

Clonetics™ 血管内皮細胞システム 操作手順マニュアル

1. イントロダクション

Clonetics™ 血管内皮細胞システムは、健常ドナーおよび疾患ドナー由来の血管内皮細胞と血管内皮細胞培養に最適化された培地をご提供します。各システムは容易に血管内皮細胞の培養系を構築し、細胞タイプに応じた多くの実験アプリケーションが利用可能です。アプリケーションは、心臓血管新薬開発、血管病理学、動脈硬化、循環器生理学、創傷治癒、血管新生、リンパ管新生、腫瘍形成、癌研究、免疫学、膀胱機能研究、全般的な創薬および基礎研究を含みます。Clonetics™ 血管内皮細胞システムは、ユーザーが実験結果にフォーカスできる便利で簡便な培養システムです。Clonetics™ 細胞、培地、継代試薬は、細胞培養システムとして高い品質試験に合格しており、最適なパフォーマンスを保証します。

当システムのFAQについては下記データベースをご参照下さい：

http://knowledge.lonza.com/search-results?search=*&type=FAQ&orderby=relevance

当システムの引用論文については下記データベースをご参照下さい：

http://knowledge.lonza.com/search-results?search=*&type=Citations&orderby=relevance

2. 製品開封および保存方法

- 全ての容器に破損や液漏れがないか確認下さい。
- 凍結細胞製品の到着後、直ちに輸送容器(ドライアイス冷却)から液体窒素タンクに移して下さい。もしくは、融解ステップに移り、細胞製品の使用を行って下さい。製品到着時に保冷用のドライアイスが消失しているような場合は、弊社カスタマーサポートまでお問合せ下さい。
- BulletKit™ 製品到着後、基本培地は暗所冷蔵(2-8℃)、添加因子キット(SingleQuots™)は冷凍(-20℃以下)で保存して下さい。一旦添加因子キットを融解した後は、冷蔵保存し72時間以内に基本培地に添加して下さい。添加因子キット添加後の培地は冷蔵保存し、1か月以内に使用して下さい。再凍結は推奨しません。
- ReagentPack™ 継代各試薬は一度まで再凍結が可能です。トリプシン/EDTAは一度融解した後、72時間以内に使用する場合は冷蔵保存して下さい。冷蔵下での保存では品質維持期間が短いため、必要に応じてチューブへ小分け分注して冷凍保存して下さい。トリプシン中和液およびHEPES溶液については冷蔵保存の場合、1か月以内に使用して下さい。

3. 血管内皮細胞システム構成

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) を含む大血管内皮細胞培養システム			
細胞	HUVEC	単ードナー (C2517A, C2517AS)、プールドナー (C2519A, C2519AS)	
	大血管内皮細胞	HAEC (CC-2535)、HPAEC (CC-2530) など	
培地	EGM™-2 BulletKit™ (CC-3162)	EBM™-2 基本培地 (CC-3156)	500 mL
		VEGF (0.5 mL) hEGF (0.5 mL) R3-IGF-1 (0.5 mL) Ascorbic Acid (0.5 mL) Hydrocortisone (0.2 mL) hFGF-β (2 mL) Heparin (0.5 mL) FBS (10 mL) GA (0.5 mL)	
	単品販売	EBM™ 基本培地 (CC-3129) *フェノールレッドフリー	500 mL
	継代試薬	ReagentPack™ (CC-5034)	トリプシン/EDTA (CC-5012)
		トリプシン中和液 (CC-5002)	100 mL
		HEPES溶液 (CC-5022)	100 mL

Bovine Brain Extract (BBE) を含むHUVEC培養システム			
細胞	HUVEC	単ードナー (CC-2517)、プールドナー (CC-2519)	
	EGM™ BulletKit™ (CC-3124)	EBM™ 基本培地 (CC-3121)	
培地	EGM™ BulletKit™ (CC-3124)	EBM™ 基本培地 (CC-3121)	500 mL
		BBE (2 mL) hEGF (0.5 mL) Ascorbic Acid (0.5 mL) Hydrocortisone (0.5 mL) FBS (10 mL) GA (0.5 mL)	
	単品販売	EBM™ 基本培地 (CC-3129) *フェノールレッドフリー	500 mL
	継代試薬	ReagentPack™ (CC-5034)	トリプシン/EDTA (CC-5012)
		トリプシン中和液 (CC-5002)	100 mL
		HEPES溶液 (CC-5022)	100 mL

増殖率を高めたBovine Brain Extract (BBE) を含むHUVEC培養システム			
細胞	HUVEC	単ードナー (CC-2935)	
	EGM™-PLUS BulletKit™ (CC-5035) *フェノールレッドフリー	EBM™-PLUS 基本培地 (CC-5036)	
培地	EGM™-PLUS BulletKit™ (CC-5035) *フェノールレッドフリー	EBM™-PLUS 基本培地 (CC-5036)	500 mL
		EnGS (1 mL) hEGF (0.5 mL) L-Glutamine (25 mL) Heparin (0.5 mL) Ascorbic Acid (0.5 mL) Hydrocortisone Hemisuccinate (0.5 mL) FBS (10 mL) GA (0.5 mL)	
	単品販売	EBM™ 基本培地 (CC-3129) *フェノールレッドフリー	500 mL
	継代試薬	ReagentPack™ (CC-5034)	トリプシン/EDTA (CC-5012)
		トリプシン中和液 (CC-5002)	100 mL
		HEPES溶液 (CC-5022)	100 mL

