

図 9

| round bottom clear | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------------|----------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| A | DMSO 100% 50ul | PD1 0.5 mg/ml in DMSO 100ul | PD1 1.0 mg/ml in DMSO 50ul | PD1 2.0 mg/ml in DMSO 50ul | PD1 3.9 mg/ml in DMSO 50ul | PD1 7.8 mg/ml in DMSO 50ul | PD1 16 mg/ml in DMSO 50ul | PD1 31 mg/ml in DMSO 50ul | PD1 63 mg/ml in DMSO 50ul | PD1 125 mg/ml in DMSO 50ul | PD1 250 mg/ml in DMSO 50ul | PD1 500 mg/ml in DMSO 50ul |
| B | B medium 180ul | B medium 180ul | B medium 180ul | B medium 180ul | B medium 180ul | B medium 180ul | B medium 180ul | B medium 180ul | B medium 180ul | B medium 180ul | B medium 180ul | B medium 180ul |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

20ul

| round bottom clear | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------------|---|--|--|--|--|--|---|---|---|--|--|--|
| A | DMSO 100% 30ul | PD1 0.5 mg/ml in DMSO 30ul | PD1 1.0 mg/ml in DMSO 30ul | PD1 2.0 mg/ml in DMSO 30ul | PD1 3.9 mg/ml in DMSO 30ul | PD1 7.8 mg/ml in DMSO 30ul | PD1 16 mg/ml in DMSO 30ul | PD1 31 mg/ml in DMSO 30ul | PD1 63 mg/ml in DMSO 30ul | PD1 125 mg/ml in DMSO 30ul | PD1 250 mg/ml in DMSO 30ul | PD1 500 mg/ml in DMSO 30ul |
| B | IPDI 0 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul | IPDI 0.05 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul | IPDI 0.10 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul | IPDI 0.20 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul | IPDI 0.39 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul | IPDI 0.78 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul | IPDI 1.6 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul | IPDI 3.1 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul | IPDI 6.3 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul | IPDI 12.5 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul | IPDI 25 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul | IPDI 50 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul |
| 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、20 μl を取り出し、アッセイブロックの中の B 培地 980 μl に加える (50 倍に希釈される、図 10)。

図 10

| round bottom clear | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------------|---|--|--|--|--|--|---|---|---|--|--|--|
| A | DMSO 100% 30ul | PD1 0.5 mg/ml in DMSO 30ul | PD1 1.0 mg/ml in DMSO 30ul | PD1 2.0 mg/ml in DMSO 30ul | PD1 3.9 mg/ml in DMSO 30ul | PD1 7.8 mg/ml in DMSO 30ul | PD1 16 mg/ml in DMSO 30ul | PD1 31 mg/ml in DMSO 30ul | PD1 63 mg/ml in DMSO 30ul | PD1 125 mg/ml in DMSO 30ul | PD1 250 mg/ml in DMSO 30ul | PD1 500 mg/ml in DMSO 30ul |
| B | IPDI 0 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul | IPDI 0.05 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul | IPDI 0.10 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul | IPDI 0.20 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul | IPDI 0.39 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul | IPDI 0.78 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul | IPDI 1.6 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul | IPDI 3.1 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul | IPDI 6.3 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul | IPDI 12.5 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul | IPDI 25 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul | IPDI 50 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

20ul

| Assay B bck | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| A | B medium 980ul | B medium 980ul | B medium 980ul | B medium 980ul | B medium 980ul | B medium 980ul | B medium 980ul | B medium 980ul | B medium 980ul | B medium 980ul | B medium 980ul | B medium 980ul |
| 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 回ピペット

イング後、#2H4 細胞、THP-G8 細胞、THP-G1b 細胞の入ったプレートの上半分に 50 μ l 加える。(2 倍に希釈される、図 11)

2-MBT についても 5-2-1 から 5-2-5 を同様に繰り返し 3 枚のプレートの下半分に添加する。(図 12) 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。

