

取扱説明書番号: BMMN-832-03-22006-01

Epidercell

正常ヒト表皮角化細胞培養関連製品

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

クラブウ		LIFELINE		仕 様		
製品番号	製品名	製品番号	製品名			
KK-4009	凍結 NHEK(NB)	FC-0007	HEKn	正常ヒト新生児表皮角化細胞	凍結 バイアル	細胞数: 50 万個以上 容 量 : およそ 1ml
KK-4009P10	凍結 NHEK(NB) _p (複数ドナー)	FC-0064	HEKn 10- Donor Pool	正常ヒト新生児表皮角化細胞 (10ドナー)		
KK-4109	凍結 NHEK(AD)	FC-0025	HEKa	正常ヒト成人表皮角化細胞		
KK-4209	凍結 NHOKg	FC-0094	HOKg	正常ヒト口腔表皮角化細胞		

- 凍結細胞の製品名と製品番号は、製造元と異なります。
- 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。
- 組織の取得部位は、凍結 NHEK(NB)では新生児包皮、凍結 NHEK(AD)では成人の胸部または腹部由来です。
- 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。
- 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. クラブウ製培地

製品番号	製品名	仕 様
KK-2150S	HuMedia-KG2	正常ヒト表皮角化細胞増殖用培地 下記、KK-2350S と KK-6150 のセット
KK-2350S	HuMedia-KB2	正常ヒト表皮角化細胞基礎培地、 容量: 500 mL、pH7.40±0.05、 <u>カルシウム濃度: 0.15mM</u>
KK-6150	HuMedia-KG 増殖添加剤セット	正常ヒト表皮角化細胞用増殖添加剤 500mL用 1 本ずつ 5 種類 (表 1)

表1 増殖添加剤：HuMedia-KG 増殖添加剤セットの構成

	溶液濃度	添加量	最終濃度
①インスリン	10 mg/ml	0.5 ml	10 μ g/ml
②ヒト組換え型上皮成長因子 (hEGF)	0.1 μ g/ml	0.5 ml	0.1 ng/ml
③ハイドロコチゾン (Hydrocortisone Hemisuccinate)	0.67 mg/ml	0.5 ml	0.67 μ g/ml
④抗菌剤 ケンタマイシン アンフォテリシン B	50 mg/ml	0.5 ml	50 μ g/ml
	50 μ g/ml		50 ng/ml
⑤ウシ脳下垂体抽出液 (BPE)	—	2 ml	0.4% V/V

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
KK-2170S	HuMedia-KG2 特注 GC 別添	正常ヒト表皮角化細胞増殖用無血清液体培地 下記、KK-2370S と KK-6150 のセット グルコース、カルシウム、フェノールレッド [*] 添加剤 500ml用 1 本ずつ 3 種類 (表 2)
KK-2370S	HuMedia-KB2 特注 GC 別添	正常ヒト表皮角化細胞基礎培地 500ml グルコース、カルシウム、フェノールレッド [*] 添加剤 500ml用 1 本ずつ 3 種類 (表 2)
KK-6150	HuMedia-KG 増殖添加剤セット	正常ヒト角化細胞用増殖用添加剤セット 500ml用 1 本ずつ 5 種類 (表 1)

1. 従来の基礎培地 (HuMedia-KB2) から、グルコース・カルシウム・フェノールレッドをフリーにした培地です。グルコース・カルシウム・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。
2. 表2の容量を添加すると従来の HuMedia-KB2 の組成になります。
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。

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	1.000	6.00 $\times 10^{-3}$
②カルシウム (塩化カルシウム 2 水和物)	0.075	1.000	1.50 $\times 10^{-4}$
③フェノールレッド [*]	0.0165	0.100	3.30 $\times 10^{-6}$

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	
LKC-LL0007	DermaLife K Comp kit	LL-0007	DermaLife K Complete kit	正常ヒ表皮角化細胞増殖用無血清液体培地 下記、LKB-LM0004 と LKK-LS1030 のセット
LKB-LM0004	DermaLife BM	LM-0004	DermaLife Basal Medium	正常ヒ皮膚表皮細胞用基礎培地、 容量：485mL、pH7.5±0.2、 カルシウム濃度：0.06mM
LKK-LS1030	DermaLife K LifeFactors	LS-1030	DermaLife K LifeFactors kit	正常ヒ表皮角化細胞増殖用添加剤セット 500mL用 1本ずつ 8種類（表4）

- DermaLife BM は、HuMedia-KB2 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。
- DermaLife 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。DermaLife 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 DermaLife K 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。
- 各増殖添加剤は十分量が入っております。培地に添加する際には必要添加量を量って基礎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	
LKR-LS1031	L-Glutamine LifeFactor K	LS-1031	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*
LMR-LS1062	塩化カルシウム溶液(0.89M)	LS-1062	Calcium Chloride 0.89M	溶液濃度：0.89M、容量：1ml 培地 500ml への添加例： 11 μ L ~ 84 μ L 添加 $\Rightarrow$ 添加濃度 0.02mM ~ 0.15mM

