

3) 初代免疫細胞を用いた各種免疫応答の簡便な測定法

(独) 農研機構 食品総合研究所 後藤 真生

はじめに

食品中の免疫制御因子を探索し、その効果と作用機序を検証するために、動物実験 (*in vivo* 実験) と培養細胞を用いた実験 (*in vitro* 実験) をつなぐものとして動物を解剖し採取した「初代細胞」を用いた *ex vivo* 評価法がある。本稿では初代免疫細胞として、マウス脾臓細胞を用いた各種免疫応答の簡便な測定法について述べる。脾臓は免疫細胞のバザールと呼ばれ、全身性の免疫細胞群が集積する場所であり、この細胞の免疫応答性は、生体における全身免疫系の応答を比較的反映していると考えられる。

本稿ではマウス脾臓細胞を用いた初代培養法における細胞増殖、サイトカイン産生、抗体産生の誘導、およびその定量法について述べる。

準備するもの

1. 実験器具

- ・クリーンベンチ
- ・アスピレーター
- ・滅菌パスツールピペット
- ・炭酸ガスインキュベーター
- ・遠心機 (できれば温度管理できるものが望ましい)
- ・血球計算板 (改良ノイバウエル計算板)
- ・乾熱滅菌処理した解剖道具 (解剖はさみ, ピンセット, 眼科手術用はさみ, ピンセット, 先曲がりピンセット)

以下は滅菌処理済みのものを購入しておく。細胞培養用プレートのウェルの底面処理は各社によって異なり、実験結果に影響する可能性があるため、あらかじめ予備実験により実験に最適なプレートを選択しておく。

- ・ 15mL プラスチックコニカルチューブ
- ・ セルカルチャーディッシュ (細胞培養用) 96 ウェル, 平底
- ・ 35mm セルカルチャーディッシュ

2. 試薬

1) 培地

基本培地として RPMI1640 液体培地 (調製済みの液体培地を SIGMA などから購入可能である) 500mL に 2-メルカプトエタノールを 5×10^{-5} mol/L, ペニシリンス

トレプトマイシン混合液 (SIGMA) を 1% 添加する。細胞培養用培地として上記基本培地に 56°C, 30 分間の加熱処理により非働化した牛胎児血清 (Biowest などから購入可能) を 5~10% 添加して、使用時まで冷蔵保存しておく。残りの牛胎児血清は 50cc コニカルチューブなどに分注し凍結保存し、必要に応じて使用すると便利である。牛胎児血清はロットによって性質が大きく異なるため、測定予定の項目についてロットチェックを行い、実験目的に適した血清を選抜した後、ある程度の量を購入、確保しておくことが重要である。

2) 細胞計数用トリパンプルー液 (Wako など)

市販トリパンプルー液は濃厚であるため、生理食塩水で 10 倍希釈したものを測定に用いるとよい。

3) 刺激導入剤

(1) コンカナバリン A (ConA)

ConA はナタマメ由来のレクチンであり、T 細胞を T 細胞レセプターを介さず、抗原非特異的に活性化させる (幼若化反応) のに広く用いられている。使用法は添加するだけで非常に簡便であるが、正常な免疫応答においては T 細胞は抗原提示細胞が抗原提示分子 (MHC 分子) 上に提示した抗原ペプチド (MHC 抗原ペプチド複合体) と T 細胞レセプターが結合することで活性化されるため、厳密には完全に抗原刺激を模倣しているものではない。SIGMA などから購入が可能である。購入して、1mg/mL 程度に PBS など希釈した後、フィルター滅菌し、使用するまで分注・凍結保存しておく。

(2) リポポリサッカライド (LPS)

グラム陰性菌の細胞壁成分であり、Toll Like Receptors (TLRs) を介して自然免疫系を活性化する。本稿の実験系においては、主に B 細胞の活性化と増殖、抗体産生を誘導するのに用いる。マクロファージや樹状細胞も活性化する。通常、B 細胞は T 細胞からの抗原特異的な刺激がないと、抗体産生細胞への分化、クラススイッチ、抗体産生を行わないが、LPS を介する刺激によってこれらが可能となる。また、マウス細胞においては LPS 刺激によって IgE まで誘導可能である。

SIGMA などから購入可能であるが、由来菌株によってその性質が異なり、細胞に毒性を持つものもあるため、事前に実験する細胞を用いて予備実験を行うことが重要である。購入して、1mg/mL 程度に PBS で希釈した後、フィルター滅菌し、使用するまで分注・凍結保存しておく。保存チューブへの接着性が高く、損失が多いため、解凍後は速やかに使用濃度に希釈し、使い切ることが重要である。

