

を数値化できるよう今後検討をしてきたいと考えている。

また、国内では臨床用細胞培養に 3T3 細胞や狂牛病非発生国ウシ血清の使用は禁止されてはいない。しかし、無フィーダーで、既知の組成からなる無血清培養条件を用いる方が、フィーダー細胞と KSR を用いた培養に比べて、ロット差なく培養維持できる。また、品質管理にかかる経費やロット管理の点から資源化には効率が良い点が多い。しかし、一方で高度な培養の技術も必要であり、些細な操作が品質に影響を与える。今後、さらに安定した培養条件が開発されるとともに、作業手順書に品質維持技術を記載することにより、より安定して培養を行うことが可能となり臨床応用などに資する細胞の資源化が効率化されることが考えられる。

E. 結論

ヒト iPS 細胞としての幹細胞特性検査などを効率的に行うためには、様々な工程を考える必要がある。しかし、ヒト iPS 細胞は株間の差が大

きく、実際に資源化を行ってみると、作業工程表に合わないことも多い。海外のヒト幹細胞バンクにおいて、複数機関から資源化工程についての研究論文が発表されているが、このような研究が重要であることを再認識した。本研究を基盤にして、樹立機関との意見交換を推進できることを願う。

F. 健康危険情報

特筆すべき事項はなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- [1] Kinehara M., Kawamura S., Tateyama D., Suga M., Matsumura H., Mimura S., Hirayama N., Hirata M., Uchio-Yamada K., Kohara A., Yanagihara K., Furue MK. Protein Kinase C Regulates Human Pluripotent Stem Cell Self-Renewal. *Plos one.*, 8,1-13 (2013)
- [2]Shofuda T, Kanematsu D, Fukusumi H, Yamamoto A, Bamba Y, Yoshitatsu S, Suemizu H, Nakamura M, Sugimoto Y, Furue M K, Kohara A, Akamatsu W, Okada Y, Okano H, Yamasaki M, Kanemura Y, Human Decidua-Derived Mesenchymal Cells are a Promising Source for the Generation and Cell Banking of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Medicine*. DOI: <http://dx.doi.org/10.3727/215517911X658918> (2012)
- [3]Kawabe K, Tateyama D, Toyoda H, Kawasaki N, Hashii N, Nakao H, Matsumoto S, Nonaka M, Matsumura H, Hirose Y, Morita A, Katayama M, Sakuma M, Kawasaki N, Furue MK, Kawasaki T. A novel antibody for human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells recognizes a type of keratan sulfate lacking oversulfated structures. *Glycobiology*. (3):322-36. (2013)
- [4] Takayama K., Kawabata K., Nagamoto Y., Kishimoto K., Tashiro K., Sakurai F., Tachibana M., Kanda K., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. 3D Spheroid Culture of hESC/hiPSC-derived Hepatocyte-like Cells for Drug Toxicity Testing. *Biomaterials*. 2013 Feb;34(7):1781-9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.11.029.
- [5] Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Sugawara M., Kikuchi K., Higuchi M., Nagamoto Y., Watanabe H., Tashiro K., Sakurai F., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. Generation of Metabolically Functioning Hepatocytes from Human Pluripotent Stem Cells by FOXA2 and HNF1 α Transduction. *J. Hepatol.*, 57, 628-636 (2012)
- [6] Nagamoto Y., Tashiro K., Takayama K., Ohashi K., Kawabata K., Sakurai F., Tachibana M., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi H. The Promotion of Hepatic Maturation of Human Pluripotent Stem Cells in 3D Co-culture using Type I Collagen and Swiss 3T3 Cell Sheets. *Biomaterials*, 33, 4526-4534 (2012)
- [7] Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Katayama K., Higuchi M., Tashiro K., Nonaka A., Sakurai F., Hayakawa T., Furue MK., Mizuguchi

H. Efficient Generation of Functional Hepatocytes from Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells by HNF4 α Transduction. *Mol. Ther.*, 20, 127-137 (2012)

書籍

1. 柳原佳奈、古江・楠田美保, 第二章 2 の 6 幹細胞技術: 標準化に向けて幹細胞技術の標準化—再生医療への期待, 一般財団法人日本規格協会, P143-154 (2012)

2. 学会発表

【国際学会】

〈招待講演〉

1. Furue MK., A growth factor defined serum-free culture condition for human pluripotent stem cells toward the development of pharmaceutical application. JAACT2012 シンポジウム S3 : Cell Culture Technologies for Stem Cell, Nagoya, Japan, November (2012)

〈一般講演〉

2. Mimura S., Suga M., Kinehara M., Tateyama D., Hirata M., Nikawa H., Yanagihara K., Furue MK. Prospect of Neural Cells Derived from Human Pluripotent Stem Cells for Application of in vitro Developmental Toxicity Test. The 2012 World Congress on In

Vitro Biology, Bellevue, Washington USA, June (2012) 学会賞受賞

3. Takayama K., Inamura M., Kawabata K., Sugawara M., Kikuchi K., Higuchi M., Nagamoto Y., Watanabe H., Tashiro K., Sakurai F., Furue MK., Mizuguchi H. Generation of Metabolically Functioning Hepatocytes from Human Embryonic Stem Cells by Transduction of FOXA2 and HNF1 α . International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan, June (2012)

4. Nagamoto Y., Tashiro K., Takayama K., Ohashi K., Kawabata K., Tachibana M., Sakurai F., Furue MK., and Mizuguchi H. Type I Collagen Promotes Hepatic Maturation from Human Pluripotent Stem Cells in 3D Co-culture with Swiss 3T3 Cell Sheet. International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan, June (2012)

