ヒト iPS 細胞樹立・維持培養
プロトコール集

PBMC 由来フィーダーフリー編

京都大学　iPS 細胞研究所

2019/02/15

目　次

第1章　末梢血単核球からのヒト iPS 細胞の樹立方法 2
1-1. 必要な器具・機器・試薬類 2
1.1.1. 必要な器具および機器 2
1.1.2. 必要な試薬類 2
1.1.3. 試薬の調製 3
1-2. 実験方法 4
1-2-1. バキュテーナーを用いた末梢血からの単核球の分離 4
1-2-2. 末梢血単核球細胞(PBMC)の前培養 4
1-2-3. Electroporation による初期化因子の導入 5
1-2-4. iPS 細胞コロニーのピックアップ 7
第2章　Feeder-free 法による iPS 細胞の維持培養 8
2-1. 必要な器具・機器・試薬類 8
2.1.1. 必要な器具および機器 8
2.1.2. 必要な試薬類 8
2.1.3. 試薬の調製 8
2-2. 実験方法 9
2-2-1. 培養容器のコーティング 9
2-2-2. フィーダーフリーiPS 細胞の継代培養 10
2-2-3. フィーダーフリーiPS 細胞の凍結保存 11
2-2-4. 凍結 iPS 細胞の再培養 12
第3章　その他 14
3-1. iPS 細胞のアルカリフォスファターゼ（ALP）染色 14
3-1-1. 試薬の準備 14
3-1-2. iPS 細胞の固定及び染色 14
3-2. 未分化細胞マーカーSSEA-4 染色 15
3-2-1. 試薬 15
3-2-2. 染色ステップ（容量は容器に応じて適宜変更のこと，基本的には培地と等量） 15
3-3. マイコプラズマの検出 17
付録1. 19
TC20™ 全自動セルカウンター 19
付録2. 20
参考文献 20

第１章　末梢血単核球からのヒト iPS 細胞の樹立方法

本プロトコールは、ヒト末梢血単核球（PBMC）にエピソーマルベクターを用いて初期化因子を導入し、ゲノムへの挿入なく iPS 細胞を作製する手順を示したものである。実験の実施に当たっては、ヒト細胞を扱うため、必要な法規制の順守と感染症対策等を行うことが求められる。

1-1. 必要な器具・機器・試薬類

1.1.1. 必要な器具および機器

- 6-、24-、96- ウェル培養プレート（FALCON社 353046、353047、351172など）
- 15、50 ml チューブ（FALCON社 352196、352070など）
- 2、5、10、25 ml プラスチックピペット(FALCON社 357520、357543、357551、357525など）
- 2.0mlクライオチューブ（Nunc、377267など）
- Pippette aid（FALCON社など ）
- ピペットマン、チップ（GILSON社など）
- 1.5 ml　チューブ（WATSON 社など）
- セルスクレーパー(IWAKI 9000-220など）
- ミスターフロスティ(サーモサイエンティフィック社、5000-0001）
- CO_2 インキュベーター（Thermo社など）
- Nucleofector IIb Device（Lonza社）
- TC20全自動セルカンター（バイオラッド社）
- TC-20全自動セルカンター用カウンティングスライド（バイオラッド社 1450015）
- カメラ付き実体顕微鏡システム（OLYMPUS社など）

1.1.2. 必要な試薬類

- OCT3/4、SOX2、KLF4、L-MYC、LIN28、p53DD、EBNA1 発現用ベクター
  pCE -hOCT3/4 と pCE -hSK、pCE -hUL、pCE -mp53DD、pCXB -EBNA1 の 5 種類を混ぜて使用する。 米国非営利団体 Addgene (http://www.addgene.org/Shinya_Yamanaka) より入手可能。またプラスミド混合物はタカラバイオからも販売されている（製品コード；3673）。
- Phosphate buffered saline Ca, Mg free (PBS; Nacalai tesque 社 14249-95)
- Bovine serum albumin (BSA; ICN 社　810-661)
- BD バキュテイナ CPT クエン酸 Na (ベクトンディッキンソン社 362761)
- BD Pharm Lyse (ベクトンディッキンソン社, 555899)
- Amaxa® Human CD34 Cell Nucleofector® Kit (Lonza 社, VA PA- 1003)
- 0.4% Trypan Blue 溶液（バイオラッド社 1450021）

- STEM-CELL BANKER (日本全薬工業, BLC- 3S)
- Laminin-511 E8(ニッピ社、iMatrix-511;385-07361 など)
- StemFit AK02N (味の素株式会社, AK02N)
- StemSpan ACF (StemCell Technologies 社, ST-09805/09855)
- Recombinant human IL-3 (R&D 社, 203-IL, 50 μg)
- Recombinant human IL-6 (R&D 社, 206-IL, 50 μg)
- Recombinant human TPO (R&D 社, 288-TPN,, 25 μg)
- Recombinant human Flt3/Flk2-Ligand (R&D 社, 308-FK, 25 μg)
- Recombinant human SCF (R&D 社, 255-SC, 50 μg)

1.1.3. 試薬の調製

- IL-3溶液(10 μg/ml)

4.95ml の PBS に 50 μl の 10%BSA 溶液を加えて 0.1%BSA/PBS 溶液を作製する。50 μg の IL-3 を 5ml の 0.1%BSA/PBS 溶液に溶解して、分注して-20℃で保存する。

- IL-6 溶液 (100 μg/ml)

