

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

化学物質の動物個体レベルの免疫毒性データ集積とそれに基づく Multi-ImmunoTox assay（MITA）による予測性試験法の確立と国際標準化（H30-化学-一般-001）

分担研究報告書

IL-1 Luc assayクライテリアの設定ならびにプロトコールの作成

研究分担者 木村 裕 東北大学病院皮膚科

### 研究要旨

今年度は、分担者として IL-1 転写活性抑制評価試験(IL-1 luciferase reporter assay; IL-1 Luc assay)のクライテリアの設定ならびにプロトコールの作成を行った。昨年度までに国際バリデーションが終了した IL-2 転写活性抑制評価試験(IL-2 Luciferase reporter assay; IL-2 Luc assay)のプロトコールを参照とし、使用する IL-1 レポーター細胞である THP-G1b 細胞の培養条件設定(選択抗生剤を使用しない等) 刺激する LPS の選定および濃度設定(E. coli K12, 100 ng/mL) 使用する 96 ウェルプレートの選定を行った(black & white プレートを使用)。過去の施設間試験で使用した化学物質のデータを参考とし Phase 0 試験(2018年8月~9月)用の3つの化学物質を選定した。当教室で作成した60化学物質でのデータベースの結果および Phase 0 試験での各施設のデータをもとに |%suppression| >=20%を陽性とするクライテリアを設定し Phase 1 用のプロトコールを作成した。神戸大学の協力を得てバリデーション試験において使用するデータシート(Appendix 1)を作成、その他記録用紙(Appendix 2)を作成し Phase 1 試験(2018年12月~2019年3月)を行った。Phase 1 の途中で、化学物質の毒性が強い場合判定できないという問題が生じたため、その対応を盛り込んだプロトコールに改訂した。(Multi-Immuno Tox Assay protocol for THP-G1b ver.008.1E:最新プロトコール、総括 Appendix 2)

#### A. 研究目的

IL-1 Luc assayの国際バリデーションの実施に向け、その際に使用するクライテリアの設定、プロトコールを作成することを目的とした。

#### B. 研究方法

以下の方法により IL-1 プロモーター活性の測定を行った。ヒト急性単球性白血病由来細胞株 THP-1 に IL-1 $\beta$  プロモーターに制御された SLG ルシフェラーゼ遺伝子(緑色に発色)、GAPDH プロモーターに制御された SLR ルシフェラーゼ遺伝子(赤色に発色)を導入した THP-G1b(TGCHAC-A4)細胞を1ウェル当たり  $1 \times 10^5$  個、96-well プレートに播種し化学物質を加え、37、5%CO<sub>2</sub>下で

1時間培養した。つづいて Lipopolysaccharide (LPS)で刺激し37、5%CO<sub>2</sub>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、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、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(SLG-luciferase activity(SLG-LA)、SLR-luciferase activity(SLR-LA))を検出した。また細胞数の違いや各種刺激後の生存率の違いを勘案し SLG-LAを SLR-LAで除することにより

normalized SLG-luciferase activity(nSLG-LA)を算出した。さらに以下の式により化学物質によるIL-1 プロモーター活性の抑制率%suppressionを計算した。  
$$\% \text{ suppression} = (1 - \text{化学物質存在下での nSLG-LA} / \text{化学物質非存在下での nSLG-LA}) \times 100$$

(倫理面への配慮)

本研究では主に細胞株を使用しており倫理面の問題は無いと判断した。

## C. 研究結果

### I. アッセイ方法の検討

平成24年度から平成26年度の3年間にわたる厚生労働科学研究費補助金事業「多色発光細胞を用いたhigh-throughput免疫毒性評価試験法の開発」においてTHP-1細胞をベースとしたIL-1 レポーター細胞であるTHP-G1b(TGCHAC-A4)細胞を樹立した。本研究でIL-1 転写活性抑制評価試験(IL-1 luciferase reporter assay; IL-1 Luc assay)に使用するにあたり以下の条件設定を行った。

#### LPS、96ウェルプレートの選定

従来のLPS(E.coli O26:B6)ではSLR-LAに比べSLG-LAの値が極端に高くなり結果が不安定になるという問題があったため刺激するLPSについて再検討を行った。入手可能なLPS 4種について反応性を測定したところE. coli K12でE.coli O26:B6の3分の1の反応性を示すことが示された。また従来96ウェルプレートについてはblackプレートを使用していたがウェルの内側を白色、ウェル間を含めた他の部分が黒色のblack & whiteプレートの使用を検討したところシグナルの増強が認められ安定した結果が得られた。

