

2) ラット炎症性腹腔マクロファージを用いた 脂肪酸シクロオキシゲナーゼ (COX) -2 阻害活性の測定法

食品総合研究所 石川 (高野) 祐子

<図・写真提供 木村 美和子 (和歌山県工業技術センター) >

はじめに

プロスタグランジン (PG) 類は、炎症やアレルギー反応における非常に重要な脂質メディエータである。PG は、細胞膜リン脂質の 2 位を切断する酵素であるホスホリパーゼ A2 により遊離されるアラキドン酸から PGH_2 を経て生成されるが、このときの律速酵素が脂肪酸シクロオキシゲナーゼ (COX: EC 1.14.99.1) である。COX には、常在型の COX-1 および誘導型の COX-2 という 2 種類のアイソザイムが存在し、COX-1 由来の PG は血管拡張や胃粘膜の保護等の働きを持ち、生体恒常性の維持の役割を果たすのに対し、誘導型の COX-2 から産生される PG は炎症局所等における生体防御に関与する。特に、COX-2 により生成する PGE_2 は他のメディエータの作用を増強し、炎症の進展に寄与することから、COX-2 選択的阻害剤は、副作用のない抗炎症薬として有効であると考えられている。

そこで、本稿では、ラット炎症性腹腔マクロファージの初代培養系を用いた、COX-2 阻害活性成分の探索の手法について述べる。

準備するもの

1. 実験器具

- ・試験管ミキサー
- ・プレートミキサー
- ・乾熱滅菌器
- ・オートクレーブ
- ・遠心分離器 (15 ml および 50 ml のコニカルチューブが 1,500 rpm で使用できるもの、1.5 ml チューブが 15,000 rpm で使用できるもの)
- ・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: 8 チャンネルマルチピペットがあるとよい) およびオートクレーブしたチップ, チップタブ (リザーバー)
- ・滅菌メスピペット 1 ml, 5 ml, 10 ml (ファルコン, コーニングなど; プラスチック製)
- ・ピペットエイド (ドラモンドなど)
- ・プラスチックコニカルチューブ 15 ml, 50 ml (γ 線滅菌済み, ファルコン, コーニ

ングなど)

- 25 ml, 10 ml 滅菌済みディズポーザブル注射筒
- 22G 注射針 (針先をヤスリで丸めておく)
- ガラスろうと : ガーゼを 4 層に折ってろうとに入れ, アルミホイルで包み, ラットの匹数分オートクレーブ滅菌しておく. (セルストレーナー Falcon: #352340 40 μ m などを代わりに使用しても良い.)
- 駒込ピペット 5 ml, 10 ml (5 ml はラットの匹数分, 10 ml は 1 本, ゴム球部分と本体とが分けて外せるようにアルミホイルで包み, オートクレーブ滅菌しておく.)
- 解剖用はさみ (片鋭片鈍 1 本, 両鋭 1 本)
- ピンセット (硬質ステンレスで力を掛けても曲がらないようなしっかりとしたもの 2 本)
- 止血鉗子 (モスキート型, 湾曲 1 本)
- 96-well 細胞培養用プレート (Falcon: #353072 など. 平底)
- ポリプロピレン製 96-well プレート (試料保存用)
- 6-well 細胞培養用プレート (Falcon: #353046 など. 平底)
- 1.5 ml エッペンドルフチューブ, 同ロック付きチューブ

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開けて, 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インジケータータープを貼っておく.

- 可溶性デンプン (和光純薬工業株式会社など)
- Bacto-peptone (Difco Laboratories Co.など)
- NaCl (和光純薬工業株式会社)
- 大腸菌リポ多糖 (LPS; *Escherichia coli* 0111: B4, Difco Laboratories など, ロットによる差が大きいので注意)
- 生食注 (大塚薬品など)
- NS-398 (N-[2-(Cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl]-methanesulfonamide)
(ALEXIS[®] Biochemicals, CA, USA) <COX-2 選択的阻害剤>
- Aspirin[®] (Sigma Chemical Co.) <非ステロイド抗炎症剤>
- Hanks (-)液 : Hanks balanced salt solution (Ca, Mg free)
NaCl 8.0 g/l, KCl 0.4 g/l, Na₂HPO₄ 0.4788 g/l, KH₂PO₄ 0.06 g/l, D-Glucose 1.0 g/l, NaHCO₃ 0.35 g/l (または, SIGMA H-6648 などを使用)
- RPMI 1640 培地 (Gibco[®], Invitrogen Corp.)
- Fetal calf serum (FCS; JRH Bioscience, KS, USA)
- Dulbecco's phosphate buffer saline (Ca, Mg free) : (PBS (-), pH 7.4) (日水製薬など)

- PGE₂ ELISA kit (Cayman Chemical Co. USA)
- Cell lysis buffer
20 mM HEPES, 1 % Triton X-100, 10 % Glycerol, 1 mM EDTA•2Na (ethylene diaminetetraacetic acid disodium salt), 2.5 mM *p*-nitrophenylene phosphate, 1 mM Na₃VO₄ (sodium orthovanadate), 5 µg/ml leupeptin, 1 M sodium fluoride, pH 7.3
- DC protein assay[®]キット (Bio Rad Laboratories)
- Sample loading buffer
50 mM Tris, 4 % SDS (Sodium dodecyl sulfate) (v/v), 10 % Glycerol (v/v), 4 % 2-mercapto ethanol (v/v), 50 µg/ml Bromophenol blue, pH 7.4
- ポリアクリルアミドゲル (7.5 %; PAGEL[®], アトー株式会社)
- Block Ace[®] (大日本製薬株式会社)
- BSA (bovine serum albumin) (ナカライテスク社など)
- Tris buffered saline containing 0.1 % Tween 20 (TBS-T) (SIGMA 社など)
- ニトロセルロース膜 (Hybond-ECL[®], Amersham Bioscience Co.など)
- Rabbit antibody to murine COX-2 (Cayman Chemical Co.など)
- Rabbit antibody to rat COX-1 (Cayman Chemical Co.など)
- Mouse antibody to β-actin, (Clone AC-15 monoclonal) (Sigma Chemical Co.など)
- goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology Inc.など)
- goat anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology Inc.など)
- ECL detection kit (Amersham Bioscience Corp.)
- X 線フィルム (Hyperfilm[®], Amersham bioscience Corp.など)