5. Suga M., Hayashida M., Ueda N., Liu K., Wakabayashi M., Fujiki A., Matsumura H., Kohara A., Yanagihara K., Furue MK. Human Induced Pluripotent Stem Cell Banking for Drug Discovery Research, International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan, June (2012)

6. Yanagihara K., Hayashida M.,

Ozawa Y., Iemura M., Kohara A., Furue MK. Recovery Increased by Simple Improvement of the Conventional Cryopreservation Method for the Human ES and iPS Cells, International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan, June (2012)

7. Ohnuma, K, Fujiki, A, Koike, Si, Hayashi, Yi, Ito, Y, Onuma, Y, Chan, T, Michiue, T, Furue, M K., Asashima, M, ENZYME-FREE CULTURE OF HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS International Society for Stem Cell Research 10th Annual Meeting, Yokohama, Japan, June (2012)

【国内学会】
(一般演題)

1. 三村純代、菅三佳、木根原、二川浩樹、柳原佳奈、古江一楠田美保 ヒト多能性幹細胞を用いた神経発生毒性評価への応用の可能性 第12回日本再生医療学会総会 横浜 2013年3月21-23日

2. 迫勇樹、柳原佳奈、三村純代、福本健、山本翔太、馬場崇行、上田香奈、番戸博友、畑下昌範、高城啓一、寺田聡、古江・楠田美保 ヒト幹細胞培養の足場材料としてのクラゲ由来因子の有効性第12回日本再生医療学会総会 横浜 2013年3月21-23日

3. 林田みどり、小澤 裕、家村将

士、柳原佳奈、小原有弘、古江一楠田美保 ヒト多能性幹細胞の緩慢凍結法による細胞凍結・解凍における改善の検討 日本組織培養学会第85回大会 京都 2012年5月17-18日

4. 柳原佳奈、三村純代、福本 健、山本翔太、迫 勇樹、上田香奈、番戸博友、畑下昌範、高城啓一、寺田聡、古江一楠田美保 幹細胞培養技術におけるクラゲ由来コラーゲンの有効性 日本組織培養学会第85回大会 京都 2012年5月17-18日

5. 菅三佳、館山大揮、藤木彩加、木根原匡希、柳原佳奈、古江一楠田美保 次世代型細胞評価システムの開発 日本組織培養学会第85回大会 京都 2012年5月17-18日

6. 木根原匡希、河村卓、二川浩樹、古江一楠田美保 ヒト胚性幹細胞の上皮間葉移行に関与する転写因子EGR1の同定 日本組織培養学会第85回大会 京都 2012年5月17-18日

7. 高山和雄、川端健二、田代克久、神田勝弘、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之 Nanopillar プレートを用いたヒトES/iPS細胞から肝細胞への分化誘導法の開発とその毒性評価への応用 第12回日本再生医療学会総会 横浜 2013年3月21-23日

8. 渡辺仁、高山和雄、稲村充、立

花雅史、櫻井文教、古江一楠田美保、川端健二、水口裕之 ヒト ES/iPS 細胞から肝幹前駆細胞への分化における転写因子 HEX の機能解明—HEX 標的遺伝子の同定および機能解析— 第 62 回日本薬学会近畿支部総会 神戸 2012 年 10 月 20 日

9. 高山和雄、稲村 充、川端健二、菅原道子、菊池きよ美、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之 FOXA2 および HNF1 α 遺伝子導入によるヒト ES/iPS 細胞から薬剤代謝能を有した肝細胞への分化誘導 第 39 回日本毒性学会学術年会 仙台 2012 年 7 月 17-19 日

10. 長基康人、田代克久、高山和雄、大橋一夫、岡野光夫、櫻井文教、立花雅史、古江一楠田美保、川端健二、水口裕之 ES/iPS 細胞由来肝細胞の Swiss 3T3 細胞との積層 3 次元共培養下における成熟化・促進機構の解析 第 19 回大会肝細胞研究会 札幌 2012 年 6 月 29-30 日

11. 高山和雄、川端健二、稲村充、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之 c/EBP α および c/EBP β 遺伝子による TGFBR2 遺伝子発現制御を介した肝幹前駆細胞の運命決定 第 19 回大会肝細胞研究会 札幌 2012 年 6 月 29-30 日

12. 高山和雄、稲村充、川端健二、形山和史、櫻井文教、古江一楠田美保、水口裕之 SOX17、HEX、HNF4 α 遺伝子導入によるヒト多能性幹

細胞から成熟肝細胞の効率良い分化誘導 第 85 回大会日本組織培養学会 京都 2012 年 5 月 17-18 日

13. 長基康人、田代克久、高山和雄、大橋一夫、櫻井文教、立花雅史、古江一楠田美保、川端健二、水口裕之 Swiss 3T3 細胞との積層 3 次元共培養下におけるヒト ES/iPS 細胞由来肝細胞の肝細胞成熟化・促進機構の解析 第 85 回大会日本組織培養学会、京都、2012 年 5 月 17-18 日

(シンポジウム・ワークショップ等)

