

H24-化学-一般-001 厚生労働科学研究費補助金（化学リスク研究事業）
（総括）研究報告書

多色発光細胞を用いたhigh-throughput免疫毒性評価試験法の開発

研究代表者 相場 節也
東北大学病院皮膚科教授

研究要旨

免疫系に対する化学物質の影響を簡便かつ短時間に評価可能なルシフェラーゼレポーターアッセイ系を確立した(Multi-ImmunoToxicity Assay ; MITA)。この系ではT細胞におけるIL-2とIFN- γ 、マクロファージ/樹状細胞におけるIL-1 β とIL-8の転写に至るシグナル伝達経路への化学物質の影響を多面的に評価することができる。まず種々の機序の明らかな免疫抑制剤を評価したところ、その評価はすでに報告されている薬剤のT細胞とマクロファージ/樹状細胞に対する免疫学的効果と一致していた。また40種類の化学物質を評価したところ、鉛の免疫抑制作用、リチウム、水銀による免疫増強作用を検出できることも明らかとなった。さらに世界に先駆けて、人工染色体を用いたIL-1 β レポーター細胞を樹立し、MITA構成細胞の長期安定性を確保した。施設内、施設間再現性も検討し、IL-2とIFN- γ レポーター細胞に関しては既に良好な結果が得られている。以上の結果より、MITAが化学物質の免疫毒性を自然免疫と獲得免疫の両面から評価できる新しいhigh-throughput手法となりうることが明らかとなった。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

小島 肇・国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター薬理部・室長

近江谷 克裕・産業技術総合研究所・バイオメディカル部門・部門

山影 康次・食品薬品安全センター秦野研究所代替法試験部・部長

環境汚染物質、農薬、食品添加物、薬剤などの化学物質が、免疫抑制、アレルギー、自己免疫疾患など免疫系を標的として健康被害を及ぼすことはよく知られている。したがって、免疫機能に影響をおよぼす化学物質の有害作用として定義される免疫毒性は、消費者、生産者はもとより公衆衛生行政にとっても重要な課題となっている。しかし、これまで化学物質の免疫毒性評価に関する国際的ガイドラインは数少なく、感受性など一部を除けばOECD test guidelineにも取りあげられてこなかった。ところが、近年免疫毒性評価の重要性が広く認識されるようになり、2012年WHOから化学物質の免疫毒性評価に関わるガイダンスが公表さ

A．研究目的

研究背景：

れた。現在、化学物質の免疫毒性評価は動物実験を用いる方法がゴールドスタンダードであるが、ヒトと動物との種差、また動物実験を行う際の費用、倫理面など多くの課題を有している。

そこで本研究では、IL-2、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-8 プロモーターに制御されるルシフェラーゼ遺伝子を導入した 3 つの安定レポーター細胞株 (#2H4、THP-G1b、THP-G8) を使用した化学物質免疫毒性評価系(Multi-ImmunoToxicity assay; MITA)の構築をめざした。#2H4 細胞は、IL-2 プロモーターに制御された緑色発光ルシフェラーゼ遺伝子 SLG、IFN- γ プロモーターに制御された橙色発光ルシフェラーゼ遺伝子 SLO、G3PDH プロモーターに制御された赤色発光ルシフェラーゼ遺伝子 SLR を Jurkat T 細胞株に導入し樹立した。THP-G1b 細胞は IL-1 β プロモーターに制御された SLG、G3PDH プロモーターに制御された SLR を THP-1 単球細胞株に導入し、THP-G8 細胞は IL-8 プロモーターに制御された SLO、G3PDH プロモーターに制御された SLR を THP-1 細胞株に導入し樹立した。これまでの 2 年間の研究の結果、以下の点が明らかになった。

1) MITAと定量的real-time PCRによるmRNA発現

測定との相関

MITA を構成するレポーター細胞作成に使用した Jurkat 細胞、THP-1 細胞をそれぞれ、PMA/CaI, LPS で刺激し、それらの細胞における IL-2, IFN- γ mRNA、IL-1 β 、IL-8 mRNA 発現に及ぼす Dex、CyA、Tac の影響を定量的 real-time PCR で測定した。得られた結果を、MITA による薬剤評価と比較したところ極めて良好な相関関係が確認できた。

2) ヒト whole blood cytokine release assay (WBCRA)の

代替法としてのMITAの可能性の検討

WBCRA と MITA との相関に関しては、まず、従来法の欠点であるサイトカインの蛋白定量を mRNA 定量に変更することを検討した。その結果、6 時間の反応時間で回収された RNA を用いた real-time PCR により従来法と同等の結果が得られ、WBCRA の評価時間の短縮化と少数検体への対応が可能となった。さらに、WBCRA により評価した DEX, CyA, Tac のヒト末梢血細胞の IL-2、IFN- γ mRNA、IL-1 β 、IL-8 mRNA 発現に対する調節作用は、MITA により評価した結果と一致した。

3) MITA が化学物質の免疫毒性を評価する際の再現性、精度、感度、特異度、簡便性、迅速性などを考慮した最適なプロトコルの作成

薬理機序の明らかな免疫抑制剤9剤、薬理的に免疫抑制剤には分類されていないが臨床的に免疫調節作用を有することが知られている薬剤5剤、免

疫調節作用の知られていない薬剤3剤に関して、MITAにより免疫薬理作用を解析し、文献的に報告されている作用と比較しMITA評価の妥当性を検証した。

4) プロトコルの確立

MITA により 17 種類の薬剤を評価する中で、MITA のプロトコル ver 2 を作成した。特に、プロトコルの作成に際しては、3 回の繰り返し実験から得られる結果をどのように MITA による化学物質の免疫毒性評価に用いるかに留意した。まず、各実験において得られた結果は、一元配置分散分析を行い、その後 Dunnett 検定により有意な抑制効果、増強効果があるか否かを検討した。しかし、この実験を 3 回繰り返し検討すると、3 回の実験結果が必ずしも一致していない薬剤が存在した。そこで、一致が見られなかった薬剤に関しては、3 回の繰り返し実験の結果のなかから %suppression の絶対値 (免疫抑制物質に関しては正の値、増強物質に関しては負の値となる) が最も大きい値を選び Student's t-test を行い、そこで統計的有意差の得られた場合、その結果を薬剤の最終的判定結果とした。

5) 多面的な免疫毒性メカニズムの中で、MITAが評価できる免疫反応の特定

今回得られたMITAによる薬剤の免疫調節作用とそれぞれの薬剤の文献的に報告されている免疫調節作用(Allison, 2000)を比較検討した。その結果、MITAは、サイトカインの発現調節に直接作用する薬剤の免疫抑制作用は適切に評価できるが、免疫担当細胞の代謝、細胞増殖に作用し二次的にサイトカイン発現を抑制する薬剤の作用は評価できないことが明らかとなった。したがって現時点では、MITAによる化学物質の免疫毒性評価には、代謝、細胞増殖に対する影響を検出できる評価系、具体的には28日間反復投与毒性試験などとの組み合わせが必要となる。

6) 施設間比較試験を行うことによるMITAの多施設への技術移転性の検証

東北大皮膚科および本研究に参加している産業総合研究所、食品薬品安全センター秦野研究所の3施設で10種類の医薬品について施設間比較試験を施行した。4種類の薬剤に関して試験が完了し、2-MBTを除いて3施設でほぼ同等の結果が得られている。

目的:

以上の成果をふまえて、本年度の研究目標としては以下の5点を掲げた。

- 1) MITA の data set の拡充
- 2) 評価細胞の安定性の確保
- 3) 施設間再現性の検証

B. 研究方法

1) 試薬

Water-soluble Dexamethasone (Dex), Cyclosporin A (CyA), Tacrolimus (TAC), Rapamycin, Cyclophosphamide, Azathioprine, Mycophenolic acid, Mizoribine, Leflunomide, Methotrexate, 4-Aminophenyl sulfone (Dapsone), Sulfasalazine, Colchicine, Chloroquine, Minocycline, Nicotinamide, Acetaminophen, Digoxin, Warfarin, Cimetidine, Levamisol, Isoniazid, Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), Ionomycin(Io), Lipopolysaccharides from *E. coli* 026:B6 (LPS), 2,4-Diaminotoluene, 2-Aminoanthracene, 2-Mercaptobenzothiazole, Amphoterycine B, Benzethonium chloride, Chlorpromazine, Cisplatin, Dibenz[a,i]pyrene, Dibutyl phthalate, Diethanolamine, Lead acetate, Nitrofurazone, Pentamidine isethionate, p-Nitroaniline, Pyrimethamine, Ribavirin, Sodium bromate, Triethanolamine, Actinomycin D, Cobalt chloride, Dimethyl sulfoxide, Histamine, Hydrocortisone, Isophorone diisocyanate, Mitomycin C は Sigma-Aldrich から購入した。Aluminum chloride, Ethanol, Magnesium sulfate, Methanol, Nickel sulfate, Sodium lauryl sulfate, Lithium carbonate, Mercuric chloride は和光純薬から購入した。Hydrogen peroxide は三徳化学工業から購入した。Deoxyspergualin は医薬品卸業から購入した。

2) レポーターアッセイ

ヒトTリンパ芽球性白血病由来細胞株である Jurkat細胞株とヒト急性単球性白血病由来細胞株である THP-1(ATCC) は、10% ウシ胎児血清 (Biological Industries) を加えた RPMI-1640(Gibco) にて 37 °C、5%CO₂ 下で培養した。#2H4細胞は、IL-2 プロモーターに制御された SLG、IFN- γ プロモーターに制御された SLO、G3PDH プロモーターに制御された SLR を Jurkat細胞に導入し樹立した (Saito *et al.*, 2011)。THP-G1b細胞は IL-1 β プロモーターに制御された SLG、G3PDH プロモーターに制御された SLR を、また THP-G8細胞は IL-8 プロモーターに制御された SLO、G3PDH プロモーターに制御された SLR を THP-1細胞に導入し樹立した (Takahashi *et al.*, 2011) (図 1)。1ウエル当たり 2 \times 10⁵個の # 2H4細胞または 1ウエル当たり 5 \times 10⁴個の THP-G1b細胞、もしくは THP-G8細胞を黒色の 96-well プレート (Greiner bio-one) に播種し、種々の薬剤、化学物質を加え、37 °C、5%CO₂ 下で 1時間培養した。続いて #2H4細胞については 25nM PMA と 1 μ M Io の混合物 (PMA/Io)、THP-G1b細胞、THP-G8細胞については 100 ng/ml LPS で刺激し 37 °C、5%CO₂ 下で 6時間培養した。その後、細胞溶解剤とルシフェラーゼ反応

の基質であるルシフェリンの混合剤である Tripluc luciferase assay reagent (TOYOBO) を混合し、室温で 10分振盪させたのちマルチプレート対応型ルミノメーターにてルシフェラーゼ活性を測定した。SLG、SLO、SLRルシフェラーゼは共通の基質の存在により同時に発光するが、2枚の光学的フィルターにより分離し、各ルシフェラーゼの発光量を検出した。(以下、SLG-luciferase activity (SLG-LA)、SLO-luciferase activity (SLO-LA)、SLR-luciferase activity (SLR-LA) と記述) 細胞数の違い、または各種の刺激後の生存率の違いを勘案し SLG-LA、SLO-LA を SLR-LA で除することにより、それぞれ normalized SLG-luciferase activity (nSLG-LA)、normalized SLO-luciferase activity (nSLO-LA) を算出した。また、以下のように %suppression 抑制率を計算した。

%suppression =
(1 - 薬剤存在下の nSLG-LA または nSLO-LA / 薬剤非存在下の nSLG-LA または nSLO-LA) \times 100

4) 免疫毒性評価法 (図 2)

各実験において得られた結果は、一元配置分散分析を行い、その後 Dunnett 検定により有意な抑制効果、増強効果があるか否かを検討した。しかし、この実験を 3 回繰り返し検討すると、3 回の実験結果が必ずしも一致していない薬剤が存在した。そこで、一致が見られなかった薬剤に関しては、3 回の繰り返し実験の結果のなかから %suppression の絶対値 (免疫抑制物質に関しては正の値、増強物質に関しては負の値となる) が最も大きい値を選び Student's t-test を行い、そこで統計的有意差の得られた場合、その結果を薬剤の最終的判定結果とした。

3) Jurkat、THP-1 細胞における mRNA 発現

3 \times 10⁶ 細胞の Jurkat細胞または THP-1細胞を薬剤で 1時間前処理し、その後、それぞれ PMA/Io または LPS で刺激し 37 °C で 6時間培養後、Isogen (Nippon gene) を用いて total RNA を抽出した。

4) 定量的 RT-PCR

TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) (Takara Bio Inc) を用いて total RNA から相補的 DNA (cDNA) を合成した。Mx3000p QPCR System (Stratagene) を用いて定量 RT-PCR を行った。プライマーについて、それぞれの遺伝子情報は GenBank より入手し、Primer Express 1.0 (Applied Biosystems) を用いて設計、SIGMA GENOSYS にて合成した。cDNA 10ng、フォワードおよびリバースプライマー 400nM、TaqMan probe 60nM、ROX 30nM、Brilliant II Fast

