

3) HB4C5 細胞を用いた抗体産生促進活性測定法

愛媛大学農学部 菅原 卓也

はじめに

食品成分には様々な機能性分子が含まれており、その中には免疫細胞の活性を増強する免疫増強物質も数多く存在する。これら免疫増強物質はハイブリドーマ細胞株のモノクローナル抗体産生促進だけでなく、初代培養のリンパ球の抗体やサイトカイン産生を促進する。また、生体内でも促進効果を示すものもある。

我々は、ヒトハイブリドーマ細胞株 HB4C5 細胞¹⁾ を用い、食品中に含まれる抗体産生促進物質のスクリーニングを行ってきた。HB4C5 細胞は、肺ガン患者の肺ガン組織付近のリンパ節より分取したリンパ球と、ヒト細胞融合親細胞株 NAT-30 細胞との融合細胞であり、特異性は低いものの、ヒト肺ガン細胞と反応する IgM 抗体を産生している。HB4C5 細胞は、無血清培地²⁾ において増殖可能であり、食品成分だけでなく様々な生理活性物質の抗体産生促進効果のスクリーニングにおいて、血清の影響を排除した条件下でアッセイできるため、生理活性因子の活性をより明確に評価できる。HB4C5 細胞は、基本合成培地である ERDF 培地にインスリン (5 μ g/mL)、トランスフェリン (20 μ g/mL)、エタノールアミン (20 μ M)、亜セレン酸ナトリウム (25nM) を添加した無血清培地で安定した経代培養が可能である³⁾。これまでに、ニワトリ卵黄中に含まれているリポタンパク質成分である YLP (yolk lipoprotein)⁴⁾、牛乳中に存在する酸可溶性で熱安定なタンパク質画分であるプロテオースペプトン (proteose peptone) のコンポーネント 3 タンパク質⁵⁾ などの食品成分に抗体産生促進効果があることが認められた。また、日本海沿岸域で大発生し、甚大な漁業被害をもたらす巨大クラゲ由来のコラーゲン (collagen) にも抗体産生促進効果があることを見いだした⁶⁾。そこで、HB4C5 細胞による抗体産生促進活性のアッセイ法について述べる。

(1) HB4C5 細胞による培養実験

準備するもの

1. 実験器具

- ・ CO₂ インキュベーター (37°C, CO₂ 濃度 5% に設定する.)
- ・ クリーンベンチ
- ・ 卓上遠心器 (15 mL あるいは 50 mL コニカル遠心管を 2,000 rpm 程度で遠心できる, オートバランスタイプの遠心器.)
- ・ 倒立位相差顕微鏡

- ・オートクレーブ
- ・冷蔵庫 (培地, サンプルの保存.)
- ・冷凍庫 (試薬, サンプル, 血清の保存.)
- ・アスピレーター (肉厚のシリコンチューブを, 廃液ビンを経由して吸引ポンプに接続して作製する. クリーンベンチに設置.)
- ・オートピペッター (クリーンベンチ内に設置.)
- ・マイクロピペッター (50~200 μ L まで計容可能なもの.)
- ・マルチチャンネルマイクロピペッター (8 連あるいは 12 連で, 50~200 μ L が計容可能なもの.)
- ・改良ノイバウエル血球計算盤
- ・0.22 μ m 滅菌フィルター (滅菌済み使い捨てシリンジフィルター.)
- ・プラスチックシリンジ
- ・10cm 細胞培養用滅菌プラスチックシャーレ
- ・96well 培養プレート
- ・滅菌 50mL 遠心管
- ・滅菌 15mL 遠心管
- ・滅菌ピペット (各種容量.)
- ・1.5mL マイクロチューブ (オートクレーブ滅菌する.)
- ・マイクロピペットチップ (オートクレーブ滅菌する.)
- ・ボルテックスミキサー

2. 試薬

- ・ERDF 培地 (極東製薬)
- ・ウシ胎児血清
- ・リン酸緩衝生理食塩水 (カルシウム, マグネシウム不含: PBS (-))
- ・ウシ膵臓由来インスリン (SIGMA: I5500)
- ・アポ型ヒトトランスフェリン (SIGMA: T4515)
- ・エタノールアミン (SIGMA: E0135)
- ・亜セレン酸ナトリウム (SIGMA: S5261)
- ・10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (NaPB) (pH 7.4)

