

図 3.免疫抑制剤 (Dex、CyA、 Tac)の#2H4、 THP-G1b、 THP-G8 細胞サイトカインレポーター活性への影響

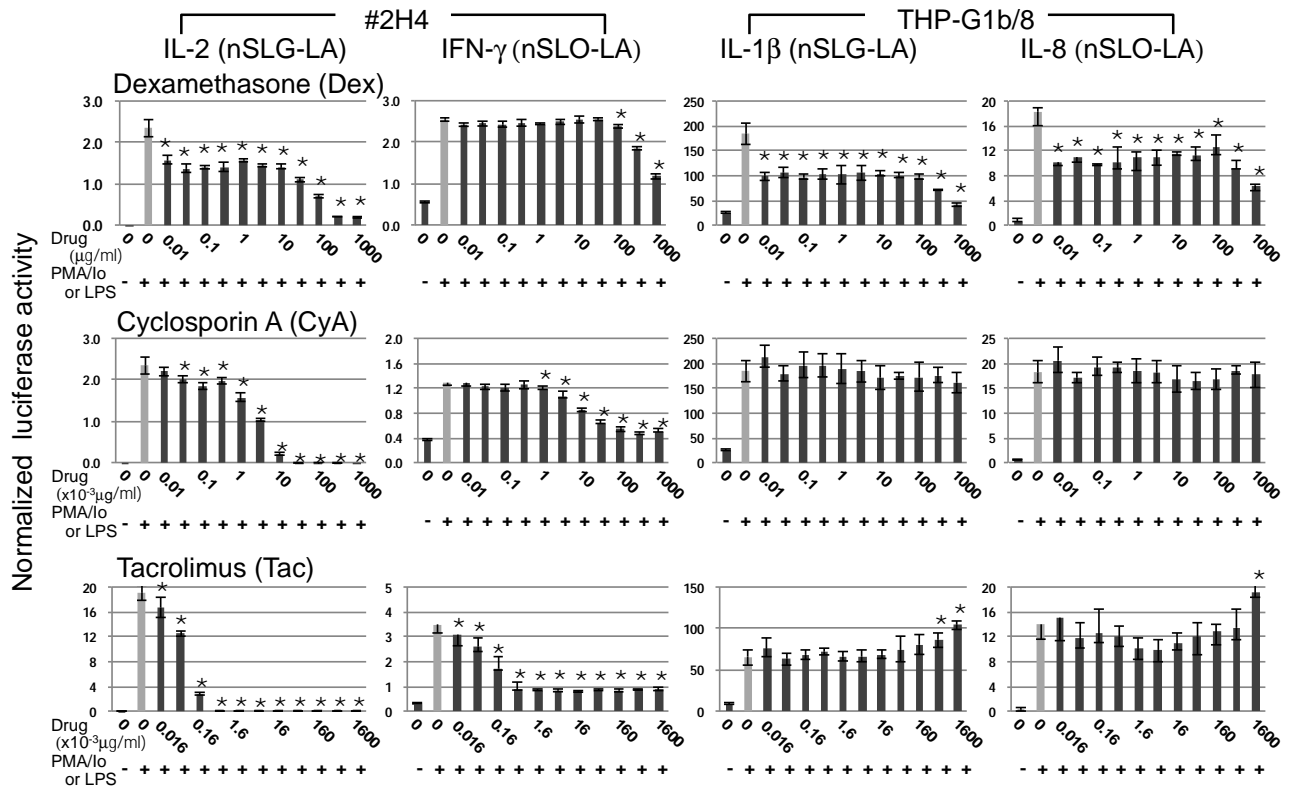


図 4 .免疫抑制剤 (Dex、CyA、 Tac)の Jurkat および THP-1 細胞サイトカイン遺伝子発現制御

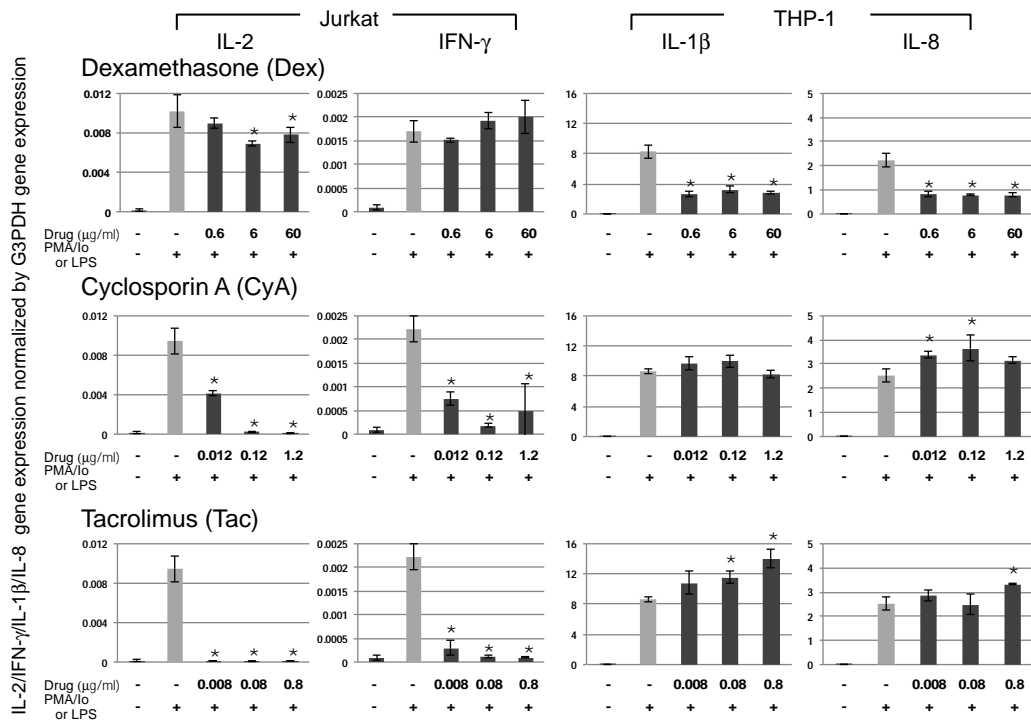


図5. 免疫抑制剤 (Dex, CyA, Tac)のヒト whole blood cytokine mRNA expression test (WBCRET)による免疫毒性評価