以上の結果からLPSはE. coli K12へ、96ウェルプレートはblack & whiteプレートへ変更した。

#### 培養条件の検討

THP-G1b(TGCHAC-A4)細胞の培養の際に選択抗生剤としてプラストサイジンを使用していたがプラストサイジンにより細胞のLPSへの反応性が低下する可能性が考えられたためプラストサイジンが入っていない培地を使用することと

した。

### II. クライテリアの設定

当教室で作成した60化学物質でのデータベースの結果およびPhase 0試験での各施設のデータをもとに|%suppression|>=20%を陽性とするクライテリアを設定しPhase 1用のプロトコールを作成した。Phase 1の途中で、化学物質の毒性が強い場合に有効なデータが得られず判定ができないという問題が生じたため、有効なデータが6濃度未満でかつ陰性と判定されるときそのアッセイは棄却されるクライテリアに変更した。

以上I、IIを反映したプロトコールを作成した。(Multi-Immuno Tox Assay protocol for THP-G1b ver.008.1E:最新プロトコール、総括Appendix 2)

### III. データシートの作成

95%信頼区間の算出法について神戸大学の協力を得てPhase 1用のデータシートを作成した。(Appendix 1)

### IV. Phase 1用の記録用紙を作成した。(Appendix 2)

## D. 考察

培養条件、LPS、96ウェルプレート、クライテリアの変更によりPhase 0における技術移転性が確認された。

## E. 結論

IL-2 Luc assayのプロトコールを参照とし、THP-G1b(TGCHAC-A4)細胞の培養条件、LPS、96ウェルプレート、クライテリアを変更しプロトコールを作成した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kimura, Y., Fujimura, C., Ito, Y., Takahashi, T., Terui, H., Aiba, S., 2018. Profiling the immunotoxicity of chemicals based on in vitro evaluation by a combination of the Multi-ImmunoTox

assay and the IL-8 Luc assay. Arch Toxicol 92, 2043-2054.

- 2) Kimura, Y., Watanabe, M., Suzuki, N., Iwaki, T., Yamakage, K., Saito, K., Nakajima, Y., Fujimura, C., Ohmiya, Y., Omori, T., Kojima, H., Aiba, S., 2018. The performance of an in vitro skin sensitisation test, IL-8 Luc assay (OECD442E), and the integrated approach with direct peptide reactive assay (DPRA). J Toxicol Sci 43, 741-749.

## 2. 学会発表

- 1) 木村 裕、安野 理恵、渡辺 美香、小林 美和子、岩城 知子、藤村 千鶴、近江谷 克裕、山影 康次、中島 芳浩、小林 眞弓、大森 崇、足利 太可雄、小島 肇、相場 節也 : Multi-ImmunoTox Assay (MITA) : バリデーション研究の結果 日本動物実験代替法学会 第31回大会 (熊本) 2018年11月

H. 知的財産権の出願・登録状況

( 予定を含む。 )

なし

Appendix 1 : Data sheet for MITA THP-G1b (TGCHAC-A4) Ver. 008 20181203  
 フェイスシート

**Multi-ImmunoTox Assay Datasheet for THP-G1b (TGCHAC-A4) cells**

Ver. 008

Laboratory		Round	
------------	--	-------	--

Exp.	1st exp.	(Highest soluble conc. In the next exp.s	mg/ml)
------	----------	--	--------

Date: (YYYY/MM/DD)		Operator:	
-----------------------	--	-----------	--

Code		Dissolution		mg/ml in	
------	--	-------------	--	----------	--

FinSLG-LA	#NUM!	#NUM!
-----------	-------	-------

Comment:	
----------	--

Appendix 1 : Data sheet for MITA THP-G1b (TGCHAC-A4) Ver. 008 20181203  
 data 入力シート

MultiReporter Assay System- Tripluc<sup>®</sup>- Calculation Sheet

Input measured data (counts)

	TF
SLG	1
SLR	1

Distance factors of filter 2 for SLG and SLR

	Null	TF	inversion matrix
SLG	1	0	#NUM!
SLR	1	0	#NUM!

