

ヒトiPS細胞用未分化維持培地 ciKIC[®] iPS medium

取扱説明書

目次

- | | | |
|----|-------------------|----|
| 1. | はじめに | 1 |
| 2. | 製品特長 | 1 |
| 3. | 製品形態 | 2 |
| 4. | 培地の調製方法 | 2 |
| 5. | プロトコール | |
| | 培養の流れ | 3 |
| | 細胞の培養方法 | 4 |
| | 細胞の凍結方法 | 10 |
| | 細胞の解凍方法 | 11 |
| 6. | よくあるご質問 | 13 |
| 7. | 参考文献 | 15 |



1. はじめに

この度は、関東化学の「ciKIC® iPS medium」をご購入頂き誠にありがとうございます。
本製品は、京都大学 高等研究院 物質－細胞統合システム拠点（iCeMS）から技術移転を受けた培地に、
関東化学独自の技術を取り入れた製品です。

■ 使用上の注意

- ・この取扱説明書をよくお読みのうえ、ご使用ください。
- ・本製品は**試験研究用**です。ヒトや動物を対象にした医療や臨床診断の目的では使用しないでください。

■ 目次

製品特長	1
製品形態	2
培地の調製方法	2
プロトコール（培養の流れ）	3
（細胞の培養方法）	4－9
（細胞の凍結方法）	10－11
（凍結保存した細胞の解凍方法）	11－12
よくあるご質問	13－15
参考文献	15

■ 本書の表記について

記号	内容
	注意事項
	ワンポイントアドバイス

2. 製品特長

ciKIC® iPS mediumは、ヒトiPS細胞の未分化性を維持した状態で培養することができるフィーダーフリー用培地です。高い増殖支持能と良好な未分化維持能を示します。また、アルブミン不含で低タンパク質な培地であるため、ロット間差が少なく性能が安定しております。本培地を使用すると、土日（または3連休）の培地交換が不要であり、シングルセルでの継代作業も可能なため、操作性に優れております。

3. 製品形態

製品番号：08371-13	製品名：ciKIC® iPS medium
---------------	-----------------------

構成	容量	保管温度
basal medium	250 mL×1	冷蔵（2～8℃）
Supplement 1	1 mL×1	冷凍（-20℃）
Supplement 2	20 µL×1	冷凍（-20℃）



冷蔵で届いたアルミ袋にbasal medium, 冷凍で届いたアルミ袋にSupplement SetとしてSupplement 1, 2が入っております。ご使用直前までアルミ袋に入れたまま上記保管温度で保管ください。

4. 培地の調製方法

以下の手順に沿って無菌環境下で培地を調製してください。

- ① basal medium 1本に対し、Supplement 1、Supplement 2 を各1本融解する（※1）。
- ② マイクロ遠心機等を用いてSupplement 溶液をスピンドウンする。
- ③ Supplement 1 を全量（1 mL） basal medium に添加後、培地を混和する。
- ④ ③の培地でSupplement 1 の容器を洗いこみ、③の培地に戻す。
- ⑤ Supplement 2 を全量（20 µL） basal medium に添加後、**直ちに**培地を混和する（※2）。
- ⑥ ⑤の培地でSupplement 2 の容器を洗いこみ、⑤の培地に戻す。
- ⑦ 調製した培地は、使い切るまでアルミ袋に入れて冷蔵で保管する。