図 11

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

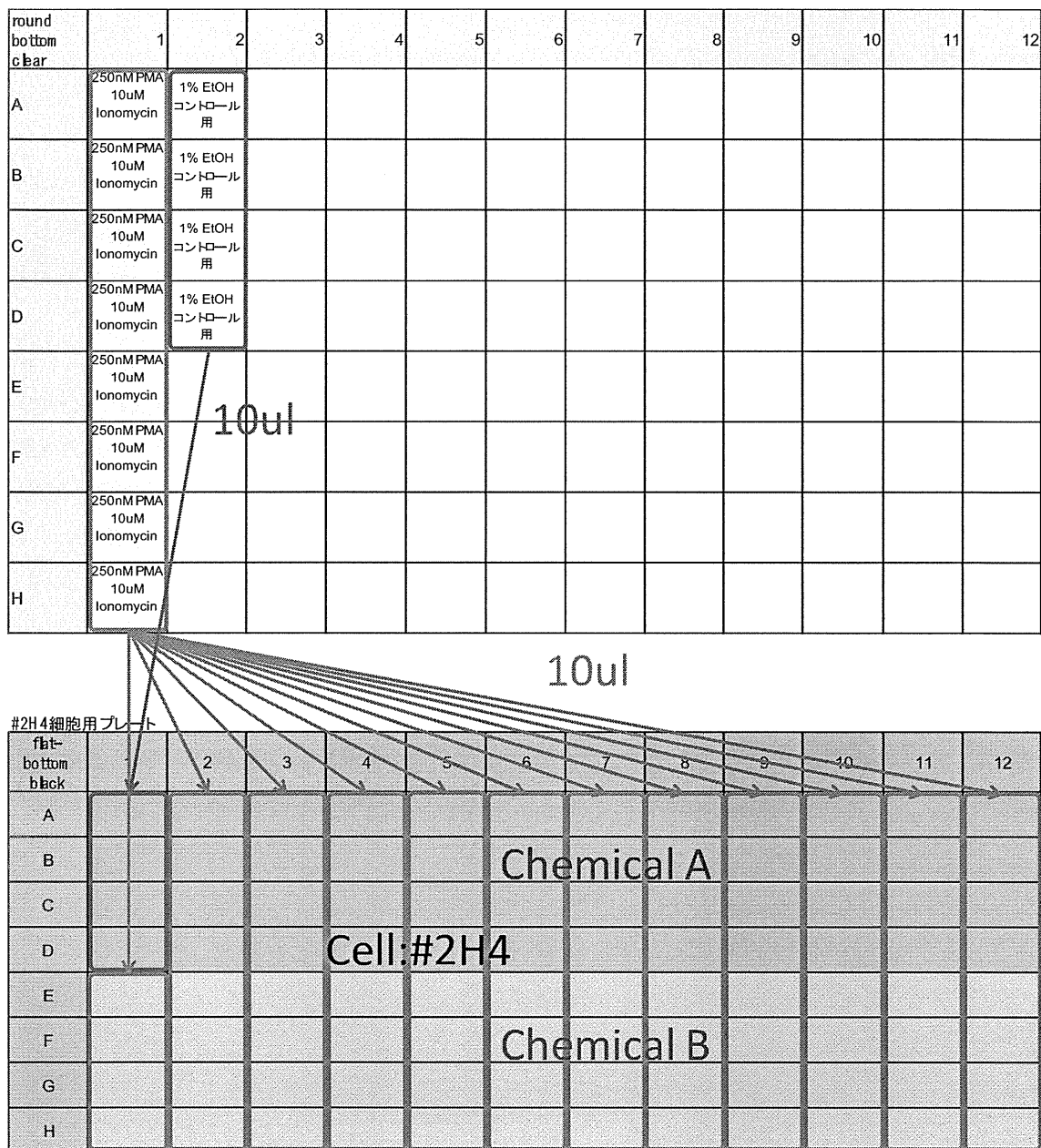
下表のように 250nM PMA 10µM ionomycin 溶液を調製する (10 倍濃度) また EtOH を含む Control 液を調製し試薬添加用の 96 well plate (U 底) に分注しておく。(図 18)

| | B 培地 必要量 (µl) | 1 mM Ionomycin (µl) | 100 µM PMA (µl) | 99.5% EtOH (µl) | Total (µl) |
|---------------|---------------------|---------------------------|--------------------|-----------------------|------------|
| Control | 990 | - | | 10 | 1000 |
| PMA/ionomycin | 987.5 | 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 18)。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、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



