

## 免疫担当細胞の活性評価

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構  
食品研究部門 後藤 真生

### 【はじめに】

今般、食品機能性の科学的根拠の解明がますます重要となり、実証におけるヒト試験の比重が増す中でも、機能性の探索や作用機序の解明にかかる培養細胞株や実験動物を用いた試験は変わらず重要である。とくに、動物組織から採取した直後の細胞、すなわち初代細胞を用いる *in vitro* 培養試験は、培養細胞株よりも由来する組織の性質を正確に反映すると考えられるため、試験結果の生理的な意味を良く吟味しながら実施すれば、培養細胞株試験と動物試験の利点を併せ持つ評価法となりうる。そこで、本稿では食品の免疫調節機能の評価に活用できる初代免疫担当細胞の各種免疫応答の誘導法、およびその定量法について述べる。

### 【準備するもの】

#### 1. 器具

- ・無菌操作用クリーンベンチ
- ・吸引ポンプおよび滅菌済ディスプレイスポーザブルパスツールピペット
- ・細胞培養用炭酸ガス恒温器（炭酸ガス濃度 5%、温度 37°C に設定）
- ・5°C～37°C の温度管理が可能な遠心分離装置
- ・細胞計数用顕微鏡および血球計算板（改良ノイバウエル計算板など）、数取り器
- ・解剖はさみ、ピンセット
- ・眼科手術用はさみ、先曲がりピンセット
- ・コルク製などの動物解剖台

以下は滅菌処理されたものを購入しておく。

- ・15mL ポリプロピレンコニカルチューブ
- ・2mL ディスポーザブルスポイト
- ・細胞培養用マルチウェル（96 ウェルが多用される）プレート
- ・細胞培養用 35mm セルカルチャーディッシュ

細胞培養用プレートおよびディッシュは底面処理や最大容量などは製品ごとに異なるため、あらかじめ研究目的に適切なものを選択しておく。

#### 2. 試薬

##### 1) 牛胎児血清（コスモバイオやフナコシなどから入手可能）

非働化处理した牛胎児血清を 5~10% の最終濃度となるよう培養用培地に添加する。濃度によって細胞の応答性が大きく変わるため、予備検討により目的に適切な濃度を決定しておく。またロットによって性質が大きく異なるため、複数のロットのサンプルを事前に入手し、実際の試験と同様の培養試験を予備検討として行い、目的に適したロットを選抜した上、可能な限り、まとまった量を確保することが長期にわたり安定した結果を得るために非常に重要である。

製品は多くの場合、凍結されて供給されるため、ウォーターバスなどで融解させ、完全に融解してから 30 分間 56° C で加熱することで、非働化処理する。処理後は急冷し、分注・凍結保存する。使用直前に解凍し、解凍したものは、冷蔵保存し、再凍結はできるだけ避け、早めに使い切るようにする。

## 2) 培養用培地

RPMI1640 培地 (pH 調整済み、L-グルタミン添加済みの滅菌液体培地をシグマアリドリッチなどから入手可能) に 2-メルカプトエタノールを  $5 \times 10^{-5}$  mol/L、ペニシリン・ストレプトマイシン溶液 (シグマアリドリッチ、和光純薬などから入手可能) を 1% 程度添加し、冷蔵保存する。上記基本培地に牛胎児血清を添加し、細胞培養用培地とする。調整した培地は一ヶ月を目処にできるだけ早めに使い切るようにする。

## 3) 生細胞計数用トリパンブルー液 (和光純薬などから入手可能)

死細胞を染色するトリパンブルー液は通常 0.2%~0.5% の濃度の製品が入手できる。染まらなかった生細胞を、顕微観察により血球計数板で計数し、試験に供する。脾臓のように大量の赤血球を含む臓器から得た細胞を計数する場合は、塩化アンモニウム溶血剤 (自作、もしくは BD バイオサイエンス社などから入手可能) などにより溶血処理を施すと、計数が容易である。血球計数板は繰り返し使用できるガラス製の他にディスポーザブルのものも入手可能である。近年は、実用に耐える自動細胞計数装置も比較的安価に入手できるようになり、多くのサンプルを計数する際の負担の大幅軽減、計数する者によるばらつきを抑えるのに有効である。

## 4) 細胞分離用試薬

動物個体の組織から調整した直後の細胞には、様々な種類の細胞が個体差によって異なる比率で含まれるため、結果がばらつき、評価が困難になることがある。その場合は、評価したい細胞のみを分離、精製して試験することで個体差を減少させることがある。細胞表面に CD4 タンパク質を発現するヘルパー T 細胞などのように、特定の細胞表面タンパク質で細胞が特徴付けられる場合は、そのタンパク質に特異的な抗体などで細胞を標識することで、分離できる。セルソーターを用いれば、蛍光色素を結合させた抗体で標識し、タンパク質の発現強度に応じて細胞を高純度で分離できる。また、磁気ビーズを結合させた抗体とそれを回収する磁石によって、標識細胞を分離するシステムがミルテニーバイオテック、日本 BD、ベリタスなど各社から比較的安価に入手できる。それらの使用方法については各々の製品に添付された操作マニュアルに準拠されたい。

