

POCA[®] ReIn- ES 細胞

取扱説明書

【注意】

POCA ReIn-ES 細胞の使用には、限定使用条件同意書を弊社に提出いただきます。

【はじめに】

マウス ES 細胞から神経細胞への分化過程における生細胞数と分化効率を、蛍光・発光量で測定する神経分化毒性の評価方法を住友化学㈱が開発しました。弊社では、神経分化毒性評価に用いる、神経分化マーカー遺伝子 (ReIn 遺伝子) をマウス ES 細胞に導入した POCA ReIn-ES 細胞を販売します。

POCA ReIn-ES 細胞は、発生過程において脳の層構造に関与する ReIn 遺伝子の発現量をルシフェラーゼ活性で簡単にモニターできる細胞株で、ES 細胞から神経細胞へと分化する過程で化学物質を曝露し、曝露終了時に細胞毒性アッセイとルシフェラーゼ活性を測定することにより、化学物質が有する神経分化阻害作用を検出できます。なお本細胞は、継代培養によってルシフェラーゼ活性が低下します。使用方法以上に継代された細胞では、本来の性能を発揮しませんのでご注意ください。

また、既発売品である「POCA Hand-1 EST」(心筋分化毒性評価用キット) と組み合わせることで、発達毒性の予測感度が向上します 1)。

1) Toxicological Sciences, 159(1), 2017, 238–250 Kobayashi et al.

【製品内容】

- POCA Reln-ES 細胞（液体窒素保存） ・ ・ ・ ・ 1 vial (1.5x10⁶cells)

【必要器材・試薬】

- ゼラチンコート済み 60 mm Dish（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 Reln-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。

60 mm の組織培養用 Dish に 0.1%ゼラチン溶液 3mL（SIGMA 社【カタログ番号】G2500 など）を添加し 37℃で 30 分以上インキュベート、ゼラチン溶液を吸引し、Reln-ES 細胞を播種します。

- サンプル希釈用プレート（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 96 well 深底（ディープ）プレート（容量 1~2 mL/well）
- セルストレーナー／マルチチャンネルピペット用リザーバー
- マイクロプレート用シール（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（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™（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®（指定メーカー：プロメガ【カタログ番号】E2510）

【必要器具&装置】

- 発光および蛍光測定用マイクロプレートリーダー
- 試薬分注用 V底 96 well 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）
- 8 ch 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（1~10μL、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

【操作手順】

1：未分化維持培地及び大脳分化用培地の準備

◆未分化維持培地 30 mL 調製の場合／4℃保存

試薬名	必要量	Cat No（メーカー）
StemMedium（マウス ES 細胞用）	30 mL	KSDSRK100 (KAC)
100 mM 2-ME 溶液	30 μL	
rmLIF（10 μg/mL）	60 μL	NIB 47080000(オリエンタル酵母)
G418 Disulfate Aqueous Solution（50 mg/mL）	60 μL	16513-84 (Nacalai)
注意点		
調製後は冷蔵保存し、1 ヶ月以内に使用する。100 mM 2-ME 溶液および mLIF は、溶解後は 4℃保存。 rmLIF と G418 溶液は使用直前に培地に添加する。 終濃度は G418 が 100 μg/mL、rmLIF が 20 ng/mL になるよう添加する。		

◆大脳分化用培地 100 mL 調製の場合/4℃保存

試薬名	必要量	Cat No (メーカー)
GMEM	86.9 mL	11710-035 (Invitrogen)
KSR	10 mL	10828028 (Invitrogen)
100 mM NEAA	1 mL	11140-050 (Invitrogen)
100 mM Sodium Pyruvate	1 mL	S8636 (SIGMA)
200 mM L-グルタミン酸	1 mL	G7513 (SIGMA)
100 mM 2-ME 溶液	100 μ L	
10 mM SB431542	10 μ L	
注意点		
調製後は冷蔵保存し、2週間以内に使用する。100 mM 2-ME 溶液および 10 mM SB 溶液は、溶解後は 4℃保存。		

◆100 mM 2-メルカプトエタノール溶液/-80℃保存

試薬名	必要量	Cat No (メーカー)
2-メルカプトエタノール(原液=14.3M)	70 μ L	指定なし
純水	10 mL	W3500 (SIGMA)
調製方法		
上記を混合し、0.22 μ m フィルターで滅菌する。0.5 mL ずつ分注し、-80℃保存。一度溶解した場合、冷蔵保存で1ヶ月以内に使用。		

