

5) がん細胞増殖抑制機能評価

食品総合研究所 小堀 真珠子

はじめに

細胞銀行には様々ながん細胞や線維芽細胞等の細胞株が保存されている。また、限られた期間培養可能な正常細胞は試薬会社から購入することができる。食品成分ががん細胞及び正常細胞の増殖に及ぼす影響を検討することによって、食品成分のがん細胞増殖抑制効果が明らかになる。ここでは、浮遊系細胞として HL60 ヒト前骨髄性白血病細胞、接着系細胞として HT29 ヒト結腸腺癌細胞を例にとって解説するが、それぞれ他の細胞に置き換えて検討することができる。正常細胞は接着細胞の測定法に準ずる。増殖抑制効果は特定のがんのみに認められる方が良いが、正常細胞に影響を及ぼす場合も多い。がん細胞増殖抑制効果が認められた場合には、その細胞特異性及び作用機構の検討が必須である。活性成分の構造やその作用機構の違いにより、増殖抑制効果が現れる時間は異なるので、24-96 時間程度で培養時間を変えて測定を行うことも有効である。

準備するもの

1. 実験器具

1) 細胞培養に必要な器具

- ・クリーンベンチ

吸引アスピレーター (培地の除去に用いる。)

パスツールピペット (培地の除去に用いる。滅菌缶に入れ乾熱滅菌したもの。)

オートピペット (ピペットエイド等。培地の添加。細胞の播種に用いる。)

培養ピペット (培地の添加。細胞の播種に用いる。滅菌済みデイスポーサブルピペットまたはガラスピペットを滅菌缶に入れ乾熱滅菌したもの)

- ・ CO₂ インキュベーター (CO₂ ボンベ (レギュレーター付き))
- ・ 倒立顕微鏡 (位相差。細胞観察用。)
- ・ 卓上遠心機 (スイングローター。50 mL, 15 mL, 1.5 mL チューブ用。細胞の回収に用いる。)
- ・ 冷蔵庫 (培地等保存用。)

以上の機器類は同一室内に近接して配置する。

- ・ ディープフリーザー (-80 °C, 細胞を保存。)
- ・ 液体窒素容器 (細胞を保存。)

- ・ フリーザー (-20~-30 °C, 血清やサンプルを保存.)
- ・ オートクレーブ (ディスポーサブル器具廃棄用.)
- ・ オートクレーブバック (ディスポーサブル器具廃棄用.)
- ・ セルカルチャーディッシュ (BD Falcon 100 mm スタンダードディッシュ 353003 等.)
- ・ 50mL, 15mL コニカルチューブ (BD Falcon 352070, 352096 等.)

2) その他の器具

- ・ マイクロプレートリーダー (測定波長 400-450 nm, 参照波長 600 nm 以上で測定できるもの.)
- ・ 96 ウェルマイクロプレート (BD Falcon 353072 等.)
- ・ 血球計算盤
- ・ マイクロピペット (0.5 μ L-1000 μ L で使用.)
- ・ マルチチャンネルピペット (8 チャンネル. 10 μ L が分注可能なもの. 50-200 μ L が分注可能なもの.)
- ・ ピペットチップ (滅菌済み, またはオートクレーブ滅菌したもの.)
- ・ ピペッティングリザーバー (8 チャンネルピペットで細胞を播種する際等に使用.)
- ・ 1.5 mL マイクロチューブ (サンプル濃度調製用. オートクレーブ滅菌したもの.)
- ・ 試験管ミキサー (マイクロチューブに調製したサンプルの攪拌に用いる.)

2. 試薬

- ・ トリパンプルー染色液, 0.4 % (Invitrogen 15250061, 細胞数測定用.)
同量の PBS で希釈し, 0.2 μ m フィルターで濾過して, 0.2 % 溶液とする.
- ・ Cell Counting Kit-1 (WST-1 試薬) (和光純薬 345-06463)
WST-1 を含む A 試薬 (粉体) と B 試薬 (液体) の 2 本 1 組. B を A のビンに入れて溶かす. 約 5mL. 冷凍保存で約 1 ヶ月間使用可能. 使用時にはあらかじめ解凍しておく.
- ・ トリプシン-EDTA (0.25 %, 1 mM) (Invitrogen 25200056, 接着細胞の剥離に用いる.)
- ・ PBS (-) (日水製薬 05913 (粉末. 溶解後, 耐圧瓶に入れオートクレーブ滅菌したもの.) 等)

3. 細胞及び培地, 血清

1) 浮遊系細胞

(1) HL60 ヒト前骨髄性白血病細胞 (JCRB0085)

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。凍結細胞解凍後の生存率は低いので、解凍翌日に低速で遠心して死細胞を除く。数週間培養して増殖が一定になってから実験に使用する。

(2) 基本培地

RPMI1640 培地に 10 % 仔牛胎児血清 (Fetal Calf Serum (FCS)) を添加したもの。500 mL の培地に 50 mL の仔牛胎児血清を添加し、冷蔵庫に保存しておく。室温に戻して使用する。

- RPMI1640 培地 (Invitrogen 11875093)

- 仔牛胎児血清 (Fetal Calf Serum (FCS), 大日本住友製薬等.)

まとめて購入し、実験の途中でロットが変わらないようにする。数種類のロットで、増殖等を比較するロットチェックを行った方がよい。56 °C で 30 分間非働化したのち、50 mL のコニカルチューブに小分けして、フリーザーで凍結保存する。使用前日には冷蔵庫に移して解凍しておく。

2) 接着細胞

(1) HT29 ヒト結腸腺癌細胞 (ATCC HTB38)

米国の細胞銀行である American Type Culture Collection (ATCC) に保存されている。大日本住友製薬から購入できる (カタログ No.04-038)。

(2) 基本培地

McCoy's 5A (Invitrogen 12330031) に 10 % 仔牛胎児血清 (Fetal calf Serum (FCS)) を添加したもの。血清のロットチェックは細胞株毎に行う。

プロトコール

1. HL60 ヒト前骨髄性白血病細胞の細胞増殖抑制効果の測定

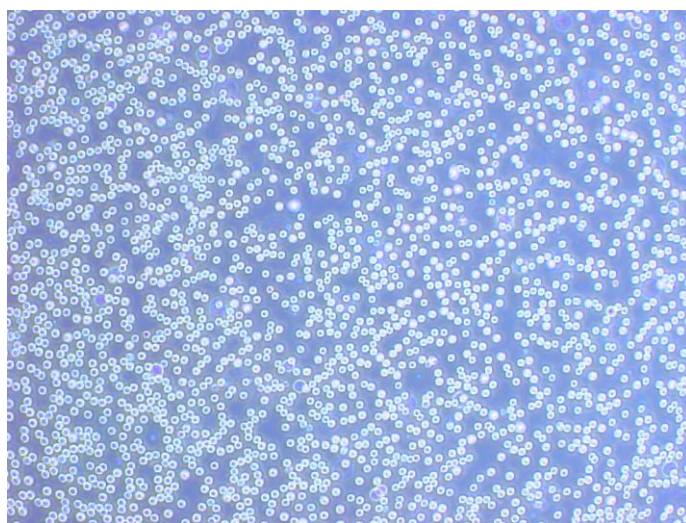


図 1 HL60 ヒト白血病細胞 約 1×10^6 cells/mL

< 1 日目 >

1) サンプルの調製

- (1) 抽出物の場合は遠心濃縮あるいは凍結乾燥により抽出溶媒を除去し、サンプルの重量を測定する。サンプルは DMSO に溶解して、ストック溶液とする。

DMSO に溶けない場合は、PBS、アルコール等に溶解するが、アルコールは揮発により保存中に濃度が変わりやすい欠点がある。また、PBS に溶解した場合は 0.2 μm のフィルターを通して滅菌する。

サンプルのストック溶液は抽出物で 50-100 mg/mL 程度とし、超音波洗浄機に浸ける、試験管ミキサーで攪拌する等してよく溶解する。不溶物が残る場合は、僅かであれば良く懸濁して用いるか、遠心除去してから用いる。

- (2) クリーンベンチ内にサンプル数×希釈濃度数のオートクレーブ滅菌済マイクロチューブを用意し、サンプル名と濃度をキャップに書く。

それぞれのサンプルを培地 (RPMI1640 培地+10 % FCS) で希釈し、最終濃度の倍濃度の溶液を 50 μL ×反復数 (n) ×2+ α 作成する。反復数は 3 または 4 程度 (n=3 または 4)。

細胞を添加しない、サンプルと培地のみをのブランクを同数作成するため、反復数の 2 倍量を準備する。最終濃度では DMSO 濃度が 0.1 %以下になるようにする。DMSO 濃度が 0.1 %を超えるときは、DMSO のみ添加したコントロールをおき、DMSO の影響がないことを確認する。

2) サンプル溶液の分注

96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに 50 μL ずつサンプル溶液を加える。同濃度のウェルが n×2 個になるようにする。また、培地のみ 50 μL 添加したウェルを n×2 個作成する。

3) 細胞懸濁液の調製

対数増殖期にある細胞を用いる。

- (1) CO₂ インキュベーターから、培養中のカルチャーディッシュを出し、15 mL コニカルチューブに細胞懸濁液を回収する。
- (2) 1000 rpm, 5 分間遠心する。
- (3) パスツールピペットで上清を除去した後、5-10 mL の培地を加えて、静かに細胞を懸濁する。
- (4) マイクロピペットで 100 μL の細胞懸濁液をマイクロチューブまたは 96 ウェルマイクロプレートのウェルにとり、0.2 %トリパンブルーと混合する。
- (5) 血球計数板に細胞懸濁液をのせ、細胞数をカウントする。
- (6) 最終濃度 (2×10⁵ または 1×10⁵ cells/mL) の 2 倍濃度になるように、培地で希釈する。

