2025 年 11 月 3 日　RD 歯科クリニック

細胞調製におけるトラブルシューティング

【細胞調製法の詳細（調製液をロスせず泡をいれないようにする方法)】

①15mL 遠心チューブにコラーゲンを入れ、細胞沈殿物を混合

A　コラーゲンは使用直前に冷蔵庫から 1 本のみ出し、クリーンベンチ内ですばやくクライオチューブに入れます。
※室内が暑い時は、クライオチューブも冷やしておくとよいでしょう。

B　200 µL のマイクロピペットの容量目盛りは、120 µL の多めに設定します。

C　200 µL のマイクロピペットで、A のクライオチューブからコラーゲンをゆっくり吸います。
※吸い終わりの際、マイクロピペットのプッシュボタンは上げ切らずに、プッシュボタンを指で押さえたまま、コラーゲン液から引き抜くと、泡が入りにくくなります。

D　15mL 遠心チューブの細胞沈殿物近くから、コラーゲン液を細胞に流し、ピペッティングではなく、マイクロピペットのプッシュボタンを指で押さえた状態で液体を回して混ぜます。
※泡を入りにくくするための操作です。
※ピペッティング：マイクロピペットで液体を吸う、吐出するのを繰り返すこと。

②15mL 遠心チューブから、0.2mL PCR チューブへの細胞調製液の回収

A　①の D の細胞調製液の入った 15mL 遠心チューブを、遠心機に入れて、軽くスピンダウンします。これにより、壁面についたコラーゲンをチューブの底に落とせます。
※スピンダウン：短時間の遠心にて容器の底に集める動作です。
※500rpm ぐらいに到達したらストップかけます。やりすぎると細胞が再度沈殿してしまいます。

B　0.2mL PCR チューブに前もって、G-CSF を 7.5 µL 入れておきます。

C　200 µL のマイクロピペットに新しいチップをつけて、ゆっくり、B の 0.2mL PCR チューブに移します。最後はプッシュボタンを一段階目で押したまま少し待って、液がチップの下に落ちてから、二段階目までピペットを押し出

す。先を押したまま、少しぐるぐる回して、泡をいれないように G-CSF を混ぜます。

D　0.2mL PCR チューブのふたをしっかり閉め、小型遠心機で数秒間回し、スピンダウンします。

E　もし、右のような角（矢印）のところまで液が来ていないときは、①A のコラーゲンを足して、十分な量に合わせておきましょう。



③0.2mL PCR チューブから細胞調製液を移植用シリンジに入れる

A　0.2mL PCR チューブの細胞調製液に泡がないことを確かめます。
まだ、泡がみられるときは、②の D を繰り返します。

B　シリンジチップを 1mL ローデットシリンジに付けて（＊）、最後までピストンを押します。

D　0.2mL PCR チューブをまっすぐ立てて、シリンジチップの先端を軽く底につけて、垂直方向に立てて、ゆっくり吸い込みます。



＊あらかじめ、1mL ローデットシリンジにシリンジチップを付けたものにカラ吸い（①の A のコラーゲンを試しに吸って、別のいらない容器にすてて、シリンジ内部をコートしておく）と、シリンジ内部に泡がつきにくく、量も少なくならないですみます。

E　底のシリンジの先をよく見て、最後まで吸い切らない（泡を入れない）ようにしましょう。

【トラブルシューティング】

「足りない時」

①15mL 遠心チューブをもう一度、スピンダウンして、集めます（②A)。

②再度①を、1mL ローデットシリンジに入れた細胞調製液とともに、先ほど使用した 0.2mL PCR チューブに戻します。

③小型遠心機で②をスピンダウンして泡をぬき（②D)、足りない場合にはコラーゲンを足して十分な量に合わせます（②E)。

「泡が入った時」

①新しい 1mL ローデットシリンジにシリンジチップを付けます。

②泡が入った 1mL ローデットシリンジの細胞調製液を、先ほど使用した 0.2mL PCR チューブに戻します。

③小型遠心機で②をスピンダウンして泡を抜きます（②D)。

④③D の要領で、①を用いて入れます。

注意

・G-CSF の濃度は、極端に変えない方がよいので、もし、細胞をかなり（半分以上）ロスしてコラーゲンを足す場合には、コラーゲン 100μL につき G-CSF を 7.5μL 加えたものから取るとよいでしょう。

・細胞数は半分から 1/3 になっても、歯髄が再生される可能性はあります。（年齢、患歯の状態にも依存します)。