3. 試薬の調製

- 1) ERDF 培地 : 17.7g/L となるように超純水 (あるいは蒸留水) に溶解する. 培地粉末溶解後, 炭酸水素ナトリウムを 1.125g/L となるように添加する. 炭酸水素ナトリウム溶解後, 直ちにクリーンベンチ内で 0.22 μ m フィルターを用いてろ過滅菌する.
- 2) 2 倍濃度 ERDF ($\times 2$ ERDF) 培地 : 35.4g/L となるように超純水 (あるいは蒸留

水)に溶解する。培地粉末溶解後、炭酸水素ナトリウムを 2.25g/L となるように添加する。炭酸水素ナトリウム溶解後、直ちにクリーンベンチ内でろ過滅菌する。

- 3) ウシ胎児血清：ウシ胎児血清を 56°C, 30 分間熱処理することにより、非働化を行う。非働化後、50mL 程度に小分けして-20°C で凍結保存する。
- 4) インスリン溶液：インスリンを 1mg/mL となるように PBS(-)に溶解する。このとき、結晶を溶解するために濃塩酸を少量添加する。調製後、クリーンベンチ内で 0.22µm 滅菌フィルターを用いて滅菌する。滅菌後、1mL 程度に小分けして-20°C で凍結保存。解凍後は 4°C 保存。終濃度 5µg/mL (0.5%添加) となるように培地に添加する。
- 5) トランスフェリン溶液：4mg/mL となるように PBS(-)に溶解する。調製後、クリーンベンチ内で 0.22µm 滅菌フィルターを用いて滅菌する。滅菌後、1mL 程度に小分けして-20°C で凍結保存する。培地に 0.5%添加する(終濃度 20µg/mL)。解凍後は 4°C 保存し、1 カ月以内に使用する。
- 6) エタノールアミン：試薬原液(濃度 16.6M) 24.1µL を 100mL の超純水(あるいは蒸留水)で 415 倍に希釈し、4mM にする。通常は段階的に希釈して調製する。調製後、クリーンベンチ内で 0.22µm 滅菌フィルターを用いてろ過滅菌する。培地に 0.5%添加する(終濃度 20µM)。
- 7) 亜セレン酸ナトリウム溶液：5µM 水溶液を調製する。超純水(あるいは蒸留水)で 4.8mg/50mL に調製し、これを 100 倍希釈する。クリーンベンチ内で 0.22µm 滅菌フィルターを用いてろ過滅菌する。培地に 0.5%添加する(終濃度 25nM)。

4. 細胞

ヒトハイブリドーマ細胞株 HB4C5 細胞：HB4C5 細胞は通常、非働化ウシ胎児血清を 5%添加した ERDF 培地で継代培養する。0 日目に 2×10^5 cells/mL の細胞密度で 10cm 培養シャーレに接種すると、2 日目には 8×10^5 cells/mL 程度の細胞密度となるので、継代作業を行う。食品中の抗体産生促進因子のアッセイへの血清の影響を排除するため、血清添加培地で継代していた HB4C5 細胞をインスリン、トランスフェリン、エタノールアミン、亜セレン酸ナトリウムを添加した ITES-ERDF 培地に接種し、1 週間程度継代培養した細胞を用いて評価実験を行う。ITES-ERDF 培地ではわずかに増殖速度が落ちるので、血清添加培地よりも接種密度を高くして継代作業を行う。

プロトコール

1. 特徴と注意点

本細胞培養実験の特徴は、2 倍濃度の培地を用いて細胞懸濁液を調製し、細胞接種することにある。2 倍濃度の培地を用いることにより、培養容量の 50%までサンプル液を添加することが可能となる。通常濃度の培地を用いる場合、サンプルによる培地の希釈の問題から、水系溶媒のサンプルでも 5%程度の添加が上限となる。活性が弱い場合や、十分な濃度での抽出ができていない場合は、実際に活性があったとしても培養実験の結果はネガティブとなってしまう恐れがある。しかし、2 倍濃度の培地を用いることにより、通常濃度の培地を用いた場合と比較して、添加濃度を最大 10 倍まで引き上げることが可能となり、ポジティブな結果が得られる可能性が出てくる。

また、アッセイにおける培養時間は 6 時間であり、比較的短く設定している。この理由は、培養上清中の IgM 量を酵素抗体法で測定する際、6 時間程度の培養時間であれば培養上清中の IgM 濃度が酵素抗体法の検量範囲内に収まるからである。HB4C5 細胞の ITES-ERDF 培地中での IgM 産生量は、6 時間で 5~10ng/mL 程度であり、抗体産生促進因子の作用を受けても、検量範囲である 100ng/mL を超えることはまれである。また、培養時間が比較的短い方が抗体産生促進物質の効果が見えやすいということも理由の一つである。また、培養と酵素抗体法による IgM 濃度の定量まで、活性物質の機能評価が 10 時間程度で完了する迅速性もある。また、6 時間という短時間での培養実験であるためサンプルを必ずしも滅菌処理する必要が無く、貴重で少量しかないサンプルがフィルター滅菌でロスするのを抑えることができる。