7 細胞賦活試薬 (LPS) の調整、THP-G8, THP-G1b 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

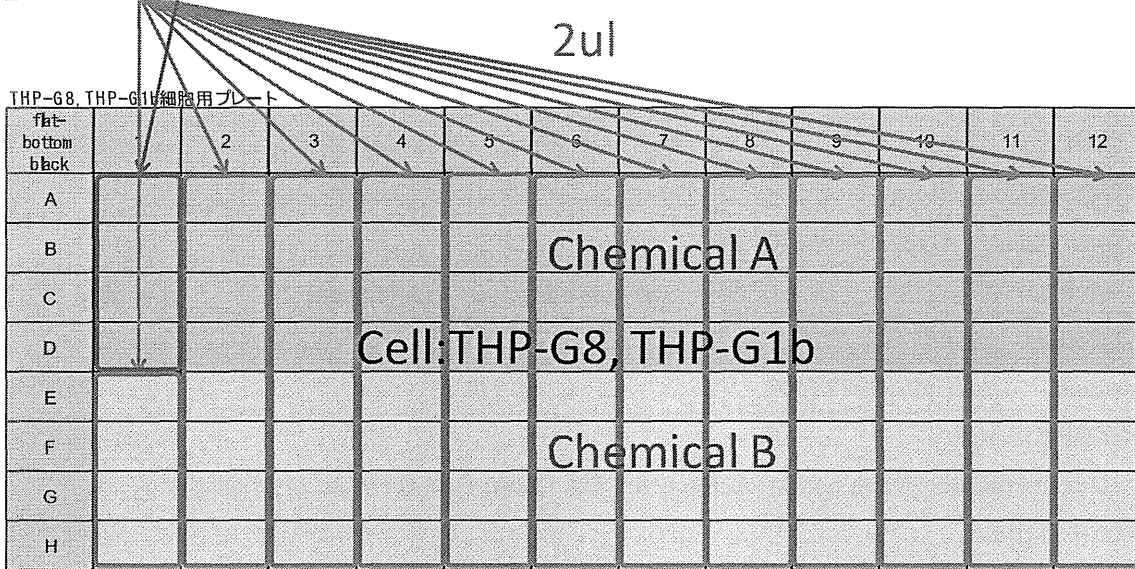
7-2 1.25 µg/ml LPS の調整方法

1 mg/ml LPS 水溶液 5 µl に Distilled water を 995 µl 加え 5 µg/ml とし、さらに 4 倍希釈し、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 14)

7-3 細胞賦活試薬 (LPS) の THP-G8, THP-G1b 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 14) 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、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。

| | | | | | | | | | | | | |
|---|-------------------|-----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| F | 1.25 ug/ml LPS | 2ul | | | | | | | | | | |
| G | 1.25 ug/ml LPS | | | | | | | | | | | |
| H | 1.25 ug/ml LPS | | | | | | | | | | | |



8 コントロール(dexamethasone, cyclosporin A) の調製

8-1 dexamethasone の調製方法

| 試薬名 | メーカー | ストック濃度 | 使用時希釈濃度 | 終濃度 |
|-----------------------------|------------------------|----------|----------|---------|
| Dexamethasone-water soluble | Sigma #D2915-100MG | 60 mg/ml | 50 mg/ml | 1 mg/ml |
| Distilled water | GIBCO Cat#10977-015 | | | |

<作製方法>

Dexamethasone-water soluble 100 mg を溶媒 Distilled water 1656 μ l に溶解する。

<保存方法>

- ・ 50 μ l/tube に分注し、冷凍保存。
- ・ 小分注したものは1回融解で使い捨てること。

8-2 細胞の調製方法

#2H4 細胞については 4×10^6 /ml、THP-G8、THP-G1b 細胞については 1×10^6 /ml となるように B 培地に細胞を懸濁する。図のように#2H4 細胞についてはアッセイプレート (greiner 96 well black plate)の#A1-#D3、THP-G8 細胞については#E1-#H3、THP-G1b 細胞については#E4-#H6 に 50 μ l/well で分注する。(図 15)

