

JCRB 細胞バンク 20090402

ヒト iPS 細胞の継代の手順

	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℃ 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 2ml ずつ入れる。	
	37℃インキュベーターに静置。	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。	
	N ₂ に入れたまま MEF 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℃ウォーターバスに入れて溶解. 半分以上凍った状態でクリーンベンチ内へ移動する. MEF 培地でピペッティングしながら溶解。	できるだけ短い時間で行う。
	MEF 浮遊液を 15ml チューブに入れる。	
	1000rpm 遠心	2 min
	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。	24 h
	MEF 用培地から ES 用培地(FGF-2 なし)に交換し、培養 ^④ 。	24 h
継代	培地を吸引。	
	1unit/ml Dispase (Roche/ 解凍後 3 日以内に使用)を 1ml 入れる ^⑤ 。	
	37℃・CO ₂ インキュベーターに入れてインキュベーション。	3~10 min ⑥
	Dispase を吸引。	
	hES 培地 10ml を入れて、10ml ピペットをつけたピペットエイド (強にする) で培地を吹きかけるようにしてコロニーをはがす (できるだけ回数を少なくする。2 回程度のピペッティングでコロニーがはがれないような場合は、セルスクレーパーを使用してコロニーをはがす)。	
	顕微鏡でコロニーの分散状態を確認する。	
	15ml チューブに細胞浮遊液を入れて、300rpm にて遠心 (大きいコロニーのみを回収する) 。	2 min
	新しい hES 培地を入れて細胞浮遊液とする (ピペッティングはしない)。	
	MEF の培地を吸引。	
	各フラスコに細胞浮遊液を入れる (Slit の割合は株による)	
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。	24h	

JCRB 細胞バンク 20090402

培 地 交 換	接着率が悪い株の場合、翌日の培地交換は行わない場合もある	(24h)
	培地交換に必要な hES 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。	5 min
	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。当バンクではコーニングを使用している。
- 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-gluthaminem、15%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ことよい。
- ⑤ Dispase の活性は解凍後 3 日以後は急激に低下する。細胞分散の処理時間を一定にするためには、用事解凍して使用するのが望ましい。また、提示されている酵素活性が同様であっても、会社によって微妙にその活性は異なる。当セルバンクでは Roch・Dispase 1unit/ml で使用できることは確認している。MEF のロットによって、Dispase 1unit/ml x 1 m l では、細胞がはがれてこない場合もあり、その場合には 2 m l に増やして時間は 1 0 分以上は作用させないようにする。
- ⑥ Dispase に対する感受性は株によって異なる。新しいロットのディスパーゼあるいは新しい細胞株の場合には、まず、3 分 37°C で処理して顕微鏡でコロニーの状態を確認する。ES、iPS 細胞のコロニーのエッジが光って、少しだけ丸くカールしていたら、すぐにディスパーゼを除く。コロニーが巻きあがるようにカールしている場合には処理時間が長すぎる。その場合、簡単に揺らしただけでコロニーがはがれてしまう可能性があるため、ディスパーゼは吸引せずに、培地を加えて遠心してディスパーゼを除く。2～3 回培地で洗った方が生着率が良い。
- 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 回のみに行っている。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。