

6) 脂肪前駆細胞分化誘導試験

—前駆脂肪細胞株 (3T3-L1) を用いた脂質代謝改善機能評価法—

(社) 日本食品科学工学会 三上 一保

玉川大学農学部 新本 洋士

はじめに

現在、脂肪細胞の機能の解明が著しい進歩を遂げ、食欲や生活習慣病など多くの生体内現象に関与していることが遺伝子レベルで解明されつつあり、糖・脂質代謝以外にもその関与する機能が明らかにされつつある。そこで、肥満解消のみならず生活習慣病の予防・改善のためにも脂肪細胞の機能に影響を与える物質の解明が行われ始めている。

このように、培養脂肪細胞は各方面の研究に使用されており、これまでこのような細胞を用いたことのない研究者においても、培養脂肪細胞はユニークな実験系を提供できる可能性がある。この目的には長期の影響が検討でき、しかも簡便であることから培養脂肪細胞を用いる方法が適している。培養脂肪細胞は脂肪組織から成熟脂肪細胞を単離する方法や、また脂肪組織中の前駆脂肪細胞を培養する方法などもあるが、何と云っても株化された細胞を用いるのが簡便で最も多く用いられている。株化された細胞は脂肪細胞としての研究以外にも細胞の分化・脱分化といった基礎研究に対してもひとつのモデル系を提供し、それらの過程における遺伝子発現制御などの研究にも用いられている。

ここでは株化された前駆脂肪細胞の中でも多く用いられている 3T3-L1 細胞の培養法について解説する。また、近年 3T3-L1 細胞などの脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化誘導を測定する簡便なキットが販売されていることから、ここではキットを用いた脂質代謝改善機能評価法について説明する。

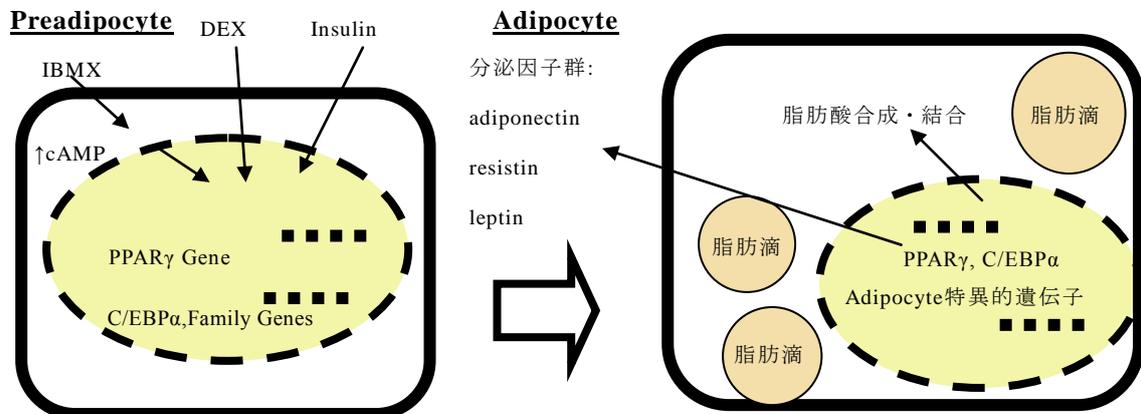


図 1 インビトロにおける脂肪合成の過程 3T3-L1 のような前駆脂肪細胞

(Preadipocyte, 図左) はイソブチルメチルキサンチン (IBMX), デキサメタゾン (DEX) 及びインスリン (Insulin) により脂肪細胞 (Adipocyte, 図右) に分化誘導の刺激を受ける。 IBMX は細胞内の cAMP を増加させ, DEX は糖質コルチコイド (ステロイドホルモンの一種) レセプターと結合し, Insulin はインスリンレセプターと結合する。 この 3 つの経路は PPAR γ , C/EBP α ファミリー遺伝子の活性を高める。 脂肪細胞 (Adipocyte) には脂肪細胞特異的遺伝子 (分泌因子群, インスリンレセプターや脂肪酸合成・結合を行うタンパク質などをコードする) を活性化する PPAR γ 及び C/EBP α 遺伝子を含んでいる。 脂肪酸は Oil Red O で染色可能な脂肪滴からなる³⁾。

準備するもの

1. 実験機器・器具

- ・ クリーンベンチ
- ・ 炭酸ガス培養器
- ・ ピペットマン
- ・ 倒立型位相差顕微鏡
- ・ 分光光度計
- ・ プレートシェーカー
- ・ 乾熱滅菌器
- ・ オートクレーブ
- ・ ピペットエイド (ドラモンド等)
- ・ 血球計算盤
- ・ 1.5 mL マイクロチューブ
- ・ 15 mL プラスチックコニカルチューブ (滅菌済, ファルコン等)
- ・ セルカルチャーディッシュ (直径 60 mm, falcon 353002 等)
- ・ セル (吸光度測定用)
- ・ 滅菌メスピペット 10 mL
- ・ パスツールピペット (乾熱滅菌したもの)

2. 試薬

- ・ ダルベッコ変法イーグル培地 ; DMEM (SIGMA 等)
- ・ 牛胎児血清 ; FCS (EQUITE CH-BIO 等)
- ・ 抗生物質 (Penicillin-streptomycin solution 100 x (SIGMA 等),
HEPES, Free Acid (SIGMA 等))
- ・ トリプシン-EDTA (生研) 溶解液 (デンカ生研株式会社 等)
- ・ 脂肪細胞分化誘導阻害物質 ; 塩化ベルベリン (和光純薬 等)。

ベルベリンはキハダ (ミカン科落葉高木) 内皮の抽出物及びキハダに含まれる有効成分。強い脂肪細胞分化誘導抑制作用をもつ。塩化ベルベリンを 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加して培養すると、細胞内へのトリグリセリドの蓄積は 5 分の 1 以下に減少、細胞内 GPDH 活性は 60 分の 1 以下になることが報告されている⁴⁾。

- Adipogenesis Assay Kit (アディポジェネシスアッセイキット, CHEMICON, ECM950) キットには分化誘導を引き起こす因子[イソブチルメチルキサンチン (IBMX Solution), インスリン (Insulin Solution), デキサメタソン (Dexamethasone (DEX) Solution)]と、形成された脂肪滴の発色用試薬 (Oil Red O solution, Wash Solution, Dye Extraction Solution) を含む。

- 1) Adipogenesis Initiation Media (分化誘導培地。DMEM/10%FCS/0.5 mmol/L IBMX/1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ dexamethasone Solution ; IBMX Solution 及び Dexamethasone Solution を DMEM/10%FCS で 1:1,000, 1:10,000 の割合で希釈する。4°C で 6 週間保存可能。)
- 2) Adipogenesis Progression Media (分化培地。DMEM/10%FCS/10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ insulin ; Insulin Solution を DMEM/10% FCS で 1:1,000 に希釈する。4°C で 6 週間保存可能。)
- 3) Adipogenesis Maintenance Media (継代培地。DMEM/10%FCS)

- PBS (SIGMA, Dulbecco's phosphate buffered saline, 10 x 等)

3. 前駆脂肪細胞株

脂肪細胞へと分化する性質を持つ細胞が細胞株として 1974 年に確立された。この細胞はマウス胎児由来の 3T3 (Swiss albino) 繊維芽細胞株より分離されたもので、脂肪細胞へと分化する能力を持っている。現在この細胞 (3T3-L1) は American Type Culture Collection (catalog No. ATCC-CCCL-92.1) から、また培養細胞株を取り扱っているメーカー等からも入手可能である。更に、この 3T3-L1 細胞からは脂肪細胞への分化能がより高い細胞 (3T3-F442A) がクローン化されている。また、遺伝的肥満マウス (BL/6Job/ob) の副睾丸脂肪細胞の脂肪細胞から脂肪細胞へと分化する能力のある繊維芽細胞様細胞 (ob 17) が確立されている。ここでは、広く用いられている 3T3-L1 細胞を用いた手法について述べる。

4. 分化脂肪細胞の特徴

1) 形態的特徴

分化すると繊維芽細胞の鋭角的な形態から丸い形になり、細胞内に微細な多くの脂肪滴が見られるようになる。分化が進むと、脂肪滴は大きくなるが単房とはならず多房性のままである。Oil Red O solution で染色すると脂肪滴は赤く染色さ

れ区別しやすい。

2) 生化学的特徴

分化の過程は新たな遺伝プログラムの進行の上に成り立っているが、実際脂肪細胞への分化に伴って多くのタンパク質の変化が電気泳動によって認められている。この中でも、グリセロール-3-リン酸脱水素酵素 (GPDH) は分化によって活性が 1,000 倍ほど上昇するので脂肪細胞への分化の指標としてよく測定されている。測定は GPDH 活性測定キット (WAKO, 308-15881 等) を用いて簡便かつ安定した結果を得ることが可能である (食品機能性評価マニュアル集 第 II 集 p.130-135 参照)。

プロトコール

1. サンプル調製

種々の抽出法で調製した試料を検定することが出来る。水や低濃度の塩溶液で抽出したものは、滅菌フィルターを通す。有機溶媒等で抽出したものは DMSO に溶解して添加する。ここでは、例として本研究室で行っている農作物試料の調製方法について示す。

- 1) 農作物試料はフードプロセッサーで粉碎後、凍結乾燥 (FD) する。
- 2) ねじ口試験管に FD 試料 0.1 g 及び 5 mL のメタノールを加え、回転シェーカーにかけ 16 時間以上振とうする。
- 3) 3000 rpm, 5 分間遠心し、上清 1 mL を褐色広口バイアルに回収する。
- 4) 窒素ガスを吹き付け、適量の DMSO に溶解する (使用時まで -20°C 保存)。