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) を含む微小血管内皮細胞培養システム			
細胞	微小血管内皮細胞	HCAEC (CC-2585)、HIAEC (CC-2545)、HMVEC-C (CC-7030) HMVEC-L (CC-2527)、HMVEC-dLyAd (CC-2810) など	
	EGM™-2 MV BulletKit™ (CC-3202)	EBM™-2 基本培地 (CC-3156)	
培地	EGM™-2 MV BulletKit™ (CC-3202)	EBM™-2 基本培地 (CC-3156)	500 mL
		VEGF (0.5 mL) hEGF (0.5 mL) R3-IGF-1 (0.5 mL) Ascorbic Acid (0.5 mL) Hydrocortisone (0.2 mL) hFGF-β (2 mL) FBS (25 mL) GA (0.5 mL)	
	単品販売	EBM™ 基本培地 (CC-3129) *フェノールレッドフリー	500 mL
	継代試薬	ReagentPack™ (CC-5034)	トリプシン/EDTA (CC-5012)
		トリプシン中和液 (CC-5002)	100 mL
		HEPES溶液 (CC-5022)	100 mL

4. 培地の調製

1. コンタミネーションを防ぐために、培地ボトルおよび添加因子各バイアルの外部表面を70%エタノールで除菌して下さい。
2. EGM™ -2培地の調製: EBM™ -2基本培地に、以下のEGM™ -2添加因子キット(CC-4176)各バイアルの中身を添加して下さい。バイアルを培地でリンスして回収するようにして下さい。
 - i. human Epidermal Growth Factor [hEGF]
 - ii. Vascular Endothelial Growth Factor [VEGF]
 - iii. R3-Insulin-like Growth Factor-1 [R3-IGF-1]
 - iv. Ascorbic Acid
 - v. Hydrocortisone
 - vi. human Fibroblast Growth Factor-Beta [hFGF-β]
 - vii. Heparin
 - viii. Fetal Bovine Serum [FBS]
 - ix. Gentamicin/Amphotericin-B [GA]
3. EGM™ 培地の調製: EBM™ 基本培地に、以下のEGM™ 添加因子キット(CC-4133)の各バイアルの中身を添加して下さい。バイアルを培地でリンスして回収するようにして下さい。
 - i. Bovine Brain Extract [BBE]
 - ii. Ascorbic Acid
 - iii. Hydrocortisone
 - iv. human Epidermal Growth Factor [hEGF]
 - v. Fetal Bovine Serum [FBS]
 - vi. Gentamicin/Amphotericin-B [GA]
4. EGM™ -PLUS培地の調製: EBM™ -PLUS 基本培地に、以下のEGM™ -PLUS 添加因子キット(CC-4542)の各バイアル中身を添加して下さい。バイアルを培地でリンスして回収するようにして下さい。
 - i. Endothelial Growth Supplement [EnGS]
 - ii. L-Glutamine
 - iii. Ascorbic Acid
 - iv. Hydrocortisone Hemisuccinate
 - v. human Epidermal Growth Factor [hEGF]
 - vi. Heparin
 - vii. Fetal Bovine Serum [FBS]
 - viii. Gentamicin/Amphotericin-B [GA]
5. EGM™ -2 MV培地の調製: EBM™ -2 基本培地に、以下のEGM™ -2 MV添加因子キット(CC-4147)の各バイアル中身を添加して下さい。バイアルを培地でリンスして回収するようにして下さい。
 - i. human Epidermal Growth Factor [hEGF]
 - ii. Vascular Endothelial Growth Factor [VEGF]
 - iii. R3-Insulin-like Growth Factor-1 [R3-IGF-1]
 - iv. Ascorbic Acid
 - v. Hydrocortisone
 - vi. human Fibroblast Growth Factor-Beta [hFGF-β]
 - vii. Fetal Bovine Serum [FBS]
 - viii. Gentamicin/Amphotericin-B [GA]

6. BulletKit™ 培地の調製時、各添加因子10%程度のロスがあったとしても、細胞培養にはほぼ影響を及ぼさないと考えられます。
7. 各添加因子キットラベルを調製済み培地ボトルに貼り移して下さい。調製した日および添加因子の添加量を記載して下さい。調製後の培地は冷蔵で1か月間保存可能です。培地の冷凍保存は避けて下さい。培地調製の過程で、培地の無菌性に懸念が生じた場合は0.2 μmのフィルター処理を行って下さい。複数回のフィルター処理は推奨しません。

5. 細胞の融解と培養の開始

1. 融解後初めての細胞播種の際は、下記表の播種密度を参考にして下さい。

細胞タイプ	融解後の推奨播種密度	必要最小限のフラスコ数
HUVEC	2,500 viable cells /cm ²	>5 x T-25フラスコまたは >1 x T-75フラスコ
HUVEC-XL	2,500 viable cells /cm ²	>12 x T-225フラスコ
HUVEC以外の 血管内皮細胞	5,000 viable cells /cm ²	>2 x T-25フラスコまたは >1 x T-75フラスコ

播種密度の計算は、製品の最低保証細胞数を基に計算されています。実際に必要となるフラスコ数は該当細胞ロットの試験成績書 (CoA) を参照するようにして下さい。適切な細胞密度 (セクション 12、13 製品情報を参照) が保たれている限りは、上記以外の培養容器の使用も可能です。

2. 推奨播種密度と使用する培養容器の培養面積を基に、必要な培養容器を算出して下さい。
3. 適切量: 1 mL/5 cm²の培地を培養容器に加え、CO₂インキュベータで30分以上は平衡化するようにして下さい。
4. 凍結バイアルの開封前にエタノールで拭き取って下さい。圧を逃すために軽く1/4回転ほどキャップを捻り、その後すぐにキャップを締め、37°Cウォーターバス上で融解して下さい。バイアル全体をウォーターバスに浸さないようにして下さい。凍結バイアルを目視して、細胞溶液中の氷片がわずかに残った状態になったらバイアルをウォーターバスから取り出し、余熱で完全に融かして下さい。2分間以上の融解は避けるようにして下さい。**注意事項: 細胞融解後の遠心操作は行わないで下さい。残存するDMSOより遠心操作の方が細胞に与えるダメージが大きいためです。**
5. バイアル中の細胞懸濁液を、ステップ3で準備した培養容器に注意深く混ぜるようにして下さい。培養容器全体に細胞が行き渡るように穏やかにフラスコを揺らして下さい。その後CO₂インキュベータに移して下さい。**注意事項: 血管内皮細胞は、他の細胞タイプよりも凍結バイアルに接着しやすい性質があります。細胞懸濁液を入念に行い、必要に応じてバイアルをリンスするようにして下さい。**
6. 播種後16~24時間で培地交換を行って下さい。

