

生物学に関する実験例 — 生化学/医療に関する実験例

In vitro 実験

1) Caco-2 細胞層での薬物の膜透過性試験 (^3H 化合物、 ^{14}C 化合物等)

[目的・原理]

薬物のヒトにおける経口吸収率をin vitroから予測する実験系として、Caco-2細胞を用いた透過性試験が実施されている。Caco-2細胞はヒト結腸癌由来の細胞株で、培養すると小腸上皮細胞に似た単層の細胞層を形成する。さらに薬物を細胞内から内腔側 (apical側) に排出するP-glycoprotein (P-gp) などのトランスポーターも発現していることが知られている。この細胞をトランスメンブレン上で培養し、apical側に薬物を添加し、基底膜側 (basal側) の溶液をサンプリングすることにより、以下の式に従って見かけの透過係数 (P_{app}) を算出する。このような実験において評価した P_{app} は、多くの薬物においてヒト経口吸収率と相関することが明らかとなっている。

$$P_{app} \text{ (cm/sec)} = (dQ/dt) / (C_0 \times S)$$

dQ/dt: 透過速度 (単位時間あたりにbasal側に出現する薬物量 nmol/sec)

C_0 : Apical 側の薬物の初濃度 ($\mu\text{mol/L}$)、S: 単層膜の表面積

[準備]

実験器具・機器:

マイクロピペットおよびチップ (各種)、アスピレーター、24well 平底プレート、トランスウェルメンブレン (上記平底プレートに適合するもの)、バイアル瓶、液体シンチレーションカウンター、 CO_2 インキュベーター、プレートシェーカー、恒温槽、pH メーター、経上皮電気抵抗測定装置、電子天秤、純水製造装置

試薬:

Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)培地 (非働化した FBS10%、ペニシリン-ストレプトマイシン含有)、Hank's balanced salt solution(HBSS)、

4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethansulfonic acid(HEPES)、BSA、グルコース、PBS(-)、シンチレーションカクテル (HIONIC-FLUOR)、

^3H]atenolol 溶液 (第一クラリティ MT-1724)

^3H]propranolol 溶液 (パーキンエルマーNET515)

^{14}C]mannitol 溶液 (第一クラリティ MC-203) 等、

水酸化ナトリウム、塩酸、DMSO、trypsin-EDTA 液、エタノール

[操作]

[A] Caco-2 細胞の単層培養

- (1) Caco-2 細胞はフラスコ (75cm²) を用い、37°C、CO₂ 濃度 5%のインキュベーター内で培養する。(詳細な培養法については成書を参照のこと。2~3 日ごとに培地を交換し、継代はコンフルエントに達する前に行なう。)
- (2) 上記フラスコ内の培地を廃棄する。
- (3) 10mL の PBS(-)をフラスコに添加し、細胞表面を洗浄する。(1 回)
- (4) 37°C設定の恒温槽内で加温した trypsin-EDTA 液 5mL をフラスコに添加。
- (5) 3 分程度静置した後、フラスコを軽く叩き、細胞を剥離する。
- (6) フラスコに培地 10mL を添加して細胞を懸濁し、50mL 遠心チューブに回収する。
- (7) フラスコを培地 10mL で洗浄して、上記 50mL 遠心チューブに回収する。
- (8) 生細胞数を計測し、24well のトランスウェルの膜上に 5.0×10⁴cells/well の濃度で播種する。
- (9) 37°C、CO₂ 濃度 5%のインキュベーター内で 2~3 日ごとに培地を代えながら培養し、播種後 21~23 日経過したものを実験に使用する。

[B] 緩衝液、被験薬液の調製

- (1) HBSS/HEPES 緩衝液 : HBSS 1000mL に対しグルコース 2.504g および HEPES 2.383g の割合で加えて溶解する。Apical 側の緩衝液は、1mmol/L の塩酸を少量滴下して pH6.5 に調整する。Basal 側の緩衝液は、HBSS/HEPES 緩衝液 10mL に対し、BSA を 0.4g の割合で加えて溶解し、1mmol/L の水酸化ナトリウムで pH7.4 に調整する。
- (2) Atenolol, propranolol 等は、まず DMSO に溶解して 0.5mmol/L 溶液とする。次に HBSS/HEPES 緩衝液で最終濃度が 1µmol/L (DMSO 濃度 0.2%) となるよう調整する。それぞれの ³H 標識化合物は、比放射能や透過性を考慮し、あらかじめ適量をガラスバイアルに添加し、窒素気流下で溶媒を乾固する (³H]の原液を 1000 倍希釈する。))。
- (3) [¹⁴C]mannitol 溶液は、90%エタノール溶液を 5µL 採取し、窒素ガスを吹き付け乾固し、HBSS/HEPES 緩衝液 (0.2%DMSO 含有) を 8.5mL 加えて溶解する (mannitol 最終濃度 1µmol/L, DMSO 濃度 0.2%)。

