

凍結肝細胞を用いたトランスポーターアッセイ 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。

内容:

商品コード	商品名	梱包単位	保存温度
IVT-M00995	Male Human Cryopreserved Human Hepatocytes	5M /本	液体窒素
IVT-F00995	Female Human Cryopreserved Human Hepatocytes		
IVT-X008052	LiverPool 5-Donor Pooled Cryopreserved Human Hepatocytes, mixed gender		
IVT-X008001	LiverPool 10-Donor Pooled Cryopreserved Human Hepatocytes, mixed gender		
IVT-FX008001	LiverPool 10-Donor Pooled Cryopreserved Human Hepatocytes, female pool		
IVT-MX008001	LiverPool 10-Donor Pooled Cryopreserved Human Hepatocytes, male pool		
IVT-X008000	Liverpool 20-Donor Pooled Cryopreserved Human Hepatocytes, mixed gender		
IVT-X008005	LiverPool 50-Donor Pooled Cryopreserved Human Hepatocytes, mixed gender		

原理:

試験物質と肝細胞を一定の時間インキュベートし、化合物を細胞内に取り込ませます。次に、懸濁液は油層を通じて遠心分離を行い、細胞を通す一方で細胞に取り込まれていないフリーの試験物質を含む溶液は除去されます。その後、フリーの試験物質を細胞から分けるためにチューブを切断します。細胞内の試験物質の濃度は放射性標識された試験物質をシンチレーションカウント、または LC/MS 法によって評価します。アッセイは活性が最も高い 37°C と、活性を示す限界温度である 4°C との両方で行います。トランスポーター活性値は、37°C での測定値から 4°C のバックグラウンド値を引いた値になります。

必要な試薬:

- *InVitroGRO*TM HT medium (BioIVT, #IVT-Z99019)
- *InVitroGRO*TM KHB medium (BioIVT, #IVT-Z99074)
- 2N NaOH
- 2N HCl
- シリコンオイル
- ミネラルオイル
- メタノール
- Taurocholic acid
- Estrone-3-sulfate
- *Methyl-4-phenylpyridinium iodide*
- ³H-Taurocholic acid
- ³H-Estrone-3-sulfate
- ³H- *Methyl-4-phenylpyridinium iodide*

必要な器具:

- 安全キャビネット
- CO₂ インキュベーター
- ウェルプレート
- ポンプ
- 0.4 mL 遠心チューブ
- プラスチックチューブ用カッター
- ローテーター
- 0.4 mL 遠心チューブが使用可能な遠心分離機

1. 準備:

1.1 トランスポーターアッセイを行う際の注意点

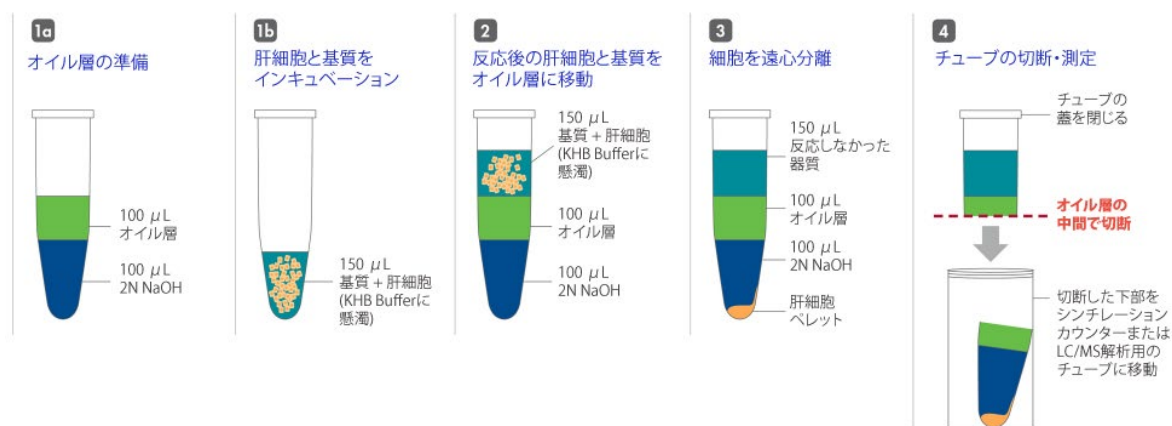
- 1 種類のアッセイあたり、少なくとも 3 サンプル (4 サンプルを推奨) 行ってください。
- バックグラウンドを減少させるために、試験を行う段階で生存率が 80% 以上の肝細胞を使用してください。
- 予め 37°C にインキュベートした肝細胞で試験しますが、4°C でインキュベートした肝細胞との生存率の差を少なくするために、37°C での長時間のインキュベートは避けてください。