6. 細胞のメンテナンス

1. 播種後16～24時間で培地交換を行った後は、48時間おきに培地交換を行って下さい。
2. 細胞密度が25～45%の時は、1.5 mL/5 cm²になるように培地量を調整して下さい。
3. 細胞密度が45%を超えたら、2 mL/5 cm²になるように培地を加えて下さい。
4. 培地が繰り返し加熱/冷却されることを避けるため、培地交換に必要な培地量だけを滅菌済みの別の容器に移して温めておくようにして下さい。

7. 細胞の継代

注意事項：ロンザの継代試薬をご利用された場合にのみ、Clonetics™ 細胞の継代後の生育不良による製品交換を承ります。推奨される継代試薬はトリプシン/EDTA (CC-5012)、トリプシン中和溶液 (CC-5002)、HEPES バッファー (CC-5022) です。ReagentPack™ 継代試薬 (CC-5034) は上記3点のセット製品です。

以下の手順は 25 cm² フラスコを使用する場合です。他のサイズを使用する場合はサイズに従って培地量を変更して下さい。

1. 細胞が70～85%コンフルエントに達したら継代を行って下さい。
2. 25 cm²の細胞の継代を行うために下記を準備して下さい。
 - a. トリプシン/EDTA溶液2 mLを融解し室温に戻して下さい。
 - b. HEPESバッファー 7～10 mLを室温に戻して下さい。
 - c. トリプシン中和溶液 5 mLを室温に戻して下さい。
 - d. 増殖培地を室温に戻して下さい。
 - e. 新しいフラスコを準備して下さい。
3. 継代は、1フラスコずつ実施してください。最初のフラスコでこのセクションで説明する手順で細胞の剥離を行い、細胞数、生存細胞数を計測し、推奨される播種密度から継代に必要なフラスコ数などを計算します。
4. 培養容器から培地をアスピレーターで吸引して下さい。
5. HEPESバッファー5 mLで細胞をリンスして下さい。培地にはトリプシンを中和してしまう様々なタンパク質やカルシウムが含有されるため、このステップは必ず行うようにして下さい。
6. HEPESバッファーをフラスコから吸引して下さい。
7. 2 mLのトリプシン溶液をフラスコに加え、細胞が浸るようにします。
8. 培養容器をCO₂インキュベータに戻し3～5分静置して下さい。その間に顕微鏡で細胞剥離を何度か確認して下さい。

9. 約90%の細胞が丸く観察されるようになるまでトリプシン処理を行って下さい。
10. この際に、手のひらでフラスコを軽くタップしてフラスコから細胞を容器表面から遊離させるようにして下さい。あまり細胞が剥がれていない時はトリプシン処理を続け、30秒後に再度タップして下さい。まだ剥離が不十分な場合は、以降30秒おきのタップを繰り返して下さい。全体のトリプシン処理は5分を超えないようにして下さい。

注意事項：もし多くの細胞が5分間以内に剥離しなかった場合、トリプシン反応温度が十分に高くなかった、または活性が低かったなどが問題点として考えられます。その際は、後に記載する要領で細胞を回収し、十分に温めた新しいトリプシン/EDTA溶液で再度細胞剥離を行って下さい。新しいトリプシン溶液を調製している間は、トリプシン中和溶液で細胞をリンスした後に、新しい培地を加えインキュベータで細胞を維持するようにして下さい。

11. 細胞が剥がれたら、5 mLのトリプシン中和溶液をフラスコに加えてトリプシン反応を停止させてください。
12. 細胞をすみやかに15 mLの遠心チューブに移して下さい。
13. フラスコを2 mLのHEPES/バッファーで洗浄し、残存した細胞を回収して下さい。
14. 細胞が回収されたフラスコを顕微鏡で観察し、細胞が回収されているかを確認して下さい。細胞の残存は5%以下が望ましいです。
15. 回収した細胞を200 Gで5分間遠心して下さい。100～200 μLを残し、大部分の上清をアスピレーターで除いて下さい。遠心チューブを指で軽く弾いて、細胞ペレットを少し崩して下さい。
16. 培地を加えて細胞を希釈し、最終量を2～3 mLとして下さい。その細胞懸濁液量を記録して下さい。
17. 血球計算盤およびトリパンブルーを使用して、セルカウントと細胞生存率を測定して下さい。細胞の収量を記録して下さい。
18. 必要に応じて培地を加えて、望ましい細胞数/mLになるように調整して下さい。
19. 以下の計算式で全生細胞数を算出して下さい。

$$\text{全生細胞数} = \frac{\text{細胞カウント数} \times \text{細胞生存率} (\%)}{100}$$

20. 細胞の収量、細胞タイプ、その細胞の推奨播種密度、アプリケーションに応じて、継代に使用するフラスコの数を決めて下さい。拡大培養や血管新生の用途における継代播種密度は以下の表を参照して下さい。以下の計算式で使用するフラスコ数を算出して下さい。

細胞タイプ/アプリケーション	継代時の推奨播種密度
HUVEC	2,500 viable cells /cm ²
HMVEC-dNeo – 膚微小血管内皮細胞	2,000 viable cells /cm ²
その他の血管内皮細胞	5,000 viable cells /cm ²
血管新生	65,000~80,000 viable cells /cm ²