QPCR Master Mix (Stratagene)を含む反応液を、95℃で2分間反応させたのち、95℃、5秒間、60℃、20秒間の反応を45サイクル行った。恒常的に発現するG3PDHをコントロール遺伝子とし、Ct法で各遺伝子発現の解析を行った。

MITAによる化学物質免疫毒性評価

WagnerらがFluorescent Cell Chip assay (FCC)において検討した46種類の化学物質 (Wagner *et al.*, 2006)に関してMITAを行う。この46種類の化学物質は、すでに、過去の報告をもとにin vivo, in vitroにおいて免疫毒性が報告されていない化学物質(N)、免疫抑制の報告のある化学物質(IT-1)、アレルギー、自己免疫などを誘発する可能性のある化学物質(IT-2)、in vivoにおける影響は明らかではないが、何らかの免疫関連パラメーターを変動させる化学物質(M)などに分類されている。そこで、これらの化学物質をMITAで評価し、既知の免疫毒性をMITAが正確に評価できるか否かを明らかにする。

5) 施設内、施設間再現性

産業総合研究所、食品薬品安全センター秦野研究所、東北大皮膚科の3施設で4種類の薬剤に関して施設間施設間再現性試験をおこない問題点を明らかにした。その検討結果をふまえて、さらに10種類の化学物質について施設間再現性試験を施行した。

(倫理面への配慮)

健康人からの採血に際しては、研究内容、採血における危険性、得られた検査結果により本人の人権が損なわれることのないこと、得られた検査結果は守秘され個人のプライバシーを侵害する可能性がないこと、研究に協力することに同意した後も、いつでも自由に辞退できること、この研究によって生じる知的財産権は被験者には帰属しないことについて説明し、本人より同意書を取得している。また、東北大学医学系研究科倫理委員会の承認も得ている。

C. 研究結果

1)から5)の研究目標にそって研究を遂行した。主に平成24年度に関しては1)と2)を、平成25年度、26年度に関しては2) 3) 4) 5)を行った。1) 2)の成果に関しては、東北大皮膚科木村裕がEvaluation of the Multi-ImmunoTox assay composed of 3 human cytokine reporter cells by examining immunological effects of drugsのtitleでToxicol In Vitroに掲載された(Kimura *et al.*,

2014)。

1) MITAのdata setの拡充 (Table 1)

平成25年度に引き続き26年度もWagnerら(Wagner *et al.*, 2006)がFluorescent Cell Chip assay (FCCA)に関する論文で検討した46化学物質に関してMITAによる評価をおこないMITAのdata setを作成した。その結果、鉛、活性酸素による免疫抑制作用、水銀、リチウムによる免疫増強作用、ニッケル、コバルトによるT細胞サイトカイン産生抑制作用などがMITAにより評価できることを明らかにした。すなわち鉛の免疫抑制作用がIL-2, IFN- γ のレポーター活性により、リチウム、水銀による免疫増強、自己免疫誘導作用が、IFN- γ のレポーター活性を指標に評価できる可能性が示された。

2) MITAとFluorescent cell chip assay (FCCA)との比較 (Table 2)

MITA、FCCAともにDex, CyA, Tac, Dapsone、鉛の免疫抑制作用と水銀による免疫増強作用(IFN- γ 転写活性増強)を適確に評価できた。一方、ニッケル、コバルトなど2価イオンにはT細胞活性化に必須な転写因子であるNFATの上流に位置するCa²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channelを抑制する作用が存在することが良く知られているが(Saito *et al.*, 2011)、MITAは両金属の抑制作用を検出できたのに対し、FCCAは検出できなかった。

3) 施設間再現性試験を行うことにより、MITAの多施設への技術移転性を検証する (Table 3-1 and 3-2)

東北大皮膚科および本研究に参加している産業総合研究所、食品薬品安全センター秦野研究所の3施設で10種類の化学物質について施設間再現性試験を施行した。これに先立ち技術移転が確実に行われているかを確認する目的で4種類の薬剤に関して各施設で試験を施行した (Table 3-1)。#2H4細胞については3施設間で88%の施設間再現性が確認できた。一方、THP-G1bおよびTHP-G8細胞の再現性は乏しかった。そこで、試験方法の施設間での共有化を再度図った後、10種類の化学物質について施設間再現性試験をおこない#2H4細胞に関しては85%、THP-G1b細胞とTHP-G8細胞に関してはそれぞれ70%、50%の一致率を認めた (Table 4-2)。またTHP-G1b細胞に代えて、TGCHAC-A4細胞を用いて行った試験では、東北大学と食薬センター間での一致率の改善を認めた。

4) MITAの改良

4-1) IL-8 Luc assayとの組み合わせ

近年、免疫反応は大きく自然免疫と獲得免疫

から構築されていることが報告され、免疫毒性もその両者の観点から評価することが求められている。実際、化学物質による自己免疫発症などに関しても自然免疫の重要性が明らかにされている(Pollard and Kono, 2013)。MITA同様のhigh through-put免疫毒性試験であるFCCAは自然免疫を評価できないが、MITAでは化学物質の自然免疫系への影響が評価可能である。しかし、LPS刺激によるIL-8発現は、代表的なハプテンである2-mercaptobenzothiazole、CoCl₂、NiCl₂により予想外に抑制された。一方、LPS非存在下に化学物質によるTHP-G8細胞のIL-8レポーター活性を評価するIL-8 Luc assayは、感作性試験法として、既にその迅速性、精度、感度、特異度、施設間再現性がvalidationにより評価され現在OECDにSPSFを提出している。そこで、感作性物質を含めた幅広い化学物質の免疫毒性評価系の構築には、MITAとIL-8 Luc assayの両者の組み合わせが必要となる。

4-2) 人工染色体を用いた新規IL-1 レポーター細胞の樹立

THP-G1b細胞の問題点

MITAを種々化学物質で評価するなか、THP-G1b細胞の以下のような問題点が明らかになった。1) 細胞増殖が遅く、解析に必要な細胞数を確保するのに時間を要する。2) LPSで刺激後にSLR-LAが負になってしまう。

人工染色体技術を用いた新規IL-1 レポーター細胞の樹立(図3)

上記の問題点を克服するために、人工染色体技術(Hoshiya *et al.*, 2009)を応用して、新たにIL-1レポーター細胞樹立を試みた。その結果、数種類のクローンを樹立することができた。その代表的なクローンのLPSに対する反応性を図に示した(図8)。いずれのクローンもLPS刺激によりSLG-LAを顕著に増加させるが、多くの細胞で、THP-G1b同様にSLG-LAが負の値になってしまった。その中で、唯一TGCHAC-A4細胞のみが、10 ng/mlの濃度のLPSでSLG-LAの値が負にならずSLG-LAが正の値として計算できた。そこで以後の実験ではTGCHAC-A4細胞を用いることとした。

TGCHAC-A4細胞の増殖曲線(図4)

THP-G1b細胞のもう一つの問題点は増殖速度が遅い点にあったので、TGCHAC-A4細胞の増殖曲線をTHP-G1b細胞の増殖曲線と比較した。その結果、図9に示す様にTGCHAC-A4細胞の増殖が極めて良好なことが確認できた。

TGCHAC-A4細胞とTHP-G1b細胞との同等性(図5)

これまでMITAにおいては、THP-G1b細胞のLPS刺激後のSLG-LAが負になってしまうためTHP-G8細胞のSLG-LAを使用してnSLG-LAを算出していた。同様の事をおこなうと、TGCHAC-A4細胞のLPS刺激に対するDex、CyAの抑制効果がTHP-G1b細胞と同等に評価できることが明らかになった。更に、その結果は、TGCHAC-A4細胞のSLG-LAを用いても得られた。従って、TGCHAC-A4細胞は反応性においても、これまでMITAに用いられていたTHP-G1b細胞と同等であることが確認された。

TGCHAC-A4細胞の技術移転(図6, 図7)

TGCHAC-A4細胞が多施設でも同様にMITAの評価細胞として使用できるかを検証した。まずLPSの濃度と反応性を検討したところ、いずれの施設においても10 ng/mlまでの濃度ではSLR-LAが正の値を示しnSLG-LAを正の値として評価することができた。ただし、25 ng/mlの濃度では、東北大学においてのみSLG-LAが負になってしまった(図6)。

さらに、DexとCyAの影響を検討したところ、どの施設においてもDexによる顕著な抑制とCyAによる軽度の抑制が検出できた(図7)。

7) MITAによるアルキル化剤、プリンまたはリミジン合成阻害剤の評価(図8, 図9) 9)

昨年までの研究で、MITAでは、サイトカインの発現調節に直接作用する薬剤の免疫抑制作用は適切に評価できるが、T細胞の代謝、細胞増殖に作用する免疫抑制剤の作用は評価できないことが明らかとなった。しかし詳細に検討すると、CP、AZ、MPA、MZR、MTXなどの薬剤が、MITAのいずれかのレポーター活性を逆に増強する特性を共有していること、さらにその作用がPMA/I_o刺激前に24時間培養を行う事でより顕著になることを見いだした。このような作用はDexやCyAには認められなかった。

D. 考察

免疫系に対する化学物質の影響を簡便かつ短時間に評価することのできるルシフェラーゼレポーターアッセイ系を確立した(Multi-Immuno Tox Assay ; MITA)。この系ではT細胞におけるIL-2とIFN- γ 、マクロファージ/樹状細胞におけるIL-1 β とIL-8転写に至るシグナル伝達経路への化学物質の影響を評価することができる。まず種々の免疫抑制剤を評価したところ、その評価はすでに報告されている薬剤のT細胞やマクロファージ/樹状細胞に対する免疫学的効果とほぼ一致していた。また

この薬剤を用いた検討により、MITAが化学物質の免疫毒性作用の標的細胞がT細胞かマクロファージ/樹状細胞かを容易に同定できることも明らかとなった。

最近、共同研究者の鳥取大学分子制御内科学分野 渡部仁成講師らは、THP-G8細胞を用いて、実際に日本に飛来してくるPM2.5.や黄砂と中国の黄土高原の砂との生物学的活性の相違を容易に検出できることを明らかにした(Watanabe *et al.*, 2014)。また、この研究では、PM2.5の喘息、鼻炎などの誘発には、単なる粒子量ではなく、その生物学的活性すなわちTHP-G8レポーター活性が相関することを明らかにした。今後THP-G8細胞のPM2.5の健康被害予測への応用が期待されている。又、共同研究者の東北大学病院皮膚科 木村裕助教は、同じくTHP-G8細胞が河川などの環境水の汚染をリムルテストなど既存の方法よりも簡便に評価できることを平成26年日本代替法学会総会で報告した。さらにTHP-G8細胞を用いた感作性予測試験法 IL-8 Luc assayは現在OECDにSPSFを提出している。このように、MITAを構成するTHP-G8細胞の安定性ならびに化学物質評価における有用性が漸次明らかになってきている。

また、今年度の研究では、研究期間中に明らかになったIL-1 レポーター細胞THP-G1bの脆弱性を克服する目的で、あらたにTGCHAC-4A細胞を樹立した。この細胞は、人工染色体上にIL-1

レポーター遺伝子が搭載されている世界で初めてのレポーター細胞である。樹立後、SLR-LAの陰性化などの問題を克服し、またTHP-G1bとの同等性比較試験なども行い、今後THP-G1b細胞に代わるMITAのあらたなIL-1 レポーター細胞として使用していく予定である。

現在までに40化学物質のMITAによる評価が完了した。その結果、鉛、活性酸素による免疫抑制作用、水銀、リチウムによる免疫増強作用、ニッケル、コバルトによるT細胞サイトカイン産生抑制作用などが評価できることを明らかになった。また同じくhigh throughputの免疫毒性試験法であるFCCAと異なり、MITAでは化学物質の自然免疫系への影響も評価できる。ただし予想外に、現行のMITAのプロトコルでは、化学物質処理後にLPS刺激を加えるため、多くのハプテンでIL-8プロモーター活性が抑制される。しかし、MITAとIL-8 Luc assayを組み合わせることにより、感作性物質を含めてより幅広く化学物質の免疫毒性を評価することが可能となる。

しかし、その一方、現時点ではMITAのみでは代謝、細胞増殖を介して免疫抑制を誘導する薬剤の評価は行えない。そのため、MITAによる免疫毒性評価は、28日間反復投与毒性試験などとの組み合わせが必要であるが、今後はMITAのプロトコルの変更(24時間の前培養)などにより、これら化学物質の免疫毒性評価の可能性も見いだせた。

最後に、3施設の再現性比較試験では、2H4に関しては施設内、施設間再現性とも良好であったが、新たなレポーター細胞が加わったこともありTGCHAC-A4およびTHP-G8細胞に関しては、いまだ満足いく結果は得られていない。しかし、今後プロトコルの更なる簡略化、試験細胞の培養方法、刺激に用いるLPS濃度などを検討することで良好な再現性が得られるよう検討を続けている。

文献

Allison AC (2000) Immunosuppressive drugs: the first 50 years and a glance forward. *Immunopharmacology* 47:63-83.

