

## 図の説明

図 1. MITA の構成するレポーター細胞と各種パラメーター

図 2. MITA2 による免疫毒性判定基準

図 3. 人工染色体を用いて作成した新規 IL-1 $\beta$ レポーター細胞

新たに樹立した TGCHAC-A1, TGCHAC-A4, TGCHAC-B1 および THP-G1b 細胞を  $5 \times 10^4$  細胞/100 $\mu$ l/ウェルを 96 プレートに播種し、図示した濃度の LPS で刺激し 37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$  下で 6 時間培養後ルシフェラーゼ活性を測定した。左軸に SLR-LA (赤棒)、SLG-LA (緑棒)、右軸に nSLG-LA (黒線) を示す。(n=4)

図 4. 新しく樹立した IL-1 $\beta$  レポーター細胞 TGCHAC-4A と THP-G1b の増殖速度の違い  
TGCHAC-4A と THP-G1b を 10%ウシ胎児血清および図示された抗生剤を加えた RPMI-1640 にて 37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$  下で培養し、経時的に細胞数を測定した。

図 5. TGCHAC-A4 細胞の THP-G1b 細胞の同等性の証明  
THP-G1b, TGCHAC-A4 および THP-G8 細胞を  $5 \times 10^4$  細胞/50 $\mu$ l/ウェルを 96 プレートに播種、図示された濃度の dexamethasone, cyclosporin A で 1 時間前処理し、10ng/ml または 25ng/ml の LPS で刺激し 37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$  下で 6 時間培養後ルシフェラーゼ活性を測定した。1 列目、2 列目については nSLG-LA を算出する際に THP-G8 細胞の

SLR-LA を利用した。4 列目については nSLG-LA を算出する際に TGCHAC-A4 の SLR-LA を利用した。nSLG-LA (緑棒) または nSLO-LG (オレンジ棒) を示す。(n=4)

図 6. TGCHAC-A4 細胞の施設間差試験 (LPS)

TGCHAC-A4 および THP-G8 細胞を  $1 \times 10^5$  細胞/100 $\mu$ l/ウェルを 96 プレートに播種、図示された濃度の LPS で刺激し 37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$  下で 6 時間培養後ルシフェラーゼ活性を測定した。左軸に SLR-LA (赤棒)、SLG-LA (緑棒) または SLO-LA (オレンジ棒)、右軸に nSLG-LA または nSLO-LA (黒線) を示す。(n=4)

図 7. TGCHAC-4A 細胞の施設間差試験 (Dex and CyA)

TGCHAC-A4 および THP-G8 細胞を  $1 \times 10^5$  細胞/100 $\mu$ l/ウェルを 96 プレートに播種、図示された濃度の dexamethasone, cyclosporin A で 1 時間前処理し、10ng/ml の LPS で刺激し 37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$  下で 6 時間培養後ルシフェラーゼ活性を測定した。左軸に SLR-LA (赤棒)、SLG-LA (緑棒) または SLO-LA (オレンジ棒)、右軸に nSLG-LA (緑線) または nSLO-LA (オレンジ線) を示す。

(n=4)

図 8. Cyclosporin A, Methotrexate に対する 24 時間前培養の影響

#2H4 細胞、THP-G1b 細胞および THP-G8 細胞を 96 プレートに播種、図示された濃度の cyclosporin A (CyA) または methotrexate (MTX) で 1 時間 (上 2 段) または 24 時間 (下 2 段) 前処理し、PMA/I $\alpha$  または LPS で刺激し 37°C、5%CO $_2$  下で 6 時間培養後ルシフェラーゼ活性を測定した。nSLG-LA (緑棒) または nSLO-LA (オレンジ棒) を示す。(n=4)