4.95 ml の PBS に 50 μl の 10% BSA 溶液を加えて 0.1% BSA/PBS 溶液を作製する。50 μg の IL-6 を 500μl の 0.1% BSA/PBS 溶液に溶解し、分注して-20° C で保存する。

- TPO 溶液 (300 μg/ml)

25 μg の TPO を 83.3 μl の 4mM HCl 溶液に溶解し、分注して-20° C で保存する。

- Flt3/Flk2-Ligand 溶液 (300 μg/ml)

25 μg の Flt3 -Ligand を 83.3 μl の PBS 溶液に溶解し、分注して-20° C で保存する。

- SCF 溶液 (300 μg/ml)

4.95 ml の PBS に 50 μl の 10% BSA 溶液を加えて 0.1% BSA/PBS 溶液を作製する。50 μg の SCF を 166.6 μl の 0.1% BSA/PBS 溶液に溶解し、分注して-20° C で保存する

- ヒト単核球培養培地

10 ml の StemSpan ACF に IL-6 (100 μg/ml) と SCF (300 μg/ml)、TPO (300 μg/ml)、Flt3/Flk2-ligand (300 μg/ml)、IL-3 (10 μg/ml) を各 10 μl加える。

- StemFit 培地

StemFit AK02N の B 液に、StemFit AK02N の C 液を全量加え、よく攪拌する。さらに B 液と C 液の混合液を、StemFit AK02N 培地の A 液にすべて加えてよく攪拌する。

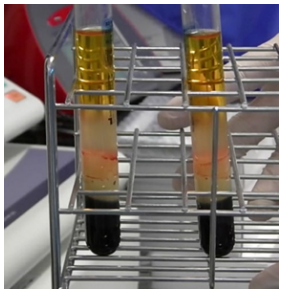
- Y-27632添加StemFit 培地

StemFit 培地に、5～10mM の Y-27632 溶液を適宜加え、最終濃度が 10μM になるよう調製する。

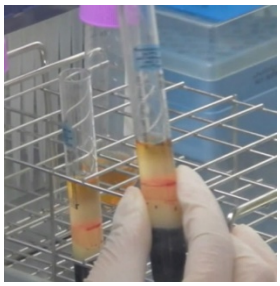
1-2. 実験方法

参考動画:　　「末梢血からの有核細胞画分の分離と前培養」
　　「PBMC からの iPS 細胞の樹立法」

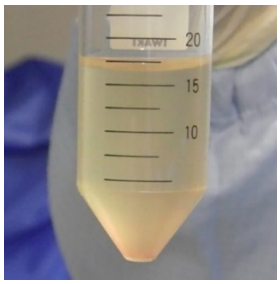
1-2-1. バキュテーナーを用いた末梢血からの単核球の分離



① 培地類を室温に戻しておく(StemSpan ACF、PBS等)。
② 採血を実施する。
③ 採血後、室温で静かに採血管を8-10回転倒混和する。
④ スイング式ローターを用いて、室温、1800xg、20分遠心する(加速→slow、減速→slow)。



⑤ 遠心後、ゲルバリアの上にある細胞層を乱さないようにして血漿層を除去する。P1000で静かに除去する。(多少残ってもよい)
⑥ P1000で単核球の細胞層をゲルバリアぎりぎりまで回収する。
⑦ 回収した細胞懸濁液にPBSを12ml加える。
⑧ 200xg、10分(加速→slow、減速slow)、で遠心する。
⑨ supをアスピレートしてStemSpan ACFを6ml加え，前培養のサンプルとする。



＊ 保存する場合
⑩ total3x10^{6}cells以上になるように必要量細胞懸濁液を15mlチューブに分注する。
(きっかり 3x10^{6}cells/tube にするとおこしたときに細胞がロスして 3x10^{6}cells 以下になるので注意する)
⑪ 160xg、7分、加速→slow、減速slowで遠心する。
⑫ supをアスピレートしてSTEM-CELL BANKERを1ml/tubeで加えて懸濁する。
⑬ クライオチューブに移し、ミスターフロスティーに入れて-80℃で凍結させる。
⑭ 翌日、細胞を液体窒素に移す

1-2-2. 末梢血単核球細胞(PBMC)の前培養

① 培地の蒸発防止用に、他の5ウェルにPBSを2 ml　ずつ入れて、37° Cに温めておく。
② 1-3-1で分離した単核球サンプルより10μlサンプリングし、等量の0.4%トリパンブルー溶液と混合し、細胞密度をTC20細胞カウンターでカウントする。

③ 3x10^{6}cells/wellになるよう1.5mlの単核球培養培地に再懸濁して6well培養プレートに播種する。

＊ 凍結単核球細胞を使用する場合は、凍結バイアルを解凍後、細胞懸濁液を9mlのStem-Span ACFに懸濁し、 160xg、7分（加速slow、減速slow）、で遠心した後1mlの単核球培養培地に懸濁して細胞数をTC20で測定する。

④ 37° C、5% CO2で6日～7日間培養する。この間、培地交換はしない。

＊ 6日目の細胞数は1x10^{6}cells/well程度になる。

1-2-3. Electroporation による初期化因子の導入

1-2-3-1.遺伝子導入試薬の準備

① プラスミド溶液（pCE-hOCT3/4、pCE-mp53DD、pCE-hSK、pCE-hUL、pCXB-EBNA1）を以下のように調整する。

- pCE-hOCT3/4 (1 mg/ml) 0.63 μg
- pCE-mp53DD (1 mg/ml) 0.63 μg
- pCE-hSK (1 mg/ml) 0.63 μg
- pCE-hUL (1 mg/ml) 0.63 μg
- pCXB-EBNA1 (1 mg/ml) 0.50 μg

