

### 3. 基本的な実験操作

#### 1) 動物細胞培養の基礎技術

玉川大学農学部 新本 洋士

##### はじめに

食品の機能性評価において、動物細胞の培養は必要不可欠な基礎技術となった。細胞の分化、サイトカインの分泌、特定の遺伝子の発現など、さまざまな目的で動物細胞培養が行われる。

動物細胞培養は一見敷居が高そうに思われるかもしれないが、機器を整え、要点を押さえさえすれば誰にでもできる実験技術である。最近では滅菌済みの液体培地が市販されているし、培養器具も品質のよいプラスチック製品が安定して供給されている。ある程度費用がかかるが、それほど難しい技術ではない。

##### 1. 培養器具

動物細胞の培養をはじめるとあって、特別に必要な機器、器具には以下のようなものがある。

###### 1) クリーンベンチ

無菌操作を行う。病原性ウイルスや遺伝子組換え細胞を用いる際には、それぞれの封じ込めレベルに応じた安全キャビネットを用いる。

###### 2) 炭酸ガスインキュベータ

通常、5%炭酸ガス95%空気の雰囲気、37℃で培養を行う。一般的な動物細胞培養用培地は、体内を模した炭酸緩衝液をベースにしており、5%炭酸ガス雰囲気下でpHが中性付近になるよう設計されている。



写真 1 炭酸ガスインキュベータ中のシャーレとプレート

###### 3) 倒立顕微鏡

シャーレ等の培養器の上から光をあて、対物レンズが培養器の底面から細胞の

姿をとらえる顕微鏡。動物細胞にはコントラストがあまりないので、位相差観察できるものがよい。位相差板の微調整の必要がない機種を購入するとメインテナンスが容易である。デジタルカメラで細胞の撮影ができるとなおよいが、市販の安価なデジタルカメラを接眼レンズに近づけて撮影するだけでもプレゼンに使える写真が撮れる場合もあるので試みるとよい。



写真 2 倒立顕微鏡と後方に培地を用意したクリーンベンチ

#### 4) 超低温フリーザーと液体窒素容器

フリーザーは $-80^{\circ}\text{C}$ 以下のもの。動物細胞の短期間の保存に用いる。補助冷却装置のあるものが安心である。長期間の保存(1年以上)には専用の液体窒素保存容器を用いる。



写真 3 液体窒素容器中のかご(キャニスター)にアルミケーン(アンプル支持棒)が入っているところ

#### 5) 低速遠心器

15mlおよび50mlの遠心管(培養細胞用コニカルチューブ)を遠心できるもの。2,000回転程度で十分細胞を沈殿させることができる。オートバランスであっても、対角線上には目分量で水を入れた同じサイズの遠心管を入れて、おおよそのバランスを取っておくこと。

#### 6) 培養器具

シャーレ、培養フラスコ、ピペット、遠心管、マルチウェルプレート、マイクロピペット等がある。研究の目的によって、接着因子がコートされたシャーレを使う場合や、初代培養細胞に適した表面処理を行った培養器を用いる。動物

由来の細胞培養がはじまって以来、ほとんどの培養器具はガラス製であった。この20年ほどの間に、培養器具のほとんどはプラスチック製になり、ガンマ線やエチレンオキサイドガスによって滅菌されたものになった。高品質のプラスチック培養器具を用いることによって、再現性の高い実験が簡単にできる。

#### ＜プラスチック器具の素材＞

##### (1)PE (ポリエチレン)

低密度ポリエチレンと高密度ポリエチレンとがある。不透明。薬品に対する耐性が強い。オートクレーブできない。加熱して加工し易い。切断も比較的容易。

##### (2)PP (ポリプロピレン)

ポリエチレンに似ている。不透明だが、透明に近いものも製造されている。薬品に対する耐性が強い。フェノール抽出に使用できる。オートクレーブにもかける。マイクロ遠心チューブ、15mlや50mlの遠心管等に用いられ、遠心力にも強い耐性を持つ。

##### (3)PS (ポリスチレン)

透明なので遠心管では試料がよく見え、密度の異なる液体を重層する時などには便利。あまり強度が高くないので強い遠心などで割れることがある。オートクレーブできない。シャーレ、培養フラスコ、マルチウェルプレートなどに用いられる。

##### (4)PC (ポリカーボネート)

透明で強度が強い。オートクレーブ可能。

##### (5)TPX (ポリメチルペンテン)

透明で薬品に対する耐性が強い。ビーカー、メスシリンダー等、ガラス器具に代えて使用できる。オートクレーブ可能。機械的強度に弱く、凍結保存には使わないほうがよい。

##### (6)ガラス器具

細胞培養実験で使うガラス器具には、メスピペット、パスツールピペットなどのピペット類、ガラス遠心管、メディウムボトルなどがあるが、大部分はプラスチック器具で置き換えることができる。ガラス器具には乾熱滅菌、オートクレーブが可能なので、洗浄して繰り返し使える利点がある。

##### (7)その他の器具

中規模の培養を行うための、スピナーフラスコ、ホローファイバー培養機、小型培養タンクなどが用いられる。さらに大規模な培養タンクが大量培養に用いられている。

## 2. 無菌操作

無菌操作を厳密に行おうとすれば、培養設備はもちろんのこと、実験従事者の健康管理にも気を付けなくてはならない。日頃から手をよく洗い、動物細胞の微生物

汚染(コンタミネーション)を起こさないための生活習慣を身につけることが必要である。

動物細胞は微生物に比べ、増殖が遅いので、いったんコンタミネーションを起こすと、細胞を救出することは絶望的である。万一のために、多数のアンフルに細胞を凍結保存しておく等の安全策を取っておくことが必須である。

## 1) 無菌操作の基礎

### (1) 器具の滅菌

器具の滅菌を完全に行うことは、無菌操作の第1歩である。ガラスピペットは滅菌缶に入れ、乾熱滅菌する。滅菌後、日付を書いた滅菌済みのシールを貼っておくなどすると、非滅菌の缶をクリーンベンチ内に持ち込む事故を防げる。様々な器具のオートクレーブの際には、オートクレーブにかけると文字が現れるような市販のテープを器具に貼っておくとよい。エチレンオキサイドガス滅菌の際もインジケータを用い、滅菌が完全に行われたことを確認する。可能なら、殺菌灯のついた滅菌器具の保管庫を用意するとよい。

### (2) 手指の消毒

手指には雑菌が多数付着している。手指の消毒は丁寧に行う。薬用石鹸等で指先、指の間、手のひら、腕、肘までよく洗いペーパータオル等で丁寧に拭く。滅菌済みのペーパータオルも市販されている。念のため、消毒用アルコールを手指に噴霧する。アルコールを十分乾燥させてからクリーンベンチで操作を行うこと。十分乾燥してないと、ガスバーナーから手に引火する恐れがある。消毒用アルコールの代わりに、グルコン酸クロルヘキシジン溶液で消毒することもできる。

せっかく洗った手指も、髪の毛や体の一部を触ったり、滅菌されていないペンなどを使ってデータの記入を行った時には、再び消毒用アルコールを噴霧するか手を洗い直す。手指に傷のある場合には、長めの手術用ゴム手袋を着用して操作を行うが、手に持った器具がすべるので細心の注意を払うこと。

### (3) 培養機器

まれに培地をクリーンベンチにこぼしたり、炭酸ガスインキュベータの中でシャーレをひっくり返したりすることがある。直ちに吸引除去するかペーパータオルなどでふき取り、洗浄、殺菌を行う。

培地を吸引除去する吸引用チューブには、毎回新しい滅菌パスツールピペットを接続するか、金属製のニードルを使って毎回ガスバーナーで焼いて確実に滅菌する。

## 2) コンタミネーションとその対策

### (1) カビ

カビの増殖はそれほど早くない。早期にみつけて処置(廃棄)すれば、被害を拡大せずに済む。しかし、成熟して胞子をたくさんつけたカビは、慎重に

処分しないと、そこらじゅうに胞子をまき散らしてコンタミネーションを広げていくことになる。

冷蔵庫で保存している古い培地にカビが侵入し、メディウムびんの底に半球形の菌糸の塊を作ることがある。もしカビのコンタミネーションに気づかず培地を使えば、すべての細胞を失うことになるかもしれない。

培養室を除湿することでカビの発生をある程度抑えることができる。また、培養をしない他の実験室でもカビを生やさないことが重要である。低温実験室やクロマトチャンバーは結露等で湿気がこもりやすいので注意が必要である。

## (2) 酵母

酵母によるコンタミネーションもしばしば起こる。倒立顕微鏡でキャンディダ属と思われる酵母の増殖を見ることができる。カビ、酵母に効く抗生物質もあるが、あまり使われていない。コンタミネーションを起こすと、培養器の底に粉をふいたように白い沈殿が見られようになる。

酵母汚染の温床となるのは、流し台、培地吸引用の配管などが考えられる。培地を吸引した後は、直ちに消毒用アルコールを通す等の対策を取るとよい。

## (3) 細菌

球菌、桿菌など、色々な菌がコンタミネーションを起こす。培地の色調が変化し、顕微鏡下で培養器の底に細かいゴミのような菌体がびっしり見られるようになる。抗生物質を培地に添加することによって、細菌によるコンタミネーションはほぼ防ぐことができる。

## (4) マイコプラズマ

マイコプラズマは実験者の呼気や他の生物試料などから細胞に感染する。細胞の調子が急に悪くなるなどの変化がみられることもあるが、感染に気づかないことも多い。実験者は決してクリーンベンチ前や、調製中の培地や試料に向かって咳をしないように、また可能ならマスクをするなどの対策を取る。様々なマイコプラズマ検出キットが販売されている。また、マイコプラズマ除去試薬も販売されており、これを用いて数代継代培養すれば、マイコプラズマを完全に除去することができる。

## (5) 細胞どうしのコンタミネーション

最もやっかいなのが、細胞どうしのコンタミネーションである。特徴のある形態の細胞であれば、他の細胞が混入したことがすぐに認識できるが、似た形態の細胞では、判別が難しい。シャーレにわずか 1 個の他の細胞株が入っただけで、数週間のうちに数万の細胞と置き換わってしまうことも考えられる。これは同一のメディウムびんに入った培地を複数の細胞に使っている時に起こると考えられる。複数の細胞で培地を共有しないようにするとよい。

細胞が抗体やサイトカインを分泌したり、特別な遺伝子をもっていたりす

る場合は、細胞のコンタミネーションを知るマーカーとなりうるが、その他の場合には、種々の酵素パターンを測定したザイモグラフなどで、オリジナルの細胞と同一かどうか検定する必要がある。

### 3. 培養実験室の設計

新しく動物細胞の培養を行う実験室を設計する際には、無菌操作を確実にするための工夫を施しておくといよい。

培養室には前室を設け、白衣を着替えてから手指を洗浄消毒し、入室する。水栓はノブ式ではなく、足踏み式か、肘で操作できるレバー式のものがよい。手指の洗浄後、ドアノブを触れなくても培養室内へ入れるように、フットスイッチ式の自動ドアを設置するとよい。室内は殺菌灯に耐える材質の壁材、床材を用い、使用しない時は殺菌灯を照射しておく。床から壁への立ち上がりはシームレスにしてホコリなどが溜まらないようにする。外気はHEPAフィルターを通して室内に導入する。可能なら部屋全体を陽圧にしておく。機器類は殺菌灯を照射したパスボックスを通して室内へ入れる。

上記のような実験室では、コンタミネーションによる事故はほとんど起こらない。逆に、一般の実験室にクリーンベンチを設置し、動物細胞培養以外の実験を同時に行っている実験室では、しばしば微生物によるコンタミネーションが起こる。細心の注意を払うことも必要であろうが、注意を払わなくてもコンタミネーションを起こさない環境を整備するほうが、結局は早道のことがある。

### 4. 試薬、培地の調製

#### 1) 培地

市販の液体培地を購入するのが便利である。ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)には低グルコースのものと高グルコースのものがあるが、通常は低グルコースのものを使う。これらの培地には抗生物質が含まれていないので、別途購入したペニシリンーストレプトマイシン液などの抗生物質を適量加える。また、pHを特に安定させて培養したい場合には、HEPESを添加する。これらの添加によって培地が多少希釈されるが、ほとんどの場合、培養結果には影響しない。

培地は使用前に室温あるいは37℃に暖めておくのがよい。しかし、低温に少々さらされても平気な細胞については、冷蔵庫から出してすぐに培地を分注することもできる。浮遊系細胞では冷たい培地を添加してもよい場合が多い。

培地を使い切る前に培地の色(フェノールレッドの色)が紫がかった色になって、明らかにアルカリ性になってしまった場合、救済策として二酸化炭素を吹き込む方法がある。20ml程度のシリンジに炭酸ガスボンベから炭酸ガスを取り、滅菌フィルターを通じて培地ボトルに吹き込み、密栓して攪拌するとpH

を下げることができる。しかしながら滅菌フィルターの価格を考えると、特に高価な培地を除いてはこの方法は経済的ではない。新しい培地を使う方がよい。

2) トリプシン

滅菌されたものが市販されている。

3) トリプシンインヒビター

大豆から調製されたトリプシンインヒビター溶液が市販されている。

4) 牛胎児血清 (FCS, FBS)

出生前の牛胎児から採取した血液から調製した血清を、ある程度の容量にプールしたものが市販されている。自分の細胞に最もよいFCSをロットチェックによって選んで購入しておく。一度に500mlのボトルを10~20本程度購入しておくとうよい。相当な高額になるので、ロットチェックは慎重に行う。

業者は2~3ロットのロットチェック用血清しか出してくれない場合が多い。また量も10~20ml程度である。実際のロットチェックの前に、メーカーで用意している代表的な細胞株を培養したデータシートを取り寄せて検討しておくとうよい。いいロットの血清は買いましをして、なるべく同一条件で実験が長くできるように心がける。-20℃に凍結保存する。

使用時には購入した500mlのボトルを融解し、100あるいは200mlのボトルに小分けするとよい。凍結融解はなるべく避け、小分けしたFCSは再凍結を1回だけに制限する。凍結融解を繰り返すと沈殿物ができる場合がある。

5) FCSの非働化は必要か

血清の非働化とは、56℃で30分間加熱することによって補体成分C3bなどを不活性化し、細胞に悪影響を与えることを事前に防ぐこととされているが、非働化しないで培養しても、ほとんどの場合、問題がないか、かえって非働化するよりも細胞の増殖がよい場合もある。子牛血清や馬血清などでは非働化が必要な場合があるので注意を要する。筆者らは通常の培養であれば、FCSを非働化することはない。