表4 増殖添加剤：DermaLife K LifeFactors の構成（DermaLife K Comp kit の場合）

	溶液濃度	添加量	最終濃度
①インスリン	5 mg/mL	0.5mL	5 μ g/mL
②ハイドロコチゾン（Hydrocortisone Hemisuccinate）	100 μ g/mL	0.5mL	100ng/mL
③BPE（製造元名：Extract P LifeFactor）	—	2mL	0.4% V/V
④L-グルタミン	200 mM	15mL	6mM
⑤エピネフリン	1 mg/mL	0.5mL	1 μ M
⑥TGF α	0.5 μ g/mL	0.5mL	0.5ng/mL
⑦トランスフェリン	5 mg/mL	0.5mL	5 μ g/mL
⑧GA（ゲンタマイシン、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5 角化細胞用添加剤の組成比較

製品名	DermaLife K LifeFactor	HuMedia-KG 増殖添加剤セット
製品番号	LKK-LS1030	KK-6150
①インスリン	5 μ g/ml	10 μ g/ml
②hEGF	—	0.1ng/ml
③ハイドロコチゾン (Hydrocortisone Hemisuccinate)	100ng/ml	670ng/ml
④抗菌剤	ゲンタマイシン 30 μ g/ml アンフォテリシン 15ng/ml	ゲンタマイシン 50 μ g/ml アンフォテリシン B 50ng/ml
⑤BPE (製造元名 : Extract P LifeFactor)	0.4% V/V	0.4% V/V
⑥L-グルタミン	6mM	—(※)
⑦エピネフリン	1.0 μ M	—
⑧TGF α	0.5ng/ml	—
⑨トランスフェリン	5 μ g/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-KG2) 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) 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 1 分間覆います。その後、トリプシン/EDTA 溶液を 0.5ml 残して吸引除去します。顕微鏡で観察しながら、細胞が丸く、個々にバラバラになってくるのを確認します。

<注意>

顕微鏡観察の間は、トリプシン/EDTA 溶液が培養面全体にいきわたるようにフラスコを時々傾けます。約 2 分おきにフラスコ側面を手の平で非常に軽くたたくことで、トリプシン/EDTA 溶液が細胞コロニーに浸透し、剥がれ易くなります。

トリプシンの添加から約 6-9 分後(※:角化細胞の場合)、細胞のおよそ半分が剥がれたところで、フラスコ側面を強くたたくと、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 (DermaLife K 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) 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-KG2) を用いた培養系” に準じて行ってください。

<参考>

角化細胞は 2,500 個/cm² で凍結細胞を植え込むと 5~6 日で 40~80% コンフルエントになります。2 次培養では大部分の細胞は上皮細胞様形態をもち、互いにコロニー状に集まります。2 次培養では少数のメラニン細胞が存在することがありますが、DermaLife K comp kit では増殖しません。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、角化細胞は 80% コンフルエント以上になる前に継代してください。一度、角化細胞が完全にコンフルエントになると有糸分裂がなくなります。また、角化細胞の増殖を停止したままにすると解凍後の培養可能継代次数が減少します。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6 培地・添加剤の保存安定性

	0℃未満	4℃冷蔵	37℃以上
HuMedia-KB2	凍結不可	ラベルに記載の期日まで	不可
HuMedia-KG 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-KG2 (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-KG2 特注培地	凍結不可	2 週間	不可
HuMedia-KB2 特注培地	凍結不可	8 週間	不可
グルコース、カルシウム、 フェノールレッド添加剤	凍結不可	8 週間	不可
DermaLife BM	凍結不可	ラベルに記載の期日まで	不可
DermaLife K LifeFactors	-20℃:ラベルに記載の期日まで※	解凍後一週間	不可
DermaLife K 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“正常ヒト新生児表皮角化細胞(製品番号:KK-4009)”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7 正常ヒト角化細胞の性能

解凍・継代培養時の推奨播種密度	2,500 個/cm ²
1 ハ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)
保証継代次数	3 次培養まで

表8 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 NHEK(NB) 凍結 NHEK(NB)p 凍結 NHEK(AD)	2	2,500	5-6	24,000	3	2,500	5-7	30,000
凍結 NHOKg	3				4			

- 細胞の品質管理は「HuMedia-KG2」培地に行っています。
- 本製品は解凍直後の培養細胞(NHEK(NB)と(NHEK(NB)pおよび NHEK(AD)は 2 次培養細胞、NHOKgは3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(NHEK(NB)と(NHEK(NB)pおよび NHEK(AD)は 3 次培養細胞、NHOKgは 4 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8)を超える培養次数(NHEK(NB)と(NHEK(NB)pおよび NHEK(AD)は 3 次培養を越えて、NHOKgは 4 次培養を越えて)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/>

‘22.12©