



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I493036 B

(45)公告日：中華民國 104 (2015) 年 07 月 21 日

(21)申請案號：102147888

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 12 月 24 日

(51)Int. Cl. : C12N5/07 (2010.01)

C12N15/79 (2006.01)

(71)申請人：財團法人工業技術研究院(中華民國) INDUSTRIAL TECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE (TW)

新竹縣竹東鎮中興路 4 段 195 號

(72)發明人：賴惠敏 LAI, HUEY MIN (TW)；郭宗鏗 KUO, ZONG KENG (TW)；江彭笙 CHIANG, WEN SHENG (TW)；曾湘文 TSENG, HSIANG WEN (TW)

(74)代理人：洪澄文；顏錦順

(83)生物材料寄存：

食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 BCRC 960475 2013 年 12 月 04 日

(56)參考文獻：

Wang N et. al., "Constitutive activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma suppresses pro-inflammatory adhesion molecules in human vascular endothelial cells", The Journal of Biological Chemistry, vol.277, no.37, p.34176-34181, 2002/09/13

Benard C et. al., "Degraded carrageenan causing colitis in rats induces TNF secretion and ICAM-1 upregulation in monocytes through NF-kB activation", PLoS ONE, vol.5, no.1, e8666, p.1-10, 2010/01/13

NCBI GenBank accession no.U09360, 1994/05/19

NCBI GenBank accession no.EU372000, 2008/05/27

審查人員：施雅儀

申請專利範圍項數：24 項 圖式數：3 共 41 頁

(54)名稱

含一 CD 5 4 表現之報導系統之免疫細胞的應用以及一經選殖之新穎細胞

APPLICATIONS OF AN IMMUNOCYTE CONTAINING A REPORTER SYSTEM FOR CD54 EXPRESSION AND A NOVEL CLONED CELL

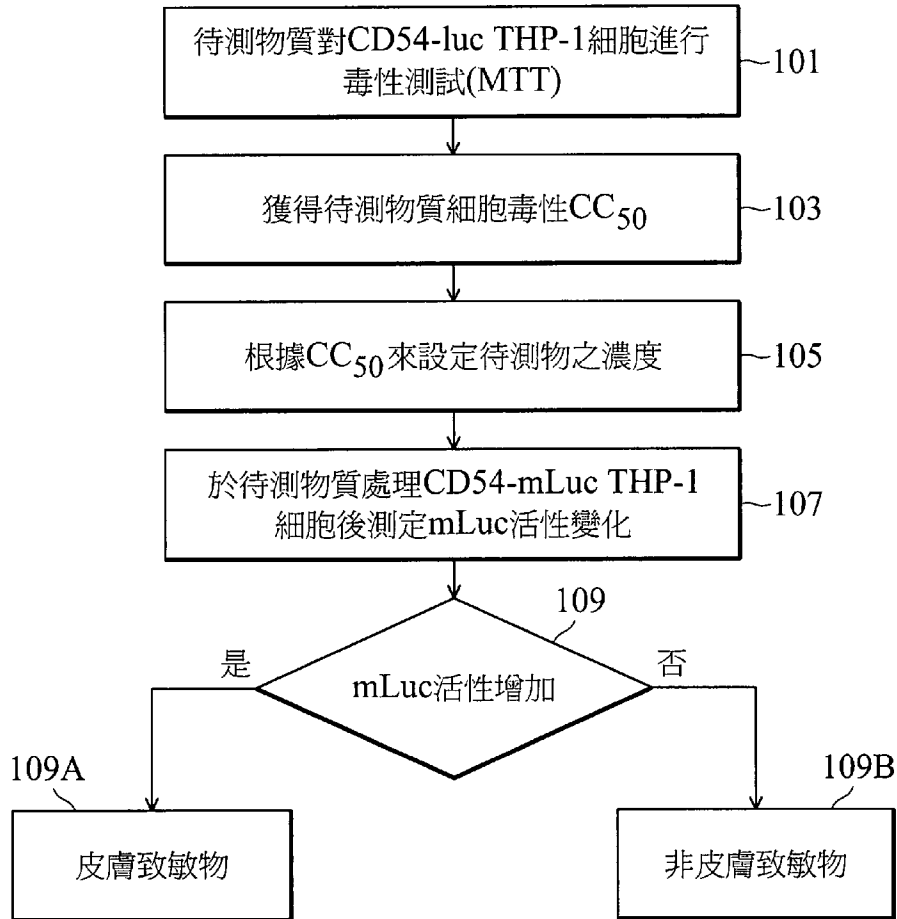
(57)摘要

本發明提供一種確認一免疫調節物質的方法，包括：(a)提供一待測物與一免疫細胞，其中該免疫細胞包括一 CD54 表現之報導系統，而該 CD54 表現之報導系統，包括：一 CD54 基因之啟動子；以及一報導基因，與該 CD54 基因之啟動子連接，用以報導該 CD54 基因之啟動子的表現；(b)以該待測物處理該免疫細胞；以及(c)測定經該待測物處理之該免疫細胞所產生之該報導基因的產物表現以判定該待測物是否有免疫調節作用。

The invention provides a method for identifying an immune modulator, including: (a) providing a sample to be tested and an immunocyte, wherein the immunocyte includes a reporter system for CD54 expression, and the reporter system for CD54 expression includes: a CD54 gene promoter; and a reporter gene connected

to the CD54 gene promoter, for reporting the expression the expression of the CD54 gene promoter; (b) treating the immunocyte with the sample to be tested; and (c) determining the expression of the product of the reporter gene produced by the immunocyte treated with the sample to be tested to determine whether the sample to be tested is an immune modulator or not.

101、103、105、
107、109、109A、
109B . . . 步驟



第 2 圖

發明摘要

C12N 5/07 (2010.01)

※ 申請案號： 102147888

C12N 15/79 (2006.01)

※ 申請日： 102.12.24

※IPC 分類：

【發明名稱】 含一CD54表現之報導系統之免疫細胞的應用以及一經選殖之新穎細胞

Applications of an immunocyte containing a reporter system for CD54 expression and a novel cloned cell

【中文】

本發明提供一種確認一免疫調節物質的方法，包括：(a) 提供一待測物與一免疫細胞，其中該免疫細胞包括一CD54表現之報導系統，而該CD54表現之報導系統，包括：一CD54基因之啓動子；以及一報導基因，與該CD54基因之啓動子連接，用以報導該CD54基因之啓動子的表現；(b) 以該待測物處理該免疫細胞；以及(c) 測定經該待測物處理之該免疫細胞所產生之該報導基因的產物表現以判定該待測物是否有免疫調節作用。

【英文】

The invention provides a method for identifying an immune modulator, including: (a) providing a sample to be tested and an immunocyte, wherein the immunocyte includes a reporter system for CD54 expression, and the reporter system for CD54 expression includes: a CD54 gene promoter; and a reporter gene

connected to the CD54 gene promoter, for reporting the
expression the expression of the CD54 gene promoter; (b)
treating the immunocyte with the sample to be tested; and (c)
determining the expression of the product of the reporter gene
produced by the immunocyte treated with the sample to be
tested to determine whether the sample to be tested is an
immune modulator or not.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 2 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

101、103、105、107、109、109A、109B~步驟。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】 含一CD54表現之報導系統之免疫細胞的應用以及一經選殖之新穎細胞

Applications of an immunocyte containing a reporter system for CD54 expression and a novel cloned cell

【技術領域】

【0001】 本發明關於含一CD54表現之報導系統之免疫細胞的應用，且特別關於將此含一CD54表現之報導系統之免疫細胞應用於確認一免疫調節物質的方法。

【先前技術】

【0002】 CD54 (分化簇54(Cluster of Differentiation 54)) (也已知為細胞間黏附分子-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1, ICAM-1))，其為於人類體中由*ICAM1*基因所編碼出之蛋白質。此基因編碼出一通常表現於內皮細胞(endothelial cells)與免疫系統之細胞上的細胞表面醣蛋白(glycoprotein)。CD54與CD11a / CD18型(type)，或CD11b / CD18型之整合蛋白(integrins)結合，且也被鼻病毒(rhinovirus)利用為一受體(receptor)。目前已知CD54為免疫反應，特別是過敏反應的一生物標記。

【0003】 免疫反應在許多疾病皆扮演重要的角色，例如發炎反應，皮膚敏感性等等，因此許多藥物皆針對調節免疫系統進行開發。但是免疫系統所涉及的生物分子及細胞種類繁多，因此常需要以活體動物實驗以進行實驗評估，而造成時間及成

