

ストック 5 μ l に Distilled water を 995 μ l 加え 5 μ g/ml とし、1 well (培地 100 μ l) 当たり 2 μ l ずつ分注する。(最終濃度 100 ng/ml)

3. 実験方法

3-1 細胞培養方法

3-1-1 細胞蘇生

あらかじめ、C 培地 9 ml を 15ml コニカルチューブに入れて 37 °C の恒温槽で（遠心用）、また、T-75 Flask に入れた C 培地 15 ml を 37 °C、CO₂ インキュベーターで温めておく（培養用）。

凍結細胞(2x10⁶ 細胞/0.5 ml セルバンカー1 細胞凍結保存液)を 37 °C 恒温槽で融解し、あらかじめ温めておいた C 培地 9 ml の入ったコニカルチューブに加えて(細胞液 0.5 ml + C 培地 9 ml = 計 9.5 ml) 浮遊後、遠心して細胞を集める (1,400 rpm、5 分程度)。上清を吸引除去し、先に温めておいた C 培地 15 ml に細胞を懸濁して T-75 Flask で培養を開始する (37 °C、5% CO₂)。

3-1-2 選択抗生剤での培養開始

あらかじめ、A 培地必要量を 37 °C、CO₂ インキュベーターで温めておく。

細胞蘇生して 3 日～4 日後に選択抗生剤を入れた培養を開始する。フラスコ中の細胞塊を滅菌ピペットでピペッティングしてほぐし、細胞数を計測する。

* 細胞の状態がよい場合...3×10⁵/ml で継代

* 細胞の増えが悪い場合...4~6×10⁵/ml で継代

必要細胞量を取り、遠心して細胞を集める (1,400 rpm、5 分程度)。上清を吸引除去し、先に温めておいた A 培地 15 ml に細胞を懸濁して T-75 Flask で培養する。

※継代濃度が同一であれば、容量の変更は構わない。

3-1-3 通常の継代培養

あらかじめ、A 培地必要量を 37°C 恒温槽で温めておく

フラスコ中の細胞塊を滅菌ピペットでピペッティングしてほぐし、細胞数を計測する。継代細胞濃度は 3×10⁵/ml、継代間隔は 3~4 日程度で行う (継代前細胞数は間隔日数×10⁵/ml)。

必要細胞量を取り、遠心して細胞を集める (低回転、5 分程度)。上清を吸引除去し、先に温めておいた A 培地 15 ml に細胞を懸濁して T-75 Flask で培養する。

※継代濃度が同一であれば、容量の変更や維持本数は構わない。

4. 細胞液の調製方法

アッセイ 2-4 日前に細胞継代をしておく。

解凍後 1~6 週間の範囲の細胞を使用する。

※あらかじめ、B 培地を必要量 37°C 恒温槽で温めておく。

フラスコ中の細胞塊を滅菌ピペットでピペッティングしてほぐし、細胞数を計測する。必要細胞量を取り、遠心して細胞を集める (1,400 rpm、5 分程度)。上清を吸引除去し、先に温めておいた B 培地を使用して #2H4 細胞については 4×10^6 /ml、149-14 細胞については 1×10^6 /ml となるように細胞を懸濁する。リザーバーに調整した細胞溶液を移し、8 チャンネルもしくは 12 チャンネルピペットマンを使用してアッセイプレート (greiner 96 well black plate) に 50 μ l/well で分注する。(図 2, 3)

図 2 #2H4 細胞用プレート

flat-bottom black	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul
B	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul
C	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul
D	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul
E	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul
F	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul
G	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul
H	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ B medium 50ul

5 被験物質の調整方法

最終濃度が $100 \times C_{max}$ (C_{max} : 薬物の最高血中濃度 (ヒト)) の濃度になるように調整する。具体的には、水溶性の化学物質の場合には $50 \times 100 \times C_{max}$ の濃度、DMSO に溶解する化学物質の場合には $1000 \times 100 \times C_{max}$ の濃度を調製する。

