

表 2 抗エストロゲン活性評価試験の質を保証する対照区の解析結果

	1 nM E2 の RTA (%)	25 pM E2 の Fold-induction	1 μ M OHT の RTA (%)	100 μ M Dig. の RTA (%)
n-1	143.3	8.3	6.7	-11.3
n-2	159.4	11.9	6.0	-7.5
n-3	134.1	6.3	-2.7	-17.7
n-4	105.9	9.7	9.4	-10.3
n-5	142.6	6.5	-2.1	-16.5
n-6	101.8	9.9	2.2	-9.8
n-7	138.5	11.2	8.0	-8.4
n-8*	(80.7)	(6.0)	(-4.1)	(-18.9)
n-9	143.1	6.9	3.1	-15.6
n-10	144.4	8.1	5.9	-12.6
AVG	134.8	8.8	4.1	-12.2
SD	18.8	2.0	4.3	3.6
3SD	56.5	6.1	12.8	10.9
CV (%)	14.0	23.1	105.0	-29.9
AVG-3SD	78.3	2.7	-8.7	-23.1
AVG+3SD	191.3	14.9	16.9	-1.3

*:QC クライテリアを満たさなかったため、AVG、SD、CV の算出において解析データから除外

():AVG、SD、CV の算出において解析から除外したデータ

表 3 各プレートの品質管理をする基準値

項目	基準値
25 pM E2 の Fold-induction	>6
RTA of 1 nM E2	> 100%
RTA of 1 μ M OHT	< 16.9%
RTA of 100 μ M Dig.	< 0%

表 4 10 回繰返し測定における lin.IC30、lin.IC50 及び var.IC50

n	OHT		ICI		TAM		RAL	
	lin.IC30	lin.IC50	lin.IC30	lin.IC50	lin.IC30	lin.IC50	lin.IC30	lin.IC50
1*	(-9.42)	(-9.18)	(-9.84)	(-9.54)	(-7.35)	(-6.88)	(-12.10)	(-9.90)
2	-9.00	-8.60	-9.59	-9.32	-7.24	-6.78	-9.65	-9.42
3	-9.50	-9.26	-9.91	-9.62	-7.57	-7.10	-9.97	-9.68
4	-9.48	-9.24	-9.84	-9.54	-7.52	-7.13	-9.92	-9.64
5	-9.36	-9.10	-9.69	-9.41	-7.37	-6.94	-9.75	-9.52
6	-9.44	-9.24	-9.95	-9.64	-7.64	-7.17	-10.53	-9.84
7	-9.21	-8.90	-9.73	-9.40	-7.27	-6.78	-9.71	-9.46
8*	(-9.51)	(-9.30)	(-10.05)	(-9.71)	(-7.57)	(-7.13)	(-10.35)	(-9.86)
9	-9.39	-9.17	-9.89	-9.61	-7.51	-7.13	-9.81	-9.55
10	-9.11	-8.76	-9.59	-9.30	-7.33	-6.88	-9.59	-9.38
AVG	-9.31	-9.03	-9.77	-9.48	-7.43	-6.99	-9.87	-9.56
SD	0.18	0.25	0.14	0.14	0.15	0.16	0.30	0.15
3SD	0.55	0.75	0.43	0.42	0.44	0.49	0.89	0.46
CV/%	-1.98	-2.78	-1.47	-1.46	-1.99	-2.34	-3.01	-1.60
AVG-3SD	-9.86	-9.79	-10.20	-9.90	-7.88	-7.48	-10.76	-10.02
AVG+3SD	-8.76	-8.28	-9.34	-9.06	-6.99	-6.50	-8.97	-9.10
							var.IC50	var.IC50
							(-7.00)	(-9.76)
							-6.94	-9.33
							-6.96	-9.56
							-7.01	-9.58
							-6.98	-9.46
							-6.99	-9.66
							-6.82	-9.14
							(-6.99)	(-9.78)
							-7.03	-9.47
							-7.01	-9.12
							-6.97	-9.42
							0.07	0.20
							0.20	0.60
							-0.95	-2.14
							-7.17	-10.02
							-6.77	-8.81

*1:2 点の lin.IC30 が算出されたため、AVG、SD、CV の算出において解析データから除外

*2:QC クライテリアを満たさなかったため、AVG、SD、CV の算出において解析データから除外

():AVG、SD、CV の算出において解析から除外したデータ

表 5 試験性能基準値

	log [lin.IC30]	log [lin.IC50]	log [var.IC50]
OHT	-9.86 ~ -8.76	-9.79 ~ -8.28	-9.15 ~ -8.94
ICI	-10.20 ~ -9.34	-9.90 ~ -9.06	-9.83 ~ -8.95
TAM	-7.88 ~ -6.99	-7.48 ~ -6.50	-7.17 ~ -6.77
RAL	-10.76 ~ -8.97	-10.02 ~ -9.10	-10.02 ~ -8.81

