

## 8) 細胞の運動性評価法

畜産草地研究所 高山 喜晴

### はじめに

細胞運動は多くの細胞にみられる基本的な生命現象であり、様々な細胞機能の発現に深くに関与している。たとえば、創傷治癒の過程では、真皮を構成する線維芽細胞(図 1①)が創傷を受けた部位に移動し、I 型コラーゲンを産生することで、肉芽組織(図 1②)が形成される。肉芽組織の収縮により創傷面が縮小すると共に、上皮を構成する角化細胞が肉芽組織上に移動・増殖し表皮(図 1③)が形成されて創傷が完治する。したがって、線維芽細胞や角化細胞の運動活性は速やかな創傷治癒のために必須である。

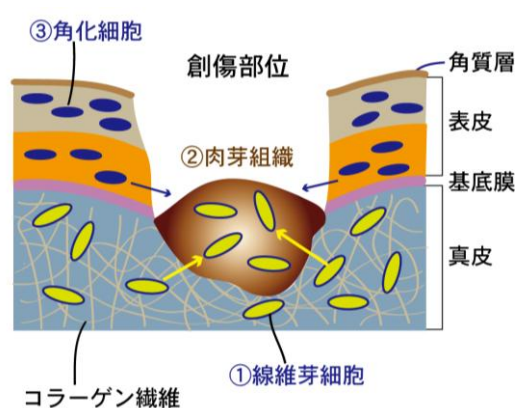


図 1 線維芽細胞と角化細胞による創傷治癒

線維芽細胞をコラーゲングル内またはコラーゲングル上で三次元培養すると、コラーゲングルが収縮し、真皮に類似した構造をとるようになる。線維芽細胞のコラーゲングル収縮能はその運動活性を反映するため、細胞の運動性評価法として用いられる。これまでに、PDGF(血小板由来細胞増殖因子)・FGF(線維芽細胞増殖因子)などの細胞増殖因子が、線維芽細胞のコラーゲングル収縮活性を促進することが知られている。本稿では、コラーゲングル内培養法より簡便なコラーゲングル上培養法を用いて、線維芽細胞の運動活性評価をする手法を紹介する。

### 準備するもの

#### 1. 実験器具

- ・CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C, 5%CO<sub>2</sub> に設定)
- ・クリーンベンチ
- ・位相差顕微鏡
- ・アスピレーター (耐圧チューブでダイヤフラムポンプに接続したもの)
- ・オートクレーブ
- ・小型アイスボックス
- ・ピペットエイド
- ・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)

- ・直径 60 mm・90 mm の滅菌済み細胞培養用ポリスチレンディッシュ (ファルコン・コーニング等)
- ・10 mL 滅菌ポリスチレン製ピペット (ファルコン・コーニング等)
- ・滅菌済 12 ウェル細胞培養プレート (ファルコン・コーニング等：1 ウェルあたりの面積は 200 mm<sup>2</sup>)
- ・滅菌済 50 mL ポリスチレンチューブ (ファルコン・コーニング等)
- ・0.45 μm ろ過滅菌用膜 (ミリポア)
- ・50 mL・20 mL 滅菌済みプラスチックシリンジ (テルモなど)
- ・1.5 mL チューブ (エッペンドルフなど、オートクレーブ滅菌する)
- ・金属製マイクロスパーテル (1 個ずつアルミホイルで包み、乾熱滅菌またはオートクレーブ滅菌する)
- ・トーマ血球計算盤
- ・遠心分離器 (50 mL・15 mL のポリスチレンチューブを、最大毎分 3000 回転で遠心できるもの)
- ・CCD カメラ付画像解析装置
- ・画像解析用ソフトウェア (Image-J など選択部分の面積が測定できるもの)

## 2. 試薬

- ・0.3%セルマトリックス タイプ I-A 酸可溶化コラーゲン溶液  
新田ゼラチンより 100mL 入りのボトルが販売されている。冷蔵保存する。  
(凍結厳禁)
- ・5 倍濃縮 DMEM 培養液  
粉末 DMEM (ニッスイ) 9.5g  
200mL の超純水 (ミリ Q 水など) に溶解させ、ろ過滅菌する。炭酸水素ナトリウムは加えない。ガラスボトルで冷蔵保存。
- ・再構成用 HEPES 緩衝液  
HEPES (ナカライ・バイオテクノロジーグレード) 4.77g  
1N 水酸化ナトリウム溶液 8 mL  
超純水 80 mL  
100 mL にメスアップした後、クリーンベンチ内でろ過滅菌する。1 mL ずつ滅菌したチューブに分注し、-20℃で保存する。
- ・PBS-EDTA 溶液  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・12H<sub>2</sub>O 2.9g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g  
NaCl 8.0g  
KCl 0.2g

