

## 7) マクロファージ様ヒト細胞を用いた貪食活性の評価

(独) 農研機構 野菜茶業研究所 物部 真奈美

### はじめに

生体の免疫システムにおいて重要な働きをするのが血液細胞の一種である白血球である。中でも、顆粒球やマクロファージ等の貪食細胞は、体内に侵入した微生物等の異物にいち早く反応し、異物を直接取り込み、分解・無毒化することにより、感染防御の役割を果たしている。この反応は、貪食細胞の表面にあるスカベンジャーレセプター、マンノースレセプター、Toll 様レセプター (Toll-like receptor: TLR) 等の様々なレセプターが異物の多糖体や核酸等を認識し、細胞が活性化されることにより起こる。貪食活性は生体の免疫システムにおける一次防御網 (自然免疫系) の 1 つであり、その活性化は生体防御の第一線としての働きに重要であるだけでなく、リンパ球により担われる獲得免疫系の起動にも重要な役割を果たす。

本項では、ヒト前骨髄性白血病由来細胞株 (HL60) の活性型ビタミン D (カルシトリオール) を用いた貪食細胞への分化誘導方法と、その細胞を用いた免疫賦活活性の評価方法について述べる。

### 準備するもの

#### 1. 実験器具

- ・フローサイトメーター (ベックマン・コールター社製 EPICS XL 等)
- ・クリーンベンチ
- ・アスピレーター (培地の除去に用いる)
- ・パストゥールピペット (乾熱滅菌したもの。培地の除去に用いる。)
- ・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 (滅菌済み, Falcon532095 等)
- ・50 mL コニカルチューブ (滅菌済み, Falcon532070 等)
- ・1.5 mL マイクロチューブ (オートクレーブ滅菌したもの)
- ・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 (細胞培養用の表面処理をしてい

ない浮遊細胞用)

- ・ 48 ウェル平底マイクロプレート (Falcon351178 等)
- ・ マイクロプレートシェーカー
- ・ ナイロンメッシュ (有限会社共進理工等)

## 2. 試薬

- ・ 基本培地：RPMI1640 培地 (GIBCO 等) 500 mL に、56°C、30 分間の加熱処理により非働化した牛胎児血清 (GIBCO 等) 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。
- ・ 分化誘導剤：Calcitriol (WAKO) はエタノールで溶解し、冷蔵保存。
- ・ 陽性対照：Lipopolysaccharide (LPS; CALBIOCHEM) は PBS で溶解し、冷蔵保存。
- ・ 蛍光標識ラテックスビーズ (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：PBS 500 mL に FBS を 10 mL とアジ化ナトリウム (NaN<sub>3</sub>) 0.5 g を添加し、使用時まで冷蔵保存する。

## 3. 細胞株

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

## プロトコール

以下の操作はクリーンベンチ内で行う。

### 1. HL60 細胞の貪食細胞への分化誘導

- 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、 $1.0 - 2.5 \times 10^5$  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 1 週間以上継代培養する。カルシトリオール含有培地で継代培養することにより、貪食細胞として約 1 ヶ月間の使用が可能である。

### 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への 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  $\mu$ L 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  $\mu$ L ずつ添加する。
- 4) 最後に、サンプルを 1 ウェルあたり 25  $\mu$ L ずつ添加する。陰性対照のウェルには PBS を 25  $\mu$ L ずつ添加し、陽性対照のウェルには、添加後の最終濃度が 1  $\mu$ g/mL になるように濃度調整した LPS (12  $\mu$ g/mL) を 25  $\mu$ 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 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 40-50  $\mu$ m のナイロンメッシュに通した後に分析を行い、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。