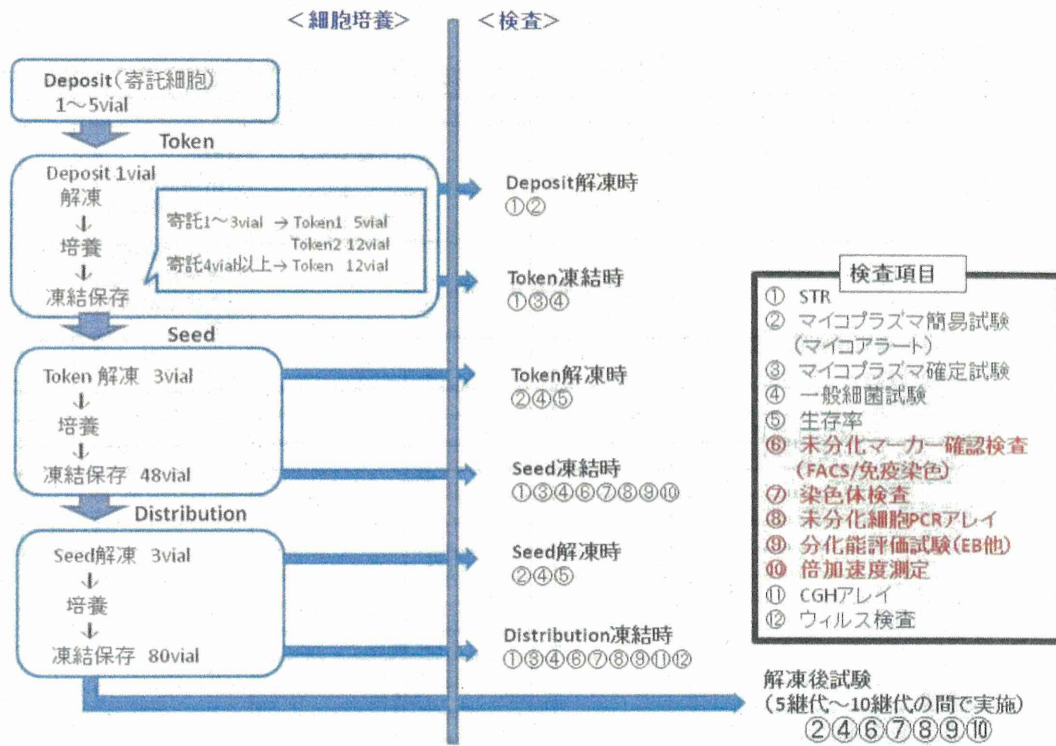
14. 古江一楠田美保、臨床応用を目指したヒト多能性幹細胞用培地の標準化、2012 年 11 月 29 日、ヒト多能性幹細胞：臨床応用最前線

15. 古江一楠田美保、培養条件による iPS 細胞の形態・性質の変化と細胞診への応用、2012 年 8 月 6 日、がんプロセミナー(主催：大阪大学保健学科)料及び細胞培養技術の標準化(主催：ダイアログ株式会社)

表2 海外ヒト幹細胞分譲機関リスト

| 国 | バンク機関名 URL |
|---------|---|
| 米国 | Wisconsin International Stem Cell (WISC) Bank http://www.wicell.org/ |
| 米国 | Harvard Stem Cell Institute http://www.hsci.harvard.edu/ |
| 米国 | Massachusetts Human Stem Cell Bank http://umassmed.edu/MHSCB/index.aspx |
| 英国 | UK Stem Cell Bank http://www.ukstemcellbank.org.uk |
| シンガポール | Singapore Stem cell Consortium http://www.sscb.a-star.edu.sg/stemCellBank.php |
| オーストラリア | Australian Stem Cell Centre http://www.stemcellcentre.edu.au/ |
| オーストラリア | Australian Stem Cell Bank http://www.ascb.com.au |
| 台湾 | Taiwan Stem Cell Bank http://www.tscb.bcrc.firdi.org.tw//index.do |
| スペイン | National Stem Cell Bank?Banco?Nacional de Lineas Celulares (BNLC) http://www.isciii.es/htdocs/terapia/terapia_banco celular.jsp (アクセスエラー) |
| フランス | Agence de la Biomedicine National Registry for hESC http://www.agence-biomedecine.fr/ |
| ドイツ | Charite Cell Bank-Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies n/a |
| イスラエル | Tel Aviv Sourasky Medical Center Cell Bank n/a |
| インド | National Centre for Cell Science?Cell Repository http://www.nccs.res.in |
| 韓国 | Korean Stem Cell Bank http://kscb.co.kr/eng |

表3. 改訂ヒトiPS細胞資源化工程表：トークン、シード、分譲用バイアル作成



別添1 ヒトiPS細胞培養の作業手順書（SOP） 解凍作業

独)医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 ヒト幹細胞応用開発室
SOP 培養 iPS細胞解凍 (on MEF)

目的

ヒトiPS細胞をMEF上で解凍する

使用試薬・器具

| | メーカー | カタログ番号 | 必要量 | 備考 | チェック | |
|---|--------|----------|-------|---|---------------------------|--|
| ヒトiPS細胞凍結バイアル | | | | | | |
| ヒトiPS細胞用培地 | | | wash用 | 10mL | SOP- 使用期限は4℃ 保管で1週間 | |
| | | | 播種用 | 8mL×フ ラスコ数 | | |
| ヒトリコンビナントFGF-2 (10µg/ml) | 片山化学工業 | 16100102 | | SOP-PB-M-22 解凍後4℃保管 で使用期限は2 週間 | | |
| ヒトiPS細胞用培地置換済み MEF播種25cm ² フラスコ | | | | SOP-CS-D-01 | | |
| 15mL遠心管 | | | | | | |
| 先トランスファーピペット | BMBio | 300-S | | | | |
| 吸引用パスツールピペット | | | | | | |
| 各種滅菌ピペット | | | | | | |
| 各種滅菌ピペットチップ | | | | | | |
| パラフィルム | | | | | | |
| ピペットエイド | | | | | | |
| ピペットマン | | | | | | |
| 37℃恒温槽 | | | 1台 | | | |
| 37℃、5%CO ₂ インキュベーター | | | 1台 | | | |
| 遠心機 | | | 1台 | | | |
| 顕微鏡 | | | 1台 | | | |
| 安全キャビネット | | | 1台 | | | |
| 液体窒素を入れる発砲スチ ロールの箱 | | | 1 | | | |
| 液体窒素 | | | | | | |
| 水 | | | | | | |

