

# hES 細胞継代培養手順

Ver 1.1 : 2019 年 2 月 28 日

京都大学ウイルス・再生医科学研究所  
Institute for Frontier Life and Medical Sciences,  
Kyoto University

## 6well plate からの継代の場合

### 1. 準備

#### 試薬一覧

試薬	メーカー	型番
StemFit	味の素ヘルシーサプライ	AK03N
iMatrix-511MG	ニッピ	892005
Culture Sure 10mmol/L Y-27632	富士フィルム和光純薬	039-24591
細胞培養プレート, 6 ウェル	住友ベークライトなど	MS-80060S
エデト酸ナトリウム水和物 (EDTA-2Na)	関東化学など	11511-08
PBS(-)	細胞科学研究所など	1102P05B
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Sigma など	D2438, D2650, etc

StemFit AK03N→ StemFit AK02N, iMatrix-511MG→ iMatrix-511,他試薬類は同等品に代えても培養自体は可能と思われる。

EDTA は 0.5M pH8.0 水溶液を作製、滅菌してストック溶液とする。

EDTA/PBS 溶液は PBS に EDTA ストック溶液を 1/100 量添加する。final 5mM EDTA

インキュベータは 37°C、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub> を推奨

### 2. 細胞確認

顕微鏡で継代に適した細胞密度であることを確認、必要に応じて画像を保存。

### 3. コーティング

- 1) well あたり 1.5mL の PBS を加え、4.8μL の iMatrix を添加しよく混ぜる。
- 2) 37°C で 1 時間以上インキュベートする。当日使用しない場合はプレートをパラフィルムなどでシールし 4°C で保存。3 日以内に使用すること。

### 4. 継代操作

- 1) 継代する well から培養上清を吸引除去する。
- 2) PBS を 2mL/well で加えてウォッシュし、除去する

- 3) EDTA/PBS 溶液を、1 mL/well で加える。
- 4) そのまま室温で 5～10 分保持する。適宜細胞を顕微鏡で確認すること。
- 5) 15mL 遠沈管に Stemfit を 2mL 入れておく。
- 6) インキュベート終了後、プレートを取り出し細胞が十分に解離していることを確認する(写真参照)。
- 7) EDTA 溶液を吸引除去する。
- 8) Stemfit を 1 mL/well 加える。
- 9) P-1000 を用いて 10 回ピペッティングしてシングルセルとし、5)の遠沈管に回収する。
- 10) Stemfit を 1 mL/well 加える。
- 11) P-1000 を用いて 10 回ピペッティングしてシングルセルとし、遠沈管に回収する。Total 4mL となる。
- 12) 1,000 rpm、4 °Cにて 5 分間遠心する。
- 13) 遠心後、遠沈管の上清を吸引除去する。
- 14) Stemfit 2 mL で細胞を懸濁する。2 mL ピペットを使用すること。  
\*細胞数が多くペレットがほぐれにくい場合は、P-1000 ピペットを使用すること。
- 15) マイクロチューブに細胞数検査用検体を 100  $\mu$ L 分取し、細胞数、生存率を測定する。  
通常、総細胞数は  $1\text{-}3 \times 10^6/\text{well}$ 、生存率は 80%以上である。
- 16) 播種する well 数あたり 2 mL の Stemfit を新しい遠沈管に加える。  
例：4well に播種するなら 8 mL

17) 遠心管に  $0.75 \times 10^5$  cells/mL となるよう細胞懸濁液を加える。

18) 遠沈管に final  $10 \mu\text{M}$  となるよう ROCK Inhibitor を添加する

19) コート済みのディッシュを搬入し、コート液を除去する。

20) 2 mL/well の細胞懸濁液を加える ( $1.5 \times 10^5$  cells/Well となる)。播種したらすぐにプレートを揺すって均一に広げること。

