



Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells, Rat

【Rat bone marrow-derived, Catalog No. MSB01C】

July 1, 2024

I. Product Overview

Mesenchymal stem cells (MSCs), a type of somatic stem cell, can be isolated from adipose tissue, bone marrow, umbilical cord, and dental pulp etc. In 2006, Dominici *et al.* defined human MSCs based on three criteria¹⁾: (1) Adhesion to plastic culture vessels; (2) Expression of positive markers CD105, CD73, and CD90, and non-expression of negative markers CD45, CD34, HLA-Class II (DR), CD14, CD11b, CD79a, and CD19; and (3) Ability to differentiate into osteocytes, adipocytes, and chondrocytes.

MSCs are known for their excellent self-proliferation abilities, and possess the capacity to differentiate into a variety of cells, including not only bone, cartilage, and fat, but also liver^{2, 3, 4, 5)}. MSCs do not express MHC Class-II proteins³⁾, possess immunomodulatory functions⁶⁾, and accumulate at diseased sites, secreting various cytokines and growth factors⁴⁾, which promotes tissue regeneration and repair^{5, 7)}.

This product consists of cells that have been subcultured (one passage) after being isolated from the bone marrow of adult SD rats by density gradient centrifugation method⁸⁾. This product has been confirmed to differentiate into osteocytes, adipocytes, and chondrocytes (Note: Verification of surface antigen markers has not been conducted.).

II. Precautions Before Use

Please make sure to review this manual before using the product.

Product should be used under [aseptic operation]. The biosafety level is [Level 1].

Please use the dedicated medium sold separately for culturing this product.

III. Product Warranty

We guarantee against growth failure after the start of culture only if cells have been properly stored in liquid nitrogen, and cultured according to the manual using the dedicated medium and reagents.

The warranty period is [within 6 months of receiving the product].

Please note that the warranty does not apply if there have been changes to the medium or the method of use, if cells have been subcultured beyond the recommended number of passages, or re-frozen cells have been used.

IV. Product Components

Product Name	Catalog No	Size	Quantity	Storage	Expiration
Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells, Rat	MSB01C	0.5 × 10 ⁶ cells/vial	1	Liquid nitrogen vapor phase	6 months

(This product is shipped with dry ice package. If the product is not to be used immediately upon receipt, please store it in liquid nitrogen.)

V. Cell origin

Derived from the femoral bone marrow of 3-5-weeks old SD rats

VI. Dedicated Media (Serum-Containing Media) (sold separately)

Growth Medium

Product Name	Catalog No.	Components	Size	Quantity	Storage	Expiration date
BMMSC Growth Medium	MSB-GM	Growth Medium	200 mL	1	-20 °C (frozen) 4 °C (after thawing)	Labeled on the bottle (when stored at -20 °C) 3 months after thawing (when stored at 4 °C)
		Supplement	250 µL	2		Labeled on the bottle (when stored at -20 °C) 2 weeks after thawing (when stored at 4 °C)

(Medium's main ingredients: DMEM (Low glucose), serum, antibiotics, etc.)

Adipogenic Differentiation Medium

Product Name	Catalog No.	Size	Quantity	Storage	Expiration date
MSC Adipogenic Differentiation Medium	MSC-ADDM	250 mL	1	-20 °C (frozen) 4 °C (after thawing)	Labeled on the bottle (when stored at -20 °C)
MSC Adipogenic Maintenance Medium	MSC-ADMM	250 mL	1		3 months after thawing (when stored at 4 °C)

Chondrogenic Differentiation Medium

Product Name	Catalog No.	Components	Size	Quantity	Storage	Expiration date
BMMSC/CBMSC Chondrogenic Differentiation Medium	MSC-CHB	Chondrogenic Differentiation Medium	50 mL	1	-20 °C (frozen) 4 °C (after thawing)	Labeled on the bottle (when stored at -20 °C) 3 months after thawing (when stored at 4 °C)
		Supplement	125 µL	1		Labeled on the bottle (when stored at -20 °C) 1 month after thawing (when stored at 4 °C)

VII. Related Products

Collagen Coating Solution

Product Name	Catalog No.	Size	Quantity
Collagen Coating Solution	SCO	100 mL	1

Cell Cryopreservation Medium

Product Name	Catalog No.	Size	Quantity
COS banker	COS-CFM01	120 mL	1

Adipocytes Staining Kit

Product Name	Catalog No.	Components	Size	Quantity
Lipid Assay Kit	AK09F	Oil Red O Solution	150 mL × 2	1 Set
		Solvent for Oil Red O	200 mL × 2	

VIII. Instructions For Use

- Remove the cryovial from the dry ice packaging and immediately place in liquid nitrogen until use.
- This product is confirmed [to be capable of being subcultured only once]. Subculturing more than twice may affect cell proliferation rate and differentiation efficiency. Therefore, customers should use their own discretion regarding its feasibility.
- We recommend using a collagen-coated culture vessel. This is particularly important when inducing differentiation into adipocytes, as the cells become very prone to detachment.