1.2 溶液の準備

試験したい化合物を *InVitroGRO*TM KHB 溶液で適切な濃度に用意します。放射性標識化合物を使用する場合は、適切な濃度および比活性を提供するために、非放射性標識物質 (cold) を混合してください。各試験物質のストック溶液は、インキュベーション時の濃度に対して3倍濃縮液です。48 ウェルプレートと、分注した試験物質のストック溶液の両方を 37°C と 4°C でインキュベートしてください。0.4 mL 遠心チューブの底に 100 μ L の 2N NaOH を入れてください。NaOH 層の上に 100 μ L のオイル層を作ってください。オイル層に添加するオイルは、シリコンオイルとミネラルオイルを 5:1 の割合で混合したもの (密度: 1.015 g/mL) を使用します。

2. 操作方法:

2.1 操作方法 概要



2.2 操作方法

1. ヒト凍結肝細胞を、BioIVT 社の「Cryopreserved Hepatocyte 使用方法 (または LiverPoolTM 5- 10- 20- and 50- Donor Pooled Cryopreserved Human Hepatocytes 使用方法)」の手順に従って解凍します。細胞を数えた後、 2×10^6 個の生細胞 / mL の濃度になるように *InVitroGRO*TM KHB 溶液で再懸濁します。
2. 細胞懸濁液を 2 本のチューブに等量に分け、一方を 37°C で、もう一方を 4°C で 15 分間インキュベートします。
3. 37°C でインキュベートした細胞懸濁液を、予め 37°C でインキュベートした 48 ウェルプレートに 100 μ L ずつ 4 ウェルに分注します。タイマーを用意して、適切な時間だけインキュベーションしてください。
4. 37°C でインキュベートした 3 倍基質溶液 50 μ L を、細胞懸濁液を含むウェルに加えます。タイマーを始め、プレートをインキュベーターに戻しローターを通常速度で回してください。
5. 反応が終わる 20 秒前にプレートをインキュベーターから取り出し、細胞懸濁液を 0.4 mL チューブに入ったオイル層の上に静かに入れた後、すぐに 13,000 xg にて 15 秒間遠心します。この操作により、細胞はオイル層を通過して最下層の NaOH 層に、また未反応な基質はオイル層よりも上層に分離されます。
6. 4°C でインキュベートした細胞に対しても、同様にステップ 3~5 を行います。
7. 遠心したチューブを 2 時間~1 晩常温でインキュベートします。必要に応じて、切断の前にチューブを -80°C の冷凍庫に入れるか、ドライアイス上に置いて凍結させてください。各層を凍結させることで、切断時に溶液の飛散によるサンプルロスや、未反応な基質とのコンタミを最小限に抑えることができます。
8. チューブをオイル層の中央で切断し、最下層の部分を適切なチューブに移します。もし反応物質が放射性標識されている場合は、ペレットを 2N HCl で再懸濁して物質を中和させます。シンチレーションカウンタを加えた後シンチレーションカウンタで読みとるか、LC/MS 分析の際は互換性のある方法で抽出します。

9. トランスポーター活性値は、37℃での測定値から4℃での測定値を引くことで算出できます。

参考文献

1. Li, A. P. Primary hepatocyte cultures as an in vitro experimental model for the evaluation of pharmacokinetic drug-drug interactions. *Adv. Pharmacol. Series* **1997**, *43*, 103–130.
2. Jigorel E. *et. al.* Functional expression of sinusoidal drug transporters in primary human and rat hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition* **2005**, *33(10)*, 1418-1422.

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ってください。
- 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。
- 各化学物質を取り扱う際には、各メーカーのSDSを参照ください。

参考資料

ヒト肝細胞を用いたトランスポーターアッセイに使用する基質・濃度・反応時間

トランスポーター	基質	濃度 / 反応時間
OATP (1B1, 1B3, 2B1)	Estone-3-Sulfate	2 μ M / 3 min.
	Estradiol 17-beta-Glucuronide	0.1 μ M / 3 min.
NTCP	Taurocholic Acid	1 μ M / 3 min.
OCT1	1-Methyl-4-Phenylpyridium	1 μ M / 3 min.

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