

---

## ヒト iPS/ES 細胞用凍結保存液 「CP-5E」 プロトコル集

---

### 【プロトコル一覧】

1. 一般的な細胞株の凍結保存・解凍方法
2. フィーダレスシングルセルフラット培養したヒト iPS 細胞の凍結保存・解凍方法
3. オンフィーダー培養したヒト iPS 細胞の凍結保存・解凍方法

### 【プロトコル】

#### 1. 一般的な細胞株の凍結保存・解凍方法

※ 対数増殖期にある細胞で凍結保存を行うことを推奨します。

##### ■ 凍結保存

1. 培養中の細胞数を計数する。
2. 遠心（ $190 \times g$ , 5分, 室温）後、上清を除去する。
3. 凍結する細胞に応じて適切な細胞密度になるように CP-5E を加える。（通常は  $1 \times 10^6$  cells/mL 程度）
4. ピペッティングにて均一に懸濁する。
5. 1 mL ずつ凍結用バイアルに分注する。
6. 凍結処理容器（例：BICELL）に入れ、 $-80^\circ\text{C}$ のディープフリーザーで緩慢凍結する。
7. 24 時間経過後、凍結用バイアルを液体窒素または $-150^\circ\text{C}$ ディープフリーザーへ移す。

##### ■ 解凍（1 バイアルを処理する場合）

1. 凍結していたバイアルを  $37^\circ\text{C}$ の温浴で解凍する。
2. 8 割程度まで溶けたら全量を、培地 9 mL を入れた 15 mL 遠心管へ加える。
3. 遠心（ $190 \times g$ , 5分, 室温）後、上清を除去する。
4. 適量の培地を加え懸濁し、細胞数を計数する。
5. 常法にて細胞を培養容器に播種し培養する。

## 2. フィーダーレスシングルセルフラット培養したヒト iPS 細胞の凍結保存・解凍方法

※ 対数増殖期にある細胞で凍結保存を行うことを推奨します。

### 注意点

- ・翌日の初期接着率は、細胞株や培地、ECM 処理などの条件によって異なります。ご自身の培養環境における条件設定を行ってからご使用ください。
- ・凍結前の培養条件がクランプ培養であっても、シングルセル状態にすることで凍結保存が可能です。また、解凍の際にシングルセルフラット状態で培養することが可能です。

### ■ 凍結保存 (6 ウェルプレート 1 ウェルを処理する場合)

1. 培地を吸引除去し、PBS (-) 2 mL で洗浄する。
2. あらかじめ 37°C に温めた Pronase/EDTA for Stem を 1 mL 加える。
3. インキュベーター内で 2~5 分間静置し、細胞を剥離・分散する。
4. 培地を加え、ピペティングにて細胞をシングル化し、細胞数を計数する。
5. 細胞懸濁液を遠心チューブに回収し、遠心 (400 × g, 3 分, 4°C) 後、上清を除去する。
6. あらかじめ氷冷した CP-5E を加えて、 $2 \times 10^6$  cells 以上/mL になるように均一に懸濁する。
7. 0.5 mL ずつ凍結用バイアルに分注する。
8. 凍結処理容器 (例: BICELL) に入れ、-80°C で緩慢凍結する。
9. 24 時間経過後、液体窒素または -150°C ディープフリーザーへ移す。

### ■ 解凍 (1 バイアルを処理する場合)

1. あらかじめ ECM コートした 6-well プレートを準備する。
2. 培地 5 mL を遠心チューブに分注し、室温に戻す。
3. 凍結していたバイアルを 37°C の温浴で解凍する。
4. 8 割程度溶けたら解凍全量を培地 5 mL へ加え、遠心 (400 × g, 3 分, 4°C) する。
5. 上清を除去し、ROCK 阻害剤添加培地を加えて再懸濁する。
6. 細胞数を計数する。
7. あらかじめ ECM コートしたプレートへ  $0.5 \sim 1.0 \times 10^6$  cells/well になるように播種する。  
(最終容量 2 mL/well)
8. 翌日、ROCK 阻害剤非添加の培地に交換し、その後、毎日培地交換を行う。

### 3. オンフィーダー培養したヒト iPS 細胞の凍結保存・解凍方法

※ 対数増殖期にある細胞で凍結保存を行うことを推奨します。

#### ⚠ 注意点

- ・ 本法は SNL フィーダー細胞上で培養したヒト iPS/ES 細胞の凍結保存に最適化されております。
- ・ CP-5E を使用して SNL フィーダー上で培養したヒト iPS/ES 細胞を凍結保存する場合には、Pronase/EDTA for Stem (別売品) を使用して細胞の回収を行ってください。その他の分散液を使用した場合、期待する性能が得られない可能性があります。
- ・ MEF フィーダー細胞上で培養したヒト iPS/ES 細胞を本品で凍結保存する場合には、適切な分散液を選択し、ヒト iPS/ES 細胞の回収を行ってください。
- ・ 翌日の初期接着率は、細胞株や培地、ECM 処理などの条件によって異なります。ご自身の培養環境における条件設定を行ってからご使用ください。

