

# ガラス化法凍結 (Vitrification method) ヒト iPS・ヒト ES 細胞の取り扱い

**<通常の細胞とは全く異なる方法で保存した細胞です。細胞使用前に、この注意書きを必ずお読みください>**

## 【ガラス化法について】

当室では「**ガラス化法 (Vitrification method)**」で凍結したヒト iPS (ES) 細胞も取り扱っております。これらは、細胞凍結で一般的に用いられている「**緩慢冷却法**」とは凍結及び融解の手順が大きく異なりますので、本紙をご一読いただき、操作を十分に理解された上で、融解作業を行ってください。

尚、当室ホームページに「**ガラス化法を用いた細胞の融解・凍結方法**」の**動画を公開**しておりますのでご参照ください。<https://cell.brc.riken.jp/ja/manual/vitrification>

## 運搬上の注意 (重要)

- ・ガラス化法で凍結した細胞の送付には、約 $-80^{\circ}\text{C}$ のドライアイスではなく、**約 $-170^{\circ}\text{C}$ 以下での発送が可能なドライシッパー**を使用しています。  
※気相保存ですので、ドライシッパー本体内部に液体窒素は入っておりません。
- ・凍結チューブ内の凍結保存液は液量が少なく ( $200\ \mu\text{l}$ )、融点が低いため ( $-65^{\circ}\text{C}$ 前後)、凍結チューブの温度が $-140^{\circ}\text{C}$ 以上に上がらないよう注意してください。  
※保管場所から作業用のクリーンベンチに運ぶ際は、**たとえ近距離であっても液体窒素を用いて確実に冷却した状態で運んでください。**

## 【凍結チューブ取り扱い上の注意】

- ・凍結チューブは破裂する可能性がありますので、取り扱われる際 (取り出しや保管、融解等) には手袋とフェイスガードを着用してください。
- ・作業中の温度変化により、凍結チューブの蓋が緩む可能性がありますので、蓋が緩んでいないことを確認し、充分注意して作業を行ってください。
- ・凍結チューブは $-140^{\circ}\text{C}$ 以下のフリーザーもしくは**液体窒素タンク (気相)**での保管をお願いします。液相中での保管は液体窒素がチューブ内部へ浸入する可能性があるため避けてください。
- ・受取り後、上記のような保管場所がなければ、ドライシッパー内で1~2日程度の保管は可能です。

## 【送付された凍結チューブの取り出し】

- (1) 液体窒素を入れた容器 (発砲スチロール等) を準備する。
- (2) 「天地無用」のシールを剥がし、輸送用ハードケースの上蓋を開ける。  
結束バンドを切断し、ドライシッパーの蓋を開ける。(図1参照)
- (3) ドライシッパー内のキャニスターに凍結チューブが入っていますので、**液体窒素を入れた容器に取り出し、チューブ下部を液体窒素に浸けた状態でビニールを切って凍結チューブを取り出す。**(図2参照)

**※ 危険ですので、ドライシッパー本体は上下をひっくり返さないでください。**



図1. 発送容器

ドライシッパーを輸送用ハードケースから取り出したり、キャニスター以外の内部部品を取り外したりしない

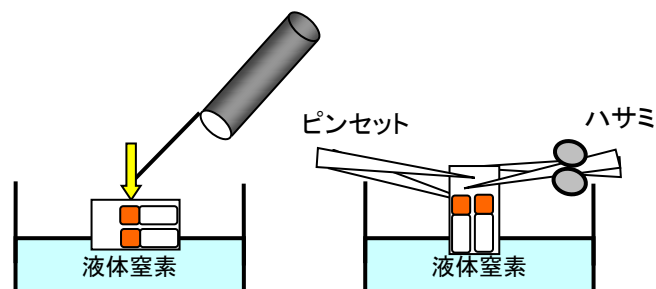


図2. 凍結チューブの取り出し方法

キャニスターを液体窒素の入った容器上でひっくり返して凍結チューブを取り出し、チューブ下部を浸けた状態でビニールのシール部分を切る

## 【融解及び培養方法】

培養を開始前に、当室ホームページの「細胞詳細情報」及び細胞発送時に同梱の「データシート」に記載の培養方法をご確認ください。

### 融解上の注意点（重要）

- ・ガラス化法は凍結保存液の毒性が非常に高く、細胞が作業中に融解した高濃度の凍結保存液に触れる時間ができる限り短くなるように急速に融解し、培地で希釈することが重要です。
- ・液体状態の保存液に触れると、細胞は1分程度でほとんどが死滅してしまいます。凍結チューブを液体窒素から取り出してから、培地に戻すまでの操作を目安として30～40秒程度で行って下さい。

