

Human renal proximal tubular epithelial cells

プレートの取り扱い

及び

試験方法

本プロトコールは、Human renal proximal tubular epithelial cells (以下、RPTC) プレート製品を用いた被験化合物の双方向性輸送試験のためのプロトコールです。

Human renal proximal tubular epithelial cells 細胞プレート (insert 播種 / 24 well)

RPTC 細胞プレート (24 well)

(Cat. No. RPT201)

目次

1. はじめに.....	3
2. 細胞プレートの取り扱い.....	3
3. 培養細胞プレート製品 (キット) 内容.....	3
4. 使用機器, 消耗品, 試薬.....	3
4.1 機器.....	3
4.2 消耗品.....	3
4.3 試薬.....	3
5. 到着後の操作.....	3
6. 試験手順.....	4
6.1 経細胞輸送試験.....	4
6.2 阻害試験.....	5
7. データ解析.....	6
7.1 取込み試験.....	6
7.2 阻害試験.....	7
8. 推奨基質.....	7
9. 注意事項.....	7

1. はじめに

本培養細胞プレートは、ヒト腎近位尿細管上皮細胞の初代培養細胞(以下、RPTC)を、Transwellプレートに播種した状態でお届けする Ready-to-use キットです。

本製品は、被験化合物の双方向性の輸送を測定することで輸送特性を評価することが可能です。以下に本製品の取扱い方法、及び本製品を用いた試験方法を記載しております。

2. 細胞プレートの取扱い

本製品の最適使用期間は、製品到着翌日ですが、製品到着日も 37 °C, 5 % CO₂ のインキュベーター内で 4 時間以上静置後、試験可能です。

本製品到着後は、本プロトコルの「5. 到着後の操作」をご参照の上、ご使用日まで 37 °C の CO₂ インキュベーターにて培養して下さい。

3. 培養細胞プレート製品(キット)内容

◆ 細胞プレート (insert 播種 / 24 well)

- ・ 全ての insert に細胞を播種し、本製品の到着翌日に最適な使用状態になるよう調製されております。
- ・ 室温でゲル化する培地を使用しております。到着後、速やかに 37 °C, 5 % CO₂ インキュベーターに入れて下さい。到着当日の培地交換は必要ありません。

4. 使用機器, 消耗品, 試薬

4.1 機器

- ・ CO₂ インキュベーター
- ・ マイクロピペット
- ・ クリーンベンチ、もしくは安全キャビネット
- ・ ホットプレート

4.2 消耗品

- ・ ピペット、チップ
- ・ 希釈、調製用の容器(チューブなど)

4.3 試薬

- ・ HBSS w/o phenol red (Thermo Fisher Scientific, 14025-092)
Note 必要に応じて適切な緩衝剤をご使用ください。

5. 到着後の操作

本製品到着後、直ちにプレートを梱包容器より取り出し、以下のように処理して下さい。

1. 試験に使用するまで、37 °C, 5 % CO₂ インキュベーターで培養する。

6. 試験手順

Note;

- Lucifer Yellow 等のパラセルラーマーカーを用いてタイトジャンクションの形成を確認する。
- 取り込み試験中はホットプレート、及び熱伝導率の良い補助板を使用して、細胞の温度を 37 °C に保って下さい。

6.1 経細胞輸送試験

1) 【Lucifer Yellow を用いたタイトジャンクション形成を確認する場合】

- ① 細胞を播種した各 insert から溶液を除去し、37 °C に加温した 100 μ L の Permeability Buffer を、細胞を剥がさない様に慎重に添加して細胞を洗浄する。
- ② 24 well plate に 37 °C に加温した 600 μ L の Permeability Buffer を添加し、①の insert をセットする。
- ③ ①～②の操作を計 3 回繰り返す。
- ④ insert から Permeability Buffer を除去し、予め 37 °C に加温した 100 μ L の薬液を、細胞を剥がさないように慎重に添加して反応を開始する。
- ⑤ CO₂ インキュベーター内で保温し、一定時間後、下層よりサンプリングを行う。
- ⑥ サンプリングした各試料の蛍光を測定する。

