

マクロファージによる炎症の抑制作用の評価

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 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リポ多糖 (Lipopolysaccharide (LPS)) や炎症性サイトカインである TNF α により活性化され、TNF α やインターロイキン 1 β (IL1 β)、IL6 等の炎症性サイトカインを産生する。LPS は Toll 様受容体 (Toll-like receptor) を、また TNF α は TNF 受容体を介して転写因子の NF- κ B 等を活性化し、炎症反応に関与する多くの遺伝子発現を誘導することが明らかになっている¹⁾。このような炎症反応は、感染症や関節炎等の炎症性疾患をはじめとする様々な疾患の発症に関与することが明らかになっている²⁾。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・機器

- ・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。滅菌済みディスプレイ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 (50ml、15ml、1.5ml チューブ用。細胞の回収用)
- ・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 (ディスプレイサブル器具廃棄用)
- ・セルカルチャーディッシュ (Corning 100mm スタンダードディッシュノントリートメント 353003 等)
- ・コニカルチューブ (50ml、15ml Corning 352070、IWAKI 2325-015 等)

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 (Corning 353072 等。細胞培養用)
- ・96 ウェルマイクロプレート (ThermoFisher Scientific MaxiSorp flat-bottom 456537)

等。ELISA 用)

- 血球計算盤 (ノイバウエル計算盤等)
- 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の播種等に使用)
- マイクロチューブ (1.5ml、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細胞に用いる)
- 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. 細胞・培地・試薬

1) 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。

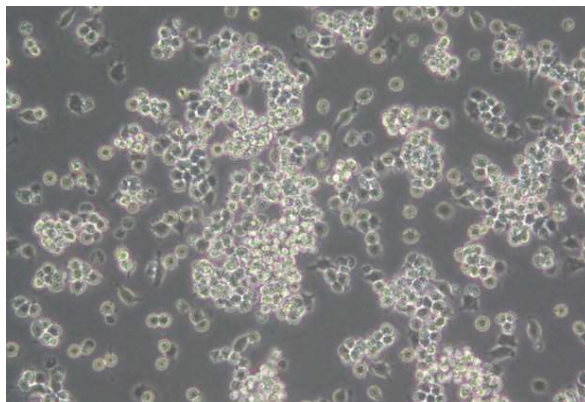


図1 RAW264.7 マウスマクロファージ細胞 (ATCC TIB-71)

2) RPMI1640 培地 (ThermoFisher Scientific 11875093 等)

3) ウシ胎児血清 (Fetal Calf Serum (FCS)、和光純薬等)

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 $^{\circ}$ 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。

4) PBS (-) (粉末、日水製薬 05913)

5) LPS (Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* Serotype 0111:B4、Sigma-Aldrich)

6) トリパンブルー染色液、0.4% (ThermoFisher Scientific 15250061、細胞数測定用)

(0.22 μ m フィルター (メルクミリポア マイレクス GP 孔径 0.22 μ m))

7) Mouse TNF- α ELISA Ready-SET-Go! (Affymetrix 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 Tetremethylbenzidine (TMB) Substrate Solution
TNF α standard
以上は冷蔵保存。

- 8) Tween20 (ポリエチレングリコールソルビタンモノラウレート、Sigma-Aldrich P5927)
- 9) Cell Counting Kit-8 (WST-8 試薬) (和光純薬 347-07621 (500 回用)、343-07623 (2500 回用))
WST-8 を含む 1 液タイプ。500 回用で約 5ml。冷蔵 (4°C) 保存で約 12 ヶ月間使用可能。
長期保存する場合は、測定に必要な量を分注して冷凍 (-20°C) 保存する。

3. 調合・調整

- 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。
500ml の培地に 50ml のウシ胎児血清を添加し、冷蔵庫に保存しておく。室温に戻して使用する。
- 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) PBS (-)
 - ・PBS(-) 粉末 9.6g を蒸留水に溶解して全量を 1l とし、121°C で 15 分間オートクレーブ滅菌する。
- 4) LPS
 - ・PBS に溶解して 100 μ g/ml のストック溶液とし、100 μ l ずつ小分けして冷凍保存する。
- 5) トリパンブルー染色液
 - ・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。
- 6) Wash Buffer
 - ・PBS(-) 溶液に 0.05% Tween-20 を添加したもの。室温保存。
- 7) Stop Solution
 - ・1M リン酸 (H₃PO₄) 溶液。リン酸 6.83ml に蒸留水を添加して 100ml に定容したもの。室温保存。
- 8) 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。

