

## マクロファージによる免疫賦活作用評価

国立研究開発法人 農業・食品産業総合研究機構  
果樹茶業研究部門 物部 真奈美

### 【はじめに】

生体は様々な方法で外界からの病原体の侵入を防いでいるが、その一つに病原体などの異物を貪食して排除する方法がある。白血球のうち、好中球、マクロファージ、樹状細胞は生体内に侵入した微生物を貪食・殺菌・消化する働きがある。マクロファージは微生物を殺菌するだけでなく炎症性サイトカインやケモカインを産生し、末梢血から好中球などを局所に遊走させ異物の除去を促進させる。また、樹状細胞は異物を貪食した後リンパ節へ移動し、ナイーブ T 細胞を活性化させ、獲得免疫の形成に重要な役割を果たしている。さらに、マクロファージは死んだ細胞、老廃物などを除去するなど、組織における恒常性の維持にも重要な役割を果たしている。

本稿では、貪食関連分子を刺激する物質の探索などに利用可能な、蛍光ラッセクスビーズとフローサイトメーターを利用した貪食活性の測定法について紹介する。

### 【準備するもの】

#### 1. 実験器具・機器

- ・CO<sub>2</sub> インキュベーター
- ・クリーンベンチ
- ・フローサイトメーター
- ・クリーンベンチ
- ・アスピレーター(培地の除去に用いる)
- ・パストツールピペット(培地の除去に用いるため滅菌されたもの)
- ・滅菌メスピペット(5 ml、10 ml、20 ml 等)
- ・マイクロピペット
- ・マイクロピペットチップ(滅菌されたもの)
- ・炭酸ガスインキュベータ(5%CO<sub>2</sub>、37°C)
- ・遠心機(50 ml、15 ml、1.5 ml チューブ用、遠心加速度 150-1700 g)
- ・15 ml コニカルチューブ(滅菌されたもの)
- ・50 ml コニカルチューブ(滅菌されたもの)
- ・1.5 ml マイクロチューブ(滅菌されたもの)
- ・血球計算盤(改良ノイバウエル計算盤、ビュルケルチュルク計算盤等)
- ・セルカルチャーフラスコまたはディッシュ
- ・48 ウェル平底マイクロプレート
- ・マイクロプレートシェーカー
- ・40-50 μm のナイロンメッシュ

#### 2. 細胞

HL60(ヒト前骨髄性白血病由来細胞株):例 ATCC 番号:CCL-240

ここでは、HL60 を貪食細胞へ分化誘導した細胞を用いた方法を紹介するが、貪食能

を有する細胞株や腹腔マクロファージなどの生体から採取した細胞も利用可能。

### 3. 試薬

- ・基本培地:RPMI1640 培地 500 ml に、56°Cで30分間の加熱処理により非働化した牛胎児血清を50 ml 添加し、使用するまで冷蔵保存する。使用時は室温または37°Cに温めて使用する。
- ・HL60 分化誘導剤:Calcitriol はエタノールで溶解し、冷蔵保存。
- ・陽性対照:目的とする貪食関連分子を刺激する物質。例えばTLR4 活性化成分を探索したい場合は、TLR4 リガンド、例えばLipopolysaccharide を陽性対象にするとよい。
- ・蛍光標識ラテックスビーズ (例:2 μm YG ラベルラテックスビーズ POL09847 等):使用時に基本培地で1% (v/v)に希釈する。
- ・細胞固定剤:20倍濃度のPBS 50 ml にホルマリンを50 ml 添加したものを保存液とし、使用時に必要量を10倍希釈して用いる。
- ・フローサイトメトリー用緩衝液:500 ml のPBSにFBSを10 ml とアジ化ナトリウム(Na<sub>3</sub>N)0.5 gを添加し、使用時まで冷蔵保存する。

### 【プロトコール】

#### 1. HL60 細胞のマクロファージ様細胞への分化誘導

HL60 細胞は貪食活性を有していないため、マクロファージ様細胞へ分化誘導して使用する。

(以下の操作はクリーンベンチ内で行う)

- 1) 基本培地により継代培養した HL60 細胞の細胞数を、血球計算盤を用いてカウントし、 $1.0\text{--}2.5 \times 10^5$  cells/ml となるように基本培地で希釈する。
- 2) 希釈した細胞をセルカルチャーフラスコまたはシャーレに移し、カルシトリオールを最終濃度 120 nM になるように添加し、炭酸ガスインキュベータへ入れる。
- 3) カルシトリオール刺激後の細胞は、細胞数が  $1.0 \times 10^6$  cells/ml 以上にならないように、カルシトリオール含有培地で数日から1週間以上継代培養し、目的の貪食関連分子の活性が得られるようになったら貪食活性試験に使用する