Data without filter

Null	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Data using Filter 2

F2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Appendix 1 : Data sheet for MITA THP-G1b (TGCHAC-A4) Ver. 008 20181203

ResultFormat シート

MiReporter Assay System - Triplus<sup>®</sup> - Calculation Sheet

Filter Null Data

Null	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Note: Not edit table  
When there is a calculation error message appears, Shift + Control + Enter key is to calculate the app.



Filter 2 Data

Filter 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Not edit table

MiReporter Assay System - Triplus<sup>®</sup> - Calculation Sheet

Transmittance Data

SLG	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
B	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
C	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
D	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
E	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
F	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
G	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
H	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!

SLR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
B	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
C	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
D	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
E	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
F	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
G	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
H	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!

SLG mod	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
B	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
C	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
D	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
E	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
F	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
G	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
H	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!

SLR mod	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
B	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
C	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
D	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
E	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
F	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
G	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
H	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!

rSLG - LA

#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!

Chemical concentration

cont.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	FALSE	ng/ml
SLG - LA Average	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
S.D.	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!

SLR - LA Average

#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!

rSLG - LA Average

#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!

濃度の誤り (%)

0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

II - SLR - LA

#NUM!	1.000	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

%suppression (L-1)

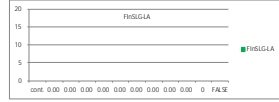
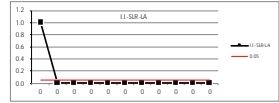
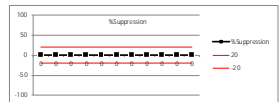
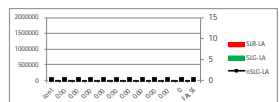
#NUM!	0.000	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

FitSLG - LA

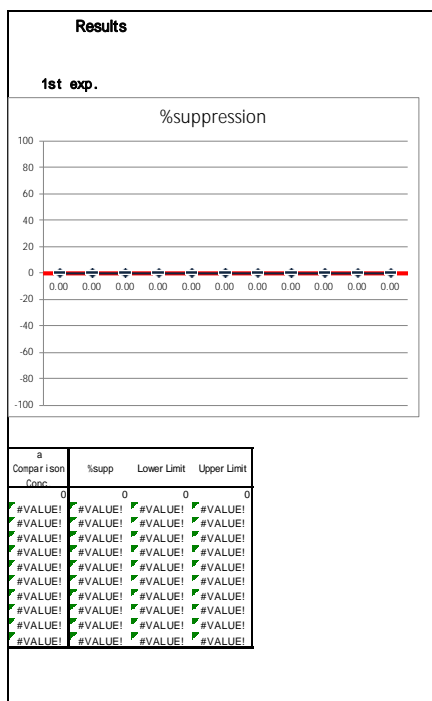
#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

#NUM!	1	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!
#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!	#NUM!

20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
-20	-20	-20	-20	-20	-20	-20	-20	-20	-20	-20	-20	-20	-20	-20
0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05



%suppression グラフシート



Appendix 2 : MITA 記録用紙 Ver. 005J 20181203

試薬管理シート

実験名 MITA バリデーション研究

被試験試薬コード \_\_\_\_\_

被試験試薬管理

受領日 \_\_\_\_\_ 年 月 日 受領者氏名 \_\_\_\_\_

保管場所 \_\_\_\_\_ 温度( ) \_\_\_\_\_

備考 \_\_\_\_\_

受領量(容器込) \_\_\_\_\_ g

月 日	使用量(g)	残存量(g)	実験担当者名	備考	Exp. No.	溶解性検討
H. / /						
/						
/						
/						
/						
/						
/						
/						
/						
/						
/						
/						
/						