Gennari A, Ban M, Braun A, Casati S, Corsini E, Dastyh J, *et al.* (2005) The Use of In Vitro Systems for Evaluating Immunotoxicity: The Report and Recommendations of an ECVAM Workshop. *J Immunotoxicol* 2:61-83.

Hoshiya H, Kazuki Y, Abe S, *et al.* (2009) A highly stable and nonintegrated human artificial chromosome (HAC) containing the 2.4 Mb entire human dystrophin gene. *Mol therapy* 17:309-17.

Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, Aiba S.(2014) Evaluation of the Multi-ImmunoTox Assay composed of 3 human cytokine reporter cells by examining immunological effects of drugs. *Toxicol In Vitro* 28:759-768.

Langezaal I, Hoffmann S, Hartung T, Coecke S (2002) Evaluation and prevalidation of an immunotoxicity test based on human whole-blood cytokine release. *Alternatives to laboratory*

animals : *ATLA* 30:581-95.

Pollard KM, Kono DH (2013) Requirements for innate immune pathways in environmentally induced autoimmunity. *BMC medicine* 11:100.

Saito R, Hirakawa S, Ohara H, Yasuda M, Yamazaki T, Nishii S, *et al.* (2011) Nickel differentially regulates NFAT and NF-kappaB activation in T cell signaling. *Toxicol Appl Pharmacol* 254:245-55.

Takahashi T, Kimura Y, Saito R, Nakajima Y, Ohmiya Y, Yamasaki K, *et al.* (2011) An in vitro test to screen skin sensitizers using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 124:359-69.

Thurm CW, Halsey JF (2005) Measurement of cytokine production using whole blood. *Curr Protoc Immunol* Chapter 7:Unit 7 18B.

Wagner W, Walczak-Drzewiecka A, Slusarczyk A, Biecek P, Rychlewski L, Dastych J (2006) Fluorescent Cell Chip a new in vitro approach for immunotoxicity screening. *Toxicol Lett* 162:55-70.

Watanabe M, Kurai J, Tomita K, *et al.* (2014) Effects on asthma and induction of interleukin-8 caused by Asian dust particles collected in western Japan. *The Journal of asthma : official journal of the Association for the Care of Asthma* 51:595-602.

E. 結論

免疫系に対する化学物質の影響を簡便かつ短時間に評価可能なルシフェラーゼレポーターアッセイ系を確立した(Multi-Immuno Tox Assay ; MITA)。本研究により、この評価系を用いることで、T細胞

におけるIL-2とIFN- γ 、マクロファージ/樹状細胞におけるIL-1 β とIL-8の転写に至るシグナル伝達経路への化学物質の影響を多面的に評価することができることが明らかとなった。あらたに世界に先駆けて、人工染色体を用いたIL-1 β レポーター細胞を樹立し、MITA構成細胞の長期安定性を確保した。施設間再現性も検討し、IL-2とIFN- γ レポーター細胞に関しては既に良好な結果が得られている。以上の研究より、MITAが化学物質の免疫毒性を自然免疫と獲得免疫の両面から評価できる新しいhigh-throughput手法となりうることを明らかにした。

F. 健康危険情報

特に報告すべき内容は存在しない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Watanabe M, Noma H, Kurai J, Sano H, Saito R, Abe S, Kimura Y, Aiba S, Oshimura M, Yamasaki A, Shimizu E. Decreased pulmonary function in school children in Western Japan after exposure to Asian desert dusts and its association with interleukin-8. *BioMed Res International*, in press, 2015.
2. Yu Z, Ono C, Aiba S, Kikuchi Y, Sora I, Matsuoka H, and Tomita H. Therapeutic concentration of lithium stimulates complement C3 production in dendritic cells and microglia via GSK-3 inhibition. *Glia*. 63:257-70, 2015.
3. Watanabe M, Kurai J, Tomita K, Sano H, Abe S, Saito R, Minato S, Igishi T, Burioka N, Sako T, *et al.* Effects on asthma and induction of interleukin-8 caused by Asian dust particles collected in western Japan. *J Asthma*. 51:595-602, 2014.
4. Tsujita-Inoue K, Hirota M, Ashikaga T, Atobe T, Kouzuki H, and Aiba S. Skin sensitization risk assessment model using artificial neural network analysis of data from multiple in vitro assays. *Toxicol in Vitro* 28:626-39, 2014

5. Onami K, Kimura Y, Ito Y, Yamauchi T, Yamasaki K, and Aiba S. Nonmetal haptens induce ATP release from keratinocytes through opening of pannexin hemichannels by reactive oxygen species. *J Invest Dermatol.* 134:1951-60, 2014
 6. Ohashi K, Sampei K, Nakagawa M, Uchiumi N, Amanuma T, Aiba S, Oikawa M, and Mizuno K. Damnacanthal, an effective inhibitor of LIM-kinase, inhibits cell migration and invasion. *Mol Biol Cell.* 25:828-40, 2014.
 7. Ogura F, Wakao S, Kuroda Y, Tsuchiyama K, Bagheri M, Heneidi S, Chazenbalk G, Aiba S, and Dezawa M. Human adipose tissue possesses a unique population of pluripotent stem cells with nontumorigenic and low telomerase activities: potential implications in regenerative medicine. *Stem Cell Dev.* 23:717-28, 2014.
 8. Li N, Yamasaki K, Saito R, Fukushima-Takahashi S, Shimada-Omori R, Asano M, and Aiba S. Alarmin function of cathelicidin antimicrobial peptide LL37 through IL-36gamma induction in human epidermal keratinocytes. *J Immunol.* 193:5140-8, 2014.
 9. Kimura Y, Fujimura C, Ito Y, Takahashi T, and Aiba S. Evaluation of the Multi-ImmunoTox Assay composed of 3 human cytokine reporter cells by examining immunological effects of drugs. *Toxicol in Vitro* 28:759-68, 2014.
 10. Watabe A, Sugawara T, Kikuchi K, Yamasaki K, Sakai S, and Aiba S. Sweat constitutes several natural moisturizing factors, lactate, urea, sodium, and potassium. *J Dermatol Sci.* 272:177-82, 013;.
 11. Takahashi T, Kimura Y, Niwa K, Ohmiya Y, Fujimura T, Yamasaki K, and Aiba S. In vivo imaging demonstrates ATP release from murine keratinocytes and its involvement in cutaneous inflammation after tape stripping. *J Invest Dermatol.* 133:2407-15, 2013
 12. Okuma A, Hoshino K, Ohba T, Fukushi S, Aiba S, Akira S, Ono M, Kaisho T, and Muta T. Enhanced apoptosis by disruption of the STAT3-IkappaB-zeta signaling pathway in epithelial cells induces Sjogren's syndrome-like autoimmune disease. *Immunity.* 38:450-60, 2013.
 13. Hirota M, Kouzuki H, Ashikaga T, Sono S, Tsujita K, Sasa H, and Aiba S. Artificial neural network analysis of data from multiple in vitro assays for prediction of skin sensitization potency of chemicals. *Toxicol in Vitro* 27:1233-46, 2013
 14. Suzuki N, Yamashita N, Koseki N, Yamada T, Kimura Y, Aiba S, Toyozumi T, Watanabe M, Ohta R, Tanaka N, et al. Assessment of technical protocols for novel embryonic stem cell tests with molecular markers (Hand1- and Cmya1-ESTs): a preliminary cross-laboratory performance analysis. *J Toxicol Sci* 37:845-51, 2012.
- 2 . 学会発表
Kaoru Onami, Yutaka Kimura, Yumiko Ito, Takeshi Yamauchi, Kenshi Yamasaki, Setsuya Aiba : Nonmetal haptens induce ATP release from keratinocytes through opening of pannexin hemichannels by reactive oxygen species. Society for Investigative Dermatology 73rd Annual Meeting, Albuquerque, United State of America (2014.5)
- 相場 節也、木村 裕、藤村 千鶴 : IL-8 Luc assay ワークショップ「日本発の動物実験代替法の現状」(東京) 2014年8月
- Yutaka Kimura, Chizu Fujimura, Miho Higuchi

hi, Mika Watanabe, Kohji Yamakage, Yoshihiro Ohmiya, Hajime Kojima, Setsuya Aiba : Evaluation of the Multi-ImmunoTox assay (MITA) composed of 3 human cytokine reporter cell lines by examining the immunological effects of drugs. 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Prague, Czech (2014.8)

Yutaka Kimura, Chizu Fujimura, Setsuya Aiba : A dataset on 99 chemicals tested by IL-8 Luc assay. 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Prague, Czech (2014.8)

Yutaka Kimura, Mika Watanabe, Noriyuki Suzuki, Tomoko Iwaki, Kohji Yamakage, Koichi Saito, Yoshihiro Nakajima, Chizu Fujimura, Aoi Maruya, Yoshihiro Ohmiya, Takashi Omori, Shojiro Yamazaki, Hajime Kojima, Norihiro Tanaka, Setsuya Aiba : An inter-laboratory validation study of IL-8 Luc assay using a stable THP-1-derived IL-8 reporter cell line, THP-G8. 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Prague, Czech (2014.8)

木村 裕、渡辺 美香、鈴木 紀之、岩城 知子、山影 康次、斎藤 幸一、中島 芳浩、藤村 千鶴、近江谷 克裕、酒井 綾子、丸谷 あおい、大森 崇、山崎 晶次郎、小島 肇、田中 憲穂、相場 節也 : IL-8 Luc assayの施設間差試験およびデータセットの作製. 日本動物実験代替法学会 第27回大会 (横浜) 2014年12月

木村 裕、藤村 千鶴、Socorro P. Lupisan、相場 節也 : IL-8レポーター細胞を用いた微生物毒素簡易定量

法の開発. 日本動物実験代替法学会 第27回大会 (横浜) 2014年12月

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

特願2010-151362; PCT/JP2011/65090

1. 研究打ち合わせ会議

1. 平成24年度第一回班会議 :

日時 : 平成24年5月11日 (金) 13:00 ~ 16:00
(東京)

2. Multi-ImmunoTox assay 技術説明会

日時 : 平成24年8月29日 (水) 10:00 ~ 17:00
(仙台)

3. 平成24年度第二回班会議 :

日時 : 平成25年1月25日 (金) 13:30 ~ 16:00
(東京)

4. 平成25年度第一回班会議 :

日時 : 平成25年6月28日 (金) 13:30 ~ 6月28日 (土) 9:00 ~ 12:00 (仙台)

5. 平成25年度第二回班会議 :

日時 : 平成25年10月25日 (金) 10:00 ~ 12:00
(東京)

図1. Multi-ImmunoToxicity assay (MITA)の構成と各種パラメーター

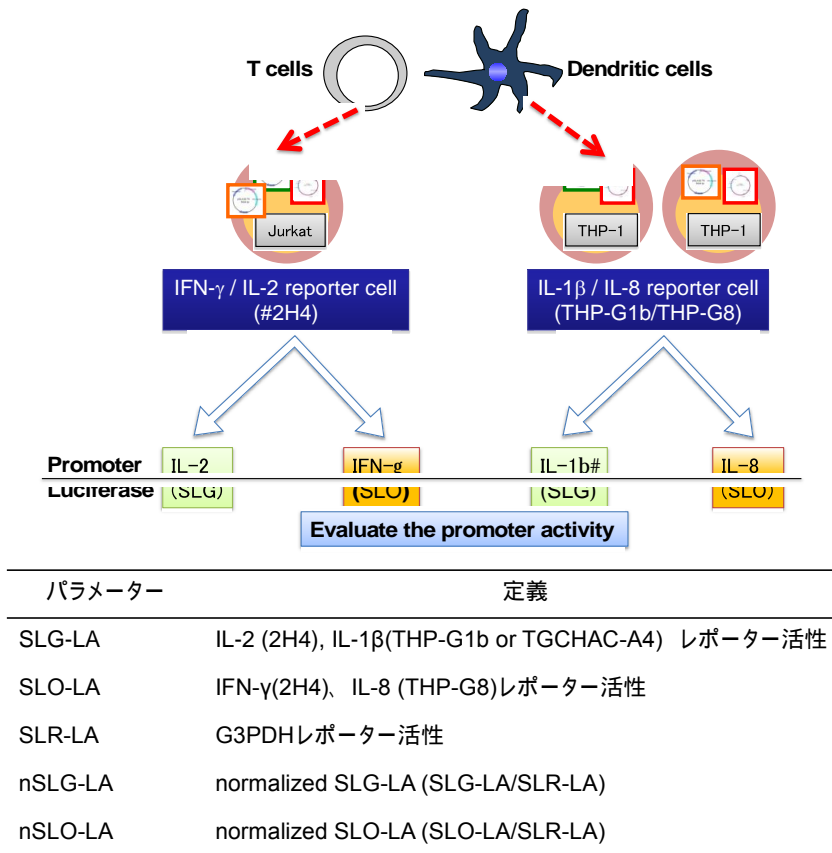
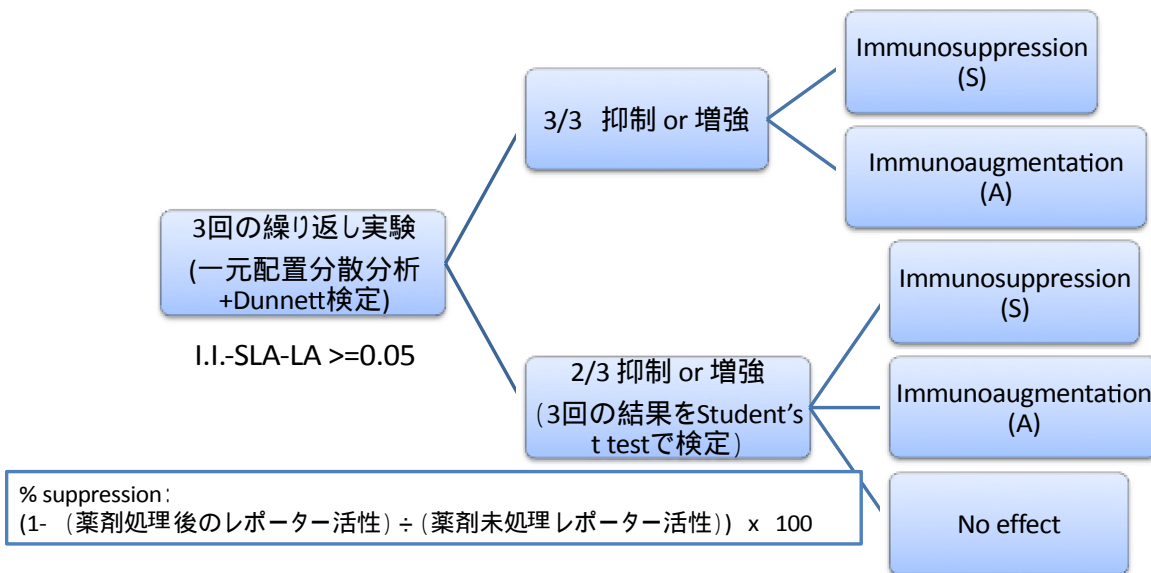


