

2) 緑茶のカテキン類 (ペットボトル中のカテキン類も含む)

野菜茶業研究所 山本(前田)万里

はじめに

カテキン類は、多くの植物に含まれる強力な抗酸化物質であり、フラバン-3-オールを基本骨格とするフラボノイド類の総称である。(+)catechin が一般的な物質である。特に茶には苦汁味や水色に大きく影響するカテキン類が多く含まれており、抗酸化作用、抗腫瘍作用、発ガン抑制作用、血圧上昇抑制作用、抗菌作用、抗ウイルス作用、抗う蝕性、抗アレルギー性、消臭作用、脂質代謝改善作用等といった生理機能性があることがわかってきた。カテキン類は、縮合することにより、縮合型タンニンを形成するが、他のフラボノイド類と異なり、配糖体としては存在していないようである。緑茶に含まれているカテキン類は 10~20%で、その主要なものは、カテキン類の約半量を占めるエピガロカテキン-3-O-ガレート(EGCG)、その他エピガロカテキン(EGC)、エピカテキン-3-O-ガレート(ECG)、エピカテキン(EC)である。近年、エピガロカテキン-3-O-(3-O-メチル)ガレート(EGCG3"Me)やエピガロカテキン-3-O-(4-O-メチル)ガレート(EGCG4"Me)などの機能性も明らかにされ、注目されている。紅茶にはそれらの重合したテアフラビン(TF1)、テアフラビン-3-ガレート(TF2A)、テアフラビン-3'-ガレート(TF2B)、テアフラビン-3-3'-ジガレート(TF3)、テアシネンシン類、テアルビジン類が含まれており、オレンジ色の水色に関連している。烏龍茶では、緑茶や紅茶には存在しない多様なカテキン類が見いだされている。現在まで、50 種以上のカテキン類が茶で見いだされている。カテキン類の分析法としては、従来、酒石酸鉄法による比色法(タンニン分析法)、ペーパークロマトグラフ法、薄層クロマトグラフ法等が用いられてきた。これらの方法では、多様なカテキン類の正確な分別は難しく、現在では、ほとんど逆相カラムによる高速液体クロマトグラフ(HPLC)法が用いられている。また、キャピラリー電気泳動法(ミセル動電クロマトグラフィ)を用いて、カテキン類、アミノ酸、カフェイン、アスコルビン酸の同時分析も試みられている。

準備するもの

1. 実験器具

- 液体クロマトグラフ装置(グラジエント可能なポンプ、10°C 以下に保持できるオートサンプラ、カラムオープン、UV 検出器もしくは PDA 検出器、データ処理装置)

HPLC のポンプは分析用のもので良いが、できればグラジエント溶出の可能な装置が必要である。検出器は、UV 検出器 (PDA 検出器) や電気化学検出器を用いる。UV 検出器の波長は、200~280nm である。分析カラムは、逆相カラムを用いる。内径 4.6mm、長さ 100mm から 250mm、粒子径が 5~10 μ m 程度の ODS カラムで分析する。多数のサンプルを連続して分析する場合は、カラム劣化が起こるので、プレカラムを用いる方がよい。カラム温度は、30~40 $^{\circ}$ C 程度である。連続分析のためには、10 $^{\circ}$ C 程度に測定試料を冷却できるオートインジェクタ、デガッサ (脱気装置) が必要である。

- ・ 恒温水槽 (30 $^{\circ}$ C)
- ・ 試験管ミキサー
- ・ ピペットマン (P-200, P-1000)
- ・ 25mL メスフラスコ
- ・ No.2 濾紙
- ・ 1.5mL チューブ
- ・ 親水性シリンジフィルタ (0.45 μ m)

2. 試薬

- ・ カテキン類スタンダード

茶葉中カテキン類として、エピガロカテキン-3-O-ガレート (EGCG), エピカテキン-3-O-ガレート (ECG), エピカテキン (EC), エピガロカテキン (EGC), カテキン (+C), エピガロカテキン-3-O-(3-O-メチル)-ガレート (EGCG3"Me) 等がある。それぞれを精密に秤取り、等モル程度のアスコルビン酸を添加して、測定する 5 倍量の溶液にして少量ずつ-85 $^{\circ}$ C で保存すれば、3 年間は用時 5 倍希釈して使用可能である。

- ・ リン酸
- ・ エタノール
- ・ メタノール
- ・ アセトニトリル
- ・ 移動相 A: 水 (DW) : アセトニトリル : リン酸 (H₃PO₄) を体積比で 400:10:1
- ・ 移動相 B: メタノール (HPLC 用) : 移動相 A を体積比で 1 : 2 混合する

3. 使用カラム

- ・ 和光純薬 Wakopak Navi C18-5 (4.6*10cm) ポアサイズ 5 μ m (ガードカラムは和光純薬 Wakopak Navi C18-5 (4.6*10cm) ポアサイズ 5 μ m)

プロトコール

1. 抽出

<茶葉の場合>

- 1) 茶粉末 250mg (定法より水分%を求めておく: 0.2505g を目標に) を薬包紙に量り取る。
- 2) 乾いた 25mL 容メスフラスコに茶粉末を入れた後, 2%リン酸を 10mL メスシリンダーで秤量し, 器壁についた茶粉末を洗うようにして加えて, よく攪拌する。
- 3) 分散後, さらにエタノールを 10mL メスシリンダーで秤量し, リン酸同様, 壁を洗うように加える。栓をして, 器壁に茶粉末が飛び散らないようやさしく攪拌する。
- 4) 恒温水槽内で, 30°C, 60 分インキュベートする。
- 5) 洗ビンを使用し, 蒸留水 (DDW) にてメスアップ後, 攪拌する。
- 6) 5 分ほど静置して, No.2 ろ紙 (4 つ折り) でろ過する。
- 7) 0.45 μ m の親水性フィルター (ADVANTEC 社: DISMIC-13HP, PTFE non-sterile) と 1mL シリンジを用いてさらにろ過する。この時, 最初のろ液 1mL 前後は採取せず捨てる (フィルターにカテキン類が吸着しているため)。その後のろ液 1mL 程度を 1.5mL エッペンチューブに採取する。
- 8) 新たな 1.5mL チューブを用意し, 希釈用の蒸留水 (DDW) 900 μ L をいれておく。
- 9) 7) のチューブを軽く攪拌し, 100 μ L を 8) の蒸留水 (DDW) に加え 10 倍希釈して, よく攪拌する。
- 10) オートインジェクタチューブに 9) を約 100 μ L (40 μ L 以上であれば適量で可) 取り, 以下の条件で HPLC 測定 (スタンダードを打つ前に DDW を 1 回うつ)
- 11) サンプル測定時には毎回スタンダード (用時 5 倍希釈) も測定する。
※カラムの新旧や溶離液組成の変化・カラムオープン温度に留意し, 保持時間に著しい変化がないか確認する。

<ペットボトル等の液体の場合>

- 1) サンプルをよく混ぜる。
- 2) 0.45 μ m の親水性フィルター (ADVANTEC 社: DISMIC-13HP, PTFE non-sterile) と 1mL シリンジを用いてろ過する。この時, 最初のろ液 2mL 前後は採取せず捨てる (フィルターにカテキン類が吸着しているため)。その後のろ液 1mL 程度を 1.5mL エッペンチューブに採取。
- 3) 蒸留水で適宜希釈 (3~5 倍希釈程度) し, HPLC で測定する。

2. HPLC による測定

オートサンプラ：4°C

カラム温度：40°C，注入量：20μL，流速：1mL/min

検出波長 (UV-VIS もしくは PDA 検出器で検出する)