本增加。雖然目前已有許多的細胞實驗模型可以進行調節免疫反應的測試，然而，其在分析上常需要以ELISA或流式細胞儀來進行實驗，也較平常生物實驗複雜。

【0004】 又，致敏性是化粧品、各種化學品、農產品、環境毒物、工業製品等產品上市前的重要安全性評估項目。順應動物實驗倫理及減量的趨勢，歐美日各國的研究機構和相關企業公司均投入相當大的資源於替代性動物實驗方法的開發，但目前在國際上仍未出現公認可以取代動物實驗的替代方式。

【0005】 因此，目前亟需發展不須動物實驗之確認免疫調節物質或致敏物質的新方法以適合高通量測試使用。

【發明內容】

【0006】 本發明提供一種確認一免疫調節物質的方法，包括：(a) 提供一待測物與一免疫細胞，其中該免疫細胞包括一CD54表現之報導系統，而該CD54表現之報導系統，包括：一CD54基因之啟動子；以及一報導基因，與該CD54基因之啟動子連接，用以報導該CD54基因之啟動子的表現；(b) 以該待測物處理該免疫細胞；以及(c) 測定經該待測物處理之該免疫細胞所產生之該報導基因的產物表現以判定該待測物是否有免疫調節作用。

【0007】 本發明也提供一種確認一皮膚致敏物質的方法，包括：(a) 提供一待測物與一免疫細胞，其中該免疫細胞包括一CD54表現之報導系統，而該CD54表現之報導系統，包括：一CD54基因之啟動子；以及一報導基因，與該CD54基因之啟動子連接，用以報導該CD54基因之啟動子的表現；(b) 以該待

測物處理該免疫細胞；以及(c) 測定經該待測物處理之該免疫細胞所產生之該報導基因的產物表現以判定該待測物是否為一皮膚致敏物質。

【0008】 本發明更提供一種經選殖之新穎細胞，其係於102年12月04日寄存於中華民國食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心，寄存編號為BCRC No. 960475。

【0009】 因此本發明提供了不須動物實驗之確認免疫調節物質或皮膚致敏物質的新方法以適合高通量測試使用，開發出替代動物實驗的方法，符合相關動物實驗倫理及減量的趨勢。

【圖式簡單說明】

【0010】

第1圖顯示本發明一實施例之CD54-啟動子mLuc表現系統。
第2圖顯示本發明一實施例之判定待測物質是否為皮膚致敏物的流程。以及
第3圖顯示本發明一實施例之判定待測物質是否為抗發炎物質的流程。

【實施方式】

【0011】 在本發明一實施態樣中，本發明提供一種確認一免疫調節物質的方法。本發明之確認一免疫調節物質的方法，可包括，但不限於下列所述步驟。

【0012】 首先，提供一待測物與包括一CD54表現之報導系統的一免疫細胞。

【0013】 上述待測物之例子可包括，例如，化妝品、藥物、化學物、天然物之萃取物等，但不限於此。而上述免疫細胞之

來源的例子則可包括，但不限於 THP-1 細胞、U937 細胞、MUTZ-3 細胞等。在一實施例中，而上述免疫細胞之來源為 THP-1 細胞。

【0014】 上述免疫細胞之 CD54 表現之報導系統，可包括，但不限於，一 CD54 基因之啓動子 (CD54 promoter) 與一報導基因 (reporter gene)，其中上述報導基因與上述 CD54 基因之啓動子連接，用以報導 CD54 基因之啓動子的表現。

【0015】 在一實施例中，上述 CD54 基因之啓動子之序列可包括序列辨識號：1 之序列，而在另一實施例中，上述 CD54 基因之啓動子之序列可為序列辨識號：1 之序列。

【0016】 再者，上述報導基因的例子可包括，但不限於長腹水蚤科冷光酵素 (Metridia luciferase) 基因、螢火蟲冷光酵素 (firefly luciferase) 基因、綠色螢光蛋白質 (green fluorescent protein, GFP) 基因、 β -葡萄糖醛酸苷酶 (β -glucuronidase) 基因等。在一實施例中，上述報導基因為長腹水蚤科冷光酵素基因。長腹水蚤科冷光酵素基因之產物會被細胞直接分泌至培養液，因此測定其表現（例如，活性）時，可直接將培養基進行冷光分析，不須將細胞打破，具有節省分析時間之優點。

【0017】 在一實施例中，上述 CD54 基因之啓動子之序列為序列辨識號：1 之序列，而上述免疫細胞之來源為 THP-1 細胞。在另一實施例中，上述 CD54 基因之啓動子之序列為序列辨識號：1 之序列，而上述報導基因為長腹水蚤科冷光酵素基因。又，在另一實施例中，上述 CD54 基因之啓動子之序列為序列辨識號：1 之序列，上述免疫細胞之來源為 THP-1 細胞，且上述

報導基因爲長腹水蚤科冷光酵素基因。

【0018】 於本發明之確認一免疫調節物質的方法的一實施例中，包含CD54基因之啓動子與報導基因之前述CD54表現報導系統的序列可包括序列辨識號：2之序列。在一特定實施例中，前述CD54表現報導系統的序列可爲序列辨識號：2之序列，即CD54表現報導系統爲CD54基因之啓動子-長腹水蚤科冷光酵素基因(CD54 promoter- *Metridia* Luc)之形式。而於此特定實施例中，所使用之包括CD54表現之報導系統的免疫細胞，可爲藉由將具有序列辨識號：2之序列的病毒載體感染進入一THP-1細胞所獲得的一細胞，而此細胞可以是一命名爲CD54-mLuc-THP-1之細胞，其於102年12月04日寄存於財團法人食品工業發展研究所，寄存號碼爲BCRC No. 960475。

【0019】 接著，以上述待測物處理上述包括CD54表現之報導系統的免疫細胞。在一實施例中，處理時間爲約1-2天，但不限於此。又，在一實施例中，在以上述待測物處理上述包括CD54表現之報導系統的免疫細胞之前，可先將待測物對此免疫細胞進行細胞毒性分析，測定出此待測物對此細胞之半生長抑制濃度，並藉此獲得處理濃度。

【0020】 然後，在以上述待測物處理上述包括CD54表現之報導系統的免疫細胞之後，測定經上述待測物處理之上述免疫細胞所產生之報導基因的產物表現以判定上述待測物是否有免疫調節作用。

【0021】 於本發明之確認一免疫調節物質的方法的一實施例中，在測定經上述待測物處理之免疫細胞所產生之報導基因

的產物表現以判定上述待測物是否有免疫調節作用的步驟中，係將經待測物處理之免疫細胞所產生之報導基因的產物表現與一未經待測物處理之上述免疫細胞之報導基因產物的表現作比較，以判定待測物是否具有免疫調節作用。若經待測物處理之免疫細胞所產生之報導基因的產物表現高於未經待測物處理之免疫細胞之報導基因產物的表現，則判定此待測物具有免疫調節作用，為一免疫調節物質。

【0022】 在於本發明之確認一免疫調節物質的方法的另一實施例中，在以待測物處理包括CD54表現之報導系統的免疫細胞的步驟中，進一步包含添加一免疫誘發物質，以使免疫細胞產生免疫反應。於此實施例中，在測定經待測物處理之免疫細胞所產生之報導基因的產物表現以判定上述待測物是否有免疫調節作用的步驟中，係將經待測物與免疫誘發物質處理之免疫細胞所產生之報導基因的產物表現與一僅經免疫誘發物質處理之免疫細胞之報導基因產物的表現作比較，以判定待測物是否有免疫調節作用。若經待測物與免疫誘發物質處理之免疫細胞所產生之報導基因的產物表現低於僅經免疫誘發物質處理之免疫細胞之報導基因產物的表現，則判定此待測物具有免疫抑制作用，為一免疫抑制物質。

【0023】 上述免疫反應誘發物質可包括任何可引起免疫反應的物質，例如脂多醣體 (lipopolysaccharide, LPS)、乙酸豆塞外佛波酯 (phorbol myristate acetate, PMA)、刀豆素 A (concanavalin A, Con A)等，但不限於此。

【0024】 在一實施例中，於本發明之確認一免疫調節物質

的方法中所使用之免疫反應誘發物質可為脂多醣體、乙酸豆塞外佛波酯或刀豆素A，其為一致發炎物質。

【0025】 於上述實施例中，在測定經待測物處理之免疫細胞所產生之報導基因的產物表現以判定上述待測物是否有免疫調節作用的步驟中，判定待測物是否有免疫調節作用，可包含判定待測物是否具抗發炎作用，以判定此待測物是否一抗發炎物質。

