

4. 実験動物による機能性評価

1) 抗原抗体反応による血管透過性亢進作用の評価

(独) 国際農林水産業研究センター 八巻 幸二

はじめに

アレルギー性疾患における、その抗原として、食物性あるいはハウスダスト、花粉、ペット、ダニなど様々なものがあり、皮膚においては、抗原抗体複合体による血管透過性亢進により、皮膚炎症を起こし、慢性化に移行することによって、アトピー性皮膚炎等を生じる。抗原抗体反応が気道粘膜で惹起されれば、喘息、鼻腔内で起これば、アレルギー性鼻炎と呼ばれる。これらは原則として、抗原感作よって生体に特異抗体が産生され、再感作されることによって炎症反応が惹起される。その箇所が皮膚であれば、その炎症反応はアレルギー性皮膚炎のモデルとしてもっとも近い物と考えることができる。さらに長期に持続する様な症状であれば、アトピー性皮膚炎のモデルとして考えることも可能である。ここで齧歯類としてラットは比較的抗体産生能が高く、容易に抗体を作ることができることと、皮膚炎症の作成が比較的簡単であることより、皮膚アレルギーのモデルとしても汎用されている。

1. ラット (マウス) の免疫

準備するもの

【動物】

ラット (SD, Wistar など, 200g 前後, 5 週齢, 雄), マウス (Balb/c, ICR など, 25-30g, 6-7 週齢, 雄)

【器具】

注射針 (25-26G), 注射筒 (1ml ツベルクリン), メスの刃, 動物用バリカン

【抗原】

アルブミンなど (卵白, 異種動物, 抗原蛋白など)

【アジュバント】

Freund Complete Adjuvant (FCA), Freund incomplete Adjuvant (FIA), ALUM
(水酸化アルミニウムゲル) など

実際の操作

1) 免疫方法

(1) 抗原アルブミン (2mg/ml PBS) とアジュバント (FCA) と 1 : 1 で混合しエマルジョンを作る。

(2) ラットの背中の中毛を動物用バリカンで刈り、このエマルジョンを5カ所に皮内注射 (0.1 ml, 26G 針, 1ml ツベルクリン注射筒) をする。背中の中毛は後に皮内反応に用いるため、なるべく縁の方を用いる。マウスでも同様であるが、皮内は投与量 0.05 ml が限界であるため、腹腔で免疫する場合が多い。

(3) 7日後、同じエマルジョンを尾根部に1カ所皮内注射をする (追加免疫 day 7)。

2) 採血 (2~3日間隔)

ラットの尻尾にメスの刃 (No.10 程度) で傷を付け (上部の動脈側), マイクロピペッター等で吸い取る。適切なチューブに移し、遠心後上清 (血清) を採取。

2. 抗体価測定 (ELISA)

準備するもの

抗原, 1 次抗体 (血清サンプル), 2 次抗体 (抗ラットIgG 抗体-ペルオキシダーゼ, 測定したいサブクラスのものを用意する), ELISAプレート, PBS (-), Blocking solution (5% BSA, 0.1% NaN₃ in PBS), 30% 過酸化水素水 (キット), ABTS (基質, キット), 2% シュウ酸 (停止液)。

操作の実際

- 1) 抗原を 0.1 M NaHCO₃, 0.5 M NaCl (pH=8.3) のBufferに溶かし 50 µg/ml の濃度に調整する。ELISA用の96穴プレートに 5 µg (100µl) ずつ加え、4°Cで3 時間静置する。
- 2) PBSで2-3 回洗浄した後、blocking solutionを200 µl/well 加え、室温で2 時間静置する。
- 3) PBSで 2-3 回洗浄した後、血清試料の希釈系列 (1% BSA-PBSで2 倍希釈系列を作っておく) を100µl/well 加え、室温で1 時間静置する。
- 4) PBSで 2-3 回洗浄した後、2 次抗体 (1:2000) を50 µl/well 加え、室温で1時間放置する。
- 5) PBSで2-3回洗浄した後、ABTSを使用直前に溶かし、9:1の割合で 30% H₂O₂を加え、混合し、これをすばやく100 µl/well 加え、20分静置する。
- 6) 停止液 (2% シュウ酸) を100 µl 加えて反応を止め、415 nmの吸光度を測定する。