EDTA・4Na            0.2g

超純水に溶解後 1000 mL にメスアップする。オートクレーブ後、冷蔵保存する。PBS 溶液はインビトロジェン・シグマなどから発売されているので、それに EDTA を加えて滅菌してもよい。

・ 10 倍濃度トリプシン溶液

粉末トリプシン 1:250 (インビトロジェン) 2.5 g

PBS・EDTA 溶液 100 mL

コールドルームで攪拌しながらトリプシンの粉末を完全に溶解させた後、クリーンベンチ内でろ過滅菌する。滅菌チューブに 1 mL ずつ分注し -20°C で保存する。(インビトロジェンより 2.5%トリプシン 1:250 溶液も発売されている。)

・ DMEM 液体培地 (シグマ等)

冷蔵保存

・ 0.4%トリパンブルー染色液 (インビトロジェン等)

室温保存

・ ウシ胎児血清 (FBS)

補体を非動化するため、解凍した FBS を 56°C で 30 分間インキュベートした後、ろ過滅菌する。100 mL ずつオートクレーブしたガラスポトルに分注して -20°C で保存する。

・ 滅菌水

超純水をオートクレーブした後、冷蔵保存する。

3. 細胞株の入手と維持

・ WI38 正常二倍体ヒト胎児由来線維芽細胞 (理化学研究所・バイオリソースセンターより入手可能)

一般的に、線維芽細胞はどれもコラーゲンゲル収縮活性を持つが、トランスフォームした株化細胞よりも、正常二倍体細胞の方が、ゲル収縮活性が高いとされている。また、ゲル収縮アッセイは無血清で行うので、1 週間程度、無血清培養に耐えうる細胞を用いることが望ましい。

入手した WI38 細胞は 60 mm ポリスチレンディッシュ上に播種し、FBS を最終濃度 10 % で添加した DMEM で培養する。3 日毎にトリプシンを最終濃度 0.25 % で含む PBS-EDTA で 5 分間、室温でインキュベートして細胞を浮遊させ、4 倍希釈して継代する。正常二倍体細胞は分裂回数が限られているので、細胞入手直後に細胞を凍結保存したストックを作っておき、細胞の継代数が 10 回以上になる前に、新しい凍結ストックから細胞を起こし直す。

#### 4. 検体

PBS に溶解後、ろ過滅菌して凍結保存しておく (-80 °C が望ましい)。凍結融解の繰り返しを避けるため、1 回に使用する量をチューブに分注してから保存する。

#### プロトコール

以下の操作はクリーンベンチ内で無菌的に行う。

1. 50 mL ポリスチレンチューブ・5 倍濃縮 DMEM・I 型コラーゲンゲル溶液をアイスボックス内で氷冷しておく。
2. ポリスチレンピペットを用いて、2 mL の 5 倍濃縮 DMEM と 7 mL の I 型コラーゲン溶液をチューブ内で均一になるまで混和する。(DMEM 中のフェノールレッドにより、ゲル溶液は黄色になる。)
3. 混和したコラーゲンゲル溶液に、ピペットを用いて再構成用 HEPES 緩衝液 1 mL を加え、均一になるまで混和する。(緩衝液により pH が上昇するため、ゲル溶液は淡いピンク色になる。)
4. ピペットで混和しながら液量を測定し、最終液量が 10 mL になるように滅菌水で調節する。
5. 混和したコラーゲン溶液を 400  $\mu$ L ずつ 12 ウェル細胞培養用プレートに分注する。
6. 12 ウェル細胞培養用プレートを、37°C にセットした CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 2 時間静置してゲルを重合させる。
7. 90mm ディッシュで単層培養した WI38 細胞が、培養面のほぼ全面を覆う状態(コンフルエント)になるのを待つ。コンフルエントになった細胞を、5 mL の PBS-EDTA で 2 回洗浄した後、2.7 mL の PBS-EDTA に 300  $\mu$ L の 10 倍濃度トリプシン溶液を加えたもので 5 分間インキュベートし、浮遊させる。
8. FBS を最終濃度 10% で含む DMEM を 12 mL 加え、トリプシンの反応を停止させる。
9. 細胞懸濁液を 50 mL のポリスチレンチューブに移し、毎分 1000 回転で 3 分間遠心して細胞を沈殿させる。
10. 上清をアスピレーターで吸引した後、細胞を 15 mL の無血清 DMEM に懸濁する。
11. 再び毎分 1000 回転で 3 分間遠心し細胞を沈殿させる。(FBS を完全に除去する。)
12. 清をアスピレーターで吸引し、細胞を 10 mL の無血清 DMEM に懸濁する。40  $\mu$ L の細胞懸濁液を 2  $\mu$ L のトリパンブルー溶液と混合し、血球計算盤を用いて細胞数を測定する。
13. 細胞の密度が 1 mL あたり  $4 \times 10^4$  となるように無血清 DMEM で調整する。1 ウェルあたり 400  $\mu$ L の細胞懸濁液をゲル上に蒔く。

14. CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 2 時間静置し、位相差顕微鏡でゲルに細胞が完全に付着したのを確認する。滅菌したマイクロスパーテルをゲルとウェルの境界に差し込み、周囲を一周させることでプレートより剥離し、ゲル収縮を開始させる。同時に検体を培地（無血清 DMEM）に添加する。
15. 一定時間毎にゲルを上部から CCD カメラで撮影し、画像を jpeg 形式で保存する。
16. 画像ファイルを、画像解析ソフトを用いて開く。画像上のゲルとウェルの境界を選択し、その内部の面積を測定することにより、ゲル収縮の程度を定量化する。

### プロトコールのポイント

コラーゲンゲル溶液は粘度が高いため、ゲル溶液と DMEM を混和する際には、ゆっくりとピペットエイドを操作し、ゲルに泡が混入しないように細心の注意を払う。また、温度が上昇するとゲルの重合が進むので、ゲルをウェルに分注するまでの操作は一貫してアイスボックスの中で行う。また、新田ゼラチンから粘度が低く混和しやすいタイプ I-P コラーゲンが発売されているので、これを使用してもよい。（但し、タイプ I-A を用いた場合と比較してゲルの強度は低くなる。）

また、ゲル収縮の速度は細胞の種類やコラーゲンの強度によって大きく変わるので、予め予備実験をして、写真撮影するタイミングを決定しておくのが望ましい。

### 後片づけ

細胞やコラーゲン溶液を取り扱ったピペット・チューブ・プレート類は使い捨てのものを用いれば、洗浄の必要がないので便利である。いずれもオートクレーブした後に廃棄する。クリーンベンチ内でアスピレーターにより吸引した PBS・培養液などもオートクレーブした後に廃棄する。

### おわりに

線維芽細胞によるコラーゲンゲルの収縮は、皮膚の創傷の治癒や、加齢もしくは糖尿病によりもたらされる皮膚の弾性の低下のモデルとされており、本稿で紹介したコラーゲンゲル収縮アッセイは、これら解析にも有用と考えられている。

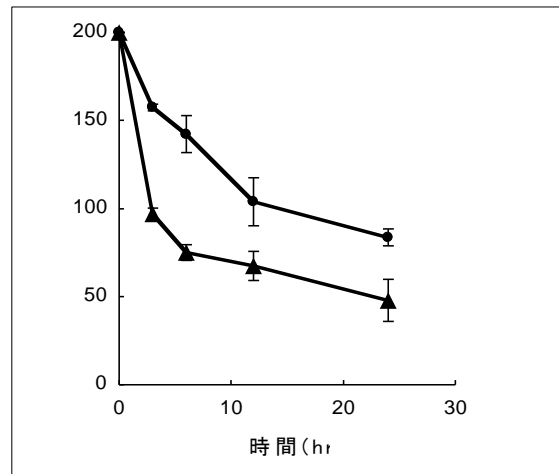


図 2 コントロール（無血清 DMEM 培地：●）および 1%ウシ初乳(乳清画分)を DMEM 培地に添加した場合（▲）の、コラーゲンゲル面積の変化



図 3 収縮開始 24 時間後のコラーゲンゲルを上方から撮影した写真。左側がコントロール（無血清 DMEM），右側がウシ初乳の乳清画分を最終濃度 1% で添加したもの

#### 参考文献

- 1) 新田ゼラチン オンラインマニュアル Cell Matrix コラーゲンを用いる細胞培養法 <http://www.nitta-gelatin.co.jp/products/labo/manual/index.html>
- 2) 渡邊利雄, 細胞を培養する, 「細胞工学別冊 バイオ実験イラストレイテッド 6 すくすく育て細胞培養」, 第 1 版 (秀潤社, 東京), pp.86-100 (1996).
- 3) Grinnell, F., Fibroblast-collagen-matrix contraction: growth-factor signaling and mechanical loading. *Trends Cell Biol.*, **10**, 362-365 (2000).
- 4) Takayama, Y. and Mizumachi, K., Effect of lactoferrin on collagen gel contractile activity and myosin light chain phosphorylation in human fibroblasts. *FEBS Lett.*, **508**, 111-116 (2001).
- 5) Takayama, Y., Takahashi, H., Mizumachi, K. and Takezawa, T., Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is required for lactoferrin-enhanced gel contractile activity of human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **278**, 22112-22118 (2003).

