

## 5-2 DMSO 溶性被験物質 (DP, 2-MBT) の調製

### 5-2-1 試薬の配置 (DMSO 溶性被験物質)

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

### 5-2-2 段階希釈 (DMSO 溶性被験物質)

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

図 8

round bottom clear	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO 100% 50ul	DMSO 100% 50ul	DMSO 100% 50ul	DMSO 100% 50ul	DMSO 100% 50ul	DMSO 100% 50ul	DMSO 100% 50ul	DMSO 100% 50ul	DMSO 100% 50ul	DMSO 100% 50ul	DMSO 100% 50ul	DP 500 mg/ml in DMSO 100ul
B	B medium 180ul	B medium 180ul	B medium 180ul	B medium 180ul	B medium 180ul	B medium 180ul	B medium 180ul	B medium 180ul	B medium 180ul	B medium 180ul	B medium 180ul	B medium 180ul
C												
D	2-fold dilution : transfer 50 ul (pipetman, yellow tip)											
E												
F												
G												
H												

↓

round bottom clear	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO 100% 50ul	DMSO 100% 50ul	DP 1.0 mg/ml in DMSO 100ul	DP 2.0 mg/ml in DMSO 50ul	DP 3.9 mg/ml in DMSO 50ul	DP 7.8 mg/ml in DMSO 50ul	DP 16 mg/ml in DMSO 50ul	DP 31 mg/ml in DMSO 50ul	DP 63 mg/ml in DMSO 50ul	DP 125 mg/ml in DMSO 50ul	DP 250 mg/ml in DMSO 50ul	DP 500 mg/ml in DMSO 50ul
B	B medium 180ul	B medium 180ul	B medium 180ul	B medium 180ul	B medium 180ul	B medium 180ul	B medium 180ul	B medium 180ul	B medium 180ul	B medium 180ul	B medium 180ul	B medium 180ul
C												
D												
E												
F												
G												
H												

### 5-2-3 B 培地での希釈 (DMSO 溶性被験物質)

矢印のように段階希釈した被試験試薬 DMSO 溶液 20  $\mu$ l を 8 チャンネルもしくは 12 チャンネルピペットマンを使用して下の B 培地 180  $\mu$ l にうつし 10 倍に希釈する。(10 倍に希釈される、図 9)

図 9

round bottom 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  $\mu$ l を取り出し、アッセイブロックの中の B 培地 980  $\mu$ l に加える (50 倍に希釈される、図 10)。

図 10

round bottom c bar	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO 100% 30ul	DMSO 100% 30ul	DP 10 mg/ml in DMSO 80ul	DP 20 mg/ml in DMSO 30ul	DP 39 mg/ml in DMSO 30ul	DP 78 mg/ml in DMSO 30ul	DP 16 mg/ml in DMSO 30ul	DP 31 mg/ml in DMSO 30ul	DP 63 mg/ml in DMSO 30ul	DP 125 mg/ml in DMSO 30ul	DP 250 mg/ml in DMSO 30ul	DP 500 mg/ml in DMSO 30ul
B	DP 0 mg/ml in B medium 200ul	DP 0 mg/ml in B medium 200ul	DP 0.10 mg/ml in B medium 200ul	DP 0.20 mg/ml in B medium 200ul	DP 0.39 mg/ml in B medium 200ul	DP 0.78 mg/ml in B medium 200ul	DP 1.6 mg/ml in B medium 200ul	DP 3.1 mg/ml in B medium 200ul	DP 6.3 mg/ml in B medium 200ul	DP 12.5 mg/ml in B medium 200ul	DP 25 mg/ml in B medium 200ul	DP 50 mg/ml in B medium 200ul
C												
D												
E												
F												
G												
H												

20ul

Assay B bck	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B medium 980ul	B medium 980ul	B medium 980ul	B medium 980ul	B medium 980ul	B medium 980ul	B medium 980ul	B medium 980ul	B medium 980ul	B medium 980ul	B medium 980ul	B medium 980ul
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

### 5-2-5 細胞への添加 (DMSO 溶性被験物質)

50  $\mu$ l にセッティングしたピペットを用いて泡立たないように注意して 20 回ピペッティング後、#2H4 細胞、THP-G8 細胞、TGCHAC-A4 細胞の入ったプレートの上半分に 50  $\mu$ l 加える (2 倍に希釈される、図 11)。5-2-3 から 5-2-5 にかけての操作は可及的迅速におこない、5-2-3 後、5-2-4 後の段階で長時間放置しないようにする。

2-MBT についても 5-2-1 から 5-2-5 を同様に繰り返し 3 枚のプレートの下半分に添加する。(図 12) 終了後、プレートシェーカーを使用し、攪拌して混合する。細胞をインキュベーターへ入れ、1 時間反応させる。