図2. MITA による免疫毒性判定基準



各実験において得られた結果に関して一元配置分散分析, Dunnett検定を行い有意な抑制効果, 増強効果があるか否かを検討する. 3回の結果が一致していた際には, その結果を最終判定結果とする.

3回の実験結果が一致していなかった場合は, 3回の繰り返し実験の結果の中から%suppressionの絶対値(免疫抑制物質に関しては正の値, 増強物質に関しては負の値となる)が最も大きい値を選びStudent's t-testを行い, そこで統計的有意差の得られた場合, その結果を薬剤の最終判定結果とする.

図 3. 人工染色体を用いて作成した新規 IL-1 レポーター細胞

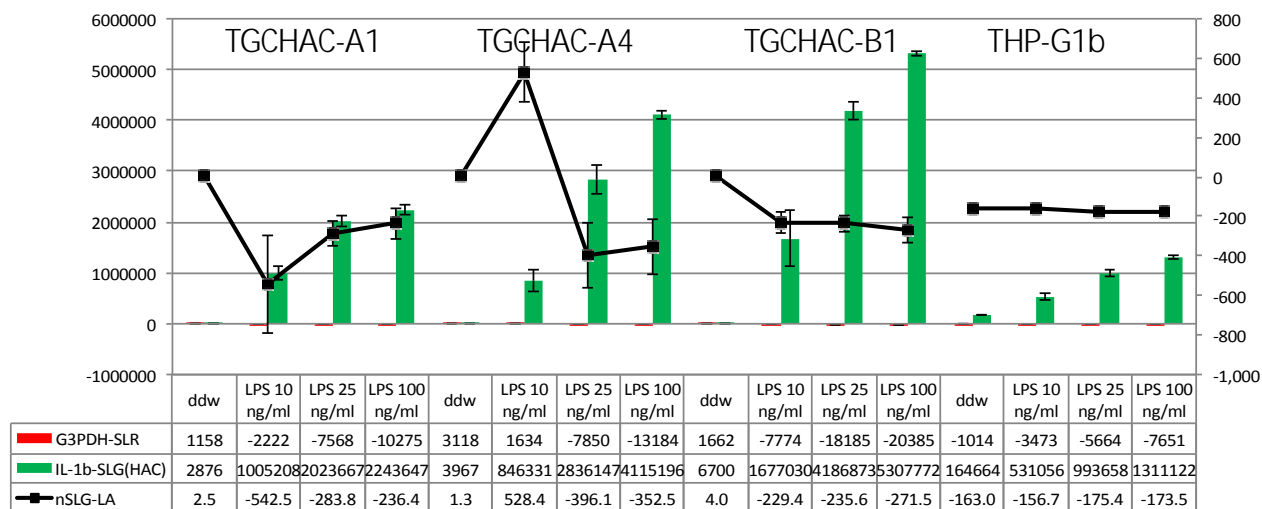


図 4. 新しく樹立した IL-1 レポーター細胞 TGCHAC-4A と THP-G1 b の増殖速度の違い

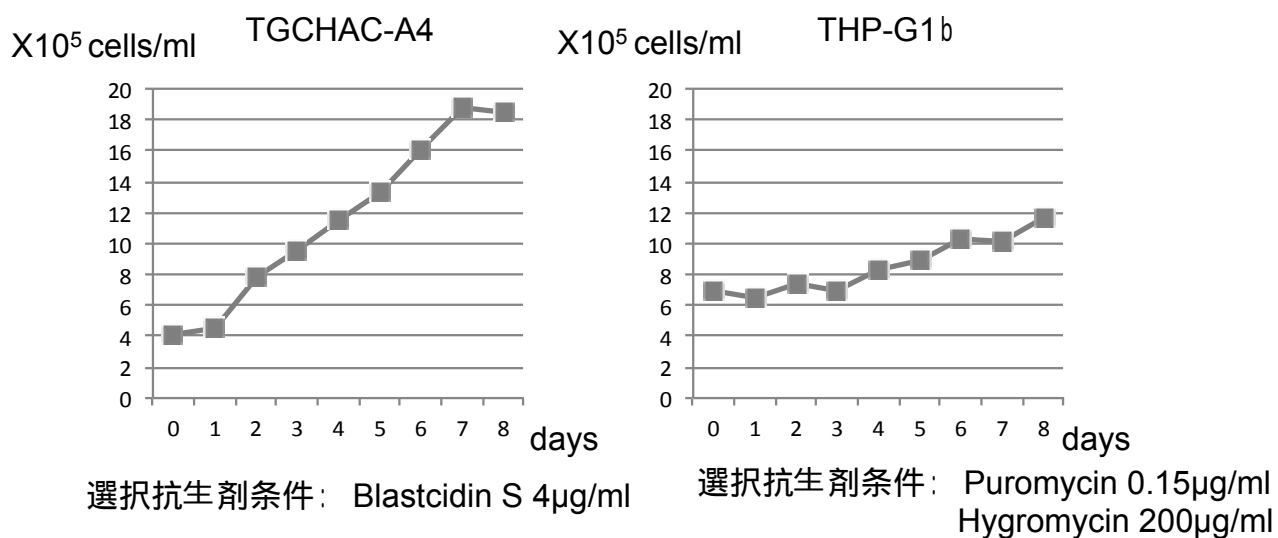


図 5. TGCHAC-A4 細胞の THP-G1b 細胞の同等性の証明

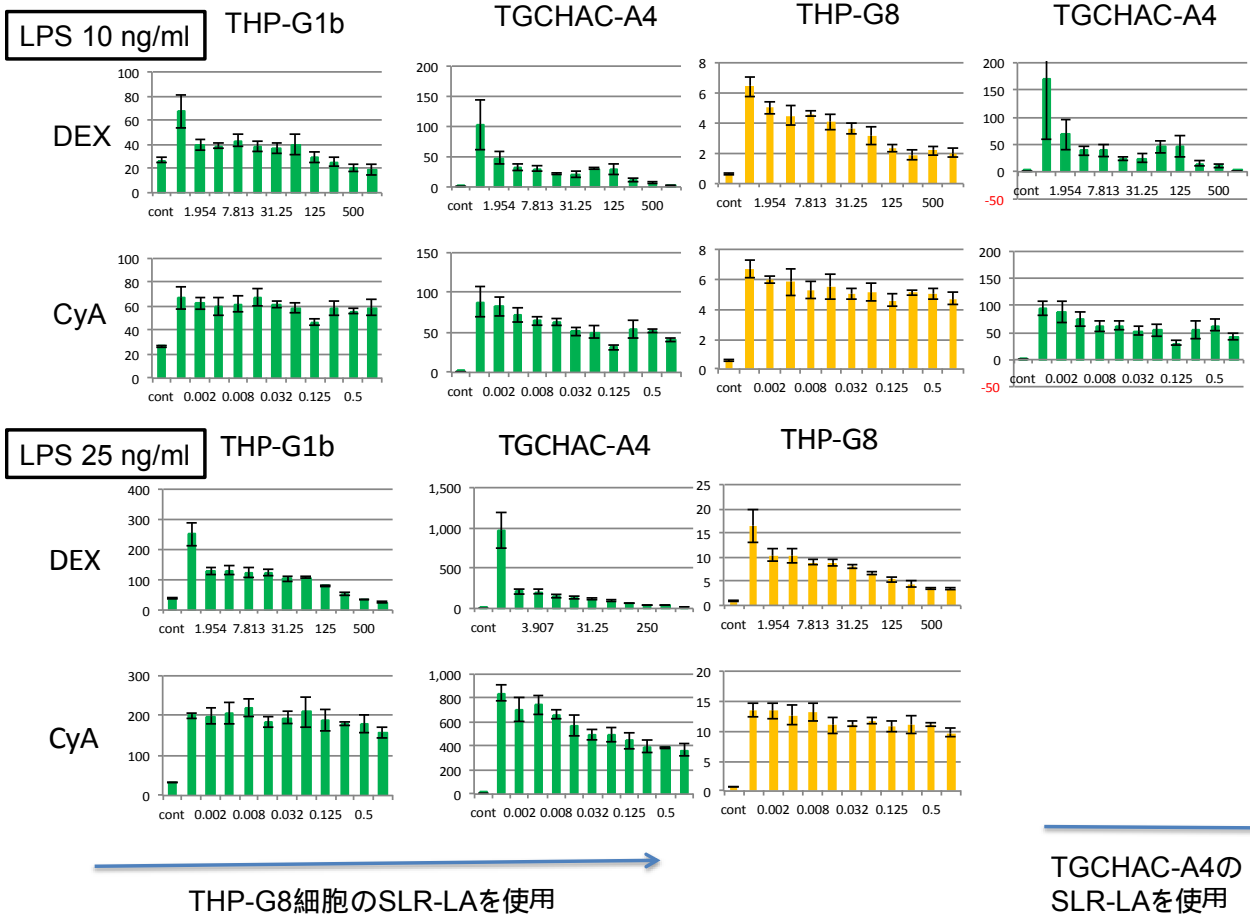
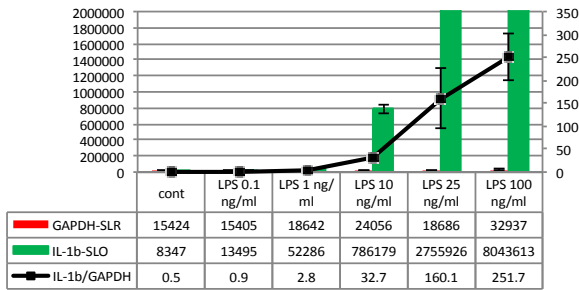


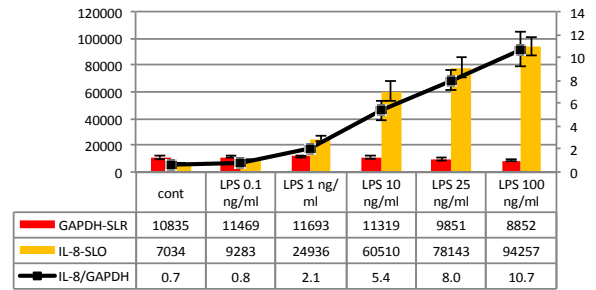
図 6. TGCHAC-A4 細胞の施設間差試験 (LPS)

食薬センター

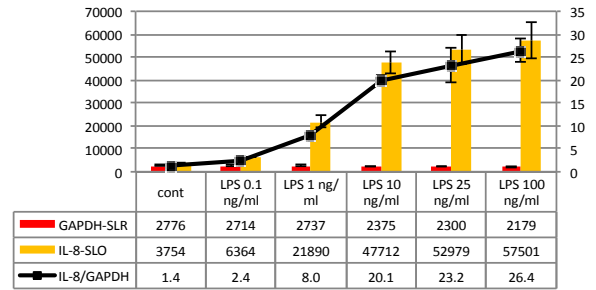
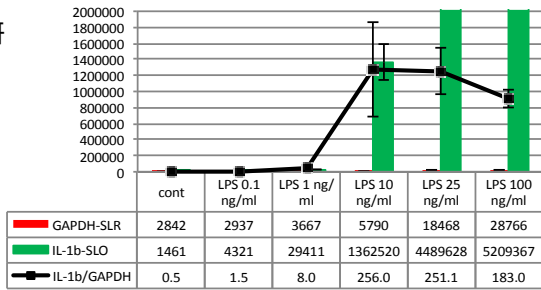
TGCHAC-A4