注意 試料や抗体の希釈率は一例であり、最適の希釈率はその都度求める必要がある。抗体には添付文書に希釈倍率が書いてあるものが多い。

抗体価計算

横軸に希釈率を対数で、縦軸に吸光度をプロットし、最大吸光度の半分になる希釈度を、その個体の抗体価とする。(参考文献1)

3. 皮膚反応

準備するもの

【実験器具】 注射針, 注射筒, メスの刃, 分光光度計, 実験動物用バリカン, 解剖用具など

【試薬】 麻酔用エーテル, ヒスタミン, 色素 (Direct blueあるいはEvans blue), 水酸化カリウム, リン酸, アセトン, Tyrode氏液

操作の実際 (参考文献 2)

追加免疫後約1週間で抗体価が上昇するので, この頃のラットを使用する. マウスでも同様に行えるが, 体が小さいため, 少し熟練が必要である.

- 1) エーテル麻酔下で, ラットの背部の毛をバリカンで刈る.
- 2) 約1 時間おいた後, エーテル麻酔下で5-6カ所に皮内に注射する. 抗原は一カ所あたり 0.1 ml 注射する. 上記のヒスタミンによる血管透過性亢進反応の操作の実際の項参照. 抗原濃度は0.1, 1.0, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で用量依存性を確認できる. 試験物質は抗原と混ぜて投与するか (直接作用), 腹腔内あるいは経口投与 (間接, すなわち全身作用) する.
- 3) 血管透過性の亢進を調べるため, そのトレーサーとして, 牛血清アルブミンをあらかじめ蛍光標識したタンパクを用いる. 透過性を調べたい時間の30分前に, このトレーサーを100 mg/kg 静脈内投与 (1.0 ml / kg, 100 mg/ml 生理食塩水) する. 組織に漏れ出たこの蛍光量を測定すれば血管透過性の指標となる.
- 4) 一定時間 (急性反応では, ~1時間, 遅延型では24 - 72時間) 後脱血死させ, 血液を一部採取したのち, 注射部位を切り取る.
- 5) 切り取った皮膚片を24穴のプレートに入れ, ホルムアミドを1 ml 加え, 50°C, 2-6時間加熱し, 皮膚片の光の透過度を高めて, 蛍光プレートリーダーで測定する.
- 6) 採取した血液は, 1700 x g, 20°C, 20分遠心し, 血清を採取し同様のプレートの一部のウェルにこの10倍希釈液 (1 ml) を加えて蛍光を測定する.

計算方法

局所の血管透過性の指標としては, 血清に含まれる蛍光量 (Se_{FL}) を測定する. 注射した皮膚から求められた蛍光量 (Sk_{FL}) を測定する. 注射部位に漏出した血清相当量を求め注射して採血までの30分間での皮膚に漏れ出た血清量を求め, この浸出液量を滲出速度 (EX_{rate}) として表わす.

$$\text{計算式} \quad \text{EX}_{\text{rate}} (\mu\text{l serum Eq} / 30 \text{ min}) = \text{Sk}_{\text{FL}} (\text{fluo}) / \text{Se}_{\text{FL}} (\text{fluo}/\mu\text{l serum})$$