※1 Supplement 2 は光に不安定な成分を含むため、付属のアルミ袋に入れたまま、室温にて融解してください。

※2 直ちに混和しない場合、不溶物が生じるおそれがあります。但し、不溶物が生じた場合でも性能には影響ありません。また、混和する際に多少泡立っても問題ありません。



調製後の培地はアルミ袋に入れて冷蔵保存し、2週間以内にご使用ください。

5. プロトコール

■ 培養の流れ

0. 事前準備

on feederでのiPS細胞培養  従来の方法で培養してください

1. 細胞の培養

Day 0 手順Ⅰ：プレートのコーティング

 ①と②のどちらか選択可能

①添加法

②プレコート法

手順Ⅱ：ciKIC® iPS mediumへの移行

6 ページ

Day 1・5・6 培地交換

Day 7 手順Ⅲ：継代

 ①と②のどちらか選択可能

①セルスクレーパーを使用する方法

②セルスクレーパーを使用しない

(5 mM EDTA-PBSを使用する) 方法

8-9 ページ

2. 細胞の凍結

-80℃（長期保存時は液体窒素中）で凍結保存

10-11 ページ

3. 凍結保存した細胞の解凍

Day 0 手順Ⅰ：プレートのコーティング

 ①と②のどちらか選択可能

①添加法

②プレコート法

手順Ⅱ：細胞の解凍、播種

6ページ

12ページ

■ 細胞の培養方法

■ 準備するもの



6ウェルプレートでの培養時の方法を紹介します。
培養スケールに合わせて適宜変更してください。

■ 細胞

- ・ 6ウェルプレートで培養した80～90%コンフルエントの on feeder ヒトiPS細胞

■ 試薬

- ・ PBS (-) (滅菌済み)
製品番号 : 49432-80、メーカー / メーカーコード : BioConcept / 3-05F29-I
- ・ 2.4 µg/mL iMatrix-511溶液

試薬	メーカー	メーカーコード	添加量	終濃度
0.5 mg/mL iMatrix-511	マトリクソーム	892012	4.8 µL	2.4 µg/mL
PBS (-)			1 mL	

※プレコート法でプレートをコーティングする際に使用します。
※用時調製してください。

- ・ CTK解離液

試薬	メーカー	メーカーコード	添加量	終濃度
Collagenase IV	Thermofisher	17104-019	100 mg	0.1%
2.5% Trypsin溶液	Thermofisher	15090-046	10 mL	0.25%
KnockOut Serum Replacement	Thermofisher	10828-028	20 mL	20%
CaCl ₂	関東化学	07057-00	11.1 mg	1 mM
PBS (-)			fill up to 100 mL	

※調製した溶液は0.22 µmフィルターでろ過滅菌してください。

- ・ 0.5 × TrypLE Select

試薬	メーカー	メーカーコード	添加量	終濃度
TrypLE Select	Thermofisher	12563-011	50 mL	
0.5 M EDTA溶液 (pH 8.0)	ナカライテスク	06894-14	50 µL	0.25 mM
PBS (-)			50 mL	

- ・ 10 mM Y-27632

試薬	メーカー	製品番号	添加量	終濃度
Y-27632 dihydrochloride	APEX BIO	49030-06 (メーカーコード : A3008-10)	10 mg	10 mM
滅菌水			3.1 mL	

- ・ on feeder 培養用培地

※普段使用されている培地をご用意ください。

- ・ ciKIC® iPS medium

※2ページ目「4. 培地の調製方法」に従って調製済みの培地をご用意ください。

※培地は室温に戻してから使用してください。

試薬	メーカー	メーカーコード	添加量	終濃度
10 mM Y-27632			20 μ L	10 μ M
ciKIC® iPS medium			20 mL	

※用時調製してください。

※培養スケールに応じて調製量は適宜変更してください。

■その他

- ・ セルスクレーパー
- ・ 遠沈管 (15 mL、50 mL)
- ・ ピペット
- ・ ピペットチップ
- ・ 接着細胞用 6ウェルプレート

手順Ⅰ：プレートのコーティング

下記の添加法、プレコート法のいずれかの方法によりプレートをコーティングする。

■ 添加法

- ① 0.5 mg/mL iMatrix-511を、ciKIC® iPS medium (+Y) 2 mL あたり 4.8 μ L添加、混合し、1ウェルあたり2 mLずつ加える（添加量 0.25 μ g/cm²）。
- ② 使用するまで37℃、5% CO₂ in airのインキュベーター内で保存する。



iMatrix-511含有培地を添加した直後から細胞を播種することが可能です。

■ プレコート法

- ① 2.4 μ g/mL iMatrix-511溶液を、1ウェルあたり1 mLずつ加える（添加量：0.25 μ g/cm²）。
- ② 37℃、5% CO₂ in airのインキュベーター内で60 minインキュベートする。
- ③ ウェル内のiMatrix-511溶液を取り除き、ciKIC® iPS medium (+Y) を2 mL加える。
- ④ 使用するまで37℃、5% CO₂ in airのインキュベーター内で保存する。

