

マスト細胞による抗アレルギー活性評価法

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
食品研究部門 山本（前田）万里

【はじめに】

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おり、日常摂取する食品によりアレルギー緩和が期待されている。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。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（Fc ϵ RI）を持っている。そこへIgEが結合し、そのIgEにアレルゲン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。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。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。

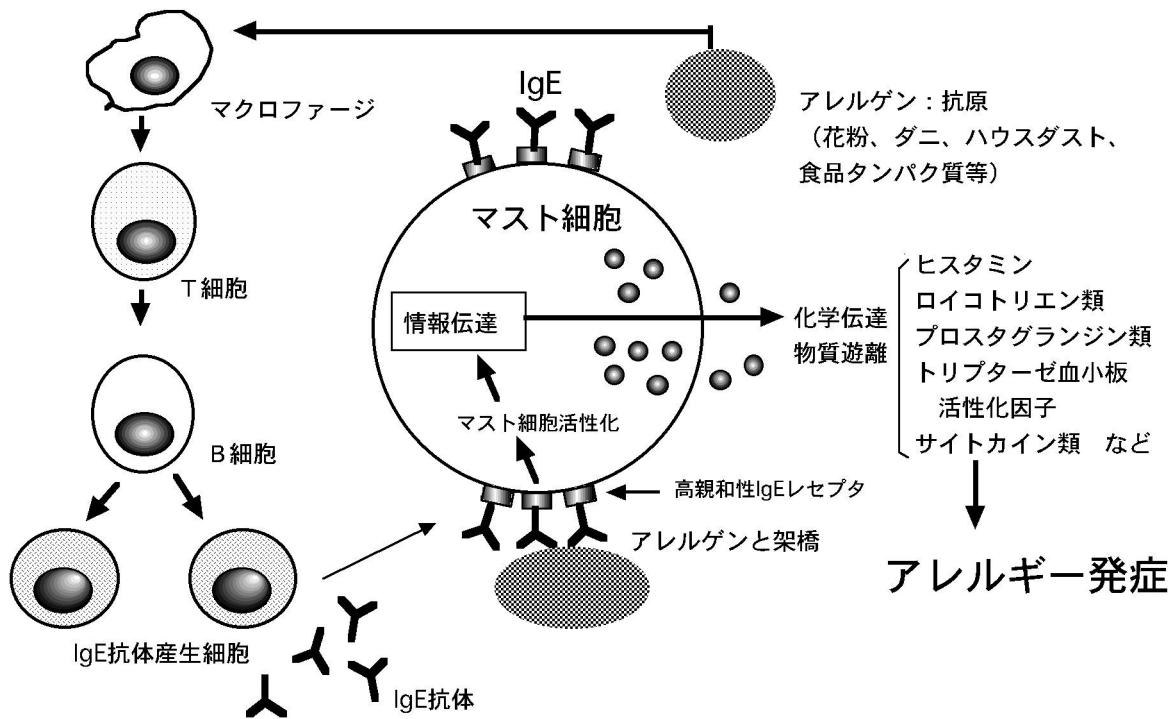


図1 マスト細胞を介するアレルギー発症機序

【評価法の概要】

食品成分の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）の活性化に与える影響について、マウスマスト細胞を用いたヒスタミン遊離量を指標に評価する。