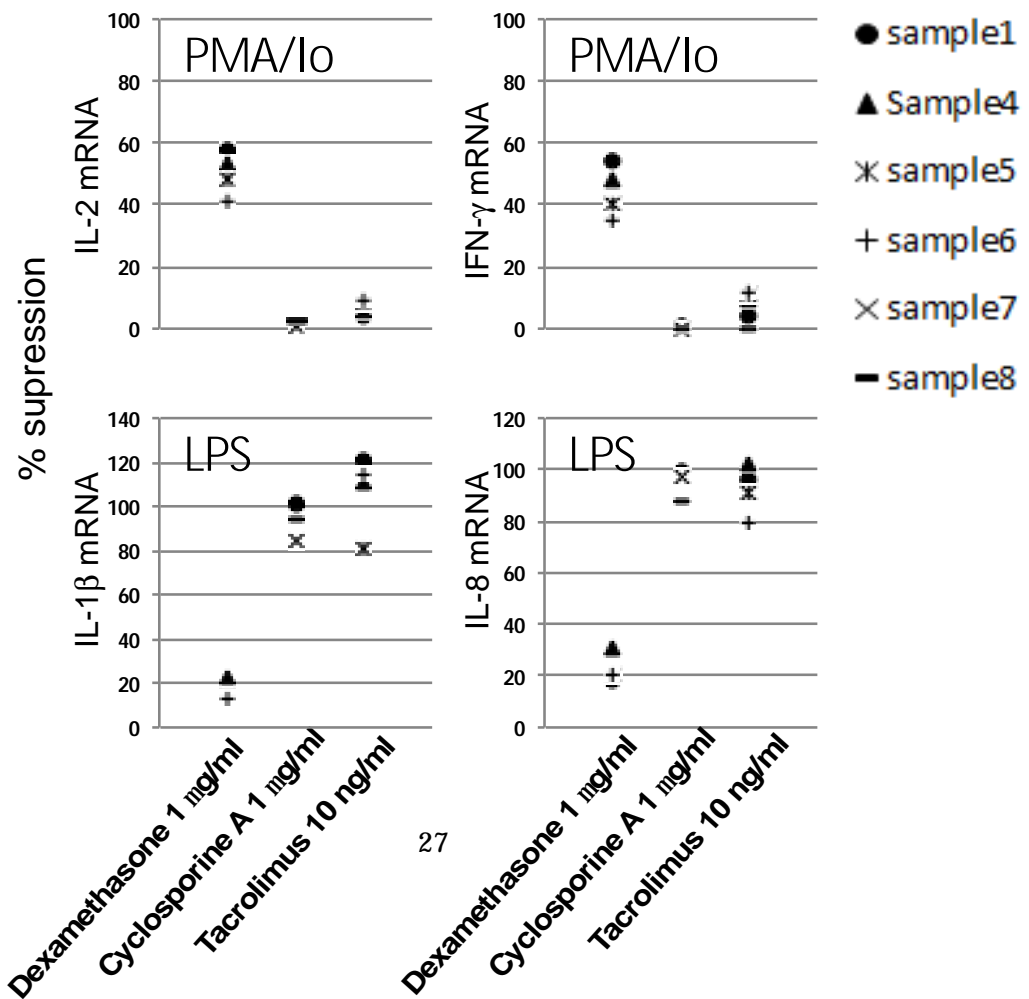


図 6 . MITA による免疫抑制剤 (核酸合成阻害剤)の評価

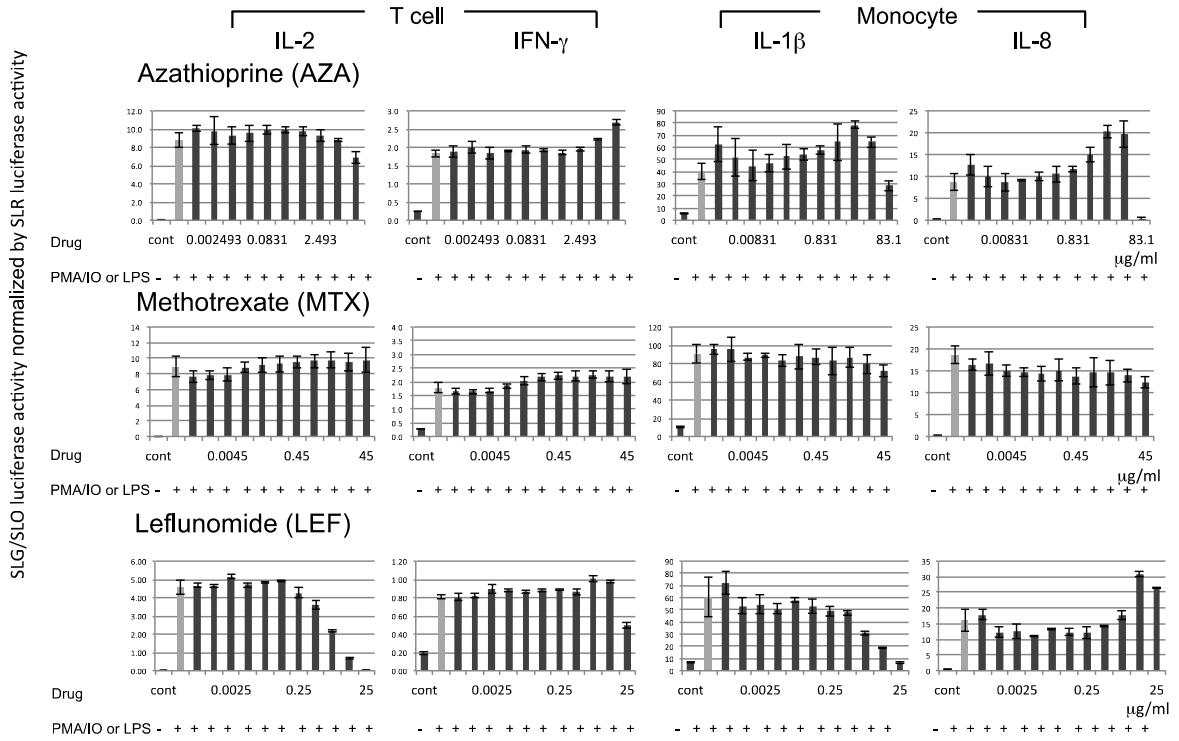
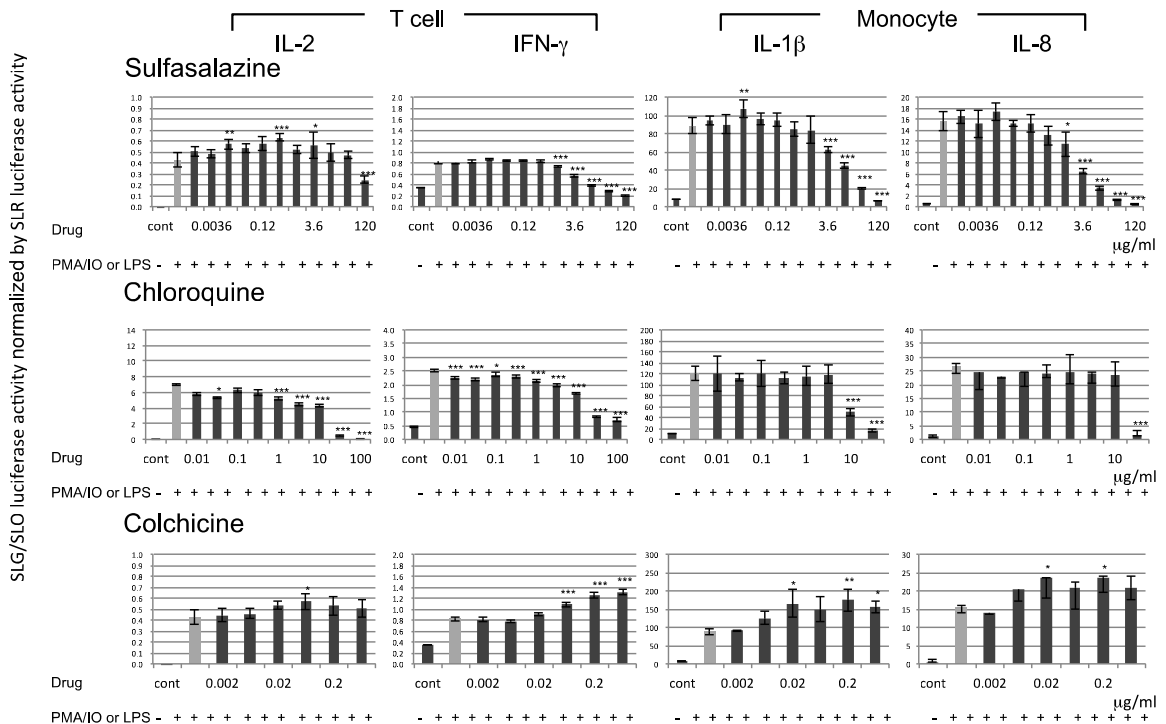


図 7 . MITA による免疫調節剤 (SASP, CQ, colchicine)の免疫毒性評価



Statistical significance was calculated by one-way ANOVA followed by a Dunnett's post test compared with the control group (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001)

図8 . MITA による免疫調節作用の知られていない薬剤の評価

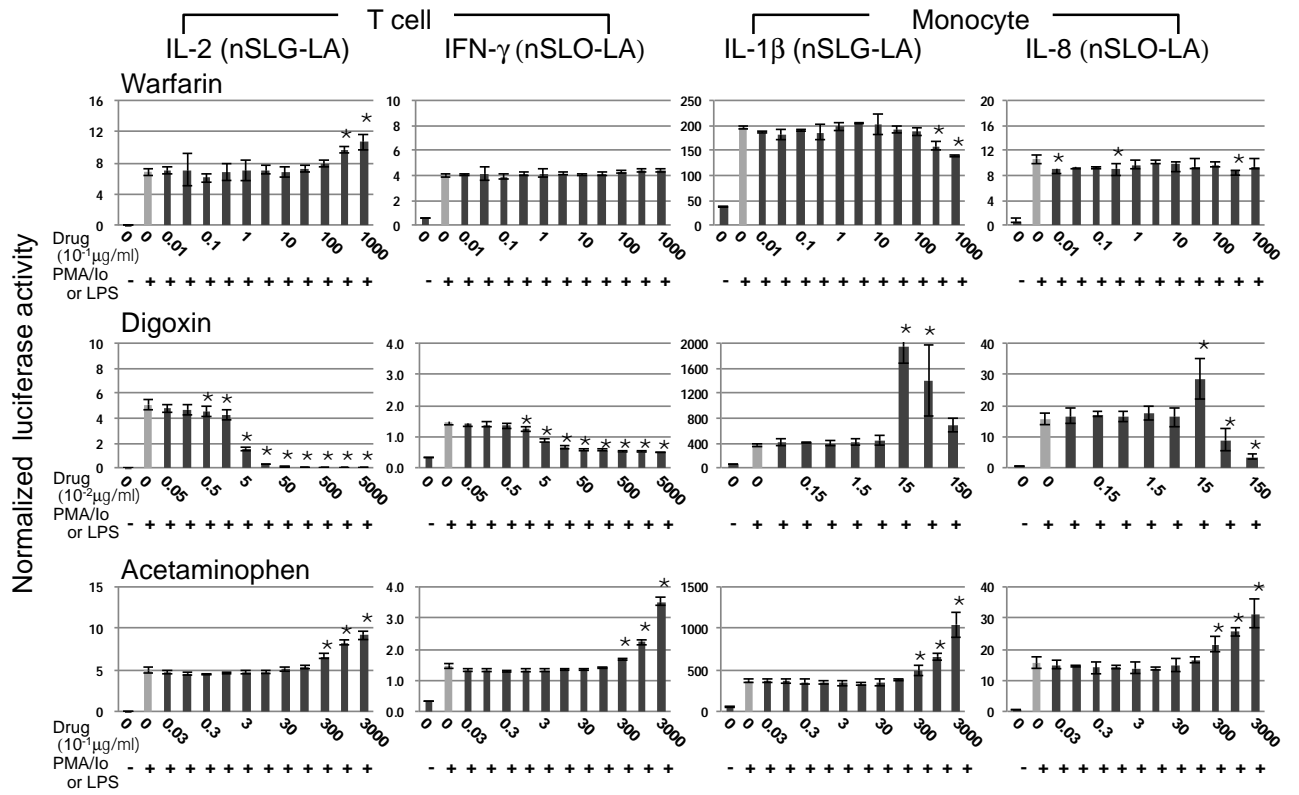
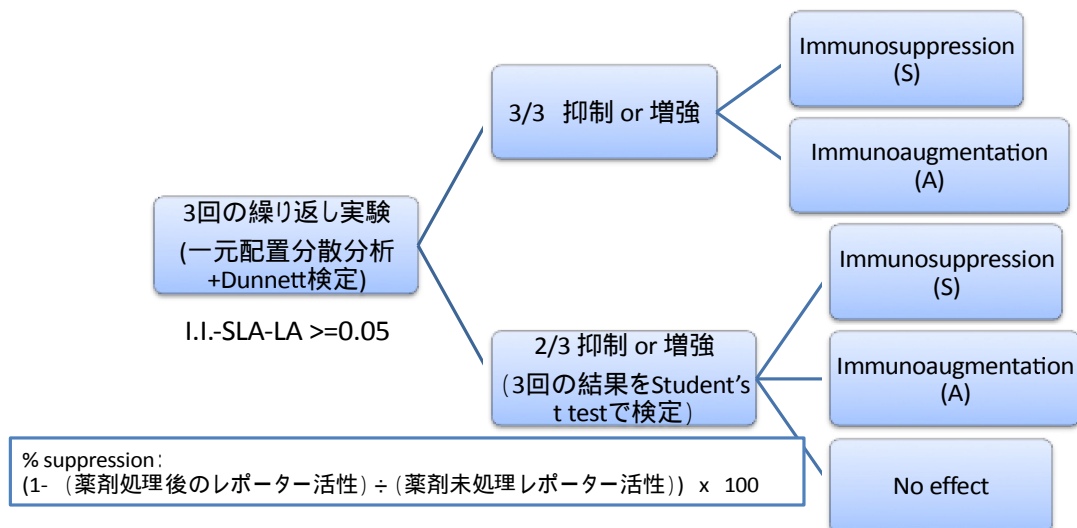


図9 . MITA による免疫毒性判定基準



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回繰り返しの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.

9

図10. あらたに樹立した人工染色体技術を用いた IL-1 レポーター細胞と THP-G1b の LPS 反応性比較

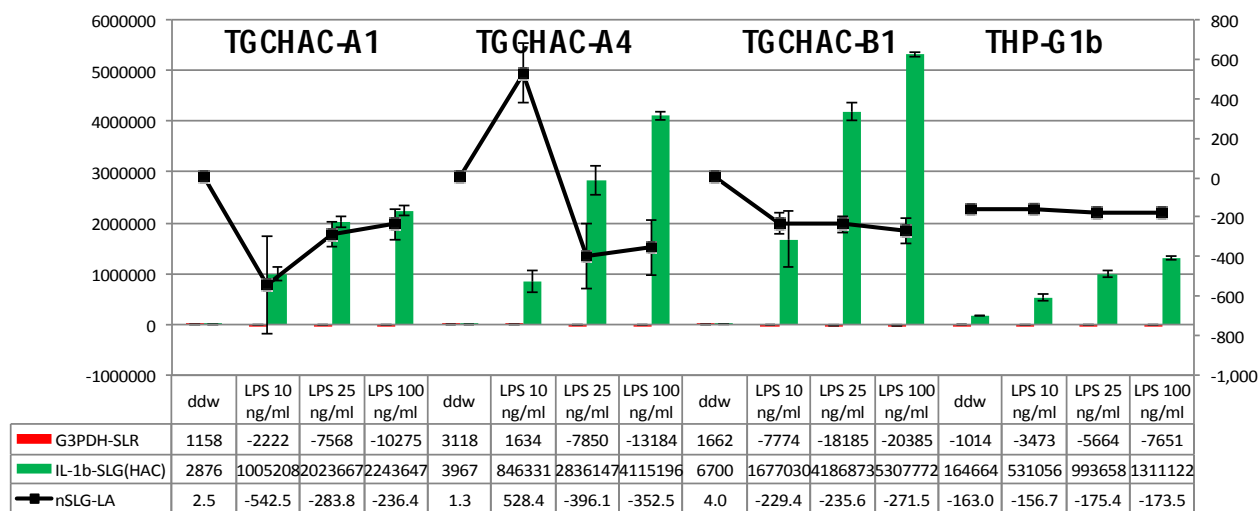
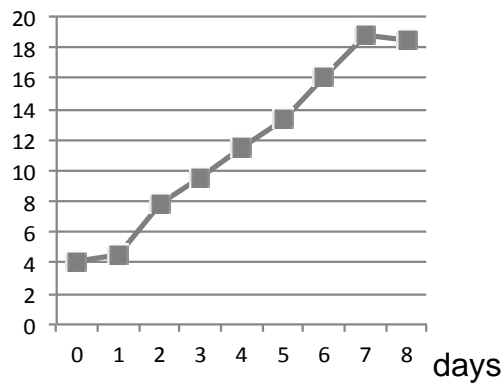


