

付着可能肝細胞 (Cryoplateable Hepatocytes) 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:

商品コード	商品名
IVT-F00995-P	Female Human Plateable Cryopreserved Hepatocytes
IVT-M00995-P	Male Human Plateable Cryopreserved Hepatocytes
IVT-M003055-P	Male Cynomolgus Monkey Plateable Cryopreserved Hepatocytes
IVT-M003155-P	Male Rhesus Monkey Plateable Cryopreserved Hepatocytes
IVT-M00615-P	Male Gottingen Minipig Plateable Cryopreserved Hepatocytes
IVT-X008052-P	Plateable LiverPool, Mixed Gender Human 5-donor Pooled Cryoplateable Hepatocytes
IVT-X008001-P	Plateable LiverPool, Mixed Gender Human 10-donor Pooled Cryoplateable Hepatocytes

保存温度:

-150℃以下で 5 年間安定

製品説明:

BioIVT 社の肝細胞は、同日に単離と凍結保存が行われています。全ての凍結保存肝細胞について特性評価情報が、BioIVT 社のウェブページ (<https://info.bioivt.com/human-hepatocytes-characterization-tables>) にて確認できます。付着可能肝細胞は、誘導試験や毒性試験にご利用いただけます。BioIVT 社の肝細胞には、*InVitroGRO*TM 肝細胞培地をご使用ください。

必要な試薬:

1. *InVitroGRO*TM CP Medium (IVT-Z99029)
2. *Torpedo*TM Antibiotic Mix (IVT-Z99000)
3. トリパンプルー溶液
4. オプション (セルカウンティングの際のトリパンプルー溶液希釈用) : *InVitroGRO*TMKHB (IVT-Z99074)

細胞溶解方法:

- 操作は無菌的に行う。

*InVitroGRO*TM CP Medium の調製

1. *Torpedo*TM Antibiotic Mix を 37℃の湯浴に 3-5 分入れて溶かす。
2. 1.0 mL の *Torpedo*TM Antibiotic Mix を 45 mL の *InVitroGRO*TM CP Medium に加える
 - *Torpedo*TM Antibiotic Mix 添加後の培地の使用期限は冷蔵 4℃保存で 7 日間。

細胞の融解

1. *Torpedo*TM Antibiotic Mix を添加した *InVitroGRO*TM CP Medium を 37°C に温めておく
2. 1. で用意した *Torpedo*TM 入り *InVitroGRO*TM CP Medium を 5 mL とり、50 mL のチューブに入れ、使用するまで 37°C に温めておく。
3. バイアルを液体窒素の輸送コンテナで移動する。ない場合は DRY ICE に入れて移動する。
4. すぐに 37°C の湯浴に入れて揺らしながら氷の周りが溶け出して管壁から離れ、逆さにすると動くようになる程度まで溶かす。この状態になるまでおよそ 90-120 秒かかる。
 - この間、時々湯浴から取り出して逆さにして動くかを確認する。
 - バイアルのラベルをはがすと中の状況が見やすい
5. ただちにバイアルを逆さにして、2. で用意した 5 mL の 37°C に温めた *Torpedo*TM 入り *InVitroGRO*TM CP Medium に中身をデカントして入れる。
 - 加えた直後は Medium の中に氷の塊が見えるが、すぐ溶けてしまう状態。
6. 5. のチューブから、約 1.0 mL の *InVitroGRO*TM CP Medium を空のバイアルにデカントで戻し、バイアルの壁面に残った細胞を 50 mL のチューブに回収する。
7. チューブをゆっくりと 3 回転倒混和して懸濁する。
8. チューブ内の全量をピペットに吸い込んで全液量を測定する。
9. トリパンブルー法を使って生細胞数と死細胞数を数える。
 - トリパンブルー 200 μ L に *InVitroGRO*TM KHB 700 μ L を加えたトリパンブルー希釈溶液に細胞を 100 μ L 加えて、1 分置いてから細胞を計数する。
 - 3-5 分以内で細胞数のカウントを終えないと死んだ細胞数が多くなるので注意。
 - 肝細胞は重くすぐ沈むので、採取前に転倒混和する事。
10. *InVitroGRO*TM CP Medium を使って肝細胞懸濁液を 0.70×10^6 生細胞 / mL に希釈する。

