

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
10 µl	90 µl	1 mM	100 µM	100 µl

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

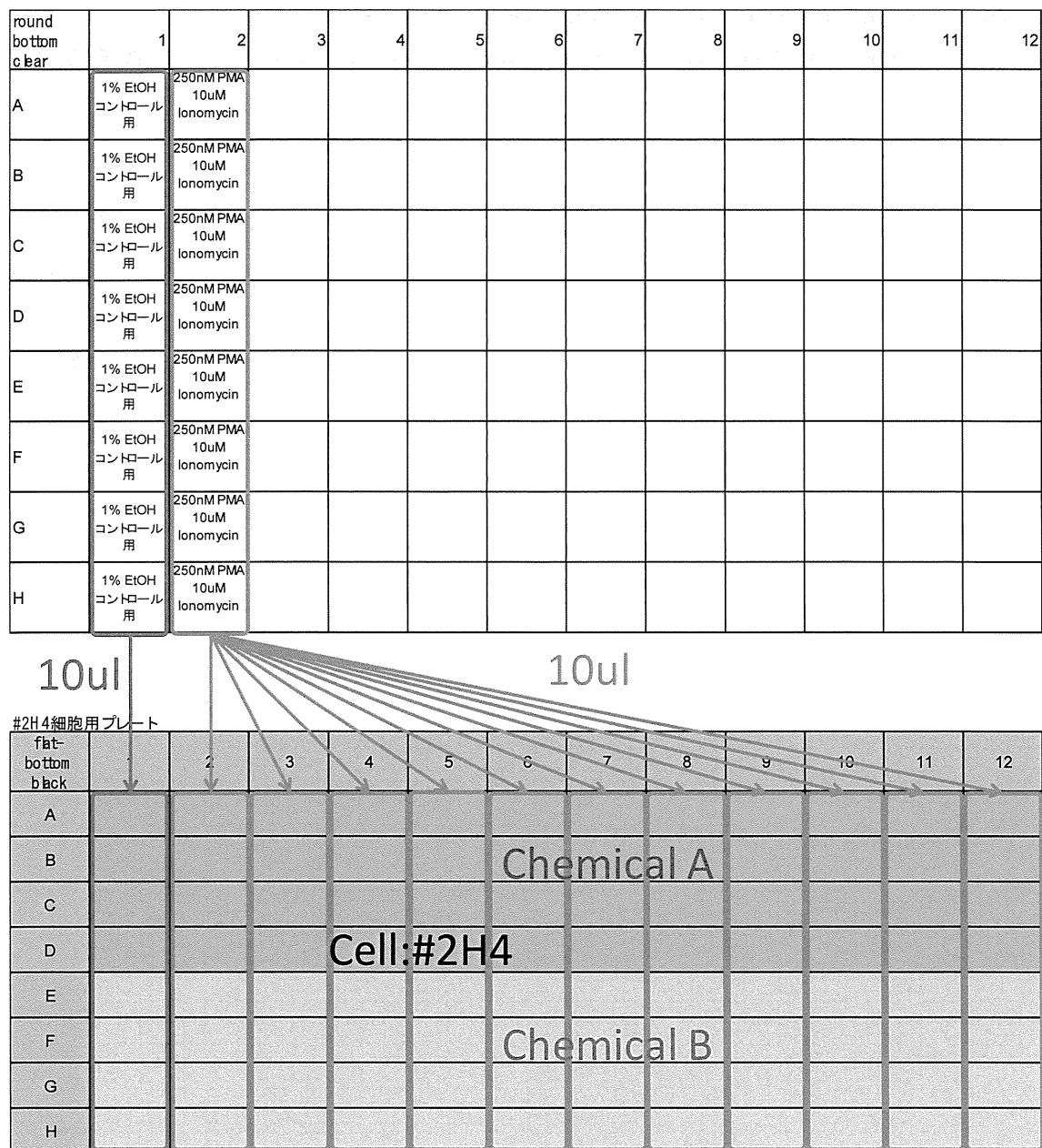
下表のように 250 nM PMA 10 µM ionomycin 溶液を調製する (10 倍濃度) また EtOH を含む Control 液を調製し試薬添加用の 96 well plate (U 底) に分注しておく。(図 13)

	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	2370	24	6	-	2400

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 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、96 well plate (U 底) に分注した Control 溶液 (Ethanol 溶媒コントロール) もしくは PMA/ionomycin を 10 μ l/well ずつそれぞれ#A1-#H1 もしくは#B1-#H12 の細胞に添加する (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。チップは 1 回添加する毎に交換する。終了後、プレートシェーカーを使用し、攪拌して混合する。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, TGCHAC-A4 細胞への添加