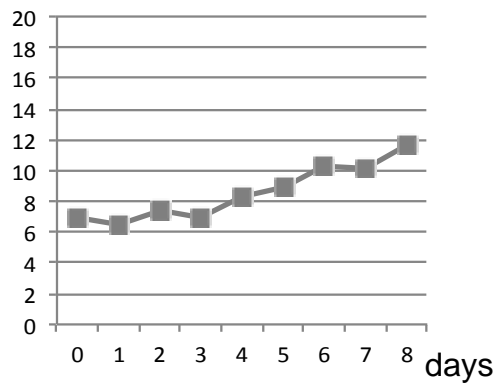
図11. あらたに樹立した IL-1b レポーター細胞 TGCHAC-A4 と THP-G1b の増殖速度の違い

X10⁵ cells/ml TGCHAC-A4



選擇抗生素条件: Blastcidin S 4 μ g/ml

X10⁵ cells/ml THP-G1 b



選擇抗生素条件: Puromycin 0.15 μ g/ml
Hygromycin 200 μ g/ml

図 1 2 . TGCHAC-A4 細胞ルシフェラーゼ活性評価に使用する SLR-LA によるデータの安定性の相違

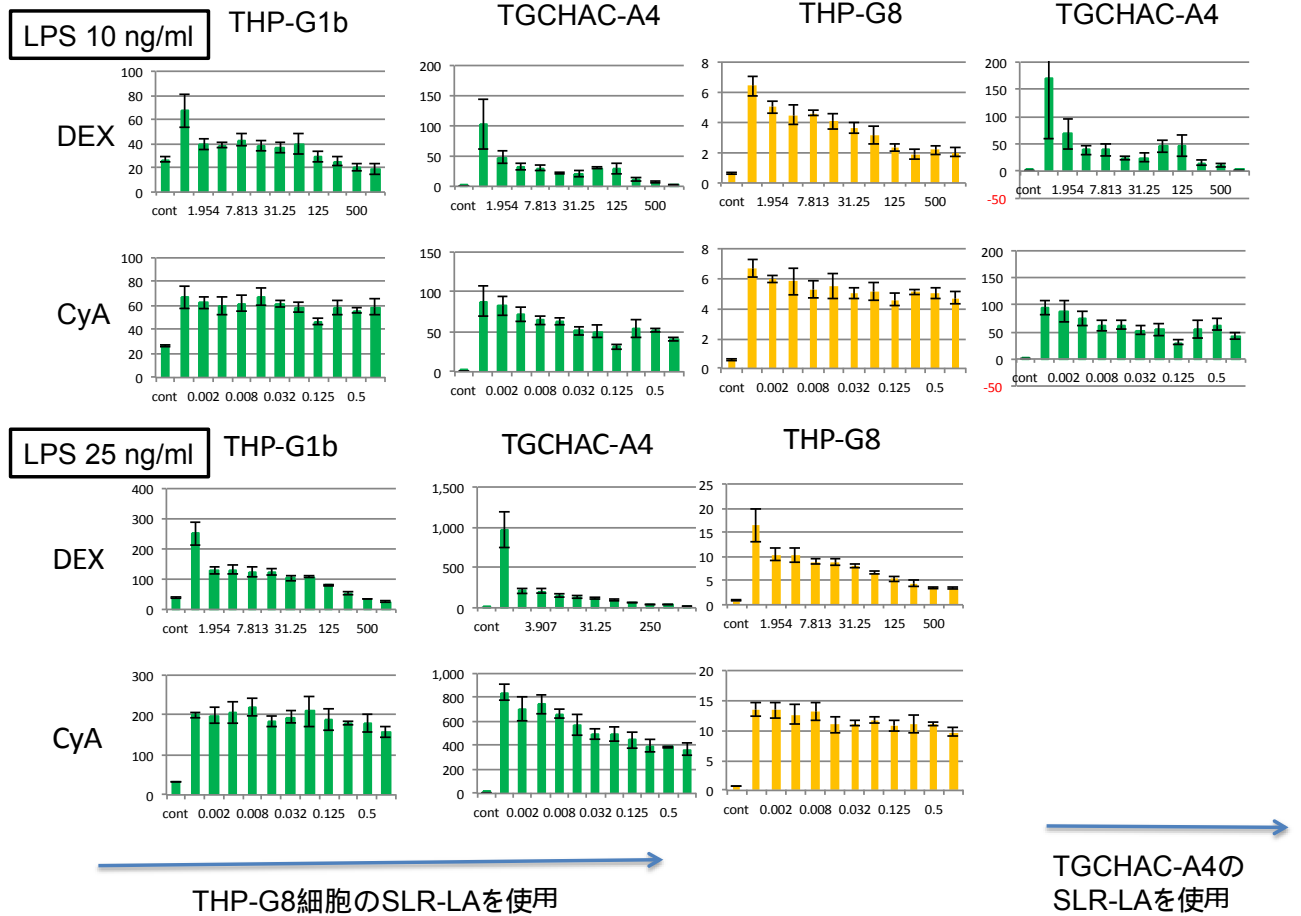
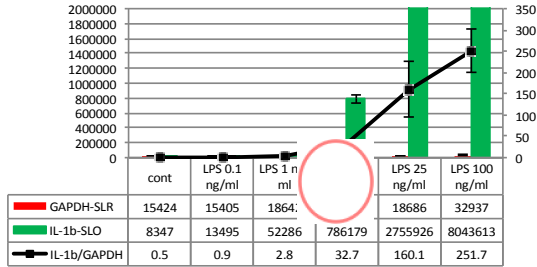


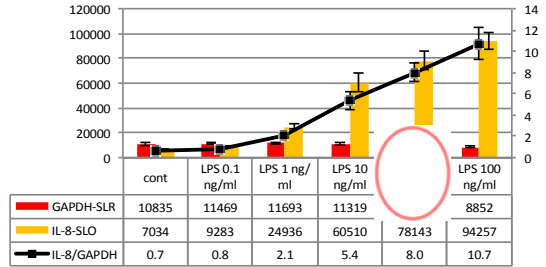
図 1 3 . TGCHAC-A4 細胞を用いた施設間比較試験 (LPS)

食薬センター

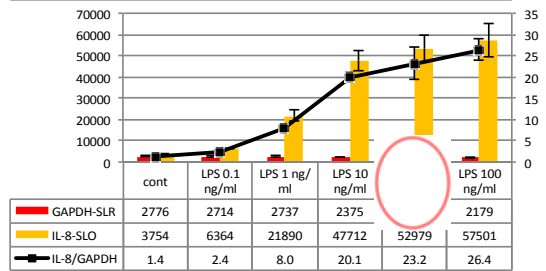
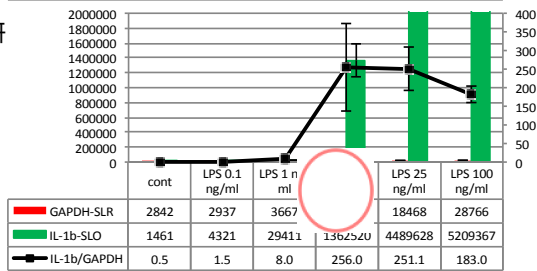
TGCHAC-A4



THP-G8



産総研



東北大

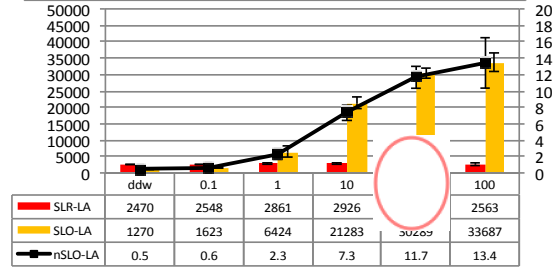
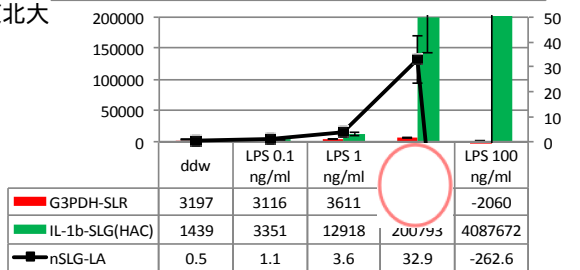
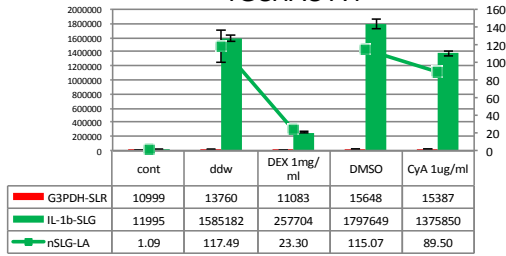


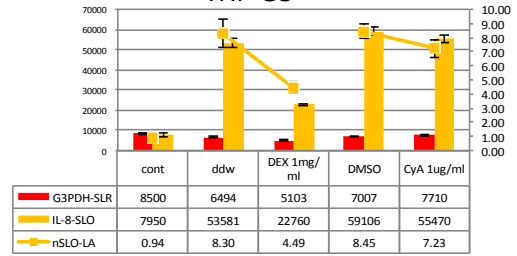
図 1 4 . TGCHAC-A4 細胞を用いた施設間比較試験 (Dex と CyA)

食薬センター

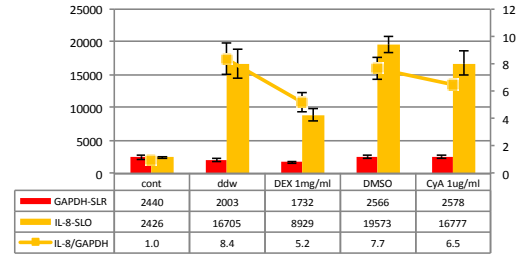
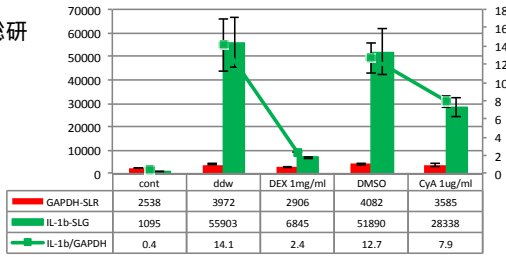
TGCHAC-A4



THP-G8



産総研



東北大

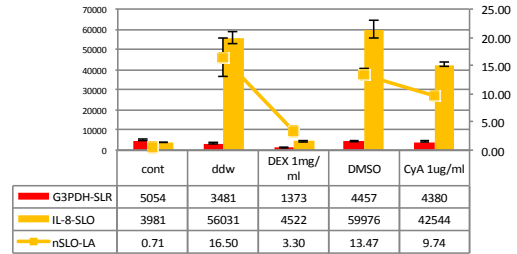
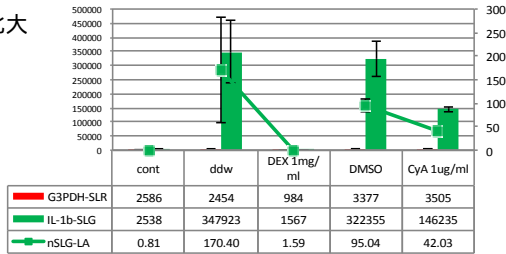


図 1 5 . 免疫抑制剤との前培養の MITA 評価に及ぼす影響 (CyA と MTX)

