

取扱説明書

PXB マウス[®]から分離された新鮮ヒト肝細胞

PXB-cells[®]



もくじ

はじめに.....	3
PXB-cells の特徴.....	3
製品仕様.....	5
使用する機器・試薬.....	5
PXB-cells のお取り扱い.....	5
受領時の操作.....	6
培養操作.....	7
その他.....	7
FAQ.....	8

はじめに

PXB-cells をお買い上げいただき有難うございます。

PXB-cells を研究にご活用いただくため、本書をよく読み、正しくご使用ください。

なお、PXB-cells は研究目的以外には使用できません。

PXB-cells の特徴

PXB-cells®は、ヒト肝細胞キメラマウス（PXB マウス®）から、コラゲナーゼ灌流により回収したヒト新鮮肝細胞です。PXB マウスとは、cDNA-uPA/SCID マウス（肝障害免疫不全マウス）に、インフォームドコンセントが得られている凍結ヒト肝細胞を移植することにより作製した、肝臓の70%以上がヒト肝細胞で置換されたマウスです。移植後のヒト肝細胞はマウス体内で500～1000倍に増殖するため、同一ドナー由来のヒト肝細胞を大量に安定供給することが可能です。

PXB-cells のヒト肝細胞の純度は93%程度であり、プレートへの良好な接着性を示します。また、回収直後の新鮮細胞をご提供するため、凍結融解による障害がありません。

PXB-cells は、薬物代謝酵素であるCYPの活性、ヒトアルブミンの分泌といった機能を、少なくとも培養21日までヒト肝細胞と同等のレベルで、形態の変化なく長期間維持することが確認されております。

これらの特徴から、薬物代謝や毒性評価など、様々な肝機能を標的とした試験にご使用いただくことが可能です。

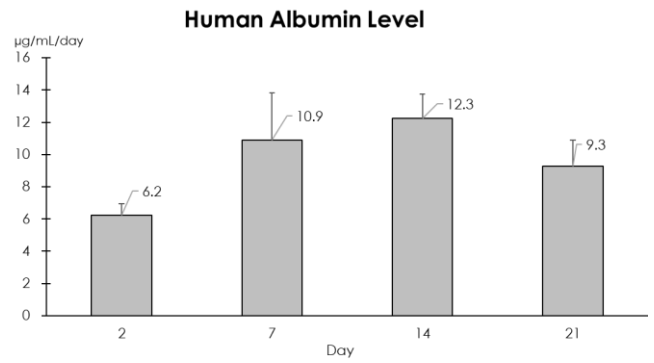
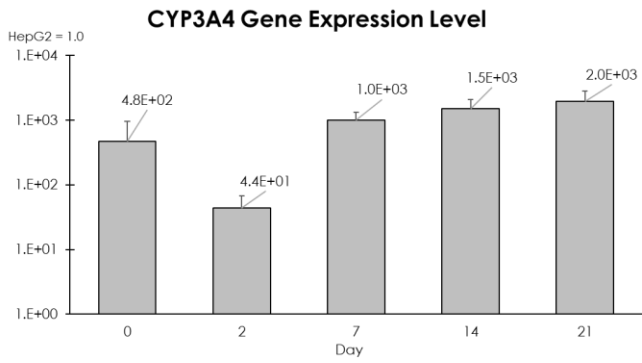
また、HBVへの持続感染能も有しており、抗ウイルス薬剤の評価などにご使用いただくことも可能です。(Ishida et. al. 2015)

コラゲナーゼ灌流とは：

肝臓の結合組織をコラゲナーゼで分解し、肝実質細胞を回収します。播種直前の細胞生存率は80%以上です。

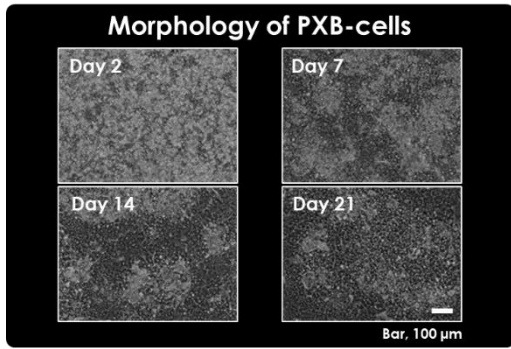
参考文献：

Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Fujikawa K, Watashi K, Abe H, Wakita T, Hayes CN, Chayama K, Tateno C. Novel robust in vitro hepatitis B virus infection model using fresh human hepatocytes isolated from humanized mice. *Am J Pathol.* 2015 May;185(5):1275-85.