具体実験例

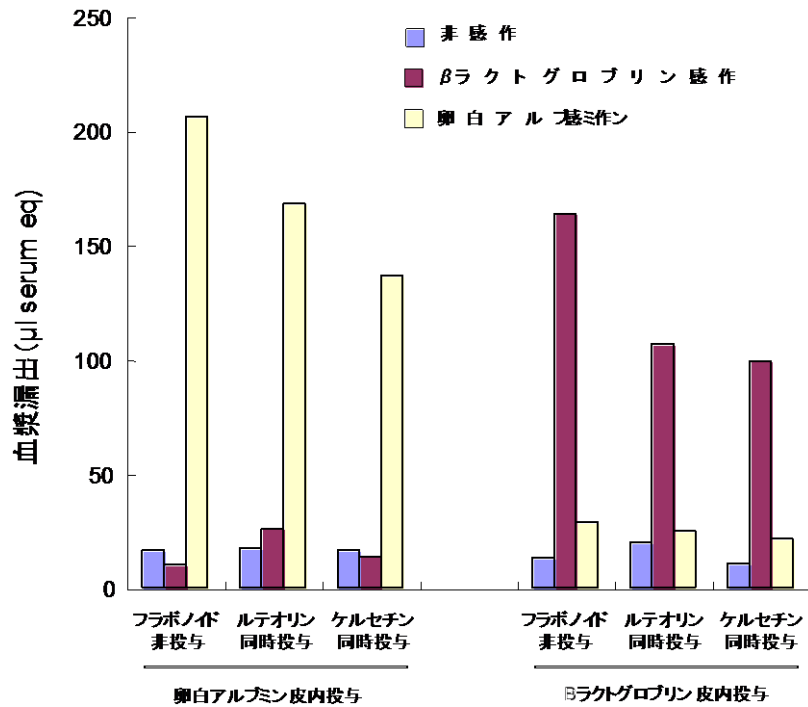


図 1 皮膚反応結果

ICRマウスをそれぞれの抗原（卵白アルブミン、 β ラクトグロブリン）で感作し、2週間後、背部皮内に抗原（50 $\mu\text{g/ml}$ ）を投与し、皮膚反応を起こした。同時にフラボノイドとしてルテオリンとケルセチン（final 10 μM ）を混合し、抑制作用を検討した。その結果、抗原のクロス反応は明らかに起こらず、ルテオリンと比較すればケルセチンがより強く抑制した。

参考文献

- 1) Yamaki, K., Nakagawa, H. and Tsurufuji, S., Inhibitory effects of anti-inflammatory drugs on type II collagen-induced arthritis in rats. *Ann. Rheum. Dis.*, **46**, 543-548 (1987).
- 2) Yamaki, K., Takano-Ishikawa, Y., Goto, M., Kobori, M. and Tsushida T., An improved method for measuring vascular permeability in rat and mouse skin. *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, **48**, 81-86 (2002).

2) α -グルコシダーゼ阻害活性の簡易測定法

(独) 国際農林水産業研究センター 八巻 幸二

はじめに

α -グルコシダーゼは消化管の上皮細胞上で二糖類の α 結合を分解し、単糖となったグルコースを吸収し、血管の中へグルコースを運ぶ過程で作用している酵素である。そのため、生活習慣病の一つである糖尿病の予備軍あるいは軽度の糖尿病の患者で、食後の血糖値の上昇を抑制する目的でこの酵素の阻害薬が治療薬として用いられている。食品の中にもこの酵素の抑制活性を有するものが存在し、民間療法としても行われているものもある。食物の中でこの活性を有するものは、それ自身が血糖値の上昇を抑制する可能性があることより、機能性食品として期待できる。特にこの種の抑制物質は腸管内で作用するため、それ自身の吸収過程を必要としない。そのためその機能性を発揮するハードルは一段階低いと考えられる。

この酵素活性の測定は、一般的に汎用されている合成基質を用いた呈色反応があるが、食品の場合、しばしばその食物自身に色がついている場合があり、活性が低く濃縮して調べるときには妨害する可能性がある。そこで、着色試料にも応用可能で、多検体測定が可能で簡便に測定できる方法を考案した。