【プロトコール】

< 1 日目 >

1. 細胞懸濁液の調製
 - 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、15ml コニカルチューブに細胞懸濁液を回収する。
 - 3) 1000rpm、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、5~10ml 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 50~100 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、同量の 0.2%トリパンブルーと混合する。
- 6) 血球計算盤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 x 10⁵ cells/ml) に合わせて、培地で希釈する。
2. 細胞の分注
 - 1) よく攪拌した細胞懸濁液をリザーバーに移し、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×希釈濃度数+2 (無処理及び LPS 処理のみのコントロール))×反復数(n) 個のウェル (n=3 または 4) を準備する。
 - 2) 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、顕微鏡下で細胞の状態を確認する。
3. 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。
4. ELISA プレートの準備
ELISA キットの Coating Buffer を調製し、250 x 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 x Capture Antibody を 100 μ l ずつ分注する。プレートシールをして、4°Cで一晩インキュベートする。
(サンプル数×希釈濃度数+2 (無処理及び LPS 処理のみのコントロール))×反復数(n) 個のウェル (n=3 または 4) に加えて、定量 (検量線作成) のため、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 >

5. サンプル液の調製
 - 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、サンプル抽出物の重量を測定する。滅菌 DMSO に溶解して、ストック溶液とし、-30°C下で保存する。
 - 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ラベルしておく。
 - 3) LPS を RPMI1640 培地 (FCS (-)) で希釈し、終濃度 2ng/ml とする。それぞれのサンプルを、調製した RPMI1640 培地 (FCS (-)) +LPS で希釈し、最終濃度の溶液を 100 μ l×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)
6. 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ツールピペットで培地を吸引除去する。
 - 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 RPMI1640 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。
7. 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。
8. 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 μ l の Wash Buffer で3回洗う。
- 2) 各ウェルに1 x Assay Diluent を200 μ l 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。1 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 μ l \times 反復数（3または4）+ α 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 μ l の Wash Buffer で3回洗う。
 - 5) スタンダードの TNF α をELISA用96ウェルマイクロプレートに100 μ l ずつ添加する。また6時間培養後の96ウェルマイクロプレートの培養上清を25 μ l ずつELISA用96ウェルマイクロプレートに添加したのち、1 x Assay Diluent を75 μ l ずつ添加して、100 μ l/well になるようにする。
 - 6) ELISA用96ウェルマイクロプレートをシールして、4 $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートする。
9. 細胞生存率（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（25 μ l）を採取した後、WST-8試薬を各ウェルに10 μ l ずつ添加する。
 - 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。
 - 4) マイクロプレートリーダーで450nm（405-450nm）、参照波長650nm（600nm以上）の吸光度を測定する。

< 3日目 >

10. TNF α の測定（つづき）
- 1) ELISA用96ウェルマイクロ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。
 - 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。
 - 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。
 - 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5~10分程度、静置する。
 - 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) マイクロプレートリーダーで450nmの吸光度を測定する。

【プロトコールのポイント・注意点】

1. 細胞懸濁液の調製

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

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。

2. 細胞の分注

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。

5. サンプル液の調製

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50~100 mg/ml 程度とし、超音波洗浄器に浸ける、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、わずかであればよく懸濁して用いるか、遠心除去してから用いる。

細胞を添加しない、サンプルと培地のみ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。

6. サンプル溶液の分注

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。

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。

7. TNF α の測定

洗浄の際は、Wash Buffer を添加後、96 ウェルマイクロプレート逆さにして振り、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。

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1 X Assay Diluent で希釈して用いる。

8. 細胞生存率（バイアビリティ）の測定

WST-8 試薬添加前に、顕微鏡下で細胞の状態を確認しておく。

ウェルに残っている気泡は、吸光度の値に影響するため、チップの先等で除く。

データの計算

1) サンプルと培地のみのブランクが培地のみの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のブランクの値が、培地のみの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。

$$\text{細胞生存率(\%)} = [(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{control}} - A_{\text{blank}})] \times 100$$

