

POCA[®] Hand1-EST

取扱説明書

【注意】

- *本キット中の Hand1-ES 細胞の使用は弊社とのライセンス契約条件に従う必要があります。
- *本製品の一部はPromega Corporationとの契約に基づいて製造・販売をしております。製品を開封する前にPromega CorporationのLimited Use Label Licenseの内容を必ずご確認ください。

研究用試薬

この度は、POCA® Hand1-EST をお買い求めいただきまして誠にありがとうございます。
ご利用前に下記説明をご一読いただき、ご利用下さい。

【目次】

1. 製品キット構成	・・・・・・・・・・	P 3
2. 保存温度・必要器具&装置	・・・・・・・・・・	P 3
3. 操作手順		
3-1：被験物質の準備と、溶媒の選択	・・・・・・・・・・	P 4
3-2：被験物質&陽性対照の希釈とプレートレイアウト	・・・・・・・・・・	P 5
3-3：ES (Hand1-ES) 細胞の準備	・・・・・・・・・・	P 6
3-4：Hand1-ES 細胞の継代	・・・・・・・・・・	P 6
3-5：アッセイするための試薬と細胞の準備	・・・・・・・・・・	P 6
3-6：蛍光／発光測定（細胞毒性／分化効率測定）	・・・・・・・・・・	P 7
3-7：データ解析	・・・・・・・・・・	P 8
4. お問い合わせ先	・・・・・・・・・・	P 10

【はじめに】

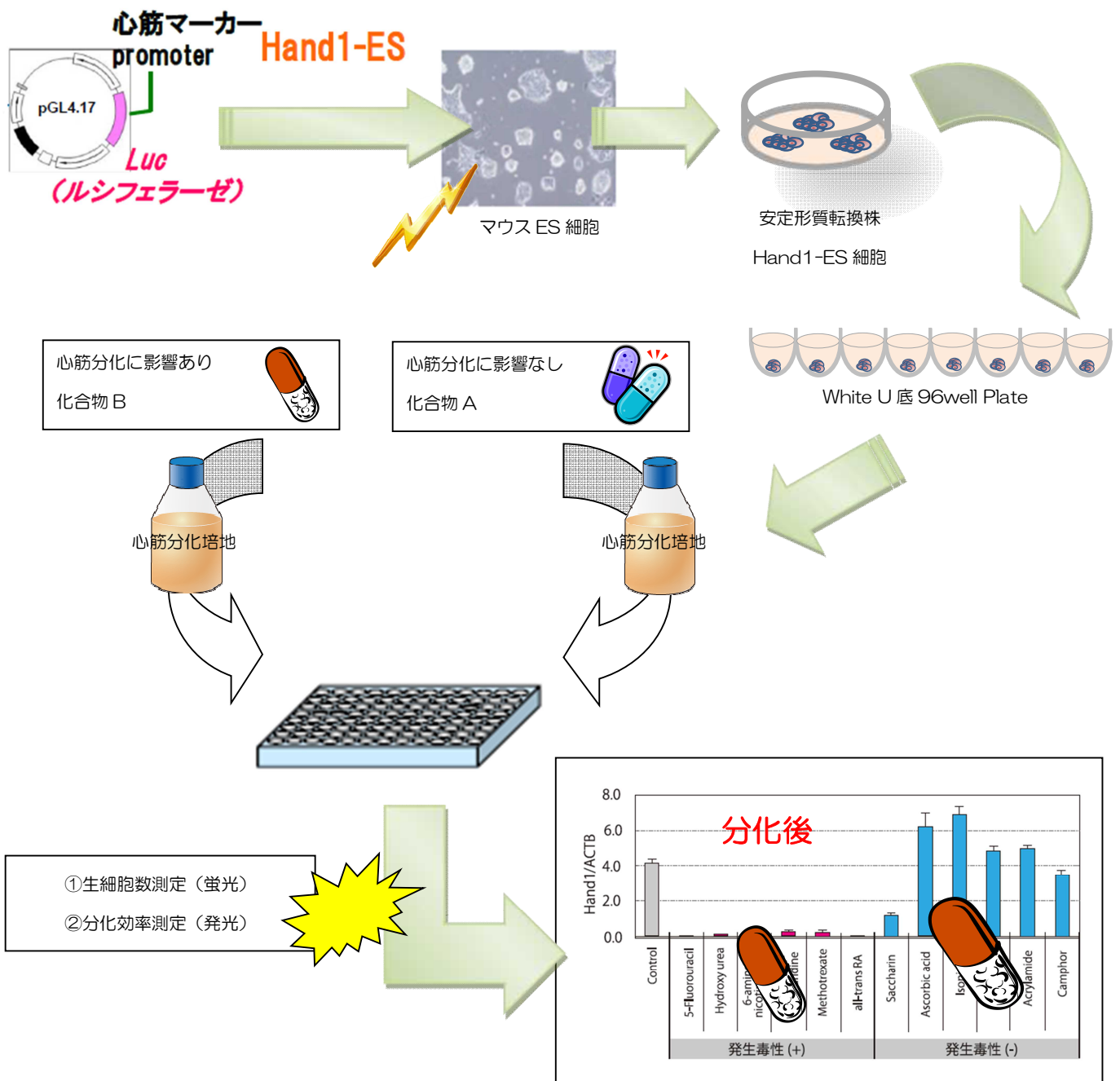
我々の身の回りには、工業製品、化粧品、農薬、医薬品などの多数の化学物質が存在する。現在、これらのヒトへの安全性を高精度に評価するために、多くの実験動物を用いた毒性試験が実施されている。安全性評価の中で生殖発生毒性試験が対象としている項目は、配偶子（精子、卵子）の形成および生殖機能（受胎、妊娠維持、分娩、哺育）ならびに次世代の発生および成長といった世代を越えた幅広いものである。特に、次世代（胎児）の形態的な異常を検出する催奇形性試験は生殖発生毒性試験の中で最も重要視されているが、多くの時間と動物による経費が必要な点が問題視されている。