【0026】 測定上述免疫細胞所產生之報導基因的產物表現的方式，根據報導基因之產物的性質而定（例如可測其活性）。而不同報導基因的產物表現的測定方式，為該技術領域中具有通常知識者所熟知。例如，由於長腹水蚤科冷光酵素基因之產物會被細胞直接分泌至培養液，因此可直接將培養細胞之培養基進行冷光分析來測定長腹水蚤科冷光酵素基因之產物表現。

【0027】 在本發明另一實施態樣中，本發明還提供一種確認一皮膚致敏物質的方法，而本發明之確認一皮膚致敏物質的方法，可包括下列所述步驟，但不限於此。

【0028】 提供一待測物與包括一CD54表現之報導系統的一免疫細胞。

【0029】 待測物可為任何物質，並無特別限制。上述待測物之例子可包括，例如，化妝品、藥物、化學物、天然物之萃取物等，但不限於。而上述免疫細胞之來源的例子則可包括，THP-1細胞、U937細胞、MUTZ-3細胞等，但不限於此。在一實施例中，上述免疫細胞之來源為THP-1細胞。

【0030】 此外，上述免疫細胞所包含之CD54表現之報導系

統，可包括一CD54基因之啓動子與一報導基因，但不限於此，其中上述報導基因與上述CD54基因之啓動子連接，用以報導CD54基因之啓動子的表現。

【0031】 在一實施例中，上述CD54基因之啓動子之序列可包括序列辨識號：1之序列，而在另一實施例中，上述CD54基因之啓動子之序列可爲序列辨識號：1之序列。

【0032】 而相似於前述本發明之確認一免疫調節物質的方法中所使用之報導基因，本發明之確認一皮膚致敏物質的方法中之報導基因的例子可包括，但不限於長腹水蚤科冷光酵素基因、螢火蟲冷光酵素基因、綠色螢光蛋白質基因、 β -葡萄糖醛酸苷酶基因等。在一實施例中，上述報導基因爲長腹水蚤科冷光酵素基因。長腹水蚤科冷光酵素基因之產物會被細胞直接分泌至培養液，因此測定其表現（例如，活性）時，可直接將培養基進行冷光分析，不須將細胞打破，具有節省分析時間之優點。

【0033】 在一實施例中，上述CD54基因之啓動子之序列爲序列辨識號：1之序列，而上述免疫細胞之來源爲THP-1細胞。在另一實施例中，上述CD54基因之啓動子之序列爲序列辨識號：1之序列，而上述報導基因爲長腹水蚤科冷光酵素基因。又，在另一實施例中，上述CD54基因之啓動子之序列爲序列辨識號：1之序列，上述免疫細胞之來源爲THP-1細胞，且上述報導基因爲長腹水蚤科冷光酵素基因。

【0034】 於本發明之確認一皮膚致敏物質的方法的一實施例中，包含CD54基因之啓動子與報導基因之前述CD54表現報

導系統的序列可包括序列辨識號：2之序列。在一特定實施例中，前述CD54表現報導系統的序列可為序列辨識號：2之序列，即CD54表現報導系統為CD54基因之啓動子-長腹水蚤科冷光酵素基因(CD54 promoter- Metridia Luc)之形式。而於此特定實施例中，所使用之包括CD54表現之報導系統的免疫細胞，可為藉由將具有序列辨識號：2之序列的病毒載體感染進入一THP-1細胞所獲得的一細胞，而此細胞可以是一命名為CD54-mLuc-THP-1之細胞，其於102年12月04日寄存於財團法人食品工業發展研究所，寄存號碼為BCRC No. 960475。

【0035】 接著，以上述待測物處理上述包括CD54表現之報導系統的免疫細胞。在一實施例中，處理時間為約1-2天，但不限於此。

【0036】 又，在一實施例中，在以上述待測物處理上述包括CD54表現之報導系統的免疫細胞之前，可先將待測物對此免疫細胞進行細胞毒性分析，測定出此待測物對此細胞之半生長抑制濃度，並藉此獲得處理濃度。

【0037】 最後，在以上述待測物處理上述包括CD54表現之報導系統的免疫細胞之後，測定經上述待測物處理之上述免疫細胞所產生之報導基因的產物表現以判定上述待測物是否為一皮膚致敏物質。

【0038】 於一實施例中，在測定經上述待測物處理之上述免疫細胞所產生之報導基因的產物表現以判定上述待測物是否為一皮膚致敏物質的步驟中，係將經上述待測物處理之上述免疫細胞所產生之報導基因的產物表現與一未經上述待測物

處理之免疫細胞之報導基因產物的表現作比較，以判定上述待測物是否具有免疫調節作用。若經待測物處理之免疫細胞所產生之報導基因的產物表現高於未經待測物處理之免疫細胞之報導基因產物的表現，則判定此待測物為一皮膚致敏物質。

【0039】 測定上述免疫細胞所產生之報導基因的產物表現的方式，根據報導基因之產物的性質而定（例如可測其活性）。而不同報導基因的產物表現的測定方式，為該技術領域中具有通常知識者所熟知。例如，由於長腹水蚤科冷光酵素基因之產物會被細胞直接分泌至培養液，因此可直接將培養細胞之培養基進行冷光分析來測定長腹水蚤科冷光酵素基因之產物表現。

【0040】 此外，在本發明之又另一實施態樣中，本發明更提供一種經選殖之新穎細胞，命名為CD54-mLuc-THP-1，其係於102年12月04日寄存於財團法人食品工業發展研究所，寄存號碼為BCRC No. 960475。

【0041】 此細胞具有CD54基因之啓動子-長腹水蚤科冷光酵素基因(CD54 promoter- Metridia Luc)之形式的CD54表現報導系統，而CD54表現報導系統之序列為序列辨識號：2之序列。

【0042】 實施例

【0043】 實施例1

【0044】 建立CD54-mLuc-THP-1細胞

【0045】 依照LVX-MetLuc (Clontech, PT4422-5)質體的製造商操作指南，將LVX-MetLuc質體以BstB I及BamH I限制酵素處理，以使CD54啓動子序列（序列辨識號：1）轉殖至LVX-MetLuc質體中，以形成CD54-promoter mLuc表現系統（第

1圖)，其中於此表現系統中，CD54啟動子-mLuc之序列為序列辨識號：2之序列。之後將所形成之CD54-promoter mLuc表現系統利用 Lenti-X™Ready-To-Glow™ Secreted Luciferase Reporter System (Clontech, 631746)轉染至293FT細胞中以產生帶有CD54-mLuc的Lentivirus。接著以此病毒感染THP-1細胞。THP-1細胞係培養於THP-1培養液，其成分為RPMI培養液(GIBCO,31800)，內含10%FBS (GIBCO,10437)，4.5 g/L 葡萄糖(Sigma,G7021)，10 mM HEPES(Sigma,H4034)、1x盤尼西林(penicillin)與鏈黴素(streptomycin) (Biowest,L0022)、1 mM 丙酮酸鈉(sodium pyruvate) (Biowest,L0642)、0.05 mM 2-巰基乙醇(2-mercaptoethanol, 2-ME) (GIBCO,21985-023)。

【0046】 然後，以0.5~1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 嘌呤霉素(puromycin) (Invivogen, ant-pr-1)來對THP-1細胞進行篩選。篩選2周之後，再加入100 μL 帶有細胞之培養液(濃度：5細胞/ mL)至96孔盤(Corning Incorporation COSTAR, 3599)中，待細胞數增加之後，將細胞逐步利用24孔盤(Corning Incorporation COSTAR, 3516)、6孔盤(Corning Incorporation COSTAR, 3524)及T25 flask(Corning Incorporation COSTAR, 430639)放大。並將各細胞株以已知的致敏物(sensitizer) 1-氯-2,4-二硝基苯(1-chloro-2,4-dinitrobenzene, DNCB)以及非致敏物(non-sensitizer) 十六烷基三甲基溴化銨(hexadecyltrimethylammonium bromide, CTAB)進行測試，並挑選最佳反應的細胞株，將其命名為CD54-mLuc-THP-1，且於102年12月04日寄存於中華民國食品工業發展研究所生物資源保

存及研究中心，寄存編號為BCRC No. 960475。

【0047】 實施例2

【0048】 待測物質是否為皮膚致敏物（或免疫調節物質）的判定

【0049】 於本實驗中之判定待測物質是否為皮膚致敏物的流程如第2圖所示。參見第2圖與下方詳細步驟說明。

【0050】 1. 待測物對CD54-mLuc-THP-1細胞之毒性測試

【0051】 CD54-mLuc-THP-1細胞培養於THP-1培養液，其成分為RPMI培養液(GIBCO, 31800)，內含10%胎牛血清(GIBCO, 10437)、4.5 g/L葡萄糖(Sigma, G7021)、10 mM HEPES(Sigma, H4034)、1x 盤尼西林 (penicillin) 與鏈黴素 (streptomycin) (Biowest, L0022)、1 mM 丙酮酸鈉 (sodium pyruvate) (Biowest, L0642)、0.05 mM 2-巰基乙醇 (2-mercaptoethanol) (GIBCO, 21985-023)及0.5 µg/mL嘌呤霉素 (puromycin)。

