

再生医療の基礎研究用培地「StemFit® AK02N」に細胞凍結保存液「バンバンカーhRM®」を使用したiPS細胞の保存効率の評価

味の素株式会社 フロンティア研究所
細胞栄養研究グループ 千田 将

当社が製造している再生医療の基礎研究用培地「StemFit® AK02N」に株式会社 リンフォテック社製細胞凍結保存液「バンバンカーhRM®(CS-07-001)」を用い、ヒトiPS細胞 201B7を凍結保存した保存効果を評価した。

・使用細胞: ヒトiPS細胞 201B7

・実験方法

(1)培養: iMatrix-511(ニッピ社製)を用いてシングルセル播種による維持培養を行った。培養1日目はRock阻害剤を使用した。

(2)凍結: TrypLE Select処理とスクレーピングにより剥離、ピペッティングによりシングルセル化した。その後、遠心分離し上清を除去し 1×10^6 生細胞/mlとなるよう凍結保存液に懸濁、 $200 \mu\text{l}$ (2×10^5 生細胞)ずつ凍結バイアルに分注し凍結した。

(3)凍結保存温度:

-80°C: 凍結バイアルに分注後サンプルボックスに入れ-80°Cへ移動した。

-150°C: 凍結バイアルに分注後CoolCell®に入れて-80°Cに移動し、20~24時間後に-150°Cに移動した。

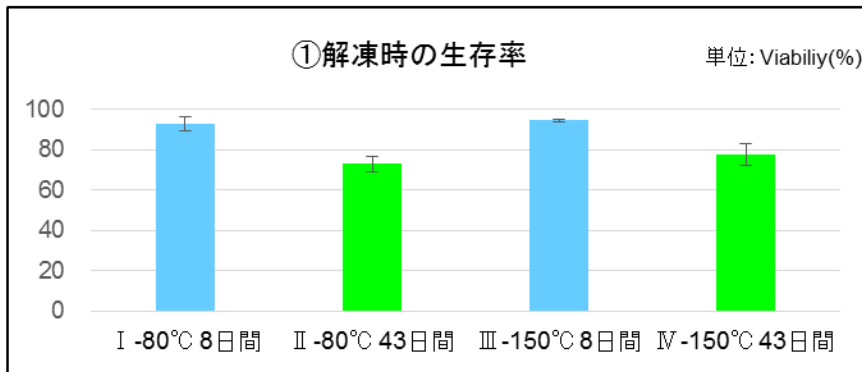
(4)凍結保存期間: 凍結日の8日後に解凍(群 I, III) 凍結日の43日後に解凍(群 II, IV)

群	保存温度	保存期間
I	-80°C	8日間
II	-80°C	43日間
III	-150°C	8日間
IV	-150°C	43日間

(5)解凍: バイアルを37°Cに設定したウォーターバスにて素早く解凍し、Rock阻害剤入りのAK02Nを加え遠心分離、上清を除去した後、Rock阻害剤入りのAK02Nに懸濁した。6-well plateに1ウェル当たり20,000個の生細胞を播種し、培養を開始した。培養は上記(1)に記載の条件で行った。

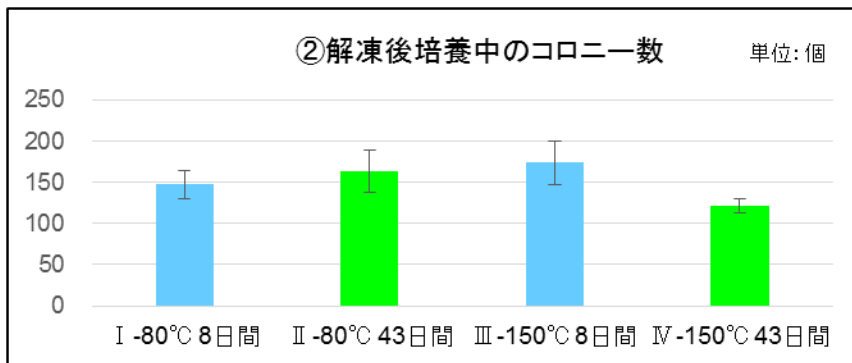
・評価項目および方法

①解凍時の生存率: 解凍・遠心分離後に培地に懸濁した状態でトリパンブルー染色法で計測



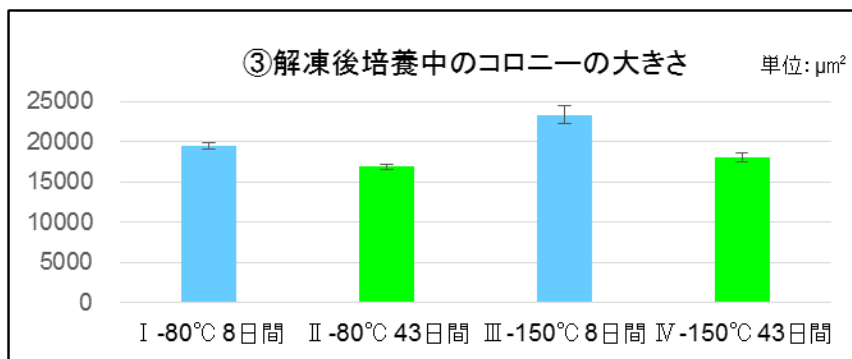
②解凍後培養中のコロニーの数:

