

# Feeder-Free 法によるヒト iPS 細胞の培養方法 プロトコール

作成 : 2021 年 8 月 4 日  
改訂 : 2024 年 1 月 10 日



公益財団法人  
京都大学 iPS 細胞研究財団

Public Interest Incorporated Foundation

**CiRA Foundation**

## 目次

1. iPS 細胞凍結ストックの解凍.....	3
2. 培地交換 .....	5
3. iPS 細胞の継代 (6 ウェルプレートから 6 ウェルプレートへ) .....	6
4. iPS 細胞の凍結 (6 ウェルプレート) .....	9
参考資料.....	11
1) StemFit AK03N 培地の調製.....	11
2) 0.5×TrypLE Select 溶液の調製 .....	11
3) 培養スケールに応じた試薬量、細胞播種数等 .....	12

## iPS 細胞凍結ストックの解凍

### 【準備】

- 細胞 : iPS細胞の凍結バイアル
- 試薬 : iMatrix-511 (Laminin-511 E8) (ニッピ、892012)  
10 mM Y-27632 (富士フィルム和光純薬、036-24023)  
PBS (ナカライテスク、14249-24)  
StemFit (AK03N)培地 (味の素)  
トリパンブルー溶液 (シグマアルドリッチ、T8154)
- 器材 : 6ウェルプレート  
15/50 mL コニカルチューブ  
プラスチックピペット

### 【手順】

#### 1. 培地、試薬の準備

- 1) 作業開始30分前にStemFit培地を室温に置いておく。
- 2) 50 mLチューブに2 mLのStemFit培地を分注する。2  $\mu$ LのY-27632溶液を添加し、よく混ぜる (最終濃度10  $\mu$ M)。→“StemFit+Y培地”

#### 2. 6ウェルプレートのコーティング

- 1) 50 mLチューブにPBSを必要量準備する (1.5 mL $\times$ ウェル数)。
- 2) iMatrix-511溶液を必要量 (9.2  $\mu$ L $\times$ ウェル数) 準備し、1)のPBSに添加する。良く混合し、6ウェルプレート各ウェルに1.5 mLずつ添加する。
- 3) すぐに6ウェルプレートを揺らして全体に行き渡らせた後、37°C、5% CO<sub>2</sub>インキュベーターで1時間以上静置する。
- 4) インキュベーターからコーティング中の6ウェルプレートを取り出す。
- 5) 各ウェルにStemFit培地を0.75 mLずつ添加し、全体に良くなじませた後、除去する。
- 6) コーティングしたウェルに StemFit+Y 培地を 1.5 mL ずつ加える。空いたウェルには PBS を 2 mL ずつ添加する。
- 7) 全ての 6 ウェルプレートをインキュベーターに入れる。

#### 3. 凍結細胞の融解

- 1) 恒温槽を37°C に温めておく。
- 2) 50 mLチューブにStemFit培地を5 mL分注する。

## Feeder-Free 法によるヒト iPS 細胞の培養方法プロトコール

- 3) 液体窒素保存容器からiPS細胞の凍結バイアルを取り出し、恒温槽で氷の塊が少し残る程度まで解凍する（約1分間）。
- 4) StemFit培地を分注した50 mLチューブに、ステップ3) で融解した細胞懸濁液を添加する。遠心し（ $160 \times g$ 、 $23^{\circ}\text{C}$ 、5 min）、上清を取り除く。
- 5) 0.3 mLのStemFit+Y培地を加え、ピペッティング（6回）により細胞を懸濁する。
- 6) 細胞懸濁液10  $\mu\text{L}$ にトリパンブルー溶液10  $\mu\text{L}$ を加えて混合し、セルカウントを行う。コーティングした6 ウェルプレート1 ウェル に65,000 個の生細胞を播種する。すぐにプレートを揺らし、細胞を均一に広げる。顕微鏡で細胞を確認する。
- 7)  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ インキュベーターで培養する。