以下の計算式でフラスコに播種する細胞懸濁液量を算出して下さい。

21. 各フラスコに細胞タイプ、継代日、継代数などの情報を記載して下さい。

$$\text{フラスコ数} = \frac{\text{全生細胞数}}{\text{フラスコ面積} \times \text{播種密度}}$$

22. 各フラスコに細胞タイプ、継代日、継代数などの情報を記載して下さい。

$$\text{播種量} = \frac{\text{細胞懸濁液 全量}}{20 \text{ で決定したフラスコ数}}$$

23. 血管新生用途でフラスコやプレートに播種する場合は、マトリゲルコート培養容器を使用するようにして下さい。増殖目的であればプレートコーティングは必要ありません。

24. 注意深く培地を新しい培養容器に1 mL/5 cm²の量で加えて下さい。

25. 15 mLチューブ中の細胞懸濁液を、5 mLピペットを使用して均一な細胞懸濁液を行い、計算した液量の細胞を新しい継代フラスコに分注して下さい。

26. ベントキャップを使用していない場合は、フラスコのキャップを緩めて下さい。インキュベータに戻して培養を行って下さい。

8. 細胞の凍結保存

注意事項：細胞凍結保存により、細胞の品質やパフォーマンスを犠牲にしてしまう場合があります。ロンザは、ユーザーにより凍結保存された Clonetics™ と Poietics™ 細胞のパフォーマンスは保証しません。基本的には凍結保存を行わず継続的に培養して細胞を維持することをお奨めします。

凍結保存培地について

細胞タイプ	ベース培地	DMSO	FBS
HAEC	80% EGM™ -2	10% DMSO	10% FBS
HCAEC	80% EGM™ -2MV	10% DMSO	10% FBS
HIAEC	80% EGM™ -2MV	10% DMSO	10% FBS
HPAEC	80% EGM™ -2	10% DMSO	10% FBS
HUVEC in EGM™ -2	80% EGM™ -2	10% DMSO	10% FBS
HUVEC in EGM™	80% EGM™	10% DMSO	10% FBS
HUVEC in EGM™ -PLUS	80% EGM™ -PLUS	10% DMSO	10% FBS
HMVEC-Bd	80% EGM™ -2MV	10% DMSO	10% FBS
HMVEC-C	80% EGM™ -2MV	10% DMSO	10% FBS
HMVEC-DBIAd	80% EGM™ -2MV	10% DMSO	10% FBS
HMVEC-DAd	80% EGM™ -2MV	10% DMSO	10% FBS
HMVEC-DNeo	80% EGM™ -2MV	10% DMSO	10% FBS
HMVEC-DBINeo	80% EGM™ -2MV	10% DMSO	10% FBS
HMVEC-DLyAd	80% EGM™ -2MV	10% DMSO	10% FBS
HMVEC-DLyNeo	80% EGM™ -2MV	10% DMSO	10% FBS
HMVEC-L	80% EGM™ -2MV	10% DMSO	10% FBS
HMVEC-LLy	80% EGM™ -2MV	10% DMSO	10% FBS
HMVEC-Myo	80% EGM™ -2MV	10% DMSO	10% FBS
D-HAEC (Type I and II)	80% EGM™ -2	10% DMSO	10% FBS
D-HCAEC (Type I and II)	80% EGM™ -2MV	10% DMSO	10% FBS
D-HPAEC (Type I and II)	80% EGM™ -2	10% DMSO	10% FBS
D-HMVEC-C (Type I and II)	80% EGM™ -2MV	10% DMSO	10% FBS
D-HMVEC-Dad (Type I and II)	80% EGM™ -2MV	10% DMSO	10% FBS

1. 上表に従って、凍結保存培地を調製し、4℃に冷やして下さい。
2. 凍結バイアルやアンプルを用意し、細胞タイプ・保存日・継代数をラベルして下さい。
3. 凍結保存培地を0.2 μm滅菌フィルター処理して下さい。
4. セクション7 細胞の継代のステップ1~15に従って、細胞を回収し、遠心操作を行って下さい。
5. 500,000~2,000,000 cells/mLの濃度で、凍結保存培地により細胞懸濁液を行って下さい。
注意事項：細胞へのダメージを最小限にするために作業は手早く行って下さい。
6. 細胞懸濁液を1 mLずつ凍結バイアルに小分け分注し、封をして下さい。
7. バイアルをキャニスターに収納して下さい。
8. 細胞を一晩 -80℃で保存して下さい。
9. 12~24時間以内に細胞を液体窒素タンクに移して下さい。

9. 血管新生：イントロダクション

注意事項：ロンザの血管内皮細胞システムにおいて、血管新生アプリケーションに対する品質試験は実施しておりません。血管新生実験はあくまで推奨の範囲に留まり、パフォーマンス保証は致しかねます。

血管新生は、既存の血管から新たな血管が発生し、血管網の形成を担う一連のプロセスで、血管内皮細胞がプロセスに密接に関与しています。血管新生の過程は、基底膜破壊、内皮細胞の遊走、侵襲、増殖、管腔形成と複数のステージから成り立ちます。*in vitro* 実験においても、時間の経過と共に細胞遊走、直鎖状の血管形成などのフェーズを経て、新しい管腔形成が行われ、最終的に細胞ネットワークが形成されます。従って、タイムポイント毎の測定は抗血管新生因子の働きに関する詳細な情報を得るために重要です。文献ではいくつかの阻害剤が阻害剤コントロールとして利用されてきました。これらの阻害剤の一つがスラミンです。スラミンは特異的、競合的な G タンパク質共役型受容体活性 (GPCR) の阻害剤で、ジャンクションの数、チューブの数、全体のチューブ長など血管形成における様々なアウトプットに影響を及ぼします。血管形成の完了と共に、顕微鏡での明視野およびカルセイン AM などの染色による蛍光観察で確認することができます。カルセイン染色は、より明瞭なチューブの視覚化が可能です。

10. 血管新生：プレートコーティング

[プレートコーティング コンポーネント]