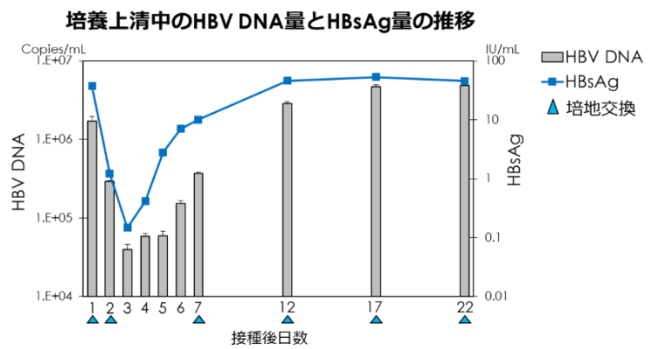


CYP3A4 遺伝子発現推移

ヒトアルブミン分泌量推移



細胞形態



HBV 感染試験

・これらの試験には PXB-cells 培養用培地を使用しております。

製品仕様

PXB-cells (新鮮ヒト肝細胞)

各培養器への播種条件は以下の表をご参照ください。

播種密度は、すべての培養器において、 2.1×10^5 cells/cm² となります。

プレート

Type	播種プレートの製品番号	細胞数 ($\times 10^5$ cells/well)	推奨培地量 (μ L/well)
12-well	356500	8.0	1000
24-well	356408	4.0	500
48-well	356505	1.6	200
96-well	356407	0.7	85
96-well (B/C)	655956	0.7	89
384-well	356666	0.2	27
384-well (B/C)	781956	0.2	27

フラスコ

Type	播種フラスコの製品番号	細胞数 ($\times 10^6$ cells/flask)	推奨培地量 (mL/flask)
T-25-flask	356484	5.3	6.6
T-75-flask	356485	16.0	20.0

- ・各プレート/フラスコには BioCoat™ Collagen I clear plate/vented flask (Corning) を使用しています。
- ・B/C タイプのプレートには μ CLEAR® BLACK CELLCOAT® Collagen I (Greiner) を使用しています。

使用する機器・試薬

<機器>

CO₂ インキュベーター (庫内条件を 5%CO₂, 37°C に設定ください)

<試薬>

PXB-cells 培養用培地 (Cat No. : PPC-M100, PPC-M200) または、各種肝細胞培養用培地など

- ・PXB-cells 培養用培地組成については Application Note 1 をご参照ください。

PXB-cells のお取り扱い

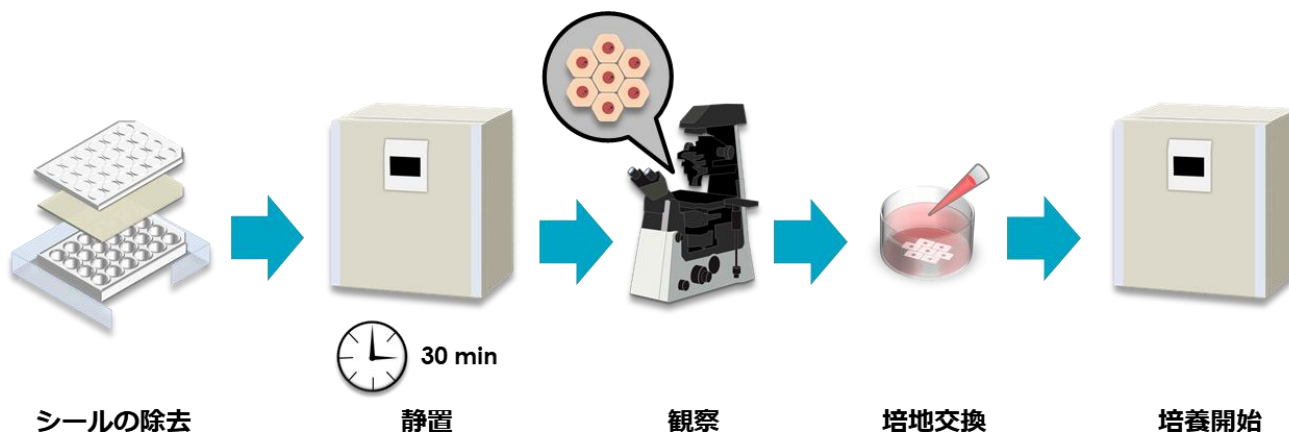
PXB-cells をお受け取りいただいた後の主要な操作には以下の 2 項目が含まれます。

- ・受領時の操作
- ・培養操作

以上の操作は、いずれもクリーンベンチなどの清浄度が確保された場所でお取り扱いいただくようお願いいたします。

受領時の操作

1. 培地漏出防止用のプラスチックパラフィンフィルムおよびシリコンシートを除去します。
2. CO₂ インキュベーター内で約 30 分静置します。
3. 細胞状態を顕微鏡にて確認します。
4. 輸送用の培地を全量除去し、適量の PXB-cells 培養用培地または、各種肝細胞培養用培地などを添加します。
5. CO₂ インキュベーターで培養します。



- ・日本国内では通常当社からの発送翌日に受領いただけます。まれに輸送に2日かかる場合がございますが、PXB-cellsの機能に影響はございません。
- ・受領時に培地が少量漏れていた場合においても、細胞が乾燥していなければご使用いただくことが可能です。
- ・受領時の PXB-cells の状態が悪い場合（剥離等の異常が観察された場合）、顕微鏡写真を撮影していただいたうえで、当社までお問い合わせ下さい。当社では品質チェックのため、製品と同じロットの細胞を維持しておりますので、その細胞の状態を踏まえて対応いたします。
- ・PXB-cells 培養用培地または各種肝細胞培養用培地は、添加前に 37°C に加温することを推奨いたします。