2. 培養法

1) 細胞の増殖及び保存

培地は 10 %牛胎児血清を含む DMEM を基本的に用い、通常 5 %炭酸ガス-空気、飽和水蒸気、 37°C の環境下で培養する。抗生物質はペニシリン (100 units/mL), ストレプトマイシン (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 及び培地の pH を安定させるため HEPES を添加する。500 mL の DMEM 培地に対し、ペニシリン-ストレプトマイシン (100 倍溶液) を 5 mL, 1 mol/L HEPES (Free Acid) は 7.5 mL 加える。培地交換は週間に 3 回程度行う。

入手した 3T3-L1 細胞は顕微鏡で細胞の密度を見て、コンフルエンスにならない、まだまばらな成長期の時期に継代しなければならない。コンフルエンスになるまで増殖させたり、また継代を繰り返した細胞は分化能力が低下し使えなくなったりするので、最初に凍結保存用の細胞を大きなディッシュ、フラスコを用いて十分増やしておくことが重要である。

2) 脂肪細胞への分化

上記 1 の方法で培養した細胞を約 3 日毎に培地交換 (10%FCS/DMEM) (5 mL/60 mm dish) すると倍加時間約 30 時間で 5~6 日目にはコンフルエンスに達する。細胞がコンフルエンスに達した後, 1 $\mu\text{mol/L}$ DEX, 0.5 mmol/L IBMX, を含む 10%FCS-DMEM を加え 2 日間培養処理する。次に, 10 $\mu\text{g/mL}$ Insulin を含む 10%FCS-DMEM 培地を加え 2 日間培養処理する。その後 10% FCS/DMEM を 1 週間に 3 回培地交換しながら培養を続ける。

DEX などを含む培地での 2 日間の処理後, 細胞質に球形の微細な透明の脂肪滴が見られるようになる。高い分化能を持った細胞であれば, 1 週間するとほとんどの細胞に脂肪滴が認められるようになる。この状態で培地交換しながら 1 ヶ月間以上脂肪細胞として保つことが出来る。分化能が低い細胞の場合, 脂肪滴の見られる細胞の割合が低く, 繊維芽細胞の割合が高くなる。継代を繰り返すと分化能が低下するので凍結保存した細胞に戻り, 実験を行う。分化能が低下した細胞についてはその中からクローニングによって分化能の高い株を再び得ることが出来る。

牛胎児血清の代わりに分化誘導前後の培養には安価である仔牛血清を用いることも出来る。その場合, 分化誘導時のみ牛胎児血清を含む培地を用いる。以下には、Adipogenesis Assay Kit を用いた脂質代謝改善機能評価法について記す。

3. 操作の実際

- 1 日目 ; マウス前駆脂肪細胞 3T3-L1 は 10%FCS を含む DMEM に 3×10^4 細胞/mL の密度で浮遊させ, この細胞懸濁液 5 mL を 60 mm ディッシュに巻き込む。1~2 日間 37°C , 5% CO_2 で培養。(1 $\times 10^4$ 細胞/mL の場合, コンフルエントになるまで約 4 日かかる。)
- 3 日目 ; コンフルエントになった細胞の培地を分化誘導培地 (Initiation Media) に交換し, 2 日間 37°C , 5% CO_2 で培養。培地交換は出来るだけ穏やかに行い, 細胞の剥離を防ぐ。ネガティブコントロール用の 60 mm ディッシュには継代培地を用いる。
- 5 日目 ; 誘導培地を分化培地 (Progression Media) に交換し, 2 日間 37°C , 5% CO_2 培養。ネガティブコントロール用の 60 mm ディッシュの培地は継代培地に交換する。
- 7 日目 ; 分化培地を継代培地 (Maintenance Media) に交換し, サンプル^{*1} を添加する。2 日間 37°C , 5% CO_2 培養。ネガティブコントロール用の 60 mm ディッシュの培地は継代培地に交換する。

9 日目；継代培地を再び継代培地に交換し，再度サンプル*¹ を添加する．2 日間
37℃，5%CO₂ で培養．

11 日目；検出．

*¹ サンプル調製の詳細な抽出方法は「サンプル調製」の項を参照．DMSO に
溶解しているサンプルは，60 mm のディッシュに対して 20 μl 以上加えないこと．
大量の DMSO は細胞の増殖を阻害する．

4. 検出方法

- 1) 培地を除去する．
- 2) PBS を 5 mL 加える．
- 3) 軽く振とうした後、PBS を除去する．
- 4) 2) → 3) をもう 1 回繰り返す．
- 5) 1.25 mL の Oil Red Solution を加える．
- 6) 室温で 15 分インキュベートする．
- 7) 上澄みを除去する．
- 8) 2.5 mL の washing solution を加え，軽く混ぜる．
- 9) 上澄みを除去する．
- 10) 8) → 9) をもう 2 回繰り返す
- 11) スキャンもしくは写真撮影する（図 2 A, C 参照）．
- 12) Dye Extraction Solution を 625 μL 加える．
- 13) プレートシェーカーで振とうする（15～30 分）．
- 14) セルに移して 520 nm の吸光度を測定する（図 2 B 参照）．

*24 ウェルマルチウェルプレートを用いると一度に多くのサンプルを測定できるが，
均一に細胞を撒けず，データにムラが出ることもあるため注意が必要である．

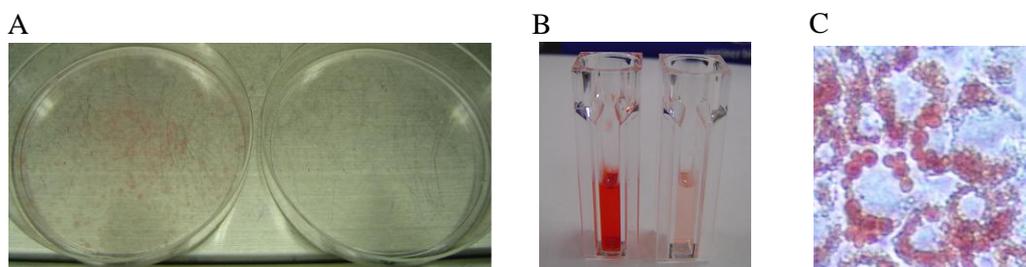


図 2 Oil Red O solution による脂肪滴の染色

A ; Oil Red Solution で染色後 washing solution で洗浄した状態．サンプルとして左
ディッシュは DMSO，右ディッシュはベルベリンを添加． B ; A に Dye Extraction
Solution を添加し Oil Red O solution を溶出． C ; 3T3-L1 細胞の顕微鏡写真．油滴が

Oil Red で赤く染色されている。

5. データの取りまとめ

脂肪細胞分化誘導試験は反復試験(2~3 連)し、測定結果は平均値と標準偏差で表す。分化の程度は細胞中の油滴の状況を顕微鏡で見れば簡単に分かる。ここではオイル・レッド O の染色程度による評価方法を示したが、より定量的な指標としては GPDH 活性や油滴のトリグリセリドの定量があり、キットにより簡便に調査出来るため、多く用いられている。他、研究者によって多くの生理的・分子生物学的測定が行われている。

おわりに

生活習慣の欧米化に伴い、高血圧、高脂血症、糖尿病等に代表される生活習慣病の罹患者数の増加が近年問題となっている。そしてこれらに共通する因子として、内臓脂肪の増加を特徴としたメタボリックシンドロームという概念が提唱された^{8,9)}。成熟した脂肪細胞はもはやその数において増加することはないので、脂肪組織の増大には前駆脂肪細胞が寄与する可能性が示唆されている¹⁰⁾。脂肪細胞は中胚葉系多機能細胞が分化してできるが、同じ中胚葉系前駆細胞である 3T3-L1 細胞は DEX, IBMX, インスリンによる刺激で効率よく脂肪細胞に分化することが知られており⁸⁾、脂肪細胞分化の研究に広く用いられている。3T3-L1 細胞を用いた脂質代謝改善機能評価法によりスクリーニングされる様々な素材が、メタボリック症候群予防・治療に役立つ可能性がある。更に、脂肪細胞への分化がどのような因子に影響を受けるかが解明されれば、肥満等に起因する疾患の原因解明につながる事が期待できる。

参考文献

- 1) 関谷敬三, VI 脂質代謝改善機能評価法 (VI-1 前駆脂肪細胞株 (3T3-L1) の培養法), 「食品の機能性評価マニュアル集」, (農林水産省農林水産技術会議事務局, 農林水産省食品総合研究所, 編集・発行), pp.96-99 (1999).
- 2) 関谷敬三, 前駆脂肪細胞 (3T3-L1) を用いた代謝機能評価, 「食品機能研究法」, (篠原和毅, 鈴木建夫, 上野川修一編著, 光琳) pp. 133-136 (2000).
- 3) アディポジェネシスアッセイキット, (CHEMICON International, Inc.), 付属プロトコール (2004).
- 4) 新本洋士, 岩下恵子, 小堀真珠子, 木村俊之, 山岸賢治, 鈴木雅博, マウス 3T3-L1 細胞に対するキハダ抽出物のトリグリセリド蓄積抑制作用, 食科工, **52**, 535-537 (2005).