THP-G8



産総研



東北大

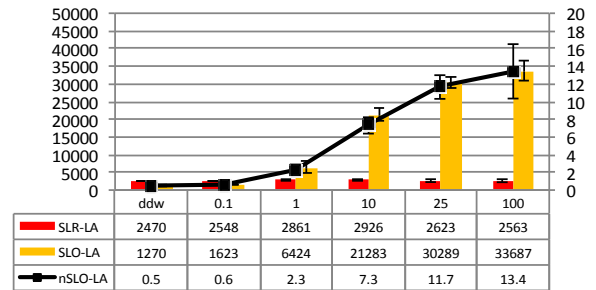
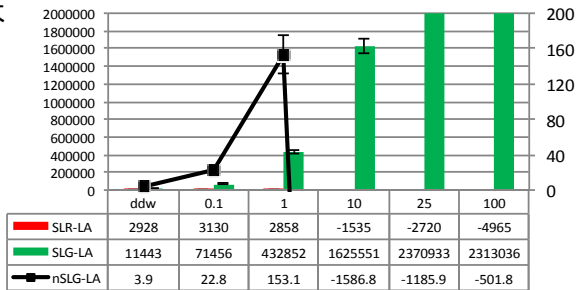
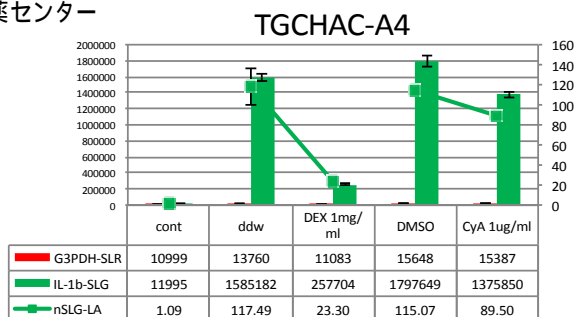
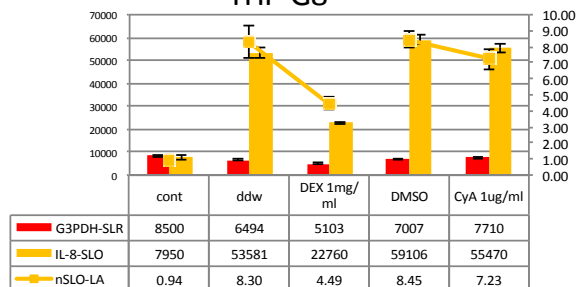


図7. TGCHAC-4A 細胞の施設間差試験 (Dex and CyA)

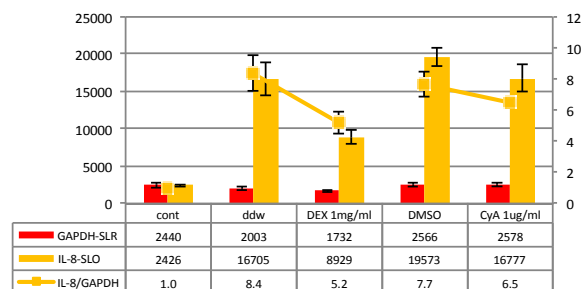
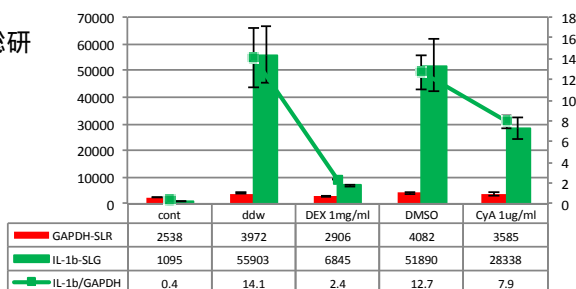
食薬センター



THP-G8



産総研



東北大

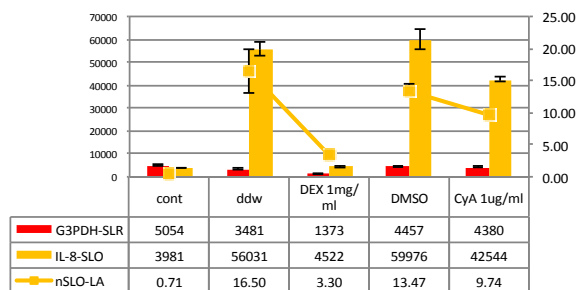
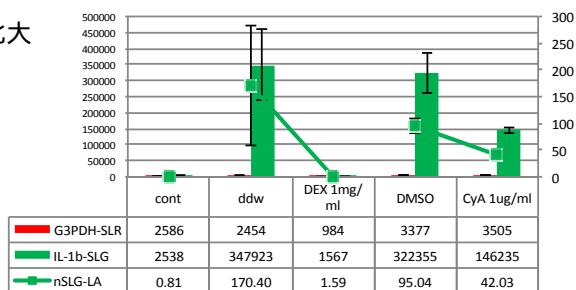


図 8. Cyclosporin A, Methotrexate の作用に与える 24 時間前培養の影響

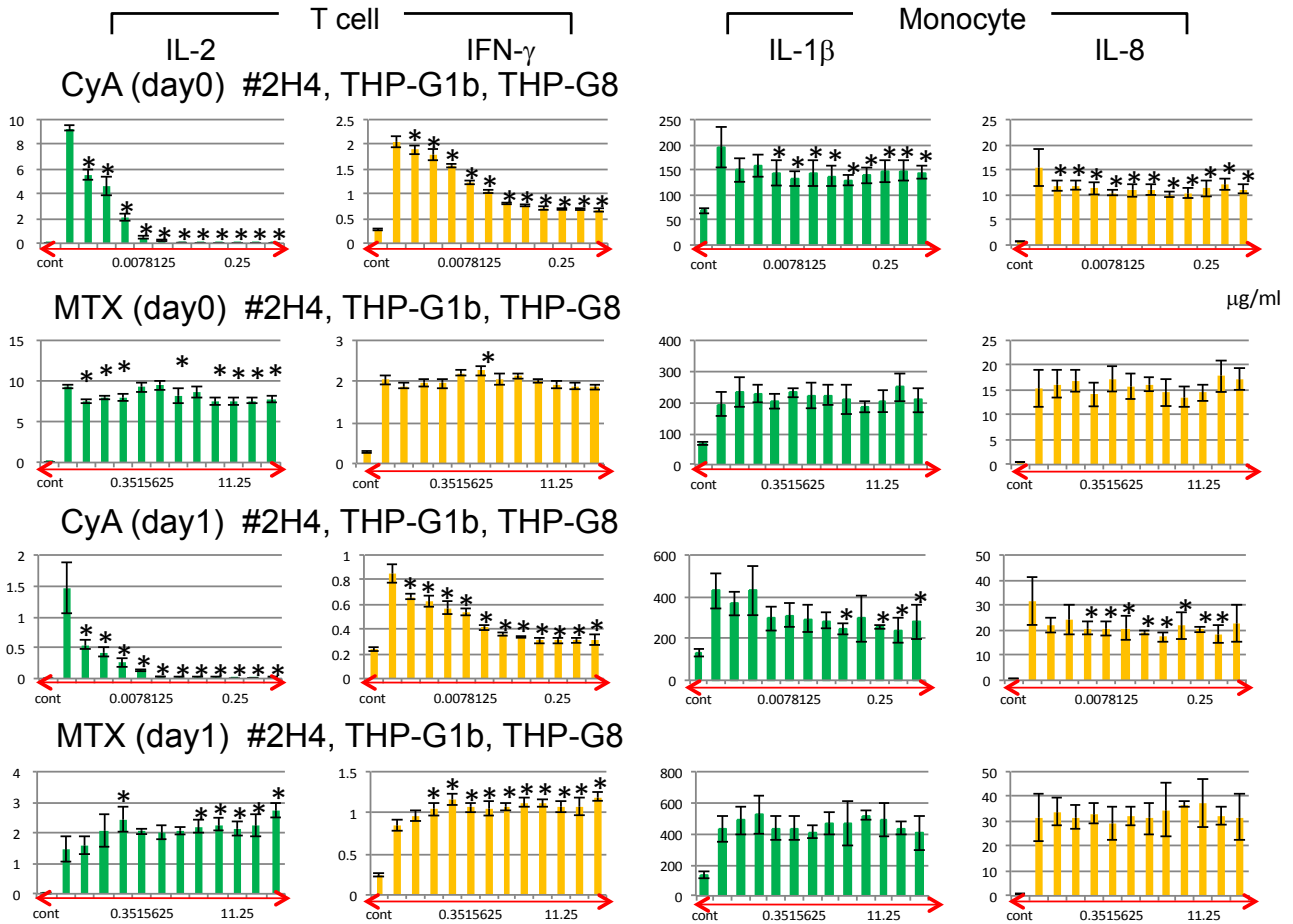
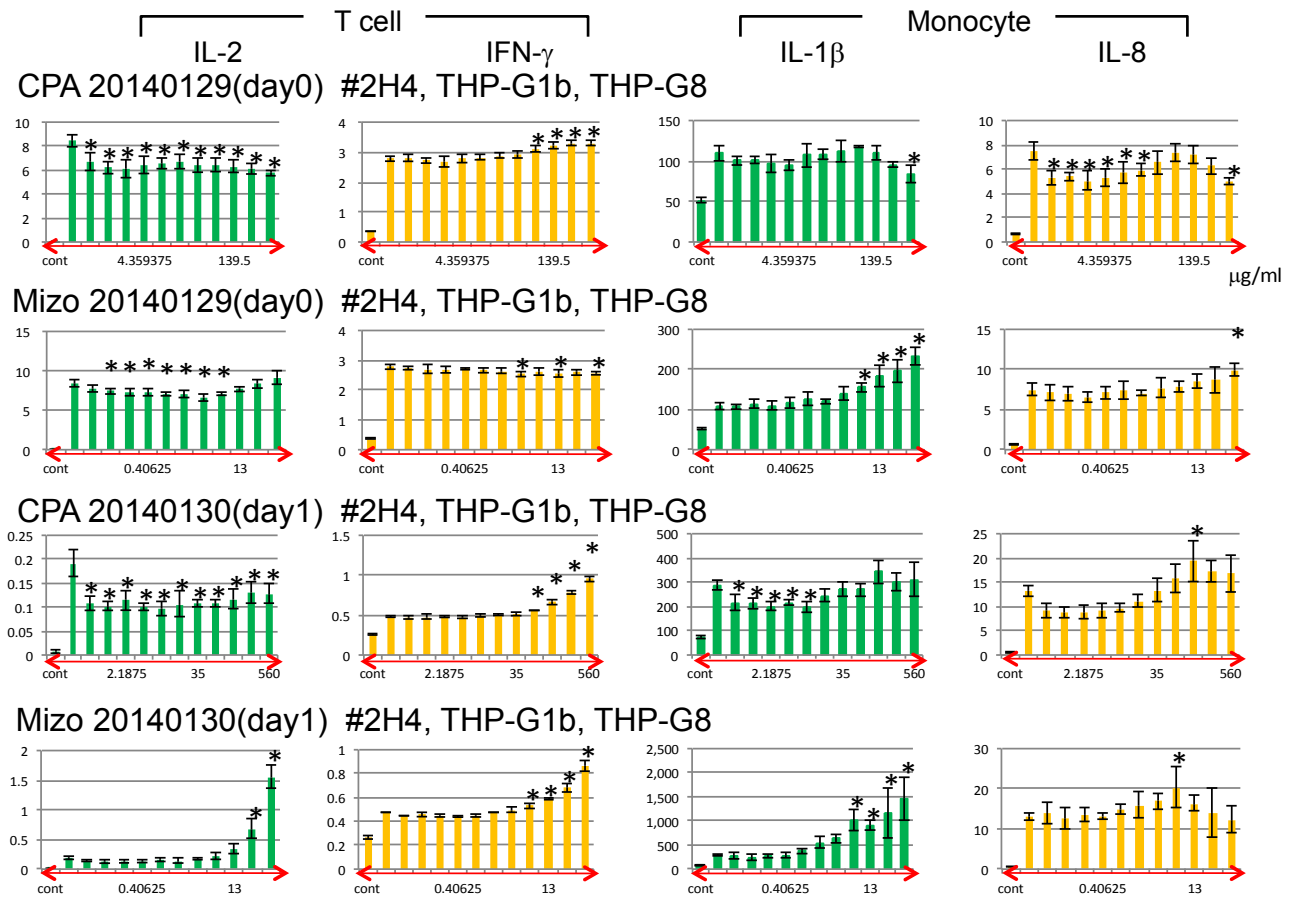