培養操作

1. PXB-cells 培養用培地または、各種肝細胞培養用培地などを 37°C に加温します。
2. CO₂ インキュベーターからプレートまたはフラスコを取り出します。
3. 古い培養上清を回収または廃棄し、推奨培地量の PXB-cells 培養用培地または、各種肝細胞培養用培地などに交換します。
4. CO₂ インキュベーターで培養します。
5. 試験にご使用するまで、3~5 日間に 1 回の頻度で培地交換（手順 2~4）を繰り返します。

- 培地を冷蔵温度（2~8°C）で細胞に直接添加すると、細胞状態を悪化させる恐れがあります。添加前に 37°C に加温することを推奨いたします。
- 維持培養時の培地液量は推奨培地量を厳守ください。
- PXB-cells 到着時には、死細胞や脂肪滴が多数観察される事がありますが、通常は 1~2 週間培養することで除去されます。
- 長期培養の場合は、細胞の状態をみて 3~4 日までを目途に培地交換を推奨いたします。
- 培地交換にあたり、アスピレーターなどを使用した急激な培地の除去、または細胞面への培地の直接添加により、細胞シートが剥離する場合があります。マイクロピペットを使用し、緩やかな培地除去、ウェル壁面からの穏やかな培地添加を推奨いたします。
- 3~4 週間は安定的に維持培養する事が可能です。

その他

1. 培養上清中ヒトアルブミン量

培養上清中のヒトアルブミン量の変動は、細胞ヘルスの一つの指標となります。
細胞の状態変化はヒトアルブミン量の低下を示す事があります。

2. 核酸およびタンパク質抽出

核酸およびタンパク質を抽出される場合、細胞を Trypsin-EDTA などプレートから剥がした後に抽出試薬で処理を行うと、収量が著しく悪くなる場合があります。ウェルに抽出試薬を直接添加した後に処理を行う事を推奨いたします。

FAQ

- Q. 培地は何を使用すればよろしいですか？
A. 当社では本書 5 ページの培地を推奨しています。組成につきましては *Application Note 1* をご参照下さい。
- Q. 受領時に培地が漏れていました。
A. 細胞が乾燥していなければご使用いただくことが可能です。
- Q. 使用前に培地を加温する必要はありますか？
A. 培地を冷蔵温度（2～8℃）で細胞に直接添加すると、細胞状態を悪化させる恐れがあります。使用する量を分注後に 37℃ に加温することを推奨いたします。
- Q. 培地の推奨添加量はありますか？
A. 本書 5 ページをご参照ください。
- Q. 培地の推奨交換頻度はありますか？
A. 3～5 日間に 1 回の頻度を推奨いたします。
長期培養の場合は、細胞の状態をみて 3～4 日までを目途に培地交換ください。
- Q. どのくらいの期間、維持培養することが出来ますか？
A. 3～4 週間は安定的に維持培養する事が可能です。
- Q. 各プレートの 1well あたりの播種細胞数は？
A. 本書 5 ページをご参照ください。
- Q. PXB-cells をプレートから剥がして播種し直す事は可能ですか？
A. Trypsin-EDTA などを用いてプレートから細胞を回収し、別のプレートに播種する事は可能です。但し、培養期間によって、Trypsin-EDTA の処理条件をご検討頂く必要が有ります。また細胞の回収率は 50%以下となるためご注意下さい。T-75 フラスコから播種し直す具体的な手順につきまして、*Application Note 2* をご参照ください。
- Q. ヒトアルブミンの測定方法は？
A. 当社では「LZ テスト'栄研' U-ALB」を使用して、ヒトアルブミン値を測定しています。測定原理はラテックヌ凝集免疫比濁法（測定：カイネティックス法）です。
- Q. PXB-cells から RNA 抽出や DNA 抽出を行う上で注意点はありますか？
A. RNA や DNA を抽出する場合は、Trypsin-EDTA など細胞を剥がしてから抽出試薬で処理するのではなく、直接 well に抽出試薬を添加する事をお勧めしております。
- Q. 受け取った細胞の状態が悪い場合はどうすればよいですか？
A. 受領時に撮影した顕微鏡写真と併せて、当社までご連絡下さい。当社で培養している同 lot の品質チェック用の細胞の状態を踏まえて対応させていただきます。
- Q. HBV 感染源を接種する条件は？
A. HBV 感染試験手順の手順につきまして、*Application Note 3* をご参照ください。

Q. 培地交換の際に気を付けることはありますか？

A. アスピレーターなどを使用した急激な培地の除去、または細胞面への培地の直接添加により、細胞シートが剥離する場合があります。マイクロピペットを使用し、緩やかな培地除去、ウェル壁面からの穏やかな培地添加を推奨いたします。

ご不明な点がございましたら、当社までお問い合わせください。

お問い合わせ先

株式会社フェニックスバイオ

本社：広島県東広島市鏡山 3 丁目 4 番 1 号

TEL：082-431-0016 FAX：082-431-0017

E-mail：pxb-cells@phoenixbio.co.jp

<https://phoenixbio.co.jp>