## 培地交換

※培地から Y-27632を除くため、細胞融解後や細胞継代後の翌日には必ず培地交換を行う。

### 【準備】

- 細胞 : 細胞を播種した6ウェルプレート
- 試薬 : StemFit (AK03N)培地 (味の素)
- 器材 : プラスチックピペット

### 【手順】

- 1) 作業の30分前にStemFit培地を室温に戻しておく。
- 2) 顕微鏡で細胞の状態を確認し（細胞生着、iPS細胞様コロニーの有無）、必要に応じて写真を撮る。
- 3) 培地を除去し、StemFit培地を1ウェルあたり3 mL、静かに添加する（ウェルの壁を伝わらせるように）。
- 4) 37°C、5% CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養する。

※培地交換の目安；

6日目に継代する場合：Day1（細胞播種後1日目）、Day4、Day5

7日目に継代する場合：Day1、Day4、Day6

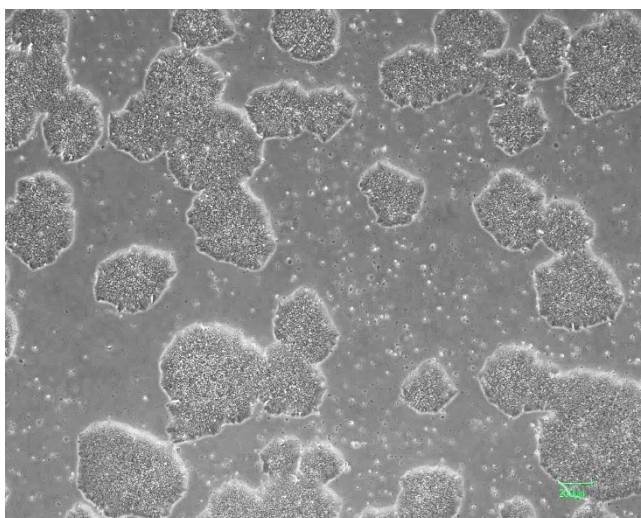
## iPS 細胞の継代（6 ウェルプレートから 6 ウェルプレートへ）

### 【準備】

□ 細胞 : iPS細胞を播種した6ウェルプレート※

※コロニーが大きくなり始めており、かつ大きくなりすぎしていない状態を見計らって継代を行う。財団では、通常、培養 6、7 日目に継代を行っている。

細胞状態の目安



(Scale bar; 200  $\mu$ m)

- 試薬 : iMatrix-511 (Laminin-511 E8) (ニッピ、892012)  
10 mM Y-27632 (富士フィルム和光純薬、036-24023)  
PBS (ナカライテスク、14249-24)  
0.5×TrypLE Select溶液  
StemFit (AK03N)培地 (味の素)  
トリパンブルー溶液 (シグマアルドリッチ、T8154)
- 器材 : 6ウェルプレート  
15/50 mL コニカルチューブ  
プラスチックピペット  
セルスクレーパー

### 【手順】

#### 1. 培地、試薬の準備

- 1) 作業開始30分前にStemFit培地を室温に置いておく。

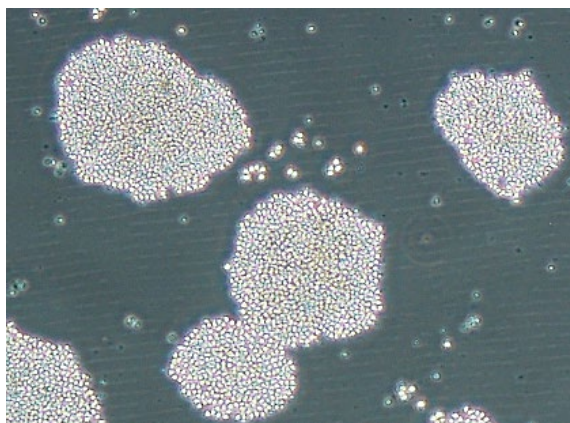
- 2) 50 mLチューブに2 mLのStemFit培地を分注する。2  $\mu$ LのY-27632溶液を添加し、よく混ぜる（最終濃度10  $\mu$ M）。→「StemFit+Y培地」

