

凍結ヒト iPS 細胞の解凍の手順

	手順	時間
準備するもの	液体窒素 25cm ² フラスコ (Corning #430639) ① 0.1%ゼラチン溶液(ミリポア Embryomax #ES-006-B) MEF 用培地 15ml 用遠心チューブ 50ml 用遠心チューブ 37°Cウォーターバス マイトマイシン処理済み C57/BL6 mouse embryonic fibroblast (MEF) (液体窒素保存) ②	
準備	25cm ² フラスコに 0.1%ゼラチン溶液を 3ml ずつ入れる。	
	37°Cインキュベーターに静置 (室温の場合、2時間以上)。	30 min
	MEF 用培地を作成③。	
	ゼラチン液を吸引。PBS にて洗浄。 各フラスコに MEF 用培地を 4ml ずつ入れる。	
	15ml チューブに MEF 培地を 9ml 入れる。	
	液体窒素に入れたまま凍結 MEF バイアルをクリーンベンチ近くに持ってくる。	
	バイアルの蓋をクリーンベンチ内で開けてバイアルの N ₂ を抜く。	
	37°Cウォーターバスに入れ、半分ぐらい溶解状態でクリーンベンチ内へ移動し、MEF 培地でピペッティングしながらすばやく溶解。	
	MEF 浮遊液を 15ml チューブに入れる。	
	1000rpm 遠心	3min
	新しい MEF 用培地に MEF を浮遊させる。	
	MEF 細胞浮遊液を 1ml ずつ各フラスコに入れる。	
MEF を CO ₂ インキュベーターに入れて、培養。	24hr	
MEF 用培地から ES 用培地 (FGF-2 なし) に交換し、培養④。	24hr	
準備するもの	15ml 用遠心チューブ 50ml 用遠心チューブ 37°Cウォーターバス ヒト iPS 細胞用培地 ヒトリコンビナント FGF-2 (Sigma F0291) ヒト iPS 細胞凍結バイアル (液体窒素保存)	
細胞解凍	ヒト iPS 用培地 16ml を 50ml 用遠心管に分取する。	
	そのうち、ヒト iPS 用培地 9ml を 15ml 用遠心管に入れ、37°Cウォーターバスで暖めておく。	
	残りの 7ml ヒト iPS 用培地に FGF-2 (10ng/ml) を添加して、クリーンベンチ内に置く。	
	液体窒素に入れたまま凍結ヒト iPS 細胞のバイアルをクリーンベンチ近くに持ってくる。	
	37°Cウォーターバスで暖めてある 15ml 用遠心管に入ったヒト iPS 用培地をクリーンベンチに持ってくる。	

	ピンセットで凍結バイアルを液体窒素から取り出し、クリーンベンチ内に入れて蓋を開け、暖かい培地を入れてピペッティングを行って、素早く解凍させる。	
	解凍させた細胞をすばやく 15ml 用遠心管に回収する。	
	700rpm (90G)にて遠心する。	2min
	上清を吸引	
	FGF-2 の入ったヒト iPS 用培地 7ml を加える。	
	MEF が播種してあるフラスコの培地を吸引。	
	ヒト iPS 細胞浮遊液 7ml をフラスコ 1 つに播種。	
	顕微鏡でコロニーの分散状態を確認。	
	CO ₂ インキュベーターに入れて培養。	24hr
	細胞観察 (できるだけ揺らさないようにする) ⑤	
	CO ₂ インキュベーターに入れて培養。	24hr
培 地 交 換	培地交換に必要なヒト iPS 用培地をチューブに分取し、FGF-2 を入れる。	
	37°C ウォーターバスで培地を温める⑥。	5min
	細胞の状態を顕微鏡でチェック。	
	温めた培地を取り出す。	
	フラスコの培地を吸引。	
	温めた培地を入れる。	
	細胞の状態をチェック。	
	CO ₂ インキュベーターに入れて、培養。	
	基本的に毎日培地交換を行う⑦。	

① メーカーによって細胞の生着率や継代時のディスパーゼの処理時間なども変わってくる。BD、スミロンは、Corning とほぼ同等。

② 成育医療センター樹立 iPS 細胞は、C57/BL6 マウスの MEF を使用して樹立されている。市販のものでは、マイトマイシン C 処理済み Hygro Resistant Strain C57/BL6 (ミリポア) が使用可能であることを確認している。MEF バイアル 1 本を 30 枚の 25cm² フラスコに播種している。ただし、ロット差があるため、新しいロットの際には、密度を変えて播種してチェックする必要がある。

③ high glucose, L-glutamine、10% 牛胎児血清 (ES グレード) 含有 DMEM

④ MEF は播種してから 24 時間後では十分に広がっていないため、2 日後以降に使用する方が望ましい。継代する前に、事前にヒト ES 用培地に交換をしておき、MEF をヒト ES 培地になじませておくとよい。

⑤ 生着には時間がかかる場合もあるので、48 時間はできるだけ静置しておくのが望ましい。そのため培地を 7ml にしている。

⑥ ヒト iPS 細胞培地は、必要以上に 37°C ウォーターバスに放置しないこと。

⑦ 平日は毎日培地交換を行うが、週末は土曜日か日曜日のどちらか 1 回のみになっている。ただし、その場合、コンフルエントでない状態にしておく必要がある。