

厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

ヒト抹消血誘導型ミクログリア細胞技術を用いた食品の神経毒性評価システムの開発

分担研究報告書

ミクログリアのカルシウムイメージング実験系の構築

研究分担者 原口 祥典 佐賀大学 研究員

**研究要旨**

カルシウムイメージングとは、細胞内カルシウムの流動を測定し、活動中の細胞内のカルシウムシグナリングを直接観察する手法である。カルシウムシグナリングは、神経伝達物質やホルモンなどの分泌、筋肉の収縮など生命や健康の維持に関与している。つまり、カルシウムイメージングを行うことで、細胞が健康な状態かを判断することが可能となる。一方、カルシウムイメージングは、特殊な機器と豊富な経験が必要な実験系である。特に、細胞ごとに実験条件の検討が必須であり、試薬の負荷時間やバッファ類の塩濃度などを最適化する必要がある。

初年度である本年は、来年度以降の実験に向けて、カルシウムイメージング実験系の構築を行った。

カルシウムイメージング実験系のポジティブコントロールとして用いられる ATP およびインターフェロニン $\gamma$  で実験系が構築できたことを確認した。本年度の成果により、次年度以降の実験はスムーズに実施可能となった。

**A. 研究目的**

カルシウムイメージングとは、細胞内カルシウムの流動を測定し、活動中の細胞内のカルシウムシグナリングを直接観察する手法である。カルシウムシグナリングは、神経伝達物質やホルモンなどの分泌、筋肉の収縮など生命や健康の維持に関与している。つまり、カルシウムイメージングを行うことで、細胞が健康な状態かを判断することが可能となる。

従来は、ニューロンのカルシウムイメージングが生理学的実験手法の代表例として広く研究されてきたが、近年、ミクログリアのカルシウムイメージングも重要な研究手法の 1 つとされている（工藤佳久、歯薬療法、2017）。

その一方で、カルシウムイメージングは、高感度の検出器、蛍光顕微鏡、灌流装置、高性能ワー

クステーション、暗室、2 波長切り替え式フィルターなどの特殊な機器が必要で、手技的にも経験が必要な実験系である。特に、細胞ごとに実験条件の検討が必須であり、試薬の負荷時間やバッファ類の塩濃度などを最適化する必要がある。

本年度は、来年度以降の実験に向けて、カルシウムイメージング実験系の構築を行った。

**B. 研究方法**

カルシウムイメージングは、Fura-2AM 試薬を用いて、2 波長励起蛍光顕微鏡を用いて測定を行った。ミクログリア細胞を  $2 \times 10^4$  cells/ml でガラスボトムディッシュに播種し、翌日、Fura-2AM 試薬を 5 $\mu$ M で 30 分間の染色を行った。その後、

顕微鏡にセットし、バッファの灌流を行った。カルシウムイメージングは、Ratio Imaging による細胞内カルシウム濃度測定を行った。カルシウムイメージングのポジティブコントロール（実験が正しく行われているかの検討）として、ATP およびインターフェロン $\gamma$ を用いた反応を測定した。

（倫理面への配慮）

本研究は、マウスの株化細胞を用いているため、倫理面において特筆すべき事項は存在しない。

### C. 研究結果

ミクログリア細胞株を用いたカルシウムイメージングの条件検討を行い、Ratio Imaging による測定に成功した（図 1）。条件検討の結果、Fura-2AM は  $5\mu\text{M}$ 、30 分の染色が最適条件であることが明らかとなった。また、バッファ組成（ $150\text{mM NaCl}$ ,  $5\text{mM KCl}$ ,  $2\text{mM CaCl}_2$ ,  $1\text{mM MgCl}_2$ ,  $10\text{mM glucose}$  and  $10\text{mM HEPES}$ , pH 7.4 with Tris-OH）も確立することに成功した。

