

取扱説明書番号: BMMN-832-03-22005-01

Endocell-MV

正常ヒト微小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

クラボウ		LIFELINE		仕 様		
製品番号	製品名	製品番号	製品名			
KE-4209	凍結 HMVEC(NB)	FC-0042	HMVEC	正常ヒト新生児包皮 微小血管内皮細胞	凍結 バイアル	細胞数: 50 万個以上 容 量 : およそ 1ml

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、弊社カタログ又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-2550	HuMedia-MvG	正常ヒト微小血管内皮細胞増殖用低血清液体培地 下記、KE-2350S と KE-6550 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-6550	HuMedia-MvG 増殖添加剤セット	正常ヒト微小血管内皮細胞増殖用添加剤添加剤セット 500ml用 1本ずつ7種類の増殖因子・抗菌剤と接着因子2本 (表1)

表1 増殖添加剤: HuMedia-MvG 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)	—	25ml	5% V/V
②ヒト組換え型上皮成長因子 (hEGF)	10 μg/ml	0.5ml	10 ng/ml
③ハイドロコチゾン (Hydrocortisone Hemisuccinate)	1.34 mg/ml	0.5ml	1.34 μg/ml
④抗菌剤	ゲンタマイシン	0.5ml	50 μg/ml
	アンフォテリシン B		50 ng/ml
⑤ヒト組換え型塩基性繊維芽細胞増殖因子 (hFGF-B)	5 μg/ml	0.5ml	5 ng/ml
⑥ヘパリン	10 mg/ml	0.5ml	10 μg/ml
⑦dbcAMP	39.3mg/ml	0.5ml	39.3 μg/ml
⑧接着因子	—	40 ml x 2本	

1. 接着因子は培養容器へのコーティング剤です。培地には添加しないでください。
2. 接着因子の使用方法は、本資料「5. 細胞培養 コーティング」をご参照ください。
3. 増殖添加剤を 37°Cのウォーターバスで温めて解凍します。(約 3 分間)
4. 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。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-2570	HuMedia-MvG 特注 GA 別添	正常ヒト微小血管内皮細胞増殖用低血清液体培地 下記、KE-2370S と KE-6550 のセット グルコース、アルギニン、フェノールレッド [*] 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 グルコース、アルギニン、フェノールレッド [*] 添加剤 500ml用 1 本ずつ 3 種類 (表 2)
KE-6550	HuMedia-MvG 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 7 種類の増殖因子・抗菌剤と接着因子 2 本 (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. 価格・納期は別途お問い合わせください。グルコース、アルギニン、フェノールレッド以外の組成を無添加にした特注培地の調整をご希望の方は、お気軽にお問い合わせください。
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。

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グルコース	3.000	0.925	5.55×10^{-3}
②アルギニン	0.360	0.417	3.00×10^{-4}
③フェノールレッド [*]	0.0165	1.000	3.30×10^{-5}

4. LIFELINE 製培地

クラボウ		LIFELINE		仕様
製品番号	製品名	製品番号	製品名	
LEC-LL0004	EnGS-MV Comp kit	LL-0004	VascuLife EnGS-Mv Medium Complete kit	正常ヒ微小血管内皮細胞増殖用低血清液体培地 (EnGS タイプ) 下記、LEB-LM0002 と LEK-LS1035 のセット
LEC-LL0005	VEGF-MV Comp kit	LL-0005	VascuLife VEGF-Mv Medium Complete kit	正常ヒ微小血管内皮細胞増殖用低血清液体培地 (VEGF タイプ) 下記、LEB-LM0002 と LEK-LS1029 のセット
LEB-LM0002	VascuLife BM	LM-0002	VascuLife Basal Medium	正常ヒ血管細胞基礎培地 容量: 475ml、pH7.8±0.3
LEK-LS1035	EnGS-MV LifeFactors	LS-1035	VascuLife EnGS-Mv LifeFactors kit	正常ヒ微小血管内皮細胞増殖添加剤 (EnGS タイプ) 500ml用 1本ずつ 8種類(表 4)
LEK-LS1029	VEGF-MV LifeFactors	LS-1029	VascuLife VEGF-Mv LifeFactors kit	正常ヒ微小血管内皮細胞増殖添加剤 (VEGF タイプ) 500ml用 1本ずつ 10種類(表 5)

- VascuLife BM は、HuMedia-EB2 とは異なる培地です。LIFELINE 製基礎培地の容量は、各細胞によって異なります。
- VascuLife BM は、L-グルタミン、フェノールレッド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。
- 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。
- 各添加剤に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。
- 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

クラボウ		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-グルタミン
LQR-LS1009	Phenol Red LifeFactor	LS-1009	Phenol Red LifeFactor	フェノールレッド*

表4 増殖添加剤:EnGS-MV LifeFactors®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-グルタミン	200mM	25ml	10mM
③hEGF	5 μg/ml	0.5ml	5ng/ml
④アスコルビン酸	50mg/ml	0.5ml	50 μg/ml
⑤ハイドロコチゾン (Hydrocortisone Hemisuccinate)	1 mg/ml	0.5ml	1 μg/ml
⑥ヘパリン	750unit/ml	0.5ml	0.75unit/ml
⑦FBS	-	25ml	5% V/V
⑧GA (ゲンタマイシン、アンフォテリシン)	G: 30mg/ml	0.5ml	30 μg/ml
	A: 15 μg/ml		15ng/ml

