



凍結初代細胞製品

# ウサギ軟骨細胞

【Rabbit chondrocyte, 品番：CHC04C】

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関節障害により日常生活に支障をきたす人の数は、年々増加の一途をたどり人口の約1%に達しております。これら関節疾患の大部分は軟骨組織が損傷を受けたり壊死したりすることによって起こる変形関節症もしくは慢性関節リュウマチによるものがほとんどです。

本製品はウサギ関節軟骨組織から機能を損なうことなく初代培養した軟骨細胞（凍結細胞）です。軟骨細胞の機能解明、関節疾患治療薬の開発、軟骨再生実験などにご利用ください。

## 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。

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
ウサギ軟骨細胞	2×10 <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

ウサギ関節軟骨組織由来（日本白色種・メス）

## VI. 専用メディウム（別売）

品名	品番	容量	保存方法	使用期限
軟骨細胞増殖用メディウム	CHCG	500 mL	-20°C保存 (解凍後は4°C保存)	ボトル記載(-20°C) 解凍後は4°C保管し、 お早めにご使用ください
軟骨細胞分化用メディウム	CHCM	500 mL	-20°C保存 (解凍後は4°C保存)	ボトル記載(-20°C) 解凍後は4°C保管し、 お早めにご使用ください

培地の主成分：RPMI1640、血清、抗生剤、その他

## VII. 操作方法

※本製品は【1回のみ継代可能】です。

### 細胞解凍・播種

※下記は、24well プレートで培養する場合のプロトコールになります。

#### 【準備するもの】

- ・軟骨細胞増殖用メディウム（品番：CHCG）
- ・軟骨細胞分化用メディウム（品番：CHCM）
- ・24well プレート（コラーゲンIでコーティングしたもの）
- ・滅菌済ピペット、遠心チューブなどの培養器具

1. 予め増殖用メディウムを 4°Cで解凍し、必要量を 37°Cで温めてください。
2. 15mL 遠心チューブ 1 本に 37°Cに保温した増殖用メディウム 9mL を分注してください(注1)。
3. 凍結細胞 1 本を 37°C温水で速やかに解凍してください。  
※37°C温水に浸けてから 1 分 50～2 分 05 秒（小さな氷塊が残る程度）ほどで解凍します。  
※1 バイアルあたり 1mL の凍結保存液が入っています。
4. 解凍した細胞液は、予め用意した 15mL 遠心チューブ（増殖用メディウム 9mL を含む）に移し、室温、600gで 5 分間遠心してください。
5. 上清を除去し、温めた増殖用メディウムを 12.5mL 加え、細胞浮遊液（ $1.6 \times 10^5$  cells/mL）を調製してください。
6. 24well プレート（コラーゲンIコート済）に 1well あたり細胞浮遊液 0.5mL ずつ播種後、5%CO<sub>2</sub> 存在下の 37°Cインキュベーターで培養し、2 日間静置してください。
7. 播種から翌々日、37°Cに保温した増殖用メディウムで 1well あたり 0.5mL ずつ培地交換し、コンフルエントになるまで 1～2 日おきに増殖用メディウムで培地交換してください。  
※播種してから 3～5 日後にコンフルエントなります。
8. コンフルエント以降は分化用メディウムで培養し、4～6 日おきに培地交換してください。

注1：保温していないメディウムを使用した場合は、細胞の生存率に大きく影響しますので、増殖用メディウムは必ず 37°Cに温めて使用してください。

## 細胞継代

軟骨細胞は継代により脱分化しやすくなるため、本細胞の継代は1回まででご使用ください。

### 【準備するもの】

- ・滅菌済み平衡塩溶液(Hank's BSS(-)もしくは PBS(-))
- ・トリプシン-EDTA 溶液 (0.05%トリプシン, 0.53mM EDTA)
- ・実験に使用する培養用容器 (コラーゲン I コート済)
- ・滅菌済ピペット、遠心チューブなどの培養器具
- ・軟骨細胞増殖用メディウム (品番: CHCG)
- ・軟骨細胞分化用メディウム (品番: CHCM)

1. 増殖用メディウムで培養した軟骨細胞 (70%コンフルエント状態) を用意してください。  
※コンフルエントもしくは分化用メディウムで培養した軟骨細胞は、細胞外基質の影響でトリプシンによる細胞回収率が極端に低くなりますのでご注意ください。
2. 培養容器のメディウムを吸引除去後に、滅菌済み平衡塩溶液 (HBSS(-)もしくは PBS(-)) を加えて洗浄してください (この操作を2回繰り返してください)。
3. 培養容器内の平衡塩溶液を除去してください。
4. トリプシン-EDTA 溶液を添加して培養表面を行き渡らせた後、直ちに容器内のトリプシン溶液を吸引除去してください (この操作を2回繰り返してください)。
5. 容器を 37°Cインキュベーターに静置して酵素処理を行ってください。鏡検で細胞が丸くなるのを確認し、軽く手のひらで培養容器をたたき、細胞が培養面から流動する様子が観察されるまで酵素処理を行ってください。
6. 培養容器に増殖用メディウムを加えて酵素処理を停止し、分散した細胞を遠心管に回収し、4°C、600xgで10分間遠心してください。
7. 上清を除去し、増殖用メディウム加えて細胞浮遊液を調製した後、血球計算盤で細胞数をカウントし、適切な細胞密度になるように調整してください。
8. 培養容器に播種して任意の実験系に供してください。

## VIII. 技術情報

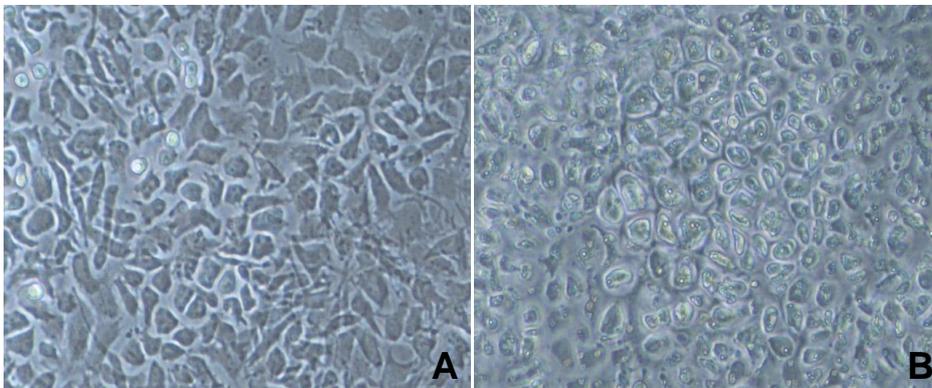


図 1.軟骨細胞写真

A : 分化用メディウムで培養 2 日目、B : 分化用メディウムで培養 20 日目