

# 白血球における貪食活性評価法の確立とハーブが及ぼす影響

6年B組 初田 葵

指導教員 櫻井 昭

## 1. 要約

体を守るために働く免疫機能を、身近な食材によって向上させることを目指し、研究を行った。身近な食材としてハーブ3種類（タイム、セージ、スペアミント）を選択し、抽出液を作成した。次に、マウス由来のマクロファージ様細胞株 Raw264.7 にビーズを貪食させ、蛍光顕微鏡で観測、計測し、貪食作用の評価方法を確立した。この方法を用いて、5種類のサンプル(3種のハーブ抽出液、LPS、PBS)ごとのビーズの取り込み量を比較した結果、スペアミントの抽出液においては貪食作用の活性を確認することができたが、タイム、セージの抽出液では有意な差は認められなかった。

**キーワード** 貪食作用, マウス由来マクロファージ様細胞株(Raw264.7), ハーブ

## 2. 研究の背景と目的

風邪や感染症へのかかりやすさには免疫力が関係しているといわれている。生まれつき備わっている免疫機能だが、日々の生活習慣から免疫を高めることができることを知り、その働きについて興味を持った。特に、免疫力を高めるといわれている食材が実際に免疫力を向上させるのか、その仕組みや真偽を検証したいと考えた。体内にウイルスや細菌等の抗原が侵入してきた際、白血球はこれらを細胞内に取り込む食作用と呼ばれる働きにより排除する。この働きは自然免疫でも見られる反応であるが、B細胞やT細胞による獲得免疫を誘導し、重要な役割を果たしている。従って、白血球の食作用を向上させることで、免疫賦活活性を確認できる。また近年、免疫機能や生体防御機構に対する食品成分や野菜抽出物の効果が盛んに調べられている<sup>[1][2]</sup>。そこで本研究では、一般に免疫を高めるといわ

れている食材を、白血球に与えることにより、白血球の食作用を向上させることができるのではないかと考えた。そこで注目した食材が、ハーブである。ハーブは、古くから抗炎症作用、抗菌作用を持つものとして世界中で利用されている。中国では漢方としても用いられてきた歴史がある。ハーブの中でも比較的手に入りやすいタイム、セージ、スペアミント3種が免疫機能の要である白血球の食作用を活性化させるのか、その真偽を検証することにした。

## 3. 研究内容

### 3.1 研究材料

本研究に用いたマウス由来のマクロファージ様細胞株（以下、Raw264.7）は、関西医科大学の松田達志准教授から提供して頂いた。この Raw264.7 は 37℃の CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養し、2～3日に一回植え継ぎを行った。また、培養液にはダルベ

ツコ変法イーグル培養液（ニッスイ）500 mLに、3%グルタミン 5 mL、炭酸水素ナトリウム水溶液 5 mL、ペンシリン-ストレプトマイシン 5 mL、牛胎児血清（非動化済み）50 mLを添加し、使用するまで冷蔵保存した。使用時は室温に温めて使用した。

### 3.2 研究方法

#### 3.2.1 ハーブ3種（セージ、タイム、スペアミント）の成分抽出

ハーブ（セージ 1.8 g、タイム 1.7 g、スペアミント 1.3 g）を乳鉢ですりつぶし、40%程度のエタノール 10 mLに浸し、12日間暗所に置いた。このハーブ抽出液 2 mLと純水 60 mLをビーカーに入れ煮沸し、全量が半分～1/3ほどの量になるまで煮詰め、滅菌フィルターに通して殺菌した。これを抽出液とした。

#### 3.2.2 ハーブ抽出液の Raw264.7 に及ぼす影響

ハーブ抽出液を培養液に加え、**実験 3.2.1**の抽出液が Raw264.7 に及ぼす影響について調べた。細胞計算盤で細胞密度が  $3.4 \times 10^5 / \text{mL}$  になっていることを確認した培養液に、以下の2通りの濃度条件になるようにハーブ抽出液を加え、1晩インキュベーションした後、細胞の観察を行った。