IX. Protocols

Collagen Coating

[Requirements]

- Culture vessels (100-mm dishes recommended for cell proliferation; 24-well plates recommended for induction of adipocyte or osteocyte differentiation.)
 - Collagen coating solution (Catalog No.: SCO)
 - PBS(-) or HBSS(-)
 - Sterile pipettes, conical tubes, and other culture equipment
1. Add enough collagen coating solution to cover the surface of the culture vessel (approximately 5 mL for a 100-mm dish, 0.3–0.5 mL/well for a 24-well plate); thereafter, immediately remove the solution. For glass-bottom vessels, let the solution stand overnight before removing it.
 2. Wash twice with PBS(-) or HBSS(-), then add PBS(-) or HBSS(-) and let stand for at least one hour before use. If not using immediately, fill the vessel with PBS(-) or HBSS(-) and store at room temperature for several days.

Preparation of Growth Medium

[Requirements]

- BMMSC Growth Medium (Catalog No.: MSB-GM)
 - Sterile pipettes, conical tubes, and other culture equipment
1. Thaw the growth medium at 4 °C and transfer 100 mL to a new medium bottle. The remaining medium can be stored for 3 months at 4 °C.
 2. Thaw the supplement at 4 °C and add one bottle of thawed supplement (250 µL) to the 100 mL growth medium. The prepared growth medium with the supplement can be stored for 2 weeks at 4 °C.

Cell Thawing and Seeding

※ For culturing in 100-mm dishes.

[Requirements]

- Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells, Rat (Catalog No.: MSB01C)
 - BMMSC Growth Medium (Catalog No.: MSB-GM) (Prepared medium)
 - Three collagen-coated 100-mm dishes
 - Sterile pipettes, conical tubes, and other culture equipment
1. Remove the cryovial containing the frozen cells from liquid nitrogen storage, and immediately place it in a 37 °C water bath. Quickly thaw the cells (within 90–120 seconds) by gently swirling the vial in the 37 °C water bath until only a small bit of ice remains in the vial.
 2. Transfer the vial to a clean bench. Before opening, wipe the outside of the vial with 70% ethanol.
 3. Transfer the thawed cell solution to a 15-mL conical tube containing 10 mL of pre-warmed (37 °C) growth medium. After gentle mixing, centrifuge the solution at 200 ×g for 5 minutes at room temperature.
 4. Remove and discard the supernatant, then add 9 mL of pre-warmed (37 °C) growth medium and

resuspend the cells.

5. Add 3 mL of the cell suspension and 7 mL of pre-warmed (37 °C) growth medium each to three 100-mm dishes pre-coated with collagen. Gently mix to evenly disperse the cells. Then, culture the cells in a 37 °C incubator with 5% CO₂.
6. At the next day after seeding of cells (the 1st day of culture), replace the medium with pre-warmed (37 °C) growth medium. Thereafter, replace the medium every 1–2 days with pre-warmed (37 °C) growth medium (Fig. 1).
7. Once 70–80% confluency is achieved (the 2nd to 4th day of culture), proceed with passaging, differentiation induction experiments, or freeze the cells for storage.

Cell Subculturing

※ For subculturing from 100-mm dishes.

[Requirements]