- 5) Yuan, M., Konstantopoulos, N., Lee, J., Hansen, L., Li, Z.W., Karin, M. and Shoelson, E., Reversal of obesity-and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science*, **31**,1673-1677 (2001).
- 6) Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. and Matsubara, K., cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (adipose most abundant gene transcript 1). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **16**, 286-9 (1996).
- 7) Yamauchi, T., Kamon, J., Ito, Y., Tsuchida, A., Yokomizo, T., Kita, S., Sugiyama, T., Miyagishi, M., Hara, K., Tsunoda, M., Murakami, K., Ohteki, T., Uchida, S., Takekawa, S., Waki, H., Tsuno, N.H., Shibata, Y., Terauchi, Y., Froguel, P., Tobe, K., Koyasu, S., Taira, K., Kitamura, T., Shimizu, T., Nagai, R. and Kadowaki, T., Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*, **12**, 423, 762-769 (2003).
- 8) Reaven, G.M., Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, **37**, 1595-1607 (1988).
- 9) Fujioka, S, Matsuzawa, Y., Tokunaga, K. and Tarui, S., Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity. *Metabolism*, **36**, 54-59 (1987).
- 10) Spiegelman, B.M. and Flier, J.S., Adipogenesis and Obesity: Rounding Out the Big Picture. *Cell*, **87**, 377-389 (1996).
- 11) Rubin, C.S., Hirsch, A., Fung, C. and Rosen, O.M., Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem.*, **253**, 7570-7578 (1978).

(3) β-カロテン退色法 (リノール酸自動酸化法)

(社) 日本食品科学工学会 三上 一保
 (独) 農研機構 食品総合研究所 津志田 藤二郎

はじめに

この方法はリノール酸の自動酸化に伴い生じるリノール酸過酸化物が、β-カロテンの二重結合と反応することによって、470nm に吸収をもつ黄色を帯びた β-カロテンの色が消失することを利用したものである。リノール酸と β-カロテンに界面活性剤を添加してエマルジョンを形成させ温度を上げることによってリノール酸の自動酸化が促進され、1 時間以内の反応時間でも十分に抗酸化性が測定できる。反応系にサンプルを添加することで吸光度の減少が抑えられ、このことを指標として様々な農作物の抗酸化活性を評価出来る。また、試料液が少量で済む、一度に数点の試料の測定ができる等の特徴をもつ、簡便な方法である。

これまでの手法では、近年、人の健康に及ぼす安全性が問題視され、添加物としての使用が禁止されるようになった合成抗酸化剤、BHA (*tert*-ブチルヒドロキシアニソール) を抗酸化性の標準物質とする例が多かったが、本法では Trolox を標準物質とした評価法を紹介する。

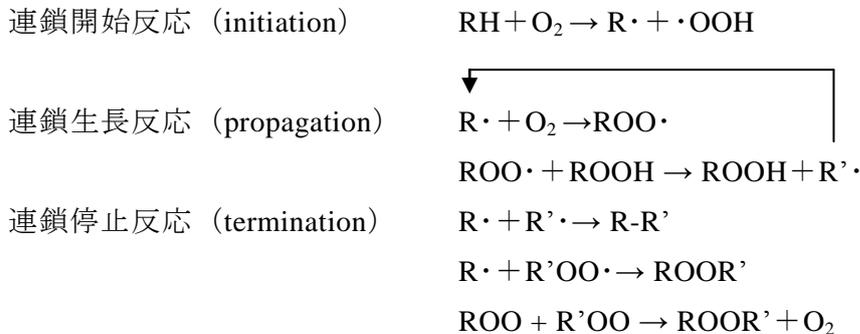


図 1 脂肪酸自動酸化の機構

連鎖開始反応では、脂質分子 (RH) の水素分子 (H) が引き抜かれて脂質ラジカル (R·) を発生する。R· が連鎖的に増えるので自動酸化と呼ばれる。水素の引き抜かれやすさは脂質の構造に起因している¹⁾。

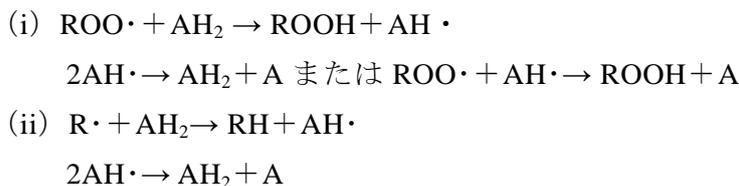


図 2 抗酸化物質による脂質の抗酸化の作用機構

AH₂ は抗酸化物質. (i)では抗酸化物質が脂質ペルオキシラジカルに作用して、以降に生じる連鎖生長反応を停止する. すなわち、抗酸化物質が代わって酸化されて脂質ペルオキシラジカルを消去する. (ii)では抗酸化物質が脂質ペルオキシラジカルの生成を阻止する. すなわち、抗酸化物質が生成した脂質ラジカルに水素を与えて反応を停止する¹⁾.

準備するもの

1. 実験器具

- ・分光光度計
- ・ディスポセル (1mL 用)
- ・試験管立て (セルを立てるため)
- ・恒温浴槽 (ウォーターバス)
- ・ドラフト (窒素ガスでクロロホルムを乾かすため.)
- ・褐色メスフラスコ (5mL)
- ・100mL 三角フラスコ
- ・ピペットマン
- ・ピペットマン用チップ

2. 試薬

- ・リノール酸 (和光純薬 等)
- ・β-カロテン (和光純薬 等)
- ・クロロホルム (和光純薬 等)
- ・Trolox (CALBIOCHEM[®]等)
- ・第 1 リン酸ナトリウム (NaH₂PO₄・2H₂O) (ナカライ等)
- ・第 2 リン酸ナトリウム (Na₂HPO₄・12H₂O) (ナカライ等)
- ・80%エタノール
- ・ツイーン 40 (和光純薬 等)

プロトコール

1. ストック試薬の調製

1) リン酸緩衝液 ; 0.2M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.8)

- (1)保存 A 液 ; 0.2M 第 1 リン酸ナトリウム (NaH₂PO₄・2H₂O) 溶液. 27.8g を溶かして 1000mL の溶液を作製.
- (2)保存 B 液 ; 第 2 リン酸ナトリウム (Na₂HPO₄・12H₂O) 溶液. 53.65g を溶かして 1000mL の溶液を作製.

- (3) 保存 A 液及び B 液を混合し、pH6.8 になるように調製する。
- 2) 2mM Trolox (80%エタノールに溶解する。)
2. 試験当日に調製する試薬
- ・ リノール酸溶液 ; 5mL 褐色メスフラスコ使用し、555 μ L のリノール酸(0.9g/mL)をクロロホルムに溶解して 5mL とする。
 - ・ β -カロテン溶液 ; 5mL 褐色メスフラスコ使用し、4mg の β -カロテンをクロロホルムに溶解して 5mL とする。
 - ・ ツイーン 40 溶液 ; 5mL 褐色メスフラスコ使用し、1g のツイーン 40 をクロロホルムに溶解して 5mL とする。
 - ・ Trolox 標準溶液 ; 2mM Trolox ストック溶液を 80%エタノール溶液で希釈し、10~500 μ M の間に 4~6 段階の Trolox 標準溶液を作製する。
3. リノール酸- β -カロテンエマルジョンの作製
- 1) 100mL の三角フラスコにリノール酸溶液を 100 μ L 入れる。
 - 2) β -カロテン溶液を 250 μ L 加える。
 - 3) ツイーン 40 溶液を 500 μ L 加える。
 - 4) ドラフト内において、3) のフラスコに窒素ガスを吹き込み、クロロホルムを完全にとばす。
 - 5) 45mL の蒸留水を加えて溶解する。
 - 6) 5) に溶液に 5mL の 0.2M リン酸緩衝液を加える。
4. 反応液の作製
- 1) 1mL ディスポセルにコントロールとしての蒸留水と 4~6 段階の濃度の Trolox 標準液及び試料液をそれぞれ 20 μ L 採取する。試料液については、2 連にて実施する。従って、セルの通し番号は以下ようになる (以下は試料 3 種類の例)。セル番号 1 はコントロール (蒸留水), 2 は 500 μ M Trolox 溶液, 3 は 250 μ M Trolox 溶液, 4 は 100 μ M Trolox 溶液, 5 は 50 μ M Trolox 溶液, 6 は 25 μ M Trolox 溶液, 7 は 10 μ M Trolox 溶液, 8 と 9 は試料液 1, 10 と 11 は試料液 2, 12 と 13 は試料液 3 となる。
 - 2) 次いで、980 μ L のリノール酸- β -カロテン溶液をピペットマンで勢い良く加える (図 1)。
5. 操作の実際 ; 酸化の促進と吸光度の測定
- 1) 4.2) の後、セル番号 1 (コントロール) の 470nm の吸光度を測定する (A_0)。
 - 2) 直ちに恒温浴槽内の試験管立てに立てる。
 - 3) 次いで 2 番目のセルの吸光度を測定し、同様に恒温浴槽に入れる。
 - 4) 3 番目、4 番目と同様に行い、13 番目まで測定を続ける。

注意点

- * ストップウォッチは 1 番目のセルの吸光度を測定して浴槽に移動した時にスタートさせ、以後 5~10 分おきに約 50 分後までの吸光度の減少を測定する。
- * この方法では、セル番号 1 番から 13 番までの反応時間を揃えるために、常に一定のリズムで吸光度を測定する必要がある。1 番から 13 番までの測定を約 2 分程度で終わるのが望ましい。
- * 吸光度の測定にあたって、セルの外側には浴槽の水が付着するので、測定の際にはセルの周囲の水をすばやくふき取るとよい。