4) 細胞の分注

- (1) よく攪拌した細胞懸濁液をリザーバーに写し、8 チャンネルピペットを用いて、サンプルを分注した 96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに 50 μL ずつ手早く分注する。各濃度の n 個のウェルに細胞懸濁液を分注し、残りの n 個のウェルには培地のみ 50 μL ずつ分注する。

細胞は、均一になるようによく攪拌しながら手早く分注する。

- (2) 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ の細胞浮遊液または細胞なしのブランク溶液となるので、平面上でかるく揺らして液を混合する。培養を開始する前に、顕微鏡下で細胞およびサンプルの状態を確認しておく。

細胞が均一に分注されているか、細胞の状態は良好か、サンプルが析出していないか等を確認する。

5) 細胞の培養

CO_2 インキュベーターで 37 $^{\circ}\text{C}$ 、24 時間培養する。

< 2 日目 >

1) 細胞増殖 (バイアビリティ) の測定

- (1) WST-1 試薬 (Cell Counting Kit-1) を調製する。または冷凍保存した WST-1 試薬を解凍して室温に戻す。
- (2) リザーバーに well 数 \times 10 μL + α の WST-1 試薬を移す。
- (3) 24 時間培養後の 96 ウェルマイクロプレートを CO_2 インキュベーターから取り出し、顕微鏡で細胞の状態を観察する。

サンプルの影響やその他の理由で、測定値が細胞数 (細胞生存率 (バイアビリティ)) を反映しない場合がある。また、WST-1 試薬添加後の培養時間が長いと細胞が死ぬ場合があるので、24 時間後の細胞の状態を顕微鏡下で確認しておく。

- (4) 8 チャンネルピペットで各 well に 10 μL の WST-1 試薬を分注する。
- (5) 96 ウェルマイクロプレートを CO_2 インキュベーターに入れ、1 時間培養する。
- (6) 1 時間後プレートを取り出し、再度、顕微鏡で細胞の状態を観察しておく。well にのこっている気泡は、チップの先等で除く。
- (7) 分光光度計で 450nm (405~450 nm, 参照波長は 600 nm 以上) の吸光度を測定する。

2) データの計算

- (1) サンプルと培地のみブランクが培地のみブランクと同程度であることを確認する。

サンプルと培地のみブランクの値が、培地のみブランクに比べて著しく高い場合には、血球計算盤を用いてカウントする等、他の方法を用いて測定する。また顕微鏡下の観察結果

と併せて結果を確認する。

- (2) 細胞を添加した各ウェルの吸光度からブランクの平均値を引き、細胞のみのコントロールを 100%として各濃度での細胞生存率(バイアビリティ)を計算する。
- (3) 計算値をグラフにして結果を考察する。

2. HT29 ヒト結腸腺癌細胞に対する細胞増殖抑制効果の測定

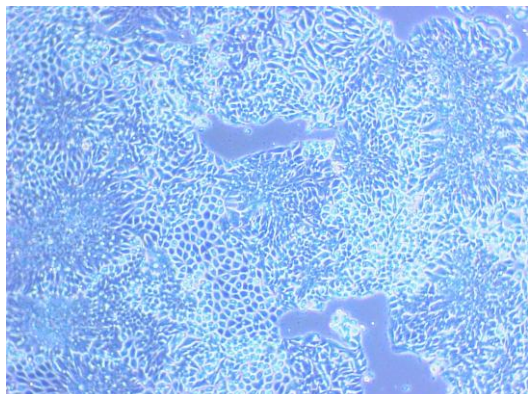


図 2 HT29 ヒト結腸腺癌細胞

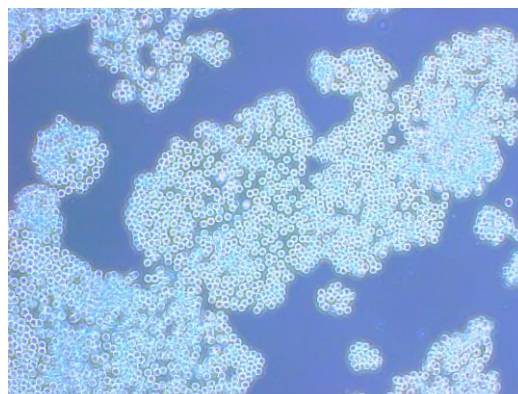


図 3 トリプシン処理後の HT29 細胞

< 1 日目 >

1) 細胞の播種

対数増殖期にある細胞を用いる。

- (1) CO₂ インキュベーターから、培養中のカルチャーディッシュを出し、クリーンベンチ内で、培地を吸引する。
- (2) PBS(-)を 5-10 mL 添加して、細胞表面を洗ったのち、PBS(-)を吸引する。
- (3) トリプシン-EDTA 1 mL を添加して全体に行き渡らせた後、CO₂ インキュベーターで 1~2 分間インキュベーションする。
- (4) 倒立顕微鏡で細胞が剥離し、浮遊しているのを確認する。
- (5) 細胞が丸くなって剥離し始めていれば、インキュベーションを終了し、シャーレに培地 (McCoy's 5A 培地+10% FCS) 9 mL を加え、細胞懸濁液を 15 mL コニカルチューブに回収する。
- (6) 1000 rpm, 5 分間遠心分離する。
- (7) パスツールピペットで上清を除去した後、約 10 mL の培地を加えて、静かに細胞を懸濁する。
- (8) マイクロピペットで 100 μ L の細胞懸濁液をマイクロチューブまたは 96 ウェルマイクロプレートのウェルにとり、0.2%トリパンブルーと混合する。
- (9) 血球計数板に細胞懸濁液をのせ、細胞数をカウントする。

- (10) 最終濃度 (1×10^5 または 5×10^4 cells/mL) に合わせて、培地で希釈する。
- (11) よく攪拌した細胞懸濁液をリザーバーに写し、8 チャンネルピペットを用いて、96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに 100 μ L ずつ手早く分注する。サンプル数に応じたブランクを作成する必要があるため、サンプル数 \times 希釈濃度数 \times 反復数 (n) 個のウェル (n=3 または 4) をあけておく。

2) 細胞の前培養

CO₂ インキュベーターで 37 °C, 24 時間培養する。

< 2 日目 >

1) サンプル液の調製

クリーンベンチ内にサンプル数 \times 希釈濃度数のオートクレーブ滅菌済マイクロチューブを用意し、サンプル名と濃度をキャップに書く。

それぞれのサンプルを培地で希釈し、最終濃度に合わせた溶液を 100 μ L \times 反復数 (n) $\times 2 + \alpha$ 作成する。反復数は 3 または 4 程度 (n=3 または 4)。

細胞を添加しない、サンプルと培地だけのブランクを同数作成するため、反復数の 2 倍量を準備する。最終濃度では DMSO 濃度が 0.1 % 以下になるようにする。DMSO 濃度が 0.1 % を超えるときは、DMSO のみ添加したコントロールをおき、DMSO の影響がないことを確認する。

2) サンプル溶液の分注

- (1) 24 時間前培養した 96 ウェルマイクロプレートの各ウェルからアスピレーターに接続したパストツールピペットで培地を吸引除去する。

パストツールピペットをウェルの底面に当てると細胞が剥がれるので、底面に当てないように注意する。過度に吸い過ぎて細胞が乾いたり、培地を残し過ぎてサンプル濃度に影響を及ぼしたりしないように注意する。

- (2) 各ウェルに 100 μ L ずつサンプル溶液を加える。

同濃度のウェルが n 個になるように細胞に添加すると共に、空いているウェル n 個にも添加して細胞なしのブランクとする。また、サンプルを添加しない培地だけのコントロール細胞及びブランクを n 個ずつ作成する。

3) 培養

顕微鏡で細胞の状態を確認後、CO₂ インキュベーターで 37 °C, 24 時間培養する。

< 3 日目 >

1) 細胞増殖 (バイアビリティ) の測定

- (1) WST-1 試薬 (Cell Counting Kit-1) を調製する。または冷凍保存した WST-1 試薬を解凍して室温に戻す。
- (2) リザーバーに well 数 $\times 10 \mu$ L $+ \alpha$ の WST-1 試薬を移す。

- (3) 24 時間培養後の 96 ウェルマイクロプレート を CO₂ インキュベーター から取り出し、顕微鏡で細胞の状態を観察する。

サンプルの影響やその他の理由で、測定値が細胞数(細胞生存率(バイアビリティ))を反映しない場合がある。また、WST-1 試薬添加後の培養時間が長いと細胞が死ぬ場合があるので、24 時間後の細胞の状態を顕微鏡下で確認しておく。

- (4) 8 チャンネルピペットで各 well に 10 μL の WST-1 試薬を分注する。
(5) 96 ウェルマイクロプレート を CO₂ インキュベーター に入れ、1 時間培養する。
(6) 1 時間後プレートを取り出し、再度、顕微鏡で細胞の状態を観察しておく。well にのこっている気泡は、チップの先等で除く。
(7) 分光光度計で 450 nm, 参照波長 650 nm (405~450 nm, 参照波長は 600 nm 以上) の吸光度を測定する。

2) データの計算

- (1) サンプルと培地のみ(空白)の空白が培地のみ(空白)と同程度であることを確認する。

サンプルと培地のみ(空白)の値が、培地のみ(空白)に比べて著しく高い場合には、血球計算盤を用いてカウントする等、他の方法を用いて測定する。また顕微鏡下の観察結果と併せて結果を確認する。

- (2) 細胞を添加した各ウェルの吸光度から空白の平均値を引き、細胞のみ(コントロール)を 100 % として各濃度での細胞生存率(バイアビリティ)を計算する。
(3) 計算値をグラフにして結果を考察する。

