラーゲンコート済みの細胞培養用 100mm ディッシュ
- ・滅菌済ピペット、遠心チューブなどの培養器具

- ①凍結細胞を 37°C 温水にて 80~90 秒間解凍してください。(1 mm 程度の氷塊が残る程度)
  - ②コンタミ防止のためバイアル外側に付着した水分をアルコール綿でふき取ったのち開封し、解凍した細胞液を、予め室温に戻した増殖用メディウム・10 mL が入っている 15 mL コニカルチューブに移します。穏やかに混和した後、室温、100xg で 5 分間遠心してください。
  - ③上清を吸引除去し、9 mL 増殖用メディウムを加え細胞を分散させてください(0.55×10<sup>5</sup> cells/mL)。
  - ④コラーゲンコート済み 100 mm ディッシュに、7 mL の増殖用メディウムと、3 mL の細胞浮遊液を加え、穏やかに攪拌して細胞を均一に分散させます。5%CO<sub>2</sub> 存在下の 37°C インキュベーターで培養してください。
- (凍結細胞 1 本は 100 mm ディッシュ、3 枚相当になります)
- ⑤播種した翌日 (培養 1 日目)、37°C に保温した増殖用メディウムで培地交換してください。
  - ⑥70~80%コンフルエント (培養 2~4 日目) で継代・分化実験、または凍結保存を行ってください。

### ※コラーゲンコート方法

#### 【準備するもの】

- ・ご使用になる培養容器
- ・コラーゲンコート用溶液 (製品コード : SCO)
- ・PBS(-)または HBSS(-)

- ① 使用する培養容器にコラーゲンコート用溶液 (製品コード SCO) が覆われる程度加え (24 ウェルプレートの場合 300~500μL)、1 時間以上 (ガラス底の場合は一晩) 静置後に除去します。
- ② PBS(-)で 2 回洗浄後、PBS(-)を加えて 1 時間以上静置してからご使用してください。  
ただちに使用しない場合は PBS(-)を満たして室温で数日間保管可能です。

### 細胞回収・継代 (100mm ディッシュの場合)

#### 【準備するもの】

- ・70~80%コンフルエントになった細胞
- ・調製済みのラット骨髄由来間葉系幹細胞(BMSC)増殖用メディウム
- ・HBSS(-)または PBS(-)
- ・0.05%トリプシン-EDTA 溶液

- ①70~80%コンフルエント (培養 2~4 日目) になった細胞の培養容器から、古い培地を除去し、HBSS(-)または PBS(-)で 1~2 回洗浄します。
- ②0.05%トリプシン-EDTA を 3 mL 入れ、観察しながら 37°C で 1~2 分インキュベートします。
- ③培養容器を水平に軽くたたいた後、顕微鏡で細胞が剥がれた事を確認します。剥がれていない時は、さらに 37°C で 1 分間インキュベートします。
- ④増殖用メディウムを 10 mL 加え、トリプシンの活性を止め、ピペッティングして細胞を遠心チューブに回収します。
- ⑤室温、100xg、5 分間遠心後、上清を除去し、メディウムを適量加えて懸濁し細胞を分散させます。
- ⑥細胞数をカウント後、目的の実験に必要な細胞密度に調整し、播種、分化誘導実験を行ってください。

注意)

- ・2回以上の継代は増殖速度や分化効率が著しく低下する為お勧めいたしません。
- ・10分以上のトリプシン-EDTA処理は細胞の状態が悪化します。

### 凍結ストックの調整

#### 【準備するもの】

- ・70～80%コンフルエントになった細胞
- ・調製済みのラット骨髄由来間葉系幹細胞(BMSC)増殖用メディウム
- ・HBSS(-)またはPBS(-)
- ・0.05%トリプシン-EDTA溶液
- ・凍結保存液 (COS banker 製品コード: COS-CFM01 など)
- ・凍結保存用チューブ
- ・細胞凍結用コンテナ (CoolCell BM 機器 製品コード: BCS-136 など)

- ① 継代方法の①～④を行います。
- ② 室温、100xg、5分間遠心後、上清を除去し、メディウムを適量加えて再懸濁し細胞をカウントします。
- ③ 再度、室温、100xg、5分間遠心を行った後、上清を除去し、凍結保存液 (COS banker 製品コード COS-CFM01 など) を  $1 \times 10^6$  cells/mLになる様に加えて懸濁します。
- ④ 細胞を凍結保存用チューブに分注し、細胞凍結用コンテナ等を用いて-80℃で凍結します。
- ⑤ 翌日以降、液体窒素容器に移して保管してください。

### 脂肪細胞への分化誘導

※脂肪分化メディウムセット (製品コード: MSC-ADM) を用いた分化誘導プロトコールです。

注意) 脂肪分化後は、細胞が非常に剥がれやすくなります。コラーゲンコート済みの培養容器をご使用になることをお勧めいたします。

※コラーゲンコート方法については、「細胞の解凍・播種」の記載をご参照下さい。

### 脂肪細胞への分化誘導プロトコール

#### 【準備するもの】

- ・調製済みのラット骨髄由来間葉系幹細胞(BMSC)増殖用メディウム
- ・70～80%コンフルエントになった細胞
- ・コラーゲンコート済みの培養容器
- ・脂肪分化用メディウムセット (製品コード: MSC-ADM)

