

## 細胞の簡易凍結保存法

### 血清入り培地で培養されている細胞の場合

一般的な動物細胞株の凍結法で凍結保存ができます。

#### 凍結に供する細胞の状態

この点はあまり注意が払われなれないと思われませんが、細胞が増えている状態（できるだけ対数増殖期）であることが大切です。細胞の状態が悪かったり、コンフルエントの状態が長く続いて、静止期(G<sub>0</sub>期)に入っている細胞を凍結対象とすると、解凍後の生存率や回復が悪いことが多いです。細胞を多数回収しようとして、過密な状態まで培養して凍結されるケースがよくみられますが、むしろコンフルエント直前の状態で凍結した方が良い結果が得られます。

#### 凍結保存液の組成

バンクでは、10% DMSO, 20% FBS を含む基礎培地を凍結用培地としています。なお、細胞浮遊液に DMSO を直接混合することは避けてください（有害）。凍結用培地は予め4℃程度に冷やしておきます。調製した凍結用培地に対して、細胞を浮遊させます。セルバンカーなどをご使用の場合、それでも問題ありません。

#### 凍結法

細胞バンクでは、プログラミングフリーザーをもちいて、-1℃/min の条件で凍結しています。しかし、この機器は一般には普及していません。最も簡単には、凍結保存培地にサスペンドして、2 ml 程度のクライオチューブに1 ml ずつ分注して（分注後は氷上に保持しておく）、15 ml ディスポ遠心管の発泡スチロールラック（図）の穴にクライオチューブをセットします。さらに穴とチューブの隙間に脱脂綿などを詰めます。（望ましくは、市販のバイセル(BICELL)や Mr. Frosty のような、簡易凍結用容器にクライオチューブを入れます。）

セットしたクライオチューブを-80℃のディープフリーザーに一晩おきます。-30℃、-80℃と段階的に凍結する必要はありません。凍結後、利用可能であれば、液体窒素保管容器に移します（この際、温度が上昇しないよう、いったん液体窒素でバイアルを冷やすと効果的です）

この穴にクライオチューブをセットする



なお凍結が成功していることを確認するまではバックアップ用の培養は残しておいてください。転ばぬ先の杖です。

むしろ凍結後の温度管理が大事です。液体窒素タンクに保存するのが最もよいですが、ディープフリーザーで保管する場合は可能であれば-135℃の高性能のフリーザー、-80℃の場合は頻繁に開閉するディープフリーザーは避け、また、定期的を起こして細胞の生存率が下がっていないかどうか確かめたほうが無難です。（-80℃フリーザーではせいぜい1年程度の保存を目安としてください。）

なお、液体窒素タンクの液相中に保存すると液体窒素がチューブに浸入して取り出し時に破裂することがあります。気相部分、または気相式のタンクに保存してください。凍結操作について更に詳細には、細胞培養の教科書等を参照してください。