【準備するもの】

1. 実験器具・機器

- 1) 高速液体クロマトグラフ装置：送液ポンプ、冷却器付きオートインジェクター、オンライン脱気装置、カラムオープン、蛍光検出器(RF)、データ処理システムを備えたもの。ここでは島津製作所製 LC-10ACvp HPLC を使用した。
- 2) 高速液体クロマトグラフ用カラム： Asahipak ODP-50 4E (内径 4.6 mm X 長さ 250 mm、粒子径 5 μ m、Shodex 製)
- 3) 超低温冷凍庫： -28 $^{\circ}$ C 以下で冷凍保存できるもの。
- 4) 冷蔵庫： 4 $^{\circ}$ C で冷蔵保存できるもの。
- 5) クリーンベンチ
- 6) CO₂ インキュベータ： 95%O₂, 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C で制御できるもの
- 7) 恒温水槽： 37 \pm 1 $^{\circ}$ C , 56 \pm 1 $^{\circ}$ C で制御できるもの
- 8) ボルテックスミキサー[®]： 同等の機能を有する機器でも良い
- 9) 遠心分離器：15ml ファルコンチューブ用は常温、回転数 1,500rpm まで、1.5mL マイクロチューブ用は 4 $^{\circ}$ C、回転数 15,000rpm まで
- 10) プッシュボタン式液体用微量体積計： マイクロピペッター。容量は 1000 μ L、200 μ L および 20 μ L のもの。必要に応じて、ポジティブディスプレイメント方式のもの。適合するチップも必要。例：ピペットマン P-1000、P-200、P-20
- 11) タイマー
- 12) マグネットスターラー
- 13) PTFE 製攪拌子
- 14) 葉さじ
- 15) 薬包紙： パラフィン紙
- 16) メスフラスコ (5mL)： 日本工業規格 (JIS R3505:1994) で規定されているクラス A 又はそれ以上の規格のもの。
- 17) メスシリンダー (200 mL、1 L)： 日本工業規格 (JIS R3505:1994) で規定されているクラス A 又はそれ以上の規格のもの。
- 18) ビーカー (20 mL, 1 L)： 日本工業規格 (JIS R3503 : 2007) で規定されているもの又はそれに準ずる。
- 19) 三角フラスコ (1L)： 日本工業規格 (JIS R3503 : 2007) で規定されているもの又はそれに準ずる。
- 20) ポリプロピレンビーカー (1L)
- 21) メジューム瓶 (100 mL、500 mL、1 L)： ガラス製のもの。または同等の保管容器。
- 22) 滅菌コンカルチューブ (15 mL、50 mL)： γ 線滅菌済、ポリプロピレン製、細胞培養液や試料が入るもの。または同等の容器。Falcon 製
- 23) 滅菌細胞培養フラスコ (25cm²、75cm²、175cm² の T フラスコ)： γ 線滅菌済、Falcon 製
- 24) 滅菌ディスポーザブルピペット (10mL、25mL)： γ 線滅菌済、ポリスチレン製、個別包装、Falcon 製
- 25) 電動ピペット吸引機 (ピペットエイド)： ポンプ、汚染防止フィルター付き、Drummond 製
- 26) パスツールピペット： ガラス製、オートクレーブをかけて滅菌しておく。
- 27) サンプル前処理用フィルターユニットカップ： 0.45 μ m、ポリエチレン製、メンブレンは親水性 PTFE、濾過量は 300mL~3L、Merck Millipore 製ミリカップ LH 等
- 28) 26G 注射針付きプラスチック注射筒： 滅菌、テルモ製
- 29) マイクロチューブ： ポリプロピレン製 (1.5 mL 容量)、オートクレーブをかけて滅菌して

おく。

- 30) バイアル： オートインジェクターに適合したシリコンもしくは低吸着ポリプロピレンバイアル。ガラスバイアルはヒスタミンが吸着するので使用不可。
- 31) パラフィルムシール
- 32) 血球計算盤： 改良型ノイバウエル、エルマ製

2. 使用試薬と調整法

1) PBS(-) (Phosphate Buffered Saline) 溶液：

10 倍量 PBS(-)液

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄ /12H ₂ O	29 g
KH ₂ PO ₄	2g

を 1 L の DW に溶解し、500mL メジューム瓶に入れ、オートクレーブをかける。要事に 10 倍希釈して使用する。(試薬は全て和光純薬工業)。

2) Tyrode 液 (Ca²⁺-free)

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

50mL コニカルチューブに入れ、冷蔵保存。

(試薬はすべて和光純薬工業)

3) 反応停止液

4mM EDTA 含有 Tyrode 液 (Ethylendiaminetetraacetic acid(EDTA)は和光純薬工業)
50 mL の Tyrode 液に EDTA を 58.44mg 溶解する。冷蔵保存。

4) 0.1N HCl 溶液 (HCl は和光純薬工業)

純水 99.17 mL に濃塩酸 0.83 mL を混合して、100mL メジューム瓶に冷蔵保存。

5) 細胞溶解液：1% Triton X-100 (Triton X-100 (Polyoxyethylene(10) Octylphenyl Ether) は和光純薬工業)

6) 5N NaOH 溶液 (NaOH は和光純薬工業)

7) RPMI1640 培地 (Invitrogen Japan)

8) FBS (牛胎児血清) (Invitrogen Japan)：(56°Cの恒温水槽に 30 分静置して非働化したもの)

9) L-Glutamine, 2-Mercaptoethanol, streptomycin, penicillin (和光純薬工業)

10) Recombinant Murine IL3 (PeproTech)