## 5. 継代培養の実際

継代できる動物細胞株がさまざまな食品の機能評価系に用いられている。微生物と異なり、動物細胞株はある程度の密度からでないとう増殖できない場合が多い。継代時のスプリット比は通常1:20~1:3程度である。細胞株によってはコンプレント(接着性細胞が培養器いっぱいとう増殖した状態)にすると分化能を失ってしまうものもあるので注意を要する。

1) 浮遊細胞, 弱く接着する細胞の場合

細胞をピペットで強く懸濁して分散させ、遠心管に回収する。低速で遠心沈殿させた後、培地を吸引除去し、沈殿した細胞を新しい培地に懸濁させてその5分の1から10分の1を新しい培養器に播種する。

## 2) 接着細胞の場合

培養器から培地を吸引除去し、PBSを加えて培養器を少し揺らした後、培養器にわずかに残った培地をPBSとともに吸引除去する。ここにトリプシン溶液を適量加え、顕微鏡下で細胞が剥離するのを観察する。トリプシンの働きは、FCSやトリプシンインヒビターを適量加えることで停止させる。細胞がひとつずつばらばらに剥離してくる場合は新しい培地を加えて軽く懸濁し、遠心管に回収する。シート状に大きな塊で剥離してくる場合は新しい培地を加えた後、丁寧に細胞を分散させてから遠心管に回収する。ピペットで吸い上げて勢いよく培養器の底などに吹き付けると大きな塊がほぐれていく。

細胞を遠心沈殿後、上清を吸引除去、新しい培地を添加してよく懸濁し、一部を新しい培養器に入れて培地を追加する。

## おわりに

空調のできる清浄な実験室に培養機器を準備できさえすれば、動物細胞培養は困難な技術ではない。動物細胞培養技術を用いたさまざまな食品機能の評価系が開発されているので、目的に応じて細胞や培養方法を使い分けるとよい。評価系によっては完全にキット化されているものもあり、マニュアル通りに実施すれば初心者も迷うことがない。

動物細胞を用いた実験系は、動物あるいはヒトを用いたインビボの実験系に比べて有意差が出やすい。このためこの技術を用いてスクリーニングを行った場合に、新しい食品の機能性をたくさん発見したかのように錯覚することがある。実際には機能性のある素材の候補をみつけただけであることを認識する必要がある。

ヒトが摂食した際には、食物は消化酵素によって消化された後、腸管で低分子の状態で吸収され、臓器に運ばれる。動物細胞を用いた評価系はこのような複雑な経路を単純化しているため、その後の動物実験では効果ははっきりしない場合もある。

有用な機能性を持った作物や食品の候補を絞り込むためのツールとして、またすでにインビボの評価系で明らかになった機能を詳しく検証するための方法として動物細胞培養技術は有用であり、さまざまな測定系が本書にも紹介されているので参照されたい。

## 参考文献

- 1) 日本組織培養学会編，組織培養の技術，(朝倉書店，東京)，(1982)。
- 2) 安東民衛，千葉丈，単クローン抗体実験操作入門，(講談社サイエンティフィック，東京)，(1991)。
- 3) 渡邊利雄，バイオ実験イラストレイテッド 6，「すくすく育て培養細胞」，(秀潤社東京)，(1996)。
- 4) 日本動物細胞工学会編，動物細胞工学ハンドブック，(朝倉書店，東京)，(2000)。

## 2. 細胞による機能性評価法

### 1) サルモネラ菌 TA98 株を用いた抗変異原性試験法

(社)日本食品科学工学会 山口美奈子

玉川大学農学部 新本 洋士

#### はじめに

エームス法はカリフォルニア大学バークレー校の B.N. Ames らが開発したサルモネラ菌を用いた変異原性試験法である。本項で紹介するサルモネラ菌 (*Salmonella typhimurium*, ただしこの菌の現在の正式名称は *Salmonella enterica* subsp. *enterica*” (Smith 1984) Le Minor and Popoff 1987 である) TA98 株はヒスチジン合成酵素系遺伝子にフレームシフト型の変異が起ったヒスチジン要求生株であり、フレームシフト型変異を起こす変異原性物質によって、ヒスチジン要求性からヒスチジン非要求性となり、ヒスチジンを含まない寒天培地プレート上にコロニーを作ることができるようになる。このような、ヒスチジン非要求性の復帰変異の頻度を指標として、被検物質の変異原性の有無を判定する。

この試験法を応用し、既知の変異原物質の作用を消去するような物質(抗変異原性物質)の性質を検索することができる。本項では、変異原物質として Trp-P2 を用いた実際の手技について述べる。

#### 準備するもの

##### 1. 実験器具

- ・シェーカーのついたウォーターバス
- ・インキュベータ (37°C)
- ・クリーンベンチ
- ・試験管ミキサー
- ・乾熱滅菌器
- ・オートクレーブ
- ・メカニカルマイクロピペット (ギルソン, エッペンドルフなど) およびオートクレーブしたチップ.
- ・滅菌メスピペット 1 mL, 5 mL, 10 mL (ファルコン, コーニング等, プラスチック製)
- ・ピペットエイド (ドラモンド)
- ・L字培養管 (タイテック 18x120x70 mm など) とシリコセン.
- ・エームス管 (小型試験管) 13x100 mm 試験管に記入用のコーティングがされ

ているものが使いやすい。

- ・モルトン栓 (アズワンアルミキャップ M1 型)
- ・15 mL プラスチックコニカルチューブ (滅菌済, ファルコン等)

## 2. 試薬

オートクレーブする液体はすべてガラスボトルに入れ、キャップを密栓から半回転あけて、その上からアルミホイルをかぶせてオートクレーブする。アルミホイルの上にオートクレーブテープを貼っておく。

- ・ニュートリエントブイオン No. 2 (OXID Nutrient Broth No. 2, 関東化学 711067-5)  
200 mL ガラスボトルに超純水 200 mL , ニュートリエントブイオン 5 g を入れ、よく混和溶解後オートクレーブする。冷蔵保存。

- ・テスメディア

分注済み市販最小グルコースプレート (和光純薬) は室温で保存する。

- ・PBS

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) は、PBS 粉末 (日水製薬) を水に溶解するか、10 倍濃度 PBS (シグマ) を水で希釈する。ガラスボトルに入れ、オートクレーブして用いる。冷蔵保存。

- ・超純水

ガラスボトルに入れ、オートクレーブする。冷蔵保存。

- ・トッペアガー用ビオチン-ヒスチジン溶液

D-Biotin                    30.9 mg

L-Histidine/HCl        24.6 mg

超純水                    250 mL

300mL ガラスボトルに入れてオートクレーブし、冷蔵保存する。水を先に入れること。オートクレーブ後、100℃以下になった時点でよく混和する。

- ・トッペアガー

寒天末                    0.75 g

NaCl                    0.54 g

超純水                    100 mL

100 mL のガラスボトルに入れてオートクレーブし、冷却前に均一に混和してから密栓して冷蔵保存する。使用直前にキャップを軽くゆるめ沸騰水浴あるいは電子レンジ融解し、50℃に冷えたら、トッペアガー用ビオチン-ヒスチジン溶液 10 mL と混合し、使用まで 45~50℃に保温する。電子レンジを用いる場合には突沸しないよう、アガーの融解具合をみながらこまめにボトルを回転させる。また、アガーを焦がさないように注意する。使用直前にクリーンベンチに入れる。

クリーンベンチ内にペーパータオルを敷いてその上にボトルを置くと冷めにくい。

#### ・ S-9 Mix

変異原性物質の代謝活性化のために添加する。ラット肝臓ホモジネートから調製したマイクロソーム画分(S-9)と補酵素類溶液を混合したものであるが、プレミックスされた S-9 Mix が市販されているのでこれを用いるとよい(家田貿易 S-9MIX)。マイナス 80 °C で保存する。凍結融解は 3 回程度までにとどめる。融解したら転倒混和して均一にしてから使用する。

#### ・ Trp-P2 溶液

ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解する。高濃度のものを調製しておき、これを DMSO で希釈したものを 10 mL 程度のガラスバイアル等に分注し、-20 °C に保存する。使用時は微温湯で融解し、よく混和する。滅菌の必要はない。

### 3. 試験菌株

TA98 株は適当な菌株分譲機関から入手する(国内分譲機関登録番号は JCM 6977, IFO 14193, NBRC 14193 など)。TA98 は遺伝子組換え菌株であるので、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(カルタヘナ法)にしたがった取り扱いをする必要がある。

[http://www.bch.biodic.go.jp/bch\\_1.html](http://www.bch.biodic.go.jp/bch_1.html)

クリーンベンチ中で滅菌した L 字培養管のシリコセンを取り、ニュートリエントブイオン 10 mL を分注する。ここに融解した保存菌懸濁液を 1 白金耳接種し、シリコセンをしてその上をアルミホイルで軽く覆う。これを 37°C で 12~14 時間振とう培養する。この培養液 8 mL にジメチルスルホキシド(DMSO) 0.7 mL を加え、滅菌した 0.5 mL プラスチック遠心管等に 0.2 mL ずつ分注する。これをドライアイス-アセトン、あるいは液体窒素により急速凍結して種菌株として-80 °C に保存する。多数保存しておくとうい。

試験前日に種菌株懸濁液を溶解し、1 白金耳をニュートリエントブイオン 10 mL に接種する。37 °C で 14 時間振とう培養後、15 mL 滅菌プラスチックチューブに移し、変異原性試験に使用するまで氷冷保存する。使用直前に 10 mL 滅菌メスピペット、あるいはボルテックスミキサーで均一になるよう混和する。

### 4. 試料

種々の抽出法で調製した試料を検定することができる。水や低濃度の塩溶液で抽出したものは、滅菌フィルターを通す。有機溶媒などで抽出した物は、DMSO に溶解して添加する。DMSO 溶液は滅菌する必要はない。しかし、DMSO を高濃度に添加すると試験菌株の TA98 が死滅するので、DMSO 添加量は最大でも 100 µL/シャーレまで

とするのがよい。したがって、試料を DMSO に溶解して添加する場合は、Trp-P2 溶液の濃度を倍にして 50  $\mu\text{L}$  添加し、試料は 50  $\mu\text{L}$  添加する。また、必ずすべてのシャーレの DMSO 濃度を同一にしておかなくてはならない。



写真 1 L字管（左）とモルトン栓をしたエームス管

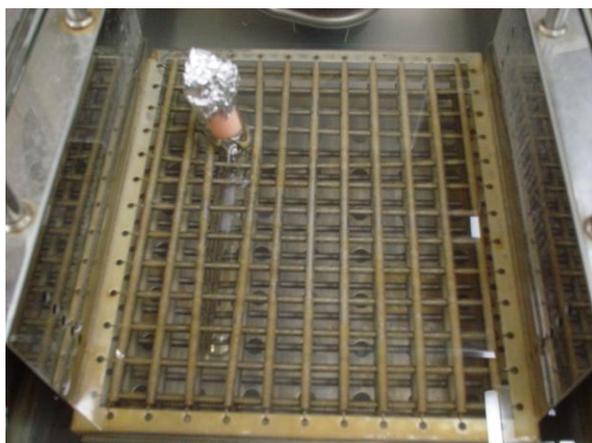


写真 2 TA98 を接種したL字管をシェーカーウォーターバスにセットしたところ

## プロトコール

クリーンベンチの中で行う。以下の例は試料が DMSO 溶液の場合。

1. 滅菌エームス管に PBS を分注する。最終液量がちょうど 1 mL となるようあらかじめ計算しておく。
2. DMSO を分注する。DMSO の最終添加容量はエームス管あたり 100  $\mu\text{L}$  とする。
3. 被験物質を添加する。DMSO 溶液の場合は 50  $\mu\text{L}$  まで。水溶液の場合は 200  $\mu\text{L}$  まで。
4. 100  $\mu\text{L}$  の S-9 Mix を分注する。
5. 50  $\mu\text{L}$  の Trp-P2 溶液（DMSO 溶液、20-100 ng/mL の濃度範囲で適当な濃度をあ

- らかじめ決めておく) を分注する。この時点で液量は 900  $\mu\text{L}$  になっている。ここで試験管ミキサーを用い、よく混合する。
6. TA98 培養液を各エームス管に 100  $\mu\text{L}$  ずつ分注する。よく混合し 37°C のウォーターバスで 20 分間振盪する。終了後はエームス管を底の水をペーパータオルでよく拭き取って別の試験管立てに移す。
  7. トップアガーを 2 mL 添加, 最少グルコースアガープレートにまく。この時, 5 mL のメスピペットにシリコンゴム球 (スポイト) をつけて分注するとよい。2 mL は正確でなくてもよい。1.9 mL であっても 2.2 mL であっても結果には影響しない。手早く行って, 均一にトップアガーを広げることが重要である。トップアガーがプレート上に偏らないように固化する前にプレートを適宜動かす。プレートは培地面を上にして培養する。蓋を上にするると蒸発した水分が蓋の裏に水滴となつてつき, 培地表面に落下してコロニーが流れてしまうことがある。シャーレラックに積み重ねると取り扱いが便利である。
  8. 37 °C で 48 時間培養した後, 増殖したヒスチジン非要求性コロニー数をカウントする。ペンタイプのコロニーカウンターがあると便利である。n=2, あるいは n=3 で実験を行い, 最終結果 (抗変異原性%) の平均値を表示する。

表 1 試料添加リスト

	C0	S0	S1	C1	S2	C2
PBS	700	700	700	700	600	600
DMSO	100	50	0	50	50	100
試料/DMSO	0	0	50	50	0	0
試料/水	0	0	0	0	100	100
S9-Mix	100	100	100	100	100	100
Trp-P2	0	50	50	0	50	0
TA98	100	100	100	100	100	100

単位  $\mu\text{L}$

S1, C1 DMSO 溶液試料

S2, C2 水溶性試料

### プロトコールのポイント

1. トップアガーを加えてシャーレの最少培地に重層するコツをつかむとうまくいく。手早く重層し, 全面に均一に広げ, 気泡を入れないように注意する。前もって何度か練習する。室温が低いとトップアガーが固まるのが早すぎて均一にならないので, 冬場でも室温を 25 °C 程度に上げておくとよい。
2. 試料を添加しないコントロール実験では, TA98 では 10~30 コロニー程度が自然復帰コロニーとして出現する。自然復帰コロニーが多い場合は, L 字管での前培

養時間を 13 時間あるいは 12 時間に短縮する。Trp-P2 を加えると数百から数千コロニーとなる。コロニー数が多すぎてカウントが困難な場合には、Trp-P2 濃度を下げる。