Appendix 2 : MITA 記録用紙 Ver. 005J 20181203

試験者シート

実験名 MITA バリデーション研究

実験日 \_\_\_\_\_

施設名 \_\_\_\_\_

実験責任者名 \_\_\_\_\_

実験担当者名 \_\_\_\_\_

実験担当者名 \_\_\_\_\_

実験担当者名 \_\_\_\_\_

実験担当者名 \_\_\_\_\_

試験物質コード

_____	回目
_____	回目
_____	回目
_____	回目
_____	回目
_____	回目
_____	回目
_____	回目
_____	回目
_____	回目
_____	回目

## Appendix 2 : MITA 記録用紙 Ver. 005J 20181203

### 細胞継代シート

#### 3-1 THP-G1b (TGCHAC-A4) 培養方法

##### 3-1-1 細胞蘇生(P1)

- あらかじめ、THP-G1b (TGCHAC-A4)用A培地15 mLを37° C恒温槽で温めておく(培養用)。
- 凍結細胞を37° C恒温槽で融解し、THP-G1b (TGCHAC-A4)用A培地9 mLを入れておいた15 mLの遠沈管に加える(細胞液0.5 mL+C培地 9 mL=計9.5 mL)
- 遠心して細胞を集める(120-350 x g, 5分程度)。
- 上清を吸引除去し、先に温めておいたTHP-G1b (TGCHAC-A4)用A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>)。
- 上記より一部細胞浮遊液を採取し、培養開始時の細胞生存率を計測する。(計算)

生細胞数:

死細胞数:

実施日: \_\_\_\_\_ 年 月 日、実施者: \_\_\_\_\_

##### 3-1-2 通常の継代培養(P2以降)

P-

- あらかじめ、THP-G1b (TGCHAC-A4)用A培地必要量を37° C恒温槽で温めておく。
  - 細胞数を計測する。
- 継代細胞濃度は $2.5 \times 10^5$ /mL、継代間隔は3~4日程度で行う。
- ( + ) / × = × 10<sup>5</sup>/mL-A液
- 必要細胞量を取り、遠心して細胞を集める(120-350 x g, 5分程度)。上清を吸引除去し、先に温めておいたA培地15mLに $2.5 \times 10^5$ /mLで細胞を懸濁して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変更は構わない。

A液の採取量: \_\_\_\_\_ mL

実施日: \_\_\_\_\_ 年 月 日、実施者: \_\_\_\_\_

P-

- あらかじめ、THP-G1b (TGCHAC-A4)用A培地必要量を37° C恒温槽で温めておく。
  - 細胞数を計測する。
- 継代細胞濃度は $2.5 \times 10^5$ /mL、継代間隔は3~4日程度で行う。
- ( + ) / × = × 10<sup>5</sup>/mL-A液
- 必要細胞量を取り、遠心して細胞を集める(120-350 x g, 5分程度)。上清を吸引除去し、先に温めておいたA培地15mLに $2.5 \times 10^5$ /mLで細胞を懸濁して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変更は構わない。

A液の採取量: \_\_\_\_\_ mL

実施日: \_\_\_\_\_ 年 月 日、実施者: \_\_\_\_\_

P-

- あらかじめ、THP-G1b (TGCHAC-A4)用A培地必要量を37° C恒温槽で温めておく。
  - 細胞数を計測する。
- 継代細胞濃度は $2.5 \times 10^5$ /mL、継代間隔は3~4日程度で行う。
- ( + ) / × = × 10<sup>5</sup>/mL-A液
- 必要細胞量を取り、遠心して細胞を集める(120-350 x g, 5分程度)。上清を吸引除去し、先に温めておいたA培地15mLに $2.5 \times 10^5$ /mLで細胞を懸濁して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変更は構わない。

A液の採取量: \_\_\_\_\_ mL

実施日: \_\_\_\_\_ 年 月 日、実施者: \_\_\_\_\_

P-

- あらかじめ、THP-G1b (TGCHAC-A4)用A培地必要量を37° C恒温槽で温めておく。
  - 細胞数を計測する。
- 継代細胞濃度は $2.5 \times 10^5$ /mL、継代間隔は3~4日程度で行う。
- ( + ) / × = × 10<sup>5</sup>/mL-A液
- 必要細胞量を取り、遠心して細胞を集める(120-350 x g, 5分程度)。上清を吸引除去し、先に温めておいたA培地15mLに $2.5 \times 10^5$ /mLで細胞を懸濁して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変更は構わない。

A液の採取量: \_\_\_\_\_ mL

実施日: \_\_\_\_\_ 年 月 日、実施者: \_\_\_\_\_

Appendix 2 : MITA 記録用紙 Ver. 005J 20181203

細胞調製シート

実験名 MITA バリデーション研究

実験日 \_\_\_\_\_

施設名 \_\_\_\_\_

細胞調製

室温 \_\_\_\_\_

予定プレート数 \_\_\_\_\_ 枚 ×  $10 \times 10^6$  cells/枚 × 1.5 = \_\_\_\_\_ cells (必要細胞数)

細胞調製 (試験物質用)

