KURABO

研究専用試薬

取扱説明書番号:BMMN-832-03-22004-01

Endocell
正常ﾋﾄ血管内皮細胞培養関連製品
製品情報

お願い:総合取扱説明書と合わせて、使用前に必ずお読みください。

1. 細胞製品

<table>
<tr><th colspan="2">ｸﾗﾎﾞｳ</th><th colspan="2">LIFELINE</th><th colspan="3" rowspan="2">仕　様</th></tr>
<tr><th>製品番号</th><th>製品名</th><th>製品番号</th><th>製品名</th></tr>
<tr><td>KE-4109</td><td>凍結 HUVEC</td><td>FC-0003</td><td>HUVEC</td><td>正常ﾋﾄさい帯静脈
血管内皮細胞</td><td rowspan="5">凍結
ﾊﾞｲｱﾙ</td><td rowspan="5">細胞数:50 万個以上
容量:およそ 1mℓ</td></tr>
<tr><td>KE-4109P10</td><td>凍結 HUVECp
(複数ﾄﾞﾅｰ)</td><td>FC-0044</td><td>HUVEC 10-
Donor Pool</td><td>正常ﾋﾄさい帯静脈
血管内皮細胞(10 ﾄﾞﾅｰ)</td></tr>
<tr><td>KA-4009</td><td>凍結 HAEC</td><td>FC-0014</td><td>HAoEC</td><td>正常ﾋﾄ大動脈
血管内皮細胞</td></tr>
<tr><td>KA-4109</td><td>凍結 HPAEC</td><td>FC-0055</td><td>HPAEC</td><td>正常ﾋﾄ肺動脈
血管内皮細胞</td></tr>
<tr><td>KA-4209</td><td>凍結 HCAEC</td><td>FC-0032</td><td>HCAEC</td><td>正常ﾋﾄ冠状動脈
血管内皮細胞</td></tr>
</table>

1. 凍結細胞の製品名と製品番号は、製造元と異なります。
2. 凍結細胞は、ロットにより細胞数が異なりますので、ロットの性能データをご確認ください。
3. 細胞の形状は、弊社カタログまたはウェブサイトをご参照下さい。
4. 性能と品質管理基準は、本資料の「7. 細胞の性能と品質管理基準」をご覧ください。

2. クラボウ製培地

製品番号	製品名	仕　様
KE-2150S	HuMedia-EG2	正常ﾋﾄ血管内皮細胞増殖用低血清液体培地 下記、KE-2350S と KE-6150 のｾｯﾄ
KE-2350S	HuMedia-EB2	血管内皮細胞基礎培地、容量:500 mℓ pH7.80±0.05
KE-6150	HuMedia-EG 増殖添加剤ｾｯﾄ	正常ﾋﾄ血管内皮細胞増殖用添加剤ｾｯﾄ 500mℓ用 1 本ずつ 6 種類 (表 1)

表1　増殖添加剤： HuMedia-EG 増殖添加剤ｾｯﾄの構成

	溶液濃度	添加量	最終濃度
①ｳｼ胎児血清（FBS）	100% V/V	10mℓ	2% V/V
②ﾋﾄ組換え型上皮成長因子　（hEGF）	10μg/mℓ	0.5mℓ	10 ng/mℓ
③ﾊｲﾄﾞﾛｺｰﾁｿﾞﾝ(Hydrocortisone Hemisuccinate)	1.34 mg/mℓ	0.5mℓ	1.34μg/mℓ
④抗菌剤　ｹﾞﾝﾀﾏｲｼﾝ ｱﾝﾌｫﾃﾘｼﾝ B	50 mg/mℓ 50μg/mℓ	0.5mℓ	50μg/mℓ 50 ng/mℓ
⑤ﾋﾄ組換え型塩基性繊維芽細胞増殖因子(hFGF-B)	5μg/mℓ	0.5mℓ	5 ng/mℓ
⑥ﾍﾊﾟﾘﾝ	10 mg/mℓ	0.5mℓ	10μg/mℓ

1. 増殖添加剤を 37℃のウォーターバスで温めて解凍します。（約 3 分間）
2. 全量を添加することで、最適濃度の増殖因子と抗菌剤を含む増殖用培地となります。
3. 保存安定性は、本資料の「6.培地・添加剤の保存安定性と品質管理」をご覧ください。