[C] 膜透過性の測定

- (1) Apical 側の培地を吸引によって取り除いた後、37°Cに加温した HBSS/HEPES 緩衝液 (0.2%DMSO 含有) を 300 μ L 添加し、basal 側にも HBSS/HEPES 緩衝液 (0.2% DMSO 含有) 1000 μ L に置換する。その後、37°Cで 30 分間プレインキュベーションする。
- (2) プレインキュベーションの後、経上皮電気抵抗測定装置 (例: Milli-cell ERS) を用いて膜抵抗値を測定する。300 Ω ×cm² 以下のものは除外する。
- (3) Apical 側の HBSS/HEPES 緩衝液を吸引によって取り除いた後、37°Cに加温した適量の ³H 標識化合物を含む atenolol、propranolol または [¹⁴C]mannitol 溶液を 300 μ L 添加する。
- (4) 続いて basal 側の HBSS/HEPES 緩衝液 (0.2%DMSO 含有) も新しい 1000 μ L に置換する。その後、37°Cで 0.5、1、1.5 および 2 時間インキュベーションする。
- (5) 0.5、1、1.5 および 2 時間における apical 側および basal 側の緩衝液を各々 10 μ L 及び 300 μ L ずつ採取し、バイアル瓶に移す。各時点において、basal 側は新鮮な HBSS/HEPES 緩衝液 (0.2%DMSO 含有) 1000 μ L に交換する。apical 側は液量を一定にするために、新鮮な HBSS/HEPES 緩衝液を 10 μ L 添加する。
- (6) 測定用試料を採取したバイアル瓶にシンチレーションカクテルを 3mL ずつ添加して、液体シンチレーションカウンターにより 5 分間測定する。
- (7) バックグラウンドとして、バイアル瓶にシンチレーションカクテルのみを 3mL 添加したものを液体シンチレーションカウンターにより 5 分間測定する。
- (8) 細胞内に残存する放射能を測定する場合、(5) で apical 側の緩衝液を除去した後のトランスウェルに、1mol/L 水酸化ナトリウム 150 μ L を添加し、37°Cで 30 分間インキュベーションすることによって細胞を可溶化する。1mol/L 塩酸 150 μ L を添加することによって中和し、全量をバイアル瓶に採取する。シンチレーションカクテルを 3mL ずつ添加して、液体シンチレーションカウンターにより 5 分間測定する。
- (9) (Apical 側、細胞内、) basal 側の放射能から各時点の透過薬物量を求め、プロットの直線領域の傾きから透過速度を算出する。

[考察への手引き]

P_{app} を求める式は、basal 側の薬物量は直線的に増加するという仮定に基づいている。しかし、薬物によって apical 側に添加してから basal 側に出現するまでに lag time が存在したり、basal 側の薬物濃度が直線的な増加の後、頭打ちになったりする場合がある。このようなケースの要因として考えられることは何か。

2) 正常ヒト肺繊維芽細胞 (NHLF) での DNA 合成能の測定

[目的・原理]

細胞が増殖するためには、DNA の合成が必要である。その量的な増加は、分裂によって増加する細胞の増殖を反映するパラメータの一つである。適当な増殖因子、サイトカインやホルモン等を共存させることによって、それらの物質が細胞の増殖に及ぼす影響を定量的に評価することができる。本実習では DNA の原料であるチミジンを標識した [methyl-³H] thymidine の取り込みを指標として、NHLF における DNA 合成能を測定する方法について述べる。

[準備]

実験器具・機器：

マイクロピペットおよびチップ (各種)、アスピレーター、ディスポーザブルピペット (各種)、電動ピペッター、連続分注器およびコンビチップ、細胞培養用フラスコ (75cm²)、50ml および 15ml 遠心チューブ、96well 平底プレート、バイアル瓶、遠心分離機、液体シンチレーションカウンター、CO₂ インキュベーター、プレートシェーカー、恒温槽

試薬：

DMEM 培地 (非働化した FBS10%含有)、trypsin-EDTA 液、PBS(-)、クリアゾル I (またはクリアゾル II)、[methyl-³H]thymidine 溶液 (パーキンエルマー-NET-027E)、トリクロロ酢酸 (TCA)、水酸化ナトリウム、塩酸、メタノール、TGFβ1、angiotensin II、アルドステロンなど適当な増殖刺激物質