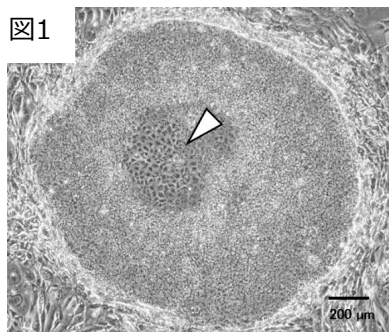
手順Ⅱ：ciKIC® iPS mediumへの移行



下記の培養方法は253G1株、201B7株の培養実績に基づくものです。その他の細胞株を使用する場合は、はじめに最適な継代条件を検討することをお勧めします。

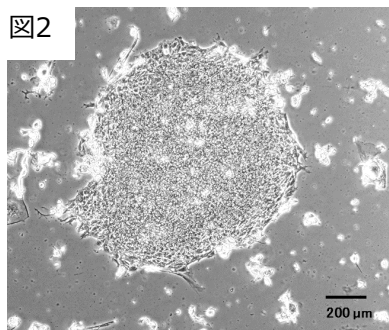
- ① 手順Ⅰ（プレートのコーティング）を行う。
- ② 顕微鏡で細胞を観察する（図1）。分化が進行したコロニーがある場合は、パスツールピペットの先端で分化部分をつついて吸引するなどして取り除く。
- ③ 培地を全量吸引除去する。
- ④ PBS (-) を2 mL加えてウェル全体になじませた後、PBS (-) を全量除去する。
- ⑤ CTK解離液を0.5 mL加えて室温で2～3 min インキュベートする。顕微鏡で観察し、feeder細胞が剥離したことを確認する（図2）。
- ⑥ 剥がれたfeeder細胞ごとCTK解離液を全量吸引して除去する。
- ⑦ PBS (-) を1 mL加えてウェル全体になじませた後、PBS (-) を除去する。この操作をもう一度繰り返す。
※但し、iPS細胞が剥がれそうな場合は、洗浄を1回にとどめる。

図1



on feeder培養したヒトiPS細胞コロニー
中心部（矢印）は分化が進行している。

図2



CTK解離液で処理した後のヒトiPS細胞
コロニー

- ⑧ 0.5×TrypLE Selectを1 mL加えて37℃、5% CO₂ in airのインキュベーターで5 min インキュベートする。
- ⑨ 0.5×TrypLE Selectを除去する。
- ※ iPS細胞が剥離していた場合は、on feeder培養用培地を3 mL加えて15 mL遠沈管 回収し、160×g、4℃で5 min遠心分離する。その後、上清を除去してciKIC® iPS medium (+Y) を2 mL加え、⑬以降の手順を行う。
- ⑩ PBS (-) を2 mL加えてウェル全体になじませた後、PBS (-) を除去する。
- ⑪ ciKIC® iPS medium (+Y) を2 mL加え、セルスクレーパーで細胞を剥離する。
- ⑫ 15 mL遠沈管に細胞を回収し、ピペッティングにより細胞を分散させる。
- ⑬ 細胞懸濁液を一部サンプリングして生細胞数を計測する。
- ⑭ 手順Ⅰであらかじめ培地2 mLを加えたウェルに、50,000 cells/ウェルとなるように 細胞懸濁液を加える。
- ※ 添加量が200 µLを超える場合は、あらかじめウェルから等量の培地を除去する。
- ⑮ プレートを前後左右に何度か動かし、細胞を均一に分散させる。
- ⑯ 37℃、5% CO₂ in airのインキュベーターで培養する。
- ⑰ 翌日より下記培養スケジュールに従って、培地交換または継代（手順Ⅲ）を行う。
培地交換の際は、Y-27632を添加していないciKIC® iPS mediumを用いる。

<培養スケジュール>

Day	1	2	3	4	5	6	7
条件①	○	—	—	—	○	○	P
条件②	○	—	—	○	○	○	P

○：培地交換、P：継代



手順⑭：細胞株によって増殖性が異なるため、はじめに最適な細胞播種数を検討しておくことを推奨します。

手順⑰：細胞株に応じて条件①もしくは条件②を選択してください。253G1株、201B7株については条件①で正常に培養できることを確認済みです。
木曜日に継代を行えば週末（最大3連休）の培地交換が不要です。

