動物 肝ミクロソーム 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:

Sprague-Dawley ラット 誘導肝ミクロソーム

コード No.	品名	梱包単位
M10001	Aroclor 1254-induced	10 mg
M20001	ß-Naphthoflavone-induced	10 mg
M30001	Clofibrate-induced	10 mg
M40001	Dexamethasone-induced	10 mg
M50001	Isoniazid-induced	10 mg
M60001	3-Methylcholanthrene-induced	10 mg
M70001	Phenobarbital-induced	10 mg

動物 肝ミクロソーム

コード No.	品名	梱包単位
M00001	Male Sprague-Dawley rat	10 mg
F00001	Female Sprague-Dawley rat	10 mg
M00011	Male Fischer 344 Rat	10 mg
F00011	Female Fischer 344 Rat	10 mg
M00021	Male Wistar rat	10 mg
F00021	Female Wistar rat	10 mg

動物 肝ミクロソーム (続き)

コード No.	品名	梱包単位
M00101	Male Dunkin-Hartley guinea pig	10 mg
F00101	Female Dunkin-Hartley guinea pig	10 mg
M00201	Male beagle dog	10 mg
F00201	Female beagle dog	10 mg
M00301	Male cynomolgus monkey	10 mg
F00301	Female cynomolgus monkey	10 mg
M00311	Male rhesus monkey	10 mg
F00311	Female rhesus monkey	10 mg
M00401	Male New Zealand white rabbit	10 mg
F00401	Female New Zealand white rabbit	10 mg
M00501	Male ICR/CD-1 mouse	10 mg
F00501	Female ICR/CD-1 mouse	10 mg
M00601	Male Yucatan minipig	10 mg
F00601	Female Yucatan minipig	10 mg
M00611	Male Gottingen minipig	10 mg
F00611	Female Gottingen minipig	10 mg

保存温度:

-70℃以下

製品説明:

肝ミクロソームには、シトクロム P450 酵素, フラビンモノオキシゲナーゼおよび UDP グルコニルトランスフェラーゼ [1] などの薬物代謝酵素が含まれています。肝ミクロソームは異物代謝、薬物間の相互作用や共有結合 [2–3] について調べるのに主に使われます。ヒト肝ミクロソームのプールロットは数名分の肝臓から抽出されているため、“ヒトの平均的な”薬物代謝を評価することが可能な製品です。

必要な試薬:

1. 脱イオン水
2. 50 - 100 mM Trisバッファー
3. $NaHCO_3$
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因子が必要です。外因性因子として、NADPH-再生系(phase I、 酸化反応) または ウリジン5’-二リン酸-α-D-グルクロン酸 (UDPGA; phase II、グルクロン酸化反応)[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は通常、50 - 100 mM Trisバッファーを使用します。 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。

- 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$NaHCO_3$ を混ぜ、2% $NaHCO_3$溶液を作製する
  2. 2% $NaHCO_3$溶液に以下の溶液を加える
     - ✧ 1.7 mg/mL NADP (100 mLに対し170 mgを添加)
     - ✧ 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を添加)

     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[4]。

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決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 microsome and the pore-forming peptide alamethicin. **2000**, *28*, 560–566.

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