UV242nm (AsA, GC, EGC を読む)

UV272nm (+C, Caffeine, EGCG, EC, GCG, EGCG3"Me, ECG, CG を読む)

(AUX RANGE=2:1AU/V)

グラジエント：

	A	B
0 ～ 2 分：	80%	20%
2 ～ 27 分：	20%	80% (直線的に上昇させる)
27 ～ 37 分：	上記条件を保つ	
37.01 ～ 45 分：	80%	20% (次の測定に備えて圧力を安定させる)

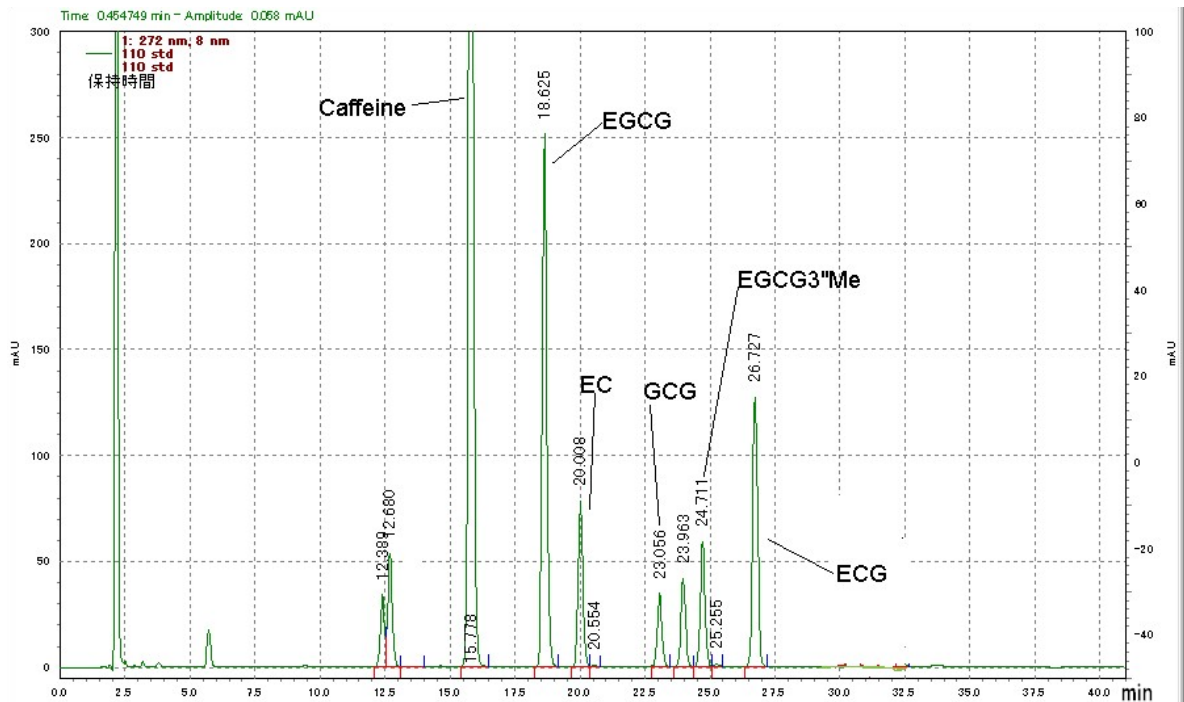


図1 スタンダード類の 272nm におけるクロマトグラム

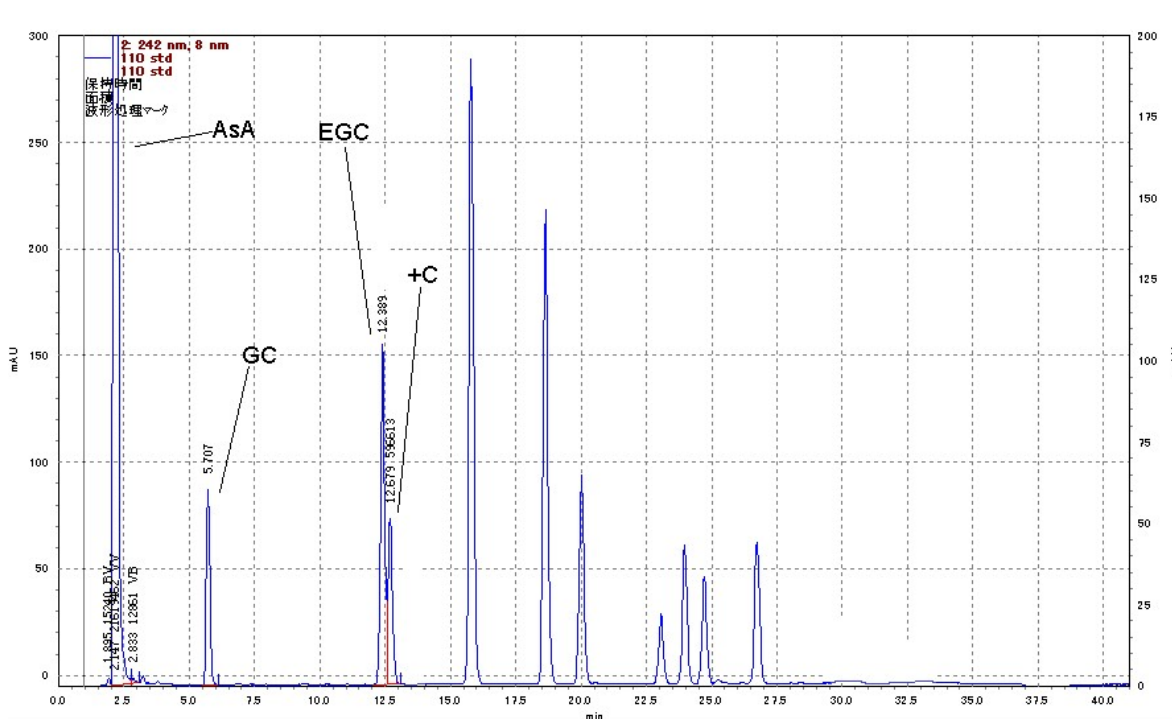


図2 スタンダード類の 242nm におけるクロマトグラム

プロトコルのポイント

1. 植物体中のカテキン類は、破碎等の処理により酸化酵素の働きで、酸化されて変化しやすい。特に茶の生葉では、摘採後、長時間放置すると、萎凋のため、カテキン類の変化（重合等）がおこる。そのため、試料調整をする前にまずなんらかの方法で加熱して酸化酵素を失活させる必要がある。蒸気で短時間蒸すか（1 分程度）、釜で炒るか、最も簡便なのは、電子レンジで加熱して殺青するとよい。しかし、加熱温度が高すぎたり長い場合、熱によりカテキン類の構造変化（エピ化）が生じるので注意する必要がある。また、試料を乾燥するときも高温にすることは好ましくなく、80℃以下で乾燥するか、減圧乾燥するのが望ましい。加工された茶（荒茶、仕上げ茶）では上記のような操作は必要ないが、室温で長時間、窒素充填もせず放置しておくと、カテキン類の自動酸化が起きて、カテキン組成の変化が起きている可能性があるため、注意する必要がある。そのため、乾燥試料を長期保存する際は、窒素充填して-20℃以下の冷凍庫へ保管する。
2. 加熱により、例えばエピガロカテキン-3-O-ガレートがガロカテキン-3-O-ガレート（エピマー）に構造変換する。茶の抽出液をレトルトするような過激な条件では、約 50%がエピ化する。
3. 標準的なカテキン類、テアフラビンは、シグマアルドリッチ社、フナコシ社、コスモバイオ社などから、エピガロカテキン-3-O- (3-O-メチル) ガレートや