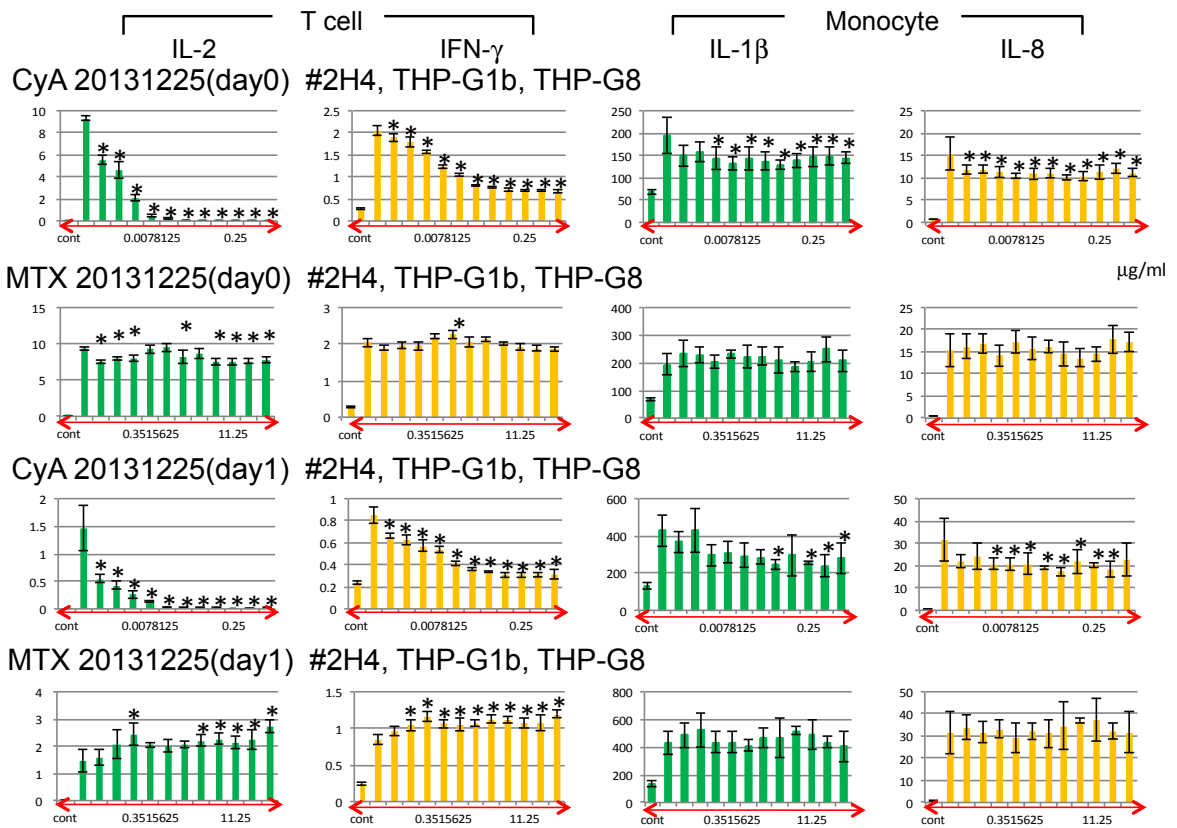


図 1 6 . 免疫抑制剤との前培養の MITA 評価に及ぼす影響 (Cyclophosphamide と Mizoribine)