2. サンプルの段階希釈

試験サンプルが水系の溶媒に溶解したサンプルである場合と、有機溶媒などの非水系の溶媒に溶解している場合とで段階希釈液の調製法が異なる。まず、水系の溶媒に溶解している場合、あまり塩濃度が高いと培地の浸透圧の上昇を招き、細胞の培養に悪影響を及ぼす可能性がある。したがって、塩濃度が高い場合には 10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (NaPB) などの低塩溶媒に対して透析して脱塩しておく必要がある。透析後、フィルター滅菌したのち、1.5mL マイクロチューブ内で滅菌 10mM NaPB (オートクレーブ滅菌可能) を用いて適当な希釈幅で段階希釈液を調製する。

ジメチルスルホキシド (DMSO) やエタノールなどの非水系の溶媒に溶解しているサンプルの場合は、滅菌処理後、同じ溶媒を用いてサンプルを段階希釈する。次にそれぞれの段階希釈液を 2%となるように滅菌 10mM NaPB で希釈する (図 1 参照)。この作業のポイントは 2 点あり、1 点は、コントロールを含めて培地中

の溶媒濃度をすべての段階希釈サンプルで同一にすることである。非水系溶媒に溶解しているサンプルを NaPB で段階希釈すると、各段階希釈液間で溶媒濃度が変化してしまい、それぞれに溶媒コントロールを設定する必要がある。2 つ目の注意点は、溶媒は細胞に対して毒性を示す場合が多いので、溶媒の培地終濃度を 1%以下にすることである。

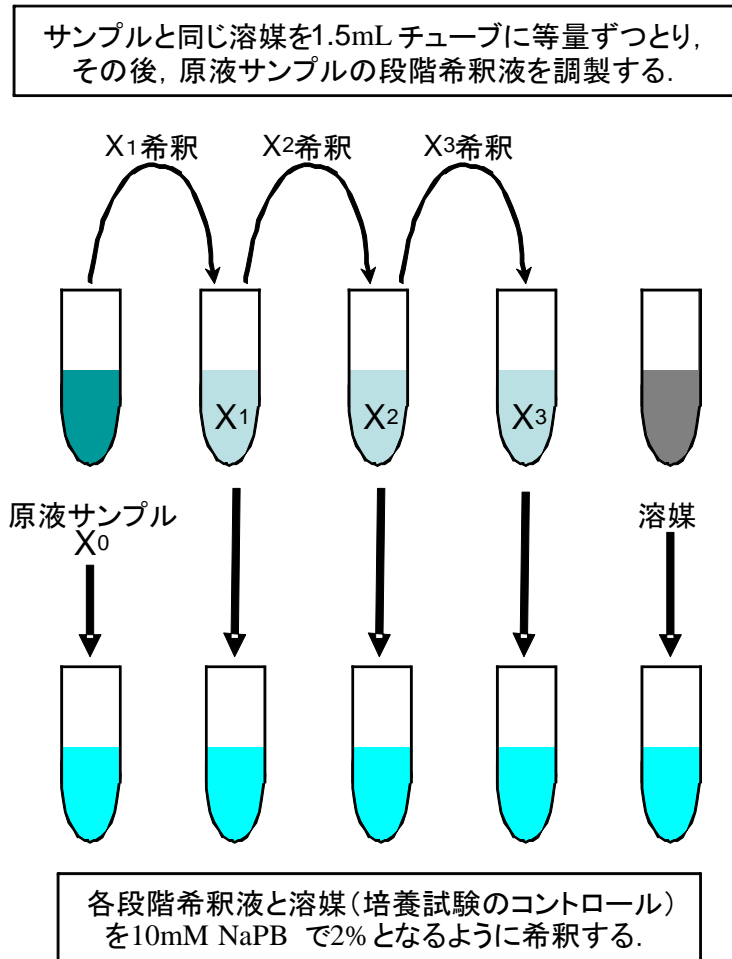


図 1 非水系溶媒サンプルの段階希釈法

3. サンプルの分注

段階希釈サンプル、および溶媒コントロールそれぞれ 100 μ L をマイクロピペッターを用いて 96well 培養プレートにとる。このとき、1 濃度あたり、3 点か 4 点の複数化することで、実験の精度を上げることができる。また、培養後の酵素抗体法 (ELISA) での IgM 濃度の定量操作を見越し、ヒト IgM 標準液をサンプリングする ELISA プレートの well の番地と同じ番地の well は培養実験には使わずに、空にしておく。例えば、酵素抗体法を行うときにヒト IgM 標準液を A 列と