エピガロカテキン-3-O-(4-O-メチル)ガレートなどのメチル化カテキンは長良サイエンス社から販売されている。

4. EGC は 280nm での感度が低いため、二波長で検出できる UV 検出器やフォトダイオードアレイ検出器を使用して分析する場合は、242nm での検出を行うと定量精度が向上する。また、測定試料中のピークが標準物質のリテンションタイムと同じ位置に出ている場合、カテキン類以外の物質を検出していることがあるので、標準物質のフォトダイオードアレイ検出器での三次元クロマトグラムにより、スペクトル解析しながらピークを同定する方法が有効となる。

計算方法

測定したいカテキンの含量 (g/100g) = (標準液中の標準カテキンの量 (μg/mL) / 標準カテキンの Area x 測定したい物質の Area x 10) / (100-水分%)

後片付け

次の日に続けて使用するのであれば、HPLC 内部は移動相 A でよく洗浄する。しばらく使用しない場合は、カラムをはずして、含水メタノールで洗浄する。

おわりに

緑茶のカテキン類は、機能性成分として広く利用されている。ポリフェノールなので、過剰摂取等今後安全性についても論議されてくると思われるので、個別カテキンを正確に定量していくことが重要であると考えられる。

参考文献

- 1) 堀江秀樹, 山本(前田)万里, 氏原ともみ, 木幡勝則. 茶葉中カテキン類分析のための抽出方法の検討, 茶業研究報告, **94**, 60-64 (2002).
- 2) Sano, M., Tabata, M., Suzuki, M., Degawa, M., Miyase, T. and Maeda-Yamamoto, M., Simultaneous determination of twelve tea catechins by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analyst*, **126**, 816-820 (2001).
- 3) Maeda-Yamamoto, M., Nagail, H., Suzuki, Y., Ema, K., Kanda, E. and Mitsuda, H., Changes in O-methylated Catechin and Chemical Component Contents of 'Benifuuki' Green Tea (*Camellia sinensis* L.) Beverage under Various Extraction Conditions. *Food Science and Technology Research*, **11**, 248-253 (2005).

2) マスト細胞を用いるヒスタミン遊離抑制活性評価法

野菜茶業研究所 山本(前田)万里

はじめに

近年、アレルギー疾患が増加しその治療法の確立が急務となっているが、抗アレルギー薬の副作用を考えると、日常摂取する食品により軽減をはかることが望ましい。そこで、食品中の抗アレルギー因子探索のため、I 型アレルギーの初期反応で最も重要な役割を果たすマスト細胞(肥満細胞)の活性化阻害をヒスタミン遊離量を指標に評価する。本項では、マウスマスト細胞の脱顆粒時のヒスタミン遊離量阻害により、食品中の抗アレルギー成分を探索する方法について紹介する。

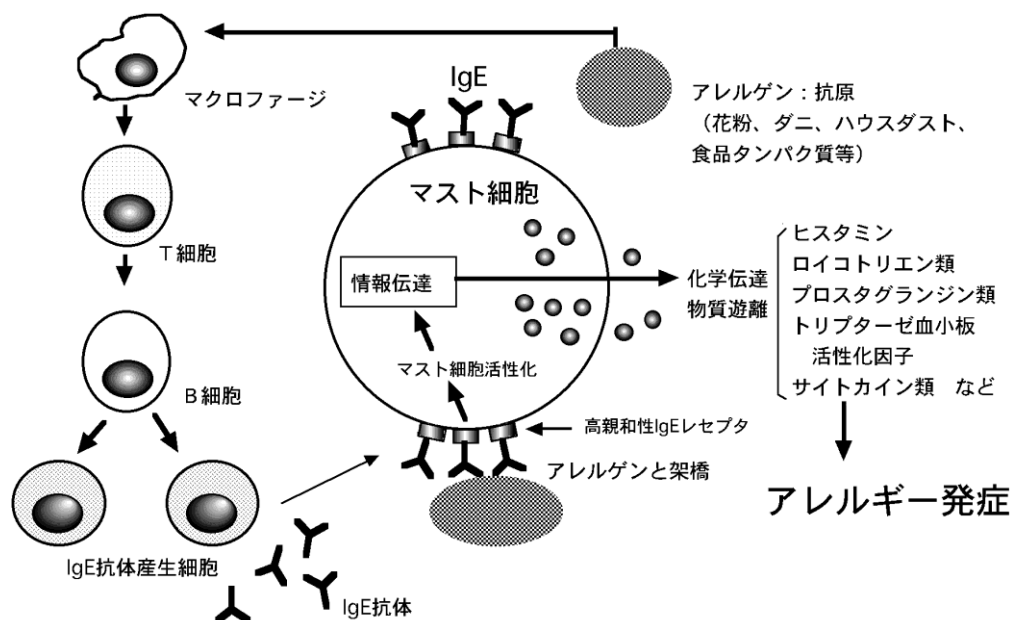


図 1 マスト細胞を介するアレルギー発症機序

準備するもの

1. 実験器具

- ・ クリーンベンチ
- ・ CO₂ インキュベータ (37℃)
- ・ 恒温水槽 (37℃)
- ・ 試験管ミキサー
- ・ 遠心分離器 (15 mL ファルコンチューブ用, 1.5 mL エッペンチューブ用)
- ・ ピペットマン (P-20, P-200, P-1000)

2. 試薬

- ・ 抗 TNP-マウス IgE 抗体 (Pharminggen03231D)
- ・ TNP-BSA 溶液：
TNP-BSA (コスモバイオ LG1117) 300ng/mL CaCl₂ 300 μM (final)/PBS
(10 μg/mL TNP-BSA, 10 mM CaCl₂·2H₂O 1.47 mg/mL)
- ・ Tyrode 液：
50mM HEPES pH 7.4 10 mL
1% glucose 5 mL
1% gelatin 2.5 mL
×25 TA 2 mL
(NaCl 100g, KCl 2.5g, NaH₂PO₄ 0.7g/ DW 500 mL)
2.5M MgCl₂ · 6H₂O 20 μL
H₂O 30.48 mL
- ・ 反応停止液：4 mM EDTA 含有 Tyrode 液
- ・ 0.1N HCl 溶液
- ・ 細胞溶解液：1% Triton X100

3. 細胞

マウスマスト細胞株 PT-18 もしくはマウス骨髄誘導マスト細胞 (BMBC) を用いる。培地は、RPMI1640 培地 500 mL に非働化 FBS75 mL, 200mML-Glutamine 5 mL, 50 mM 2-Mercaptoethanol 0.5 mL, 4 ng/mL recombinant-mu-IL3 (ペプロテック) を加えたものを用いる。マウス (Nc/Nga (日本チャールズ・リバー) 5 週令メス) を解剖して、大腿骨をとり、27G 針を付けた注射筒 (10 mL の培地入り) で 25 cm²T フラスコに骨髄を流し入れる。3 日後に 25 cm²T フラスコに移し、1 週間目に中フラに移し 30 mL の培地でメインテナンスする。2 週間目に 750cm²T フラスコに移し 100 mL の培地を添加する。1 週間毎にメインテナンスを行い、4 週間～5 週間で使用できる。

プロトコール

1. 細胞実験

- 1) 細胞は 1 サンプルにつき、 1×10^7 cells/mL が 0.25 mL 必要となる (サンプル数 \times 0.25 mL \times 1×10^7 /mL で計算する)。
- 2) 細胞数を血球計算盤 (改良型ノイバウエル) で計測し、必要数になるように細胞を回収する (普通 1×10^8 個)。
- 3) 1,100 rpm で 5 min 遠心分離。
- 4) ペレットを軽くほぐして、抗 TNP-IgE 抗体を加えて (IgE (μL) 量 = 細胞数 \div (2×10^6 \times 1), 2×10^6 cells/mL でまきこみ、37°C 5% インキュベータ内で一晚培養 (1×10^8 個