手順Ⅲ：継代

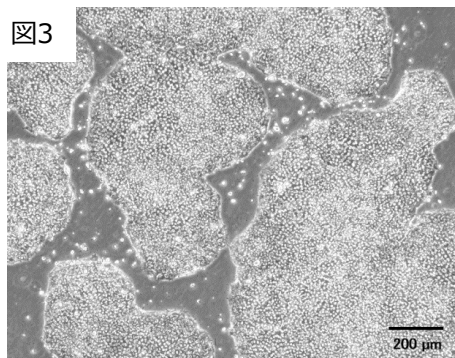


下記の培養方法は253G1株、201B7株の培養実績に基づくものです。その他の細胞株を使用する場合は、はじめに最適な継代条件を検討することをお勧めします。

■ セルスクレーパーを使用する継代方法

- ① 手順Ⅰ（プレートのコーティング）を行う。
- ② 顕微鏡で細胞を観察する（図3）。
- ③ 培地を吸引除去する。
- ④ PBS（-）を2 mL加えてウェル全体になじませた後、PBS（-）を除去する。
- ⑤ 0.5×TrypLE Selectを1 mL加えて37℃、5% CO₂ in airのインキュベーターで5 minインキュベートする。
- ⑥ 0.5×TrypLE Selectを除去する。
- ⑦ PBS（-）を2 mL加えてウェル全体になじませた後、PBS（-）を除去する。
- ⑧ ciKIC® iPS medium（+Y）を2 mL加え、セルスクレーパーで細胞を剥離する。
- ⑨ 15 mL遠沈管に細胞を回収し、ピペッティングにより細胞を分散させる。
- ⑩ 細胞懸濁液の一部をサンプリングして生細胞数を計測する。
- ⑪ 手順Ⅰであらかじめ培地2 mLを加えたウェルに、25,000 cells/ウェル となるように細胞懸濁液を加える。
※ 添加量が200 μ Lを超える場合は、あらかじめウェルから等量の培地を除去する。
- ⑫ プレートを前後左右に何度か動かし、細胞を均一に分散させる。
- ⑬ 37℃、5% CO₂ in airのインキュベーターで培養する。
- ⑭ 翌日より培養スケジュール（6ページ目）に従って、培地交換または継代を行う。
培地交換の際は、Y-27632を添加していないciKIC® iPS mediumを用いる。

図3



ciKIC® iPS mediumで培養した
ヒトiPS細胞の様子



手順⑪：細胞播種数は、on feeder培養からciKIC® iPS mediumへの移行時や細胞解凍時の半数になりますのでご注意ください。

また、細胞株によって増殖性が異なるため、はじめに最適な細胞播種数を検討しておくことを推奨します。

■ セルスクレーパーを使用しない（5 mM EDTA-PBSを使用する）継代方法

- ① 手順 I（プレートのコーティング）を行う。
- ② 顕微鏡で細胞を観察する。
- ③ 培地を吸引除去する。
- ④ PBS（-）を2 mL加えてウェル全体になじませた後、PBS（-）を除去する。
- ⑤ 5 mM EDTA-PBSを1 mL加えて37℃、5% CO₂ in air のインキュベーターで15 min インキュベートする。
- ⑥ ciKIC® iPS medium（+Y）を1 mL加え、ピペッティングにより細胞を剥離、分散させる。
- ⑦ 15 mL遠沈管に細胞を回収し、160×g、4℃で5分間遠心分離する。
- ⑧ 上清を除去し、タッピングする。
- ⑨ ciKIC® iPS medium（+Y）を2 mL加え、ピペッティングにより細胞を分散させる。
- ⑩ 細胞懸濁液の一部をサンプリングして生細胞数を計測する。
- ⑪ 手順 I であらかじめ培地2 mLを加えたウェルに、25,000 cells/ウェル となるように細胞懸濁液を加える。
※ 添加量が200 μLを超える場合は、あらかじめウェルから等量の培地を除去する。
- ⑫ プレートを前後左右に何度か動かし、細胞を均一に分散させる。
- ⑬ 37℃、5% CO₂ in airのインキュベーターで培養する。
- ⑭ 翌日より培養スケジュール（6ページ目）に従って、培地交換または継代を行う。
培地交換の際は、Y-27632を添加していないciKIC® iPS mediumを用いる。



酵素やスクレーパーを使用しないことで細胞に対する物理的なダメージを軽減しつつ、簡便にシングルセル継代を行うことが可能です。

■ 細胞の凍結方法

準備するもの

■ 細胞

- ・ ciKIC® iPS mediumで培養した80～90%コンフルエントのヒトiPS細胞

■ 試薬

- ・ バンバンカー® hRM

メーカー / メーカーコード : GCリンフォテック / CS-07-001

- ・ PBS (-) (滅菌済み)

製品番号 : 49432-80 メーカー / メーカーコード : BioConcept / 3-05F29-I

- ・ 0.5 × TrypLE Select

- ・ 10 mM Y-27632

- ・ ciKIC® iPS medium

- ・ ciKIC® iPS medium (+Y)

