

InVitroCYP™ H-class™ Human Liver Microsomes 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 | 梱包単位 | 保存温度 |
|--------------|---|--------|------|
| IVT-X008061 | <i>InVitroCYP</i> H-class 10-Donor Pooled Human Liver Microsomes | 10 mg | 液体窒素 |
| IVT-X008062 | <i>InVitroCYP</i> H-class 10-Donor Pooled Human Liver Microsomes | 20 mg | 液体窒素 |
| IVT-X008063 | <i>InVitroCYP</i> H-class 10-Donor Pooled Human Liver Microsomes | 100 mg | 液体窒素 |
| IVT-X008064 | <i>InVitroCYP</i> H-class 25-Donor Pooled Human Liver Microsomes | 10 mg | 液体窒素 |
| IVT-X008065 | <i>InVitroCYP</i> H-class 25-Donor Pooled Human Liver Microsomes | 20 mg | 液体窒素 |
| IVT-X008066 | <i>InVitroCYP</i> H-class 25-Donor Pooled Human Liver Microsomes | 100 mg | 液体窒素 |
| IVT-FX008061 | <i>InVitroCYP</i> H-class 10-Donor Pooled Female Human Liver Microsomes | 10 mg | 液体窒素 |
| IVT-FX008062 | <i>InVitroCYP</i> H-class 10-Donor Pooled Female Human Liver Microsomes | 20 mg | 液体窒素 |
| IVT-MX008061 | <i>InVitroCYP</i> H-class 10-Donor Pooled Male Human Liver Microsomes | 10 mg | 液体窒素 |
| IVT-MX008062 | <i>InVitroCYP</i> H-class 10-Donor Pooled Male Human Liver Microsomes | 20 mg | 液体窒素 |
| IVT-FX008064 | <i>InVitroCYP</i> H-class 25-Donor Pooled Female Human Liver Microsomes | 10 mg | 液体窒素 |
| IVT-FX008065 | <i>InVitroCYP</i> H-class 25-Donor Pooled Female Human Liver Microsomes | 20 mg | 液体窒素 |
| IVT-MX008064 | <i>InVitroCYP</i> H-class 25-Donor Pooled Male Human Liver Microsomes | 10 mg | 液体窒素 |
| IVT-MX008065 | <i>InVitroCYP</i> H-class 25-Donor Pooled Male Human Liver Microsomes | 20 mg | 液体窒素 |
| IVT-F008084 | <i>InVitroCYP</i> H-class Individual Female Human Liver Microsomes | 10 mg | 液体窒素 |
| IVT-F008085 | <i>InVitroCYP</i> H-class Individual Female Human Liver Microsomes | 20 mg | 液体窒素 |
| IVT-M008084 | <i>InVitroCYP</i> H-class Individual Male Human Liver Microsomes | 10 mg | 液体窒素 |
| IVT-M008085 | <i>InVitroCYP</i> H-class Individual Male Human Liver Microsomes | 20 mg | 液体窒素 |

保存温度:

-70℃以下

製品説明:

BioIVT 社 ヒト肝ミクロソームは、cytochrome P450 (CYP)酵素阻害試験に容易に利用できる最適化された生物試験モデルです。InVitroCYP H-class ミクロソームは、関連する様々な CYP 酵素について高活性なものから調製されています。これら CYP には、通常では活性の低い CYP も含んでおりますが、このミクロソームでは通常活性の低い CYP の活性が高められております。

必要な試薬:

1. 脱イオン水
2. 50 - 100 mM Trisバッファー
3. NaHCO₃
4. NADP
5. グルコース-6-リン酸
6. グルコース-6-リン酸脱水素酵素
7. ウリジン5'-二リン酸- α -D-グルクロン酸 (UDPGA)
8. アセトニトリル

1. 準備:

肝ミクロソームを活性化させるには、外因性の因子が必要です。外因性因子として、NADPH-再生系 (phase I、NADP 酸化) または ウリジン 5'-二リン酸- α -D-グルクロン酸 (UDPGA; phase II、グルクロン酸化)¹ から構成される因子が用いられます。インキュベーションでは通常、50 - 100 mM Tris バッファーが使用されます。その他のバッファーでインキュベーションする際は、条件をご検討ください。