B 列に分注する場合、培養実験の際にはその列は使わずに、空けておく。そうすることで、培養上清を ELISA 用 96 well プレートにサンプリングする際、培養プレートと同じ番地にサンプリングできるようになる。そうすると、ELISA のサンプリング作業時にミスせずにすむ。

4. ×2 ITES-×2 ERDF 培地の調製

終濃度の 2 倍濃度となるようにインスリン、トランスフェリン、エタノールアミン、亜セレン酸ナトリウムを 2 倍濃度 ERDF 培地に添加する。すなわち、各培地添加因子を 1% となるように 2 倍濃度 ERDF 培地にとる。

5. 細胞懸濁液の調製

ITES-ERDF 培地で継代培養していた HB4C5 細胞をインキュベーターから取り出し、50mL 遠心管に細胞懸濁液を回収する。1,000 rpm、5 分間の遠心を行い、細胞をペレット状に回収する。アスピレーターを用いて培養上清を吸引廃棄する。培養容量と等量の ERDF 培地で細胞ペレットを懸濁し、ピペッティングにより細胞を洗浄する。再度遠心により、ペレット状に細胞を回収し、接種に必要な細胞懸濁液の液量を目安にして適当量の×2 ITES-×2 ERDF 培地で細胞ペレットを懸濁する。

細胞懸濁液の細胞密度を改良ノイバウエル血球計算盤で測定する。測定した細胞密度をもとに、細胞密度が 1×10^5 cells/mL となるように×2 ITES-×2 ERDF 培地を用いて希釈、調整する。希釈後、細胞密度が 1×10^5 cells/mL になっていることを確認する。

ポイントは、細胞密度の調整にかかる時間を極力短くすることである。理由は 2 点あり、1 点目は、無血清培地は pH 変動が大きいことに起因する。無血清培地は pH 緩衝能が希薄であるため、大気中では pH の上昇が起りやすく、動物細胞はアルカリに傾いた培地にさらされると、細胞活性が低下してしまう。第 2 点目は、細胞懸濁液の調製に×2 ERDF 培地を用いていることによる。培地濃度が 2 倍であるため高張となり、細胞内の水分が細胞外に吸い出されてしまうからである。

6. 細胞の接種

調製した細胞懸濁液全量を 10cm (あるいは 6cm) 培養シャーレや滅菌したりザー容器などにとり、マルチチャンネルマイクロピペッターを用いて速やかに 100 μ L ずつ分注し、プレートミキサー等を用いてよく混合する。これにより培地と添加因子の濃度は通常濃度に希釈され、細胞密度は 5×10^4 cells/mL となる。混合後、速やかに培養プレートを CO₂ インキュベーターに入れ、培養を開始する。培養時間は 6 時間とする。

(2) 酵素抗体法 (ELISA) による培養上清中のヒト IgM の定量実験

準備するもの

1. 実験器具

- ・ マイクロプレートリーダー
- ・ 冷蔵庫 (抗体, 試薬, サンプルの保存.)
- ・ 冷凍庫 (抗体, サンプルの保存.)
- ・ マイクロピペッター (50~200 μ L まで計容可能なもの.)
- ・ マルチチャンネルマイクロピペッター (8 連, あるいは 12 連で, 50~300 μ L が計容可能なもの.)
- ・ ELISA 用 96well プラスチックプレート (Nunc 430341)
- ・ 96 well プラスチックプレート用シーリングフィルム
- ・ 1.5mL マイクロチューブ
- ・ マイクロピペットチップ
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ プレートミキサー