3. クラボウ製特注培地

製品番号	製品名	仕　様
KE-2170S	HuMedia-EG2 特注 GA 別添	正常ﾋﾄ血管内皮細胞増殖用低血清液体培地 下記、KE-2370S と KE-6150 のｾｯﾄ ｸﾞﾙｺｰｽ、ｱﾙｷﾞﾆﾝ、ﾌｪﾉｰﾙﾚｯﾄﾞ添加剤　500mℓ用　1 本ずつ 3 種類（表 2）
KE-2370S	HuMedia-EB2 特注 GA 別添	血管内皮細胞基礎培地　500mℓ ｸﾞﾙｺｰｽ、ｱﾙｷﾞﾆﾝ、ﾌｪﾉｰﾙﾚｯﾄﾞ添加剤　500mℓ用　1 本ずつ 3 種類（表 2）
KE-6150	HuMedia-EG 増殖添加剤ｾｯﾄ	正常ﾋﾄ血管内皮細胞用増殖添加剤　500mℓ用　1 本ずつ 6 種類（表 1）

1. KE-2370S HuMedia-EB2 特注 GA 別添は、従来の基礎培地（HuMedia-EB2）から、グルコース・アルギニン・フェノールレッドをフリーにした培地です。グルコース・アルギニン・フェノールレッドの濃縮溶液を 1 種類ずつ別々の容器に分注し添付しておりますので、必要に応じて添加量を調節することが可能です。表2の容量を添加すると従来の HuMedia-EB2 の組成になります。
2. 保存安定性は、本資料の「6.培地・添加剤の保存安定性と品質管理」をご覧ください。

表2　クラボウ製特注培地用添加剤組成

成　　分	溶液濃度(M)	添加量(mℓ)	最終濃度(M)
①ｸﾞﾙｺｰｽ	3.000	0.925	5.55×10^{-3}
②ｱﾙｷﾞﾆﾝ	0.360	0.417	3.00×10^{-4}
③ﾌｪﾉｰﾙﾚｯﾄﾞ	0.0165	1.000	3.30×10^{-5}

4. LIFELINE 製培地

ｸﾗﾎﾞｳ		LIFELINE		仕　様
製品番号	製品名	製品番号	製品名	
LEC-LL0002	VascuLife EnGS Comp kit	LL-0002	VascuLife EnGS Medium Complete kit	正常ﾋﾄ血管内皮細胞増殖用低血清液体培地 (EnGS ﾀｲﾌﾟ) 下記、LEB-LM0002 と LEK-LS1019 のｾｯﾄ
LEC-LL0003	VascuLife VEGF Comp kit	LL-0003	VascuLife VEGF Medium Complete kit	正常ﾋﾄ血管内皮細胞増殖用低血清液体培地 (VEGF ﾀｲﾌﾟ) 下記、LEB-LM0002 と LEK-LS1020 のｾｯﾄ
LEB-LM0002	VascuLife BM	LM-0002	VascuLife Basal Medium	正常ﾋﾄ血管細胞基礎培地 容量:475mℓ、pH7.8±0.3
LEK-LS1019	VascuLife EnGS Lfactors	LS-1019	VascuLife EnGS LifeFactors kit	正常ﾋﾄ血管内皮細胞用増殖添加剤 (EnGS ﾀｲﾌﾟ) 500mℓ用　1 本ずつ 8 種類(表 4)
LEK-LS1020	VascuLife VEGF Lfactors	LS-1020	VascuLife VEGF LifeFactors kit	正常ﾋﾄ血管内皮細胞用増殖添加剤 (VEGF ﾀｲﾌﾟ) 500mℓ用　1 本ずつ 10 種類(表 5)

1. VascuLife BM は、HuMedia-EB2 とは異なる培地です。LIFELINE 製の基礎培地の容量は、各細胞によって異なります。
2. VascuLife BM は、L-グルタミン、フェノールレッド（表 3）が含まれておりません。VascuLife BM を単独でご購入の方は、L-グルタミンを別途ご購入し添加する必要があります。増殖培地 VascuLife EnGS Comp kit 又は、VascuLife VEGF Comp kit をご購入の方は、L－グルタミンの追加購入は不要です。
3. 基礎培地の組成は非公開ですが、一部の成分濃度については弊社までお問い合わせください。
4. 各増殖添加剤は十分量が入っています。必要量を培地に添加してください。
5. 保存安定性は、本資料の「6.培地・添加剤の保存安定性と品質管理」をご覧ください。