\*接着が早いので、細胞が偏らないように注意。

21) ディッシュをインキュベータに入れ、培養を開始する。

## 5. 継代後

翌日以降、顕微鏡で細胞の状態を確認する。

播種後 2 日および 3 日目に培地を交換する。通常 4 日後に継代可能な状態になる。

継代間隔を長くしたい場合は  $2 \times 10^4$ /well 程度まで播種細胞数を減らすことが可能である。この場合継代間隔は 6-7 日程度になる。

## 6. 細胞凍結法

1) StemFit 9mL に対し DMSO mL を添加し細胞凍結液\*を作製、4°C で保存

2) バイセル\*\*を 4°C で冷却する。

3) 継代操作と同様に細胞を解離する

4) 細胞数を計測し、遠心管を遠心、上清を除く。

5)  $1 \times 10^6$ /mL になるよう\*\*\*細胞凍結液で懸濁する。

6) クライオバイアルに1 mL ずつ分注しフタをしめる。

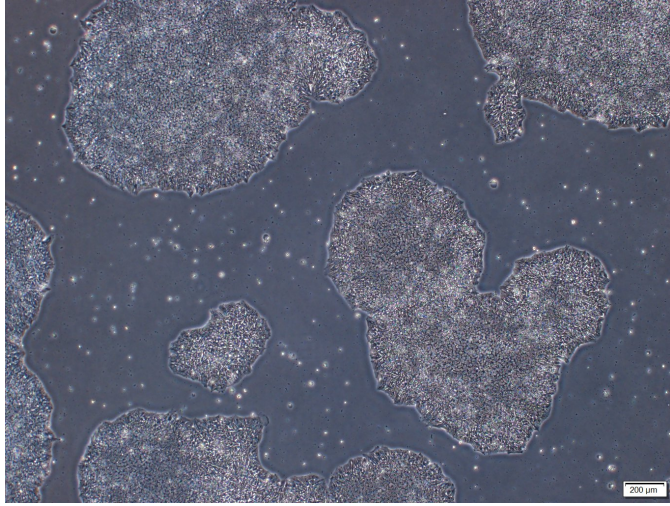
7) バイセルにバイアルを入れ、-80°Cフリーザーに移す

8) 翌日液体窒素タンクにバイアルを移す

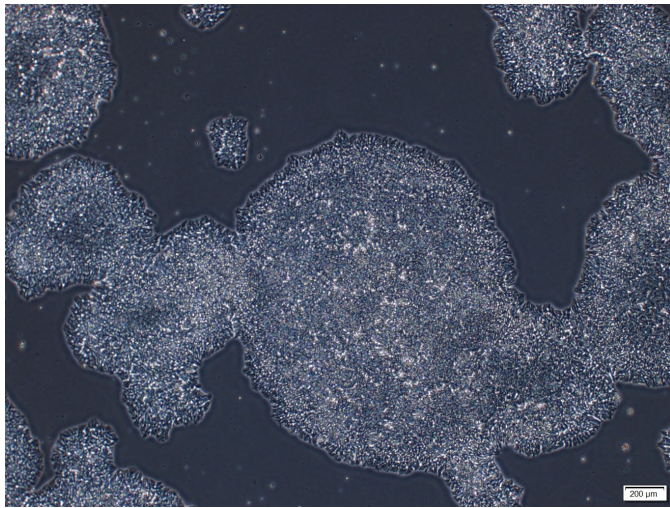
\* 細胞凍結液は用時調製する。バンバンカー、セルバンカーなどでも良いが他の ES/iPS 細胞で予め検討することが望ましい。

\*\* バイセルの他、ミスターフロスティなど類似の容器で可。

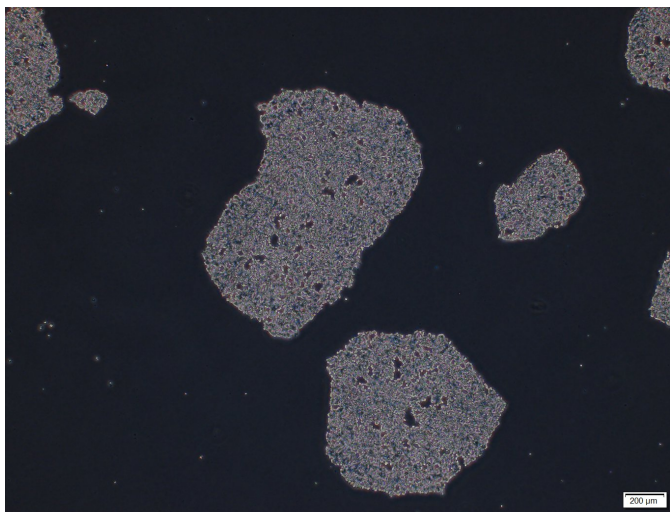
\*\*\*  $3 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$  程度の濃度範囲であれば通常は問題ない。