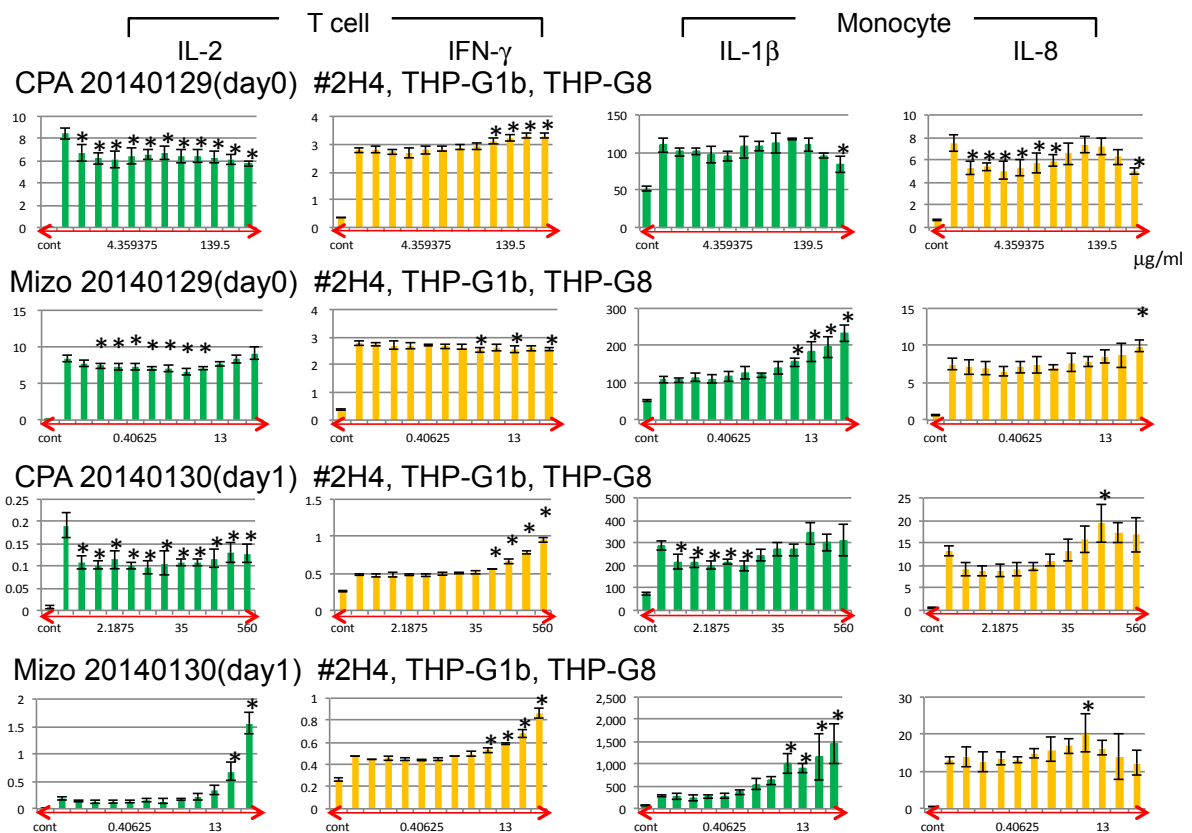


図 17 . 2H4 細胞培養上清による 2H4 細胞 IL-2、IFN- レポーター活性の抑制

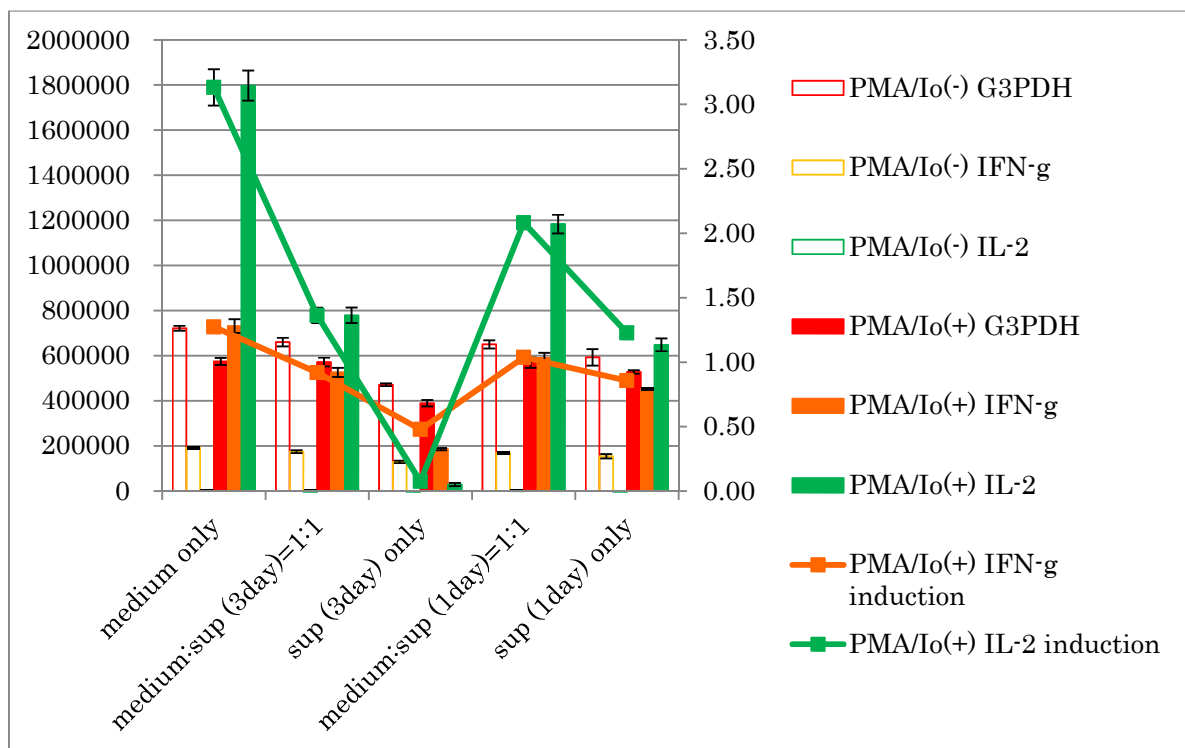


図 18 . 2H4 細胞培養上清による 2H4 細胞サイトカイン活性の抑制におよぼす MTX の効果

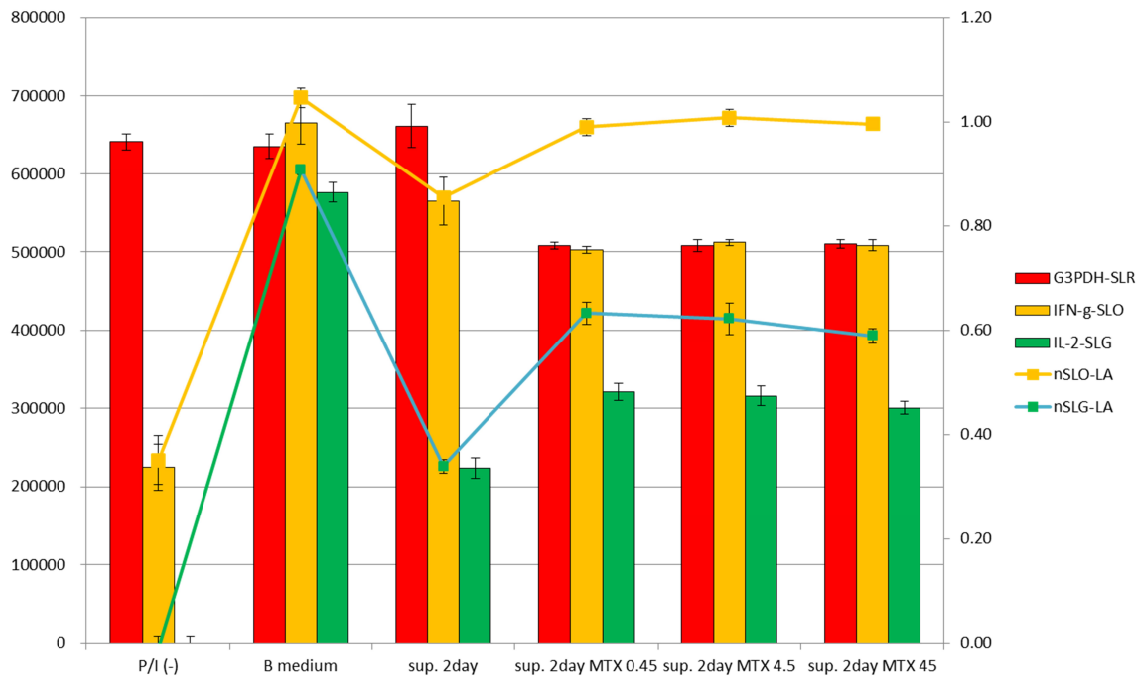


図 19 . 2H4 細胞培養上清による 2H4 細胞サイトカイン活性の抑制におよぼす cyclophosphamide の効果

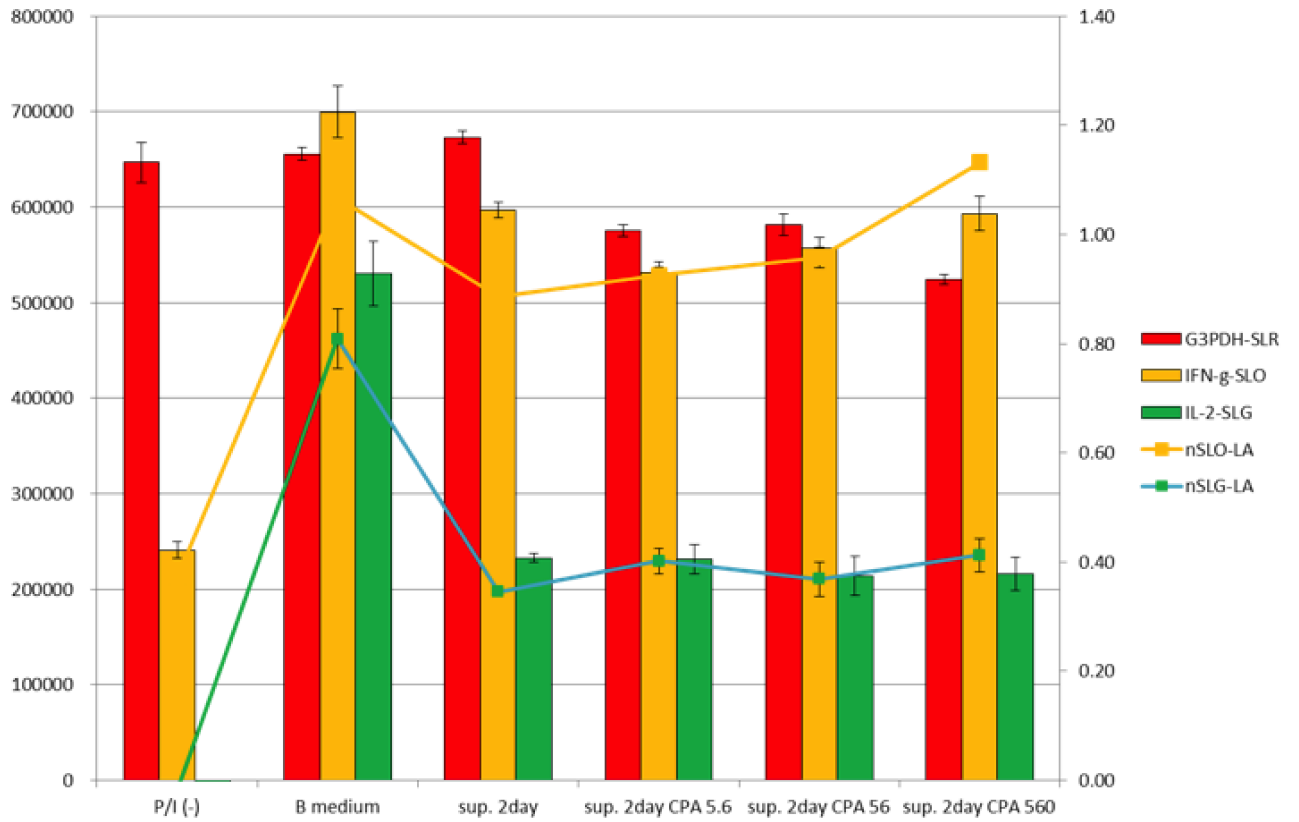


図 20 . 2H4 細胞培養上清による 2H4 細胞サイトカイン活性の抑制におよぼす mizoribine の効果

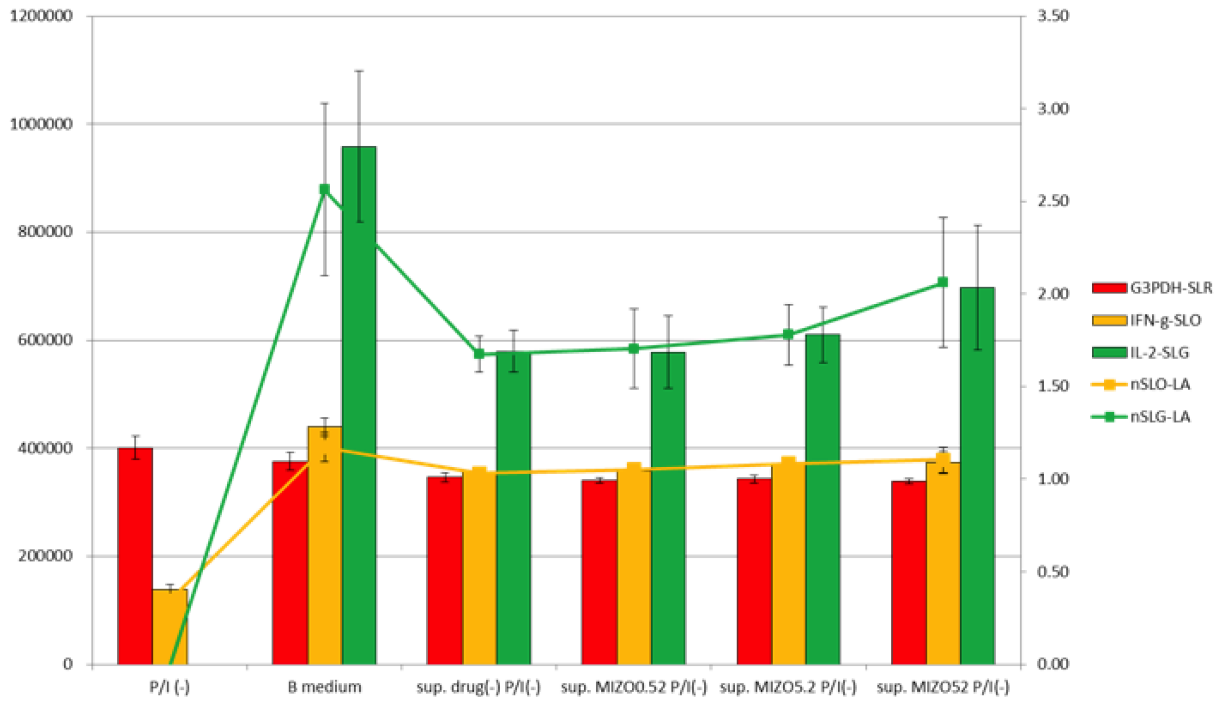


図 2.1 . 免疫抑制剤の 2H4 細胞の免疫抑制遺伝子発現に及ぼす影響 (IL-10)

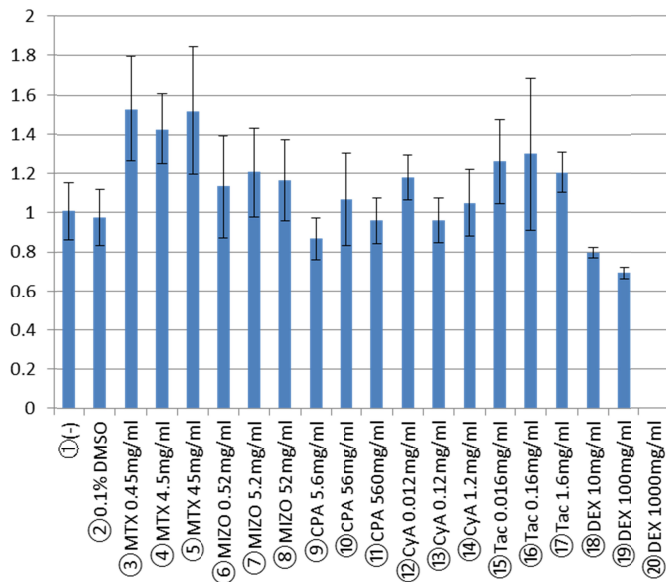


図 2.2 . 免疫抑制剤の 2H4 細胞の免疫抑制遺伝子発現に及ぼす影響 (TGF- 1)

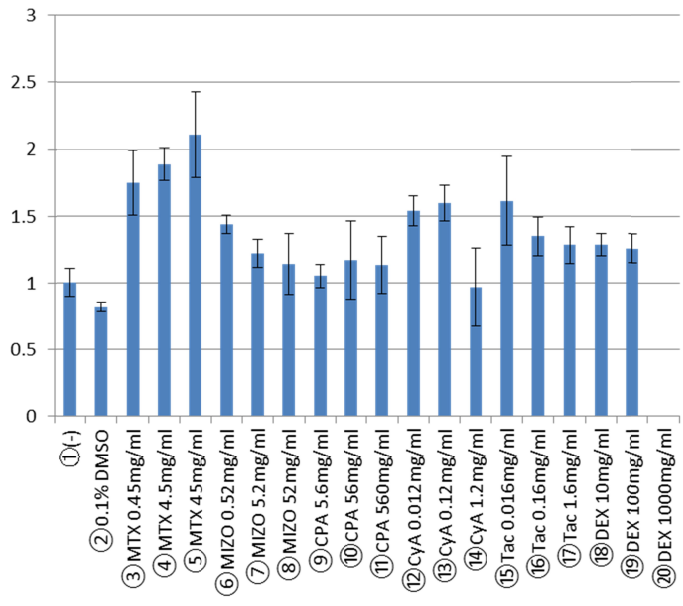


図 2 3 . 免疫抑制剤の 2H4 細胞の免疫抑制遺伝子発現に及ぼす影響 (TGF- 1)