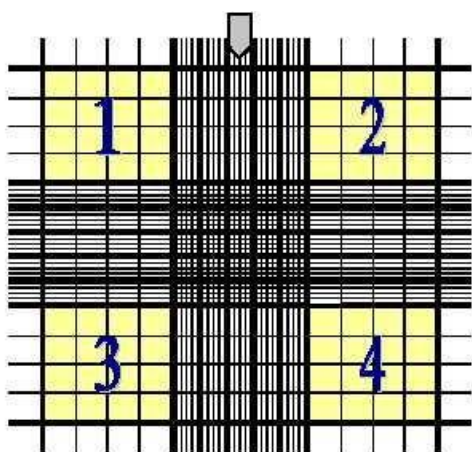
<参考> トリパンプルーを用いたセルカウントの例

- セルカウント用に細胞懸濁液を希釈する
10倍希釈の例(dilution factor = 10)
(700 μL培地もしくはバッファー) + (200 μLトリパンプルー) + (100 μL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
- 血球計算盤の両側のチャンバーに脇から10 μLずつ細胞懸濁液を入れる
- 顕微鏡10 Xで生細胞と死細胞の数を数え、viabilityを算出する

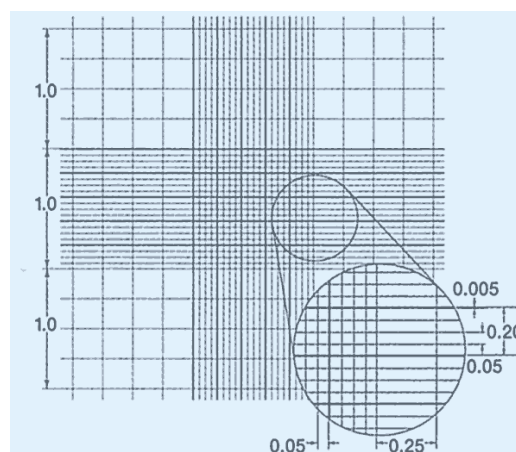
細胞数カウントのガイドライン

1. 下図に記載された血球計算盤のチャンバーの1-4の4つの四角にある生細胞と死細胞(青)の数をカウントする。

Burker-Turk 計算盤



改良ノイバウエル計算盤



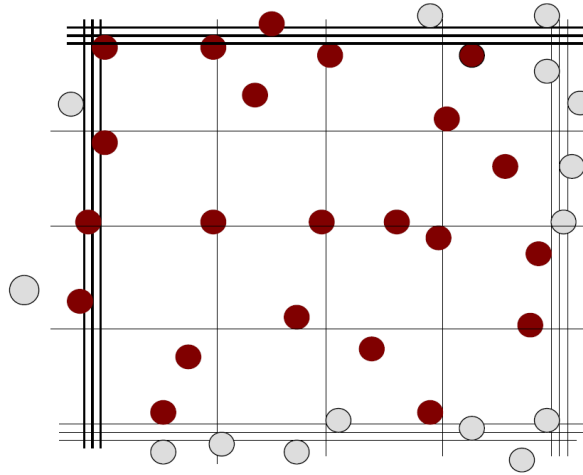
2. 反対側のチャンバーでも同様に4つの四角にある生細胞と死細胞の数をカウントする
3. 両方のチャンバーの生細胞の数と死細胞の数の平均をそれぞれ求める。総細胞数を算出する。
(総細胞数 = 生細胞数 + 死細胞数)