図 9. Cyclophosphamide, Mizoribine に対する 24 時間前培養の影響

#2H4 細胞、THP-G1b 細胞および THP-G8 細胞を 96 プレートに播種、図示された濃度の cyclophosphamide (CP) または mizoribine (MZR) で 1 時間 (上 2 段) または 24 時間 (下 2 段) 前処理し、PMA/I $\alpha$  または LPS で刺激し 37°C、5%CO $_2$  下で 6 時間培養後ルシフェラーゼ活性を測定した。nSLG-LA (緑棒) または nSLO-LA (オレンジ棒) を示す。(n=4)

Table 1. MITAによるWagner化学物質の評価

Chemicals	IL-2		IFN- $\gamma$		IL-1 $\beta$		IL-8		報告されている免疫作用
2,4-Diaminotoluene	+/-	N	+/+	A	+/-	N	0/-*	S	抗体産生 $\downarrow$ , NK $\uparrow$
2-Aminoanthracene	-/-	S	-/-	S	-/-	S	+0/+	N	抗体産生 $\downarrow$ , NK $\downarrow$ , DTH $\downarrow$
2-Mercaptobenzothiazole	+/-+	N	-/+	N	0/+0	N	-/-	S	感作性
Acetaminophen	+/++	A	+/+	A	+/+	A	+/+	A	
Aluminum chloride	-/-	S	-/-	S	+/-+	N	+/-+	N	喘息
Amphoterycin B	-/-	S	-/-	S	+0/+*	A	+0/+*	A	サイトカイン産生 $\uparrow$
Benzethonium chloride	-/-	S	-/-	S	-/-	S	-0/-	N	感作性
Chlorpromazine	-/-	S	-/-	S	-/-	S	-/-	S	NK $\uparrow$ , 光感作性
Cisplatin	-/-	S	-/-	S	+/+0	N	-/+	N	アナフィラキシー, DTH $\downarrow$ , LLNA+
Cobalt chloride	-/-	S	-/-	S	-/-	S	-/-	S	感作性
Cyclophosphamide	+0/-	N	+/+	A	0/0-	N	0/+	N	感作性
Cyclosporine A	-/-	S	-/-	S	0/0/0	N	0/0	N	免疫抑制
Dapsone	-/-	S	-/-	S	-/-	S	-/-	S	免疫抑制
Dexamethasone	-/-	S	-/+	N	-/-	S	-/-	S	免疫抑制
Diethanolamin	-/-	S	-/+	N	0/0	N	-/+	N	喘息, 感作性, 抗体産生 $\downarrow$ , NK $\downarrow$ , CSM $\downarrow$
Ethanol	0/-	N	0/0/0	N	0/0	N	0/0	N	
FK 506	-/-	S	-/-	S	+/+	A	-/+0	N	免疫抑制
Hydrocortisone	-/-	S	+/+	A	-/-	S	-/-	S	免疫抑制
Hydrogen peroxide	-/-	S	-/-	S	-0/0	N	-0/0	N	酸化ストレス
Isoniazid	-/-	S	-/+0	N	+/-	N	-/-	S	CSM $\uparrow$ , cytotoxicity $\uparrow$ , Ig $\downarrow$
Isophorone diisocyanate	-/-	S	+/-+	N	-/-	S	-/-	S	感作性
Lead(II) acetate	-/-	S	-/-	S	+0/+	N	0/-	N	免疫抑制
Lithium carbonate	-/-	S	+/+	A	-/-	S	-/-	S	免疫増強
Magnesium sulfate	-/0	N	+/+	N	-/0*	S	-0/-	N	
Mercuric chloride	-0/0	N	+/+	A	-/-	S	-/-	S	感作性, アレルギー反応, 自己免疫
Methanol	-/+	N	-/+	N	0/0	N	+/-	N	NK $\downarrow$
Mitomycin C	-/-	S	+/-	N	+0/-	N	+0/-	N	感作性, 免疫複合体病
Nickel sulfate	-/-	S	-/-	S	-/-	S	-/-	S	感作性
Nitrofurazone	-/-	S	+/+	A	+/+	A	+/+	A	感作性
p-Nitroaniline	-/-	S	-/-	S	-/-	S	-/-	S	cytotoxicity $\downarrow$ , CSM $\downarrow$ , NK $\uparrow$ , 抗体産生 $\uparrow$ , Ig $\downarrow$
Sodium bromate	-/-	S	+/-0	N	-/+	N	-0/+	N	Ig $\uparrow$
Triethanolamine	-/-	S	-/-	S	-/0	N	-/+	N	感作性

- and + mean significant suppression and augmentation by one-way ANOVA followed by a Dunnett's post-hoc test compared with the control group, respectively. 0 means no significant change.