近年、動物福祉の観点から、動物細胞や微生物などを用いた in vitro 試験法は短期間に少量の化合物で評価できる簡便な試験法であり、

化学物質の安全性評価の効率化に大きく寄与しグローバルに研究が進められている。

この度、住友化学株式会社がマウス ES 細胞から心筋への分化過程における生細胞数と分化効率を、蛍光・発光量で測定する心筋分化毒性評価方法を開発し、株式会社ケー・イー・シーよりキットとして販売するに至った。

【測定原理】



【製品キット構成】

• Hand1-ES 細胞	1 vial (2×10 ⁶ cells)
• 未分化用維持培地	1 本/30mL
• 心筋分化用培地	1 本/200mL
• IC50、ID50 解析ソフト	1

(*初回ご購入時、またはアップデート時に、商品に同梱、別送、ダウンロード、メール等でお送りいたします。)

<その他必要器材・試薬>

- ゼラチンコート済み 60mm Dish 2 枚 (推奨メーカー：住友ベークライト 【カタログ番号】MS-0060G)

または、以下方法にて Hand1-ES 細胞播種前に培養用 Dish にゼラチンコートを行い使用します。

60mm の組織培養用 Dish に 0.1%ゼラチン溶液 5mL (メルク社【カタログ番号】ES006B) を分注し 37℃で 30 分間インキュベートし、ゼラチン溶液を吸引後 Hand1-ES 細胞を播種します。