Corning® マトリゲル基底膜マトリックス フェノールレッドフリー 10 mL (コーニング 製品番号 356237)

1. Corning® マトリゲル基底膜マトリックスを氷上4°Cオーバーナイトで融解して下さい。
2. 適切な培養容器を予め冷やしておいて下さい。コーティング工程中はプレートを氷上で維持して下さい。
注意事項：48 ウェルまたは 96 ウェル培養プレートを推奨します。
3. 予め冷やしておいたピペットチップを使用して、マトリゲルを200 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ の割合で培養容器に分注して下さい(例：150 μL のマトリゲルを48ウェルプレートの各ウェルに分注する。75 μL のマトリゲルを96ウェルプレートの各ウェルに分注する)。
4. 残ったマトリゲルは1 mL ずつ予め冷やしておいた1.5 mL チューブに小分けし、速やかに-20°C 冷凍保存して下さい。複数回の凍結融解は避けて下さい。
5. プレートは室温で10分以上、静置して下さい。
6. 室温でのインキュベーション後、CO₂インキュベータで30分間インキュベートして下さい。

注意事項：コーティング工程が完了したら、直ちに細胞を播くようにして下さい。

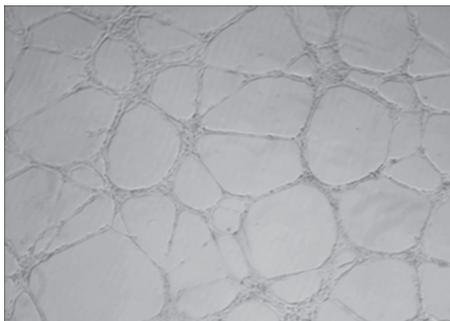


図 1. HUVEC におけるチューブ形成：マトリゲル コートされた 48 ウェルプレートに 50,000 cells/ウェルで播種後、16 時間後の画像 (5 倍拡大)

11. 血管新生：プロトコル

[血管新生コンポーネント]

- (推奨) HUVEC - 臍帯静脈内皮細胞スクリーニング済 (C2517AS または C2519AS)
 - セクション4 培地の調製で準備した EGM™ -2 培地
 - セクション10 血管新生：プレートコーティングで調製したコーティング済の培養容器
1. HUVECによる血管新生実験での推奨播種密度は65,000~80,000 cells/cm²です。
 2. 推奨播種密度とプレート播種面積を基に必要なとなるコーティング済みプレートの枚数を算出して下さい。
 3. コントロールサンプルには培地 (0.5 mL/3 cm²) を、実験サンプルには2倍濃度の血管新生阻害剤/誘導剤を含む適当量 (0.5 mL/3 cm²) の増殖培地 (EGM™ -2 培地) をプレートに添加し、プレートをCO₂インキュベータ内で30分以上平衡化して下さい。(例：2倍濃度の阻害剤/誘導剤を含む125 μL 培地を48ウェルプレートの各ウェルに分注する。2倍濃度の阻害剤/誘導剤を含む75 μL 培地を96ウェルプレートの各ウェルに分注する)
注意事項：この後に細胞懸濁液を添加する都合上、血管新生阻害剤/誘導剤は2倍濃度で調製して下さい。コントロールサンプルには阻害剤/誘導剤を含まない培地を添加して下さい。阻害剤ポジティブコントロールとしてのスラミン (シグマ カタログ番号 S2671) は30 μM および60 μM (最終濃度15 μM および30 μM) で調製して下さい。
 4. セクション7 細胞の継代のステップ1~19に従って、細胞継代を行って下さい。
注意事項：最適な結果のために、継代数の少ない細胞を使用するようにして下さい。
 5. 通常の継代よりも、さらに細胞を増殖培地 (EGM™ -2 培地) で希釈し、最終濃度を400,000 cells/mlになるようにして下さい。
 6. 阻害剤/誘導剤を分注済みのマトリゲル コーティング済みプレートに細胞懸濁液を0.5 mL/3 cm²の密度で播種して下さい。(例：125 μL の細胞懸濁液を48ウェルプレートの各ウェルに分注する。75 μL の細胞懸濁液を96ウェルプレートの各ウェルに分注する)
 7. チューブ形成は細胞播種後4時間以内に始まることが知られています。完全なチューブ形成には12~16時間を要します。また細管の破壊は播種後16~18時間後に典型的に起こります。チューブ形成の解析は播種後16時間までに始めるようにして下さい。カルセインAM染色などによるライブセルイメージングによる視覚化が可能です。

血管新生に関する留意点

- 理論的には、適切な培養環境において全ての血管内皮細胞にて血管新生の再現が可能です。当プロトコルはHUVEC以外の血管内皮細胞でも適用可能と考えられますが、条件は細胞タイプ毎に最適化する必要があります。
- 血管新生の程度や血管新生阻害剤/誘導剤に対する反応性は細胞タイプ、ドナーおよび継代数に大きく依存します。
- 細胞密度は血管新生において決定的な側面を持ちます。細胞密度があまりにも低いと不完全なチューブ形成に至ります。また細胞密度が高すぎると細胞塊が見られたり、単層培養となってしまうケースが考えられます。

