

炎症性サイトカイン、NK 活性評価法

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構
西日本農業研究センター 齋藤 武

【はじめに】

ナチュラルキラー（NK）細胞はウイルスに感染した細胞やがん細胞を認識し、アポトーシスを誘導することにより生体防御機能を担っているリンパ球の一種である。NK 細胞の細胞傷害活性（NK 活性）は、*in vitro* でターゲットとなる細胞（がん細胞）と共培養した結果として生じる、がん細胞の細胞傷害を指標に評価することができる。

従来の標準的な NK 活性の評価方法は、あらかじめ ^{51}Cr で標識したターゲット細胞（がん細胞株など）と NK 細胞（あるいは脾細胞など NK 細胞を含む細胞集団）を混合し、傷害されたターゲット細胞から放出される ^{51}Cr の放射能を測定するものである。しかしながら放射性同位元素の使用は購入から廃棄までの各種手続きや施設の維持管理にコストがかかるなど何かと面倒が多い。本稿では放射性同位元素を使わずに、傷害された標的細胞から放出される細胞内酵素（乳酸脱水素酵素；LDH）を比色定量する方法について述べる。

また、NK 細胞からは様々な炎症性サイトカインやケモカインが産生されることが知られている。本稿では特に NK 細胞が産生する代表的な炎症性サイトカインである IFN- γ の定量方法についても併せて記載する。

【準備するもの】

1. 実験器具・機器

1) 細胞培養に用いる機器類

- ・クリーンベンチ
- ・CO₂ インキュベーター
- ・自動セルカウンター（検体の数が多い場合、血球計算盤より効率的である）
- ・遠心機（96 ウェルプレートの遠心も可能であること）
- ・電動ピペット
- ・マイクロピペット

2) NK 活性の測定に用いる機器類

- ・吸光マイクロプレートリーダー（490 nm の吸光度と、対照波長も測定する場合は 600 nm 以上の吸光度も測定可能であるもの）
- ・マルチチャンネルピペット

3) サイトカインの定量に用いる機器類

- ・吸光マイクロプレートリーダー（450 nm の吸光度が測定可能であるもの）
- ・プレートシェーカー
- ・マルチチャンネルピペット

4) 消耗品類

- ・アッセイプレート（96 ウェル、平底）

以下のプラスチック製品はいずれも滅菌済みのものを使用する。本実験で使用する細胞はいずれも浮遊細胞であるが、接着細胞用のディッシュおよびプレートで

も特に問題ない。

- ・ 60×15mm セルカルチャーディッシュ（継代培養に用いる）
- ・ マルチウェル細胞培養プレート（NK 細胞に各種試料を添加して培養する場合に用い、アッセイ時に必要となる細胞数等を考慮して 6-well や 12-well プレート、あるいは 60×15 mm ディッシュなどを使い分ける）
- ・ 96 well（丸底）細胞培養プレート（NK 細胞と標的細胞の共培養に用い、細胞同士の接触を促すため平底ではなく丸底のプレートを使用する）
- ・ コニカルチューブ（15 ml、50 ml）
- ・ ディスポーザブルピペット（10 ml など）
- ・ トランスファーピペット（2～3 ml の溶液が扱えるもの）
- ・ チップ（10 μ l、200 μ l、1000 μ l など）
- ・ マイクロチューブ（1.5 ml、2.0 ml）

2. 培養細胞および細胞培養用試薬

1) 培養細胞（いずれも JCRB 細胞バンクより入手可能）

- ・ ヒト NK 様細胞株 KHYG-1（JCRB0156）
- ・ ヒト急性白血病細胞株 K562（JCRB0019）

2) 細胞培養用試薬

- ・ RPMI-1640
- ・ ウシ胎児血清（FBS）
- ・ ヒト IL-2（和光純薬 #097-03951 など）
- ・ ペニシリンーストレプトマイシン溶液（×100）（和光純薬 #168-23191 など）
- ・ 0.4% トリパンブルー（生細胞数の測定に用いる）

3. NK 活性測定用試薬

- ・ 細胞傷害性検出キット（LDH）（ロシュ #11644793001；同様の測定原理を用いたキットが他社からも販売されており、これらも利用可能であると思われる）
- ・ Triton X-100 溶液（NK 活性測定用培地で 2% 溶液を調製しておく）

4. サイトカイン定量用試薬

- ・ BioLegend Human IFN- γ ELISA MAXTM Deluxe
- ・ PBS
- ・ 10% Tween 20
- ・ 2N H₂SO₄