### 3) 骨芽細胞分化誘導活性の評価

(独) 農研機構 畜産草地研究所 高山 喜晴

#### はじめに

骨組織は骨細胞より分泌された I 型コラーゲンを主体とする基質と、そこに沈着したヒドロキシアパタイト (リン酸カルシウム) より構成されている。骨芽細胞は I 型コラーゲンなどの骨基質タンパク質を合成すると共に、血中からカルシウムとリンを取り込み骨組織の石灰化 (ヒドロキシアパタイトの形成) を促進する機能を持つ。近年の組織工学の発展と共に、培養骨細胞とコラーゲンを組み合わせた様々な人工骨形成法が提案されている。骨芽細胞によるヒドロキシアパタイトの形成を促進するため、アスコルビン酸・ $\beta$  グリセロリン酸・デキサメサゾンなどの培地添加物が一般的に使用される。一方、牛乳中に含まれる鉄結合蛋白質であるラクトフェリンや大豆由来のゲニステイン (イソフラボン誘導体) などの天然物も骨芽細胞の骨形成能を高める機能を持つことが知られている。本稿では、日本組織工学会の「培養骨形成のガイドライン」に準拠して、MG-63 ヒト骨肉腫細胞の骨芽細胞分化に伴う細胞外マトリックスへのカルシウム沈着量の増大および細胞のアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の上昇を指標に、様々な機能性成分から骨芽細胞分化を促進する物質をスクリーニングする方法を紹介する。

#### 1. MG-63 細胞の骨芽細胞様細胞への分化誘導

##### 準備するもの

##### 1) 実験器具

- ・ CO<sub>2</sub> インキュベーター (37°C・5% CO<sub>2</sub> に設定)
- ・ クリーンベンチ
- ・ 吸引アスピレーター (耐圧チューブでダイヤフラムポンプに接続する)
- ・ オートクレーブ
- ・ pH メーター
- ・ ピペットエイド
- ・ メカニカルミクロピペット (ギルソン・エッペンドルフ等)
- ・ 直径 90 mm の滅菌済み細胞培養用ポリスチレンディッシュ (ファルコン・コーニング等)
- ・ 10 ml 滅菌ポリスチレン製ピペット (ファルコン・コーニング等)
- ・ 12 ウェル細胞培養プレート (培養面積 3.8 cm<sup>2</sup>:ファルコン・コーニング等)
- ・ 滅菌済 50 ml ポリスチレンチューブ (ファルコン・コーニング等)

- ・ 0.45  $\mu\text{m}$  ろ過滅菌用膜 (ミリポア)
- ・ ボトルトップフィルター (コーニング等)
- ・ 50 ml・20 ml 滅菌済みプラスチックシリンジ (テルモなど)
- ・ 1.5 mL チューブ (エッペンドルフなど、オートクレーブ滅菌する)
- ・ トーマ血球計算盤
- ・ 位相差倒立顕微鏡
- ・ 卓上遠心分離器 (50 ml・15 ml のポリスチレンチューブを、最大毎分 3000 回転で遠心できるもの)

## 2) 試薬

- ・ ウシ胎児血清 (FBS) : 補体を非働化するため、解凍した FBS を 56°C で 30 分間インキュベートした後、ろ過滅菌する。100 ml ずつオートクレーブしたガラスボトルに分注し-20°C で保存。
- ・ 培養液 : MEM 培養液 (シグマ : M4655) 500 ml に非必須アミノ酸溶液 (シグマ : M7145) 5 ml・ペニシリン・ストレプトマイシン溶液 (ギブコ・インビトロジェン) 5 ml・FBS 50ml を添加し、冷蔵保存する。
- ・ 分化誘導培養液 : 上記の培養液 500 ml にさらにデキサメサゾン溶液 1 ml,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (ナカライ) 0.4 g を溶解させた後ろ過滅菌する。冷蔵保存。(デキサメサゾン最終濃度は 100 nM, カルシウム最終濃度は 8 mM になる。)

### ・ PBS-EDTA

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.9 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.2 g
NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
EDTA-4Na	0.2 g