細胞蘇生年月日 \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

前回継代年月日 \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日

前回継代時

細胞濃度・培養液量 \_\_\_\_\_ cells/mL × \_\_\_\_\_ mL

実験当日細胞濃度 \_\_\_\_\_ cells/mL -

遠心した細胞数 \_\_\_\_\_ cells<sup>-1</sup>

を \_\_\_\_\_ mL を採取

再懸濁した培地量 \_\_\_\_\_ mL (〃の細胞数 ÷  $(2 \times 10^6)$ )

それぞれのプレートに 50  $\mu$ L / well で分注 \_\_\_\_\_ ( : )

細胞調製 (コントロール(dexamethasone)用)

上で調製した細胞を別のプレートの #A1-#D5 に 50  $\mu$ L / well で分注 \_\_\_\_\_ ( : )

Appendix 2 : MITA 記録用紙 Ver. 005J 20181203

被試験試薬の調製 シート

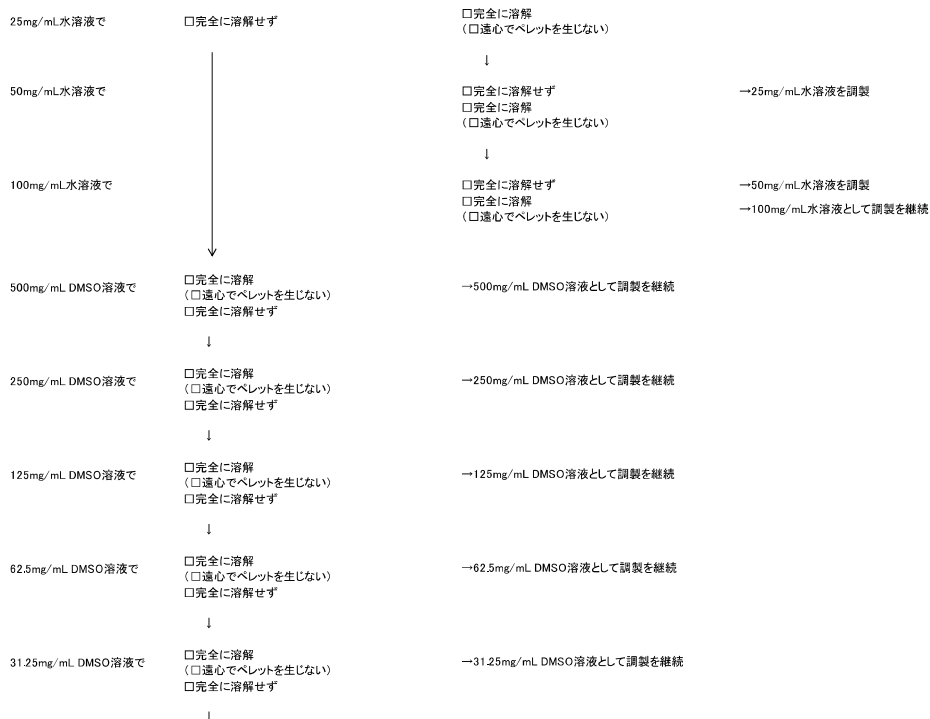
実験名 MITA バリデーション研究 \_\_\_\_\_

実験日 \_\_\_\_\_

施設名 \_\_\_\_\_

被試験試薬コード \_\_\_\_\_ 回目 \_\_\_\_\_

被試験試薬の調製① (溶媒への溶解)



Appendix 2 : MITA 記録用紙 Ver. 005J 20181203

被試験試薬の調製 (ddw)シート

実験名 MITA バリデーション研究

実験日 \_\_\_\_\_

施設名 \_\_\_\_\_

被試験試薬コード \_\_\_\_\_ 1 2 3 4 5 回目

Distilled water溶液に調製された場合

1st experimentまたは2nd experimentより決定された調整濃度  
(最終濃度が、IL-SLR-LA ≤ 0.05となる最も低い濃度の1段階高い(2倍の)濃度になるように設定、  
その50倍の濃度のDistilled water溶液を調整する。データシートのface sheetに算出されます) \_\_\_\_\_ mg/mL

試験液の調製と細胞への処理

被試験試薬 \_\_\_\_\_ mgをDistilled waterに溶解し \_\_\_\_\_ mLとする。 → \_\_\_\_\_ mg/mL 調製時間 ( : )  
さらにDistilled waterで \_\_\_\_\_ 倍希釈する → \_\_\_\_\_ mg/ml