\* means statistical significance by Student's t test

S, A, and N indicate immunosuppression, immunostimulation, and no effects in final judgment, respectively.

Table 2. 4物質3施設によるMITAの施設間比較試験(技術移転  
確認)

	東北大学皮膚科	産総研	食薬センター
<b>CoCl<sub>2</sub></b>			
IL-2	S (-/-)	S (-/-)	S (-/+/-*)
IFN- $\gamma$	S (-/-+*)	S (-/-)	S (-/-)
IL-1 $\beta$	S (-/-)	S (-/-)	N (+/+/-)
IL-8	S (-/-)	S (+/-/+*)	N (+/+/-)
<b>NiSO<sub>4</sub></b>			
IL-2	S (-/-)	S (-/-)	S (-/+/-*)
IFN- $\gamma$	S (+/-/-*)	S (-/-)	S (-/-)
IL-1 $\beta$	S (-/-)	S (-/-)	N (+/+/-)
IL-8	S (-/+/-*)	S (-/-)	A (+/+/-*)
<b>Isophorone diisocyanate</b>			
IL-2	S (+/-/-*)	S (-/-)	N (+/+/-)
IFN- $\gamma$	N (+/-/+)	N (0/+/-)	N (+/+/-)
IL-1 $\beta$	S (-/-)	S (-/-)	N (-/+)
IL-8	S (-/-)	S (-/-)	S (-/-)
<b>2-Mercaptobenzothiazole</b>			
IL-2	N (+/-/+)	N (+/+/-)	N (+/+/-)
IFN- $\gamma$	N (+/+/-)	N (+/+/-)	N (+/+/-)
IL-1 $\beta$	N (0/+0)	N (+/0/-)	A (+/+)
IL-8	S (-/-)	N (0/+0)	N (-/+)

- and + mean significant suppression and augmentation by one-way ANOVA followed by a Dunnett's post-hoc test compared with the control group, respectively. 0 means no significant change.

\* means statistical significance by Student's t test

S, A, and N indicate immunosuppression, immunostimulation, and no effects in final judgment, respectively.

細胞		一致率
Jurkat	<b>IL-2</b>	3/4= 0.75
	<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	4/4= 1.00
	<b>IL-2+IFN-<math>\gamma</math></b>	7/8= 0.88
THP-G1b	<b>IL-1<math>\beta</math></b>	0/4= 0.00
THP-G8	<b>IL-8</b>	1/4= 0.25
全体		8/16= 0.50