- Cells at 70–80% confluency
 - BMMSC Growth Medium (Catalog No.: MSB-GM) (Prepared medium)
 - PBS(-) or HBSS(-)
 - 0.05% trypsin-EDTA solution
 - Collagen-coated culture vessels
 - Sterile pipettes, conical tubes, and other culture equipment
1. Remove and discard the remaining growth medium from the culture vessel containing cells at 70–80% confluency (the 2nd to 4th day of culture), wash the vessel with pre-warmed (37 °C) PBS(-) or HBSS(-) 1–2 times.
 2. Add 3 mL of 0.05% trypsin-EDTA solution and incubate the cells at 37 °C for 1–2 minutes while observing.
 3. Gently tap the culture vessel horizontally, then check for cell detachment under a microscope. If the cells have not detached, incubate further for 1 minute at 37 °C (**Note: Extending trypsin-EDTA treatment beyond 10 minutes may affect cell condition. Cells not detached are strongly adhered to the vessel, and should not be forcibly detached to avoid damage or denaturation.**).
 4. Add 10 mL of pre-warmed (37 °C) growth medium to inactivate trypsin, and pipette to collect cells into a conical tube.
 5. Centrifuge at 200 ×g for 5 minutes at room temperature, remove and discard the supernatant, add an appropriate amount of pre-warmed (37 °C) growth medium, and resuspend and count the cells.
 6. After counting the cells, adjust to the required cell density for seeding, differentiation induction experiments, etc.

Cryopreservation of Cells

[Requirements]

- Cells at 70–80% confluency
 - BMMSC Growth Medium (Catalog No.: MSB-GM) (Prepared medium)
 - PBS(-) or HBSS(-)
 - 0.05% trypsin-EDTA solution
 - COS banker (Cell cryopreservation medium) (Catalog No.: COS-CFM01)
 - Cryovial
 - Cell freezing container (Product name: CoolCell FTS30, Manufacturer: BM Equipment Co, Ltd., Catalog No.: BCS-170 etc.)
 - Sterile pipettes, conical tubes, and other culture equipment
1. Perform steps 1 to 5 of “Cell Subculturing.”
 2. Centrifuge again at 200 ×g for 5 minutes at room temperature, remove and discard the supernatant, add pre-cooled (4 °C) cell cryopreservation medium, and resuspend to achieve 1×10^6 cells/mL.
 3. Dispense aliquots of the cell suspension into cryovials and freeze at –80 °C in a cell freezing container.
 4. Transfer to liquid nitrogen storage the following day.

Adipogenic Differentiation

※ For culturing in 24-well plates.

[Requirements]

- Collagen-coated 24 well plates
 - Cells at 70–80% confluency
 - BMMSC Growth Medium (Catalog No.: MSB-GM) (Prepared medium)
 - MSC Adipogenic Differentiation Medium (Catalog No.: MSC-ADDM)
 - MSC Adipogenic Maintenance Medium (Catalog No.: MSC-ADMM)
 - Sterile pipettes, conical tubes, and other culture equipment
 - Lipid Assay Kit (Catalog No.: AK09F)
1. Following “Cell Thawing and Seeding” or “Cell Subculturing”, seed cells in a collagen-coated 24-well plate (seeding density: 1×10^4 cells/cm²), and culture in growth medium (0.5 mL/well) until 70–80% confluency is achieved.
 2. Replace the medium with pre-warmed (37 °C) adipogenic differentiation medium (0.5 mL/well) and culture for 3 days.
 3. Replace the medium with pre-warmed (37 °C) adipogenic maintenance medium (0.5 mL/well) and culture for 2 days.
 4. Small lipid droplets will start appearing at this stage.
 5. Thereafter, replace the medium every 2–3 days with pre-warmed (37 °C) adipogenic maintenance medium (0.5 mL/well), and observe the growth of the lipid droplets.
 6. Accumulated lipid droplets will maximize in approximately 7 days. The accumulated lipid droplets can

be stained with a Lipid Assay Kit (Fig. 2).

Chondrogenic Differentiation

[Requirements]

- Collagen-coated 100-mm dishes
 - Cells at 70–80% confluency
 - BMMSC Growth Medium (Catalog No.: MSB-GM) (Prepared medium)
 - BMMSC/CBMSC Chondrogenic Differentiation Medium (Catalog No.: MSC-CHB)
 - Sterile pipettes, conical tubes, and other culture equipment
1. Before use, thaw the chondrogenic differentiation medium (50 mL) at 4 °C, and add one bottle of thawed supplement.
 2. Following “Cell Thawing and Seeding” or “Cell Subculturing”, seed cells in a collagen-coated 100-mm dish, and culture in growth medium until 70–80% confluency is achieved.
 3. Perform steps 1 to 5 of “Cell Subculturing”.
 4. Centrifuge again at 200 ×g for 5 minutes at room temperature, remove and discard the supernatant, add pre-warmed (37 °C) chondrogenic differentiation medium, and resuspend the cells to achieve 5×10^5 cells/mL.
 5. Dispense 0.5 mL of the resuspended cells in 15-mL conical tubes (2.5×10^5 cells/tube).
 6. Centrifuge at 300 ×g for 5 minutes at room temperature, leave the supernatant, loosen the lid of the 15-mL conical tube slightly on a clean bench for gas exchange, and culture in a 37 °C incubator with 5% CO₂ (**Note: Do not resuspend the cells as they are cultured in pellet form.**).
 7. After 24 hours, replace the medium with pre-warmed (37 °C) chondrogenic differentiation medium (0.5 mL/well).
 8. Thereafter, replace the medium every 2–3 days with pre-warmed (37 °C) chondrogenic differentiation medium (0.5 mL/well). If the pellet adheres to the side of the 15-mL conical tube, gently tap the tube to detach the pellet.
 9. Chondrocyte aggregates will form in 3–4 weeks. The formed chondrocyte aggregates can be fixed with formalin, embedded in paraffin, and then stained with Alcian Blue, etc (Fig. 5).

