

# MC3T3 preosteoblast cell line의 5-(and-6)-carboxy-2',7' -dichlorofluorescein diacetate, succinimidyl ester mixed에 의한 fluorescent labelling

국 민 석

전남대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실

전남대학교 치의학 연구소

**Abstract** (J. Kor. Oral Maxillofac. Surg. 2005;31:461-467)

## FLUORESCENT LABELLING OF MC3T3 CELL LINE BY 5-(AND-6)-CARBOXY-2', 7' -DICHLOROFUORESCHEIN DIACETATE, SUCCINIMIDYL ESTER MIXED

Min-Suk Kook

Department of Oral & Maxillofacial Surgery, School of Dentistry

Dental Science Research Institute, Chonnam National University

**Background.** 5-(and-6)-carboxy-2',7' -dichlorofluorescein diacetate, succinimidyl ester mixed (CFSE) is the fluorescent labelling agent of living cells and used to trace the cells in vivo after transplatnation of various cells. The CFSE labelled cells can maintain fluorescence for up to 7 days after labelling. The MC3T3-E1 cell line (MC3T3) has been used for many studies about osteoblast, which is well known as a mouse preosteoblast. So the CFSE would be used to trace the transplanted MC3T3. However there are few reports about CFSE labelling of MC3T3. This study is aimed to know about adequate concentration and incubation time of CFSE to MC3T3.

**Materials and methods.** The MC3T3 was incubated in a humidified atmosphere of 95% air with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C using  $\alpha$ -minimal essential medium ( $\alpha$ -MEM) containing 10% FBS and gentamycin. Ten mM CFSE solution in dimethylsulphoxide (DMSO: 1%) was diluted with phosphate buffered saline (PBS) and final concentration of culture medium was, respectively, 5, 10, 15, 20, 25 and 30  $\mu$ M. Then the MC3T3 was incubated with CFSE in a humidified atmosphere of 95% air with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C for 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 and 45 minutes in each concentration. The fluorescence of CFSE labelled cells was analysed with a inverted fluorescence microscope. The duration of cell labelling was also studied. Trypan blue dye exclusion test was done for cell viability.

**Results.** For concentration between 5 and 10  $\mu$ M, CFSE did not significantly label the MC3T3 *in vitro*. The destruction of MC3T3 was observed at the concentration of 20  $\mu$ M. In the concentration of 15  $\mu$ M, the best labelling was obtained at an incubation period between 15 and 30 minutes. The MC3T3 labelled with an incubation period of 15 minutes at 15  $\mu$ M was still fluorescent 7 days after CFSE labelling. The mean cell viability was 95.93%.

**Conclusion.** These results suggests an incubation period of 15 minutes at 15  $\mu$ M of CFSE provides best labelling of MC3T3 *in vitro*.

**Key words:** Fluorescent labelling, 5-(and-6)-carboxy-2',7' -dichlorofluorescein diacetate, Succinimidyl ester mixed (CFSE)

## I. 서 론

5-(and-6)-carboxy-2',7' -dichlorofluorescein diacetate, succinimidyl ester mixed (CFSE)는 살아있는 세포의 추적에 이용되는 형광염

색제로서 비장세포 이식 후의 적응과정, 포유류나 조류의 배아세포의 조직학적 추적 및 태아세포, 간세포, 백혈구 등 다양한 세포의 추적에 이용되는 시약이다<sup>1,5</sup>. CFSE는 친유성 분자로서 세포내로 들어가기 전에는 형광을 보이지 않다가, 세포 내부의 esterase에 의해 acetyl group이 분리되면 형광을 발하게 된다<sup>6</sup>. 반대로 CFSE는 죽어있는 세포에는 흡수가 되어도 acetyl group이 분리될 수 없으므로 형광을 발하지 못하게 되고, 이러한 원리를 이용하여 살아있는 세포의 추적에 이용되는 약물이다. CFSE는 살아있는 세포에 흡수된 후 형광을 발하게 되면 생체내에서 7일 이상 형광을 유지하는 것으로 알려져 있다<sup>6</sup>.

