

Point Of Cell Assay

ヒト小腸吸収評価キット

POCA[®] 小腸吸収 (CACO-2)

※ POCA とは Point Of Cell Assay のアルファベット頭文字から作った
弊社のオリジナル用語で必要な時に誰もが簡単にアッセイ出来る
Ready to use のキットです。

POCA[®] 小腸吸収 (CACO-2)

<製品概要>

CACO-2 細胞を Transwell プレートのインサート側に播種した状態でお届けする 小腸吸収評価用の細胞アッセイキットです。

【CACO-2】

上皮細胞様の形態をしており単層膜を形成し、小腸上皮モデルとして細胞透過性試験などに用いられている。

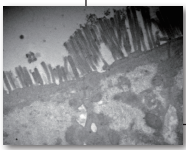
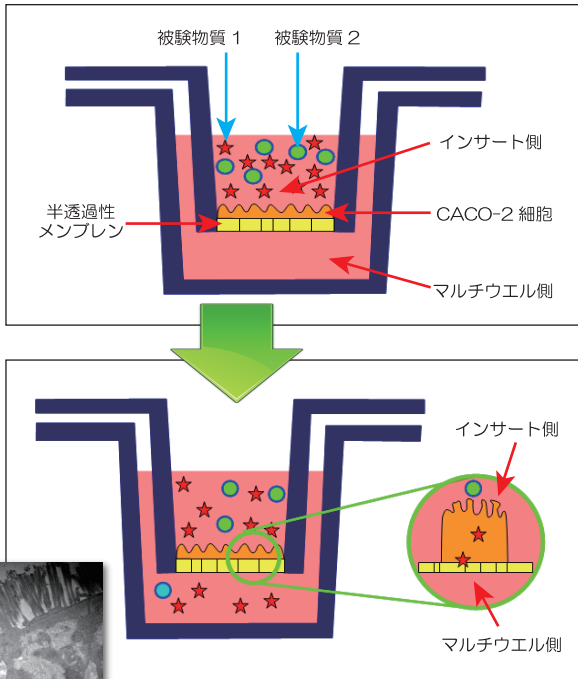
製品特長

- CACO-2 細胞に必要な煩雑な 21 日間の培養が不要
- キット毎に ECACC の CACO-2 細胞を使用しており一定の品質



本キットは『ECACC (European Collection of Cell Culture)』の標準株細胞 CACO-2 (カタログ番号: EC86010202-GO) を材料に作製しております。

<被験物質 吸収評価時のイメージ図>

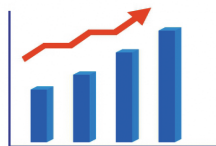


【食品開発メーカー】

2015年4月から始まった「機能性表示食品制度」による食品素材の科学的根拠作りに！

英国の公的細胞バンク (ECACC) の細胞を使用しているためスムーズな論文文化へ！

煩雑な CACO-2 細胞培養からの解放！



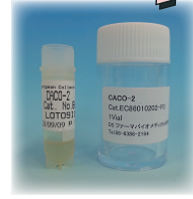
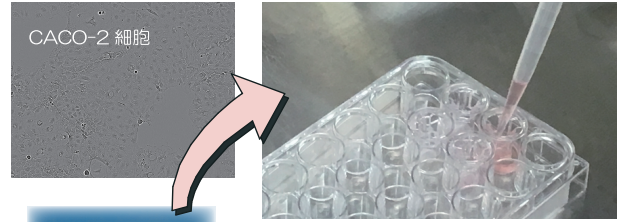
【医薬品開発メーカー】