（合計 3.02 μg）

＊ タカラバイオのHuman iPS Cell Generation™ Episomal Vector Mixを使用する場合は、そのまま3μlを使用する。

② 以下の様に遺伝子導入試薬を調製する。

- Nucleofector solution 81.8 μl
- Supplement solution 18.2 μl
- プラスミド溶液 3.02 μl

（合計 103 μl）

1-2-3-2. プレートのコーティング

① PBS (-)4.5 mlに、Laminin-511 E8（コート量：0.5 μg/cm^2）を28.8 μl加え、よく攪拌する。

② 6wellプレートの3wellに①のコート液を1.5mlずつ加える。

③ 37℃、CO_2 5%インキュベーターで60 min以上インキュベーションする。

④ 60 min後インキュベーターから取り出す。

⑤ StemSpan ACF（サイトカイン無添加）培地を0.75ml/wellで加え良くなじませる。

⑥ コート液を吸引除去する。

⑦ 直ちに単核球培養培地を1.5 ml/wellずつ加えインキュベーターに入れておく。

1-2-3-3. 遺伝子導入

① 単核球培養培地0.8mlを、1.5mlマイクロチューブに取り分けておく。

② 1-2-2④で前培養したPBMCを培地ごと15mlチューブに回収する。

③ PBMCの培養液10μlをサンプリングし、等量の0.4%トリパンブルー溶液と混合し、細胞密度をTC20細胞カウンターでカウントする。

④ 200xg、10min（加速slow、減速slow）、で遠心する。

⑧ 遠心終了後、細胞の上清をしっかりと取り除く。

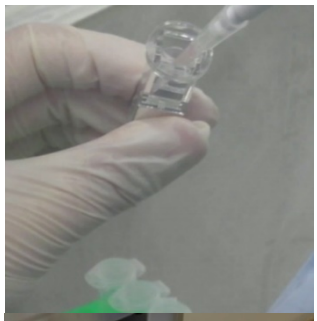
⑨ 遺伝子導入試薬（103μl）に細胞を懸濁して、キュベットに移す。（泡を入れないこと）

⑩ Nucleofector IIb Deviceにキュベットを差し込み、プログラム008でエレクトロポレーションを実施する。

⑪ エレクトロポレーション後、細胞懸濁液を①で用意したマイクロチューブに素早く移しよく混合する。

⑫ ③のカウントに基づいて、$2x10^5$cells/well、$1x10^5$cells/well、$5x10^4$cells/wellになるように細胞懸濁液を各wellに播種する。

⑬ 37℃、CO_2 5%インキュベーターで培養を開始する。

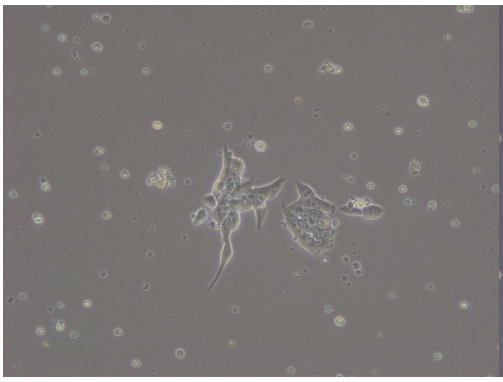


1-2-3-4. コロニーピックアップまでの培養

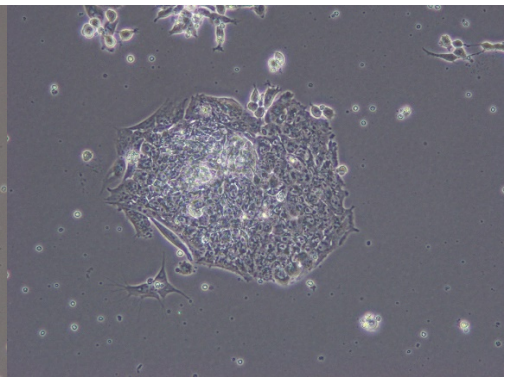
① 遺伝子導入後、2、4、6日目までは1.5mlのStemFit培地を各wellに静かに添加する。

② 遺伝子導入後8日目にそれまでの培地をすべて吸引除去し、新しいStemFit培地を1.5ml加える。以後1日おきに培地交換を行い、コロニーが1mm程度になるまで培養を続ける。

＊ 遺伝子導入後4日目あたりから一部の細胞が接着しはじめ、6日目程度からコロニー形成が観察される。8日目の全量培地交換で、一部剥がれたり、死んだりする細胞も発生するが、そのまま接着を維持したコロニーは、10日前後で典型的なiPS細胞コロニーの形態を示す。



