

Cryopreserved Hepatocytes 使用方法

注：この説明書は、英文添付文書の簡易訳です。製品に添付されている英文マニュアルも必ずご確認ください。

対象製品:

製品コード	製品名
IVT-M00995	Male Human, individual
IVT-F00995	Female Human, individual
IVT-M00005	Male Sprague–Dawley rat, pooled
IVT-F00005	Female Sprague–Dawley rat, pooled
IVT-M00025	Male Wistar rat, pooled
IVT-F00025	Female Wistar rat, pooled
IVT-M00065	Male Han Wistar rat, Barrier 7, pooled
IVT-F00065	Female Han Wistar rat, Barrier 7, pooled
IVT-M00105	Male Dunkin–Hartley guinea pig, pooled
IVT-F00105	Female Dunkin–Hartley guinea pig, pooled
IVT-M00205	Male beagle dog, pooled
IVT-F00205	Female beagle dog, pooled
IVT-M00305	Male cynomolgus monkey, pooled

製品コード	製品名
IVT-F00305	Female cynomolgus monkey, pooled
IVT-M00315	Male rhesus monkey, pooled
IVT-F00315	Female rhesus monkey, pooled
IVT-M00325	Male Marmoset monkey, pooled
IVT-F00325	Female Marmoset monkey, pooled
IVT-M00405	Male New Zealand white rabbit, pooled
IVT-F00405	Female New Zealand white rabbit, pooled
IVT-M00505	Male ICR/CD–1 mouse, pooled
IVT-F00505	Female ICR/CD–1 mouse, pooled
IVT-M005052	Male ICR/CD-1 mouse, pooled
IVT-F005052	Female ICR/CD-1 mouse, pooled
IVT-M00615	Male Gottingen minipig, pooled
IVT-F00615	Female Gottingen minipig, pooled

保存温度:

-150°C以下で5年間安定

製品説明:

BioreclamationIVT 社 肝細胞は、同日に単離と凍結保存が行われています。全ての凍結保存肝細胞について特性評価情報が、BioreclamationIVT 社のウェブページにてご確認ください。浮遊肝細胞は、4 時間以内の短期間での Phase I および Phase II 代謝試験にご利用いただけます。培地は BioreclamationIVT 社の InVitroGRO™ hepatocyte media をお使い下さい。

必要な試薬:

1. InVitroGRO HT Medium (IVT-Z99019)
2. InVitroGRO KHB (IVT-Z99074)
3. トリパンブルー溶液

細胞溶解方法

細胞の融解

1. InVitroGRO™ HT Medium を 37°C に温めておく
2. 48 mL の InVitroGRO™ HT Medium を 50 mL のチューブに入れる
3. バイアルを輸送コンテナもしくはフリーザーから出す
 - 液体窒素中で保存されていた場合は、慎重にキャップをはずして液体窒素をすべて除去し、キャップを

してから湯浴に入れる

4. すぐに 37°C の湯浴に入れて揺らしながら氷が少し残っている程度まで溶かす。
▶ バイアルのラベルをはがすと中の状況が見やすい
5. ただちにバイアルの中の肝細胞を 37°C に温められた InVitroGRO™ HT Medium に入れて懸濁する（デカントでもピペットでも可）
6. 1 mL の InVitroGRO™ HT Medium を空のバイアルに戻し、バイアルの壁面に残った細胞などを 50 mL のチューブに回収する
7. チューブをゆっくりと転倒混和して懸濁する
8. 細胞懸濁液を 50 x g で 5 分間遠心する（室温）
9. 上清をデカントで注ぎ流す（1 回の動作で行い、何度も繰り返さない）か、またはアスピレーターで吸引除去する。
10. 遠心チューブを穏やかに回してペレットをほぐす
11. 2 mL の InVitroGRO™ KHB Buffer を加え、肝細胞を穏やかに再懸濁する
12. トリパンプルー法を使って細胞数と生細胞数を数える

<<付録 1>> トリパンプルーを用いたセルカウントのワークシート

- セルカウント用に細胞懸濁液を希釈する

10 倍希釈の例

(700 μL 培地もしくはバッファー) + (200 μL トリパンプルー) + (100 μL 細胞懸濁液)

- よく混ぜた後、室温で 1 分間インキュベートする
- 血球計算板の両脇から 10 μL ずつ細胞懸濁液を入れる
- 顕微鏡 10 X で生細胞と死細胞の数を数え、viability を算出する

細胞のカウント

Dilution Factor: _____ X 総生細胞数: _____

カウントしたスクエア数: _____ 総死細胞数: _____

総細胞数: _____

% Viability = 総生細胞数 / 総細胞数 x 100 = _____

細胞懸濁液の希釈

細胞濃度 (生細胞数/mL) = $\frac{\text{総生細胞数}}{\text{カウントしたスクエア数}} \times 10,000 \times \text{Dilution Factor}$ _____ = _____ cells/mL

細胞濃度 x _____ 総細胞懸濁液量 (mL) = _____ 総細胞数

$$\text{総再懸濁液量} = \frac{\text{総細胞数}}{\text{目的する細胞濃度 (cells/mL)}} = \text{_____ mL}$$

$$\text{加える液量} = \text{総再懸濁液量} - \text{最初の細胞懸濁液量} = \text{_____ mL}$$

参考文献:

1. Li, A. P. (1997). Primary hepatocyte cultures as an in vitro experimental model for the evaluation of pharmacokinetic drug-drug interactions. *Adv. Pharmacol. Series* 43, 103–130.
2. Loretz, L. J.; Li, A. P.; Flye, M. W.; Wilson, A. G. Optimization of cryopreservation procedures for rat and human hepatocytes. *Xenobiotica* **1989**, 19(5), 489–498.
3. Ruegg, C. E.; Silber, P. M.; Mughal, R. A.; Ismail, J.; Lu, C.; Bode, D. C.; Li, A. P. Cytochrome-P450 induction and conjugated metabolism in primary human hepatocytes after cryopreservation. *In Vitro Toxicology* **1997**, 10(2), 217–222.
4. Li, A. P.; Lu, C.; Brent, J. A.; Pham, C.; Fackett, A.; Ruegg, C. E.; and Silber, P. M. Cryopreserved human hepatocytes: characterization of drug-metabolizing enzyme activities and applications in higher throughput screening assays for hepatotoxicity, metabolic stability, and drug-drug interaction potential. *Chem. Biol. Interact.* **1999**, 121, 17–35.

注意事項

- ヒトおよびサル由来の製品は感染の可能性のあるものとして取り扱いください
- 細胞はバイオリジカルセーフティキャビネットの中など、無菌環境下で取り扱いってください
- BioreclamationIVT 社の製品は、全て研究用試薬です。診断や臨床目的で使用しないでください

株式会社ベリタス 〒105-0013 東京都港区浜松町1丁目10-14 住友東新橋ビル3号館5階
TEL 03-5776-0078 FAX 03-5776-0076
技術的なお問い合わせは：TEL 03-5776-0040 E-mail techservice@veritastk.co.jp