## 2. 6ウェルプレートのコーティング

- 1) 50 mLチューブにPBSを必要量（1.5 mL $\times$ ウェル数）準備する。
- 2) iMatrix-511溶液を必要量（9.2  $\mu$ L $\times$ ウェル数）準備し、PBSに添加する。良く混合し、各ウェルに1.5 mLずつ添加する。
- 3) すぐにプレートを揺らして全体に行き渡らせた後、37°C、5% CO<sub>2</sub>インキュベーターで1時間以上静置する。
- 4) インキュベーターからコーティング中のプレートを取出す。
- 5) 各ウェルにStemFit培地を0.75 mLずつ添加し、全体に行き渡らせた後、除去する。
- 6) コーティングしたウェルにStemFit+Y培地を1.5 mLずつ加える。空きウェルにはPBSを2 mLずつ添加する。
- 7) プレートをインキュベーターに入れる。

## 3. 継代

- 1) 顕微鏡で細胞の状態を確認し（細胞生着の様子、iPS細胞様コロニーの有無）、必要に応じて写真を撮る。
- 2) 培地を除去し、PBSを1 mL加える。プレートを揺らしながら細胞全体を洗浄したのち、PBSを除去する。
- 3) 0.5 $\times$ TrypLE Select溶液を1 mL加え、プレートを揺らし、全体に行き渡らせる。
- 4) 37°C、5% CO<sub>2</sub>インキュベーターで最長10分間反応させる。
- 5) インキュベーターからプレートを取出し、顕微鏡下で観察する（細胞間接着が緩んで個々の細胞が認識できるかどうかを確認する）。



- 6) 0.5 $\times$ TrypLE Select溶液を除去する。2 mLのPBSを静かに加え、プレートを揺らしながら細胞全体を洗浄した後、PBSを除去する。
- 7) 新しいStemFitを1 mL加えた後、セルスクレーパーで細胞を剥がす<sup>(注1)</sup>。

(複数のクローンまたは株をまとめて継代する場合、先に全ての細胞をスクレーパーで剥がしてから次に進む)

- 8) ピペッティング (10 回程度) で細胞をばらばらにし、新しいコニカルチューブに回収する。。
- 9) 細胞懸濁液10  $\mu$ Lにトリパンブルー溶液10  $\mu$ Lを加えて混合し、セルカウントを行う。  
コーティングした6ウェルプレート1ウェルに13,000個の生細胞を播種する。  
全量播種の場合は、細胞懸濁液に1/1000量のY-27632を添加する。
- 10) すぐにプレートを揺らし、細胞を均一に広げる。
- 11) 顕微鏡で各ウェルの細胞を確認する。37°C、5% CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養する。
- 12) 継代翌日、培地交換を行う (「2. 培地交換」を参照) 。

---

注1: 当財団内の検証では、StemFit培地の代わりにPBSを添加し、ピペッティングで細胞を剥離して回収する方法でも、細胞生存率・増殖率、未分化マーカー (OCT3/4) の発現量において差がない結果を得ている。

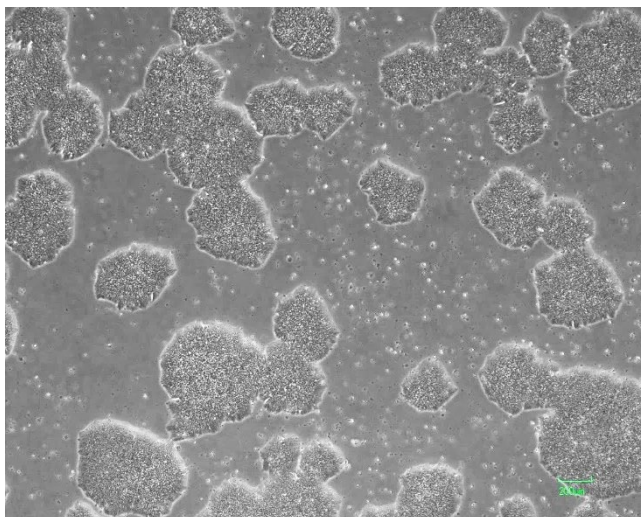


## iPS 細胞の凍結（6 ウェルプレート）

### 【準備】

- 細胞 : iPS細胞を播種した6ウェルプレート

細胞状態の目安



(Scale bar; 200  $\mu$ m)