測定例

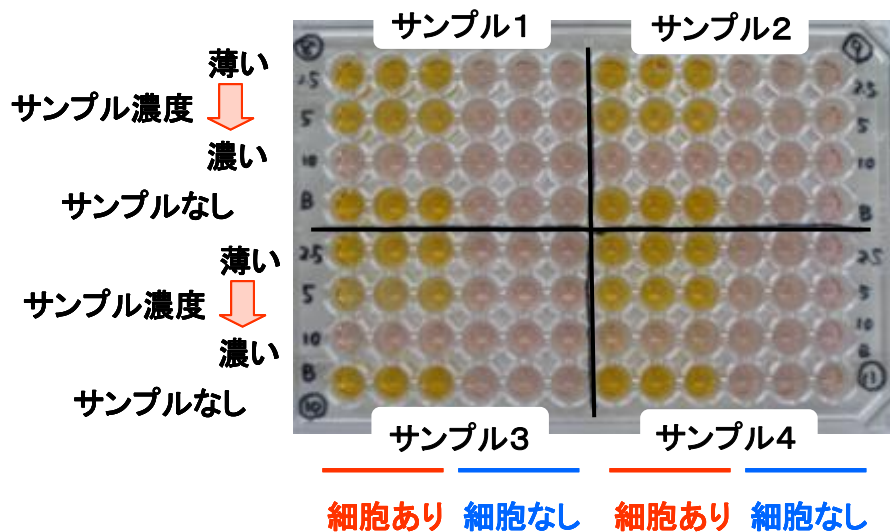


図 4 は 4 種類のサンプルについて、反復数 3, 3 点の異なる濃度で測定した例である。サンプル濃度が濃い 3 行目では細胞が死んでいるため発色が殆どみられない。また、サンプルと培地のみブランクにおいて、サンプルによる着色はみられないことがわかる。

2. がん細胞以外の細胞

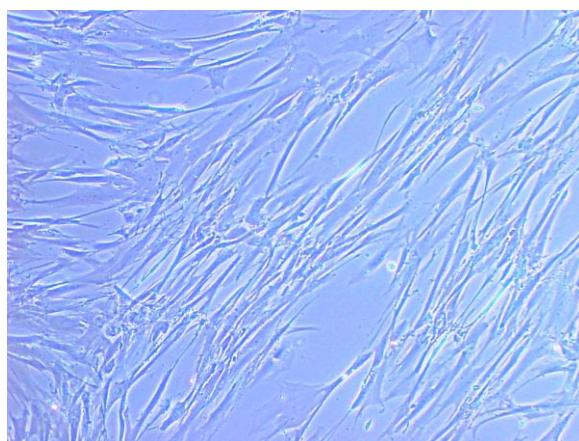


図 5 WI38 ヒト肺線維芽細胞 (JCRB9017)

おわりに

本法は簡便であり、生理活性成分の探索に適している。しかし、WST-1 法は色素が還元されることにより、間接的にバイアビリティを測定する方法であり、しばしば、細胞数を反映しない値を示す場合があり、注意を要する。

一方、多くの場合、がん細胞の増殖を抑制する成分は正常細胞の増殖にも影響を与えることから、異なるがん細胞に対する効果を測定し、がんに対する特異性、作用機構を明らかにすると共に、正常細胞等の対照を適切に選ぶことが重要である。HL60 細胞は酸化ストレス等により、容易にアポトーシスを誘導され、増殖が抑制される。

文部科学省がん特定領域研究・総合がん 化学療法基盤情報支援班では、ヒトがん細胞 36 系に対する増殖抑制効果を測定し、個々のがん細胞株に対する薬剤感受性の違いをフィンガープリントとして表し、そのパターンから新たな作用機作をもつ抗がん剤の解明を目指している。

参考文献

- 1) 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 細胞培養」(秀潤社, 東京), (1996).

- 2) 培養細胞実験ハンドブック 細胞培養の基本と解析法のすべて, 黒木登志夫, 許南浩編, (羊土社, 東京), (2004).
- 3) 小堀真珠子, 雨宮潤子, 酒井美穂, 白木己歳, 杉下弘之, 坂上直子, 星良和, 柚木崎千鶴子, にかうりのがん細胞アポトーシス誘導効果および炎症性サイトカイン産生抑制効果, 食科工, **53**, 408-415 (2006).
- 4) Kobori, M., Yoshida, M., Ohnishi-Kameyama, M., Takei, T. and Shinmoto, H., 5 α , 8 α -Epidoxy-22E-ergosta-6, 9 (11), 22-trien-3 β -ol from an edible mushroom suppress growth of HL60 leukemia and HT29 colon adenocarcinoma cells. *Biol.Pharm.Bull.*, **29**, 755-759 (2006).

7) 炎症性サイトカイン産生抑制機能評価

食品総合研究所 小堀 真珠子

はじめに

マクロファージにバクテリアの細胞壁多糖である LPS を作用させることによって、炎症性サイトカインである TNF α やインターロイキン 1 β (IL1 β) 等、炎症反応に関与する多くの遺伝子発現が誘導される。このような炎症反応は、感染症や関節炎等の炎症性疾患の原因となることが知られている。また、炎症反応は遅延型アレルギーや発がんにも関与することが明らかになっている。本法では、マクロファージ様細胞株を用いて、LPS によって誘導される TNF α の産生を、培地中に放出された TNF α の量を酵素免疫測定法 (Enzyme linked immunoSorbent assay (ELISA 法)) により測定する。細胞死の誘導により、見かけ上 TNF α の産生量が低くなる場合もあることから、同時に細胞のバイアビリティを測定し、細胞死が誘導されていないことを確認する。

準備するもの

1. 実験器具

1) 細胞培養に必要な器具

- ・クリーンベンチ
 - ・吸引アスピレーター (培地の除去に用いる。)
 - ・パストールピペット (培地の除去に用いる。滅菌缶に入れ乾熱滅菌したもの。)
 - ・オートピペット (ピペットエイド等。培地の添加。細胞の播種に用いる。)
 - ・培養ピペット (培地の添加。細胞の播種に用いる。滅菌済みディスポーザブルピペットまたはガラスピペットを滅菌缶に入れ乾熱滅菌したもの)
 - ・CO₂ インキュベーター (CO₂ ボンベ (レギュレーター付き))
 - ・倒立顕微鏡 (位相差。細胞観察用。)
 - ・卓上遠心機 (スイングローター。50 mL, 15 mL, 1.5 mL チューブ用。細胞の回収に用いる。)
 - ・冷蔵庫 (培地等保存用。)
- 以上の機器類は同一室内に近接して配置する。
- ・ディープフリーザー (-80 °C, 細胞を保存。)
 - ・液体窒素容器 (細胞を保存。)
 - ・フリーザー (-20~-30 °C, 血清やサンプルを保存。)
 - ・オートクレーブ (ディスポーザブル器具廃棄用。)
 - ・オートクレーブバック (ディスポーザブル器具廃棄用。)

- ・セルカルチャーディッシュ (BD Falcon 100 mm スタンダードディッシュノントリートメント 351005 等.)
- ・ 50 mL, 15 mL コニカルチューブ (BD Falcon 352070, 352096 等.)

2) その他の器具

- ・マイクロプレートリーダー (測定波長 400-450nm, 参照波長 600nm 以上で測定できるもの.)
- ・ 96 ウェルマイクロプレート (BD Falcon 353072 等. 細胞培養用.)
- ・ 96 ウェルマイクロプレート (Nunc MaxiSorp flat-bottom 456537 等. ELISA 用.)
- ・血球計算盤
- ・マイクロピペット (0.5 μ L-1000 μ L で使用.)
- ・マルチチャンネルピペット (8 チャンネル. 10 μ L が分注可能なもの. 100-200 μ L が分注可能なもの.)
- ・ピペットチップ (滅菌済み, またはオートクレーブ滅菌したもの.)
- ・ピペッティングリザーバー (8 チャンネルピペットで細胞を播種する際等に使用.)
- ・ 1.5 mL マイクロチューブ (サンプル濃度調製用. オートクレーブ滅菌したもの.)
- ・試験管ミキサー (マイクロチューブに調製したサンプルの攪拌に用いる.)
- ・耐圧瓶 (PBS, 蒸留水のオートクレーブ滅菌及び保存に用いる.)
- ・キムタオル (プレートの洗浄に用いる. Wash Buffer を除去するため.)
- ・プレートシール

2. 試薬

- ・トリパンブルー染色液, 0.4 % (Invitrogen 15250061, 細胞数測定用.)
同量の PBS で希釈し, 0.2 μ m フィルターで濾過して, 0.2 % 溶液とする.
- ・ Mouse TNF- α ELISA Ready-SET-Go! (Bay Bioscience 88-7324-88)
 - 250 x Capture Antibody
 - 250 x Detection Antibody
 - 10 x Coating Buffer
 - 5 x Assay Diluent
 - 250 x Avidin-HRP
 - 1 x Tetramethylbenzidine (TMB) Substrate Solution以上は冷蔵保存.
TNF α standard (1 μ g/mL) -80 $^{\circ}$ C 保存.
- ・ Wash Buffer
 - 1 x PBS (-), 0.05 % Tween-20. 室温保存.
 - PBS (-) (日水製薬 05913 (粉末. 溶解後, 耐圧瓶に入れオートクレーブ滅菌した

もの。)等)

• Stop Solution

1 M H_3PO_4 . 室温保存.

• 滅菌水 (蒸留水を耐熱瓶に入れ, オートクレーブ滅菌したもの. ELISA キットの試薬の調製に用いる.)

• LPS (Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* Serotype 0111:B4, Sigma-Aldrich)

PBS に溶解して 1 mg/mL のストック溶液とし, 小分けして冷凍保存する.

• Cell Counting Kit-1 (WST-1 試薬) (和光純薬 345-06463)

WST-1 を含む A 試薬 (粉体) と B 試薬 (液体) の 2 本 1 組. B を A のビンに入れて溶かす. 約 5 mL. 冷凍保存で約 1 ヶ月間使用可能. 使用時にはあらかじめ解凍しておく.