(3) 抗 CD3ε抗体

CD3ε分子は T 細胞レセプターに会合し、抗原のシグナルを細胞内に伝達する T 細胞に特異的な分子である。この分子をその特異抗体によって架橋することで、MHC 抗原ペプチド複合体の代わりに T 細胞を活性化することができる。ConA よりもより自然に近い刺激といえるが、抗原提示細胞は実際にはより多彩な刺激を T 細胞に伝達すること、MHC 分子と抗原ペプチド、T 細胞レセプターの結合度などで入る刺激の強度は多様化されており、やはり完全な抗原刺激の代替にはならないことは留意すべきである。とはいえ、抗原特異性の判明していない T 細胞を刺激する非常に有用な手法である。

抗体は 145-2C11 モノクローナル抗体がよく使われる。BD bioscience や eBioscience, Biologend, CALTAG など抗体制作会社各社から販売されているが、濃度など品質に差異があるため、予備実験で目的に最適な抗原濃度を決定することが必要とされる。多くの抗体にはアジ化ナトリウムなど保存剤が添加されており、これらの多くは動物細胞にも有害であるため、培養に添加できるよう調整された製品を選ばなくてはならない。

3. マウス

免疫学実験においては BALB/c, C57B6, C3H マウスなどがよく使用される。マウスの種類、週齢や性別は実験の目的によって適当なものを選択する。日本チャールス・リバーなどの国内業者から購入できる。

プロトコール

細胞サンプルを取得し、培養インキュベータに入れるまでの全操作をクリーンベンチ内で行う。全工程において、使用する培地などは低温に保ち、臓器・細胞の劣化を防ぐ。

1. マウス脾臓細胞の調整

- 1) マウスを頸椎脱臼などで屠殺した後、消毒し、左側面を上にして、解剖台に乗せる。
- 2) ピンセットで皮をつまみ、はさみを入れ、皮をはぎながら切開し、薄い皮筋を露出させる。
- 3) 皮筋を眼科手術用はさみを用いて切り、胃の下からのぞいている赤黒い脾臓を眼科用先曲がりピンセットで引き出す。
- 4) 付属する脂肪組織などをはさみでできるだけ取り除きながら、摘出する。
- 5) 2mL の基本培地を入れた 35mm カルチャーディッシュに脾臓を浸す。
- 6) そのまま脾臓を摩砕し、細胞が懸濁された培地を丁寧に回収し（この際、摩砕後の組織の残骸や脂肪組織などをできるだけ回収しないようにする）、6mL の基

本培地をあらかじめ入れた 15mL コニカルチューブに入れて、合わせて 8mL とする。

- 7) よく懸濁し、1 分間静置する。
- 8) 底の 1mL を残して上 7mL を回収し、別の 15mL コニカルチューブに移す。
- 9) 250G 前後で 4°C で遠心して、細胞をペレットとする。滅菌したパスツールピペットとアスピレーターで上清をペレットぎりぎりまで吸う。
- 10) 4mL の培養用培地でペレットを再懸濁し、サンプルとする。少量とり、トリパンプルー液で懸濁し、細胞計数板で検鏡、計数する。細胞数に応じて、適宜、実験に必要な細胞数に培養培地で希釈する。

2. マウス脾臓細胞刺激実験

細胞数や刺激に用いる試薬の濃度、培養期間などはマウスの個体差や実験環境などにより変動するため目的に応じて、予備実験により最適値を決定する必要がある。脾臓細胞は $0.5\sim 5\times 10^5$ cells/well を 96well culture plate で培養する。培地総量は 200~300 μ L とする。炭酸ガスインキュベーターで 37°C, CO₂ 5%の条件で培養する。回収した培養上清は凍結保存し、測定直前に解凍する。一度解凍した上清サンプルは再凍結・保存してはならない。

1) ConA による刺激

脾臓細胞に ConA (0.5~4 μ g/mL) を添加する。培養後 12~96 時間後にサイトカインの定量用に培養上清を回収する。また細胞は細胞増殖の測定に用いる。これらは予備実験で最適な条件を決定する。

2) 抗 CD3 抗体を用いた刺激

細胞調整の前日に、PBS で希釈して 0.5~2 μ g/mL とした抗 CD3 抗体を細胞培養プレートにまき、冷蔵庫で一晩維持し、抗体を固相化する。細胞を撒く直前に、アスピレーターで抗体液を除去し、滅菌 PBS などで 3 回洗浄する。脾臓細胞を撒き、培養後 12~96 時間後に培養上清を回収し、サイトカインの定量に用いる。細胞は細胞増殖の測定に用いる。これらの条件は予備実験で最適なものを決定する。

3) LPS を用いた刺激

脾臓細胞に LPS (0.5~2 μ g/mL) を添加する。培養後 12~96 時間後に培養上清を回収し、サイトカインの定量に用い、細胞は細胞増殖の測定に用いる。培養開始後 1 週間後に培養上清を回収し、抗体の定量に用いる。これらの条件は予備実験で最適なものを決定する。