#### 2. 貪食活性試験

- 1) カルシトリオール含有培地で1週間以上継代培養した細胞から、必要細胞数を50 ml または15 ml コニカルチューブに採取し、400 g で5分間遠心沈澱させ、上清を吸引除去後、 $1.0 \times 10^6$  cells/ml となるように基本培地で希釈する。必要細胞数は、48 ウェルマイクロプレートの1ウェルあたり  $2.5 \times 10^5$  cells/ml であり、1サンプルあたり3ウェルを使用する(n=3)ことを考慮してあらかじめ計算しておく。
- 2) 48 ウェル平底マイクロプレートへ、細胞数を調整した細胞浮遊液を1ウェルあたり250 μl ずつ添加する。
- 3) さらに、蛍光標識ビーズを1ウェルあたり25 μl ずつ添加する。
- 4) 最後に、サンプルを1ウェルあたり25 μl ずつ添加する。陰性対照のウェルにはPBSを25 μl ずつ添加し、陽性対照のウェルには、例えば、添加後の最終濃

度が  $1 \mu\text{g/ml}$  になるように濃度調整した LPS ( $12 \mu\text{g/ml}$ ) を  $25 \mu\text{l}$  ずつ添加する。

(以降の操作はクリーンベンチ外で行ってよい)

- 5) マイクロプレートシェーカーで 30 秒間振とう混和し、炭酸ガスインキュベーターへ入れる。
- 6) 16 h のインキュベーション後、各ウェルの細胞浮遊液を  $1.5 \text{ ml}$  マイクロチューブに移し、細胞を  $1700 g$  で 20 秒間遠心沈澱させ、上清を除去後、固定液を  $250 \mu\text{l}$  ずつ添加し、室温で 10 分間固定する。
- 7) 細胞の固定後、フローサイトメトリー用緩衝液を  $250 \mu\text{l}$  ずつ添加し、よく混和する。
- 8) フローサイトメーターの流路の詰まりを防ぐため、測定直前に細胞浮遊液を  $40\text{-}50 \mu\text{m}$  のナイロンメッシュに通した後分析を行い、蛍光ビーズを貪食した細胞の割合を測定する。図 1 に実際のヒストグラムを示す。

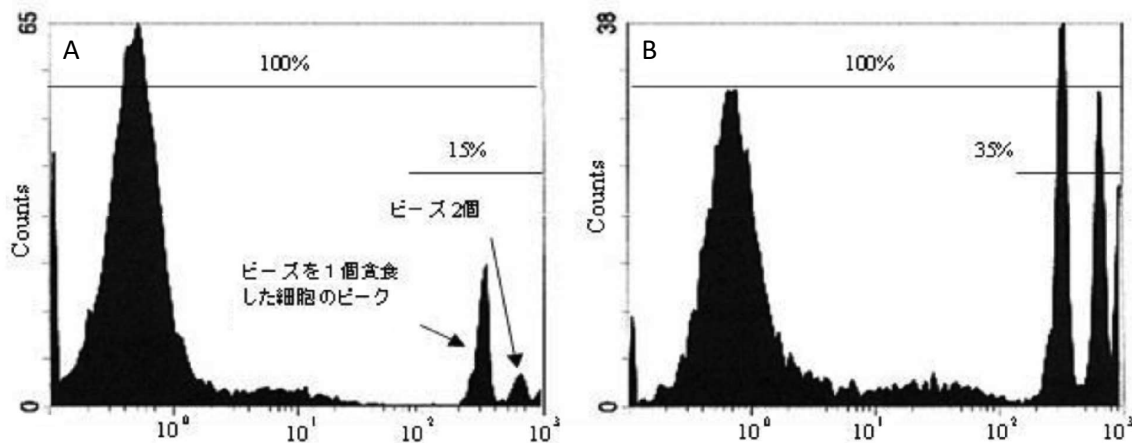


図 1 ヒストグラム例

LPS 刺激により得られた実際のヒストグラムである。A:LPS 刺激なし、B:LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) 刺激あり。縦軸は細胞数、横軸は蛍光強度を表している。LPS 刺激なし(A)に比べて LPS 刺激群(B)でビーズを 1 個、2 個、さらにそれ以上貪食している細胞数が増加している。

#### 【プロトコールのポイント・注意点】

##### 1. 貪食活性試験

- 1) 腹腔マクロファージを使用する場合など生体から採取した細胞を用いる場合、赤血球の混入をできるだけ減らす。
- 2) 供試物質を感知する貪食関連分子が発現していなければ活性の増強は得られない。マクロファージ様細胞へ分化誘導させた細胞を用いる場合は特に注意が必要。
- 3) 供試物質を感知する貪食関連分子が不明の場合、供試物質の添加前に各種貪食関連分子の活性阻害物質を加えるなどすることにより、供試物質を感知する貪食関連分子を絞り込むことが可能。

【参考文献】

- 1) Monobe, M., Ema, K., Kato, F., Hirokane, H. and Maeda-Yamamoto, M., Technique for screening immune-enhancing polysaccharides in food using, 25-dihydroxyvitamin D3-differentiated HL60 cells. J. Agric. Food Chem., 55, 2543-2547 (2007).