- サンプル希釈用プレート 1 枚 (推奨メーカー：コーニング【カタログ番号】3359 薬剤耐性プレート)
- 試薬準備用 96well 深底 (ディープ) プレート 1 枚 (容量 1~2mL/well)
- マルチチャンネルピペット用リザーバー 1 個
- マイクロプレート用シール 2 枚 (指定メーカー：パーキンエルマー 【カタログ番号】6050185)
- PrimeSurface® 96U White Plate 2 枚 (指定メーカー：住友ベークライト【カタログ番号】MS-9096W)
- IC50 用蛍光試薬 CellTiter-Fluor™ 10mL×2 (指定メーカー：プロメガ 【カタログ番号】G6081 または G6080)
- ID50 用発光試薬 Steady-Glo® 10mL×2 (指定メーカー：プロメガ 【カタログ番号】E2510)

*** 赤字にて記載している製品は必ず必要ですので、アッセイ前にご準備下さい。**

【保存温度】

- Hand1-ES 細胞 : 液体窒素保存
- 未分化用維持培地、心筋分化用培地 : -20℃

【必要器具&装置】

- 発光測定用マイクロプレートリーダー
- 蛍光測定用マイクロプレートリーダー
- 試薬分注用 V底 96well マイクロプレート (Cytotoxicity Assay 試薬分注時に使用)
- プレートミキサー
- ボルテックス
- ウォーターバス
- CO₂インキュベーター (37℃、5%)
- シングルピペット (20~200 μL、100~1,000 μL)
- 8ch マルチチャンネルピペット (1~10 μL、20~200 μL)
- ピペットチップ (1~10 μL、20~200 μL、100~1,000 μL)
- 血球計算盤 (ヘモサイトメーター)
- 遠心分離機
- アルミホイル

3. 操作手順

3-1: 被験物質の準備と、溶媒の選択

被験物質は PBS (-) や DMSO などの適切な溶媒で溶かし、推奨される最大の最終濃度は心筋分化培地中に対し PBS (-) で 1%、DMSO で 0.1% である。被験物質は各実験前に重量を測定し、陽性対照として 5-FU を使用する場合も同様に重量を測定しておく。本キットでは、IC50 (50%細胞阻害濃度) と ID50 (50%Hand1 活性阻害濃度) が用量反応曲線から計算できる 7 濃度を、適切な最大終濃度から希釈系列を設定しアッセイを行う。使用する最適な最大終濃度が未知の場合、最大終濃度 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または溶解しない場合は、下図の方法にて確認した最大溶解濃度 (Water Solubility Conc.) から 1:10 で希釈し、容量設定試験を行う。