96 well clear plate(丸底)に下図のようにDistilled water、被試験試薬Distilled water溶液を分注する。

丸底・透明	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	被試験試薬水溶液 100uL
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

well#A11から#A3までDistilled waterで公比2で段階希釈を9段階おこなう。

アッセイブロックにB培地480 μLを分注し、上図の希釈液を20 μL添加して25倍希釈し、これを50 μL/wellずつ細胞に添加する。 添加時間 ( : )

プレートをシールし、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。 □

賦活剤(LPS)の調製と細胞への処理

1 mg/mL LPSストックをDistilled waterで200倍希釈し5 μg/mL溶液を作製する。(1 mg/mL LPSストック 5 μL + Distilled water 995 μL) □

5 μg/mL LPS溶液をDistilled waterで5倍希釈し1000 ng/mL LPS溶液を作製する。(5 μg/mL LPS溶液 250 μL + Distilled water 1000 μL) □

Distilled waterを#C1-#F1、1000 ng/mL LPS溶液を#C2-#F12に10 μLずつ分注する。 添加時間 ( : )

プレートをシールし、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。

測定(被試験物質)

Tripluc® Luciferase assay reagentを溶解させる。 □

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チャンネルビベ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。 添加時間 ( : )

Tripluc添加後、プレートシェーカーを使用して室温(23-27 °C)で10分間(30分間まで可)攪拌し、細胞を溶解させる。 □ 攪拌中温度 ( °C)

ルミノメータでLuciferase活性を測定する。(測定中温度が26-31°Cであることを確認する。) □ 測定時間 ( : )  
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の場合はF0、F2を使用) 測定中温度 ( °C)

Appendix 2 : MITA 記録用紙 Ver. 005J 20181203

被試験試薬の調製 (DMSO)シート

実験名 MITA バリデーション研究 \_\_\_\_\_

実験日 \_\_\_\_\_

施設名 \_\_\_\_\_

被試験試薬コード \_\_\_\_\_ 1 2 3 4 5 \_\_\_\_\_ 回目

DMSO溶液に調製された場合

1st experimentまたは2nd experimentより決定された調整濃度  
(最終濃度が、IL-SLR-LA ≤ 0.05となる最も低い濃度の1段階高い(2倍の)濃度になるように設定、  
その1000倍の濃度のDMSO溶液を調整する。データシートのface sheetに算出されます) \_\_\_\_\_ mg/mL

試験液の調製と細胞への処理

被試験試薬 \_\_\_\_\_ mgをDMSOに溶解し \_\_\_\_\_ mLとする。 → \_\_\_\_\_ mg/mL  
さらにDMSOで \_\_\_\_\_ 倍希釈する → \_\_\_\_\_ mg/ml 調製時間  
( : )

96 well clear plate (丸底)に下図のようにDMSO、B培地、被試験試薬DMSO溶液を分注する。

丸底・透明	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO 50uL	DMSO 50uL	DMSO 50uL	DMSO 50uL	DMSO 50uL	DMSO 50uL	DMSO 50uL	DMSO 50uL	DMSO 50uL	DMSO 50uL	DMSO 50uL	被試験試薬 DMSO溶液 100uL
B	B培地 90uL	B培地 90uL	B培地 90uL	B培地 90uL	B培地 90uL	B培地 90uL	B培地 90uL	B培地 90uL	B培地 90uL	B培地 90uL	B培地 90uL	B培地 90uL
C												
D												
E												
F												
G												
H												

well#A11から#A3までDMSOで公比2で段階希釈を9段階おこなう。 □

段階希釈した被試験試薬DMSO溶液 10 μL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90 μLにうつつ10倍に希釈する。 □  
希釈した段階での沈殿の有無、性状

#B1	#B2	#B3	#B4	#B5	#B6	#B7	#B8	#B9	#B10	#B11	#B12
有口無口	有口無口	有口無口	有口無口	有口無口	有口無口	有口無口	有口無口	有口無口	有口無口	有口無口	有口無口

沈殿の性状 (例: 粉状、泥状、膜状、ミセル様) \_\_\_\_\_

アッセイブロックにB培地490 μLを分注し、上図の希釈液を10 μL添加して50倍希釈し、これを50 μL/wellずつ細胞に添加する。 □ 添加時間  
( : )