3. 動物

- Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラット (日本チャールス・リバーなど)

プロトコール

1. ラット炎症性腹腔マクロファージの調製

ラットを用いる実験の際には、咬傷やアレルギーなどを防ぐためにマスクや手袋を着用することが望ましい

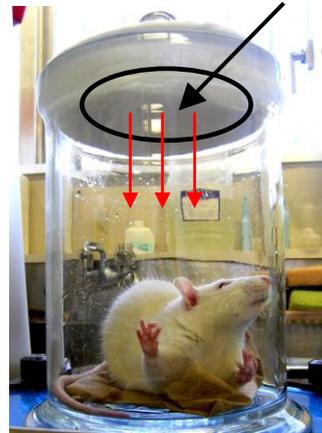
1) 試薬の調整

可溶性デンプンと Bacto-peptone をそれぞれ 5 % (w/v) になるようにはかり取り、必要量よりも大きめの容積を持つ三角フラスコを用いて生理食塩水に溶かす。このときデンプンがダマになりやすいので、先に Bacto-peptone を溶かした液をスターラーで攪拌しながら、デンプンを少しずつ加えること。アルミホイルで蓋をして、オートクレーブ滅菌する。オートクレーブをかけると、デンプンは完全に溶解するので、室温まで戻してから使用する。

2) ラット腹腔内投与

(1) 体重 100 g あたり 5 ml の 6-10 週令の Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラットにオートクレーブ滅菌したデンプン- Bacto-peptone 溶液を腹腔内投与する。

(2) 右図のような 2.0 l 程度の容量の標本瓶を麻醉瓶として使用する。蓋の部分に綿を入れ、ガーゼで蓋ごと包み、エーテルをしみこませておく。



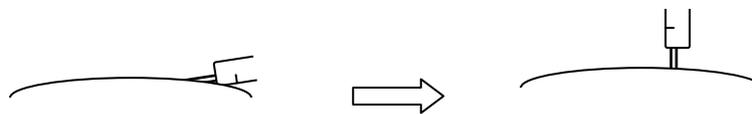
この部分にエーテルをしみこませておく (10~15 ml)

3~5 分でエーテルが容器内に充満

(3) ラットを麻醉瓶に入れ、正向反射

(倒れたときに元に戻ろうとする動き)がなくなるまで、待つ。

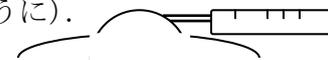
(4) 麻醉がかかったら、ラットを仰向けにし、腹部をつまみあげ、体とほぼ平行に皮下へ注射針を入れた後、注射筒を腹部に垂直に突き立てる。(あらかじめ注射針の先をヤスリで丸めることにより、内臓を傷つけずに腹腔へ針を入れることができる。皮下の筋肉層を通り抜ける時に、軽い抵抗がある。)



(5) 再び注射筒を水平に戻し、ピストンをゆっくり押して、注射液を腹腔に入れる。腹部全体がふくれる感触があればよい。皮膚が部分的にふくれる(下図)場合、皮下へ注射液が入っているので、やり直す。

(6) 注射筒を回しながら、引き抜く(注射液が漏れないように)。

腹部を 2-3 分間軽くマッサージして、腹腔内全体に液が回るようにする。



3) マクロファージ回収

(1) 可溶性デンプン- Bacto-pepton 溶液を投与してから 4 日後、炎症により腹腔内に浸潤したマクロファージを回収する¹⁾。

(2) 前項と同様にラットにエーテル麻酔を行う。頸動脈を切断して、放血致死させる。(このとき、頸椎脱臼により死亡させると、腹腔内に出血し、



マクロファージ回収の妨げとなる場合がある。)

- (3) ラット体表をアルコール滅菌し、以降の操作はクリーンベンチ内で行う。

注射筒に冷 Hanks (-) 液を 10 ml 取り、前項と同様に腹腔内に投与する (前ページ写真)。約 1 分間腹部全体をマッサージする。(このとき、肝臓近辺を強く揉むと、出血することがあるので注意する。)

- (4) 腹部外皮にはさみで切れ目をいれ、肋骨から下腹部にかけ、外皮をはぎ、腹部筋層を露出させる。

- (5) 腹部正中線よりやや横をピンセットでつまみ上げ、はさみで小さく穴を開ける。5 ml メスピペットを使い、穴から Hanks (-) 液を吸い取り、50 ml コニカルチューブに回収する。(このとき、開けた穴に腹筋上にこぼれた Hanks (-) 液が流れ込まないように注意する。また、腹腔内の脂肪塊や腸が吸引中のピペット先に吸い付くことがあるので外側の腹部筋層に沿ってピペットの先端を入れた方がやりやすい。)



