

4) マクロファージを用いた NO 産生の簡易評価

(独) 農研機構 畜産草地研究所 青木 玲二

はじめに

一酸化窒素 (NO) は、1992 年に Science 誌において“molecule of the year”に選ばれた分子である。1998 年には、NO の機能解明に貢献したという理由で、ファーチゴット、イグナロ、ムラドの 3 人にノーベル生理学・医学賞が授与されており、哺乳類において神経系、循環器系、免疫系など、多くの生理現象に関与していることが明らかにされている。NO は生体内では分子状酸素とアルギニンから合成されるが、この反応を触媒しているのが一酸化窒素合成酵素 (NOS) である。NOS には nNOS, eNOS, iNOS と呼ばれる 3 種のアイソザイムが存在し、それぞれが重要な役割を担っている。神経細胞に発現する nNOS はニューロン間の情報伝達に関与しており、血管内皮細胞に発現する eNOS は血管平滑筋の弛緩を介して血圧の調節に関与している。一方、マクロファージなどの炎症性の細胞に発現する iNOS は、リポポリサッカライド (LPS) などの微生物成分の刺激を受けて誘導され、病原菌などに対する生体防御に働いている。このように生体にとって重要な機能を果たしている NO ではあるが、合成される量が多量であると炎症の悪化、発癌などの原因になり、人体にとって有害となることもある。そのため、特に産生量の多いマクロファージの NO 合成を制御することは、炎症を制御することに有効であるとされ、食品分野においてもマクロファージの NO 合成の阻害成分の探索が行われている。

本稿では、一般的なマクロファージの NO 産生量の測定法について解説する。上述のように、マクロファージは微生物やその成分に刺激されると iNOS が誘導され、アルギニンから多量の NO を合成する。放出された NO は即座に酸化されて NO₂ になり、さらに水と反応して亜硝酸や硝酸となる。本法ではこのようにして生じた亜硝酸を、グリース試薬を用いて定量し、マクロファージの NO 産生量として間接的に評価する。グリース試薬による亜硝酸の発色は、スルファニルアミドと亜硝酸のジアゾ化反応を利用しており、N-1-ナフチルエチレンジアミンとのカップリング反応によりアゾ色素が生成することによる (図 1)。

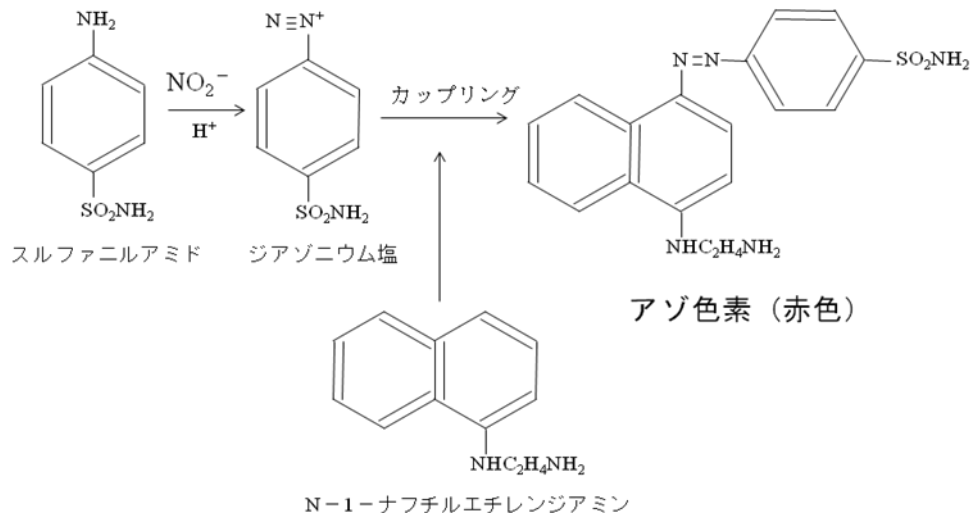


図 1 亜硝酸のグリース試薬による発色の原理

準備するもの

1. 実験器具

- ・ 5%CO₂ インキュベーター (細胞培養用)
- ・ クリーンベンチ
- ・ 電子天秤 (試薬調製用)
- ・ 位相差顕微鏡 (細胞観察用)
- ・ 血球計算盤
- ・ 吸引アスピレーター (培地の除去用)
- ・ パスツールピペット (培地の除去用)
- ・ オートピペット (培地の添加, 細胞の播種用)
- ・ マイクロピペット
- ・ マルチチャンネルピペット
- ・ ピペットチップ
- ・ フィルター (MILLIPORE など. 濾過滅菌用)
- ・ リザーバー (グリース試薬を添加するときなど)
- ・ 50 mL ポリスチレンチューブ (BD Falcon など)
- ・ 遠心機 (50 mL チューブ用. 細胞の回収に用いる.)
- ・ 冷蔵庫
- ・ -20℃, -80℃フリーザー (食品成分などのサンプルや培養上清の保存用)
- ・ 液体窒素容器 (細胞保存用)
- ・ オートクレーブ
- ・ 96 ウェルマイクロプレートリーダー (測定波長 550 nm)
- ・ 培養用 24 ウェルマイクロプレート (BD Falcon など. 細胞培養用)