5. 調合・調整

1) 試験成分の調製

- ・ 各試験成分を 100 mM になるよう DMSO に溶解する。抽出物の場合は 100 mg/ml となるよう DMSO に溶解する。溶けにくい場合は濃度を半分程度にするか、エタノールなど他の溶媒で溶解させることを検討する。

2) 継代培養用培地

- ・ KHYG-1 細胞、K562 細胞ともに 10% FBS を含む RPMI-1640 培地を基本とする。

コンタミネーションが心配な場合はこれにペニシリン-ストレプトマイシン溶液を 1/100 量添加する。KHYG-1 細胞の培養にはさらに 100 U/ml となるようヒト IL-2 を添加する。IL-2 溶液の調製方法および添加量は、製品に添付されているデータシートの記載内容に従う。

3) NK 活性測定用培地

- ・ 1% FBS を含む RPMI-1640 培地を調製する（FBS にはウシ由来の LDH が含まれているため、10%濃度で加えるとバックグラウンドが高くなってしまう）。

4) ELISA 用試薬

- ・ 5×Coating Buffer A を脱イオン水で 5 倍希釈し、1×Coating Buffer A を作製する。
- ・ 5×Assay Diluent A を PBS で 5 倍希釈し、1×Assay Diluent A を作製する。
- ・ スタンダード（凍結乾燥品）のバイアルに 200 μ l の 1×Assay Diluent A を加え stock solution を作製する（濃度はデータシートに記載してある）。
- ・ PBS に 10% Tween 20 を終濃度 0.05% になるよう加え、Wash Buffer を作製する。

【プロトコール】

1. NK 活性測定法

1) KHYG-1 細胞への食品成分の添加、培養

- ・ 継代用培地に 2×10^5 cells/ml となるよう 60×15 mm 培養ディッシュに播く（ELISA のように培養上清のみの回収であれば 24 ウェルプレートで十分であるが、NK 活性の測定では細胞数を確保するため 60×15 mm 培養ディッシュもしくは 6 ウェルプレートを使用した方がよい）。
- ・ 試験成分を KHYG-1 細胞を含む培地に終濃度が 10~100 μ M になるよう添加する。試験成分を加えない無処理区（溶媒のみ添加）の細胞も用意する。細胞を 24~72 時間 CO₂ インキュベーターで培養する。

2) K562 細胞の培養

- ・ NK 活性を測定する 2 日前に、60 mm 径培養ディッシュに 6×10^5 cells/ml となるよう播き、CO₂ インキュベーターで培養する。

3) KHYG-1 細胞の回収

- ・ 試験成分で処理した細胞を、トランスファーピペットを用いて 15 ml コニカルチューブに移し、1,000 rpm で 3 分間遠心し、上清を除く。
- ・ 細胞ペレットに 3 ml の NK 活性測定用培地を加え、トランスファーピペットを用いて穏やかに分散させる。再度 1,000 rpm で 3 分間遠心し、上清を除去する。
- ・ 細胞ペレットに 500 μ l から 3 ml の NK 活性測定培地を加えトランスファーピペットを用いて穏やかに分散させる。生細胞数を自動セルカウンターで計測する。

4) K562 細胞の回収

- ・ K562 細胞をトランスファーピペットを用いて 15 ml コニカルチューブに移し、1,000 rpm で 3 分間遠心し、上清を除く。
- ・ 細胞ペレットに 1 ml の NK 活性測定用培地を加え穏やかに分散させる。細胞数

を自動セルカウンターを用いて計測する。

5) KHYG-1 細胞と K562 細胞の共培養

96 well 細胞培養プレート（丸底）を用意し、調製した細胞あるいは培地を図 1 に示すような配置で添加する。A 行、C 行、E 行は KHYG-1 細胞（Effector）と K562 細胞（Target）を混合したものを含む（Effector-Target Mix）。B 行、D 行、F 行は Effector 細胞のみ（Effector Control）。H2-H4 は Target 細胞と Triton X-100 溶液を混合したものを含み、Target 細胞は完全に溶解される（High Control）。H6-H8 は Target 細胞のみを含む（Low Control）。H10-H12 には培地のみを添加し、バックグラウンドの測定に使用する（Background Control）。プレート 1 枚あたり最大 12 種類（通り）以上の試料（条件）を検討できる。実際に測定される LDH 活性は、表 1 に示すとおり Effector 由来、Target 由来、FBS 由来の 3 通りがあるので、後に示す計算式を使って Effector によって細胞傷害を受けた Target から放出される LDH 活性を算出する。