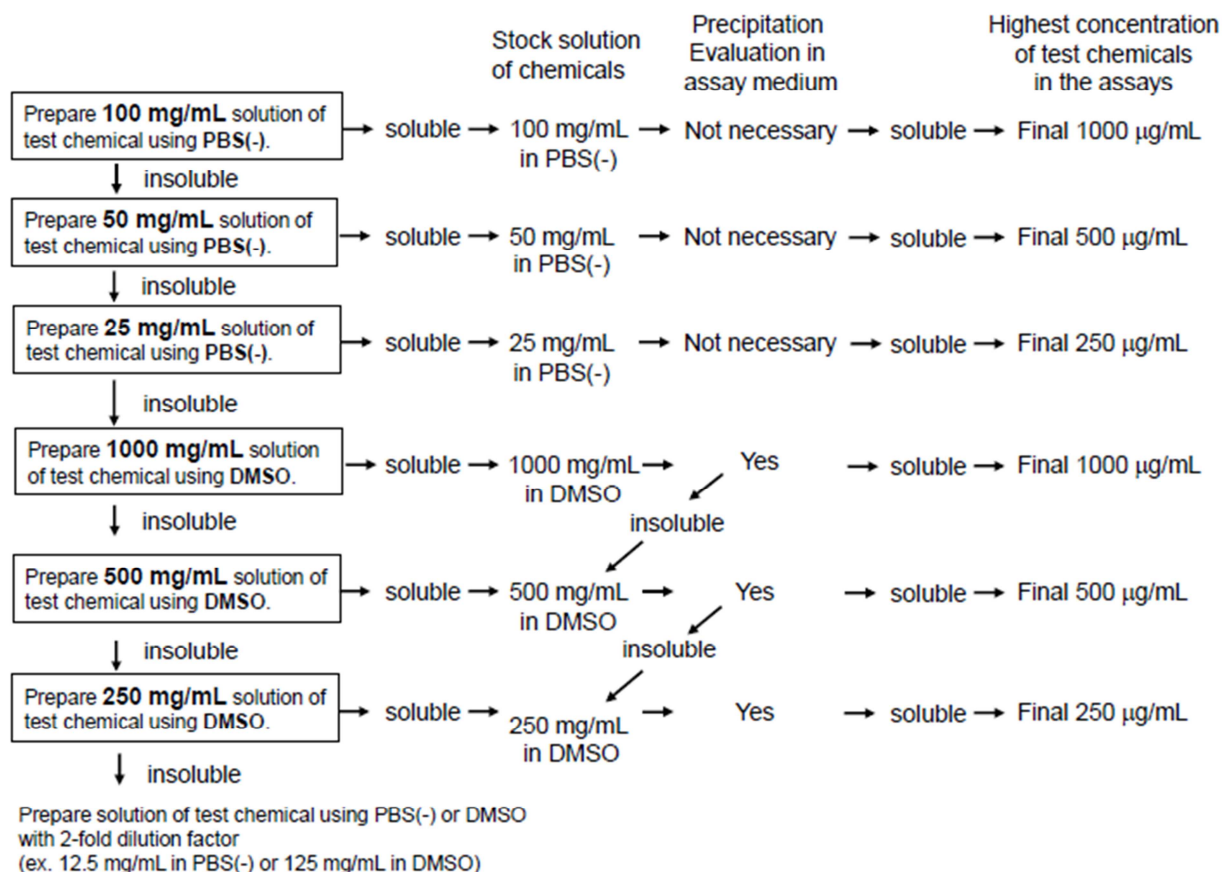
(注) 本試験の開始濃度は 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ または最大溶解濃度ではなく、IC50 (50%細胞阻害濃度) と ID50 (50%Hand1 活性阻害濃度) が用量反応曲線から算出できる適切な濃度です。

(注) 最大溶解濃度 (Water Solubility Conc.) は「face cover」に入力します。(最大 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 本濃度は ID50、IC50 同様判定に使用します。(本濃度の入力がない場合、最終判定結果が表示されません。)

25	(4)	Chemical code	Maximum conc.(mg/mL)	common-ratio-of-dilution	1.5	Solvent	PBS(-)
26		Exp.	Final maximum conc.($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Water solubility conc. (mg/mL)			
27							
28							
29							
30							

*単位が mg/mL です。ご注意ください。

(最大溶解濃度決定試験チャート)



※注意：被験物質を溶解する際、必要に応じて少なくとも 5 分間程度の超音波処理やボルテックスミキサー等を実施し溶解を試みてください。

陽性対照の 5-FU については PBS (-) で溶解させた 0.02mg/mL の原液から連続 2 倍希釈にて下記のように 7 濃度を設定する。

(0.02, 0.01, 0.005, 0.0025, 0.0013, 0.0006, 0.0003mg/mL)

3-2: 被験物質 & 陽性対照の希釈とプレートレイアウト

一般的に被験物質は以下のように準備する。

最大濃度（最終濃度）は 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ （被験物質の溶解度によって変わります）で連続希釈は可能な限り細かな濃度設定、（公比 1:1.5、1:2、1:3、1:5、1:10）で希釈系列を設定しアッセイを行う。（同一溶媒使用）。

- ①. 「被験物質の準備と溶媒の設定」で記載された方法で溶解した陽性対照（5-FU）と被験物質を、サンプル希釈用プレート（推奨プレート：コーニング Cat.No 3359）を使って準備する。（表 1 参照）

