

# 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



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-well プレートから 6-well プレートへ) .....	6
4. iPS 細胞の凍結 (6-well 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

## 1. 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、892001/892002)  
10 mM Y-27632 (和光純薬工業、253-00511)  
PBS (ナカライテスク、14249-24)  
StemFit AK03N (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 well プレート  
15/50 mL チューブ  
ピペット

### 【手順】

- 1) 培地、試薬の準備
  - 作業開始30分前にStemFit培地を室温に置いておく。
  - 50 mLチューブに2 mLのStemFit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-well 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×well数)。
  - (2) iMatrix-511溶液を必要量準備 (9.2  $\mu$ L×well数) し、PBSに添加する。
  - (3) 良く混合し、各wellに1.5 mLずつ添加する。
  - (4) 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時間以上反応させる。
  - (5) インキュベーターからコーティング中のプレートを取り出す。
  - (6) 各wellにStemFitを0.75 mLずつ添加し、全体に良くなじませた後、除去する。
  - (7) コーティングした well に StemFit+Y 培地を 1.5 mL ずつ加える。空き well には PBS を 2 mL ずつ添加する。
  - (8) 全ての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を5 mL分注する。
- (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、約1分間解凍する。
- (4) StemFit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。
- (5) 遠心し(860 rpm (160 × g)、23°C、5 min)、上清を取り除く。
- (6) 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。
- (7) 細胞懸濁液10 μLにトリパンプルー溶液10 μLを加えて混合し、セルカウントを行う。
- (8) コーティングした6-well プレート1well 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。
- (9) 顕微鏡で細胞を確認する。
- (10) 37°C、5% CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養する。

## 2. 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-well プレート
- 試薬 : StemFit AK03N (味の素)
- 器材 : 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1wellあたり3 mL、静かに添加する(well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

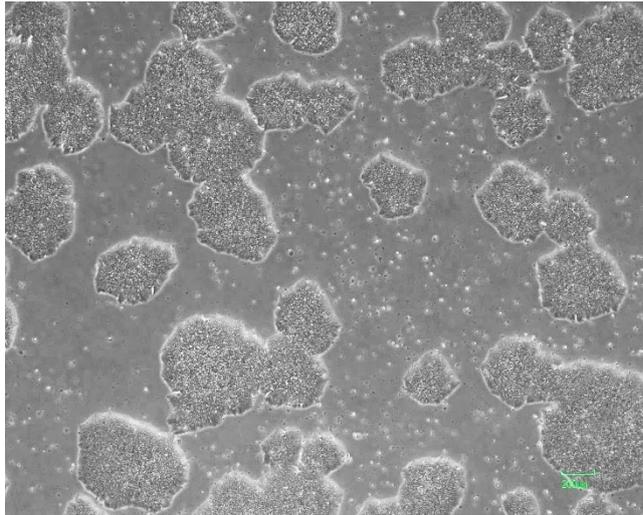
7日目に継代する場合; Day1、Day4、Day6

### 3. iPS 細胞の継代(6-well プレートから 6-well プレートへ)

#### 【準備】

- 細胞 : 細胞を播種した6-well プレート

#### 細胞状態の目安



(Scale bar; 200  $\mu$ m)

- 試薬 : iMatrix-511 (Laminin-511 E8) (ニッピ、892001/892002)  
10 mM Y-27632 (和光純薬工業、253-00511)  
PBS(ナカライテスク、14249-24)  
0.5 $\times$  TrypLE Select溶液  
StemFit AK03N (味の素)  
トリパンプルー溶液 (シグマアルドリッチ、T8154)
- 器材 : 6-well プレート  
15/50 mL コニカルチューブ  
ピペット  
セルスクレーパー

#### 【手順】

##### 1) 培地、試薬の準備

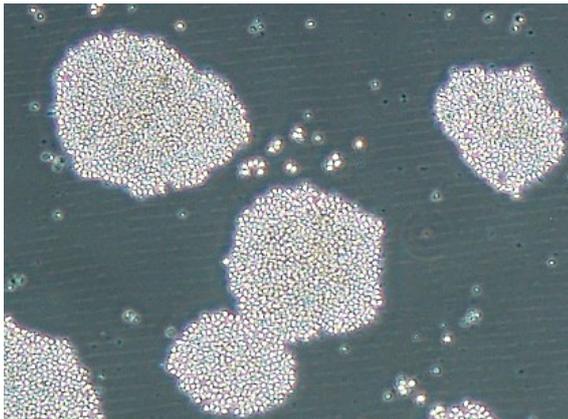
- (1) 作業開始30分前にStemFit培地を室温に置いておく。
- (2) 50 mLチューブに2 mLのStemFitを分注する。2  $\mu$ LのY-27632溶液を添加し、よく混ぜる (最終濃度10  $\mu$ M)。→「StemFit+Y培地」

2) 6-well 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×well数)。
- (2) iMatrix-511溶液を必要量準備 (9.2  $\mu$ L×well数) し、PBSに添加する。  
良く混合し、各well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り出す。
- (5) 各wellにStemFit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wellにStemFit+Y培地を1.5 mLずつ加える。空きwell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、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×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溶液を除去する。
- (7) 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。
- (8) 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)