Table 3-2. 10物質3施設によるMITAの施設間比較試験

東北大学皮膚科				産総研				食薬センタ			
<b>Benzethonium chloride</b>								<b>Sodium bromate</b>			
IL-2 S (-/-)				S (-/-)				S (-/+/-*)			
IFN- $\gamma$ S (-/-)				S (-/-)				N(+/-/0)			
IL-1 $\beta$ S (-/-)				S (-/0*)				N(+/0/0)			
IL-8 N (-/0)				N (0/0/0)				N(+/+/0)			
<b>Ethanol</b>								<b>Nitrofurazone</b>			
IL-2 N (0/-)				N (0/+)				S(-/-/+*)			
IFN- $\gamma$ N (0/0/0)				N (0/0/+)				S(+/+/-*)			
IL-1 $\beta$ N (0/0)				N (0/0/0)				N(+/+/-)			
IL-8 N (0/0)				N (0/0/0)				A(+/+/-)			
<b>Dapsone</b>								<b>Aluminium chloride</b>			
IL-2 S (-/-)				S (-/+/-*)				IL-2 S(-/-)			
IFN- $\gamma$ S (+/-/-*)				S (-/-)				IFN- $\gamma$ S(-/+/-*)			
IL-1 $\beta$ S (-/-)				S (-/-)				IL-1 $\beta$ N(+/+)			
IL-8 S (-/-)				S (-/0*)				IL-8 N(+/-)			
<b>Acetaminophen</b>								<b>Chlorpromazine</b>			
IL-2 A (+/+)				A (+/+/-*)				IL-2 S(-/-)			
IFN- $\gamma$ A (+/+)				A (+/+)				IFN- $\gamma$ S(-/-)			
IL-1 $\beta$ A (+/+)				A (+/+)				IL-1 $\beta$ S(-/-)			
IL-8 A (+/+)				N (-/+)				IL-8 S(-/-)			
<b>Dibutyl phthalate</b>								<b>p-Nitroaniline</b>			
IL-2 S(-/-)				S (+/+/-*)				IL-2 S(-/-)			
IFN- $\gamma$ S(-/-)				S (-/+/-*)				IFN- $\gamma$ N(-/+/-)			
IL-1 $\beta$ S (+/-/-)				N (+/0)				IL-1 $\beta$ S(-/-)			
IL-8 S (-/-)				N (0/0/0)				IL-8 S(-/-)			

- and + mean significant suppression and augmentation by one-way ANOVA followed by a Dunnett's post-hoc test compared with the control group, respectively. 0 means no significant change.

\* means statistical significance by Student's t test

S, A, and N indicate immunosuppression, immunostimulation, and no effects in final judgment, respectively.

細胞		一致率
Jurkat	IL-2	10/10= 1.00
	IFN- $\gamma$	7/10= 0.70
	IL-2+IFN- $\gamma$	17/20= 0.85
THP-G1b	IL-1 $\beta$	7/10= 0.70
THP-G8	IL-8	5/10= 0.50
全体		29/40= 0.73

資料 1 .

## Multi-Immuno Tox Assay バリデーションプロトコール

平成 27 年 1 月 9 日 ver. 005.0J

## 目次

1. はじめに.....	5
2. 材料及び試薬調整方法.....	6
2-1 使用する細胞.....	6
2-2 使用する試薬及び調整方法.....	6
2-2-1 使用試薬.....	6
2-2-2 消耗品.....	7
2-2-3 測定機器.....	7
2-2-4 準備するもの.....	7
2-2-5 培地作製方法.....	9
2-2-6 細胞賦活試薬の調製方法（#2H4 用）.....	10
2-2-7 細胞賦活試薬の調製方法（THP-G8, TGCHAC-A4 用）.....	11
3. 実験方法.....	12
3-1 細胞培養方法.....	12
3-1-1 細胞起眠.....	12
3-1-2 選択抗生剤での培養開始.....	12
3-1-3 通常の継代培養.....	12
4. 細胞液の調製方法.....	13
5. 被験物質の調整方法.....	15
5-1 水溶性被験物質(NaBrO <sub>3</sub> , NiSO <sub>4</sub> )調製.....	15
5-1-1 試薬の配置（水溶性被験物質）.....	15
5-1-2 段階希釈（水溶性被験物質）.....	15
5-1-3 2段階希釈（水溶性被験物質）.....	16
5-1-4 細胞への添加（水溶性被験物質）.....	16
5-2 DMSO 溶性被験物質（DP, 2-MBT）の調製.....	20
5-2-1 試薬の配置（DMSO 溶性被験物質）.....	20

