

## Platable Cryopreserved Human Hepatocyte を用いた代謝試験

注：この説明書は、英文文書の簡易訳です。英文マニュアルも必ずご確認ください。

### 製品関連培地:

製品コード	製品名	梱包単位	保存温度
IVT-Z99029	InVitroGRO™ CP Medium	250mL	2-8℃
IVT-Z99009	InVitroGRO™ HI Medium	250mL	2-8℃
IVT-Z99000	Torpedo™ Antibiotic Mix	5.5mL x2 本	-20℃
IVT-Z99074	InVitroGRO™ KHB	250mL	2-8℃
NA	24-well collagen-coated plate	1 plate	2-8℃

### 必要な器具と試薬:

- 0.4 %トリパンブルー
- 血球計算板
- 顕微鏡 (10X 対物レンズ)
- 血清用ピペットとピペットエイド
- ピペッターと滅菌済チップ
- 滅菌された 50 ml のチューブ
- バイオロジカルセーフティキャビネット
- インキュベーター (37℃、5 % CO<sub>2</sub>、飽和湿度)
- リピーターピペットと滅菌済チップ
- ウォーターバス (37℃設定)
- 70 %エタノールが入ったアルコールスプレー
- マイクロ遠心チューブ
- 計算機

### <<1 日目>> 細胞溶解及びプレーティング

#### 培地の調製

#### 1. InVitroGRO™ CP Medium の調製

- Torpedo™ Antibiotic Mix (5.5 mL)を 37℃の湯浴に入れて溶かす
- Torpedo™ Antibiotic Mix (5.5 mL)を 250 mL の InVitroGRO™ CP Medium に入れる
- Complete InVitroGRO™ CP Media(Torpedo™ Antibiotic Mix が入ったもの)を 37℃に温める

\*Torpedo™ Antibiotic Mix 添加後の使用期限は 7 日間で、保存は 4℃となります

#### 細胞の融解とプレーティング

- 5 mL の Complete InVitroGRO™ CP Medium を 50 mL のチューブに入れる
  - 複数のバイアルを使用する場合は、1 バイアルにつき 5 mL ずつ増やす例：3 バイアルの場合、培地 15 mL を使用
- 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
- すぐに 37℃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

4. 70%エタノールでバイアルをスプレーする
5. ただちにバイアル中の肝細胞を 37°C に温められた Complete InVitroGRO™ CP Medium に入れて懸濁する  
(デカントでもピペットでも可)
6. 肝細胞懸濁液のうち 1 mL 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洗い流す
7. 洗い流したバイアルの中の肝細胞懸濁液を 50 mL のチューブに回収する
8. チューブをゆっくりと転倒混和して懸濁する
9. トリパンブルー法を使って細胞数と生細胞数を数える(\*細胞数カウントに関しては本マニュアル後半も参照下さい)
  - マイクロ遠心チューブを使って肝細胞懸濁液を希釈する
    - ① InVitroGRO™ CP Medium : トリパンブルー : 肝細胞懸濁液 = 7 : 2 : 1  
例 : 700 uL InVitroGRO™ CP Medium  
200 uL トリパンブルー  
100 uL 肝細胞懸濁液
    - ② よく混ぜた後、室温で 1 分間インキュベートする
    - ③ 血球計算板の両脇から 10 uL ずつ②の懸濁液を入れる
    - ④ 顕微鏡 (対物 10X) で生細胞と死細胞の数を数える 数え方は本マニュアル後半を参照
    - ⑤ %Viability=(生細胞数/全細胞数) X 100
    - ⑥ 生細胞濃度 (生細胞/ml) = (生細胞数 / 8 squares) X 10 X 10,000
    - ⑦ 総生細胞数= 生細胞濃度 (cells/mL) X 細胞懸濁液の総量(mL)
10. InVitroGRO™ CP Medium を使って肝細胞懸濁液を 0.70 X 10<sup>6</sup> Viable cells / mL に希釈する
  - 例 : 6 ml の 6.3 X 10<sup>6</sup> Total Viable Cells に 3 ml の InVitroGRO™ CP Medium を加えて、9 mL の 0.70 X 10<sup>6</sup> Viable Cell / mL にする
11. コラーゲンがコーティングされたプレートに適量の肝細胞懸濁液を入れる
  - 24 well plate : 0.5 mL / well
12. プレートをゆっくりと前後左右に傾けて揺らす
  - 円を描くように揺らすことは細胞が均一にならないので避ける
13. プレートを 37°C のインキュベーターに入れる (5% CO<sub>2</sub>、飽和湿度)
14. ヒト肝細胞は 2-4 時間以内に接着するが一晚インキュベーションすることも可能

## <<2日目>> 培地交換

### 培地の交換

1. InVitroGRO™ CP Medium を 37°C に温める
2. 温めた新しい培地と置換して、接着していない細胞を洗い流す
3. 温めた新しい培地に置換する

4. プレートを 37°Cのインキュベーターに入れる (5% CO<sub>2</sub>、飽和湿度)