図 15

| flat-bottom black | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------------------|--|--|--|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | #2H4 2×10^5 cell B medium 50ul | #2H4 2×10^5 cell B medium 50ul | #2H4 2×10^5 cell B medium 50ul | | | | | | | | | |
| B | #2H4 2×10^5 cell B medium 50ul | #2H4 2×10^5 cell B medium 50ul | #2H4 2×10^5 cell B medium 50ul | | | | | | | | | |
| C | #2H4 2×10^5 cell B medium 50ul | #2H4 2×10^5 cell B medium 50ul | #2H4 2×10^5 cell B medium 50ul | | | | | | | | | |
| D | #2H4 2×10^5 cell B medium 50ul | #2H4 2×10^5 cell B medium 50ul | #2H4 2×10^5 cell B medium 50ul | | | | | | | | | |
| E | THP-G8 5×10^4 cell B medium 50ul | THP-G8 5×10^4 cell B medium 50ul | THP-G8 5×10^4 cell B medium 50ul | THP-G1b 5×10^4 cell B medium 50ul | THP-G1b 5×10^4 cell B medium 50ul | THP-G1b 5×10^4 cell B medium 50ul | | | | | | |
| F | THP-G8 5×10^4 cell B medium 50ul | THP-G8 5×10^4 cell B medium 50ul | THP-G8 5×10^4 cell B medium 50ul | THP-G1b 5×10^4 cell B medium 50ul | THP-G1b 5×10^4 cell B medium 50ul | THP-G1b 5×10^4 cell B medium 50ul | | | | | | |
| G | THP-G8 5×10^4 cell B medium 50ul | THP-G8 5×10^4 cell B medium 50ul | THP-G8 5×10^4 cell B medium 50ul | THP-G1b 5×10^4 cell B medium 50ul | THP-G1b 5×10^4 cell B medium 50ul | THP-G1b 5×10^4 cell B medium 50ul | | | | | | |
| H | THP-G8 5×10^4 cell B medium 50ul | THP-G8 5×10^4 cell B medium 50ul | THP-G8 5×10^4 cell B medium 50ul | THP-G1b 5×10^4 cell B medium 50ul | THP-G1b 5×10^4 cell B medium 50ul | THP-G1b 5×10^4 cell B medium 50ul | | | | | | |

8-3 試薬の配置

Distilled water 50 μ l(#A1, #A2)、DEX 60 mg/ml stock 50 μ l に distilled water 10 μ l を加えたもの(#A3)を下図のように 96 well clear plate (丸底)に分注する (図 16)。

図 16

| round bottom clear | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------------|----------------------|----------------------|--|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | Distilled water 50ul | Distilled water 50ul | DEX 60 mg/ml stock 50ul + distilled water 10ul | | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

8-4 2段階希釈

40 μ l を取り出し、アッセイブロックの中の B 培地 960 μ l に加える (25 倍に希釈される、図 17)。

図 17

| round bottom clear | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------------|----------------------|----------------------|--|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | Distilled water 50ul | Distilled water 50ul | DEX 60 mg/ml stock 50ul + distilled water 10ul | | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | 40ul | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

| Assay B bck | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------------|----------------|----------------|----------------|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | B medium 960ul | B medium 960ul | B medium 960ul | | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

8-5 細胞への添加

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、#2H4 細胞、THP-G8 細胞、THP-G1b 細胞の入ったプレートの 50 μ l 加える。(2 倍に希釈される、図 18、19)