3. 陽性対照のコロニー数は 200-400 の間がかウントしやすい。
4. 本来なら 2 人一組になって 1 人が 20-30 秒間隔で TA98 を分注混合し、エームス管を 1 本ずつウォーターバスに入れるとともに、他の 1 人が 20 分間経過したらトップアガーを入れてプレートにまく必要がある。本法ではこの部分を 1 人で行えるよう、20 分間のインキュベーションを一斉に行っている。室温が 25℃くらいまでであればウォーターバスから出した時点で種々の反応が遅くなるので、30 枚程度のプレートに TA98 をまく時間の影響は少ないと考えている。
5. TA98 培養液を分注する際は、1 本のチップですべてのエームス管に素早く分注する。管壁にチップを付けないように気をつけるとともに、チップ先端に TA98 培養液が残らない分注スピードを覚える。また、ピペット本体に TA98 培養液をつけないこと。
6. 自分の試料を測定する前に、市販のドリンク類で試してみるとよい。缶コーヒーは高い抗変異原性を示すので陽性例として練習に使うとよい。

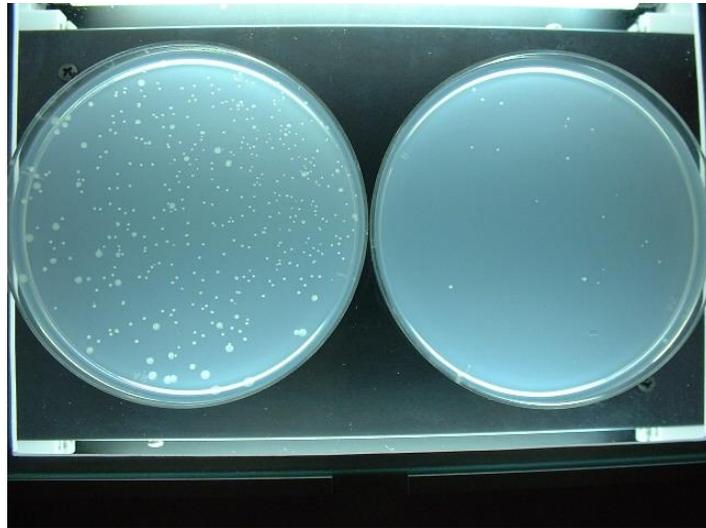


写真 3 Trp-P2 による復帰コロニー（左）と抗変異原物質による復帰の抑制（右）

#### 計算方法

抗変異原性（%）は以下の計算で求める。

$$(1 - (S_n - C_n) / (S_0 - C_0)) \times 100$$

S<sub>n</sub> 試料と Trp-P2 添加時のコロニー数

C<sub>n</sub> 試料のみ添加時のコロニー数

- S0 Trp-P2 添加時のコロニー数  
C0 Trp-P2 なしのコロニー数 (自然復帰)

表 2 市販牛乳の Trp-P2 に対する抗変異原性

試料		抗変異原性 (%)
低温殺菌乳	P-1	78.6
	P-2	88.7
高温殺菌乳	C-1	43.5
	C-2	52.3
LL 牛乳	L-1	36.6
	L-2	48.6
	L-3	44.8

試料は 500  $\mu$ L 添加した。この分 PBS を減らしてある<sup>7)</sup>

抗変異原性 (%) の同一試験内での比較は直接できるが、独立した試験 (別の日に行った試験) では同一の試料でも抗変異原性 (%) が 20% 以上もばらつくことがある。抗変異原性の強い作物、食品のスクリーニングを行う場合には、最終的に強い抗変異原性を示した試料を同一の試験で測定し、比較する必要がある。

#### 後片付け

L 字管, エームス管, はステンレスビーカーなどに集め, オートクレーブ後, 洗浄あるいは廃棄する。高濃度の Trp-P2 に接触した器具は市販の漂白剤を水道水で 5% 程度に希釈した溶液に翌日まで浸してから廃棄するか, 液体は紙ウェスにしみこませ, プラスチックバッグで厳重に封をして焼却する。ピペット類, カウント後のプレート (シャーレ) もオートクレーブしてから廃棄する。プレートはオートクレーブバッグに培地を下にして並べ, バッグ内に培地が漏れないようにしてオートクレーブするとよい。オートクレーブバッグを密封するとオートクレーブ中に破裂するので, 滅菌終了後に口をしめること。バッグから寒天培地がオートクレーブ内に漏れると, オートクレーブの洗浄に多大な労力を要することになる。

#### おわりに

サルモネラ菌を用いた抗変異原性試験によって, ただちに「抗変異原性食品」「癌発生を抑制する食品」が証明できるわけではないが, 抗変異原性のある農作物や食品は Trp-P2 のような変異原物質の作用を消去する作用が期待できる。このような作用は変異原物質に直接作用している場合もあるし, S-9Mix に含まれる薬物代謝酵素系 (P450) による Trp-P2 の代謝を阻害している場合もある。

また、同様の方法で TA100 等の他のサルモネラ菌株を用いた MNNG 等の異なる変異原に対する抗変異原性試験も可能である。

#### 参考文献

- 1) Ames ,B.N., McCann, J. and Yamasaki, E., Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalianmicrosome mutagenicity test. *Mutat. Res.* **31**, 347-364 (1975).
- 2) Gasser, C.S. and Fraley, R.T., Genetically Engineering Plants for Crop Improvement. *Science*, **244**, 1293-1299 (1989).
- 3) 石館基, 毒性試験講座 12, 変異原性, 遺伝毒性, 石館基編 (地人書館) pp. 1-8 (1991).
- 4) 中村晃忠, 細胞トキシコロジー試験法, 日本組織培養学会編 (朝倉書店, 東京) pp. 59-65 (1991).
- 5) 矢作多貴江, 環境変異原実験法, 田島彌太郎, 賀田恒夫, 近藤宗平, 外村晶編 (講談社サイエンティフィック, 東京), pp. 56-68 (1982).
- 6) 新本洋士, 食品機能研究法, 篠原和毅, 鈴木建夫, 上野川修一編 (光琳), pp. 252-255 (2000).
- 7) 新本洋士, 小林正枝, 徳田節子, 津志田藤二郎, 市販牛乳の加熱処理条件と抗変異原性, 東北農業研究, **52**, 259-260 (1999).

### 3) ラット細胞株 (RBL-2H3) を用いた脱顆粒抑制試験

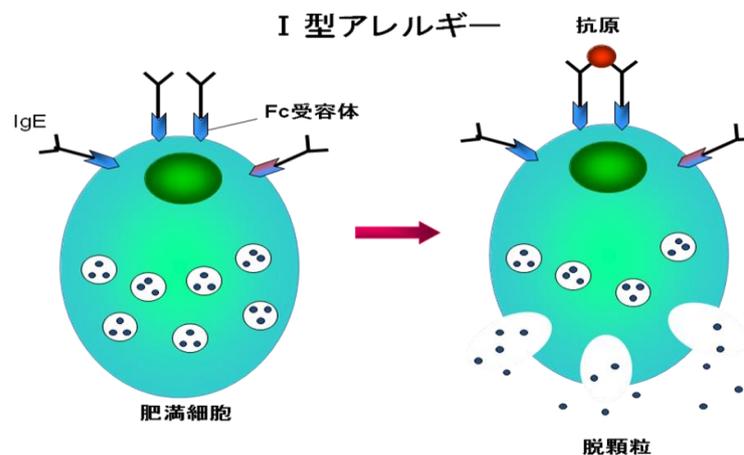
南九州大学健康栄養学部 井手 三津子  
玉川大学農学部 新本 洋士

#### はじめに

アレルギーには I 型～IV 型の 4 種類があり、通常アレルギー反応と言えば、I 型アレルギーを示す。I 型アレルギーは即時型過敏症の別名をもち、抗原の侵入から 30 分以内に発現する。このアレルギー反応には、抗原特異的な抗体 IgE と IgE 特異的な高親和性 Fc レセプターをもつ肥満細胞や好塩基球がかかわる。Fc レセプターを介して肥満細胞や好塩基球の表面に結合している IgE が抗原によって架橋されると、肥満細胞は活性化され、ヒスタミンやタンパク質分解酵素などの細胞内顆粒内容物が放出される。この現象を脱顆粒と呼ぶ。ヒスタミンにより血管透過性の亢進や平滑筋の収縮を誘導され、タンパク質分解酵素によって組織のリモデリングが誘導される。その後、プロスタグランジンなどの脂質メディエーターやサイトカインが放出され、さらにアレルギーの炎症が亢進する。このような I 型アレルギーの発症を抑えるためには、肥満細胞からの脱顆粒を抑制することが重要である。

本法ではラット好塩基球由来細胞株 (RBL-2H3) を用い、好塩基球の顆粒中に豊富に存在するリソソーム酵素の一つである  $\beta$ -hexosaminidase を脱顆粒の指標として測定することにより、検体の脱顆粒抑制作用の有無を評価する。

$\beta$ -hexosaminidase は、糖分解酵素であり、基質 p-nitrophenyl-2-acetoamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside に作用して p-ニトロフェノールを遊離する。この遊離された p-ニトロフェノールを比色法により測定 (405 nm) することにより、脱顆粒時に細胞から放出された  $\beta$ -hexosaminidase 遊離量を定量する。検体の代わりに MT Buffer を添加した場合の  $\beta$ -hexosaminidase の遊離量と比較し、検体の脱顆粒抑制率を求める。



## 準備するもの

### 1. 実験器具

- ・ 24 ウェル平底マイクロプレート (Falcon 353047 等)
- ・ 96 ウェル平底マイクロプレート (Falcon 353072 等)
- ・ セルカルチャーディッシュ (Falcon 353003 等)
- ・ 15 mL プラスチックコニカルチューブ (Falcon 352196 等)
- ・ 50 mL プラスチックコニカルチューブ (Falcon 352070 等)
- ・ 滅菌メスピペット 1 mL, 10 mL
- ・ パスツールピペット
- ・ ピペットエイド (ドラモンド)
- ・ メカニカルマイクロピペット (ギルソン, エッペンドルフ等) およびチップ
- ・ 8 チャンネルピペットおよびチップ
- ・ オートクレーブ
- ・ 乾熱滅菌器
- ・ クリーンベンチ
- ・ 5%CO<sub>2</sub>インキュベータ (37°C)
- ・ 血球計算盤
- ・ 超音波細胞破碎機
- ・ 倒立型位相差顕微鏡

### 2. 試薬

- ・ 基本培地 : Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, SIGMA, D6046) に Penicillin-streptomycin solution 100X (SIGMA, P4333) を 1%, 牛胎児血清 (FCS, EQUITE CH-BIO 社) を 10% で添加. 室温にもどして使用する.
- ・ トリプシン-EDTA (デンカ生研株式会社等) : 室温にもどして使用する.
- ・ PBS (-) : Dulbecco's PBS (-) (SIGMA, 10X, D1408) を純水で 10 倍に希釈し, オートクレーブ滅菌する.
- ・ 抗体 : Anti DNP-IgE 溶液 ; Mouse monoclonal anti-dinitrophenol (SIGMA, D8406) を PBS (-) で 500 µg/mL とし, 分注して-30°C に保存. 使用時に培地で希釈して 50 ng/mL とする.
- ・ 抗原 : DNP-HSA (DNP-labeled human serum albumin) 溶液 ; Albumin, dinitrophenyl (SIGMA, A6661) を PBS (-) で 10 mg/mL に溶解し, 分注して 4°C に保存. 使用時に MT Buffer で 4000 倍希釈する.
- ・ 陽性対照 : Wortmannin 溶液 ; Wortmannin (和光 231-01254) をジメチルスルホキシド (DMSO) に 1 mmol/L 濃度に溶解し, 分注して凍結保存する. 使

用時に MT Buffer で 200 倍に希釈する。

- MT Buffer : 137 mmol/L NaCl (和光 191-01665, 8006 mg/L)  
2.7 mmol/L KCl (和光 163-03545, 201 mg/L)  
1.8 mmol/L CaCl<sub>2</sub> (和光 039-00475, 265 mg/L)  
1 mmol/L MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O (和光 135-00165, 203 mg/L)  
5.6 mmol/L Glucose (和光 041-00595, 1008 mg/L)  
20 mmol/L HEPES (和光 348-01372, 4766 mg/L)  
0.1% BSA (Albumin Bovine F-V ナカライ 01863-77, 1000 mg/L)
- 以上の試薬を秤取し純水に溶解して NaOH で pH7.3 に調整し、メスアップ。フィルター滅菌，4℃保存。
- 100mmol/L CitrateBuffer : クエン酸 (和光 036-05522) の 100 mmol/L 溶液を NaOH 粒で pH4.5 に調整。
  - 基質溶液 : p-nitrophenyl-2-acetoamido-2-deoxy-β-D-glucopyranoside (和光 144-05631) を 3.3 mmol/L で 100 mmol/L Citrate Buffer に溶解。 用時調製。
  - 酵素反応停止液 : 2mol/L Glycine Buffer ; グリシン(和光 075-00731) の 2mol/L 溶液を NaOH 粒で pH10.4 に調整。
  - 0.1% Triton X-100 溶液 : Triton X-100 (SIGMA X100) を MT Buffer で 0.1% に希釈。

### 3. 細胞株

RBL-2H3 (JCRB0023), ラット好塩基球由来株細胞, 接着細胞 ; 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 ヒューマンサイエンス研究資源バンクより分譲されたもの

※RBL-2H3 細胞の培養上の注意 ; RBL-2H3 細胞は, ディッシュ表面との付着性がかなり強い。増殖も早いので, ~3 日ごとに継代培養し, 継代時は, トリプシン添加後, 37℃で 1 分間インキュベーションし, ピペッティングを丁寧におこなって細胞浮遊液とする。自然に浮遊し始めるまでトリプシン処理を長引かせると viability が低下するので注意する。

### 4. 検体

検体は 10%程度に DMSO で溶解し, 適当な濃度まで MT Buffer で希釈して用いる。DMSO を高濃度に添加すると細胞毒性があるので, 培地中の DMSO 濃度は 0.1%以下で試験を行う。

## プロトコール

以下の操作はクリーンベンチの中で行う。

### 1. 細胞播種

- 1) パスツールピペットで細胞を傷つけないように, ディッシュ中の培地を吸引除去する。

- 2) 滅菌メスピペットで PBS(-) を 10 mL 加える。
- 3) パスツールピペットで PBS(-) を吸引除去する。
- 4) 滅菌メスピペットでトリプシン溶液 1 mL を加え、全体になじませ、37°C で 1 分間インキュベーションする。
- 5) 顕微鏡で細胞が剥がれるのを確認し、ディッシュに基本培地を 9 mL 加え、ピペッティングを丁寧におこなって細胞浮遊液とし、遠心管に回収する。
- 6) 遠心分離 (1000 rpm, 5 分間) を行い、細胞を沈降させる。
- 7) 遠心管内培地をパスツールピペットで吸引除去し、基本培地 5mL を加え、よくピペッティングする。
- 8) 血球計算盤を用いて細胞数をカウントし、 $2.5 \times 10^5$  cell / mL となるように基本培地で希釈する。
- 9) ピペッティングを繰り返しながら、24 ウェルマイクロプレートに 1 mL / well となるように分注し、37°C, 5%CO<sub>2</sub> インキュベータ中で一晩培養する。