図 9. Cyclophosphamide, Mizoribin の作用に与える 24 時間前培養の影響



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 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 5×10^4 細胞 /100 μ 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 °C、5%CO₂ 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 レポーター細胞 TGCHAC-4A と THP-G1b の増殖速度の違い
TGCHAC-A4 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 °C、5%CO₂ 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 5×10^4 細胞/50 μ 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 °C、5%CO₂ 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 1×10^5 細胞 /100 μ 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 °C、5%CO₂ 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 1×10^5 細胞 /100 μ 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 °C、5%CO₂ 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 α または LPS で刺激し 37 °C、5%CO₂ 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 α または LPS で刺激し 37 °C、5%CO₂ 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-g		IL-1b		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↓, NK↑
2-Aminoanthracene	-/-	S	-/-	S	-/-	S	+0/+	N	抗体産生↓, NK、DTH↓
2-Mercaptobenzothiazole	+/-+	N	-/+	N	0/+0	N	-/-	S	感受性
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↑
Benzethonium chloride	-/-	S	-/-	S	-/-	S	-0/-	N	感受性
Chlorpromazine	-/-	S	-/-	S	-/-	S	-/-	S	NK↑, 光感受性
Cisplatin	-/-	S	-/-	S	+/-0	N	-/+	N	アナフィラキシー, DTH↓, LLNA+
Cobalt chloride	-/-	S	-/-	S	-/-	S	-/-	S	感受性
Cyclophosphamide	+0/-	N	+/+/+	A	0/0-	N	0/+-	N	感受性
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, 感受性, 抗体産生↓, NK↓, CSM↓
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↑, cytotoxicity↑, Ig↓
Isophorone diisocyanate	-/-	S	+/-+	N	-/-	S	-/-	S	感受性
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	感受性, アレルギー反応, 自己免疫
Methanol	-/+	N	-/+	N	0/-0	N	+/-	N	NK↓
Mitomycin C	-/-	S	+/-	N	+0/-	N	+0/-	N	感受性, 免疫複合体病
Nickel sulfate	-/-	S	-/-	S	-/-	S	-/-	S	感受性
Nitrofurazone	-/-	S	+/+/+	A	+/+/+	A	+/+/+	A	感受性
p-Nitroaniline	-/-	S	-/-	S	-/-	S	-/-	S	cytotoxicity↓, CSM↓, NK↑, 抗体産生↑, Ig↓
Sodium bromate	-/-	S	+/-0	N	-/+	N	-0/+	N	Ig↑
Triethanolamine	-/-	S	-/-	S	-/-0	N	-/+	N	感受性

- 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
CoCl₂			
IL-2	S (-/-)	S (-/-)	S (-/+/-+*)
IFN- γ	S (-/+/-*)	S (-/-)	S (-/-)
IL-1 β	S (-/-)	S (-/-)	N (+/+/-+)
IL-8	S (-/-)	S (+/-/-*)	N (+/+/-+)
NiSO₄			
IL-2	S (-/-)	S (-/-)	S (-/+/-+*)
IFN- γ	S (+/-/-*)	S (-/-)	S (-/-)
IL-1 β	S (-/-)	S (-/-)	N (+/+/-+)
IL-8	S (-/+/-*)	S (-/-)	A (+/+/-+*)
Isophorone diisocyanate			
IL-2	S (+/-/-*)	S (-/-)	N (+/+/-+)
IFN- γ	N (+/-/+)	N (0/+/-)	N (+/-/+)
IL-1 β	S (-/-)	S (-/-)	N (-/+)
IL-8	S (-/-)	S (-/-)	S (-/-)
2-Mercaptobenzothiazole			
IL-2	N (+/-/-+)	N (+/-/-+)	N (+/+/-+)
IFN- γ	N (+/+/-+)	N (+/-/-+)	N (+/-/-+)
IL-1 β	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	IL-2	3/4= 0.75
	IFN-g	4/4= 1.00
	IL-2+IFN-g	7/8= 0.88
THP-G1b	IL-1b	0/4= 0.00
THP-G8	IL-8	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			
Benzethonium chloride											
IL-2	S (-/-)	S (-/-)	S (-/-)	S (-/-)	S (-/-)	S (-/-)	S (-/-)	S (-/-)	S (-/-)	S (-/-)	S (-/-)
IFN- γ	S (-/-)	S (-/-)	S (-/-)	S (-/-)	S (-/-)	S (-/-)	S (-/-)	S (-/-)	S (-/-)	S (-/-)	S (-/-)
IL-1 β	S (-/-)	S (-/0*)	N (0/0/+)	S (-/-)	S (-/0*)	N (0/0/+)	S (-/-)	S (-/0*)	N (0/0/+)	S (-/-)	S (-/0*)
IL-8	N (-/0/-)	N (0/0/0)	N (0/0/0)	N (-/0/-)	N (0/0/0)	N (0/0/0)	N (-/0/-)	N (0/0/0)	N (0/0/0)	N (-/0/-)	N (0/0/0)
Ethanol											
IL-2	N (0/-)	N (0/+)	N (+/+/-)	N (0/-)	N (0/+)	N (+/+/-)	N (0/-)	N (0/+)	N (+/+/-)	N (0/-)	N (0/+)
IFN- γ	N (0/0/0)	N (0/0/+)	N (+/+/-)	N (0/0/0)	N (0/0/+)	N (+/+/-)	N (0/0/0)	N (0/0/+)	N (+/+/-)	N (0/0/0)	N (0/0/+)
IL-1 β	N (0/+)	N (0/0/0)	N (-/0/+)	N (0/+)	N (0/0/0)	N (-/0/+)	N (0/+)	N (0/0/0)	N (-/0/+)	N (0/+)	N (0/0/0)
IL-8	N (0/+)	N (0/0/0)	N (-/0/0)	N (0/+)	N (0/0/0)	N (-/0/0)	N (0/+)	N (0/0/0)	N (-/0/0)	N (0/+)	N (0/0/0)
Dapsone											
IL-2	S (-/-)	S (-/+*)	S (+/+/-)	S (-/-)	S (-/+*)	S (+/+/-)	S (-/-)	S (-/+*)	S (+/+/-)	S (-/-)	S (-/+*)
IFN- γ	S (+/+*)	S (-/-)	S (+/+/-)	S (+/+*)	S (-/-)	S (+/+/-)	S (+/+*)	S (-/-)	S (+/+/-)	S (+/+*)	S (-/-)
IL-1 β	S (-/-)	S (-/-)	S (-/-)	S (-/-)	S (-/-)	S (-/-)	S (-/-)	S (-/-)	S (-/-)	S (-/-)	S (-/-)
IL-8	S (-/-)	S (-/0*)	S (-/-)	S (-/-)	S (-/0*)	S (-/-)	S (-/-)	S (-/0*)	S (-/-)	S (-/-)	S (-/0*)
Acetaminophen											
IL-2	A (+/+/+)	A (+/+*)	A (+/+/-)	A (+/+/+)	A (+/+*)	A (+/+/-)	A (+/+/+)	A (+/+*)	A (+/+/-)	A (+/+/+)	A (+/+*)
IFN- γ	A (+/+/+)	A (+/+/+)	N (+/+/-)	A (+/+/+)	A (+/+/+)	N (+/+/-)	A (+/+/+)	A (+/+/+)	N (+/+/-)	A (+/+/+)	A (+/+/+)
IL-1 β	A (+/+/+)	A (+/+/+)	A (+/+/+)	A (+/+/+)	A (+/+/+)	A (+/+/+)	A (+/+/+)	A (+/+/+)	A (+/+/+)	A (+/+/+)	A (+/+/+)
IL-8	A (+/+/+)	N (-/-)	A (+/+/+)	A (+/+/+)	N (-/-)	A (+/+/+)	A (+/+/+)	N (-/-)	A (+/+/+)	A (+/+/+)	N (-/-)
Dibutyl phthalate											
IL-2	S (-/-)	S (+/+*)	S (+/-)	S (-/-)	S (+/+*)	S (+/-)	S (-/-)	S (+/+*)	S (+/-)	S (-/-)	S (+/+*)
IFN- γ	S (-/-)	S (-/+*)	S (-/-)	S (-/-)	S (-/+*)	S (-/-)	S (-/-)	S (-/+*)	S (-/-)	S (-/-)	S (-/+*)
IL-1 β	S (+/-)	N (+/0)	S (+/-)	S (+/-)	N (+/0)	S (+/-)	S (+/-)	N (+/0)	S (+/-)	S (+/-)	N (+/0)
IL-8	S (-/-)	N (0/0/0)	S (+/-)	S (-/-)	N (0/0/0)	S (+/-)	S (-/-)	N (0/0/0)	S (+/-)	S (-/-)	N (0/0/0)
p-Nitroaniline											
IL-2	S (-/-)	S (-/-)	S (+/+*)	S (-/-)	S (-/-)	S (+/+*)	S (-/-)	S (-/-)	S (+/+*)	S (-/-)	S (-/-)
IFN- γ	N(-/+/-)	N(+/+/-)	N(+/+/-)	N(-/+/-)	N(+/+/-)	N(+/+/-)	N(-/+/-)	N(+/+/-)	N(+/+/-)	N(-/+/-)	N(+/+/-)
IL-1 β	S(-/-)	S(-/-)	S(-/-)	S(-/-)	S(-/-)	S(-/-)	S(-/-)	S(-/-)	S(-/-)	S(-/-)	S(-/-)
IL-8	S(-/-)	S(-/-)	S(-/-)	S(-/-)	S(-/-)	S(-/-)	S(-/-)	S(-/-)	S(-/-)	S(-/-)	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-g	7/10= 0.70
	IL-2+IFN-g	17/20= 0.85
THP-G1b	IL-1b	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 ₃ , NiSO ₄) 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 μ M PMA の調整方法.....	26
6-3	Control 液及び $\times 10$ 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 变更履歴..... 40

1. はじめに

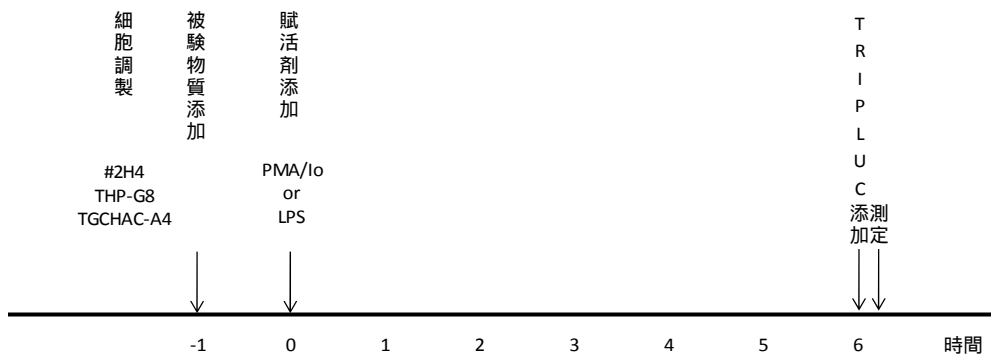
本 Protocol は IL2-SLG、IFN γ -SLO、G3PDH-SLR を含む多色発光細胞株 (#2H4)、IL8-SLO、G3PDH-SLR を含む多色発光細胞株 (THP-G8) および IL-1 β -SLG、G3PDH-SLR を含む多色発光細胞株 (TGCHAC-A4) を利用した化学物質の免疫毒性試験法における細胞培養方法、被験物質調整及び添加方法、及びルシフェラーゼアッセイの方法について記載した。

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/lo or LPS only	A/2 ⁹ μg/ml	A/2 ⁸ μg/ml	A/2 ⁷ μg/ml	A/2 ⁶ μg/ml	A/2 ⁵ μg/ml	A/2 ⁴ μg/ml	A/2 ³ μg/ml	A/2 ² μg/ml	A/2 ¹ 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/lo or LPS only	B/2 ⁹ μg/ml	B/2 ⁸ μg/ml	B/2 ⁷ μg/ml	B/2 ⁶ μg/ml	B/2 ⁵ μg/ml	B/2 ⁴ μg/ml	B/2 ³ μg/ml	B/2 ² μg/ml	B/2 ¹ μg/ml	B μg/ml
被験物質B (1/2希釈、10段階、n=4)											

PMA/lo 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 γ -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 γ 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- κ 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 β -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 β 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[®] 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 μ M	25 nM
DMSO	Sigma #D5789			

<作製方法>

PMA 1 mg を溶媒 DMSO 1338.5 μ l に溶解する。

<保存方法>

- ・ 10~30 μ 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 μ M
Ethanol	Wako #057-00456			

<作製方法>

Ionomycin 1 mg を溶媒 Ethanol 1621 μ l に溶解する。

<保存方法>

- ・ 10~30 μl /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 μl /tube に分注し、冷凍保存。
- ・ 分注したものは 1 回融解で使い捨てること。

<使用方法>

ストック 5 μl に Distilled water を 995 μl 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 μl) 当たり 10 μl 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 μl +ddw 5ml)、1 well (培地 100 μl) 当たり 10 μl 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, CO₂ 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% CO₂)。

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、CO₂ 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。3×10⁵/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 3×10⁵/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 4×10^6 /ml、THP-G8、TGCHAC-A4 細胞については 2×10^6 /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