X. Cell Morphology

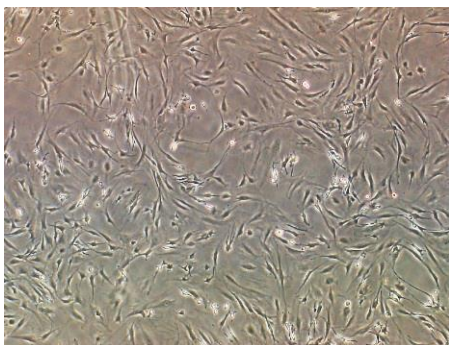


Fig. 1 Cells on the 3rd day of culture
(Culturing in growth medium)

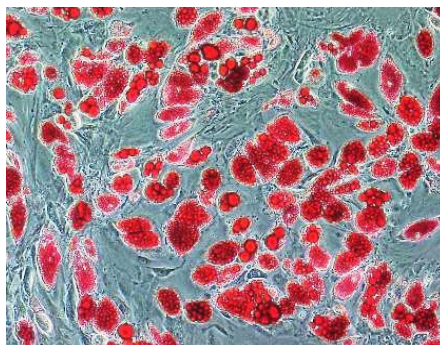


Fig. 2 Adipogenically differentiated
cells (Staining with Lipid Assay Kit)

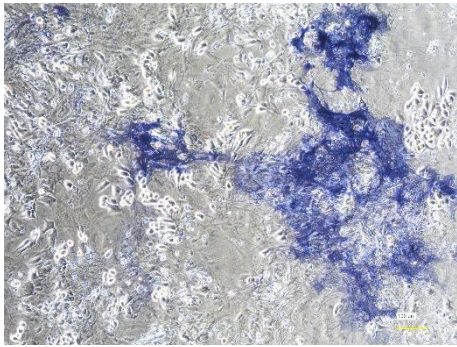


Fig. 3 Osteogenically differentiated cells (Staining with Alkaline Phosphatase Staining Kit)

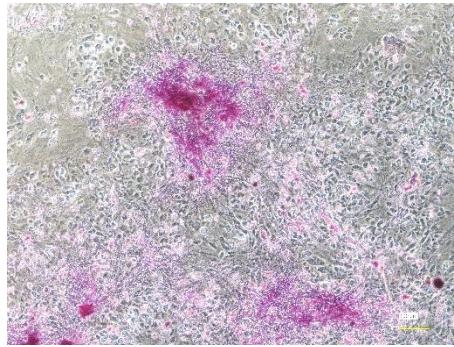


Fig. 4 Osteogenically differentiated cells (Staining with Calcified Nodule Staining Kit)



Fig. 5 Chondrogenically differentiated cells (Staining with Alcian blue)

XI. References

- 1) Dominici M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8, 315-317 (2006).
- 2) Uccelli A. *et al.* Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 726-736 (2008).
- 3) Le Blanc K. *et al.* Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood. Marrow. Transplant.* 11, 321-334 (2005).
- 4) 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.* 26, 2705-2712 (2008).
- 5) Sato Y. *et al.* Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood.* 106, 756-763 (2005).
- 6) Alma J. N. *et al.* Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood.* 110, 3499-3506 (2007).
- 7) Wollert.K.C. *et al.* Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet.* 364, 141-148 (2004).
- 8) Yoshimura H. *et al.* Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res.* 327, 449-462 (2007).