遺伝子導入後 6 日目



遺伝子導入後 10 日目

1-2-4. iPS 細胞コロニーのピックアップ

1-2-4-1. プレートのコーティング

① 12-wellプレートにPBS (-)を0.6ml/well入れる。

② Laminin-511 E8(コート量:0.5 μg/cm^2)を3.8 μl/well加えすぐによく混ぜる。

③ 37℃、CO_2 5%インキュベーターで60 min以上インキュベーションする。

④ 60 min後インキュベーターから取り出す。

⑤ StemFit培地(Y-27632無添加)培地を0.3 ml/wellで加え良くなじませる。

⑥ コート液を吸引除去する。

⑦ 直ちにY-27632添加StemFit培地を0.6 ml/wellずつ加えインキュベーターに入れておく。

1-2-4-2. コロニーピックアップ

① カメラ付き実体顕微鏡システムなどコロニーピックアップに使う機器を準備する。

② コロニーを拾うwellの培地を新しい培地に交換する。

③ モニタでコロニーを見ながらP20ピペットでコロニーをピックアップし、1.5mlチューブに入れる。

④ 必要に応じて手順③を繰り返し数個から十数個のコロニーをピックアップする。

⑤ P20ピペットマントを用いて、機械的にiPS細胞コロニーを細かくし、全量をコーティングした12wellプレートに播種する。

⑥ 37℃、CO_2 5%インキュベーターで培養する。

⑦ 翌日、StemFit培地(Y-27632無添加)に交換する。

⑧ 1日おきに培地交換を行い、50%コンフルエント程度になるまで培養を続ける。

第２章　Feeder-free 法による iPS 細胞の維持培養

本プロトコールはヒト iPS 細胞のフィーダーフリー条件下での継代、凍結保存、解凍の手順を示したものである。

2-1. 必要な器具・機器・試薬類

2.1.1. 必要な器具および機器

- 6-、24-、96- ウェル培養プレート（FALCON社 353046、353047、351172など）
- 100mm培養ディッシュ（IWAKI 3020-100など）
- 15、50 ml チューブ（FALCON社 352196、352070など）
- 2、5、10、25 ml プラスチックピペット(FALCON社 357520、357543、357551、357525など）
- 1.2mlクライオチューブ（Nunc社、375353など）
- Pippette aid（FALCON社など ）
- ピペットマン、チップ（GILSON社など）
- 1.5 ml　チューブ（WATSON 社など）
- セルスクレーパー(IWAKI 9000-220など）
- ミスターフロスティ(サーモサイエンティフィック社、5000-0001）
- CO_2 インキュベーター（Thermo社など）
- TC20全自動セルカンター（バイオラッド社）
- TC-20全自動セルカンター用カウンティングスライド（バイオラッド社 1450015）

2.1.2. 必要な試薬類

- Phosphate buffered saline Ca, Mg free (PBS; Nacalai tesque 社 14249-95)
- TrypLE Select（Gibco、12563-011 など）
- 0.5 M EDTA 溶液（ナカライテスク、689414 など）
- 0.4% Trypan Blue 溶液（バイオラッド社 1450021）
- STEM-CELL BANKER（日本全薬工業, BLC-　3S）
- Laminin-511 E8（ニッピ社、iMatrix-511；385-07361 など）
- StemFit AK02N (味の素株式会社, AK02N)

2.1.3. 試薬の調製

- 0.5× TrypLE Select溶液の調製

PBS(-) 250 ml をフィルターシステムのカップに入れたのち、250μl の 0.5 M EDTA 溶液を加え

る。バキュームを引き吸引ろ過滅菌を行うい 0.5 mM EDTA/PBS 溶液を調製する。15 ml チューブに 7 ml の 0.5 mM EDTA/PBS を加え、 同じチューブに 7 ml の TrypLE Select を分取しよく混合する。

・ StemFit 培地

StemFit AK02N の B 液に、StemFit AK02N の C 液を全量加え、よく攪拌する。さらに B 液と C 液の混合液を、StemFit AK02N 培地の A 液にすべて加えてよく攪拌する。

・ Y-27632添加StemFit 培地

StemFit 培地に、5～10mM の Y-27632 溶液を適宜加え、最終濃度が 10μM になるよう調製する。

2-2. 実験方法

参考動画: 「フィーダーフリー条件でのヒト iPS 細胞の継代培養法」
「フィーダーフリー条件でのヒト iPS 細胞の凍結保存法」

2-2-1. 培養容器のコーティング

2-2-1-1. 6well プレートのコーティング

① PBS (-)1.5 mlに、Laminin-511 E8(コート量:0.5μg/cm^2)を9.6μl加え、よく攪拌する。
② 6wellプレートの1wellに①のコート液を加える。
③ 37℃、CO_2 5%インキュベーターで60 min以上インキュベーションする。
④ 60 min後インキュベーターから取り出す。
⑤ StemFit培地(Y-27632無添加)を0.75ml/wellで加え良くなじませる。
⑥ コート液を吸引除去する。
⑦ Y-27632添加StemFit培地を1.5 ml/well加えインキュベーターに入れておく。

2-2-1-2. 100mm ディッシュのコーティング

① PBS (-)9mlに、Laminin-511 E8(コート量:0.5 μg/cm^2)を55μl加え、よく攪拌する。
② 100mmディッシュに①のコート液を加える。
③ 37℃、CO_2 5%インキュベーターで60 min以上インキュベーションする。
④ 60 min後インキュベーターから取り出す。
⑤ StemFit培地(Y-27632無添加)を4.5ml/wellで加え良くなじませる。
⑥ コート液を吸引除去する。
⑦ Y-27632添加StemFit培地を9ml/well加えインキュベーターに入れておく。