のときは 50 mL の中に IgE が 50 μ L)。

- 5) 翌日、培養液を 50 mL 遠心管に回収し、1,100 rpm で 5 min 遠心分離。
- 6) ペレットを 37°C に温めておいた PBS でそっと懸濁、もう一回洗浄。
- 7) ペレットを 1×10^7 cells/mL になるように 37°C の Tyrode 液を加え、そっと懸濁
- 8) マイクロチューブに 250 μ L ずつ分注し、37°C の恒温槽につける。
- 9) 12.5 μ L の被験液を添加し、かるく攪拌して 37°C で 10 分インキュベート。
- 10) 7.5 μ L の CaCl₂ 入り TNP-BSA 溶液 を添加し、軽く攪拌して 37°C で 20 分インキュベート。
- 11) 10 μ L の 反応停止液を添加し、氷中で 10 分インキュベート。
- 12) 15,000rpm で 5 分遠心分離して上清 150 μ L を HPLC 用ディスポ PP チューブに回収し、同量の 0.1N HCl を添加して HPLC 分析する。
- 13) 細胞コントロールを作成する。使用した同数の細胞を 1.5 mL チューブに入れ、遠心分離して上清を除き、ペレットに 0.25mL の細胞溶解液を添加して 1 分間激しく攪拌。氷中で 10 分インキュベート後、15,000rpm で 5 分遠心分離して上清 150 μ L を HPLC 用ディスポ PP チューブに回収し、同量の 0.1N HCl を添加して HPLC 分析する。

2. HPLC 条件

カラム：Shodex-Asahipak ODP-50 4D

移動相：50 mM 硼酸ナトリウム (pH9.5)：2 mM OPA， 2 mM N-アセチルシステイン含有アセトニトリル=84:16

オートサンブラ：10°C

カラム温度：37°C，注入量：20 μ L，流速：0.5 mL/min

検出器：RF(em.330 nm, ex.440 nm)

スタンダード：塩酸ヒスタミン 1 μ g/mL 0.05N HCl

プロトコールのポイント

1. われわれのラボでは、1つの検体につき 3本ずつ試験し、15秒おきに試薬を添加するタイムコースで試験を行っている。
2. 細胞コントロールとして上記 13) の試料、及びコントロールとして、供試液を作成した溶媒のみ+抗原の代わりに Tyrode を添加したコントロール (抗原 (-)) 及び溶媒+抗原を添加したコントロール (抗原 (+)) をそれぞれ 3本ずつ作成する。
3. ヒスタミンは、ガラスなどに非常に吸着しやすいので、塩酸溶液やキレート剤を添加して安定させることが肝要である。ヒスタミンが微量であるような試料を扱う場合は、エッペンチューブもシリコンコーティングする必要がある。
4. 冷たい溶媒の添加、荒い操作でヒスタミン遊離が誘発されるので注意を要する。

5. HPLC 分析がすぐに行えないときは、ディスポチューブをパラフィルムで包み、
 -28℃で保管してもよい。

計算方法

絶対検量線法で面積値の比較でヒスタミン量を定量する。それぞれのヒスタミン量は抗原 (+) の平均値に対する比率を求め、統計処理を行う。ヒスタミン遊離抑制活性を求める場合は、次式により算出する。

$$\%inhibition = 100 \times \{1 - [(S-C)/(AC-C)]\}$$

C : 抗原 (-) 平均値 (サンプル無添加)

AC : 抗原 (+) 平均値 (サンプル無添加)

S : サンプル値

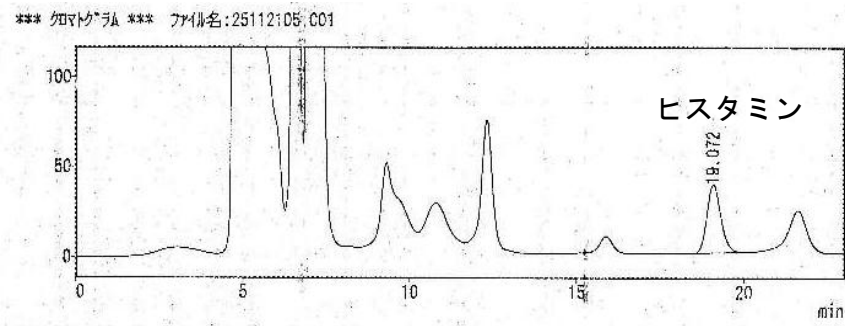


図2 ヒスタミンのクロマトグラム

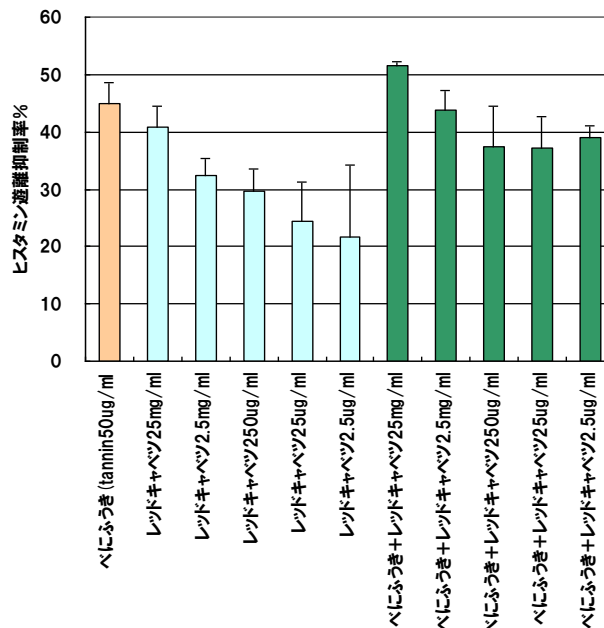


図3 ヒスタミン遊離抑制率の実際の測定例；べにふうき緑茶（タンニン含量 50 μg/mL）とレッドキャベツエタノール抽出液，その混合物の効果

後片付け

HPLC の溶離液はアルカリ性なので、分析終了後は HPLC 内をよく洗浄して、pH 試験紙などを利用して中性にもどったことを確認する。

おわりに

ヒスタミン遊離抑制活性の評価系は、食品中抗アレルギー成分の 1 次スクリーニング方法として活用すれば、アレルギー予防食品、軽減食品の開発に有効なツールになると考えられる。

参考文献

- 1) Musch, M.W. and Siegel, M.I., Antigenic stimulated release of arachidonic acid, lipoxigenase activity and histamine release in a cloned murine mast cell MC9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **126**, 517-525 (1985).
- 2) Maeda-Yamamoto, M., Inagaki, N., Kitaura, J., Chikumoto, T., Kawahara, H., Kawakami, Y., Sano, M., Miyase, T., Tachibana, H., Nagai, H. and Kawakami, T., O-methylated catechins from tea leaves inhibit multiple protein kinases in mast cells. *J. Immunol.*, **172**, 4486-4492 (2004).
- 3) Saito, K., Horie, M., Nose, N. and Nakagawa, H., High-performance liquid chromatography of histamine and 1-methylhistamine with on-column fluorescence derivatization. *J. Chromatogr.*, **595**, 163-168 (1992).
- 4) Maeda-Yamamoto, M., Ema, K. and Shibuichi, I., In vitro and in vivo anti-allergic effects of 'benifuuki' green tea containing O-methylated catechin and ginger extract enhancement. *Cytotechnology*, **55**, 135-142 (2007).