## 2. 脱顆粒抑制試験

- 1) 培地を吸引除去し、1 mL PBS(-) で洗浄後、500  $\mu$ L / well Anti DNP-IgE 溶液を入れ、37°C, 5%CO<sub>2</sub>-95%Air インキュベータで 2 時間培養することにより細胞を感作させる。Blank には基本培地を入れる。
- 2) Anti DNP-IgE 溶液を除去し、1.5 mL/well MT Buffer で 2 回洗浄する。
- 3) 検体の MT Buffer 溶液を 490  $\mu$ L/well 入れる。  
Control には MT Buffer のみを 490  $\mu$ L/well 入れる。  
陽性対照には Wortmannin 溶液を 490  $\mu$ L/well 入れる。

	Anti DNP-IgE	sample
Blank	—	MT Buffer
Control	+	MT Buffer
陽性対照	+	Wortmannin
試料	+	試料 + MT Buffer

- 4) 37°C, 5%CO<sub>2</sub>-95%Air インキュベータで 10 分間培養する。
- 5) 10  $\mu$ L/well DNP-HSA 溶液を加えよく混合し、37°C, 5%CO<sub>2</sub>-95%Air インキュベータで 30 分間培養する。抗原を添加し培養することで細胞を刺激する

【注】以降の操作はクリーンベンチの外にて開放系で行ってよい。

- 6) インキュベータから 24 ウェルマイクロプレートを取りだし、10 分間氷冷して反応を止める。
- 7) 図 1 のように、培養上清を対応する supernatant well に移し、supernatant とする。
- 8) 残った細胞に 500  $\mu$ L/well 0.1% Triton X-100 溶液を入れ、超音波細胞破碎機をかけ

溶解したものを cell lysate とする。

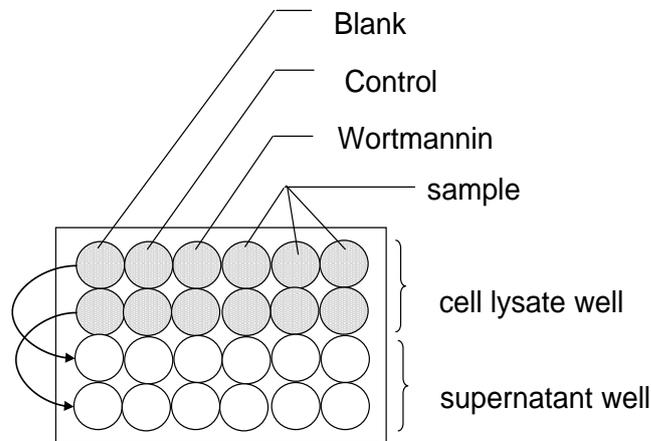


図 1 24 ウェルプレートでの脱顆粒試験のレイアウト

- 9) 50  $\mu\text{L}$  の supernatant および 50  $\mu\text{L}$  の cell lysate をそれぞれ 96 ウェルマイクロプレートにとり 37°C, 5 分間プレインキュベーションする。
- 10) 基質溶液を 100  $\mu\text{L}$  / well 加え, ピペッティングでよく混合した後, 37°C, 25 分間インキュベーションする。
- 11) 反応停止溶液として 2M Glycine Buffer を 100  $\mu\text{L}$  / well 加えピペッティングでよく混合する。
- 12) 泡がある場合は, 先端をエタノールに浸した注射針で消泡し, マイクロプレートリーダーで 405 nm の吸光度を測定する。
- 13)  $\beta$ -hexosaminidase の放出率を計算する。

#### 計算方法

$$\beta\text{-hexosaminidase 放出率 (\%)} = 100 \times [(S - Sc) / \{ (S - Sc) + (CL - CLc) \}]$$

CL : cell lysate の吸光度

CLc : 反応停止溶液→基質溶液の順で加えた際の cell lysate の吸光度

S : supernatant の吸光度

Sc : 反応停止溶液→基質溶液の順で加えた際の supernatant の吸光度

※検体の代わりに MT Buffer のみを添加したコントロールの  $\beta$ -hexosaminidase 放出率を 100% とし, 検体の  $\beta$ -hexosaminidase 放出抑制活性を計算する。

※試料抽出物が 405 nm に吸収をもつ可能性があるため, 9) において supernatant および cell lysate を 2 連で 96 ウェルマイクロプレートに入れ, 反応停止溶液→基質溶液の順で加えた際の吸光度を同時に測定し, 差し引いて計算する。

## プロトコールのポイント

1. この試験法において  $\beta$ -hexosaminidase の放出率を測定するために基質溶液を添加するが、この基質 p-nitrophenyl-2-acetoamido-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside は、Citrate Buffer に難溶である。超音波洗浄器や Vortex ミキサーによる攪拌処理を繰り返すことで溶解を早めることができる。
2. supernatant や、cell lysate を 24 ウェルプレートから 96 ウェルプレートへ 50  $\mu$ L ずつ移す場合、8 チャンネルピペットに一つおきにチップをつけて使用すると、同時に 4 ウェル分移すことができるので効率よく行うことができる。

## 後片付け

使用した 24 ウェル平底マイクロプレート、96 ウェル平底マイクロプレート、セルカルチャーディッシュ、チップなど RBL-2H3 細胞に接触した器具はオートクレーブバッグに入れ、オートクレーブして廃棄する。

## おわりに

この手法を用いることにより、脱顆粒抑制作用を有する食品や食品成分を迅速に検索することができる。ここで陽性となった食品成分等は、抗アレルギー性食品開発の候補となりうる。しかし、ここで述べた方法はあくまで細胞レベルでのスクリーニングの試験であり、そのアレルギー抑制効果を立証するためには動物試験さらにヒトでの臨床試験が必要である。

## 参考文献

- 1) 子安重夫, 「免疫学 集中マスター」, 子安重夫編 (羊土社, 東京) pp.10-44 (2005).
- 2) 金子裕隆, 川村博幸, 熊谷武久, 渡辺紀之, 亀山眞由美, 吉田 充, 新本 洋士, ラット白血病細胞 RBL-2H3 に対するイネポリフェノールの脱顆粒阻害作用, 食科工, **53**, 416-422 (2006).
- 3) Watanabe, J., Shinmoto, H. and Tsushida, T. Coumarin and Flavone Derivatives from Estragon and Thyme as Inhibitors of Chemical Mediator Release from RBL-2H3 Cells. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **69**, 1-6 (2005).
- 4) Demo, S.D., Masuda, E., Rossi, A.B., Thronset, B.T., Gerard, A.L., Chan, E.H., Armstrong, R.J., Fox, B.P., Lorens, J.B., Payan, D.G., Scheller, R.H. and Fisher, J.M., Quantitative Measurement of Mast Cell Degranulation Using a Novel Flow Cytometric Annexin-V Binding Assay. *Cytometry*, **36**, 340-348 (1999).

## 6) 脂肪前駆細胞分化誘導試験

### —前駆脂肪細胞株 (3T3-L1) を用いた脂質代謝改善機能評価法—

(社) 日本食品科学工学会 三上 一保

玉川大学農学部 新本 洋士

#### はじめに

現在、脂肪細胞の機能の解明が著しい進歩を遂げ、食欲や生活習慣病など多くの生体内現象に関与していることが遺伝子レベルで解明されつつあり、糖・脂質代謝以外にもその関与する機能が明らかにされつつある。そこで、肥満解消のみならず生活習慣病の予防・改善のためにも脂肪細胞の機能に影響を与える物質の解明が行われ始めている。

このように、培養脂肪細胞は各方面の研究で使用されており、これまでこのような細胞を用いたことのない研究者においても、培養脂肪細胞はユニークな実験系を提供できる可能性がある。この目的には長期の影響が検討でき、しかも簡便であることから培養脂肪細胞を用いる方法が適している。培養脂肪細胞は脂肪組織から成熟脂肪細胞を単離する方法や、また脂肪組織中の前駆脂肪細胞を培養する方法などもあるが、何と云っても株化された細胞を用いるのが簡便で最も多く用いられている。株化された細胞は脂肪細胞としての研究以外にも細胞の分化・脱分化といった基礎研究に対してもひとつのモデル系を提供し、それらの過程における遺伝子発現制御などの研究にも用いられている。

ここでは株化された前駆脂肪細胞の中でも多く用いられている 3T3-L1 細胞の培養法について解説する。また、近年 3T3-L1 細胞などの脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化誘導を測定する簡便なキットが販売されていることから、ここではキットを用いた脂質代謝改善機能評価法について説明する。

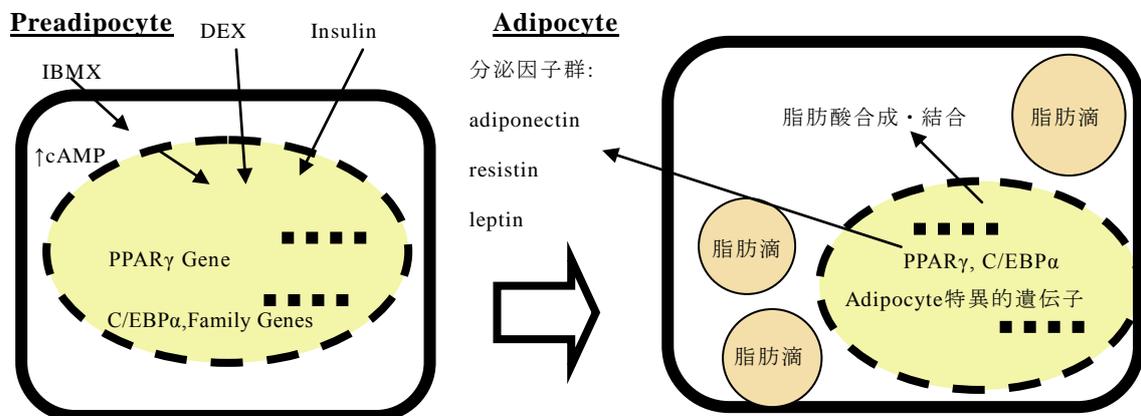


図 1 インビトロにおける脂肪合成の過程

3T3-L1 のような前駆脂肪細胞

(Preadipocyte, 図左) はイソブチルメチルキサンチン (IBMX), デキサメタゾン (DEX) 及びインスリン (Insulin) により脂肪細胞 (Adipocyte, 図右) に分化誘導の刺激を受ける。 IBMX は細胞内の cAMP を増加させ, DEX は糖質コルチコイド (ステロイドホルモンの一種) レセプターと結合し, Insulin はインスリンレセプターと結合する。 この 3 つの経路は PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$  ファミリー遺伝子の活性を高める。 脂肪細胞 (Adipocyte) には脂肪細胞特異的遺伝子 (分泌因子群, インスリンレセプターや脂肪酸合成・結合を行うタンパク質などをコードする) を活性化する PPAR $\gamma$  及び C/EBP $\alpha$  遺伝子を含んでいる。 脂肪酸は Oil Red O で染色可能な脂肪滴からなる<sup>3)</sup>。

## 準備するもの

### 1. 実験機器・器具

- ・ クリーンベンチ
- ・ 炭酸ガス培養器
- ・ ピペットマン
- ・ 倒立型位相差顕微鏡
- ・ 分光光度計
- ・ プレートシェーカー
- ・ 乾熱滅菌器
- ・ オートクレーブ
- ・ ピペットエイド (ドラモンド等)
- ・ 血球計算盤
- ・ 1.5 mL マイクロチューブ
- ・ 15 mL プラスチックコニカルチューブ (滅菌済, ファルコン等)
- ・ セルカルチャーディッシュ (直径 60 mm, falcon 353002 等)
- ・ セル (吸光度測定用)
- ・ 滅菌メスピペット 10 mL
- ・ パスツールピペット (乾熱滅菌したもの)

### 2. 試薬

- ・ ダルベッコ変法イーグル培地 ; DMEM (SIGMA 等)
- ・ 牛胎児血清 ; FCS (EQUITE CH-BIO 等)
- ・ 抗生物質 (Penicillin-streptomycin solution 100 x (SIGMA 等),  
HEPES, Free Acid (SIGMA 等))
- ・ トリプシン-EDTA (生研) 溶解液 (デンカ生研株式会社 等)
- ・ 脂肪細胞分化誘導阻害物質 ; 塩化ベルベリン (和光純薬 等)。

ベルベリンはキハダ（ミカン科落葉高木）内皮の抽出物及びキハダに含まれる有効成分。強い脂肪細胞分化誘導抑制作用をもつ。塩化ベルベリンを 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  添加して培養すると、細胞内へのトリグリセリドの蓄積は 5 分の 1 以下に減少、細胞内 GPDH 活性は 60 分の 1 以下になることが報告されている<sup>4)</sup>。

- Adipogenesis Assay Kit（アディポジェネシスアッセイキット，CHEMICON，ECM950）キットには分化誘導を引き起こす因子[イソブチルメチルキサンチン (IBMX Solution)，インスリン (Insulin Solution)，デキサメタソン (Dexamethasone (DEX) Solution)]と，形成された脂肪滴の発色用試薬 (Oil Red O solution, Wash Solution, Dye Extraction Solution) を含む。

- 1) Adipogenesis Initiation Media（分化誘導培地。DMEM/10%FCS/0.5 mmol/L IBMX/1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  dexamethasone Solution；IBMX Solution 及び Dexamethasone Solution を DMEM/10%FCS で 1:1,000, 1:10,000 の割合で希釈する。4°C で 6 週間保存可能。）
- 2) Adipogenesis Progression Media（分化培地。DMEM/10%FCS/10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  insulin；Insulin Solution を DMEM/10% FCS で 1:1,000 に希釈する。4°C で 6 週間保存可能。）
- 3) Adipogenesis Maintenance Media（継代培地。DMEM/10%FCS）

- PBS（SIGMA，Dulbecco's phosphate buffered saline, 10 x 等）

### 3. 前駆脂肪細胞株

脂肪細胞へと分化する性質を持つ細胞が細胞株として 1974 年に確立された。この細胞はマウス胎児由来の 3T3 (Swiss albino) 繊維芽細胞株より分離されたもので、脂肪細胞へと分化する能力を持っている。現在この細胞 (3T3-L1) は American Type Culture Collection (catalog No. ATCC-CCCL-92.1) から、また培養細胞株を取り扱っているメーカー等からも入手可能である。更に、この 3T3-L1 細胞からは脂肪細胞への分化能がより高い細胞 (3T3-F442A) がクローン化されている。また、遺伝的肥満マウス (BL/6Job/ob) の副睾丸脂肪細胞の脂肪細胞から脂肪細胞へと分化する能力のある繊維芽細胞様細胞 (ob 17) が確立されている。ここでは、広く用いられている 3T3-L1 細胞を用いた手法について述べる。