2) 【Apical to Basolateral (A to B)の輸送を検討する場合】

- ① 各 insert から溶液を除去し、37 °C に加温した 100 μ L の Permeability Buffer を、細胞を剥がさない様に慎重に添加して細胞を洗浄する。
- ② 24 well plate に 37 °C に加温した 600 μ L の Permeability Buffer を添加し、①の insert をセットする。
- ③ ①～②の操作を計 2 回繰り返す。
- ④ insert から Permeability Buffer を除去し、予め 37 °C に加温した 100 μ L の Permeability Buffer を、細胞を剥がさない様に慎重に加える。
- ⑤ 24 well plate に 37 °C に加温した 600 μ L の Permeability Buffer を添加し、④の insert をセットし、一定時間プレインキュベーションする。
- ⑥ プレインキュベーション後、各 insert 内の Permeability Buffer を慎重に吸い取り、あらかじめ 37 °C 保温しておいた薬液を 100 μ L を、細胞を剥がさない様に慎重に添加して反応を開始する。
- ⑦ CO₂ インキュベーター内で保温し、一定時間後、24 well plate よりサンプリングを行う。その際、サンプリングした量と同量の新鮮な Permeability Buffer を 24 well plate に添加し補充する。

3) 【Basolateral to Apical (B to A)の輸送を検討する場合】

- ① 各 insert から溶液を除去し、37 °C に加温した 100 μ L の Permeability Buffer を、細胞を剥がさない様に慎重に添加して細胞を洗浄する。
- ② 24 well plate に 37 °C に加温した Permeability Buffer を 600 μ L を添加し、①の insert をセットする。

- ③ ①～②の操作を計2回繰り返す。
 - ④ insertから Permeability Buffer を除去し、予め37℃に加温した100 μLの Permeability Buffer を、細胞を剥がさない様に慎重に加える。
 - ⑤ 24 well plate に37℃に加温した600 μLの Permeability Buffer を添加し、④の insert をセットし、一定時間プレインキュベーションする。
 - ⑥ 24 well plate をから Permeability Buffer を除去し、あらかじめ37℃で保温しておいた600 μLの薬液を添加して反応を開始する。
 - ⑦ CO₂インキュベーター内で保温し、一定時間後、insertよりサンプリングを行う。その際、サンプリングした量と同量の新鮮な Permeability Buffer を insert に添加し補充する。
- 4) 2), 3)でサンプリングした各試料を定量する。

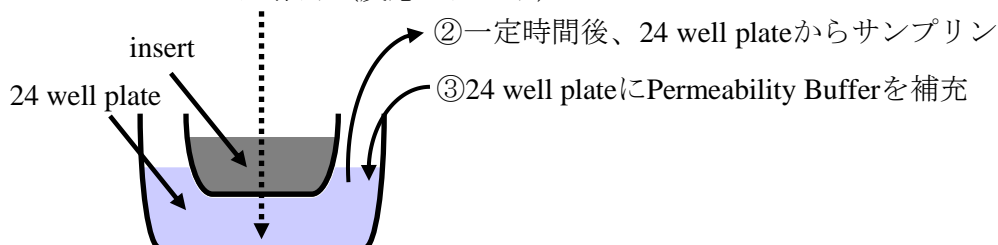
6.2 阻害試験

- 1) 各 insert から溶液を除去し、37℃に加温した100 μLの Permeability Buffer を、細胞を剥がさない様に慎重に添加して細胞を洗浄する。
- 2) 24 well plate に37℃に加温した600 μLの Permeability Buffer を添加し、1)の insert をセットする。
- 3) 1)～2)の操作を2回繰り返す。
- 4) insert から Permeability Buffer を除去し、予め37℃に加温した100 μLの Permeability Buffer を、細胞を剥がさない様に慎重に加える。
- 5) 24 well plate に37℃に加温した600 μLの Permeability Buffer を添加し、4)の insert をセットし、一定時間プレインキュベーションする。
- 6) 【Apical to Basolateral (A to B)の輸送を検討する場合】
 - ① 各 insert から被験化合物含有 Permeability Buffer もしくは陽性対照阻害剤含有 Permeability Buffer を慎重に除去し、あらかじめ37℃保温しておいた100 μLの薬液を、細胞を剥がさない様に慎重に添加して反応を開始する。
 - ② CO₂インキュベーター内で保温し、一定時間後、24 well plate よりサンプリングを行う。その際、サンプリングした量と同量の新鮮な被験化合物含有 Permeability Buffer もしくは陽性対照阻害剤含有 Permeability Buffer を24 well plate に添加し補充する。
- 7) 【Basolateral to Apical (B to A)の輸送を検討する場合】
 - ① 24 well plate から被験化合物含有 Permeability Buffer もしくは陽性対照阻害剤含有 Permeability Buffer を除去し、あらかじめ37℃で保温しておいた600 μLの薬液を添加して反応を開始する。
 - ② CO₂インキュベーター内で保温し、一定時間後、insertよりサンプリングを行う。その際、サンプリングした量と同量の新鮮な被験化合物含有 Permeability Buffer もしくは陽性対照阻害剤含有 Permeability Buffer を insert に添加し補充する。
- 8) サンプリングした各試料を定量する。