12. 製品情報：正常細胞

カタログ番号	製品名	推奨培地	凍結時の継代数	播種密度	継代に至るまでの日数
CC-2535	HAEC – 大動脈内皮細胞	EGM™ -2 BulletKit™ 培地	Passage 3	5,000 viable cells/cm ²	5~9日
CC-2585	HCAEC – 冠動脈内皮細胞	EGM™ -2 MVBulletKit™ 培地	Passage 3	5,000 viable cells/cm ²	5~9日
CC-2545	HIAEC – 腸骨動脈内皮細胞	EGM™ -2 MVBulletKit™ 培地	Passage 3	5,000 viable cells/cm ²	5~9日
CC-2530	HPAEC – 肺動脈内皮細胞	EGM™ -2 BulletKit™ 培地	Passage 3	5,000 viable cells/cm ²	5~9日
CC-2519	HUVEC – 臍帯静脈内皮細胞プールドナー	EGM™ BulletKit™ 培地	Passage 1	2,500 viable cells/cm ²	5~9日
C2519A	HUVEC – 臍帯静脈内皮細胞プールドナー	EGM™ -2 BulletKit™ 培地	Passage 1	2,500 viable cells/cm ²	5~9日
C2519AS	HUVEC – 臍帯静脈内皮細胞プールドナー スクリーニング済	EGM™ -2 BulletKit™ 培地	Passage 1	2,500 viable cells/cm ²	5~9日
00191027	HUVEC-XL – 臍帯静脈内皮細胞プールドナー大容量	EGM™ -2 BulletKit™ 培地	Passage 3	2,500 viable cells/cm ²	5~9日
CC-2517	HUVEC – 臍帯静脈内皮細胞単一ドナー	EGM™ BulletKit™ 培地	Passage 1	2,500 viable cells/cm ²	5~9日
C2517A	HUVEC – 臍帯静脈内皮細胞単一ドナー	EGM™ -2 BulletKit™ 培地	Passage 1	2,500 viable cells/cm ²	5~9日
C2517AS	HUVEC – 臍帯静脈内皮細胞単一ドナー スクリーニング済	EGM™ -2 BulletKit™ 培地	Passage 1	2,500 viable cells/cm ²	5~9日
CC-2935	HUVEC – 臍帯静脈内皮細胞単一ドナー	EGM™ PLUSBulletKit™ 培地	Passage 1	2,500 viable cells/cm ²	5~9日
CC-7016	HMVEC-Bd – ヒト膀胱微小血管内皮細胞	EGM™ -2 MVBulletKit™ 培地	Passage 3	5,000 viable cells/cm ²	5~9日
CC-7030	HMVEC-C – 心臓微小血管内皮細胞	EGM™ -2 MVBulletKit™ 培地	Passage 3	5,000 viable cells/cm ²	5~9日
CC-2543	HMVEC-dAd – 皮膚微小血管内皮細胞	EGM™ -2 MVBulletKit™ 培地	Passage 3	5,000 viable cells/cm ²	5~9日
CC-2516	HMVEC-dNeo – 皮膚微小血管内皮細胞 プールドナー	EGM™ -2 MVBulletKit™ 培地	Passage 3	5,000 viable cells/cm ²	5~9日
CC-2505	HMVEC-dNeo – 皮膚微小血管内皮細胞単一ドナー	EGM™ -2 MVBulletKit™ 培地	Passage 3	5,000 viable cells/cm ²	5~9日
CC-2810	HMVEC-dLyAd – 皮膚リンパ管微小血管内皮細胞	EGM™ -2 MVBulletKit™ 培地	Passage 3	5,000 viable cells/cm ²	5~9日
CC-2527	HMVEC-L – 肺微小血管内皮細胞	EGM™ -2 MVBulletKit™ 培地	Passage 3 or 4	5,000 viable cells/cm ²	5~9日

13. 製品情報：疾患ドナー由来細胞

カタログ番号	製品名	推奨培地	凍結時の継代数	播種密度	継代に至るまでの日数
CC-2919	D-HAEC – 大動脈内皮細胞 I型糖尿病	EGM™ -2 BulletKit™ 培地	Passage 3	5,000 viable cells/cm ²	5~9日
CC-2920	D-HAEC – 大動脈内皮細胞 II型糖尿病	EGM™ -2 BulletKit™ 培地	Passage 3	5,000 viable cells/cm ²	5~9日
CC-2921	D-HCAEC – 冠動脈内皮細胞 I型糖尿病	EGM™ -2 MV BulletKit™ 培地	Passage 3	5,000 viable cells/cm ²	5~9日
CC-2922	D-HCAEC – 冠動脈内皮細胞 II型糖尿病	EGM™ -2 MV BulletKit™ 培地	Passage 3	5,000 viable cells/cm ²	5~9日
CC-2923	D-HPAEC – 肺動脈内皮細胞 I型糖尿病	EGM™ -2 BulletKit™ 培地	Passage 3	5,000 viable cells/cm ²	5~9日
CC-2924	D-HPAEC – 肺動脈内皮細胞 II型糖尿病	EGM™ -2 BulletKit™ 培地	Passage 3	5,000 viable cells/cm ²	5~9日
CC-2927	D-HMVEC – 心臓微小血管内皮細胞 I型糖尿病	EGM™ -2 MV BulletKit™ 培地	Passage 3	5,000 viable cells/cm ²	5~9日
CC-2928	D-HMVEC – 心臓微小血管内皮細胞 II型糖尿病	EGM™ -2 MV BulletKit™ 培地	Passage 3	5,000 viable cells/cm ²	5~9日
CC-2929	D-HMVEC – 皮膚微小血管内皮細胞 I型糖尿病	EGM™ -2 MV BulletKit™ 培地	Passage 3	5,000 viable cells/cm ²	5~9日
CC-2930	D-HMVEC – 皮膚微小血管内皮細胞 II型糖尿病	EGM™ -2 MV BulletKit™ 培地	Passage 3	5,000 viable cells/cm ²	5~9日