3. 細胞及び培地, 血清

1) 細胞

• RAW264.7 マウスマクロファージ細胞 (ATCC TIB-71)

米国の細胞銀行である American Type Culture Collection (ATCC) に保存されている. 大日本住友製薬等から購入できる.

2) 培地

(1) 基本培地 (培養用)

• RPMI1640 培地に 10% ウシ胎児血清 (Fetal calf Serum (FCS)) を添加したもの. 500 mL の培地に 50 mL の仔牛胎児血清を添加し, 冷蔵庫に保存しておく. 室温に戻して使用する.

• RPMI1640 培地 (Invitrogen 11875093)

• 仔牛胎児血清 (Fetal Calf Serum (FCS)), 大日本住友製薬等.)

まとめて購入し, 実験の途中でロットが変わらないようにする. 数種類のロットで, 増殖等を比較するロットチェックを行った方がよい. 56 °C で 30 分間非働化したのち, 50 mL のコニカルチューブに小分けして, フリーザーで凍結保存する. 使用前日には冷蔵庫に移して解凍しておく.

(2) アッセイ用培地

• RPMI1640 培地 (ウシ胎児血清を含まない. RPMI1640 培地 (FCS (-)))

(3) RAW264.7 細胞の培養

RAW264.7 細胞は浮遊系細胞であるが, シャーレの底に接着しやすいため, 浮遊細胞用シャーレ (細胞培養用の表面処理をしていないもの) を用いて培養する. トリプシン処理はせず, ピペッティングで剥がれる細胞を回収して継代培養する.

プロトコール

< 1 日目 >

1. 細胞の播種

- 1) 対数増殖期にある細胞を用いる.
- 2) CO₂ インキュベーターから、培養中のカルチャーディッシュを出し、15 mL コニカルチューブに細胞懸濁液を回収する.
- 3) 1000 rpm, 5 分間遠心する.
- 4) パスツールピペットで上清を除去した後、5-10 mL の培地 (RPMI1640 培地 + 10% FCS) を加えて、静かに細胞を懸濁する.
- 5) マイクロピペットで 100 μ L の細胞懸濁液をマイクロチューブまたは 96 ウェルマイクロプレートのウェルにとり、0.2% トリパンブルーと混合する.
- 6) 血球計数板に細胞懸濁液をのせ、細胞数をカウントする.
- 7) 最終濃度 (1×10^5 cells/mL) に合わせて、培地で希釈する.
- 8) よく攪拌した細胞懸濁液をリザーバーに写し、8 チャンネルピペットを用いて、96 ウェルマイクロプレートの各ウェルに 100 μ L ずつ手早く分注する. 平面上でかき混ぜて液を混合し、顕微鏡下で細胞の状態を確認する. (サンプル数 \times 希釈濃度数 + 2 (無処理及び LPS 処理のみのコントロール)) \times 反復数 (n) 個のウェル (n=3 または 4) を準備する.

2. 細胞の前培養

CO₂ インキュベーターで 37 $^{\circ}$ C, 24 時間培養する.

3. ELISA プレートの準備

ELISA キットの Coating Buffer を調製し、Capture Antibody を Coating Buffer で希釈する. ELISA 用の 96 ウェルマイクロプレートに $1 \times$ Capture Antibody を 100 μ L ずつ分注する. プレートシールをして、4 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートする. (サンプル数 \times 希釈濃度数 + 2 (無処理及び LPS 処理のみのコントロール)) \times 反復数 (n) 個のウェル (n=3 または 4) に加えて、定量的ため、スタンダード TNF α を添加するウェル (6-10 個) を準備しておく.

< 2 日目 >

1. サンプル液の調製

LPS を PRMI1640 培地 (FCS (-)) で希釈し、終濃度 2 ng/mL とする. サンプルを、調製した PRMI1640 培地 (FCS (-)) + LPS 溶液で、終濃度に合わせて希釈する. またコントロールにサンプルを添加しない PRMI1640 培地 (FCS (-)) + LPS 溶液及び PRMI1640 培地 (FCS (-)) を準備する. それぞれの最終濃度に合わせた溶液を 100 μ L \times 反復数 (n) + α 作成する. 反復数は 3 または 4 程度 (n=3 または 4).

サンプルが DMSO に溶解したストック液である場合、最終濃度では DMSO 濃度が 0.1% 以下になるようにする。DMSO 濃度が 0.1% を超えるときは、DMSO のみ添加したコントロールをおき、DMSO の影響がないことを確認する。

2. サンプル溶液の分注

- 1) 24 時間前培養した 96 ウェルマイクロプレートの各ウェルからアスピレーターに接続したパストゥールピペットで培地を吸引除去する。

パストゥールピペットをウェルの底面に当てると細胞が剥がれるので、底面に当てないように注意する。過度に吸い過ぎて細胞が乾いたり、培地を残し過ぎてサンプル濃度に影響を及ぼしたりしないように注意する。

- 2) 各ウェルに 100 μL ずつサンプル溶液を加える。

同濃度のウェルが n 個になるように細胞に添加すると共に、空いているウェル n 個にも PRMI1640 培地 (FCS (-)) を添加してバイアビリティ測定の際のブランクとする。

サンプル溶液が着色している場合は、細胞の入っていないウェルに各濃度のサンプル溶液を入れてバイアビリティ測定の際のブランクとし、バイアビリティの測定にサンプルの色が影響しないことを確認する。

3. 培養

顕微鏡で細胞の状態を確認後、CO₂ インキュベーターで 37 °C、6 時間培養する。

4. TNF α の測定

- 1) 培養終了 1 時間前に ELISA 用 96 ウェルマイクロプレートの 1 x Capture Antibody を除去し、200 μL の Wash Buffer で 3 回洗う。

96 ウェルマイクロプレートを逆さにして振り、液を捨てる。逆さにしたまま厚く重ねたキムタオルに数回たたきつけて液を切る。8 チャンネルピペットで Wash Buffer を加え、同様に液を除去する。

- 2) 各ウェルに 1 x Assay Diluent を 200 μL ずつ添加した後、プレートをシールして、室温で 1 時間インキュベーションする。(ブロッキングする。)
- 3) 培養終了前にスタンダードの TNF α を 1 x Assay Diluent で希釈する。2 ng/mL から倍々希釈し、濃度 0 を含めて 6~10 点程度作成する。それぞれ 100 μL 以上作成する。
- 4) ELISA 用 96 ウェルマイクロプレートの 1 x Assay Diluent を除去し、200 μL の Wash Buffer で 3 回洗う。

4) の①と同様に行う。

- 5) スタンダードの TNF α を ELISA 用 96 ウェルプレートに 100 μL ずつ添加する。また 6 時間培養後の 96 マイクロプレートの培養上清を 25 μL ずつ ELISA 用 96 ウェルプレートに添加したのち、1 x Assay Diluent を 75 μL ずつ添加して、100 $\mu\text{L}/\text{well}$

になるようにする。

培養上清は、1 x Assay Diluent で希釈する。細胞の状態により TNF α の産生量は異なるが、25 μ L 以下程度の培養上清を希釈して用いる。

6) ELISA 用 96 ウェルプレートにシールして、4 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートする。

5. バイアビリティの測定

1) 培養用 96 ウェルマイクロプレートから TNF α 測定用の培養上清を除去した後、調製済みの WST-1 試薬を各ウェルに 10 μ L ずつ添加する。

WST-1 試薬添加前に、顕微鏡下で細胞の状態を確認しておく。

2) プレートを CO₂ インキュベーターに入れ、1 時間培養する。

3) 1 時間後プレートをとり出し、再度、顕微鏡で細胞の状態を観察しておく。ウェルにのこっている気泡は、チップの先等で除く。

4) 分光光度計で 450 nm、参照波長 650 nm (405–450 nm、参照波長は 600 nm 以上) の吸光度を測定する。

詳しくは、「II-2-5) がん細胞増殖抑制機能評価」の項を参照する。

< 3 日目 >

1. TNF α の測定 (つづき)

1) ELISA 用 96 ウェルプレートを室温に戻す。

2) スタンダード TNF α 及び培養上清を除去して、200 μ L の Wash Buffer で 5 回洗う。

4) の①と同様に行う。

3) 1 x Assay Diluent で希釈して 1 x Detection Antibody を作成し、各ウェルに 100 μ L ずつ添加する。

4) プレートをシールして、室温で 1 時間インキュベーションする。

5) 1 x Detection Antibody を除去して、200 μ L の Wash Buffer で 5 回洗う。

4) の①と同様に行う。

6) 1 x Assay Diluent で希釈して 1 x Avidin-HRP を作成し、各ウェルに 100 μ L ずつ添加する。

7) プレートをシールして、室温で 30 分インキュベーションする。1 x TMB Substrate Solution は室温に戻しておく。

8) 1 x Avidin-HRP を除去して、200 μ L の Wash Buffer で 7 回洗う。

4) の①と同様に行う。

9) 各ウェルに 1 x TMB Substrate Solution を 100 μ L ずつ添加して、明らかな発色がみられるまで 10–15 分程度、静置する。

室温により発色が異なるので、室温の管理された実験室で行うことが望ましい。

10) 各ウェルに Stop Solution を 50 μ L ずつ添加して反応を停止する。

11) 分光光度計で 450 nm の吸光度を測定する。

2. データの計算

- 1) スタンダード TNF α の測定値から検量線を作成し、各ウェルにおける TNF α の産生量を算出する。
- 2) バイアビリティ（細胞生存率）と合わせてグラフ化し、バイアビリティに影響を及ぼさない濃度での TNF α の産生抑制効果を検討する。