調製方法については、
4～5ページをご参照ください。

■ その他

- ・ セルスクレーパー
- ・ 遠沈管 (15 mL)
- ・ ピペット
- ・ ピペットチップ
- ・ クライオチューブ (2.0 mL)

手順

- ① 培地を吸引除去する。
- ② PBS (-) を2 mL加えてウェル全体になじませた後、PBS (-) を除去する。
- ③ 0.5×TrypLE Selectを1 mL加えて37℃、5% CO₂ in airのインキュベーターで5 min インキュベートする。
- ④ 0.5×TrypLE Selectを除去する。
- ⑤ PBS (-) を2 mL加えてウェル全体になじませた後、PBS (-) を除去する。
- ⑥ ciKIC® iPS medium (+Y) を2 mL加え、セルスクレーパーで細胞を剥離する。

- ⑦ 15 mL遠沈管に細胞を回収し、ピペッティングにより細胞を分散させる。
- ⑧ 細胞懸濁液の一部をサンプリングして生細胞数を計測する。
- ⑨ 160×g、4℃で5 min遠心分離する。
- ⑩ 上清を除去し、タッピングする。
- ⑪ 1×10^6 cells/mLとなるようにバンバンカー® hRMを添加する。
- ⑫ クライオチューブに細胞懸濁液1 mLを分注する。
- ⑬ -80℃で凍結保存する。長期間保存する場合には、液体窒素中に移して保存する。

■ 凍結保存した細胞の解凍方法

準備するもの

■ 細胞

- ・ ヒトiPS細胞の凍結ストック

■ 試薬

- ・ PBS (-) (滅菌済み)

製品番号 : 49432-80 メーカー / メーカーコード : BioConcept / 3-05F29-I

- ・ 2.4 µg/mL iMatrix-511溶液
- ・ 10 mM Y-27632
- ・ ciKIC® iPS medium
- ・ ciKIC® iPS medium (+Y)

調製方法については、
4～5ページをご参照ください。

■ その他

- ・ セルスクレーパー
- ・ 遠沈管 (15 mL、50 mL)
- ・ ピペット
- ・ ピペットチップ
- ・ 接着細胞用6ウェルプレート
- ・ ウォーターバス

手順Ⅰ：プレートのコーティング

6ページ目「細胞の培養方法（手順Ⅰ：プレートのコーティング）」に従って、プレートをコーティングする。

手順Ⅱ：細胞の解凍、播種

- ① ウォーターバスを37℃に加温する。
- ② 細胞凍結ストックを取り出し、ウォーターバスで氷塊が少し残る程度まで解凍する。
- ③ 解凍した細胞懸濁液をciKIC® iPS medium（+Y）10 mLを入れた15 mL遠沈管に速やかに回収する。
- ④ 160×g、4℃で5 min遠心分離する。
- ⑤ 上清を除去し、タッピングする。
- ⑥ ciKIC® iPS medium（+Y）を2 mL加え、ピペッティングにより細胞を分散させる。
- ⑦ 細胞懸濁液を一部サンプリングして生細胞数を計測する。
- ⑧ 手順Ⅰであらかじめ培地2 mLを加えたウェルに、50,000 cells/ウェル となるように細胞懸濁液を加える。
- ⑨ プレートを前後左右に何度か動かし、細胞を均一に分散させる。
- ⑩ 37℃、5% CO₂ in airのインキュベーターで培養する。
- ⑪ 翌日より培養スケジュール（6ページ目）に従って、培地交換または継代（7ページ目）を行う。培地交換の際は、Y-27632を添加していないciKIC® iPS mediumを用いる。

6. よくあるご質問

■ 培地について

Q1： 培地の使用期限は？

A1： 未開封の状態では製造後12ヶ月です。製品ラベルに使用期限が記載されておりますので、そちらでご確認いただけます。

Q2： 培地調製後の使用期限は？

A2： 遮光袋に入れて冷蔵保管し、2週間以内にご使用ください。

Q3： 培地調製後の凍結保存は可能ですか？

A3： 凍結保存により性能が落ちる可能性があるため、事前に検討いただくことを推奨いたします。

Q4： 培地は冷蔵庫から取り出してすぐに使えますか？

A4： 室温に戻してから使用してください。

Q5： ciKIC® iPS mediumはゼノフリー（異種動物由来成分不含）ですか？

A5： はい、ゼノフリーです。一部、ヒト由来成分を含みます。

Q6： ciKIC® iPS mediumはカルタヘナ法に該当しますか？

A6： 該当しません。

Q7： ciKIC® iPS mediumは毒劇物指定成分を含みますか？

A7： 含みません。

■ 培養方法について

Q1： コーティング剤には何を使用することができますか？

A1： iMatrix-511（マトリクソーム）の他、BIOLAMININ 521 LN・BIOLAMININ 511 LN（BioLamina）について実績がございます。ビトロネクチン・マトリゲルの使用は推奨しておりません。