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。

図 18

| Assay | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-------|--------------------|--------------------|---------------------------------|---|------|---|---|---|---|----|----|----|
| B bck | | | | | | | | | | | | |
| A | B medium 1000ul | B medium 1000ul | DEX2mg/ml B medium 1000ul | | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | 50ul | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

| flat-bottom bck | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------------|--|--|--|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | #2H4 2x10 ⁵ cell B medium 50ul | #2H4 2x10 ⁵ cell B medium 50ul | #2H4 2x10 ⁵ cell B medium 50ul | | | | | | | | | |
| B | #2H4 2x10 ⁵ cell B medium 50ul | #2H4 2x10 ⁵ cell B medium 50ul | #2H4 2x10 ⁵ cell B medium 50ul | | | | | | | | | |
| C | #2H4 2x10 ⁵ cell B medium 50ul | #2H4 2x10 ⁵ cell B medium 50ul | #2H4 2x10 ⁵ cell B medium 50ul | | | | | | | | | |
| D | #2H4 2x10 ⁵ cell B medium 50ul | #2H4 2x10 ⁵ cell B medium 50ul | #2H4 2x10 ⁵ cell B medium 50ul | | | | | | | | | |
| E | THP-G8 5x10 ⁴ cell B medium 50ul | THP-G8 5x10 ⁴ cell B medium 50ul | THP-G8 5x10 ⁴ cell B medium 50ul | THP-G1b 5x10 ⁴ cell B medium 50ul | THP-G1b 5x10 ⁴ cell B medium 50ul | THP-G1b 5x10 ⁴ cell B medium 50ul | | | | | | |
| F | THP-G8 5x10 ⁴ cell B medium 50ul | THP-G8 5x10 ⁴ cell B medium 50ul | THP-G8 5x10 ⁴ cell B medium 50ul | THP-G1b 5x10 ⁴ cell B medium 50ul | THP-G1b 5x10 ⁴ cell B medium 50ul | THP-G1b 5x10 ⁴ cell B medium 50ul | | | | | | |
| G | THP-G8 5x10 ⁴ cell B medium 50ul | THP-G8 5x10 ⁴ cell B medium 50ul | THP-G8 5x10 ⁴ cell B medium 50ul | THP-G1b 5x10 ⁴ cell B medium 50ul | THP-G1b 5x10 ⁴ cell B medium 50ul | THP-G1b 5x10 ⁴ cell B medium 50ul | | | | | | |
| H | THP-G8 5x10 ⁴ cell B medium 50ul | THP-G8 5x10 ⁴ cell B medium 50ul | THP-G8 5x10 ⁴ cell B medium 50ul | THP-G1b 5x10 ⁴ cell B medium 50ul | THP-G1b 5x10 ⁴ cell B medium 50ul | THP-G1b 5x10 ⁴ cell B medium 50ul | | | | | | |