条件1 培養液：ハーブ抽出液=10：1

条件2 培養液：ハーブ抽出液=1：1

条件1では細胞に影響がみられなかったが、条件2では細胞の破壊が起こったため、以後、条件1の濃度で実験を行うこととした。

#### 3.2.3 細胞数計測法の確立

1 mm×1 mmの格子をつけたシャーレに、継続培養した Raw264.7 培養液を 500

μL 加えた。1晩培養後、1マス分の細胞数を計測し、細胞計測盤で計測した細胞数との比較を行った。前者では細胞数  $2.3 \times 10^5$  個/500 μL、後者では細胞数  $2.9 \times 10^5$  個/500 μL となり、誤差 25%程度に収まった。

#### 3.2.4 蛍光標識ビーズを与えたときの Raw264.7 の経過観察

継続培養した Raw264.7 の細胞浮遊液をガラスボトムディッシュに 170 μL ずつ、5つ分注し、1晩培養した。その後、各々のガラスボトムディッシュの古い培養液を捨て、新しい培養液 200 μL、サンプル(表1) 20μL、蛍光標識ラテックスビーズ (0.1μm Phagocytosis Assay Kit, IgG FITC 500290) 0.4μL を添加した。全てのディッシュを2時間インキュベーションした後、観察を行った。

	サンプル
陽性対照	LPS ; Lipopolysaccharide, from E.coil 0111(by phenol extraction) 10μg/mL
陰性対照	PBS ; リン酸緩衝食水
ハーブ抽出液	タイム
	セージ
	スペアミント

表1 20μL ずつ添加したサンプル

陽性対照として先行研究<sup>4)</sup>により貪食作用の活性化が認められている LPS を用いた。同様に陰性対照として PBS を用いた。

#### 3.2.5 Raw264.7 のビーズ取り込み量の比較(2h)

本実験では、光学顕微鏡での観察を可能とするため、2.0 μm のラテックスビーズ (2.0μmPOL19814)を培養液で0.1%に希釈したものを用いた。培養液 1 mL の入ったディッシュに、継続培養した Raw264.7 の培養液をマイクロピペット 5～7 滴移し、1晩培養した。このディッシュから液体成分

のみを取り除き、新たに培養液 1 mL, サンプル 100  $\mu$ L, ラテックスビーズ 2  $\mu$ L を混合して添加した。2 h インキュベーションした後、ディッシュ内の細胞をランダムに選び、細胞が取り込んだビーズの総数をカウントした。

### 3. 2. 6 Raw264. 7 のビーズ取り込み量の比較 (18~20h)

本実験では、光学顕微鏡での観察を可能とするため、実験 3. 2. 5 と同様、2.0 $\mu$ m のラテックスビーズを用いた。培養液 1 mL の入ったディッシュに、継続培養した Raw264.7 の細胞浮遊液をマイクロピペット 5~7 滴移し、1 晩培養した。その後、このディッシュの液体成分のみを取り除き、培養液 1 mL で 2 回洗浄した。次に、培養液 1 mL, サンプル 100  $\mu$ L, ラテックスビーズ 2  $\mu$ L を混合した溶液を準備し、細胞を洗浄したディッシュに 1.1 mL 加えた。18~20 h インキュベーションした後、液体成分のみを取り除き、5% に希釈したホルマリン溶液 500  $\mu$ L を加え固定した。10 分後にホルマリン溶液を取り除き、PBS 1 mL を加えた。ディッシュの底面には 1 mm 四方の格子をレーザーで描いておいたため、この 1 mm 四方の枠の隣り合った 3 つを 1 セットとして、ランダムに選び、この 3 つの枠内にある細胞が取り込んだビーズの総数をカウントした。

## 4. 研究結果

### 4. 1 蛍光標識ビーズを与えたときの Raw264. 7 の経過観察結果

奈良女子大学理学部化学生物環境学科生物科学コースの保智己教授の指導の下、光学顕微鏡で観察を行った。その結果、細胞

内に蛍光標識ビーズを取り込む様子がみられた(図 1)。

しかし、光学顕微鏡での観察では細胞の表面等に蛍光標識ビーズが付着している可能性を否定できないため、合わせて共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。これにより、細胞内に蛍光標識ビーズが取り込まれていることを確認できた(図 2)。