薬物抑制

IC₅₀ や Ki, mechanistic などのパラメーター定義、FDA guidance⁴ による

薬物代謝

- 凍結ミクロソームの入ったバイアルを冷たい流水にて解凍する。解凍したバイアルは、使用するまで氷水に置いておく
- Phase I: NADPH-再生系用試薬の準備 (NRS; 100 mL 溶液を調製する場合)
 - 100 mL の脱イオン水に 2 g の NaHCO₃ を混ぜ、2% NaHCO₃ 溶液を作製する
 - 2% NaHCO₃ 溶液に以下の溶液を加える
 - ◇ 1.7 mg/mL NADP (100 mL に対し 170 mg)
 - ◇ 7.8 mg/mL グルコース-6-リン酸 (100 mL に対し 780 mg)
 - ◇ 6 units/mL グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (100 mL に対し 600 units)最良の結果を得るには、上記の溶液をすぐ (4 °C で保存し、調製後 8 時間以内) に使用すること。
- 被験物質の最終濃度を決定する。プローブ基質は、一つの P450 enzyme に対して選択する。最適なプローブ基質及び濃度については、FDA guidance⁴ 参照。様々な被験物質及び、プローブ基質濃度は、Ki を決定するために使用される。DW で 100X 被験物質及び、プローブ基質溶液を調製する。不溶性の被験物質またはプローブ基質の場合、アセトニトリル (ACN) が有機溶媒として望ましい。この時、ACN の最終濃度は 1% 以下にする

2. 操作方法:

- 16 × 100 mm のガラスチューブに、Tris バッファーで適当な濃度 (5 - 20 mg/mL) に希釈した肝ミクロソーム液 100 μ L をチューブに入れる (タンパクの最終濃度は 0.5 - 2.0 mg/mL になる)。事前に、最適なタンパク濃度を定めるための予備実験を行うことが望ましい。
- テストチューブを氷上に置いた状態で、肝ミクロソーム液を加える。
- 630 μ L の Tris バッファーを加える。
- 10 μ L の 100X 試験項目のストック溶液を加える。NRS を加える前に、各反応溶液が 750 μ L になっている事を確認する。
- 「4」で調製した肝ミクロソームが入ったテストチューブと NRS 溶液を、それぞれ 150 rpm で振盪しながら 37°C の恒温槽で 5 分間インキュベートする。
- 適切にラベルしたチューブに 10 μ L の 100X プローブ基質溶液を加える
- 「5」でインキュベートしたテストチューブに NRS 溶液を 250 μ L ずつ加える。最初の検体に NRS 溶液を添加した地点で反応時間の測定をスタートさせる。
- 30 - 60 分インキュベートする。

参考文献:

- Guengerich, F. P. Analysis and characterization of enzymes. In *Principles and Methods of Toxicology* (A.W. Hayes, Ed.). Raven Press, New York, **1989**, pp. 777-813.
- Spatzenegger, M.; Jaeger, W. Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism. *Drug Metab. Rev.* **1995**, *27*, 397-417.
- Bjornsson, T. D.; Callaghan, J. T.; Einolf, H. J.; Fischer, V.; Gan L.; Grimm, S.; Kao, J.; King, S. P.; Miwa, G.; Ni, L.; Kumar, G.; McLeod, J.; Obach, S. R.; Roberts, S.; Roe, A.; Shah, A.; Snikeris, F.; Sullivan, J. T.; Tweedie, D.; Vega, J. M.; Walsh, J.; Wrighton, S. A. The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies: A PhRMA perspective. *J. Clin. Pharmacol.* **2003** *43*, 443-469.

4. Guidance for Industry: Drug Interaction Studies – Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling (Draft, 2006)

注意事項

- ヒトおよびサル由来の製品は感染の可能性があるものとして取り扱いください。
- BioIVT 社の製品は、全て研究用です。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