- (6) 10 ml 駒込ピペットを用い、Hanks (-) 液 10 ml を再度腹腔内へ注入する。止血鉗子を用いて、先に開けた穴を封じ、もう一度軽くマッサージする。同様に 5 ml 駒込ピペットで腹腔内の Hanks (-) 液を回収する。先に開けた穴から大きく腹部筋層を切り開き、できるだけ液を回収する。回収終了後の 50 ml コニカルチューブは、直ちに氷冷しておく。

- (7) コニカルチューブを 1,000-1,500 rpm で 5 分間遠心分離する。上清を除き、細胞のペレットを RPMI1640 に懸濁し、トリパンブルーで染色してマクロファージの生細胞数を数える (リンパ球、赤血球なども混じっているため、特に大型の細胞を数えること)。

- (8) 回収したマクロファージを RPMI 1640 培地に懸濁し、 2×10^5 cells/well になるよう 96-well 細胞培養プレートに播種、37 °C のインキュベータ (air 95 %-CO₂ 5 %) で 2 時間静置する。その後、プレートを 37 °C に暖めた Hanks (-) で 3 回洗浄し、リンパ球などの非接着性の細胞を除く。この操作により、90 % 以上がマクロファージとなる。10 % FCS を含む RPMI 1640 培地で 24 時間培養した後、実験に供する。(COX-1 由来の PG を除きたい場合には、あらかじめ Aspirin 処理を行うが、本マニュアルでは省略する。)

2. マクロファージの刺激方法およびプロスタグランジン産生量の測定方法

1) 24 時間培養後、細胞を 37 °C に暖めておいた Hanks (-) で 3 回洗浄する。RPMI 培地を 160 μ l 入れた後、試料を 20 μ l 加える。試料を Dimethyl sulfoxide (DMSO) もしくはエタノールに溶解した場合には、最終の溶媒濃度が 0.1 % (v/v) 以下になるように PBS (-) で希釈してから加える。コントロールには同量の溶媒のみを添加する。さらに LPS (ストック溶液として 100 μ g/ml になるよう生食注に溶かし冷凍保存したものを、使用直前に RPIM1640 培地で 10 倍に希釈し、10 μ g/ml 溶液とする) を 20 μ l 添加 (最終濃度 : 1 μ g/ml) し、マクロファージのプロスタグランジン産生を誘導する。試料のみの効果を見るためには、同様に LPS を含まない RPIM1640 培地を加える。12-14 時間培養後、培養上清をポリプロピレン製 96-well プレートなどに回収し、PGE₂ の測定試料とする。試料は測定時まで -30°C で凍結保存しておく。

2) 培養上清に遊離した PGE₂ 含量の測定は PGE₂ ELISA kit (Cayman Chemical Co, MN, USA) による ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法を用い、キットのマニュアルに則って行う。測定結果は陽性対照に対する百分率で表す。

3. ウェスタンブロット法による脂肪酸シクロオキシゲナーゼ-2 の発現量測定

1) 前述のように回収したラット炎症性腹腔マクロファージを、6-well 細胞培養用プレート) に 3×10^6 cells/well になるよう RPMI 1640 培地 3 ml に懸濁して播種し、37 °C のインキュベータ (air 95 %-CO₂ 5 %) で 2 時間静置する。その後、プレートを 37 °C に暖めた Hanks (-) で 3 回洗浄し、非接着の細胞を除く。10 % FCS を含む RPMI 1640 培地で 24 時間培養した後、細胞を 37 °C に暖めた Hanks (-) で 3 回洗浄し、RPMI 1640 培地を 2.4 ml 入れる。試料 300 μ l を添加し、コントロールには同量の溶媒のみを添加した。さらに LPS (10 μ g/ml) を 300 μ l 添加 (最終濃度 : 1 μ g/ml) することにより、マクロファージの COX-2 蛋白質を誘導する。

2) 12-14 時間培養後、細胞を氷冷した PBS (-) で 3 回洗浄した後、100 μ l の氷冷した cell lysis buffer²⁾ を加えて細胞を溶解する。得られた細胞溶解液は、4 °C で 15,000 rpm x 15 分間遠心分離し、上清を回収、COX-2 タンパク質測定試料として使用時まで -30°C で保存する。上清中のタンパク質含量を DC protein assay[®] (Bio Rad Laboratories) で測定する。

3) 測定試料に 3 倍量 (v/v) の sample loading buffer を加え、5 分間煮沸する。それぞれの試料をタンパク質 2 μ g BSA 相当量、ポリアクリルアミドゲル (7.5 %; PAGEL[®], アトー) に添加し、20 mA 定電流で 80 分間電気泳動する。泳動終了後、分離されたタンパク質をニトロセルロース膜 (Hybond-ECL[®]) に 20 V で 1 時間転写する。転写されたニトロセルロース膜を 4 °C で一晩ブロッキング (Block Ace[®], 大日本製薬株式会社) した後、1 % BSA/TBS-T で希釈した一次抗体 (rabbit antibody to

murine COX-2, rat COX-1, x1000 および β -actin, Clone AC-15 monoclonal antibody, x5000) で室温にて 1 時間インキュベートする。洗浄後、二次抗体 (COX-1 および COX-2 については goat anti-rabbit IgG-HRP, x500, β -actin については goat anti-mouse IgG-HRP, x500) で室温にて 1 時間、それぞれ免疫染色を行う。最後に、ECL detection kit で室温 1 時間インキュベーションし、X 線フィルムを用いて発光を検出する。得られた画像は、画像処理ソフトウェア (NIH Image: Apple 社製 PC 用, Scion Image: Windows PC 用, いずれもフリーソフト) 等を用いて数値化することができる。