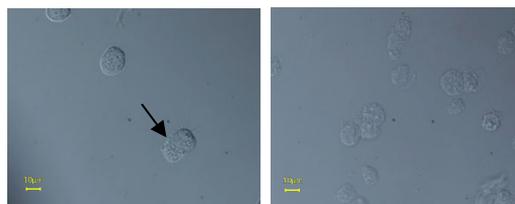


図 1 光学顕微鏡によるビーズ取り込み確認

左が蛍光標識ビーズを加えた時の Raw264.7 の光学顕微鏡写真であり、右が蛍光標識ビーズを加えなかった時のものである。矢印は、蛍光標識ビーズを示している。

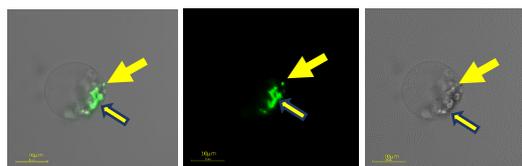


図 2 共焦点レーザー顕微鏡によるビーズ取り込み確認

左から、共焦点レーザー顕微鏡写真、蛍光顕微鏡写真、共焦点顕微鏡写真である。黄色太矢印が細胞表面の蛍光標識ビーズを示し、細矢印が細胞内の蛍光標識ビーズを示している。

### 4. 2. 1 Raw264. 7 のビーズ取り込み量の比較結果 (2h)

本校の光学顕微鏡において、Raw264.7 のビーズ取り込みを観察することができた(図 3)。

次に隣り合う 3 マス内の細胞が取り込んだラテックスビーズの総数をカウントし、細胞 100 個あたりのビーズ総数で比較した(表 2, 図 4)。

### 4. 2. 1 Raw264. 7 のビーズ取り込み量の比較結果 (18~20h)

実験は合計 5 回行った。細胞内に取り込んだビーズ量は、細胞 100 個あたりのビー

ズ総数で比較した(表 3, 図 5)。

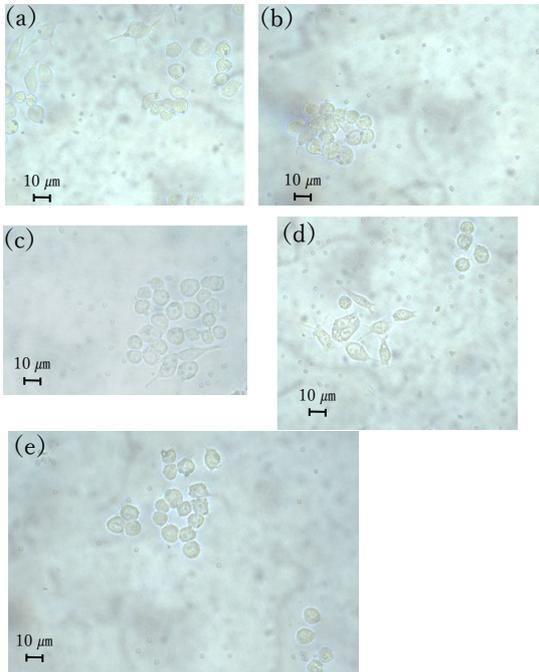


図 3 光学顕微鏡によるビーズ取り込み確認

(a) は LPS を加えた時, (b) は PBS を加えた時, (c) はセージの抽出液を加えた時, (d) はタイムの抽出液を加えた時, そして (e) はスペアミントの抽出液を加えた時の Raw264.7 の光学顕微鏡で撮影した写真を示している。