### <<3日目>> 誘導 (Induction)

#### 培地の調整

1. Complete InVitroGRO™ HI Medium を用意する
    - Torpedo™ Antibiotic Mix (5.5 mL)を 37°Cの湯浴に入れて溶かす
    - Torpedo™ Antibiotic Mix (5.5 mL)を 250 mL の InVitroGRO™ HI Medium に加える
- \*Torpedo Antibiotic Mix 添加後の使用期限は 7 日間で、保存は 4°Cとなります

#### Dosing Solution の調製と培地の交換

1. テスト検体や既知の誘導剤とのインキュベーションは細胞培養後、3 日目に行う
  - CYP の種類によって推奨されている誘導剤および濃度などは下記のリンクをご覧ください(Table3)  
<http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DrugInteractionsLabeling/ucm081177.htm#inVitro>
2. テスト検体や既知の誘導剤の Stock Solution (100X もしくは 1000X) を InVitroGRO™ HI Medium、Acetonitrile、DMSO、Methanol、Ethanol などの溶媒で調製する  
例 : DMSO で 1 mM の rifampin を調製
3. 既知の誘導剤、溶媒コントロール、テスト検体それぞれの 1 X Dosing Solution を InVitroGRO™ HI Medium を使用して調製する。最終的な溶媒濃度は 1%かそれ以下にする  
例 : 10 uM rifampin(既知の誘導剤)と 1% DMSO (溶媒コントロール)
4. 肝細胞がプレートされている 24 ウェルプレートの InVitroGRO™ CP Medium を 0.5 mL の 1 X Dosing Solution と置換する
5. プレートを 37°Cのインキュベーターに入れる (5% CO<sub>2</sub>、飽和湿度)

### <<4日目>>

#### 培地の調製

1. InVitroGRO™ HI Medium を 37°Cに温める

#### Dosing Solution の調製と培地交換

1. テスト検体や既知の誘導剤の Stock Solution を InVitroGRO™ HI Medium、Acetonitrile、DMSO、Methanol、Ethanol などの溶媒用意する  
例 : DMSO で 1 mM の rifampin
2. 既知の誘導剤、溶媒コントロール、テスト検体それぞれの 1 X Dosing Solution を InVitroGRO™ HI Medium を使用して調製する。最終的な溶媒濃度は 1%かそれ以下にする  
例 : 10 uM rifampin(既知の誘導剤)と 1% DMSO (溶媒コントロール)

3. 肝細胞がプレートされている 24 ウェルプレートの InVitroGRO™ CP Medium を 0.5 mL の 1 X Dosing Solution と置換する
4. プレートを 37°Cのインキュベーターに入れる (5% CO<sub>2</sub>、飽和湿度)

### <<5日目>> 基質のインキュベーション

#### 培地の調整

1. InVitroGRO™ KHB を 37°Cに温める

#### 基質のインキュベーション

1. テスト検体や既知の Inducer とのインキュベーションは細胞培養後、3 日目に行う

➤ CYP の種類によって推奨されている基質などは下記のリンクをご覧ください (Table 2)

<http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DrugInteractionsLabeling/ucm081177.htm#inVitro>

\* “Substrate Preferred” は代謝物であり、親化合物 (parent compound) ではありません。基質を親化合物として使用ください。

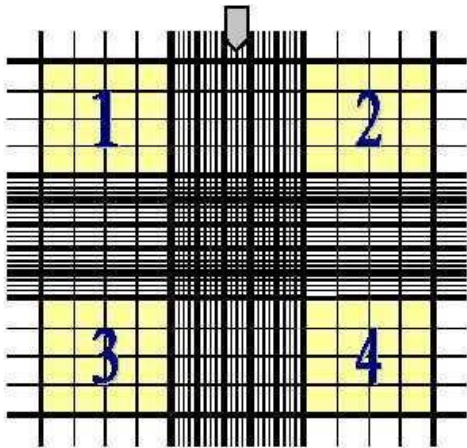
2. 既知の基質の 100 X Stock Solution を Acetonitrile、DMSO、Methanol、Ethanol などの溶媒で調製する  
例：1 mM の Testosterone を Acetonitrile で調製する
3. InVitroGRO KHB Medium で 1 X の Substrate Dosing Solution を調製する  
例：100 uM Testosterone
4. 肝細胞がプレートされている 24 ウェルプレート(溶媒コントロールと誘導剤の両ウェル)の培地を 0.3 ml の 1 X Substrate Dosing Solution と置換する  
例：10 uM Rifampin (既知の誘導剤) と 1%の DMSO (溶媒コントロール)を以前添加したウェルに 100 uM Testosterone 0.3 mL を添加する
5. プレートを 37°Cのインキュベーターに 1~4 時間入れる (5% CO<sub>2</sub>、飽和湿度)
6. 解析方法に合わせて反応を止める  
例：Substrate 溶液をバイアルに移し-70°Cに保存するか、有機溶媒をそれぞれのウェルに添加し、基質/有機溶媒溶液をバイアルに移し-70°Cで保存する
7. 基質添加による代謝物の量を解析し決定する  
➤ 解析結果を活性値 (pmol/min/well) で表す
8. 解析結果を Fold Induction もしくは % Positive Control で表す  
➤ Fold Induction の算出  
    ✧ 活性値 (既知の Inducer) /活性値 (Vehicle control)  
➤ % Positive Control の算出

$$\% \text{ positive control} = \frac{(\text{activity of test drug treated cells} - \text{activity of negative control})}{(\text{activity of positive control} - \text{activity of negative control})} \times 100$$