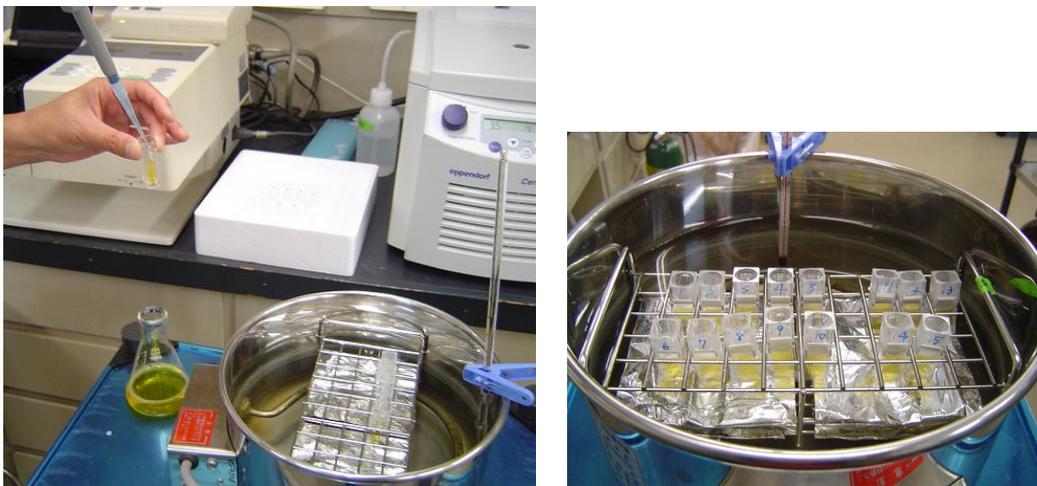


図 1 酸化の促進と吸光度の測定

サンプル及びリノール酸- β -カロテンエマルジョンを入れたセルを 50°C 恒温浴槽内の試験管立てに立てる。

計算方法

1. 試料溶液及び段階希釈した抗酸化性標準物質 Trolox における 15 分及び 45 分後の O.D. 値を用いて $\Delta A = (A_{t1}) - (A_{t2})$ を算出する (O.D.15min - O.D.45min)。
2. Trolox 濃度 (μM) と ΔA の関係を対数グラフにとり (図 3) 直線性が得られる範囲におけるグラフの式を求める。
3. 2. で得られた計算式と 1. における試料の ΔA とより、試料溶液の相対的な抗酸化活性を数値化する。

プロトコールのポイント

- * ΔA の値が少ないものほど抗酸化性が強い。
- * 食品の抗酸化能の一次スクリーニング法として活用できる。
- * リノール酸・ β -カロテン溶液の調製に際しては、 A_0 が Abs 1 程度になるよう β -

カロテン溶液の添加量を調整する。

*本法では 15 分後及び 45 分後の測定値を用いた評価例を示しているが、インキュベート時間 t は、ブランクの A_t が約 4 割程度 (Abs 0.7~0.8 の範囲) 低下するまでの時間とする。

*リノール酸は、イニシエーターとして働くのでやや酸化したものがよい。

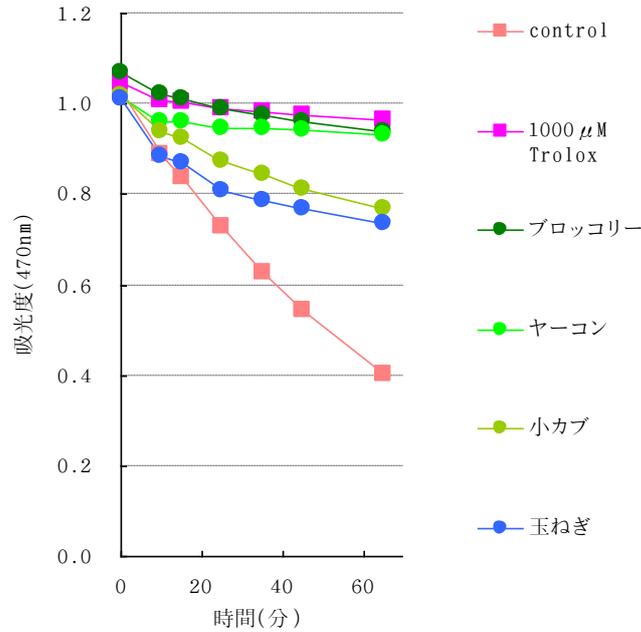


図 2 Trolox 及び様々な野菜抽出物における抗酸化能力の比較 (縦軸は 470nm における吸光度)

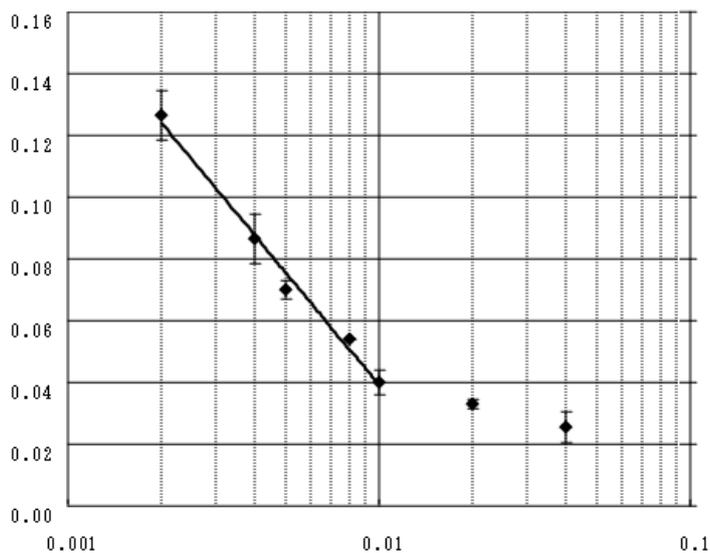


図 3 Trolox 濃度と ΔA の関係 (横軸は μ M Trolox 濃度, 縦軸は ΔA)⁴⁾

おわりに

食品工業で広く使われている抗酸化剤の中には、化成品である BHA や BHT など、効力・化学的安定性の点では優れているが、その使用が人の健康に及ぼす安全性が問題視されているものもある。そのため、天然性成分が脚光を集めている。これまでも脂質自動酸化に対する天然抗酸化物質がいくつも見つかっており、植物油に広く存在する α -トコフェノール (ビタミン E)、ゴマ油に存在するセサミノール、ショウガ科ウコン由来のクルクミン等はその例である。合成酸化剤を添加した場合と比較し、効果が劣る・コストが高い等の問題があるものの、人に安全なものであることは今の時代、必須の条件である。

農作物の抗酸化能力を評価する方法としては種々の方法が提案されている。供試試料の性状 (水溶性, エタノール可溶性, 有機溶媒可能性) や測定装置の有無, また, どのような場面 (試験管内, あるいは食品や組織等) で抗酸化能の発揮を期待したいのかを考慮して選択すると良い。ただしこれらには一長一短がある。評価法によっては異なる結果が得られる場合もあるので, 可能ならばメカニズムの異なる複数の評価法で評価することが望ましい。

本項にはセルを用いた手法を示したが, マイクロプレートを使用して測定する方法があるので, 多数の検体を測定する場合には工夫されたい。

参考文献

- 1) 大橋英雄, カバノキ科樹木成分, ジアリルヘプタノイドの抗酸化能とその機能の高度利用, 岐阜大学リポジトリ研究報告書 (1994)。
- 2) 津志田藤二郎, 鈴木雅博, 黒木柁吉, 各種野菜の抗酸化性の評価および数種の抗酸化成分の同定, 日食工誌, **41**, 611-618 (1994)。
- 3) 山本展久, 水江智子, 佐野一成, 高野済, 宮本安紀子, 上野洋子, 工藤恭子, 望月聡, 大分県産フレッシュハーブの特性把握およびその機能性に関する研究—ハーブ類の抗酸化性について—, 大分県産業科学技術センター研究報告, 144-149 (2001)。
- 4) 熊本県食品加工研究所・研究開発課, β -カロテン退色法を利用した簡易な抗酸化能測定法, 九州農業研究成果情報 (1999)。

5) B16 細胞を用いたメラニン産生の評価

(社) 日本食品科学工学会 三上 一保
玉川大学農学部 新本 洋士

はじめに

メラニンとは生体内にみられる褐色ないし黒色の色素の総称で、皮膚の色、毛髪の色を決定する色素である。メラニンの生合成経路は詳しく研究されており、メラノサイトと呼ばれる色素細胞中のメラノソーム顆粒中でチロシンがチロシナーゼによって酸化され、何段階もの酸化重合過程を経て色素が合成される。

マウスの黒色肉腫細胞である B16 細胞を用いることにより、農産物や食品がシミやそばかすの原因となるメラニンの産生を抑制するか否かを容易に培養細胞で評価することが出来る。

準備するもの

1. 実験器具

- ・クリーンベンチ
- ・分光光度計
- ・CO₂ インキュベーター
- ・遠心器
- ・倒立型位相差顕微鏡
- ・オートクレーブ
- ・ソニケーター（発信器先端投入型）
- ・ボルテックスミキサー
- ・ピペットエイド
- ・血球計算盤
- ・培養ピペット
- ・滅菌済みパスツールピペット
- ・ピペットマン
- ・1.5mL マイクロチューブ
- ・15mL ファルコンチューブ（Falcon 352096 等）
- ・セルカルチャーディッシュ（Falcon 353002 等）
- ・セル（可視光線用ディスポーザブル 198-19-35-02 等）
- ・滅菌フィルター（NALGENE, 290-3320, SFCA, Bottle top Filter, 150ml, 0.2µm pore size 等。培地のフィルター滅菌用。）

2. 試薬

- ・炭酸水素ナトリウム (和光純薬等)
- ・ダルベッコ変法イーグル培地「ニッスイ」粉末組織培養用炭酸水素ナトリウム不含 (日水製薬株式会社等)
- ・メラニン (ナカライ等)
- ・リノール酸 (和光純薬等)
- ・アルブチン (和光純薬等)
- ・DC プロテインアッセイキット II (BIO-RAD, 500-0112JA 等, タンパク含量測定用.)
- ・PS (Penicillin Streptomycin, SIGMA 等)
- ・HEPES, Free Acid (SIGMA 等)
- ・PBS (DULBECCO'S PHOSPHATE BUFFERED SALINE, SIGMA, 10 x 等)
- ・FCS (Fetal Calf Serum, 牛胎児血清)
- ・トリプシン-EDTA (生研) 溶解液 (デンカ生研株式会社等)
- ・NaOH (和光純薬等)