5-2-2	段階希釈 (DMSO 溶性被験物質)	20
5-2-3	B 培地での希釈 (DMSO 溶性被験物質)	21
5-2-4	2 段階希釈 (DMSO 溶性被験物質)	22
5-2-5	細胞への添加 (DMSO 溶性被験物質)	22
6	細胞賦活試薬 (PMA/ionomycin) の調整、#2H4 細胞への添加	26
6-1	準備	26
6-2	100 $\mu$ M PMA の調整方法	26
6-3	Control 液及び x10 PMA/ionomycin 溶液の調整	26
6-4	細胞賦活試薬 (PMA/ionomycin) の細胞への添加	27
7	細胞賦活試薬 (LPS) の調整、THP-G8, TGCHAC-A4 細胞への添加	28
7-1	準備	28
7-2	LPS の調製方法	28
7-2-1	250 ng/ml LPS (THP-G8 用)の調整方法	28
7-2-2	10 ng/ml LPS (TGCHAC-A4 用)の調整方法	28
7-3	細胞賦活試薬 (LPS) の THP-G8, TGCHAC-A4 細胞への添加	28
8	コントロール(dexamethasone, cyclosporin A) の調製	30
8-1	コントロール試薬の調製	30
8-1-1	dexamethasone の調製方法	30
8-1-2	cyclosporin A の調製方法	30
8-2	細胞の調製方法	31
8-3	試薬の配置	32
8-4	2 段階希釈	32
8-5	細胞への添加	33
8-6	細胞賦活試薬 (PMA/ionomycin) の#2H4 細胞への添加	34
8-7	細胞賦活試薬 (LPS) の THP-G8, TGCHAC-A4 細胞への添加	36
9	シグナルアッセイ (6 時間後)	38



10	データ解析 .....	38
11	変更履歴 .....	40

## 1. はじめに

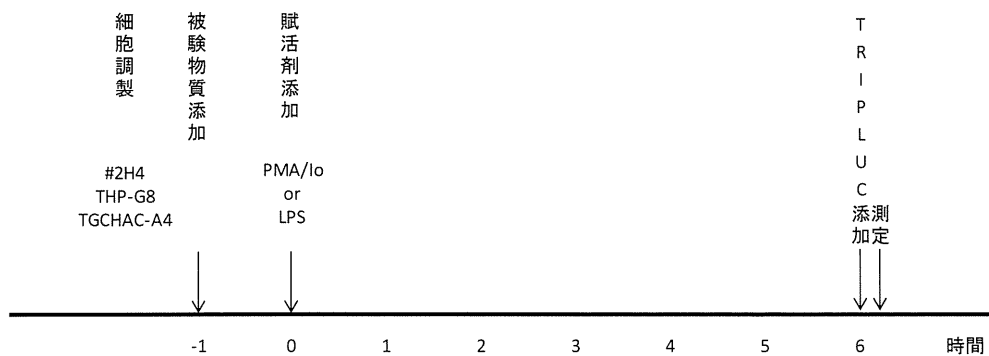
本 Protocol は IL2-SLG、IFN $\gamma$ -SLO、G3PDH-SLR を含む多色発光細胞株 (#2H4)、IL8-SLO、G3PDH-SLR を含む多色発光細胞株 (THP-G8) および IL-1 $\beta$ -SLG、G3PDH-SLR を含む多色発光細胞株 (TGCHAC-A4) を利用した化学物質の免疫毒性試験法における細胞培養方法、被験物質調整及び添加方法、及びルシフェラーゼアッセイの方法について記載した。

