

食品中の健康機能性成分の分析法マニュアル

平成22年3月作成 (H22. 5. 17修正)

四国地域イノベーション創出協議会
地域食品・健康分科会 編

s-food@m.aist.go.jp

アコヤガイの糖脂質の免疫活性の測定法

作成者：産業技術総合研究所 健康工学研究センター
生体機能評価チーム長 仲山 賢一

1. 糖脂質について

1. 1 概要

糖脂質はほぼ全ての生物がもっている複合分子であり、その構造は親水性の糖鎖と脂溶性の脂質部分からなっている。このため、糖脂質は水にも油にも溶けるとい性質を有している。生物に含まれているときには、主に細胞膜や原核生物では細胞壁に存在しており、様々な生理活性を担っている分子として知られている。特に真核生物に含まれる糖脂質は、セラミドを脂質成分とするものが広く知られており、人間においては、肌の保湿・バリア成分として主に知られておる他、神経系などに多く存在し、神経におけるシグナルの制御や、細胞の増殖制御に大きく関わっていることが明らかとなっている。その制御機構は糖鎖やセラミドにより様々であり、特に糖鎖の違いは顕著にその機能を買えることが知られてきている。また、ほ乳類においてはその糖鎖構造の多様性が知られており、様々な活性を持つと考えられている。

一般的に糖脂質は細胞膜に埋め込まれた状態で存在していることから、一部の食品以外では容易に吸収されない。従って、食品からの糖脂質の摂取はあまり期待できないのが一般的である。近年、食品残渣などから糖脂質成分の抽出を行い、これを添加物として使用することが盛んとなってきている。また、牛乳などの一部の食品は、糖脂質が多く含まれていることも知られている。さらに、多くの糖脂質が免疫系の活性の制御に関わることも知られてきていることから、個々の食品の糖脂質についてその免疫活性を測定することは、食品の付加価値を上げるためには重要であると考えられる。特に免疫系は腸管免疫を通して食品接種からの直接的な作用が見込まれることから、重要である。

1. 2 アコヤガイに含まれる糖脂質の機能性

糖脂質、特に真核生物に含まれるセラミドを脂質部分に持つスフィンゴ糖脂質は、概要にも書いたように肌に含まれるセラミド成分の供給源として、肌の保湿やバリア機能の強化を行うだけでなく、神経の調節や免疫活性の調節などが知られている。その多くの機能は、細胞膜に取り込まれることにより機能するため、有効にその機能を発揮させるためには、食品中の細胞より一度抽出することが重要となる。

いては免疫賦活活性が観察されたため、マウスへの影響が懸念されたので、主に培養細胞を用いた評価系でのみ評価する方法を述べる。

3. 1 準備する器具など

1. 96 穴プレート
2. クリーンベンチ
3. CO2 インキュベータ
4. マイクロタイタープレートリーダー
5. 遺伝子増殖計測システム(リアルタイム PCR)

[試薬]

1. DMEM
2. ウシ胎児血清
3. LPS
4. サイトカイン検出用 ELISA キット (TNF- α)
5. TaKaRa RNAiso
6. クロロホルム
7. イソプロパノール
8. 75%エタノール
9. SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR キット
10. ユニバーサルプロープライブラリー

3. 2 培養細胞を利用した免疫系評価法

1. マクロファージ様培養細胞(RAW264) を一つの well あたり 1×10^5 /200 μ l ずつ 96 well plate (平底) に必要 well 数用意する。評価する糖脂質 1 つあたり 3well 用意する。
2. 2 時間以上 37 $^{\circ}$ C にてインキュベートする。
3. 各 well の培地を捨てて、100 μ l ずつ新しい培地を入れる。
4. 残り 100 μ l 中に LPS(100ng/well) とアコヤガイの糖脂質を必要濃度に調整して各 well に加える。最終的に well あたり 200 μ l となるので、そのことを注意して調整する。
5. 24 時間培養後培養液 100 μ l を回収し、-20 $^{\circ}$ C にて保存。
6. 培地上清は各種サイトカインアッセイに用いる。

3. 3 mRNA 測定による免疫系評価方法

1. マクロファージ様培養細胞(RAW264) を一つの well あたり 1×10^7 /2ml ずつ 6 well plate (平底) に必要 well 数用意する。評価する糖脂質 1 つあたり 2well 用意する。
2. 2 時間以上 37 $^{\circ}$ C にてインキュベートする。
3. 各 well の培地を捨てて、1ml ずつ新しい培地を入れる。