なお、被験物質が水、または DMSO に溶けにくい、入手できる被験物質が少ない等の理由で上記の溶液を調製するのが困難なときは、できる範囲で濃い濃度を調製する。

また、同一のプレートでアッセイする Chemical A, Chemical B の溶媒が同一になるようにする。(コントロールを共通にしているため)

5-1 水溶性被験物質の調製

5-1-1 試薬の配置 (水溶性被験物質)

調製した被験物質 $5000 \times C_{max}$ 水溶液 $100 \mu\text{l}$ (#A12)、Distilled water $100 \mu\text{l}$ (#A1-A11) を下図のように 96 well clear plate (丸底) に分注する (図 4)。

5-1-2 段階希釈 (水溶性被験物質)

矢印のように well#A11 から #A2 まで Distilled water で公比 3 の段階希釈を 10 段階おこなう。($50 \mu\text{l}$ ずつ左隣のウェルに移す、図 4)

図 4

round bottom clear	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Distilled water 100ul	Distilled water 100ul	Distilled water 100ul	Distilled water 100ul	Distilled water 100ul	Distilled water 100ul	Distilled water 100ul	Distilled water 100ul	Distilled water 100ul	Distilled water 100ul	Distilled water 100ul	Chemical A $5000 \times C_{max}$ in distilled water 100ul
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

3-fold dilution : transfer 50 ul (pipetman, yellow tip)

round bottom clear	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Distilled water 100ul	Chemical A $0.05 \times C_{max}$ in distilled water 150ul	Chemical A $0.15 \times C_{max}$ in distilled water 50ul	Chemical A $0.5 \times C_{max}$ in distilled water 50ul	Chemical A $1.5 \times C_{max}$ in distilled water 50ul	Chemical A $5 \times C_{max}$ in distilled water 50ul	Chemical A $15 \times C_{max}$ in distilled water 50ul	Chemical A $50 \times C_{max}$ in distilled water 50ul	Chemical A $150 \times C_{max}$ in distilled water 50ul	Chemical A $500 \times C_{max}$ in distilled water 50ul	Chemical A $1500 \times C_{max}$ in distilled water 50ul	Chemical A $5000 \times C_{max}$ in distilled water 50ul
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

5-1-3 2段階希釈 (水溶性被験物質)

段階希釈した溶液から、20 μ l を取り出し、アッセイブロックの中の B 培地 480 μ l に加える。(25 倍に希釈される、図 5)

図 5

round bottom clear	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Distilled water 100ul	Chemical A 0.05xCmax in distilled water 150ul	Chemical A 0.15xCmax in distilled water 50ul	Chemical A 0.5xCmax in distilled water 50ul	Chemical A 1.5xCmax in distilled water 50ul	Chemical A 5xCmax in distilled water 50ul	Chemical A 15xCmax in distilled water 50ul	Chemical A 50xCmax in distilled water 50ul	Chemical A 150xCmax in distilled water 50ul	Chemical A 500xCmax in distilled water 50ul	Chemical A 1500xCmax in distilled water 50ul	Chemical A 5000xCmax in distilled water 50ul
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Assay Block	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B medium 480ul	B medium 480ul	B medium 480ul	B medium 480ul	B medium 480ul	B medium 480ul	B medium 480ul	B medium 480ul	B medium 480ul	B medium 480ul	B medium 480ul	B medium 480ul
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

5-1-4 細胞への添加（水溶性被験物質）

50 μ l にセッティングしたピペットを用いて泡立たないように注意して 20 回ピペッティング後、細胞の入った well（プレートの上半分）に 50 μ l 加える。(2 倍に希釈される、図 6) 終了後、プレートシェーカーを使用し、攪拌して混合する。混合したら、細胞をインキュベーターへ入れ、1 時間反応させる。

同様にふたつめの被験物質 (Chemical B) についても調製シプレートの下半分の細胞に添加する。

5-2 DMSO 溶性被験物質の調製

5-2-1 試薬の配置 (DMSO 溶性被験物質)