### 4. 分化脂肪細胞の特徴

#### 1) 形態的特徴

分化すると繊維芽細胞の鋭角的な形態から丸い形になり、細胞内に微細な多くの脂肪滴が見られるようになる。分化が進むと、脂肪滴は大きくなるが単房とはならず多房性のままである。Oil Red O solution で染色すると脂肪滴は赤く染色さ

れ区別しやすい。

## 2) 生化学的特徴

分化の過程は新たな遺伝プログラムの進行の上に成り立っているが、実際脂肪細胞への分化に伴って多くのタンパク質の変化が電気泳動によって認められている。この中でも、グリセロール-3-リン酸脱水素酵素 (GPDH) は分化によって活性が 1,000 倍ほど上昇するので脂肪細胞への分化の指標としてよく測定されている。測定は GPDH 活性測定キット (WAKO, 308-15881 等) を用いて簡便かつ安定した結果を得ることが可能である (食品機能性評価マニュアル集 第 II 集 p.130-135 参照)。

## プロトコール

### 1. サンプル調製

種々の抽出法で調製した試料を検定することが出来る。水や低濃度の塩溶液で抽出したものは、滅菌フィルターを通す。有機溶媒等で抽出したものは DMSO に溶解して添加する。ここでは、例として本研究室で行っている農作物試料の調製方法について示す。

- 1) 農作物試料はフードプロセッサーで粉碎後、凍結乾燥 (FD) する。
- 2) ねじ口試験管に FD 試料 0.1 g 及び 5 mL のメタノールを加え、回転シェーカーにかけ 16 時間以上振とうする。
- 3) 3000 rpm, 5 分間遠心し、上清 1 mL を褐色広口バイアルに回収する。
- 4) 窒素ガスを吹き付け、適量の DMSO に溶解する (使用時まで $-20^{\circ}\text{C}$ 保存)。

### 2. 培養法

#### 1) 細胞の増殖及び保存

培地は 10 % 牛胎児血清を含む DMEM を基本的に用い、通常 5 % 炭酸ガス-空気、飽和水蒸気、 $37^{\circ}\text{C}$  の環境下で培養する。抗生物質はペニシリン (100 units/mL)、ストレプトマイシン (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 及び培地の pH を安定させるため HEPES を添加する。500 mL の DMEM 培地に対し、ペニシリン-ストレプトマイシン (100 倍溶液) を 5 mL, 1 mol/L HEPES (Free Acid) は 7.5 mL 加える。培地交換は週間に 3 回程度行う。

入手した 3T3-L1 細胞は顕微鏡で細胞の密度を見て、コンフルエンスにならない、まだまばらな成長期の時期に継代しなければならない。コンフルエンスになるまで増殖させたり、また継代を繰り返した細胞は分化能力が低下し使えなくなったりするので、最初に凍結保存用の細胞を大きなディッシュ、フラスコを用いて十分増やしておくことが重要である。

## 2) 脂肪細胞への分化

上記 1 の方法で培養した細胞を約 3 日毎に培地交換 (10%FCS/DMEM) (5 mL/60 mm dish) すると倍加時間約 30 時間で 5~6 日目にはコンフルエンスに達する。細胞がコンフルエンスに達した後, 1  $\mu\text{mol/L}$  DEX, 0.5 mmol/L IBMX, を含む 10%FCS-DMEM を加え 2 日間培養処理する。次に, 10  $\mu\text{g/mL}$  Insulin を含む 10%FCS-DMEM 培地を加え 2 日間培養処理する。その後 10% FCS/DMEM を 1 週間に 3 回培地交換しながら培養を続ける。

DEX などを含む培地での 2 日間の処理後, 細胞質に球形の微細な透明の脂肪滴が見られるようになる。高い分化能を持った細胞であれば, 1 週間するとほとんどの細胞に脂肪滴が認められるようになる。この状態で培地交換しながら 1 ヶ月間以上脂肪細胞として保つことが出来る。分化能が低い細胞の場合, 脂肪滴の見られる細胞の割合が低く, 繊維芽細胞の割合が高くなる。継代を繰り返すと分化能が低下するので凍結保存した細胞に戻り, 実験を行う。分化能が低下した細胞についてはその中からクローニングによって分化能の高い株を再び得ることが出来る。

牛胎児血清の代わりに分化誘導前後の培養には安価である仔牛血清を用いることも出来る。その場合, 分化誘導時のみ牛胎児血清を含む培地を用いる。以下には、Adipogenesis Assay Kit を用いた脂質代謝改善機能評価法について記す。

## 3. 操作の実際

- 1 日目 ; マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 は 10%FCS を含む DMEM に  $3 \times 10^4$  細胞/mL の密度で浮遊させ, この細胞懸濁液 5 mL を 60 mm ディッシュに巻き込む。1~2 日間 37°C, 5%CO<sub>2</sub> で培養。(1  $\times 10^4$  細胞/mL の場合, コンフルエントになるまで約 4 日かかる。)
- 3 日目 ; コンフルエントになった細胞の培地を分化誘導培地 (Initiation Media) に交換し, 2 日間 37°C, 5%CO<sub>2</sub> で培養。培地交換は出来るだけ穏やかに行い, 細胞の剥離を防ぐ。ネガティブコントロール用の 60 mm ディッシュには継代培地を用いる。
- 5 日目 ; 誘導培地を分化培地 (Progression Media) に交換し, 2 日間 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培養。ネガティブコントロール用の 60 mm ディッシュの培地は継代培地に交換する。
- 7 日目 ; 分化培地を継代培地 (Maintenance Media) に交換し, サンプル\*1 を添加する。2 日間 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 培養。ネガティブコントロール用の 60 mm ディッシュの培地は継代培地に交換する。

9 日目；継代培地を再び継代培地に交換し，再度サンプル\*<sup>1</sup> を添加する．2 日間 37℃，5%CO<sub>2</sub> で培養．

11 日目；検出．

\*<sup>1</sup> サンプル調製の詳細な抽出方法は「サンプル調製」の項を参照．DMSO に溶解しているサンプルは，60 mm のディッシュに対して 20 μl 以上加えないこと．大量の DMSO は細胞の増殖を阻害する．

#### 4. 検出方法

- 1) 培地を除去する．
- 2) PBS を 5 mL 加える．
- 3) 軽く振とうした後、PBS を除去する．
- 4) 2) → 3) をもう 1 回繰り返す．
- 5) 1.25 mL の Oil Red Solution を加える．
- 6) 室温で 15 分インキュベートする．
- 7) 上澄みを除去する．
- 8) 2.5 mL の washing solution を加え，軽く混ぜる．
- 9) 上澄みを除去する．
- 10) 8) → 9) をもう 2 回繰り返す
- 11) スキャンもしくは写真撮影する（図 2 A, C 参照）．
- 12) Dye Extraction Solution を 625 μL 加える．
- 13) プレートシェーカーで振とうする（15～30 分）．
- 14) セルに移して 520 nm の吸光度を測定する（図 2 B 参照）．

\*<sup>24</sup> ウェルマルチウェルプレートを用いると一度に多くのサンプルを測定できるが，均一に細胞を撒けず，データにムラが出ることもあるため注意が必要である．

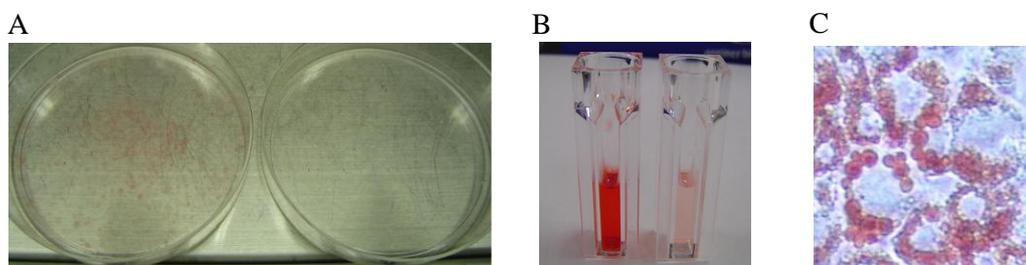


図 2 Oil Red O solution による脂肪滴の染色

A ; Oil Red Solution で染色後 washing solution で洗浄した状態．サンプルとして左ディッシュは DMSO，右ディッシュはベルベリンを添加． B ; A に Dye Extraction Solution を添加し Oil Red O solution を溶出． C ; 3T3-L1 細胞の顕微鏡写真．油滴が

Oil Red で赤く染色されている。

## 5. データの取りまとめ

脂肪細胞分化誘導試験は反復試験(2~3 連)し、測定結果は平均値と標準偏差で表す。分化の程度は細胞中の油滴の状況を顕微鏡で見れば簡単に分かる。ここではオイル・レッド O の染色程度による評価方法を示したが、より定量的な指標としては GPDH 活性や油滴のトリグリセリドの定量があり、キットにより簡便に調査出来るため、多く用いられている。他、研究者によって多くの生理的・分子生物学的測定が行われている。

## おわりに

生活習慣の欧米化に伴い、高血圧、高脂血症、糖尿病等に代表される生活習慣病の罹患者数の増加が近年問題となっている。そしてこれらに共通する因子として、内臓脂肪の増加を特徴としたメタボリックシンドロームという概念が提唱された<sup>8,9)</sup>。成熟した脂肪細胞はもはやその数において増加することはないので、脂肪組織の増大には前駆脂肪細胞が寄与する可能性が示唆されている<sup>10)</sup>。脂肪細胞は中胚葉系多機能細胞が分化してできるが、同じ中胚葉系前駆細胞である 3T3-L1 細胞は DEX, IBMX, インスリンによる刺激で効率よく脂肪細胞に分化することが知られており<sup>8)</sup>、脂肪細胞分化の研究に広く用いられている。3T3-L1 細胞を用いた脂質代謝改善機能評価法によりスクリーニングされる様々な素材が、メタボリック症候群予防・治療に役立つ可能性がある。更に、脂肪細胞への分化がどのような因子に影響を受けるかが解明されれば、肥満等に起因する疾患の原因解明につながる事が期待できる。

## 参考文献

- 1) 関谷敬三, VI 脂質代謝改善機能評価法 (VI-1 前駆脂肪細胞株 (3T3-L1) の培養法), 「食品の機能性評価マニュアル集」, (農林水産省農林水産技術会議事務局, 農林水産省食品総合研究所, 編集・発行), pp.96-99 (1999).
- 2) 関谷敬三, 前駆脂肪細胞 (3T3-L1) を用いた代謝機能評価, 「食品機能研究法」, (篠原和毅, 鈴木建夫, 上野川修一編著, 光琳) pp. 133-136 (2000).
- 3) アディポジェネシスアッセイキット, (CHEMICON International, Inc.), 付属プロトコール (2004).
- 4) 新本洋士, 岩下恵子, 小堀真珠子, 木村俊之, 山岸賢治, 鈴木雅博, マウス 3T3-L1 細胞に対するキハダ抽出物のトリグリセリド蓄積抑制作用, 食科工, **52**, 535-537 (2005).

- 5) Yuan, M., Konstantopoulos, N., Lee, J., Hansen, L., Li, Z.W., Karin, M. and Shoelson, E., Reversal of obesity-and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science*, **31**,1673-1677 (2001).
- 6) Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. and Matsubara, K., cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (adipose most abundant gene transcript 1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **16**, 286-9 (1996).
- 7) Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., Murakami, K., Ohteki, T., Uchida, S., Takekawa, S., Waki, H., Tsuno, N.H., Shibata, Y., Terauchi, Y., Froguel, P., Tobe, K., Koyasu, S., Taira, K., Kitamura, T., Shimizu, T., Nagai, R. and Kadowaki, T., Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*, **12**, 423, 762-769 (2003).
- 8) Reaven, G.M., Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, **37**, 1595-1607 (1988).
- 9) Fujioka, S, Matsuzawa, Y., Tokunaga, K. and Tarui, S., Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity. *Metabolism*, **36**, 54-59 (1987).
- 10) Spiegelman, B.M. and Flier, J.S., Adipogenesis and Obesity: Rounding Out the Big Picture. *Cell*, **87**, 377-389 (1996).
- 11) Rubin, C.S., Hirsch, A., Fung, C. and Rosen, O.M., Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem.*, **253**, 7570-7578 (1978).

## 4. 基本的な実験操作

### 1) モノクローナル抗体の作製に関する実験操作

玉川大学農学部 新本 洋士

#### はじめに

タンパク質などの分子を免疫学的手法で検出するためには、抗体を用いた酵素免疫測定(ELISA)、フローサイトメトリー、イムノクロマト、ウェスタンブロッティング、さまざまな免疫染色法等が用いられる。ヤギやウサギなどの動物に目的タンパク質を抗原として免疫して得た血清には、目的タンパク質のいくつかの抗原決定部位(エピトープ)に対する抗体が含まれる。このような抗体をポリクローナル抗体と呼ぶ。免疫された動物のなかで、たくさんの細胞クローンが抗体を分泌しているからである。これに対して、モノクローナル抗体は単一の抗体分泌クローンによって生産される抗体である。

本項では古典的なマウスモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ(融合細胞)の作製について述べる。モノクローナル抗体を得る方法として、マウス以外の動物(ラット、ウサギ、ヒト)によるハイブリドーマ、ファージに抗体遺伝子を組み込んでファージ表面に抗体の抗原結合部位を発現させる方法(ファージディスプレイ法)、植物に抗体を作らせる方法などもある。

#### モノクローナル抗体作製の概要

- ・マウスに目的タンパク質を注射して免疫する。
- ・脾臓細胞を取り出し、マウス骨髄腫細胞(ミエローマ)と細胞融合する。
- ・選択培地でハイブリドーマだけを増殖させる。
- ・培養上清の抗体を測定する。
- ・抗体陽性の細胞群から抗体を分泌する単一クローンを分離する(クローニング)
- ・得られたクローンを培養し、モノクローナル抗体を得る。

#### 1. マウスの免疫

1) 抗原: マウスに免疫する抗原は、精製したタンパク質などがよい。精製度がそれほど高くないものでもよいという記述もあるが、なるべく精製されたものを用いる。不純物に対する抗体が優勢になっては効率が悪い。不活性化した病原菌の菌体を免疫することもできる。滅菌した生理食塩水やリン酸生理緩衝液(PBS)に溶解あるいは浮遊させる。