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_3) (Distilled water, 100 mg/ml)

Nickel (II) sulfate (NiSO_4) (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_3 , NiSO_4)調製

5-1-1 試薬の配置 (水溶性被験物質)

調製した NaBrO_3 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	NaBrO3 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	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												

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 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 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 Block	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 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上半分に 50 μ l 加える。（2 倍に希釈される、図 6）

NiSO₄ 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 μ l (#A12)、DMSO 50 μ l (#A1-A11)、
B 培地 180 μ 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 μ 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												
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	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 μ 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 μ 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 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												

20ul

↓

round bottom clear	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 μ l を取り出し、アッセイブロックの中の B 培地 980 μ l 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	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 DMSO 10% in B medium 200ul	DP 0 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul	DP 0.10 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul	DP 0.20 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul	DP 0.39 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul	DP 0.78 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul	DP 1.6 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul	DP 3.1 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul	DP 6.3 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul	DP 12.5 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul	DP 25 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul	DP 50 mg/ml DMSO 10% in B medium 200ul
C												
D												
E												
F												
G												
H												

20ul

Assay Block	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 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上半分に 50 μ 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。

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

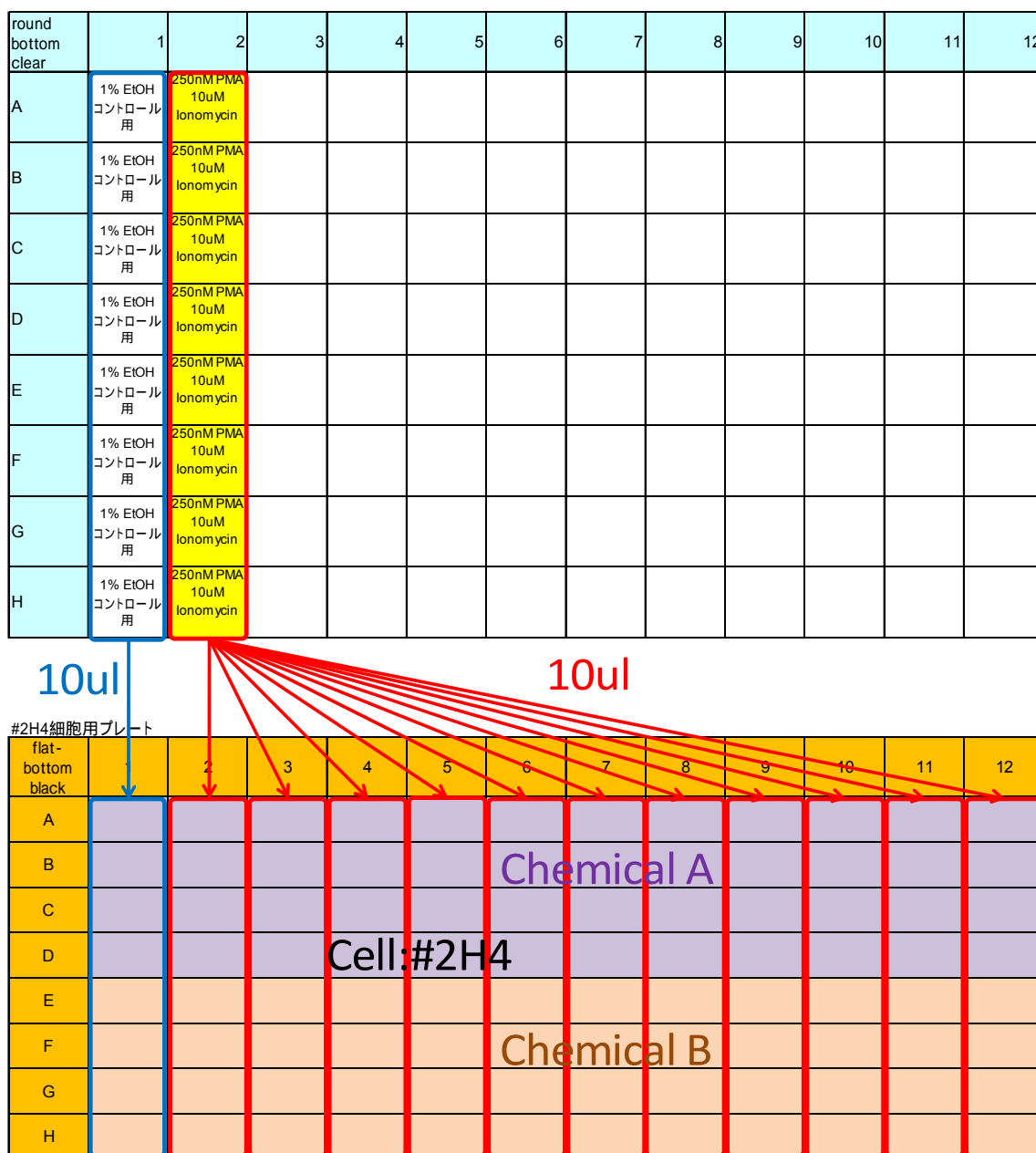
下表のように 250 nM PMA 10 µM ionomycin 溶液を調製する (10 倍濃度) また EtOH を含む Control 液を調製し試薬添加用の 96 well plate (U 底) に分注しておく。(図 13)

	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)

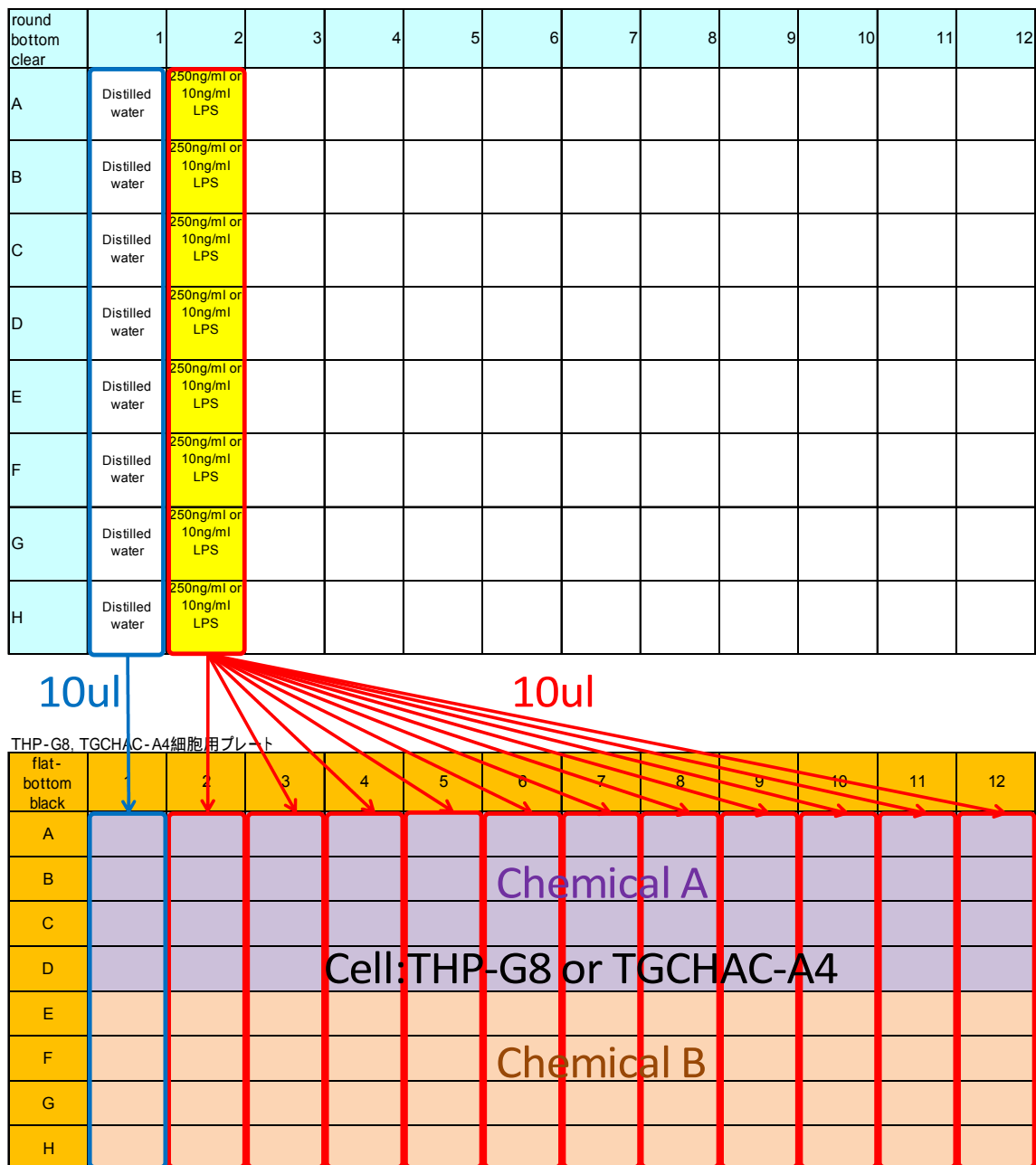
7-2-2 10 ng/ml LPS(TGCHAC-A4 用)の調整方法

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 (Distilled water) もしくはLPS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、撪拌して混合する。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, TGCHAC-A4 細胞については 2×10^6 /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-#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 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 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	

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 50ul	CyA 12 mg/ml stock 10ul + DMSO 110ul							
B	Distilled water 50ul	Distilled water 50ul	DEX 50 mg/ml stock 50ul	B medium 180ul	B medium 180ul							
C												
D												
E												
F												
G												
H												

↓

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

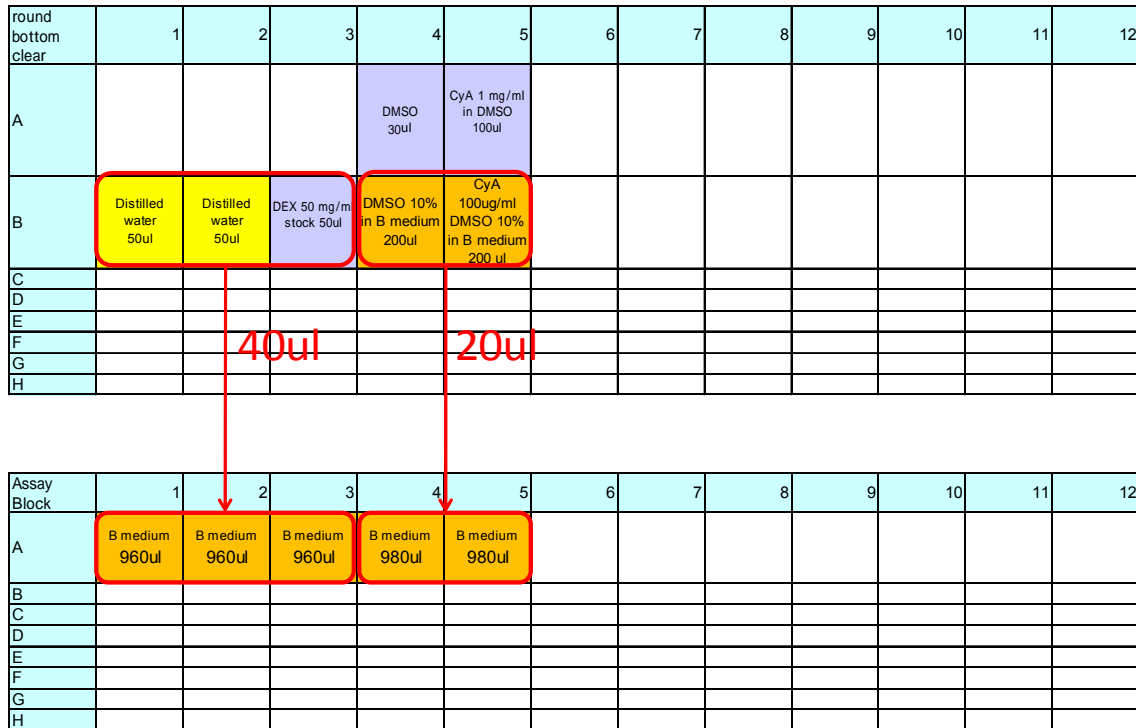
8-4 B 培地での希釈

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、撹拌して混合する。細胞をインキュベーターへ入れ、1 時間反応させる。