P-gp、BCRP のトランスポーター発現と Lot 間差なしのデータ取得

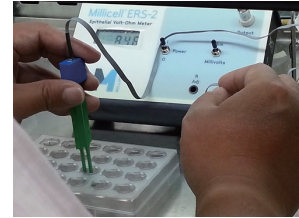
英国の公的細胞バンク (ECACC) の細胞を使用しているため、一定品質

👉 詳細データは次ページ参照

ECACCから輸入したオリジナルの CACO-2細胞を継代せずに直接トランスウエルプレートに播種



Transwell プレート 拡大写真



19日間培養後 膜抵抗値測定

【CACO-2 QC】

POCA 小腸吸収 (CACO-2)

- 細胞播種日:
- 培地交換日:
- 使用細胞: Caco-2 (ECACC カタログ No.EC86010202-F0 Lot.08B011 継代数: 44)
- 播種細胞数: 1.77×10^4 Cells/well

【Quality Control】

- 出荷前検査結果
- ・真菌: 陰性
- ・細菌: 陰性
- ・マイコプラズマ: 陰性
- ・膜抵抗値 [24well-1 回目測定]

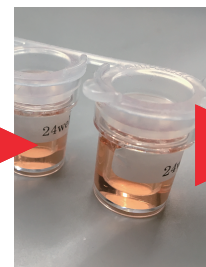
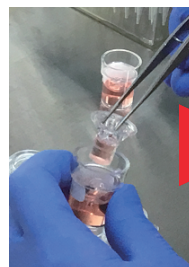
1520	1390	1650	1620	1720	1620
1530	1410	1590	1640	1730	1600
1420	1440	1450	1670	1630	1620
1440	1430	1460	1690	1580	1630

培養 19 日目に膜抵抗値が規格内 (1000Ω以上) であることを確認後、インサートカップを個別のコンテナ容器に入れ、発送しております。

1580	1690	1520	1600	1560	1760
1560	1690	1520	1620	1540	1740
1620	1620	1550	1660	1720	1590
1630	1630	1520	1640	1720	1580

【Procedure for Handling Cultured Caco-2】

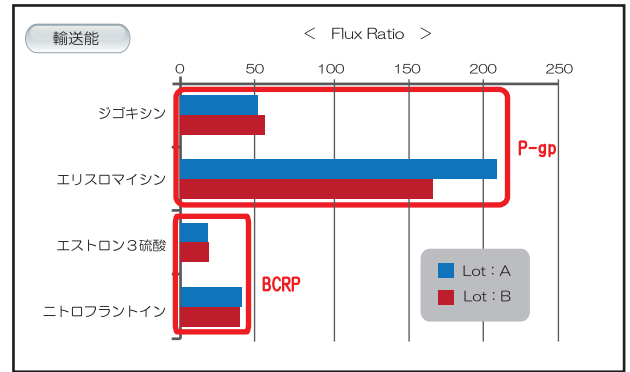
1. 入荷しましたら、箱からプレートを取り出し、アルコール綿で消毒してください。以下の操作は、無菌条件下で行なってください。
2. 蓋をシールしているテープを剥がしてください。
3. プレート内部のシールを剥がしてください。
4. 培地の漏れなどがありましたら、吸引にて除去してください。
5. 37℃、5%炭酸ガスインキュベーター内で静置のうえ、ご使用ください。



POCA 小腸吸収 (CACO-2) の細胞2ロットにおける2種トランスポーター『P-gp (MDR-1)』、『BCRP』の輸送能&ロット差確認試験結果

*4 体内のバリア組織に局在しており、糖、アミノ酸などの栄養物質やホルモンなどの生理活性物質を細胞外へ輸送(排出)するタンパク質である。
Flux Ratio (透過速度比: インサート側→外側、外側→インサート側) が2.0以上の場合、P-gp、BCRPの基質と判定され、排出型トランスポーターが機能しております。

	基質	Flux Ratio	
		細胞Lot : A	細胞Lot : B
P-gp	ジゴキシン	51.4	56.1
	エリスロマイシン	208.9	166.7
BCRP	エストロン3硫酸	22.7	23.5
	ニトロフラントイン	41.7	41.1