上記の試薬をミリQ水に溶解後 1000 ml にメスアップする。オートクレーブで滅菌した後、冷蔵保存する。PBS 溶液はインビトロジェンやシグマ等から発売されているので、それに EDTA を加えてオートクレーブ滅菌してもよい。

- ・ デキサメサゾン溶液 (x500) : デキサメサゾン (シグマ) を最終濃度 200  $\mu\text{M}$  でジメチルスルフォキシド (DMSO : ナカライ) に溶解した後、1 ml ずつ分注して-20°C で凍結保存する。
- ・ 2.5% トリプシン溶液 (x10) : トリプシン 1 : 250 (ナカライ) 2.5 g を 100 ml の PBS-EDTA 溶液に溶解させ、ろ過滅菌する。-20°C で凍結保存。
- ・ コラーゲン溶液 : ガラスボトルに入れた 100 ml のミリ Q 水に酢酸を 1 ml を加えた後 (最終濃度 0.15 M), 121°C で 20 分間オートクレーブ滅菌する。室温で冷却後タイプ I-C 型コ



ラーゲン溶液(新田ゼラチン)を 3.3 ml 加える(最終濃度は 0.1 mg/ml になる)。冷蔵で保存する。

### 3) 細胞株の入手と維持

MG-63 ヒト骨肉腫細胞(ヒューマンサイエンス研究資源バンク); 90 mm 細胞培養ディッシュ上に播種し、5% CO<sub>2</sub>・37°C に設定したインキュベーター内で培養する。3 日毎にトリプシン 1:250 を 0.25 % 含む PBS-EDTA で細胞を 5 分間処理することにより浮遊させ、培養液で 1/6-1/8 に希釈後、ディッシュに播種し継代操作を行う。継代を繰り返すと細胞の形質が変化しやすいので、2 ヶ月に一度ストックから起こしなおす。

### 4) 検体

水溶性の検体の場合、ミリ Q 水または PBS に溶解後、ろ過滅菌したものを凍結保存する(-80°C が望ましい)。凍結融解の繰り返しを避けるため、1 回に使用する量をチューブに分注し保存する。水に難溶性の検体の場合、DMSO に溶解させるが、培養液に添加する DMSO の量が 12 ウェル培養プレートの場合、20 µl 以下になるようにする。

## プロトコール (MG-63 細胞の分化誘導)

以下の操作はクリーンベンチ内で無菌的に行う。

1. 12 ウェル培養プレート(培養面積 3.8 cm<sup>2</sup>)を I 型コラーゲン溶液でコートする。クリーンベンチ内でコラーゲン溶液を 1 ウェル当たり 2 ml 加え、15 分間静置した後、滅菌水で 2 回洗浄する。
2. コート済みの培養プレートに、MG-63 細胞を初期細胞数 5 x 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> で播種する。細胞がコンフルエントになるまで培養を継続する。
3. MEM 培養液を分化誘導培養液と交換し、石灰化を開始させる。(1 ウェルあたり 2ml の培養液を用いる。)同時に検体を培養液に添加する。
4. 以後、2 日おきに分化誘導培養液を交換し培養を継続する。細胞が剥がれやすいので培養液を交換する時は強く細胞に吹きつけないように注意する。

## プロトコールのポイント

細胞の分化誘導には 24 ウェル培養プレート(培養面積 1.9 cm<sup>2</sup>)を用いることも可能である。その場合は使用する培養液の量を 1 ウェルあたり 1 ml にする。またコラーゲンコートした培養プレートの代わりに、コラーゲン薄膜(高研・新田ゼラチンなど)を用いると、長期間の培養においても細胞が剥がれにくくなるので培養が容易になる。分化効率を上げるためには、細胞を十分コンフルエントの状態にし、その増殖を完全に停止させてから分化誘導することが重要である。

## 2. オルトクレゾールフタレインコンプレクソン法によるカルシウム量の測定

オルトクレゾールフタレインコンプレクソン (OCPC) はアルカリ性条件下でカルシウムと結合し、赤紫色に発色する。この性質を利用して細胞外マトリクスに沈着した結晶化カルシウムをギ酸により可溶化した後、比色定量する方法を紹介する。

### 準備するもの

#### 1) 実験器具

- ・96 ウェル透明マイクロプレート (ヌンク等)
- ・1.5 ml チューブ (エッペンドルフ等)
- ・セルスクレイパー (ファルコン・住友ベークライト等)
- ・遠心分離器 (1.5 ml のポリスチレンチューブを最大毎分 15,000 回転で遠心できるもの)
- ・マイクロプレートリーダー (570 nm の吸光が測定できるもの)