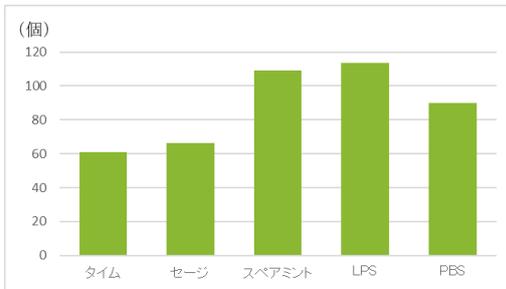


図 4 サンプルと細胞 100 個あたりのラテックスビーズ食数

縦軸はラテックスビーズの総数。横軸は各サンプルを示す。

タイム	60.7
セージ	66.4
スペアミント	109.1
LPS	113.5
PBS	89.7

表 2 2h インキュベーションさせた時のサンプルと細胞 100 個あたりのラテックスビーズ食数

	①	②	③	④	⑤
タイム	364.7	460	439	487.3	493.1
セージ	417.1	366.7	613.8	470.8	401.7
スペアミント	400	547.8	473.4	628	489.6
LPS	507.3	839.1	416.7	571.7	385.7
PBS	200	300	554.5	398.4	452.7

表 3 18~20h インキュベーションさせた時のサンプルと細胞 100 個あたりのラテックスビーズ食数

①~⑤は実験回数を示している。

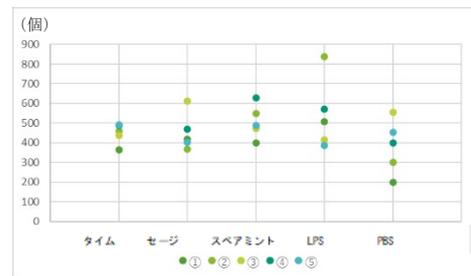


図 5 サンプルと細胞 100 個あたりのラテックスビーズ食数

縦軸は、細胞 100 個あたりのラテックスビーズ数を示している。①~⑤は実験回数を示している。

## 5. 考察

全てのサンプルにおいて、長時間インキュベーションするほど細胞 100 個あたりのラテックスビーズの食数が多いことから、2 時間~18 時間では Raw264.7 の食食活性が維持されると考えられる (表 2, 表 3)。

実験結果 4.2.1 において LPS (陽性対照), PBS (陰性対照) に対する t 検定を行った結果,  $p = 0.075 > 0.05$  となり, 有意差が認められなかった。また, ③⑤では, 陽性対照の LPS よりも陰性対照の PBS のビーズ取り込み量が多くなるというイレギュラーな結果となっていると言える(表 3)。そこで, ③と⑤の結果を外れ値と考え, ①, ②, ④の結果をもとにグラフを作成すると, 図 6 が得られた。



図6 外れ値を除いた、サンプルと細胞 100 個あたりのラテックスビーズ貪食数

縦軸は、細胞 100 個当たりのラテックスビーズ数を示している。①、②、④は実験回数を示している。

LPS (陽性対照)、PBS (陰性対照) に対する t 検定の結果、 $p = 0.029 < 0.05$  から有意差が認められた。タイム、PBS では、 $p = 0.063 > 0.05$  から有意差が認められなかった。スペアミント、PBS では、 $p = 0.032 < 0.05$  から有意差が認められた。セージ、PBS では  $p = 0.082 > 0.05$  から有意差が認められなかった。

各サンプルの PBS との有意差を t 検定により検討すると、スペアミントは Raw264.7 の貪食作用を活性化させると考えられる。しかしタイム、セージに関しては、図 6 より概ね同様の傾向がみられるが、有意差は確認することができなかった。

細胞にラテックスビーズを貪食させ、計測させる一般的な方法として、フローサイトメトリー法を用いたものがある<sup>[4][5][6]</sup>。

しかし、この方法は多額の費用を必要とし、調整操作による誤差といった様々な誤差が発生する可能性がある。本研究によって、これらの誤差を極力省き、蛍光顕微鏡下で可視化した貪食活性の評価が可能となった。また、ビーズにより貪食活性を調べる際、見かけ上の貪食があることが問題とされる<sup>[5]</sup>。今回の手法では、インキュベーション後に細胞を 2 回洗浄することにより、貪食されず表面に付着しているビーズが計測されることを防ぎ、実際に貪食されたビーズのみを計測できるようにした。そして、