Q2： bFGFを別途添加する必要はありますか？

A2： 必要ありません。

Q3 : ciKIC® iPS mediumへの移行方法を教えてください。

A3 : on feeder培養からの移行を推奨しております。他社フィーダーフリー培養用培地から直接移行した場合、分化する細胞が発生しやすい・増殖率がやや劣るなど、培地性能を十分に発揮できないため、推奨しておりません。

Q4 : 凍結保存液には何を使用することができますか？

A4 : バンバンカー® hRM (GC リンフォテック)、STEM CELLBANKER GMP grade (日本全薬工業) について、使用可能であることを確認しています。

Q5 : 毎日の培地交換が必要ですか？

A5 : 必要ありません。継代日をDay 0とした場合、Day1・(Day4・) Day 5・Day 6に培地交換を行ってください。木曜日に継代を行えば、週末(最大3連休)の培地交換を回避できます。

Q6 : 週末の培地交換が不要とのことですが、培地量を増やす必要はありますか？

A6 : 1回の培地添加量を増やす必要はありません。

Q7 : 継代翌日に培地交換が必要である理由を教えてください。

A7 : ROCK inhibitorを細胞に長期間暴露することは推奨されていないため、シングルセル培養の場合、継代翌日の培地交換が必要です。

Q8 : 未分化維持成分を除いて培養を行いたいです。

A8 : サプリメント1・2を添加せずにご使用ください。

■ 培地性能について

Q1 : 培養実績のある細胞株はありますか？

A1 : ヒトiPS細胞の253G1株、201B7株、1201C1株にて培養実績がございます。

Q2 : ES細胞の培養にも使用できますか？

A2 : ES細胞については、KhES-1株にて培養実績がございます。細胞形態、増殖性能、未分化マーカーの発現に問題ないことを確認しています。

Q3 : 増殖性能はどれくらいですか？

A3 : on feeder培養から移行後7日目の時点をDay 0とした場合、28日間の培養で約 10^7 倍に増殖することを確認しています。

Q4 : 多能性について確認していますか？

A4 : 253G1株を用いた実験において、三胚葉への分化を確認しています。

Q5 : 週末に培地交換をしなくても、培養に問題はないのでしょうか？

A5 : 毎日培地交換を行った場合と、週末の培地交換を行わなかった場合を比較し、増殖率・未分化率に差異がないことを確認しています。培地中に含まれるグルコース、乳酸およびアンモニア濃度の変動についても、細胞増殖に影響を与えない範囲であることを確認しています。

Q6 : なぜ週末に培地交換をしなくても大丈夫なのですか？

A6 : 従来のフィーダーフリー用培地に含まれている熱に不安定な成分を、一部低分子化合物に代替しているため、週末に培地交換しなくても安定的に細胞を培養することができます。

Q7 : ロット間差はありますか？

A7 : ciKIC® iPS medium はロット間差の原因となるタンパク質の含量が少なく、その他の成分についてもHPLCで定量して調製しているため、ロット間差は非常に少ないと考えられます。

7. 参考文献

1. Yasuda, Shin-ya, et al., (2018) Chemically defined and growth-factor-free culture system for the expansion and derivation of human pluripotent stem cells. Nature Biomedical Engineering 2, 173-182.
2. 池田達彦, 長谷川光一 (2016) 応用利用に向けた低分子化合物によるヒトiPS細胞の培養. THE CHEMICAL TIMES, 241(3), 7-11.
3. 渡邊剛広, 澤口智哉 (2020) ヒトiPS 細胞用培地「ciKIC™ iPS medium」の開発. THE CHEMICAL TIMES, 256(2), 23-27.

▼ その他、ご不明な点などがございましたら下記へお問合せください。

関東化学株式会社

試薬事業本部 バイオケミカル部

〒103-0022

東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

TEL : 03-6214-1090

HP : <https://www.kanto.co.jp>



関東化学株式会社