4) がん転移抑制評価系 (浸潤抑制評価系)

野菜茶業研究所 山本 (前田) 万里

はじめに

がんの転移には、血管内転移及びリンパ節転移の 2 種類があり、血管内転移では、がん細胞は原発巣から離脱し、蛋白質分解酵素を産生し周囲の間質や基底膜を破壊して脈管内に侵入する。次に脈管内を移動して標的臓器の血管内皮細胞へ接着し、血管内から組織中へ同様の機序で浸潤していく。そしてその場で増殖することにより転移巣を形成すると考えられている。特に、血管から組織に浸潤していく過程や、転移巣を形成する血管新生過程を抑制することががん転移を抑制することでは大切と考えられ、本項では、浸潤抑制評価及び浸潤に大きく関わる基底膜破壊酵素 (マトリクスメタロプロテナーゼ ; MMP, ゼラチナーゼ) の活性抑制評価系について述べる。マトリクスメタロプロテナーゼは浸潤のみならず、リウマチ疾患も増悪化する。

準備するもの

1. 実験器具

- ・クリーンベンチ
- ・細胞培養 CO₂ インキュベータ (37°C)
- ・蛍光分光光度計
- ・電気泳動装置 (パワーサプライも含む)
- ・往復振とう機
- ・恒温庫 (37°C)
- ・遠心分離器 (室温, 15mL もしくは 50mL ファルコンチューブ用)
- ・24 穴カルチャーインサート (8μm 径穴あき膜, ファルコン 3097)
0.5%ゼラチン-PBS でプレコートしておく。
- ・12 穴プレート (ファルコン 3046)
- ・ピペットエイド, 滅菌したガラスピペット (5mL, 10mL, 20mL)
- ・ピペットマン (P-20, P-200, P-1000)

2. 試薬

- ・ゼラチン (耐熱瓶に 0.5g/100mLDW で懸濁し, 120°C 5 分のオートクレーブをかけて, 熱いうちに取り出して, よく混和する)
- ・PBS (NaCl 8.01g, Na₂HPO₄ 1.15g, KCl 0.20g, KH₂PO₄ 0.20g/L)
- ・細胞蛍光標識キット Z-PKH2 (大日本住友製薬)
- ・1% triton X-100 溶液

- ・ 0.5%トリプシン-PBS 溶液
- ・ 牛胎児血清 (Invitrogen, 56°C 30 分で非働化しておく)
- ・ E-RDF 培地 (極東製薬工業)
- ・ 血管内皮細胞用培地 (生化学工業)
- ・ リポポリサッカライド (LPS, 和光純薬)
- ・ サンプルバッファ : 1.25M Tris pH6.8 1mL, 20% SDS 2mL, glycerol 2mL; BPB 0.48mg

SDS-PAGE	分離ゲル(mL)	濃縮ゲル(mL)
30% アクリルアミド bis	6.6	0.85
1.5M Tris pH8.8 (SDS)	5.0	-
0.5M Tris pH6.8 (SDS)	-	1.25
TEMED	0.015	0.01
10% APS	0.05	0.025
Gelatin 2.4mg/mL	8.3	-
DW	-	2.9

- ・ ゲル染色液 (1%クマシーブルーR-250/10%メタノール, 5%酢酸液)
- ・ ゲル脱色液 (10%メタノール含有 5%酢酸液)

3. 使用細胞

- ・ ヒト血管内皮細胞株 HU-VE-C-C (IFO50271) : 血管内皮細胞成長因子の含有された血管内皮細胞用培地で, 37°C, 5%CO₂ インキュベータ内で培養.
- ・ ヒト非上皮性細胞 HT-1080 (IFO50354) : 5%FBS 含有 E-RDF 培地で 37°C, 5%CO₂ インキュベータ内で培養.

プロトコール

1. 細胞浸潤抑制

- 1) ゼラチン-PBS でプレコートしたカルチャーインサートに HU-VE-C-C を培養する.
- 2) 単層になるまで培養後, 活性化のため 1µg/穴の LPS で 2 時間刺激して, PKH-2 で蛍光標識した HT-1080 と PBS に溶解した終濃度 5%の供試液を添加する.
- 3) 5 時間培養した後, 下層の培地とトリプシン溶液で剥離したカルチャーインサート下面の細胞を回収し, 250µL の 1%Triton-X100 溶液に懸濁する.
- 4) 5 分間超音波破碎を行い, 蛍光強度 (FI) を蛍光分光光度計 (ex.490nm, em.504nm) で測定し, 浸潤率は, PBS 添加時の蛍光強度を対照に算出する.
- 5) 3) で細胞を回収した際, 一部をトリパンブルー染色して細胞の生存率を求める.

図 1 は、茶葉中のエステル型カテキン、紅茶テアフラビンのがん細胞浸潤抑制率を本法で求めた図である。

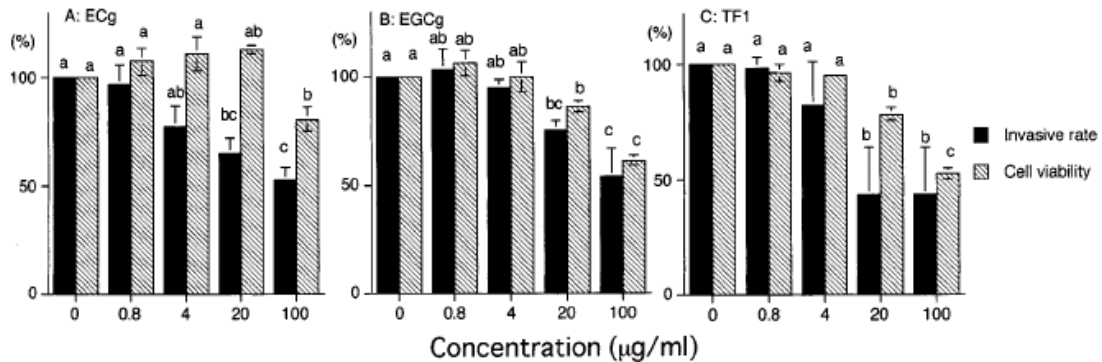


図 1 がん浸潤に及ぼすカテキン、テアフラビンの抑制効果

2. マトリクスメタロプロテアーゼ (MMP-2/MMP-9) 産生抑制

- 1) HT-1080 を 12well プレートにまきこみ (3×10^5 /mL を 0.4 mL ずつ), サブコンフルエントまで培養する。
- 2) 0.4mL の無血清 ERDF 培地に替え, 被験液を添加し, 37°C, 24 時間インキュベートする。
- 3) 培養上清 20µL と 2-メルカプトエタノール及び DTT 無しのサンプルバッファ 5µL を混合して, 95°C で 5 分加熱後, 1%ゼラチン含有 10%SDS ゲルにアプライする。
- 4) 電気泳動後, ゲルを 2.5% Triton-X100 で 30 分 2 回, 10mM Tris-HCl(pH8.0) で 30 分 2 回それぞれ振とうしながら洗浄した後, MMPs を活性化するために, 0.5 mM CaCl_2 , 1µM ZnCl_2 を含有する 50 mM Tris-HCl(pH8.0) で 37°C, 18 時間インキュベートする。
- 5) 活性化したゲルは染色液で 10~30 分染色し, 脱色液で 1~2 時間脱色する。
- 6) それぞれのゼラチナーゼ活性程度はバックグラウンドに対するバンドの抜け方で判定し, スキャナーで読み込んだゲルの画像を Scion Image で処理し, 数値データに変換する (<http://www.scioncorp.com/>)。