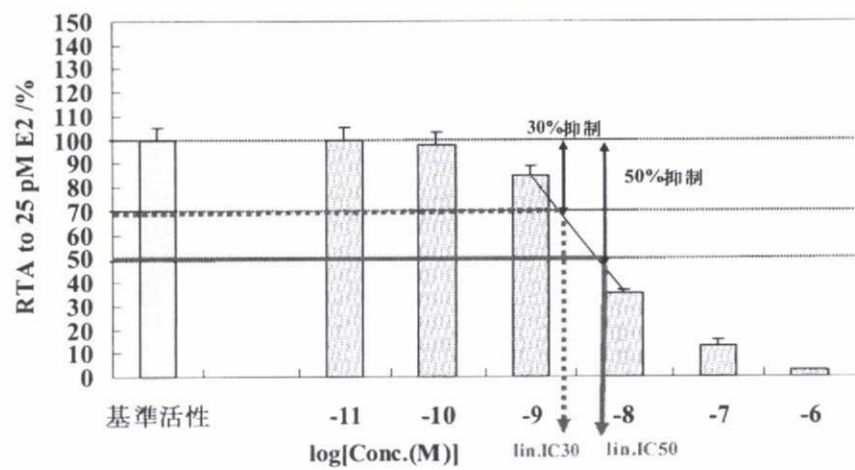


図 1 2点間の直線回帰による lin.IC30 及び lin.IC50 算出法模式図

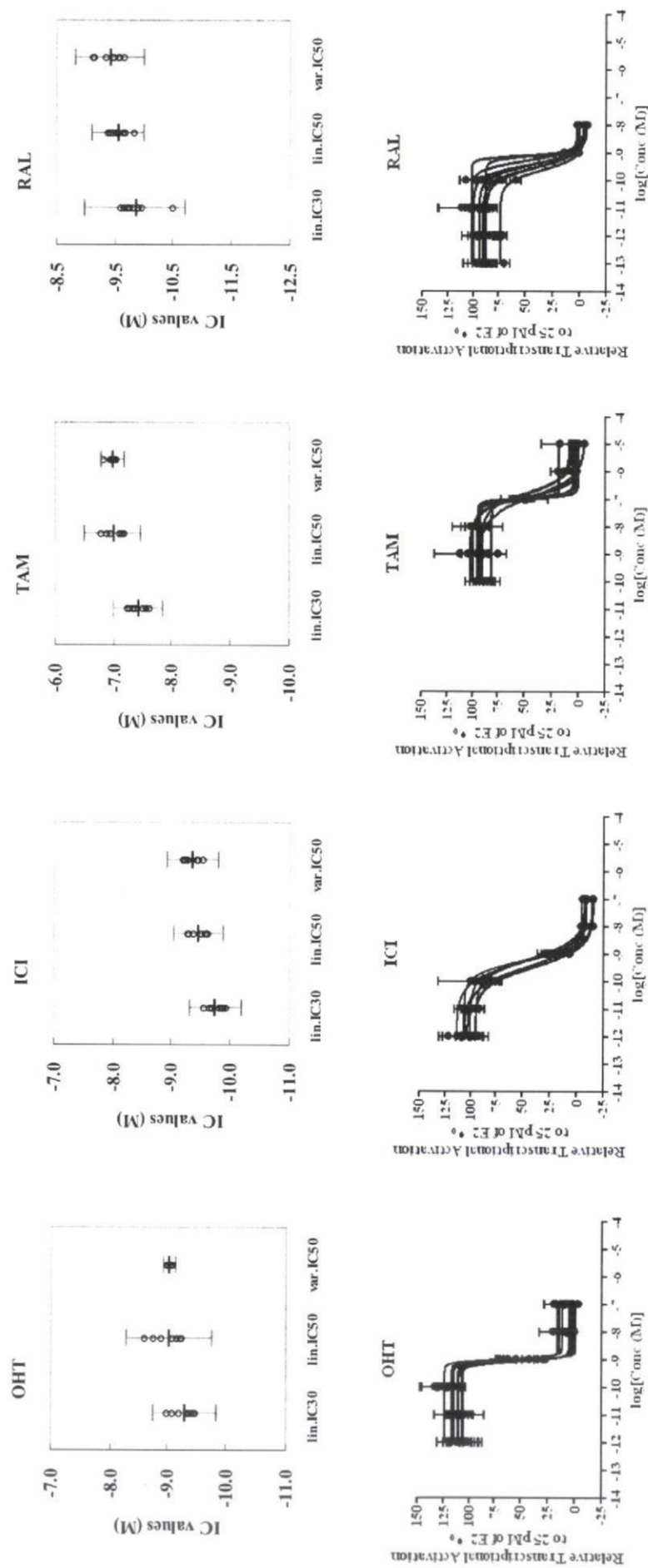


図 2 OHT、ICI、TAM 及び RAL の IC 値のばらつき及び用量反応曲

研究報告書

内分泌かく乱物質スクリーニング

Lumi-cell ER アッセイのバリデーション (Phase I)

分担研究者 中村 昌文
(株式会社 日吉 技術部分析研究課)

研究報告書

研究テーマ

内分泌かく乱物質スクリーニング Lumi-cell ER アッセイの バリデーション (Phase I)

分担研究者 中村 昌文 株式会社 日吉 技術部分析研究課

1. 緒言

株式会社日吉では、NICEATM、ECVAM、そしてJaCVAMによって設計されたアゴニスト及びアンタゴニスト検出のためのLUMI-CELL® ER アッセイのマルチフェーズ国際バリデーションスタディーのPhase Iを行いました。Phase Iでは共通のプロトコールによる標準物質及びコントロール物質を用いた様々な独立した実験によりLUMI-CELL® ER アッセイの能力を実証し、ビスフェノールAの細胞毒性濃度検査により細胞活性の目視による評価能力を実証した。基準をクリアしたアゴニスト及びアンタゴニストの標準物質及びコントロール物質の結果は本バリデーションスタディーのPhase IIの経歴データベース作成に使われる。試験結果は、Validation Study Project Coordinatorに送られ、研究所内、研究所内及び研究所内間の再現性、細胞活性目視法による能力の実証が評価される。

2. 目的

化学物質リスク評価法の国際的バリデーションに関する研究 (Phase I) を行った。

- 1) Lumi-cell ER の国際的バリデーションに関する研究(Phase I)
- 2) Lumi-cell ER の国際的バリデーションに関する研究(Phase I)追加
- 3) Lumi-cell ER の国際的バリデーションに関する研究(Phase I)追加2

3. 方法、結果・考察

全体フロー

内分泌かく乱物質スクリーニング Lumi-cell ER アッセイのバリデーション (Phase0) の際のフロー、試薬を用いて行った。主なフローを図1. にて示す。