独)医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 ヒト幹細胞応用開発室
SOP 培養 iPS細胞解凍 (on MEF)

前準備

| ステップ | 作業場所 | 作業内容 | 備考 | チェック | 所内用 |
|--------------------|--------------|--|---|------|-----|
| | 1 位相差顕微鏡 | ヒトiPS細胞用培地置換済みのMEFの状態を確認する | | | |
| | 2 恒温槽 | 恒温槽を37°Cにセットし、作動させる | | | |
| 培地の準備 1 | 3 | ヒトiPS細胞用培地の容器、15mL遠心管をアルコール噴霧清拭し、安全キャビネットに入れる | ヒトiPS培地の使用期限を確認する | | |
| | 4 安全キャビネット内 | ヒトiPS細胞用培地を必要量分取する(wash用10mL、播種用 8mL×フラスコ数) | | | |
| | 5 | ヒトiPS細胞用培地の容器のフタをきちんとしめ、パラフィルムでシールする | | | |
| | 6 4°C冷蔵庫 | ヒトiPS細胞用培地の容器を直ちに保管場所に戻す | | | |
| | 7 | FGF-2の容器をアルコール噴霧清拭し、安全キャビネットに入れる | FGF-2の使用期限を確認する | | |
| | 8 安全キャビネット内 | 播種用のヒトiPS細胞用培地に、必要量のFGF-2を加える | FGF-2最終濃度 成育医療センター系細胞:10ng/mL 京都大学系細胞:4ng/mL | | |
| | 9 4°C冷蔵庫 | FGF-2を直ちに保管場所に戻す | | | |
| | 10 安全キャビネット内 | 培地入り遠心管のフタをきちんとしめ、パラフィルムでシールする | | | |
| | 11 水中 | 培地入り遠心管を水中に保管する | | | |
| | 凍結バイアル準備 | 12 実験台 | 液体窒素を入れる発砲スチロールの箱に液体窒素を入れる | | |
| 13 ヒトiPS細胞保管用窒素タンク | | ヒトiPS細胞凍結バイアルをタンクから取り出し、液体窒素入りの発砲スチロールに入れる | バイアルのフタが液体窒素につからないようにしておく | | |
| 14 | | 細胞管理ノートに日付と名前を記入する | | | |
| 15 実験台 | | 凍結バイアルの入った液体窒素入りの発砲スチロールを安全キャビネットの近くに置いて準備しておく | | | |
| 培地の準備 2 | 16 恒温槽 | 分取したwash用と播種用のヒトiPS細胞用培地を、37°C恒温槽で5分間温める | ヒトiPS細胞用培地は、5-10分程度温めればよいが、確実に温まっていることを確認する。必要以上に37°C恒温槽に放置しないようにする | | |

独)医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 ヒト幹細胞応用開発室
SOP 培養 iPS細胞解凍 (on MEF)

作業

*一連の作業は15分以内に終了すること

| ステップ | 作業場所 | 作業内容 | 備考 | チェック | 所内用 |
|-------|------|--|---|------|-----|
| 細胞の解凍 | 1 | 恒温槽で加温済みのヒトiPS細胞用培地の入った遠心管(wash用、播種用)の水分を拭き取り、アルコール噴霧清拭し、安全キャビネットに入れる | | | |
| | 2 | 安全キャビネット内 液体窒素から凍結ヒトiPS細胞のバイアルを取り出し、キムワイプで包みアルコールを全体に噴霧清拭し、安全キャビネットに入れる | | | |
| | 3 | wash用遠心管から培地を先太トランスファーピペットで約0.5mL吸引し、凍結バイアルに添加、軽くピettingsし、解凍させた細胞懸濁液を素早くwash用遠心管に回収する | ピettings回数はできるだけ少なくし、一気に解凍し、素早く回収する | | |
| | 4 | 遠心機 80G (700rpm)、室温で2分遠心する | GIに弱い細胞は遠心時間を1分にする | | |
| 細胞の播種 | 5 | iPS細胞用培地置換済みMEF播種フラスコを安全キャビネットに入れる | | | |
| | 6 | 培地置換済みMEF播種フラスコに、細胞株名、ヒトiPSが凍結されているバイアルに記載されている情報に「+1」を加えた経代情報と解凍の日付を記載する | | | |
| | 7 | 遠心後、直ちに遠心管をアルコール噴霧清拭し、安全キャビネットに入れる | | | |
| | 8 | ペレットを吸わないように、上清を吸引除去する | | | |
| | 9 | 安全キャビネット内 ペレットを軽く3回タッピングする | ほぐれていることを確認する | | |
| | 10 | 播種用培地をピペットで吸い上げ、ペレットに優しく加えてヒトiPS細胞懸濁液を作製する | | | |
| | 11 | iPS細胞用培地置換済みMEFのフラスコの培地を吸引除去する | | | |
| | 12 | ヒトiPS細胞懸濁液を8mL/フラスコで播種する(*1) | 懸濁操作は、コロニーが底に沈んでいる場合は、懸濁液の上清をピペットで取り、底にゆるやかに吹きかけて、底にあるコロニーを浮かせ上げる(コロニーを直接吸引排出すると、コロニーが必要以上に小さくなる) | | |
| | 13 | 位相差顕微鏡 顕微鏡でコロニーの状態(大きさ、分散状態)を確認する | | | |