1990년대부터 골세포를 이용한 2차원적인 세포배양뿐만 아니라 3차원 배양이나 배양한 세포를 이식 후 생체내에서 세포

### 국 민 석

501-757 광주광역시 동구 학동 5번지

전남대학교 치의학전문대학원 구강악안면외과학교실

### Min-Suk Kook

Dept. of OMFS, School of Dentistry Dental Science Research Institute, Chonnam National Univ. 5 Hak-Dong, Dong-Ku, Gwangju, 501-757, Korea

Tel: 82-62-220-5439 Fax: 82-62-228-8712

E-mail: mir93@hanmail.net

의 운명을 구명하는 실험들이 많이 이루어지고 있다<sup>7,12)</sup>. 세포 이식 후 배양된 세포의 생체내에서의 위치, 분포 및 생존여부를 검사하는 방법으로 대부분 조직학적인 검사가 이루어져왔다. 그러나 이 방법은 배양 후 이식된 세포를 확인하는 데에는 한계가 있다. Simain-Sato 등<sup>9)</sup>은 백서 치은에서 채취된 섬유아 세포를 배양 후 이식한 실험에서 이식된 세포를 추적하는데 CFSE를 이용하였다. 이 실험에서 이식 후 3일째와 7일째 각각 실험동물을 희생시켜 형광현미경으로 관찰한 결과 모두 CFSE가 labelling된 세포를 관찰할 수 있었다고 보고하였다. 그러므로 CFSE는 배양된 세포를 이식한 후 생체내에서 확인할 수 있는 좋은 생물학적 표지자라고 할 수 있다. 그의 여러 연구에서 다양한 세포에 이 CFSE가 표지자로 이용되고 있다<sup>10)</sup>. 골세포를 이용한 연구는 많으나 CFSE를 이용한 골세포의 형광염색에 관한 연구는 아직까지 거의 시행되지 않고 있다<sup>10,13,14)</sup>. 또한 CFSE가 골과 관련된 세포에 미치는 독성에 대한 연구도 미미한 실정이다.

본 연구는 골아세포를 형광염색하기 위한 적절한 농도와 배양시간 및 CFSE가 골아세포에 미치는 영향 등을 구명하고자 생쥐 두개에서 유래된 MC3T3-E1 preosteoblast cell line(MC3T3)을 이용하여 CFSE의 농도와 배양시간에 따른 염색정도와 세포 생존율을 평가하였다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. MC3T3 preosteoblast culture

MC3T3 E1 cell line (RIKEN)을  $8 \times 10^5$  세포밀도로 분주하여, 10% 우태아혈청(FBS ; Gibco, USA)과 gentamycin이 함유된  $\alpha$ -minimal essential medium ( $\alpha$ -MEM)으로 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하였다. 배지는 2일마다 교환하였다. 세포가 밀생에 도달했을 때, phosphate buffered saline(PBS)으로 세척하고, 0.05% trypsin과 0.53 mM EDTA (Gibco, USA) 1 ml를 첨가하여 37°C, 5% 이산화탄소 배양기 내에 5분간 배양하였다. 세포가 배양접시로부터 분리되면 10% FBS가 함유된  $\alpha$ -MEM 1 ml를 첨가하고, 2,000 rpm에서 3분간 원심분리를 시행하였다. 상방의 액체는 버리고,  $\alpha$ -MEM 5 ml를 첨가하여 세포의 수를 세고, 8개의 6 wall plate와 4개의 flask에  $8 \times 10^5$  세포밀도로 분주하여 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 2일에 한번씩 배지를 교환하며, 밀생에 도달할 때까지 배양하였다(Fig. 1).

### 2. Fluorescent labelling

밀생에 도달한 후 각 6 wall plate의 세포를 CFSE, 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate, succinimidyl ester mixed ( $C_{29}H_{17}Cl_2NO_{11}$ , Molecular weight: 626.36)로 fluorescent labelling을 하였다. CFSE의 preosteoblast에 대한 적절한 농도 및 배양시간을 알아보기 위해 CFSE를 dimethylsulphoxide (DMSO: 1%)에 10 mM의 농도로 녹인 다음, PBS를 이용하여 5, 10, 15, 20, 25 및 30

$\mu$ M로 희석시킨 후 37°C에 5분간 두었다. 6 wall plate의 배지를 제거하고, 준비된 CFSE가 함유된 PBS를 2 ml씩 첨가한 후 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 각각 농도별로 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45분간 배양하였다. 각각의 배양시간이 끝나면 각각의 wall에서 CFSE가 함유된 PBS를 제거하고, 미리 37°C로 데워진 배지를 첨가한 후, 다시 30분간 배양하였다. 세포의 fluorescent labelling은 Olympus IX 50 inverted fluorescent microscope를 이용하여 검경하였다. 이 중 가장 적절하다고 생각되는 농도 및 배양시간에 대하여 추가로 새로운 flask에 fluorescent labelling 후 7일째 fluorescent microscope를 이용하여 labelling의 지속정도를 검경하였다.