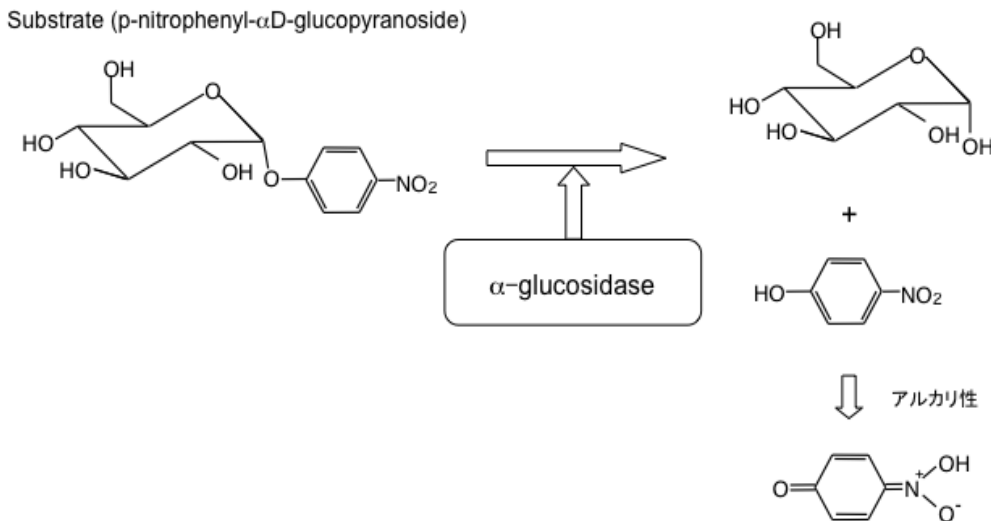


図 1 α -グルコシダーゼの測定原理

準備するもの

1. 基質 p-nitro-phenyl- α -D-glucopyranoside (Sigma Chemical Co.)

基質液作成：3mM (0.9mg/ml)となるように基質をリン酸緩衝液で調整する。

2. 酵素 ラット小腸アセトン粉末 (Sigma Chemical Co.)

酵素液作成：酵素原末をリン酸緩衝液で溶解し、25mg/ml とする。原末はアセトン粉末であるので、不溶物が多い。そのため 5000rpm 程度で遠心した後、上清を採取し、0.45µm のフィルターで濾過し、この液を酵素液とする。

- 3. 緩衝液 0.05M リン酸緩衝液, pH6.7
- 4. 停止液 0.67M 炭酸ナトリウム液
- 5. 96 穴マイクロプレート

プロトコール

(プレートに入れる量は一例であり、濃度等を考慮すれば適宜変更可能)

1. 試料作成

個体試料は粉末化し、適宜の濃度になるようにリン酸緩衝液で抽出する。この場合試料によっては、10% (w/v) 程度で予備試験を行っても良い。液体試料はそのままを原液として用いることも可能である。この原液を 8 段階の 2 倍希釈液を作成する。水に溶けにくい試料では、DMSO 等を最終濃度 20%程度になるように用いても良い。高い濃度のウェルは、計算時には十分に考慮する。

2. 操作の実際

- 1) リン酸緩衝液を各ウェルに 120µl 分注する。
- 2) 試験試料 20µl を試料ウェルと酵素なし試料ウェルに分注する。陽性対照と陰性対照には代わりにリン酸緩衝液を同量分注する。
- 3) 陰性対照と酵素なし試料ウェルには 50µl の緩衝液を加える。陽性対照と試料ウェルに酵素液を 50µl 添加する。
- 4) 基質液を 50µl 添加し、37°Cで 40 分インキュベーションを行う。(インキュベーション時間は一例であり、30-60 分で適切な時間を決めるとよい)
- 5) 反応終了後、炭酸ナトリウム液を 50µl 添加し反応を停止させる。
- 6) 405nm の吸光度をマイクロプレートリーダーで測定する。

| <> | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----|------|-----------|----------------|-----------|----------------|---|---|---|---|----|----|----|
| A | 陽性対照 | S-1(x128) | S-1(x128, 無酵素) | S-2(x128) | S-2(x128, 無酵素) | | | | | | | |
| B | 陰性対照 | S-1(x64) | S-1(x64, 無酵素) | S-2(x64) | S-2(x64, 無酵素) | | | | | | | |
| C | 陰性対照 | S-1(x32) | S-1(x32, 無酵素) | S-2(x32) | S-2(x32, 無酵素) | | | | | | | |
| D | 陰性対照 | S-1(x16) | S-1(x16, 無酵素) | S-2(x16) | S-2(x16, 無酵素) | | | | | | | |
| E | 陰性対照 | S-1(x8) | S-1(x8, 無酵素) | S-2(x8) | S-2(x8, 無酵素) | | | | | | | |
| F | 陰性対照 | S-1(x4) | S-1(x4, 無酵素) | S-2(x4) | S-2(x4, 無酵素) | | | | | | | |
| G | 陰性対照 | S-1(x2) | S-1(x2, 無酵素) | S-2(x2) | S-2(x2, 無酵素) | | | | | | | |
| H | 陰性対照 | S-1(原液) | S-1(原液, 無酵素) | S-2(原液) | S-2(原液, 無酵素) | | | | | | | |

