

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。

2018年11月28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 Domini ci 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

### 低血清増殖培地

品名	製品コード	容量
KBM ADSC-1	16030020	500mL

(コージンバイオ株式会社 メーカー略号：KJN)

### 無血清増殖培地

品名	製品コード	容量
MSC NutriStem <sup>(R)</sup> XF Medium		
MSC Nutristem <sup>(R)</sup> XF Basal Medium	05-200-1A / 1B	500 mL / 100 mL
MSC Nutristem <sup>(R)</sup> XF Supplement Mix	05-201-1U / 106	1 × 3 mL / 0.6 mL
MSC Attachment Solution(100×)	05-752-1H / 1F	5 mL / 1 mL

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



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ウム	MSC-ADGM	500 mL	1本			
脂肪分化誘導用メディウム	MSC-ADDM	500 mL	1本			
脂肪細胞維持用メディウム	MSC-ADMM	500 mL	1本			

(メーカー略号：PMC)

軟骨分化用メディウムセット(BMSC用)

品名	製品コード	構成	容量	本数	保存方法	有効期限
軟骨分化用メディウム セット(BMSC用)	MSC-CHB	軟骨分化用 メディウム	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		

(メーカー略号：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℃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℃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℃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 300～500 $\mu$ L）、1 時間以上（ガラス底の場合は一晚）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

- 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、古い培地を除去し、HBSS(-)または PBS(-)で 1～2 回洗浄します。
- ② 0.05%トリプシン-EDTA を 3 mL 入れ、観察しながら 37 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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

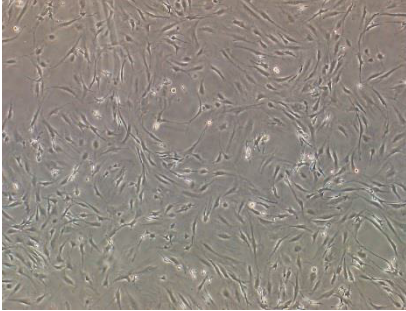


図 1) 培養 3 日目の細胞  
(BMSC 増殖用メディアウムで培養)

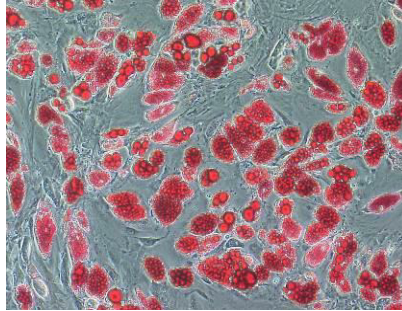


図 2) 脂肪分化した細胞  
(リピッドアッセイキットにて染色)



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



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/>