3. 細胞及び培地

1) 細胞

マウス由来のメラニン高生産性 B16C7 メラノーマ細胞を用いる。財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 ヒューマンサイエンス研究資源バンクより元株の B16 が分譲可能 (JCRB0202)。

2) 培地

フェノールレッド濃度が低い DMEM 培地に 10% 牛胎児血清 (FCS) 及び 1% PS を添加したもの。細胞は高濃度のフェノールレッドを含む DMEM を用いると B16 細胞が白化するため、フェノールレッド濃度が低い培地を使用する必要がある。

プロトコール

1. 培地の調製

フェノールレッド濃度の低い DMEM を調製する。以下はダルベッコ変法イーグル培地「ニッスイ」粉末組織培養用炭酸水素ナトリウム不含 (日水製薬株式会社) を用いた調整方法。

- 1) 10g を蒸留水に溶解し、全量を 1000mL とする (培地は黄色)。
- 2) 炭酸水素ナトリウムを 1.2g 加える (培地は濃いピンク色になる)。
- 3) 培地の色が黄色に戻るまで炭酸ガスを吹き込む。
- 4) 滅菌フィルターを用いて濾過滅菌する。

2. 細胞の播種及びサンプル添加

- 1 日目; 5×10^4 /mL の密度の B16 細胞を, 5 mL ずつ 6 cm ディッシュにまきこむ.
培地は 10% FCS 含有 DMEM を用いる. 37°C , 5% CO_2 で 24 時間培養. 1 つの試料につき 3 枚のディッシュを用いる (3 連).
 - 2 日目; 培地を吸引除去し, 新しい培地 (10% FCS-DMEM) に交換し, サンプルを加える. 37°C , 5% CO_2 で 48 時間培養.
(注) DMSO に溶解しているサンプルを使用する場合は, 培養液 5mL あたり 20 μL 程度とする. この場合 DMSO の終濃度は 0.4% であるが, 理想的には 0.1% 程度にした方が細胞毒性の影響が出ない.
 - 4 日目; 培地を吸引除去し, 新しい培地 (10% FCS-DMEM) に交換し, サンプルを加える. 37°C , 5% CO_2 で 24 時間培養.
 - 5 日目; メラニン及びタンパク含量を測定する (3., 4., 5. を参照).
3. メラニン及びタンパク含量測定用細胞のサンプリング
 - 1) 培地を吸引除去する.
 - 2) PBS を 5mL 加える.
 - 3) PBS を吸引除去する.
 - 4) トリプシンを 0.5mL 加える.
 - 5) 細胞がディッシュから剥がれ始めたら, FCS を 0.5mL 加えトリプシンの反応を止める.
 - 6) PBS を 4mL 加える (計 5mL).
 - 7) 5mL の細胞懸濁液のうち, 4mL を 15mL ファルコンチューブに入れる (メラニン測定用). 残りの 1mL は 1.5mL マイクロチューブに入れる (タンパク含量測定用).
 4. メラニン含量の測定
 - 1) 3.7) の 15mL ファルコンチューブを 800 rpm で 5 分遠心する.
 - 2) 上澄みを吸引除去する.
 - 3) 1N NaOH を 1mL 加える.
 - 4) 発信器先端投入型のソニケーターを 2 分かけ, 細胞を十分に破砕する (クリアな溶液になるまでしっかりと破砕する).
 - 5) 1mL 容量のセルに入れ 475nm の吸光度を測定する.
 - 6) 市販メラニン標準試薬の水酸化ナトリウム溶液で作成した検量線からメラニン生成量を計算する.

(注) メラニン生成を強く抑制する陽性対照としてアルブチン, リノール酸 (いずれも 50~100 μM で強い作用を示す) などを用いる³⁾⁴⁾.

5. タンパク含量の測定

ここでは DC プロテインアッセイキットⅡ (BIO-RAD) を使用する場合の例を示す (Lowry 法によるスタンダードアッセイ法)。詳細は付属マニュアル参照²⁾。

- 1) 3.7) の 1.5mL マイクロチューブを 800 rpm, 5 分遠心する。
- 2) 上清を除去する。
- 3) 沈殿を手でタッピングし, 充分にほぐす。
- 4) 200 μ L の PBS を加え, ボルテックスでよく混ぜる。
- 5) 100 μ L の A' 試薬を加え, ボルテックスでよく混ぜる。

(注) A' 試薬は 1mL の A 試薬に対して S 試薬を 20 μ L 混ぜて作成する。4°C で保存し, 1 週間保存可能。検量線の作成には, 濃度の異なるタンパク質スタンダード溶液 (ウシ血清アルブミン; BSA 等) を 3~5 種類使用する。PBS で希釈したタンパク質スタンダード溶液を 200 μ L ずつ作成し 100 μ L の A' 試薬を加える。

- 6) 800 μ L の B 試薬を加え, ボルテックスでよく混ぜる。
- 7) 室温で 15 分以上インキュベートする。
- 8) 750nm の吸光度を測定する (インキュベートしてから 1 時間以内に測定する)。
- 9) タンパク質スタンダードで作成した検量線から, サンプル中のタンパク質含量を求める。
- 10) 4.7) 及び 9) で得られたメラニン及びタンパク含量より, タンパク質 1mg 当たりのメラニン含量を計算する。

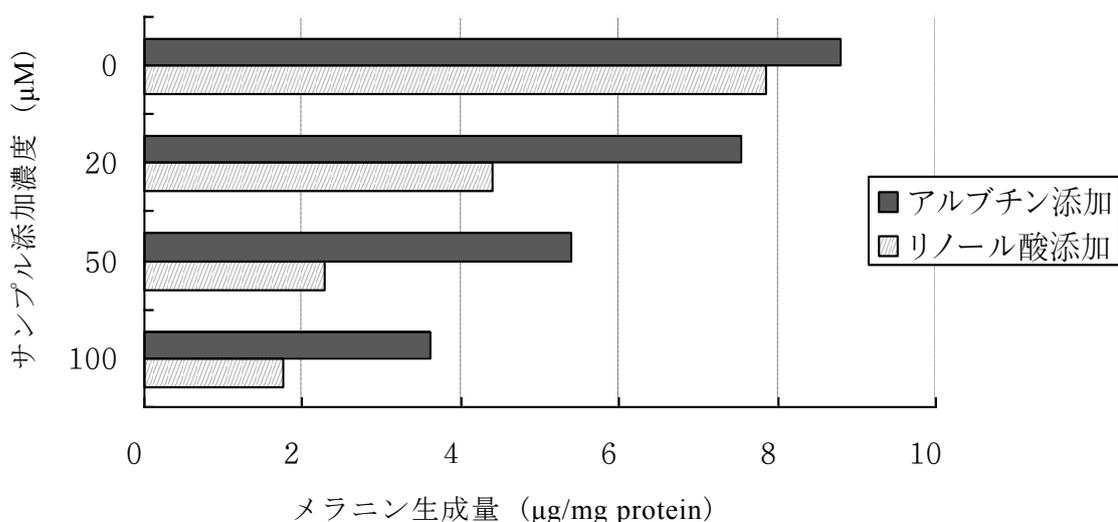


図 1 アルブチン及びリノール酸の B16 細胞のメラニン生成抑制作用

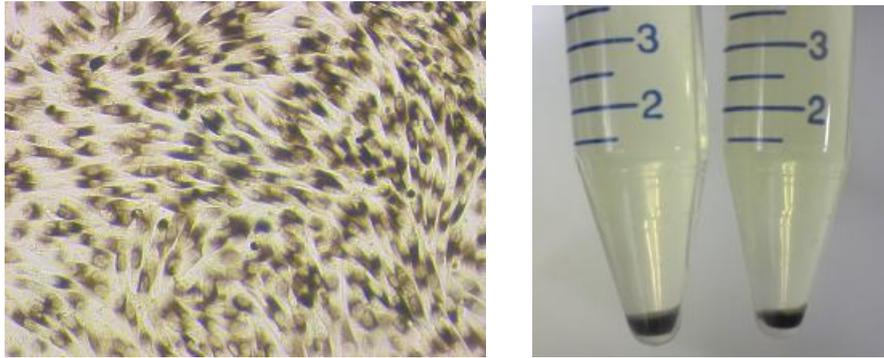


図2 B16 細胞

プロトコールのポイント

- ・継代培養を長く続けると、フェノールレッド濃度の低い DMEM 培地を用いても B16 細胞が白化してくるため、細胞が黒いうちに実験に必要な細胞を十分に増やし凍結保存し、細胞を確保しておく必要がある。
- ・ソニケーターによる細胞の破碎は充分に行うことが大切である。ソニケーションが不十分であるとクリアな溶液にならず白く濁り、データが得られないことがある。
- ・B16 細胞は接着細胞であるため、トリプシン処理して継代するが、コンフルエントまで培養すると死滅して浮遊することがあるので、ディッシュの底面積の半分程度まで増えた状態で継代培養する。
- ・本項では、6cm シャーレ規模の比較的大きな規模の培養を用いたメラニン生成調整物質の検索法を示したが、この他に 24 穴プレート、96 穴プレートを用いて培養する方法、メラニン生成をプレートリーダーで測定する簡便法などもあるので多数の検体を試験する場合には工夫されたい。