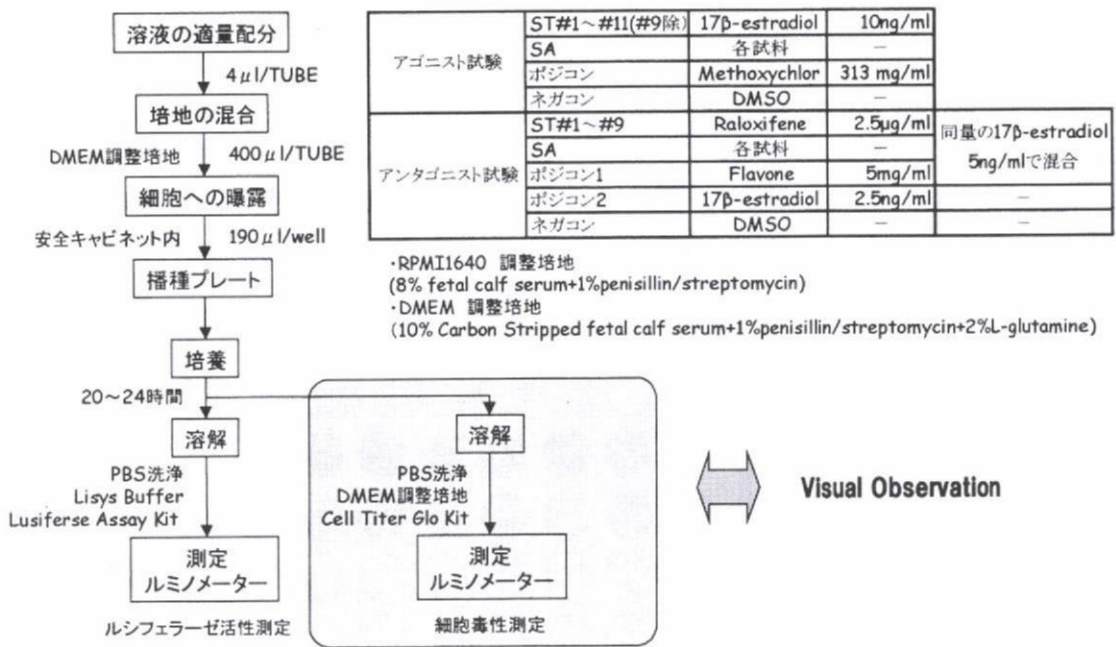


図1. 曝露の操作フロー

Viability Score	Brief Description
1	Normal Cell Morphology and Cell Density
2	Altered Cell Morphology and/or Small Gaps between Cells
3	Altered Cell Morphology and/or Large Gaps between Cells
4	Few (or no) Visible Cells
P	Wells containing precipitation are to be noted with "P"

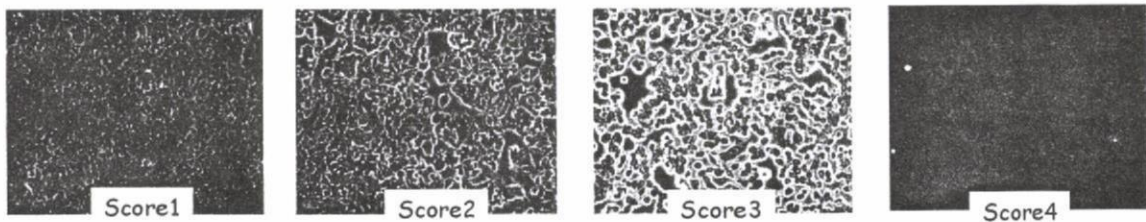


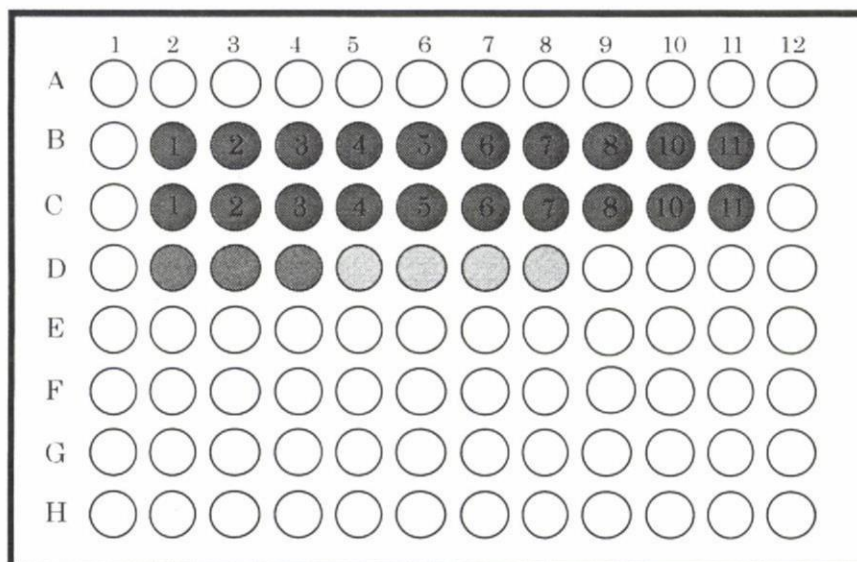
図2. Visual Observation の一例

3. 1 Lumi-cell ER の国際的バリデーションに関する研究(Phase I)

アゴニスト及びアンタゴニストの標準及びコントロールの試験を用いて、Lumi-cell ER アッセイの熟練度合いを示し、ラボ内の繰り返し性及びラボ内・ラボ間の再現性を示し、個々の実験を行って（アゴニスト及びアンタゴニストのプロトコールそれぞれ 10 回）経歴データベースを作成する。

1) 方法

試験に用いられる標準及びコントロールは the LUMI-CELL® ER Validation Study Substance Inventory and Distribution Management group(Dr. Cynthia Smith, Group Leader)により提供された。標準及びコントロールの前処理はルミセルプロトコール¹⁾²⁾³⁾に具体的に記載されている。プロトコールに具体的に記載されているアゴニストの標準及びコントロール物質の96穴プレートレイアウトは下記に示す







-  : E2 Reference Standard Dose Response Curve
-  : Methoxychlor Control (3.13 µg/mL)
-  : DMSO Control (1% v/v)
-  : Media only wells

図3. アゴニスト応答反応試験 ; 96穴プレートレイアウト

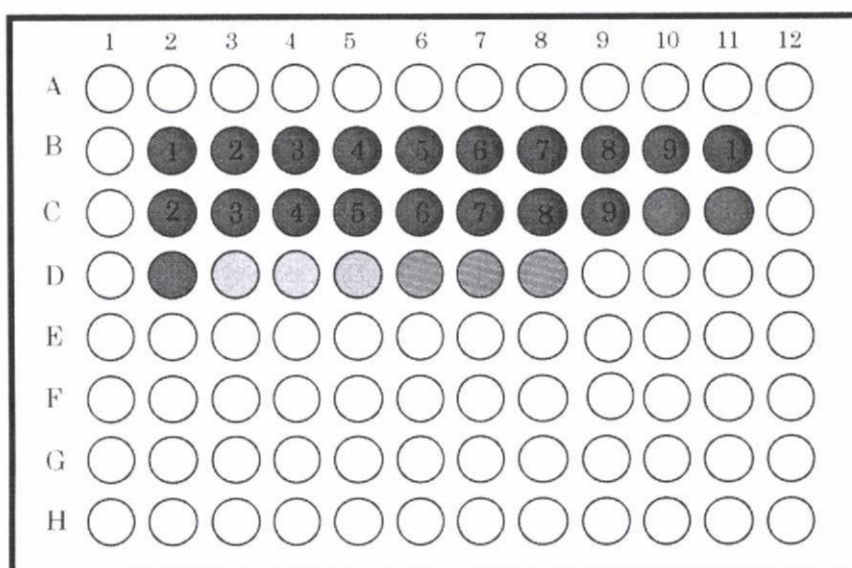
アゴニスト試料

スポンサーより下記の試料を提供された。

- ・ 17β-estradiol (E2) CASRN 50-28-2
- ・ p,p'-methoxychlor (methoxychlor) CASRN 72-43-5