抗原の濃度は0.5mg/ml程度までとし、1ml容のガラスシリンジに0.5mlとる。もう1本のガラスシリンジにフロイントの完全アジュバント(FCA)0.5mlを取り、交流針で2本のシリンジを連結する。内容液を双方のシリンジ内を行き来させて乳化させる。しだいに抵抗が増してくるのでそのまましばらく乳化を続ける。プラスチック製のシリンジは使えない。水の上に乳化した抗原溶液を1滴落とし、エマルションが小さく浮かんで安定した状態であれば免疫に用いる。エマルションが水の上で広がっていくようであれば乳化が足りない。

- 2) 免疫：8週齢程度のBalb/cマウスの皮下数箇所をFCAと乳化させた抗原溶液、合計0.2ml程度注射する。2～3週間後に、FCAを用いず、抗原溶液のみを静脈注射あるいは腹腔投与する。抗原量は初回と同じ量とする。数日後、少量の採血を行い、抗体が上昇しているかどうかを測定する。血清を希釈して1000倍希釈程度でも陽性となることを確認する。採血はマウスを麻酔し、眼底採血するか、あるいは尾錠脈を注射針で傷つけて出血する微量の血液を採取する。

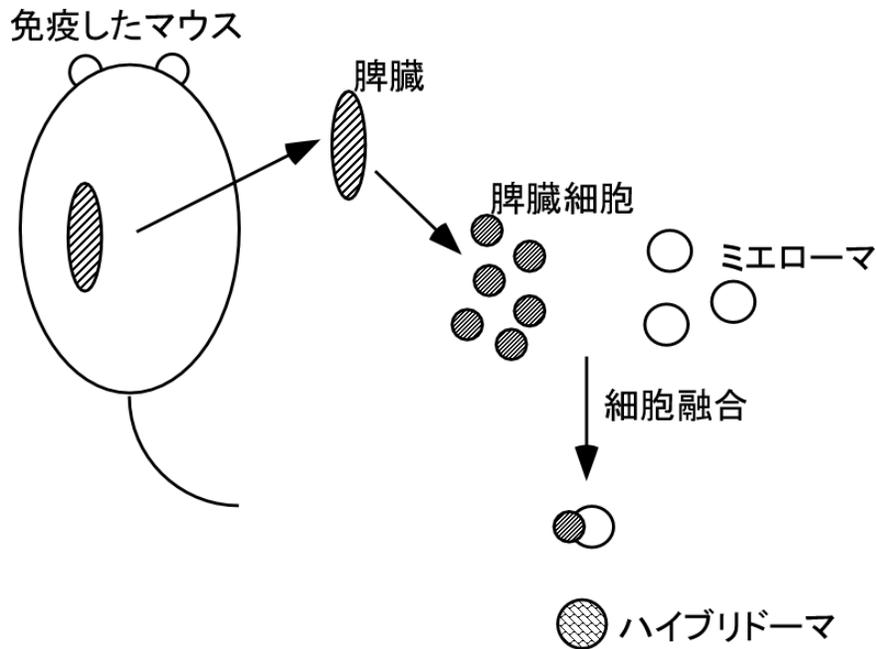


図1 マウスハイブリドーマ作製の概要

## 2. ミエローマの培養

- 1) 細胞株：ここでは抗体非分泌性のミエローマSP2/O(SP2/O-Ag14)を用いる。NS-1やP3X63などのミエローマを用いることもできる。ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)に牛胎児血清(FCS)を10%添加して培養する。DMEMは市販の液体

培地を用いる。抗生物質を添加して用いる。FCS はハイブリドーマの培養に適したロットを選ぶ。

- 2) SP2/O の培養：10cmシャーレで継代する。週に2回，1:10～1:20にスプリットして継代する。SP2/Oは浮遊細胞ではあるが，比較的強くシャーレ底に付着するので，ピペットを用い，培地をシャーレ底面に吹き付けながら丁寧に浮遊させていく。この0.5mlを新しい10cmシャーレに移し，ここに新しい培地9.5mlを加えれば1:20で継代培養したことになる。

細胞融合の3日前に1:20で継代したSP2/Oの培養シャーレ(10cm)を10枚程度用意しておく。当日細胞を50mlチューブに回収し，遠心する。培地を吸引除去し，FCSを含まないDMEMを加えて丁寧に浮遊させ，再び遠心する。この洗浄操作を3回繰り返し，最終的にDMEMに浮遊させた細胞の密度を測定する。

### 3. 脾臓細胞の調製

- 1) マウスの解剖：マウスは軽く麻酔してピンセットなどで頸部をおさえ，尾を引っ張って頸椎脱臼により屠殺する。全身を消毒用エタノールで拭き，腹部をヨードチンキで拭く。解剖台に四肢を伸ばした状態で腹部を前にしてはり付けにし，解剖用ハサミで下腹部から肋骨上部まで皮膚を切開して左右にピンでとめる。新しいハサミで腹膜を切開する。マウスを正面に見て右奥に脾臓があるが，たいていは肝臓の裏に隠れている。色は肝臓と似ている。脂肪組織などが付着している場合は取り除く。丁寧に脾臓を切り取り，滅菌シャーレに入れる。
- 2) 脾臓細胞の調製：細胞融合に先立って，脾臓内の細胞をばらばらにする必要がある。ここではスライドグラスを用いた方法を紹介する。

10cmシャーレにDMEMを10ml入れ，ここに脾臓を置く。滅菌したスライドグラス2枚を左右の手に持ち，右手のスライドグラスで脾臓の先端部を少し切る。脾臓は袋状の外皮の中に細胞が詰まったソーセージ状の組織である。左手のスライドグラスで脾臓を軽く抑えながら，右手のスライドグラスで脾臓内部の細胞を切った部分からしごき出す。脾臓細胞は大きなかたまりとして取り出されるので，これをスライドグラスではさんでつぶしてばらばらにする。

ピペットで脾臓内部の細胞のみを50mlチューブに移し，シャーレに残った細胞を10mlのDMEMで回収する。さらにチューブの中で強いピペッティングを行い，かたまった細胞をばらばらにしていく。細胞のかたまりをピペットで吸って，ピペットの先端をチューブの底につけ，わずかな隙間から細胞を押し出すとほぐれることがある。

脾臓細胞をよく懸濁し，2分程度静置すると，脾臓の袋部分の破片やもはやばらばらにならない大きな組織がチューブの底に沈殿する。沈殿部分を取らない

ように浮遊している脾臓細胞懸濁液を慎重に新しいチューブに移す。細胞を遠心し、上清を除く。DMEMを10ml加えて浮遊させ、遠心洗浄を3回繰り返した後、DMEMに再浮遊させ、細胞密度を測定する。脾臓のリンパ球はミエローマに比べて小さい。赤血球が混在しているのでこれを数えないよう注意する。

#### 4. 細胞融合と選択培養

1) 細胞融合：脾臓細胞全量と $5 \times 10^7$ 個のSP2/Oを50mlチューブ中で混合する。

強めに遠心して細胞を沈殿させ、上清がなるべく残らないように丁寧に上清を吸引除去する。赤血球と白血球+SP2/Oの層になって見えることがあるがそれでよい。チューブをクリーンベンチの作業台に打ち付けるようにして細胞のかたまりをチューブ底面に広げておく。ここにあらかじめ37℃に温めておいた1mlの50%ポリエチレングリコール溶液(PEG)を1分間かけて加える。1ml容量のメスピペットの先端で細胞のかたまりをほぐすようにかきまわしながらPEGを加える。添加し終わったら、2～5分間静置する。

あらかじめ37℃に温めておいたDMEMでPEGを希釈していく。一気に希釈せず、最初に1ml、30秒後に2ml、さらに30秒後に4ml、8mlと加える。この際、激しくかくはんせず、チューブを左手で回転しながらPEG溶液をDMEMで希釈していくとよい。低速で15分間遠心して細胞を沈殿させる。上清を吸引除去し、10%FCSを含むDMEMに懸濁する。培地は100mlのボトルに70ml入れて37℃であらかじめ保温しておき、細胞をこの培地で懸濁しながら、全量をボトルに移す。この細胞懸濁液70mlを96穴マイクロカルチャープレート5枚に分注する。10mlのメスピペットを用い、2～3滴ずつ滴下するか、8連あるいは12連のピペットで150μLずつ分注する。

2) 選択培養：融合翌日からヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン培地

(HAT培地)による選択培養をはじめ。アミノプテリンによってde novo回路におけるヌクレオチド合成がブロックされる。SP2/Oは6-チオグアニン耐性のヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT)欠損株であるため、サルベージ回路を用いての核酸合成もできない。したがってHAT培地中ではSP2/Oは死滅する。脾臓細胞はもともと増殖しないが、脾臓細胞と細胞融合したハイブリドーマは脾臓細胞からHGPRTを供給されるため、HAT培地中で増殖することができる。

培地のおよそ1/2を吸引除去し、ここに新しいHAT培地を加える。その後、2～3日置きに培地の半量を除去し、HAT培地を添加しつづけ、2～4週間培養する。顕微鏡下でハイブリドーマの増殖が見られるようになったら、抗体チェックの準備を行う。

## 5. 酵素免疫測定法(ELISA)による抗体の検出

- 1) 準備：抗原溶液を0.05mol/Lの重炭酸ナトリウム溶液で希釈し(タンパク質濃度0.1-10 $\mu$ g/ml) 60 $\mu$ LをELISAプレートに分注する。冷蔵庫に1晩置いて抗原をプレートに吸着させる。抗原溶液を捨て、プレートをブロックエース(1/4に希釈したもの)で満たして室温で1時間ブロッキングを行う。ブロックエースを捨て、プレートを0.05%Tween20を含むPBS(PBS-Tween)で3回洗浄後する。
- 2) 培養上清の分注：洗浄したプレートに培養上清を50 $\mu$ Lずつ分注する。8連ピペットを用いるとよい。ピペットのチップラック、ハイブリドーマを培養している培養プレート、ELISAプレート、いずれも8x12の96単位であるので、培養上清を移す位置を間違えることはほとんどない。培養上清を入れたELISAプレートを室温で1時間静置、上清を捨てPBS-Tweenで3回洗浄する。
- 3) 2次抗体と基質による発色：1/1,000~1/10,000に希釈した西洋わさびペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体(予備実験で希釈倍率を決めておく)を2次抗体として50 $\mu$ L加え、さらに室温で1時間静置する。ELISAプレートをPBS-Tweenで6回洗浄し、ABTSなどのペルオキシダーゼ基質溶液100 $\mu$ Lを添加し、プレートに結合した酵素活性を測定する。必要であればマイクロプレートリーダーで吸光度を測定するが、ほとんどの場合はデジタルカメラで発色を撮影しただけの記録でよい。
- 4) 抗体の特異性の確認：得られた抗体が目的のタンパク質等の分子に結合するものであることを確かめる必要がある。ひとつはブロッキングしたELISAプレートのみ(抗原をコートしていない)と反応しないことを確かめることである。非特異的結合をする抗体や、ブロッキング試薬に対する抗体が得られている場合がある。もうひとつは、ウェスタンブロッティングによって目的のバンドにたしかに結合することを証明することである。

## 6. ハイブリドーマのクローニング

- 1) オリゴクローンでの増殖：ELISAで陽性であった培養ウェルは、ハイブリドーマが十分増殖したら24穴プレートへ培養を拡大する。培地は最初は1mlとし、2mlまで増やす。この際、アミノプテリンを含まないHT培地に変える。必要であればクローニング前の細胞を6cmシャーレ程度にまで増やし、凍結保存しておく。
- 2) クローニング：96穴培養プレート2~5枚にハイブリドーマを薄く播種する。穴あたり0.2-0.5個播種するとよい。具体的には70mlの培地にハイブリドーマが100-250個浮遊させ、96穴プレート5枚に播種する。ハイブリドーマは96プレート穴であれば、1個の細胞からも増殖できるので、特にフィーダー細胞は必要ない。増殖が悪い場合には、丸底の96穴プレートを用いるとよい場合もある。適

宜培地を新しいものに半量ずつ交換する。

顕微鏡下で1個の細胞からだけ増殖していた穴を探し、ELISAにより目的の抗体を分泌しているクローンを探す。ただし培地交換の際に細胞のかたまりが分散してしまうこともあるので、あまり厳密になる必要はない。陽性クローンがみつかったら、同様のクローニングを再度行い、得られたクローンを拡大培養する。なるべく早いうちに多数のアンプルを液体窒素中に凍結保存しておく。

HT培地からSP2/Oの培養に用いる通常のFCS-DMEMに変えるタイミングは、初回のクローニング終了後に培養を拡大した段階がよいが、早い段階で変えられるならそのほうが培地が安上がりである。

## 7. 大量培養

以前はマウスの腹腔にハイブリドーマを移植し、腹水中に分泌された抗体を回収する方法が用いられていたが、実験動物愛護の立場から、マウスを用いたモノクローナル抗体生産は行われなくなった。代わって大量培養、高密度培養によるモノクローナル抗体生産が行われている。

実験室レベルでモノクローナル抗体を検出に用いるのみであれば、10mlシャーレで培養した培養上清を100mlも準備しておけば足りる。より大量には小型のスピンナープラスチックやホローファイバーを用いた高密度培養が行われる。FCSを含まない培地での培養、すなわち無血清培養も好んで行われている。

### おわりに

液体培地が安価に市販され、PEGも調製済みのものが入手できる。HATもHT(アミノプテリンを含まない)も添加剤としてミックスされたものがあり、ハイブリドーマ作製における試薬調製の手間はそれほどかからない。試薬カタログには多数のモノクローナル抗体が掲載されているが、個々の研究者が自分が対象としているタンパク質等に対するモノクローナル抗体を持つことは、研究のスピードを飛躍的に向上させる。

まず、電気泳動後のウェスタンブロッティングによる検出が容易になる。組織染色やフローサイトメトリーによる細胞や組織での発現が測定できる。また、モノクローナル抗体を固定させたカラムによる目的タンパク質のアフィニティー精製が可能になる。

研究対象のタンパク質等に対する抗体が市販されていない場合には、ポリクローナル抗体作製を業者に依頼する前に、モノクローナル抗体の作製を考えてみるのも一つの選択肢である。

## 参考文献

- 1) Köhler, G. and Milstein, C., Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature*, **256**, 495-497 (1975).
- 2) Campbell, A.M.(大沢利昭監訳), モノクローナル抗体(生化学実験法10), 東京化学同人(1989).
- 3) 戸沢秀樹, モノクローナル抗体の作製法, *Med Technol*, **16**, 1157-1162 (1988).
- 4) 海老原充, 小野寺一清, 迅速なモノクローナル抗体作製法:λファージを用いた抗体ライブラリー, *Biomedica*, **6**, 323-328 (1991).
- 5) 広橋説雄, モノクローナル抗体の作製と応用上の問題点, *病理と臨床*, **2**, 1441-1446 (1984).