注意

全ての動物実験は、各種法令、指針に則って行うこと。さらに、実験者の所属する研究機関において、動物実験計画の審査および適切な助言、適正な実施の監視を行うための組織として動物実験管理委員会を設置しなければならない。

参考文献

- 1) Watanabe, M., Tamura, T., Ohashi, M., Hirasawa, N., Ozeki, T., Tsurufuji, S, Fujiki, H. and Ohuchi, K., Dual effects of staurosporine on arachidonic acid metabolism in rat peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta*, **1047**, 141-147 (1990).
- 2) Kim, Y.P., Yamada, M., Lim, S.S., Lee, S.H., Ryu, N., Shin, K.H. and Ohuchi, K., Inhibition by tectorigenin and tectoridin of prostaglandin E₂ production and cyclooxygenase-2 induction in rat peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta*, **1438**, 399-407 (1999).

2) 血管内皮細胞を用いた白血球接着因子発現抑制活性の評価

(独) 農研機構 食品総合研究所 石川 祐子

はじめに

炎症反応は、血管透過性の亢進と血管拡張による発赤と浮腫に伴って発熱物質や発痛物質による熱や痛みという主症状を呈する、重要な生体防御機構である。しかし、過剰な炎症反応や、炎症の慢性化は組織破壊や機能不全など生体にとって悪影響をもたらす。そこで、炎症反応を抑制するためには、特に炎症初期に認められる様々な炎症反応を制御することが必要と考えられる。

炎症初期の重要な反応として、炎症局所における白血球の血管外遊走が挙げられる。白血球の血管外遊走過程の最初の段階では、白血球が血管内皮細胞表面を転がる（ローリング）現象が起こる。ローリング現象の開始においては、selectin ファミリーと称されるレクチン様分子が重要な役割を果たすことが知られており、そのうち、血管内皮細胞表面に誘導される白血球接着因子が E-selectin 分子である。この発現を cell surface ELISA 法により測定する方法について述べる。

準備するもの

1. 実験器具

- ・ ウォーターバス（培地の加温に使用する）
- ・ CO₂ インキュベータ（37℃）
- ・ クリーンベンチ
- ・ 試験管ミキサー
- ・ 乾熱滅菌器
- ・ オートクレーブ滅菌器
- ・ 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。8 channel マルチピペットがあると良い）およびオートクレーブしたチップ
- ・ チップタブ
 - ・ 滅菌メスピペット 1 ml, 5 ml, 10 ml（ファルコン，コーニングなどプラスチック製）
 - ・ ピペットエイド（ドラモンドなど）
 - ・ 15 ml コニカルチューブ（滅菌済み，ファルコンなど）
 - ・ 50 ml コニカルチューブ（滅菌済み，ファルコンなど）
 - ・ T-25, T-75 細胞培養用フラスコ（ファルコンなど）
 - ・ 96 well 細胞培養用マルチウエルプレート（平底：ファルコンなど）
 - ・ 使い捨て手袋（ラテックス製など）

2. 試薬

1) 細胞

正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC pooled)

(注意) 細胞はドライアイス梱包されて輸送されるので、届き次第すぐに取り出し、液体窒素中に移して保存すること。液体窒素保存ができない場合には、すぐに細胞を融解し、培養を開始すること。

細胞は、HIV-1, HBV, HCV が PCR 法によって陰性であることが確認されているが、感染予防のためにも使い捨て手袋を使用することが望ましい。

2) 培養

Lonza 社正常ヒト細胞専用培地 (BulletKit[®]) を用いる。内皮細胞培地キット-2 (2% FBS) (EGM[™] -2 BulletKit[®]) は、基本培地 (Basal Medium) と内皮細胞添加因子セット (SingleQuots[®]) からなる。

[内皮細胞添加因子セット-2]

EGM-2 SingleQuots 全量を基本培地 (EGM-2 BulletKit[®]) に混合して使用する。

(注意) 基本培地は 4℃、添加因子セットは -20℃で保存する。基本培地のボトルと添加因子セットの各バイアルの表面をエタノールで拭いて滅菌し、クリーンベンチ内で添加因子セットの各バイアルの中身をピペットで基本培地に添加する。最後にバイアルの内部を、混合後の培地で共洗いする。混合したものは、4℃保存で、30 日以内に使用する。

サブカルチャー用試薬セット (ReagentPack[™] : Trypsin/EDTA , HEPES-BSS, TNS のセット) については、使用開始前までは -20℃、その後は 4℃保存とする。1 ヶ月以内に使い切ることが望ましい。Trypsin/EDTA は融解後、小分けして -20℃に保存する。

3) cell surface ELISA

- PBS (-)
- PBS (-)-T (PBS に 0.05% Tween 20 を加えたもの)
- Hanks (-) solution
- メタノール (和光 特級など)
- ELISA 用ブロッキング溶液 (ブロックエースなど)
- Human recombinant TNF- α (Genzyme, MN, USA)
- Mouse anti-human E-selectin 抗体 (clone: 68-5H11, Pharming, Becton Dickinson, NJ, USA)
- peroxidase- conjugated goat anti-mouse IgG 抗体 (Immunotech, France)
- TMB Microwell Peroxidase Substrate (1-Component) (BioFX Laboratories Inc., MD, USA など)
- TMB Stop solution

・ LDH Cytotoxicity Detection Kit (タカラバイオ, 大津, 滋賀) など

プロトコール

1. 細胞の準備 (タカラバイオ株式会社 HP : Lonza 社 (旧 Cambrex 社) 正常ヒト細胞の培養方法に準ずる)

