

骨吸収活性評価キット
BONE RESORPTION ASSAY KIT

本製品は、蛍光標識リン酸カルシウム固層化プレートを用いた簡便な骨吸収活性評価キットです。リン酸カルシウムと結合した蛍光標識コンドロイチン硫酸（FACS）上で破骨細胞を培養し、骨吸収作用により培養上清中に溶出した蛍光を測定する方法です。従来の pit アッセイと異なり、pit の面積等を測定する必要が無く、破骨細胞によるリン酸カルシウム基質の吸収活性を簡便に評価できます（特許第 5 6 0 9 1 4 6 号）。

本製品は、東北大学大学院歯学研究科顎口腔機能創建学分野との共同開発品です。

1) キットの構成

(A)骨吸収活性評価キット 24

- ①BONE RESORPTION ASSAY PLATE 24（骨吸収活性評価プレート 24、Cat. BRA-24P、滅菌済）：1 枚
リン酸カルシウムを固層化した 24well プレートです。
- ②BONE RESORPTION ASSAY FACS（骨吸収活性評価用 FACS、Cat. BRA-FACS1、PBS 溶液、滅菌済、冷蔵保存）：1 本
リン酸カルシウムを標識する蛍光標識コンドロイチン硫酸（FACS）です。
- ③BONE RESORPTION ASSAY BUFFER（骨吸収活性評価用緩衝液、滅菌済、Cat. BRA-B1、冷蔵保存）：1 本
蛍光強度を測定する際に使用する緩衝液です。

(B)骨吸収活性評価キット 48

- ①BONE RESORPTION ASSAY PLATE 48（骨吸収活性評価プレート 48、Cat. BRA-48P、滅菌済）：1 枚
リン酸カルシウムを固層化した 48well プレートです。
- ②BONE RESORPTION ASSAY FACS（骨吸収活性評価用 FACS、Cat. BRA-FACS1、PBS 溶液、滅菌済、冷蔵保存）：1 本
リン酸カルシウムを標識する蛍光標識コンドロイチン硫酸（FACS）です。
- ③BONE RESORPTION ASSAY BUFFER（骨吸収活性評価用緩衝液、滅菌済、Cat. BRA-B1、冷蔵保存）：1 本
蛍光強度を測定する際に使用する緩衝液です。

(C)骨吸収活性評価キット 96

- ①BONE RESORPTION ASSAY PLATE 96（骨吸収活性評価プレート 96、Cat. BRA-96P、滅菌済）：1 枚
リン酸カルシウムを固層化した 96well プレートです。
- ②BONE RESORPTION ASSAY FACS（骨吸収活性評価用 FACS、Cat. BRA-FACS1、PBS 溶液、滅菌済、冷蔵保存）：1 本
リン酸カルシウムを標識する蛍光標識コンドロイチン硫酸（FACS）です。
- ③BONE RESORPTION ASSAY BUFFER（骨吸収活性評価用緩衝液、滅菌済、Cat. BRA-B1、冷蔵保存）：1 本
蛍光強度を測定する際に使用する緩衝液です。

(D)骨吸収活性評価キット 24x2

- ①BRA-24P：2 枚、②BRA-FACS1：2 本、③BRA-B1：1 本

(E)骨吸収活性評価キット 48x2

- ①BRA-48P：2 枚、②BRA-FACS1：2 本、③BRA-B1：1 本

(F)骨吸収活性評価キット 96x2

- ①BRA-96P：2 枚、②BRA-FACS1：2 本、③BRA-B1：1 本

2) 基質の固層化法

- (1) 固層化および培養操作は無菌条件下で行って下さい。
- (2) A：骨吸収活性評価プレート 24（BRA-24P）の各 well に、骨吸収活性評価用 FACS を 0.5mL 添加する。
B：骨吸収活性評価プレート 48（BRA-48P）の各 well に、骨吸収活性評価用 FACS を 0.25mL 添加する。
C：骨吸収活性評価プレート 96（BRA-96P）の各 well に、骨吸収活性評価用 FACS を 0.1mL 添加する。
- (3) プレートの蓋をした後、37℃（CO₂インキュベーター等）、遮光状態で 1~2 時間インキュベートする。
- (4) A：24well プレートの各 well を 1mL の PBS(-)で 2 回洗浄した後、1mL の培地を添加する。
B：48well プレートの各 well を 0.5mL の PBS(-)で 2 回洗浄した後、0.5mL の培地を添加する。
C：96well プレートの各 well を 0.2mL の PBS(-)で 2 回洗浄した後、0.2mL の培地を添加する。
洗浄の際には、CaP 固層化層を傷つけないようにご注意ください。（培地：フェノールレッド不含、血清含有培地）
- (5) プレートをアルミホイル等で包んで遮光し、細胞播種の準備を行って下さい。