図 2 は、茶カテキン類のエピカテキンガレートの MMPs 抑制の様子をゼラチンザイモグラム上で示したものである。

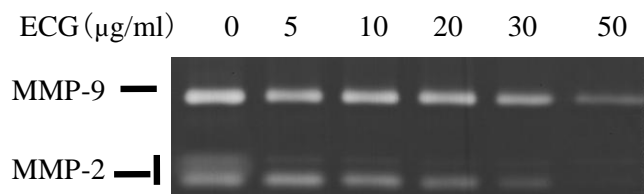


図 2 ゼラチンザイモグラムの画像

プロトコールのポイント

1. スクリーニングした物質がマトリクスメタロプロテアーゼ産生を抑制するのか、分泌を抑制するのかを明らかにするため、物質を添加するタイミングを変えて試験する必要がある。
2. 供試物質が PBS や DW には溶解できない場合は、エタノールや DMSO を用いることもできるが、その場合は、最終添加濃度は 1%にして、対照も溶解溶媒にする必要がある。

計算方法

$$\text{がん浸潤抑制率 (\%)} = (\text{FI (C)} - \text{FI (S)}) / \text{FI (C)} \times 100$$

FI (S) : 供試液を添加した時の浸潤細胞の蛍光強度

FI (C) : PBS を添加した時の浸潤細胞の蛍光強度

おわりに

マトリクスメタロプロテアーゼ抑制活性の評価は、がん転移抑制因子スクリーニングに用いるだけでなく、リウマチ予防因子、歯周病予防因子(コラーゲン分解抑制因子)のスクリーニングにも用いることができる。マトリクスメタロプロテアーゼ(コラゲナーゼ)は様々な局所で働く重要な酵素であり、食品からの機能性成分探索には、こちらの方がより現実的であると思われる。

参考文献

- 1) Tomita, T., Nakase, T., Kaneko, M., Shi, K., Takahi, K., Ochi, T. and Yoshikawa, H., Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and enhancement of the production of matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, **46**, 373-378 (2002).
- 2) Openakker, G., Masure, S., Grillet, B. and Van Damme, J., Cytokine-mediated regulation of human leukocyte gelatinases and role in arthritis. *Lymphokine Cytokine Res.*, **10**, 317-324 (1991).

- 3) 清木元治, 癌転移—分子機構から臨床まで, 実験医学増刊, **12**, (羊土社, 東京), pp.12-17 (pp.906-911) (1994).
- 4) Nagase, H. and Woessner, J. F., Matrix metalloproteinases. *J. Biol. Chem.*, **274**, 21491-21494 (1999).
- 5) 久保田俊一郎, がんの浸潤・転移研究マニュアル(金芳堂, 京都), pp.189-192 (1994).
- 6) Albin, A., Iwamoto, Y., Kleinman, H.K., Martin, G.R., Aaronson, S.A., Kozlowski, J.M., and McEwan, R.N.A., A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Res.* **47**, 3239-3245 (1987).
- 7) Ohigashi, H., Shinkai, K., Mukai, M., Ishikawa, O., Iwanaga, T. and Akedo, H., In vitro invasion of endothelial cell monolayer by rat ascites hepatoma cells. *Jpn. J. Cancer Res.*, **80**, 818-821 (1989).
- 8) Liu, X.H. and Rose, D.P., Suppression of type IV collagenase in MDA-MB-435 human breast cancer cells by eicosapentaenoic acid in vitro and in vivo. *Cancer Lett.*, **92**, 21-26 (1995).
- 9) Kubota, S., Fridman, R. and Yamada, Y., Transforming growth factor- β suppresses the invasiveness of human fibrosarcoma cells in vitro by increasing expression of tissue inhibitor of metalloprotease. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **176**, 129-136 (1991).
- 10) Maeda-Yamamoto, M., Kawahara, H., Tahara, H., Tsuji, K., Hara, Y. and Isemura, M., Effects of tea polyphenols on the invasion and matrix metalloproteinases activities of human fibrosarcoma HT1080 cells. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 2350-2354 (1999).
- 11) Maeda-Yamamoto, M., Suzuki, N., Sawai, Y., Miyase, T., Sano, M., Hashimoto-Ohta, A. and Isemura, M., Association of suppression of extracellular signal-regulated kinase phosphorylation by epigallocatechin gallate with the reduction of matrix metalloproteinase activities in human fibrosarcoma HT1080 cells. *J.Agric.Food Chem.*, **51**, 1858-1863 (2003).

8) マスト細胞サイトカイン類産生評価

(独) 農研機構 野菜茶業研究所 山本(前田) 万里

はじめに

食品中の抗アレルギー因子、特にアレルギーのマーチ化、重篤化に影響を与える遅延型アレルギー反応への影響を探索するため、I型アレルギーの遅延反応で最も重要な役割を果たすマスト細胞(肥満細胞)からのサイトカイン産生を評価する。マスト細胞は、その表面にIgEと特異的に結合するレセプター(FcεRI)を持っている。そこへIgEが結合し、そのIgEにアレルギーが結合するとレセプターの架橋が起こりマスト細胞は活性化され、細胞内から化学伝達物質(ヒスタミン、ロイコトリエン等のケミカルメディエータ類)が放出され、種々のサイトカインが産生される(図1)。ヒスタミン、ロイコトリエン、サイトカインは好酸球等を遊走し、炎症作用を増強する。また、血管内皮細胞における接着分子を誘導することによってセレクチンを介した白血球の接着、さらに繊維芽細胞増殖を通じたアレルギー炎症のリモデリングなどに関与する。さらに活性化好酸球から分泌されるMBP、ECP、EDNなどのタンパク質により組織が傷害され、アレルギー症状が進行すると考えられている。また、活性化マスト細胞は、IL-4やIL-5などのTh2型サイトカインも産生し、IL-4はIgEクラススイッチを促進、またマスト細胞自体を活性化するなどさらなるアレルギー反応を進行させる。本項では、マウスマスト細胞の脱顆粒後のサイトカイン産生阻害により、食品中の抗アレルギー成分を探索する方法について紹介する。

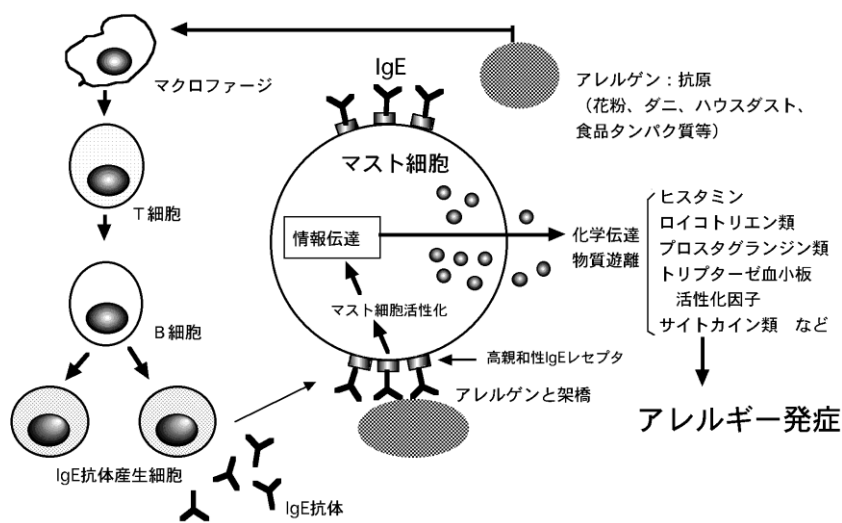


図1 マスト細胞を介するアレルギー発症機序

準備するもの

1. 実験器具

- ・ クリーンベンチ
- ・ CO₂ インキュベータ (37°C, 5%CO₂)
- ・ 恒温水槽 (37°C)
- ・ 試験管ミキサー
- ・ 遠心分離器 (15mL ファルコンチューブ用, 1.5mL エッペンチューブ用)
- ・ マイクロピペット (P-20, P-200, P-1000), ピペットチップ
- ・ プロテインサスペンションアレイ (日本バイオラッド, Bio-plex)