表1. アゴニスト試験で用いる試薬一覧

スポンサーID	状態	保存方法	受け入れ日	受け入れ者	Comments
E2	固形	室温	16-Apr-07	中村 昌文	
Methoxychlor	固形	室温	16-Apr-07	中村・昌文	








-  : 9 point Ral/E2 Reference Standard Dose Response Curve
-  : Flavone Control (25 µg/mL)
-  : DMSO Control (1% v/v)
-  : E2 Control (2.5×10^{-5} µg/mL)
-  : Media only wells

図4. アンタゴニスト応答反応試験 ; 96 穴プレートレイアウト

アンタゴニスト試料

スポンサーより下記の試料を提供された。

- 17β-estradiol (E2) CASRN 50-28-2
- Raloxifene HCl (Ral) CASRN 84449-90-1
- Flavone CASRN 525-82-6

表2. アンタゴニスト試験で用いる試薬一覧

スポンサーID	状態	保存方法	受け入れ日	受け入れ者	Comments
E2	固形	室温	16-Apr-07	中村 昌文	
Flavone	固形	室温	16-Apr-07	中村 昌文	
Ral	固形	室温	16-Apr-07	中村 昌文	

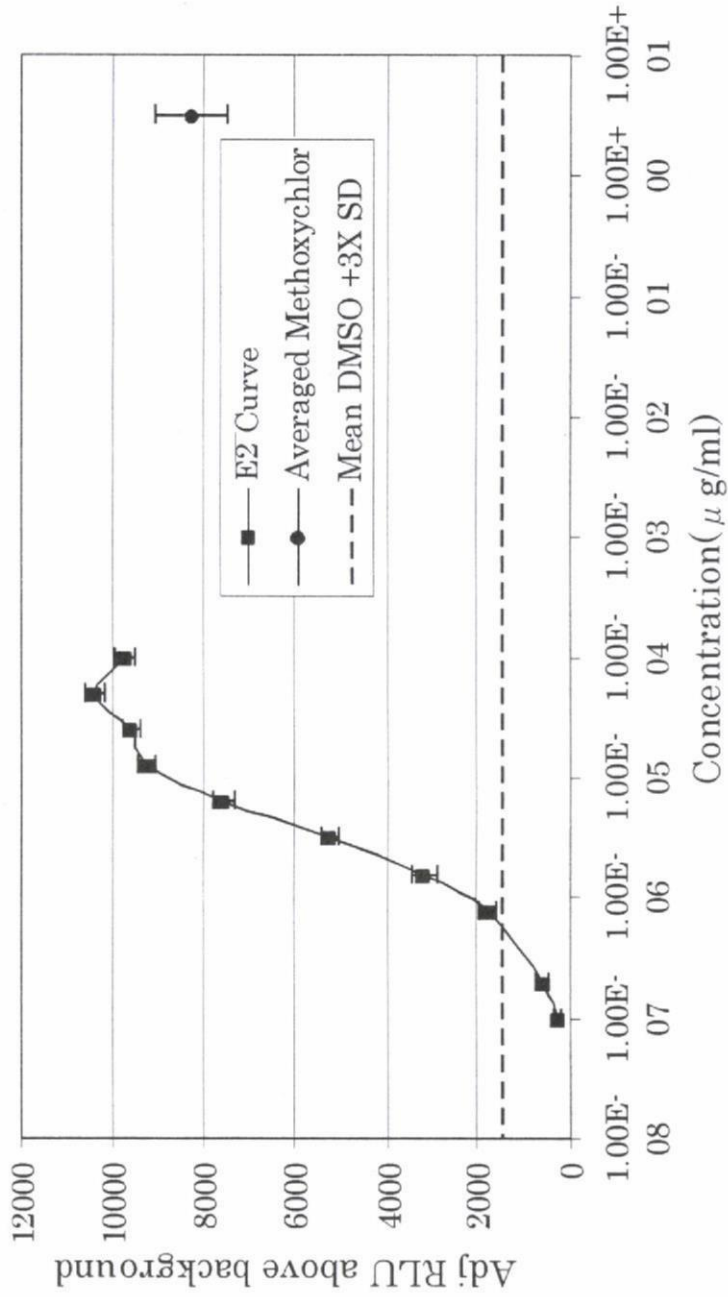
2) 結果

Lumi-cell ER 細胞のアゴニスト活性及びアンタゴニスト活性については、EC50 もしくは、IC50 及び Dose response curve の経歴データベースを作成した。表3. 図5. 表4. 図6. に示す。

表3. アゴニスト試験の結果一覧

Experiments: Phase I ¹							
試験 I.D.	試料 Code	日付	Maximum Soluble 濃度 (µg/mL) ¹	試験濃度範囲 (µg/mL)	Plate Induction	EC ₅₀ (µg/mL)	採用の有無 不採用の理由
Ag1	E2	28-May-07	N/A	9.78 x 10 ⁻⁸ to 1.00 x 10 ⁻⁴	4.3	8.76E-6	Used
Ag2	E2	30-May-07	N/A	9.78 x 10 ⁻⁸ to 1.00 x 10 ⁻⁴	4.5	1.53E-5	Used
Ag3	E2	04-Jun-07	N/A	9.78 x 10 ⁻⁸ to 1.00 x 10 ⁻⁴	1.6	3.60E-5	Repeated Induction not > 3
Ag4	E2	06-Jun-07	N/A	9.78 x 10 ⁻⁸ to 1.00 x 10 ⁻⁴	2.7	2.09E-5	Repeated Induction not > 3
Ag5	E2	11-Jun-07	N/A	9.78 x 10 ⁻⁸ to 1.00 x 10 ⁻⁴	3.4	1.24E-5	Used
Ag6	E2	13-Jun-07	N/A	9.78 x 10 ⁻⁸ to 1.00 x 10 ⁻⁴	3.8	9.31E-6	Used
Ag7	E2	18-Jun-07	N/A	9.78 x 10 ⁻⁸ to 1.00 x 10 ⁻⁴	3.8	1.27E-5	Used
Ag8	E2	20-Jun-07	N/A	9.78 x 10 ⁻⁸ to 1.00 x 10 ⁻⁴	4.2	7.37E-6	Used
Ag9	E2	25-Jun-07	N/A	9.78 x 10 ⁻⁸ to 1.00 x 10 ⁻⁴	3.8	1.31E-5	Used
Ag10	E2	27-Jun-07	N/A	9.78 x 10 ⁻⁸ to 1.00 x 10 ⁻⁴	3.8	7.13E-6	Used
Ag1 Repeat	E2	02-Jul-07	N/A	9.78 x 10 ⁻⁸ to 1.00 x 10 ⁻⁴	4.1	9.14E-6	Used
Ag2 Repeat	E2	06-Jul-07	N/A	9.78 x 10 ⁻⁸ to 1.00 x 10 ⁻⁴	6.0	1.58E-5	Used

