

薬物脳内移行性検定 : BBB Kit™ (RBT-24H, MBT-24H)

(Ver. 1.0)

脳内移行性検定は BBB キット™ のインサート内側 (血管腔側) に化合物を入れ、一定時間内に内皮細胞及びペリサイトの層を通過し、プレートのウェル内 (脳実質側) に漏れ出てきた化合物濃度を測定します。

測定した化合物濃度より透過係数 (P_{app} , P_e) を算出し、脳内移行性を判定します。



1. 必要な器具・試薬

•TEER 測定に必要な器具・試薬

BBB Kit™ のTEER 測定プロトコールにてご確認ください。

•TEER > 150 $\Omega \times \text{cm}^2$ に達したBBB Kit™ (RBT-24H, MBT-24H)

•マイクロピペットと滅菌済みチップ (1000 μL , 200 μL) ※

•先曲がりピンセット (滅菌済み、もしくは使用直前に先端を炙って使用) ※

•24 ウェルプレート (#PIMW S24 50, Millipore) x 2 ※

•アッセイバッファー (DPBS-H): 10xD-PBS(Ca+/Mg+), 1M HEPES, D-glucose ※

•ストップウォッチ ※

•37°C設定のインキュベーターおよびオービタルシェーカー (100 rpm) ※

※ キットに添付されておりません。

2. まとめ

解凍した BBB Kit™ のTEERが **150 $\Omega \times \text{cm}^2$** 以上に達していることを確認する

→ アッセイバッファー、被検物質、ウォッシュプレート、アッセイプレートを準備する

→ 薬物脳内移行性検定

→ プレートウェル内 (脳側) バッファー中の被検物質濃度を測定する

→ 透過係数 (P_{app}) を算出する

注意事項:

TEER 測定について:

TEER ($\Omega \times \text{cm}^2$) = (電気抵抗計に表示される抵抗値 - ブランクインサートの抵抗値) $\times$ 0.33

ブランクインサートの値は、ブランクインサート内にDMEMを300 μL 添加して測定します。

薬物脳内移行性検定には、TEERが **150 $\Omega \times \text{cm}^2$ 以上に達したウェルのみをご使用ください。**

薬物脳内移行性検定について:

• 被検物質がDMSO等に懸濁されている場合、検定時のDMSO添加濃度が0.5 %以下となるようにしてください。

• 被検物質は細胞障害性が出ない程度の濃度で添加してください。

細胞障害性が不明な場合は、1 μM を添加濃度の目安としてください。

• より正確な透過係数算出のために、被検物質添加後はシェーカー上で脳側液面がゆるやかに動く程度に攪拌しながらインキュベーションを行ってください。

※本製品は研究用試薬です。人、動物への医療・臨床診断には使用しないようご注意ください。

3. BBB Kit™のTEER測定

薬物脳内移行性検定を実施する前にBBB Kit™のTEERを測定し、**150 $\Omega \times \text{cm}^2$** 以上に達していることを確認してください。測定方法の詳細はTEER測定プロトコールにてご確認ください。

4. アッセイバッファー (DPBS-H), 被検物質, ウォッシュ & アッセイプレートの準備

1. アッセイバッファー (DPBS-H)の調製;

10 x Dulbecco's PBS (Ca+/Mg+)	10 mL
1M HEPES	1 mL
D-glucose	0.45 g
distilled water	89 mL
total	100 mL

2. 被検物質をアッセイバッファーにて適当な添加濃度に希釈し、37℃に加温します。

3. 900 μL のアッセイバッファーをウォッシュプレート、アッセイプレートの各12ウェルに添加し、37℃に加温します。



ウォッシュプレート

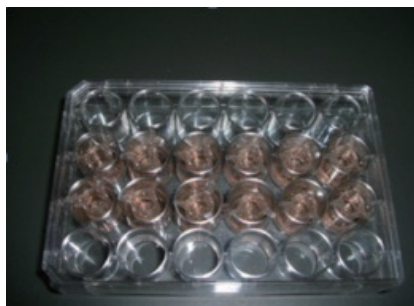
←→
900 μL のアッセイバッファー
を赤枠の12ウェルに添加する



アッセイプレート

5. 薬物脳内移行性検定

1. ピンセットを用いてBBB Kit™ からインサートを **ウォッシュプレート** のアッセイバッファーが添加されたウェルに移します。



BBB Kit™ (TEER > 150 $\Omega \times \text{cm}^2$)