### 準備するもの

- ・ヒト iPS (ES) 細胞の凍結チューブ（ガラス化法で凍結したもの）
- ・フィーダー細胞を播種した培養ディッシュ  
（融解後のヒト iPS (ES) 細胞を播種するため、各細胞株指定のものをデータシート記載の播種密度に従って 60 mm dish 2 枚＋予備 1 枚を準備しておく）
- ・ヒト iPS (ES) 細胞の培養培地（各細胞株に応じた指定の培地）
- ・液体窒素を入れた容器（凍結細胞の移動に使用）
- ・ピンセット（液体窒素からの凍結チューブ取り出しに使用）
- ・凍結チューブ立て
- ・15 ml 遠心チューブ
- ・1000  $\mu$ l マイクロピペット及びチップ
- ・その他、培養操作に必要な器具

### 操作手順

- (1) 15 ml 遠心チューブに培養培地を 10 ml 入れ、パラフィルムをしてウォーターバスで 37°C に温めておきます。
- (2) 凍結チューブを保管場所から液体窒素を入れた容器に移し、冷却した状態でクリーンベンチまで運びます。
- (3) 融解直前まで 37°C に温めておいた培地をクリーンベンチ内に入れ、融解操作を開始します。
- (4) ピンセットで凍結チューブを液体窒素から取り出し、必ず温めた培地 1 ml を 1000  $\mu$ l マイクロピペットで細胞凍結液に全量を吹きつけるように大きく 10 回程度ピペッティングを行い、完全に融解後、すぐに細胞懸濁液を (3) の温めた培地に戻します。