[操作]

[A] NHLF プレートの調製

(1) NHLF をフラスコ (75cm²) に培養する。培養法については成書を参照のこと。

実験に使用する細胞は 6~8 継代程度が適当。

(2) 上記フラスコ内の培地を廃棄する。

(3) 10ml の PBS(-)をフラスコに添加し、細胞表面を洗浄する。(2 回)

(4) 37°C設定の恒温槽内で加温した trypsin-EDTA 液 5ml をフラスコに添加。

(5) 3 分程度静置した後、フラスコを軽く叩き、細胞を剥離する。

(6) フラスコに培地 10ml を添加して細胞を懸濁し、50ml 遠心チューブに回収する。

(7) フラスコを培地 10ml で洗浄して、上記 50ml 遠心チューブに回収する。

- (8) 220g, 25°Cで5分間遠心分離する。
- (9) 上清を除去し、ペレットを培地 4ml で再懸濁する。
- (10) 細胞数を計測し、培地を加えて 1.25×10^5 cells/ml の細胞懸濁液を調整する。
- (11) 96 穴平底プレートに上記細胞懸濁液を 80 μ l/well で播種する (1×10^4 cells/well)。
- (12) 37°C、CO₂ 濃度 5%のインキュベーター内で 24 時間培養する。

[B] 細胞増殖刺激（阻害）物質の添加およびチミジン取り込み

- (1) 24 時間培養したプレートに、増殖刺激物質を溶解した培地を 20 μ l/well 添加し、プレートシェーカーで混和後、37°C、CO₂ 濃度 5%のインキュベーター内で 24 時間培養する。無刺激群は培地のみ 20 μ l/well 添加する。（添加物の最終濃度の例 ...TGF β 1:5ng/ml、angiotensin II:10⁻⁶M、アルドステロン:10⁻⁷M）
- (2) 増殖刺激物質または培地を添加した 21 時間後（細胞回収の 3 時間前）に、培地に 3.7kBq/ μ l に調整した [methyl-³H]thymidine を 10 μ l/well 添加する。（37kBq/well）
- (3) 増殖刺激物質または培地を添加した 24 時間後、プレート内の培地を廃棄し、PBS(-) で数回洗浄する。
- (4) メタノールを 150 μ l/well 添加して 5 分静置。（2 回）
- (5) メタノールを除去して蒸留水でリンスした後、5%TCA を 10 μ l/well 添加して 10 分静置。再度、5%TCA を 10 μ l/well 添加して 10 分静置。
- (6) 0.3N 水酸化ナトリウム溶液を 150 μ l/well 添加し、それぞれ全量をバイアルに移す。
- (7) バイアルごとに 4.5N 塩酸を 10 μ l、クリアゾルを 3ml 添加し、液体シンチレーションカウンターで計測する。

[データ処理ほか追記]

- (1) 無刺激群のカウントを 100%として、増殖刺激（阻害）物質によるカウントを比較する。
- (2) 測定値は複数の well の値を平均して求める。3 well を一組とした場合、1 プレートで無刺激群のほかに最大 31 群の刺激物質の種類や濃度を比較することができる。
- (3) ³H の下限数量が 1GBq であることから、（使用核種が 1 種類で、ほかに使用しない場合）1 回の実験でプレート 280 枚までスケールを拡大することが可能。多数のプレートを処理する場合は、マルチチャンネルピペット、グラスフィルタープレート、セルハーベスター、送風定温乾燥機、（液体シンチレーションカウンターの代わりに）マイクロプレートシンチレーションルミネッセンスカウンター（Top count あるいは マイクロ β II 等）といった機器を用いると効率的である。

- (4) その場合、[methyl-³H]thymidine 取り込み終了後、プレート内の培地を廃棄し、PBS(-) で洗浄、trypsin-EDTA で細胞を剥離して、セルハーベスターを用いてグラスフィルタープレートに回収する。
- (5) グラスフィルタープレートに蒸留水を通してフリーの[methyl-³H]thymidine を除去し、送風定温乾燥機で乾燥。専用のシンチレータを添加した後、マイクロプレートシンチレーションルミネッセンスカウンターを用いて計測する。

[考察への手引き]

- (1) 測定値に影響する因子には、事例以外どのようなものがあるかを調査する。
- (2) 種々の薬品の毒性や増殖増強作用について評価する実験例をデザインする。