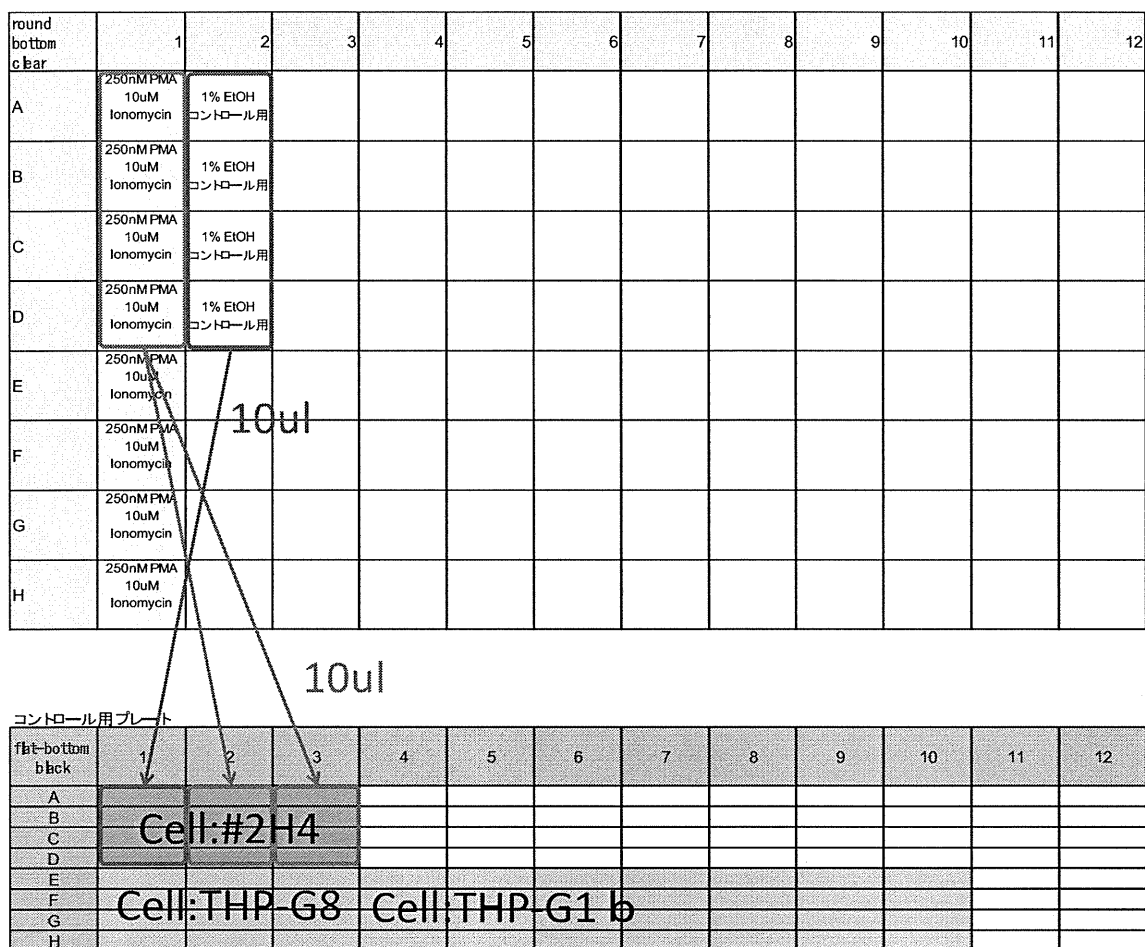
図 19 プレートにまき終わった状態

| flat-bottom black | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------------------|---|---|--|--|--|---|---|---|---|----|----|----|
| A | #2H4 2x10 ⁵ cell B medium 100ul | #2H4 2x10 ⁵ cell B medium 100ul | #2H4 2x10 ⁵ cell DEX 1mg/ml B medium 100ul | | | | | | | | | |
| B | #2H4 2x10 ⁵ cell B medium 100ul | #2H4 2x10 ⁵ cell B medium 100ul | #2H4 2x10 ⁵ cell DEX 1mg/ml B medium 100ul | | | | | | | | | |
| C | #2H4 2x10 ⁵ cell B medium 100ul | #2H4 2x10 ⁵ cell B medium 100ul | #2H4 2x10 ⁵ cell DEX 1mg/ml B medium 100ul | | | | | | | | | |
| D | #2H4 2x10 ⁵ cell B medium 100ul | #2H4 2x10 ⁵ cell B medium 100ul | #2H4 2x10 ⁵ cell DEX 1mg/ml B medium 100ul | | | | | | | | | |
| E | THP-G8 2x10 ⁵ cell B medium 100ul | THP-G8 2x10 ⁵ cell B medium 100ul | THP-G8 2x10 ⁵ cell DEX 1mg/ml B medium 100ul | THP-G1b 2x10 ⁵ cell B medium 100ul | THP-G1b 2x10 ⁵ cell B medium 100ul | THP-G1b 2x10 ⁵ cell DEX 1mg/ml B medium 100ul | | | | | | |
| F | THP-G8 2x10 ⁵ cell B medium 100ul | THP-G8 2x10 ⁵ cell B medium 100ul | THP-G8 2x10 ⁵ cell DEX 1mg/ml B medium 100ul | THP-G1b 2x10 ⁵ cell B medium 100ul | THP-G1b 2x10 ⁵ cell B medium 100ul | THP-G1b 2x10 ⁵ cell DEX 1mg/ml B medium 100ul | | | | | | |
| G | THP-G8 2x10 ⁵ cell B medium 100ul | THP-G8 2x10 ⁵ cell B medium 100ul | THP-G8 2x10 ⁵ cell DEX 1mg/ml B medium 100ul | THP-G1b 2x10 ⁵ cell B medium 100ul | THP-G1b 2x10 ⁵ cell B medium 100ul | THP-G1b 2x10 ⁵ cell DEX 1mg/ml B medium 100ul | | | | | | |
| H | THP-G8 2x10 ⁵ cell B medium 100ul | THP-G8 2x10 ⁵ cell B medium 100ul | THP-G8 2x10 ⁵ cell DEX 1mg/ml B medium 100ul | THP-G1b 2x10 ⁵ cell B medium 100ul | THP-G1b 2x10 ⁵ cell B medium 100ul | THP-G1b 2x10 ⁵ cell DEX 1mg/ml B medium 100ul | | | | | | |