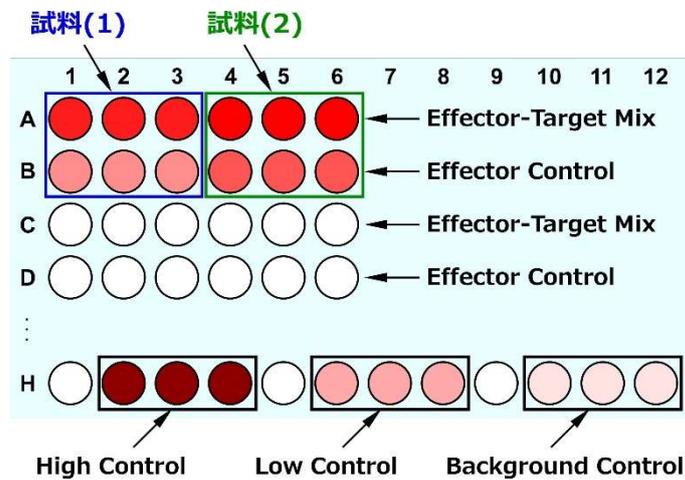


図 1 96 ウェルプレートの配置（ウェルの色は発色したときのイメージ）

表 1 各ウェルに含まれる LDH 活性

	Effector由来LDH	Target由来LDH	FBS由来LDH
Effector-Target Mix	●	● (自然放出+細胞傷害)	●
Effector Control	●		●
High Control		● (最大量)	●
Low Control		● (自然放出)	●
Background Control			●

- ・NK 活性測定用培地を、Effector Control、Low Control のウェルに 100 μ l ずつ、Background Control のウェルに 200 μ l ずつ分注する。
- ・NK 活性測定用培地に再懸濁した K562 細胞を、 2.5×10^5 cells/5 ml となるよう

NK 活性測定用培地に希釈する。これを Effector-Target Mix、High Control、Low Control のウェルに 100 μ l ずつ分注する。このとき 1 ウェルあたり 5×10^3 個の Target 細胞が含まれる。

- NK 活性測定用培地に再懸濁した KHYG-1 細胞を 4×10^5 cells/800 μ l となるよう NK 活性測定用培地で調製する。これを Effector Control、Effector-Target Mix のウェルに 100 μ l ずつ分注する。このとき 1 ウェルあたり 5×10^4 個の Effector 細胞が含まれる。
- 2% Triton X-100 溶液 (NK 活性測定用培地で調製したもの) を、High Control のウェルに 100 μ l ずつ分注する。
- プレートにフタをし、CO₂ インキュベーターで 4 時間培養する。

6) LDH アッセイ

LDH アッセイは市販のキットを用いて行う。キットに含まれる試薬の調製は添付の説明書に従う。ここではロシュ社の細胞傷害性検出キット (LDH) の説明書に従った方法について述べる。

- 共培養したプレートを 250 \times g で 10 分間遠心する。
- 上清 100 μ l をマルチチャンネルピペットを使いアッセイプレートの対応するウェルへ移す (細胞を吸わないように気をつける)。
- 各ウェルに 100 μ l の反応混合液 (キットに含まれる触媒溶液と色素溶液を混合したもの) を分注し、High Control のウェルが十分に発色するまで室温で 20 分から 30 分静置する (プレートは遮光しておく)。
- マイクロプレートリーダーで 490 nm の吸光度を測定する。対照波長も測定する場合は 600 nm 以上とする。得られた吸光度から Background Control の値を差し引いておく。
- 各処理区について、以下の計算式に従い細胞傷害活性を算出し、無処理区の結果と比較する。

$$\text{細胞傷害活性 (\%)} = \frac{((\text{Effector-Target mix}) - \text{Effector control}) - \text{Low control}}{\text{High control} - \text{Low control}} \times 100$$

2. 炎症性サイトカイン測定法

KHYG-1 細胞への食品成分の添加、培養までは上記の NK 活性測定で述べた方法に従う。

1) 培養上清の回収

- 各ウェルに含まれる全量を適当な遠心用チューブに移し、1,000 rpm で 3 分間遠心する。
- 培養上清をマイクロピペットを用いて新しいチューブ等に移す (このとき使う保存用チューブは、ストレージチューブあるいはディルーションチューブと呼ばれるものや PCR チューブなど、配置を 96 ウェルプレートに対応させることが可能なものを使うと便利である)。NK 活性測定と同時進行させる場合も同様に KHYG-1 細胞の回収時に培養上清を回収する。
- 培養上清をすぐに使用しない場合は -80°C で保存する。