- ・培養用 96 ウェルマイクロプレート (BD Falcon など、細胞培養用)
- ・96 ウェルマイクロプレート (Nunc など、吸光度測定用)

2. 試薬

- ・0.04%トリパンブルー染色液
細胞数測定用。粉末トリパンブルー (invitrogen など) を生理食塩水に溶かす。
濾過滅菌し、室温で保存。
- ・グリーンス試薬 (1%スルファニルアミド/0.1%N-1-ナフチルエチレンジアミン/2.5%リン酸液)
リン酸 (Wako など) 0.5 mL を脱イオン水 19.5 mL に加え、スルファニルアミド (Wako など) を 200 mg と N-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩 (Wako など) を 20 mg 溶解させる。用時調製。
- ・100 mM 亜硝酸ナトリウム水溶液
亜硝酸の標準液用。亜硝酸ナトリウム (Wako など) を 69 mg を 10 mL の脱イオン水に溶かす。亜硝酸ナトリウムは吸湿性があるので使用前に乾燥させておく。用時調製。

3. 細胞及び培地, 血清

- ・J774.1 マウスマクロファージ様細胞
細胞バンク (理化学研究所バイオリソースセンターなど) から入手する。
- ・ウシ胎児血清 (FCS)
56°C で 30 分間非働化した後、濾過滅菌し、-20°C で保存。
- ・mod. RPMI1640 培地 (+FCS)
RPMI1640 培地 (Sigma など) 500 mL に 250 mM 2-メルカプトエタノールを 0.1 mL, ストレプトマイシン/ペニシリン (100 倍溶液) を 5 mL, 1 M HEPES を 5 mL 加え、非働化した FCS を 10% となるように加える。冷蔵保存。

4. サンプル

微生物や微生物成分の懸濁液、食品成分を水や水溶液などで抽出したもの、有機溶媒で抽出したものなど、様々なサンプルに対して検定が可能。ただし、細胞添加時の溶媒の持ち込みに関しては注意を払う。例えば、ジメチルスルホキシド (DMSO) を溶媒としている場合、添加した際の DMSO の濃度を 0.1% 以下に抑える。

【注】当然のことながら、サンプルに関しては亜硝酸塩を高濃度に含んでいるものは適さない。

プロトコール

1. 細胞の培養・維持

J774.1 細胞は mod. RPMI1640 培地 (+FCS) で培養する。培地に懸濁した J774.1 細胞を 1 mL ずつ培養用 24 ウェルマイクロプレートに撒き、2, 3 日ごとに培地を交換する。コンフルエントに達する前に 10 倍希釈して継代する。

2. 2× サンプル溶液の調製

mod. RPMI 培地 (+FCS) に終濃度の 2 倍の濃度となるよう、食品成分などのサンプルを溶解させる。コントロールとして何も加えない mod. RPMI 培地 (+FCS) と、LPS (Sigma など) を 20 µg/mL (終濃度は 10 µg/mL) となるように溶解させた mod. RPMI 培地 (+FCS) を準備する。

3. NO 産生の誘導

以下の操作はクリーンベンチ内で行う。

- 1) 対数増殖期の細胞培養液を 50 mL ポリスチレンチューブに回収する。
- 2) 1000 rpm, 3 分間遠心し、細胞を沈殿させる。
- 3) 上清をアスピレーターで吸引した後、細胞を mod. RPMI1640 培地 (+FCS) に懸濁する。
- 4) 懸濁液の一部をトリパンブルー液で希釈し、血球計算盤で生細胞数を測定する。
- 5) 細胞濃度が 1.0×10^6 cells/mL となるように mod. RPMI 培地 (+FCS) で調整し培養用 96 ウェルマイクロプレートに 1 ウェルあたり 100 µL の細胞懸濁液を撒く。なお、この時blankとして、mod. RPMI 培地 (+FCS) のみを 100 µL 入れたウェルも用意しておく。
- 6) 5%CO₂ インキュベーター内で 2 時間プレインキュベートする。
- 7) 2. で調製した 2×サンプル溶液を細胞懸濁液の入ったウェルに 100 µL ずつ添加する。また、blankとして用意したウェルにも 2×サンプル溶液を添加する。
- 8) 5%CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養する。
- 9) 培養上清を採取する。すぐに測定しない場合は -80°C で凍結保存しておく。