## 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

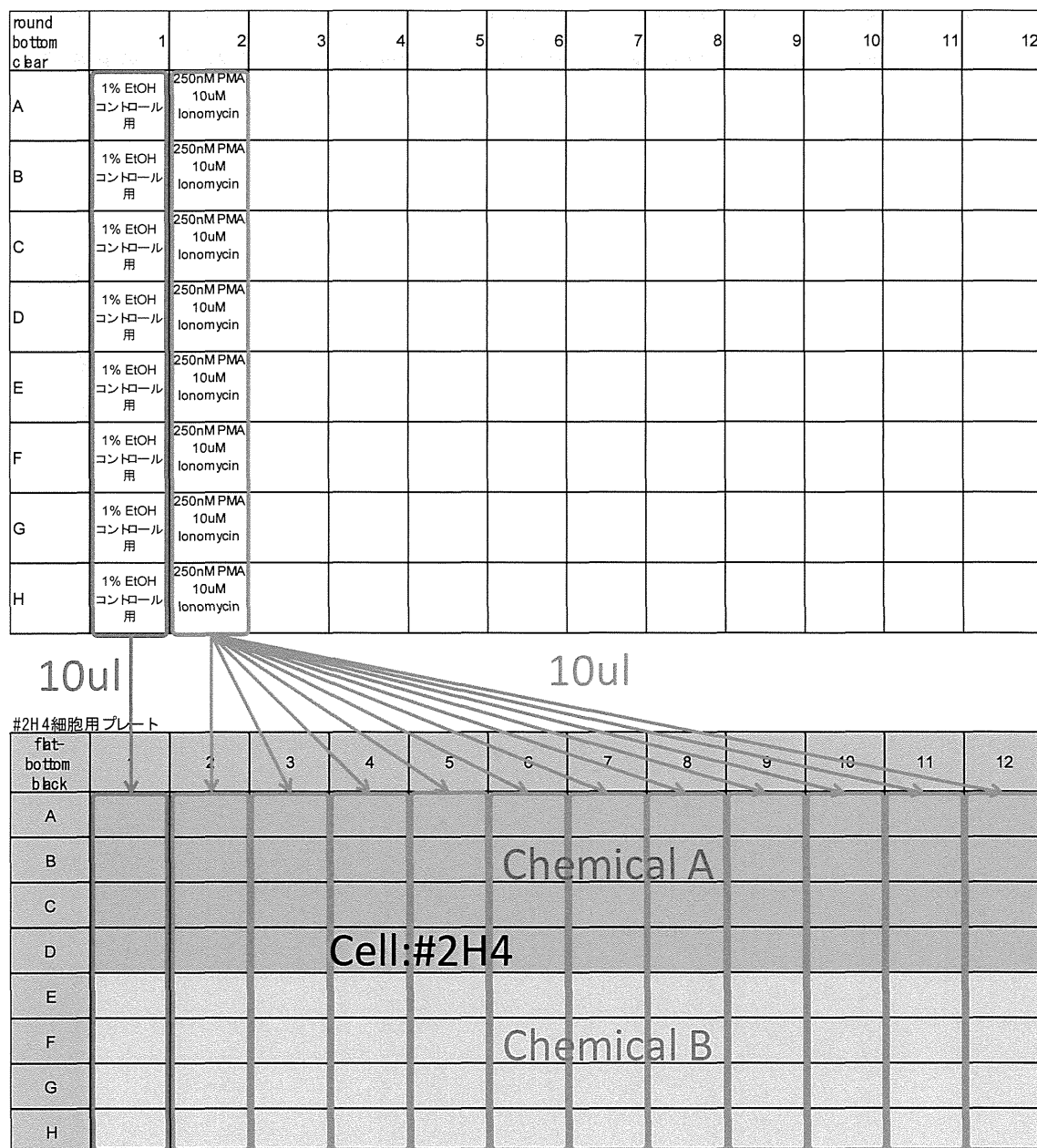
下表のように 250 nM PMA 10 µM ionomycin 溶液を調製する (10 倍濃度) また EtOH を含む Control 液を調製し試薬添加用の 96 well plate (U 底) に分注しておく。(図 13)

	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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ l に Distilled water を 995  $\mu$ l 加え 5  $\mu$ g/ml とし、この 5  $\mu$ 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  $\mu$ g/ml LPS 200 $\mu$ l + Distilled water 800  $\mu$ l、1  $\mu$ g/ml に希釈される)。さらに 4 倍希釈し(例: 1  $\mu$ g/ml LPS 250 $\mu$ l + Distilled water 750  $\mu$ 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  $\mu$ l に Distilled water を 995  $\mu$ l 加え 5  $\mu$ g/ml とし、この 5  $\mu$ 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  $\mu$ g/ml LPS 200 $\mu$ l + Distilled water 800  $\mu$ l、1  $\mu$ g/ml に希釈される)。さらに 100 倍希釈し(例: 1  $\mu$ g/ml LPS 10 $\mu$ l + Distilled water 990  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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、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