14. 品質管理:正常細胞

カタログ番号	製品名	細胞数/バイアル	細胞生存率	分裂保証回数	倍加時間	マーカー
CC-2535	HAEC – 大動脈内皮細胞	>5 x 10 ⁵ cells	>70%	>15回	15~48時間	Alpha Actin陰性 FactorVIII陽性 アセチルLDL取込陽性
CC-2585	HCAEC – 冠動脈内皮細胞	>5 x 10 ⁵ cells	>70%	>15回	15~48時間	Alpha Actin陰性 FactorVIII陽性 アセチルLDL取込陽性
CC-2545	HIAEC – 腸骨動脈内皮細胞	>5 x 10 ⁵ cells	>70%	>10回	15~48時間	Alpha Actin陰性 FactorVIII陽性 アセチルLDL取込陽性
CC-2530	HPAEC – 肺動脈内皮細胞	>5 x 10 ⁵ cells	>70%	>15回	11.5~32.5時間	Alpha Actin陰性 FactorVIII陽性 アセチルLDL取込陽性
CC-2519	HUVEC – 臍帯静脈内皮細胞ブールドナー	>5 x 10 ⁵ cells	>70%	>15回	15~48時間	CD31/CD105陽性
C2519A	HUVEC – 臍帯静脈内皮細胞ブールドナー	>5 x 10 ⁵ cells	>70%	>15回	12~48時間	CD31/CD105陽性
C2519AS	HUVEC – 臍帯静脈内皮細胞 ブールドナー スクリーニング済	>5 x 10 ⁵ cells	>70%	>15回	12~48時間	CD31/CD105陽性 Axl, eNOS, Tie-2, VEGFr2陽性
00191027	HUVEC-XL – 臍帯静脈内皮細胞 ブールドナー大容量	>1 x 10 ⁷ cells	>70%	>5回	12~48時間	CD31/CD105陽性 Alpha Actin陰性 FactorVIII陽性 アセチルLDL取込陽性
CC-2517	HUVEC – 臍帯静脈内皮細胞単一ドナー	>5 x 10 ⁵ cells	>70%	>15回	15~48時間	CD31/CD105陽性
C2517A	HUVEC – 臍帯静脈内皮細胞単一ドナー	>5 x 10 ⁵ cells	>70%	>15回	12~48時間	CD31/CD105陽性
C2517AS	HUVEC – 臍帯静脈内皮細胞単一ドナー スクリーニング済	>5 x 10 ⁵ cells	>70%	>15回	12~48時間	CD31/CD105陽性 Axl, eNOS, Tie-2, VEGFr2陽性
CC-2935	HUVEC – 臍帯静脈内皮細胞単一ドナー	>5 x 10 ⁵ cells	>70%	>15回	15~48時間	CD31/CD105陽性
CC-7016	HMVEC-Bd – ヒト膀胱微小血管内皮細胞	>5 x 10 ⁵ cells	>70%	>10回	12~48時間	Alpha Actin陰性 FactorVIII陽性 アセチルLDL取込陽性
CC-7030	HMVEC-C – 心臓微小血管内皮細胞	>5 x 10 ⁵ cells	>70%	>10回	12~48時間	Alpha Actin陰性 FactorVIII陽性 アセチルLDL取込陽性
CC-2543	HMVEC-dAd – 皮膚微小血管内皮細胞	>5 x 10 ⁵ cells	>70%	>15回	15~48時間	Alpha Actin陰性 FactorVIII陽性 アセチルLDL取込陽性
CC-2516	HMVEC-dNeo – 皮膚微小血管内皮細胞 ブールドナー	>5 x 10 ⁵ cells	>70%	>15回	15~48時間	Alpha Actin陰性 FactorVIII陽性 アセチルLDL取込陽性
CC-2505	HMVEC-dNeo – 皮膚微小血管内皮細胞 単一ドナー	>5 x 10 ⁵ cells	>70%	>15回	15~48時間	Alpha Actin陰性 FactorVIII陽性 アセチルLDL取込陽性
CC-2810	HMVEC-dLyAd – 皮膚リンパ管微小血管 内皮細胞	>5 x 10 ⁵ cells	>70%	>12回	15~48時間	Alpha Actin陰性 FactorVIII陽性 アセチルLDL取込陽性 CD31陽性 Podoplanin陽性
CC-2527	HMVEC-L – 肺微小血管内皮細胞	>5 x 10 ⁵ cells	>70%	>15回	15~48時間	Alpha Actin陰性 FactorVIII陽性 アセチルLDL取込陽性 PECAM陽性

15. 品質管理:疾患ドナー由来細胞

カタログ番号	製品名	細胞数/バイアル	細胞生存率	分裂保証回数	倍加時間	マーカー
CC-2919	D-HAEC – 大動脈内皮細胞 I 型糖尿病	>5 x 10 ⁵ cells	>70%	参考情報	参考情報	Alpha Actin陰性 FactorVIII陽性 アセチルLDL取込陽性
CC-2920	D-HAEC – 大動脈内皮細胞 II 型糖尿病	>5 x 10 ⁵ cells	>70%	参考情報	参考情報	Alpha Actin陰性 FactorVIII陽性 アセチルLDL取込陽性
CC-2921	D-HCAEC – 冠動脈内皮細胞 I 型糖尿病	>5 x 10 ⁵ cells	>70%	参考情報	参考情報	Alpha Actin陰性 FactorVIII陽性 アセチルLDL取込陽性
CC-2922	D-HCAEC – 冠動脈内皮細胞 II 型糖尿病	>5 x 10 ⁵ cells	>70%	参考情報	参考情報	Alpha Actin陰性 FactorVIII陽性 アセチルLDL取込陽性
CC-2923	D-HPAEC – 肺動脈内皮細胞 I 型糖尿病	>5 x 10 ⁵ cells	>70%	参考情報	参考情報	Alpha Actin陰性 FactorVIII陽性 アセチルLDL取込陽性
CC-2924	D-HPAEC – 肺動脈内皮細胞 II 型糖尿病	>5 x 10 ⁵ cells	>70%	参考情報	参考情報	Alpha Actin陰性 FactorVIII陽性 アセチルLDL取込陽性
CC-2927	D-HMVEC – 心臓微小血管内皮細胞 I 型糖尿病	>5 x 10 ⁵ cells	>70%	参考情報	参考情報	Alpha Actin陰性 FactorVIII陽性 アセチルLDL取込陽性
CC-2928	D-HMVEC – 心臓微小血管内皮細胞 II 型糖尿病	>5 x 10 ⁵ cells	>70%	参考情報	参考情報	Alpha Actin陰性 FactorVIII陽性 アセチルLDL取込陽性
CC-2929	D-HMVEC – 皮膚微小血管内皮細胞 I 型糖尿病	>5 x 10 ⁵ cells	>70%	参考情報	参考情報	Alpha Actin陰性 FactorVIII陽性 アセチルLDL取込陽性
CC-2930	D-HMVEC – 皮膚微小血管内皮細胞 II 型糖尿病	>5 x 10 ⁵ cells	>70%	参考情報	参考情報	Alpha Actin陰性 FactorVIII陽性 アセチルLDL取込陽性