2. 試薬

- ・ ヒト IgM (標準液用) : 10 μ g/mL 溶液を一次ストックとし, -80 $^{\circ}$ C で保存する. また, これを 100 倍希釈して 100ng/mL としたものを二次ストックとし, -20 $^{\circ}$ C で保存する. 標準ヒト IgM 溶液の希釈には 1%ウシ血清アルブミン-PBS(-)溶液を用いる.
- ・ 抗ヒト IgM 抗体 (CAPEL 550732) : 80%グリセロール-PBS(-)で, 2 倍希釈. 保存は-20 $^{\circ}$ C であるが, グリセロール含量が高いため-20 $^{\circ}$ C でも凍結はしない.
- ・ ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgM 抗体 (Biosource AH10604)
- ・ 50mM 炭酸-重炭酸緩衝液 (pH9.6)
- ・ 5%スキムミルク-PBS 溶液 : スキムミルクを 5%となるように PBS (-)に溶解する.
T-PBS : PBS (-)に Tween 20 (ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート : 和光純薬 167-11515) を 0.05%となるように添加する.
- ・ 0.018% H₂O₂-0.1 M クエン酸緩衝液 (pH4.0) : 0.1M クエン酸緩衝液 (pH4.0) に 30% 過酸化水素水を 0.018%となるように添加する.
- ・ ABTS 溶液 : ABTS (和光純薬 018-10311) を超純水 (あるいは蒸留水) に 6.0mg/mL となるように溶解する. 4 $^{\circ}$ C, 遮光保存.
- ・ 1.5% シュウ酸溶液 : シュウ酸 (無水) を 15g/L となるように溶解する.

3. 試薬の調製

発色基質液 : 0.018% H₂O₂-0.1M クエン酸緩衝液 (pH4.0), 6.0mg/mL ABTS 溶液および超純水を 10 : 1 : 9 の割合で混合する. 使用直前に調製する.

プロトコール

1. 特徴と注意点

前項の細胞培養と連続して、培養上清中の IgM 量を ELISA により測定する。培養時間が 6 時間であり、培養開始 6 時間後、培養上清を直ちに ELISA 反応のサンプリング操作に供する必要があるため、培養終了時には以下に述べる ELISA 手順のうち、IgM 標準液の調製段階まで作業工程が完了している必要がある。

2. 一次抗体（固相抗体）によるコーティング

抗ヒト IgM 抗体（CAPEL 550732 を 80%グリセロール-PBS(-)で 2 倍希釈したもの）を 50mM 炭酸-重炭酸緩衝液（pH9.6）で 1,000 倍希釈し、ELISA 用の 96 穴プレートに 100 μ L 分注する。プレートをプレートシーリングフィルムで密閉する。一次抗体の固定に要する時間は 37 $^{\circ}$ C で 2 時間、あるいは 4 $^{\circ}$ C で 1 晩である。一次抗体でコーティングした ELISA プレートは 4 $^{\circ}$ C で 1 ヶ月程度の保存が可能である。

3. ブロッキング

コーティングが完了したプレートの各 well を 0.05%Tween-PBS（T-PBS）で 2 回洗浄する。洗浄後、よく水切りをしたのち、5%スキムミルク-PBS 溶液を各 well に 300 μ L 分注する。ブロッキングは 37 $^{\circ}$ C で 2 時間、あるいは 4 $^{\circ}$ C では 1 晩以上保持する。ブロッキングしたプレートは 4 $^{\circ}$ C で 1 週間程度の保存は可能である。保存期間はブロッキングに用いるスキムミルクの腐敗の進行度合いに依存する。

4. IgM 標準液の調製

100ng/mL のヒト IgM 二次ストックを用い、0~100ng/mL のヒト IgM 溶液を各 200 μ L 調製する。

5. サンプリング

ブロッキングしたプレートを T-PBS で 3 回洗浄する。よく水切りをしたのち、培養上清、およびヒト IgM 標準液を 50 μ L ずつ分注する。このとき、培養時の 96 well プレートの well の番地と ELISA 用 96well プレートの well の番地を合致させてサンプリングすればミスが防げる。また、培養上清を 50 μ L サンプリングする際、細胞まで吸い取らないように、マイクロピペッターのチップの先端を well の深いところまで挿入せずに培養上清を吸い取るようにするとともに、細胞はプレートの底に沈んでいるので、培養液をあまり乱さないように静かに吸い取る。サンプリングの反応は 37 $^{\circ}$ C で 60 分、あるいは 4 $^{\circ}$ C で 1 晩保持する。反応時、プレートはプレートシーリングフィルムで密封するか、ラップで包んでおく。

6. 二次抗体の反応

5%スキムミルク-PBS を用いて二次抗体（ペルオキシダーゼ標識抗ヒト IgM 抗体）を 2,000 倍希釈する。サンプリング反応が終了したプレートを T-PBS で 3 回

洗した後、二次抗体希釈液を 1well に 100 μ L 加え、37 $^{\circ}$ C で 60 分、あるいは 4 $^{\circ}$ C で 1 晩保持する。

