

旭硝子中央研究所は、再生医療実現拠点ネットワークプログラム(技術開発個別課題; 再生医療に用いるiPS細胞大量培養プラットフォームの開発)の委託を受け開発を実施しています。

EZSPHERE®を用いたiPS細胞の胚様体培養

EZSPHERE®のウエル内で形成したヒトiPS細胞由来胚様体の生死判定

■細胞種: ヒト由来iPS細胞 (201B7)

■プレ培養: フィーダーレス

- ① Matrigel上に、iPS細胞を播種。(培地: mTeSR1)
- ② 4日後、10 μ M Y-27632にて 1時間処理
- ③ Accutaseにて、iPS細胞をシングルセル化

AGCテクノグラス(株)製品

- EZSPHERE®96wellプレート
(品種コード: 4860-900)
ウエル径: 400~500 μ m
深さ: 100~200 μ m
ウエル数: 約80well/1プレートウエル

■胚様体形成 : EZSPHERE®上で非接着培養

- ① シングルセル化したiPS細胞を、EZSPHERE®容器に播種。
(培地: APEL 培地)

- 播種細胞数: 1,000cells/EZSPHERE®ウエル
80,000cells/プレートウエル(96wellの1wellあたり)

- 培地量: 200 μ L / プレートウエル(96wellの1wellあたり)

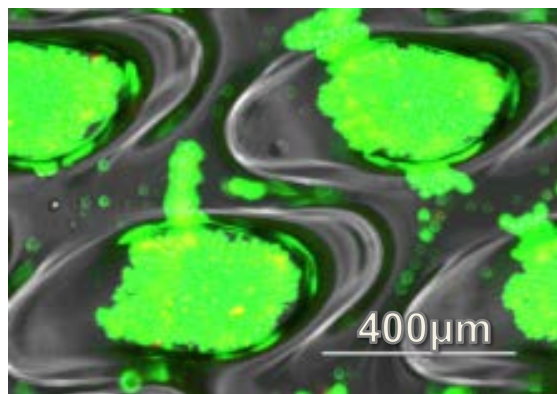
- ② 播種直後または、CO₂インキュベーターで培養1日目に生死判定試薬を添加し染色。
蛍光顕微鏡にて観察した。

<観察>

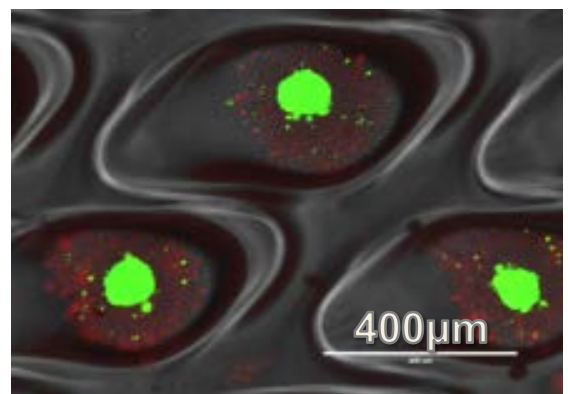
Live Dead 細胞染色後の蛍光顕微鏡写真(マージ画像)

生細胞: 緑
死細胞: 赤

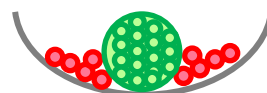
播種直後



培養1日後

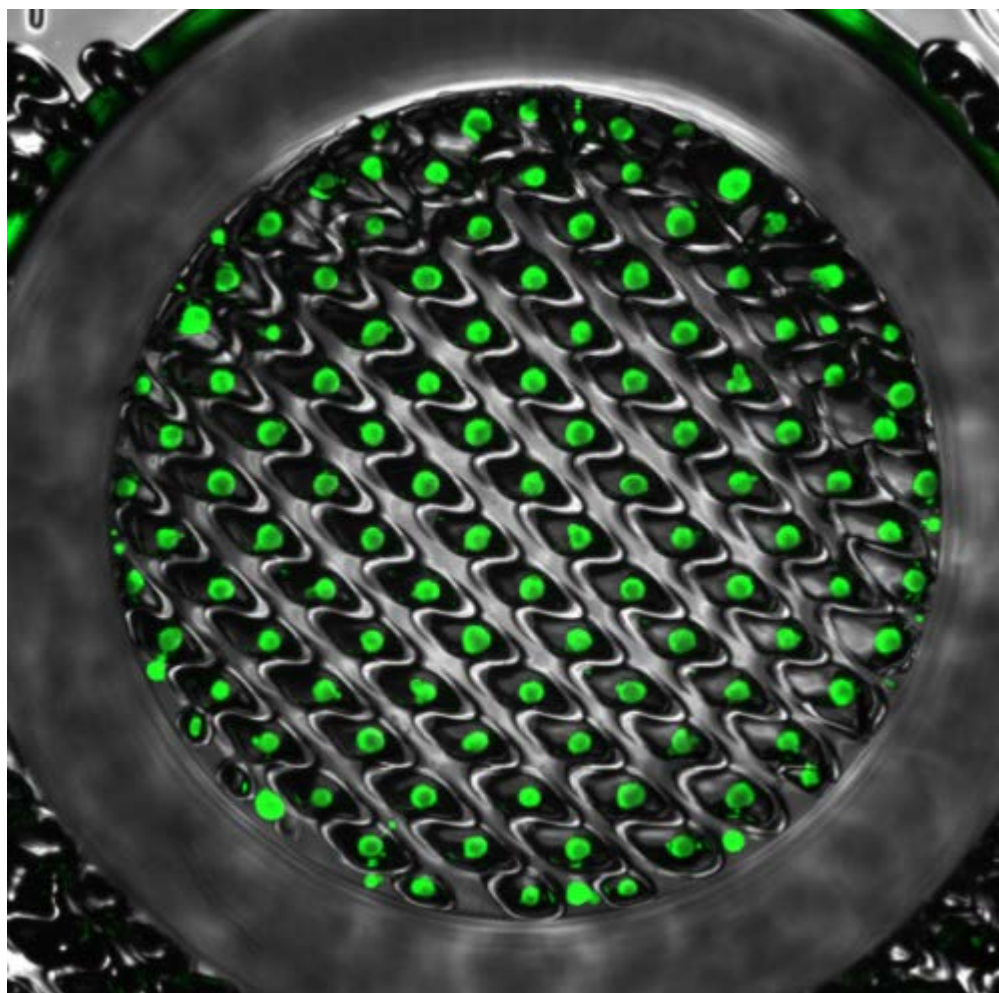


横から見た
模式図



<観察>

iPS細胞播種後1日目生細胞(緑)と位相差(白黒)のマージ画像
96wellマイクロプレートの1ウエル全体をスキャン



今回の試験において、播種直後のヒトiPS細胞はほとんどの生細胞(緑)であったが、培養1日後では胚様体を形成した細胞のみが生細胞(緑)であり、周りのシングルセルは死細胞(赤)であった。また、EZSPHERE®ウエル(微細ウエル)1個に、1個の胚様体が効率よく形成されていた。

スフェロイド1個のみのアッセイでは、スフェロイド個体の差異により影響が出る恐れがありますが、EZSPHERE®96wellプレートでは、1ウエルあたり、多数の同サイズのスフェロイドが形成出来る為、より信頼度が高いアッセイ結果を得ることができます。