<考察>

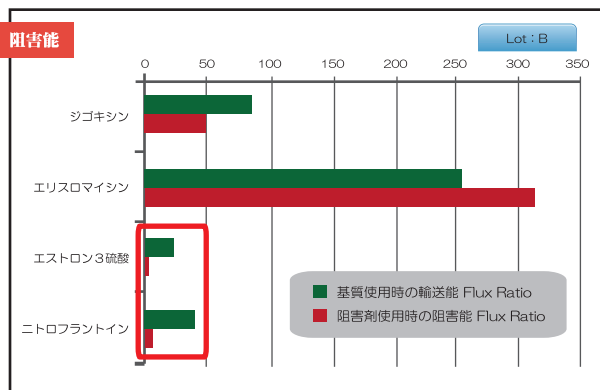
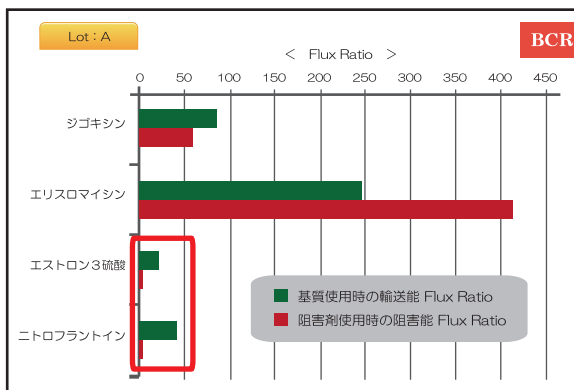
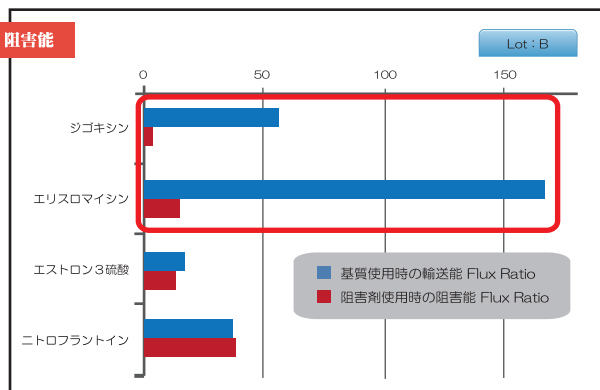
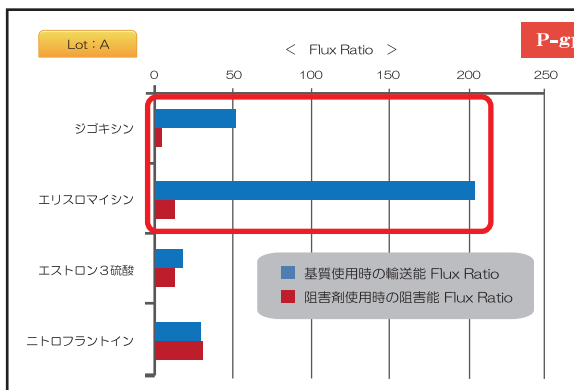
- P-gp、BCRPともにFlux Ratioは2以上あり発現していることを確認できた。
- 2ロットにおける大きなロット差も見受けられなかった。

POCA 小腸吸収 (CACO-2) の細胞2ロットにおける『P-gp (MDR-1)』、『BCRP』の阻害能&ロット差確認試験結果

阻害剤	基質	細胞Lot : A		細胞Lot : B		
		Flux Ratio	% of control	Flux Ratio	% of control	
P-gp	PSC833	ジゴキシン	51.4→3.6	7.0	56.1→3.7	6.6
		エリスロマイシン	208.9→13.3	6.4	166.7→15.2	9.1
		エストロン3硫酸	18.0→13.4	74.4	17.3→13.4	77.5
		ニトロフラントイン	29.4→3.1	105.4	37.2→38.2	102.7
BCRP	Ko134	ジゴキシン	85.8→59.4	69.2	86.5→50.4	58.3
		エリスロマイシン	246.8→414.3	167.9	255.5→313.2	122.6
		エストロン3硫酸	22.7→3.5	15.4	23.5→3.0	12.8
		ニトロフラントイン	41.7→5.4	12.9	41.1→6.2	15.1

