



凍結初代細胞製品

骨形成培養キット(マウス)

【Osteogenesis Culture kit (Mouse), Code No. OGC11】

本製品は研究目的にのみご使用になれます。

2018年12月11日作成

I. 製品概要

骨髄には造血細胞とそれを支持する骨髓間質細胞に分けることができます。この骨髓間質細胞の一部には未分化な間葉系幹細胞も含まれており、骨芽細胞や軟骨細胞、脂肪細胞などに分化誘導することができます。

本キットは、マウス骨髄から精製した細胞群と2種類の培養用メディアムを組み合わせた細胞培養キットです。増殖用メディアムで増殖させた細胞を骨形成メディアムで骨芽細胞へと分化誘導しカルシウム沈着させることができます。

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。

本製品の培養には付属の専用メディアムをご使用下さい。

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、専用メディア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。

メディア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	使用期限
マウス骨髓間質細胞	1×10 ⁶ cells/vial	1本	液体窒素保存	6ヶ月
増殖用メディアム	125mL	1本	−20°C保存 (解凍後は4°C保存)	6ヶ月(−20°C保存) 3ヶ月(4°C保存)
骨形成メディアム	250mL	1本		

※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

ICR マウスの骨髄から分離させた細胞群

VI. 専用メディアの単品販売リスト

品名	品番	容量	保存方法	使用期限
増殖用メディア	OGCMG	250 mL	−20°C 保存 (解凍後は 4°C 保存)	ボトル記載(-20°C) 解凍後は 4°C 保管し、 お早めにご使用ください
骨形成メディア	OGCMO	250 mL	−20°C 保存 (解凍後は 4°C 保存)	ボトル記載(-20°C) 解凍後は 4°C 保管し、 お早めにご使用ください

培地の主成分 : α-MEM、血清、抗生素、その他

VII. 関連製品

品名	製品コード	容量
コラーゲンコート用溶液	SCO	100 mL

VIII. 操作方法

※本製品は【継代不可】です。

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(-)

- 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 (24well プレートの場合 300~500μL)、1 時間以上静置後に除去します。
- 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。



細胞解凍・播種

※下記は、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】

- ・増殖用メディアム
- ・骨形成メディアム
- ・24well プレート（コラーゲンコート用溶液でコーティングしたもの）
- ・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 1 本を取り、37°C温水にてすばやく解凍してください。

※37°C温水に浸けてから 1 分 50~2 分 05 秒（小さな氷塊が残る程度）ほどで解凍します。

※1 バイアルあたり 1mL の凍結保存液が入っています。

2. 解凍した細胞液は、予め増殖用メディアム・10mL が入っている 15mL 遠心管に移し混和した後、4°C、600 g で 5 分間遠心してください。

3. 上清を除去し、増殖用メディアムを 5mL 加え細胞浮遊液とします。

4. 細胞浮遊液を 1 ウェルあたり 0.5mL 播種し、5%CO₂ 存在下の 37°C インキュベーターで培養してください。

※他の培養容器に播種する場合、細胞密度を培養面積 1cm² あたり 2.5×10^4 cells 以上になるように播種してください。この細胞密度より低く播種した場合は、細胞増殖に悪く影響を及ぼしますので注意してください。

5. 翌日、保温した増殖用メディアムで培地交換し、コンフルエントになるまで 2 日おきに培養してください。

※播種してから 3~4 日後にコンフルエントになります。

6. 細胞がコンフルエントになったら、骨形成メディアムに交換し骨形成を促進させます。

保温した骨形成メディアムを 1 ウェルあたり 0.5mL 培地交換し、それ以降は 2 日ないし 3 日おきに培地交換してください。

※骨形成メディアムに交換してから 4~7 日目ごろから細胞層が白くなります。

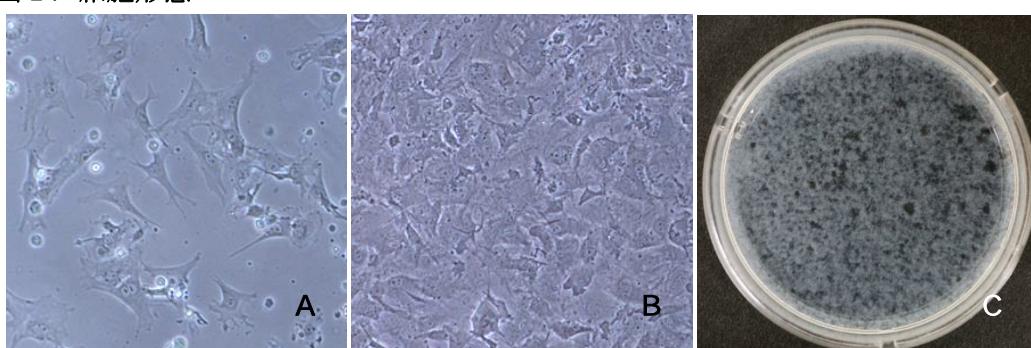
※一部の細胞から分化した脂肪細胞も出現します。

細胞継代

本製品は播種後の細胞が剥がれにくいため、継代培養はお勧めできません。

IX. 技術情報

図 1. 細胞形態



A. 播種翌日／B. コンフルエント／C. 骨形成メディアムで 3 週間培養させた細胞 (35mm Dish で培養)

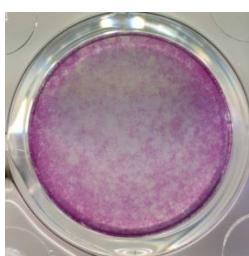


培養例

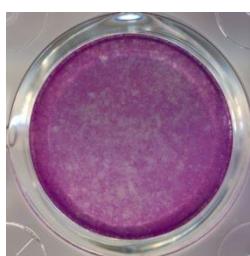
プロトコールに従って 24well プレートで培養し、骨形成メディアで培養した細胞をアルカリホスファターゼ活性およびカルシウム沈着について検出させました。アルカリホスファターゼ活性を視覚化するためにアルカリホスファターゼ染色キット(Code: AK20)、カルシウム沈着した部位を染色させるために石灰化染色キット(Code: AK21)を用いて染色した結果、下図のように培養日数が経つにつれてカルシウム沈着が進んでいることがわかりました。



アルカリホスファターゼ染色キット



1 日目



5 日目



10 日目

石灰化染色キット

15 日目

X. 参考文献

- (1) SL Cheng et al., Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology*, 134(1) p277-286 (1994)
- (2) Ohgushi et al., *In vitro* bone formation by rat marrow cell culture. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 32(3) p333-340 (1996)

《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 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