- ① あらかじめ細胞の解凍・播種(細胞密度: $1.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>)に従い増殖用メディウムで70～80%コンフルエントまで培養します。
- ② 37℃に保温した脂肪分化メディウムセットの増殖用メディウムで培地交換し、100%コンフルエントになるまで1～2日間培養します。
- ③ 37℃に保温した脂肪分化メディウムセットの分化誘導用メディウムに培地交換し、3日間培養し

てください。

- ④ 37℃に保温した脂肪分化メディウムセットの維持メディウムに培地交換し、2日間培養してください。
- ⑤ 再び分化誘導用メディウムに培地交換し、3日間培養してください。  
この段階で小さな脂肪球が現れ始めます。
- ⑥ 維持メディウムに培地交換し、脂肪球の成長を観察します。以降は、2～3日に1回維持メディウムにて培地交換を行ってください。

※蓄積した脂肪はリピットアッセイキット（製品コード：AK09F）で染色できます（図2）。

### 軟骨細胞への分化誘導

※軟骨分化用メディウムセット（製品コード：MSC-CHB）を用いた分化誘導プロトコールです。

### 軟骨用分化用メディウムの調製

ご使用前に軟骨分化用メディウム(50mL)を室温にて溶解し、溶解したサプリメント1本を添加してください。

### 軟骨細胞への分化誘導プロトコール

#### 【準備するもの】

- ・調製済みのラット骨髄由来間葉系幹細胞(BMSC)増殖用メディウム
- ・調製済みの軟骨分化用メディウムセット（BMSC用）
- ・70～80%コンフルエントになった細胞

- ① 70～80%コンフルエントになった細胞を、細胞の継代方法の①～⑤を行い、細胞数をカウントします。
- ② 室温、100xg、5分間遠心後、上清を除去し、軟骨分化用メディウムで懸濁し、 $5.0 \times 10^5$  cells/mLになるように細胞密度を調整します。15mLチューブ1本につき0.5mLずつ分注します。（チューブ1本当たり、 $2.5 \times 10^5$  cells）
- ③ 室温、100xg、5分間遠心した後、上清は吸引せず、ガス交換できるようにするためクリーンベンチ内でチューブのフタを軽く緩め、5%CO<sub>2</sub>存在下の37℃インキュベーターでそのまま培養してください。

※ペレットのまま培養しますので、ピペッティングなどで細胞を再浮遊させないでください。

- ④ ペレットは24時間静置し、以後2～3日おきに、サプリメントを添加した軟骨分化メディウムで培地交換します。培地交換の時に、ペレットがチューブの側面に付着していた場合は、チューブを軽くたたいてペレットをチューブの底に落とします。
- ⑤ 2～4週間で軟骨細胞塊が形成されます。
- ⑥ 形成された軟骨細胞凝集塊はホルマリン固定、パラフィン包埋の後、アルシアンブルーなどで染色できます。（図3）

## IX. 技術情報

### 細胞形態写真

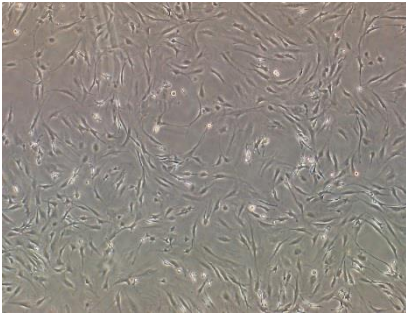


図1) 培養3日目の細胞  
(BMSC増殖用メディウムで培養)

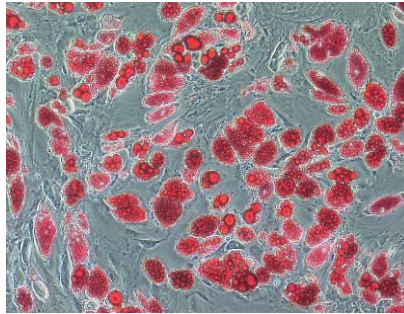


図2) 脂肪分化した細胞  
(リピッドアッセイキットにて染色)

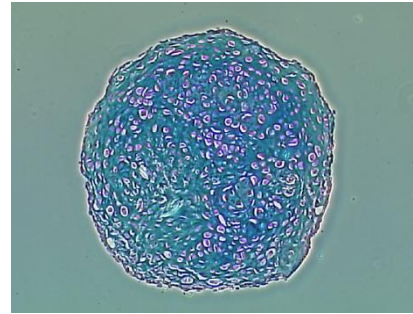


図3) 軟骨分化した細胞  
(アルシアンブルー染色)

- 1 Dominici M et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4):315-7.
- 2 Uccelli A et al. Mesenchymal stem cells in health and disease, *Nat.Rev.Immunol.*,8,726,2008.
- 3 Le Blanc K. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2005 May; 11(5):321-34.
- 4 Alma J N et al. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007 Nov 15; 110(10):3499-506
- 5 Banas A et al. IFATS collection: In vivo therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury. *Stem Cells*. 2008 Oct; 26(10):2705-12.
6. Wollert.K.C. et al. *Lancet*,364 : 141,2004
7. Sato.Y.et al. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood*,106,756,2005

《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き投稿された論文、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



〒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