図 1 アッセイの概要

### アッセイデザイン (1プレートあたり2被験物質を施行)

cont (ddw or DMSO only)	PMA/b or LPS only	A/2 <sup>9</sup> μg/ml	A/2 <sup>8</sup> μg/ml	A/2 <sup>7</sup> μg/ml	A/2 <sup>6</sup> μg/ml	A/2 <sup>5</sup> μg/ml	A/2 <sup>4</sup> μg/ml	A/2 <sup>3</sup> μg/ml	A/2 <sup>2</sup> μg/ml	A/2 <sup>1</sup> μg/ml	A μg/ml
被験物質A 1/2希釈、10段階、n=4)											
cont (ddw or DMSO only)	PMA/b or LPS only	B/2 <sup>9</sup> μg/ml	B/2 <sup>8</sup> μg/ml	B/2 <sup>7</sup> μg/ml	B/2 <sup>6</sup> μg/ml	B/2 <sup>5</sup> μg/ml	B/2 <sup>4</sup> μg/ml	B/2 <sup>3</sup> μg/ml	B/2 <sup>2</sup> μg/ml	B/2 <sup>1</sup> μg/ml	B μg/ml
被験物質B 1/2希釈、10段階、n=4)											

PMA/b or LPS



## 2. 材料及び試薬調整方法

### 2-1 使用する細胞

- Jurkat 3 色発光細胞株 #2H4 (IL2-SLG、IFN $\gamma$ -SLO、G3PDH-SLR)  
American Type Culture Collection より供与されたヒト T リンパ細胞株である Jurkat に、IL-2 プロモーター、IFN $\gamma$  プロモーター、G3PDH プロモーターの下流にそれぞれ SLG ルシフェラーゼ遺伝子、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を東洋紡績株式会社、敦賀バイオ研究所にて樹立した。  
(Saito R. et al. Nickel differentially regulates NFAT and NF- $\kappa$ B activation in T cell signaling *Toxicology and Applied Pharmacology*, 254, 245-255, 2011)
- 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、G3PDH 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)
- THP-1 由来 2 色発光細胞株 TGCHAC-A4 (IL1 $\beta$ -SLG、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、G3PDH プロモーターの下流に SLR ルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだベクターを導入した安定細胞株 (TGC17 細胞) を東北大学医学部皮膚科学教室にて樹立した。この TGC17 細胞株に、IL-1 $\beta$ プロモーターの下流に SLG ルシフェラーゼ遺伝子を結合したコンストラクトを含む人工染色体を移入した安定細胞株を株式会社ジーピーシー研究所に委託し樹立した。

### 2-2 使用する試薬及び調整方法

#### 2-2-1 使用試薬

##### ▼培地関連試薬

- RPMI-1640 (GIBCO Cat#11875-093, 500ml)
- FBS (Biological Industries Cat#04-001-1E Lot:715004)
- 抗菌剤 Antibiotic-Antimycotic (GIBCO Cat#15240-062)
- 選択抗生物質 G418 (ナカライテスク Cat#16513-84)  
HygromycinB (Invitrogen Cat#10687-010)

## Puromycin (InvivoGen Cat#ant-pr-1)

### ▼刺激物質関連試薬

- ・ Ionomycin (Sigma Cat#I0634)
- ・ Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma Cat#P8139)
- ・ Ethanol (Wako Cat#057-00456)
- ・ Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma Cat#D5879)
- ・ Distilled water (GIBCO Cat#10977-015)
- ・ Lipopolysaccharides from E. coli 026:B6 (LPS) (Sigma Cat#L8274)

### ▼ルシフェラーゼアッセイ関連試薬

- ・ Tripluc<sup>®</sup> Luciferase assay reagent (TOYOBO Cat#MRA-301)

### 2-2-2 消耗品

- ・ T-75 Flask Tissue Culture Treated (例：BD Falcon Cat#35-3136)
- ・ 96 well µclear black plate (例：Greiner bio-one Cat#655090)  
Luciferase assay 測定用プレート
- ・ 96 well clear plate  
U 底、試験化学物質および PMA/ionomycin、LPS 分注用
- ・ 96 well Assay Block, 2ml (例：Costar Cat#3960)
- ・ リザーバー
- ・ 滅菌ピペット

### 2-2-3 測定機器

- ・ 測定装置：2枚の光学フィルタが搭載できるマルチプレート対応型ルミノメータ (ATTO 社製 Phelios AB-2350、PerkinElmer 社製 ARVO、Berthold 社製 Tristar LB941 など)。
- ・ 光学フィルタ：560 nm ロングパスフィルタ、600 nm ロングパスフィルタまたは 600~700 nm バンドパスフィルタなど。(以下それぞれ Filter 1, Filter 2 と表記)
- ・ 測定時間：1~5 秒/ウェルの任意の測定時間を設定