凍結初代細胞製品

ラット骨髄由来間葉系幹細胞 (BMMSCs)

【ラット大腿骨髄由来、品番：MSB01C】

2024年7月1日改訂

本製品は研究目的にのみご使用になれます。

I. 製品概要

体性幹細胞の一種である間葉系幹細胞 (MSCs : Mesenchymal Stem Cells) は、脂肪組織、骨髄、臍帯、歯髄などから分離できます。2006年に Dominici らは、ヒトの MSCs を次の3つの条件で定義しました¹⁾。①プラスチック培養容器に接着すること、②CD105、CD73、CD90を陽性マーカーとし、CD45、CD34、HLA-Class II (DR)、CD14、CD11b、CD79a、CD19を陰性マーカーとすること、③骨細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化能があること。

MSCs は、優れた自己増殖性に加え、骨、軟骨、脂肪だけでなく肝などへも多様な細胞に分化する能力があり^{2, 3, 4, 5)}、MHC Class-II を発現せず³⁾、免疫調整機能を持ち⁶⁾、さらに疾患部位に集積して様々なサイトカインや増殖因子を分泌して⁴⁾、組織再生・修復を促進する効果があること^{5, 7)}が知られています。

本製品は、SD ラット成獣の骨髄から分離した細胞群を、密度勾配遠心法により処理し、そこから分取した画分を継代 (1 継代) した細胞です⁸⁾。骨細胞、脂肪細胞および軟骨細胞への分化することを確認しております (※表面抗原マーカーの確認は実施していません)。

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】で実施してください。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ください。

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いたします。

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、推奨継代数以上の細胞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

品名	品番	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 (BMMSCs)	MSB01C	0.5×10 ⁶ cells/vial	1本	液体窒素保 存	6ヶ月

(本製品は、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、液体窒素で保存してください。)

V. 細胞の由来

- ・ 3-5週齢SDラット 大腿骨髄由来

VI. 専用メディアム (血清含有) (別売)

増殖メディアム

品名	品番	構成	容量	本数	保存方法	有効期限
骨髄由来 MSC 増殖メディアム	MSB-GM	増殖メディアム	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	250 µL	2本		ボトルに記載 (-20℃保存) 解凍後は2週間 (4℃保存)

(メディアムの主成分：DMEM (低グルコース)、血清、抗生剤、その他)

【各種分化誘導培地】

脂肪分化メディアム

品名	品番	容量	本数	保存方法	有効期限
MSC 脂肪分化メディアム	MSC-ADDM	250 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)
MSC 脂肪維持メディアム	MSC-ADMM	250 mL	1本		

軟骨分化メディウム

品名	品番	構成	容量	本数	保存方法	有効期限
骨髄／緻密骨由来 MSC 軟骨分化メディウム	MSC-CHB	軟骨分化 メディウム	50 mL	1 本	-20 °C保存 (解凍後は 4 °C保存)	ボトルに記載 (-20 °C保存) 解凍後は 3 ヶ月 (4 °C保存)
		サプリメント	125 μL	1 本		ボトルに記載 (-20 °C保存) 解凍後は 1 ヶ月 (4 °C保存)

VII. 関連製品

コラーゲンコート用溶液

品名	品番	容量	本数
コラーゲンコート用溶液 (ウシ由来 I 型コラーゲン)	SCO	100 mL	1 本

培養細胞凍結保存液

品名	品番	容量	本数
COS banker	COS-CFM01	120 mL	1 本

脂肪染色キット

品名	品番	構成	容量	本数
リピッドアッセイキット	AK09F	オイルレッド O 原液	150 mL	2 本
		抽出液	200 mL	2 本
				一式

VIII. 操作方法

- ※ 本製品をドライアイスから取り出し、使用するまでは液体窒素で保管してください。
- ※ 本製品は【**1回のみ継代可能**】であることを確認しています。2回以上の継代培養は、細胞の増殖速度や分化効率に影響を及ぼす可能性があるため、お客様ご自身で実施可否をご判断ください。
- ※ 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します。特に、脂肪細胞への分化誘導を行う場合は、細胞が非常に剥がれやすくなります。