・プレートレイアウト例：【陽性対照】1A-1H、【被験物質】2A-2H

【表 1：希釈倍率とプレートレイアウト（サンプル希釈用プレート） 希釈公比 10 の場合】

	陽性対照（5-FU）	被験物質										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PBS (-)	VC										
B	0.0003 mg/mL	Conc.1			ratio 1:10							
C	0.0006 mg/mL	Conc.2			ratio 1:10							
D	0.0013 mg/mL	Conc.3			ratio 1:10							
E	0.0025 mg/mL	Conc.4			ratio 1:10							
F	0.005 mg/mL	Conc.5			ratio 1:10							
G	0.01 mg/mL	Conc.6			ratio 1:10							
H	0.02 mg/mL	Conc.7			ratio 1:10							

VC : Vehicle control (DMSO or PBS (-))

- ②. 陽性対照の準備

深底プレート（別紙表 2）の 1A-1H に「心筋分化培地」を 980 μL 入れ、サンプル希釈用プレート（表 1）1A-1H 陽性対照溶液（5-FU）20 μL をマルチチャンネルピペットにて深底プレート（別紙表 2）に加える。

※注意：心筋分化培地に溶液を分注時、マルチチャンネルピペットを使用した際、チップの表面に不溶物が析出する場合は、その濃度は使用せず更に希釈したものを使用する。

- ③. 被験物質の準備

<被験物質が PBS (-) にて溶解されている場合>

深底プレートの 2A-2H に「心筋分化培地」を 980 μL 入れ、表 1 の 2A-2H の溶液 20 μL を深底プレートの 2A-2H に加える。（次ページ表 2 参照）

<被験物質が DMSO にて溶解されている場合>

深底プレートの 2A-2H に「心筋分化培地」を 998 μL 入れ、表 1 の 2A-2H の溶液 2 μL を深底プレートの 2A-2H に加える。（次ページ表 2 参照）

※注意：心筋分化培地に溶液を分注時、マルチチャンネルピペットを使用した際、チップの表面に不溶物が析出する場合は、その濃度は使用せず更に希釈したものを使用する。

- ④. ES 細胞の準備と PrimeSurface® への ES 細胞の播種まで、深底プレートは室温にて置いておく。

【表 2：陽性対照、被験物質溶液の分注と深底プレートレイアウト】

	陽性対照 (5-FU) in 溶媒	被験物質 in 溶媒										
	↓添加	↓添加										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			}									
B												
C												
D												
E					← 980 μ L or 998 μ L の心筋分化培地							
F												
G												
H												

3-3：ES 細胞 (Hand1-ES) の準備

- 凍結されている「未分化維持培地」をあらかじめ融解させ、15mL の遠心管に 9mL 入れて準備しておく。
- Hand1-ES 細胞が入った凍結アンプルを 37°C のウォーターバスにて温浴解凍する。
- あらかじめ準備した①に温浴解凍した②を添加する。
- 室温にて 5 分間 900~1,400rpm の回転速度で遠心分離をさせ上清を除去し、再度「未分化維持培地」5mL を添加し懸濁する。
- 懸濁した全量をゼラチンコート済み 60mm Dish、または 0.1%ゼラチン溶液 5mL (メルク社【カタログ番号】ES006B) を

分

注し 37°C で 30 分間インキュベート後、ゼラチン溶液を吸引しコートした 60mm の Dish に播種し、2~3 日間 *1)37°C5%

CO2

にてインキュベートする。

*1)培養期間 (2~3 日) は細胞の状態により適宜ご判断ください。尚、培養期間が 3 日間となる場合は 2 日目の培地交換をお勧めいたします。

3-4：Hand1-ES 細胞の継代 (ES 細胞の安定化)