2-2-2. フィーダーフリーiPS 細胞の継代培養

2-2-2-1. 6well プレートから 6well プレートへの継代培養

① 培地を除去する。

② PBS 1 mlを加えて洗浄し、PBSを除去する。

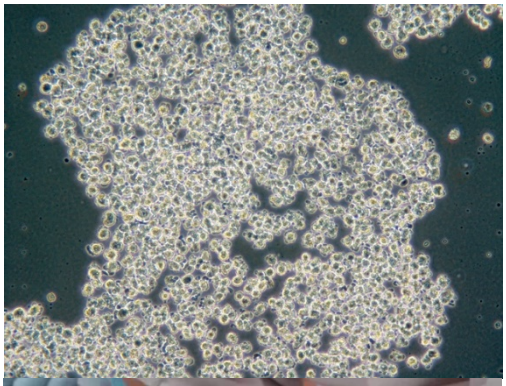
③ 0.5× TrypLE Selectを300 μL/wellずつ加えよくなじませる。

④ 37℃、CO_2 5%インキュベーターで1 min反応させる。

⑤ 1 min後インキュベーターから取り出し、再びwell全体によく行き渡らせる。

⑥ 37℃、CO_2 5%インキュベーターでさらに3 min反応させる（合計4 min）。

⑦ インキュベーターから取り出し顕微鏡で細胞の様子を観察する（細胞間接着が破壊され細胞1個1個が丸くなっている様子を確認する。4 minの処理時間では細胞基質間接着は剥がれないためplateに接着したままである。右の写真の通り。）。



⑧ 0.5× TrypLE Selectを除去する。

⑨ 2 ml/wellのPBS(-)で洗浄し、PBS(-)を除去する（細胞が剥がれやすいので静かに加える）。

⑩ StemFit培地（Y-27632無添加）を1 ml/well加える。

⑪ セルスクレーパーで細胞を剥がす。

⑫ 位相差顕微鏡で細胞が剥がれているか確認する。

⑬ P1000のピペットマンで10回ピペッティングを行い新しいチューブに回収する。

⑭ トリパンブルー染色を行いTC20細胞カウンターでセルカウントを行う（Min size: 8, Max size: 30）。

⑮ 13,000個の生細胞をlamininコーティングした6-wellプレート1 wellに播種する（**細胞の接着が非常に強いので播種後すぐにプレート等を揺らし均一に広げる。**）。

⑯ 37℃、CO_2 5%インキュベーターで培養する。

⑰ 翌日、StemFit培地（Y-27632無添加）に交換する。

＊培地交換は継代**翌日**、その後 1 日おきに行い、継代後7、8日目頃から毎日交換する（培地の色が1日でオレンジ～黄色に変わってきたり、死細胞が増えてきたら毎日交換するようにする。）。

＊細胞の継代は8日前後をメドに行う。

2-2-2-2. 6well プレートから 100mm ディッシュへの継代培養

① 培地の除去からセルカウントまでは、2-2-2-1の①～⑭までと同様に実施する。

② PBS 1 mlを加えて洗浄し、PBSを除去する。

③ 80,000個の生細胞をlamininコーティングした100mmディッシュに播種する（**細胞の接着が非常に強いので播種後すぐにプレート等を揺らし均一に広げる。**）。

④ 37℃、CO_2 5%インキュベーターで培養する。

⑤ 翌日、StemFit培地（Y-27632無添加）に交換する。

2-2-3. フィーダーフリーiPS 細胞の凍結保存

2-2-3-1. 6well プレートから 5 本程度の凍結ストック作製

① 培地を除去する。

② PBS 1 mlを加えて洗浄し、PBSを除去する。

③ 0.5× TrypLE Selectを300 μL/wellずつ加えよくなじませる。

④ 37℃、CO_2 5%インキュベーターで1 min反応させる。

⑤ 1 min後インキュベーターから取り出し、再びwell全体によく行き渡らせる。

⑥ 37℃、CO_2 5%インキュベーターでさらに3 min反応させる（合計4 min）。

⑦ インキュベーターから取り出し顕微鏡で細胞の様子を観察する（細胞間接着が破壊され細胞1個1個が丸くなっている様子を確認する。4 minの処理時間では細胞基質間接着は剥がれないためplateに接着したままである。）。

⑧ 0.5× TrypLE Selectを除去する。

⑨ 2 ml/wellのPBS(-)で洗浄し、PBS(-)を除去する（細胞が剥がれやすいので静かに加える）。

⑩ StemFit培地（Y-27632無添加）を1 ml/well加える。

⑪ セルスクレーパーで細胞を剥がす。

⑫ 位相差顕微鏡で細胞が剥がれているか確認する。

⑬ P1000のピペットマンで10回ピペッティングを行い新しいチューブに回収する。

⑭ トリパンブルー染色を行いTC20細胞カウンターでセルカウントを行う（Min size: 8, Max size: 30）。

⑮ $1x10^6$個以上の生細胞を15mlチューブに移し、160 ×g, 22°C, 5 min遠心を行う。

⑯ 上清を除き、ペレットをタッピングで崩す。

⑰ $1x10^6$ cells/mlとなるようにSTEM-CELL BANKERに懸濁する。

⑱ P1000などのピペットマンを利用して、200μl (=2 x 10^5 cells)ずつクライオチューブに分注する。

⑲ ミスターフロスティーに入れて-80℃で凍結させる。

⑳ 当日または翌日に液体窒素に移して保存する。

2-2-3-2. 100mm ディッシュから 30 本程度の凍結ストック作製

① 培地を除去する。

② PBS 6 mlを加えて洗浄し、PBSを除去する。

③ 0.5× TrypLE Selectを1.8ml加えよくなじませる。

④ 37℃、CO_2 5%インキュベーターで1 min反応させる。

⑤ 1 min後インキュベーターから取り出し、再びwell全体によく行き渡らせる。

⑥ 37℃、CO_2 5%インキュベーターでさらに3 min反応させる（合計4 min）。

⑦ インキュベーターから取り出し顕微鏡で細胞の様子を観察する（細胞間接着が破壊され細胞1個1個が丸くなっている様子を確認する。4 minの処理時間では細胞基質間接着は剥がれないためplateに接着したままである。）。