測定精度をより向上させるためには、貪食数が上昇しない飽和状態で測定を行うことが必要だと考えられる。そのため、インキュベーション 18h 以上を設定した実験を行い、最適な培養時間の検討を行う必要がある。

## 6. 今後の課題

セージ、タイムのサンプルで有意差が認められなかった要因は、濃度条件が適切でなかったことが考えられる。つまり、この 2 種のハーブが細胞に影響を及ぼすほどの濃度ではなかったか、もしくは影響を与えすぎる濃度だったかもしれない。これらの真偽を検証し、ハーブ 3 種が最も貪食作用を活性させる濃度を明らかにする必要がある。そのためには、抽出液の濃度条件を変え、複数の濃度条件で実験する必要がある。また、ハーブ抽出液の溶媒として用いた蒸留水には、エンドトキシンを除去するためのフィルターがついていなかったため、エンドトキシンの影響が否定できない。エンドトキシンが除去された純水を用いて追試を行い、エンドトキシンの影響の有無についてもさらなる調査が必要である<sup>[7]</sup>。

LPS は、マクロファージ様細胞の細胞膜表面にある TLR4 というセレプターに結合することにより、貪食作用を活性化させる。つまり、LPS が貪食作用を活性化させるメカニズムには、その構造が関係している<sup>[8]</sup>。今回サンプルとして用いたハーブについても、成分分析を行い、TLR4 に結合する構造をしているのかどうかなど、分子メカニズムを解明したい。

本研究の結果と同様の傾向がヒト細胞においても得られれば、免疫機能を向上させ

ることを目的とした食品や薬品等へ応用できると考えられる。

## 7. 謝辞

本研究を進めるにあたり、奈良女子大学理学部の保智己教授、安田恵子教授、渡邊利雄教授に多大なるご助言をいただきました。また、関西医科大学松田達志准教授には、細胞提供とともに、研究方法に関するアドバイスを頂きました。この場を借りて深く感謝申し上げます。

## 8. 参考文献

- [1] Shihoko Kaku, Koji Yamada, Nasra Hassan, Takashi Watanabe & Michihiro Sugano, Effect of Vegetable Extracts on Immunoglobulin Production by Mesenteric Lymph Node Lymphocytes of Sprague-Dawley Rats, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 1997
- [2] 川村博幸・瀬野公子・熊谷武久・渡辺紀之・八巻幸二・津志田藤二郎, 日本食品科学工学会誌, 乳酸菌体成分および野菜抽出物のラットマクロファージ貪食能に対する効果, 2000年
- [3] 物部真奈美, 平成19年度農林水産省補助事業食品機能性評価マニュアル集第II集, マクロファージ様ヒト細胞を用いた貪食活性の評価, 平成19年
- [4] 山脇克広・辻田美香子・橋本美保・米田昭代・木戸口とも子・赤塚尚美・西山和弘・藤原卓・庵原俊昭・神谷齊, 医療, ぶどう球菌, 大腸菌標準株を刺激物質に用いたフローサイトメトリー法による顆粒球機能検査, 1991年
- [5] 岩崎秀生・林正敏・湯沢賢治・大塚雅昭・深尾立・岩崎洋治・中沢正樹, 日本臨床免疫学会会誌, フローサイトメーターを用いた末梢血Leu-M3陽性細胞の貪食能の測定, 1988年
- [6] Steinkamp, J. A., Wilson, J. S., Saunders, G. C., Stewart, C. C.: Phagocytosis: Flow Cytometric Quantitation with Fluorescent Microspheres. *Science*, 215: 64-66, 1982
- [7] 岸本武利・山上征二・丹羽允・前川正信, 日本透析療法学会雑誌, 透析とエンドトキシン (ET), 1989年
- [8] Kensuke Miyake, Endotoxin recognition molecules, Toll-like receptor 4-MD-2, *Seminars in Immunology* 16:11-16, 2004