独)医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 ヒト幹細胞応用開発室
SOP 培養 iPS細胞解凍 (on MEF)

| | | | | | |
|--|------------------------------------|--|--|--|--|
| | CO ₂ イン 14 キュベ ター | 軽く揺すり均一にしてCO ₂ 濃度5%の インキュベーターに2日以上静置す る | 細胞が均一に分布す るよう、静置する前 に容器を斜め20°くら いに傾けて前後にゆす り、浮遊液が動いてい る状態で素早く静置す る | | |
|--|------------------------------------|--|--|--|--|

(*1) 6well plateの場合は5mL/wellで播種する

別添2 ヒト iPS 細胞培養の作業手順書 (SOP) 凍結作業

独)医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 ヒト幹細胞応用開発室
SOP 培養 iPS細胞凍結 (on MEF)

目的

ヒトiPS細胞を緩慢法で凍結保存する

使用試薬・器具

| | メーカー | カタログ番号 | 必要量 | 備考 | チェック |
|-------------------------------|--------|-----------|---------|-----------------------------------|------|
| ヒトiPS細胞培地 | | | | SOP- 使用期限は4℃ 保管で1週間 | |
| ヒトリコンビナントFGF-2(10μg/ml) | 片山化学工業 | | | SOP-PB-M-22 解凍後4℃保管 で使用期限は2 | |
| Disapase | Roche | | 1mL | SOP-PB-M-02 | |
| DMEM High Glucose | GIBCO | 11965-092 | 9mL(*1) | | |
| Dimethyl sulfoxide (DMSO) | | | | | |
| セルスクレーパー | | | | | |
| 15mL遠心管 | | | | | |
| 50mL遠心管 | | | | | |
| 滅菌ガラスバスタービベット | | | | | |
| アスピレーションビベット | | | | | |
| 各種滅菌ビベット | | | | | |
| 各種滅菌ビベットチップ | | | | | |
| 1000μLゲノム用マイクロビベットチップ (先太) | | | | | |
| 超低温細胞保存用チューブ | | | | | |
| 超低温細胞保存用チューブ用ラベル | | | | | |
| 緩慢冷却容器 | | | | | |
| ビベットエイド | | | | | |
| ビベットマン | | | | | |
| 金属製ラック | | | | | |
| パラフィルム | | | | | |
| 37℃恒温槽 | | | 1台 | | |
| 37℃、CO ₂ インキュベーター | | | 1台 | | |
| 遠心機 | | | 1台 | | |
| 位相差顕微鏡 | | | 1台 | | |
| 安全キャビネット | | | 1台 | | |
| ストップウォッチ | | | 1 | | |
| 水 | | | | | |
| -80℃ディープフリーザー | | | | | |
| 液体窒素タンク | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

(*1) DisapaseのLotによって7-12mL必要の場合がある

独) 医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 ヒト幹細胞応用開発室
SOP 培養 iPS細胞凍結 (on MEF)

前準備1 緩慢冷却容器、チューブラベル

| ステップ | 作業場所 | 作業内容 | 備考 | チェック | 所内用 |
|------|--------|-----------------------------|-----------------------------|------|-----|
| 1 | 4°C冷蔵庫 | 緩慢冷却容器を必要個数4°C冷蔵庫に入れて冷却しておく | 凍結前日までに準備しておく | | |
| 2 | ラベル印刷機 | 超低温細胞保存チューブのラベルを必要枚数準備する | 細胞名、継代数、ロットNo.(凍結日)、作製者名を記載 | | |

前準備2 超低温細胞保存チューブ

| ステップ | 作業場所 | 作業内容 | 備考 | チェック | 所内用 |
|-------------|-----------|--------|---|------|-----|
| 細胞保存チューブの準備 | 安全キャビネット内 | 1 | チューブに貼るラベル、金属製のラック、超低温細胞保存チューブを外袋ごとアルコールで噴霧拭拭し、安全キャビネットへ入れる | | |
| | | 2 | 超低温細胞保存チューブを必要な本数を出しラベルする | | |
| | | 3 | 超低温細胞保存チューブを金属製のラックに立てる | | |
| | 4 | 4°C冷蔵庫 | 金属製のラックごと超低温細胞保存チューブを4°Cで冷やしておく | | |

前準備3 機器準備、写真撮影、細胞の確認、培地・凍結用培地の準備

| ステップ | 作業場所 | 作業内容 | 備考 | チェック | 所内用 |
|------------|-----------|--------------------------|---|--|-----|
| | 1 | 作業台 | 氷を準備しておく | | |
| | 2 | 遠心機 | 遠心機を4°Cに冷却しておく | | |
| 写真撮影と細胞の確認 | 位相差顕微鏡 | 3 | 凍結するiPS細胞を位相差顕微鏡で写真撮影する | 代表的なコロニーと悪いコロニー(分化したコロニー、形態がよくないコロニー)(弱拡大+強拡大) | |
| | | 4 | 位相差顕微鏡下の観察あるいは目視で、分化しているコロニーの取り除く箇所をマジックで丸く囲む | | |
| | 5 | CO ₂ インキュベーター | iPS細胞をCO ₂ インキュベーターに戻す | | |
| デイスパーゼの | 安全キャビネット内 | 6 | DMEM-High-Glucoseの容器、分注凍結済みのDispaseの容器をアルコール噴霧拭拭し、安全キャビネットへ入れる | | |
| | | 7 | 分注凍結してあるDispase溶液1mLにDMEM-High-Glucoseを9mL添加して10mLにfull upし、0.1%溶液とする | DispaseのLotによってDMEM-High-Glucoseを7-12mL添加する | |