【0052】 將表1中所列已知致敏性之參考化學樣品或表2中所列常見於化妝品中之中草藥萃取物，以適當之溶劑（DMSO或不含2-ME之THP-1培養液），溶解後形成儲備溶液 (stock solution)。接著將儲備溶液進行6~8次之3倍連續稀釋，以形成不同稀釋倍數之操作溶液 (working solution)。

【0053】 表1、已知皮膚致敏特性之參考化學物質

名稱	Cas	貨號	廠商	致敏性
咪唑烷基脲 (imidazolidinyl urea, IU)	39236-46-9	I5133	Sigma	+
1-氯-2,4-二硝基苯	97-00-7	237329	Sigma	+

(1-chloro-2,4-dinitrobenzene, DNCB)				
苯甲酸苯酯 (phenyl benzoate, PB)	93-99-2	B22986	Sigma	+
丁香酚 (eugenol, EU)	97-53-0	A14332	Sigma	+
2-巯苯并噻唑 (2-mercaptobenzothiazole, MBT)	149-30-4	149-30-4	Sigma	+
水楊酸 (salicylic acid, SA)	69-72-7	other	Sigma	-
十六烷基三甲基溴化銨 (hexadecyltrimethylammonium bromide, CTAB)	57-09-0	other	Sigma	-

【0054】 表2、常用於化妝品之中草藥萃取物

名稱	萃取方式
紅蔘	95% 乙醇熱萃
丁香	95% 乙醇熱萃

【0055】 接著進行細胞毒性測試（步驟101）。將10 μ L/孔之操作溶液添加至96孔盤中。接著將CD54-mLuc-THP-1細胞懸浮在不含2-ME及嘌呤霉素的THP-1培養液中，之後並以 5×10^4 個細胞/90 μ L/孔的密度接種於上述96孔細胞培養盤中。然後將培養盤置於細胞培養箱(NUAIR nu-5510)並培養1天。需注意的是，若待測物溶於DMSO，則需將最終待測物與細胞接觸時之培養液中的DMSO濃度控制於0.2%。

【0056】 然後，將10 μ L之5 mg/mL MTT的培養液加入培養盤中，並置於二氧化碳細胞培養箱中培養2小時。接著，將100 μ L之10% SDS加至培養盤並靜置隔夜。然後將紫色沉澱溶解，並以連續波長微孔盤分析系統 (Molecular Devices, SPECTRAMAX 5)中，測定細胞於560 nm波長的吸光值。

【0057】 以對照組之平均吸光值代表100%之細胞的存活率(%)，來計算加入各種不同濃度之樣品之實驗組細胞的存活率(%)。細胞存活率計算公式為： $(\text{實驗組吸光值}/\text{對照組吸光值}) \times 100\%$ 。並計算各濃度測試物的細胞生長抑制率，細胞生長抑制率計算公式為： $1 - \text{細胞存活率}$ 。

【0058】 之後，以各實驗組之細胞生長抑制率作xy散佈圖，並利用Grafit軟體以 IC_{50} 方程式求得各待測物之50%細胞生長抑制的樣品濃度(CC_{50}) (步驟103)。

【0059】 若藥物會干擾MTT的顏色判讀，則改用Cell-Glo kit進行細胞毒性測試。步驟如下：

【0060】 將35 μ L之細胞液添加至冷光用之96孔白盤，之後將35 μ L之Cell-Glo kit(Promega, G7571)加入上述96孔白盤，且將白盤置於震盪器震盪10分鐘。然後，將受質添加至上述96孔白盤中，並立即以微盤冷光儀(Berthold, MPL4)來測量細胞所產生之冷光強度(Rlu/s)，作為當次實驗之各濃度測試物細胞毒性參考值。

【0061】 細胞存活率計算公式為： $(\text{實驗組冷光值}/\text{對照組冷光值}) \times 100\%$ 。並計算各濃度測試物的細胞生長抑制率，細胞生長抑制率計算公式為： $(1 - \text{細胞存活率})$ 。

【0062】 並以各實驗組之細胞生長抑制率作 xy 散佈圖，並利用 Grafit 軟體以 IC_{50} 方程式求得各待測物之 50% 細胞生長抑制的濃度 (CC_{50})。

【0063】 後續實驗中將選擇各待測物的 $CC_{50} \pm 25\%$ 作為 CD54-mLuc-THP-1 細胞之 mLuc 冷光活性之參考測試起始濃度。

【0064】 若第一次實驗無法測得準確之 CC_{50} ，則參考實驗結果改變待測物濃度及稀釋倍率。以取得最佳趨勢線以求得 CC_{50} 。

【0065】 而所測得之各待測物之 50% 細胞生長抑制的濃度如表 3 所示。

【0066】 表 3、上述各待測物之 50% 細胞生長抑制的濃度

名稱	$CC_{50}(\mu M)$
咪唑烷基脲 (imidazolidinyl urea, IU)	83.28
1-氯-2,4-二硝基苯 (1-chloro-2,4-dinitrobenzene, DNCB)	6.79
苯甲酸苯酯 (phenyl benzoate, PB)	1026.92
丁香酚 (eugenol, EU)	762.79
2-巯苯并噻唑 (2-mercaptobenzothiazole, MBT)	941.03
水楊酸 (salicylic acid, SA)	>4000
十六烷基三甲基溴化銨 (hexadecyltrimethylammonium bromide, CTAB)	3.60

名稱	CC ₅₀ (μg/mL)
紅 蔘	983.13
丁香	308.5

【0067】 2. 待測物對 CD54-mLuc-THP-1細胞之 m-Luc 活性影響測試

【0068】 依據上方所獲得之各待測物的 CC₅₀，來選擇各待測物之測試起始濃度（約 CC₅₀±25%濃度，若無法求得準確 CC₅₀，則以待測物最高可溶解濃度或是最終濃度 4000 μM 進行測試），並以此濃度來配製待測物之儲備溶液。之後將上述待測物之儲備溶液以 1.4 倍連續兩次稀釋成以形成另外兩個濃度之操作溶液，總共獲得 3 個濃度之溶液（步驟 105）。

【0069】 將 10 μL/孔之操作溶液添加至 96 孔盤中。接著將 CD54-mLuc-THP-1 細胞懸浮在不含 2-ME 及 嘌呤霉素的 THP-1 培養液中，之後並以 5×10⁴ 個細胞/90 μL/孔的密度接種於上述 96 孔細胞培養盤中。然後將培養盤置於細胞培養箱 (NUAIR nu-5510) 中培養 1 天，其中以 50 ng/mL 之脂多醣體 (lipopolysaccharide, LPS) 作為正對照組 (positive control)。需注意的是，若待測物溶於 DMSO，則需將最終待測物與細胞接觸時之培養液中的 DMSO 濃度控制於 0.2%。

【0070】 之後，從上述培養盤取出 10 μL 之細胞液並將其添加至冷光用之 96 孔白盤。接著，將 40 μL 之 Luciferase Assay 試劑 (GeneCopoeia, SPGA-G100) 添加至上述白盤，並立即以微盤

冷光儀(Berthold, MPL4)來測量細胞之冷光強度(Rlu/s) (步驟107)。

【0071】 以對照組的冷光強度為標準來計算各樣品實驗組之促進CD54啟動子活性之誘導率(induction rate)。誘導率(induction rate)的計算公式為：(實驗組冷光值/對照組冷光值)。若結果顯示一待測物促進mLuc表現，則判定此待測物為致敏物質(步驟109(含步驟109A與步驟109B))。上述各待測物所測得之促進CD54啟動子活性之誘導率的結果顯示於表4中，而判定各待測物是否為致敏物質之結果，則顯示於表5中。

【0072】 表4、各待測物所測得之促進CD54啟動子活性之誘導率

	IU (μM)		
	40.0	56.6	80.0
mLuc 活性變化 (倍數)	1.31 \pm 0.21	1.53 \pm 0.18	1.55 \pm 0.07
	DNCB (μM)		
	4.0	5.7	8.0
mLuc 活性變化 (倍數)	1.36 \pm 0.15	1.66 \pm 0.09	1.29 \pm 0.23
	PB (μM)		
	500.2	707.2	1000.0
mLuc 活性變化	0.88 \pm 0.06	1.06 \pm 0.18	0.9 \pm 0.06