#### 2) 試薬

- ・OCPC 発色試薬：脱イオン水 25 ml に濃塩酸 (12N) 15 ml を加えた後、OCPC (ナカライ) 25 mg を加えて完全に溶解させる。8-ヒドロキシキノリン 250 mg を加え、脱イオン水で 250 ml にメスアップする。褐色ガラスボトルで室温保存し、調製から 1 ヶ月以内に使用する。
- ・AMP 緩衝液：2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール (AMP：ナカライ等) 37.8 ml を脱イオン水 150 ml と混和し、6N 塩酸で pH を 10.7 に合わせ脱イオン水で 250 ml にメスアップする。褐色ガラスボトルで冷蔵保存し、調製から 3 週間以内に使用する。
- ・カルシウム標準液：0.2 mg/ml の炭酸カルシウム溶液を脱イオン水で倍々に希釈し 2 倍希釈系列のカルシウム標準液 (0.2, 0.1, 0.05 mg/ml) を調製する。
- ・ギ酸 (ナカライ・和光純薬等)：脱イオン水で 10 % (v/v) に希釈する。室温保存。

### プロトコール

1. 12 ウェル細胞培養プレートに播種した MG-63 細胞を、分化誘導開始後 1 週間後・2 週間後・3 週間後に回収する。細胞を 2 ml の PBS で 2 回洗浄した後、10%ギ酸 400  $\mu$ l を加えてセルスクレイパーでかき取り、1.5 ml のチューブに移した後室温で 30 分置く。
2. サンプルを 15,000 rpm で 15 分間遠心し、上清 5  $\mu$ l を AMG 緩衝液 500  $\mu$ l に加え良く混和する。2 倍希釈系列のカルシウム標準液も 5  $\mu$ l ずつ AMG 緩衝液 500  $\mu$ l に加え良く混和する。
3. OCPC 発色試薬 50  $\mu$ l を 5 分以内に加える。
4. 反応液を 96 ウェル透明マイクロプレートに 200  $\mu$ l ずつ分注し、プレートリーダーで

570 nm の吸光度を測定する。カルシウム標準液のサンプルは 2 ウェルで測定する。発色試薬を加えて 2 時間以内に吸光を測定する。

5. カルシウム標準液の吸光度より標準曲線を作成する。
6. 標準曲線を基にサンプル中のカルシウム濃度を求める。

図 1 は OCPC 法による結晶化カルシウムの定量により、MG-63 細胞の骨芽細胞分化に対するウシラクトフェリンの効果を検証した一例である。

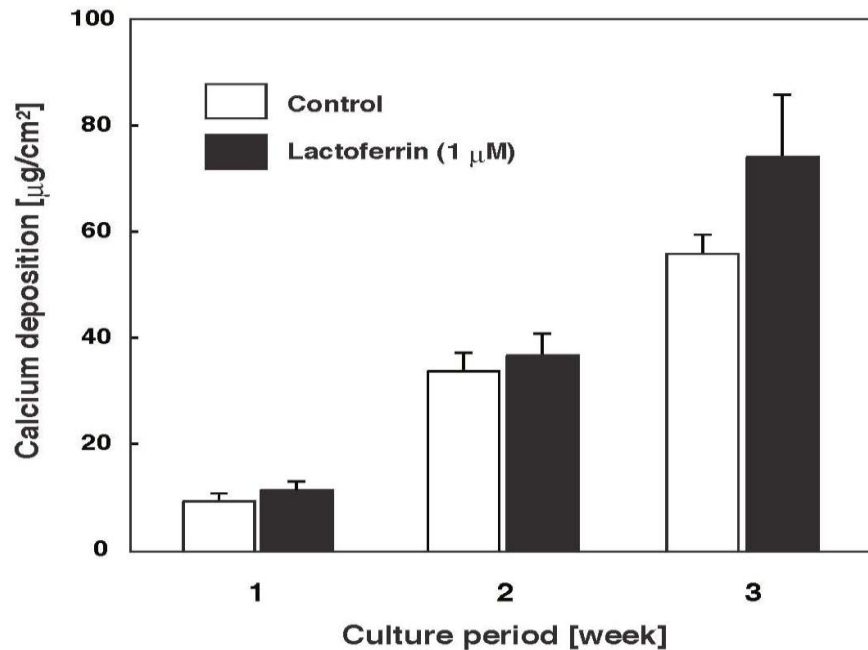


図 1 MG-63 細胞の細胞外マトリックスへのカルシウム沈着に対するウシラクトフェリンの効果 (参考文献 4 より改変して引用)

