

[成果情報名] 破骨細胞への分化抑制効果を評価する簡易手法の開発

[要約] 破骨細胞へ分化誘導した破骨前駆細胞の培養上清を用いて、破骨細胞の分化マーカーを簡易に測定することができる。この方法を用いることにより、多検体の分化抑制効果を簡易に低コストで評価できる。

[キーワード] 破骨細胞、破骨前駆細胞、分化抑制効果

[担当] 三重県農業研究所 フード・循環研究課

[分類] 研究

[背景・ねらい]

消費者の健康志向の高まりを背景に、品種改良や栽培方法等で機能性を高めた機能性農産物が注目されている。本研究では、農産物の機能性について、機能性成分の含有量やその効果の強さを総合的に評価し、体内に摂取した際に得られる骨代謝改善効果が高い素材のスクリーニングすることを目的に、培養細胞系を用いて簡易かつ低コストに多検体を評価できる方法の検討を行った。

[成果の内容・特徴]

1. 破骨細胞へ分化誘導したマウスマクロファージ様細胞 RAW264 の培養上清を用いることで、破骨細胞の分化マーカーである酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) の活性を、基質 *p*-ニトロフェニルリン酸 (*p*-NPP) による比色法により簡易に測定することができる。
2. さらに、96well マイクロプレートに細胞を播種し、破骨細胞への分化誘導を行うと同時に機能性を調査したい試料を添加する。これにより、検定試料が多数であっても破骨細胞への分化抑制効果を評価できる。
3. 本法は、市販酵素活性測定キット、あるいは汎用的に用いられる遺伝子発現解析法や染色法による TRAP 活性評価と比較し、低コストで多サンプルの評価が可能であり、効果の期待される機能性成分の予備的な選抜手法として適している。

[成果の活用面・留意点]

1. 供試する試料は細胞に対する毒性をあらかじめ調査し、細胞毒性のない濃度の範囲内で添加する必要がある。
2. 細胞の状態や継代数により誤差が生じる場合があるため、複数の反復をとることが必要である。

[具体的データ]

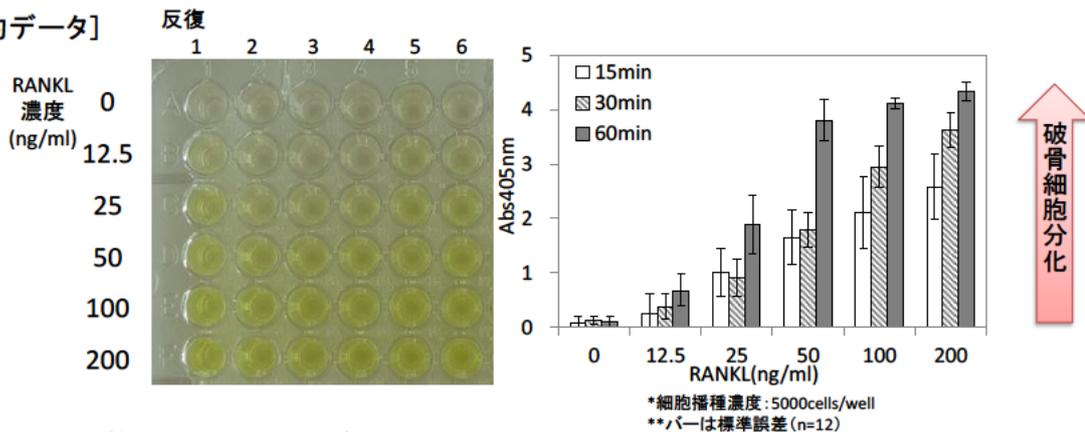


図 1.培養上清を用いた比色法による TRAP 活性測定

RANKL 濃度,呈色反応時間と吸光度の関係 (細胞播種濃度: 5,000cells/well)

注) RANKL (Receptor activator of NF- κ B ligand) : 破骨細胞への分化を誘導するサイトカイン

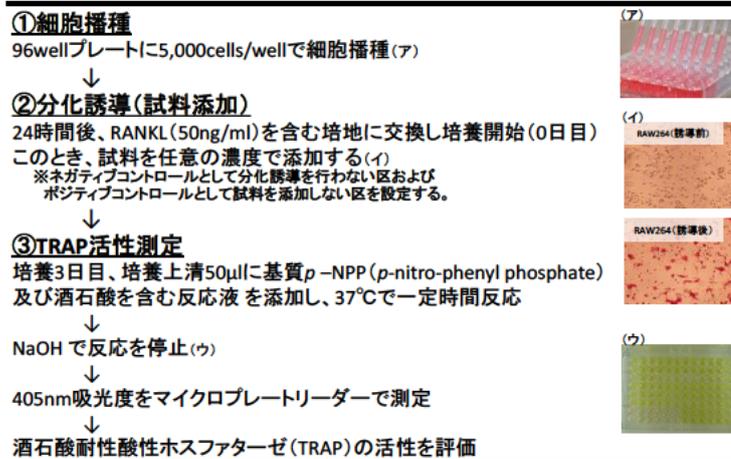


図 2. 破骨細胞分化抑制効果の簡易評価法の操作手順

表 1. 破骨細胞分化抑制効果 (TRAP 活性) 評価法の比較

	【本法】 培養上清 を用いた 簡易評価	市販酵素 活性測定 キット	遺伝子発 現解析	TRAP染色
培養期間	3日	3~5日	3日	5~7日
培養 プレート	96well	96well	12well	任意
測定機器	マイクロ プレート リーダー	マイクロ プレート リーダー	リアルタイムPCR	目視
1検体あたりのコスト	30円	85円	数千円	50円
定量性	○	○	◎	×

(執筆者氏名) 藤田 絢香

[その他]

研究課題名: 健全な骨の維持に! 高機能性かんきつを創る

予算区分: 競争的資金 (岡三研究助成)

研究期間: 2014 年度

研究担当者: 藤田 絢香、松田 智子、橋爪 不二夫