¹ MAXIMUM SOLUBLE CONCENTRATION IN 1% DMSO. 99% ESTROGEN-FREE DMEM THIS CONCENTRATION INDICATES THE HIGHEST CONCENTRATION THAT WAS APPLIED TO THE CELLS.



採用データは、Ag1~Ag2 Ag5 ~Ag2Repeat の N=10 データ

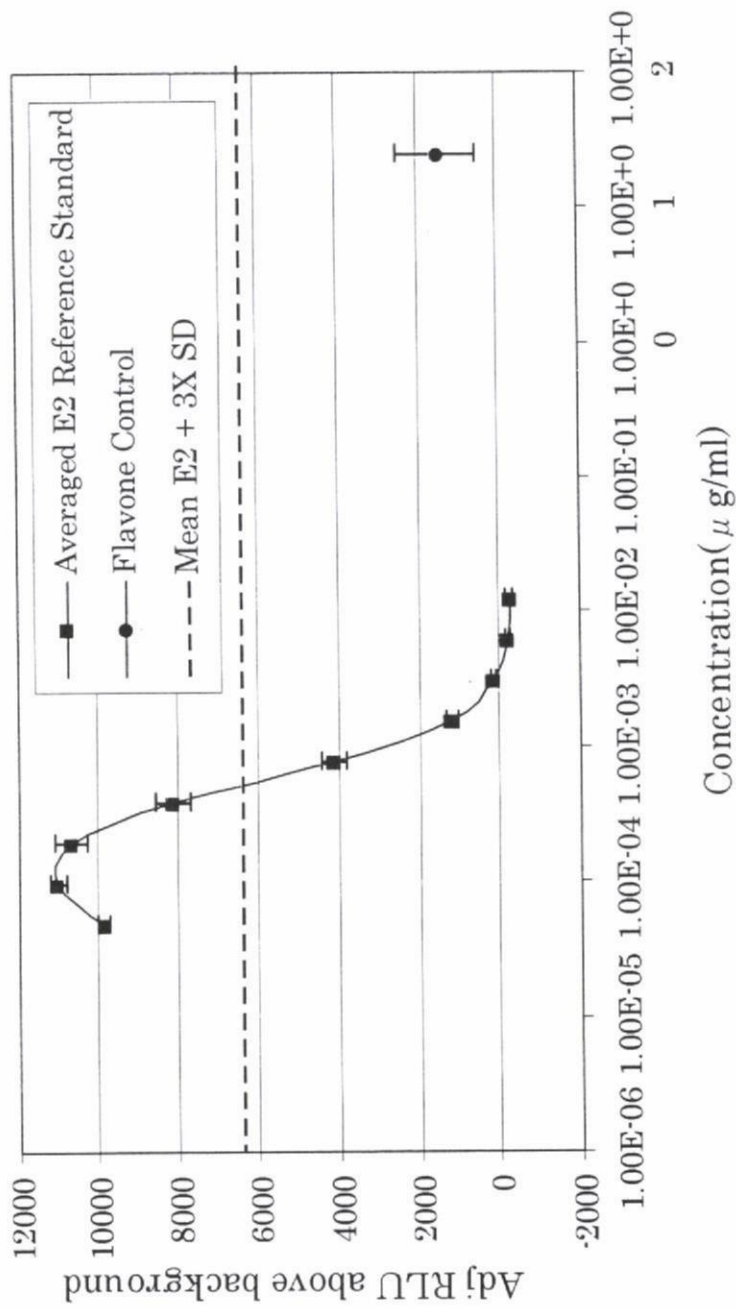
図5. アゴニスト試験(Phase I)の経歴データベース

表4. アンタゴニスト試験の結果一覧

Experiments: Phase I ¹									
試験 I.D.	試料 Code	日付	Maximum Soluble 濃度 (µg/mL) ¹	試験濃度範囲 (µg/mL)	Plate Induction	IC ₅₀ (µg/mL)	採用の有無	不採用の理由	
An1	Ral/E2	28-May-07	N/A	4.88 x 10 ⁻⁵ to 1.25 x 10 ⁻²	8.84	1.34E-03	Used		
An2	Ral/E2	30-May-07	N/A	4.88 x 10 ⁻⁵ to 1.25 x 10 ⁻²	6.35	1.63E-03	Used		
An3	Ral/E2	04-Jun-07	N/A	4.88 x 10 ⁻⁵ to 1.25 x 10 ⁻²	6.69	1.94E-03	Used		
An4	Ral/E2	06-Jun-07	N/A	4.88 x 10 ⁻⁵ to 1.25 x 10 ⁻²	3.96	1.73E-03	Used		
An5	Ral/E2	11-Jun-07	N/A	4.88 x 10 ⁻⁵ to 1.25 x 10 ⁻²	5.20	2.02E-03	Used		
An6	Ral/E2	13-Jun-07	N/A	4.88 x 10 ⁻⁵ to 1.25 x 10 ⁻²	9.18	1.48E-03	Used		
An7	Ral/E2	18-Jun-07	N/A	4.88 x 10 ⁻⁵ to 1.25 x 10 ⁻²	4.81	1.61E-03	Used		
An8	Ral/E2	20-Jun-07	N/A	4.88 x 10 ⁻⁵ to 1.25 x 10 ⁻²	10.53	1.43E-03	Used		
An9	Ral/E2	25-Jun-07	N/A	4.88 x 10 ⁻⁵ to 1.25 x 10 ⁻²	6.35	1.96E-03	Used		
An10	Ral/E2	27-Jun-07	N/A	4.88 x 10 ⁻⁵ to 1.25 x 10 ⁻²	5.50	1.94E-03	Used		
An1 Repeat	Ral/E2	02-Jul-07	N/A	4.88 x 10 ⁻⁵ to 1.25 x 10 ⁻²	6.37	1.84E-03	Used	2	
An2 Repeat	Ral/E2	06-Jul-07	N/A	4.88 x 10 ⁻⁵ to 1.25 x 10 ⁻²	9.95	1.29E-03	Used	2	

1 MAXIMUM SOLUBLE CONCENTRATION IN 1% DMSO, 99% ESTROGEN-FREE DMEM THIS CONCENTRATION INDICATES THE HIGHEST CONCENTRATION THAT WAS APPLIED TO THE CELLS.