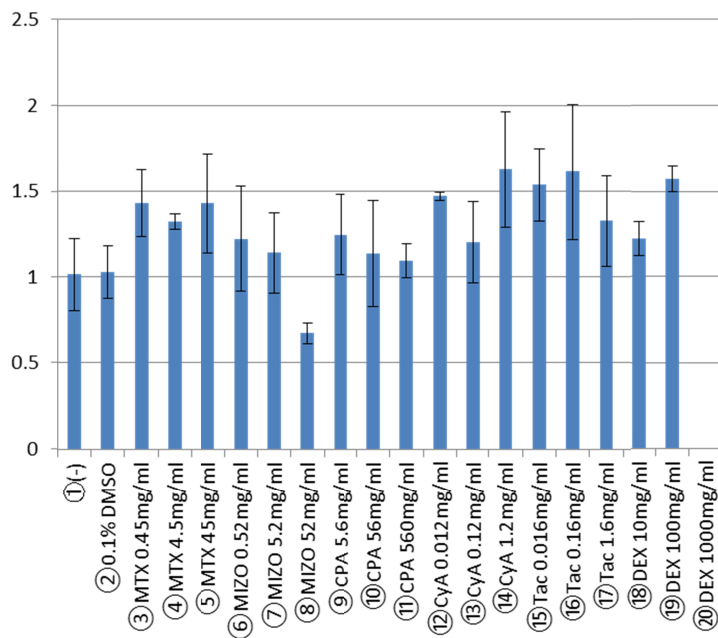


図 2 4 . 25 人の抗 TNF- α 抗体製剤を投与された乾癬患者における PASI スコアの改善率と%suppression の相関

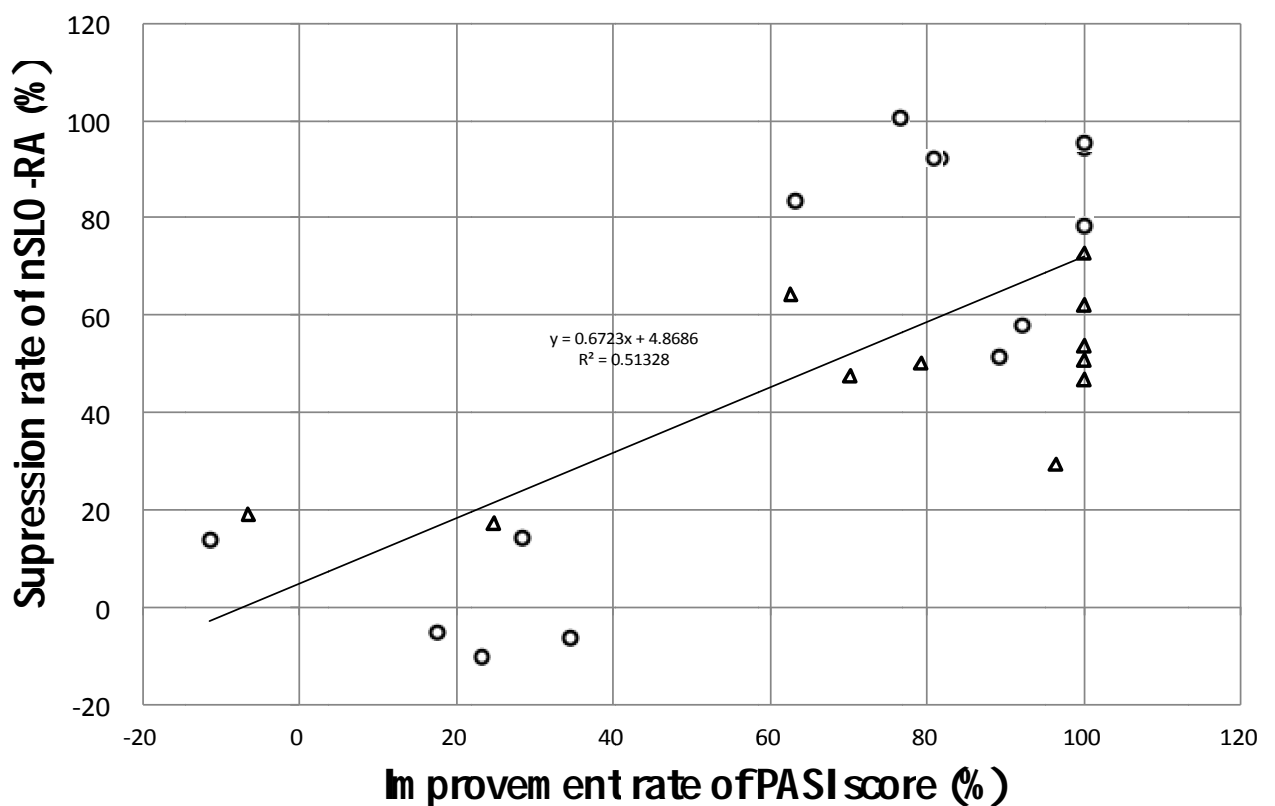
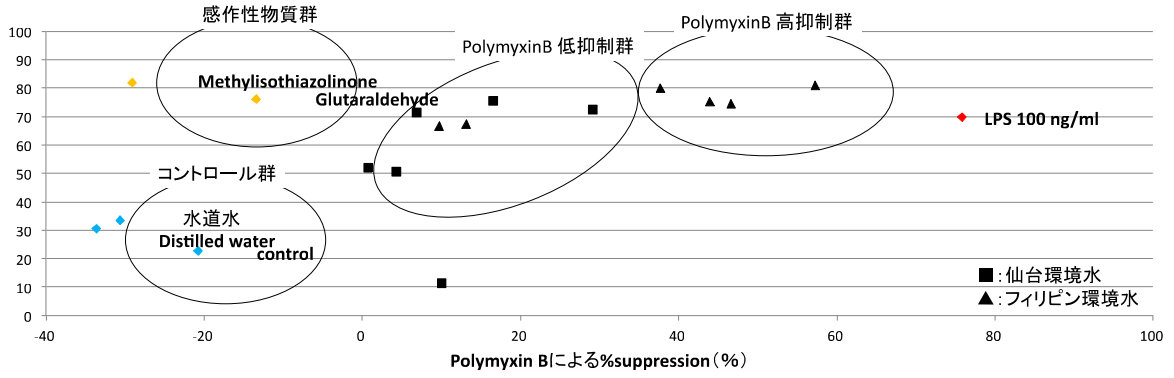


図 2 5 . 仙台およびマニラ周辺の環境水に誘導される THP-G8 の IL-8 プロモーター活性に対する Polymyxin B と N-acetylcysteine による阻害



図の説明

図1 . Multi-ImmunoTox assay (MITA) MITAの構成するレポーター細胞と各種パラメーター

図2 . 各レポーター細胞ルシフェラーゼ活性の刺激後の経時的変化

#2H4細胞 (2×10^5 cells/100 μ l/well) (A), THP-G1b細胞 (5×10^4 cells/100 μ l/well) (B), THP-G8細胞 (5×10^4 cells/100 μ l/well) (C)をPMA/I α またはLPSで刺激後、ルシフェラーゼ活性を測定した。左軸にSLR-LA (白棒) SLO-LA (斜線棒) SLG-LA (黒棒) 右軸にnSLO-LA または nSLG-LA (黒線)を示す。(n = 4).

図3 . 免疫抑制剤 (Dex, CyA, Tac)の#2H4, THP-G1b, THP-G8細胞サイトカインレポーター活性への影響

#2H4, THP-G1b および THP-G8細胞を96プレートに播種、図示された濃度のdexamethasone, cyclosporin A, Tacrolimusで1時間前処理、PMA/I α またはLPSで刺激し、37、5%CO₂下で6時間培養後ルシフェラーゼ活性を測定した。灰色棒は薬剤の前処理のない値を示す。*はコントロールに比べ有意な変化を示す。(p < 0.05)

図4 . 免疫抑制剤 (Dex, CyA, Tac)のJurkat およびTHP-1細胞サイトカイン遺伝子発現制御

Jurkat細胞およびTHP-1細胞 (3×10^6 cells)を図示された濃度のdexamethasone, cyclosporin A, Tacrolimusで1時間前処理、PMA/I α またはLPSで刺激し、37、5%CO₂下で6時間培養後、mRNAを単離しqPCRで各サイトカイン遺伝子発現を解析した。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。灰色棒は薬剤の前処理のない値

を示す。*はコントロールに比べ有意な変化を示す。(p < 0.05)

図5 . 免疫抑制剤 (Dex, CyA, Tac)のヒト whole blood cytokine mRNA expression test (WBCRET)による免疫毒性評価

6人の健常人から全血(WB)の採血を行い、図示された濃度のdexamethasone, cyclosporin A, Tacrolimusで前処理し、37で1時間培養した。その後、PMA/I α またはLPSで刺激し37で6時間培養した。mRNAを単離しqPCRで各サイトカイン遺伝子発現を解析した。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。%suppression抑制率は以下のように計算した。%suppression = (1 - 薬剤存在下のmRNA発現/薬剤非存在下のmRNA発現) x 100

図6 . MITAによる免疫抑制剤 (核酸合成阻害剤)の免疫毒性評価

#2H4, THP-G1b および THP-G8細胞を96プレートに播種、図示された濃度のazathioprine (AZA), methotrexate (MTX), leflunomide (LEF)で1時間前処理、PMA/I α またはLPSで刺激し、37、5%CO₂下で6時間培養後ルシフェラーゼ活性を測定した。灰色棒は薬剤の前処理のない値を示す。*はコントロールに比べ有意な変化を示す。(p < 0.05)

図7 . MITAによる免疫調節剤 (SASP, CQ, colchicine)の免疫毒性評価

#2H4, THP-G1b および THP-G8細胞を96プレートに播種、図示された濃度のsulfasalazine(SASP), chloroquine(CQ), colchicineで1時間前処理、PMA/I α またはLPSで刺激し、37、5%CO₂下で6時間培養後ルシフェラーゼ活性を測定した。灰色棒は薬剤の前処理のない値を示す。*

はコントロールに比べ有意な変化を示す。
($p < 0.05$)

図 8 . MITA による免疫調節作用の知られていない薬剤 (Warfarin, Digoxin, acetaminophen) の免疫毒性評価

#2H4, THP-G1b および THP-G8 細胞を 96 プレートに播種、図示された濃度の warfarin, digoxin, acetaminophen で 1 時間前処理、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。灰色棒は薬剤の前処理のない値を示す。* はコントロールに比べ有意な変化を示す。 ($p < 0.05$)

図 9 . MITA2 による免疫毒性判定基準

図 10 . あらたに樹立した人工染色体技術を用いた IL-1 レポーター細胞と THP-G1b の LPS 反応性比較

新たに樹立した TGCHAC-A1, TGCHAC-A4, TGCHAC-B1 および THP-G1b 細胞を 5x10⁴ 細胞/100 \square I/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 11 . あらあに樹立した IL-1 β レポーター細胞 TGCHAC-A4 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 12 . TGCHAC-A4 細胞ルシフェラーゼ活性評価に使用する SLR-LA によるデータの安定性の相違

THP-G1b, TGCHAC-A4 および THP-G8 細胞を 5x10⁴ 細胞/50 \square I/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 13 . TGCHAC-A4 細胞を用いた施設間比較試験 (LPS)

TGCHAC-A4 および THP-G8 細胞を 1x10⁵ 細胞/100 \square I/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 14 . TGCHAC-A4 細胞を用いた施設間比較試験 (Dex と CyA)

TGCHAC-A4 および THP-G8 細胞を 1x10⁵ 細胞

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 $^{\circ}$ 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 15 . 免疫抑制剤との前培養の MITA 評 価に及ぼす影響 (CyA と MTX)

#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/Io
または LPS で刺激し 37 $^{\circ}$ 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 16 . 免疫抑制剤との前培養の MITA 評価に及ぼす影響 (Cyclophosphamide と Mizoribine)

#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/Io
または LPS で刺激し 37 $^{\circ}$ 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 17 . Jurkat 細胞培養上清による #2H4 細胞 IL-2、IFN- γ レポーター活性の抑制

2x10⁵ 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 刺激し 37 $^{\circ}$ 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。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 6x10⁵/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/Io で刺激し 37 $^{\circ}$ 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。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 6x10⁵/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 α 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。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 6x10⁵/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 α 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。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)

3 x10⁶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 °C、5%CO₂ 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、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- β 1)

3 x10⁶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 °C、5%CO₂ 下で 12 時間培養後、mRNA を単離し qPCR

で TGF- β 1 遺伝子発現を解析した。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。

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- β 2)

3 x10⁶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 °C、5%CO₂ 下で 12 時間培養後、mRNA を単離し qPCR で TGF- β 2 遺伝子発現を解析した。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。

図 24 . 25 人の抗 TNF- α 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- α 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-G 8 細胞を用いて測定した患者血清中の抗 TNF- α 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、△ : infliximab 投与患者。

図 25 . 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 (methylisothiazolinone 2.5 μ g/ml、glutaraldehyde 5 μ g/ml)、LPS(100 ng/ml) について、ポリミキシン B(50 μ 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 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 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