LPS は最終濃度の 10 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
- ・Distilled water

7-2 LPS の調製方法

7-2-1 250 ng/ml LPS(THP-G8 用)の調整方法

1 mg/ml LPS 水溶液 5 μ l に Distilled water を 995 μ l 加え 5 μ g/ml とし、この 5 μ g/ml ストックをエッペンドルフチューブまたは同等のチューブを用い Distilled water で 5 倍希釈する(例: 5 μ g/ml LPS 200 μ l + Distilled water 800 μ l、1 μ g/ml に希釈される)。さらに 4 倍希釈し(例: 1 μ g/ml LPS 250 μ l + Distilled water 750 μ l、250 ng/ml に希釈される)、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 Distilled water も分注しておく。(図 14)

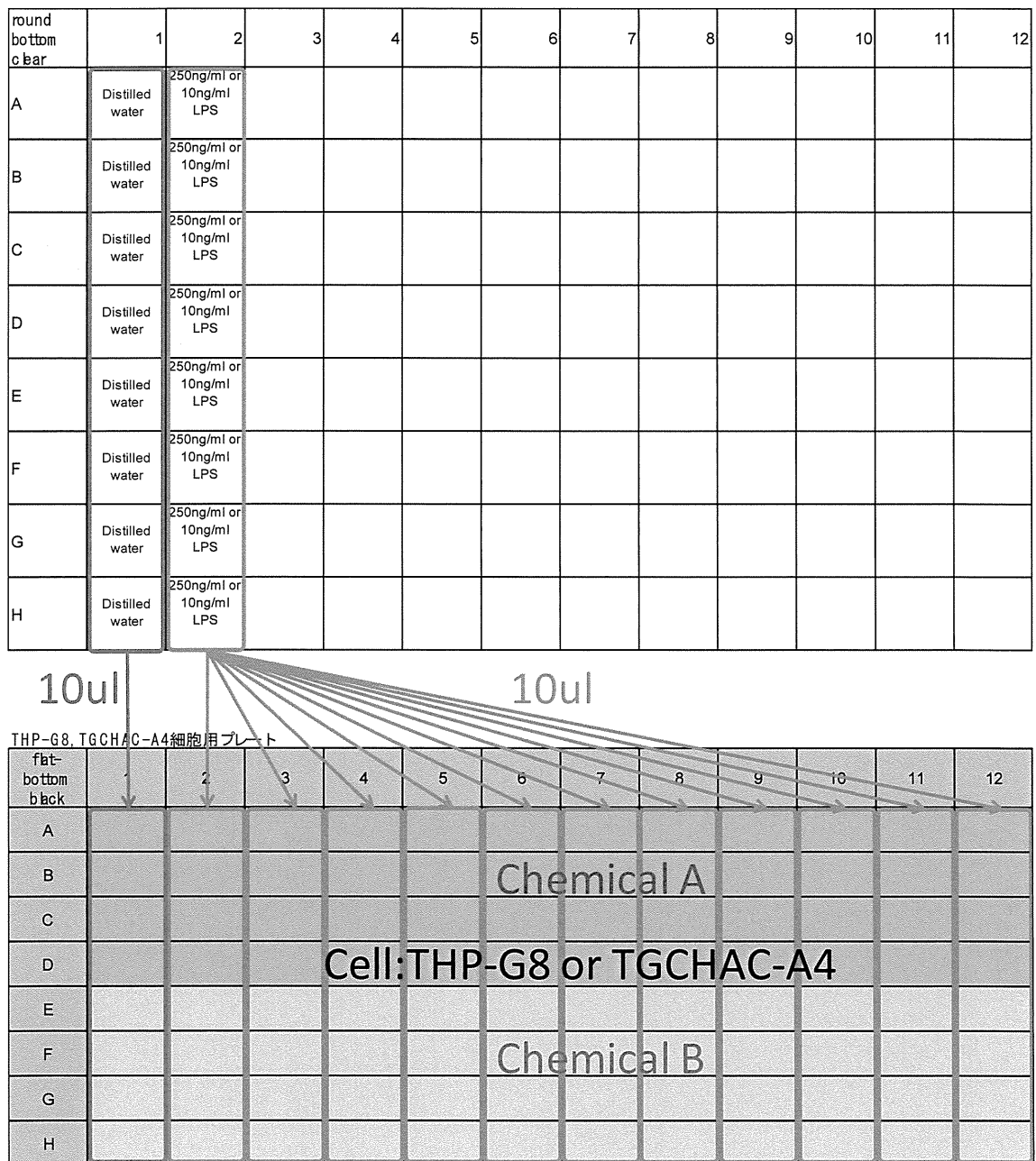
7-2-2 10 ng/ml LPS(TGCHAC-A4 用)の調整方法

1 mg/ml LPS 水溶液 5 μ l に Distilled water を 995 μ l 加え 5 μ g/ml とし、この 5 μ g/ml ストックをエッペンドルフチューブまたは同等のチューブを用い Distilled water で 5 倍希釈する(例: 5 μ g/ml LPS 200 μ l + Distilled water 800 μ l、1 μ g/ml に希釈される)。さらに 100 倍希釈し(例: 1 μ g/ml LPS 10 μ l + Distilled water 990 μ l、10 ng/ml に希釈される)、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 Distilled water も分注しておく。(図 14)

7-3 細胞賦活試薬 (LPS) の THP-G8, TGCHAC-A4 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Control溶液 (Distilled water) もしくはLPSを10 $\mu\text{l}/\text{well}$ ずつそれぞれ#A1-#H1 もしくは#B1-#H12の細胞に添加する(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。チップは1回添加する毎に交換する。終了後、プレートシェーカーを使用し、攪拌して混合する。細胞をインキュベーターへ入れ、6時間反応させる。

図 14



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

8-1-1 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	50 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 2000 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回融解で使い捨てすること。

8-1-2 cyclosporin A 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
cyclosporin A	Sigma #C1832-5MG	12 mg/ml	1 mg/ml	1 μ g/ml
DMSO	Sigma #D5789			

<作製方法>

cyclosporin A 5 mg を溶媒 DMSO 416 μ l に溶解する。

<保存方法>

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

8-2 細胞の調製方法

#2H4 細胞については $4 \times 10^6/\text{ml}$ 、THP-G8, TGCHAC-A4 細胞については $2 \times 10^6/\text{ml}$ 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-#D5、THP-G8 細胞については#E7-#H11、TGCHAC-A4 細胞については#E1-#H5 に 50 $\mu\text{l}/\text{well}$ 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 50 μl	#2H4 2×10^5 cell B medium 50 μl	#2H4 2×10^5 cell B medium 50 μl	#2H4 2×10^5 cell B medium 50 μl	#2H4 2×10^5 cell B medium 50 μl							