2 BECAUSE AG3 AND AG4 OF PHASE I AGONIST EXPERIMENTS WAS REPEATED, WE HAVE ALSO REPEATED ANTAGONIST ANALYSIS (ONLY FOR REFERENCE)



採用データは、An1~An10のN=10データ

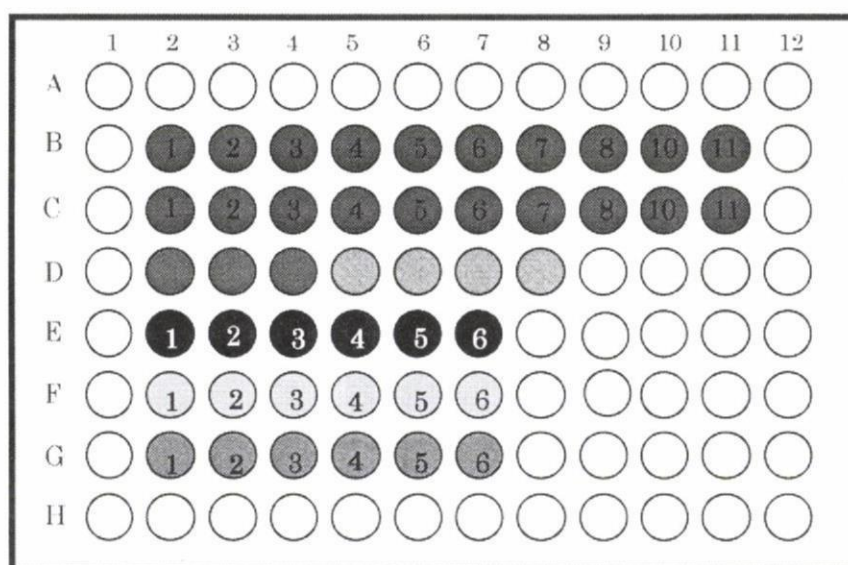
図6. アンタゴニスト試験(Phase I)の経歴データベース

3. 2 Lumi-cell ER の国際的バリデーションに関する研究(Phase I)追加

アゴニスト標準及びコントロール、Bisphenol-A の試験を用いて、Lumi-cell ER に対して併行に Visual observation 及び Cell TiterGlo®で測定する。個々の実験を行って、データベースを作成する。

1) 方法

試験に用いられる標準及びコントロール、Bisphenol-A は the LUMI-CELL® ER Validation Study Substance Inventory and Distribution Management group(Dr. Cynthia Smith, Group Leader)により提供済み。標準及びコントロール、BisphenolA の前処理はルミセルプロトコールに具体的に記載されている。参考に、プロトコールに具体的に記載されているアゴニストの標準及びコントロール物質の96穴プレートレイアウトは別途示す。



- : E2 Reference Standard Dose Response Curve
- : Methoxychlor Control (3.13 µg/mL)
- : DMSO Control (1% v/v)
- : Media only wells
- : Comprehensive Dose Response Bisphenol-A, Replicate #1
- : Comprehensive Dose Response Bisphenol-A, Replicate #2
- : Comprehensive Dose Response Bisphenol-A, Replicate #3

図7. アンタゴニスト応答反応試験 (Cell Viability) ; 96穴プレートレイアウト

・ Viability 試験試料

スポンサーより下記の試料を提供された。

- ・ Bisphenol A (BPA) CASRN 80-05-7

表 5. Viability 試験で用いる試薬一覧

スポンサーID	状態	保存方法	受け入れ日	受け入れ者	Comments
Bisphenol A	固形	室温	18-Jul-07	中村 昌文	

Bisphenol-A は、10mg/ml の Stock solution を作成し、最終濃度 100 μ g/ml ~ 2 倍希釈で 6 段階(100 μ g/ml ~ 3.125 μ g/ml)を供試試料とする。これらの濃度で、各試料 3 ウェル、別のプレートで計 3 回測定を行う。

・ Visual observation(1 プレート目)

顕微鏡で確認し、DRAFT LUMI-CELL[®]ER ASSAY Visual Observation Cell Viability Manual に従って、カテゴリー1、2、3、4 を判断する。さらに顕微鏡では、倍率×100 でウェル毎にデジタルカメラで撮影し、カテゴリーの判断を評価する。

・ Cell TiterGlo[®](2 プレート目)

AGONIST PROTOCOL [11.4 CellTiter-Glo[®] Assessment of Cell Viability]に従って、分析を行う。

2)結果

・ Visual observation(1 プレート目)及び Cell TiterGlo[®](2 プレート目)の結果を図 5. 表 3. で示す。顕微鏡を使った目視判定及び Cell TiterGlo を使った Viability(%)の数値と合致していた。しかし、選定試料の特性もあるが、濃度の振分けが悪く、判定 1~4 全てを見ることができなかったため、再度濃度を振りなおして、細胞毒性の評価を行う。

・ Visual observation(1 プレート目)