表3 LIFELINE 製培地用製品

ｸﾗﾎﾞｳ		LIFELINE		仕様
製品番号	製品名	製品番号	製品名	
LER-LS1013	L-Glutamine LifeFactor E	LS-1013	L-Glutamine LifeFactor	Lｰｸﾞﾙﾀﾐﾝ
LQR-LS1009	Phenol Red LifeFactor	LS-1009	Phenol Red LifeFactor	ﾌｪﾉｰﾙﾚｯﾄﾞ

表4 増殖添加剤:VascuLife EnGS LFactors の構成

	溶液濃度	添加量	最終濃度
①EnGS LifeFactor (ｳｼ脳抽出液を含む)	－	1mℓ	0.2% V/V
②Lｰｸﾞﾙﾀﾐﾝ	200mM	25mℓ	10mM
③hEGF	5μg/mℓ	0.5mℓ	5ng/mℓ
④ｱｽｺﾙﾋﾞﾝ酸	50mg/mℓ	0.5mℓ	50μg/mℓ
⑤ﾊｲﾄﾞﾛｺｰﾁｿﾞﾝ(Hydrocortisone Hemisuccinate)	1 mg/mℓ	0.5mℓ	1μg/mℓ
⑥ﾍﾊﾟﾘﾝ	750unit/mℓ	0.5mℓ	0.75unit/mℓ
⑦FBS	－	10mℓ	2% V/V
⑧GA (ｹﾞﾝﾀﾏｲｼﾝ、ｱﾝﾌｫﾃﾘｼﾝ)	G: 30mg/mℓ	0.5mℓ	30μg/mℓ
	A: 15μg/mℓ		15ng/mℓ

表5 増殖添加剤: VascuLife VEGF LFactors の構成

	溶液濃度	添加量	最終濃度
①Lｰｸﾞﾙﾀﾐﾝ	200mM	25mℓ	10mM
②VEGF	5μg/mℓ	0.5mℓ	5ng/mℓ
③hEGF	5μg/mℓ	0.5mℓ	5ng/mℓ
④hFGF-b	5μg/mℓ	0.5mℓ	5ng/mℓ
⑤hIGF-1	15μg/mℓ	0.5mℓ	15ng/mℓ
⑥ｱｽｺﾙﾋﾞﾝ酸	50mg/mℓ	0.5mℓ	50μg/mℓ
⑦ﾊｲﾄﾞﾛｺｰﾁｿﾞﾝ(Hydrocortisone Hemisuccinate)	1 mg/mℓ	0.5mℓ	1μg/mℓ
⑧ﾍﾊﾟﾘﾝ	750unit/mℓ	0.5mℓ	0.75unit/mℓ
⑨FBS	-	10mℓ	2% V/V
⑩GA(ｹﾞﾝﾀﾏｲｼﾝ､ｱﾝﾌｫﾃﾘｼﾝ)	G: 30mg/mℓ	0.5mℓ	30μg/mℓ
	A: 15μg/mℓ		15ng/mℓ

表6 血管内皮細胞用添加剤の組成比較

製品名	VascuLife EnGS LFactors	VascuLife VEGF LFactors	HuMedia-EG 増殖添加剤ｾｯﾄ
製品番号	LEK-LS1019	LEK-LS1020	KE-6150
EnGS LifeFactor (ｳｼ脳抽出液を含む)	0.2% V/V	—	—
VEGF	—	5ng/mℓ	—
hEGF	5ng/mℓ	5ng/mℓ	10ng/mℓ
hFGF-b	—	5ng/mℓ	5ng/mℓ
hIGF-1	—	15ng/mℓ	—
ｱｽｺﾙﾋﾞﾝ 酸	50μg/mℓ	50μg/mℓ	—
ﾊｲﾄﾞﾛｺｰﾁｿﾞﾝ(Hydrocortisone Hemisuccinate)	1μg/mℓ	1μg/mℓ	1.34μg/mℓ
ﾍﾊﾟﾘﾝ	0.75unit/mℓ	0.75unit/mℓ	10μg/mℓ
Lｰｸﾞﾙﾀﾐﾝ	10mM	10mM	—(※)
FBS	2% V/V	2% V/V	2% V/V
抗菌剤	ｹﾞﾝﾀﾏｲｼﾝ 30μg/mℓ ｱﾝﾌｫﾃﾘｼﾝ 15ng/mℓ	ｹﾞﾝﾀﾏｲｼﾝ 30μg/mℓ ｱﾝﾌｫﾃﾘｼﾝ 15ng/mℓ	ｹﾞﾝﾀﾏｲｼﾝ 50μg/mℓ ｱﾝﾌｫﾃﾘｼﾝ B 50ng/mℓ