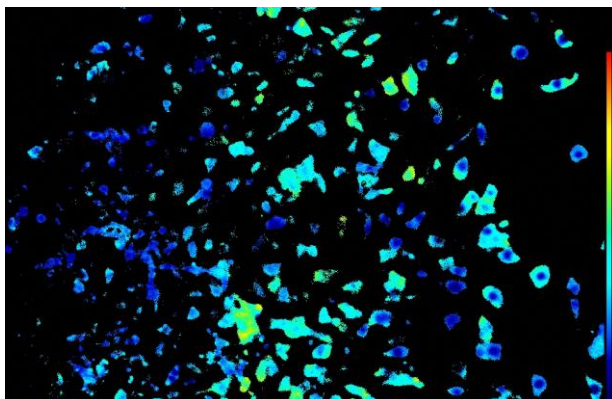


図 1) ミクログリア細胞のカルシウムイメージング (Ratio Imaging)

カルシウムイメージングでは、ATP やインターフェロン $\gamma$ に対して特徴的な反応を示すことが知られており、実験系のポジティブコントロールとしても用いられている。我々も実験系の確認として、ATP およびインターフェロン $\gamma$ を用いて、反

応を確認した。

ATP を添加した場合、鋭いスパイク状の反応が出る事が知られている。我々の条件においても、ポジティブコントロールとして知られるスパイク状の反応が捉えられており、実験系は問題ないと判断した（図 2）。

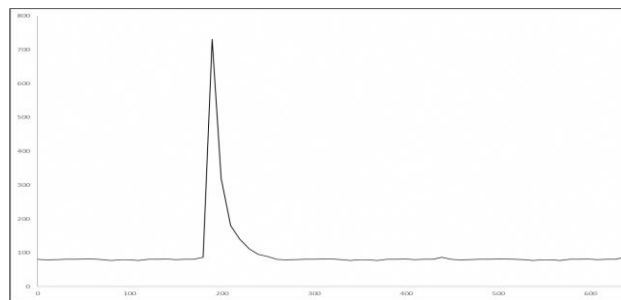


図 2) ATP 添加によるカルシウムイメージング実験系の確認

次に、ATP と同様にインターフェロン $\gamma$ でも反応を確認した。インターフェロン $\gamma$ を添加した場合、経時的に細胞内カルシウム濃度が増大することが知られている。我々の条件においても、ポジティブコントロールとして知られている細胞内カルシウム濃度の経時的な増大が捉えられており、実験系は問題ないと判断した（図 3）。

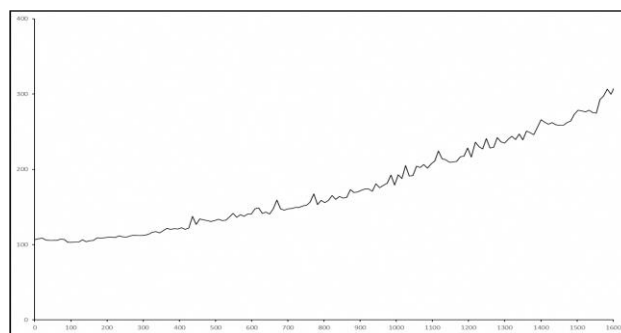


図 3) インターフェロン $\gamma$ 添加によるカルシウムイメージング実験系の確認

### D. 考察

カルシウムイメージングのポジティブコントロールとして用いられている ATP およびインター

フェロン<sup>γ</sup>で従来の報告と同様の結果を得ることに成功した。このことから、ミクログリア細胞を用いたカルシウムイメージング実験系の構築は成功し、今年度の目標は達成したと判断した。

#### **E. 結論**

本年度は、ミクログリア細胞のカルシウムイメージング実験系の構築に成功した。次年度に予定している実験系では、本年度に構築した実験基盤を用いて初めて実施可能となるものであり、本年度の成果は、次年度に活用されるものである。

#### **F. 健康危険情報**

なし

#### **G. 研究発表**

なし

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）**

なし