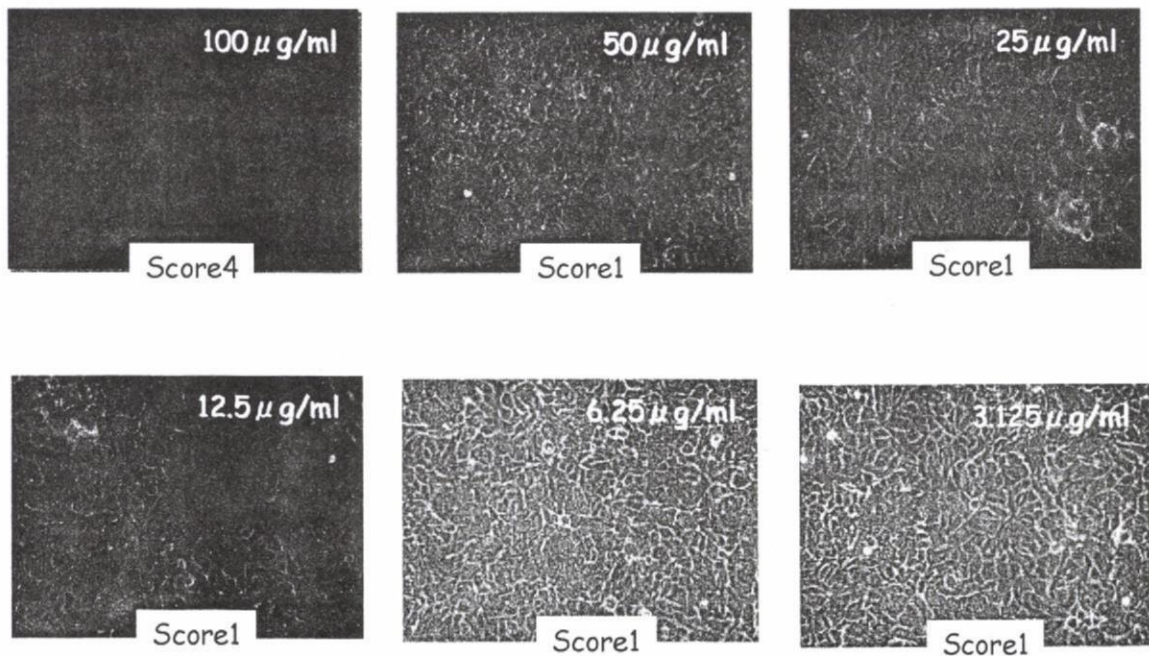


図 8. Visual observation の顕微鏡写真及びスコア判定値

・ Cell TiterGlo®(2プレート目)

表6. アンタゴニスト試験の結果一覧

Cell name	Project/Sample ID	Dosing Fraction	Comments	results	DMSO Average		5265000		Score
					Absolute RLU Value	% Cell Death	% Viable		
B2	EA1-3.1	40.00	β-estradiol a	-245000	245000	4.7%	95.3%	1	
B3	EA1-3.1	20.00	β-estradiol a	-115000	115000	2.2%	97.8%	1	
B4	EA1-3.1	10.00	β-estradiol a	-45000	45000	0.9%	99.1%	1	
B5	EA1-3.1	5.00	β-estradiol a	-25000	25000	0.5%	99.5%	1	
B6	EA1-3.1	2.50	β-estradiol a	45000	45000	0.9%	100.9%	1	
B7	EA1-3.1	1.25	β-estradiol a	165000	165000	3.1%	103.1%	1	
B8	EA1-3.1	0.63	β-estradiol a	125000	125000	2.4%	102.4%	1	
B9	EA1-3.1	0.31	β-estradiol a	125000	125000	2.4%	102.4%	1	
B10	EA1-3.1	0.08	β-estradiol a	75000	75000	1.4%	101.4%	1	
B11	EA1-3.1	0.04	β-estradiol a	95000	95000	1.8%	101.8%	1	
C2	EA1-3.1	40.00	β-estradiol b	-325000	325000	6.2%	93.8%	1	
C3	EA1-3.1	20.00	β-estradiol b	-195000	195000	3.7%	96.3%	1	
C4	EA1-3.1	10.00	β-estradiol b	-65000	65000	1.2%	98.8%	1	
C5	EA1-3.1	5.00	β-estradiol b	-15000	15000	0.3%	99.7%	1	
C6	EA1-3.1	2.50	β-estradiol b	175000	175000	3.3%	103.3%	1	
C7	EA1-3.1	1.25	β-estradiol b	75000	75000	1.4%	101.4%	1	
C8	EA1-3.1	0.63	β-estradiol b	185000	185000	3.5%	103.5%	1	
C9	EA1-3.1	0.31	β-estradiol b	105000	105000	2.0%	102.0%	1	
C10	EA1-3.1	0.08	β-estradiol b	55000	55000	1.0%	101.0%	1	
C11	EA1-3.1	0.04	β-estradiol b	115000	115000	2.2%	102.2%	1	
D2	EB-1.1	1.25E+06	Methoxychlor	-685000	685000	13.0%	87.0%	1	
D3	EB-1.1	1.25E+06	Methoxychlor	-575000	575000	10.9%	89.1%	1	
D4	EB-1.1	1.25E+06	Methoxychlor	-425000	425000	8.1%	91.9%	1	
D5	#105K00451	DMSO	control	-15000	15000	0.3%	99.7%	1	
D6	#105K00451	DMSO	control	-65000	65000	1.2%	98.8%	1	
D7	#105K00451	DMSO	control	195000	195000	3.7%	103.7%	1	
D8	#105K00451	DMSO	control	-115000	115000	2.2%	97.8%	1	
D9	EG1-1.1	4.00E+07	Bisphenol-A	-4892008	4892008	92.9%	7.1%	4	
D10	EG1-1.1	2.00E+07	Bisphenol-A	-875000	875000	16.6%	83.4%	1	
D11	EG1-1.1	1.00E+07	Bisphenol-A	415000	415000	7.9%	92.1%	1	
E2	EG1-1.1	5.00E+06	Bisphenol-A	-275000	275000	5.2%	94.8%	1	
E3	EG1-1.1	2.50E+06	Bisphenol-A	-45000	45000	0.9%	99.1%	1	
E4	EG1-1.1	1.25E+06	Bisphenol-A	105000	105000	2.0%	102.0%	1	

・ Visual observation(1プレート目)及び Cell TiterGlo®(2プレート目)の比較

Visual observation : DRAFT LUMI-CELL®ER ASSAY Visual Observation Cell Viability Manual の通り Score1~4 で判定

$$\text{Cell TiterGlo®; Viability(\%)} = 100 - (\text{Absolute RLU Value} \div \text{DMSO Average} \times 100)$$

0~20%=Score4 20~40%=Score3 40~80%=Score2 80~100%=Score1

3. 3 Lumi-cell ER の国際的バリデーションに関する研究(Phase I)追加2

Bisphenol-A は、10mg/ml の Stock solution を作成し、最終濃度 100、90、80、70、60、50 μg/ml で 6 段階(100 μg/ml~50 μg/ml)を供試試料とする。これらの濃度で、各試料 3 ウェル、別のプレートで計 3 回測定を行う。