### 3. Cell viability test

Trypan blue dye exclusion test를 이용하여 세포의 생존율을 측정하였다. 밀생에 도달한 3개의 배양접시를 15  $\mu$ M의 CFSE로 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 15분간 배양하여 fluorescent labelling 후 24시간이 경과한 다음 형광현미경으로 관찰하고, PBS로 세척한 후 0.05% trypsin과 0.53 mM EDTA 1 ml를 첨가하여 37°C, 5% 이산화탄소 배양기 내에 5분간 배양하였다. 세포가 배양접시로부터 분리된 후 10% FBS가 함유된  $\alpha$ -MEM 1 ml를 첨가하고, 2,000 rpm에서 3분간 원심분리를 시행하였다. 상방의 액체를 모두 버리고 1 ml의 Hank's balanced salt solution (HBSS)을 첨가한 후, 0.2 ml를 새로운 시험관에 옮겼다. 여기에 0.4% trypan blue solution 0.5 ml와 HBSS 0.3 ml를 첨가하고, 골고루 섞은 후 10분간 실온에서 방치하였다. 이 용액을 hemacytometer chamber로 옮기고 세포 수를 현미경하에서 산정한 후, 전체세포에 대한 염색되지 않은 세포의 비율을 계산하여 cell viability를 산출하였다. Hemacytometer의 중앙 및 각 모서리에 있는 4개의 사각형에서 trypan blue에 염색되지 않은 세포 및 염색된 세포의 수를 측정 한 후, 5개의 사각형에서 측정된 수의 평균을 이용하여 viability를 계산하였다. 각 배양접시당 5회씩 hemacytometer의 양쪽 chamber를 이용하여 총 10회 측정하였다.

## III. 결 과

### 1. MC3T3 preosteoblast culture

모든 flask에서 배양된 세포들은 균일한 외형을 나타냈으며 감염이나 오염 등의 이상소견 없이 배양 후 7일째 밀생에 도달하였다.

### 2. Fluorescent labelling

모든 배양접시에서 CFSE에 의한 fluorescent labelling이 관찰되었으며, 세포질이 진하게 염색되었다. 5  $\mu$ M의 농도에서는 35분까지 희미한 labelling을 보였으며 40분부터는 세포의 파괴가 관찰되었다(Fig. 2). 10  $\mu$ M에서도 5  $\mu$ M에서와 유사한 양상을

**Table 1.** Trypan blue dye exclusion test

Flask	MVC±SD	MDC±SD	MTC±SD	MCV(%)±SD
A	32.4±8.9	1.4±0.5	33.8±9.0	95.9±2.0
B	40.4±8.4	1.5±1.0	41.9±8.8	96.4±2.2
C	38.3±6.5	1.8±0.8	40.1±6.9	95.5±1.6

A, B, C : culture flask, SD: standard deviation, MVC: mean viable cells, MDC: mean dead cells, MTC: mean total cells.

보였다(Fig. 3). 15  $\mu\text{M}$ 에서는 15분에 labelling이 선명하였으며, 30분까지 유사한 양상을 보였으며, 35분부터는 세포에 구멍이 형성되어 있었다(Figs. 4, 5). 20  $\mu\text{M}$ 에서는 전반적으로 세포에 구멍이 형성되어 있었으며 30분부터는 일부 세포의 파괴도 관찰되었다(Fig. 6). 25  $\mu\text{M}$ 에서는 전체적인 시간에 걸쳐 세포에 구멍이 형성되었으며, 25분부터는 세포의 파괴가 관찰되었다(Fig. 7). 30  $\mu\text{M}$ 에서는 초기부터 세포의 파괴가 관찰되었으며, 시간 경과에 따라 파괴 정도는 더 심한 양상을 보였다(Fig. 8).

15  $\mu\text{M}$ 에서 15분간 배양한 배양접시에서 가장 선명한 labelling이 되었으며, 이는 labelling 후 7일째에도 별다른 이상소견 없이 labelling이 관찰되었으며, 형광의 강도는 labelling 직후보다 약간 감소되었다(Fig. 9).

### 3. Cell viability test

Hemocytometer의 chamber에서 trypan blue에 의해 염색된 세포는 남색으로 관찰되었으며, 이는 죽은 세포로 간주되었다. Hemocytometer chamber내에 있는 세포중에서 inverted microscope로 광학하에서 남색으로 염색된 세포는 형광하에서는 관찰되지 않았다(Fig. 10).