(倍數)			
	EU (μM)		
	500.2	707.2	1000.0
mLuc 活性變化 (倍數)	1.51 ± 0.16	1.67 ± 0.25	1.5 ± 0.04
	MBT (μM)		
	500.2	707.2	1000.0
mLuc 活性變化 (倍數)	1.55 ± 0.07	1.43 ± 0.18	1.4 ± 0.11
	SA (μM)		
	2001	2829	4000
mLuc 活性變化 (倍數)	1 ± 0.18	0.98 ± 0.05	1.02 ± 0.22
	CTAB (μM)		
	2	2.82	4
mLuc 活性變化 (倍數)	0.72 ± 0.03	0.74 ± 0.08	0.66 ± 0.04
	紅蔘 ($\mu\text{g/mL}$)		
	500	707	1000
mLuc 活性變化 (倍數)	0.92 ± 0.18	0.99 ± 0.02	0.91 ± 0.14

	丁香 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	150	212	300
mLuc 活性變化 (倍數)	1.02 \pm 0.15	0.94 \pm 0.16	0.92 \pm 0.05

【0073】 表5、各待測物是否為致敏物質之判定結果

	皮膚致敏性
IU	+
DNCB	+
PB	-
EU	+
MBT	+
SA	-
CTAB	-
紅蔘	-
丁香	-

【0074】 此外，另將35 μL 之細胞液添加至冷光用之96孔白盤，之後將35 μL 之Cell-Glo kit (Promega, G7571)加入上述96孔白盤，且將白盤置於震盪器震盪10分鐘。然後，將受質添加至上述96孔白盤中，並立即以微盤冷光儀(Berthold, MPL4)來測量細胞所產生之冷光強度(Rlu/s)，作為當次實驗之各濃度測試物細胞毒性參考值。細胞存活率計算公式為：(實驗組冷光值/對照組冷光值) \times 100%。

【0075】 實施例 3

【0076】 待測物質是否為抗發炎物質（或免疫調節物質）的判定

【0077】 於本實驗中之判定待測物質是否為皮膚致敏物的流程如第3圖所示。參見第3圖與下方詳細步驟說明。

【0078】 1. 待測物對CD54-mLuc-THP-1細胞之毒性測試

【0079】 CD54-mLuc-THP-1細胞培養於THP-1培養液，其成分為RPMI培養液(GIBCO, 31800)，內含10%胎牛血清(GIBCO, 10437)、4.5 g/L葡萄糖(Sigma, G7021)、10 mM HEPES(Sigma, H4034)、1x 盤尼西林 (penicillin) 與鏈黴素 (streptomycin) (Biowest, L0022)、1 mM 丙酮酸鈉 (sodium pyruvate) (Biowest, L0642)、0.05 mM 2-巰基乙醇 (2-mercaptoethanol) (GIBCO, 21985-023)及0.5 µg/mL嘌呤霉素(puromycin)。

【0080】 將表6中所列已知具有抗發炎能力之待測物，以適當之溶劑（DMSO或不含2-ME之THP-1培養液），溶解後形成儲備溶液(stock solution)。接著將儲備溶液進行6~8次之3倍連續稀釋，以形成不同稀釋倍數之操作溶液(working solution)

【0081】 表6、已知具抗發炎活性之參考化學物質

名稱	Cas	貨號	廠商
小檗鹼 (Berberine)	2086-83-1	B3251	Sigma
薑黃素 (Curcumin)	458-37-7	C1386	Sigma
水飛薊素 (Silibinin)	22888-70-6	S0417	Sigma

【0082】 接著進行細胞毒性測試（步驟201）。將10 μL /孔之操作溶液添加至96孔盤中。接著將CD54-mLuc-THP-1細胞懸浮在不含2-ME及嘌呤霉素的THP-1培養液中，之後並以 5×10^4 個細胞/90 μL /孔的密度接種於上述96孔細胞培養盤中。然後將培養盤置於細胞培養箱(NUAIR nu-5510)並培養1天。需注意的是，若待測物溶於DMSO，則需將最終待測物與細胞接觸時之培養液中的DMSO濃度控制於0.2%。

【0083】 然後，將10 μl 之5 mg/mL MTT的培養液加入培養盤中，並置於二氧化碳細胞培養箱中培養2小時。接著，將100 μl 之10% SDS加至培養盤並靜置隔夜。然後將紫色沉澱溶解，並以連續波長微孔盤分析系統(Molecular Devices, SPECTRAMAX 5)中，測定細胞於560 nm波長的吸光值。

【0084】 以對照組之平均吸光值代表100%之細胞的存活率(%)，來計算加入各種不同濃度之樣品之實驗組細胞的存活率(%)。細胞存活率計算公式為： $(\text{實驗組吸光值} / \text{對照組吸光值}) \times 100\%$ 。並計算各濃度測試物的細胞生長抑制率，細胞生長抑制率計算公式為： $1 - \text{細胞存活率}$ 。

【0085】 之後，以各實驗組之細胞生長抑制率作xy散佈圖，並利用Grafit軟體以 IC_{50} 方程式求得各待測物之50%細胞生長抑制的樣品濃度(CC_{50})（步驟203）。

【0086】 若藥物會干擾MTT的顏色判讀，則改用Cell-Glo kit進行細胞毒性測試。步驟如下：

【0087】 將35 μL 之細胞液添加至冷光用之96孔白盤，之後將35 μL 之Cell-Glo kit(Promega, G7571)加入上述96孔白盤，且

將白盤置於震盪器震盪10分鐘。然後，將受質添加至上述96孔白盤中，並立即以微盤冷光儀(Berthold, MPL4)來測量細胞所產生之冷光強度(Rlu/s)，作為當次實驗之各濃度測試物細胞毒性參考值。

【0088】 細胞存活率計算公式為： $(\text{實驗組冷光值}/\text{對照組冷光值}) \times 100\%$ 。並計算各濃度測試物的細胞生長抑制率，細胞生長抑制率計算公式為： $(1-\text{細胞存活率})$ 。

【0089】 並以各實驗組之細胞生長抑制率作xy散佈圖，並利用Grafit軟體以 IC_{50} 方程式求得各待測物之50%細胞生長抑制的濃度(CC_{50})。

【0090】 後續實驗中將選擇各待測物的 $CC_{50} \pm 25\%$ 作為CD54-mLuc-THP-1細胞之mLuc冷光活性之參考測試起始濃度。

【0091】 若第一次實驗無法測得準確之 CC_{50} ，則參考實驗結果改變待測物濃度及稀釋倍率。以取得最佳趨勢線以求得 CC_{50} 。

【0092】 而所測得之各待測物之50%細胞生長抑制的濃度如表7所示。

【0093】 表7

名稱	CC_{50} (μM)	IC_{50} (μM)
小檗鹼(Berberine)	>25	4.7
薑黃素(Curcumin)	>50	11.36
水飛薊素(Silibinin)	>200	91.00

【0094】 2. 待測物對脂多醣體 (LPS) 誘發 CD54-mLuc-THP-1細胞之 m-Luc 活性影響測試

【0095】 依據上方所獲得之各待測物的 CC_{50} ，來選擇各待測物之測試起始濃度（約 $CC_{50} \pm 25\%$ 濃度，若無法求得準確 CC_{50} ，則以待測物最高可溶解濃度或是最終濃度 $4000 \mu\text{M}$ 進行測試），並以此濃度來配製待測物之儲備溶液。之後將上述待測物之儲備溶液以 2 倍連續三次稀釋成以形成另外三個濃度之操作溶液，總共獲得四個濃度之溶液（步驟 205）。

【0096】 將 $10 \mu\text{L}$ /孔之操作溶液以及 $10 \mu\text{L}$ 之 100 ng/mL 脂多醣體 (Sigma, L2880) 添加至 96 孔盤中。接著將 CD54-mLuc-THP-1 細胞懸浮在不含 2-ME 及嘌呤霉素的 THP-1 培養液中，之後並以 5×10^4 個細胞/ $80 \mu\text{L}$ /孔的密度接種於上述 96 孔細胞培養盤中。然後將培養盤置於細胞培養箱 (NUAIR nu-5510) 中培養 1 天。需注意的是，若待測物溶於 DMSO，則需將最終待測物與細胞接觸時之培養液中的 DMSO 濃度控制於 0.2%。

【0097】 之後，從上述培養盤取出 $10 \mu\text{L}$ 之細胞液並將其添加至冷光用之 96 孔白盤。接著，將 $40 \mu\text{L}$ 之 Luciferase Assay 試劑 (GeneCopoeia, SPGA-G100) 添加至上述白盤，並立即以微盤冷光儀 (Berthold, MPL4) 來測量細胞之冷光強度 (Rlu/s)。（步驟 207）。