独)医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 ヒト幹細胞応用開発室
SOP 培養 iPS細胞凍結 (on MEF)

| | | | | | | |
|----------|----|--------------------------------|---|---|--|--|
| 調製 | 8 | 水中 | 調製したDispaseを使用するまで、水中で保管する | 分注冷凍Dispaseは SOP-PB-M-02参照 調製した0.1%Dispase は3日間使用可能 | | |
| | 9 | 安全キャビ ネット内 | ヒトiPS用培地の容器、遠心管をアルコールで噴霧清拭し、安全キャビネットへ入れる | ヒトiPS培地の使用期限を確認する | | |
| | | | 15mL遠心管にwash用ヒトiPS培地を10mL分取する | 以下培地1とする | | |
| | | | 50mL遠心管にヒトiPS培地(凍結用)を必要量分取する | 以下培地2とする | | |
| | 12 | 4°C冷蔵庫 | ヒトiPS用培地の容器を4°C冷蔵庫へ戻す | | | |
| | 13 | 安全キャビ ネット内 | 培地1の遠心管のフタをきちんとしめ、パラフィルムでシールする | | | |
| | 14 | 水中 | 培地1を水中で保管する | | | |
| 凍結用培地の準備 | 15 | 安全キャビ ネット内 | FGF-2の容器をアルコール噴霧清拭し、安全キャビネットに入れる | FGF-2の使用期限を確認する | | |
| | 16 | | 培地2にFGF-2を添加する | FGF-2最終濃度 成育医療センター系細胞: 10ng/mL 京都大学系細胞: 4ng/mL | | |
| | 17 | 4°C冷蔵庫 | FGF-2を保管場所に戻す | | | |
| | 18 | 安全キャビ ネット内 | 培地2の遠心管のフタをきちんとしめ、パラフィルムでシールする | | | |
| | 19 | 水中 | 培地2を水中で冷却する | | | |
| | 20 | 安全キャビ ネット内 | 十分に冷却した培地2の遠心管、DMSOの入った容器をアルコール噴霧清拭し、安全キャビネットへ入れる | 培地にDMSOを入れると熱が発生するため、培地を十分冷却してからDMSOを添加する | | |
| | 21 | | 培地2にDMSOを最終濃度10%になるように添加する | 以下凍結用培地とする | | |
| 22 | | 素早く凍結用培地入り遠心管のフタをきちんとしめ水中で冷却する | DMSOを添加すると熱が発生するので、すぐに水中に入れて冷却する | | | |

独)医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 ヒト幹細胞応用開発室
SOP 培養-iPS細胞凍結 (on MEF)

| | | | | | |
|----|----|---------------------------------------|--|--|--|
| 23 | 水中 | 凍結用培地の遠心管のフタの部分をパラフィルムでシールして水中で保管しておく | | | |
|----|----|---------------------------------------|--|--|--|

作業

*一連の操作は15分以内に終了すること

| ステップ | 作業場所 | 作業内容 | 備考 | チェック | 所内用 |
|------|--------------------------|---|---|------|-----|
| 1 | 安全キャビネット内 | スクレーパー、培地1の遠心管、水中のDispaseの入った容器をアルコール噴霧拭拭し、安全キャビネットに入れる | | | |
| 2 | | 凍結する細胞をCO ₂ インキュベーターから安全キャビネットに移す | | | |
| 3 | | 丸く困った箇所を滅菌ガラスパスツールピペットを用いて吸引除去する | 細胞が乾かないように注意する | | |
| 4 | | 細胞の既存培地を吸引除去する | | | |
| 5 | | よく懸濁したDispaseを1mL入れ、細胞になじませる | | | |
| 6 | | ストップウォッチをスタートさせる | DispaseのLot、細胞株によって、時間は変化するが、1-10分間にする | | |
| 7 | CO ₂ インキュベーター | CO ₂ インキュベーターに入れる | 細胞、MEFの状態、DispaseのLot、作成・調製後経過時間等によりDispaseの処理時間は変わってくるが、10分以上は処理しない | | |
| 8 | 位相差顕微鏡 | Dispase処理後、位相差顕微鏡で細胞の状態を確認する | コロニー周辺が光って、コロニーの外周の1/3程度がカールしている状態でDispaseを取り除く | | |
| 9 | 安全キャビネット内 | 素早く細胞を安全キャビネットに移す | | | |
| 10 | | 素早くDispaseを吸引除去する | | | |
| 11 | | 培地1を7mL添加する | | | |
| 12 | | セルスクレーパーでコロニーを大きく剥離する | 細胞を乾かさないように、培地に浸っている状態で、確実に細胞がはがれるように、スクレーパーをプラスチック表面に強く斜めに押し付ける 同じ箇所を再度スクレーブしない | | |

独)医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 ヒト幹細胞応用開発室
SOP 培養 iPS細胞凍結 (on MEF)

