

ヒト iPS 細胞の凍結の手順

	手 順	時間
準備するもの	氷 ヒト iPS 細胞用培地 Dimethyl sulfoxide (DMSO): DMSO Hybri-Max™, Sigma D2650 超低温細胞保存用チューブ : Nalgene Cryoware™, Cryogenic vials, 5000-0020 ディスパーゼ : Roche Dispase II, neutral protease, grade II, 04942078001 15ml 用遠心管 50ml 用遠心管 緩慢冷却容器 (Nalgen Cryo1°C Freezing Container, #5100-0001、あるいは、日本フリーザー 凍結処理容器バイセル)	
準備	必要な量のヒト iPS 細胞用培地を 50ml 用遠心管に入れる。	
	凍結用に使用するヒト iPS 細胞用培地を適量とって 50ml チューブに入れ、FGF-2 を必要量添加して、氷中にて冷却する。 十分冷却したら、DMSO を最終濃度 10% になるように添加し、直ちに氷中にて冷却する。	
	培地を吸引。	
細胞分散	1unit/ml ディスパーゼ(解凍後 3 日以内に使用)を 1ml 入れる。	
	37°C・CO2 インキュベーターに入れてインキュベーション。	3~10 分
	ディスパーゼを吸引。	
	ヒト iPS 細胞用培地 10ml を入れて、10ml ピペットでピペットエイドを強にして培地を吹きかけるようにしてコロニーをはがす (コロニーを小さくしすぎないように気をつける。普段の継代よりやや大きめがよい。2~3 回程程度のピペッティングでコロニーをはがれないような場合は、セルスクレーパーを使用してコロニーをはがす)。	
	顕微鏡でコロニーの分散状態を確認する。	
	15ml チューブに細胞浮遊液を入れて、300rpm (20G)にて遠心 (大きいコロニーのみを回収する)。	2 分
	十分冷却した凍結培地を入れて、すぐに氷中におく。 冷却している間に、超低温細胞保存チューブに、ラベルする。	5 分
凍結	超低温細胞保存用チューブに 0.5ml ずつに分け、蓋を閉めたら、すぐに氷中におく。	15 分
	4°C に冷却しておいた緩慢冷却容器などに入れて、マイナス 80°C ディープフリーザーに入れる。	一晩
	翌日、液体窒素タンクに保存する。	

ポイント：培地に DMSO を入れる際には、十分培地を冷却してから DMSO を添加し、添加後後すぐに氷中に入れて冷却する。また、細胞を DMSO 含有凍結培地に入れた際も、すぐに超低温細胞保存チューブに入れず、先に氷中に入れて十分冷却してから、超低温細胞保存チューブに分注する。