図 2 プレート配置の一例

試料を 2 種行った場合の例である。1 プレートで 5 種可能である。

| | 陽性対照 | 陰性対照 | 試料 | 試料(無酵素) |
|------------------------------|------|------|-----|---------|
| リン酸緩衝液 | 120 | 120 | 120 | 120 |
| 試料に用いた緩衝液 | 20 | 20 | | |
| 試料液 | | | 20 | 20 |
| リン酸緩衝液 | | 50 | | 50 |
| 酵素液 | 50 | | 50 | |
| 基質 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| 37°C, 40 分 Incubation | | | | |
| 停止液 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| 吸光度測定(405nm) | | | | |

(単位μL)

図 3 プロトコール手順

これは模式化したものであり、適宜に変更可能。

計算方法

1. 希釈度を横軸に吸光度を縦軸に取り，試料と酵素なし試料とそれらの差のグラフを作成する。
2. 3 点から 5 点の，直線性の高いところを選択する。
3. 吸光度の差の傾きを求め，この傾きを抑制活性の指標とする。

計算のポイント

エクセル等のグラフソフトで，客観性を高めるため相関係数がより 1 に近くなる点群を用いる。点群は 4 点以上が良いが，3 点でも可能な場合もある。この方法では試料に含まれる色の影響を除くことができるが，極端に着色しているときには注意が必要である。

図 4 に桑葉の抽出液とコーヒーを試料にした例を示した。これらは典型的な例であり，どちらも着色した試料である。抑制活性を有する桑葉に対し，ほとんど活性が認められないコーヒーである。桑には強力な抑制物質であるデオキシノジリマイシンが含まれていることが明らかになっている。

この例では桑葉抽出試料は傾き 17.3，コーヒーは，0.18 となり，両者に大きな差が認められる。活性として，原液の濃度にもよるが，傾きが 1 以上であれば，活性があると判断でき，さらに IC₅₀ 値などの客観性のある正確な測定法に切り替えて測定することが望ましい。

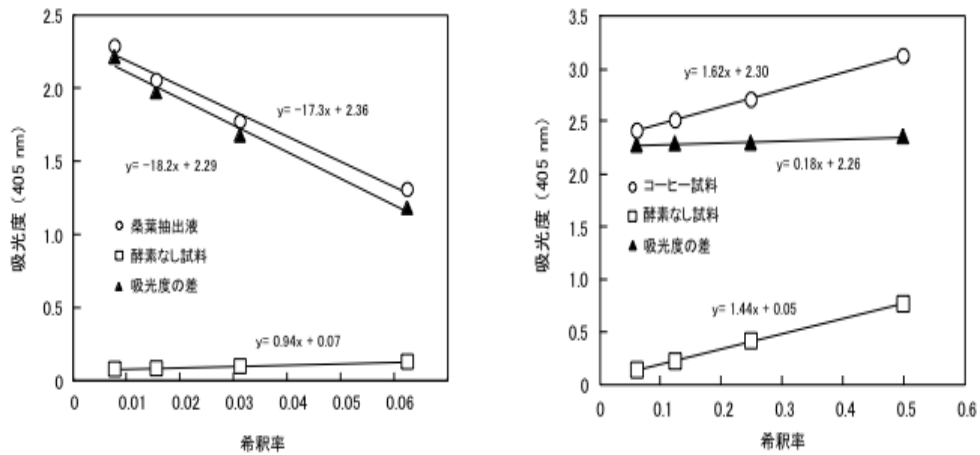


図 4 希釈吸光度直線の一例

桑葉抽出液とコーヒーを試料にして、希釈 - 吸光度曲線を示した。

おわりに

α -グルコシダーゼの活性は、試料中にショ糖など、基質となるものが食品には含まれている可能性が多いため、この影響が懸念される試料ではあらかじめショ糖含量を別の方法で測定しておくことが望ましい。

参考文献

- 1) 八巻幸二, 森隆, 簡便な α グルコシダーゼ抑制活性測定法: 抑制曲線の傾きを用いる方法, 食科工, **53**, 229-231 (2006).