おわりに

これまで B16 メラノーマ細胞を用いて多くのメラニン産生抑制作用をもつ物質がスクリーニングされている。アルブチン、コウジ酸、ビタミン C、 α -リポ酸、味噌中の遊離リノール酸等はその例で^{3) 4) 6)}、一部の成分は美白成分として、シミ・そばかすを薄くして色白に導くことを謳った化粧品に含まれている。しかし、味噌汁を飲むことが美白につながるという直接の証拠にはならない⁴⁾。多くの植物抽出物においてもメラニン生成を抑制するという報告があり、甘草の根 (*Glycyrrhiza glabra* L.)、ブドウの種、エラグ酸はその例である。

参考文献

- 1) 新本洋士, マウスメラノーマ B16 細胞を用いたメラニン生成調節物質の探索, 「食品の機能性評価マニュアル集」, 第 1 版, (農林水産省農林水産技術会議事務局, 農林水産省食品総合研究所編), pp.72-73 (1999).
- 2) プロテインアッセイシリーズ 日本語クイックガイド (BIO-RAD), pp.9.
- 3) 間和彦, 新本洋士, 小堀真珠子, 津志田藤二郎, マウスメラノーマ細胞における脂肪酸のメラニン生成調節作用, 食科工, **47**, 793-796 (2000).
- 4) 間和彦, 新本洋士, 小堀真珠子, 津志田藤二郎, 味噌中のメラニン生成抑制物質の同定, 食科工, **45**, 205-209 (1998).
- 5) Iwashita, K., Kobori, M., Shinmoto, H. and Tsushida, T., Eggplant extract inhibits melanogenesis in B16 melanoma cells. *Food Sci Technol Int Tokyo*, **4**, 159-161 (1998).
- 6) Shoji, T., Masumoto, S., Moriguchi, N., Kobori, M., Kanda, T., Shinmoto, H. and Tsushida, T., Procyanidin Trimers to Pentamers Fractionated from Apple Inhibit Melanogenesis in B16 Mouse Melanoma Cells. *J Agric Food Chem*, **53**, 6105-6111 (2005).

Ⅱ 機能性評価実験法

1. 化学反応，酵素反応を用いた機能性評価

1) β カロテン退色法（マイクロプレート法）

(社) 日本食品科学工学会 三上 一保

はじめに

マニュアル集第Ⅱ集には、リノール酸の酸化物が β -カロテンを退色させる作用を利用した津志田らの方法(1994)^{1, 2)}を記載した³⁾。この方法は、セル及び分光光度計を使用する方法であったが、本項では、96穴プレート及びプレートリーダーを用いる方法を紹介する。

準備するもの

1. 実験器具

- ・プレートリーダー（470nm 付近の吸光度が測定できるもの）
- ・恒温浴槽（ウォーターバス，50℃で使用）
- ・ドラフト（窒素ガスでクロロホルムを乾かすため）
- ・褐色メスフラスコ（5mL）
- ・100mL 三角フラスコ
- ・96穴プレート（透明平底，falcon 353072 等）
- ・ピペットマン
- ・チップ
- ・リザーバー

2. 試薬

- ・リノール酸（和光純薬，126-03612，25mL など）
- ・ β -カロテン（和光純薬，035-05531，1g など）
- ・クロロホルム（和光純薬，038-2606，500mL など）
- ・Trolox（Aldrich 社製，238813-1G など）
- ・第1リン酸ナトリウム（ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）（ナカライ，31718-15，500g など）
- ・第2リン酸ナトリウム（ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ）（ナカライ，31723-35，500g など）
- ・80%エタノール
- ・ツイーン 40（和光純薬，164-11535，500g など）

プロトコール

1. サンプル調製（例）

凍結乾燥サンプル 0.1g に 4mL の 80%エタノールを加え、室温にて 16 時間、回転培養器で攪拌する。その後、遠心分離 (3000rpm, 10min) により得られた上清を試料溶液とする。

2. ストック試薬の調製 (セルを用いる方法と同じ^{2,3,4)})
 - 1) リン酸緩衝液 ; 0.2M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.8)
 - ・ 保存 A 液 ; 第 1 リン酸ナトリウム ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MW.156.01) 溶液。
31.2g を水に溶解して 1000mL の溶液を作製。
 - ・ 保存 B 液 ; 第 2 リン酸ナトリウム ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, MW.358.14) 溶液。
71.63g を水に溶解して 1000mL の溶液を作製。
 - ・ 保存 A 液及び B 液を混合し、pH6.8 になるように調製する。
 - 2) 2mM Trolox (80%エタノールに溶解する。)
3. 当日調製する試薬
 - 1) リノール酸溶液 ; 5mL 褐色メスフラスコ使用し、555 μL のリノール酸 (0.9g/mL) をクロロホルムに溶解して 5mL とする。
 - 2) β -カロテン溶液 ; 5mL 褐色メスフラスコ使用し、5mg の β -カロテンをクロロホルムに溶解して 5mL とする。
 - 3) ツイーン 40 溶液 ; 5mL 褐色メスフラスコ使用し、1g のツイーン 40 をクロロホルムに溶解して 5mL とする。
 - 4) Trolox 標準溶液 ; 2mM Trolox ストック溶液を 80%エタノール溶液で希釈し、10~500 μM の間に 4~6 段階の Trolox 標準溶液を作製する。

測定の実際

1. プレートリーダーの起動及び恒温槽の準備
プレートリーダーを起動し 50°C に加温しておく。また、50°C に温めた恒温槽を使用し、22.5mL の蒸留水及び 2.5mL の 0.2M リン酸緩衝液を温めておく。
2. サンプル溶液の希釈
サンプル溶液は Trolox 溶液の検量線範囲に入るように 80%エタノール溶液を用いて希釈する。試験管に 250 μM の Trolox 溶液及びサンプル溶液を x μL 分注した (x = 30, 60, 90, 120, 150) 後、80%エタノールを (300-x) μL 添加する。
3. サンプル溶液の分注
2. で調製した Trolox 及びサンプル溶液は 96 穴プレートに 8 μL ずつ 2 連で分注する (サンプルの入れ方は図 1 参照。). プレートの外周のウェルには 200 μL 程度の蒸留水を満たす。
4. リノール酸- β -カロテンエマルジョンの作製

100mL の三角フラスコに β カロテン溶液，リノール酸溶液，ツイーン 40 をそれぞれ 250μL，100μL，250μL ずつ入れた後，ドラフト内にて窒素ガスを吹きかけ，クロロホルムを完全に乾かす．その後，50℃に温めた 22.5mL の蒸留水及び 2.5mL の 0.2M リン酸緩衝液を加える．

5. リノール酸-β-カロテンエマルジョンの分注

4. をすばやく混ぜて溶解させた後，リザーバーに移し 8 連ピペットマンで Trolox 及びサンプル溶液を入れた 96 穴プレートに 200μL ずつ加える．

6. 吸光度の測定

攪拌後，50℃に加温したプレートリーダーで 5～10 分毎に 470nm の吸光度を測定する．

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		Blank (80EtOH)										
C		T-1	S1-1	S2-1	S3-1	S4-1						
D		T-2	S1-2	S2-2	S3-2	S4-2						
E		T-3	S1-3	S2-3	S3-3	S4-3						
F		T-4	S1-4	S2-4	S3-4	S4-4						
G		T-5	S1-5	S2-5	S3-5	S4-5						
H												

図 1 サンプルの並べ方 (例)

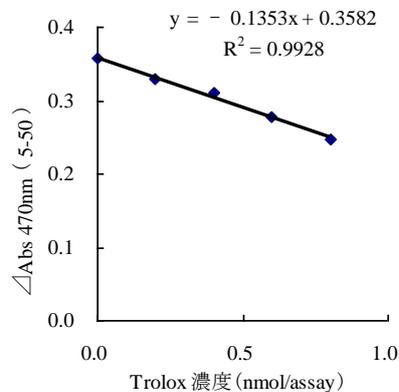


図 2 測定例

横軸に Trolox 添加量 (nmol/assay)，縦軸に 470nm における 5 分後及び 50 分後の吸光度の差 [$\Delta A = (A_5) - (A_{50})$] をプロットした (2 連の平均値を使用.) .

計算方法

Trolox を標準溶液として，β-カロテンの退色速度を被検体と比較することにより，相対的な抗酸化活性を測定する．

1. 横軸に Trolox 添加量 (nmol/assay)，縦軸に 470nm における 5 分後及び 50 分

後の吸光度の差 [$\Delta A = (A_5) - (A_{50})$] をプロットし、Trolox の一次回帰式を計算する。直線性が維持されている範囲で一次回帰式を求める。

$$Y = a_1 \times X + b_1$$

(Y: 470nm における 5 分後及び 50 分後の吸光度の差 [$\Delta A_1 = (A_5) - (A_{50})$],

X: Trolox 添加量)

- 測定サンプルについては、横軸にサンプル溶液の添加量 ($\mu\text{L}/\text{assay}$)、縦軸に 470nm の 5 分後及び 50 分後の吸光度の差 [$\Delta A = (A_5) - (A_{50})$] をプロットする。Trolox 同様直線性が維持されている範囲で一次回帰式を求める。

$$Y = a_2 \times X + b_2$$

(Y: 470nm における 5 分後及び 50 分後の吸光度の差 [$\Delta A_2 = (A_5) - (A_{50})$],

X: 試料添加量)

- 測定サンプル自身が 470nm で吸光度を示す場合は、リノール酸・ β カロテン溶液の代わりに β カロテン溶液を含まないリノール酸溶液 (リノール酸及びツイーン 40 を蒸留水及びリン酸緩衝液で溶解したもの) で同様に吸光度を測定し、測定サンプル自身の吸光度を差し引いて吸光度値の補正を行う。
1. 及び 2. (必要に応じて 3.) で得られた一次回帰式の傾きを用い、 β カロテン退色活性を算出する。

β カロテン退色活性 (nmol-Trolox 相当量/ μL)

= 測定サンプルの傾き ($\Delta A_2 / (\mu\text{L}/\text{assay})$) / Trolox の傾き ($\Delta A_1 / (\text{nmol}/\text{assay})$)