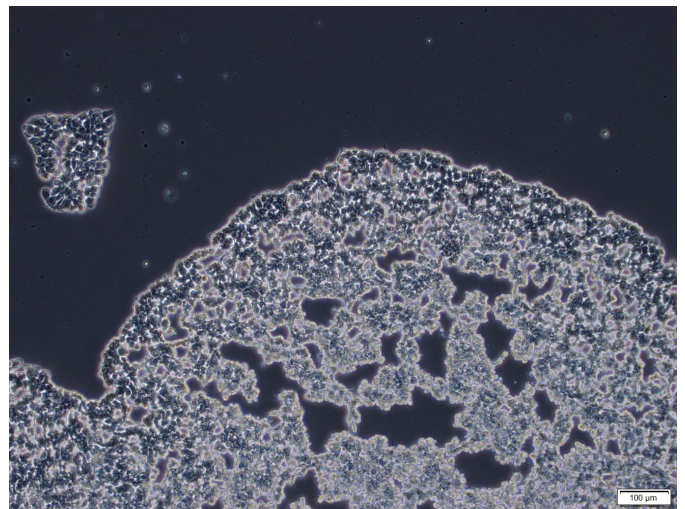
継代前の細胞

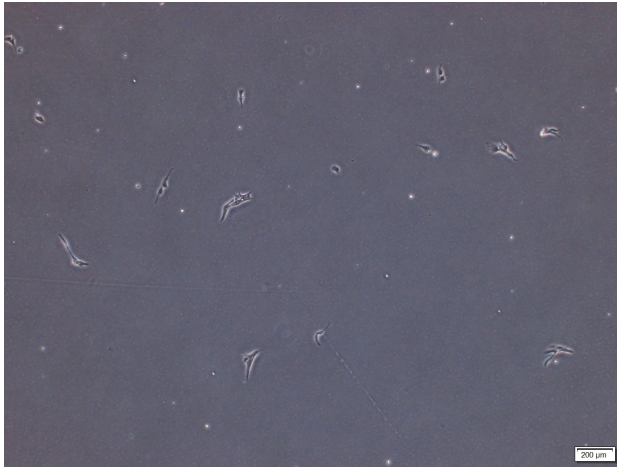


EDTA/PBS 処理約 2 分

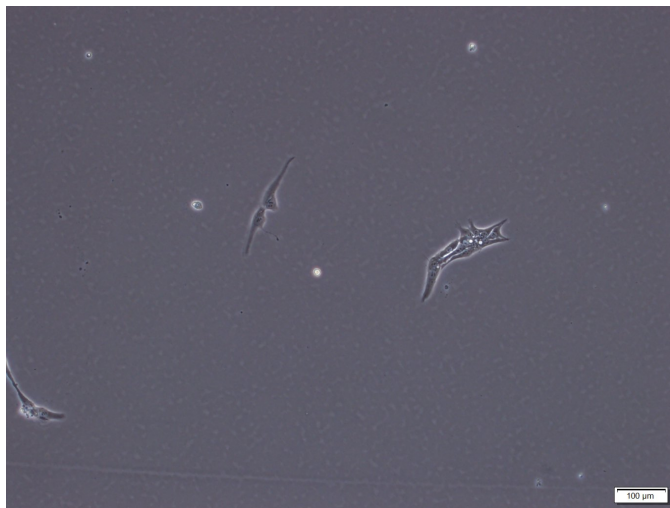


EDTA/PBS 処理約 5 分





継代翌日( $0.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 程度で播種)



数個から 10 個程度の細胞のクラスターが形成されていることが望ましい  
1-2 細胞のクラスターは培地交換後に死ぬ場合も多い。