- 3-3-⑤の Dish の培養上清を除去し、5mLPBS(-) で細胞を Wash した後に 0.25% トリプシン/1mM EDTA 2mL を Dish 内に添加後、速やかに除去し、その後 1~2 分程度 37°C でインキュベートする。(1~2 分インキュベートすることにより ES 細胞が剥離されます)
- その後、Dish へ 2mL の未分化維持培地を添加し、1,000 μ L ピペットにて ES 細胞を懸濁させ 15mL の遠心管へ移す。
- シングルセルになるようよく懸濁した後に血球計算盤などで細胞数を測定する。
- 新しい 60mm のゼラチンコート済み Dish に 2×10^6 cells/5mL 未分化維持培地になるように細胞を播種し 37°C の 5%CO₂ で一晩インキュベートする。

3-5：アッセイするための試薬と細胞の準備 (1 枚は陽性対照用、もう 1 枚は被験物質用で使用)

- 予め心筋分化培地と PBS (-) は 37°C、0.25%トリプシン/1mM EDTA 溶液は室温に戻しておく。
- 住友ベークライト社 PrimeSurface® White U 底 96well プレートの一番外側の well に PBS (-) を 100 μ L ずつ添加し (アッセイ well の乾燥を防ぐため)「心筋分化培地」100 μ L をプレート内 11B-11G に添加する。(次ページ表 3 参照)
- 3-4-④でインキュベートした細胞の培養上清を吸引し、5mLPBS (-) で細胞を Wash した後に 0.25% トリプシン/1mM EDTA 2mL を Dish 内に添加後、速やかに除去し、その後 1~2 分程度 37°C にてインキュベートする。(1~2 分インキュベ

トすることにより ES 細胞が剥離されます)

- ④. その後、Dish へ 2mL の心筋分化培地を添加し、1,000 μ L ピペットにて ES 細胞を懸濁させ 15mL の遠心管へ移す。^{*2}細胞数を測定し「心筋分化培地」で、15,000cells/mL にする。(※注：この際の細胞は 90%以上の生存率の物を使用します。)

その調整溶液を PrimeSurface[®]プレート内の 2B-10G に 750cells/50 μ L/well になるように添加する。

*2)：細胞がシングルセルになっていない場合や大きな塊が観察された場合は、40 μ m のセルストレーナー (BD Falcon[™]) などでシングルセルのみを回収して下さい。

- ⑤. PrimeSurface[®]にプレートの蓋をした状態で 2 時間以上のインキュベート (37 $^{\circ}$ C、5%CO₂) を実施する。
 ⑥. 2B-2G の各 well に 50 μ L の「心筋分化培地」を添加する。
 ⑦. 濃度勾配をつけた「被験物質溶液」及び「陽性対照溶液」が入った深底プレートから 8ch のマルチチャンネルピペットを使用し吸引したものを「B3-B10」の方向で 8ch のチップ先端をあて、「G3-G10」方向へ 50 μ L/well を連続分注する。
 ⑧. プレートミキサーにて数秒攪拌し、播種後 120 時間 (5 日間)^{*注} 37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ にて蓋をした状態でインキュベートする。

*注：④の播種後から 120 時間インキュベートして下さい。

【表 3：アッセイ時のプレートレイアウト】

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		MC	VC	Conc.1	Conc.2	Conc.3	Conc.4	Conc.5	Conc.6	Conc.7		
C		MC	VC	Conc.1	Conc.2	Conc.3	Conc.4	Conc.5	Conc.6	Conc.7		
D		MC	VC	Conc.1	Conc.2	Conc.3	Conc.4	Conc.5	Conc.6	Conc.7		
E		MC	VC	Conc.1	Conc.2	Conc.3	Conc.4	Conc.5	Conc.6	Conc.7		
F		MC	VC	Conc.1	Conc.2	Conc.3	Conc.4	Conc.5	Conc.6	Conc.7		
G		MC	VC	Conc.1	Conc.2	Conc.3	Conc.4	Conc.5	Conc.6	Conc.7		
H												

 : Cells  : 100 μ L of PBS (-)  : 100 μ L 心筋分化培地

■MC : Medium Control ■VC : Vehicle Control (溶媒 : PBS (-)、DMSO 等)