IX. プロトコール

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（細胞増殖を行う場合は 100 mm ディッシュの使用を推奨します。また、脂肪細胞または骨細胞への分化誘導を行う場合は 24 well プレートの使用を推奨します。）
 - ・ コラーゲンコート用溶液（品番：SCO）
 - ・ PBS(-)または HBSS(-)
 - ・ 滅菌済ピペット、コニカルチューブなどの培養器具
- ① 使用する培養容器にコラーゲンコート用溶液（以下、溶液）が覆われる程度加え（100 mm ディッシュで 5 mL 程度、24 well プレートで 0.3~0.5 mL/well）、すぐに溶液を除去します。なお、ガラス底の培養容器の場合は、溶液を入れた状態で一晚静置した後、溶液を除去してください。
 - ② PBS(-)または HBSS(-)で 2 回洗浄後、PBS(-)または HBSS(-)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(-)または HBSS(-)を満たして、室温で数日間保存可能です。

増殖メディウムの調製

【準備するもの】

- ・ 骨髄由来 MSC 増殖メディウム（品番：MSB-GM）
 - ・ 滅菌済ピペット、コニカルチューブなどの培養器具
- ① 増殖メディウムを 4℃で溶解し、100 mL を新しいメディウムボトルに移します。残った増殖メディウムは、4℃で 3 ヶ月間保存可能です。
 - ② サプリメント 1 本（250 µL）を 4℃で溶解し、増殖メディウム 100 mL に加えてください。サプリメント添加後の調製済み増殖メディウムは、4℃で 2 週間保存可能です。

細胞の解凍・播種

※ 下記は、100 mm 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】

- ・ ラット骨髄由来間葉系幹細胞（BMMSCs）（品番：MSB01C）
 - ・ 骨髄由来 MSC 増殖メディウム（品番：MSB-GM）（調製済み）
 - ・ コラーゲンコート済みの細胞培養用 100 mm ディッシュ 3 枚
 - ・ 滅菌済ピペット、コニカルチューブなどの培養器具
- ① 凍結細胞を含むクライオチューブを液体窒素から取り出し、すぐに 37℃のウォーターバスで温めます。クライオチューブ内にほんの少しの氷が残るまで、37℃のウォーターバス内でクライオチューブを静かに旋回させ、細胞を急速に解凍します（90~120 秒間）。
 - ② 解凍した細胞液を含むクライオチューブをクリーンベンチ内に移動させます。開封前にクライオチューブの外側を 70%エタノールで清拭します。
 - ③ 解凍した細胞液を、37℃に保温した増殖メディウム 10 mL が入っている 15 mL コニカルチューブに移します。穏やかに混合した後、室温、200 ×g で 5 分間遠心してください。

- ④ 上清を吸引除去し、37℃に保温した増殖メディウム 9 mL を加え、細胞を懸濁させてください。
- ⑤ コラーゲンコート済みの 100 mm ディッシュ 3 枚に、細胞懸濁液を 3 mL ずつ、37℃に保温した増殖メディウムを 7 mL ずつ加え、穏やかに混合して細胞を均一に分散させます。その後、5% CO₂ 存在下の 37℃インキュベーターで培養してください。
- ⑥ 播種してから 1 日後 (培養 1 日目) に、37℃に保温した増殖メディウムで培地交換してください。以降は、1~2 日おきに 37℃に保温した増殖メディウムで培地交換してください (図 1)。
- ⑦ 70~80%コンフルエント (培養 2~4 日目) で継代・分化誘導実験等、または凍結保存を行ってください。

細胞の継代

※ 下記は、100 mm ディッシュから継代する場合のプロトコールです。

【準備するもの】

- ・ 70~80%コンフルエントになった細胞
 - ・ 骨髄由来 MSC 増殖メディウム (品番: MSB-GM) (調製済み)
 - ・ PBS(-)または HBSS(-)
 - ・ 0.05%トリプシン-EDTA 溶液
 - ・ コラーゲンコート済みの細胞培養用容器
 - ・ 滅菌済ピペット、コニカルチューブなどの培養器具
- ① 70~80%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、古い増殖メディウムを除去し、37℃に保温した PBS(-)または HBSS(-)で 1~2 回洗浄します。
 - ② 0.05%トリプシン-EDTA 溶液を 3 mL 入れ、観察しながら 37℃で 1~2 分間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。細胞が剥がれていない時は、さらに 37℃で 1 分間インキュベートします (※トリプシン-EDTA 処理を 10 分間以上行くと、細胞の状態に影響を及ぼす可能性があります。剥がれていない細胞については、培養容器に強固に接着しており、剥がすことが困難です。他の細胞へのダメージや変性の原因となるため、追加のインキュベーションはお勧めしません。)
 - ④ 37℃に保温した増殖メディウムを 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コニカルチューブに回収します。
 - ⑤ 室温、200 ×g、5 分間遠心後、上清を除去し、37℃に保温した増殖メディウムを適量加えて懸濁し、細胞をカウントします。
 - 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た細胞懸濁液を播種し、分化誘導実験等を行ってください。