注) 凍結チューブを液体窒素から取り出してから、培地に戻すまでの操作をできるだけ迅速に行ってください。目安は 30～40 秒程度。

注) このステップで、冷めた培地の使用、不十分なピペッティング等の要因により、再凍結が起きると生存率が著しく低下します。

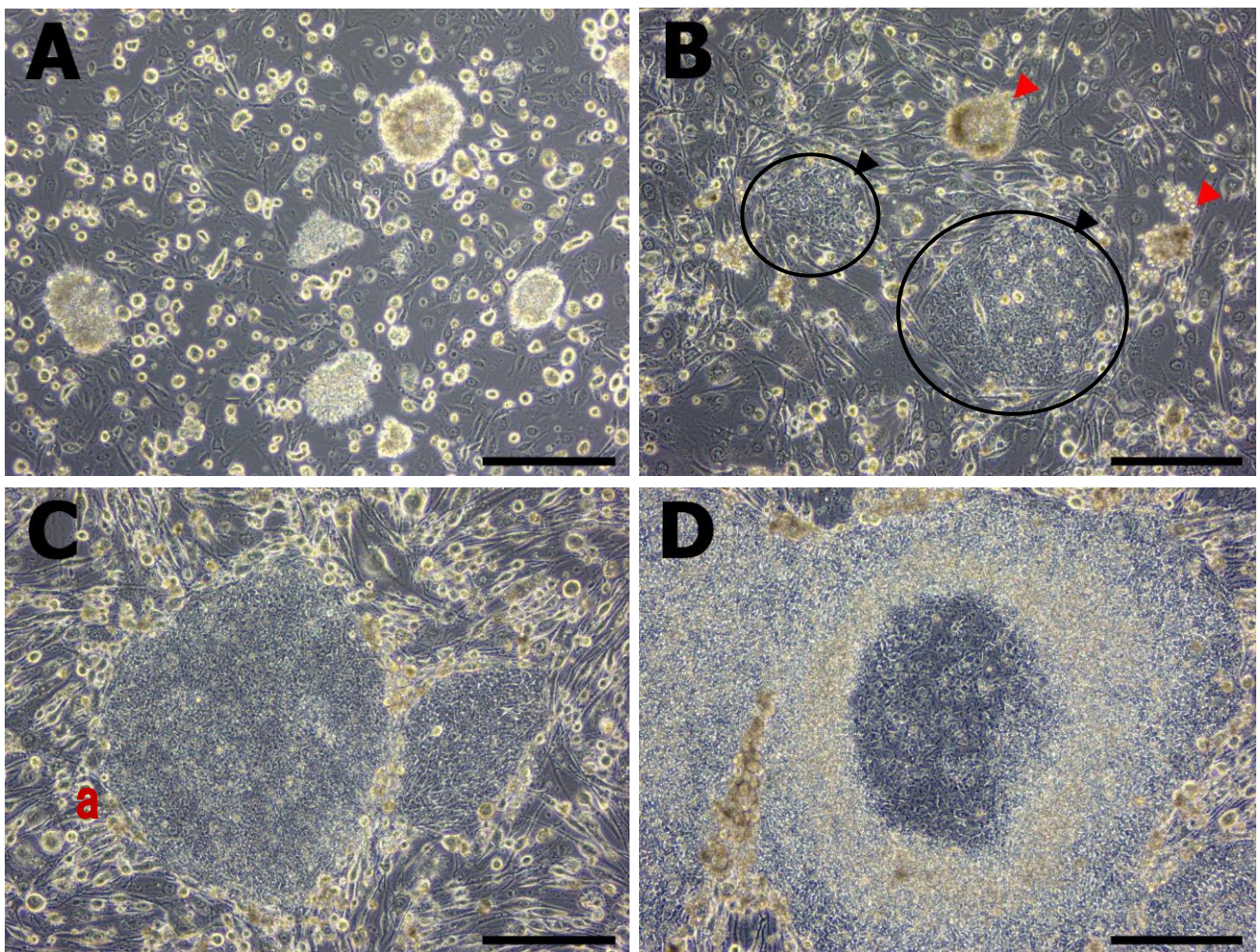
(5) 200xG (1,000 rpm)、室温、3分間遠心します。

(6) 上清を除き、培養培地 4~5 ml に懸濁後、用意しておいたフィーダー細胞の培養ディッシュに播種して培養を開始します。(凍結チューブ1本に対して 60 mm dish 1~2枚)

(7) 培養中は毎日培地交換と観察を行います。

注) 融解翌日に細胞塊が浮遊していることがありますが、60mm dish 全体で数十個程度のコロニーの接着が確認できます。接着しているコロニー数が少なく、浮遊しているヒト iPS(ES) 細胞の細胞塊が多い場合は、上清を遠心して取り除き、細胞を新しい培地に懸濁後、元のディッシュに播き直してください。

(8) ディッシュ全体の 7~8 割のコロニーが **a** (図 3-C 参照) のようになり、分化を始める前に継代操作を行います。継代時に使用するフィーダー細胞を忘れないように準備しておきます。



スケールバー 200 μm

図 3. A 融解直後のヒト iPS(ES) 細胞  
B 融解翌日のコロニー (接着したコロニー (黒) と浮遊している細胞塊 (赤) )  
C 融解後、3 日目のコロニー (**a** のようなコロニーがディッシュ全体の 7~8 割になったら継代)  
D 中心部が分化したコロニー

【特許番号】 特許 4317337 号、PCT/JP2004/016167

関連製品 霊長類 ES 細胞剥離液 (RCHEFM002)

霊長類 ES 細胞用凍結保存液 (RCHEFM001)

[ホームページ]

RIKEN BRC CELL BANK

<https://cell.brc.riken.jp/ja/>

[お問い合わせ先]

提供依頼等 : [cellbank.brc@riken.jp](mailto:cellbank.brc@riken.jp)

細胞材料、培養等 : [cellqa.brc@riken.jp](mailto:cellqa.brc@riken.jp)

請求書、支払い等 : [brc-front@brc.riken.jp](mailto:brc-front@brc.riken.jp)

理化学研究所

バイオリソース研究センター

細胞材料開発室

〒305-0074

茨城県つくば市高野台 3-1-1

FAX 029-836-3611