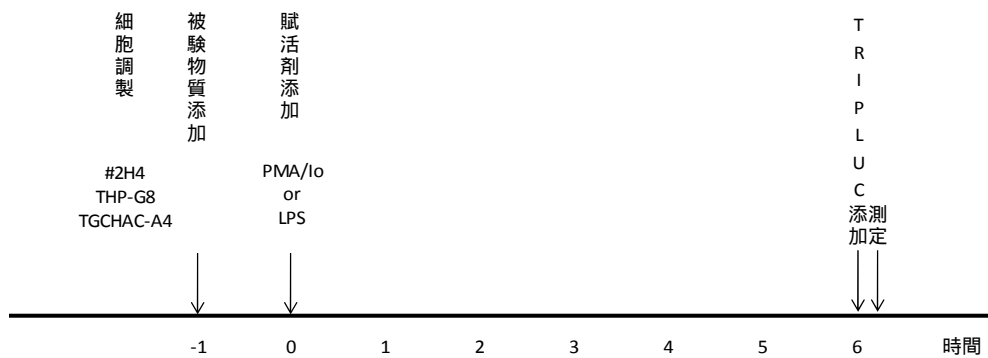
本 Protocol は IL2-SLG、IFN γ -SLO、G3PDH-SLR を含む多色発光細胞株 (#2H4)、IL8-SLO、G3PDH-SLR を含む多色発光細胞株 (THP-G8) および IL-1 β -SLG、G3PDH-SLR を含む多色発光細胞株 (TGCHAC-A4) を利用した化学物質の免疫毒性試験法における細胞培養方法、被験物質調整及び添加方法、及びルシフェラーゼアッセイの方法について記載した。

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 μ l, 0.5~10 μ l 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 μ g/ml Puromycin+200 μ g/ml Hygromycin+300 μ g/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 μ g/ml	7.5 μ l
Hygromycin	Invitrogen #10687-010	50 mg/ml	200 μ g/ml	2 ml
G418	ナカライテスク #16513-84	50mg/ml	300 μ g/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 μ g/ml Puromycin +300 μ g/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 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。

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-A4:10n g/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 μ 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 μ l に Distilled water を 995 μ l 加え 5 μ 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 μ l) 当たり 10 μ 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 μ g/ml としたものをさらに 500 倍希釈し(10 μ l+ddw 5ml)、1 well (培地 100 μ l) 当たり 10 μ 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, 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 4×10^6 /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 (NaBrO₃) (Distilled water, 100 mg/ml)

Nickel (II) sulfate (NiSO₄) (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 (NaBrO₃, NiSO₄)調製

5-1-1 試薬の配置 (水溶性被験物質)

調製した NaBrO₃ 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	NaBrO ₃ 100 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 ₃ 0.2 mg/ml in distilled water 100ul	NaBrO ₃ 0.4 mg/ml in distilled water 50ul	NaBrO ₃ 0.8 mg/ml in distilled water 50ul	NaBrO ₃ 1.6 mg/ml in distilled water 50ul	NaBrO ₃ 3.1 mg/ml in distilled water 50ul	NaBrO ₃ 6.3 mg/ml in distilled water 50ul	NaBrO ₃ 13 mg/ml in distilled water 50ul	NaBrO ₃ 25 mg/ml in distilled water 50ul	NaBrO ₃ 50 mg/ml in distilled water 50ul	NaBrO ₃ 100 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 μl を取り出し、アッセイブロックの中の B 培地 960 μl 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 μl 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 μl 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			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 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												

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												

20ul

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

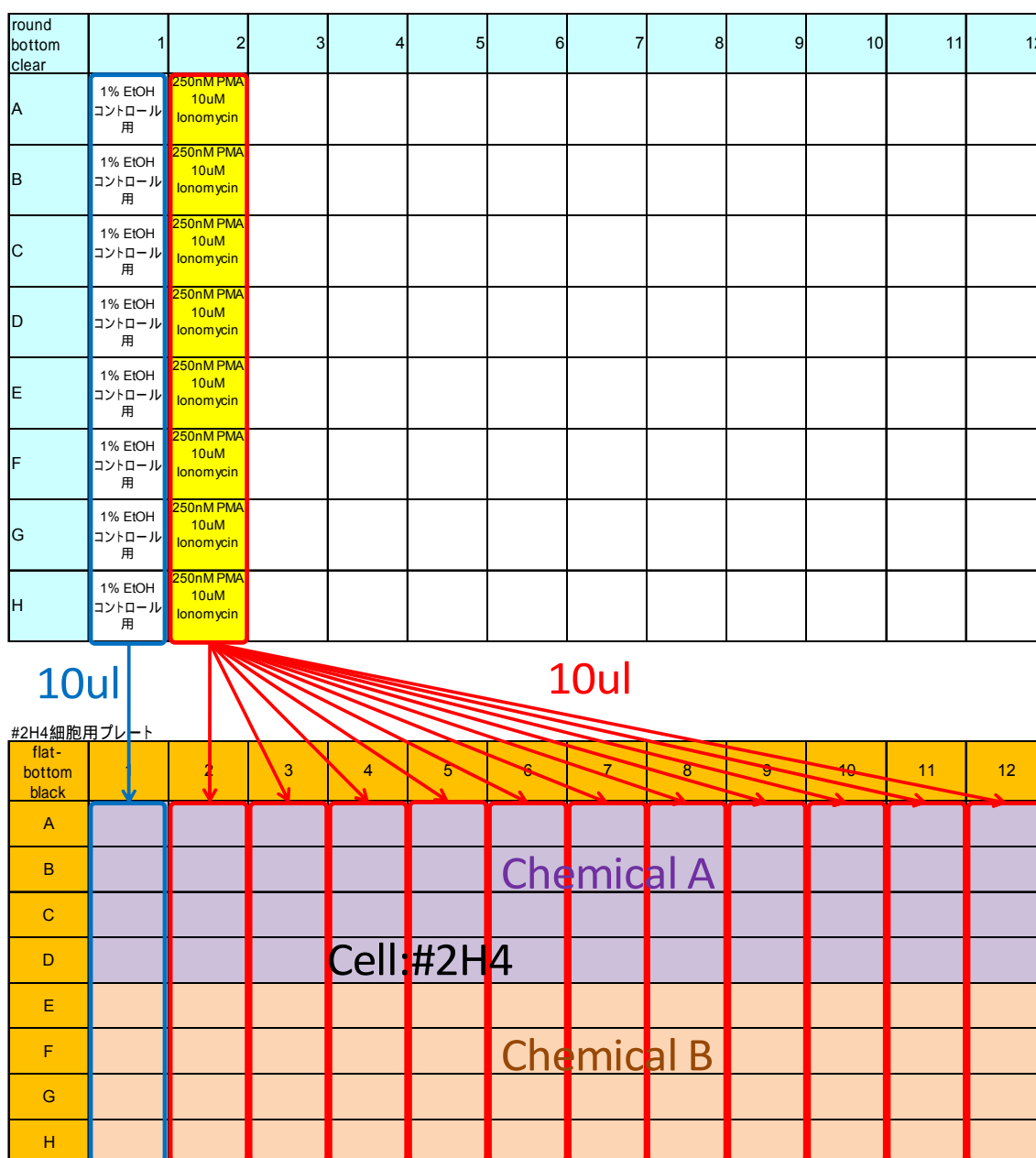
下表のように 250 nM PMA 10 µM ionomycin 溶液を調製する (10 倍濃度) また EtOH を含む Control 液を調製し試薬添加用の 96 well plate (U 底) に分注しておく。(図 13)

	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)

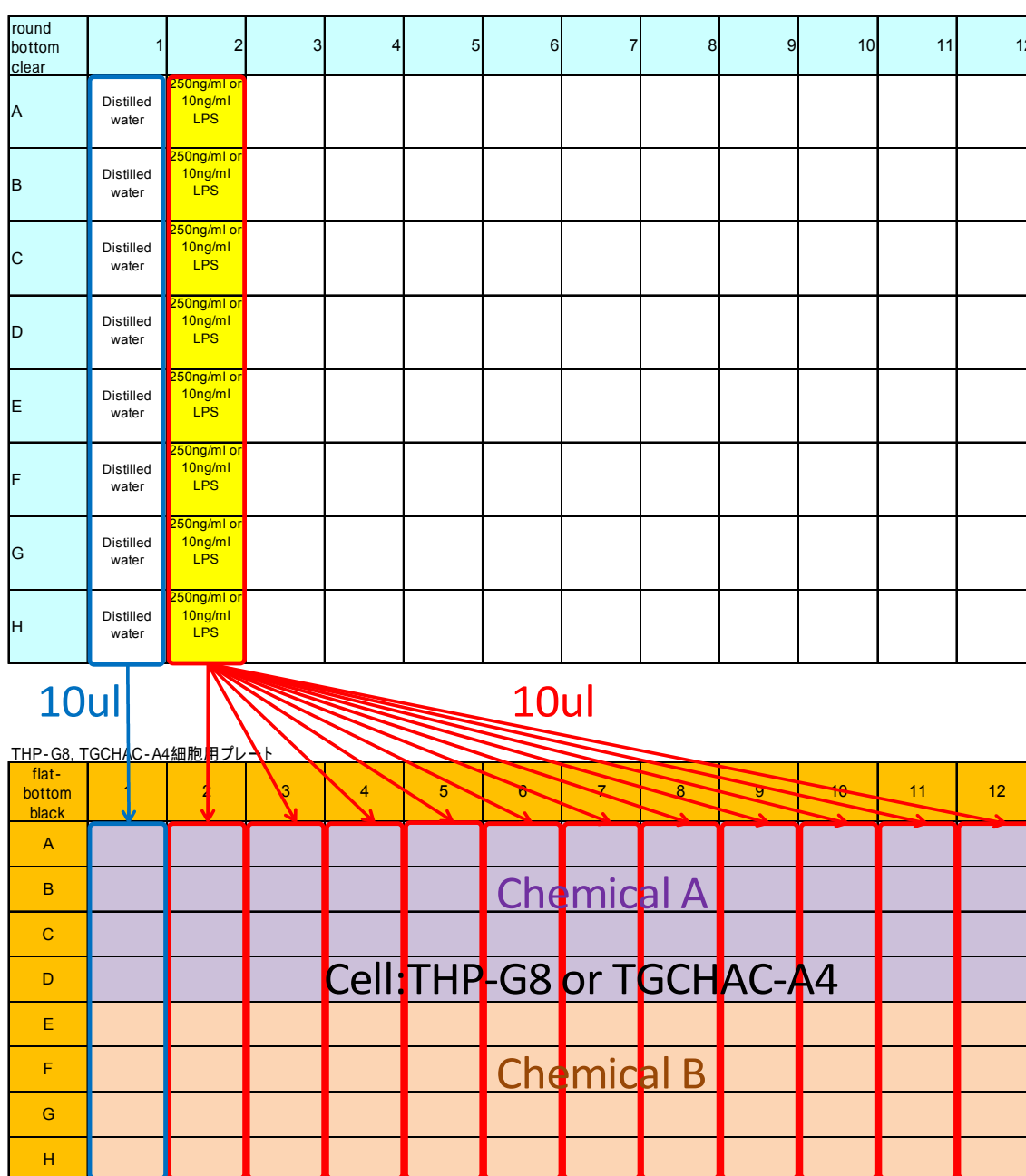
7-2-2 10 ng/ml LPS(TGCHAC-A4 用)の調整方法

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、攪拌して混合する。細胞をインキュベーターへ入れ、6時間反応させる。

図 14



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

8-1-1 dexamethasone の調製方法

試薬名	メーカー	ストック濃度	使用時希釈濃度	終濃度
Dexamethasone-water soluble	Sigma #D2915-100MG	50 mg/ml	50 mg/ml	1 mg/ml
Distilled water	GIBCO Cat#10977-015			

<作製方法>

Dexamethasone-water soluble 100 mg を溶媒 Distilled water 2000 μ l に溶解する。

<保存方法>

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

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 50 mg/ml stock 50 μ l に distilled water 10 μ l を加えたもの(#B3)、 B 培地 180 μ l (#B4-B5)を下図のように 96 well clear plate (丸底)に分注する (図 16)

図 16

round bottom clear	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A				DMSO 50 μ l	CyA 12 mg/ml stock 10 μ l + DMSO 110 μ l							
B	Distilled water 50 μ l	Distilled water 50 μ l	DEX 50 mg/ml stock 50 μ l	B medium 180 μ l	B medium 180 μ l							
C												
D												
E												
F												
G												
H												