2. 試薬

- ・ 抗 TNP-マウス IgE 抗体 (Pharmingen 03231D)
- ・ TNP-BSA 溶液 : TNP-BSA (コスモバイオ LG1117) 300ng/mL, CaCl₂ 300μM (final)/PBS (10μg/mL TNP-BSA, 10mM CaCl₂ · 2H₂O 1.47mg/mL)

- ・ Tyrode 液 :

50mM HEPES pH7.4	10mL
1% glucose	5mL
1% gelatin	2.5mL
×25 TA	2mL
(NaCl 100g, KCl 2.5g, NaH ₂ PO ₄ 0.7g/ DW 500mL)	
2.5M MgCl ₂ · 6H ₂ O	20μL
H ₂ O	30.48mL

- ・ 細胞溶解液 : 1% Triton X100 (細胞内サイトカインを測定する時の溶解液)

3. 細胞

マウス骨髄誘導マスト細胞 (BMMC) を用いる。培地は、RPMI1640 培地 500mL に非働化 FBS75mL, 200mL-Glutamine 5mL, 50mM 2-Mercapto- ethanol 0.5mL, 4ng/mL recombinant-mu-IL3 (ペプロテック) を加えたものを用いる。マウス (Nc/Nga (日本チャールズリバー) 5 週令メス) を解剖して、大腿骨をとり、26G 針を付けた注射筒 (10mL の培地入り) で 25cm² T フラスコに骨髄を流し入れる。2 日後に中フラスコに移し 30mL の培地にし、1 週間目に 750cm² T フラスコに移し 100mL の培地でメインテナンスする。2 週間目以降は、750cm² T フラスコに 100mL の培地で 1 週間毎にメインテナンスを行い、4 週間～5 週間で使用できる。

プロトコール

1. 細胞実験

- 1) 細胞は 1 サンプルにつき、1 x 10⁷ cells/mL が 0.25mL 必要となる。(サンプル数

x 0.25mL x 1 x 10⁷/mL で計算する.)

- 2) 細胞数を血球計算盤 (改良型ノイバウエル) で計測し, 必要数になるように細胞を回収する. (普通 1 x 10⁸ 個)
- 3) 1,500rpm で 5min 遠心分離.
- 4) ペレットを軽くほぐして, 抗 TNP-IgE 抗体を加えて (IgE (μL) 量=細胞数 ÷ (2 x 10⁶) x 1), 2x10⁶cells/mL でまきこみ, 37°C, 5%インキュベータ内で一晚培養. (1 x 10⁸ 個のときは 50mL の中に IgE が 50μL).
- 5) 翌日, 培養液を 50mL 遠心管に回収し, 1,500rpm で 5min 遠心分離.
- 6) ペレットを PBS でそっと懸濁, もう一回洗浄.
- 7) ペレットを 1x10⁷cells/mL になるように 37°C の Tyrode 液を加え, そっと懸濁
- 8) マイクロチューブに 250μL ずつ分注し, 37°C の恒温槽につける.
- 9) 12.5μL の被験液を添加し, かるく攪拌して 37°C で 10 分インキュベート.
- 10) 7.5 μL の CaCl₂ 入り TNP-BSA 溶液 を添加し, かるく攪拌して 37°C で 2~4 時間インキュベート.
- 11) 15,000rpm で 5 分遠心分離して上清 150μL を 1.5ml エッペンチューブに回収し以下の方法でサイトカインを分析する.

2. Bio-plex 分析条件 (本機が使用できないときは, 個別のサイトカイン含量を ELISA 法にて測定する.)

- 1) 装置のウォームアップ: 装置の電源を入れ, 約 1 時間ウォームアップを実施する.
キャリブレーション: 測定, 装置のバリデーションを行う前に, 必ず毎回実施する.
バリデーション: 月に 1 回, 装置の検定を実施する. アッセイの準備を始める前に, 必ず装置が正常に動作することを確認する.

2) 測定用フィルタプレートの準備

96 ウェルフィルタプレート (ASSAY BUFFER を 100μL ずつ添加.)

↓ 吸引濾過

(緑) 希釈ビーズを 20 秒ボルテックスし, 各ウェルに 50μL ずつ添加.

(それぞれに示した色はキットに付属のキャップの色を表す.)

↓ 吸引濾過で洗浄 (WASH BUFFER で) 2 x 100μL

(赤) 調整したスタンダード (高濃度と低濃度の 2 種がある) もしくはサンプルを 50μL ずつ添加.

↓

プレートを専用プラスチックシートでシールし, 底がフラットになるようにアルミホイルで覆い, 1,100rpm x 30 秒, さらに 300rpm x 30 分 (2 時間まで延長可) 振とう (室温), CAL1, CAL2 ビーズを冷蔵庫から出す.

↓ 吸引濾過にて洗浄, 3 x 100μL

(青) 二次抗体 (二次抗体チューブを遠心後, cytokine detection antibody diluent で希釈したもの, 10 分以内に使用) を穏やかにボルテックスし, 各ウェルに 25 μ L ずつ添加. (ここで Bio-Plex System を立ち上げて, キャリブレーションを実施しておく.)

↓

プレートを専用プラスチックシートでシールし, 底がフラットになるようにアルミホイルで覆い, 1,100rpm x 30 秒, さらに 300rpm x 30 分 (2 時間まで延長可) 振とう (室温).

↓ 吸引濾過して洗浄, 3 x 100 μ L

(茶) ストレプトアビジン-PE 溶液をしっかりとボルテックスし, 各ウェル 50 μ L 添加. プレートをシールし, アルミホイルで覆い, 1,100rpm x 30 秒間, さらに 300rpm x 10 分間振とう (室温).

↓ 吸引濾過にて洗浄, 3 x 100ul

ASSAY BUFFER を各ウェルに 125 μ L 添加.

↓

プレートをシールし, 1,100rpm x 30 秒振とう. シールをとり, すぐに ARRAY Reader で測定. (アルミホイルでまき, 4 $^{\circ}$ C で 24 時間までなら測定可能.)

3) スタンドアの調製 (細胞の産生量に応じ, A (高濃度スタンダード), B (低濃度スタンダード) を調整する.)

(赤) スタンダードチューブ (50,000pg/mL) を穏やかに 5 秒攪拌し, サイトカインを含まない培養培地 (Tyrode 液) 500 μ L を添加し, 30 分間氷上で静置する.

↓

サイトカインを含まない培養培地 (Tyrode 液) で, A.高濃度と B.低濃度のいずれかの方法でスタンダードの希釈系列を調製する.

