

## InVitroCYP™ M-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-X008067	<i>InVitroCYP M-class 50-Donor Pooled Human Liver Microsomes</i>	10 mg	液体窒素
IVT-X008068	<i>InVitroCYP M-class 50-Donor Pooled Human Liver Microsomes</i>	20 mg	液体窒素
IVT-X008069	<i>InVitroCYP M-class 50-Donor Pooled Human Liver Microsomes</i>	100 mg	液体窒素

### 保存温度:

-70°C 以下

### 製品説明:

ヒト肝ミクロソームは、チトクローム p450 (CYP)や Flavin monooxygenases、UDP glucuronyl transferases などの薬物代謝酵素を含む細胞質分画です。InVitroCYP M-class ミクロソームは、中程度の CYP 活性を示すようにデザインされており、排泄や代謝物質識別試験などに有効です。BioIVT 社では、広範囲の特性評価及び tissue profiling process により、それぞれのロットにおいて排泄及び代謝試験で一貫した再現性の高い結果をご提供します。

### 必要な試薬:

1. 脱イオン水
2. 50 - 100 mM Tris バッファー
3. NaHCO<sub>3</sub>
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- $\alpha$ -D-グルクロン酸 (UDPGA)
8. アセトニトリル

### 1. 準備:

BioIVT 社の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- $\alpha$ -D-グルクロン酸 (UDPGA; phase II、グルクロン酸化)<sup>1</sup> 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。

### 薬物代謝

1. 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)

1. 100 mLの脱イオン水に2 gのNaHCO<sub>3</sub>を混ぜ、2% NaHCO<sub>3</sub>溶液を作製する
2. 2% NaHCO<sub>3</sub>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。

- Phase II用の溶液として使用する場合には、上記「2」で調製した溶液に1.9 mg/mL UDPGA (100 mL に対し190 mg を添加)を添加する

注意: アラメチシンという抗生物質は、ミクロソーム膜を透過させてグルクロン酸化、膜を介してフリーなUDPGAやグルクロニド産物を輸送させる<sup>4</sup>

最良の結果を得るには、調製した試験項目の溶液はすぐに使用すること(4°Cで8時間保存可能)。試験項目の最終濃度は予め決定しておくこと。各テスト項目は脱イオン水で100Xのストック溶液として用意しておく。テスト溶液が水で溶解できない場合は、有機溶媒(アセトニトリル)を1%以下まで添加してもよい。

## 2. 操作方法:

1. 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 μL 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。
2. 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。
3. 640 μL の Tris バッファーを加える。
4. 10 μL 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 μL になっている事を確認する。
5. 「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。
6. 「5」でインキュベートしたテストチューブに NRS 溶液を 250 μL 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。
7. 30 - 60 分インキュベートする。

## 参考文献:

1. 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.
2. Spatzenegger, M.; Jaeger, W. Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism. *Drug Metab. Rev.* **1995**, 27, 397-417.
3. 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. Fisher, M. B.; Campanale, K.; Ackermann, B. L.; VandenBranden, M.; Wrighton, S. A. In vitro glucuronidation using human liver microsomes and the pore-forming peptide alamethicin. **2000**, 28, 560-566.
5. 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](mailto:techservice@veritastk.co.jp)