



# Osteoclasts , Human

Catalog No. OSC15C

July 1, 2024

## I. Product Overview

Bone metabolism is composed of balanced osteogenesis and bone resorption. Research studies have shown that bone marrow cells can be differentiated into osteoclasts using M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor) and RANKL (Receptor Activator of NF kappa B Ligand).

This product consists of human-derived osteoclast precursors (frozen). When cultured in a medium containing M-CSF and RANKL, which are sold separately, osteoclasts are formed.

It is useful for experiments on osteoclast formation, studies on bone resorption function, and research on conditions such as osteoporosis, rheumatoid arthritis, and Paget's disease.

\*The human cells used as raw materials in the cells have been confirmed to meet the following criteria:

- Informed consent has been properly obtained.
- Donor information confidentiality is maintained.
- The donor is negative for major infectious diseases (HIV, HBV, HCV, etc.).

\*These cells are shipped in dry ice packaging. Upon receipt, please promptly store the cells in liquid nitrogen. If liquid nitrogen storage is not possible, please proceed with cell culture immediately.

## 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 2].

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 re-frozen cells have been used.**

## IV. Components

Product Name	Size	Quantity	Storage Conditions	Expiration date
Osteoclast precursor, Human, cryopreserved	1.5x10 <sup>6</sup> cells/vial	1 vial	Liquid Nitrogen vapor phase	6 months

\*Shipping: dry ice

## V. Dedicated Media (Serum Containing Media) (sold separately)

Product Name	Catalog No.	Size	Quantity	Storage Conditions	Expiration date
Osteoclast Wash Medium	OSCMW	100 mL	1	-20°C Freezer	- Written on the bottle
Osteoclast Culture Medium (w/ RANKL and M-CSF)	OSCMHB	30 mL	1	-20°C Freezer	- Written on the bottle

**Culture Medium components:  $\alpha$ -MEM, FBS, antibiotics, etc.**

\*If the test period is long, please aliquot the medium after thawing and store it frozen. Re-freezing after thawing is only allowed once. Avoid further freezing and thawing as it may cause a deterioration in quality.

## VI. Related Products (sold separately)

Product Name	Catalog No.	Size	Storage	Expiration date
RANKL <sup>*1</sup>	AK30	10 $\mu$ g	-70°C (frozen)	6 months
M-CSF <sup>*2</sup>	AK39	20 $\mu$ g	-70°C (frozen)	6 months

\*1 RANKL is identical to the substance included in human osteoclast culture medium. It is expressed and purified as a GST fusion protein from human-derived soluble RANKL.

\*2 M-CSF is identical to the substance included in human osteoclast culture medium.

## VII. General Information

Organism	<i>Homo sapiens</i> , human
Tissue	Bone Marrow
Cultural Properties	Adherent
Biosafety Level	2
Virus Check	HIV-1(-), HBV (-), HCV (-)

## VIII. Materials required but not provided

- ✧ Osteoclast Wash Medium (Cat No. OSCMW)
- ✧ Human Osteoclast Culture Medium (Cat No. OSCMHB)
- ✧ Variable volume pipettes
- ✧ Culture vessels
- ✧ 15 ml centrifuge tube

## IX. Protocol

### A) Cultured with the 96-well culture plate

- 1) Carefully remove the cryovial from liquid nitrogen and thaw cells in a water bath at 37°C with gently shaking.
- 2) Transfer thawed cells into a 15 ml centrifuge tube containing 10 ml of Osteoclast Wash Medium (Cat No. OSCMW) and Transfer 1mL of culture medium in the same conical tube back to the cryovial and pour the contents back to 15mL conical tube.
- 3) Centrifuge for 5 minutes at 4°C at 200 x g for 5 minutes.
- 4) Remove the supernatant, and re-suspend the cell pellet in 2.5 to 5.0 ml of Human Osteoclast Culture Medium (Cat No. OSCMHB).
- 5) Dispense 100  $\mu$ L of the cell suspension to each well of 96-well culture plate, and incubate the flask at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> and 100% humidity.
- 6) Three days later, Replace the medium with fresh culture medium.
- 7) Change the medium every other day.  
※Osteoclasts will begin to fuse and form osteoclasts after 4 or 7 days of incubation

## Technical information

1. For experiments on osteoclastogenesis regulation factors, add the regulatory factors to the culture medium and culture in the wells for 7 days. Afterward, perform tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining to measure the number of osteoclasts. The TRAP staining kit (Cat No. AK04F), available separately, is a convenient tool for staining tartrate-resistant acid phosphatase, a marker enzyme for osteoclasts (Fig 2).
2. Pit Formation Assay Method (Staining Method)  
After culturing osteoclast precursors on dentin slices for 2 to 4 weeks, collect the slices and ultrasonicate them in 5 ml of 1 M ammonia solution to destroy the cells. After treatment, remove the slices from the ammonia solution, directly stain them with Mayer's hematoxylin solution for 1 minute, rinse with water, dry, and then measure the total area of resorption pits formed by osteoclasts (Figure 3-1, 3-2).
3. Pit Formation Assay Method (SEM Method)  
Perform a series of operations on dentin slices similar to the Pit Formation Assay Method (Staining Method), and observe the surface of the dried slices using a scanning electron microscope (SEM) to measure the area of resorption pits. For clearer images of resorption pits, SEM observation is recommended (Figure 4).