細胞の凍結保存

【準備するもの】

- ・ 70～80%コンフルエントになった細胞
- ・ 骨髄由来 MSC 増殖メディウム（品番：MSB-GM）（調製済み）
- ・ PBS(-)または HBSS(-)
- ・ 0.05%トリプシン-EDTA 溶液
- ・ COS banker（培養細胞凍結保存液）（品番：COS-CFM01）
- ・ クライオチューブ
- ・ 細胞凍結用コンテナ（製品名：CoolCell FTS30 メーカー：BM 機器 品番：BCS-170 など）
- ・ 滅菌済ピペット、コニカルチューブなどの培養器具

- ① 「細胞の継代」の①～⑤を行います。
- ② 再度、室温、200×g、5分間遠心を行った後、上清を除去し、4℃に保冷した培養細胞凍結保存液を 1×10^6 cells/mL になるように加えて懸濁します。
- ③ 細胞懸濁液をクライオチューブに分注し、細胞凍結用コンテナ等を用いて-80℃で凍結します。
- ④ 翌日以降、液体窒素容器に移して保存してください。

脂肪細胞への分化誘導

※ 下記は、24 well プレートで培養する場合のプロトコールです。

【準備するもの】

- ・ コラーゲンコート済みの細胞培養用 24 well プレート
- ・ 70～80%コンフルエントになった細胞
- ・ 骨髄由来 MSC 増殖メディウム（品番：MSB-GM）（調製済み）
- ・ MSC 脂肪分化メディウム（品番：MSC-ADDM）
- ・ MSC 脂肪維持メディウム（品番：MSC-ADMM）
- ・ 滅菌済ピペット、コニカルチューブなどの培養器具
- ・ リピッドアッセイキット（品番：AK09F）

- ① 「細胞の解凍・播種」もしくは「細胞の継代」に従い、コラーゲンコート済みの 24 well プレートに細胞を播種し（播種密度： 1×10^4 cells/cm²）、増殖メディウムで 70～80%コンフルエントまで培養します（0.5 mL/well）。
- ② 37℃に保温した脂肪分化メディウムに培地交換し（0.5 mL/well）、3日間培養してください。
- ③ 37℃に保温した脂肪維持メディウムに培地交換し（0.5 mL/well）、2日間培養してください。
- ④ この段階で小さな脂肪球が現れ始めます。
- ⑤ 以降は、2～3日ごとに 37℃に保温した脂肪維持メディウムで培地交換を行い（0.5 mL/well）、脂肪球の成長を観察します。
- ⑥ 7日間程で蓄積した脂肪球が最大化します（蓄積した脂肪球は、リピッドアッセイキットで染色できます（図 2）。）。

軟骨細胞への分化誘導

【準備するもの】

- ・ コラーゲンコート済みの細胞培養用 100 mm ディッシュ
 - ・ 70~80%コンフルエントになった細胞
 - ・ 骨髄由来 MSC 増殖メディウム (品番: MSB-GM) (調製済み)
 - ・ 骨髄/緻密骨由来 MSC 軟骨分化メディウム (品番: MSC-CHB)
 - ・ 滅菌済ピペット、コニカルチューブなどの培養器具
-
- ① ご使用前に軟骨分化メディウム (50 mL) を 4 °C で溶解し、溶解したサプリメント 1 本を添加してください。
 - ② 「細胞の解凍・播種」もしくは「細胞の継代」に従い、コラーゲンコート済みの 100 mm ディッシュに細胞を播種し、増殖メディウムで 70~80%コンフルエントまで培養します。
 - ③ 「細胞の継代」の①~⑤を行い、細胞数をカウントします。
 - ④ 再度、室温、200 ×g、5 分間遠心後、上清を除去し、37 °C に保温した軟骨分化メディウムを 5×10^5 cells/mL になるように加えて懸濁します。
 - ⑤ 細胞懸濁液を 15 mL コニカルチューブ 1 本につき、0.5 mL ずつ分注します。(チューブ 1 本当たり、 2.5×10^5 cells)
 - ⑥ 室温、300 ×g、5 分間遠心した後、上清は吸引せず、ガス交換ができるように、クリーンベンチ内で、15 mL コニカルチューブのフタを軽く緩め、5% CO₂ 存在下の 37 °C 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するので、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。)。
 - ⑦ ペレットは 24 時間静置し、その後 37 °C に保温した軟骨分化メディウムで培地交換します (0.5 mL/well)。
 - ⑧ 以後は、2~3 日ごとに、37 °C に保温した軟骨分化メディウムで培地交換を行います (0.5 mL/well)。ペレットがチューブの側面に付着していた場合は、15 mL コニカルチューブを軽くたたいてペレットをはがします。
 - ⑨ 3~4 週間で軟骨細胞塊が形成されます (形成された軟骨細胞凝集塊はホルマリン固定、パラフィン包埋後、アルシアンブルーなどで染色できます。) (図 5)。

