

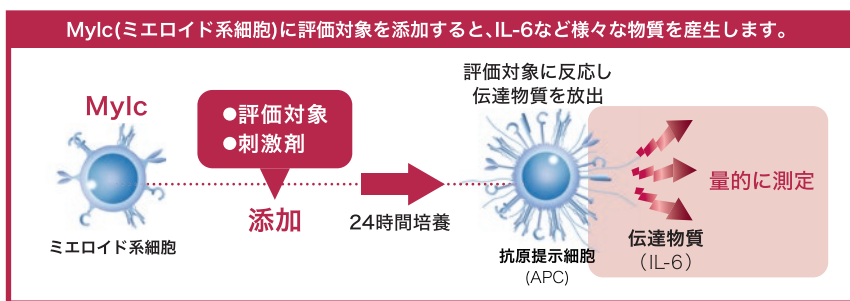
Mylcを使った各種評価を、どこでも手軽に。

# 評価用キット <研究用> Mylc ELISA (human IL-6) Kit Version 2.0

Version2.0ではiPS細胞より生体に近い状態での評価をしたいとの声に答え、PBMCからMylc細胞を作製しました。被験物質のヒトミエロイド系細胞(Mylc細胞)に対する炎症性サイトカイン産生をキット開封後、わずか1日で評価できます。

## 評価原理

被験物質を添加した際に、Mylc細胞の表面にあるC型レクチン受容体(CLR)やトール様受容体(TLR)などに作用し、産生される炎症性サイトカイン(IL-6)を測定します。  
既存の細胞より低濃度から評価可能であることや、キット開封後1日で結果が得られることなどが特徴です。



## Mylc細胞とは？



※ PBMC由来のMylc細胞:aMylc iPS細胞由来のMylc細胞:iMylc

## 評価の手順

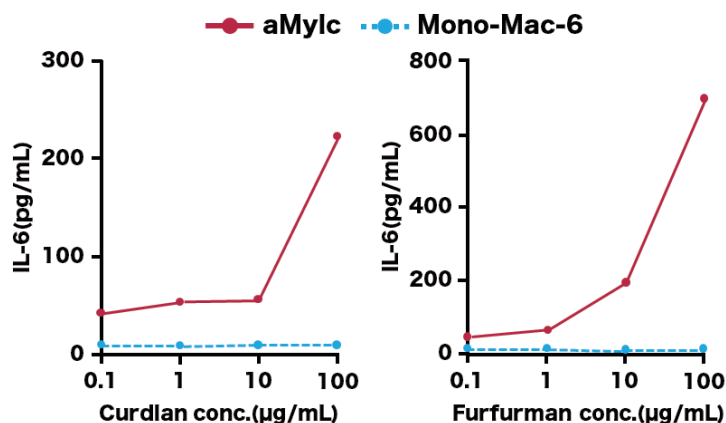


**Mylc細胞解凍** ウォーターバスにバイアルを浸し細胞を解凍します。  
**Mylc細胞調製** 遠心分離洗浄後、専用培養液に細胞を懸濁させます。  
**細胞播種** お手持ちの96well plateに一定数細胞を播種します。  
**評価物質添加** 評価対象とコントロール物質を添加し24時間培養します。  
**培養上清を回収** 各wellの培養上清を取り、キットの96wellに移します。  
**培養上清中IL-6の測定** ELISAキット添付の方法で呈色反応を測定します。

## 評価実験データ(CLR)

### CLR ligand刺激によるIL-6産生評価

C型レクチン受容体リガンドを、aMylc細胞とMono-Mac-6(ヒト急性単球性白血病由来細胞株)に添加した際のサイトカイン(IL-6)産生評価を実施しました。

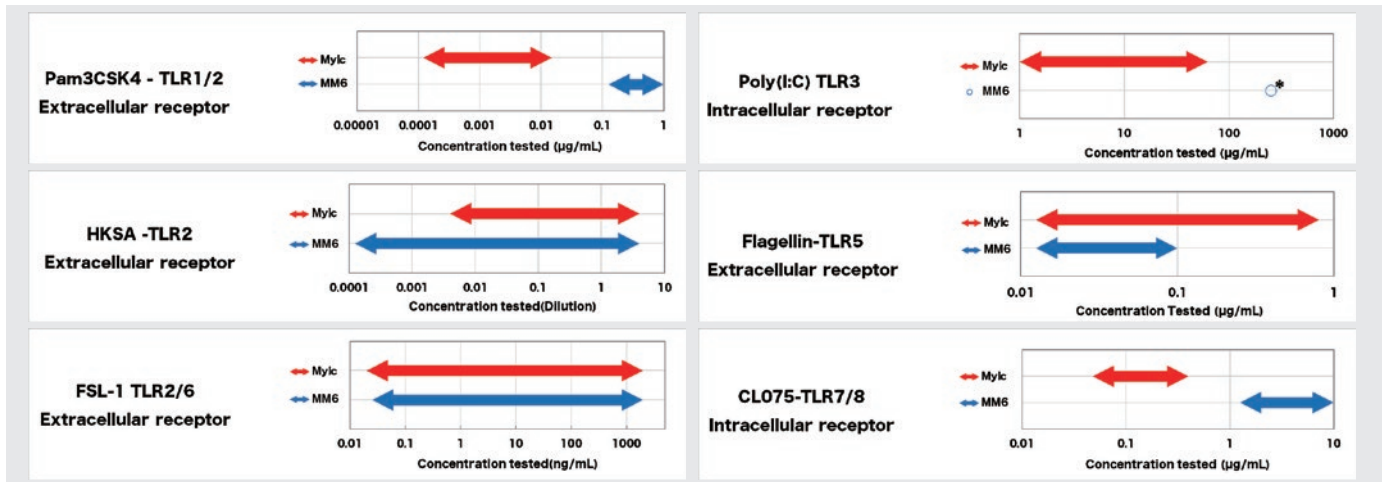


C型レクチン受容体として、Curdian (Dectin-1 agonist, Invivogen, #tlrl-curd)と Furfurman(Dectin-2 agonist, Invivogen #tlrl-ffm)をそれぞれの細胞に作用させ、24時間後のサイトカイン(IL-6)の産性能を評価しました。  
aMylc細胞は、Dectin受容体に作用するCurdian及びFurfurmanに10ug/mL程度から反応し、IL-6を産生しました。一方でMono-Mac-6は100ug/mL添加した場合においても全く反応せず、IL-6を産生しませんでした。