| | | | | | | |
|--------|-----------|--|---|---|--|--|
| | 13 | | コロニーを砕かないように、コロニー懸濁液を優しく回収し、新しい15mL遠心管に加える | | | |
| 細胞凍結作業 | 14 | 安全キャビネット内 | 残った培地1をすべて取り、コロニーを砕かないようにフラスコに残った細胞を優しく回収し、13の遠心管に加える | | | |
| | 15 | 遠心機 | 20G (300rpm)、4°Cで2分遠心する | 細胞株、細胞の状態によって変わるGに弱い細胞は遠心時間を1分にする | | |
| | 16 | 安全キャビネット内 | 水中の凍結用培地入り遠心管をアルコール噴霧拭拭し、安全キャビネットに入れる | 遠心している間に行う | | |
| | 17 | | 遠心後、遠心管をアルコール噴霧拭拭し、安全キャビネットに入れる | | | |
| | 18 | | ペレットを吸わないように、上清を吸引除去する | | | |
| | 19 | | ペレットがほぐれる程度に軽く3回ほどタッピングする | 細胞が多い場合はタッピングの回数を増やす | | |
| | 20 | | 凍結用培地を入れ、細胞懸濁液を作製する | | | |
| | 21 | 水中 | すぐに水中に入れる | 細胞を凍結用培地に入れたら熱が発生するため、すぐに水中に入れて2~5分冷却する | | |
| | 22 | 安全キャビネット内 | 細胞懸濁液を新しい50mL遠心管へ移す | マイクロピペットで細胞を分注しやすいように径の太い遠心管を使用する | | |
| | 23 | 水中 | すぐに水中に入れる | | | |
| 24 | 安全キャビネット内 | 冷却しておいた超低温細胞保存チューブを安全キャビネットへ入れ蓋をあけておく | | | | |
| 25 | | 先太のゲノム用マイクロピペットチップを使用し、超低温細胞保存用チューブに0.25mLずつ、凍結用細胞液を手早く入れる | | | | |
| 26 | 水中 | 蓋をしめて直ちに超低温細胞保存チューブを水中に入れる | | | | |
| 保存 | 27 | -80°Cディープフリーザー | 直ちに4°Cに冷却しておいた緩慢凍結容器に入れて、-80°Cディープフリーザーへ入れる | | | |
| | 28 | 液体窒素タンク | 翌日、液体窒素タンクへ移して保存する | | | |

別添3 ヒト iPS 細胞培養の作業手順書 (SOP) 継代作業

独)医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 ヒト幹細胞応用開発室
SOP 培養 iPS細胞継代 (on MEF)

目的

ヒトiPS細胞の継代を行う

使用試薬・器具

| | メーカー | カタログ番号 | 必要量 | | 備考 | チェック |
|---|--------|-----------|----------|-----------|-------------------------------------|------|
| | | | | | | |
| ヒトiPS細胞培地 | | | wash用 | 10mL | SOP- 使用期限は4℃保 管で1週間 | |
| | | | 懸濁用 | | | |
| | | | 播種用 | 8mL×フラスコ数 | | |
| ヒトリコンビナントFGF-2 (10μg/ml) | 片山化学工業 | | | | SOP-PB-M-22 解凍後4℃保管で 使用期限は2週間 | |
| Dispase | | | 1mL | | SOP-PB-M-02 | |
| DMEM High Glucose | GIBCO | 11965-092 | 9mL (*1) | | | |
| ヒトiPS細胞用培地置換 済みMEF播種25cm ² フラ スコ | | | | | SOP-CS-D-01 | |
| セルスクレーパー | | | 1本 | | | |
| 15mL遠心管 | | | | | | |
| 滅菌ガラスバスツールピ ベット | | | | | | |
| 10mL滅菌ピベット | | | | | | |
| 各種滅菌ピベットチップ | | | | | | |
| パラフィルム | | | | | | |
| ピベットエイド | | | | | | |
| ピベットマン | | | | | | |
| 37℃恒温槽 | | | 1台 | | | |
| 37℃、5% CO ₂ インキュ ベーター | | | 1台 | | | |
| 遠心機 | | | 1台 | | | |
| 位相差顕微鏡 | | | 1台 | | | |
| 安全キャビネット | | | 1台 | | | |
| 水 | | | | | | |
| ストップウォッチ | | | 1 | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

(*1)DispaseのLotによって7-12mL必要の場合がある

独) 医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 ヒト幹細胞応用開発室
SOP 培養 iPS細胞継代 (on MEF)

前準備

| ステップ | 作業場所 | 作業内容 | 備考 | チェック | 所内用 |
|------------|-----------|---|---|--|-----|
| 写真撮影と細胞の確認 | 1 | 位相差顕微鏡 | ヒトiPS細胞用培地置換済みのMEFの状態を確認する | | |
| | 2 | 位相差顕微鏡 | 継代するiPS細胞を位相差顕微鏡で写真撮影する | 代表的なコロニーと悪いコロニー(分化したコロニー、形態がよくないコロニー)(弱拡大+強拡大) | |
| | 3 | | 位相差顕微鏡下の観察あるいは目視で、分化しているコロニーの取り除く箇所をマジックで丸く囲む | | |
| | 5 | CO ₂ インキュベーター | 継代するiPS細胞をCO ₂ インキュベーターに戻す | | |
| | 6 | 安全キャビネット内 | ヒトiPS細胞用培地置換済みMEF播種フラスコをCO ₂ インキュベーターから安全キャビネットへ移す | | |
| | 7 | | ヒトiPS細胞用培地置換済みMEF播種フラスコに細胞名、継代数、継代日、播種濃度を記入する | | |
| | 8 | CO ₂ インキュベーター | CO ₂ インキュベータに戻す | | |
| | ディスプレイの調製 | 9 | 安全キャビネット内 | DMEM-High-Glucoseの容器、分注凍結済みのDispaseの容器をアルコール噴霧清拭し、安全キャビネットへ入れる | |
| 10 | | 分注凍結してあるDispase溶液1mLにDMEM-High-Glucoseを9mL添加して10mLにfull upし、0.1%溶液とする | | DispaseのLotによってDMEM-High-Glucoseを7-12mL添加する | |
| 11 | | 水中 | 調製したDispaseを使用するまで、水中で保管する | 分注冷凍DispaseはSOP-PB-M-02参照調製した0.1%Dispaseは3日間使用可能 | |
| 培地の準備 | 12 | 安全キャビネット内 | 15mL遠心管、ヒトiPS細胞用培地の容器をアルコール噴霧清拭し、安全キャビネットに入れる | ヒトiPS細胞用培地の使用期限を確認する | |
| | 13 | | 15mL遠心管にwash用ヒトiPS培地を10mL分取する | | |
| | 14 | | wash用培地入り遠心管のフタをきちんとしめて、パラフィルムでシールする | | |
| | 15 | | 水中 | wash用培地は水中で保管する | |
| | 16 | 安全キャビネット内 | 15mL遠心管にヒトiPS培地(懸濁用、播種用)を必要量分取する | | |
| | 17 | | ヒトiPS培地の容器のフタをきちんとしめ、パラフィルムでシールする | | |
| | 18 | 4℃冷蔵庫 | ヒトiPS培地の容器を直ちに保管場所に戻す | | |

