

**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、40  $\mu$ l を取り出し、アッセイブロックの中の B 培地 960  $\mu$ 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 50ul	Distilled water 50ul	NaBrO3 0.2 mg/ml in distilled water 100ul	NaBrO3 0.4 mg/ml in distilled water 50ul	NaBrO3 0.8 mg/ml in distilled water 50ul	NaBrO3 1.6 mg/ml in distilled water 50ul	NaBrO3 3.1 mg/ml in distilled water 50ul	NaBrO3 6.3 mg/ml in distilled water 50ul	NaBrO3 13 mg/ml in distilled water 50ul	NaBrO3 25 mg/ml in distilled water 50ul	NaBrO3 50 mg/ml in distilled water 50ul	NaBrO3 100 mg/ml in distilled water 50ul
B												
C												
D												
E												
F												
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 medium 960ul	B medium 960ul	B medium 960ul	B medium 960ul	B medium 960ul	B medium 960ul	B medium 960ul	B medium 960ul	B medium 960ul
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

**5-1-4 細胞への添加（水溶性被験物質）**

50  $\mu$ 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、TGCHAC-A4 細胞の入ったプレートの上半分 に 50  $\mu$ l 加える。（2 倍に希釈される、図 6）

NiSO<sub>4</sub>についても 5-1-1 から 5-1-4 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 7）終了後、プレートシェーカーを使用し、攪拌して混合する。細胞をインキュベーターへ入れ、1 時間反応させる。







## 5-2 DMSO 溶性被験物質 (DP, 2-MBT) の調製

### 5-2-1 試薬の配置 (DMSO 溶性被験物質)

調製した DP の 500 mg/ml DMSO 溶液 100  $\mu$ l (#A12)、DMSO 50  $\mu$ l (#A1-A11)、  
B 培地 180  $\mu$ l (#B1-B12)を下図のように 96 well clear plate (丸底)に分注する (図 8)。

### 5-2-2 段階希釈 (DMSO 溶性被験物質)

矢印のように well#A11 から#A3 まで DMSO で公比 2 の段階希釈を 9 段階おこなう。  
(50  $\mu$ l ずつ左隣のウェルに移す、図 8)

図 8

round bottom clear	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO 100% 50ul	DMSO 100% 50ul	DMSO 100% 50ul	DMSO 100% 50ul	DMSO 100% 50ul	DMSO 100% 50ul	DMSO 100% 50ul	DMSO 100% 50ul	DMSO 100% 50ul	DMSO 100% 50ul	DMSO 100% 50ul	DP 500 mg/ml in DMSO 100ul
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			2-fold dilution : transfer 50 ul (pipetman, yellow tip)									
E												
F												
G												
H												

↓

round bottom clear	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO 100% 50ul	DMSO 100% 50ul	DP 1.0 mg/ml in DMSO 100ul	DP 2.0 mg/ml in DMSO 50ul	DP 3.9 mg/ml in DMSO 50ul	DP 7.8 mg/ml in DMSO 50ul	DP 16 mg/ml in DMSO 50ul	DP 31 mg/ml in DMSO 50ul	DP 63 mg/ml in DMSO 50ul	DP 125 mg/ml in DMSO 50ul	DP 250 mg/ml in DMSO 50ul	DP 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												

### 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 20  $\mu$ l を 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 180  $\mu$ l にうつし 10 倍に希釈する。(10 倍に希釈される、図 9)

図 9

round bottom c.ear	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO 100% 50ul	DMSO 100% 50ul	DP 1.0 mg/ml in DMSO 100ul	DP 2.0 mg/ml in DMSO 50ul	DP 3.9 mg/ml in DMSO 50ul	DP 7.8 mg/ml in DMSO 50ul	DP 16 mg/ml in DMSO 50ul	DP 31 mg/ml in DMSO 50ul	DP 63 mg/ml in DMSO 50ul	DP 125 mg/ml in DMSO 50ul	DP 250 mg/ml in DMSO 50ul	DP 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 c.ear	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO 100% 30ul	DMSO 100% 30ul	DP 1.0 mg/ml in DMSO 80ul	DP 2.0 mg/ml in DMSO 30ul	DP 3.9 mg/ml in DMSO 30ul	DP 7.8 mg/ml in DMSO 30ul	DP 16 mg/ml in DMSO 30ul	DP 31 mg/ml in DMSO 30ul	DP 63 mg/ml in DMSO 30ul	DP 125 mg/ml in DMSO 30ul	DP 250 mg/ml in DMSO 30ul	DP 500 mg/ml in DMSO 30ul
B	DP 0 mg/ml in B medium 200ul	DP 0 mg/ml in B medium 200ul	DP 0.10 mg/ml in B medium 200ul	DP 0.20 mg/ml in B medium 200ul	DP 0.39 mg/ml in B medium 200ul	DP 0.78 mg/ml in B medium 200ul	DP 1.6 mg/ml in B medium 200ul	DP 3.1 mg/ml in B medium 200ul	DP 6.3 mg/ml in B medium 200ul	DP 12.5 mg/ml in B medium 200ul	DP 25 mg/ml in B medium 200ul	DP 50 mg/ml 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  $\mu$ l を取り出し、アッセイブロックの中の B 培地 980  $\mu$ l に加える（50 倍に希釈される、図 10）。

図 10

round bottom c bar	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO 100% 30ul	DMSO 100% 30ul	DP 10 mg/ml in DMSO 80ul	DP 20 mg/ml in DMSO 30ul	DP 39 mg/ml in DMSO 30ul	DP 78 mg/ml in DMSO 30ul	DP 16 mg/ml in DMSO 30ul	DP 31 mg/ml in DMSO 30ul	DP 63 mg/ml in DMSO 30ul	DP 125 mg/ml in DMSO 30ul	DP 250 mg/ml in DMSO 30ul	DP 500 mg/ml in DMSO 30ul
B	DP 0 mg/ml in B medium 200ul	DP 0 mg/ml in B medium 200ul	DP 0.10 mg/ml in B medium 200ul	DP 0.20 mg/ml in B medium 200ul	DP 0.39 mg/ml in B medium 200ul	DP 0.78 mg/ml in B medium 200ul	DP 1.6 mg/ml in B medium 200ul	DP 3.1 mg/ml in B medium 200ul	DP 6.3 mg/ml in B medium 200ul	DP 12.5 mg/ml in B medium 200ul	DP 25 mg/ml in B medium 200ul	DP 50 mg/ml 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  $\mu$ 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、TGCHAC-A4 細胞の入ったプレートの上半分に 50  $\mu$ l 加える（2 倍に希釈される、図 11）。5-2-3 から 5-2-5 にかけての操作は可及的迅速におこない、5-2-3 後、5-2-4 後の段階で長時間放置しないようにする。

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。細胞をインキュベーターへ入れ、1 時間反応させる。