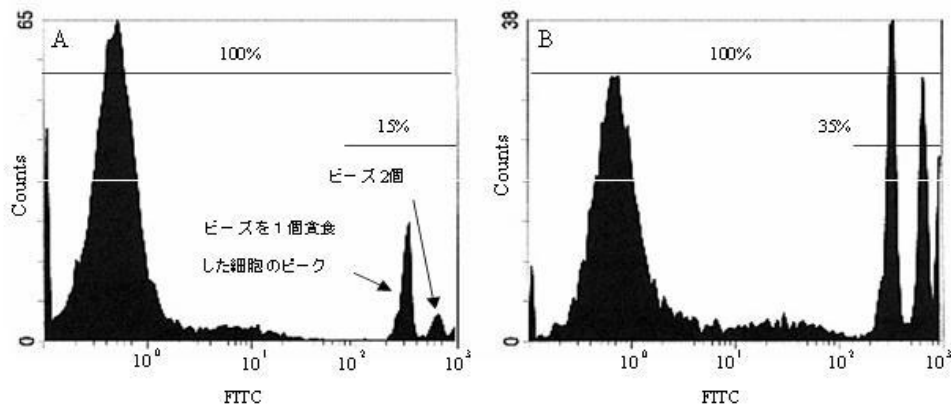


図 1 ヒストグラム例

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 $\mu$ 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、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。

## その他

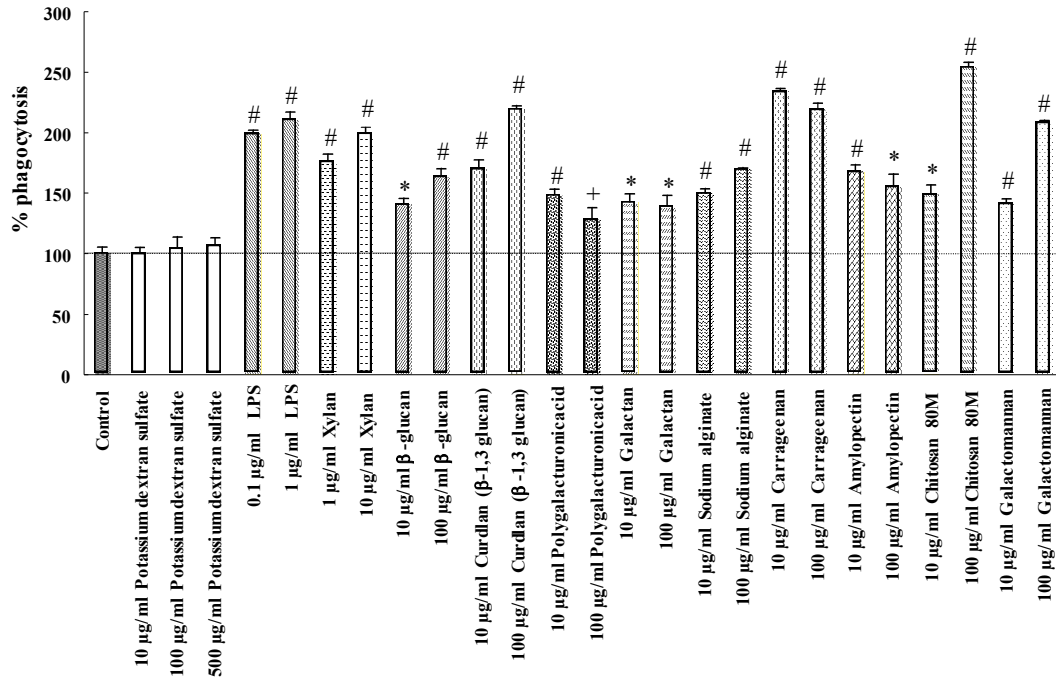


図 2 実施例

コントロールの貪食細胞率を 100%とした時の様々な多糖での活性値を示している。Potassium dextran sulfate (デキストラン硫酸カリウム) 以外の多糖は免疫賦活作用を持つことが報告されている物質である。平均値±SD (n = 3), コントロールに対する有意差: +  $p < 0.05$ , \*  $p < 0.01$ , #  $p < 0.001$

## 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).