B	#2H4 2×10^5 cell B medium 50 μl	#2H4 2×10^5 cell B medium 50 μl	#2H4 2×10^5 cell B medium 50 μl	#2H4 2×10^5 cell B medium 50 μl	#2H4 2×10^5 cell B medium 50 μl							
C	#2H4 2×10^5 cell B medium 50 μl	#2H4 2×10^5 cell B medium 50 μl	#2H4 2×10^5 cell B medium 50 μl	#2H4 2×10^5 cell B medium 50 μl	#2H4 2×10^5 cell B medium 50 μl							
D	#2H4 2×10^5 cell B medium 50 μl	#2H4 2×10^5 cell B medium 50 μl	#2H4 2×10^5 cell B medium 50 μl	#2H4 2×10^5 cell B medium 50 μl	#2H4 2×10^5 cell B medium 50 μl							
E	TGCHAC-A4 1×10^5 cell B medium 50 μl	TGCHAC-A4 1×10^5 cell B medium 50 μl	TGCHAC-A4 1×10^5 cell B medium 50 μl	TGCHAC-A4 1×10^5 cell B medium 50 μl	TGCHAC-A4 1×10^5 cell B medium 50 μl		THP-G8 1×10^5 cell B medium 50 μl	THP-G8 1×10^5 cell B medium 50 μl	THP-G8 1×10^5 cell B medium 50 μl	THP-G8 1×10^5 cell B medium 50 μl	THP-G8 1×10^5 cell B medium 50 μl	
F	TGCHAC-A4 1×10^5 cell B medium 50 μl	TGCHAC-A4 1×10^5 cell B medium 50 μl	TGCHAC-A4 1×10^5 cell B medium 50 μl	TGCHAC-A4 1×10^5 cell B medium 50 μl	TGCHAC-A4 1×10^5 cell B medium 50 μl		THP-G8 1×10^5 cell B medium 50 μl	THP-G8 1×10^5 cell B medium 50 μl	THP-G8 1×10^5 cell B medium 50 μl	THP-G8 1×10^5 cell B medium 50 μl	THP-G8 1×10^5 cell B medium 50 μl	
G	TGCHAC-A4 1×10^5 cell B medium 50 μl	TGCHAC-A4 1×10^5 cell B medium 50 μl	TGCHAC-A4 1×10^5 cell B medium 50 μl	TGCHAC-A4 1×10^5 cell B medium 50 μl	TGCHAC-A4 1×10^5 cell B medium 50 μl		THP-G8 1×10^5 cell B medium 50 μl	THP-G8 1×10^5 cell B medium 50 μl	THP-G8 1×10^5 cell B medium 50 μl	THP-G8 1×10^5 cell B medium 50 μl	THP-G8 1×10^5 cell B medium 50 μl	
H	TGCHAC-A4 1×10^5 cell B medium 50 μl	TGCHAC-A4 1×10^5 cell B medium 50 μl	TGCHAC-A4 1×10^5 cell B medium 50 μl	TGCHAC-A4 1×10^5 cell B medium 50 μl	TGCHAC-A4 1×10^5 cell B medium 50 μl		THP-G8 1×10^5 cell B medium 50 μl	THP-G8 1×10^5 cell B medium 50 μl	THP-G8 1×10^5 cell B medium 50 μl	THP-G8 1×10^5 cell B medium 50 μl	THP-G8 1×10^5 cell B medium 50 μl	