独)医薬基盤研究所 難病・疾患資源研究部 ヒト幹細胞応用開発室
SOP 培養 iPS細胞継代 (on MEF)

| | | | | | |
|----|-----------|---|--|--|--|
| 19 | | FGF-2の容器をアルコール噴霧清拭し、安全キャビネットに入れる | FGF-2の使用期限を確認する | | |
| 20 | 安全キャビネット内 | ヒトiPS培地(懸濁用、播種用)にFGF-2を添加する | FGF-2最終濃度 成育医療センター系細胞: 10ng/mL 京都大学系細胞: 4ng/mL | | |
| 21 | 4°C冷蔵庫 | FGF-2を保管場所に戻す | | | |
| 22 | 安全キャビネット内 | 培地入り(懸濁用、播種用)遠心管のフタをきちんとして、パラフィルムでシールする | | | |
| 23 | 水中 | 培地(懸濁用、播種用)を氷中で保管する | | | |

作業

* 一連の操作は15分以内に終了すること

| ステップ | 作業場所 | 作業内容 | 備考 | チェック | 所内用 |
|------|--------------------------|---|--|------|-----|
| 2 | 恒温槽 | 1 恒温槽を37°Cにセットし、作動させる | | | |
| | | 2 分取済み各培地(wash用、懸濁用、播種用)を使用時に5分間恒温槽で加温する | 培地は、5-10分程度温めればよいが、確実に温まっていることを確認する 必要以上に37°C恒温槽に放置しないようにする | | |
| 3 | 安全キャビネット内 | 3 スクレーパー、恒温槽で加温したwash用培地入り遠心管、氷中のDispaseの容器をアルコール噴霧清拭し、安全キャビネットに入れる | | | |
| | | 4 継代する細胞をCO ₂ インキュベーターから安全キャビネットに移す | | | |
| | | 5 丸く囲った箇所を、滅菌ガラスバスターールピペットを用いて吸引除去する | 細胞が乾かないように注意する | | |
| | | 6 継代する細胞の既存培地を吸引除去する | | | |
| | | 7 よく懸濁したDispaseを1mL入れ、細胞になじませる | | | |
| 8 | | ストップウォッチをスタートさせる | DispaseのLot、細胞株によって、時間は変化するが、1-10分間にする | | |
| 9 | CO ₂ インキュベーター | CO ₂ インキュベーターに入れる | 細胞、MEFの状態、DispaseのLot、作成・調製後経過時間等によりDispaseの処理時間は変わってくるが、10分以上は処理しない | | |

独) 医業基盤研究所 難病・疾患資源研究部 ヒト幹細胞応用開発室
SOP 培養 iPS細胞継代 (on MEF)

| | | | | | | | |
|-------|----|-----------------------------------|---|---|-----------------------------------|--|--|
| 細胞の継代 | 10 | 位相差顕微鏡 | Dispase処理後、位相差顕微鏡で細胞の状態を確認する | コロニー周辺が光って、コロニーの外周の1/3程度がカールしている状態でDispaseを取り除く | | | |
| | 11 | 安全キャビネット内 | 素早く細胞を安全キャビネットに移す | | | | |
| | 12 | | 素早くDispaseを吸引除去する | | | | |
| | 13 | | 加温したwash用培地を7mL添加する | | | | |
| | 14 | | セルスクレーパーでコロニーを大きく剥離する | 細胞を乾かさないうちに、培地に浸っている状態で、確実に細胞がはがれるように、スクレイパーをフラスコ表面に強く斜めに押し付ける同じ箇所を再度スクレイプしない | | | |
| | 15 | | コロニーを碎かないように、コロニー懸濁液を優しく回収し、新しい遠心管に加える | | | | |
| | 16 | | 残ったwash用培地をすべて取り、コロニーを碎かないようにフラスコに残った細胞を優しく回収し、15の遠心管に加える | | | | |
| | 17 | | 遠心機 | 20G (300rpm)、室温で2分遠心する | 細胞株、細胞の状態によって変わるGに弱い細胞は遠心時間を1分にする | | |
| | 18 | | 安全キャビネット内 | 恒温槽で加温した懸濁用、播種用培地入り遠心管をアルコール噴霧清拭し、安全キャビネットに入れる | 遠心している間に行う | | |
| | 19 | | | ヒトiPS細胞用培地置換済みMEF播種フラスコをCO ₂ インキュベーターから安全キャビネットに移す | | | |
| | 20 | | | 遠心後、遠心管をアルコール噴霧清拭し、安全キャビネットに入れる | | | |
| | 21 | | | ペレットを吸わないように、上清を吸引除去する | | | |
| | 22 | | | 軽く2回ほどタッピングする | | | |
| | 23 | | | 10mLピペットで懸濁用培地を加え、2回大きくピペッティングし、細胞懸濁液を作製する | | | |
| | 24 | 必要量の細胞懸濁液を取り、加温した播種用培地に加える | | | | | |
| | 25 | iPS細胞用培地置換済みMEF播種フラスコの既存培地を吸引除去する | | | | | |