全ての細胞について性能評価試験および HIV-1、Hepatitis-B、Hepatitis-C ウイルス、細菌、酵母、カビ類の陰性試験が行われています。細胞生存率、細胞数、細胞形態、増殖能力が凍結融解後の細胞で測定されています。Clonetics™ 培地はヒト血管内皮細胞の培養にとって最適に調製されています。試験成績書 (CoA) は全ロットにおいて利用可能です。

<https://www.lonza.com/about-lonza/knowledge-center/certificates-of-analysis.aspx>

製品保証についてはセクション 17 製品保証についてをご参照下さい。

16. 品質管理: 培地と継代試薬

基本培地			
製品名	EBM™ 基本培地	EBM™ -2 基本培地	EBM™ -PLUS 基本培地
カタログ番号	CC-3121 CC-3129 (フェノールレッドフリー)	CC-3156	CC-5036
試験		仕様	
無菌試験	陰性	陰性	陰性
pH	7.5~8.0	7.6~8.0	7.4~8.0
浸透圧 (mOsm/Kg H ₂ O)	260~290	260~290	260~290
エンドトキシン	参考情報	参考情報	参考情報

大血管 SingleQuots™ 添加因子キット				微小血管 SingleQuots™ 添加因子キット
製品名	EGM™ 添加因子キット	EGM™ -2 添加因子キット	EGM™ -PLUS 添加因子キット	EGM™ -2 MV 添加因子キット
カタログ番号	CC-4133	CC-4176	CC-4542	CC-4147
試験		仕様		
無菌試験	陰性	陰性	陰性	陰性
性能試験	合格	合格	合格	合格

継代試薬			
製品名	トリプシン/EDTA	トリプシン中和液	HEPES溶液
カタログ番号	CC-5012	CC-5002	CC-5022/CC-5024
試験		仕様	
無菌試験	陰性	陰性	陰性
性能試験	合格	—	合格
pH	参考情報	—	参考情報
浸透圧 (mOsm/Kg H ₂ O)	参考情報	—	参考情報
エンドトキシン	—	—	参考情報

17. 製品保証について

当製品の *in vitro* 培養は有限のライフスパンがあります。

弊社は、適切な Clonetics™ 培地および継代試薬が使用され、かつ適切な保存条件および当マニュアルに従って細胞培養が行われた時のみ Clonetics™ 初代細胞製品の性能を保証します。代替の培地および継代試薬の使用時には製品保証は致しかねます。最適なロンザ培地、継代試薬およびプロトコルをお探しの場合は弊社テクニカルサポートまでお問合せ下さい。

- Clonetics™ HAEC、HCAEC、HPAEC、HUVE、HMVEC-D、HMVEC-L、UtMVEC-Myo細胞製品については15回の細胞分裂を保証します。HMVEC-DLy、HMVEC-LLy細胞製品については12回の細胞分裂を保証します。HIAEC、HMVEC-Bd、HMVEC-C細胞製品については10回の細胞分裂を保証します。D-HAEC、D-HCAEC、D-HPAEC、D-HMVEC-C、DHMVEC-D細胞製品については融解後最初の培養において90%コンフルエントに達することを保証し、また融解後の2継代における細胞分裂回数の情報が参考情報 (For Information Only) としてご提供できます。
- Clonetics™ 正常血管内皮細胞システムは最低5回の細胞分裂を保証します。Clonetics™ 疾患ドナー由来血管内皮細胞は最低1回の継代を保証します。
- 上記の保証内容を超える細胞分裂や継代は可能です。但し、増殖率や生物学的応答性、機能については継代と共に劣化していきます。
- 血管内皮細胞はコンフルエントに達した場合、不可逆的な接着阻害を引き起こします。貴重な細胞製品を無駄にしないように、また製品保証の有

効性を維持するために、細胞の継代は80%コンフルエントに達する前に実施するようにして下さい。

保存条件	
Clonetics™ 細胞	液体窒素タンク保存
基本培地	冷蔵 (2-8℃) 保存
BulletKit™	添加因子キット 冷凍 (-20℃以下) 保存
BulletKit™ 調製後	冷蔵 (2-8℃) 保存。1か月以内に使用
ReagentPack™ 継代試薬	トリプシン/EDTA 冷凍保存。冷蔵の場合は72時間以内に使用
	トリプシン中和液 冷凍保存。冷蔵の場合は1か月以内に使用
	HEPES溶液 冷凍保存。冷蔵の場合は1か月以内に使用

当製品は研究用途に限定されています。臨床や診断の用途には使用することはできません。

注意事項：Clonetics™ と Poietics™ 細胞製品はヒト由来成分が含有されており、潜在的な感染リスクがあります。FDA (米国食品医薬品局) が承認する試験方法により、各細胞ドナーに対する HIV-1 ウイルス、Hepatitis B ウイルス、Hepatitis C ウイルス陰性は確認されていますが、ドナーに対するウイルス試験が不可能なケースでは細胞製品に対してウイルス核酸の有無がテストされています。試験による完全な HIV-1 ウイルス、Hepatitis B ウイルス、Hepatitis C ウイルス陰性の保証はしていません。全てのヒト原料を含む製品はバイオセーフティレベル 2 施設での取扱いをお願いします。