その他

1. 結果の例

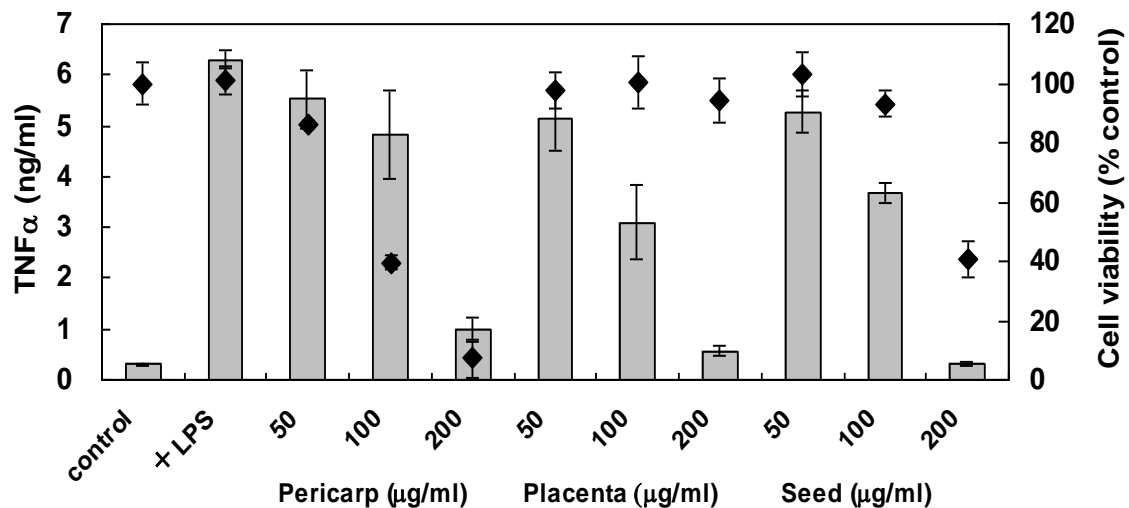


図 1 ニガウリ胎座抽出物の RAW264.7 マウスマクロファージ細胞における TNF α 産生抑制効果（小堀ら，食科工，53，408-415（2006））

ニガウリの可食部（pericarp），胎座（placenta）及び種子（seed）のエタノール抽出物について，RAW264.7 細胞の TNF α 産生抑制効果を検討した結果，胎座の抽出物が RAW264.7 細胞の増殖に影響を及ぼさない濃度で，TNF α の産生抑制効果を示すことが明らかになった。

おわりに

TNF α 量の測定は，キットのプロトコールに従う。TNF α の産生抑制効果が認められた場合には，IL1 α または IL1 β 等の他の炎症性サイトカイン産生抑制効果を検討する，あるいは RT-PCR 等により遺伝子発現に及ぼす影響を検討する等して，その効果を確認する。

RAW264.7 細胞における TNF α 産生には，転写因子である NF- κ B 及び C/EBP，及び

MAP キナーゼ等が関与していることが明らかになっている。

参考文献

- 1) 塚田旬, 久保允人, 「免疫学的プロトコール」, 中内啓光編 (羊土社, 東京) pp.140-149 (2004).
- 2) 小堀真珠子, 雨宮潤子, 酒井美穂, 白木己歳, 杉下弘之, 坂上直子, 星良和, 柚木崎千鶴子, ながうりのがん細胞アポトーシス誘導効果および炎症性サイトカイン産生抑制効果, 食科工, **53**, 408-415 (2006).
- 3) Kobori, M., Yoshida, M., Ohnishi-Kameyama, M. and Shinmoto, H., Ergosterol peroxide from an edible mushroom suppresses inflammatory responses in RAW264.7 macrophages and growth of HT29 colon adenocarcinoma cells. *Br. J. Pharmacol.*, **150**, 209-219 (2007).

3. 動物細胞を用いた機能性評価

1) がん細胞アポトーシス誘導作用の評価

(独) 農研機構 食品総合研究所 小堀 真珠子

はじめに

アポトーシスは生理的な細胞死であり、がん細胞にアポトーシスが誘導されることによってがんが抑制される。これまでに多くの食品成分ががん細胞のアポトーシスを誘導することが明らかになっている。本項では、アポトーシスに特徴的な細胞及び核の断片化、及び DNA のヌクレオソーム単位での断片化の測定法を示す。アポトーシス誘導機構の下流でカスパーゼ 3 が活性化すると、DNase が活性化され、ヌクレオソーム単位での特異的な DNA の断片化が起こる。既に、詳細なアポトーシスの分子機構が明らかになっているが、食品成分によるアポトーシスはミトコンドリアを介した経路で誘導される場合が多い。

準備するもの

1. 実験器具

1) 細胞培養に必要な器具

- ・クリーンベンチ
吸引アスピレーター (培地の除去に用いる.)
パストツールピペット (培地の除去に用いる。滅菌缶に入れ乾熱滅菌したもの.)
オートピペット (ピペットエイド等。培地の添加。細胞の播種に用いる.)
培養ピペット (培地の添加。細胞の播種に用いる。滅菌済みディスポーザブルピペットまたはガラスピペットを滅菌缶に入れ乾熱滅菌したもの.)
- ・CO₂ インキュベーター (CO₂ ボンベ (レギュレーター付き))
- ・倒立顕微鏡 (位相差。細胞観察用.)
- ・卓上遠心機 (スイングローター。50ml, 15ml チューブ用。細胞の回収に用いる.)
- ・冷蔵庫 (培地等保存用.)
以上の機器類は同一室内に近接して配置する。
- ・ディープフリーザー (-80℃, 細胞を保存.)
- ・液体窒素容器 (細胞を保存.)
- ・フリーザー (-20~-30℃, 血清やサンプルを保存.)
- ・オートクレーブ (ディスポーザブル器具廃棄用.)

- ・オートクレーブバック (ディスプレイサブル器具廃棄用.)
- ・セルカルチャーディッシュ (BD Falcon 100mm スタンダードディッシュ 353003 等.)
- ・ 50ml, 15ml コニカルチューブ (BD Falcon 352070, 352096 等.)

2) その他の器具

- ・ 蛍光顕微鏡
- ・ スライドグラス
- ・ カバーグラス
- ・ 恒温水槽 (50°C にセットして使用. 細胞抽出液を RNase 及び Proteinase K で処理する際に用いる.)
- ・ 電子レンジ又はオートクレーブ
- ・ 電気泳動装置 (サブマリン型. Mupid 等)
- ・ 電気泳動用電源
- ・ UV トランスイルミネーター
- ・ ゲル撮影装置
- ・ 6 ウェルセルカルチャープレート (BD Falcon 353046 等.)
- ・ 血球計算盤
- ・ マイクロピペット (0.5~200 μ l で使用.)
- ・ ピペットチップ (滅菌済み, またはオートクレーブ滅菌したもの.)
- ・ 1.5ml マイクロチューブ (サンプル保存用等. オートクレーブ滅菌したもの.)
- ・ 試験管ミキサー (マイクロチューブに調製したサンプルの攪拌等に用いる.)
- ・ 小型微量遠心機 (1.5ml マイクロチューブ用. 壁面についての電気泳動用 DNA サンプルをチューブの底に回収する.)

2. 試薬

- ・ トリパンブルー染色液, 0.4% (Invitrogen 15250061, 細胞数測定用.)
同量の PBS で希釈し, 0.22 μ m フィルターで濾過して, 0.2% 溶液とする.
- ・ PBS (-) (日水製薬 05913 (粉末. 溶解後, 耐圧瓶に入れオートクレーブ滅菌したもの.) 等)
- ・ 細胞固定液 (1% グルタルアルデヒド (25% Glutaraldehyde solution (WAKO, 079-00533) 等を PBS (-) で希釈して調整)
- ・ 蛍光染色液 (1 mM ヘキスト 33258 (Bisbenzimidazole H33258 (WAKO, 029-07841) 等を PBS (-) で希釈して調整. 用時調整.)
- ・ 抽出 Buffer (0.5% SDS, 10mM EDTA を含む 50mM Tris-HCl buffer, pH8.0)
- ・ RNase 溶液 (RNase (Sigma) 10mg を 1ml の蒸留水に溶解し, -20°C に保存する.)

- ・ Proteinase K 溶液 (Proteinase K (Sigma) 10mg を 1ml の蒸留水に溶解し、-20℃ に保存する.)
- ・ アガロース (電気泳動用)
- ・ 1 x TBE (89mM Boric acid, 2mM EDTA を含む 89mM Tris-HCl buffer, pH8.0)
- ・ Ethidium bromide (Ethidium bromide solution 10mg/ml (ニッポンジーン 315-90051) 等)

強力な突然変異誘起剤である。使い捨ての手袋を使用し、ゲルはサララップにのせる、使用後にはすぐに拭き取る等して実験台や器具に試薬が残らないようにする。その他、使用上の注意を良く読み、廃棄の際も含めて、取り扱いに注意する。

- ・ BFB 溶液 (bromophenol blue (BPB) 1mg, グリセリン 0.1ml 及び蒸留水 0.9ml を混和する)
- ・ DNA マーカー (100bp DNA Ladder 等)

3. 細胞及び培地, 血清

1) HL60 ヒト前骨髄性白血病細胞 (JCRB0085)

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。凍結細胞解凍後の生存率は低いので、解凍翌日に低速で遠心して死細胞を除く。数週間培養して増殖が一定になってから実験に使用する。

2) 基本培地

- ・ RPMI1640 培地に 10% 仔牛胎児血清 (Fetal Calf Serum (FCS)) を添加したもの。500ml の培地に 50ml の仔牛胎児血清を添加し、冷蔵庫に保存しておく。室温に戻して使用する。
- ・ RPMI1640 培地 (Invitrogen 11875093)
- ・ 仔牛胎児血清 (Fetal Calf Serum (FCS), 大日本住友製薬等.)