プレートにシールし、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。 □

賦活剤(LPS)の調製と細胞への処理

1 mg/mL LPSストックをDistilled waterで200倍希釈し5 μg/mL溶液を調製する。(1 mg/mL LPSストック 5 μL + Distilled water 995 μL) □

5 μg/mL LPS溶液をDistilled waterで5倍希釈し1000 ng/mL LPS溶液を調製する。(5 μg/mL LPS溶液 250 μL + Distilled water 1000 μL) □

Distilled waterを#C1-#F1、1000 ng/mL LPS溶液を#C2-#F12に10 μLずつ分注する。 □ 添加時間  
( : )

プレートにシールし、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。

測定(被試験物質)

Tripluc® Luciferase assay reagentを溶解させる。 □

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。 □ 添加時間  
( : )

Tripluc添加後、プレートシェーカーを使用して室温(23-27 °C)で10分間(30分間まで可)攪拌し、  
細胞を溶解させる。 □ 攪拌中温度  
( °C)

ルミノメータでLuciferase活性を測定する。(測定中温度が26-31°Cであることを確認する。)  
フィルタ無し、フィルタ有り各々3秒/well測定する(アトー社製Pheliosの場合はF0、F2を使用)。 □ 測定時間  
( : )  
測定中温度  
( °C)

Appendix 2 : MITA 記録用紙 Ver. 005J 20181203  
 被試験試薬の調製 (コントロール)シート

実験名 MITA バリデーション研究 \_\_\_\_\_

実験日 \_\_\_\_\_

施設名 \_\_\_\_\_

被試験試薬コード \_\_\_\_\_ 回目

コントロールの調製と細胞への処理

dexamethasone (DEX)の調製

96 well clear plate(丸底)に下図のようにDMSO 50  $\mu$ L (#A1, #A2)、DEX 10 mg/mL DMSO溶液 50  $\mu$ L (#A3)、DEX 50 mg/mL DMSO溶液 50 mL (#A4)、DEX 100 mg/mL DMSO溶液 50 mL (#A5)、B培地 90  $\mu$ L (#B1-5)を分注する。

添加時間  
( : )

丸底・透明	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO 50 $\mu$ L	DMSO 50 $\mu$ L	DEX 10 mg/mL DMSO溶液 50 $\mu$ L	DEX 50 mg/mL DMSO溶液 50 $\mu$ L	DEX 100 mg/mL DMSO溶液 50 $\mu$ L							
B	B培地 90 $\mu$ L	B培地 90 $\mu$ L	B培地 90 $\mu$ L	B培地 90 $\mu$ L	B培地 90 $\mu$ L							
C												
D												
E												
F												
G												
H												

#A1-2のDMSOと#A3-5のDEX DMSO溶液 10  $\mu$ Lを下下のB培地90  $\mu$ Lにうつつ10倍に希釈する。

アッセイブロックの#A1-5にB培地490  $\mu$ Lを分注し、上図の希釈液を10  $\mu$ L添加して混合し、50  $\mu$ L/wellずつ細胞に添加する。

添加時間  
( : )

プレートにシールし、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。

賦活剤(LPS)の調製と細胞への処理

1 mg/mL LPSストックをDistilled waterで200倍希釈し5  $\mu$ g/mL溶液を作製する。(1 mg/mL LPSストック 5  $\mu$ L + Distilled water 995  $\mu$ L)

5  $\mu$ g/mL LPS溶液をDistilled waterで5倍希釈し1000 ng/mL LPS溶液を作製する。(5  $\mu$ g/mL LPS溶液 250  $\mu$ L + Distilled water 1000  $\mu$ L)

添加時間  
( : )

Distilled waterを#A1-#D1、1000 ng/mL LPS溶液を#A2-#D5に10  $\mu$ Lずつ分注する。

プレートにシールし、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。

測定(被試験物質)

Tripluc® Luciferase assay reagentを溶解させる。

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。

添加時間  
( : )

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  $\mu$ 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(23-27  $^{\circ}$ C)で10分間(30分間まで可)攪拌し、細胞を溶解させる。

攪拌中温度  
(  $^{\circ}$ C)

ルミノメータでLuciferase活性を測定する。(測定中温度が26-31 $^{\circ}$ Cであることを確認する。) 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の場合はF0、F2を使用)。

測定時間  
( : )  
測定中温度  
(  $^{\circ}$ C)