3) 細胞培養および骨吸収活性の検出

以下に、マウスマクロファージ細胞株 RAW264 あるいは RAW264.7 細胞を用いた薬剤評価系について例示します。

- (1) 上記「2)基質の固着化法」において添加した各 well 中の培地を除き、RAW264 あるいは RAW264.7 細胞をフェノールレッド不含培地 (例えば 10~20%FBS を含む DMEM/F-12、 α MEM など) で播種する。同時に、破骨細胞分化誘導剤である RANKL および評価する薬剤を添加する。
A : 24well プレート 1×10^4 cell/1mL 培地/well
B : 48well プレート 5×10^3 cell/0.5mL 培地/well
C : 96well プレート 2×10^3 cell/0.2mL 培地/well
- (2) 培地交換せずに 5~6 日間培養する (おおよそ培養 4~6 日目に多核化した破骨細胞が観察されます)。
- (3) 培養 5~6 日目に、培養上清 100 μ L を 96well プレート (蛍光測定用ブラックプレート) に採取する。50 μ L の骨吸収活性評価用緩衝液を添加し、振とう機で混合した後、プレートリーダーにて蛍光強度 (Ex : 485nm Em : 535nm) を測定する。
- (4) pit の面積を測定する際には、まず、培地を除き、5%次亜塩素酸ナトリウムを 0.2~0.5mL 添加して、3~5 分間放置することにより細胞を除去する (リン酸カルシウムが剥がれることがありますので、5%次亜塩素酸ナトリウム中で 5 分以上放置しないで下さい)。純水で洗浄、乾燥させた後、pit の写真を撮影する。画像解析ソフトにより pit 面積を測定する。

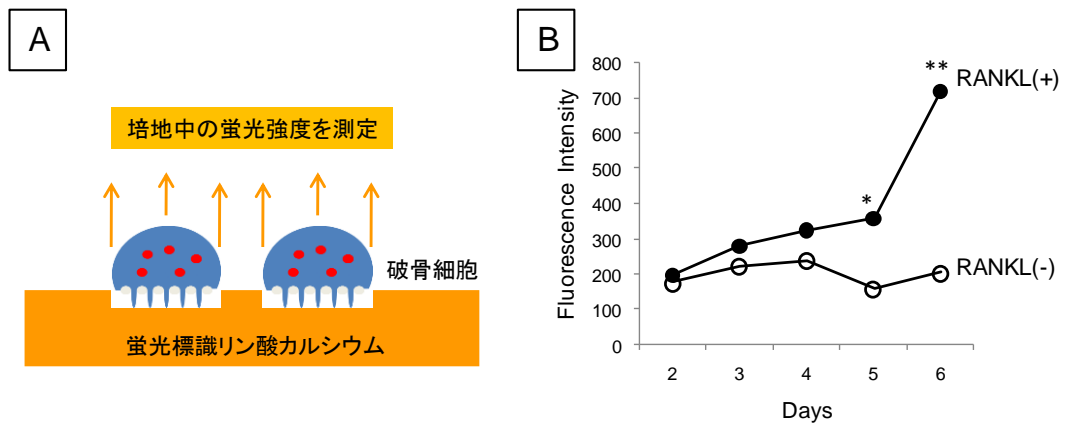
4) 注意事項

- (1) 培養の際には、フェノールレッド不含培地をお使い下さい。
- (2) お使いの細胞の種類や培養条件等により、破骨細胞分化能は多少変動いたします。通常のプラスチックプレートを用い、ご使用の細胞が破骨細胞へ分化することを確認の上、本キットを使用されることをお勧めします。
- (3) 通常の培養操作で構いませんが、取扱に際しては光を避け、顕微鏡による観察では出来るだけ光源を弱くして下さい。
- (4) プラスチックプレートを用いた一般的な破骨細胞誘導系よりも、高濃度の分化誘導剤をご使用下さい。
- (5) 培地の pH により蛍光強度が変動しますので、測定の際には付属の骨吸収活性評価用緩衝液の使用をお勧めします。
- (6) 本品は研究用試薬であり、医薬品その他の目的にはご使用になれません。

5) 参考データ

RAW264 細胞を用いた検討結果を示します。(Miyazaki T., et al., Anal Biochem, 410: 7-12, 2011)