## <<付録1>> 細胞数カウントのガイドライン

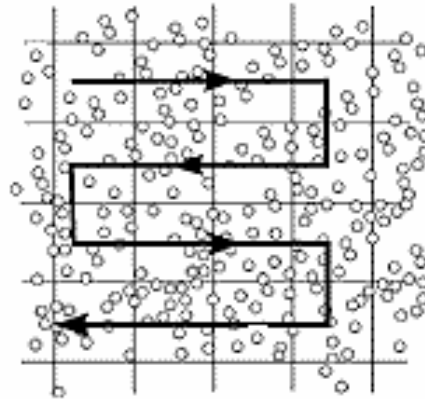
### 1. 血球計算板のチャンバーの例

カウントするチャンバーを1から4で表記しています



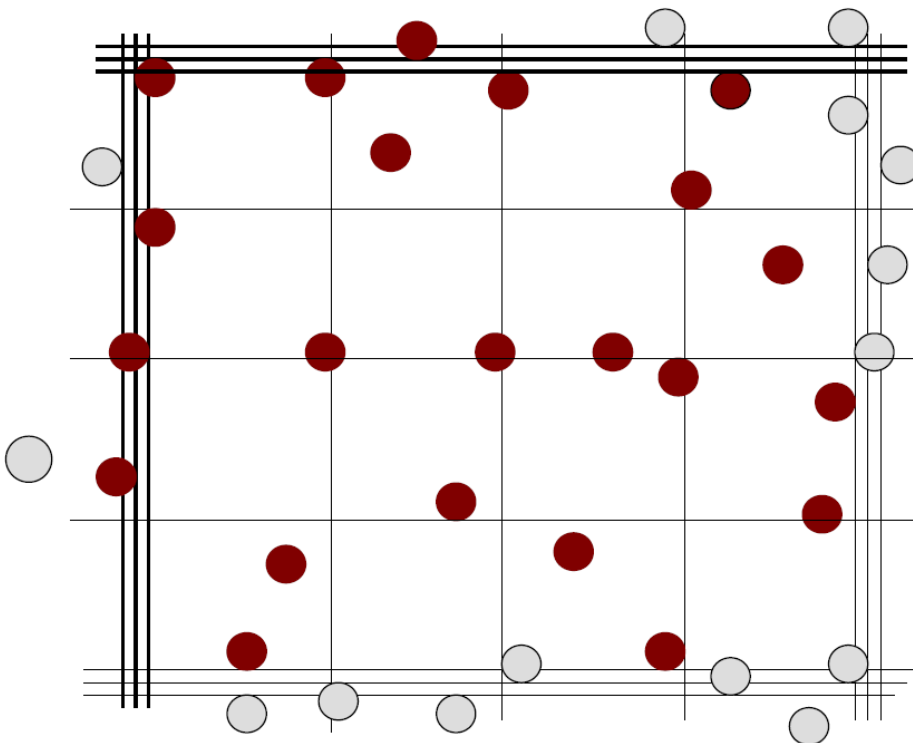
### 2. チャンバー内での細胞のカウント方法

矢印に沿って左上から始めます。カウントのばらつきを防ぐために、最低でも4つの四角にある細胞をカウントします。



図に示したカウントのためのガイドラインを参考にしてください

カウントするチャンバーのリミットラインを知る必要があります。リミットラインは3本の線になります。細胞のミスカウントを防ぐため、リミットライン上の細胞を正確にカウントする必要があります。黒く塗りつぶされている●はカウントした細胞を表しています。太い線にあたっている細胞はカウントしますがセンターラインに触れている必要があります。他のチャンバーでも同じようにカウントする必要があります。



## <<付録2>> 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  $\mu$ L *In Vitro*GRO™ CP Medium) + (200  $\mu$ L トリパンプルー) + (100  $\mu$ L 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  $\mu$ L ずつ細胞懸濁液を入れる
- 顕微鏡10X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

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

加える液量 = 総再懸濁液量 - 最初の細胞懸濁液量 = \_\_\_\_\_ mL

### 参考文献:

1. Roymans, D.; Van Looveren, C.; Leone, A.; Parker, J. B.; McMillan, M.; Johnson, M. D.; Koganti, A.; Gilissen, R.; Silber, P.; Mannens, G.; Meuldermans, W. Determination of cytochrome P450 1A2 and cytochrome P450 3A4 induction in cryopreserved human hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *67(3)*, 427-437.

## 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。
- 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](mailto:techservice@veritastk.co.jp)