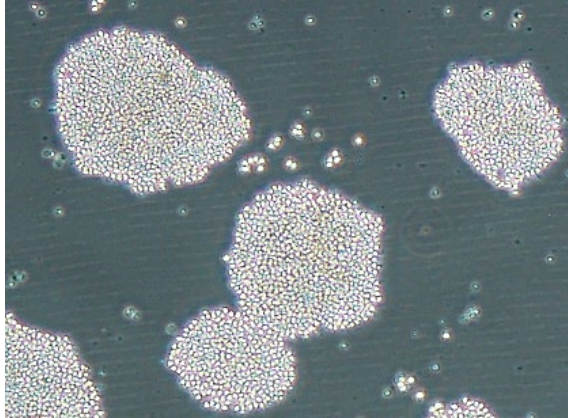
### <試薬>

- 試薬 : StemFit AK03N (味の素)  
STEM-CELLBANKER (日本全薬工業、CB045/047)  
PBS (ナカライテスク、14249-24)  
0.5×TrypLE Select溶液
- 器材 : クライオチューブ (1.0 mL)  
プラスチックピペット  
セルスクレーパー  
バイセル (日本フリーザー、BICELL)

### 【手順】

- 1) 顕微鏡で細胞の状態を確認し（細胞生着の様子、iPS細胞様コロニーの有無など）、必要に応じて写真を撮影する。
- 2) 培地を除去し、PBSを1 mL加える。揺らしながら細胞全体を洗浄した後、PBSを除去する。
- 3) 0.5×TrypLE Select溶液を1 mL加え、細胞全体を覆うように6ウェルプレートを揺らす。
- 4) 37°C、5% CO<sub>2</sub>インキュベーターで最長10分間反応させる。
- 5) インキュベーターから6ウェルプレートを取り出し、顕微鏡下で観察する（細胞間接着が緩んで個々

の細胞が認識できるかどうかを確認する)。



- 6) 0.5×TrypLE Select溶液を除去した後、PBSを2 mL静かに加え、プレートを揺らしながら細胞全体を洗浄する。添加したPBSを除去する。
- 7) 新しいStemFit を1 mL加えた後、セルスクレーパーで細胞を剥がす<sup>(注1)</sup>。  
(複数のクローンまたは株をまとめて継代する場合、先に全ての細胞をスクレーパーで剥がしてから次に進む)
- 8) ピペティング (10 回程度) で細胞をばらばらにし、新しいチューブに回収する。
- 9) 細胞懸濁液を50 mLチューブに移す。(全てのウェルの懸濁液を1本のチューブにまとめる)
- 10) 細胞懸濁液をピペティング (6回) で混合し、液量をピペットのメモリで測る。
- 11) 細胞懸濁液10 μLにトリパンブルー溶液10 μLを加えて混合し、セルカウントを行う。
- 12) 凍結する本数を確認し、必要な生細胞数を確認する (ストック本数× $2.4 \times 10^5$  cells)。
- 13) 適切な容量の新しいチューブを準備し、細胞懸濁液の入ったチューブからストックに必要な生細胞数に相当する細胞懸濁液を分取する。
- 14) 遠心を行う。(160×g、23℃、5分間) 遠心中に新しいクライオチューブを必要本数準備する。
- 15) 遠心終了後、上清を除去する。
- 16) ペレットをやさしくタッピングで崩し、STEM-CELLBANKERを $1.2 \times 10^6$  cells/mLの濃度になるように加え、泡が生じないよう気をつけながらピペティング (8回) で懸濁する。
- 17) 細胞懸濁液をクライオチューブに200 μLずつ分注する。分注後、予め冷却したバイセルにクライオチューブを入れて-80℃で凍結する。
- 18) 数日中に液体窒素タンクに移して保存する。