4. Viability を求める。

$$\text{Viability} = \text{総生細胞数} / \text{総細胞数} \times 100$$

- 細胞数を正確に加える事が重要なので、細胞の計数の際は血球計算盤の両側のチャンバーで計数して平均をとる。
- 小さい、透明な丸い細胞はリンパ球なので読まない。死細胞は青くみえる。
- 塊になっている細胞は構成している細胞の数をカウントする。(ラット、マウスでは塊になっている事が多い。)
- カウントの際、4角の外周4辺に乗っている細胞の計数に注意する。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る。改良ノイバウエル計算盤ではリミットラインは1本(右図)、Burker-Turk 計算盤の場合リミットラインは3本の線になっている。それぞれ4辺のうちの上と左の辺の上の細胞をカウントして、下と右の辺の上の細胞はカウントしない。他の四角でも同様にカウントする。
- 2つのチャンバーの測定値の差が大きい場合は、再度細胞溶液を採取して染色、測定し直す。

➤ Burker-Turk 計算盤の場合の例。塗りつぶされている●はカウントした細胞を表す。



トリパンブルーを用いたセルカウントのワークシート

細胞のカウント

総生細胞数: _____ 総死細胞数: _____ 総細胞数: _____

% 生細胞 = 総生細胞数 / 総細胞数 x 100 = _____

細胞懸濁液の希釈

上記の条件の場合 : 希釈倍率: 10 X カウントした四角の数: 4

細胞濃度 (生細胞数/mL) = $\frac{\text{総細胞数}}{\text{カウントした四角の数}} \times 10,000 \times \text{希釈倍率}$ _____ = _____ cells/mL

総細胞数 = 細胞濃度 _____ cells/mL x 測定した細胞懸濁全液量 (mL) _____ = _____ cells

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

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

細胞のプレーティング方法：

1. 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

- 6-ウェルプレート： 2.5 mL / ウェル (全ウェルに細胞をまく場合、細胞懸濁液は 15 mL 必要)
- 12-ウェルプレート：1.0 mL / ウェル (全ウェルに細胞をまく場合、細胞懸濁液は 12 mL 必要)
- 24-ウェルプレート：0.5 mL / ウェル (全ウェルに細胞をまく場合、細胞懸濁液は 12 mL 必要)
- 48-ウェルプレート： 0.2 mL / ウェル (全ウェルに細胞をまく場合、細胞懸濁液は 10 mL 必要)
- 96-ウェルプレート：70 μ L / ウェル (全ウェルに細胞をまく場合、細胞懸濁液は 10 mL 必要)
- T-フラスコ：0.25 mL / cm^2

- 細胞数が多いと特に中心部に細胞がたまって栄養が行き渡らずに死んでしまい、後日中心が剥がれてしまう事があるので、多く播き過ぎないように注意する。(Over plating)
- 細胞数が少なすぎても細胞間の結合ができず好ましい培養状態にならないので細胞数のカウントには注意する。(製品に添付されている細胞数、viability を参考にする。)

2. プレートをゆっくりと前後左右方向にそれぞれ 3 回ずつに揺らす。インキュベーターに入れる直前に上下左右に再度揺らしてすぐに 37°C のインキュベーターに入れる。(5% CO₂、飽和湿度)

- 揺らさずにインキュベートしたり、円を描くように揺らすと well の中心に細胞がかたよってしまい、細胞が重なり合って剥がれてしまう可能性がある。

3. 肝細胞は 2-4 時間以内に接着するので、2-4 時間後に上清を吸い取って 37°C に温めた新しい培地(*Torpedo*TM 入り *InVitroGRO*TM CP Medium)を加える。

- プレートを傾けて接着していない細胞を含む培地をアスピレーターで吸引して除去する。
- この際、ピペットが well の底に触らないように注意する。
- 温めた新しい培地は、ピペットの先を well の壁の上の方につけてプレーティングの際と同じ量の培地を各 well に加える。

4. 一晚インキュベーションして再度培地を除去して 37°C に温めた新しい培地(*Torpedo*TM 入り *InVitroGRO*TM CP Medium)を加える。

5. プレートを 37°C のインキュベーターに入れる (5% CO₂、飽和湿度)