図 18

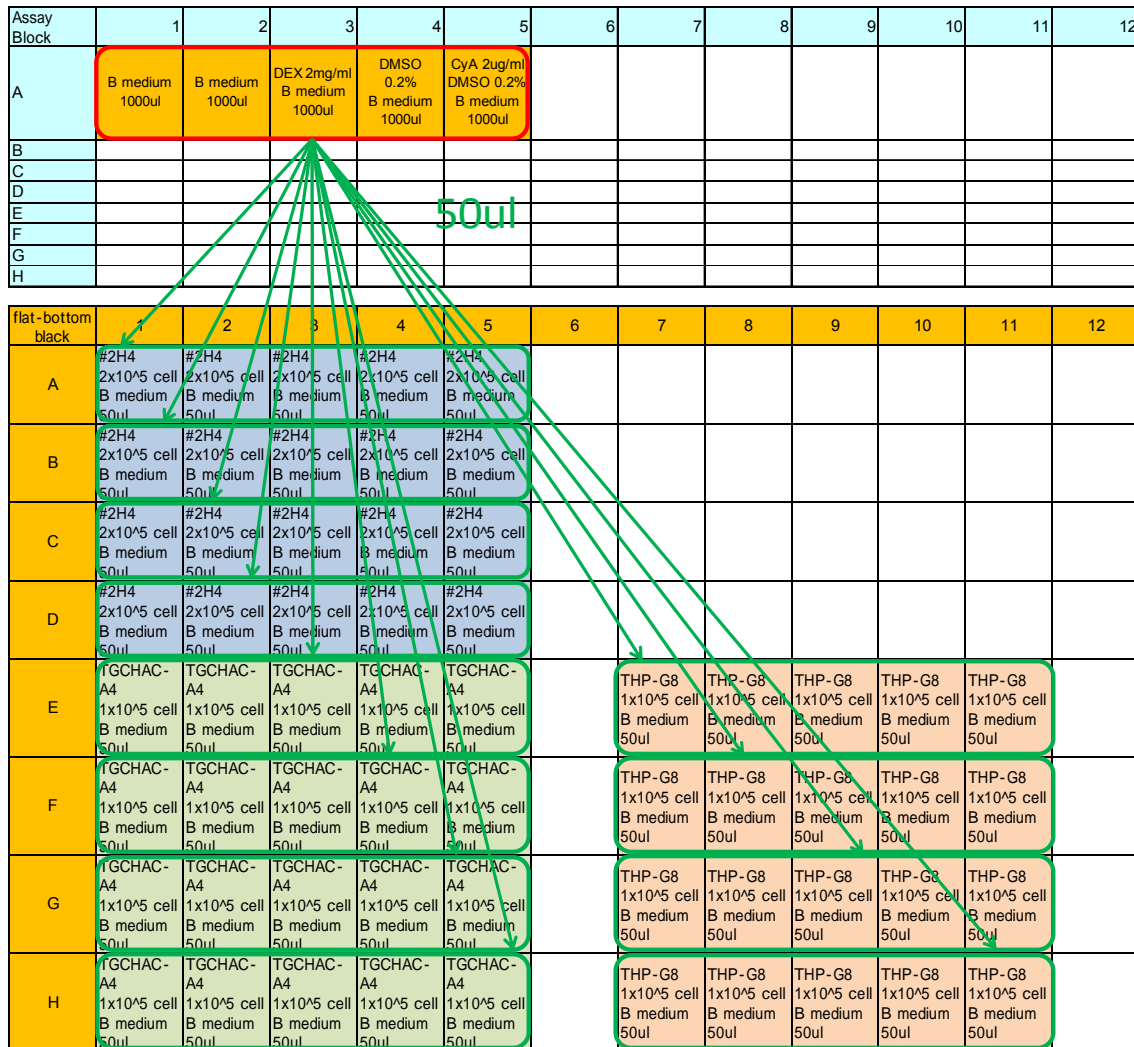


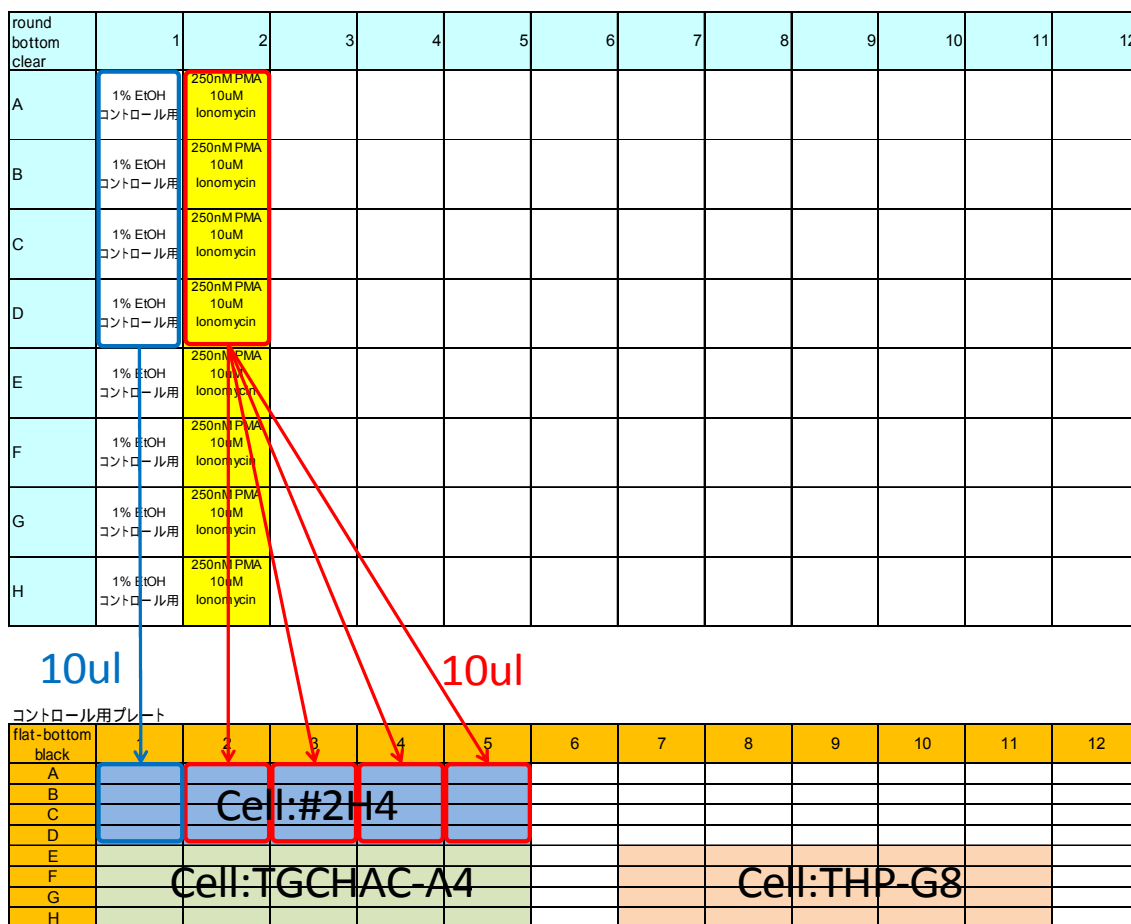
図 19 プレートにまき終わった状態

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	#2H4 2x10 ⁵ cell DMSO 0.1% B medium 100ul	#2H4 2x10 ⁵ cel 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 cel 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 cel 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 cel 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 cel 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 cel 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 cel 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 cel 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 cel 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 cel 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 cel 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 cel CyA 1ug/ml DMSO 0.1% B medium 100ul	

8-7 細胞賦活試薬 (PMA/ionomycin) の#2H4 細胞への添加

DEX または CyA を添加した 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、**6-4** で 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 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。チップは 1 回添加する毎に交換する。

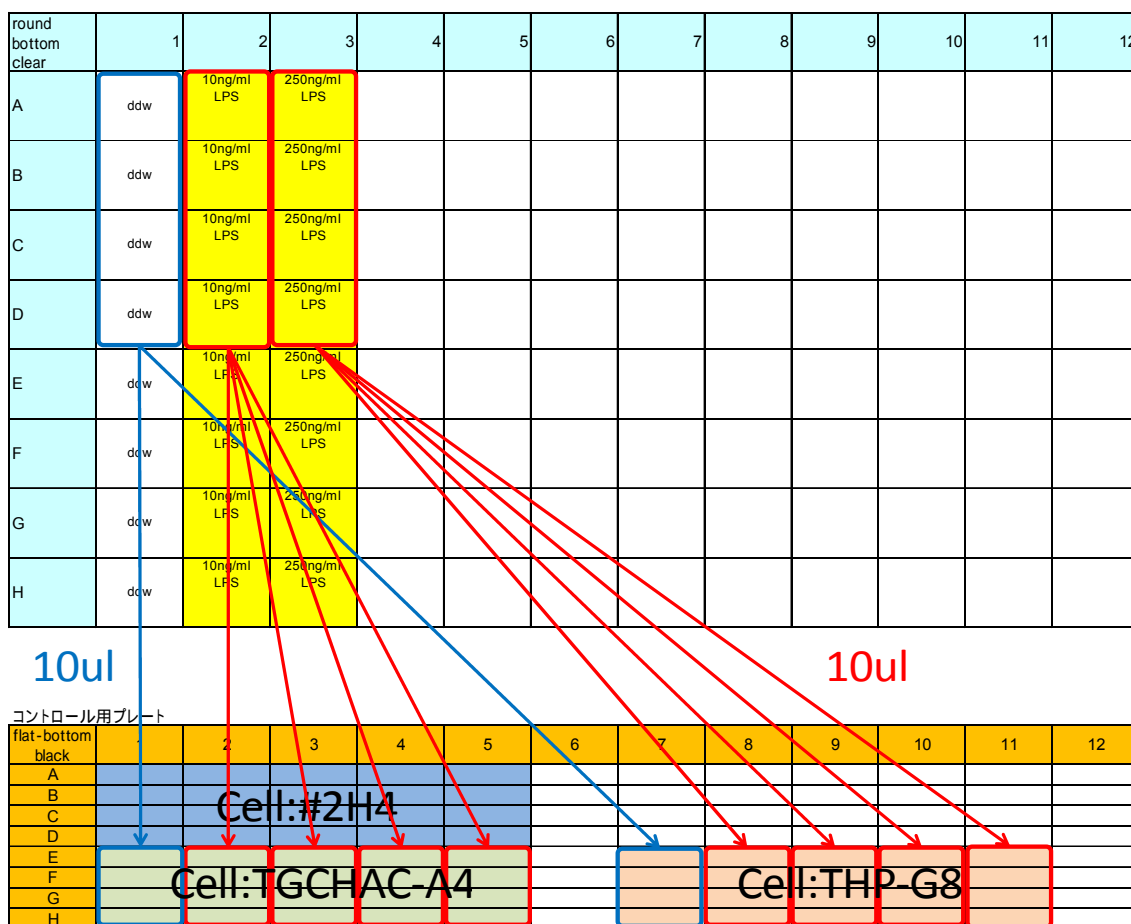
図 20



8-8 細胞賦活試薬 (LPS) の THP-G8, TGCHAC-A4 細胞への添加

続いて、LPS 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、7-2-1, 7-2-2 で 96 well plate (U 底) に分注した Control 溶液 (Distilled water) もしくは LPS を 10 μ l/well ずつそれぞれ #E1-#H1, #E7-#H7 もしくは #E2-#H5 (10ng/ml), #E8-#H11 (250ng/ml) の細胞に添加する (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。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 21



9 シグナルアッセイ(6時間後)

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 前後)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。

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。

Tripluc 添加後、プレートシェーカーを使用して室温(25 前後)で 10 分間攪拌し、細胞を溶解させる。

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。

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、TGCHAC-A4 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. 004.0 20141112, Data sheet for MITA THP-G8 Ver. 006.0 20150109)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。

THP-1 細胞由来の TGCHAC-A4 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。同時にアッセイした THP-G8 細胞の SLR-LA を代わりに使用する。

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/I₀ 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)。-または+が2回含まれる際に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 (+については、濃度依存性が+側、-側のどちらか片方で認められる際には濃度依存性が認められる濃度でもっともコントロール値より離れた%suppressionの値、+側、-側の両方に濃度依存性が認められる際、または両方に濃度依存性が認められない際にはすべての濃度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 :
(1-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. 005.0J 2015.1.9 配布

TGCHAC-A4 の nSLG-LA を算出する際に THP-G8 の SLR-LA を使うよう変更

Ver. 004.1J 2014.12.10 配布

継代時の細胞密度を変更

図 16, 17 を修正

Ver. 004.0J 2014.11.17 配布

産総研筑波、食薬センター、東北大学施設間試験用(化学物質 Sodium Bromate (NaBrO_3), Nickel (II) sulfate (NiSO_4), Dibutyl phthalate (DP), 2-Mercaptobenzothiazole (2-MBT))

THP-G1b 細胞を TGCHAC-A4 細胞に変更

THP-G8 と TGCHAC-A4 の細胞数を $5 \times 10^4/\text{well}$ から $1 \times 10^5/\text{well}$ に変更

化学物質の濃度を 11 段階から 10 段階に変更

LPS 最終濃度を変更 (THP-G8 : 25 ng/ml, TGCHAC-A4 : 1 ng/ml)

LPS 添加方法を変更 (2 $\mu\text{l}/\text{well}$ で添付 10 $\mu\text{l}/\text{well}$ で添付)

判定基準を変更

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 CoCl_2 , NiSO_4 , 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

資料 2 .

Data sheet for MITA Ver.006 20150109

Data 入力シート

Multireporter Assay System -TriStar™- Calculation Sheet

For TGCHAC-A4

Transmittance Data

T1	SLR	
T2		#VALUE! #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												

For THP-G8

Transmittance Data

T1	SLR	
T2		#VALUE! #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												