調製した被験物質 DMSO 溶液 100000 x Cmax 100 μ l (#A12)、DMSO 50 μ l (#A1-A11)、B 培地 90 μ l (#B1-B12)を下図のように 96 well clear plate (丸底)に分注する (図 7)。

5-2-2 段階希釈 (DMSO 溶性被験物質)

矢印のように well#A11 から#A2 まで DMSO で公比 3 の段階希釈を 10 段階おこなう。(50 μ l ずつ左隣のウェルに移す、図 7)

図 7

round bottom clear	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO 100% 100ul	DMSO 100% 100ul	DMSO 100% 100ul	DMSO 100% 100ul	DMSO 100% 100ul	DMSO 100% 100ul	DMSO 100% 100ul	DMSO 100% 100ul	DMSO 100% 100ul	DMSO 100% 100ul	DMSO 100% 100ul	Chemical A 100000xCmax in DMSO 100ul
B	B medium 90ul	B medium 90ul	B medium 90ul	B medium 90ul	B medium 90ul	B medium 90ul	B medium 90ul	B medium 90ul	B medium 90ul	B medium 90ul	B medium 90ul	B medium 90ul
C												
D												
E												
F												
G												
H												

3-fold dilution : transfer 50 ul (pipetman, yellow tip)

↓

round bottom clear	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO 100% 100ul	Chemical A 1xCmax in DMSO 150ul	Chemical A 3xCmax in DMSO 100ul	Chemical A 10xCmax in DMSO 100ul	Chemical A 30xCmax in DMSO 100ul	Chemical A 100xCmax in DMSO 100ul	Chemical A 300xCmax in DMSO 100ul	Chemical A 1000xCmax in DMSO 100ul	Chemical A 3000xCmax in DMSO 100ul	Chemical A 10000xCmax in DMSO 100ul	Chemical A 30000xCmax in DMSO 100ul	Chemical A 100000xCmax in DMSO 50ul
B	B medium 90ul	B medium 90ul	B medium 90ul	B medium 90ul	B medium 90ul	B medium 90ul	B medium 90ul	B medium 90ul	B medium 90ul	B medium 90ul	B medium 90ul	B medium 90ul
C												
D												
E												
F												
G												
H												

5-2-3 B 培地での希釈 (DMSO 溶性被験物質)

矢印のように段階希釈した被試験試薬 DMSO 溶液 10 μ l

を 0.5~10 μ l 対応の 8 チャンネルもしくは 12 チャンネルピペットマンを使用して下の B 培地 90 μ l にうつし 10 倍に希釈する。(10 倍に希釈される、図 8)

図 8

round bottom clear	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO 100% 100ul	Chemical A 1xCmax in DMSO 150ul	Chemical A 3xCmax in DMSO 100ul	Chemical A 10xCmax in DMSO 100ul	Chemical A 30xCmax in DMSO 100ul	Chemical A 100xCmax in DMSO 100ul	Chemical A 300xCmax in DMSO 100ul	Chemical A 1000xCmax in DMSO 100ul	Chemical A 3000xCmax in DMSO 100ul	Chemical A 10000xCmax in DMSO 100ul	Chemical A 30000xCmax in DMSO 100ul	Chemical A 100000xCmax in DMSO 50ul
B	B medium 90ul	B medium 90ul	B medium 90ul	B medium 90ul	B medium 90ul	B medium 90ul	B medium 90ul	B medium 90ul	B medium 90ul	B medium 90ul	B medium 90ul	B medium 90ul
C												
D												
E												
F												
G												
H												