측정된 세포의 수 및 각각의 생존율은 Table 1과 같으며, A 배양접시는 95.9%, B는 96.4% 및 C는 95.5%의 생존율을 보였으며 평균 생존율은 95.9%였다(Table 1).

## IV. 고 찰

MC3T3는 생쥐 두개에서 유래된 preosteoblast cell line으로서 ascorbic acid와 dexamethason 및 glycerophosphate를 투여하면 osteoblast로 분화해서 mineralized nodule을 형성하는 것으로 알려진 세포주이다<sup>15,16</sup>. 본 연구에서 세포의 특성이나 종류에 대한 변이를 최소로 하기 위해 골아세포주인 MC3T3 cell line을 이용하였다.

배양된 세포의 이식 후 세포의 생존을 추적하기 위해 CFSE에 의한 fluorescent labelling을 이용한다<sup>46</sup>. CFSE는 간세포이식 후의 추적이나 신경세포의 분석 및 임파구의 이주의 연구에 이용되는 시약이다<sup>46</sup>. CFSE는 친유성 분자로서 세포내로 들어가기 전에는 거의 형광을 보이지 않다가, 세포내부의 esterase에 의해 acetyl group이 분리되면 형광을 발하게 된다. 또한 CFSE는 세포외막에 결합하지 않으므로 세포의 면역학적 인지를 방

해하지 않으며, 세포내의 amine과 결합한 후에는 다른 세포를 labelling시키지 않는다<sup>46</sup>. 본 연구에서 CFSE자체는 형광현미경 하에서 형광을 발하지 않았지만 CFSE로 배양시킨 MC3T3 cell은 형광현미경하에서 관찰되었다. 그러나 살아있지 않은 세포는 형광현미경에서 관찰되지 않았다. 이는 Simain-Sato 등<sup>46</sup>이 지적한 바와 같이 죽은 세포에서는 CFSE의 acetyl group이 분리될 수 없기 때문에 형광을 발하지 못하며, 형광을 발하기 위해서는 이 acetyl group이 세포내에서 분리되어야 한다는 사실과 일치하였다고 생각된다.

Simain-Sato 등<sup>46</sup>은 섬유아세포의 labelling에 15  $\mu\text{M}$ 의 CFSE로 37°C에서 30분간 배양하는 것이 가장 적절하다고 하였다. 본 연구에서도 MC3T3 preosteoblast에서 CFSE를 15  $\mu\text{M}$ 의 농도로 15분간 labelling 하는 것이 가장 적절한 것으로 나타났으며 30분까지 labelling한 경우 비슷한 결과를 나타냈다. 이 이상의 농도나 더 긴 배양시간에 노출된 세포들의 일부에서는 세포에 구멍이 형성되었으며, 더 높은 농도나 더 긴 배양시간에서는 세포가 파괴되는 양상을 보였다. 이는 CFSE를 녹이기 위해 사용되는 DMSO의 농도와도 관련이 있을 것으로 사료되며, 이와 관련된 연구가 더 필요하리라 생각된다.

Trypan blue는 세포의 생존율을 검사하는 대표적인 약제이다. 이 약제는 살아있는 세포를 통과하지 못하지만, 죽은 세포는 통과하는 원리를 이용한 약제이다. 따라서 파랗게 염색된 세포는 죽은 세포로 간주할 수 있다. 이를 이용한 trypan blue dye exclusion test는 여러 가지 시약에 대한 각종 세포의 생존율을 측정하는데 이용되고 있다<sup>6,17-19</sup>. 본 연구에서는 결과가 가장 좋게 나온 15  $\mu\text{M}$ 의 CFSE로 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 15분간 배양한 배양접시를 이용하여 trypan blue dye exclusion test를 한 결과 세포의 생존율은 평균 95.9%였으며, 이는 적절한 농도에서 CFSE는 세포의 생존율에 거의 영향을 미치지 않음을 시사하였다.