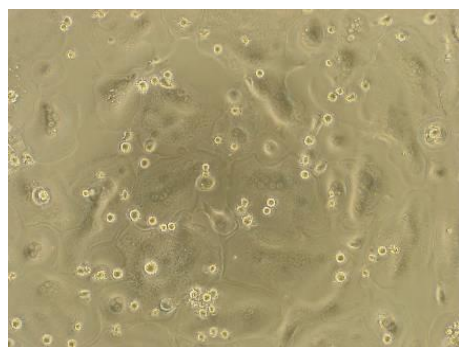


Fig.1 Osteoclast induced of differentiation with M-CSF/RANKL

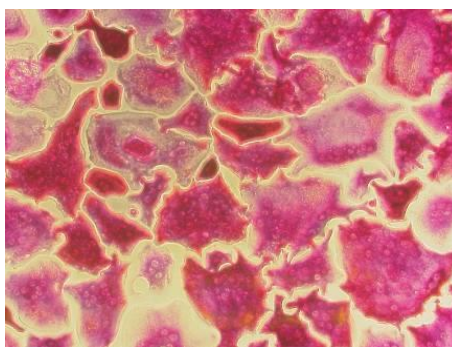


Fig. 2 TRAP staining of human osteoclast



Fig.3-1 Pit on the slice of ivory.  
(HE staining)

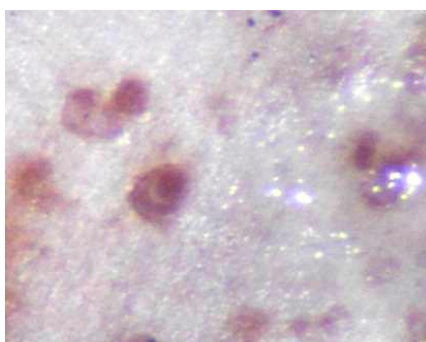


Fig.3-2 Pit on the slice of ivory.  
(HE staining)

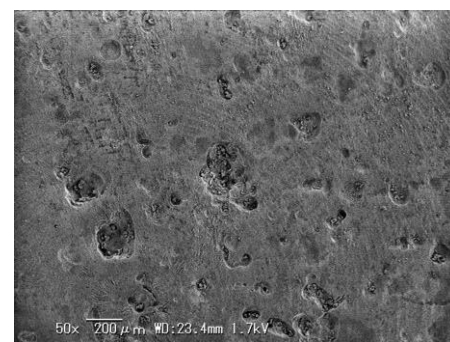


Fig.4 Pit on the slice of ivory.  
(SEM picture)

## X. References

- 1) Takeshita et al. (2000) Identification and Characterization of the New Osteoclast Progenitor with Macrophage Phenotypes Being Able to Differentiate into Mature Osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.* 15, 1477-1488.
- 2) Scheven et al. (1998) A sequential culture approach to study osteoclast differentiation from nonadherent porcine bone marrow cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 34, 568-577.
- 3) Martha et al. (1995) Enhanced Expression of  $\alpha$ V Integrin Subunit and Osteopontin during Differentiation of HL-60 Cells along the Monocytic Pathway. *Exp. Cell Res.* 216, 335-341.
- 4) Itonaga et al. (1999) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and Prostaglandin E2 Act Directly on Circulating Human Osteoclast Precursors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 242, 703-709.