X. 技術情報

細胞形態写真

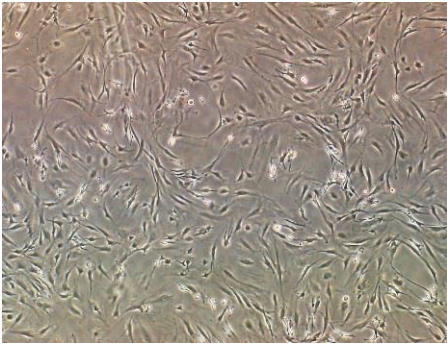


図1) 培養3日目の細胞
(増殖メEDIUMで培養)

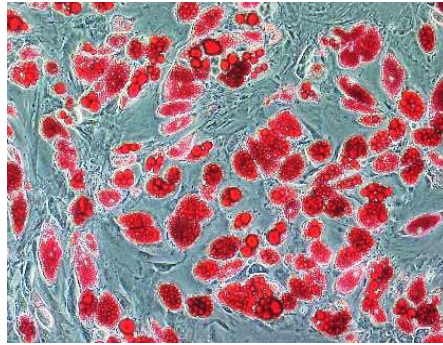


図2) 脂肪分化した細胞
(リピッドアッセイキットにて染色)

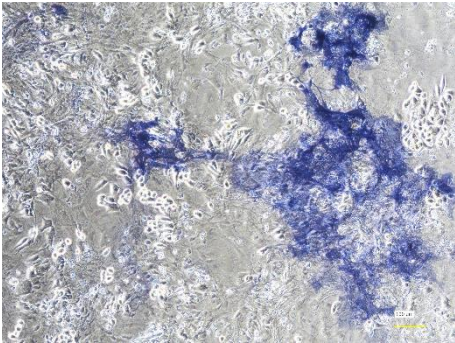


図3) 骨分化した細胞
(アルカリホスファターゼ染色キットにて染色)

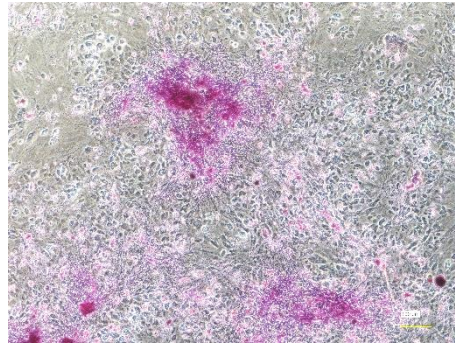


図4) 骨分化した細胞
(石灰化染色キットにて染色)

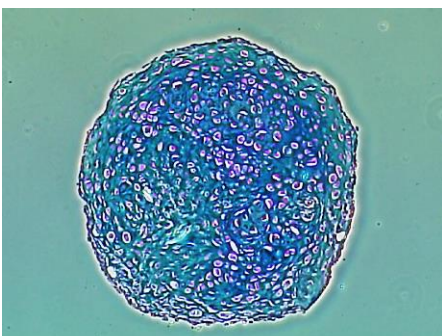


図5) 軟骨分化した細胞
(アルシアンブルーにて染色)

XI. 参考文献

- 1) Dominici M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8, 315-317 (2006).
- 2) Uccelli A. *et al.* Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 726-736 (2008).
- 3) Le Blanc K. *et al.* Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood. Marrow. Transplant.* 11, 321-334 (2005).
- 4) 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.* 26, 2705-2712 (2008).
- 5) Sato Y. *et al.* Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood.* 106, 756-763 (2005).
- 6) Alma J. N. *et al.* Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood.* 110, 3499-3506 (2007).
- 7) Wollert.K.C. *et al.* Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet.* 364, 141-148 (2004).
- 8) Yoshimura H. *et al.* Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res.* 327, 449-462 (2007).