Karrer 등<sup>20</sup>은 쥐의 간세포 이식에 대한 연구에서 CFSE labelling이 20일 이상 생체내에서 유지된다고 하였다. Oehen 등<sup>1)</sup>은 labelling 된 spleen cell들이 flow cytometry에서 11주째까지도 관찰된다고 하였다. Paramore 등<sup>3)</sup>은 CFSE가 일단 세포에 labelling이 되면 1개월까지 형광을 유지한다고 하였다. Simain-Sato 등<sup>46</sup>은 CFSE가 일단 세포내에서 esterase에 의해 acetyl group이 분리되고 세포내 amine과 결합한 후에는 더이상 다른 세포를 labelling시키지 않았으며, 세포외로 새지도 않으면서 세포 배양시 7일 이상 형광현미경에서 관찰된다고 하였다. 본 연구

에서도 Simain-Sato 등<sup>6)</sup>의 결과처럼 CFSE에 의한 MC3T3 cell의 labelling이 배양접시에서 7일째까지 유지되는 것을 관찰할 수 있었으며, Oehen 등<sup>1)</sup> 및 Simain-Sato 등<sup>6)</sup>의 소견과 유사한 소견을 보였다. Paramore 등<sup>3)</sup>은 CFSE가 *in vitro*상에서 cell viability에 대한 좋은 표지자라고 하였으며, 수일 경과 후에는 약간 희미해진다고 하였다. 본 연구에서도 labelling 직후와 비교시, 7일째 더 발색정도가 더 희미해지는 소견을 보여 Paramore 등<sup>3)</sup>과 비슷한 소견을 보였다.

## V. 결 론

본 연구는 MC3T3 preosteoblast cell line에 대한 CFSE의 적절한 농도 및 배양시간에 대하여 알아보고자 시행한 결과 15  $\mu$ M의 농도에서 15분간 배양하는 것이 형광염색의 정도 및 세포독성이 가장 적음을 시사한다.

## 참고문헌

- Oehen S, Brduscha-Riem K, Oxenius A, Odermatt B: A simple method for evaluating the rejection of grafted spleen cells by flow cytometry and tracing adoptively transferred cells by light microscopy. *J Immunol Methods* 1997;207(1):33-42.
- Garton HJ, Schoenwolf GC: Improving the efficacy of fluorescent labelling for histological tracking of cells in early mammalian and avian embryos. *Anat Rec* 1996;244(1):112-117.
- Paramore CG, Turner DA, Madison RD: Fluorescent labelling of dissociated fetal cell culture for tissue culture. *J Neurosci Methods* 1992;44(1):7-17.
- Vroemen J: Transplantation of isolated hepatocytes into the pancreas. *Eur Surg Res* 1988;20:1-11.
- Weston SA: New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescent microscopy. *J Immunol Methods* 1990;133:87-96.
- Simain-Sato F, Lahmouzi J, Heinen E, Defresne MP, De Pauw-Gillet MC, Grisar Th, Legros JJ, Legrand R: Graft of autologous fibroblasts in gingival tissue *in vivo* after culture *in vitro* preliminary study on rats. *J Periodont Res* 1999;34:323-328.
- Rey C, Kim HM, Gerstenfeld L, Glimcher MJ: Characterization of the apatite crystals of bone and their maturation in osteoblast cell culture: comparison with native bone crystals. *Connect Tissue Res* 1996;35:343-349.
- Bhargava U, Bar-Lev M, Bellows CG, Aubin JE: Ultrastructural analysis of bone nodules formed *in vitro* by isolated fetal rat calvarial cells. *Bone* 1988;9(3):155-163.
- Arceo N, Sauk JJ, Moehring J, Foster RA, Somerman MJ: Human periodontal cells initiate mineral-like nodules *in vitro*. *J Periodontol* 1991;62:499-503.
- Casser-Bette M, Murray AB, Closs EI, Erfle V, Schmidt J: Bone formation by osteoblast-like cells in a three-dimensional cell culture. *Calcif Tissue Int* 1990;46(1):46-56.
- Nolan PC, Nicholas RM, Mulholland BJ, Mollan RA, Wilson DJ: Culture of human osteoblasts on demineralised human bone. Possible means of graft enhancement. *J Bone Joint Surg Br* 1992;74(2):284-286.
- Ishaug SL, Crane GM, Miller MJ, Yasko AW, Yaszemski MJ, Mikos AG: Bone formation by three-dimensional stromal osteoblast culture in biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res* 1997;36(1):17-28.
- Roth JA, Kim BG, Lin WL, Cho MI: Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biol Chem* 1999;274(31):22041-22047.
- Dean DD, Schwartz Z, Bonewald L, Muniz OE, Morales S, Gomez R, Brooks BP, Qiao M, Howell DS, Boyan BD: Matrix vesicles produced by osteoblast-like cells in culture become significantly enriched in proteoglycan-degrading metalloproteinases after addition of  $\beta$ -glycerophosphate and ascorbic acid. *Calcif Tissue Int* 1994;54:399-408.
- Dean DD, Schwartz Z, Bonewald L, Muniz OE, Morales S, Gomez R, Brooks BP, Qiao M, Howell DS, Boyan BD: Matrix vesicles produced by osteoblast-like cells in culture become significantly enriched in proteoglycan-degrading metalloproteinases after addition of  $\beta$ -glycerophosphate and ascorbic acid. *Calcif Tissue Int* 1994;54:399-408.
- Roth JA, Kim BG, Lin WL, Cho MI: Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biologic Chem* 1999;274(31):22041-22047.
- Ilana Y, Idit S, Rachel J, David L, Dan C, Michael Y: Fluoxetine and amitriptyline inhibit nitric oxide, prostaglandin E2, and hyaluronic acid production in human synovial cells and synovial tissue cultures. *Arthritis Rheum* 1999;42(12):2561-2568.
- Partovi M, Sadeghein A, Azizi E, Ostad SN: Mitogenic effect of L-dopa on human periodontal ligament fibroblast cells. *J Endodont* 2002;28(3):193-196.
- Yasufumi I, Katsumi E, Kiyoshi M, Yojiro K, Toshiaki T, Takehiko K, Kuniko A, Takahiko A, Hideki N, Shigenobu N: Apoptosis induction in synovial fibroblasts by ceramide: *in vitro* and *in vivo* effects. *J Lab Clin Med* 1998;131(5):410-416.
- Karrer FM, Reitz BL, Hao L, Lafferty KJ: Fluorescein labelling of murine hepatocytes for identification after intrahepatic transplantation. *Transplant Proc* 1992;24(6):2820-2821.