### 2-2-4 準備するもの

- ・ ピペットマン
- ・ 8チャンネル or 12チャンネルピペットマン (20~100 µl, 0.5~10 µl 対応)
- ・ シェーカー (96 well plate を攪拌できるもの)
- ・ 恒温槽 (37 °C)
- ・ セルカウントするもの...血球計算盤、トリパンプルー、数取器 (計数器)、

セルカウンターなど

### 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。

1) A 培地(#2H4 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+200 µg/ml Hygromycin+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	-	-	440 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
Hygromycin	Invitrogen #10687-010	50 mg/ml	200 µg/ml	2 ml
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。

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	-	-	440 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。

2) B 培地: ルシフェラーゼアッセイ時に使用する培地 (500 ml 作製, 冷蔵保管)

試薬名	メーカー	濃度	培地中の 終濃度	必要量
RPMI-1640	GIBCO #11875-093	-	-	450 ml
FBS (非働化済)	Biological Industries Cat#04-001-1E Lot:715004	-	10%	50 ml

3) C 培地: **TGCHAC-A4** の通常の細胞維持、およびすべての細胞の起眠時に使用する培地 (500 ml 作製, 冷蔵保管)

試薬名	メーカー	濃度	培地中の 終濃度	必要量
RPMI-1640	GIBCO #11875-093	-	-	445 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

#### 2-2-6 細胞賦活試薬の調製方法 (#2H4 用)

\*PMA: 細胞賦活化に使用

試薬名	メーカー	ストック濃度	使用時希釈濃度	終濃度
PMA	Sigma #P8139	1 mM	100 $\mu$ M	25 nM
DMSO	Sigma #D5789			

<作製方法>

PMA 1 mg を溶媒 DMSO 1338.5  $\mu$ l に溶解する。

<保存方法>

- ・ 10~30  $\mu$ l/tube 程度に分注し、冷凍保存。
- ・ 小分注したものは 1 回融解で使い捨てすること。

\*Ionomycin: 細胞賦活化に使用

試薬名	メーカー	ストック濃度	使用時希釈濃度	終濃度
Ionomycin	Sigma # I0634	1 mM	1 mM	1 $\mu$ M
Ethanol	Wako #057-00456			

<作製方法>

Ionomycin 1 mg を溶媒 Ethanol 1621  $\mu$ l に溶解する。

<保存方法>

- ・ 10~30  $\mu\text{l}/\text{tube}$  程度に分注し、冷凍保存。
- ・ 小分注したものは1回融解で使い捨てすること。

## 2-2-7 細胞賦活試薬の調製方法 (THP-G8, TGCHAC-A4 用)

\* Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* 026:B6 (LPS)

試薬名	メーカー	ストック濃度	使用時希釈濃度	最終濃度
LPS	Sigma Cat#L8274	1 mg/ml	THP-G8:250ng/ml	THP-G8:25ng/ml
Distilled water	GIBCO Cat#10977-015		TGCHAC-A4:10ng/ml	TGCHAC-A4:1ng/ml

<作製方法>

LPS 5 mg を Distilled water に溶解し 5 ml とする。

<保存方法>

- ・ 5  $\mu\text{l}/\text{tube}$  に分注し、冷凍保存。
- ・ 分注したものは1回融解で使い捨てすること。

<使用方法>

ストック 5 $\mu\text{l}$  に Distilled water を 995  $\mu\text{l}$  加え 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  とし、THP-G8 細胞用についてはさらに 20 倍希釈し、1 well (培地 100  $\mu\text{l}$ ) 当たり 10  $\mu\text{l}$  ずつ分注する。(最終濃度 25 ng/ml)  
TGCHAC-A4 細胞用については 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  としたものをさらに 500 倍希釈し(10 $\mu\text{l}$ +ddw 5ml)、1 well (培地 100  $\mu\text{l}$ ) 当たり 10  $\mu\text{l}$  ずつ分注する。(最終濃度 1 ng/ml)