正常ヒト臍帯静脈内皮細胞の培養には、汚染予防のためにも培養用フラスコを用いたほうが望ましい。

<培地の準備>クリーンベンチ内で無菌的に培地のボトルを開け、培養面積 5 cm²あたり 1 ml の培地を入れる (例えば、25 cm² フラスコの場合、5 ml)。ベントキャップをきちんと閉める。ベントキャップ以外を使用する場合は、一旦キャップをしっかり閉めてから半回転ほど緩める。培地を入れたフラスコを 37°C、5 % CO₂-95%air のインキュベータに入れて 30 分以上静置する。

<細胞の融解>マイクロピペットの目盛りを 750-800 μl に合わせ、直ちに使用できる状態にしておく。細胞のバイアルを液体窒素から取り出し、バイアルの表面をエタノール等で拭いて滅菌する。クリーンベンチ内で 1/4 回転程度キャップを回してバイアルの内圧を弱め、再びキャップを閉める。バイアルの底から 3/4 までを 37°C 恒温槽に浸け (キャップのところまでは、水中に入れないように注意する)、1~2 分間ゆっくりバイアルを回しながら細胞を融解する。バイアルをよく観察し、氷が融け切る直前に恒温槽から取り出す。バイアル表面の水分を拭き取った後、エタノールで拭いて滅菌し、クリーンベンチ内に入れる。

バイアルのキャップを取り、マイクロピペットで 2-3 回ピペッティングして、細胞を懸濁する。泡を立てないように注意する。あらかじめ培地を入れて準備しておいたフラスコに細胞を播種する。フラスコにキャップをして、細胞を均等に分布させる。ベントキャップ以外はフラスコのキャップを少し緩めた状態で、インキュベータに戻し、水平に静置する。

(注意)

- ・液体窒素を扱う際は、急激な温度変化により液体窒素が飛び散ることがあるので保護手袋および保護眼鏡を使用すること。
- ・危険分散のため、すべての細胞を一つのフラスコに入れることは、できるだけ避ける。
- ・凍結保護液として DMSO が入っているが、これを除くための洗浄操作の方が細胞へのダメージが大きいため、洗浄は行わない。

2. 細胞の維持・継代

培地は必要な分量だけを取り分けて、室温に戻してから使用する。

DMSO および未接着の細胞を取り除くため、播種の翌日に培地交換を行う。培地交

換の際には、細胞が付着している箇所を避けて培地を吸引除去し、室温に戻した新鮮培地を加える。その後は、一日おきに培地交換を行い、毎日細胞の状態を観察する。

細胞の増殖に応じて、培地添加量を以下のように増やすとよい。

25%以下	1 ml / 5 cm ²
25~45%	1.5 ml / 5 cm ²
45%以上	2 ml / 5 cm ²

60~90%コンフルエントで継代を行い、オーバーコンフルエントにならないよう注意する。

細胞の継代は必ずサブカルチャー用試薬セット (ReagentPack) を用いて行う。T-25 フラスコ 1 個につき、Trypsin / EDTA 2 ml,

HEPES-BSS 5 ml, TNS 4ml を用意し室温に戻す。継代に必要な量の培地を室温に戻し、新しい培養容器に 1 ml / 5 cm² の割合で培地を入れ、インキュベータに 30 分以上静置しておく。

細胞を培養したフラスコから培地を吸引除去した後、3 ml の HEPES-BSS で細胞を洗浄し、培地中のトリプシン阻害成分を除く。HEPES-BSS を吸引除去する。

2 ml の Trypsin / EDTA を加え、フラスコ底面全体に行き渡らせる。フラスコの蓋を閉め、顕微鏡で細胞の状態を確認する。細胞の約 80-90%が剥がれて丸くなったら (図 2), 軽く手のひらでフラスコを叩き、細胞を剥がす。直ちに TNS 4 ml を加え、トリプシンを中和し、剥がれた細胞を速やかに 15 ml コニカルチューブに移す。フラスコを 2 ml の HEPES-BSS で洗い、残りの細胞も合わせて回収する。細胞を 220 x g で 5 分間遠心処理し、上清を吸引除去する。細胞ペレットをほぐし、4-5 ml の培地を加えて細胞を懸濁、細胞数を計測する。上記の式で算出した播種量をフラスコに分注し、細胞を均一に広げる。ベントキャップを使用していない場合は、フラスコの蓋を緩めておく。フラスコを湿潤、37℃、5%CO₂-95%Air のインキュベータに静置し培養を開始する。

3. TNF (腫瘍壊死因子) - α 刺激による E-selectin の発現誘導

フラスコで培養しておいた細胞を前述と同様にトリプシン処理により回収し、細胞数を計測する。1 x 10⁴ cells/well (200 μ l/well) になるよう細胞を EGM-2 培地で懸濁したものを 96 well 細胞培養用マルチウエルプレートに播き、コンフルエントになるまで