培養開始4日後にキーエンス社製顕微鏡(BZ-X700)を使用し、ウェル中央部の25視野の画像を取得、画像解析を行いコロニー数を算出

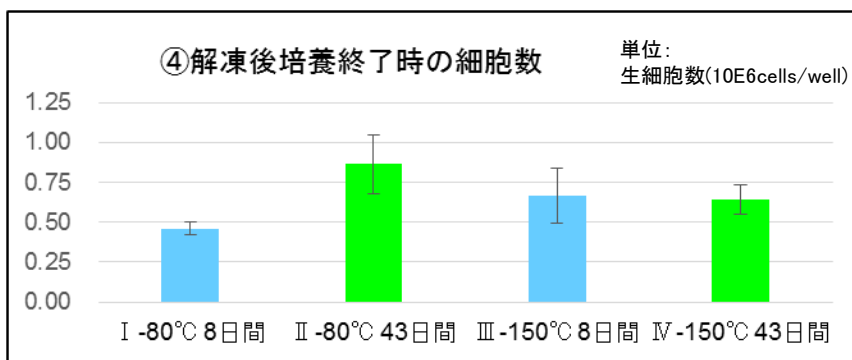


③解凍後培養中のコロニーの大きさ:

培養開始4日後にキーエンス社製顕微鏡(BZ-X700)を使用し、ウェル中央部の25視野の画像を取得、画像解析を行いコロニーの大きさを算出



④解凍後培養終了時の細胞数: 培養開始7日後に細胞を剥離・回収し、自動細胞計測装置により細胞数を計測



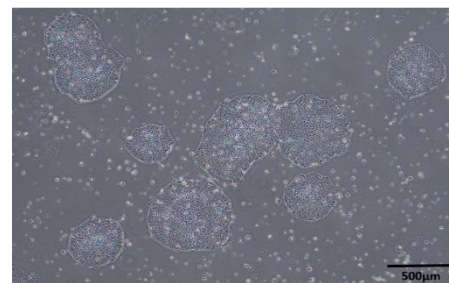
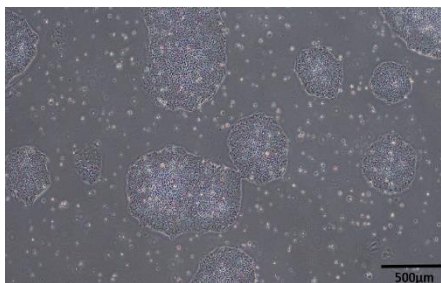
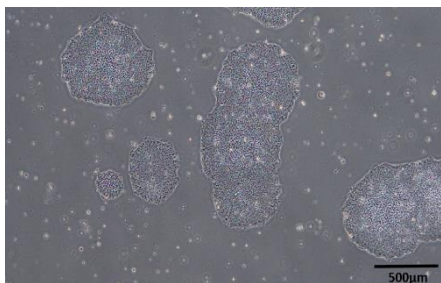
<参考画像>

-80°C 8日間保存 解凍後7日目

No.1

No.2

No.3



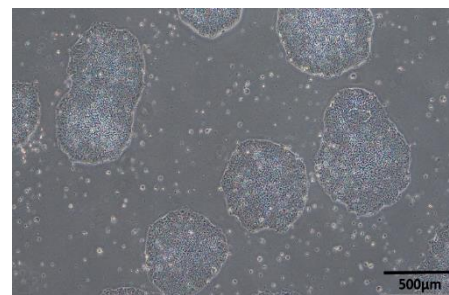
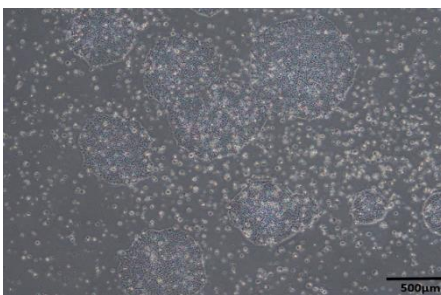
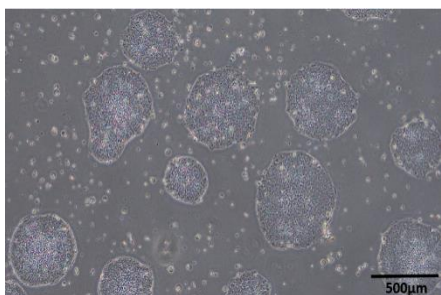
<参考画像>

-150°C 8日間保存 解凍後7日目

No.1

No.2

No.3



・結論: バンバンカーhRM®を用いたiPS細胞 201B7の凍結保存効果を評価したところ、良好な結果が得られた。