A_{sample} : サンプルの吸光度（細胞、サンプル液及びCell Counting Kit-8 溶液）

A_{control} : 陰性対照の吸光度（細胞及びCell Counting Kit-8 溶液（サンプル液なし））

A_{blank} : ブランク吸光度（培地及びCell Counting Kit-8 溶液（細胞なし））

3) 計算値をグラフにして結果を考察する。

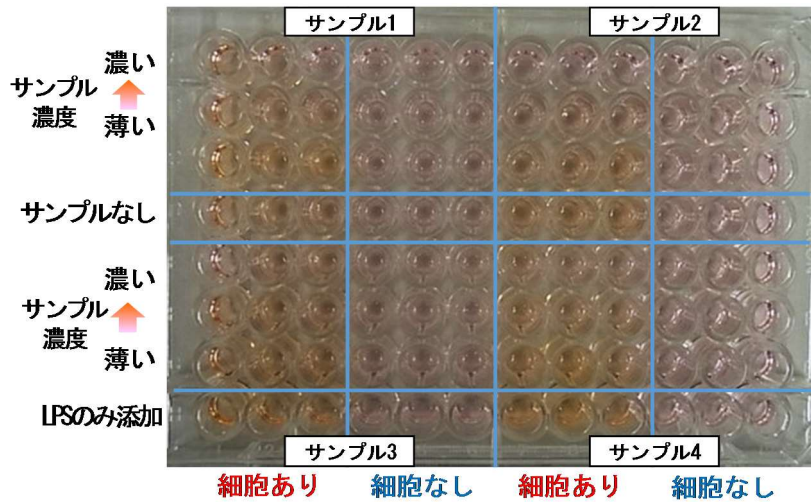


図2 4種類のサンプルについて、反復3、3点の異なる濃度で測定した例

10. TNFαの測定 (つづき)

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。発色が進み過ぎると、吸光度が高く、機器の測定上限を超えてしまうので注意が必要である。Stop Solution 添加後に青色→黄色に色調が変化する。

データの計算

- 1) スタンダード TNFα の測定値から検量線を作成し、各ウェルにおける TNFα 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 TNFα の産生抑制効果を検討する。

結果の例

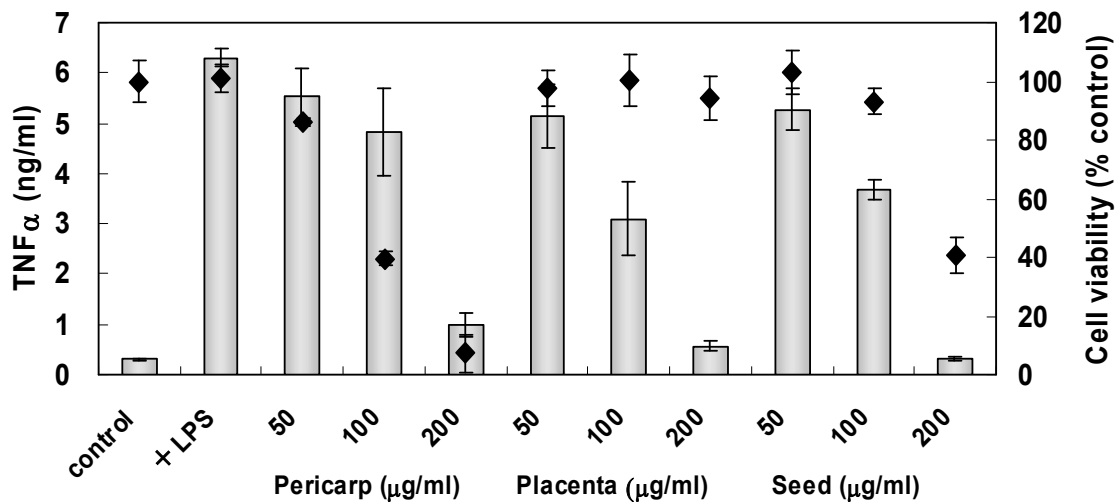


図3 ニガウリ胎座抽出物の RAW264.7 マウスマクロファージ細胞における TNFα 産生抑制効果³⁾

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 の産生抑制作用が認められた場合には、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⁴⁾。また細胞内シグナル伝達機構²⁾に基づき作用機構を検討する^{4,5)}。

【参考文献】

- 1) Toll-kije receptor signaling pathway, TNF signaling pathway, NF-kappa B signaling pathway. KEGG PATHWAY Database <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html> (Dec. 8, 2016)
- 2) G, Arango Duque, and A, Descoteaux, Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. 5, 491 (2014).
- 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、日食科工、53、408-415 (2006).
- 4) M, Kobori, H, Nakayama, K, Fukushima, M, Ohnishi-Kameyama, H, Ono, T, Fukushima, Y, Akimoto, S, Masumoto, C, Yukizaki, Y, Hoshi, T, Deguchi, M, Yoshida, Bitter gourd suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses. J Agric. Food. Chem., 56, 4004-11 (2008).
- 5) M, Kobori, M, Yoshida, M, Ohnishi-Kameyama, H, Shinmoto, Ergosterol peroxide from an edible mushroom suppresses inflammatory responses in RAW264.7 macrophages and growth of HT29 colon adenocarcinoma cells. Br. J. Pharmacol., 150, 209-19 (2007).