4. 亜硝酸濃度の測定

- 1) 100 mM の亜硝酸ナトリウム水溶液を mod. RPMI 培地 (+FCS) で 1000 倍希釈して、100 µM の亜硝酸溶液を作製する。それを元に倍々希釈して、濃度 0, 1.56~100 µM の亜硝酸標準液を作成する。
- 2) 亜硝酸標準液、培養上清、それぞれ 100 µL を吸光度測定用の 96 ウェルマイクロプレートに移す。
- 3) グリース試薬を 100 µL ずつウェルに添加する。
- 4) 室温で 20 分間反応。
- 5) マイクロプレートリーダーで 550 nm の吸光度を測定する。

6) 亜硝酸標準液より検量線を作成し、培養上清中の亜硝酸濃度を計算する。

【注】用いたサンプルによってはグリーンス試薬による発色反応を阻害する可能性があるため、念のためサンプルと亜硝酸標準液を混ぜたコントロールを作成しておき、その可能性がないことを確認しておくことよ。

【参考】本稿ではサンプルに対するマクロファージの NO 産生量を測定する方法を紹介しているが、逆に食品成分などによるマクロファージの NO 産生の阻害効果や除去効果を調べることもできる。方法としては、培養時に iNOS 誘導剤である LPS を添加することでマクロファージに NO を産生させ、サンプルを加えた時にその量がどれくらい減少するかを測定することで行う。即ち、2.の2×サンプル溶液調製の際に2×サンプル溶液に LPS を 20 $\mu\text{g/mL}$ (終濃度は 10 $\mu\text{g/mL}$) となるように溶解させておき、コントロールには mod. RPMI 培地 (+FCS), LPS のみを溶解させた mod. RPMI 培地 (+FCS) を準備する。後の操作は上記と同様に行い、吸光度を測定後、以下の計算式により阻害効果を求める。

$$\text{阻害 (\%)} = 100 - (\text{Sample}_{550} - \text{Control}_{550} / \text{LPS}_{550} - \text{Control}_{550})$$

Sample₅₅₀ : 食品成分などのサンプルと LPS を含む培地で培養したときのグリーンス試薬発色による 550 nm の吸光度

LPS₅₅₀ : LPS を含む培地で培養したときの 550 nm の吸光度

Control₅₅₀ : mod. RPMI 培地 (+FCS) で培養したときの 550 nm の吸光度

その他

検量線の一例を図 2 に示す。

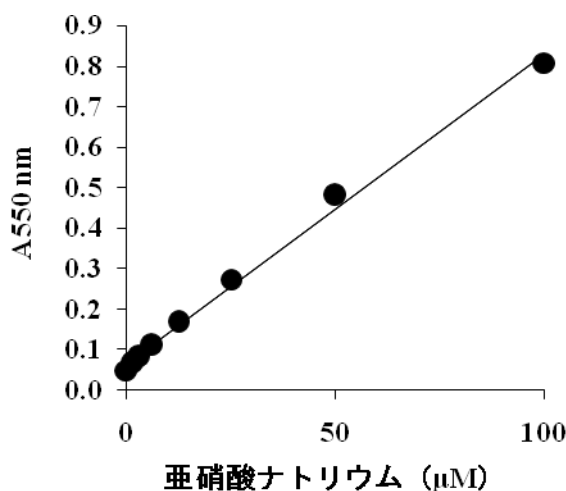


図 2 亜硝酸の検量線の例

おわりに

本法は非常に簡便であり、生理活性成分の探索など多数のサンプルを処理する場合に適している。しかし、既に述べたように、NO は培地中で亜硝酸だけでなく、硝酸にも変換されるため、厳密には亜硝酸量=NO 産生量とはいえない。そのため、本法で NO 産生量を正確に測定したい場合には、事前に硝酸を硝酸還元酵素などで亜硝酸に還元しておく必要がある。硝酸還元酵素付きの亜硝酸/硝酸定量キット（同仁化学）が市販されているので利用するとよい。なお、本稿では J774.1 細胞を用いた場合の評価法を紹介しているが、他のマクロファージ様細胞（例 RAW264.7 細胞）を用いた場合でも、同様の操作で評価することができる。

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) Marletta, M.A., Yoon, P.S., Iyengar R., Leaf, C.D. and Wishnok J.S., Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry*, **27**, 8706-8711 (1988).
- 3) Kim, H.K., Cheon, B.S., Kim, Y.H., Kim, S.Y. and Kim, H.P., Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochemical Pharmacology*, **58**, 759-765 (1999).