【薬剤輸送実験の概略】

Apical to Basolateral (A to B の場合)

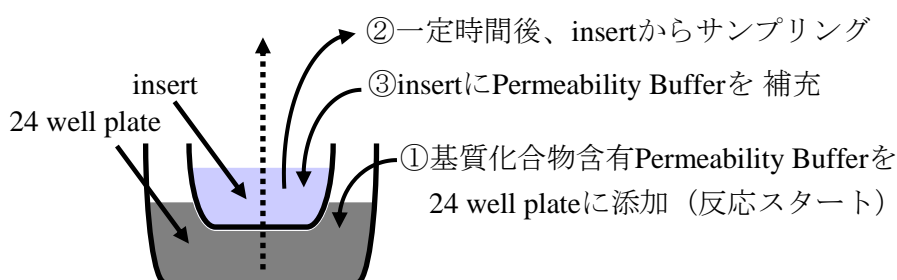
- ① 基質化合物含有 Permeability Buffer を insert に添加 (反応スタート)



- ②一定時間後、24 well plateからサンプリング

- ③24 well plateにPermeability Bufferを補充

Basolateral to Apical (B to A の場合)



- ②一定時間後、insertからサンプリング

- ③insertにPermeability Bufferを補充

- ①基質化合物含有Permeability Bufferを 24 well plateに添加 (反応スタート)

7. データ解析
7.1 取込み試験

 1) 累積透過量 Q_N [pmol] の計算

- ① Apical to Basolateral (A to B)

$$\begin{aligned}
 Q_N \text{ (A to B) [pmol]} &= C_N \text{ [nM]} \times V_B \text{ [mL]} + (C_{N-1} + C_{N-2} + C_{N-3} + \dots) \times X \text{ [mL]} \\
 &= C_N \text{ [nM]} \times V_B \text{ [mL]} + \sum C_{N(N=1 \sim N-1)} \times X \text{ [mL]}
 \end{aligned}$$

- ② Basolateral to Apical (B to A)

$$\begin{aligned}
 Q_N \text{ (B to A) [pmol]} &= C_N \text{ [nM]} \times V_A \text{ [mL]} + (C_{N-1} + C_{N-2} + C_{N-3} + \dots) \times X \text{ [mL]} \\
 &= C_N \text{ [nM]} \times V_A \text{ [mL]} + \sum C_{N(N=1 \sim N-1)} \times X \text{ [mL]}
 \end{aligned}$$

- C_N : 各測定値 [nM]
 N : サンプリングの回数
 X : サンプリングした量 (mL)
 V_B : Basal の Volume (mL)
 V_A : Apical の Volume (mL)

 2) Flux ratio = Q_N (B to A) / Q_N (A to B)

Note; Flux ratio は各時点でのデータを線形回帰分析した計算である。

3) 単位面積当たりの透過量 [pmol/cm²] の計算

単位面積当たりの透過量 [pmol/cm²]

$$= Q_N \text{ [pmol]} / A \text{ [cm}^2\text{]}$$

A : 培養面積 (Transwell insert; 0.33 cm²)

4) 見かけの透過係数(cm/sec) の計算

Papp (Apparent permeability coefficient) [cm/sec]

$$= \text{単位面積当たりの透過量 [pmol/cm}^2\text{]} \times 10^3 / t \text{ (sec)} / \text{基質の初濃度 (\mu M)}$$

Papp : 見かけの透過係数

7.2 阻害試験

被験化合物 (阻害剤) 非存在下での Papp を 100 % として被験化合物 (阻害剤) 存在下での Papp より % of Control を算出し、横軸に被験化合物 (阻害剤) の濃度、縦軸に % of Control を片対数グラフにプロットする。

$$\% \text{ of Control} = \frac{\text{被験化合物 (阻害剤) 存在下での } P_{\text{app}}}{\text{化合物 (阻害剤) 非存在下での } P_{\text{app}}} \times 100$$

得られたグラフを最小二乗法の回帰式を用いて、50 % 阻害率 (IC₅₀) を算出する。

8. 推奨基質

	基質	メーカー	Cat. No.
腎有機カチオントランスポーター	Rhodamine-123	富士フイルム和光純薬	187-01703

*上記は、当社で使用している化合物のメーカーおよび Cat.No. を記載しております。

9. 注意事項

本製品の使用方法に関してご不明な点がございましたら、下記までお問合せ下さい。

株式会社ジェノメンブレン

〒230-0052

神奈川県横浜市鶴見区生麦 2-3-18

イシカワ EMC 研究所ビル 3 階

TEL: 045-508-2326

FAX: 045-716-8884

URL: <http://www.genomembrane.com/>

E-mail: info@genomembrane.com