表5 増殖添加剤：VEGF-MV LifeFactors の構成

	溶液濃度	添加量	最終濃度
①L-グルタミン	200mM	25ml	10mM
②VEGF	5 μ g/ml	0.5ml	5ng/ml
③hEGF	5 μ g/ml	0.5ml	5ng/ml
④hFGF-b	5 μ g/ml	0.5ml	5ng/ml
⑤hIGF-1	15 μ g/ml	0.5ml	15ng/ml
⑥アスコルビン酸	50mg/ml	0.5ml	50 μ g/ml
⑦ハイドロコチゾン(Hydrocortisone Hemisuccinate)	1 mg/ml	0.5ml	1 μ g/ml
⑧ヘパリン	750unit/ml	0.5ml	0.75unit/ml
⑨FBS	-	25ml	5% V/V
⑩GA (ケンタマイシン、アンフォテリシン)	G: 30mg/ml	0.5ml	30 μ g/ml
	A: 15 μ g/ml		15ng/ml

表6 微小血管内皮細胞用添加剤の組成比較

製品名	EnGS-MV LifeFactors	VEGF-MV LifeFactors	HuMedia-MvG 増殖添加剤セット
製品番号	LEK-LS1035	LEK-LS1029	KE-6550
EnGS LifeFactor (ウソ脳抽出液を含む)	0.2% V/V	-	-
VEGF	-	5ng/ml	-
hEGF	5ng/ml	5ng/ml	10ng/ml
hFGF-b	-	5ng/ml	3ng/ml
hIGF-1	-	15ng/ml	-
アスコルビン酸	50 μ g/ml	50 μ g/ml	-
ハイドロコチゾン(Hydrocortisone Hemisuccinate)	1 μ g/ml	1 μ g/ml	1.34 μ g/ml
ヘパリン	0.75u/ml	0.75u/ml	10 μ g/ml
L-グルタミン	10mM	10mM	- (※)
FBS	5% V/V	5% V/V	5% V/V
抗菌剤	ケンタマイシン 30 μ g/ml アンフォテリシン 15ng/ml	ケンタマイシン 30 μ g/ml アンフォテリシン 15ng/ml	ケンタマイシン 50 μ g/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

※総合取扱説明書「6. 培養操作」を必ず、ご参照ください。

クラボウ製培地 (HuMedia-MvG) を用いた培養系

- コーティング : 細胞 (凍結細胞、継代培養細胞) の植え込みには、予め接着因子をコーティングした培養容器が必要です。
- 手順 ①培養容器に容器の培養面積 25cm² あたり 2~3 ml の接着因子 (HuMedia-MvG 増殖添加剤セット本資料表の⑧) を入れ、培養面を覆います。
 ②37°C で 30 分間、または室温で 1 時間静置し、吸引除去します。
 ③吸引除去後、培養面が乾燥しないようにすばやく新しい HuMedia-MvG (培養面積 5 cm² あたり 1ml) を培養容器に入れます。
 ④培地を入れた容器をインキュベーター (37°C、5% CO₂、加湿) に入れ、フラスコはキャップを緩めて、少なくとも 30 分間インキュベートします。
- 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、5,000 個/cm² (生細胞数/培養器の底面積) 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 1-2 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 MV 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、5,000 個/cm² (生細胞数/培養器の底面積) の密度となるように、培養器へ播種します。
- 細胞継代 : 上記、「クラボウ製培地 (HuMedia-MvG) を用いた培養系」に準じて行ってください。
 ※培養容器のコーティングは必要ありません。

< 参考 >

微小血管内皮細胞は 5,000 個/cm² 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。4 次・5 次培養では大部分の細胞は微小血管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、微小血管内皮細胞は 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	ラベルに記載の期日まで	不可
HuMedia-MvG 増殖添加剤セット	-20℃:ラベルに記載の期日まで※	解凍後一週間	不可
HuMedia-MvG(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-MvG 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
グルコース、アルギニン、フェノールレッド添加剤	凍結不可	8 週間	不可
VascuLife BM	凍結不可	ラベルに記載の期日まで	不可
EnGS-MV LifeFactors VEGF-MV LifeFactors	-20℃:ラベルに記載の期日まで※	解凍後 1 週間	不可
EnGS-MV Comp kit(添加剤混合後) VEFG-MV 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“正常ヒト新生児包皮微小血管内皮細胞(製品番号:KE-4209)”を細胞密度 5,000 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 正常ヒト微小血管内皮細胞の性能

解凍時の推奨播種密度	5,000 個/cm ²
継代培養時の推奨播種密度	5,000 個/cm ²
1 ハイアルからの播種総面積	約 100cm ² (T-25 フラスコ換算で約 4 個)
保証継代次数	5 次培養まで
細胞の同定	Factor VIII 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 回数	推奨播種密度 (個/cm ²)	培養日数 (日)	QC 基準値 (個/cm ²)	培養 回数	推奨播種密度 (個/cm ²)	培養日数 (日)	QC 基準値 (個/cm ²)
凍結 HMVEC(NB)	4	5,000	5-6	16,000	5	5,000	5-7	20,000

1. 細胞の品質管理は「HuMedia-MvG」培地にて行っています。
2. 本製品は4次培養細胞(凍結細胞では解凍直後の培養細胞)、および5次培養細胞(4次培養細胞を1回継代後の細胞)において品質を保証しています。品質管理基準(表9)を超える継代培養では、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)等の漸次低下にとまない、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



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/>