## FIGURE LEGENDS

- Fig. 1. Photomicrograph of MC3T3 cells. The cells reach confluent stage. (Phase contrast microscopy, original magnification  $\times 40$ )
- Fig. 2. Photomicrograph of MC3T3 cells which was incubated at  $5 \mu\text{M}$  of CFSE for 30 minutes. The MC3T3 cells are labelled weakly. (Phase contrast fluorescence microscopy, original magnification  $\times 200$ )
- Fig. 3. Photomicrograph of CFSE labelled MC3T3 cells at  $10 \mu\text{M}$ , CFSE applied on cultured MC3T3 does not significantly label cells *in vitro*. (Phase contrast fluorescence microscopy, original magnification  $\times 200$ )
- Fig. 4. Photomicrograph of MC3T3 cells which was incubated at  $15 \mu\text{M}$  of CFSE for 15 minutes. The MC3T3 cells can be observed the best labelling. (Phase contrast fluorescence microscopy, original magnification  $\times 200$ )
- Fig. 5. Photomicrograph of MC3T3 cells which was incubated at  $15 \mu\text{M}$  of CFSE for 35 minutes. Multiple small unlabelled spheres can be observed in MC3T3. (Phase contrast fluorescence microscopy, original magnification  $\times 200$ )
- Fig. 6. Photomicrograph of MC3T3 cells which was incubated at  $20 \mu\text{M}$  of CFSE. Most of cultured MC3T3 contain multiple small unlabelled spheres. (Phase contrast fluorescence microscopy, original magnification  $\times 200$ )
- Fig. 7. Photomicrograph of MC3T3 cells which was incubated at  $25 \mu\text{M}$  of CFSE. The shape of the MC3T3 cells are changed, and large unlabelled spheres can be observed. (Phase contrast fluorescence microscopy, original magnification  $\times 200$ )
- Fig. 8. Photomicrograph of MC3T3 cells which was incubated at  $30 \mu\text{M}$  of CFSE. The destruction of most of cells is observed. (Phase contrast fluorescence microscopy, original magnification  $\times 40$ )
- Fig. 9. Photomicrographs of MC3T3 cells which was incubated at  $15 \mu\text{M}$  of CFSE for 15 minutes. A. The MC3T3 cells 30 minutes after CFSE labelling, B. The MC3T3 cells 7 days after CFSE labelling. The fluorescent intensity of MC3T3 cells at 7 days after labelling is decreased than at 30 minutes. (Phase contrast fluorescence microscopy, original magnification  $\times 40$ )
- Fig. 10. Photomicrographs of MC3T3 cells in the chamber of hemacytometer after CFSE labelling at  $15 \mu\text{M}$  for 15 minutes. A. Non viable cells which stain blue can be observed. (Phase contrast microscopy, original magnification  $\times 40$ ), B. Viable cells show fluorescence. Non viable cells which are observed blue color in light microscope can't be observed in fluorescent microscope. (Phase contrast fluorescence microscopy, original magnification  $\times 40$ )