⑧ 0.5× TrypLE Selectを除去する。

⑨ 12 mlのPBS(-)で洗浄し、PBS(-)を除去する（細胞が剥がれやすいので静かに加える）。

⑩ StemFit培地（Y-27632無添加）を4.5ml加える。

⑪ セルスクレーパーで細胞を剥がす。

⑫ P5000のピペットマンで10回ピペッティングを行い新しいチューブに回収する。

⑬ StemFit培地（Y-27632無添加）を5.5mlをディッシュに加えて共洗いし、⑫のチューブに合わせる。

⑭ トリパンブルー染色を行いTC20細胞カウンターでセルカウントを行う（Min size: 8, Max size: 30）。

⑮ $8x10^6$個以上の生細胞を15mlチューブに移し、160 ×g, 22°C, 5 min遠心を行う。

⑯ 上清を除き、ペレットをタッピングで崩す。

⑰ $1x10^6$ cells/mlとなるようにSTEM-CELL BANKER8mlに懸濁する。

⑱ P1000ピペットマンなどを利用して、200μl (=2 x 10^5 cells)ずつクライオチューブに分注する。

⑲ ミスターフロスティーに入れて-80℃で凍結させる。

⑳ 当日または翌日に液体窒素に移して保存する。

2-2-4. 凍結 iPS 細胞の再培養

① ウォーターバスまたはアルミバスを37℃に温めておき、培地を室温に戻しておく。

② 15 mlコニカルチューブに5 mlのStemFit培地（Y-27632無添加）を入れる。

③ 液体窒素タンクからiPS細胞の凍結バイアルを取り出し、ウォーターバスで素早く解凍する（氷の塊が少し残っている程度の状態で）。

④ ③の細胞懸濁液を15 mlコニカルチューブに移す（ピペッティングは1，2回程度）。

⑤ 160 ×g、22°C、5 minで遠心する。

⑥ 上清を取り除く。

⑦　ペレットをタッピングで崩し、0.5 mlのStemFit培地（Y-27632無添加）を加える。
⑧　トリパンブルー染色を行いTC20細胞カウンターでセルカウントを行う（Min size: 8, Max size: 30）。
⑨　Laminin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。
⑩　細胞が均一になるようにプレートを揺らす（細胞の接着が非常に強いので播種後すぐにプレート等を揺らし均一に広げる）。
⑪　37℃、CO2 5%インキュベーターで培養する。
⑫　翌日、Y-27632を加えていない維持培養用培地に交換する。培地を除去する。

＊培地交換は継代**翌日**、その後 1 日おきに行い、継代後7、8日目頃から毎日交換する
（培地の色が1日でオレンジ～黄色に変わってきたり、死細胞が増えてきたら毎日交換するようにする。）。
＊細胞の継代は8日前後をメドに行う。

第３章　その他

3-1. iPS 細胞のアルカリフォスファターゼ（ALP）染色

3-1-1. 試薬の準備

- 4%パラホルムアルデヒド溶液（和光純薬株式会社；163-20145）
- ALAKLINE PHOSPHATASE(AP)、LEUKOCYTE kit （SIGMA； Cat.No. 86-R）
- 超純水

3-1-2. iPS 細胞の固定及び染色

① 培養後のディッシュに4%パラホルムアルデヒド溶液2mlを加え、10分間固定する。

② その後超純水でリンスする。

③ ALAKLINE PHOSPHATASE（AP）、 LEUKOCYTE kitのSodium Nitrite Solution 50 μlとFRV-Alkaline Solution 50 μlをtubeに加え転倒混和し、2分間静置する。その後、これと超純水2.25 ml、Naphthol AS-BI Alkaline Solution 50 μlを混和し基質溶液とする。