→
インサートをウォッシュ
プレートへ移す

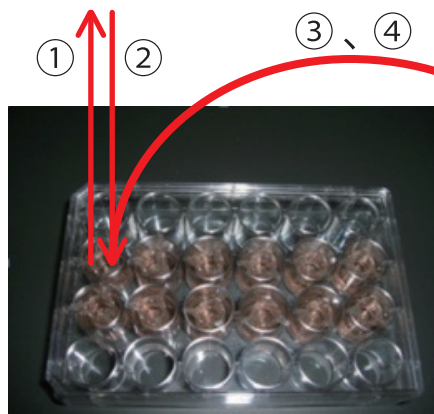


ウォッシュプレート

2. 1インサート毎に操作

- ① ピンセットでインサートをピックアップしてインサート内部の培養液を吸引除去し、ウォッシュプレートに戻す。
- ② アッセイバッファーで希釈された被検物質 (37℃) をインサート内部に200 μL 添加する。
注意: インサート内部はアッセイバッファーで洗浄しないでください。
- ③ 被検物質を添加したインサートを直ちにアッセイプレートへ移します。アッセイプレートに入れた瞬間にストップウォッチでカウントアップを開始し、各インサートをアッセイプレートに移した時間を記録していきます。
- ④ ①～③を検定に用いる全てのインサートで行います。
- ⑤ 37℃インキュベーター内で、シェーカーで振とうしながら～30分間インキュベートします。

※本製品は研究用試薬です。人、動物への医療・臨床診断には使用しないようご注意ください。



ウォッシュプレート



アッセイプレート



ストップウォッチ

3. ストップウォッチを確認しながら、各インサートのアッセイ時間がそれぞれ同じ時間となるようにインサートをアッセイ用のウェルから上下の空ウェルへ移します。全てのウェルのアッセイが終了したら、脳側のアッセイバッファーを回収し、濃度測定を行います。バッファー回収の際は、**必ず各ウェル10回以上ピペッティングを行い、ウェル内でよく攪拌してから回収してください**。攪拌が不十分な場合、バラつきが生じやすくなります。

4. 被検物質濃度を**それぞれの物質に特異的な方法で定量**し、透過係数 (Papp) を算出します。
※ 透過係数 (Papp) 算出用のExcelファイルをファーマコセルWEBサイトに提供しておりますのでご利用ください。

6. 注意事項

1. 薬物脳内移行性検定には、BBB Kit™ で採用しているMillipore社製プレート (#PIMW S24 50)の利用をお勧めいたします。

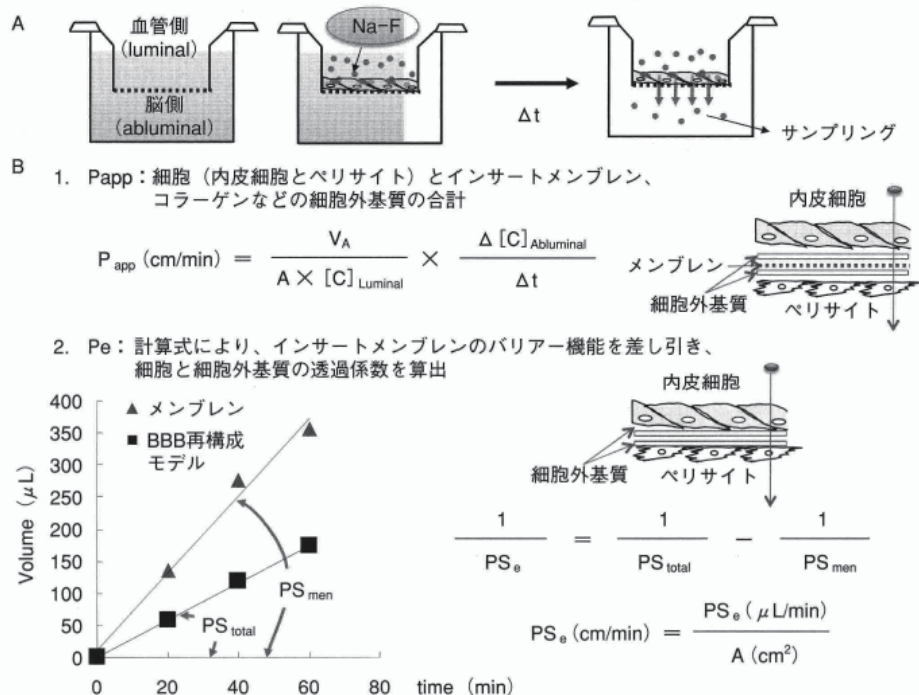
2. 他社製プレートをご利用の際は、検定時の液量が異なります。下の表を参照ください。