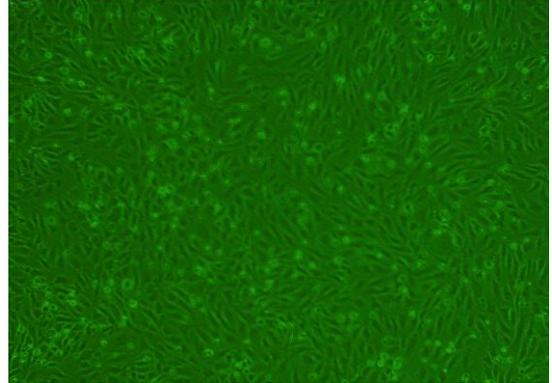


図 1 増殖した細胞

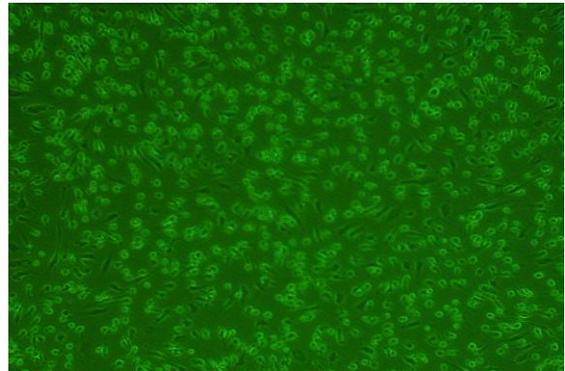


図 2 剥がれかけた細胞

37°C (air 95%-CO₂ 5%) で培養する (通常約 24 時間)。

培地を除去した後、細胞を 37°C に暖めた Hanks (-) 液で 3 回洗浄し、FCS を含まない RPMI1640 培地を 160 µl ずつそれぞれのウェルに入れる。

供試試料は DMSO もしくはエタノールに溶解し、最終の溶媒濃度が 0.1% (v/v) になるよう PBS (-) で調製し、20 µl 添加する。また、コントロールには同量の溶媒のみを添加する。同一試料の測定は 3 ウェル以上で行う。

E-selectin の発現誘導には、10 ng/ml 濃度になるよう PBS (-) で希釈した Human recombinant TNF-α (Genzyme, MN, USA) を 20 µl ずつ添加 (最終濃度 1 ng/ml) し (図 3), 37°C (air 95%-CO₂ 5%) で 4 時間培養 (図 4) を行う。

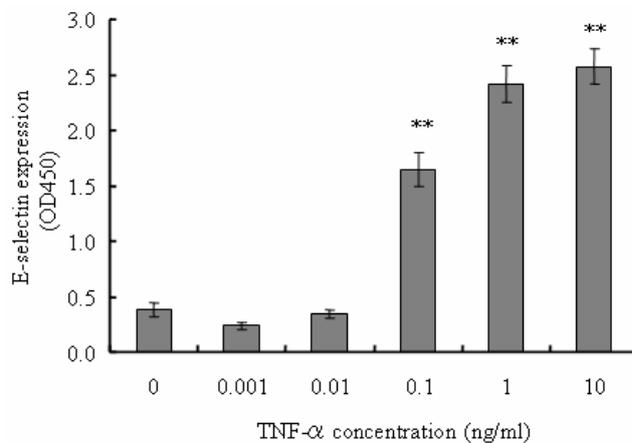


図 3 TNF-α 刺激量に対する E-selectin 誘導量

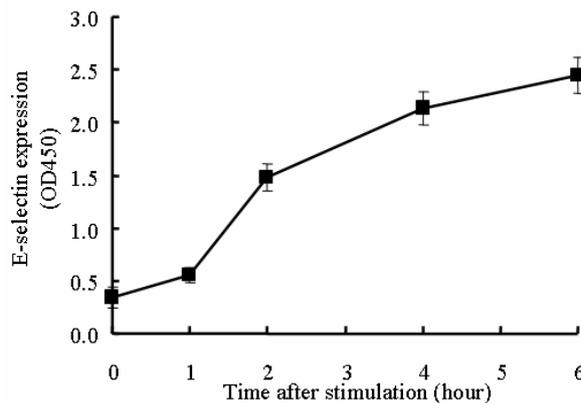


図 4 TNF-α 刺激後の E-selectin 誘導量

4. 細胞表面酵素免疫測定 (Cell Surface ELISA) による白血球接着分子発現量の測定
培養終了後、細胞の状態を顕微鏡観察する。細胞表面を 37 °C に暖めた PBS (-) で 1 回ていねいに洗浄する。このとき細胞が剥がれないよう注意すること。100% メタノールを 100 µl/well 入れて 2-3 分間静置し、細胞表面の蛋白質を固定する。固定後、直

ちに細胞を 0.05% Tween-20 を含む PBS (PBS-T) で 2 回洗浄し、200 μ l の Block Ace[®] を入れて 4°C で一晩もしくは 37°C で 1 時間ブロッキングを行う。

PBS-T で 3 回洗浄した後、1% BSA を含む PBS で 2000 倍に希釈した mouse 抗 human E-selectin 抗体を 100 μ l ずつ加え、室温で 2 時間置く。PBS-T で 3 回洗浄した後、1% BSA を含む PBS で 1 万倍に希釈した peroxidase- conjugated goat anti-mouse IgG 抗体を 100 μ l ずつ加え、室温で 1 時間置く。再度 PBS-T で 3 回洗浄した後、peroxidase 基質 (TMB) を 100 μ l ずつ加え、暗所で反応させる。発色の状況を見ながら、TMB 停止液 100 μ l で反応を停止させた後、マイクロプレートリーダーを用いて、450 nm の吸光度を測定する。

5. 細胞毒性の測定

細胞毒性を LDH Cytotoxicity Detection Kit (タカラバイオ) などを用いて確認する。測定法については、キットのマニュアル等に則って行う。