= a_2/a_1

プロトコールのポイント

- β カロテンは出来るだけ新しいものを使用すると共に、保存の際は窒素添加して出来るだけ酸化を抑える。酸化すると吸光度が下がるので注意する。リノール酸・ β カロテン溶液を加えた直後の吸光度が 0.8~1 程度になるように調製する。
- リノール酸・ β カロテン溶液の測定波長は 450~490nm の範囲であれば変更可能である (図 3 参照)。
- ここでは、80%エタノール水溶液に溶解しているサンプルの測定例を記載したが、水、DMSO やアセトンの使用も可能である。なお、80%エタノール水溶液以外の溶媒に溶解したサンプルを測定する場合は、標準物質 (Trolox) を用いて 80%エタノール水溶液と同様の測定結果が得られるか (溶媒組成の影響が有るかどうか) を確認する必要がある。
- 本項では、5 分後及び 50 分後の測定値を用いた評価例を示しているが、インキュベーション時間はブランクの At が約 4 割 (Abs0.7~0.8) 程度低下するまでの

時間を目安とする。

5. 本項では、カイネティクスプログラム及び 50℃の温度制御が出来るプレートリーダーを使用する方法を紹介したが、これらの機能が無いプレートリーダーでも測定することは可能である。その場合、第Ⅱ集のマニュアル³⁾に記載した「セルを用い、恒温槽でサンプルを加熱し分光光度計で測定する方法」と同様に、96 穴プレート自体を 50℃の恒温槽で加熱し、タイマーを使用しながら 5~10 分おきにプレートリーダーで測定する。プレートに付着する浴槽の水は測定の際には素早く拭き取る。

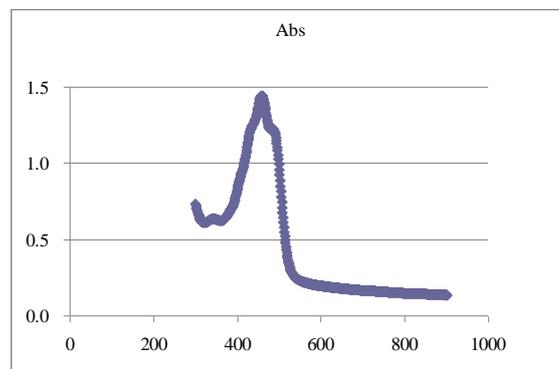


図3 リノール酸・βカロテン溶液の吸収スペクトル

おわりに

メタボリックシンドローム・生活習慣病の予防・改善と関連し、近年、抗酸化性の評価が見直されている。標準物質を用いて抗酸化性を表示することにより、他の抗酸化測定法にて得られた値との比較が可能となると共に、同じ物質であっても測定条件やメカニズムの違う方法を用いることにより異なる抗酸化能が得られることが序々に判明してきていることは興味深い。

参考文献

- 1) 津志田藤二郎, β-カロテン退色法による抗酸化性の測定, 食品総合研究所, 食品機能性マニュアル. <http://www.nfri.affrc.go.jp/yakudachi/manual/index.html> (Nov.28, 2008).
- 2) 津志田藤二郎, 鈴木雅博, 黒木柁吉, 各種野菜の抗酸化性の評価および数種の抗酸化成分の同定, 日食工誌, **41**, 611-618 (1994).
- 3) 三上一保, 津志田藤二郎, βカロテン退色法(リノール酸自動酸化法), 「食品機能性評価マニュアル集第Ⅱ集」, 食品機能性評価支援センター技術普及資料検討委員会編集, (日本食品科学工学会, 茨城), pp.87-92 (2008).

3) ACE (アンジオテンシン変換酵素) 阻害活性 (マイクロプレート法)

(社) 日本食品科学工学会 三上 一保
(独) 農研機構 九州沖縄農業研究センター 吉元 誠

はじめに

生体において、血圧は種々の系で調節され、それらの作用機能から、(1) 利尿剤、(2) 交換神経神経遮断剤、(3) 血管拡張剤、(4) アンジオテンシン I 変換酵素 (angiotensin I-converting enzyme, EC 3.4.15.1, 以降 ACE と略す) 阻害剤、(5) 5-HT₂ 受容体遮断剤などに分類される。このうち食品成分と関係が深いのは (1) の利尿作用と (4) の ACE 阻害作用である¹⁾。ここでは、石黒らの方法²⁾を参考に作成した ACE 阻害機能を指標とした *in vitro* での血圧降下作用物質の検索方法を示す。ACE は、不活性なアンジオテンシン I の C 末端ヒスチジルロイシン (以降 His-Leu と記す) を切断し、血管収縮などの強い血管拡張作用を有するブラジキニンを分解する働きをしている昇圧系酵素である (図 1)。この ACE の働きを阻害することにより高血圧の治療を行うことが可能である。

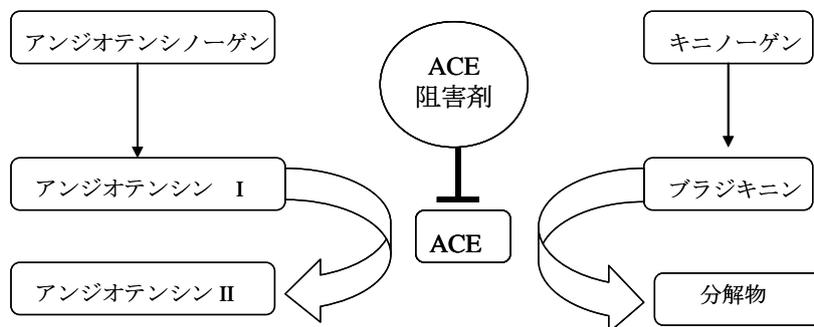


図 1 ACE 阻害薬の作用機序³⁾

人の血管は様々なことが関連して収縮拡張している。1 つとして、アンジオテンシン II が増加すると、血管は収縮し血圧は上昇する。アンジオテンシン II は上図の様にしてつくられるが、この過程には ACE が重要な役割を果たしている。またこの酵素は血圧を下げる作用のあるブラジキニンを分解する作用も発揮する。従って、ACE の作用を抑えれば、アンジオテンシン II が出来なくなり、また、ブラジキニンも分解されなくなる為、血圧は下がる方向に向かう。このような作用を持つ薬を ACE 阻害薬と呼んでいる。本項では、その 1 つであり蛇毒由来のキナーゼ II 阻害ペプチドをもとにして設計されたカプトプリルを用いた実験例も紹介する。

原 理

基質 (Hippuryl-L-histidyl-L-Leucine ; Hip-His-Leu) に ACE を添加すると酵素反応の結果、基質は馬尿酸と His-Leu とに加水分解される。His-Leu はアルカリ条件下で *O*-フタルアルデヒドにより蛍光付与されるので、蛍光強度により ACE 活性が測定できる。試料を添加して蛍光強度を測定することにより、試料による ACE 阻害活性を測定することができる。

準備するもの

1. 機器及び器具

- ・ 96 穴プレート対応蛍光プレートリーダー (Ex.360nm,Em.480nm 付近のフィルターが装着されているもの)
- ・ 遠心分離機
- ・ 天秤 (最小表示値が 1mg 以下のもの)
- ・ プレートミキサー
- ・ 回転式攪拌機もしくは超音波洗浄機 (サンプル抽出及び基質溶解用)
- ・ ボルテックス
- ・ pH メーター
- ・ 恒温槽 (37°C に設定)
- ・ マルチチャンネルピペット (8 連)
- ・ ピペットマン
- ・ タイマー
- ・ 50mL, 15mL コニカルチューブ
- ・ イエローチップ, ブルーチップ
- ・ 1.5mL マイクロチューブ
- ・ 96 ウェル黒色平底プレート (Corning 3925 等)
- ・ 蓋付き試験管 (ねじ口試験管)
- ・ リザーバー
- ・ プレートシール
- ・ アルミホイル

2. 試薬

- ・ HEPES
- ・ NaCl
- ・ アンジオテンシン変換酵素基質 ; Hippuryl-L-histidyl-L-Leucine (Hip-His-Leu, Wako 536-50441 等)
- ・ アンジオテンシン変換酵素 ; Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) (SIGMA

A6778-0.25UN,A6778-1UN 等)

- ・ NaOH
- ・ *O*-フタルアルデヒド (Wako 167-09263 等)
- ・ リン酸 (Wako 160-08636 等)
- ・ カプトプリル(Wako 039-16801 等)アンジオテンシン変換酵素阻害薬の 1 つ。
ACE を抑制することにより血圧を低下させる。
- ・ メタノール

プロトコール

1. 試薬の調製

1) 保存溶液

- ・ HEPES バッファー (0.1M HEPES,0.3M NaCl,pH 8.3). 冷蔵保存.
- ・ 酵素反応停止液 ; 1 N NaOH
- ・ 3.6M リン酸溶液 ; 35.28g/100mL. 常温保存.

2) 当日調製溶液

- (1) アンジオテンシン I 変換酵素基質溶液 ; 25mM Hip-His-Leu (HHL) 溶液
32.4mg HHL に 3mL の HEPES バッファー (pH 8.3) を加え, 超音波洗浄機
を使用して完全に溶解させる.
- (2) 10mU/mL ACE 溶液
0.25unit の酵素を使用する場合, ACE に 2.5mL の超純水を加え, これを 10
倍 ACE 酵素溶液として 4℃で保存する. 実験当日は 600μL の 10 倍 ACE 酵
素溶液に 5400μL の超純水を加え, ACE 酵素溶液として使用する.
- (3) 0.2% *O*-フタルアルデヒド溶液 (蛍光試薬)
8mg の *O*-フタルアルデヒドを 4mL のメタノールに溶解する. 使用直前に調
製し, 使用するまではアルミホイルなどで遮光しておく.