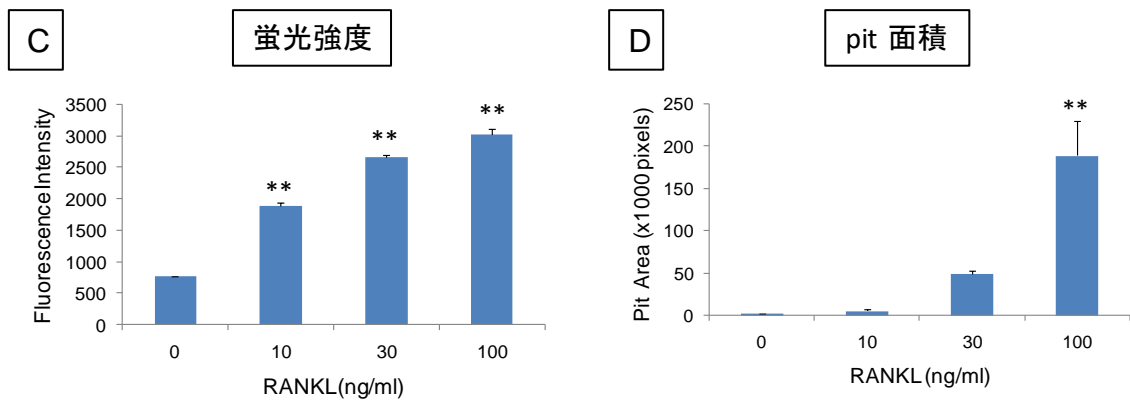
1. 測定原理



A : 測定原理の概略図

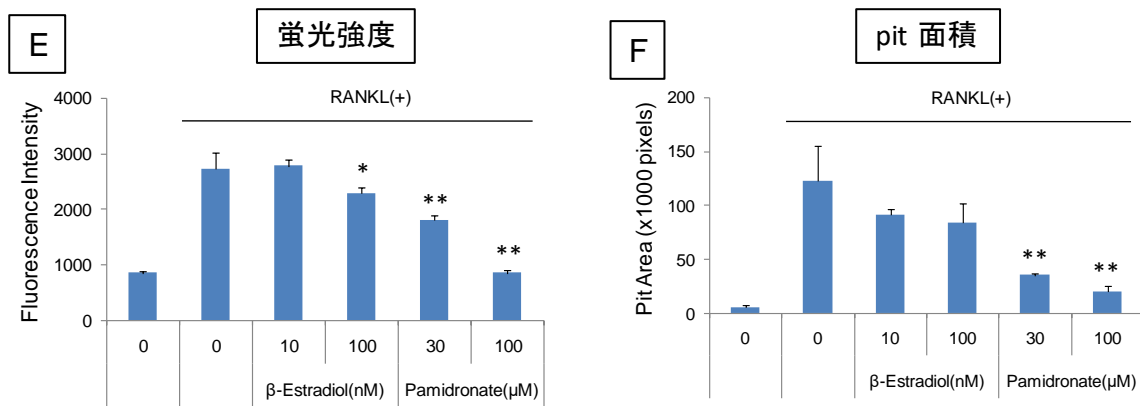
B : RANKL(100ng/mL、オリエンタル酵母社製)の添加により破骨細胞が形成され、FACS が培地中に溶出する (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.001$)

2. RANKL 濃度と骨吸収作用



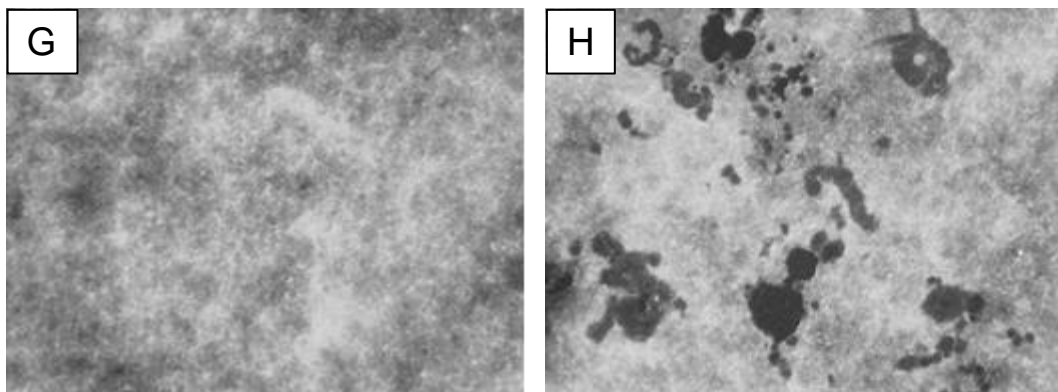
RANKL の濃度依存的に蛍光強度(C)および pit 面積(D)が増加する (平均±標準偏差、n=3、**：p<0.001)

3. 薬剤の評価



RANKL 添加による骨吸収作用を β-Estradiol およびビスホスホネート(Pamidronate)は抑制する。
E: 蛍光強度測定による評価 F: pit 面積による評価 (平均±標準偏差、n=3、*: p<0.05、**：p<0.001)

4. 培養後の pit の写真



写真撮影による pit の観察
G: RANKL 非添加、H: RANKL 100ng/mL 添加 (培養 6 日目)