8-6 細胞賦活試薬 (PMA/ionomycin) の#2H4 細胞への添加

コントロール物質で刺激し 1 時間後、PMA/ionomycin による細胞賦活化処理を行う。0.5~10 μ l 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、**6-4** で 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 μ l/well ずつ細胞に添加する (図 20)。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。

図 20



8-7 細胞賦活試薬 (LPS) の THP-G8, THP-G1b 細胞への添加

続いて、LPS による細胞賦活処理を行う。0.5~10 μ l 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、7-2 で 96 well plate (U 底) に分注した LPS または ddw を各ウェルに 2 μ l 分注する。コントロール用のウェルには ddw を 2 μ l/well ずつ細胞に添加する。(図 21) 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、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 21

| round bottom clear | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------------------|-------------------|-----|-----|---|-----|---|---|---|---|----|----|----|
| A | 1.25 ug/ml LPS | ddw | | | | | | | | | | |
| B | 1.25 ug/ml LPS | ddw | | | | | | | | | | |
| C | 1.25 ug/ml LPS | ddw | | | | | | | | | | |
| D | 1.25 ug/ml LPS | ddw | | | | | | | | | | |
| E | 1.25 ug/ml LPS | | 2ul | | | | | | | | | |
| F | 1.25 ug/ml LPS | | | | | | | | | | | |
| G | 1.25 ug/ml LPS | | | | 2ul | | | | | | | |
| H | 1.25 ug/ml LPS | | | | | | | | | | | |

コントロール用プレート

| flat-bottom black | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------------------|-------------|---|--------------|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | Cell:#2H4 | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | Cell:THP-G8 | | Cell:THP-G1b | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

9 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 (25 °C前後) に戻るように溶解させる。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 °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: #2H4 細胞とコントロールプレートは F0 と F1 と F2 を使用、THP-G8 細胞、THP-G1b 細胞は F0 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を用い、SLG と SLO と SLR の発光値を算出する。

10 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. 002.1 20121113, Data sheet for MITA THP-G8 Ver. 002.1 20121113)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。

THP-1 細胞由来の THP-G1b 細胞は SLG-LA, SLR-LA のうち SLR-LA の発現が弱く単独では生存率の評価、SLG-LA のノーマライズができない。暫定的に同時にした THP-G8 細胞の SLR-LA を代わりに使用することとした。

同時にアッセイした THP-G8 の値を入力した Data sheet for MITA THP-G8 Ver. 002.1 20121113 の「Result Format 2」シートの SLR-LA を表示した部分#B24-#M31 を、THP-G1b の値を入力した Data sheet for MITA THP-G8 Ver. 002.1 20121113 の「Result Format 2」シートの SLR-LA を表示した部分#B24-#M31 にペーストする(値

で貼り付けする)。その結果、THP-G1b 細胞についての nSLG-LA、および IL-1 β についての% suppression があたらしく算出される。

データの解析については生存率(I.I.-SLR-LA)が 0.05 以上の範囲において、各濃度毎に PMA/I α 単独、LPS 単独と比べ、サイトカインプロモーター活性が抑制されているかまたは亢進されているか 5%の有意水準で One way anova→Dunnett 検定をおこない判定する (+ : immunostimulation, - : immunosuppression, 0 : non-significant change, +と-が混在するものは+-と記載する)。同じ化学物質について 3 回アッセイを行い 3 回とも結果が一致したものはその結果をもって最終結果とする (S : immunosuppressive drug, A : immunostimulatory drug, N : not effective drug)。一致しなかったものはそれぞれのアッセイでもっともコントロール値より離れた%suppression の値で Student-t 検定を行い、5%の有意水準で有意なものはその結果を最終結果 (S : immunosuppressive drug, A : immunostimulatory drug) とし、有意でなかったものは N : not effective drug とする。