11) Anti-2,4,6-trinitrophenyl (TNP) mouse monoclonal IgE antibody(抗 TNP-IgE) (BD Pharmingen)

12) TNP-BSA 溶液：TNP-BSA(2,4,6-trinitrophenyl Bovine Serum Albumin) (LSL Lifescience、コスモバイオ LG-1117)。10 μg の TNP-BSA を 10mM CaCl₂·2H₂O(1.47 mg/mL PBS))1mL に溶解する。最終的には、300 μM CaCl₂ 含有 TNP-BSA 300 ng/mL となる。

- 13) 四ホウ酸ナトリウム (pH9.5) : sodium borate (和光純薬工業)
- 14) o-Phtalaldehyde(OPA) : OPA (和光純薬工業)
- 15) N-Acetyl-L-cysteine : NAC (Sigma Aldrich)
- 16) 塩酸ヒスタミン (和光純薬工業)

3. 細胞実験

マウス骨髄誘導マスト細胞 (BMMC) やマウスマスト細胞株 PT-18,MC/9,MCP-5 を用いる。細胞株の抗原刺激による反応性は BMMC に劣ることが多い。

1) BMMC の作製

培地は、RPMI1640 培地 500 mL に非働化 FBS 75 mL、streptomycin 50mg、penicillin 50,000 U、200mM L-Glutamine 5 mL、50mM 2-Mercaptoethanol 0.5 mL を加えたものを用い、要事に recombinant murine IL3 を 4ng/mL 添加する。

マウス (Nc/Nga (日本チャールズリバー) 5週令メス) を解剖し、大腿骨 (3cm 程度) を取って両端を少し解剖ハサミで切断する。大腿骨をピンセットで固定しながら、26G 注射針を付けた注射筒 (10mL の培地入り) で 25cm²T フラスコに骨髄中の細胞を流し入れる。少量の培地で場所を変えて両側から押し出す。26G 注射針は詰まりやすいので、押して圧力がかかるようだったらすぐに別の注射針と交換して骨髄中細胞を全て押し出すようにする。大腿骨の下から出てくる押し出し液は、最初濁っており (前駆細胞が多量存在する)、最後は透明になるのを目安とする。両足の大腿骨で 2 本の培養フラスコができる。25cm²T フラスコは CO₂ インキュベータで培養する。

3 日後に細胞の浮遊した培地をディスポーザルピペットでコニカルチューブに移し、常温、1,100rpm で遠心分離し、上清を捨てて、新しい 10 mL の培地を入れてピペッティングして新しい 25cm²T フラスコに移す (メインテイン)。フラスコに付着している細胞もいるので、表面をよくピペッティングする。1 週間目にメインテインして、75cm²T フラスコ (培地 30 mL) に移す。2 週間目にメインテインして 175cm²T フラスコ (培地 100 mL) に移す。1 週間毎にメインテインを行い、4 週間～5 週間で分化して使用できる。

2) 細胞実験プロトコール

- 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 cells/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 (通常 1×10^8 cells)。
- ③1,100rpm で 常温、5 分間遠心分離を行う。
- ④上清を滅菌ディスポーザルガラスピペット吸引し、ペレットを軽くほぐして、抗 TNP-IgE 抗体を加えて (IgE (μ L)量=細胞数 \div (2×10^6) \times 1)、 2×10^6 cells/mL で培養フラスコにまきこみ、CO₂ インキュベータ内で一晩培養 (1 $\times 10^8$ 個のときは 50mL の中に IgE が 50 μ L)。
- ⑤翌日、培養液を 50mL コニカルチューブに回収し、1,100rpm で 常温、5 分間遠心分離を行う。
- ⑥ペレットを PBS でそっと懸濁、もう一回洗浄する。この操作で細胞が物理的に破裂することがあるので、細心の注意を払って穏やかに操作を行う。
- ⑦ペレットを 1×10^7 cells/mL になるように 37 °C に温めた Tyrode 液を加え、そっと懸濁する。