◆rmLIF ストック溶液 (100 μ g/mL) /-20℃保存

試薬名	必要量	Cat No (メーカー)
Recombinant mouse LIF	20 μ g	NIB 47080000 (オリエンタル酵母)
PBS	200 μ L	生化学用
調製方法		
PBS で 100 μ g/mL に調製し、50 μ L ずつ分注し、-20℃保存。使用時に StemMedium で、1/10 希釈する (10 μ g/mL : 冷蔵保存)。培地に 2/1000 希釈して添加する。(例：培地 4 mL に対して 8 μ L 添加)		

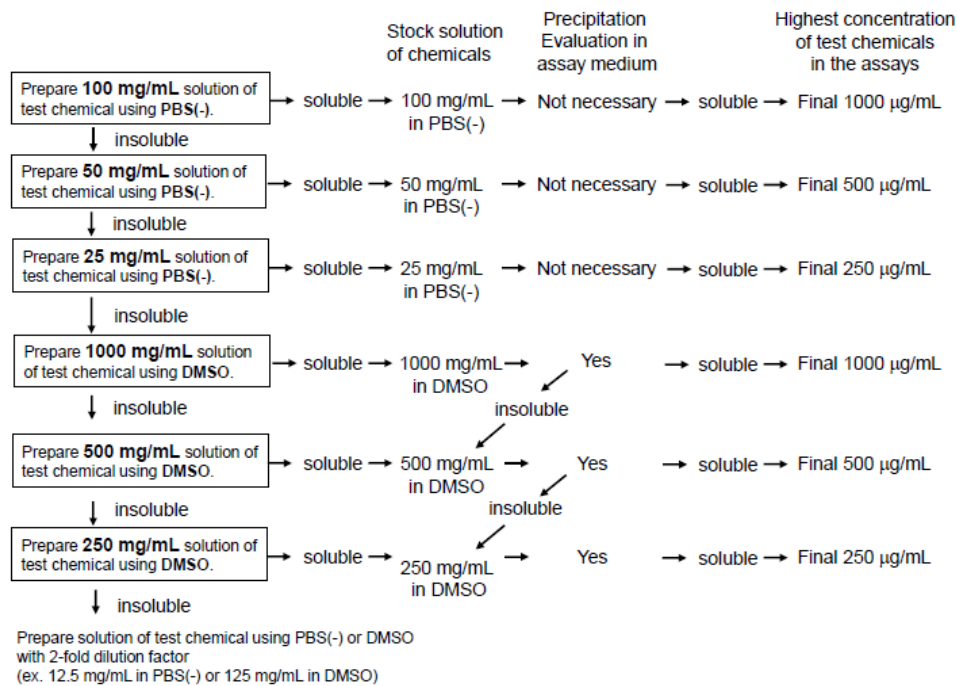
◆10 mM SB431542 溶液/-20℃保存

試薬名	必要量	Cat No (メーカー)
SB431542	5 mg	S4317 (SIGMA)
DMSO	1.30 mL	生化学用
調製方法		
上記を混合し、50~100 μ L ずつ分注し、-20℃保存。一度溶解した場合、冷蔵保存で1ヶ月以内に使用。		

2：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大脳分化培地中に対し 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。本細胞を用いる試験では、IC50 (50%細胞阻害濃度) と ID50 (50% Reln 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 μ g/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。

(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0.02 mg/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、0.0003 mg/mL)

3：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 µg/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 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										

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

② 陽性対照の準備

深底プレート（表2）の1A-1Hに「大脳分化培地」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に加える。

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「大脳分化培地」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。

<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「大脳分化培地」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。

※注意：大脳分化培地に溶液を分注時、マルチチャンネルピペットの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			} ← 980 μL or 998 μL の大脳分化培地									
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

4：ES細胞（ReIn-ES）の準備

- ① 「未分化維持培地」を15 mLの遠心管に9 mL入れて準備しておく。
- ② ReIn-ES細胞が入った凍結バイアルを37°Cのウォーターバスにて温浴解凍する。
- ③ あらかじめ準備した①に温浴解凍した②を添加する。
- ④ 遠心操作（900 rpm、5分間、室温）で分離後に上清を除去し、再度「未分化維持培地」5 mLを添加し懸濁する。
- ⑤ 細胞数を計測し、ゼラチンコート済み6 cmカルチャーディッシュ1枚あたり 0.5×10^6 個ずつReIn-ES細胞を播種し（2枚）、37°Cの5% CO₂で一晩インキュベートする。翌日「未分化維持培地」に培地交換する。その翌日（起眠後2日）、継代培養を実施する。