凍結初代細胞製品

# ヒト破骨細胞

## (Human Osteoclast, 品番 : OSC15C)

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》

現在、わが国では高齢化社会の到来に伴い骨粗鬆症等の骨代謝異常疾患が年々増加の一途をたどっています。骨量は、骨芽細胞による骨形成と、破骨細胞による骨吸収とのバランスによってコントロールされています。

近年、骨髄細胞から M-CSF(Macrophage Colony Stimulating Factor)と RANKL(Receptor Activator of NF kappa B Ligand)を用いて破骨細胞へ誘導する系が確立されました。

本製品は、ヒト由来の破骨前駆細胞（凍結品）です。別売の M-CSF、RANKL を含有した培養用メディウムで培養すると破骨細胞が形成されます。破骨細胞の形成実験、骨吸収機能等の研究にご利用ください。骨粗鬆症や関節リウマチ、パジェット病などの研究にもご利用いただけます。

※本細胞に原料として使用されている、ヒト細胞は、以下の事項が確認されたものを使用しています。

- ・インフォームドコンセントが確実に行われていること。
- ・ドナー情報非公開が守られていること。
- ・主要感染症（HIV、HBV、HCV など）がネガティブなドナーであること。

※本細胞は、ドライアイス梱包で発送しています。受領した細胞は速やかに液体窒素中で保存してください。

液体窒素保存ができない場合は、直ちに細胞培養をおこなってください。

### 《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 2】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。

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	使用期限
ヒト破骨前駆細胞 (凍結細胞)	1.5×10 <sup>6</sup> cells/vial	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》

ヒト骨髄単核球

## 《VI. 専用メディウム & 関連サプリメント（別売）》

品名	品番	容量	保存方法	使用期限
破骨細胞 洗浄用メディウム	OSCMW	100 mL	−20℃保存 (解凍後は 4℃保存)	ラベル記載(−20℃保存) 解凍後 3 か月(4℃保存)
ヒト破骨細胞 培養用メディウム (RANKL, MCSF 含有)	OSCMHB	30 mL	−20℃保存 (解凍後は 4℃保存)	ラベル記載(−20℃保存) 解凍後は速やかに使い 切ってください

培地の主成分：α-MEM、血清、抗生剤、その他

※試験期間が長い場合には、メディウム解凍後に小分けして、冷凍保存してください。解凍後の再凍結は 1 回のみ可能です。それ以上の凍結・融解は品質劣化の原因になりますので避けてください。

品名	品番	容量	保存方法	使用期限
1mg/ml RANKL ※1	AK30	10μg	−70℃保存	6 か月
M-CSF ※2	AK39	20μg	−70℃保存	6 か月

※1 RANKL は、ヒト破骨細胞培養用メディウムに含まれる物と同一です。

ヒト由来可溶性 RANKL を GST 融合タンパクで発現し精製したものです。

※2 M-CSF は、ヒト破骨細胞培養用メディウムに含まれる物と同一です。

## 《VII. 操作方法》

※本製品は【継代不可】です。

### 細胞解凍・播種

※下記は、96well プレートで培養する場合のプロトコールになります。

※凍結細胞 1 バイアルにつき、96well プレートで最大 48well 分に播種することができます

#### 【準備するもの】

- ・破骨細胞洗浄用メディウム
- ・ヒト破骨細胞培養用メディウム
- ・滅菌済ピペット、遠心チューブなどの培養器具

1. 培養開始する前に予め洗浄用メディウムと培養用メディウムは 4℃（冷蔵庫等）で解凍してください。
2. 凍結細胞のバイアルを、37℃温浴にてすばやく解凍してください（75～90 秒間、小さな氷塊が残る程度）。
3. 解凍したヒト破骨前駆細胞液は、破骨細胞洗浄用メディウム・10mL を含む 15mL 遠心管へ添加し混合した後、4℃、200xg で 5 分間遠心してください。
4. 上清を除去し、破骨細胞洗浄用メディウム・10mL で再懸濁後、4℃、200xg で 5 分間遠心してください。
5. 上清を除去し、ヒト破骨細胞培養用メディウム（M-CSF, RANKL 含有）を 5mL 加え、細胞浮遊液を調製してください。
6. 96 ウェルプレートの場合、1 ウェルあたり 100μL ずつ播種してください

※上記は推奨播種密度で培養する場合です。培養用メディウム 5mL 加えた場合、96 ウェルプレートの約半分に播種する事ができます。（播種密度が 1 ウェルあたり約  $0.3 \times 10^5$  cells になります）

※上記よりも早く破骨細胞を形成したい場合は、培養用メディウム を 3.7mL 加えて下さい。

（播種密度が 1 ウェルあたり約  $0.4 \times 10^5$  cells になります）



※Pit Formation Assay を行う場合は、あらかじめウェル内に象牙切片を入れてから細胞を播種してください。

7. 5%CO<sub>2</sub> 存在下の 37℃インキュベーターで培養し、播種してから 3 日目に 1 ウェルあたり培養用メディウム 100μL ずつ交換してください。それ以降は 1～2 日おきに 1 ウェルあたり培養用メディウム 100μL ずつ交換してください。播種してから 4～7 日目頃から数個の細胞が融合した破骨細胞が観察されます (図 1 参照)。