2. 操作の実際

1) 試料溶液の調製 (例) (試料により抽出法は考慮する.)

水抽出

- (1) 蓋付きねじ口試験管に凍結乾燥試料 0.1g をはかりとる.
- (2) 超純水 4mL を加え, 混和する.
- (3) 室温で 1 時間振とうする.
- (4) 3500rpm, 10 分間遠心する.
- (5) 上清をマイクロチューブに分注し, ACE 阻害活性測定試料とする.

熱水抽出

- (1) 蓋付きねじ口試験管に凍結乾燥試料 0.1g をはかりとる.

- (2) 100℃に加熱した超純水 4mL を加える。
- (3) 10 分間, 100℃で温める。
- (4) 冷却後, 十分にホモジナイズする。
- (5) 3000rpm, 10 分間遠心する。
- (6) 上清をマイクロチューブに分注し, ACE 阻害活性測定試料とする。

2) 酵素反応

- (1) 図 1 を参考に黒色マイクロプレートの各ウェルに適度に希釈した試料 50 μ L を入れる。希釈は超純水 (もしくは HEPES バッファー) で行い, Blank には超純水 (もしくは HEPES バッファー) を入れる。
- (2) 10mU/mL の ACE 溶液 100 μ L を添加する。
注; プレートの半分には, ACE 溶液の代わりに同量の超純水を入れ, 試料ブランクとする。
- (3) プレートミキサーで混ぜ, プレートシールを貼る。
- (4) 37℃にて 10 分間プレインキュベートする。
- (5) ACE 基質溶液 (25mM Hip-His-Leu) を 25 μ L ずつ添加する。
- (6) プレートミキサーで混ぜ, プレートシールを貼る。
- (7) 37℃にて 40 分間インキュベートし反応させる。
- (8) 1N NaOH 溶液を 50 μ L ずつ加え反応を停止させる。
- (9) プレートミキサーで混ぜる。
- (10) 0.2% *O*-フタルアルデヒド溶液を 10 μ L 添加する。
- (11) プレートミキサーで混ぜ, プレートシールを貼る。
- (12) 室温にて 15 分反応させる (アルミホイルで遮光する)。
- (13) 3.6M リン酸を 15 μ L 添加する。
- (14) プレートミキサーで混ぜる。
- (15) 360nm 励起波長, 460nm 蛍光波長で蛍光強度を測定する。

データのとりまとめ

1. ACE の阻害活性 (%) は下記の計算式により算出する。

$$\text{阻害活性 (\%)} = [1 - (S - S_B) / (C - C_B)] \times 100$$

試料液の蛍光強度を S , 試料液の代わりに超純水を使用した場合の蛍光強度を C とする。また, S 及び C に対し, 酵素液の代わりに超純水を添加した場合の蛍光強度を S_B 及び C_B とする。

2. 試料添加量・試料濃度を横軸, 阻害活性を縦軸としたプロットにおいて, 直線的に阻害活性が減少する範囲で, ACE 活性減少率が 50%を示すときの反応液中の試料添加量・試料濃度を IC_{50} 値とする。なお, 1 サンプルについて 2

反復で測定し、これを何回か繰り返し平均値を算出する。

A	Blank	Sample1 5倍希釈	Sample2 5倍希釈	Sample3 5倍希釈	Sample4 5倍希釈	Sample5 5倍希釈	Sample5 5倍希釈	Sample4 5倍希釈	Sample3 5倍希釈	Sample2 5倍希釈	Sample1 5倍希釈	Blank	酵素添加
B	カプトプリル 1ng/mL	Sample1 10倍希釈	Sample2 10倍希釈	Sample3 10倍希釈	Sample4 10倍希釈	Sample5 10倍希釈	Sample5 10倍希釈	Sample4 10倍希釈	Sample3 10倍希釈	Sample2 10倍希釈	Sample1 10倍希釈	カプトプリル 1ng/mL	
C	カプトプリル 5ng/mL	Sample1 20倍希釈	Sample2 20倍希釈	Sample3 20倍希釈	Sample4 20倍希釈	Sample5 20倍希釈	Sample5 20倍希釈	Sample4 20倍希釈	Sample3 20倍希釈	Sample2 20倍希釈	Sample1 20倍希釈	カプトプリル 5ng/mL	
D	カプトプリル 10ng/mL	Sample1 40倍希釈	Sample2 40倍希釈	Sample3 40倍希釈	Sample4 40倍希釈	Sample5 40倍希釈	Sample5 40倍希釈	Sample4 40倍希釈	Sample3 40倍希釈	Sample2 40倍希釈	Sample1 40倍希釈	カプトプリル 10ng/mL	
E	Blank	Sample1 5倍希釈	Sample2 5倍希釈	Sample3 5倍希釈	Sample4 5倍希釈	Sample5 5倍希釈	Sample5 5倍希釈	Sample4 5倍希釈	Sample3 5倍希釈	Sample2 5倍希釈	Sample1 5倍希釈	Blank	酵素 無添加
F	カプトプリル 1ng/mL	Sample1 10倍希釈	Sample2 10倍希釈	Sample3 10倍希釈	Sample4 10倍希釈	Sample5 10倍希釈	Sample5 10倍希釈	Sample4 10倍希釈	Sample3 10倍希釈	Sample2 10倍希釈	Sample1 10倍希釈	カプトプリル 1ng/mL	
G	カプトプリル 5ng/mL	Sample1 20倍希釈	Sample2 20倍希釈	Sample3 20倍希釈	Sample4 20倍希釈	Sample5 20倍希釈	Sample5 20倍希釈	Sample4 20倍希釈	Sample3 20倍希釈	Sample2 20倍希釈	Sample1 20倍希釈	カプトプリル 5ng/mL	
H	カプトプリル 10ng/mL	Sample1 40倍希釈	Sample2 40倍希釈	Sample3 40倍希釈	Sample4 40倍希釈	Sample5 40倍希釈	Sample5 40倍希釈	Sample4 40倍希釈	Sample3 40倍希釈	Sample2 40倍希釈	Sample1 40倍希釈	カプトプリル 10ng/mL	

図 1 96well プレーットの試料配置例

プレートの半分 (A, B, C, D) には酵素を添加し、残り (E, F, G, H) には酵素を添加する代わりに水を入れ試料blankとする。

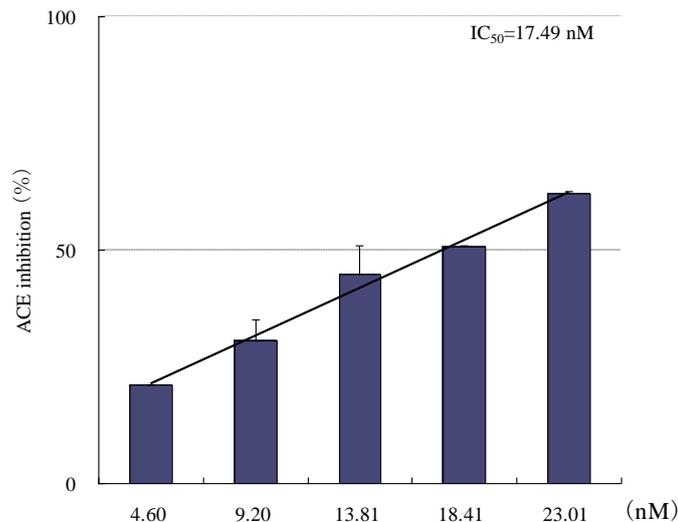


図 2 実験例 ; カプトプリルの ACE 阻害活性

試料 (カプトプリル) 濃度を変えて ACE 阻害率を求め、阻害率と試料濃度のプロット上 50% 阻害に対応する試料 (カプトプリル) 量を読み取ることで IC_{50} が得られる。

おわりに

Hip-His-Leu (Hip は馬尿酸残基), Hip-Gly-Gly, Hip-Ala-Pro など ACE の合成基質を用いる ACE 阻害活性測定法では、従来、遊離した馬尿酸を測定することが多かった⁴⁾。しかし、酵素反応停止後、酢酸エチルを用いて遊離した馬尿酸を抽出

する際、デシケーターやヒートブロックを用いた酢酸エチルの除去が煩雑であることや、酢酸エチルの除去が不完全であると酢酸エチルの影響で吸光度が高くなる等、馬尿酸の抽出効率の問題から測定値の再現性に問題があった⁴⁾。また、紫外域の吸光度測定による分光法では、混雑物からの吸収が高いときには測定しにくい欠点があった。

本法では蛍光プレートリーダーを用い蛍光付与された His-Leu を測定するため、以上の様な心配がない。何より従来法では試験管を使用していたのに対し、本法では 96 穴マイクロプレートを用いて評価するため、試料や試薬が少なくすむと共に、多数のサンプルを効率良くかつ簡便に評価することが可能である。

参考文献

- 1) 河村幸雄, 「アンジオテンシン変換酵素阻害」, 「3-3-5 循環系機能調節①血圧降下機能, 食品機能研究法」, 篠原和毅, 鈴木建夫, 上野川修一編, (光琳, 東京), pp.109-112 (2000).
- 2) 石黒浩二, 吉元誠, 諤田仁人, 高垣欣矢, サツマイモ茎葉の血圧降下作用, 食科工, 54, 45-49 (2007).
- 3) 中原保裕, 中原さとみ, 「高血圧の治療薬」, 「薬理学」, (秀和システム, 東京), pp.96-104 (2007).
- 4) 丸山進, 「アンジオテンシン変換酵素阻害物質」, 「食品中の生体調節物質研究法 (生物化学実験法 38)」, 川岸舜朗編, (学会出版センター, 東京), pp.116-129 (1997).