FIGURES ①

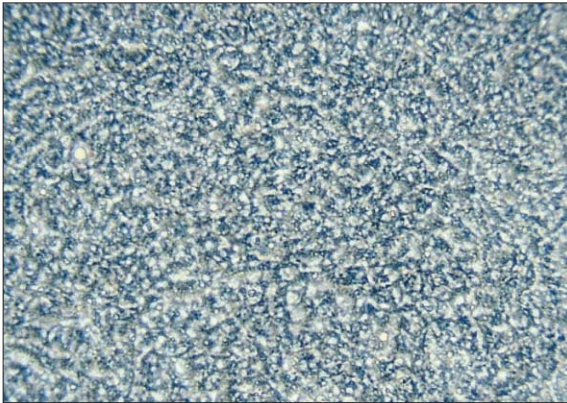


Fig. 1

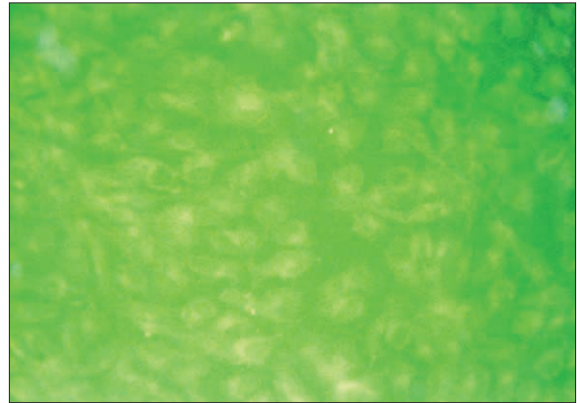


Fig. 2



Fig. 3

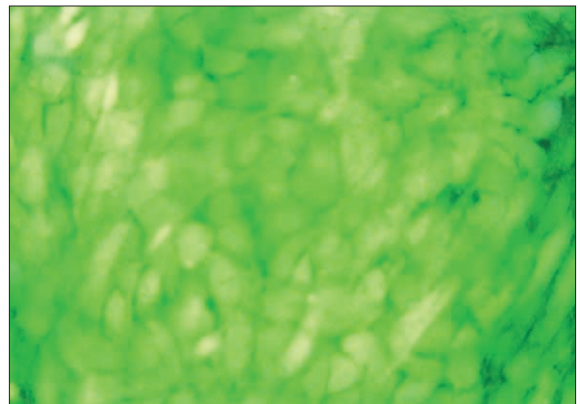


Fig. 4

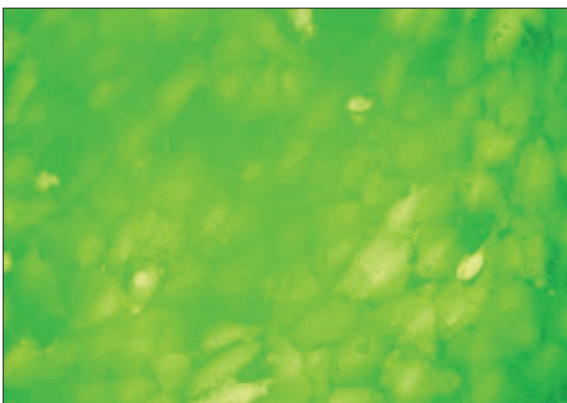


Fig. 5

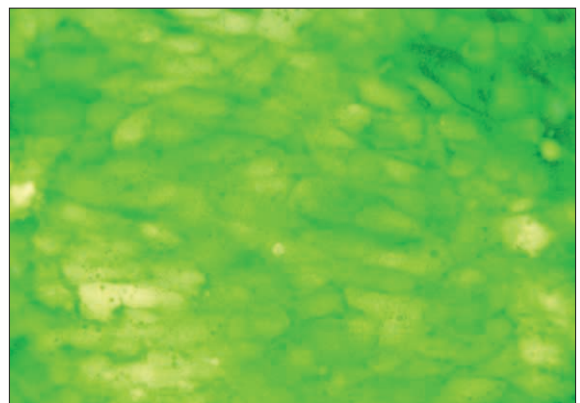


Fig. 6

FIGURES ②