10ul

↓

round bottom clear	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO 100% 90ul	Chemical A 1xCmax in DMSO 140ul	Chemical A 3xCmax in DMSO 90ul	Chemical A 10xCmax in DMSO 90ul	Chemical A 30xCmax in DMSO 90ul	Chemical A 100xCmax in DMSO 90ul	Chemical A 300xCmax in DMSO 90ul	Chemical A 1000xCmax in DMSO 90ul	Chemical A 3000xCmax in DMSO 90ul	Chemical A 10000xCmax in DMSO 90ul	Chemical A 30000xCmax in DMSO 90ul	Chemical A 100000xCmax in DMSO 40ul
B	Chemical A 0xCmax DMSO 10% in B medium 100ul	Chemical A 0.1xCmax DMSO 10% in B medium 100ul	Chemical A 0.3xCmax DMSO 10% in B medium 100ul	Chemical A 1xCmax DMSO 10% in B medium 100ul	Chemical A 3xCmax DMSO 10% in B medium 100ul	Chemical A 10xCmax DMSO 10% in B medium 100ul	Chemical A 30xCmax DMSO 10% in B medium 100ul	Chemical A 100xCmax DMSO 10% in B medium 100ul	Chemical A 300xCmax DMSO 10% in B medium 100ul	Chemical A 1000xCmax DMSO 10% in B medium 100ul	Chemical A 3000xCmax DMSO 10% in B medium 100ul	Chemical A 10000xCmax DMSO 10% in B medium 100ul
C												
D												
E												
F												
G												
H												

5-2-4 2段階希釈 (DMSO 溶性被験物質)

B 培地に希釈した溶液から、10 μl を取り出し、アッセイブロックの中の B 培地 490 μl に加える (50 倍に希釈される、図 9)。

図 9

round bottom clear	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO 100% 90ul	Chemical A 1xCmax in DMSO 140ul	Chemical A 3xCmax in DMSO 90ul	Chemical A 10xCmax in DMSO 90ul	Chemical A 30xCmax in DMSO 90ul	Chemical A 100xCmax in DMSO 90ul	Chemical A 300xCmax in DMSO 90ul	Chemical A 1000xCmax in DMSO 90ul	Chemical A 3000xCmax in DMSO 90ul	Chemical A 10000xCmax in DMSO 90ul	Chemical A 30000xCmax in DMSO 90ul	Chemical A 100000xCmax in DMSO 40ul
B	Chemical A 0xCmax DMSO 10% in B medium 100ul	Chemical A 0.1xCmax DMSO 10% in B medium 100ul	Chemical A 0.3xCmax DMSO 10% in B medium 100ul	Chemical A 1xCmax DMSO 10% in B medium 100ul	Chemical A 3xCmax DMSO 10% in B medium 100ul	Chemical A 10xCmax DMSO 10% in B medium 100ul	Chemical A 30xCmax DMSO 10% in B medium 100ul	Chemical A 100xCmax DMSO 10% in B medium 100ul	Chemical A 300xCmax DMSO 10% in B medium 100ul	Chemical A 1000xCmax DMSO 10% in B medium 100ul	Chemical A 3000xCmax DMSO 10% in B medium 100ul	Chemical A 10000xCmax DMSO 10% in B medium 100ul
C												
D												
E												
F												
G												
H												

10ul

Assay Block	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B medium 490ul	B medium 490ul	B medium 490ul	B medium 490ul	B medium 490ul	B medium 490ul	B medium 490ul	B medium 490ul	B medium 490ul	B medium 490ul	B medium 490ul	B medium 490ul
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

5-2-5 細胞への添加 (DMSO 溶性被験物質)

50 μl にセッティングしたピペットを用いて泡立たないように注意して 20 回ピペッテ

6 細胞賦活試薬 (PMA/ionomycin) の調整、#2H4 細胞への添加

Control 及び PMA/ionomycin は処理濃度の 10 倍の濃度を調整する。(添加時に 10 倍希釈となるようにする)

*control…PMA/ionomycin に含まれる EtOH に対しての溶媒コントロールである。なお、PMA に含まれる溶媒コントロールは非常に微量であるため、無視する。