- ⑧マイクロチューブに 250 μL ずつ分注し、37 $^{\circ}\text{C}$ の恒温水槽につける。
- ⑨12.5 μL の被験液を添加し、かるく攪拌して 37 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分インキュベートする。
- ⑩7.5 μL の CaCl_2 入り TNP-BSA 溶液を添加し、かるく攪拌して 37 $^{\circ}\text{C}$ で 20 分インキュベートする。
- ⑨の操作も同様だが、15 秒もしくは 20 秒おきに添加を行い、それぞれの処理時間が同じであるようにする。
- ⑪10 μL の反応停止液を添加し、氷中で 10 分インキュベートする。
- ⑫15,000 rpm で 4 $^{\circ}\text{C}$ 、5 分間、遠心分離して上清 150 μL を HPLC 用バイアルに回収し、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(刺激処理をしないコントロール)を作成する。刺激処理に使用した同数の細胞を 1.5mL マイクロチューブに入れ、遠心分離して上清を除き、ペレットに 0.25 mL 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、15,000 rpm で 4 $^{\circ}\text{C}$ 、5 分間遠心分離して上清 150 μL を HPLC 用バイアルに回収し、同量の 0.1N HCl を添加して HPLC 分析に供する。

4. HPLC による分析条件

- 1) 移動相：50mM 四ホウ酸ナトリウム (pH9.5)：アセトニトリル、84:16 (1mM OPA、1mM NAC 含有)

(調整法)

1 L ポリビーカーに超純水を 840 $\text{g}\pm 2 \text{g}$ 計量する。薬包紙に四ホウ酸ナトリウムを 8.0 $\text{g}\pm 0.05 \text{g}$ 秤量して 1 L ポリビーカーにゆっくり入れ、攪拌子で攪拌して溶解する。5N NaOH (4.5 mL 位)で pH9.5 に調整する。NAC を室温に戻して 0.165 $\text{g}\pm 0.005 \text{g}$ 秤量して四ホウ酸ナトリウム溶液に入れて溶解する。発砲スチロール容器をかぶせて遮光する。アセトニトリルを 200 mL メスシリンダーに 125 $\text{g}\pm 0.5 \text{g}$ (約 160 mL) 計量する。OPA を室温に戻して 20 mL ビーカーで 0.134 $\text{g}\pm 0.005 \text{g}$ 計量し、計量したアセトニトリル半量弱で攪拌子を使って溶解する。光に弱いのでは遮光箱で覆いながら溶解する。残ったアセトニトリルは 1L 三角フラスコに入れる。四ホウ酸ナトリウム溶液を 8 割程度 サンプル前処理用フィルターユニットカップで濾過する。濾過が進んだところで、OPA/アセトニトリル溶液を攪拌子ごと一気に流し込んで濾過する。残った四ホウ酸ナトリウム溶液で 20 mL ビーカーを共洗いして全て濾過し、1 L 三角フラスコのアセトニトリルとよく混合する。要事調整。

- 2) オートサンプリング：10 $^{\circ}\text{C}$
- 3) カラム温度：37 $^{\circ}\text{C}$
- 4) 注入量：20 μL
- 5) 流速：0.5 mL/min
- 6) 検出器：RF 蛍光検出器(em.330 nm、 ex.440 nm)
- 7) スタンダード：塩酸ヒスタミン 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 0.05N HCl

*プロトコールのポイント

- ① 1 つの試料につき 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う。
- 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 液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、マイクロ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、荒い操作によりヒスタミン遊離が誘発されるので注意を要する。
- ⑤HPLC 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。

5. 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 TNP-BSA (-) 平均値 (サンプル無添加)

AC: 抗原 TNP-BSA (+) 平均値 (サンプル無添加)