※播種から細胞の接着まで時間がかかるため、播種後 2～3 日は動かさず静置してください

※培養用メディウムは冷蔵と加温の繰り返しにより劣化しますので、培地交換時には必要量だけ取り分けて、室温に温めてご使用ください。

## 《Ⅷ. 技術情報》

- (1) 破骨細胞形成制御因子の実験には、培養液に制御因子を添加し、通常 Well 中で 7 日間培養後、酒石酸抵抗性酸性フォスフォターゼ染色 (TRAP 染色) を行い破骨細胞の細胞数を計測してください。別売りの TRAP 染色キットは、破骨細胞のマーカー酵素である酒石酸抵抗性酸性フォスフォターゼを簡便に染色できるキットですのでどうぞご利用ください (図 2 参照)。

### (2) Pit Formation Assay 法 (染色法)

破骨前駆細胞を象牙切片上で 2～4 週間培養後、切片を回収し、5ml の 1M アンモニア水中で超音波処理し細胞を破壊してください。処理した切片はアンモニア水から取り出し、直接、マイヤーのヘマトキシリン液で 1 分間染色し、水洗、乾燥させた後、破骨細胞によって形成された吸収窩の総面積を測定してください (図 3-1、図 3-2 参照)。

### (3) Pit Formation Assay 法 (SEM 法)

象牙切片を Pit Formation Assay 法 (染色法) と同様に一連の操作を行い、乾燥した切片の表面を走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察し吸収窩の面積を計測してください。鮮明な吸収窩 (Pit) 画像を必要とする場合は SEM 観察をお勧めします (図 4 参照)。

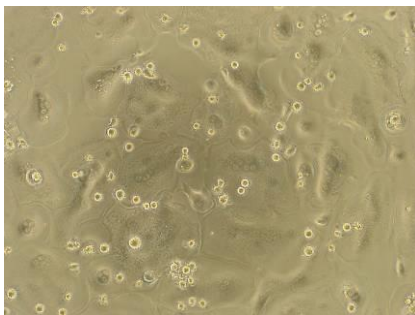


図 1 : M-CSF/RANKL で分化誘導した破骨細胞

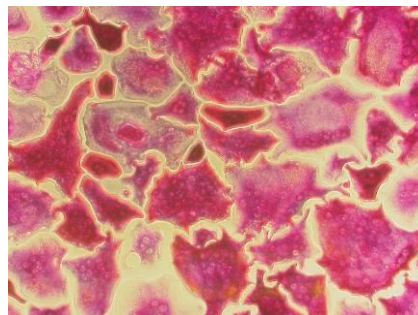


図 2 : TRAP 染色した破骨細胞



図 3-1 : 象牙切片上の吸収窩 (Pit) HE 染色

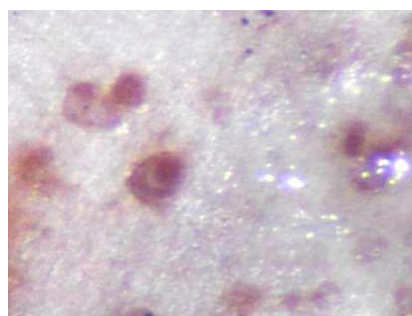


図 3-2 : 象牙切片上の吸収窩 (Pit) HE 染色

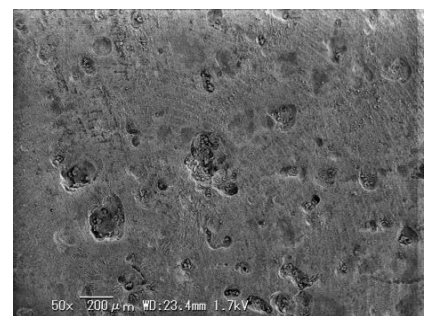


図 4 : 象牙切片上の吸収窩 (Pit) SEM写真

## 《IX. 参考文献》

1. Takeshita *et al.*(2000) Identification and Characterization of the New Osteoclast Progenitor with Macrophage Phenotypes Being Able to Differentiate into Mature Osteoclasts. J. Bone Miner. Res. 15, 1477-1488.
2. Scheven *et al.* (1998) A sequential culture approach to study osteoclast differentiation from nonadherent porcine bone marrow cells. In Vitro Cell Dev Biol Anim 34, 568–577.
3. Martha *et al.* (1995) Enhanced Expression of  $\alpha$ v Integrin Subunit and Osteopontin during Differentiation of HL-60 Cells along the Monocytic Pathway. Exp. Cell Res. 216, 335-341.
4. Itonaga *et al.*(1999) 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and Prostaglandin E<sub>2</sub> Act Directly on Circulating Human Osteoclast Precursors. Biochem. Biophys. Res. Commun. 242, 703-709.