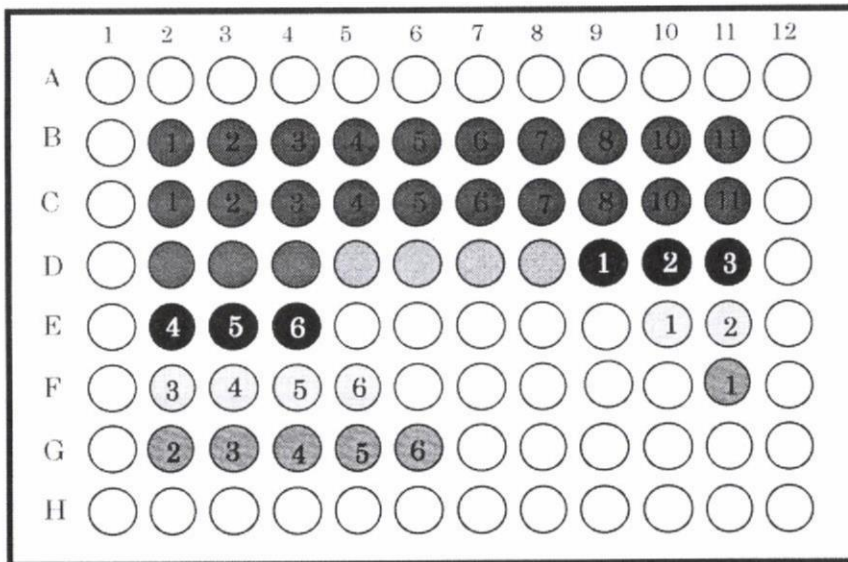
1) 方法

試薬の調整は、下記のとおり

100mg/ml ; Stock solution

90mg/ml	: Stock solution : DMSO=10 : 90(μ l)
80mg/ml	: Stock solution : DMSO=20 : 80(μ l)
70mg/ml	: Stock solution : DMSO=30 : 70(μ l)
60mg/ml	: Stock solution : DMSO=40 : 60(μ l)
50mg/ml	: Stock solution : DMSO=50 : 50(μ l)

試験に用いられる標準及びコントロール、Bisphenol-A は the LUMI-CELL® ER Validation Study Substance Inventory and Distribution Management group(Dr. Cynthia Smith, Group Leader)により提供済み。標準及びコントロール、BisphenolA の前処理はルミセルプロトコールに具体的に記載されている。参考に、プロトコールに具体的に記載されているアゴニストの標準及びコントロール物質の96穴プレートレイアウトは別途示す。



- : E2 Reference Standard Dose Response Curve
- : Methoxychlor Control (3.13 μ g/mL)
- : DMSO Control (1% v/v)
- : Media only wells
- : Comprehensive Dose Response Bisphenol-A, Replicate #1
- : Comprehensive Dose Response Bisphenol-A, Replicate #2
- : Comprehensive Dose Response Bisphenol-A, Replicate #3

図9. アンタゴニスト応答反応試験 (Cell Viability) 2 ; 96穴プレートレイアウト

・ Visual observation(1 プレート目)

顕微鏡で確認し、DRAFT LUMI-CELL[®]ER ASSAY Visual Observation Cell Viability Manual に従って、カテゴリー1、2、3、4 を判断する。さらに顕微鏡では、倍率×100 でウェル毎にデジタルカメラで撮影し、カテゴリーの判断を評価する。

・ Cell TiterGlo[®](2 プレート目)

AGONIST PROTOCOL [11.4 CellTiter-Glo[®] Assessment of Cell Viability]に従って、分析を行う。

2)結果

・ Visual observation(1 プレート目)及び Cell TiterGlo[®](2 プレート目)の結果を図 6 表 4 で示す。顕微鏡を使った目視判定及び Cell TiterGlo を使った Viability(%)の数値と合致していた。

・ Visual observation(1 プレート目)

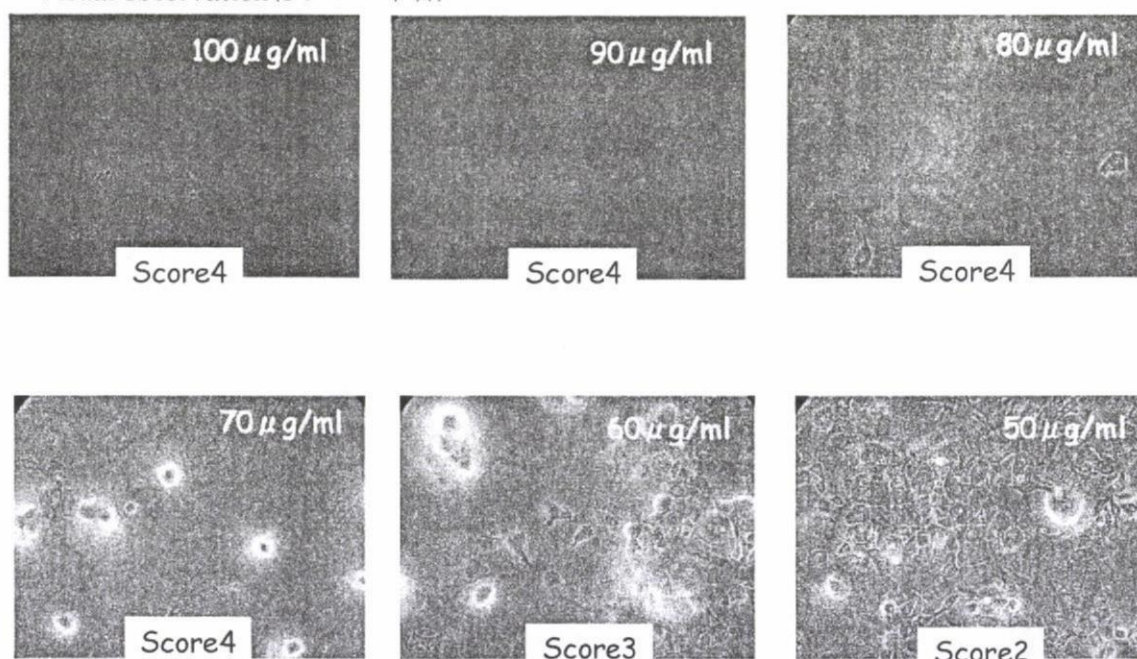


図 10. Visual observation の顕微鏡写真及びスコア判定値