6-1 準備

- ・調整済 1 mM PMA
- ・調整済 1 mM Ionomycin いずれも-20°C で保管しておいたもの
- ・B 培地
- ・99.5% EtOH

6-2 100 µM PMA の調整方法

下表のように 1 mM PMA ストックを B 培地で 10 倍希釈し 100 µM 溶液を調製する。

1 mM PMA 必要量	B 培地必要量	ストック 濃度	調整後 濃度	Total
2 µl	18 µl	1 mM	100 µM	20 µl

6-3 Control 液及び x10 PMA/ionomycin 溶液の調整

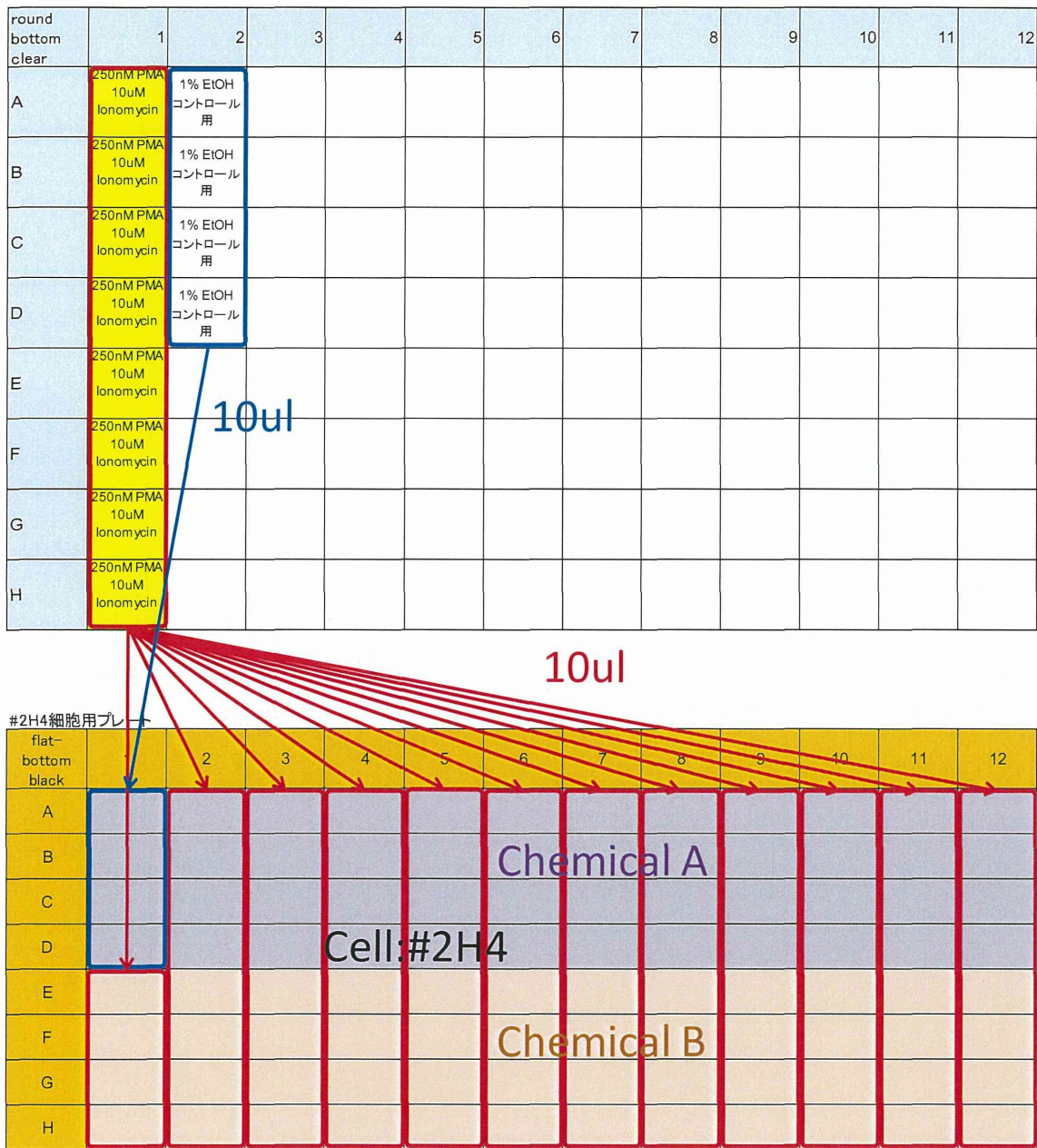
下表のように 250nM PMA 10µM ionomycin 溶液を調製する (10 倍濃度) また EtOH を含む Control 液を調製し試薬添加用の 96 well plate (U 底) に分注しておく。(図 12)