## 5) B16 細胞を用いたメラニン産生の評価

(社) 日本食品科学工学会 三上 一保  
玉川大学農学部 新本 洋士

### はじめに

メラニンとは生体内にみられる褐色ないし黒色の色素の総称で、皮膚の色、毛髪の色を決定する色素である。メラニンの生合成経路は詳しく研究されており、メラノサイトと呼ばれる色素細胞中のメラノソーム顆粒中でチロシンがチロシナーゼによって酸化され、何段階もの酸化重合過程を経て色素が合成される。

マウスの黒色肉腫細胞である B16 細胞を用いることにより、農産物や食品がシミやそばかすの原因となるメラニンの産生を抑制するか否かを容易に培養細胞で評価することが出来る。

### 準備するもの

#### 1. 実験器具

- ・クリーンベンチ
- ・分光光度計
- ・CO<sub>2</sub> インキュベーター
- ・遠心器
- ・倒立型位相差顕微鏡
- ・オートクレーブ
- ・ソニケーター（発信器先端投入型）
- ・ボルテックスミキサー
- ・ピペットエイド
- ・血球計算盤
- ・培養ピペット
- ・滅菌済みパスツールピペット
- ・ピペットマン
- ・1.5mL マイクロチューブ
- ・15mL ファルコンチューブ（Falcon 352096 等）
- ・セルカルチャーディッシュ（Falcon 353002 等）
- ・セル（可視光線用ディスポーザブル 198-19-35-02 等）
- ・滅菌フィルター（NALGENE, 290-3320, SFCA, Bottle top Filter, 150ml, 0.2µm pore size 等. 培地のフィルター滅菌用.)

## 2. 試薬

- ・炭酸水素ナトリウム (和光純薬等)
- ・ダルベッコ変法イーグル培地「ニッスイ」粉末組織培養用炭酸水素ナトリウム不含 (日水製薬株式会社等)
- ・メラニン (ナカライ等)
- ・リノール酸 (和光純薬等)
- ・アルブチン (和光純薬等)
- ・DC プロテインアッセイキット II (BIO-RAD, 500-0112JA 等, タンパク含量測定用.)
- ・PS (Penicillin Streptomycin, SIGMA 等)
- ・HEPES, Free Acid (SIGMA 等)
- ・PBS (DULBECCO'S PHOSPHATE BUFFERED SALINE, SIGMA, 10 x 等)
- ・FCS (Fetal Calf Serum, 牛胎児血清)
- ・トリプシン-EDTA (生研) 溶解液 (デンカ生研株式会社等)
- ・NaOH (和光純薬等)

## 3. 細胞及び培地

### 1) 細胞

マウス由来のメラニン高生産性 B16C7 メラノーマ細胞を用いる。財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 ヒューマンサイエンス研究資源バンクより元株の B16 が分譲可能 (JCRB0202)。

### 2) 培地

フェノールレッド濃度が低い DMEM 培地に 10% 牛胎児血清 (FCS) 及び 1% PS を添加したもの。細胞は高濃度のフェノールレッドを含む DMEM を用いると B16 細胞が白化するため、フェノールレッド濃度が低い培地を使用する必要がある。

## プロトコール

### 1. 培地の調製

フェノールレッド濃度の低い DMEM を調製する。以下はダルベッコ変法イーグル培地「ニッスイ」粉末組織培養用炭酸水素ナトリウム不含 (日水製薬株式会社) を用いた調整方法。

- 1) 10g を蒸留水に溶解し、全量を 1000mL とする (培地は黄色)。
- 2) 炭酸水素ナトリウムを 1.2g 加える (培地は濃いピンク色になる)。
- 3) 培地の色が黄色に戻るまで炭酸ガスを吹き込む。
- 4) 滅菌フィルターを用いて濾過滅菌する。

### 2. 細胞の播種及びサンプル添加

- 1 日目;  $5 \times 10^4$ /mL の密度の B16 細胞を, 5 mL ずつ 6 cm ディッシュにまきこむ.  
培地は 10% FCS 含有 DMEM を用いる.  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  で 24 時間培養. 1 つの試料につき 3 枚のディッシュを用いる (3 連).
  - 2 日目; 培地を吸引除去し, 新しい培地 (10% FCS-DMEM) に交換し, サンプルを加える.  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  で 48 時間培養.  
(注) DMSO に溶解しているサンプルを使用する場合は, 培養液 5mL あたり 20 $\mu\text{L}$  程度とする. この場合 DMSO の終濃度は 0.4% であるが, 理想的には 0.1% 程度にした方が細胞毒性の影響が出ない.
  - 4 日目; 培地を吸引除去し, 新しい培地 (10% FCS-DMEM) に交換し, サンプルを加える.  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  で 24 時間培養.
  - 5 日目; メラニン及びタンパク含量を測定する (3., 4., 5. を参照).
3. メラニン及びタンパク含量測定用細胞のサンプリング
    - 1) 培地を吸引除去する.
    - 2) PBS を 5mL 加える.
    - 3) PBS を吸引除去する.
    - 4) トリプシンを 0.5mL 加える.
    - 5) 細胞がディッシュから剥がれ始めたら, FCS を 0.5mL 加えトリプシンの反応を止める.
    - 6) PBS を 4mL 加える (計 5mL).
    - 7) 5mL の細胞懸濁液のうち, 4mL を 15mL ファルコンチューブに入れる (メラニン測定用). 残りの 1mL は 1.5mL マイクロチューブに入れる (タンパク含量測定用).
  4. メラニン含量の測定
    - 1) 3.7) の 15mL ファルコンチューブを 800 rpm で 5 分遠心する.
    - 2) 上澄みを吸引除去する.
    - 3) 1N NaOH を 1mL 加える.
    - 4) 発信器先端投入型のソニケーターを 2 分かけ, 細胞を十分に破碎する (クリアな溶液になるまでしっかりと破碎する).
    - 5) 1mL 容量のセルに入れ 475nm の吸光度を測定する.
    - 6) 市販メラニン標準試薬の水酸化ナトリウム溶液で作成した検量線からメラニン生成量を計算する.
- (注) メラニン生成を強く抑制する陽性対照としてアルブチン, リノール酸 (いずれも 50~100  $\mu\text{M}$  で強い作用を示す) などを用いる<sup>3)4)</sup>.

## 5. タンパク含量の測定

ここでは DC プロテインアッセイキットⅡ (BIO-RAD) を使用する場合の例を示す (Lowry 法によるスタンダードアッセイ法)。詳細は付属マニュアル参照<sup>2)</sup>。

- 1) 3.7) の 1.5mL マイクロチューブを 800 rpm, 5 分遠心する。
- 2) 上清を除去する。
- 3) 沈殿を手でタッピングし, 充分にほぐす。
- 4) 200  $\mu$ L の PBS を加え, ボルテックスでよく混ぜる。
- 5) 100  $\mu$ L の A' 試薬を加え, ボルテックスでよく混ぜる。

(注) A' 試薬は 1mL の A 試薬に対して S 試薬を 20  $\mu$ L 混ぜて作成する。4°C で保存し, 1 週間保存可能。検量線の作成には, 濃度の異なるタンパク質スタンダード溶液 (ウシ血清アルブミン; BSA 等) を 3~5 種類使用する。PBS で希釈したタンパク質スタンダード溶液を 200  $\mu$ L ずつ作成し 100  $\mu$ L の A' 試薬を加える。

- 6) 800  $\mu$ L の B 試薬を加え, ボルテックスでよく混ぜる。
- 7) 室温で 15 分以上インキュベートする。
- 8) 750nm の吸光度を測定する (インキュベートしてから 1 時間以内に測定する)。
- 9) タンパク質スタンダードで作成した検量線から, サンプル中のタンパク質含量を求める。
- 10) 4.7) 及び 9) で得られたメラニン及びタンパク含量より, タンパク質 1mg 当たりのメラニン含量を計算する。

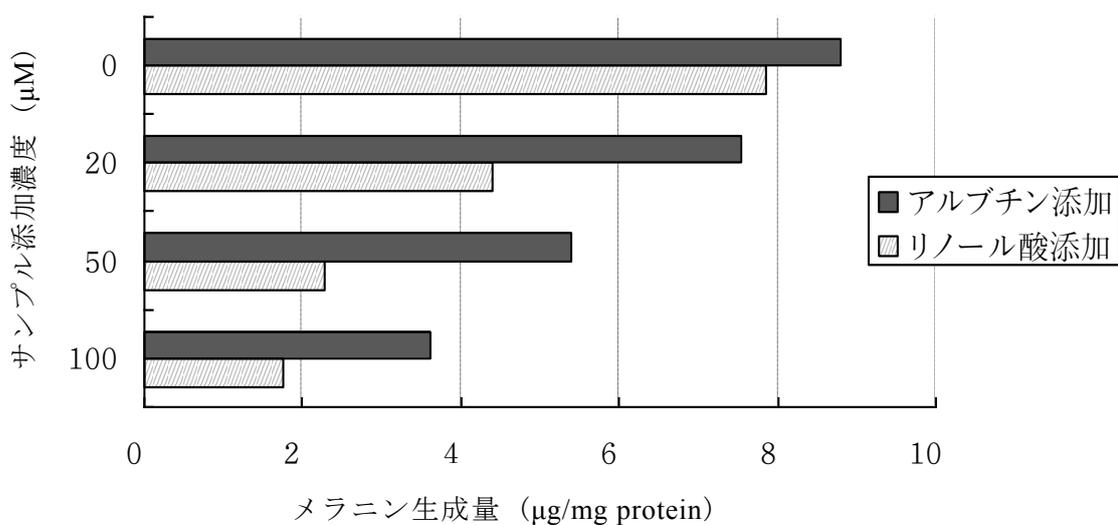


図 1 アルブチン及びリノール酸の B16 細胞のメラニン生成抑制作用

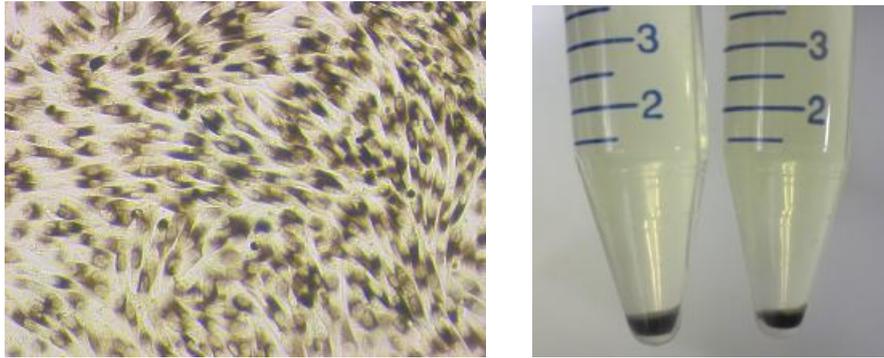


図2 B16 細胞

### プロトコールのポイント

- ・継代培養を長く続けると、フェノールレッド濃度の低い DMEM 培地を用いても B16 細胞が白化してくるため、細胞が黒いうちに実験に必要な細胞を十分に増やし凍結保存し、細胞を確保しておく必要がある。
- ・ソニケーターによる細胞の破碎は充分に行うことが大切である。ソニケーションが不十分であるとクリアな溶液にならず白く濁り、データが得られないことがある。
- ・B16 細胞は接着細胞であるため、トリプシン処理して継代するが、コンフルエントまで培養すると死滅して浮遊することがあるので、ディッシュの底面積の半分程度まで増えた状態で継代培養する。
- ・本項では、6cm シャーレ規模の比較的大きな規模の培養を用いたメラニン生成調整物質の検索法を示したが、この他に 24 穴プレート、96 穴プレートを用いて培養する方法、メラニン生成をプレートリーダーで測定する簡便法などもあるので多数の検体を試験する場合には工夫されたい。

### おわりに

これまで B16 メラノーマ細胞を用いて多くのメラニン産生抑制作用をもつ物質がスクリーニングされている。アルブチン、コウジ酸、ビタミン C、 $\alpha$ -リポ酸、味噌中の遊離リノール酸等はその例で<sup>3) 4) 6)</sup>、一部の成分は美白成分として、シミ・そばかすを薄くして色白に導くことを謳った化粧品に含まれている。しかし、味噌汁を飲むことが美白につながるという直接の証拠にはならない<sup>4)</sup>。多くの植物抽出物においてもメラニン生成を抑制するという報告があり、甘草の根 (*Glycyrrhiza glabra* L.)、ブドウの種、エラグ酸はその例である。

## 参考文献

- 1) 新本洋士, マウスメラノーマ B16 細胞を用いたメラニン生成調節物質の探索, 「食品の機能性評価マニュアル集」, 第 1 版, (農林水産省農林水産技術会議事務局, 農林水産省食品総合研究所編), pp.72-73 (1999).
- 2) プロテインアッセイシリーズ 日本語クイックガイド (BIO-RAD), pp.9.
- 3) 間和彦, 新本洋士, 小堀真珠子, 津志田藤二郎, マウスメラノーマ細胞における脂肪酸のメラニン生成調節作用, 食科工, **47**, 793-796 (2000).
- 4) 間和彦, 新本洋士, 小堀真珠子, 津志田藤二郎, 味噌中のメラニン生成抑制物質の同定, 食科工, **45**, 205-209 (1998).
- 5) Iwashita, K., Kobori, M., Shinmoto, H. and Tsushida, T., Eggplant extract inhibits melanogenesis in B16 melanoma cells. *Food Sci Technol Int Tokyo*, **4**, 159-161 (1998).
- 6) Shoji, T., Masumoto, S., Moriguchi, N., Kobori, M., Kanda, T., Shinmoto, H. and Tsushida, T., Procyanidin Trimers to Pentamers Fractionated from Apple Inhibit Melanogenesis in B16 Mouse Melanoma Cells. *J Agric Food Chem*, **53**, 6105-6111 (2005).