### プロトコールのポイント

和光純薬より OCPC 法をベースにしたキット「カルシウム C テストワーク」が発売されている。緩衝液・OCPC 発色液・カルシウム標準液にはこのキットを用いても再現性の良い結果が得られる。分化誘導後 2 週間後および 3 週間後のサンプルは脱イオン水で 1/5-1/10 に希釈してから AMG 緩衝液に加えると、測定値がカルシウム標準液の希釈系列の濃度 (0-20 mg/dl) の範囲内に収まる。

### 3. ALP 活性の測定

ALP は、骨芽細胞および骨芽細胞から分泌される骨基質小胞の表面に存在する膜結合型の蛋白質で、骨芽細胞の骨形成能に比例し活性が上昇することから骨芽細胞の初期分化マーカーとされている。本稿では、パラニトロフェニルリン酸 (PNPP) から生成されるパラニトロフェ

ノール (pNP) を比色定量することにより、ALP の活性を測定するパラニトロフェニルリン酸基質法を紹介する。

## 準備するもの

### 1) 実験器具

- ・ 96 ウェル透明マイクロプレート (ヌンク・住友ベークライト等)
- ・ 1.5 ml チューブ (エッペンドルフ等)
- ・ セルスクレイパー (ファルコン・住友ベークライト等)
- ・ 遠心分離器 (1.5 ml のチューブを、最大毎分 15,000 回転で遠心できるもの)
- ・ 恒温槽 (37°C に設定が可能なもの)
- ・ マイクロプレートリーダー (405 nm の吸光が測定できるもの)

### 2) 試薬

- ・ PBS
- ・ 炭酸緩衝液 (pH 9.8)

0.1M NaHCO <sub>3</sub> 溶液	28 ml
0.1M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 溶液	22 ml
脱イオン水	50 ml
- ・ 可溶化緩衝液

1M Tris-HCl (pH 7.5)	5.0 ml
10% Triton X-100	0.5 ml
脱イオン水	44.5 ml
- ・ 反応液

炭酸緩衝液 (pH 9.8)	100 ml
PNPP・2Na	6.7 mM
MgCl <sub>2</sub>	2 mM
- ・ 反応停止液 : 0.1N NaOH
- ・ 標準液 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.031 mmol/l の p-NP 溶液 : 0.5 mmol/l の pNP 溶液を脱イオン水で倍々に希釈し、2 倍希釈系列の標準液を調製する。

## プロトコール

1. 12 ウェル細胞培養プレートに播種した MG-63 細胞を、分化誘導開始後 1 週間後・2 週間後・3 週間後に PBS で 2 回洗浄する。400  $\mu$ l の可溶化緩衝液を加えセルスクレイパーで破碎した後 1.5 ml チューブに細胞を回収する。
2. 15 分間 15,000 rpm で遠心し上清を新しい 1.5 ml チューブに移す。その内 20  $\mu$ l を 80  $\mu$ l の

- 反応液に加える。2倍希釈系列の標準液も 20  $\mu\text{l}$  ずつ 80  $\mu\text{l}$  の反応液に加える。
- 37°C で 30 分間、恒温槽でインキュベートする。
  - 反応停止液 100  $\mu\text{l}$  を加える。混和した後 200  $\mu\text{l}$  を 96 ウェル透明マイクロプレートに移し 405 nm の吸光度を測定する。
  - カルシウム標準液の吸光度から標準曲線を作成する。
  - 標準曲線よりサンプル中の pNP の濃度を求める。

#### データの取りまとめ

37°C・pH 9.8 の条件下で 1 分間に 1 nmol の pNP を生産する酵素活性を 1 ユニットと定義すると、上記のプロトコールの場合、ALP の酵素活性は以下の式で計算される。

$$\text{ALP 活性}[\text{units}/\mu\text{l}] = (\text{pNP 濃度}[\text{nmol}/\mu\text{l}]) / 30[\text{min}] (\text{反応時間}) \times 5 (\text{希釈倍率})$$