まとめて購入し、実験の途中でロットが変わらないようにする。数種類のロットで、増殖等を比較するロットチェックを行った方がよい。

56℃で 30 分間非働化したのち、50ml のコニカルチューブに小分けして、フリーザーで凍結保存する。使用前日には冷蔵庫に移して解凍しておく。

プロトコール

1. 蛍光染色によるアポトーシスの観察

1 日目

1) サンプルの調製

- ・抽出物の場合は遠心濃縮あるいは凍結乾燥により抽出溶媒を除去し、サンプルの重量を測定する。サンプルは DMSO に溶解して、ストック溶液とする。

DMSO に溶けない場合は、PBS、アルコール等に溶解するが、アルコールは揮発により保存中に濃度が変わりやすい欠点がある。また、PBS に溶解した場合は 0.22 μ m のフィルターを通して滅菌する。

サンプルのストック溶液は抽出物で 50-100mg/ml 程度とし、超音波洗浄機に浸ける、試験管ミキサーで攪拌する等してよく溶解する。不溶物が残る場合は、僅かであれば良く懸濁して用いるか、遠心除去してから用いる。

2) サンプル溶液の分注

- ・それぞれのサンプルを培地 (RPMI1640 培地+10% FCS) で希釈し、細胞添加後の最終濃度の倍濃度の溶液を 6 ウェルカルチャープレートの各ウェルに 1.5ml ずつ加える。コントロールのウェルには培地 (RPMI1640 培地+10% FCS) 1.5ml を添加する。(6 ウェルカルチャープレートの各ウェルにサンプル溶液 1.5ml 及び細胞懸濁液 1.5ml を添加し、3ml のサンプル添加細胞懸濁液とするため。)

3) 細胞懸濁液の調製

- ・対数増殖期にある細胞を用いる。
- ・CO₂ インキュベーターで培養中の細胞懸濁液を回収し、1000rpm、5 分間遠心する。
- ・パストールピペットで上清を除去した後、5-10ml の培地を加えて、静かに細胞を懸濁する。
- ・マイクロピペットで 100 μ l の細胞懸濁液をマイクロチューブまたは 96 ウェルマイクロプレートのウェルにとり、100 μ l の 0.2% トリパンブルーと混合する。
- ・血球計算盤に細胞懸濁液をのせ、細胞数をカウントする。
- ・サンプル溶液に添加後の最終濃度 (2 x 10⁵ または 1 x 10⁵ cells/ml) の 2 倍濃度になるように、培地で希釈する。(4 x 10⁵ または 2 x 10⁵ cells/ml の細胞懸濁液にする。)

4) 細胞の分注

- ・よく攪拌した細胞懸濁液を、サンプルを分注した 6 ウェルプレートの各ウェルに 1.5ml ずつ手早く分注する。

細胞は、均一になるようによく攪拌しながら手早く分注する。

- ・6 ウェルプレートを水平方向にかるく揺らして液を混合する。培養を開始する前に、顕微鏡下で細胞およびサンプルの状態を確認しておく。

細胞が均一分注されているか、細胞の状態は良好か、サンプルが析出していないか等を確認する。

5) 細胞の培養

- ・ CO₂ インキュベーターで 37°C, 24 時間培養する.

2 日目

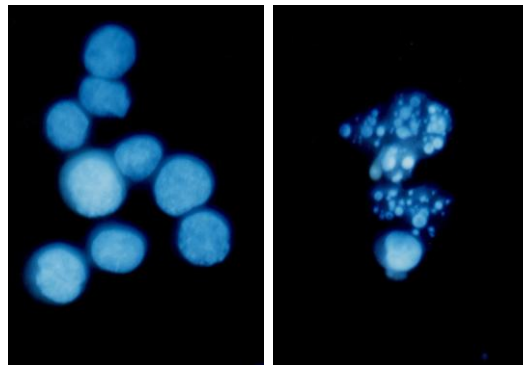
1. 蛍光染色による細胞の観察

- ・ 細胞固定液を調整する.
- ・ 各ウェルの細胞浮遊液を 15ml のチューブに入れ, 1200~2000rpm で 5 分間遠心して細胞を回収する.

断片化した細胞を回収するためには, やや高めの回転数で遠心を行うとよい.

- ・ 上清を除去した後, 細胞固定液 100 μ l を加えて, マイクロピペットで軽く懸濁させ, 室温で 30 分間静置する.
- ・ 蛍光染色液を調整し, アルミホイル等で遮光しておく.
- ・ 細胞浮遊液を PBS に懸濁させ, 遠心して細胞を回収し, PBS を除去する.
- ・ PBS 20 μ l を加えて, マイクロピペットで軽く細胞を懸濁した後, 蛍光染色液 2 μ l を加えて更に混合する.
- ・ スライドグラス上に少量とり, カバーグラスで覆って蛍光顕微鏡で観察する.

アポトーシスを起こした細胞では, 核の断片化及びクロマチンの凝集が認められる.



HL60細胞

アポトーシスを
起こしたHL60細胞

図 1 蛍光染色した細胞²⁾

HL60 細胞 (1 x 10⁵ cells/ml) にニガウリ可食部エタノール抽出物を添加して 24 時間培養した後, ヘキスト 33258 で蛍光染色することによって, HL60 細胞のアポトーシスが観察された.

2. DNA 断片化の測定

1 日目

1. と同様にサンプルを添加した培地を調整し, 細胞を添加して 24 時間培養する.

2 日目

1) DNA の調整

- ・ 恒温水槽を 50℃に調整しておく。
- ・ 各ウェルの細胞浮遊液を 15ml のチューブに入れ、1200～2000rpm で 5 分間遠心して細胞を回収する。
- ・ 回収した細胞に抽出 Buffer 20μl を加えて、溶解し、1.5ml マイクロチューブに移す。
- ・ RNase 溶液 1μl を添加してよく混ぜ、50℃で 30 分間、インキュベーションする。
- ・ Proteinase K 溶液 1μl を添加してよく混ぜ、更に 50℃で 60 分間、インキュベーションする。

この間に 2%アガロースゲルを作成しておく。

2) 電気泳動

- ・ 電子レンジ、オートクレーブ等を用いてアガロースを 1 x TBE に溶解し、2%アガロース溶液とする。

電子レンジを用いてアガロースを溶解する場合は突沸しやすいので注意する。

- ・ 2%アガロース溶液の温度が 60℃以下に下がったら、少量の Ethidium bromide 溶液 (1～数 μl. 1/20000 程度.) を添加し、ゲルトレイに流し込んでアガロースゲルを作成する。
- ・ 電気泳動槽にゲルを入れ、1 x TBE をゲルの表面より僅かに下まで満たす。
- ・ サンプル 20μl に BPB 溶液 4μl を添加して、攪拌、遠心した後、適当量のサンプルをアガロースゲルの各ウェルに入れる。また空いているウェルには DNA マーカーを入れる。
- ・ 泳動を開始する。サンプルがゲルに入ったところで、一旦泳動を止め、ゲルの上まで 1 x TBE を満たす。陽極側には少量の Ethidium bromide 溶液を添加しておく。

DNA サンプルは粘性が高いため、ウェルから浮き出てきやすい。サンプルがゲルの中に入ってから 1 x TBE を十分に満たすことにより、サンプルの流出を防ぐことができる。

- ・ 泳動終了後、ゲルを UV イルミネーター上で観察し、CCD カメラ、デジタルカメラ等で画像を取り込む。

アポトーシスが誘導されるとヌクレオソーム単位での DNA の断片化が起こり、ラダー状のバンドとして観察できる。

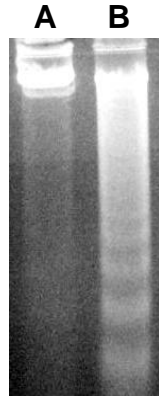


図 2 アポトーシスによる DNA の断片化³⁾

A HL60 細胞, B アポトーシスが誘導された HL60 細胞

HL60 細胞 (1 x 10⁵ cells/ml) にコウタケより精製したエルゴステロールパーオキシサイドを添加して 24 時間培養した後, アポトーシスに特徴的なヌクレオソーム単位での DNA の断片化が観察された。

おわりに

本項では HL60 ヒト白血病細胞を用いたが, 接着細胞を含めて, 他のがん細胞においても同様に測定することができる。

生理的な細胞死はアポトーシスばかりではない。オートファジーを伴う細胞死 (autophagic cell death) もがんの排除機構として機能していると考えられ, その研究が進められている⁴⁾⁵⁾。オートファジーは栄養飢餓等の状態で起こる細胞質構成成分のリソソームにおける分解機構である。更に詳しくは総説等を参照されたい。

参考文献

- 1) 「細胞工学別冊 実験プロトコールシリーズ 改訂アポトーシス実験プロトコール 1. 基礎編」, 田沼靖一監修, (秀潤社, 東京) (1998)。
- 2) 小堀真珠子, 雨宮潤子, 酒井美穂, 白木己歳, 杉下弘之, 坂上直子, 星良和, 柚木崎千鶴子, ニガウリのがん細胞アポトーシス誘導効果および炎症性サイトカイン産生抑制効果, 食科工, **53**, 408-415 (2006)。
- 3) Takei, T., Yoshida, M., Ohnishi-Kameyama, M. and Kobori M., Ergosterol peroxide, an apoptosis-inducing component isolated from *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 212-215 (2005)。
- 4) 立花研, 北中千史, オートファジーと細胞死, 「タンパク質核酸酵素増刊 ユビキチン-プロテアソーム系とオートファジー」, 田中啓示・大隅良典編, (共立出版, 東京), Vol.51, pp.1519-1524 (2006)。
- 5) Kondo, Y. and Kondo, S., Autophagy and cancer therapy. *Autophagy*, **2**, 85-90 (2006)。