<考察>

- P-gpの阻害剤(PSC833)に対する基質2種(ジゴキシン、エリスロマイシン)においてコントロールに対するFlux Ratioが50%以下、同じくBCRPの阻害剤(Ko134)に対する基質2種(エストロン3硫酸、ニトロフラントイン)においてコントロールに対するFlux Ratioが50%以下となり2種トランスポーターが発現機能していることが考察された。
- Lot : A、Lot : Bにおいて同じような反応を示しLot間差がないことがうかがえた。



【評価系の確認 (アッセイ前)】

細胞膜抵抗値の確認

膜透過評価前に膜抵抗値 (TEER) を測定し単層膜形成の確認を実施しております。

【評価系の確認 (アッセイ後)】

Lucifer Yellow (LY) の透過性確認

LYはCACO-2細胞膜を通過しない事が知られております。基質透過評価後にインサート内溶液をLYに交換し、60分間透過を行い、細胞間タイトジャンクション形成維持の確認を実施しております。

Q&A

Q フレートタイプやメンブレンのポアサイズを選択は可能ですか？またどのように使い分けますか？

A 基本的にプレートはCorning社の12、24well Transwellプレートの中から選択していただき、メンブレンのポアサイズの大きさにつきましても、0.4、3.0 μm から選択可能です。0.4 μm は細胞培養や共培養のアプリケーション、薬物輸送研究に利用されます。3.0 μm は、ケモタキシスや血管新生のアプリケーションに推奨されます。(Corning社カタログ情報)

Q 透過性試験用サンプルの前処理はどのようにしますか？

A 透過試験を実施する化合物や素材により異なりますが、DMSOなどの溶媒で溶解したサンプルを、DMSOの最終濃度が0.1%以下になるように HBSS-HEPES などのバッファーに溶解しております。

Q アッセイするためのプロトコールはお持ちですか？

A お客様によりアッセイ方法が様々なため、決まったプロトコールは持っていません。ただ一般的にご利用されておりますTransport Bufferと致しましてはHBSS(with Ca^{2+} 、 Mg^{2+})にHEPES (10mM)やグルコース(25mM)を添加させpHを7.4付近に調整したものに、サンプルを溶解させたPBSもしくはDMSO(0.1%以下)を添加溶解して透過試験を実施しております。
 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} は細胞間接着に影響がございますので、両イオンを含まないBufferを使用致しますと、バリア機能が弱くなります。トランスポーターの中にはpHの影響を受けるものもございますので、必要に応じてpHの調整をして下さい。(インサート内側pH6.4、インサート外側pH7.4など)

Q 経時的にアッセイするために、インサート内側・外側のバッファーの容量を規定量より多く入れたいのですが、可能ですか？

A 24wellのみ確認しております。24wellの規定量はインサート内側100 μL 、外側600 μL ですが、最大インサート内側が300 μL 、インサート外側が1,300 μL 入ります。ただインサート内側は漏れないギリギリの容量のため、内側は200 μL 、外側1,200 μL を推奨しております。

Q 製品が到着後、何日目位まで透過試験に使用可能ですか？

A A12:到着日を含め3日目位(例:6/1に到着した場合、6/3)までご利用可能ですが、3日目は膜抵抗値が低く機能を担保していない場合がございます。

Q 各ウエルプレートの中の1wellあたりのインサート側メンブレンの直径と表面積を教えてください。

A 24wellは6.5mmで0.33cm²、12wellは12mmで1.12cm²です。

Q 出荷時に添付しております膜抵抗値はいつ測定された時の値ですか？

A 膜抵抗値測定はメルク社(旧ミリポア社)のMillCellを使用しております。出荷前に培地中に直接電極を差し込み測定した後、新しい培地に交換し出荷しております。