## 評価実験データ(TLR)

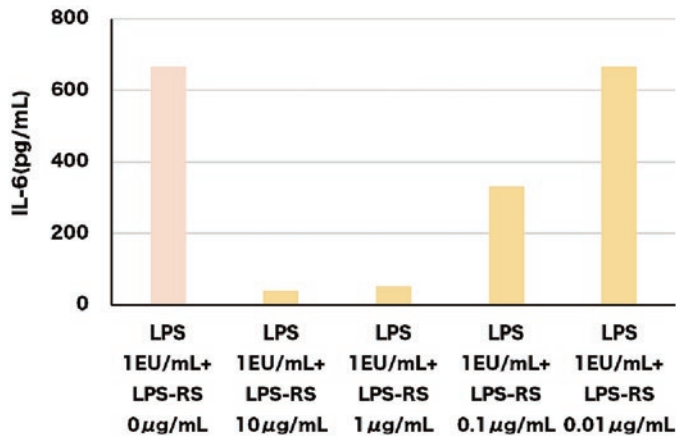
### Mono-Mac-6との比較実験

aMycとMono-Mac-6に6種類の発熱物質の希釈系列を作り添加し、IL-6の産生量を比較しました。各発熱物質の濃度に対する刺激への応答性をグラフにしています。下記グラフにある\*は最高濃度でも刺激への応答がなかったことを意味します。



### TLR4 ligandに対するantagonistの影響

aMyc細胞にTLR4 ligand (LPS)とTLR antagonistを添加してIL-6の産生を確認しました。



aMyc細胞には、様々なトール様受容体(TLR)及び、C-タイプレクチン受容体(CLR)などを発現しています。また物質がこれらの受容体に作用することで、種々のサイトカインが産生します。左に具体例としてTLR4のリガンドであるLPS(リポ多糖類)と、TLR4拮抗剤であるLPS-RSを使用した評価について記載しました。

1. Myc細胞はLPSの刺激により低濃度から炎症性サイトカイン(IL-6)の産生が確認できました。
2. LPS濃度1EU/mLでは、添加24時間後の培養上清中に600pg/mL以上のIL-6産生が確認できました。
3. 本条件において、TLR4拮抗薬であるLPS-RS濃度を変化させ前処理し、評価を実施しました。
4. その結果、用量依存的にTLR4が阻害されサイトカイン産生の減少が確認できました。
5. 特に、LPS-RSの濃度が1 µg/mL以上の場合IL-6産生がほとんど阻害されることが判明しました。

このようにサイトカイン産生量を指標にMyc細胞を用いた被験薬評価に使用できます。

#### 実証実験の条件

- ①96ウェルプレートにaMyc細胞(1 x 10<sup>4</sup> cells/well)を調製。
- ②LPSを200µL中に終濃度1EUとなるように培養液で希釈して調製。
- ③LPS-RS終濃度0µg/mL、0.01 µg/mL、0.1 µg/mL、1 µg/mL、10 µg/mLの5種類を培地で希釈して作成。
- ④細胞1 x 10<sup>4</sup> cells/100 µL/well播種。
- ⑤各wellに培地を70 µL添加。
- ⑥各wellに③で調製したLPS-RSの希釈系列を20 µL添加。
- ⑦各wellに②で調製したLPSを10 µL添加。
- ⑧24時間後の上清を用いてIL-6を測定

#### キット概要

血 球 細 胞 : Myc細胞(保存培養液で凍結、スクリーバイアル1本)  
 専 用 培 養 液 : Myc細胞測定評価専用培養液(冷凍製品、100mLボトル1本)  
 刺 激 剤 : コントロール刺激用NISO<sub>4</sub>溶液(冷凍、バイアル1本)  
 測 定 試 薬 : 上清中産生IL-6 測定用ELISAキット  
 培養用フラスコ : T25フラスコ1点

※以下の機器・用具はお客様でご用意ください。  
 滅菌遠心チューブ / ピペットおよびピペットチップ類 / 培養用96well-plate  
 遠心機、CO<sub>2</sub>インキュベーター / その他個別に必要な器材・用具

### 京都大学との 共同研究ラボで評価・研究

京都大学が、シーズ及び知的財産を活用した新事業創出を目指す「京大桂ベンチャープラザ」に本社および研究ラボを構えています。

\*正式名称: 京都大学連携型起業家育成施設

- ウィルス研究用無刺戟樹状細胞(第2号製品)の特許出願 ● 京都産業21「エコニック・ガーデンニング事業」選出
- 京都商工会議所「知恵の経営」選出(2018年) ● 大阪大学VC等シリーズA 1.27億円調達(2019年)



### マイキャン・テクノロジーズ 株式会社

〒615-8245 京都市西京区御陵大原1-36 京大桂ベンチャープラザ

☎ 075-381-3008

🌐 <https://micantechnologies.com>

✉ [info2@micantechnologies.com](mailto:info2@micantechnologies.com)

**MiCAN**  
Technologies