2) 担がんマウスを用いたがん細胞増殖抑制作用の評価

(独) 農研機構 食品総合研究所 小堀 真珠子

はじめに

培養がん細胞には、皮下又は腹腔に移植すると *in vivo* で増殖を続けるものがある。ここでは、B16 マウスメラノーマ細胞及び HT29 ヒト大腸がん細胞を用いて担がんマウスを作成し、*in vivo* でのがん細胞増殖抑制効果を測定する方法を紹介する。B16 マウスメラノーマ細胞は C57BL/6 マウスの皮下に移植することにより、黒色の腫瘍を形成する。HT29 ヒト大腸がん細胞はヌードマウスの皮下に移植することができる。

準備するもの

1. 実験器具

1) 細胞培養に必要な器具

詳しくは他項 (Ⅱ-3-1) 等を参照すること。

クリーンベンチ、吸引アスピレーター、パストゥールピペット、培養ピペット
CO₂ インキュベーター (CO₂ ボンベ (レギュレーター付き))、倒立顕微鏡 (位相差・細胞観察用.)、卓上遠心機 (スイングローター・50ml, 15ml チューブ用.)、ディープフリーザー (-80℃, 細胞を保存.)、フリーザー (-20~-30℃, 血清を保存.)、オートクレーブ (ディスポーサブル器具廃棄用.)、オートクレーブバック、セルカルチャーディッシュ (BD Falcon 100mmスタンダードディッシュ 353003 等.)、50ml, 15ml コニカルチューブ (BD Falcon 352070, 352096 等.)。

2) 動物実験に必要な器具

詳しくは他書¹⁾を参照すること。ディスポーザブルシリンジ (針規格 (26G x 1/2")), ツベルクリン用, テルモ等), 解剖用ハサミ, ピンセット, 分析天秤, 小動物用天秤。

3) その他の器具

- ・血球計算盤
- ・1.5ml マイクロチューブ (移植する細胞懸濁液を調整する。オートクレーブ滅菌したもの。)
- ・バリカン (C57BL/6 マウスの場合。移植する足の付け根の毛を除去しておく。)
- ・ノギス (腫瘍体積の測定に用いる。)

2. 試薬

- ・トリパンブルー染色液, 0.4% (Invitrogen 15250061, 細胞数測定用.)
同量の PBS で希釈し, 0.22 μ m フィルターで濾過して, 0.2% 溶液とする.
- ・トリプシン - EDTA (0.25%, 1mM) (Invitrogen 25200056, 接着細胞の剥離に用いる.)
- ・PBS (ー) (日水製薬 05913 (粉末. 溶解後, 耐圧瓶に入れオートクレーブ滅菌したもの.) 等)
- ・ジエチルエーテル又はネンブタール (ペントバルビタール) (麻酔及び屠殺に用いる) ジエチルエーテルを使用する場合は, 麻酔瓶が必要. ネンブタールは向精神薬のため, 入手及び使用方法は所属組織の担当者に問い合わせること.

3. 細胞, 培地及び血清

1) (1) B16 melanoma 4A5 細胞 (RCB0557)

(独) 理化学研究所バイオリソースセンターより入手できる.

(2) 基本培地

DMEM (low glucose, Invitrogen 11885084) に 10% 牛胎児血清 (Fetal Calf Serum (FCS)) を添加したもの. 500ml の培地に 50ml の牛胎児血清を添加し, 冷蔵庫に保存しておく. 室温に戻して使用する. 牛胎児血清は 56°C で 30 分間非働化したのち, 50ml のコニカルチューブに小分けして, フリーザーで凍結保存する. 使用前日には冷蔵庫に移して解凍しておく.

2) (1) HT29 ヒト結腸腺癌細胞 (ATCC HTB38)

米国の細胞銀行である American Type Culture Collection (ATCC) に保存されている. 大日本住友製薬から購入できる (カタログ No.04-038).

(2) 基本培地

McCoy's 5A (Invitrogen 12330031) に 10% 牛胎児血清 (Fetal Calf Serum (FCS)) を添加したもの. 血清のロットチェックは細胞株毎に行う.

4. マウス

1) C57BL/6 (日本チャールズリバー等から購入できる.)

2) Balb/c ヌードマウス (日本チャールズリバー等から購入できる.)

5~6 週齢で購入し, 予備飼育の後 6~7 週齢で実験を開始する. 筆者らはメスを用いて実験を行った.

プロトコール

1. マウスの準備

動物実験を行うにあたっては, 他書²⁾等を参考にし, 十分な実験計画を立てて

から実験を開始する。

B16 マウスメラノーマ細胞は C57BL/6 マウスに移植できる。また、HT29 ヒト大腸がん細胞は Balb/c ノードマウスに移植することができるので、移植するがんの種類に合わせて、マウスを購入し、予備飼育をする。

2. 細胞懸濁液の調整

- 1) 対数増殖期にある細胞を用いる。CO₂ インキュベーターで培養中の細胞をトリプシン-EDTA で剥離して回収し、1000rpm, 5 分間遠心する(詳しくは他書³⁾を参照すること)。
- 2) PBS を添加して静かに細胞を懸濁し、マイクロピペットで 100 μ l をとって、血球計算盤で細胞数をカウントする。
- 3) 再度遠心して細胞を回収し、5-10 x 10⁵ cells/200 μ l になるように PBS に懸濁しマイクロチューブに分注する。
- 4) 細胞懸濁液は調整後すぐにマウスにインジェクションする。

3. がん細胞のマウス皮下への移植

- 1) C57BL/6 マウスは、インジェクションの際に針先が確認できるように、右足付け根の体毛をバリカンで除去しておく。
- 2) エーテル、ネンブタール等でマウスにかかるく麻酔をかける。
- 3) 細胞は沈みやすいので、インジェクションの前によく揺らして懸濁し、200 μ l をシリンジにとる。
- 4) 右足付け根の皮膚をつまみ、手早く、正確に、皮下に細胞懸濁液をインジェクションする。

インジェクションの際は、針先が皮膚を突き抜けないように注意する。また、細胞懸濁液が漏れ出てこないように、確実に皮下に注入したのちゆっくりと針先をもどす。同じ位置になるように、インジェクションの位置や針先の角度を一定にする。

4. 食品成分の投与

- 1) がん細胞を移植した翌日または腫瘍が目視できるようになったときに、ランダムにグループ分けを行い、評価したい食品成分の投与を開始する。

食品または食品成分は、飼料あるいは飲水に混ぜて投与するか、経口あるいは腹腔内投与する。

5. がん細胞増殖抑制効果の評価

2~4 週間程度経過して、腫瘍が大きくなったところで、マウスを安楽死させ、腫瘍を摘出して体積および重量を測定する。試験期間を通して、体重、摂食量その他、ノギスで腫瘍の体積を測定しておくともよい。また、必要に応じて、組織標本を作る等して詳細な検討を行う。

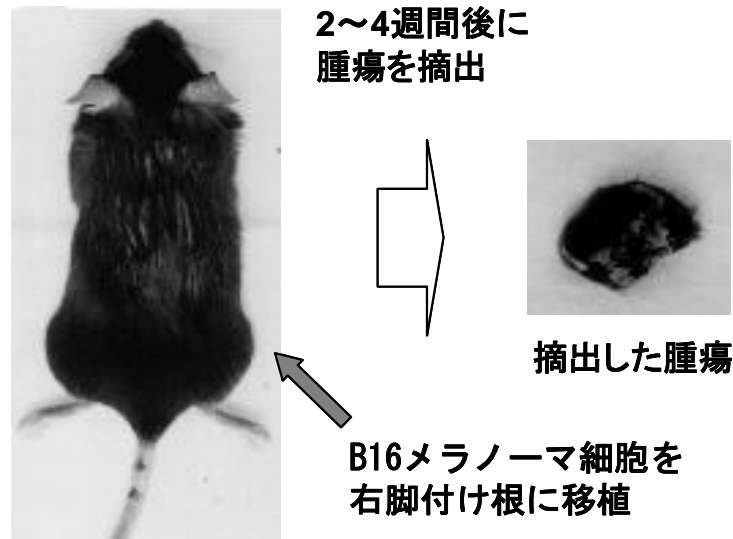


図 1 C57BL/6 マウス及び B16 メラノーマ細胞により皮下に形成された腫瘍

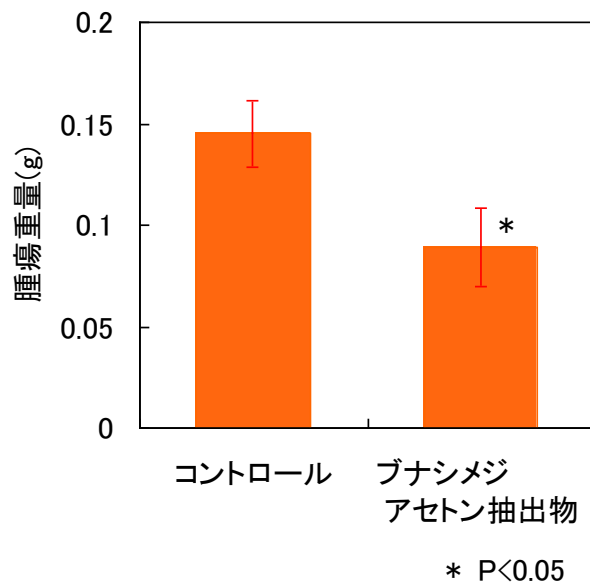


図 2 ブナシメジアセトン抽出物による腫瘍増殖抑制効果

HT29 ヒト大腸がん細胞は Balb/c ノードマウスの皮下に移植した。翌日から 3 日毎にブナシメジアセトン抽出物を経口投与し、3 週間後に腫瘍体積を測定した。

おわりに

B16 メラノーマ細胞はメラニンを生成するため、腫瘍の識別が容易である。腫瘍から細胞を回収し、移植を繰り返すことによって、移植に適した細胞群にすることができる。また、転移性をもつ場合もある⁴⁾。また免疫不全マウスであるヌードマウスを用いることによって、ヒトのがん細胞の *in vivo* での増殖を測定することができるので、実験の目的に応じてがん細胞及びマウス系統を選択するとよい。

参考文献

- 1) 細胞工学別冊 目で見える実験ノートシリーズ, 「マウス解剖イラストレイテッド」, 野村慎太郎著, (秀潤社), (2002).
- 2) 水町功子, I -3-2) 基本的な実験操作 動物実験, 「食品機能性評価マニュアル集 第Ⅰ集」, 食品機能性評価支援センター 技術普及飼料等検討委員会, (日本食品科学工学会), pp.54-63 (2007).
- 3) 小堀真珠子, II -2-5) がん細胞増殖抑制機能評価, 「食品機能性評価マニュアル集 第Ⅰ集」, 食品機能性評価支援センター 技術普及飼料等検討委員会, (日本食品科学工学会), pp.105-114 (2007).
- 4) Murphy, E.A., Davis, J.M., Brown, A.S., Carmichael, M.D., Mayer, E.P. and Ghaffar A., Effect of moderate exercise and oat β -glucan on lung tumor metastases and macrophage antitumor cytotoxicity. *J. Appl. Physiol.*, **97**, 955-959 (2004).