8-3 試薬の配置

DMSO 50 μ l (#A4)、CyA 12 mg/ml stock 10 μ l に DMSO 110 μ l を加えたもの(#A5)、 Distilled water 50 μ l (#B1, #B2)、DEX 60 mg/ml stock 50 μ l に distilled water 10 μ l を加えたもの(#B3)、B 培地 180 μ l (#B4-B5)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				DMSO 50 μ l	CyA 12 mg/ml stock 10 μ l + DMSO 110 μ l							
B	Distilled water 50 μ l	Distilled water 50 μ l	DEX 50 mg/ml stock 50 μ l	B medium 180 μ l	B medium 180 μ l							
C												
D												
E												
F												
G												
H												

↓

round bottom clear	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A				DMSO 30 μ l	CyA 1 mg/ml in DMSO 100 μ l							
B	Distilled water 50 μ l	Distilled water 50 μ l	DEX 50 mg/ml stock 50 μ l	DMSO 10% in B medium 200 μ l	CyA 100 μ g/ml in B medium 200 μ l							
C												
D												
E												
F												
G												
H												

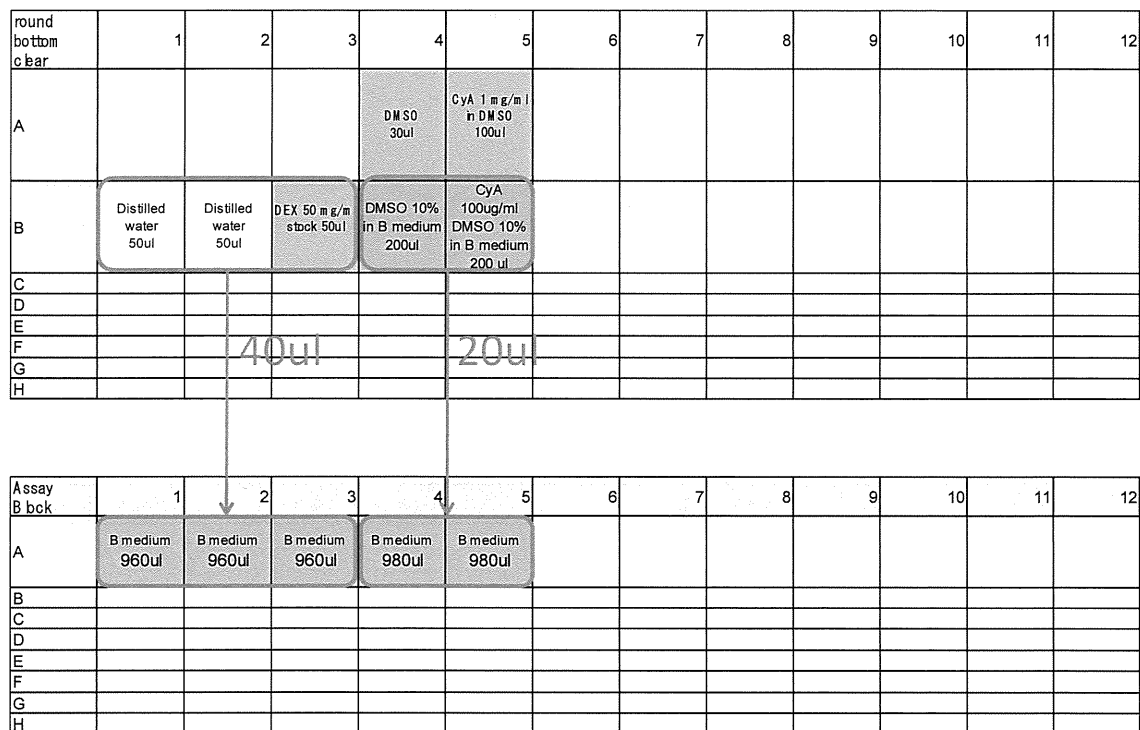
8-4 B 培地での希釈

矢印のように#A4 の DMSO、#A5 に調製した CyA の DMSO 溶液 20 μ l を下の B 培地 180 μ l にうつつし 10 倍に希釈する。(10 倍に希釈される、図 16)

8-5 2段階希釈

1-3列については40 μ l、4-5列については20 μ lを取り出し、アッセイブロックの中のB培地それぞれ960 μ l、980 μ lに加える（それぞれ25倍、50倍に希釈される、図17）。

図 17



8-6 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、TGCHAC-A4 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) 8-4 から 8-6 にかけての操作は可及的迅速におこない、8-4 後、8-5 後の段階で長時間放置しないようにする。

終了後、プレートシェーカーを使用し、攪拌して混合する。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 B bck	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B medium 1000ul	B medium 1000ul	DEX 2mg/ml B medium 1000ul	DMSO 0.2% B medium 1000ul	CyA 2ug/ml DMSO 0.2% B medium 1000ul							
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

flat-bottom b 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	#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	#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	#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	#2H4 2x10 ⁵ cell B medium 50ul	#2H4 2x10 ⁵ cell B medium 50ul							
E	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell B medium 50ul		THP-G8 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	
F	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell B medium 50ul		THP-G8 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	
G	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell B medium 50ul		THP-G8 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	
H	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell B medium 50ul		THP-G8 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell B medium 50ul	

図 19 プレートにまき終わった状態

flat-bottom back	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	#2H4 2x10 ⁵ cell DMSO 0.1% B medium 100ul	#2H4 2x10 ⁵ cell CyA 1ug/ml DMSO 0.1% 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	#2H4 2x10 ⁵ cell DMSO 0.1% B medium 100ul	#2H4 2x10 ⁵ cell CyA 1ug/ml DMSO 0.1% 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	#2H4 2x10 ⁵ cell DMSO 0.1% B medium 100ul	#2H4 2x10 ⁵ cell CyA 1ug/ml DMSO 0.1% 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	#2H4 2x10 ⁵ cell DMSO 0.1% B medium 100ul	#2H4 2x10 ⁵ cell CyA 1ug/ml DMSO 0.1% B medium 100ul							
