

JCRB1458 HUEhT-1・JCRB1459 HUEhT-2 培地、試薬の調製、継代方法

培養培地 : MCDB131 medium supplemented with 10% fetal bovine serum
0.03g/L endothelial cell growth supplement (ECGS)
5 mg/L heparin
10mM L-glutamine

培地 : MCDB131 (gibco カタログ No.10372) + 10 % FBS (Heat inactivated)
添加試薬: ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement 15 mg/vial, Corning 354006)
Heparin (Heparin Sodium Solt from porcine intestinal mucosa, SIGMA-ALDRICH, H3149-10KU)
L-Glutamine (SIGMA-ALDRICH, 12-0950-2 25g)

培地の調製方法

培地 1000 ml の調製 : MCDB131 1000 ml (500 ml x 2)
FBS (Heat Inactivated) 100 ml (10 %)
ECGS 30 mg
* Heparin 5 mg
* L-Glutamine 1.5 g
(*Heparin, L-Glutamine 以外は滅菌済)

調製手順 :

1. L-Glutamine 1.5g をメディウム瓶 (125 ml 位) に測り取り、MCDB131 100 ml 加えて溶解させる。
2. Heparin 5 mg を遠心管に測り取り、MCDB131 5 ml を加えて溶解させる。
(5mg を測り取ることが難しい場合は、濃度の高い溶液を作り、必要量加える)
3. ECGS のバイアルに少量の MCDB131 を加えて溶解させる。
4. 1 リットルのフィルターシステムに、MCDB131 と、溶解させた Heparin, L-Gultamine, ECGS を加えて、吸引ろ過滅菌する。
5. メディウム瓶に分注して冷蔵庫で保存する。
6. 使用する前に、FBS を加えて、10 ml ほどを培養容器に入れ、37℃に置いてバクテリア等で濁ってこないことを確認する。

トリプシン : 0.025 % トリプシン - EDTA

0.5 % トリプシン - EDTA (gibco, 15400) を PBS⁻ で 20 倍希釈する。

培養容器 : コラーゲン I 型コートディッシュ

Ready to use の培養液 : Cell System 社 CS-C 培地キット (CS-4Z0-500R)

Lonza 社製の EGM BulletKit

継代方法

通常の継代方法 (100 mm ディッシュを用いた場合)

1. 培養ディッシュから培養液を吸引除去する。
2. PBS⁻ 5 - 10 ml をディッシュに入れて、ディッシュを動かして細胞を洗い、吸引除去する。
3. トリプシン-EDTA 液 2 ml をディッシュに加えて、ディッシュを動かして細胞全体に行き渡るようにする。
4. 37°C CO₂ インキュベーター内で 10 - 15 分置く。
5. すべての細胞が丸くなったら、ディッシュを軽くタッピングして細胞が剥がれ落ちるのを確認し、ディッシュ当たり 3 ml の血清入り培養液を加えて、ピペッティングで細胞を集めて 50 ml の遠心管に浮遊させる、1300 rpm, 8 分間遠心して、血清入り培養液に再浮遊させる。
6. 4 倍スプリットで継代するために、必要な容量の細胞浮遊液を調製し、100 mm ディッシュに播種する。
7. 予定したコラーゲンコートディッシュに、ディッシュ当たり細胞浮遊液を、8 - 10 ml 播種する。

PDL の計算をする場合の継代方法 (細胞バンクでの実施例)

1. 培養ディッシュから培養液を吸引除去する。
2. PBS⁻ 5 - 10 ml をディッシュに入れて、ディッシュを動かして細胞を洗い、吸引除去する。トリプシン-EDTA 液 2 ml をディッシュに加えて、ディッシュを動かして細胞全体に行き渡るようにする。
3. 37°C CO₂ インキュベーター内で 10 - 15 分間置く。
4. すべての細胞が丸くなったら、ディッシュを軽くタッピングして細胞が剥がれ落ちるのを確認し、ディッシュ当たり 3 ml の血清入り培養液を加えて、ピペッティングで細胞を集めて 50 ml の遠心管に浮遊させる、1300 rpm, 8 分間遠心して、血清入り培養液に再浮遊させる。この時に、ディッシュ当たり 2 ml で再浮遊させて、細胞数をカウントする。
5. 4 倍スプリットで継代するために、必要な容量の細胞浮遊液を調製し、100 mm ディッシュに播種する。その際に同時に 1 枚の 35 mm ディッシュにも、1 ml 細胞浮遊液を巻き込んでおく。

6. 翌日、あるいは数時間後に 35 mm ディッシュ（約 10 cm²）に接着している細胞をカウントし、6 倍して 100 mm ディッシュ（約 60 cm²）当たりの細胞数を求め播種時細胞数とする。

なお、培養開始のディッシュの数が少ない時に、遠心による細胞のロスを防ぐために、遠心しないで、継代して、翌日培地交換する方法もあります。

細胞バンクではディッシュ 10 枚ぐらいまでは、この方法で継代しております。具体的にはトリプシンで細胞を剥がすところから、下記のようにします。

3. トリプシン-EDTA 液 3 ml をディッシュに加えて、ディッシュを動かして細胞全体に行き渡るようにしたのち、約 1 ml を残してピペットで吸い取る。
4. 37°C CO₂ インキュベーター内で 10 - 15 分間置く。
5. すべての細胞が丸になったら、ディッシュを軽くタッピングして細胞が剥がれ落ちるのを確認し、ディッシュ当たり 3 ml の血清入り培養液を加えて、ピペッティングで細胞を集めて
50 ml の遠心管に浮遊させ、細胞数をカウントした後、4 倍スプリットになるように、細胞浮遊液を作り、ディッシュに播種する。
6. 翌日、培地交換する。
(ただし、この方法はアッセイ等に使用するためのマルチウェルプレート等に蒔き込む時には、お勧めしません。)

PDL

PDL = population doubling level
細胞が集団として何回分裂したかを表す。

PDLを n とすると

$2^n = (\text{回収時細胞数}) / (\text{播種時細胞数})$ と表せる。

よって $\log_2 2^n = \log_2 (\text{回収時細胞数}) - \log_2 (\text{播種時細胞数})$

$n = \log_2 (\text{回収時細胞数}) - \log_2 (\text{播種時細胞数})$

よって $n = \{ \log_{10} (\text{回収時細胞数}) - \log_{10} (\text{播種時細胞数}) \} / \log_{10} 2$

$n = \{ \log_{10} (\text{回収時細胞密度}) - \log_{10} (\text{播種時細胞密度}) \} / \log_{10} 2$ でも同じ。

寄託時の情報では：

HUEhT-1, HUEhT-2 とともに、200 PDL を超えて分裂増殖するが、長期培養すると、血管内皮細胞としての性質を失う傾向にある。