3. 各種測定法

1) 細胞増殖の測定

(1) MTT アッセイ法

テトラゾリウム塩の一種である MTT は細胞内に取り込まれると細胞内のミトコンドリアにあるデヒドロゲナーゼによってホルマザンに変換され、非水溶性の結晶として沈殿する。これを DMSO などの有機溶媒で溶解させ、570nm における吸光度によって、ホルマザン産生量をミトコンドリア酵素活性、すなわち生細胞数として測定する。細胞を刺激後、実験に適した時間で MTT を添加し、数時間おいて測定する。テトラゾリウム塩は凍結融解の繰り返しで劣化するため、長期保存時は小分けして冷凍し、解凍したら使い切るべきである。

近年はテトラゾリウム塩の改良が進み、ホルマザンを可溶化する必要が無く、簡便かつ高感度なアッセイキットがナカライテスクなど各社から販売されている。具体的な測定方法はキット付属の使用説明書に従う。

(2) トリチウム化チミジンアッセイ

細胞増殖の際にはゲノム DNA の複製が起きるため、DNA 複製をモニタすることで細胞増殖を定量化できる。そこでトリチウム化チミジン 0.5~1 μ Ci を培養中に添加することにより複製中の細胞 DNA を放射標識し、それらを液体シンチレーションカウンターで測定する。チミジンの添加時間は細胞種によって最適時間が異なる。高感度であり、少数の細胞の増殖も鋭敏に測定できるが、生細胞数をそのまま反映するものではなく、たとえば、DNA 複製直後に細胞が死んでも反映されないことは留意すべきである。

トリチウム化チミジンアッセイはその利点にもかかわらず、ラジオアクティブであることによる保管やハンドリングの問題、液体シンチレーションカウンターが高価であることなど、使用には困難が伴う。それらの欠点の解決として近年は、トリチウム化チミジンの代わりに、チミジンアナログである臭素化デオキシウリジン(BrdU)を用い、ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)法で検出することで代替する手法が開発され、ロシュ・ダイアグノスティクスやタカラなどからキットとして販売されている。具体的な測定方法はキット付属の使用説明書に従う。

2) サイトカインの測定

培養上清中のサイトカインの種類と量は非常に重要な免疫応答の指標である。通常、サンドイッチ ELISA 法で測定し、各社からサイトカイン・動物の種ごとにキットが発売されている。使用法は各種キット付属の使用説明書に従う。各社ごとに感度や操作性が異なるため、製品の選択には慎重な検討が必要である。その性能によって、培養上清を希釈し、測定結果が検量線上にのるように調整

する。また、各サイトカインには測定に最適な培養時間が存在し、特に IL-2 や IL-4 のようにオートクラインなサイトカインは時間経過とともに消耗していくため、予備実験を行い、最適な培養時間をあらかじめ決定しておくことが重要である。

抗アレルギー性の検定には T 細胞を活性化する ConA 刺激、または抗 CD3 抗体刺激した培養上清を用いる。最低、IL-2、IL-4、IFN- γ の測定を行っておくことが望ましい。IL-2 は細胞の増殖と強い関わりがあり、IL-4 は Th2 型、IFN- γ は Th1 型の代表的なサイトカインである。LPS で刺激した培養上清はマクロファージ類や樹状細胞などの活性検定用に炎症性サイトカインである IL-12、TNF- α 、IL-1 α などを測定することが多い。

3) 抗体の測定

培養上清中の抗体の測定もまた非常に重要な免疫応答の指標である。通常、サンドイッチ ELISA 法で測定し、各社から動物種ごとのキットが発売されている。使用法は各種キット付属の使用説明書に従う。サイトカインと同様に各社ごとに感度や操作性が異なるため、製品の選択には慎重な検討と、それに基づく培養上清の希釈が必要である。通常、培養 1 週間程度で各種抗体が測定可能になるが、予備実験によって上清採取時期を決定しておく。

LPS 刺激により、各種抗体が T 細胞非依存的に脾臓 B 細胞から分泌されるが、これはもちろん本来の抗原特異的な免疫応答とはメカニズムが異なることは留意すべきである。とはいえ、マウスを用いて簡便に IgE 抗体などの分泌を測定できるのは大きなアドバンテージであるので、モデルとしての限界を考慮しつつ実験を行うのは有用である。アレルギーに関与する抗体としては Th1 型抗体として IgG2a、Th2 型抗体として IgG1、IgE が代表的である。

おわりに

動物を解剖して得た初代細胞の応答性は、その時の動物の健康状態、ハンドリング、細胞培養環境によって大きく異なり、個体差も大きいのが通常である。最低でも 3 匹以上から細胞を独立して調整し、さらに再実験も行うことで統計的に有意なデータを得なくてはならない。また自らの実験に最適な実験条件を綿密な予備実験によって、あらかじめ確定しておくことが非常に重要である。