※ 基礎培地に含有　　　　(表示は培地中の最終濃度です)

5. 細胞培養

<u>※総合取扱説明書「6. 培養操作」を必ずご参照ください。</u>

クラボウ製培地（HuMedia-EG2）を用いた培養系

細胞植え込み　：バイアル中の細胞浮遊液を増殖培地で 5mℓに希釈し、2,500 個/cm² (生細胞数/培養器の底面積、凍結 HCAEC は 5,000 個/cm²))の密度となるように、培養容器へ播種します。

細胞継代　：T-25 フラスコ培養の場合　培地を吸引除去後、2mℓ の HEPES 緩衝液で細胞層を緩やかに約 30 秒間洗浄します。HEPES 緩衝液を除去後、2mℓのトリプシン/EDTA 溶液で細胞層を**約 30 秒間**覆います。その後、トリプシン/EDTA 溶液を 0.5mℓ残して吸引除去します。**約 1-3 分間後**、フラスコを軽くたたくと、培養面からほぼすべての細胞が剥がれます。フラスコを傾けて、少し残したトリプシン／EDTA 溶液で細胞層を流すようにするとうまく剥がれます。
トリプシンの活性は室温に左右されますので処理時間、温度にご注意ください。

LIFELINE 製培地（VascuLife EnGS Comp Kit または VascuLife VEGF Comp Kit)を用いた培養系

細胞植え込み　：バイアル中の細胞浮遊液は希釈せずに、2,500 個/cm² (生細胞数/培養器の底面積、凍結 HCAEC は 5,000 個/cm²)の密度となるように、培養容器へ播種します。

細胞継代　：上記、"クラボウ製培地（HuMedia-EG2)を用いた培養系"に準じて行ってください。

＜参考＞

血管内皮細胞は各細胞の推奨密度で凍結細胞を植え込むと 5～6 日で 80% コンフルエントになります。大部分の細胞は、内皮細胞様形態をもち、互いにコロニー状に集まります。最高の細胞密度を得るためには、コンフルエントに近づくにつれて培地を毎日交換してください。継代培養を成功させるために、細胞は 80% コンフルエント以上になる前に継代してください。到達可能な継代次数（パッセージ数）は開始細胞密度、個々の研究者の用いる方法により変化します。

6. 培地・添加剤の保存安定性と品質管理

表7 培地・添加剤の保存安定性

	0℃未満	4℃冷蔵	37℃以上
HuMedia-EB2	凍結不可	ﾗﾍﾞﾙに記載の期日まで	不可
HuMedia-EG 増殖添加剤ｾｯﾄ	-20℃：ﾗﾍﾞﾙに記載の期日まで※	解凍後一週間	不可
Humedia-EG2（添加剤混合後）	凍結不可	増殖添加剤を添加後 2 週間	不可
HuMedia-EG2 特注 GA 別添	凍結不可	2 週間	不可
HuMedia-EB2 特注 GA 別添	凍結不可	8 週間	不可
ｸﾞﾙｺｰｽ、ｱﾙｷﾞﾆﾝ、ﾌｪﾉｰﾙﾚｯﾄﾞ添加剤	凍結不可	8 週間	不可
VascuLife BM	凍結不可	ﾗﾍﾞﾙに記載の期日まで	不可
VascuLife EnGS LFactors VascuLife VEGF LFactors	-20℃：ﾗﾍﾞﾙに記載の期日まで※	解凍後一週間	不可
VascuLife EnGS Comp kit（添加剤混合後） VascuLife VEGF Comp kit（添加剤混合後）	凍結不可	2 週間	不可

※ 再凍結は1回まで可能です。

品質管理

基礎培地と増殖添加剤のロット毎の組み合わせにおいて、細胞増殖性試験と無菌試験を行い、基準に適したものを出荷しています。細胞増殖性試験は、弊社"正常ヒトさい帯静脈血管内皮細胞（製品番号：KE-4109)"を細胞密度 2,500 個/cm² の培養条件で、細胞の付着性、伸展性、有糸分裂、細胞形態の確認を行います。