4. 実験動物による機能性評価

1) マウス関節炎モデルを用いた炎症抑制効果の評価

(独) 農研機構 食品総合研究所 小堀 真珠子

はじめに

関節炎にはいくつかの動物モデルがあるが¹⁾、タイプⅡコラーゲン抗体及びリポ多糖 (Lipopolysaccharide (LPS)) によるモデルは比較的容易に、短期間で関節炎を誘導することができる。しかし、このような疾病モデルは動物に対してストレスや苦痛を与えるものであることから、実験に当たっては計画段階で十分な検討を行い、実験回数、匹数及び動物が被るストレスや苦痛が必要最小限になるようにする。

準備するもの

1. 実験器具

- ・ディスポーザブルシリンジ (針規格 (26Gx1/2”))、ツベルクリン用、テルモ等)
- ・小動物用天秤
- ・ノギス (解剖、組織染色等を行う際は、他書^{2,3)}等を参照すること。)

2. 試薬

- 1) 関節炎惹起用モノクローナル抗体カクテルキット (Ca. No.62200, Chondrex, Inc Redmond, WA, USA 国内販売元: 岩井化学薬品)
 - ・本プロトコールではタイプⅡコラーゲンに対する 4 種類のモノクローナル抗体の混合液を用いたが、現在、5 種類のモノクローナル抗体混合液 (Ca. No.53010 (容量 10mg/mL) 等) が販売されている。実験の詳細については、製品資料を参照すること。
- 2) ジエチルエーテル又はネンブタール (ペントバルビタール) (麻酔及び屠殺に用いる)
 - ・ジエチルエーテルを使用する場合は、麻酔瓶が必要。ネンブタールは向精神薬のため、入手及び使用方法は所属組織の担当者に問い合わせること。

3. マウス

Balb/c マウス (日本チャールス・リバー等から購入できる。) 他に、DBA/1 マウス等を用いることができる。5~6 週齢で購入し、予備飼育の後 6~7 週齢で実験を開始する。筆者らはオスを用いて実験を行った。

プロトコール

1. マウスの準備

動物実験を行うにあたっては、他書⁴⁾等を参考にし、十分な実験計画を立ててから実験を開始する。また、腸内細菌叢の影響を避けるため、実験は SPF 条件下で行う。

2. モノクローナル抗体混合液 (10mg/mL) 200 μ L (2mg/mouse) を尾静脈内に投与する。その際、血管から抗体混合液が漏れないように注意する。

3. モノクローナル抗体混合液投与 3 日後に LPS (0111:B4) 溶液 (0.5mg/mL) 100 μ L (50 μ g/mouse) を腹腔内投与する。

4. 食品成分の投与

LPS 投与 4 日後くらいに関節炎が誘導される。そこで、関節炎が誘導された後、食品または食品成分を、飼料あるいは飲水に混ぜて投与するか、経口あるいは腹腔内投与する。

5. 関節炎抑制効果の評価

試料投与開始前から毎日、関節炎の状態をスコア化し、またノギスで炎症の起こった肢の厚みを測定する。また、写真を撮っておくとよい。

表 1 スコア化の例

スコア	状態
0	正常 (Normal)
1	軽度だが明らかな赤みや腫れが、前足又は後足の関節に見られる。又はその数に関わらず指に明らかな赤みや腫れが見られる。(Mild, but defined redness and swelling of the ankle or wrist, or apparent redness and swelling limited to individual digits, regardless of the number of affected digits)
2	中程度の赤みや腫れが指を含めた足全体にみられる。(Moderate redness and swelling of the entire paw including digits)
3	重度の赤みや腫れが指を含めた足全体にみられる。(Severe redness and swelling of the entire paw including digits)
4	多くの関節を含めて肢に特に重度の炎症がみられる。(Maximally inflamed limb with involvement of multiple joints)

Chondrex 社資料。その他文献⁵⁻⁷⁾も参照すること。

また試験期間を通して、体重、摂食量を測定し、必要に応じて、組織標本を作る等して詳細な検討を行う⁵⁻⁷⁾。



図 1 抗コラーゲン抗体及び LPS で Balb/c マウスに誘導された関節炎

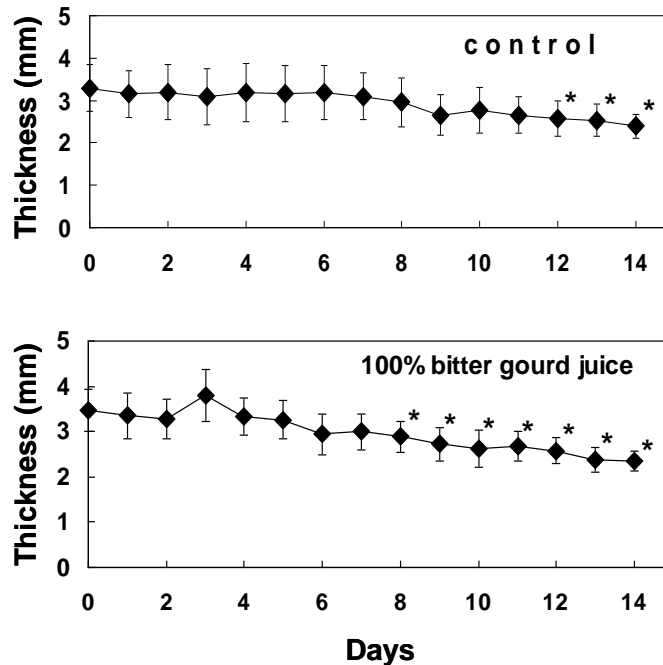


図 2 ニガウリ搾汁液が抗コラーゲン抗体及び LPS で Balb/c マウスに誘導された関節炎に及ぼす影響⁸⁾

各群 10 匹のマウスについて、関節炎が誘導された LPS 投与 4 日後 (day 0) より、3% グルコース水 (control) 又は 100% ニガウリ搾汁液 (100% bitter melon juice) 各 200 μ L を毎日経口投与すると共に、後肢の厚みを測定した。

* $P < 0.05$, day 0 との平均値の差を Bonferroni 法により検定した。

おわりに

筆者らは、in vitro において LPS で誘導される炎症性サイトカイン産生抑制効果を示したニガウリの搾汁液を用いて in vivo における関節炎抑制効果を検討した⁸⁾。

関節炎の評価，スコア化は容易ではないため，文献を参照し，また併せて組織の評価を行う等して，適切に行う必要がある．

参考文献

- 1) 小谷素子, 岩倉洋一郎, 関節リウマチのモデル動物, 細胞, **40**, 350-353 (2008).
- 2) 細胞工学別冊 目で見える実験ノートシリーズ マウス解剖イラストレイテッド 野村慎太郎著(秀潤社, 東京), (2002).
- 3) カラー版 染色法のすべて 月刊 *Medical Technology* 別冊(医歯薬出版, 東京), (1988).
- 4) 水町功子, I-3-2) 基本的な実験操作 動物実験, 食品機能性評価マニュアル集 第1集, 食品機能性評価支援センター 技術普及飼料等検討委員会(日本食品科学工学会, 茨城), pp.54-63(2007).
- 5) Kagari, T., Doi, H. and Shimozato, T., The importance of IL-1 beta and TNF-alpha, and the noninvolvement of IL-6, in the development of monoclonal antibody-induced arthritis. *J.Immunol.*, **169**, 1459-1466 (2002).
- 6) Zhou, J.S., Xing, W., Friend, D.S., Austen, K.F. and Katz, H.R., Mast cell deficiency in Kit (W-sh) mice does not impair antibody-mediated arthritis. *J.Exp.Med.*, **204**, 2797-2802 (2007).
- 7) Ichiyama, H., Onodera, S., Nishihira, J., Ishibashi, T., Nakayama, T., Minami, A., Yasuda, K. and Tohyama, H., Inhibition of joint inflammation and destruction induced by anti-type II collagen antibody/lipopolysaccharide (LPS)-induced arthritis in mice due to deletion of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Cytokine*, **26**, 187-194 (2004).
- 8) Kobori, M., Nakayama, H., Fukushima, K., Ohnishi-Kameyama, M., Ono, H., Fukushima, T., Akimoto, Y., Masumoto, S., Yukizaki, C., Hoshi, Y., Deguchi, T. and Yoshida, M., Bitter melon suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses. *J Agric.Food Chem.*, **56**, 4004-4011 (2008).