4) アセチルコリンエステラーゼ阻害活性の評価

(独) 国際農林水産業研究センター 八巻 幸二

はじめに

アセチルコリンエステラーゼは、脳神経系でのニューロンのシナプス（結合部位）末端の神経伝達物質であるアセチルコリンを分解し、その神経伝達を持続させない重要な機能を有する重要な酵素である。この酵素は、正常に働いていれば、正常な神経シグナルの伝達をもたらすが、ある疾患では何らかの影響でシナプスからのシグナルが低下すると、アセチルコリンが減少して、十分な神経活動が損なわれる。この一つがアルツハイマー型認知症である。認知症は高齢社会において、非常に重要な疾患であるが、未だに有効な治療法が確立されていない。しかし、有効とされている薬剤の一つにこの酵素の阻害薬がある。薬剤に用いられたこの酵素の阻害薬は、幾つかの優れた特徴があり、単なる阻害薬ではない。吸収、分布、比活性、代謝等の検討を重ねて医薬品として有効とされた。そのため、天然の物質から求められたものではないが、この活性を指標に現在も探索が続けられている。

この酵素活性の測定は、一般的に汎用されている合成基質を用いた呈色反応であるが、食品の場合、しばしばその食物自身に色がついている場合があり、活性が低く濃縮して調べるときには妨害する可能性がある。

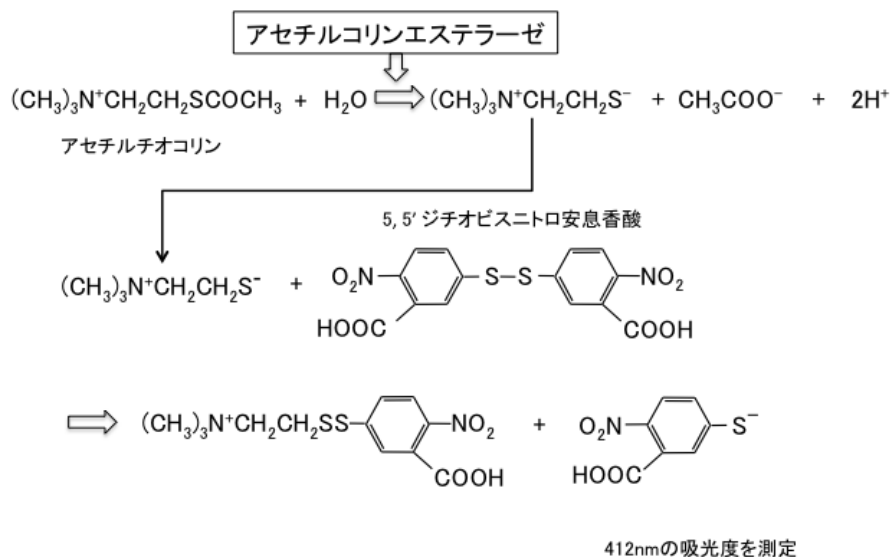


図 1 アセチルコリンエステラーゼの測定原理 (Ellman 法)

測定原理はアセチルコリンと生物学的に変わらないアセチルチオコリンを用いて行う。この酵素はアセチル基を遊離させコリンのチオ体を形成し、これに発色団として 5,5'-ジチオビスニトロ安息香酸を添加する。これと置換反応で 412nm の発色を有する物質を生成し、この吸光度を測定する。発色による方法を最初に報告した Ellman の文献¹⁾の後、アセチルチオコリンとアセチルコリンエステラーゼに基質による差がないこと、さらに発色する物質自身に抑制作用がないこと等の報告^{2,3)}があつて、この方法は確立されている。アセチルコリンの酵素反応は迅速であるため、反応停止を行って吸光度を測定する方法では、測定が難しい。そこで経時的に吸光度を測定できる酵素反応測定モードを持つプレートリーダーが必要となる。

準備するもの

1. 試薬

補酵素(5,5'-Dithiobis 2-nitro-benzoic acid (DTNB, Sigma Chemical Co.))