Q 製品が到着後、培地を交換しインキュベーターに入れると説明書に記載ありますが、その培地中に血清や抗生物質も添加しますか？

A D-MEM(Low/Highグルコースタイプどちらでも可、グルタミン最終濃度2mM)に約10%濃度になるようにFBS(非働化済みFBSが望ましい)を添加し調製したもので培地交換します。抗生物質は、実験系により添加していただいても問題ございません。

Q キットの発送スケジュールは決まっていますか。

A ご注文いただいてから製造に入りますが、出荷スケジュールにつきましては弊社HPの「細胞.jp」(<http://www.saibou.jp/>)でご確認ください。

Q 製品はどのように送られてきますか？

A 12wellプレート、24wellプレートとも、インサートカットを下記画像のように別容器に入れた形で発送しております。冬場は蓄熱財とカイロを同梱し温めた状態で発送しております。

12well時



24well時



お手数ですが下記必要事項をご記入下さい。

弊社受注後、納期等についてご連絡させていただきます。

お申込日	年	月	日
送付先施設			
ご所属			
ご芳名	〒		
送付先住所			
送付先電話番号			

代理店様通信欄：お手数ですが下記必要事項ご記入の上弊社までお送りください。

代理店名	
電話番号	
FAX番号	
ご担当者名	
注文番号	必要時ご記入下さい
特記事項	

※ご注文のプレートタイプに○印をご記入下さい。

プレートタイプ	24wellプレート				12wellプレート				細胞メンテナンス用培地*2
メンブレンPoreサイズ(μm) *1	0.4 *1	3 *1	3 *1	3 *1	0.4 *1	3 *1	3 *1	3 *1	
品名	POCA 小腸吸収 (CACO-2)								
プレート枚数	1	2	3	4	1	2	3	4	220mL×1*2
カタログ番号	DSPOCA 101-2404	DSPOCA 102-2404	DSPOCA 103-2404	DSPOCA 104-2404	DSPOCA 101-2430	DSPOCA 102-2430	DSPOCA 103-2430	DSPOCA 104-2430	DSPOCA 004-1230
価格	178,000	238,000	290,000	340,000	178,000	238,000	290,000	340,000	168,000
ご希望のプレートタイプに○									

*1 小さなPoreサイズ(0.4μm)は細胞培養や共培養のアプリケーション、薬物送達研究に利用されます。大きなPoreサイズ(3.0μm)は、ケモキシスや血管新生のアプリケーションに推奨されます。(Corning社掲載カタログ情報)
*2 <参考資料>1回培地交換時の容量:【12wellプレート】25mL/プレート【24wellプレート】20mL/プレート

弊社取り扱いの製品は、研究用として販売しております。商業利用等の研究目的以外での使用はできませんのでご注意ください。
ご購入いただきましたお客様情報は、ご質問などへの回答およびタイムリーなメール等による各種関連製品情報の提供、市場調査等に使用させていただきます。
弊社の個人情報保護に関しましては、<https://www.kacnet.co.jp/privacy/>にてご確認ください。

●掲載の商品は、全て研究用です。人や動物の医療用・臨床診断用等には使用しないでください。●掲載の希望価格は、2024年8月1日現在の価格(全て税別)です。予告なしに改定される場合がありますので、ご注文の際にご確認ください。

株式会社ケー・エー・シー
試薬事業部

(お問い合わせ窓口)

TEL: 06-6435-9747 FAX: 06-6435-9748

URL: <http://www.kacnet.co.jp/>E-mail: shiyaku-info@kacnet.co.jp

〒661-0978 兵庫県尼崎市久々知西町2丁目1-20