### **3. 実験方法**

#### **3-1 細胞培養方法**

##### **3-1-1 細胞起眠**

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, CO<sub>2</sub> インキュベーターで温めておく（培養用）。

凍結細胞(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)。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% CO<sub>2</sub>)。

##### **3-1-2 選択抗生剤での培養開始**

あらかじめ、#2H4 細胞、THP-G8 細胞についてはそれぞれの A 培地、TGCHAC-A4 細胞については C 培地の必要量を 37 °C、CO<sub>2</sub> インキュベーターで温めておく。

細胞起眠して 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。3×10<sup>5</sup>/ml で継代する。必要細胞量を取り、遠心して細胞を集める (1,400 rpm、5 分)。上清を吸引除去し、先に温めておいた A 培地または C 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、#2H4 細胞、THP-G8 細胞についてはそれぞれの A 培地、TGCHAC-A4 細胞については C 培地の必要量を 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 3×10<sup>5</sup>/ml、継代間隔は 3~4 日程度で行う。

必要細胞量を取り、遠心して細胞を集める (1,400 rpm, 5 分)。上清を吸引除去し、先に温めておいた A 培地または C 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。

起眠後 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)。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  $4 \times 10^6$ /ml、THP-G8、TGCHAC-A4 細胞については  $2 \times 10^6$ /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  $\mu$ 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 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul
B	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul
C	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul
D	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul
E	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul
F	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul
G	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul
H	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul	#2H4 2x10 <sup>5</sup> B medium 50ul



## 5 被験物質の調整方法

配布された4化学物質について以下のように Distilled water または DMSO に溶解する。

Sodium Bromate (NaBrO<sub>3</sub>) (Distilled water, 100 mg/ml)

Nickel (II) sulfate (NiSO<sub>4</sub>) (Distilled water, 100 mg/ml)

Dibutyl phthalate (DP) (DMSO, 500mg/ml)

2-Mercaptobenzothiazole (2-MBT) (DMSO, 500mg/ml)

### 5-1 水溶性被験物質 (NaBrO<sub>3</sub>, NiSO<sub>4</sub>)調製

#### 5-1-1 試薬の配置 (水溶性被験物質)

調製した NaBrO<sub>3</sub> の 100 mg/ml 水溶液 100 μl (#A12)、Distilled water 50 μl (#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#A3 まで Distilled water で公比2の段階希釈を9段階おこなう。(50 μl 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 50ul	Distilled water 50ul	Distilled water 50ul	Distilled water 50ul	Distilled water 50ul	Distilled water 50ul	Distilled water 50ul	Distilled water 50ul	Distilled water 50ul	Distilled water 50ul	Distilled water 50ul	NaBrO <sub>3</sub> 100 mg/ml in distilled water 100ul
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

2-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 50ul	Distilled water 50ul	NaBrO <sub>3</sub> 0.2 mg/ml in distilled water 100ul	NaBrO <sub>3</sub> 0.4 mg/ml in distilled water 50ul	NaBrO <sub>3</sub> 0.8 mg/ml in distilled water 50ul	NaBrO <sub>3</sub> 1.6 mg/ml in distilled water 50ul	NaBrO <sub>3</sub> 3.1 mg/ml in distilled water 50ul	NaBrO <sub>3</sub> 6.3 mg/ml in distilled water 50ul	NaBrO <sub>3</sub> 13 mg/ml in distilled water 50ul	NaBrO <sub>3</sub> 25 mg/ml in distilled water 50ul	NaBrO <sub>3</sub> 50 mg/ml in distilled water 50ul	NaBrO <sub>3</sub> 100 mg/ml in distilled water 50ul
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												