基質(acetylthiocholine iodide (Sigma Chemical Co.))

酵素(acetylcholine esterase (human recombinant, Sigma Chemical Co.))

緩衝液(phosphate buffer (0.1 M, pH=8.0))

2. 機器および器具

・マイクロプレートリーダー

経時的に吸光度の測定が可能なもの(酵素反応測定モードあり)

・96 穴マイクロプレート

プロトコール

(プレートに入れる量は一例であり、濃度等を考慮すれば適宜変更可能)

1. 試料作成

野菜の試料等は 80%エタノールで抽出して濾過後、試料原液とする。抽出比率は試料にもよるが、はじめは 1g : 10ml ぐらいを目安に、活性がないようであればさらに濃くして試料を作成する。この濃度で活性物質 0.1%含有であれば 0.1 mg/ml の濃度となる。この場合プレートに添加するためにバッファーで 8 倍希釈して試料のエタノール濃度を 10%にする。(酵素反応のためにはこの濃度以上は良くない)

2. 操作の実際

1) リン酸バッファーを 150 μ l 各ウェルに入れる。

2) 酵素液を陽性コントロールとサンプル(陰性コントロール以外)のウェルに 20 μ l 入れる。陰性コントロールにはバッファーを 20 μ l 入れる。

3) DTNB を 50 μ l 各ウェルに入れる。

- 4) 試料を 30 μ l 試料用ウェルに入れる。陽性と陰性コントロールには試料と同じバッファーを入れる。
- 5) 37 $^{\circ}$ C, 5 分間プレインキュベーションする。
- 6) 基質を 50 μ l 各ウェルに入れる。
- 7) このプレートを速やかにプレートリーダーに設置し, 測定波長 412nm, 酵素解析モードで 15 秒ごとに 10 回測定する。

プロトコールのポイント

1. 酵素反応は速やかであるため, 基質を添加してから, 素早く行う。他の添加操作は問題ないが, 基質を添加する場合, プレートリーダーのそばで行うのが良い。
2. 図 2 はある機種の結果の表示であるが, このようにウェルごとに吸光度の変化を示す表示では, 活性がわかりやすい。この機器では, この表示の他に, 傾きと切片と相関性を数値で打ち出している。
3. 酵素活性が弱い場合, 傾きが小さく測定が難しい場合, 測定間隔を長く取れば, 測定しやすくなる。

```
Model 680 Microplate Reader S/N 13570
Kinetic Plots report
25/01/2005 17:31:45
Lab. name: Bio-Rad Laboratories
Kit name : Kinetic #02
Reading mode: Single
Measurement Filter: 405nm(1)
Number of reads: 10
Start delay time: 10sec
Reading Interval time (sec):15,15,15,15,15,15,15,15,15,15
Shaking: ON, Before every read
Time= 3sec,Speed= Middle
Calculation range: 1 to 10
```