	B 培地 必要量 (µl)	1 mM Ionomycin (µl)	100 µM PMA (µl)	99.5% EtOH (µl)	Total (µl)
Control	1000-10	-		10	1000
PMA/ionomycin	1000-12.5	10	2.5	-	1000

6-4 細胞賦活試薬 (PMA/ionomycin) の細胞への添加

被験物質刺激して 1 時間後、PMA/ionomycin による細胞賦活化処理を行う。0.5~10 µl の 8 チャンネルもしくは 12 チャンネルピペットマンを使用して、96 well plate (U 底) に分注した PMA/ionomycin もしくは Control 溶液 (Ethanol 溶媒コントロール) を 10 µl/well ずつ細胞に添加する (図 12)。添加の際にはチップの先を培地につけて確実に添加する。終了後、プレートシェーカーを使用して軽めに攪拌して混合する。混合したら、細胞をインキュベーターへ入れ、6 時間反応させる。

図 12



7 細胞賦活試薬 (LPS) の調整、149-14 細胞への添加

LPS は処理濃度の 50 倍の濃度を調整する。

7-1 準備

- ・ 調整済 1 mg/ml LPS -20°C で保管しておいたもの
- ・ ddw

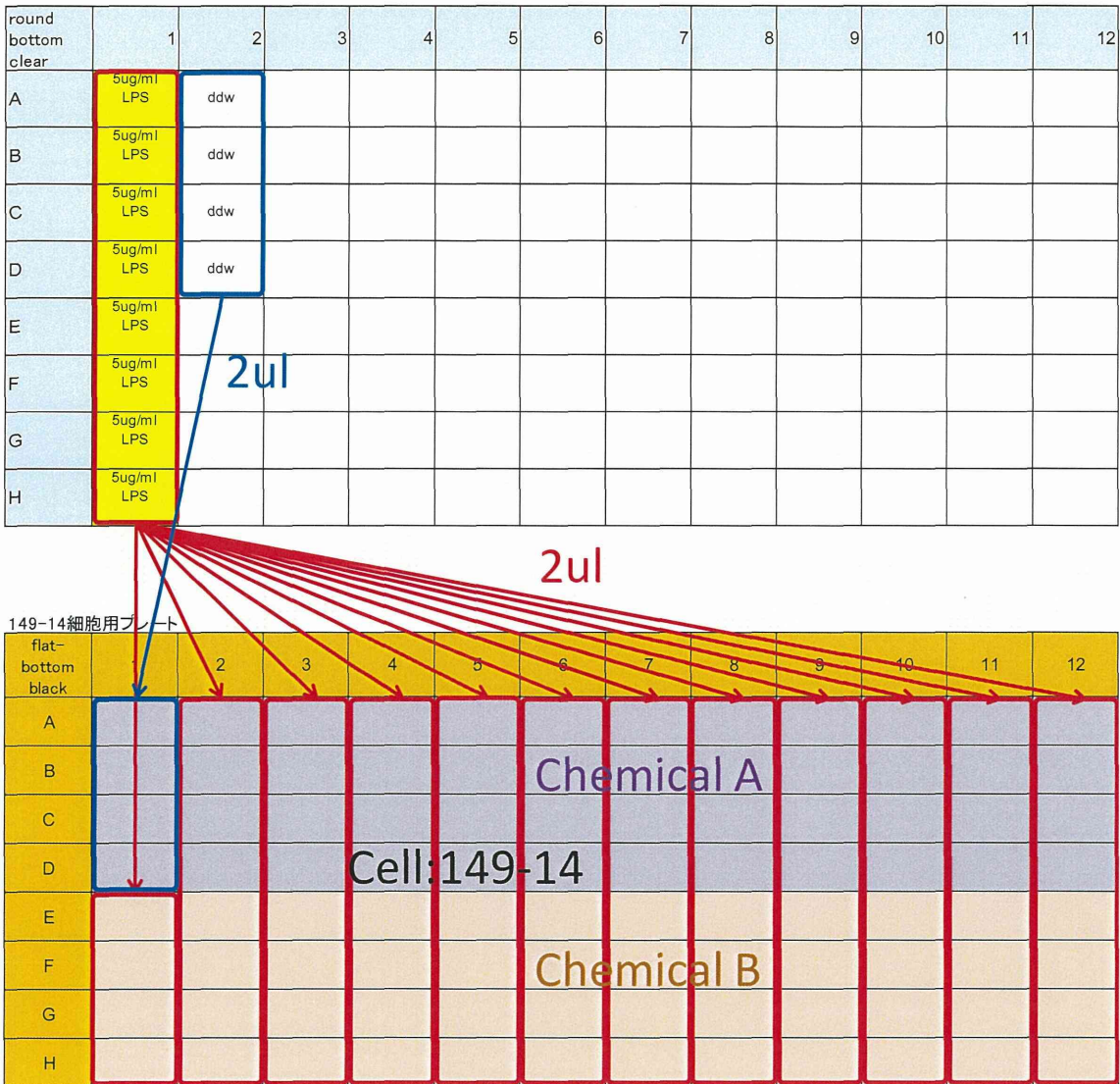
7-2 5 µg/ml PMA の調整方法

1 mg/ml LPS 水溶液 5 µl に Distilled water を 995 µl 加え 5 µg/ml とし、試薬添加用の 96 well plate (U 底) に分注しておく。またコントロール用の ddw も分注しておく。(図 13)

7-3 細胞賦活試薬 (LPS) の 149-14 細胞への添加