<<付録>>

複数のバイアルを同時溶解する場合

注 1) すべてのバイアルを同時に湯浴に入れること

1. *Torpedo*TM Antibiotic Mix を添加した *InVitroGRO*TM CP Medium を 37°C に温めておく。
2. 1. で用意した *Torpedo*TM 入り *InVitroGRO*TM CP Medium から付着可能肝細胞のバイアル 1 本あたり 5 mL にあたる量を取り、50 mL のチューブまたはビーカーに入れ、使用するまで 37°C に温めておく。
(例・5 バイアルの肝細胞を同時に使用する場合は、25 mL の *InVitroGRO*TM CP Medium を使用)
3. 肝細胞バイアルが少し氷が逆さにすると動く程度まで溶けたらすぐにバイアルからキャップを外し、2. で用意した *Torpedo*TM 入り *InVitroGRO*TM CP Medium の入ったチューブまたはビーカーに細胞を移す。
トリパンプルー法を使って細胞数と生細胞数を数える。
4. *InVitroGRO*TM CP Medium を使って肝細胞懸濁液を 0.70×10^6 生細胞 / mL に希釈する。

注 2) マウス Plateable の場合、 0.35×10^6 生細胞 / mL に希釈する。

参考： ラット及びマウスの Plateable ご利用の際は下記の培地及び抗生物質混合試薬を使用してください。この培地には血清が含まれていないため、そのままの試薬で induction 実験が可能です。

商品コード	商品名	梱包単位
IVT-Z990028	<i>InVitroGRO</i> CP Rodent Medium	250 mL
IVT-Z990027	<i>Torpedo</i> Rodent Antibiotic Mix	5.5 mL

参考： イヌの Plateable ご利用の際は下記の培地及び抗生物質混合試薬を使用してください。この培地には血清が含まれていないため、そのままの試薬で induction 実験が可能です。

商品コード	商品名	梱包単位
IVT-Z990025	<i>InVitroGRO</i> CP Dog Medium	250 mL
IVT-Z99000	<i>Torpedo</i> Antibiotic Mix	5.5 mL

<<2日目>> 培地交換

培地の交換

1. *Torpedo*TM 入り *InVitroGRO*TM CP Medium を 37°C に温める。
2. プレートを開けて接着していない細胞を含む培地をアスピレーターで吸引して除去する。
6. この際、ピペットの先が well の底に触らないように注意する。
3. 1. の温めた新しい培地を加える。
7. プレーティングの際と同じ量の培地を各 well に加える。この際、ピペットの先を well の壁の上の方につけて加える。
4. プレートを 37°C のインキュベーターに入れる (5% CO₂、飽和湿度)

<<3日目>> 誘導 (Induction)

培地の調整

1. Complete *InVitroGRO*TM HI Medium を用意する
 - *Torpedo*TM Antibiotic Mix (5.5 mL) を 37°C の湯浴に入れて溶かす
 - *Torpedo*TM Antibiotic Mix (5.5 mL) を 250 mL の *InVitroGRO*TM HI Medium に加える
 - *Torpedo*TM Antibiotic Mix 添加後の培地の使用期限は冷蔵 4°C 保存で 7 日間。

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日目を行う
 - ▶ 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FDAの資料等をご参照ください。
2. テスト検体や既知の誘導剤の Stock Solution (100X もしくは 1000X) を Complete *InVitroGRO*TM HI Medium、Acetonitrile、DMSO、Methanol、Ethanol などの溶媒で調製する。
例：DMSO で 1 mM の Rifampicin 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 Complete *InVitroGRO*TM 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 Rifampicin(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 ウェルプレートの培地 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% CO₂, 飽和湿度)。

<<4日目>>

3日目の操作を繰り返す。

培地の調製

1. Complete *InVitroGRO*TM 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*TM HI Medium、Acetonitrile、DMSO、Methanol、Ethanol などの溶媒用意する
例：DMSO で 1 mM の Rifampicin
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*TM 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 Rifampicin(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*TM 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% CO₂, 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*TM 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 日目を行う
 - 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)*“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*TM 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 Rifampicin (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% CO₂、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

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

参考文献:

Roymans, D.; Van Looveren, C.; Leone, A.; Parker, J.B.; McMillan, M.D.; Johnson, M.D.; Koganti, A.; Gilissen, R.; Siber, 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
- BioIVT 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@veritask.co.jp