7. 細胞の性能と品質管理基準

表8 正常ヒト血管内皮細胞の性能

解凍時の推奨播種密度	2,500 個/cm^2 （HUVEC、HUVECp10、HAEC、HPAEC）、5,000 個/cm^2 （HCAEC）
継代培養時の推奨播種密度	2,500 個/cm^2 （HUVEC、HUVECp10）、5,000 個/cm^2 （HAEC、HPAEC、HCAEC）
1 ﾊﾞｲｱﾙからの播種総面積	約 200cm^2 （T-25 ﾌﾗｽｺ換算で約 8 個）（HUVEC、HUVECp10、HAEC、HPAEC）
	約 100cm^2 （T-25 ﾌﾗｽｺ換算で約 4 個）（HCAEC）
保証継代次数	3 次培養まで （HUVEC、HUVECp10）
	4 次培養まで （HAEC、HPAEC）
	5 次培養まで （HCAEC）
細胞の同定	FactorⅧ関連抗原（陽性）・α-actin（陰性）

表9 品質管理基準

	凍結細胞の培養				継代培養			
	培養次数	推奨播種密度（個／cm^2）	培養日数（日）	QC 基準値（個／cm^2）	培養次数	推奨播種密度（個／cm^2）	培養日数（日）	QC 基準値（個／cm^2）
凍結 HUVEC 凍結 HUVECp	2	2,500	5-6	16,000	3	2,500	5-7	20,000
凍結 HAEC 凍結 HPAEC	3	2,500	5-6	16,000	4	5,000	5-7	20,000
凍結 HCAEC	4	5,000	5-6	16,000	5	5,000	5-7	20,000

1. 細胞の品質管理は「HuMedia-EG2」培地にて行っています。
2. 本製品は、凍結細胞では解凍直後の培養細胞(HUVEC と HUVECp10 は 2 次培養細胞、HAEC と HPAEC は 3 次培養細胞、HCAEC は 4 次培養細胞)、および、凍結細胞解凍直後の培養細胞を 1 回継代後の細胞(HUVEC と HUVECp は 3 次培養細胞、HAEC と HPAEC は 4 次培養細胞、HCAEC は 5 次培養細胞)において品質を保証しています。品質管理基準(表 9)を超えての培養次数(HUVEC、HUVECp は 4 次培養を超える、HAEC、HPAEC は 5 次培養を超える、HCAEC は 6 次培養を超える)の継代培養では、細胞のコロニー形成率、増殖速度、生物学的反応(酵素反応も含む)等の漸次低下にともない、実験結果の再現性に影響が出る可能性があります。

8. 毒劇物・危険物について

該当物はありません。

9. 免責事項

(1) 使用期限を経過した製品の使用、弊社指定外の培地等を用いた製品の使用、日本国外での製品の使用、製品を改変・改造しての使用、その他本取扱説明書または各製品情報の記載に従わない製品を使用された場合、および本取扱説明書または各製品情報に記載の取扱い方法以外の方法で製品を取り扱われた場合に起因するいかなる損害につきましても、弊社は一切の責任を負いません。

(2) 洪水、豪雪、豪雨、地すべり、地震、津波、突風、竜巻等の天災地変、火災、停電、労働紛争、原材料の入手手段の停止その他の不可抗力によって生じた製品に関連するいかなる損害につきましても、弊社は一切の責任を負いません。

(3) 製品に関連して生じた逸失利益を含む結果的損害、派生的損害、間接損害、特別損害および第三者からの請求に基づくいかなる損害につきましても、弊社は一切の責任を負いません。

(4) 購入された製品に関して弊社が責任を負う場合においても、弊社の責任はその製品の販売金額を超えないものとします。

(5) 購入された製品に関して、弊社への返品はお受けできません。

製造・輸入・販売元

クラボウ

倉敷紡績株式会社　環境メカトロニクス事業部　バイオメディカル部

・大阪

〒572-0823　大阪府寝屋川市下木田町 14-30　クラボウ先端技術センター2F

TEL.072-820-3079　FAX.072-820-3095

・東京

〒105-0004　東京都港区新橋 6 丁目 19-15　東京美術倶楽部ビルディング 6F

TEL.03-6371-1390　FAX.03-6371-1396

URL; https://www.kurabo.co.jp/bio/

'22.12 Ⓟ