おわりに

生体防御に関わる炎症初期の重要な反応の一つである、炎症局所における白血球の血管外遊走には、まずローリングが起こる必要がある。ローリングの開始に重要な役割を果たす白血球接着分子はいくつかあるが、そのうち誘導型 E-selectin の血管内皮細胞表面への発現を cell surface ELISA を用いることにより測定することができる。例えば、本法によりフラボノイドの影響を検討したところ、アピゲニン・ルテオリン・ケルセチンなどに発現抑制活性が認められている。

参考文献

- 1) Mackay, C.R. and Imhof, B.A., Cell adhesion in the immune system. *Immunol. Today*, **14**, 99-102 (1993).
- 2) Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Mendrick, D.L., Cotran, R.S. and Gimbrone, M.A.Jr., Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 9238-9242 (1987).
- 3) Lasky, L.A., Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science*, **258**, 964-969 (1992).
- 4) Rice, J.W., Davis, J.E., Crowl, R.M. and Johnston, P.A., Development of a high volume screen to identify inhibitors of endothelial cell activation. *Anal. Biochem.*, **241**, 254-256 (1996).
- 5) Ishikawa, Y., Goto, M. and Yamaki, K., Inhibitory effects of several flavonoids on E-selectin expression on human umbilical vein endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor- α . *Phytother. Res.*, **17**, 1224-1227 (2003).

5) ラット炎症性腹腔マクロファージを用いた貪食活性の測定法

(独) 農研機構 食品総合研究所 石川 祐子

はじめに

マクロファージは貪食細胞とも呼ばれ、貪食作用を通じて老廃化した細胞や異物の処理、あるいは細菌や真菌から生体を防御する働きを有する。

貪食作用は最も原始的な生体防御機構と考えられ、貪食作用を有する細胞(マクロファージ・好中球・樹状細胞)は、*PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) と呼ばれる、病原体に共通して存在するさまざまな分子構造を認識するレセプター (pattern-recognition receptors : PRRs) を介して、細胞内に異物を取り込む。貪食作用により細胞内に取り込まれた細菌等の異物は、細胞内の消化酵素による分解や、活性酸素(スーパーオキシド)や過酸化水素による殺菌を受け、無害化される。

また、マクロファージは細菌等の異物を分解消化した後に、その抗原情報をTリンパ球に伝える抗原提示細胞としての役割を持つことから、獲得免疫においても重要な役割を果たしている。このように、貪食作用は免疫反応や生体防御機能において重要な機構である。

マクロファージの貪食活性を測定する方法としては、ザイモサン等の顆粒を異物として貪食させた後に顕微鏡下で計測する方法¹⁾や、あらかじめザイモサンを蛍光標識しておき、取り込まれたザイモサンを蛍光測定あるいはフローサイトメーターで計測する方法²⁾などがある。本稿では、酵母由来のザイモサンを用い、細胞を溶解させた後に蛍光測定する方法³⁾について述べる。

* PAMPs には、グラム陰性菌のリポ多糖 (LPS), グラム陽性菌に存在するリポタイコ酸 (LTA), 細菌細胞壁の骨格構造であるペプチドグリカン (PG) などがあるが、近年それらを認識する PRRs のうち Toll 様レセプター (Toll-like receptor : TLR) が注目され、そのリガンドや機能が明らかにされてきている。

準備するもの

1. 実験器具

- ・ ウォーターバス (培地の加温に使用する)
- ・ CO₂ インキュベータ (37℃)
- ・ クリーンベンチ
- ・ 試験管ミキサー
- ・ 乾熱滅菌器

- ・オートクレーブ滅菌器
- ・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，8channel マルチピペットがあると良い）およびそれに適合するオートクレーブしたチップ
- ・チップタブ
- ・滅菌メスピペット 1,5,10ml（ファルコン，コーニングなどプラスチック製）
- ・ピペットエイド（ドラモンドなど）
- ・15ml コニカルチューブ（滅菌済み，ファルコンなど）
- ・50ml コニカルチューブ（滅菌済み，ファルコンなど）
- ・96well 細胞培養用マルチウエルプレート（平底：ファルコンなど）
- ・使い捨て手袋（ラテックス製など）
- ・セルスクレーパー（滅菌済み）あるいはシリコン製ラバーポリスマン（オートクレーブ滅菌をおこなったもの）

2. 試薬

1) 細胞

ラット炎症性マクロファージの採取方法については，マニュアル集 I pp.73-76 を参照のこと．マウス単球由来株細胞（J774A.1）を用いる場合は，ヒューマンサイエンス研究資源バンク（(財) ヒューマンサイエンス振興財団）等より入手可能．

2) 培養

(1)ラット炎症性腹腔マクロファージ：

- ・RPMI 1640 培地（R8758:シグマ）など
- ・Hanks(-)solution（カルシウム，マグネシウム不含）（H6648:シグマ）など
- ・FCS (Fetal Calf Serum; JRH Bioscience,USA) など

(2)マウス単球由来株細胞（J774A.1）：

- ・DMEM 培地（D6040:シグマ）など
- ・Hanks(-)solution（カルシウム，マグネシウム不含）（H6648:シグマ）など
- ・FCS (Fetal Calf Serum; JRH Bioscience,USA) など
- ・ペニシリンーストレプトマイシン溶液（P7539:シグマ）など

3) 貪食活性測定

- ・Hanks(-)solution（カルシウム，マグネシウム不含）（H6648:シグマ）など
- ・PBS(-) (Phosphate buffered saline)（P5493:シグマ）など
- ・DMSO (Dimethylsulfoxide) (13445:ナカライテスク) など
- ・zymosan A (*S. cerevisiae*) BioParticles[®], fluorescein conjugate (Z2841:インビトロジェン) など蛍光標識されたザイモサン (*Saccharomyces cerevisiae* 由来)
- ・Triton-X 100 (T9284:シグマ) など

プロトコール

1. 細胞の調整

1) ラット炎症性腹腔マクロファージの調製

(マニュアル集 I ラット炎症性腹腔マクロファージを用いた脂肪酸シクロオキシゲナーゼ (COX)-2 阻害活性の測定法に準ずる.)

