

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 $^{\circ}$ 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。nSLG-LA(緑棒)またはnSLO-LA(オレンジ棒)を示す。(n=4)

**図17. Jurkat細胞培養上清による#2H4細胞IL-2、IFN- $\gamma$ レポーター活性の抑制**  
2x10 $^5$ 細胞の#2H4細胞を、培地のみ、3日Jurkat細胞を培養した上清と培地を等量混合したもの、3日Jurkat細胞を培養した上清のみ、1日Jurkat細胞を培養した上清と培地を等量混合したもの、および1日Jurkat細胞を培養した上清のみで懸濁したのちPMA/I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。SLR-LA(赤棒)、SLG-LA(緑棒)、nSLG-LA(緑線)、SLO-LA(オレンジ棒) nSLO-LA(オレンジ線)を示す。(n=4)

**図18. Jurkat細胞培養上清による#2H4細胞サイトカイン活性の抑制におよぼすmethotrexateの効果**

Jurkat細胞を6x10 $^5$ /mlで播種し、図示された濃度のmethotrexateを加え、2日後に上清を回収した。培地または上清で#2H4細胞を懸濁、PMA/I $\alpha$ 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。SLR-LA(赤棒)、SLG-LA(緑棒)、nSLG-LA(緑線)、SLO-LA(オレンジ棒) nSLO-LA(オレンジ線)を示す。(n=4)。

**図19. Jurkat細胞培養上清による2H4細胞サイトカイン活性の抑制におよぼすcyclophosphamideの効果**

Jurkat細胞を6x10 $^5$ /mlで播種し、図示された濃度のcyclophosphamideを加え、2日後に上清を回収した。培地または上清で#2H4細胞を懸濁、PMA/I $\alpha$ 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。SLR-LA(赤棒)、

SLG-LA(緑棒)、nSLG-LA(緑線)、SLO-LA(オレンジ棒) nSLO-LA(オレンジ線)を示す。(n=4)。

**図20. Jurkat細胞培養上清による2H4細胞サイトカイン活性の抑制におよぼすmizoribineの効果**

Jurkat細胞を6x10 $^5$ /mlで播種し、図示された濃度のmizoribineを加え、2日後に上清を回収した。培地または上清で#2H4細胞を懸濁、PMA/I $\alpha$ 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。SLR-LA(赤棒)、SLG-LA(緑棒)、nSLG-LA(緑線)、SLO-LA(オレンジ棒) nSLO-LA(オレンジ線)を示す。(n=4)。

**図21. 免疫抑制剤のJurkat細胞の免疫抑制遺伝子発現に及ぼす影響(IL-10)**

3x10 $^6$ 細胞のJurkat細胞を図示された濃度の免疫抑制剤で刺激し、37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ 下で12時間培養後、mRNAを単離しqPCRでIL-10遺伝子発現を解析した。G3PDHをコントロール遺伝子とし、 $\Delta\Delta$ Ct法で各遺伝子発現の解析を行った。

**図22. 免疫抑制剤のJurkat細胞の免疫抑制遺伝子発現に及ぼす影響(TGF- $\beta$ 1)**

3x10 $^6$ 細胞のJurkat細胞を図示された濃度の免疫抑制剤で刺激し、37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ 下で12時間培養後、mRNAを単離しqPCRでTGF- $\beta$ 1遺伝子発現を解析した。G3PDHをコントロール遺伝子とし、 $\Delta\Delta$ Ct法で各遺伝子発現の解析を行った。

**図23. 免疫抑制剤のJurkat細胞の免疫抑制遺伝子発現に及ぼす影響(TGF- $\beta$ 2)**

3x10 $^6$ 細胞のJurkat細胞を図示された濃度の免疫抑制剤で刺激し、37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ 下で12時間培養後、mRNAを単離しqPCRでTGF- $\beta$ 2遺伝子発現を解析した。G3PDHをコントロール遺伝子とし、 $\Delta\Delta$ Ct法で各遺伝子発現の解析を行った。

図 2 4 . 25 人の抗 TNF- $\alpha$ 抗体製剤を投与された乾癬患者における PASI スコアの改善率

と%suppression の相関

抗 TNF- $\alpha$ 抗体製剤を投与された乾癬患者の PASI スコアの改善率を X 軸、THP-G8 細胞を用いて測定した患者血清中の抗 TNF- $\alpha$  活性を Y 軸とし 25 人の患者についてプロットした。○:adalimumab 投与患者、 $\Delta$ :infliximab 投与患者。

図 2 5 . 仙台およびマニラ周辺の環境水に誘導される THP-G8 の IL-8 プロモーター活性に対す

る Polymyxin B と N-acetylcysteine による阻害

仙台およびマニラ周辺の環境水、感作性物質

(methylothiazolinone 2.5  $\mu$ g/ml、glutaraldehyde 5  $\mu$ g/ml)、LPS(100 ng/ml)について、ポリミキシン B(50  $\mu$ g/ml)または N-アセチルシステイン(NAC, 25 mM)で 30 分間前処理したのち THP-G8 細胞に添加し IL-8 レポーター活性を測定した。IL-8 レポーター活性に対するポリミキシン B、NAC の影響

を%suppression として算出し、ポリミキシン B による%suppression をを X 軸、NAC による%suppression をを Y 軸としてプロットした。

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

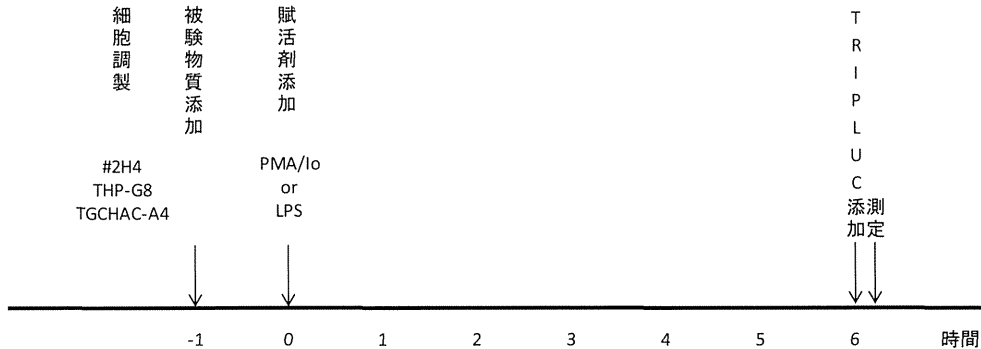
本 Protocol は IL2-SLG、IFN $\gamma$ -SLO、G3PDH-SLR を含む多色発光細胞株 (#2H4)、IL8-SLO、G3PDH-SLR を含む多色発光細胞株 (THP-G8) および IL-1 $\beta$ -SLG、G3PDH-SLR を含む多色発光細胞株 (TGCHAC-A4) を利用した化学物質の免疫毒性試験法における細胞培養方法、被験物質調整及び添加方法、及びルシフェラーゼアッセイの方法について記載した。

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 (dwt or DMSO only)	PMA/lo 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 (dwt or DMSO only)	PMA/lo 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/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 $\gamma$ -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  $\mu$ 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。

**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  $\mu$ l/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 $\mu$ l に Distilled water を 995  $\mu$ l 加え 5  $\mu$ g/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  $\mu$ l) 当たり 10  $\mu$ 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  $\mu$ g/ml としたものをさらに 500 倍希釈し(10 $\mu$ l+ddw 5ml)、1 well (培地 100  $\mu$ l) 当たり 10  $\mu$ 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  $\mu$ l (#A12)、Distilled water 50  $\mu$ l (#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  $\mu$ l 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												



### 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。