---

注1: 当財団内の検証では、StemFit培地の代わりにPBSを添加し、ピペティングで細胞を剥離して回収する方法でも、細胞生存率・増殖率、未分化マーカー (OCT3/4) の発現量において差がない結果を得ている。

## 参考資料

### StemFit (AK03N)培地の調製

#### 【準備】

- 試薬 :       StemFit AK03N A液 400 mL (4°C 保存)  
                  StemFit AK03N B液 100 mL (-30°C 保存)  
                  StemFit AK03N C液 2 mL (-30°C 保存)  
                  (B液とC液を4°Cまたは室温で溶解する(8時間以上~o/n))
- 器材 :       デイスポーザブルピペット

#### 【手順】

- 1) B液をピペッティングで混合し、100 mLをA液のボトルへ添加する。
- 2) C液2 mLをA液のボトルへ添加する。
- 3) A液の蓋をしっかりと閉めてよく混合する。
- 4) 50 mL チューブまたはボトルに混合液を分注する。
- 5) 4°Cもしくは-80°Cで保管する。

### 0.5×TrypLE Select 溶液 (0.5 mM EDTA/PBS 最終濃度0.75 mM) の調製

#### 【準備】

- 試薬 :       Cell Therapy Systems TrypLE Select CTS (Thermo Fisher Scientific, A12859)  
                  0.5 mmol/L-EDTA/PBS溶液 (ナカライテスク、13567-84)
- 器材 :       デイスポーザブルピペット  
                  250 mLストレージボトル

#### 【手順】

- 1) TrypLE Select 90 mLを250 mLストレージボトルに分注する。
- 2) 0.5 mM EDTA/PBS溶液90 mLを、1)のストレージボトルに添加し、ピペッティング (5回程度) で混合する。
- 3) ボトルの蓋を閉めて良く混ぜる。

※使用期限は室温保管で6か月とする (試薬の期限が6か月未満の場合はその期限に合わせる) 。

## 培養スケールに応じた試薬量、細胞播種数等

表1. コーティングで使用するラミニン量 (iMatrix-511MG; 0.5mg/mL) 及び培地量

Scale	培養面積	ラミニン量 (iMatrix-511)	PBS 量	プレートまたはディッシュへの StemFit+Y 培地 添加量
6 ウェルプレート※	9.2 cm <sup>2</sup>	9.2 μL	1.5 mL	1.5 mL
90 mm ディッシュ	57 cm <sup>2</sup>	57 μL	9.3 mL	9 mL

※1 ウェルあたり

表2. 細胞継代時の試薬量

Scale	0.5× TrypLE Select 量	PBS 添加量 (TrypLE 処理後)	StemFit 添加量 (細胞剥離時)
6 ウェルプレート※	1 mL	2 mL	1 mL
90 mm ディッシュ	3 mL	10 mL	5 mL

※1 ウェルあたり

表3. 細胞継代時の細胞播種数

Scale	細胞播種数
6 ウェルプレート※	1.3×10 <sup>4</sup> cells
90 mm ディッシュ	8×10 <sup>4</sup> cells

※1 ウェルあたり

作成： 公益財団法人 京都大学iPS細胞研究財団  
細胞調製施設 FiT

参考文献：

1. A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells  
M. Nakagawa et al., *Scientific Reports*, 4:3594 (2014) DOI: 10.1038/srep03594
2. An Efficient Non-viral Method to Generate Integration-Free Human iPS Cells from Cord Blood and Peripheral Blood Cells  
K. Okita et al., *Stem Cells*, 31(3):458-66 (2013) DOI: 10.1002/stem.1293