【0098】 以對照組及脂多醣體誘導組的冷光活性為標準來計算各樣品待測物抑制脂多醣體誘發之 CD54 啟動子活性的抑制率 (inhibition rate)。抑制率 (induction rate) 的計算公式為：

(脂多醣體誘導組之冷光值-待測物共處理後之脂多醣體誘導之冷光值) / (脂多醣體誘導組之冷光值-未處理組之冷光值) x100%。若抑制率為正值，即代表該待測物具有抑制脂多醣體誘發之免疫反應(步驟209(含步驟209A與步驟209B))。

【0099】 之後以各實驗組之CD54啟動子活性的抑制率作xy散佈圖，並利用Grafit軟體以IC₅₀方程式求得各待測物之抑制50%脂多醣體誘發之mLuc活性的濃度(IC₅₀)，結果參見表7。

【符號說明】

【0100】

101、103、105、107、109、109A、109B、201、203、205、207、209、209A、209B~步驟。

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

中華民國食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心(Bioresource Collection and Research Center; BCRC)

102年12月04日

BCRC No. 960475

【序列表】

<110> 財團法人工業技術研究院

<120> 含一 CD54 表現之報導系統之免疫細胞的應用以及一經選殖之新穎細胞

<130> 0965-A24490-TW

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1323

<212> DNA

<213> 人類

<400> 1

gggaaatatg cgtctctgga tggccagtga ctgcgagccc cttccccga taggaagggc 60

ctgcgcgtcc ggggaccctt cgcttcccct tctgctgcgc gacctcctg gccctcgga 120

gatctccatg gcgacgccgc gcgcgccccca caacaggaaa gccttaggcg gcgcggcttg 180

gtgctcggag acttaagagt acccagcctc gacgtggtgg atgtcgagtc ttggggtcac 240

acgcacaggc ggtggccaag caaacacccg ctcatattta gtgcatgagc ctgggttcga 300

gttgccggag cctcgcgcgt agggcagggg ttcgagcgcc ctttctccct gcctcgcctc 360

tcgcctggg ggctgctgcc tcagtttccc agcgacaggc agggatttcg agcgtcccc 420

tcccctccct cgtcaagatc caagctagct gcctcagttt ccccgcgagg cctgggacgc 480

cagcggaggg gctcggcgcg tagggatcac gcagcttctt tcctttttct gggagctgta 540

aagacgcctc cgcggccaag gccgaaaggg gaagcgagga ggccgcccgg gtgagtgccc 600

tcgggtgtag agagaggacg ccgatttccc cggacgtggt gagaccgcg ctcgtcactc 660

ccacggttag cggtcgcccg gaggtgctg gctctgctct ggccgcttct cgagaaatgc 720

ccgtgtcagc taggtgtgga cgtgacctag ggggaggggc atccctcagt ggagggagcc 780

cggggaggat tcctgggccc ccaccaggc agggggctca tccactcgat taaagaggcc 840

tcgtaagct ggagagggag gacttgagtt cggaccccct cgcagcctgg agtctcagtt 900

taccgctttg tgaaatggac acaataacag tctccactct ccggggaagt tggcagtatt 960

taaaagtact taataaacgg cttagcgcgg tgtagaccgt gattcaagct tagcctggcc 1020

gggaaacggg aggcgtggag gccgggagca gccccgggg tcatcgcct gccaccgccg 1080

cccgattgct ttagcttgga aattccggag ctgaagcggc cagcgaggga ggatgaccct 1140

ctcggcccgg gcaccctgtc agtccggaaa taactgcagc atttgttccg gaggggaagg 1200

cgcgaggttt ccgggaaagc agcaccgcc cttggcccc aggtggctag cgctataaag 1260

gatcacgcgc ccagtcgac gctgagctcc tctgctactc agagttgcaa cctcagcctc 1320

gct 1323

<210> 2

<211> 2029

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CD54 表現報導系統

<400> 2

gggaaatatg cgtctctgga tggccagtga ctgcagccc cttccccga taggaagggc 60

ctgcgcgtcc ggggaccctt cgcttccctt tctgctgcgc gacctccctg gcccctcgga 120

gatctccatg gcgacgccgc gcgcgccccca caacaggaaa gccttaggcg gcgcggcttg 180

gtgctcggag acttaagagt acccagcctc gacgtggtgg atgtcagatc ttggggtcac 240

acgcacaggc ggtggccaag caaacacccg ctcatattta gtgcatgagc ctggggtcga 300

gttgccggag cctcgcgcgt agggcagggg ttcgagcgcc ctttctccct gcctcgcctc 360

tgcgctggg ggctgctgcc tcagtttccc agcgacaggc agggatttcg agcgtcccc 420

tcccctccct cgtcaagatc caagctagct gcctcagttt ccccgcggag cctgggacgc 480

cagcggaggg gctcggcgcg tagggatcac gcagcttctc tcctttttct gggagctgta 540

aagacgcctc cgcgccaag gccgaaaggg gaagcgagga ggccgccggg gtgagtgcc 600

tcgggtgtag agagaggacg ccgatttccc cggacgtggt gagaccgcgc ttcgtcactc 660

ccacggttag cggtcgccgg gaggtgcctg gctctgctct ggccgcttct cgagaaatgc 720

ccgtgtcagc taggtgtgga cgtgacctag ggggaggggc atccctcagt ggaggagcc 780

cggggaggat tcctgggccc ccaccaggc agggggctca tccactcgat taaagaggcc	840
tgcgtaagct ggagagggag gacttgagtt cggaccccct cgcagcctgg agtctcagtt	900
taccgctttg tgaaatggac acaataacag tctccactct ccggggaagt tggcagtatt	960
taaaagtact taataaaccg cttagcgcgg tgtagaccgt gattcaagct tagcctggcc	1020
gggaaacggg aggcgtggag gccgggagca gccccgggg tcatcgcctt gccaccgccc	1080
cccgattgct ttagcttgga aattccggag ctgaagcggc cagcgaggga ggatgaccct	1140
ctcggcccgg gcaccctgtc agtccgaaa taactgcagc atttgttccg gaggggaagg	1200
cgcgaggttt ccgggaaagc agcaccgccc ctgggcccc aggtggctag cgctataaag	1260
gatcacgcg cccagtcgac gctgagctcc tctgctactc agagttgcaa cctcagcctc	1320
gctgaattct gcagtcgacg gtaccgcggg cccgggatcc cgcgactcta gaatggacat	1380
caaggtggtg ttcaccctgg tgttcagcgc cctggtgcag gccaaagagca ccgagttcga	1440
ccccaacatc gacatcgtgg gcctggaagg caagttcggc atcaccaacc tggaaccga	1500
cctgttcacc atctgggaga ccatggaagt gatgatcaag gccgacatcg ccgacaccga	1560

104年4月24日修正替換頁

ccgggccagc aacttcgtgg ccaccgagac cgacgccaac cggggcaaga tgcccggcaa 1620

gaagctgccc ctggccgtca tcatggaaat ggaagccaac gccttcaagg cgggctgcac 1680

ccggggctgc ctgatctgcc tgagcaagat caagtgcacc gccaaagatga aggtgtacat 1740

ccccggcagg tgccacgact acggcggcga caagaaaacc ggccaggccg gcatcgtggg 1800

cgccatcgtg gacatccccg agatcagcgg cttcaaagaa atggccccca tggaacagtt 1860

catgcccag gtggacagat gcgccagctg caccaccggc tgccctgaagg gcctggccaa 1920

cgtgaagtgc agcgagctgc tgaagaagtg gctgcccgac cgctgcgcca gcttcgccga 1980

caagatccag aaagaggtgc acaacatcaa gggcatggcc ggcgacagg 2029

(24年 4月24日修(更)正本)

申請專利範圍

公告本

1. 一種確認一免疫調節物質的方法，包括：

(a) 提供一待測物與一免疫細胞，

其中該免疫細胞包括一CD54表現之報導系統，而該CD54表現之報導系統，包括：

— CD54基因之啟動子；以及

— 報導基因，與該CD54基因之啟動子連接，用以報導該CD54基因之啟動子的表現；

(b) 以該待測物本身處理該免疫細胞；以及

(c) 測定經該待測物本身處理之該免疫細胞所產生之該報導基因的產物表現以判定該待測物本身是否有免疫調節作用。

2. 如申請專利範圍第1項所述之確認一免疫調節物質的方法，其中於步驟(c)中，係將經該待測物本身處理之該免疫細胞所產生之該報導基因的產物表現與一未經該待測物本身處理之該免疫細胞之該報導基因產物的表現作比較，以判定該待測物本身是否具有免疫調節作用。