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) \div
(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

11. 変更履歴

Ver. 002.0J 2013.08.19 配布

産総研筑波、食薬センター施設間試験用（化学物質 CoCl₂, NiSO₄, Isophorone diisocyanate, 2-Mercaptobenzothiazole）

公比を 3 から 2 に変更

LPS の濃度を 100ng/ml から 25ng/ml に変更

コントロール(dexamethasone)についての記載を追加

THP-G8 についての付記を削除

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



MultiReporter Assay System - Triluc[®] - Calculation Sheet (3色分離用)

(1) SLG、SLO、SLRルシフェラーゼ単独のサンプルの測定値を下記にインプットし、各フィルター透過率を算出します。

| SLG | 測定値 | | | | 透過率 | | | F1 Filter 1 測定値 | F2 Filter 2 測定値 | F3 Filter 3 測定値 | no Filter Filterなしでの測定値 |
|---------|-----|----|----|-----------|--------|--------|--------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------------|
| | F1 | F2 | F3 | no Filter | T1 | T2 | T3 | | | | |
| sample1 | | | | | #DN/0! | #DN/0! | #DN/0! | | | | |
| sample2 | | | | | #DN/0! | #DN/0! | #DN/0! | | | | |
| sample3 | | | | | #DN/0! | #DN/0! | #DN/0! | | | | |
| | | | | 平均 | #DN/0! | #DN/0! | #DN/0! | | | | |

| SLO | 測定値 | | | | 透過率 | | | SLG | SLO | SLR |
|---------|-----|----|----|-----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | F1 | F2 | F3 | no Filter | T1 | T2 | T3 | | | |
| sample1 | | | | | #DN/0! | #DN/0! | #DN/0! | #DN/0! | #DN/0! | #DN/0! |
| sample2 | | | | | #DN/0! | #DN/0! | #DN/0! | #DN/0! | #DN/0! | #DN/0! |
| sample3 | | | | | #DN/0! | #DN/0! | #DN/0! | #DN/0! | #DN/0! | #DN/0! |
| | | | | 平均 | #DN/0! | #DN/0! | #DN/0! | | | |

| SLR | 測定値 | | | | 透過率 | | |
|---------|-----|----|----|-----------|--------|--------|--------|
| | F1 | F2 | F3 | no Filter | T1 | T2 | T3 |
| sample1 | | | | | #DN/0! | #DN/0! | #DN/0! |
| sample2 | | | | | #DN/0! | #DN/0! | #DN/0! |
| sample3 | | | | | #DN/0! | #DN/0! | #DN/0! |
| | | | | 平均 | #DN/0! | #DN/0! | #DN/0! |

| | T1 | T2 | T3 |
|-----|--------|--------|--------|
| SLG | #DN/0! | #DN/0! | #DN/0! |
| SLO | #DN/0! | #DN/0! | #DN/0! |
| SLR | #DN/0! | #DN/0! | #DN/0! |

→ Data入力シートのTransmittance DATAにこのデータをコピーしてください。

(2) Data入力シート]のFilter 1~3に、サンプルの各フィルター測定値を入力してください。

(3) Result Format 1]及びResult Format 2]にSLG、SLO、SLRの算出結果が表示されます。

資料 2.

Data sheet for MITA #2H4 Ver.004 20131106.xlsx、data入力シート

| MultiReporter Assay System-TriInuc [®] - Calculation Sheet | | | | | | | | | | | | |
|---|-----|-----|-----|---------|---------|---------|---|---|---|----|----|----|
| Transmittance Data | | | | | | | | | | | | |
| | SLG | SLO | SIR | | | | | | | | | |
| T1 | 1 | 1 | 1 | #VALUE! | #VALUE! | #VALUE! | | | | | | |
| T2 | | | | #VALUE! | #VALUE! | #VALUE! | | | | | | |
| T3 | | | | #VALUE! | #VALUE! | #VALUE! | | | | | | |
| Filter 1 Data | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |
| Filter 2 Data | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |
| Filter 3 Data | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |