

## iPS 細胞の凍結

### 【準備するもの】

#### 細胞

- 至適なコンフルエントに達したヒトiPS細胞

#### 試薬

- STEM-CELLBANKER®
- PBS(-)
- 維持培養培地 StemFit®AK02N
- 0.5X TrypLE™Select
  - \* TrypLE™ Select (1 mM EDTA含有) および0.5 mM EDTA/PBSを等量混合し、調製する (最終濃度 0.75 mM EDTA) 。

#### 物品

- クライオチューブ (2.0 mL)
- セルスクレーパー
- ピペット
- 広口チップ
- プログラムフリーザーもしくは-1℃/minで温度の低下する細胞凍結容器

### 【手順】

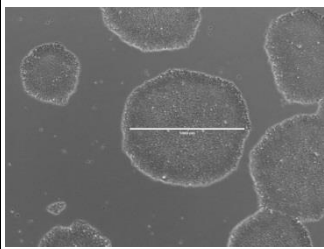
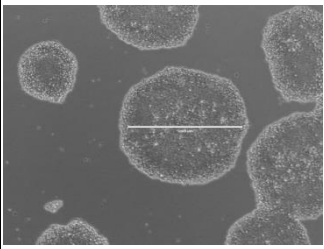
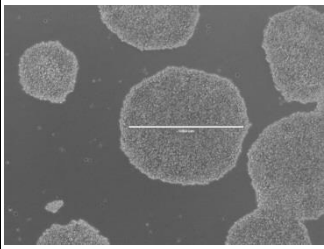
#### I. 培地の準備

必要量のStemFit®AK02Nに培地の1/1000量の10 mM Y-27632を加えてよく混合しておく (最終濃度10 μM) (以下、AK02N+Yとする) 。

#### II. 細胞の凍結

1. 位相差顕微鏡で細胞を観察し写真撮影を行う。  
(死細胞が多く細胞が観察しにくい場合には、新しい培地に交換して写真撮影を行う。PBS(-)では細胞が剥がれる可能性があるので培地の方が好ましい。)
2. 培地を除去する。
3. PBS(-) 1 mLを加えて洗浄し、PBS(-)を除去する。
4. 0.5X TrypLE™Select を300 μL/wellずつ加えよくなじませる。
5. 37℃、CO<sub>2</sub> 5%インキュベーターで反応させる。
  - \* コロニーの中心まで細胞が解離していること (顕微鏡下ではコロニー中心部まで透過度が上昇し、胞一つ一つが丸くなっている像がみられる) を確認した後、次の作業に移る (下表参照) 。201B7株<sup>1), 2)</sup> (iMatrix-511使用時) における、反応時間は7 min程度であった。

\* 下表写真は、201B7株<sup>1), 2)</sup>における弊社実施例

解離状態	処理前	処理がコロニー周辺のみ	処理がコロニー全体に及ぶ
画像			
コロニーの状態		コロニー周辺のみ 透過度上昇	コロニー全体の 透過度上昇

6. 0.5X TrypLE™ Selectを除去する。
7. 2 mL/well のPBS (-)で洗浄し、PBS (-)を除去する。  
(細胞が剥がれやすいので静かに加える。)
8. AK02N+Y培地を1 mL/well加える。
9. セルスクレーパーで細胞を剥がす。
  - \* ウェル底面を軽く撫でるようにスクレージングする。TrypLE™ Selectが十分に反応している場合、ほとんど力を入れずに抵抗感なく細胞を剥離することができる。
10. 位相差顕微鏡で細胞が剥がれているか確認する。
11. 10回ピペティングを行い新しいチューブに回収する。  
(培地を加えて総量を1.5mLにする。総量は適宜変更可能。)
12. セルカウントを行う。
13. 必要細胞懸濁液量 (ロスが多いため作製ストック数 + α分の細胞をチューブに分注してその後の操作を行う。) をチューブに移し、800 rpm, 22°C, 5 min遠心を行う。
14. 上清を除き、ペレットをタッピングで崩す。
15.  $1 \times 10^6$  cells/mLとなるようにSTEM-CELLBANKER®で広口チップを用いて懸濁する。
16. 200  $\mu$ L (=  $2 \times 10^5$  cells)を1本のクライオチューブに広口チップを用いて分注する。
17. プログラムフリーザーもしくは細胞凍結容器 (-1°C/min) にて凍結を行う。
18. 数日中に液体窒素に移して保存する。

#### 【参考・参照文献】

- 1) Takahashi K, et al. *Cell*, 2007 Nov.30; 131(5): 861-72.

- 2) Nakagawa M, et al. *Scientific Reports* 4: 3594 (2014)
- 3) 京都大学 iPS 研究所 (CiRA) HP : 「フィーダーフリーでのヒト iPS 細胞の樹立および維持培養」  
[http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/images/protocol/pdf/hipsprotocolFf\\_140311.pdf](http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/images/protocol/pdf/hipsprotocolFf_140311.pdf)