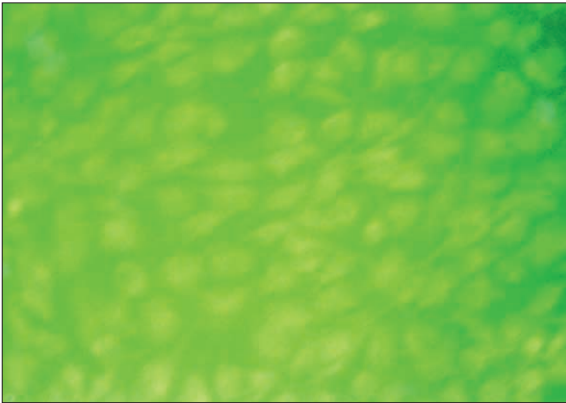


Fig. 7

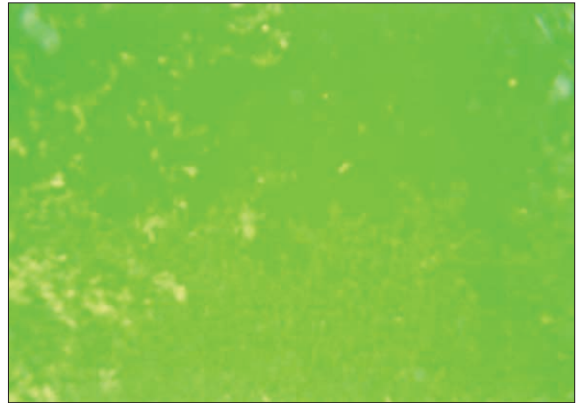
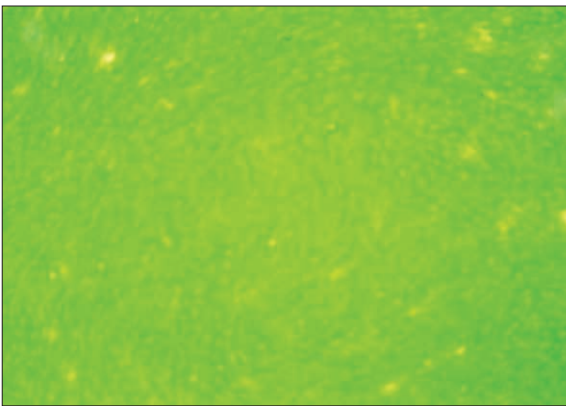
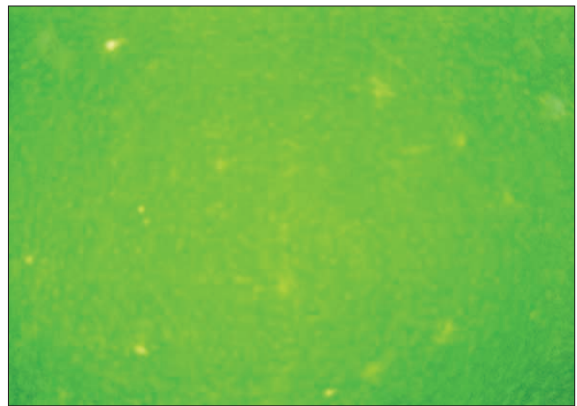


Fig. 8

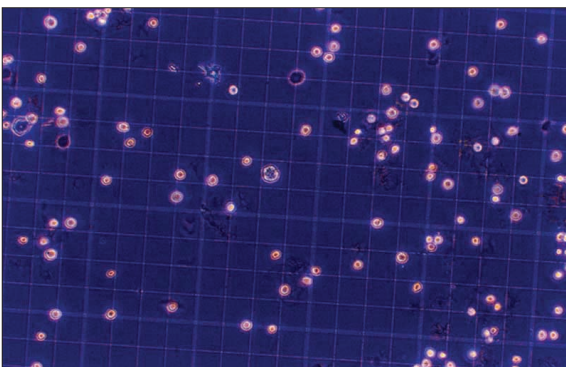


A

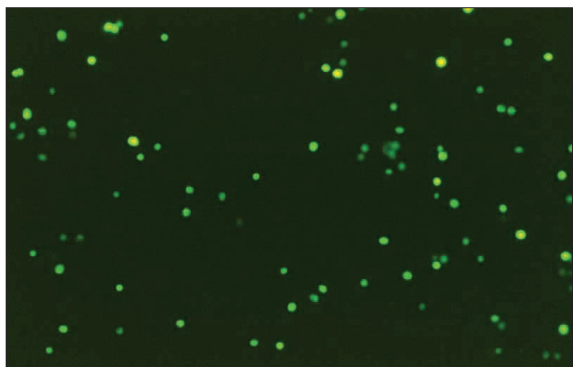


B

Fig. 9



A



B

Fig. 10