4. 残り 1ml 中に LPS(1 μ g/well)とアコヤガイの糖脂質を必要濃度に調整して各 well に加える。最終的に well あたり 2ml となるので、そのことを注意して調整する。
5. 24 時間培養後培養液 500 μ l を回収し、-20 $^{\circ}$ Cにて保存。培地上清は各種サイトカインアッセイに用いる。
6. 残った培地上清を完全に取り除き、細胞を PBS で 1 回洗浄し、TaKaRa の RNAiso を 1ml 加える。細胞が剥離したところでピペットで回収し、エッペンドルフチューブへ移す。沈殿がある場合には沈殿がなくなるまでピペッティングを行う。
7. 室温で 5 分放置する。その後クロロホルムを 200 μ l 加えよく攪拌し、さらに室温で 5 分放置する。
8. 12,000 x g で 10 分間 4 $^{\circ}$ Cで遠心を行い、上清 500 μ l 回収する。これにイソプロパノール 500 μ l 加えてよく混ぜ、室温で 10 分間放置した後に 12,000 x g で 10 分間 4 $^{\circ}$ Cで遠心を行い RNA を沈殿させる。
9. 上清を捨て、75%冷エタノール 1ml を加えボルテックスで攪拌した後に、7,500 x g で 5 分間 4 $^{\circ}$ Cで遠心し上清を捨てる。その後室温で 10 分間乾燥させ、RNase-free water を 50 μ l 加えて溶解する。
10. インビトロジェン社の SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR キットを用いて 9. で取得した RNA を元に cDNA を合成する。
11. 10 で作成した cDNA を用いロッシュのユニバーサルプローブライブラリー#49 と TNF- α のプライマー (tctttctcattcctgcttgtgg および ggtctgggcatagaactga)を用いて RT-PCR を行い、TNF- α の定量を行う。定量値はコントロール(何も処理していないものおよび LPS だけで刺激したもの)の増幅開始点を比較することで行う。

4. 分析例

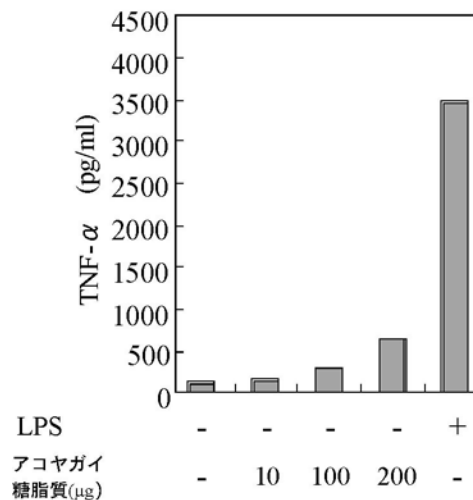


図 2 培養細胞を用いたアコヤガイ糖脂質の免疫系への活性測定

アコヤガイの糖脂質を加えたときに、TNF- α の量が上昇している。この上昇は LPS に比べるあまり大きくなく、炎症作用を起こすほどではないと判断される。比較的穏

和な免疫賦活作用があると思われる。ただしこの培養細胞を利用した免疫系評価法実験では、誤差範囲の確認ができなかったため、無添加とアコヤ貝糖脂質添加の間に有意差があると断言できない。

そこで、増幅 mRNA 測定を行う 3.3 の精度の高い免疫系評価装置を用いて、確認実験を行うことにした。表 1 にその結果を示す。

	TNF- α 増幅開始点
無添加	20.01
LPS 添加	16.16
アコヤガイ糖脂質添加	19.30

表 1 mRNA 測定による培養細胞を用いたアコヤガイの糖脂質の免疫系への影響

増幅開始点は早いほど mRNA の量が多いことを示している。アコヤガイ糖脂質を加えたときの TNF- α の生産量が無添加のものに比べると多いことが分かる。しかしながら、LPS 添加時に比べると増幅開始点はそれほど早くはないので、ここでも穏和な免疫賦活作用があるということが判断できる。

5. 分析上の留意、注意点

免疫系の指標となるサイトカインは、微妙な条件により、変動が激しく起こる性質を持つため、測定において不純物の混入による変動に注意が必要である。

－ 以上 －

[トップページに戻る](#)