<最終 well 含有物>

- 2B-2G(MC) : Hand1-ES Cells + 心筋分化培地
- 3B-3G(VC) : Hand1-ES Cells + 心筋分化培地 + 溶媒 (PBS (-)、DMSO 等)
- 4B-10G(Conc.) : Hand1-ES Cells + 心筋分化培地 + 被験物質 含有溶媒

3-6：蛍光/発光 測定 (注意：測定前の 30 分前に電源をオンにし、装置を安定させる)

<Cytotoxicity Assay (細胞毒性試験) >

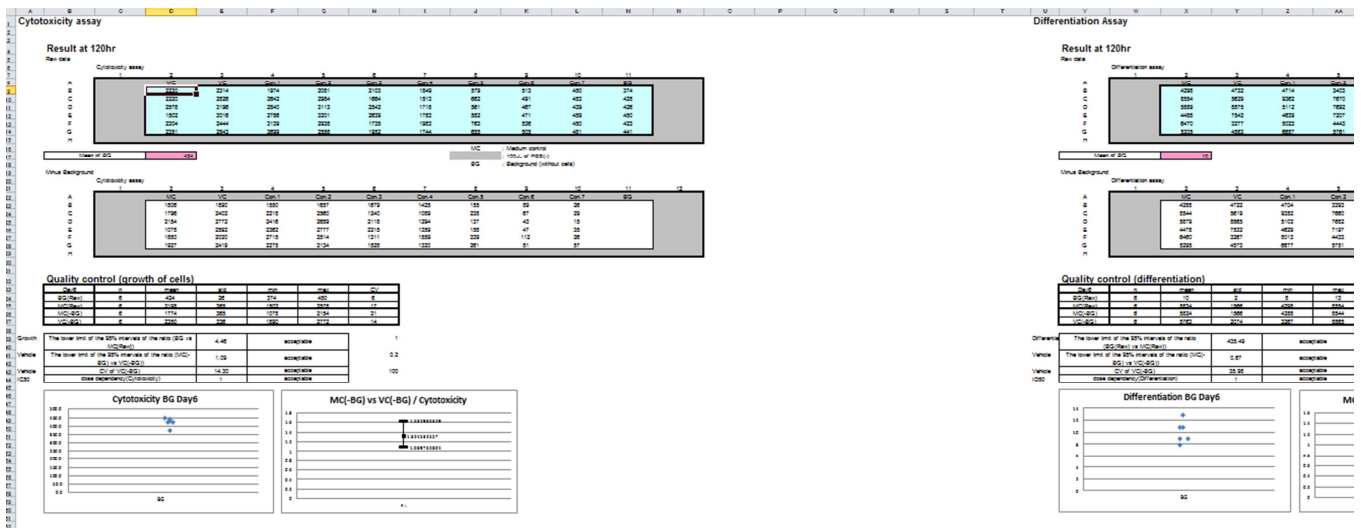
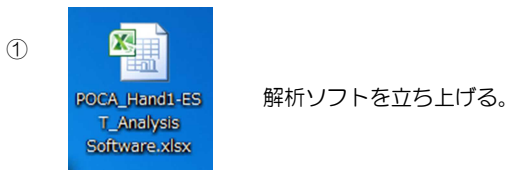
- 凍結されている「CellTiter-Fluor[™]」の Assay Buffer を完全に解凍させ室温に戻しておく。
- ①の Assay Buffer 1mL を GF-AFC substrate (基質)^{*注1} の入ったチューブに入れ、ボルテックスにて均一に完全に溶解させる。(混合率 : Assay buffer 1mL、GF-ASC 基質 10 μ L) *注1 : 基質は遮光すること。
- 完全に溶解混合した②の溶液を各 well (2B-11G) に 10 μ L ずつ添加する。(この時、②の溶液を V 底プレートの 6well に 160 μ L/well 入れ、マルチチャンネルピペットで分注することをお勧めします)
- 分注後、若干攪拌し、30 分 37 $^{\circ}$ C でインキュベートする。^{*注2}
 *注2 : すぐに測定し、1 時間以上のインキュベートはしないこと。またプレートは遮光すること。
- 蛍光マイクロプレートリーダー (EX : 380-400nm、EM : 505nm) で蛍光強度を測定する。

