



凍結初代細胞製品

# ヒト破骨細胞

## 【Human Osteoclast, Code No. OSC15C】

本製品は研究目的にのみご使用になれます。

2018年12月4日改訂

### 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ア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。

※本細胞に使用されている、原料ヒト細胞は、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アをご使用下さい。

### 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。

メディア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

ヒト骨髓単核球

#### VI. 専用メディア & 関連サプライメント (別売)

品名	品番	容量	保存方法	使用期限
破骨細胞 洗浄用メディア	OSCMW	100 mL	−20°C保存 (解凍後は 4°C保存)	ラベル記載(-20°C保存) 解凍後 3か月(4°C保存)
ヒト破骨細胞 培養用メディア (RANKL, MCSF 含有)	OSCMHB	30 mL	−20°C保存 (解凍後は 4°C保存)	ラベル記載(-20°C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、抗生素、その他

※試験期間が長い場合には、メディア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°C保存	6か月
M-CSF ※2	AK39	20μg	−70°C保存	6か月

※1 RANKL は、ヒト破骨細胞培養用メディアに含まれる物と同一です。

ヒト由来可溶型 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ア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ア
- ・ヒト破骨細胞培養用メディア
- ・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アと培養用メディアは 4°C(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°C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°C、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°C、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  $100 \mu\text{L}$  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ことができます。(播種密度が 1 ウェルあたり約  $0.3 \times 10^5 \text{ cells}$  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  $3.7 \text{ mL}$  加えて下さい。  
(播種密度が 1 ウェルあたり約  $0.4 \times 10^5 \text{ cells}$  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°C 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  $100 \mu\text{L}$  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  $100 \mu\text{L}$  ずつ交換してください。播種してから 3~5 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)。

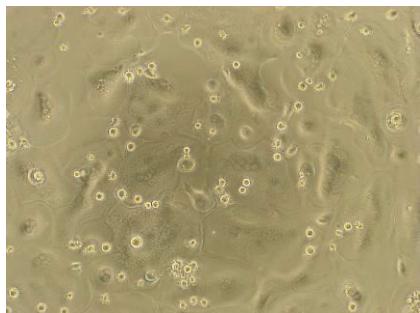


図 1 : M-CSF／RANKL で分化誘導した破骨細胞

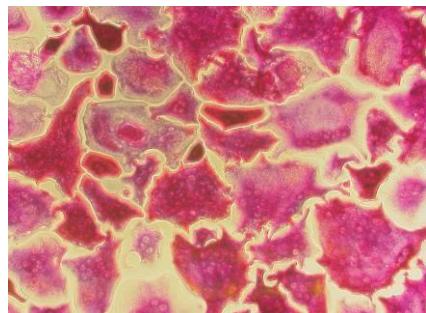


図 2 : TRAP 染色した破骨細胞



図 3-1 : 象牙切片上の吸収窩 (Pit) HE 染色

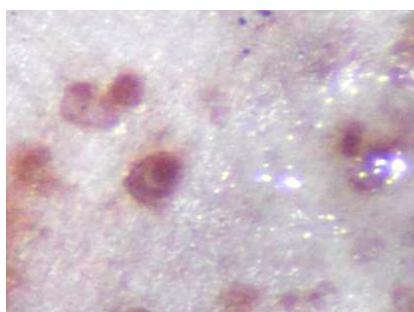
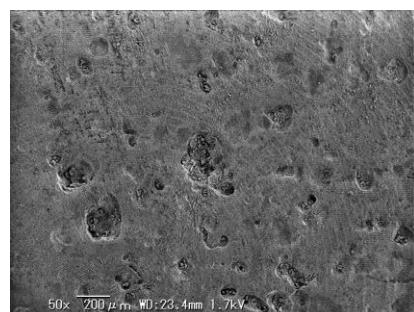


図 3-2 : 象牙切片上の吸収窩 (Pit) HE 染色



50x 200 μm WD:23.4mm 1.7kV

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.

### 《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いて投稿された論文、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



〒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](mailto:primarycell@cosmobio.co.jp)  
URL : <http://www.primarycell.com/>