被験物質刺激して 1 時間後、LPS による細胞賦活化処理を行う。0.5~10 µl の 8 チャンネルもしくは 12 チャンネルピペットマンを使用して、96 well plate (U 底) に分注した LPS または ddw を各ウェルに 2 µl 分注する。コントロール用のウェル (#A1, #B1, #C1, #D1) には ddw を 2 µl/well ずつ細胞に添加する。(図 13) 添加の際にはチップの先を培地につけて確実に添加する。終了後、プレートシェーカーを使用して軽めに攪拌して混合する。混合したら、細胞をインキュベーターへ入れ、6 時間反応させる。

図 13



8 シグナルアッセイ(6時間後)

- ① Tripluc® Luciferase assay reagent (Tripluc)の容器を水に漬ける、あるいは室温で放置するなどにより、溶液が完全に室温に戻るよう溶解させる。光電子増倍管を安定させるため、ルミノメータは測定開始 30 分前には電源を入れる。
- ② リザーバーに Tripluc を移し、8 チャンネルもしくは 12 チャンネルピペットマンを使用して、反応終了後のアッセイプレートに 100 μ l/well ずつ分注する。
- ③ Tripluc 添加後、プレートシェーカーを使用して室温 (25 $^{\circ}$ C 前後) で 10 分間攪拌し、細胞を溶解させる。
- ④ well 内に大きな気泡等があれば針などで潰し、ルミノメータで Luciferase 活性を測定する。
- ⑤ フィルタ無し、フィルタ有りで各々3秒/well 測定する (アトー社製 Phelios の場合は F0 と F1 と F2 を使用)。測定終了後、フィルタ無し、フィルタ有りの測定値から以下の様にエクセルテンプレートを用い、SLG と SLO と SLR の発光値を算出する。