2) ELISA 法

- ・アッセイ前日に、Capture Antibody を Coating Buffer で 200 倍希釈し、ELISA 用 96 ウェルプレート（キットに含まれている）のうちの使用するウェルに 100 μ l ずつ分注する。プレートシールを貼り 4℃で一晩静置する。
- ・アッセイ当日にプレートを室温に戻し、300 μ l の Wash Buffer でプレートを 4 回洗浄する。プレートを逆さにし、ペーパータオルの上に数回叩きつけることでウェルに Wash Buffer が残らないようにする。これ以後のプレート洗浄の工程の最後には同様の操作を行う。
- ・非特異的なバックグラウンドを抑えるため、各ウェルに 200 μ l の 1×Assay Diluent A を分注する。プレートシールを貼り、プレートシェーカーで室温、1 時間振盪する（500 rpm）。
- ・Top standard から zero standard まで 8 本のマイクロチューブを準備し、Top standard 以外のチューブには 500 μ l の 1×Assay Diluent A を分注する。Stock solution を 1×Assay Diluent A で希釈し、1 ml の Top standard (500 pg/ml) を調製する。Top Standard を 2 倍ずつ段階希釈し、スタンダードの希釈系列を作製する。
- ・プレートを Wash Buffer で洗浄する（300 μ l×4 回）。
- ・各ウェルに 100 μ l のスタンダードまたはサンプルを加える。プレートシールを貼り、プレートシェーカーで室温、2 時間振盪する（500 rpm）。
- ・プレートを Wash Buffer で洗浄する（300 μ l×4 回）。
- ・ビオチン化 Detection Antibody を 1×Assay Diluent A で 200 倍希釈し、これを各ウェルに 100 μ l ずつ分注する。プレートシールを貼り、プレートシェーカーで室温、1 時間振盪する（500 rpm）。
- ・プレートを Wash Buffer で洗浄する（300 μ l×4 回）。
- ・Avidin-HRP を 1×Assay Diluent A で 1000 倍希釈し、これを各ウェルに 100 μ l ずつ分注する。プレートシールを貼り、プレートシェーカーで室温、30 分間振盪する（500 rpm）。
- ・プレートを Wash Buffer で洗浄する（300 μ l×5 回）。
- ・TMB Substrate Solution A および TMB Substrate Solution B を等量混合し、各ウェルに 100 μ l ずつ分注する。遮光して 20 分程度インキュベートする。
- ・反応停止液（2N H₂SO₄）を 100 μ l 添加し、発色反応を停止させる。
- ・マイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定する。対照波長も測定する場合は 570 nm の吸光度を測定する。

【プロトコールのポイント・注意点】

1. NK 活性測定法

- 1) 本稿では実施例として Effector と Target の比率（E-T ratio）を 10 : 1 としているが、20 : 1 や 5 : 1、2.5 : 1 などの比率でも検討し、発色の程度や NK 活性に比率に依存した直線性が認められるかなどを考慮して最適な E-T ratio を決定する。
- 2) 各検体あたり 3 連で行っているため、細胞傷害活性の計算ではそれぞれの平均を取る。ウェルの配置については自由に変更可能である。

2. 炎症性サイトカイン測定法

- 1) 各スタンダードおよび検体は2連で実施する。
- 2) ELISAキットによっては構成品の中に毒劇物やカルタヘナ法該当品が含まれている可能性があるため、取り扱いに注意を要する。

【おわりに】

本稿で述べた LDH 反応系を利用した NK 活性測定は、高価な機械、設備等がなくても容易に実施でき、多数の検体の処理にも向いているといえる。もし培養細胞株ではなく血液や臓器由来の NK 活性を検討する場合などは、ウェルあたりの細胞数やインキュベーションの時間などの検討が必要になると思われる。また、本方法より検出感度が高い実験系として、フローサイトメーターを用いた細胞傷害検出系も利用できる。この場合は、あらかじめターゲット細胞を CFSE (5-(6)-carboxyfluorescein diacetate) で標識し、NK 細胞と共培養後に 7-AAD (7-Amino-Actinomycin D) を添加しアポトーシスを起こした細胞を検出する。CFSE と 7-AAD の蛍光を検出し、両方が陽性となる細胞が NK 細胞によって傷害されたターゲット細胞である。

【参考文献】

- 1) Saito T., Abe D., Nogata Y. (2015) Coffee diterpenes potentiate the cytolytic activity of KHYG-1 NK leukemia cells. *Food Sci. Technol. Res.* 21, 281-284.
- 2) Saito T., Abe D., Nogata Y. (2015) Polymethoxylated flavones potentiate the cytolytic activity of NK leukemia cell line KHYG-1 via enhanced expression of granzyme B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 456, 799-803.