④ リンス後、基質溶液を加え、室温で15分間インキュベートする。

⑤ 基質溶液を吸引後、PBSまたは超純水で洗浄する。すぐに吸引後、再び超純水を浸した後乾燥させる（図1）。

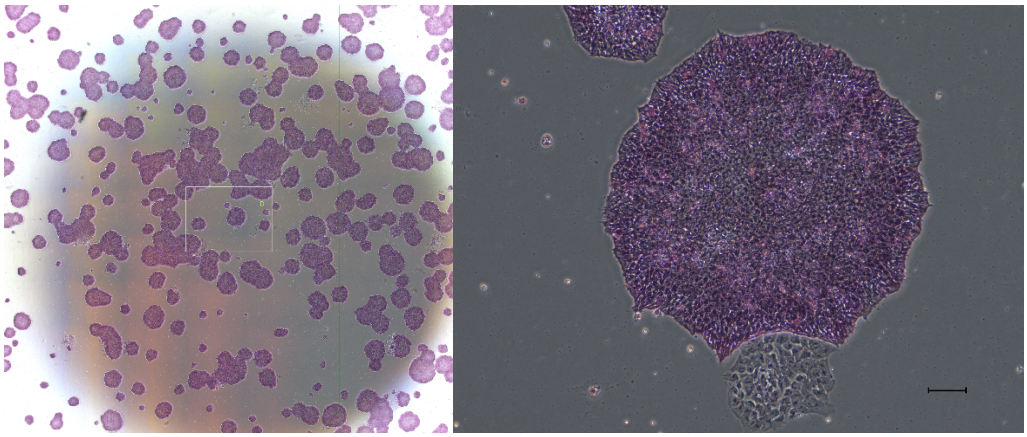


図 1　アルカリフォスファターゼ活性により染色されたコロニー

3-2. 未分化細胞マーカーSSEA-4 染色

3-2-1. 試薬

- PBS（ナカライテスク株式会社；14249-24）
- Histochoice Mb Tissue Fixative, 1X（AMRESCO；H120）
- ヤギ血清溶液（フナコシ株式会社；S-1000）
- Mouse-anti human SSEA-4 antibody（1 次抗体）（Santa Cruz Biotechnology, Inc；sc-21704）
- Alexa Fluor® 488 Goat Anti-mouse IgG, 2 mg/ml（Invitrogen；A11029）
- DAPI（Invitrogen；03571）

3-2-2. 染色ステップ（容量は容器に応じて適宜変更のこと，基本的には培地と等量）

ステップ 1. 固定

① 培地を除去し、PBS にて細胞を洗浄する。

② Histochoice Mb Tissue Fixative で固定する。----室温、10 分間

③ PBS にて細胞を洗浄する。---3 回

ステップ 2. 非特異タンパク質のブロッキング

④ 10%ヤギ血清溶液を加える。---室温、30 分間

ステップ 3. 一次抗体の反応

⑤ 1.5%ヤギ血清溶液を用いて 50 倍希釈した Mouse-anti human SSEA-4 antibody を加える。---室温、60 分間

⑥ PBS にて細胞を洗浄する。---5 分間、3 回

ステップ 4. 蛍光標識二次抗体の反応

⑦ Alexa Fluor® 488 Goat Anti-mouse IgG, 2 mg/ml を 1.5%ヤギ血清溶液で 50 倍希釈し加える。---室温、45 分間

⑧ PBS にて細胞を洗浄する。---5 分間、3 回

ステップ 5. DAPI 溶液による核染色(オプション)

⑨ 1μg/ml DAPI 溶液を加える。---室温、5 分間

⑩ PBS にて細胞を洗浄する。---3 回

ステップ 6. 蛍光顕微鏡にて観察

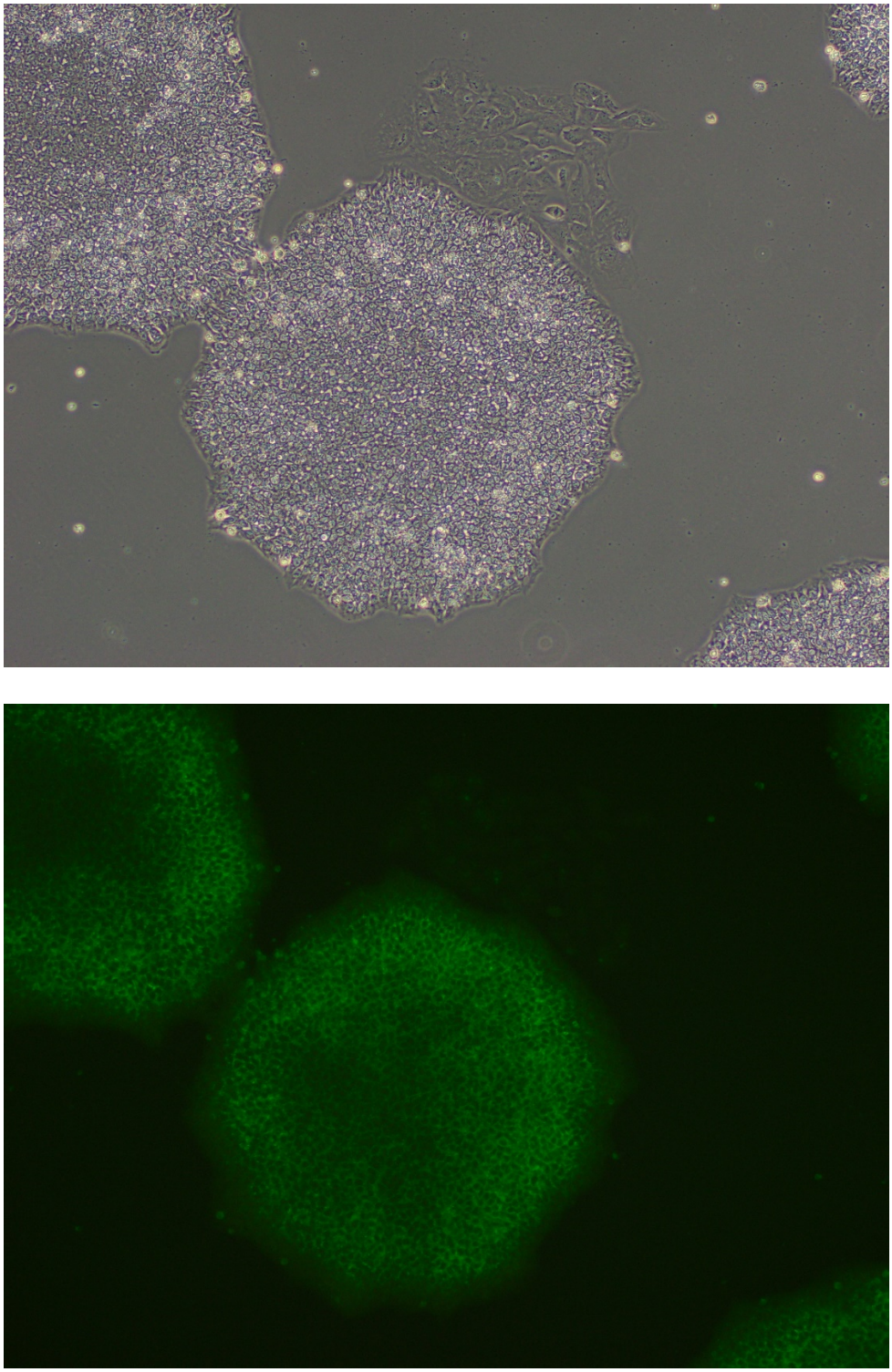
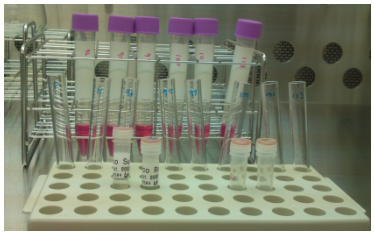