S: サンプル値

6. 後片づけ

HPLC の移動相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なったことを確認する。

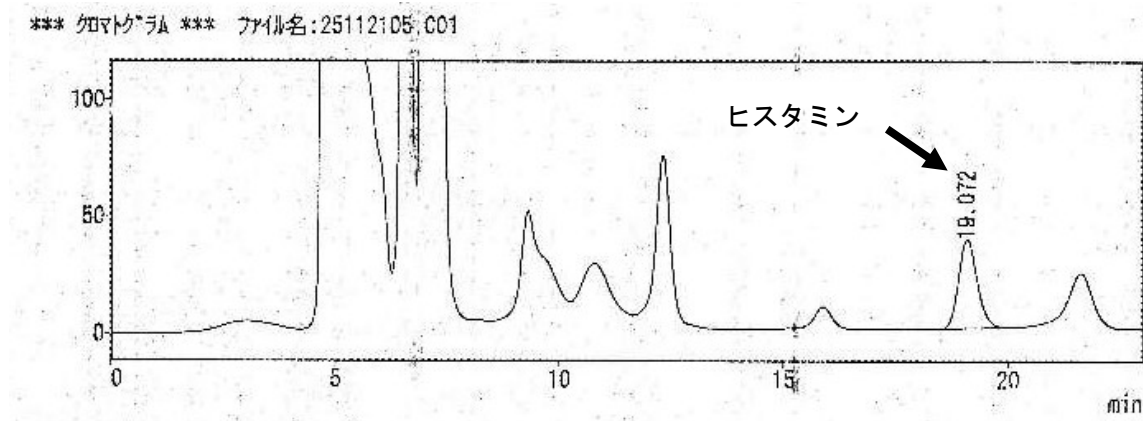


図2 HPLC クロマトグラム

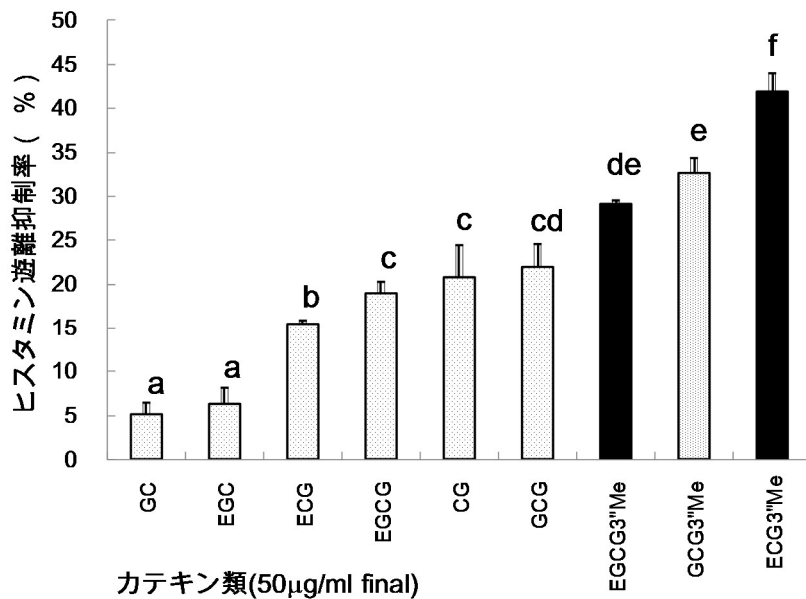


図3 ヒスタミン遊離抑制率の実際の測定例（カテキン類（50µg/mL）の効果）
異なる英字間で有意差あり、カテキンの略号についてはカテキン類の分析法の項を参照

【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、アレルギー軽減のための食品開発の有効なツールになると考えられる。スクリーニングされた機能性成分、食品について、ヒト介入試験を行う必要がある。本評価法を使用してスクリーニングされた食品成分を機能性関与成分として機能性表示食品として届出・受理された事例もある*

*届出番号：A67（べにふうき緑茶ティーバッグ）

消費者庁 Web <https://www.fld.caa.go.jp/caaks/cssc02/?recordSeq=0IKO41603310640101>

届出番号：A69（めめはな茶）

消費者庁 Web <https://www.fld.caa.go.jp/caaks/cssc02/?recordSeq=0IKO41603310660101>

届出番号：B145（べにふうき緑茶ティーバッグ）

消費者庁 Web <https://www.fld.caa.go.jp/caaks/cssc02/?recordSeq=41610060230202>

【参考文献】

- 1) Musch M.W, Siegel M.I. Antigenic stimulated release of arachidonic acid, lipoxygenase activity and histamine release in a cloned murine mast cell MC9. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 126: 517-525 (1985).
- 2) Saito K, Horie M, Nose N, Nakagawa H. High-performance liquid chromatography of histamine and 1-methylhistamine with on-column fluorescence derivatization. *J. Chromatograph.* 595: 163-168 (1992).
- 3) Maeda-Yamamoto M, Inagaki N, Kitaura J, Chikumoto T, Kawahara H, Kawakami Y, Sano M, Miyase T, Tachibana H, Nagai H, Kawakami T. O-methylated catechins from tea leaves inhibit multiple protein kinases in mast cells. *J. Immunology*, 172(7):4486-4492 (2004).
- 4) Maeda-Yamamoto M, Ema K, Tokuda Y, Monobe M, Tachibana H. Epicatechin-3-O-(3-O-methyl) gallate content in various tea cultivars (*Camellia sinensis* L.) and its in vitro inhibitory effect on histamine release. *J. Agric Food Chem*, 60(9):2165-2170 (2012).