↓

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

8-4 B 培地での希釈

矢印のように#A4 の DMSO、#A5 に調製した CyA の DMSO 溶液 20 μ l を下の B 培地 180 μ l にうつし 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

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												

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 980ul	B medium 980ul							
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

8-6 細胞への添加

50 μ l にセッティングしたピペットを用いて泡立たないように注意して 20 回ピペッティング後、#2H4 細胞、THP-G8 細胞、TGCHAC-A4 細胞の入ったプレートの 50 μ l 加える。(2 倍に希釈される、図 18、19) 8-4 から 8-6 にかけての操作は可及的迅速におこない、8-4 後、8-5 後の段階で長時間放置しないようにする。

終了後、プレートシェーカーを使用し、攪拌して混合する。細胞をインキュベーターへ入れ、1 時間反応させる。

図 18

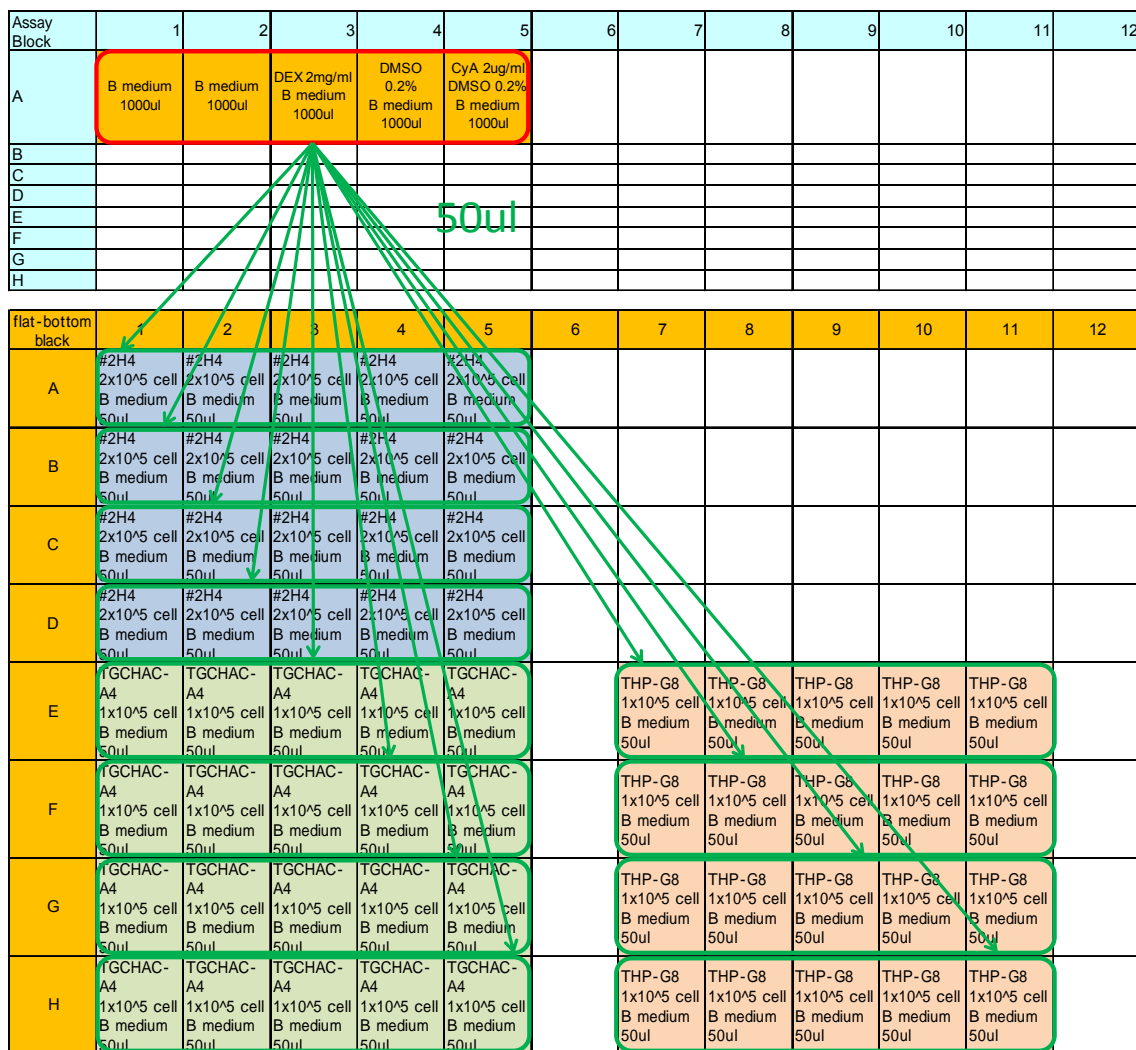


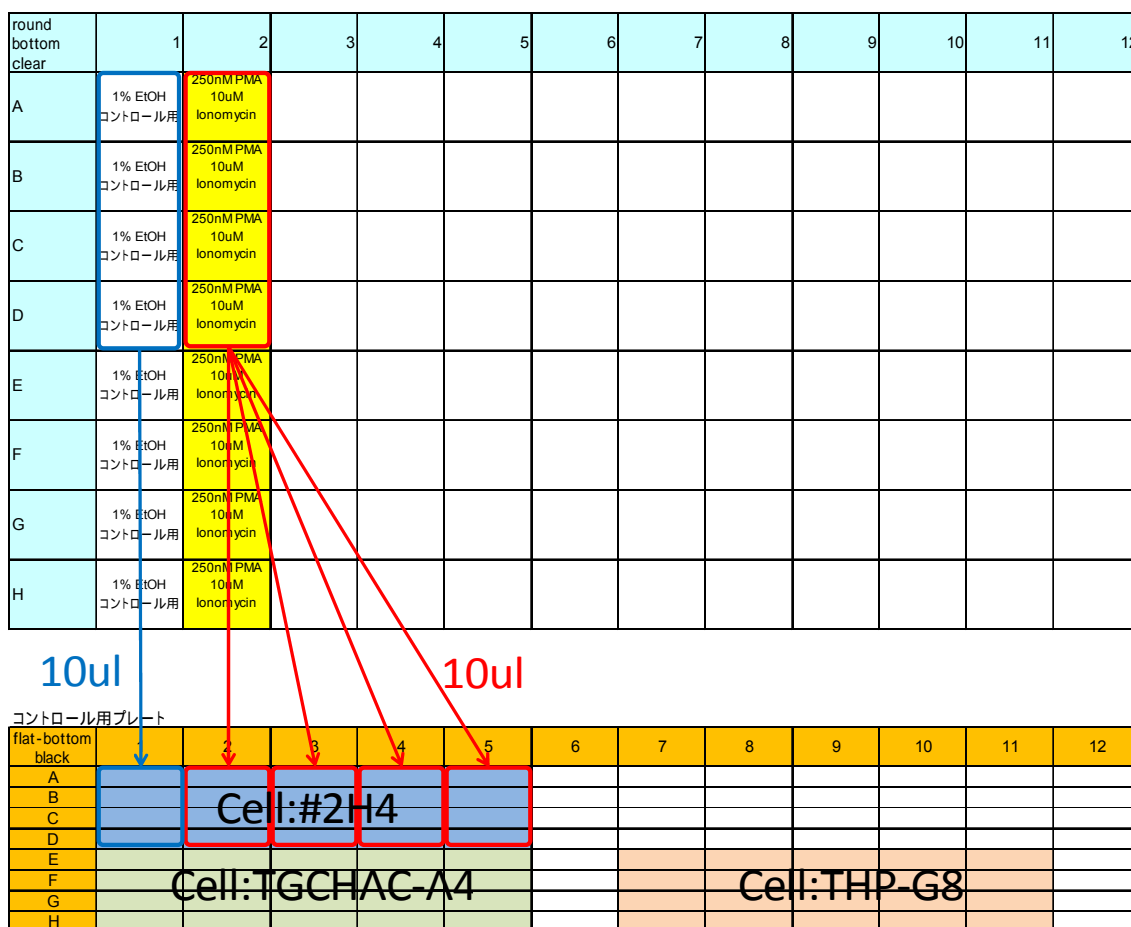
図 19 プレートにまき終わった状態

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。

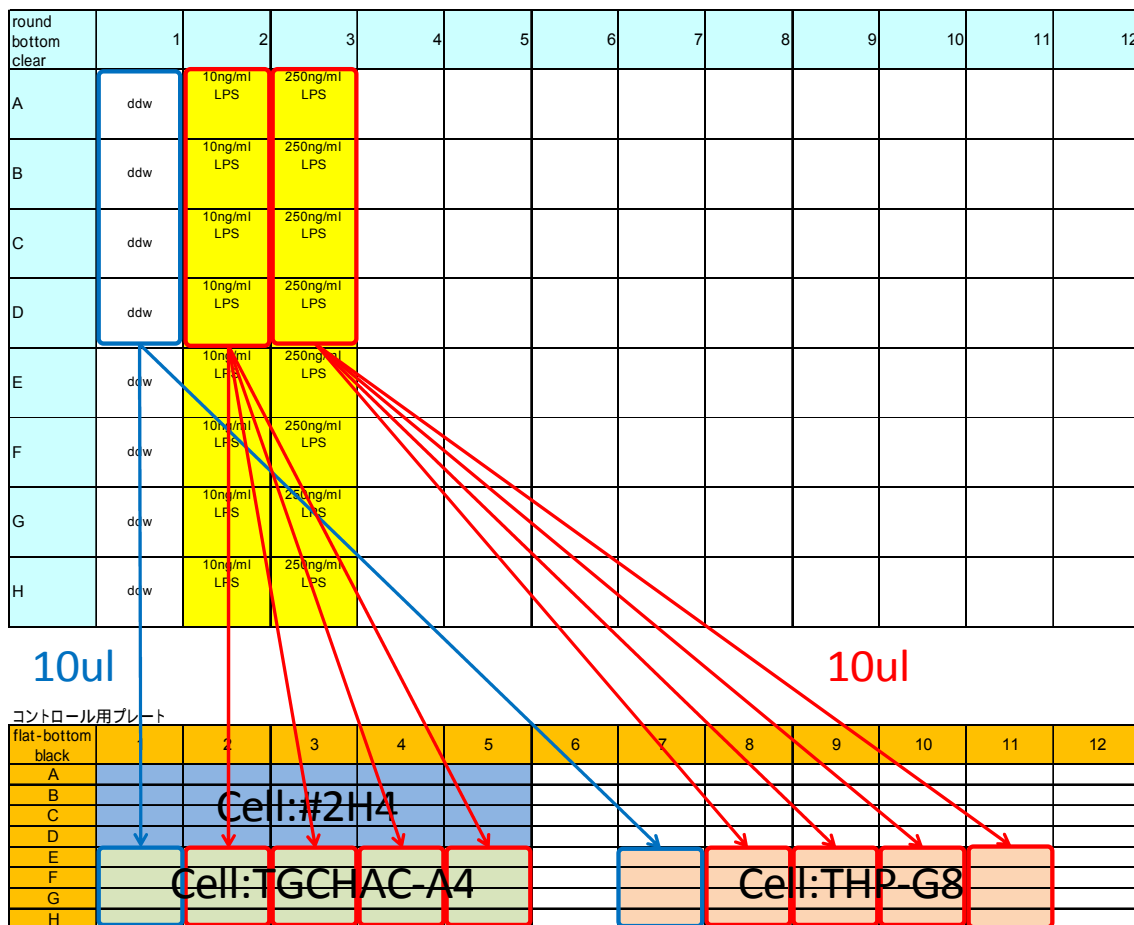
図 20



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 µl/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て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/I α 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 ÷

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