## 6) GPDH 法による 3T3-L1 細胞分化誘導作用の評価

(社) 日本食品科学工学会 井手 三津子  
玉川大学農学部 新本 洋士

### はじめに

食品機能性評価マニュアル集 第 I 集では、脂肪前駆細胞分化誘導試験—前駆脂肪細胞株(3T3-L1)を用いた脂質代謝改善機能評価法—において、Adipogenesis Assay Kit (アディポジェネシスアッセイキット) を用い Oil Red O solution で脂肪球を染色する方法について述べたが、今回は、脂肪合成活性測定用 GPDH 活性測定キットを用いて、グリセロール-3-リン酸脱水素酵素 (E.C. 1.1.1.8 Glycerol-3-phosphate dehydrogenase, GPDH) を測定する方法について述べる。

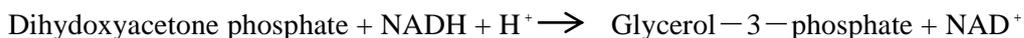
グリセロール-3-リン酸脱水素酵素 (以下 GPDH と略す) は肝細胞や脂肪細胞に存在し、グルコースがトリグリセリドに変換される際に働く律速酵素で、NAD を補酵素としてジヒドロキシアセトンリン酸からグリセロール-3-リン酸を生成する反応を触媒する。GPDH 活性は脂肪前駆細胞が脂肪細胞に分化する際に急増することが知られており、この酵素活性を測定することにより、脂肪細胞の脂肪合成活性を知ることができるため、分化抑制物質のスクリーニングや分化機構を解明する際に主な分化指標として利用される。

### [測定原理]

体内でエネルギーとして使用されなかったグルコースは、グリコリシスによりジヒドロキシアセトンリン酸に変換されるが、GPDHは、ジヒドロキシアセトンリン酸を基質として、L-グリセロール-3-リン酸を生成する反応を触媒する。その際、NADを補酵素とする。生成したグリセロール-3-リン酸は、続いてアシルトランスフェラーゼやホスファチジン酸ホスファターゼの作用を受け、最終的にトリグリセリドになって、細胞内に蓄積される。

GPDHは、肝細胞や脂肪細胞に存在し、糖質が脂肪に変換され、貯蔵される際に作用する律速酵素である。

GPDH は、NAD を補酵素として以下の反応を触媒する。



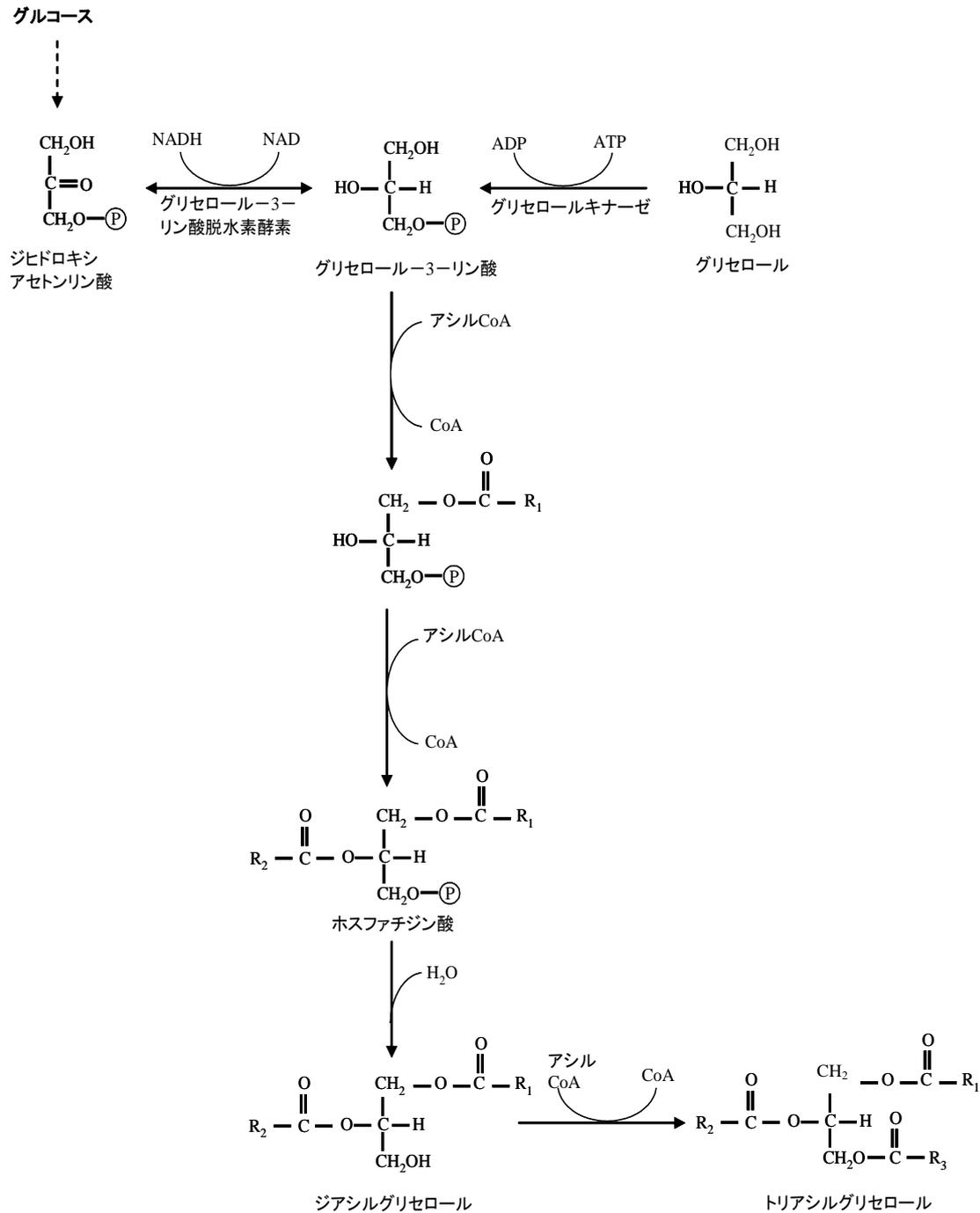


図 1 脂肪の合成経路

$\text{NADH}+\text{H}^+$  ( $\text{NADH}_2^+$ ) が 340nm の波長の光を吸収することを利用して、340nm における吸光度の変化を測定することにより GPDH の活性の測定を行うことができる。

## 準備するもの

### 1. 実験機器・器具

- ・クリーンベンチ
- ・炭酸ガス培養器
- ・ピペットマン
- ・倒立型位相差顕微鏡
- ・分光光度計 (あればカイネティクスプログラム, 加温装置のついているもの)
- ・乾熱滅菌器
- ・オートクレーブ
- ・超音波破砕機 (細い発信器コーン部分を試料に投入できるもの)
- ・小型卓上遠心機
- ・微量高速冷却遠心機
- ・ピペットエイド (ドラモンド)
- ・血球計算盤
- ・1.5mL マイクロチューブ
- ・15mL コニカルチューブ (滅菌済み, Falcon 352096 等)
- ・セルカルチャーディッシュ (Falcon 353002 等)
- ・分光光度計用石英マイクロセル
- ・セルスクレーパー
- ・滅菌メスピペット 10mL (ガラス製, 乾熱滅菌したもの)
- ・パストールピペット (乾熱滅菌したもの)

### 2. 試薬

- ・ダルベッコ変法イーグル培地 ; DMEM (SIGMA 等)
- ・牛胎児血清 ; FBS (JRH biosciences 等)
- ・ペニシリン-ストレプトマイシン (SIGMA 等)
- ・HEPES, Free Acid (SIGMA 等)
- ・トリプシン-EDTA (生研)
- ・脂肪細胞分化誘導阻害物質 ; 塩化ベルベリン (和光純薬等)
- ・脂肪細胞分化誘導試薬 (CHEMICON, アディポジェネシスアッセイキット, ECM950)
  - ・イソブチルメチルキサンチン (IBMX Solution)
  - ・デキサメタゾン (Dexamethasone Solution)
  - ・インスリン (Insulin Solution)
- ・脂肪合成活性測定用 GPDH 活性測定キット (プライマリーセル)
- ・PBS (SIGMA, DULBECCO'S PHOSPHATE BUFFERED SALINE, 10 x 等)

・ DC プロテインアッセイキット (BIO-RAD, 500-0112J A)

[GPDH 活性測定キットの試薬溶液の調製]

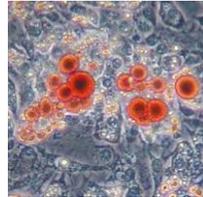
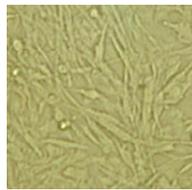
反応基質溶液：ボトルの内容物を 4.2mL の蒸留水で溶解する。4℃で 2 日間安定。

酵素抽出溶液：袋の内容物を 200mL の蒸留水で溶解する。4℃で 4 週間安定。

プロトコール

[検体の調製法]

前駆脂肪細胞株 (3T3-L1) の培養, 脂肪細胞への分化については, 食品機能性評価マニュアル集第 I 集に準じて行う。φ60mm のセルカルチャーディッシュで前駆脂肪細胞 (3T3-L1) を分化させ, 細胞内に脂肪蓄積が認められる段階 (11 日目) 以降の手順を述べる。オイルレッドによる染色は行わない。



脂肪球をオイルレッドで染色したところ

前駆脂肪細胞

脂肪細胞

1. 細胞の培養液を吸引除去する。
2. リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 5mL で 2 回洗浄する。
3. 酵素抽出溶液を 1mL 加える。
4. セルスクレーパーで細胞を剥ぎ取る。
5. 1.5mL のマイクロチューブに集める。
6. 氷上で発信器投入型の超音波破碎機を用いて細胞を破碎する。
7. 細胞破碎溶液を 10000 rpm, 4℃で 5 分間遠心する。
8. 遠心分離した上清の一部を用いて酵素活性を測定する。

また, この上清の一部 (200μL) を用い, DC プロテインアッセイキット II を使ってタンパク質量を測定する。

[GPDH 酵素活性測定方法]

1. 反応基質溶液を 400μL 取り, 分光光度計用セルに入れ 25℃に加温する。  
また, 検体も 25℃に加温しておく。
2. セル内に検体 200μL を入れ, よく攪拌した後, 340nm での吸光度の減少を時間を追って測定する。1 分間当りの吸光度の変化量 ( $\Delta$ O.D.) を求める。分光光度計にカイネティクスのプログラムがあれば, これを用いる。なければ, ストップウォッチで時間を計りながら測定する。3~5 分間測定を行う。
3. 検体を加えたときの吸光度の減少のグラフを作成する。x 軸に測定時間 (min),

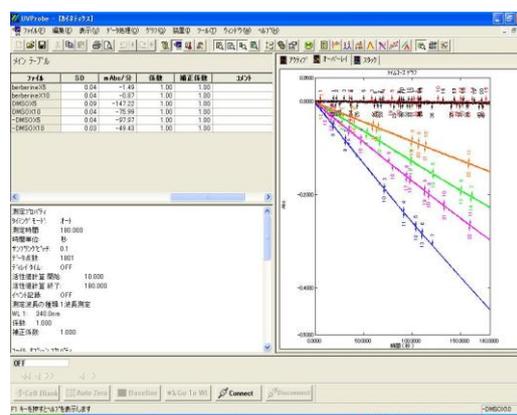
y 軸に 340nm における吸光度の値 (O.D.)をとる。

- ・直線性のあるところで傾き ( $\Delta$ O.D.) を求める。
- ・カイネティクスのプログラムがある分光光度計では、 $\Delta$ O.D./分を自動的に求められる。
- ・測定を開始してすぐにグラフが x 軸と平行になった場合は、検体の濃度が高いと考えられるので、検体を酵素抽出溶液で希釈して測定に用いる。φ60mm のディッシュで脂肪分化細胞を培養し、1mL の酵素抽出溶液で酵素抽出を行った場合、細胞破碎と遠心を行った後、酵素抽出溶液で 5~10 倍に希釈して測定に用いると、測定の間 (3 分間) 吸光度が直線的に減少する。

以下に、島津製作所の分光光度計のソフトウェア UV Probe を用いたカイネティクス (タイムコース) モードの例を示す。



分光光度計



カイネティクスグラフ

#### [GPDH 活性値の計算]

25°C で 1 分間あたり 1 μmol の NADH を消費する酵素量を 1 unit と定義するとき、検体中の GPDH 活性 (unit/ml) は次式で計算される。

$$\text{GPDH 活性 (unit/ml)} = \frac{\Delta\text{O.D.}_{340} \times A \text{ (ml)}}{6.22 \times B \text{ (ml)} \times C \text{ (cm)}} \times \text{検体希釈倍率}$$

$\Delta$ O.D.<sub>340</sub> : 1 分間あたりの 340 nm の吸光度の減少量

B (ml) : 添加した検体量

C (cm) : 使用した測定セルの光路長

6.22 : NADH のミリモル分子吸光係数

脂肪蓄積した検体の比較において、単位タンパク質量あたりの GPDH 活性で比較するため、検体のタンパク質の量を測定する。

#### [タンパク質の測定方法]

BIO-RAD の DC プロテインアッセイキットⅡ (Lowry 法) を使用する。

1. A 試薬 1mL に対し S 試薬 20 $\mu$ L の割合で加え、A'試薬を作成する。  
A'試薬は、4 $^{\circ}$ C で 1 週間保存可能。
2. [検体の調製法]の 8.の細胞破碎溶液を遠心した上清 200 $\mu$ L に A'試薬を 100 $\mu$ L 加える。検量線の作成には、タンパク質標準溶液(牛血清アルブミン)を用いる。標準溶液を希釈し、3~5 種類の濃度溶液を準備する。各濃度のタンパク質標準溶液 200 $\mu$ L にも A'試薬を 100 $\mu$ L 加える。
3. ボルテックスミキサーでよく攪拌する。
4. B 試薬 800 $\mu$ L を加える。
5. ボルテックスミキサーでよく攪拌する。
6. 室温で 15 分以上インキュベートする。
7. 750nm における吸光度を測定(インキュベートしてから 1 時間以内に測定する)。
8. タンパク質標準溶液で作成した検量線から、検体中のタンパク質含量を求める。

GPDH 酵素活性値は、GPDH 酵素活性の測定値とタンパク質量から計算して GPDH 酵素活性 unit/mg protein であらわす。測定結果は 3 連の実験の平均値 $\pm$ 標準偏差であらわす。

#### 参考文献

- 1) Adipogenesis Assay Kit (アディポジェネシスアッセイキット, CHEMICON International, Inc., ECM950) 付属プロトコール (2004).
- 2) GPDH 活性測定キット (Primary Cell Co., Ltd.) 付属プロトコール (2007).
- 3) 新本洋士, 岩下恵子, 小堀真珠子, 木村俊之, 山岸賢治, 鈴木雅博, マウス 3T3-L1 細胞に対するキハダ抽出物のトリグリセリド蓄積抑制作用, 食科工, **52**, 11, 535-537 (2005).
- 4) TaKaRa グリセロール 3-リン酸脱水素酵素 (GPDH) 活性測定キット 付属プロトコール (2007).
- 5) BIO RAD プロテインアッセイシリーズ 日本語クイックガイド
- 6) Wise, L.S. and Green, H., Participation of One Isozyme of Cytosolic Glycerophosphate Dehydrogenase in the Adipose Conversion of 3T3 Cells. *J. Biol. Chem.*, **254**, 273-275 (1979).
- 7) Kozak, L.P. and Jensen, J.T., Genetic and Developmental Control of Multiple Forms of L-Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **249**, 7775-7781 (1974).