5：ReIn-ES細胞の継代（ES細胞の安定化）

- ① 4-⑤のDishの培養上清を除去し、5 mL PBS（-）で細胞をWashした後に0.25%トリプシン/1mMEDTA 1 mLをDish内に添加後、速やかに除去し、2分間、37°Cでインキュベートする。（顕微鏡で剥離具合を観察してください）
- ② 「未分化維持培地」2 mLを添加し、1000 μLピペットにて細胞をシングルセルになるよう良く分散した後、室温にて5分間900 rpmの回転速度により細胞を集める。

- ③ 新たな「未分化維持培養培地」2 mL 程度に細胞を分散し、血球計算盤で細胞数を計測する。
- ④ 2×10^6 個の細胞をゼラチンコート済みの 6 cm カルチャーディッシュ 1 枚に播種する（細胞数として、陽性対照の 5-FU を含む 5 化合物のアッセイが可能）。

6：アッセイするための試薬と細胞の準備（プレート 1 枚は陽性対照の 5-FU をご使用ください）

- ① 予め「大脳分化培地」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 96 well プレートの一番外側の well に PBS（-）を 200 μ L ずつ添加し（アッセイ well の乾燥を防ぐため）「大脳分化培地」160 μ L をプレート内 11B-11G に添加する。（表 3 参照）
- ② 5-④でインキュベートした細胞の培養上清を吸引し、5mL の PBS（-）で細胞を Wash した後に 0.25% トリプシン/1mM EDTA 1 mL を Dish 内に添加後、速やかに除去し、2分間、37°Cでインキュベートする。（顕微鏡で剥離具合を観察してください）
- ③ その後、Dish へ 2 mL の「大脳分化培地」を添加し、1,000 μ L ピペットにて細胞を懸濁させ、室温にて 5 分間 900 rpm の回転速度により細胞を集め、新しい「大脳分化培地」2mL に分散させ、40 μ m のセルストレーナー（BD Falcon™ など）に通して、細胞塊を除去し、シングルセルに分散する。細胞数を測定し「大脳分化培地」で、75,000 cells/mL にする。（※注：この際の細胞は 90 %以上の生存率のものを使用します）
その調製溶液を PrimeSurface®プレート内の 2B-10G に 6000 cells/80 μ L/well になるように添加する。
- ③ 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°C、5% CO₂）を実施する。
- ④ 2B-2G の各 well に 80 μ L の「大脳分化培地」を添加する。
- ⑤ 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 8 ch 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、「B-G」の縦方向へ 80 μ L/well を連続分注する。
- ⑥ プレートミキサーにて数秒攪拌し、播種後 144 時間（6 日間）*注 37°C 5% CO₂にて蓋をした状態でインキュベートする。
*注：③の播種後から 144 時間、培地交換なしでインキュベートしてください。

【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
 : 200 μ L of PBS（-）
 : 160 μ L 大脳分化培地

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

<最終 well 含有物>

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

7: 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)>

- ① 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。
- ② ①の Assay Buffer 1 mL 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 1 mL, GF-ASC 基質 10 µL)
*注1: 基質は遮光すること。
- ③ 培養プレートから、ゆっくりと 60 µL ずつ培地のみを抜き取る。(well の液量を 100 µL に調整するため)
- ④ 完全に溶解混合した②の溶液を各 well (2B-11G) に 10 µL ずつ添加する。(この時、②の溶液を V 底プレートの 6well に 160 µL/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)
- ⑤ 軽くピペッティングを行い、1 時間、37°C でインキュベートする (時間厳守)。プレートは遮光すること。
- ⑥ 蛍光マイクロプレートリーダー (EX: 380 - 400 nm, EM: 505 nm) で蛍光強度を測定する。

<Differentiation Assay (分化効率試験)>

(Cytotoxicity Assay (細胞毒性試験) に用いた同じプレートを使用する。)

- 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 (8 ch: 20~200 µL) にて①を 2B-11G へ 100 µL/well ずつ添加する。
- ③ プレートシールを貼り、プレートミキサーを使用して室温にて 30 分穏やかに攪拌する *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 プレートシールを貼ったまま、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。)

8: データ解析

判定式

$$\text{Score} = 1.112 \times \log(\text{IC50}/\text{ID50}) + 0.928 \times \log(\text{MD}/\text{IC50}) - 0.822$$

Score を逆ロジット変換して Probability を算出する。(陽性 Probability ≥ 0.41 、陰性 Probability < 0.41)

IC50 (µg/mL): 細胞毒性、ID50 (µg/mL): 分化毒性、MD (µg/mL): 最大溶解度

IC50 と ID50 は、Hand-1 EST 用解析ソフトを用いて算出することができます。

陽性対照である 5-FU の MD 値は「130 µg/mL」をご使用ください。

【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・エー・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: shiyaku-info@kacnet.co.jp