7. 発色

二次抗体の反応が終了したプレートを T-PBS で 3 回洗浄する。洗浄操作後、よく水切りをしたのち、発色基質液を 1well に 100 μ L 加え発色を行う。発色が完了したら 1.5% シュウ酸溶液を 100 μ L 加え、酵素反応を止める。このとき、発色基質を入れた順番通りにシュウ酸溶液を入れるようにし、反応時間が well 間で同じになるように注意する。プレートミキサーで攪拌した後、マイクロプレートリーダーを用いて 415nm の吸光度を測定する。酵素反応が飽和してしまうほど強く発色させないように注意する。発色が強すぎると検量線の直線性が失われる。

抗体産生促進活性測定例

ここで示したプロトコールに従って行った、エチゼンクラゲより抽出したコラーゲンの HB4C5 細胞に対する抗体産生促進活性測定の結果を示す(図 2)⁶⁾。様々な濃度でクラゲコラーゲンを添加した ITES-ERDF 培地に 5 $\times 10^4$ cells/mL の細胞密度で HB4C5 細胞を接種して 6 時間培養を行った後、培養上清中の IgM 量を検討した結果、濃度依存的にクラゲコラーゲンが HB4C5 細胞の IgM 産生を促進することが確認された。クラゲコラーゲン添加により HB4C5 細胞の IgM 産生は、コントロールに対し最大 34 倍の産生量に達し、クラゲコラーゲンに強力な抗体産生促進効果があることが明らかとなった。

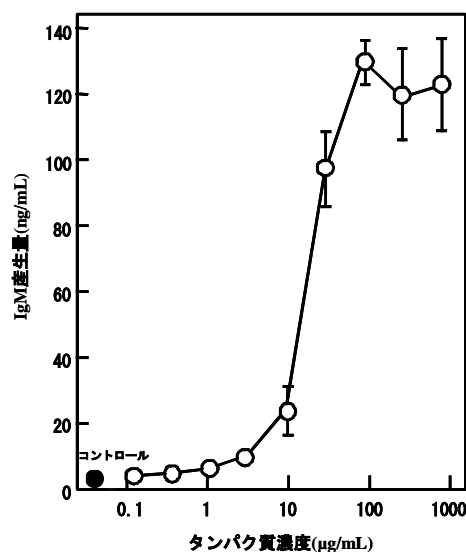


図 2 クラゲコラーゲンの抗体産生促進効果

おわりに

HB4C5 細胞を用いた抗体産生促進活性測定のための培養, および IgM 定量は, 6 時間の細胞培養とその後に引き続いて行われる ELISA による IgM 産生量の定量を合わせても 10 時間以内に完了することができ, 抗体産生促進活性が迅速にアッセイ可能である. また, 2 倍濃度の培地を利用するため, 培地の希釈を気にすることなくサンプルを添加できる. しかし, 塩濃度の高いサンプルの場合は脱塩の操作が必要となる点に注意する必要がある.

参考文献

- 1) Murakami, H., Hashizume, S., Ohashi, H., Shinohara, K., Yasumoto, K., Nomoto, K. and Omura, H., Human-human hybridomas secreting antibodies specific to human lung carcinoma. *In Vitro Cell. Dev-an.*, **21**, 593-596 (1985).
- 2) Murakami, H., Masui, H., Sato, G.H., Sueoka, N., Chow, T.P. and Kono-Sueoka, T. Growth of hybridoma cells in serum-free medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1158-1162 (1982).
- 3) Sugahara, T., Sasaki, T. and Murakami, H., Enhancement of immunoglobulin productivity of human-human hybridoma HB4C5 cells by basic proteins and poly-basic amino acids. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **58**, 2212-2214 (1994).
- 4) Yamada, K., Ikeda, I., Sugahara, T., Shirahata, S. and Murakami, H., Screening of immunoglobulin production stimulating factor (IPSF) in foodstuffs using human-human hybridoma HB4C5 cells. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2987-2991 (1989).
- 5) Sugahara, T., Onda, H., Shinohara, Y., Horii, M., Akiyama, K., Nakamoto, K. and Hara, K., Immunostimulation effects of proteose-peptone component 3 fragment on human hybridomas and peripheral blood lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1725**, 233-240 (2005).
- 6) Sugahara, T., Ueno, M., Goto, Y., Shiraishi, R., Doi, M., Akiyama, K. and Yamauchi, S., Immunostimulation effect of the jellyfish collagen. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 2131-2137 (2006).