#### ■ 凍結保存 (6 ウェルプレート 1 ウェルを処理する場合)

1. あらかじめ必要量の CP-5E を氷上などで冷やしておく。
2. 細胞の状態を確認し、必要に応じて分化したコロニーを除去する。
3. 培養容器からアスピレーターを用いて培地を除去する。
4. PBS(-) で細胞を緩やかに 1 回洗浄します。
5. 温浴で温めた Pronase/EDTA for Stem を 1 mL/well 添加し、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 2~5 分程度静置する (Point①)。
6. 浮遊してきた SNL フィーダー細胞をアスピレーターで除去する。
7. 新しい培地 1 mL/well を緩やかに添加し、細胞を 1 回洗浄する (Point②)。
8. 新しい培地 2 mL/well を添加し、ピペッティングにてヒト iPS/ES 細胞コロニーを培養容器から剥がす。
9. 細胞を遠心チューブに回収し、細胞数を計数する (Point③)。
10. 遠心 (300 x g, 3 分間, 4°C) 後、上清を除去する。
11.  $4 \times 10^4$  ~ cells/mL になるように、氷上で冷却している CP-5E を添加して均一に懸濁する。
12. 細胞懸濁液を凍結用バイアルへ 500  $\mu$ L ずつ分注する (Point④)。
13. 凍結処理容器 (例: BICELL) に入れ、-80°C のディープフリーザーで緩慢凍結する。
14. 24 時間経過後、凍結用バイアルを液体窒素または -150°C 以下のディープフリーザーに移す。

#### Point!

- ① この処理が長すぎると細胞のロス、生存率の低下などの原因となります。フィーダー細胞の状態やヒト iPS/ES 細胞の株によって剥離のスピードは異なりますので、適宜、確認してください (図 1)。
- ② 洗浄は、PBS(-) ではなく培地で行ってください。コロニーが細分化しているため、ヒト iPS/ES 細胞が剥がれやすくなっています。
- ③ 回収した細胞懸濁液から一部を抜き取り、ピペッティングにてシングルセル化します。その後、トリパンブルー染色法により細胞数を計数してください。
- ④ 液量が多くなると生存率が低下します。

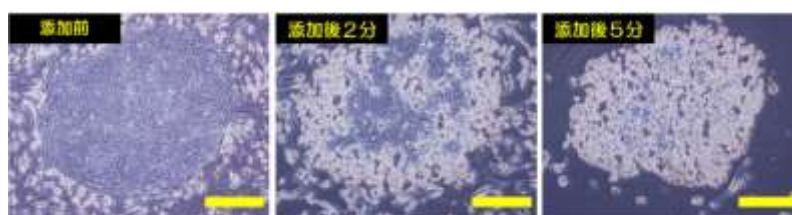


図 1. Pronase/EDTA for Stem 処理による細胞剥離の様子

先に、SNL フィーダー細胞が剥離、浮遊し、続いて時間差でヒト iPS 細胞 (201B7) のコロニーに適度にひびが入る。(Scale bar ; 500  $\mu$ m)

■ 解凍 (1 バイアル(2 x 10<sup>4</sup> cells)を 10 cm ディッシュに播種する場合)

1. 凍結していたバイアルを 37°C 温浴で解凍する。
2. 8 割程度まで溶けたら全量を、培地 5 mL 程度に添加する。
3. 遠心 (300 x g, 3 分間, 4°C) 後、上清をアスピレーターで注意深く除去する。
4. ROCK 阻害剤添加培地を 12 mL 添加し、懸濁する。
5. 10 cm ディッシュへ播種する (注)。
6. 48 時間後、ROCK 阻害剤非添加の培地に交換する。
7. 3 日後以降は、適宜培地を交換する。
8. 適度なサイズのコロニーになるまで 6~10 日程度培養を続ける。

**Point!**

バイアル 1 本 (2 x 10<sup>4</sup> cells) を 10 cm ディッシュに播種した場合、6~10 日程度培養すると適度な密度となります。

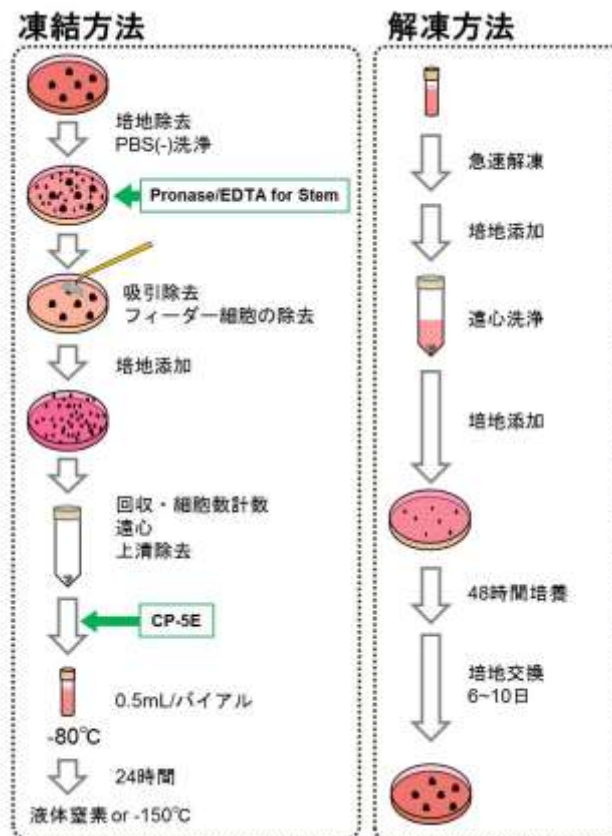


図 2. 操作方法の概略

【問い合わせ先】

極東製薬工業株式会社 営業学術部

〒103-0024 東京都中央区日本橋小舟町 7-8 電話 03-5645-5664 FAX 03-5645-5703