- (9) ピペッティング(10 回)で細胞をばらばらにし、新しいチューブに回収する
- (10) 細胞懸濁液10  $\mu$ Lにトリパンプルー溶液10  $\mu$ Lを加えて混合し、セルカウントを行う。
- (11) コーティングした6-wellプレート1wellに13,000個の生細胞を播種する。
- (12) すぐにプレートを揺らし、細胞を均一に広げる。
- (13) 顕微鏡で各wellの細胞を確認する。
- (14) 37°C、5% CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養する。

※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。

継代翌日、培地交換を行う(「2. 培地交換」を参照)。

---

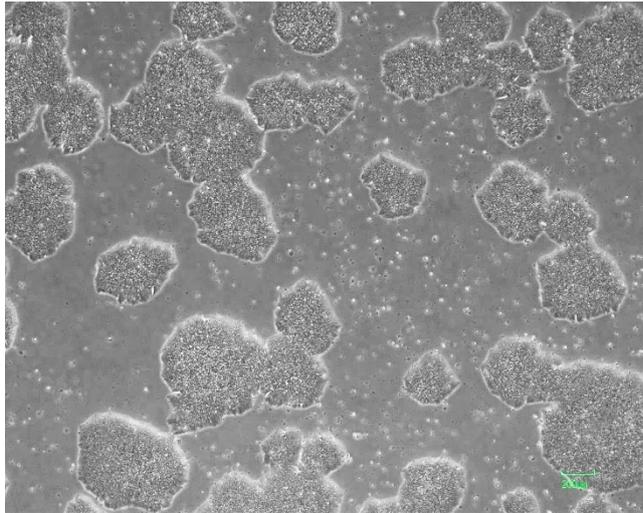
注1: 当財団内の検証では、StemFitの代わりにPBSを添加し、ピペッティングで細胞を剥離して回収する方法でも、細胞生存率・増殖率、未分化マーカー(OCT3/4)の発現量において差がない結果を得ている。

#### 4. iPS 細胞の凍結(6-well プレート)

##### 【準備】

細胞 : 細胞を播種した6-well プレート

細胞状態の目安



(Scale bar; 200  $\mu$ m)

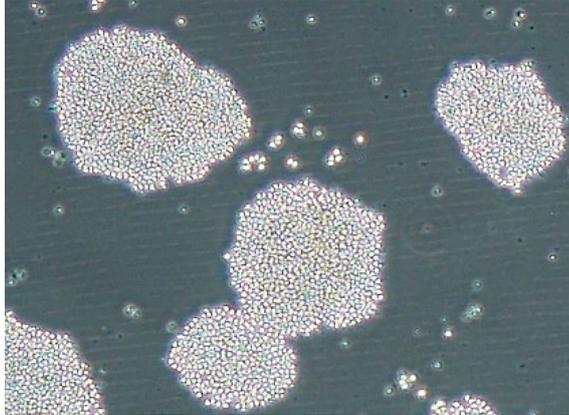
##### <試薬>

- 試薬 : StemFit AK03N (味の素)  
STEM-CELLBANKER (日本全薬工業、CB041/043)  
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 (2.0 mL)  
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、iPS細胞様コロニーの有無)、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-well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-well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。
- (7) 添加したPBSを除去する。
- (8) 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)
- (9) ピペッティング(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。
- (10) 細胞懸濁液を50 mLチューブに移す。  
(全てのwellの懸濁液を1本のチューブにまとめる)
- (11) 細胞懸濁液をピペッティング(6回)で混合し、液量をピペットのメモリで測る。
- (12) 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。
- (13) 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×2.4×10<sup>5</sup> cells)。
- (14) 新しい1.5 mL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生細胞数に相当する細胞懸濁液を分取する。
- (15) 遠心を行う。(860 rpm(160×g)、23°C、5分間)
- (16) 遠心中に新しいクライオチューブを必要本数準備する。
- (17) 遠心終了後、上清を除去する。
- (18) ペレットをタッピングで崩し、STEM-CELLBANKERを1.2×10<sup>6</sup> cells/mLの濃度になるように加え、ピペッティング(8回)で懸濁する。
- (19) 細胞懸濁液をクライオチューブに200 µLずつ分注する。
- (20) 分注後のクライオチューブをあらかじめ冷却したバイセルに入れて-80°Cで凍結する。
- (21) 数日中に液体窒素に移して保存する。

---

注1: 当財団内の検証では、StemFit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。

## 参考資料

### 1) 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 : ディスポーザブルピペット

#### 【手順】

- (1) B液をピPETTING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。

### 2) 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 : ディスポーザブルピペット  
250 mL フィルターシステム(0.2 μm filter)

## 【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（元試薬の期限が6か月未満の場合は元試薬の期限に合わせる）。

- 3) 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-well 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 well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-well プレート※	1 mL	2 mL	1 mL
90 mm ディッシュ	3 mL	10 mL	5 mL

※1 wellあたり

表3. 細胞継代時の細胞播種数

Scale	細胞播種数
6-well プレート※	$1.3 \times 10^4$ cells
90 mm ディッシュ	$8 \times 10^4$ cells

※1 well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