3. 如申請專利範圍第1項所述之確認一免疫調節物質的方法，其中，若經該待測物本身處理之該免疫細胞所產生之該報導基因的產物表現高於未經該待測物本身處理之該免疫細胞之該報導基因產物的表現，則判定該待測物本身具有免疫調節作用，為一免疫調節物質。

4. 如申請專利範圍第1項所述之確認一免疫調節物質的方法，其中步驟(b)進一步包含添加一免疫誘發物質，以使該細

胞產生免疫反應。

5. 如申請專利範圍第4項所述之確認一免疫調節物質的方法，其中於步驟(c)中，係將經該待測物本身與該免疫誘發物質處理之該免疫細胞所產生之該報導基因的產物表現與一僅經該免疫誘發物質處理之該免疫細胞之該報導基因產物的表現作比較，以判定該待測物本身是否有免疫調節作用。

6. 如申請專利範圍第5項所述之確認一免疫調節物質的方法，其中，若經該待測物本身與該免疫誘發物質處理之該免疫細胞所產生之該報導基因的產物表現低於該僅經該免疫誘發物質處理之該免疫細胞之該報導基因產物的表現，則判定該待測物本身具有免疫抑制作用，為一免疫抑制物質。

7. 如申請專利範圍第4項所述之確認一免疫調節物質的方法，其中該免疫誘發物質包括脂多醣體(lipopolysaccharide, LPS)、乙酸豆塞外佛波酯(phorbol myristate acetate, PMA)或刀豆素A (concanavalin A, Con A)。

8. 如申請專利範圍第7項所述之確認一免疫調節物質的方法，其中於步驟(c)中，判定該待測物本身是否有免疫調節作用包含判定該待測物本身是否具抗發炎作用，以判定該待測物本身是否一抗發炎物質。

9. 如申請專利範圍第1項所述之確認一免疫調節物質的方法，其中該免疫細胞之來源包括THP-1細胞、U937細胞或MUTZ-3細胞。

10. 如申請專利範圍第1項所述之確認一免疫調節物質的方法，其中該CD54基因之啓動子之序列包括序列辨識號：1之

序列。

11. 如申請專利範圍第1項所述之確認一免疫調節物質的方法，其中該報導基因包括長腹水蚤科冷光酵素 (Metridia luciferase) 基因、螢火蟲冷光酵素 (firefly luciferase) 基因、綠色螢光蛋白質 (green fluorescent protein, GFP) 基因或 β -葡萄糖醛酸苷酶 (β -glucuronidase) 基因。

12. 如申請專利範圍第1項所述之確認一免疫調節物質的方法，其中該CD54表現報導系統之序列為序列辨識號：2。

13. 如申請專利範圍第12項所述之確認一免疫調節物質的方法，其中該免疫細胞為於102年12月04日寄存於中華民國食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心，寄存編號為BCRC No. 960475的THP-1細胞。

14. 如申請專利範圍第1項所述之確認一免疫調節物質的方法，其中該待測物包括化妝品、藥物、化學物或天然物之萃取物。

15. 一種確認一皮膚致敏物質的方法，包括：

(a) 提供一待測物與一免疫細胞，

其中該免疫細胞包括一CD54表現之報導系統，而該CD54表現之報導系統，包括：

一CD54基因之啓動子；以及

一報導基因，與該CD54基因之啓動子連接，用以報導該CD54基因之啓動子的表現；

(b) 以該待測物本身處理該免疫細胞；以及

(c) 測定經該待測物本身處理之該免疫細胞所產生之該

報導基因的產物表現以判定該待測物本身是否為一皮膚致敏物質。

16. 如申請專利範圍第15項所述之確認一皮膚致敏物質的方法，其中係將經該待測物本身處理之該免疫細胞所產生之該報導基因的產物表現與一未經該待測物本身處理之該免疫細胞之該報導基因產物的表現作比較，以判定該待測物本身是否為皮膚致敏物質。

17. 如申請專利範圍第16項所述之確認一皮膚致敏物質的方法，其中，若經該待測物本身處理之該免疫細胞所產生之該報導基因的產物表現高於未經該待測物本身處理之該免疫細胞之該報導基因產物的表現，則判定該待測物本身為一皮膚致敏物質。

18. 如申請專利範圍第15項所述之確認一皮膚致敏物質的方法，其中該免疫細胞之來源包括THP-1細胞、U937細胞或MUTZ-3細胞。

19. 如申請專利範圍第15項所述之確認一皮膚致敏物質的方法，其中該CD54基因之啓動子之序列包括序列辨識號：1之序列。

20. 如申請專利範圍第15項所述之確認一皮膚致敏物質的方法，其中該報導基因包括長腹水蚤科冷光酵素基因、螢火蟲冷光酵素基因、綠色螢光蛋白質基因或 β -葡萄糖醛酸苷酶基因。

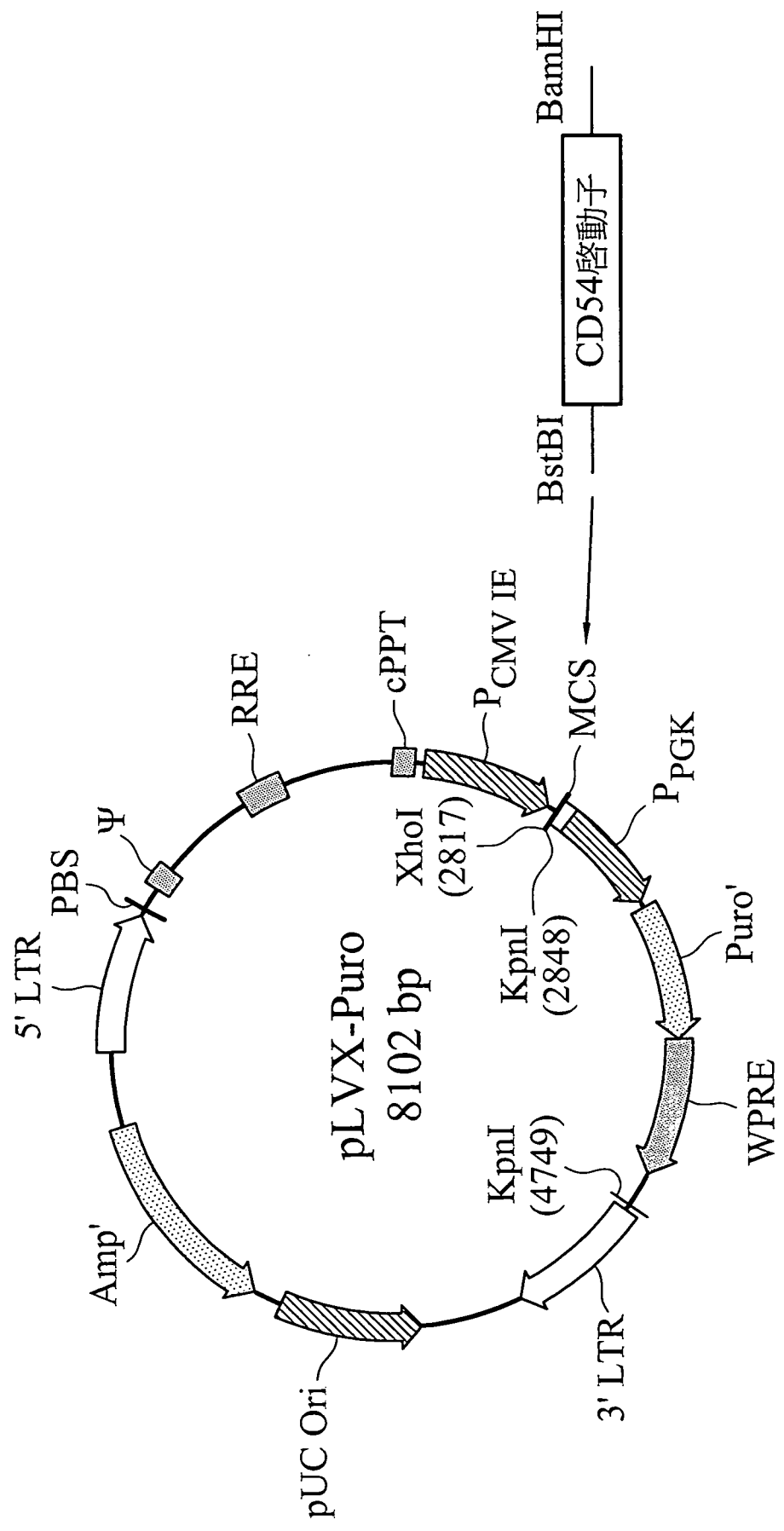
21. 如申請專利範圍第15項所述之確認一皮膚致敏物質的方法，其中該CD54表現報導系統之序列為序列辨識號：2。