可溶性デンプンと Bacto-peptone をそれぞれ 5% (w/v) になるよう生理食塩水に溶かした液をオートクレーブ滅菌し、6-10 週令の Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラットに体重 100g あたり 5ml を腹腔内投与する。投与 4 日後、炎症により腹腔内に浸潤したマクロファージを Hanks(-)液で腹腔内を洗浄することにより回収する。遠心分離した細胞のペレットを RPMI1640 に懸濁し、トリパンブルーで染色してマクロファージの細胞数を数える。回収したマクロファージを RPMI1640 培地に懸濁し、 1×10^5 cells/well になるよう 96-well 細胞培養プレートに播種、37°C のインキュベータ (air 95%-CO₂ 5%) で 2 時間静置する。その後、プレートを 37°C に暖めた Hanks(-) で 3 回洗浄し、リンパ球などの非接着性の細胞を除く。この操作により、90% 以上がマクロファージとなる。10% FCS を含む RPMI1640 培地で 24 時間培養した後、実験に供する。

2) マウス白血球由来株細胞 J774A.1 (JCRB9108) を用いる場合

ヒューマンサイエンス研究資源バンク ((財) ヒューマンサイエンス振興財団) より入手できる。凍結細胞は解凍後数週間培養を行い、増殖が一定になったものを用いる。なお、継代を行う際、本細胞株はトリプシン耐性が高く通常の処理では細胞培養用ディッシュから剥がれにくいことから、スクレーパーを用いて剥がし取る。このとき、完全に細胞を剥がし取ろうとすると死細胞数が増えるため、できるだけ丁寧に掻き取る。シリコン製のラバーポリスマンを用いた方が容易である。細胞は、10% FCS を含む DMEM 培地 (100U/ml penicillin および 100µg/ml streptomycin を含む) に懸濁し、 1×10^5 cells/well になるよう 96well 細胞培養用プレートに播種、37°C のインキュベータ (air 95%-CO₂ 5%) で 24 時間培養した後、実験に供する。

2. 貪食活性の測定

1) 24 時間培養後の細胞を 37°C に暖めておいた Hanks(-)液で 3 回洗浄し、培地中の血清を除く。

2) RPMI1640(DMEM)培地 160µl を入れた後、試料溶液 20µl を加え 1 時間インキュベーションする。供試試料は DMSO もしくはエタノールに溶解し、最終の溶媒濃度が 0.1% (v/v)になるよう PBS(-)で調製する。また、コントロールには同量の溶媒のみを添加する。同一試料の測定は 3 ウェル以上で行う。なお、前処理による貪食活性への影響を見る場合には、インキュベーション後

に、細胞を 37℃ に暖めておいた Hanks(-) 液で 3 回洗浄し、新しい RPMI1640(DMEM) 培地 180μl を入れてから、以下の操作を行う。

- 3) 蛍光標識 ザイモサンの懸濁液 (ザイモサン 30μg/0.2ml) を 20μl 添加する。このとき、ザイモサンが沈殿しやすいので、懸濁液を攪拌しながら添加する。
- 4) 30 分間インキュベートした後、37℃ に暖めておいた Hanks(-) 液で 3 回洗浄し、貪食されていないザイモサンを除く。
- 5) 10% (w/w) Triton-X 100 を加えて細胞を溶解させ、貪食されたザイモサン量を蛍光プレートリーダーにより測定する。なお、FITC ラベルの場合は 485nm/530nm の蛍光強度で測定、その他の蛍光色素を標識に用いた場合には、その色素に応じた波長を用いる。

おわりに

現在では、貪食活性を測定するキットとしてラテックスビーズで標識したザイモサンを用いる CytoSelect™ 96-Well Phagocytosis Assay (Zymosan) (CELL BIOLABS INC)⁴⁾ や、貪食された後に細胞内の活性酸素と反応して化学発光するルミノールを結合したアクリル系ポリマー微粒子⁵⁾ 等も販売されているので、これらを用いて測定することもできる。

参考文献

- 1) Oben, J.A. and Foreman, J.C., A simple quantitative fluorimetric assay of in vitro phagocytosis in human neutrophils. *J. Immunological Methods*, **112**, 99-103 (1988).
- 2) Jansen, W.T.M., Gootjes, J., Zelle, M., Madore, D.V., Verhoef, J., Snippe, H. and Verheul, A.F.M., Use of Highly Encapsulated Streptococcus pneumoniae Strains in a Flow-Cytometric Assay for Assessment of the Phagocytic Capacity of Serotype-Specific Antibodies. *Clin. Dia. Lab. Immunol.*, **5**, 703-710 (1988).
- 3) 川村博幸, 瀬野公子, 熊谷武久, 渡辺紀之, 八巻幸二, 津志田藤二郎, 乳酸菌菌体成分および野菜抽出物のラットマクロファージ貪食能に対する効果, *食科工*, **47**, 465-469 (2000).
- 4) Jutras, I. and Desjardins, M., Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **21**, 511-527 (2005).
- 5) Uchida, T., Kanno, T. and Hosaka, S., Direct measurement of phagosomal reactive oxygen by microsphere-bound luminol. *J. Immunological Methods*, **77**, 55-61 (1985).