E	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell B medium 100ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell B medium 100ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell DEX 1mg/ml B medium 100ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell DMSO 0.1% B medium 100ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell CyA 1ug/ml DMSO 0.1% B medium 100ul		THP-G8 1x10 ⁵ cell B medium 100ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell B medium 100ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell DEX 1mg/ml B medium 100ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell DMSO 0.1% B medium 100ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell CyA 1ug/ml DMSO 0.1% B medium 100ul	
F	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell B medium 100ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell B medium 100ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell DEX 1mg/ml B medium 100ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell DMSO 0.1% B medium 100ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell CyA 1ug/ml DMSO 0.1% B medium 100ul		THP-G8 1x10 ⁵ cell B medium 100ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell B medium 100ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell DEX 1mg/ml B medium 100ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell DMSO 0.1% B medium 100ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell CyA 1ug/ml DMSO 0.1% B medium 100ul	
G	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell B medium 100ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell B medium 100ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell DEX 1mg/ml B medium 100ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell DMSO 0.1% B medium 100ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell CyA 1ug/ml DMSO 0.1% B medium 100ul		THP-G8 1x10 ⁵ cell B medium 100ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell B medium 100ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell DEX 1mg/ml B medium 100ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell DMSO 0.1% B medium 100ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell CyA 1ug/ml DMSO 0.1% B medium 100ul	
H	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell B medium 100ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell B medium 100ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell DEX 1mg/ml B medium 100ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell DMSO 0.1% B medium 100ul	TGCHAC- A4 1x10 ⁵ cell CyA 1ug/ml DMSO 0.1% B medium 100ul		THP-G8 1x10 ⁵ cell B medium 100ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell B medium 100ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell DEX 1mg/ml B medium 100ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell DMSO 0.1% B medium 100ul	THP-G8 1x10 ⁵ cell CyA 1ug/ml DMSO 0.1% B medium 100ul	