22. 如申請專利範圍第 21 項所述之確認一皮膚致敏物質的方法，其中該免疫細胞為於 102 年 12 月 04 日寄存於中華民國食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心，寄存編號為 BCRC No. 960475 的 THP-1 細胞。

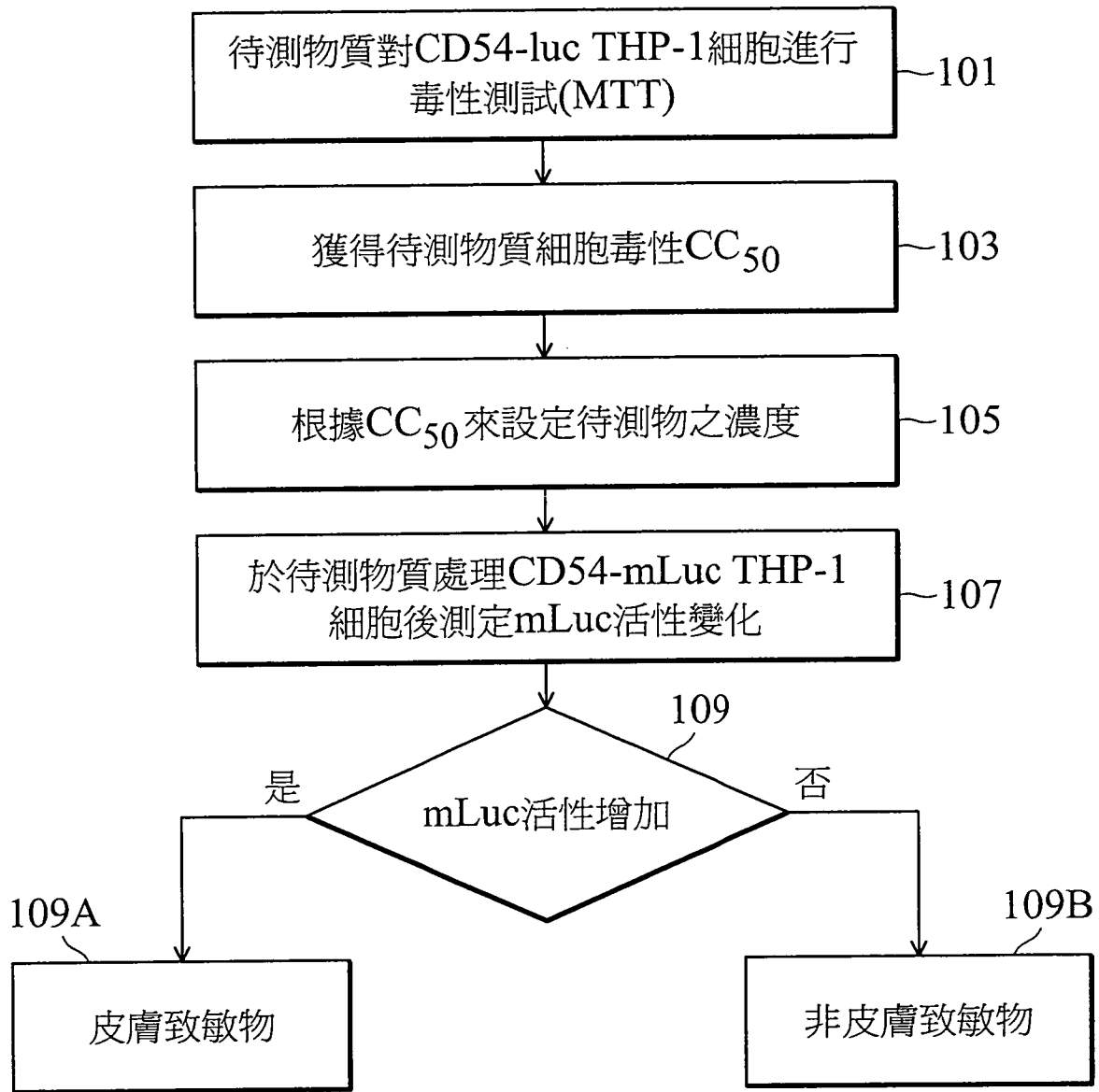
23. 如申請專利範圍第 15 項所述之確認一皮膚致敏物質的方法，其中該待測物包括化妝品、藥物、化學物或天然物之萃取物。

24. 一種經選殖之新穎細胞，其係於 102 年 12 月 04 日寄存於中華民國食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心，寄存編號為 BCRC No. 960475。

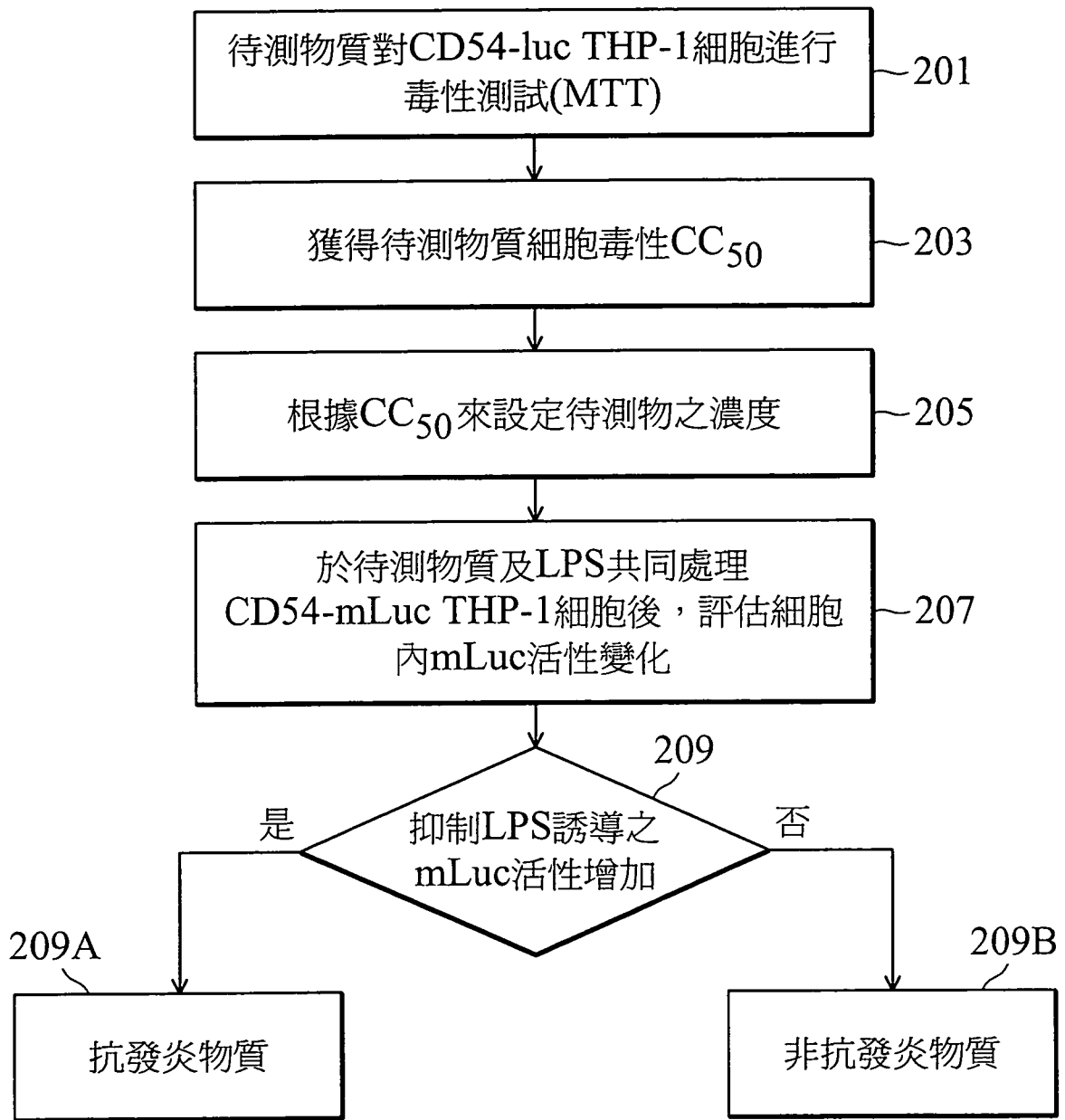
圖式



第 1 圖



第 2 圖



第 3 圖