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
A. 原液 (μ L)	128	50	50	50	50	50	50	50
希釈液 (μ L)	72	150	150	150	150	150	150	150
濃度 (pg/mL)	32000	8000	2000	500	125	31.25	7.8	1.95
B. 原液 (μ L)	12.8	50	50	50	50	50	50	50
希釈液 (μ L)	187.2	150	150	150	150	150	150	150
濃度 (pg/mL)	3200	800	200	50	12.5	3.13	0.78	0.2

キャリブレーションを行う時の CA2 ビーズの PR1 Target ナンバーの登録に注意. 容器に表示してあるため, 適するものを選択する. (A.高濃度の時は, Low PR1 Target ナンバー, B.低濃度の時は, High PR1 Target ナンバー)

プロトコルのポイント

1. コントロールとして、供試液を作成した溶媒のみ+抗原の代わりに Tyrode を添加したコントロール（抗原（-））及び溶媒+抗原を添加したコントロール（抗原（+））をそれぞれ作成する。それぞれの試験液も 3 本ずつ作成し、統計処理に供す。
2. 冷たい溶媒の添加，荒い操作によりサイトカイン産生が誘発されるので注意を要する。
3. サイトカイン分析がすぐに行えないときは，ディスポチューブをパラフィルムで包み，-28℃で保管してもよい。
4. Bio-plex プロテインサスペンションアレイの試薬キットは，マウス用サイトカイン 17 種セット（IL-1 α ，IL-1 β ，IL-2，IL-3，IL-4，IL-5，IL-6，IL-10，IL-12（p40），IL-12（p70），IL-17，IFN- γ ，TNF- α ， γ -CSF，KC，MIP1- α ，RANTES）であるが，全てが BMMC で産生が認められるわけではないので，種類の多いセットで産生量が確認できたら，目的とするサイトカインの特注試薬キットに切り替える。筆者のところでは，TNF- α ，MIP- α ，IL-6 の 3-plex のキットを使っている。

(実施例)

表 1 BMMC を 4 時間抗原刺激した時に産生されるサイトカイン類

TNP抗原刺激	(pg/ml)					
	IL-5	IL-6	GM-CSF	IL-17	TNF- α	MIP-1 α
なし	0.6	58.4	0.3	2.9	13.0	31.3
あり	2.3	1287	27.4	7.3	1400	90

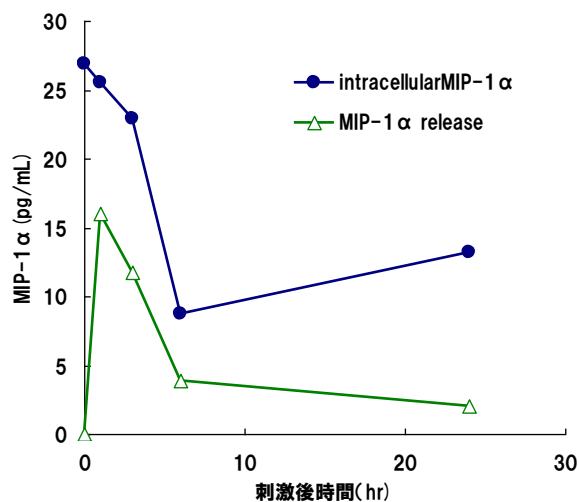


図 2 ラット好塩基球を抗原刺激した後の細胞内 MIP-1 α 及び遊離 MIP-1 α 量の経時的变化（細胞内サイトカインは細胞を 1% TritonX-100 液で溶解して測定。）

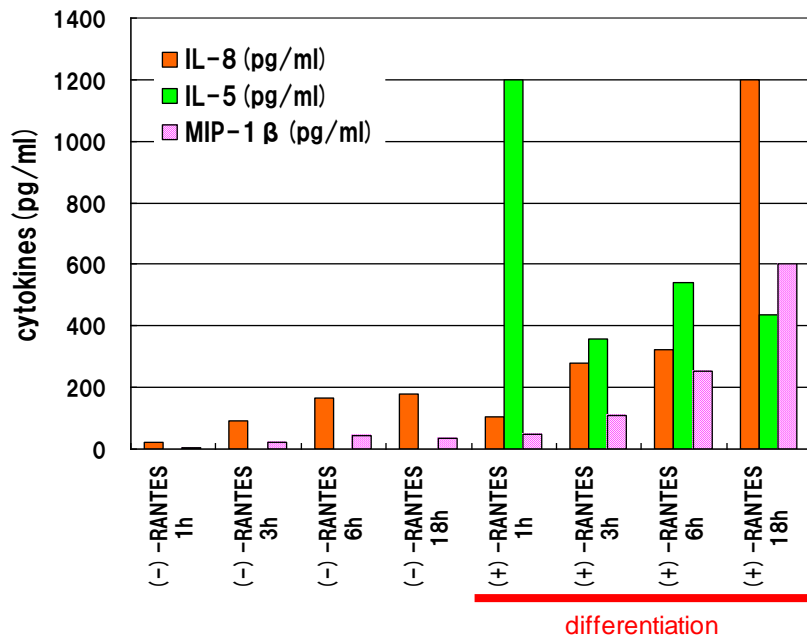


図 3 ヒト誘導好酸球株を RANTES で刺激した後の遊離サイトカイン類の経時的变化

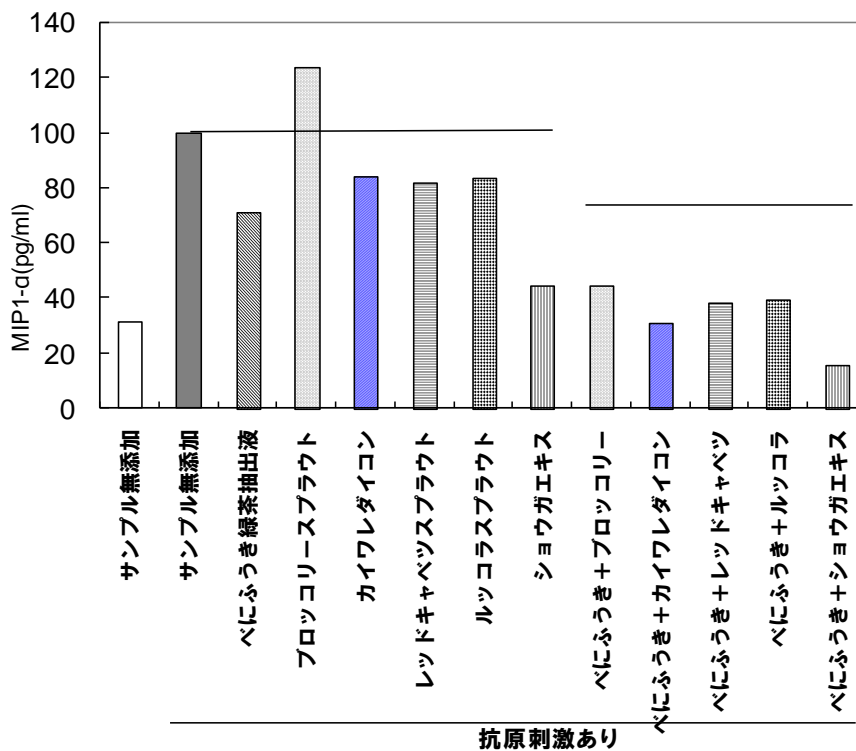


図 4 マスト細胞からの MIP-1α 産生に及ぼす茶抽出液, 野菜抽出液の影響
 べにふうき緑茶 (タンニン含量 50μg/mL) と野菜エタノール抽出液及びその混合物の効果

後片づけ

Bio-plex の洗浄プロトコールにて流路洗浄をしっかりと行って終了。

終わりに

サイトカイン産生の評価系は、食品中抗アレルギー成分のスクリーニング方法として活用すれば、アレルギー予防食品や軽減食品の開発に有効なツールになると考えられる。

参考文献

- 1) 山本(前田)万里, 永井寛, 江間かおり, 神田えみ, 岡田典久, 安江正明, 季節性アレルギー性鼻炎有症者を対象とした「べにふうき」緑茶の抗アレルギー作用評価とショウガによる増強効果, 食科工, **52**, 584-593 (2005).