<Differentiation Assay (分化効率試験)>

- ①. 凍結された「Steady-Glo」の Assay Buffer を解凍し、基質の入ったチューブに全量を入れ溶解し、使用するまで室温*注3に戻しておく。 *注3：基質は遮光すること
- ②. マルチチャンネルピペット (8ch : 20~200 μL) にて①を 2B-11G^ 100 μL/well ずつ添加する。
- ③. プレート蓋をし、プレートミキサーを使用して室温にて 30 分以上穏やかに攪拌する*注4
*注4：攪拌中 PrimeSurface®プレートはアルミホイル等で遮光する。
- ④. 攪拌後、プレートシールを貼り、発光マイクロプレートリーダーにて発光強度を測定する。(測定は機器メーカーに依存するため、適当な時間の発光量を測定する【バリデーション Study 時は 1 秒間の発光積算値】)

3-7: データ解析

データ解析には添付の CD-ROM 内専用解析ソフト (POCA Hand1-EST Analysis Software) が必要です。そのため、解析時には CD-ROM 内のエクセルファイルをご利用下さい。



②お客様情報、ポジコン、被験物質情報の入力 (face cover)

Hand1-Luc EST Datasheet
for Phase 2b study
version E07

ご所属、名前、日付等の情報を入力

Hand1-ES 細胞の生存率を入力
(生存率が90%以上のみ最終判定結果受諾)

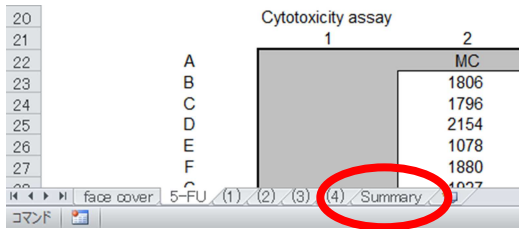
被験物質の最高濃度、被験物質の溶媒希釈倍率、使用溶媒等を入力

③ポジコン (5-FU) のデータ貼り付け

(4) Chemical code
Exp.

『5-FU』のシートを選択する。

⑤判定結果



「Summary」のシートを選択

判定結果画面上部より、ポジコン、各被験物質の判定結果が表示されます。

全て「acceptable」であることの確認

Judgement		IC50	0.021	acceptable
		ID50	0.033	acceptable
		Lower limit(BG vs MC:Cytotoxicity)	4.5	acceptable
		Lower limit(MC:-BG) vs VC:-BG):Cytotoxicity)	1.1	acceptable
		CV of VC(-BG):Cytotoxicity)	14.3	acceptable
		dose dependency(Cytotoxicity)	1	acceptable
		Lower limit(BG vs MC:Differentiation)	435.5	acceptable
		Lower limit(MC:-BG) vs VC:-BG):Differentiation)	0.7	acceptable
		CV of VC(-BG):Differentiation)	36.0	acceptable
		dose dependency(Differentiation)	1	acceptable

Pass: any problem for quality check is not found.

Judgement		Ratio	0.99	Positive
		Lower limit	0.67	
		Upper limit	1.40	

「Pass」であることの確認

最終判定結果が表示されます。

4：お問い合わせ先

製品の不備、ご質問等がございましたら、下記までご連絡下さい。

株式会社ケー・イー・シー 試薬事業部
 〒661-0978 兵庫県尼崎市久々知西町2丁目1-20
 TEL：06-6435-9747 FAX：06-6435-9748
 E-mail：cs-info@kacnet.co.jp

【発売元】

株式会社 ケー・イー・シー

<URL> <http://www.kacnet.co.jp/>