図2はパラニトロフェニルリン酸基質法による ALP 活性の測定により、MG-63 細胞の骨芽細胞分化に対するウシラクトフェリンの効果を検証した一例である。

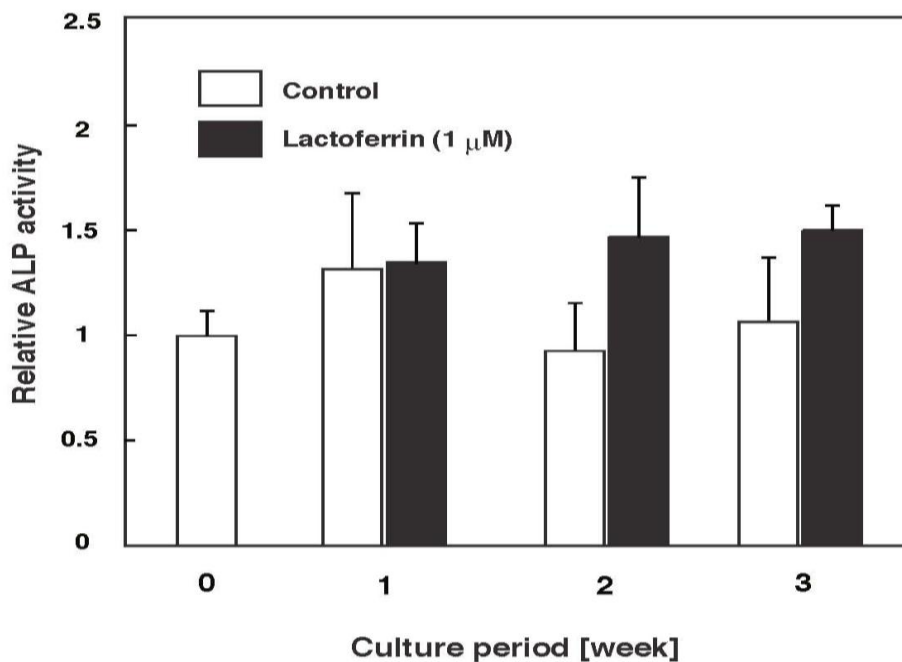


図2 MG-63 細胞の骨芽細胞分化におけるウシラクトフェリンの ALP 活性に対する効果 (参考文献 4 より改変して引用)

#### プロトコールのポイント

パラニトロフェニルリン酸法により ALP 活性を測定する場合、本稿で紹介した炭酸塩緩衝

液の他に AMP 緩衝液・N-エチルアミノエタノール (EAE)・ジエタノールアミン (DEA) などが良く用いられる。緩衝液の種類により生成される pNP の量が変わるので、ALP 活性を比較する場合は注意を要する。炭酸塩緩衝液で pNP 法を用いたキット「ラボアッセイ™ALP」が和光純薬より発売されているので、このキットを用いても再現性の良い結果が得られる。細胞あたりの ALP 活性を求める場合は、骨芽細胞数を直接測定するのは困難なため、TritonX-100 抽出液中の DNA 濃度 [μg/μl] を測定し DNA 1 μg あたりの ALP 活性 [unit/μgDNA] を計算する。

$$\text{DNA 1 } \mu\text{g あたりの ALP 活性 [unit/}\mu\text{g DNA]} = \text{ALP 活性 [units/}\mu\text{l]} / \text{DNA 濃度 [}\mu\text{g/}\mu\text{l]}$$

### 後片づけ

細胞・コラーゲン・培養液を取り扱ったピペット・チューブ・プレート類はオートクレーブした後に廃棄する。クリーンベンチ内でアスピレーターにより吸引した PBS・培養液などもオートクレーブした後に廃棄する。

### おわりに

骨形成能を持つヒト由来培養細胞としては MG-63 の他に Saos-2 や HOS 等が知られている。これらの株化細胞は骨芽細胞の形質を必ずしも保持しておらず、サイトカインへの応答性や分化形質の発現の程度に細胞間で差が認められるので、実験結果の解釈には注意を要する。

### 参考文献

- 1) Takagishi, Y., Kawakami, T., Hara, Y., Shinkai, M., Takezawa, T. and Nagamune, T., Bone-like tissue formation by three-dimensional culture of MG63 osteosarcoma cells in gelatin hydrogels using calcium-enriched medium.. *Tissue Eng.*, **12**, 927-937 (2006).
- 2) Shui, C. and Scutt, A., Mild heat shock induces proliferation, alkaline phosphatase activity, and mineralization in human bone marrow stromal cells and Mg-63 cells in vitro. *J. Bone Miner. Res.*, **16**, 731-741 (2001).
- 3) Morris, C., Thorpe, J., Ambrosio, L. and Santin, M. The soybean isoflavone genistein induces differentiation of MG63 human osteosarcoma osteoblasts. *J. Nutr.*, **136**, 1166-1170 (2006).
- 4) Takayama, Y. and Mizumachi, K., Effect of Bovine Lactoferrin on the Extracellular Matrix Calcification by Human Osteoblast-like Cells. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **72**, 226-230 (2008).