3. 検定時間:
検定時間を長くすると、脳側に漏れ出てくる化合物量も多くなり、検出感度が低い化合物の濃度測定が容易になります。しかしながら時間の経過と共に BBB キットのバリアー機能(タイトジャンクション機能)も低下し、細胞間隙輸送が亢進します。結果として、正確な判定が出来なくなる恐れがありますので、**30分以内の検定**をお勧めいたします。

	Blood-side Volume (μL)	Brain-side Volume (μL)
Millipore Plates greiner Plates	100	600
	200*	900*
	300**	1,200**
Corning Plates	100	1,000
	200	1,300
	300	1,600
BD Plates	100	1,000
	200	1,300
	300	1,600

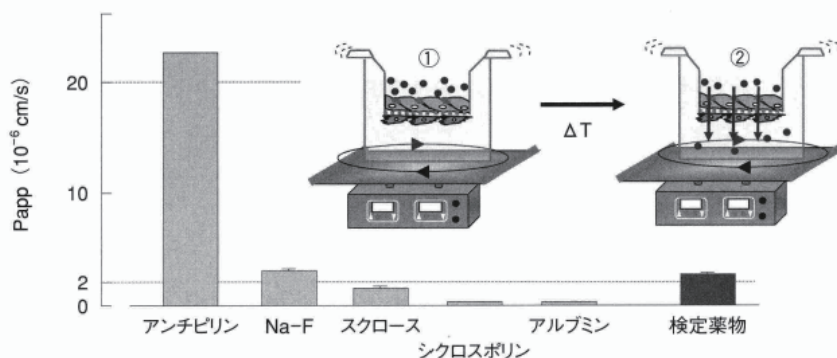
*脳内薬物移行性検定実施時の推奨液量 **BBB Kit培養時の推奨液量

※本製品は研究用試薬です。人、動物への医療・臨床診断には使用しないようご注意ください。



BBB モデルを用いた BBB (TJ) 細胞間隙輸送の評価

A: 血管側に Sodium fluorescein (Na-F) を添加し、一定時間 (Δt, 15 分など) 37℃ でインキュベートし、脳側に漏れ出てきた Na-F 濃度を測定する。添加した濃度と脳側に漏れ出てきた濃度から透過係数 (Pe, Papp) を算出する。B: BBB 透過係数 (Pe, Papp) 算出の概念。Papp は膜も含めた内皮細胞とペリサイトを通過して脳内に移行する化合物の透過指数であり (B1), Pe は膜の影響を除いた透過指数である (B2)。Pe の算出にはインサート膜のみの透過係数を算出する必要があるために、コントロールとして細胞を播種していないブランク実験が必要である。



	Papp ($\times 10^{-6}$ cm/s)	透過性	脳移行性	薬物
BBB 透過性 ↑	>20	very good	受動拡散などで容易に脳内に移行する	アンチピリン
	10~20	good	脳内に移行する	
	2~10	low	ごくわずかに脳内に移行する	ナトリウム蛍光色素 (Na-F) 検定薬物
	<2	very low	脳内にほとんど移行しない	アルブミン スクロース シクロスポリン

薬物 BBB 透過係数

既存の薬物や化合物の BBB モデル (BBB キット™) で得られた Papp と Pe 値がデータ化されており、検定薬物の脳移行性を数値として定量的に評価できる。薬物や化合物を化学的に装飾するか、種々のペクターなどに結合させて BBB 透過性の変化を検定する場合も Papp あるいは Pe の変化として定量的に評価できる。

※本製品は研究用試薬です。人、動物への医療・臨床診断には使用しないようご注意ください。