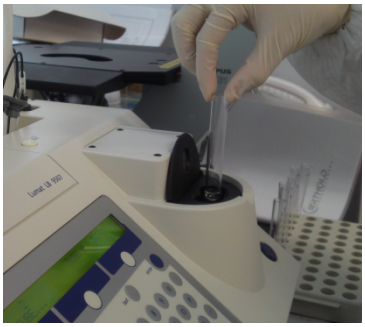
図 2　ヒト iPS 細胞での SSEA-4 染色

抗ヒト SSEA-4 抗体と Alexa Fluor®488 標識二次抗体を用いて染色を行った。A: 位相差像。B: 蛍光像。

3-3. マイコプラズマの検出

MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit（Lonza 社）





① 使用前に、すべての試薬を15分ほど室温に放置する。

② 15 mlチューブに細胞培養液、もしくは培養上清を加え、1,000 rpm（200×g）で、5分間遠心する。

③ 100 μlの遠心上清をルミノメーターの試験管に入れる。

④ 100 μlのMycoAlert Reagentを加え、5分間放置する。

⑤ 試験管をルミノメーターにセットして、測定する（Reading A）。（読み取りは1秒）

	Positive Control	Negative Control	Sample
Reading A	796	1547	485

⑥ 100 μl の MycoAlert Substrate を加え、10 分間放置する。

⑦ 試験管をルミノメーターにセットして、測定する（Reading B）。（読み取りは 1 秒）

	Positive Control	Negative Control	Sample
Reading B	22229	204	286

⑧ 測定結果の比較を行う。（Calculate ratio = Reading B/Reading A.）

	Positive Control	Negative Control	Sample
Calculate ratio	27.9	0.132	0.590

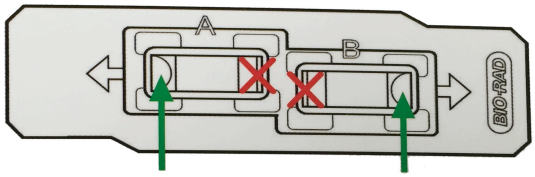
Calculate ratio の数値が、1.0 をわずかに超えた場合（例えば、Calculate rate = 1.3）は、24～48 時間後に再テストを行い、Calculate ratio の増加を確認することが推奨されています。

本実習では測定にベルトールド社のルーマット LB9507 を使用しています。数値についてはご使用の機種により変動があります。また、実際に試験される場合は同一サンプルについて適当な反復数を用意して行ってください。

付録１.

TC20™ 全自動セルカウンター

① マイクロピペットを用いて細胞懸濁液10 μlにトリパンブルー10 μlを混合し、そのうち10 μlをカウンティングスライドの（AまたはB）の区画に入れる。



② スライドを TC20 スライドスロットに挿入する。自動的に細胞数をカウントします（トリパンブルーの有無、フォーカスの調整は不要）。Focusing→Counting が表示されます。

③ 約30秒後に結果が画面に表示される。

Total count: 4.3×10^6cells/ml

Live count: 4.2×10^6/ml

Live Cells: 87%

④ 「Live count」の数値を控える。

⑤ 計算する。

目標細胞数(cells) ÷ Live (cells/ml) = 必要な細胞懸濁液(ml)

付録２.

参考文献

1) M. Nakagawa et al., A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. Scientific Reports, 4:3594 (2014) DOI: 10.1038/srep03594
2) Okita, K ., et al. An Efficient Non-viral Method to Generate Integration-Free Human iPS Cells from Cord Blood and Peripheral Blood Cells. Stem Cells. 2012 Nov 29
3) Okita, K ., et al.　A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. Nat Methods. 8, 409- 12 (2011) .
4) Yu, J., et al.　Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. Science. 324, 797- 801 (2009).
5) Mack, AA., et al. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from CD34+ Cells across Blood Drawn from Multiple Donors with Non-Integrating Episomal Vectors. PLoS One. 6, e27956 (2011).　A novel efficient feeder
6) 中川誠人, “フィーダーフリーでのヒト iPS 細胞の樹立および維持培養”2014.3.10, http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/img/protocol/hipsprotocolFf_140311.pdf
7) 沖田圭介, “エピソーマルベクターを用いた末梢血からの iPS 細胞樹立方法”2013.1.10, http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/img/protocol/Episomal_Blood_Protocol.pdf

※本プロトコール集は、CiRA で過去に開催されていた iPS 細胞培養実技トレーニングで使用されていたものを、2019 年 2 月に web で公開したものです。・