9 データ解析

アトーPhelios の場合:測定が終了した時点で画面には測定値を表示したウィンドウが表示されているのでまずファイルのタブから「名前を付けて保存」を選択し適宜保存する。AB-2350 Phelios という名前のソフトの拡張子.atm のファイルが作成される。次に、ファイルのタブからエクスポートを選択すると F0, F1 および F2 の測定値が 96 ウェルの形にならんだエクセルファイルが作成される。今回のアッセイのデザインにあわせたひな形のエクセルファイル(Data sheet for MITA #2H4 Ver. 002 20120831,)の「データ入力」のシートにフィルタの透過係数と測定値をペーストする。各ウェルの SLR-LA, SLO-LA, SLG-LA, nSLO-LA, nSLG-LA、および% suppression が算出される。被験物質の濃度が 5 x Cmax 以内の範囲、および 5 x Cmax を超える範囲における% suppression を求める。

判定に使用するパラメーター

SLG-luciferase activity (SLG-LA) : SLG のルシフェラーゼ活性
(IL-2 または IL-1 β プロモーターの下流で発現)

SLO-luciferase activity (SLO-LA) : SLO のルシフェラーゼ活性
(IFN- γ または IL-8 プロモーターの下流で発現)

SLR-luciferase activity (SLR-LA) : SLR のルシフェラーゼ活性
(G3PDH プロモーターの下流で発現)

Normalized SLG-LA (nSLG-LA) : SLG-LA / SLR-LA

(SLG-LA の値を SLR-LA の値で標準化した値)

Normalized SLO-LA (nSLO-LA) : SLO-LA / SLR-LA

(SLO-LA の値を SLR-LA の値で標準化した値)

Inhibition index of SLR-LA (I.I.-SLR-LA) :

化学物質添加時の SLR-LA / 無添加時の SLR-LA

(化学物質処理の有無による SLR-LA の変化)

% suppression :

(薬剤処理後のレポーター細胞の nSLG-LA または nSLO-LA) ÷
(薬剤処理で処理されていないレポーター細胞の nSLG-LA または nSLO-LA)

x 100

10. 変更履歴

Ver. 001.1J 2012.11.13 配布

THP-G8 の使用方法を付記として記載

Ver. 001J 2012.11.09 配布

付記：THP-G8 細胞を使う際の変更点

現在使用している THP-1 細胞由来の 149-14 細胞は SLG, SLO, SLR のうち SLR の発現が弱く単独では生存率の評価、SLG-LA、SLO-LA のノーマライズができません。暫定的に THP-G8 細胞を同様にアッセイし、その SLR-LA 値を代わりに使用することとしました。以下に THP-G8 でのアッセイ方法を示します。

2-1 使用する細胞

- THP-1 由来 2 色発光細胞株 THP-G8 (IL8-SLO、G3PDH-SLR)

(American Type Culture Collection より供与されたヒトマクロファージ様細胞株である THP-1 に、IL-8 プロモーター、GAPDH プロモーターの下流にそれぞれ SLO ルシフェラーゼ遺伝子、SLR ルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ 2 つのベクターを導入した安定細胞株 THP-G8 を東北大学医学部皮膚科学教室にて樹立した。(Takahashi T. et al. An in vitro test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicol Sci*, 124(2), 359-369, 2011, International patent publication No. ; WO2012/002507A1)

2-2-5 培地作製方法

以下の培地を下記の通り混合して作製する。(＃2H4, 149-14 用の A 培地の他、Hygromycin を含まない培地を作製しこれを THP-G8 用の A 培地として細胞培養に使用する)。

1) A 培地(THP-G8 用: 通常の細胞維持に使用する培地 (500 ml 作製, 冷蔵保管)

0.15 µg/ml Puromycin +300 µg/ml G418+10% FBS+1×Antibiotic-Antimycotic

試薬名	メーカー	濃度	培地中の終濃度	必要量
RPMI-1640	GIBCO #11875-093	-	-	442 ml
FBS (非働化済)	Biological Industries Cat#04-001-1E Lot:715004	-	10%	50 ml
Antibiotic-Antimycotic	GIBCO #15240-062	100×	1×	5 ml
Puromycin	InvivoGen # ant-pr-1	10 mg/ml	0.15 µg/ml	7.5 µl
G418	ナカライテスク #16513-84	50mg/ml	300 µg/ml	3 ml

<注意点> Puromycin の添加量を厳守する。