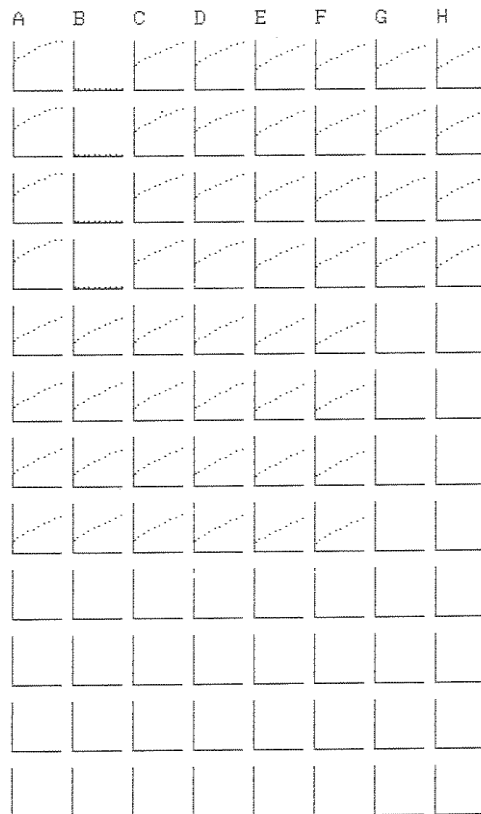


図 2 測定結果の表示一例

具体実験例

図 3 では, 傾きを酵素活性として, それに対してフラボノイド (ルテオリン) と強い抑制活性を示すネオスティグミンの測定の一例を示した。ルテオリンは 0.05-50 μ M の濃度で, ネオスティグミンは 0.01-10 μ M の濃度で抑制効果を調べた。その結果, ルテオリンとネオスティグミンの IC₅₀ 値は, 226 μ M (推測値) と 0.073 μ M となった。このネオスティグミンの値は, 強力な抑制薬としての値であると考えられる。

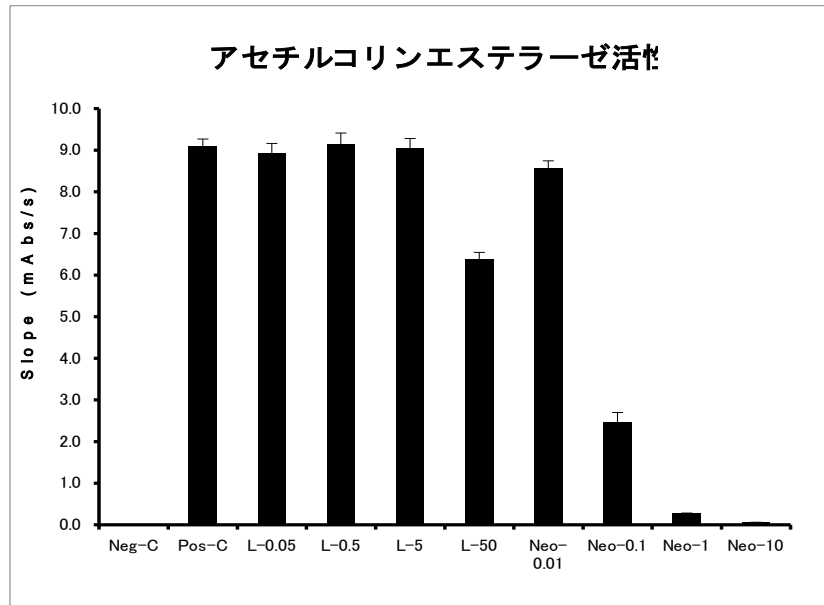


図3 活性測定結果の一例

Neg-C: 陰性コントロール, Pos-C: 陽性コントロール, L: ルテオリン
Neo: ネオスティグミン, 数字は濃度(μM)である.

おわりに

食品としての機能性にこれまで強い活性を有するものは、まだ確認されていないが、弱い活性を有する報告は散見される。たとえ可能性のあるものが発見されたとしても、実際にその機能性を発揮するためには、さらなるハードル、例えば成分の体内動態や特異性が存在することより、機能性食品としての可能性はまだまだこれからであると思われるが、リード化合物として発見されることが期待される。

参考文献

- 1) Ellman,G.L., Courtney,K.D., Andres,V.Jr. and Feather-Stone,R.M., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*,**7**, 88-95 (1961).
- 2) Augustinsson,K.B. and Eriksson,H.,The Effects of Two Disulphides on Cholinesterase Activity in the Spectrophotometric Assay. *Biochem. J.*, **139**, 123-127 (1974).
- 3) Dawson.R.M.,The Effect of some Amine Oxides and Disulphide Compounds on the Activity of Acetylcholinesterase. *Biochem. J.*, **149**, 293-295 (1975).