## 5) 刺激用試薬

免疫担当細胞のうち獲得免疫系に属する T 細胞、B 細胞は、個々の細胞がそれぞれ異なるタンパク質に特異的に応答する、いわゆる抗原特異性を持つことにより、生体は多様な外来異物に対して免疫応答を起こすことができる。抗原で刺激されたことのない免疫細胞はナイーブ細胞と呼ばれ、抗原に感作、刺激されると

エフェクター細胞に分化・増殖して、免疫応答を誘導する。たとえば、アレルギー患者にはアレルゲンに特異的な Th2 型のエフェクター T 細胞が観察されることが多い。

通常、抗原に感作されたことがない個体ではその抗原に特異的なナイーブ T 細胞、B 細胞は生来、非常に低い頻度でしか存在しない。そのため、初代免疫細胞を用いて、抗原特異的応答を観察するには、あらかじめ実験動物を抗原で免疫感作し、増殖した抗原特異的免疫細胞を採取し、抗原を添加して培養することが広く行われている。この場合、実験者はナイーブ細胞がエフェクター細胞に分化する過程については観察・評価できず、エフェクター細胞や、エフェクター細胞からさらに分化した長寿命のメモリー細胞の応答を観察している。

抗原に特異的な T 細胞培養株から得た T 細胞レセプター遺伝子を導入したマウスでは、抗原感作をしなくても抗原特異的な T 細胞を多く持つため、ナイーブ T 細胞の抗原への応答性、エフェクター細胞への分化過程を観察できる。このようなマウスとして、D.Y.Loh 博士らが作成した DO11.10 マウスがよく知られている。このマウスは卵白アルブミンに特異的なヘルパー T 細胞を大量に発現しており、初代脾臓細胞の培養中に卵白アルブミンを添加するだけで、特異的な免疫応答が起きる。一方で、これらの遺伝子組み換え動物は一般に高価な上、長期にわたり繁殖・維持しなくてはならないことが多く、実験者の負担も少なくない。

本稿では、実験者の利便性や実験のしやすさを考慮し、遺伝子組み換え動物を用いることなく、抗原刺激を模した *in vitro* 試験の技法を紹介する。

#### (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、シグマアルドリッチなどから入手できる。培養中に添加するだけで T 細胞を活性化し、細胞増殖やサイトカイン産生を誘導できる。このような剤は T 細胞マイトージェンと呼ばれる。通常の免疫応答においては、抗原提示細胞の表面に抗原提示分子 (MHC 分子) とともに提示された抗原由来のペプチド (MHC 抗原ペプチド複合体) や副刺激分子によって、MHC 抗原ペプチド複合体に結合できる T 細胞レセプターを発現した T 細胞が活性化される。すなわち、ConA による刺激は通常の抗原刺激を完全に模倣していないことには留意すべきである。細胞増殖やサイトカイン産生などの免疫応答ごとに ConA の至適濃度は異なるため、培養培地中の最終濃度 0.5~4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を目安として、ConA のロットや実験環境に応じて予備検討を行うと良い。

ConA は PBS など 1mg/mL 程度に溶解した後、口径 0.22  $\mu\text{m}$  のフィルターで滅菌し、使用するまで分注・凍結保存する。

#### (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、炎症応答の誘導に用いられる。マクロファージや B 細胞はその表面に発現している Toll Like Receptors (TLRs) を介して LPS を認識して、活性化する。通常の免疫応答では、B 細胞は T 細胞から抗原特異的な刺激を受けて、分化、増殖して抗体を産生するが、LPS 刺激によっても増殖、抗体産生が誘導されるため。LPS は B 細胞マイトージェンと呼ばれることもある。

シグマアルドリッチなどから様々な菌株に由来する LPS が入手できるが、それぞれ性質が大きく異なり、試験に用いる細胞によっては傷害されるものもある

ため、予備検討を行い、種類および至適濃度を決定しておくことが重要である。培養培地中の最終濃度が 5~10 µg/mL 程度を目安に、予備検討すると良い。LPS は 1mg/mL 程度に PBS に溶解した後、口径 0.22 µm のフィルターで滅菌し、使用するまで分注・凍結保存する。チューブの壁面などプラスチック類に接着しやすいため、解凍後は速やかに使用濃度に希釈し、使い切るようにする。

### (3)抗 CD3ε/CD28 抗体

CD3ε分子は T 細胞に特有の分子であり、T 細胞レセプターに会合し、T 細胞レセプターに結合した MHC 抗原ペプチド複合体からのシグナルを細胞内に伝達している。そのため、抗 CD3ε抗体で CD3ε分子を直接刺激することで、MHC 抗原ペプチド複合体からのシグナルと同じ経路で T 細胞を刺激・活性化できる。実際の T 細胞の免疫応答では、MHC 抗原ペプチド複合体とともに、抗原提示細胞の表面に発現している CD80 や CD86 などの分子が T 細胞表面に発現している CD28 分子に結合、刺激することにより、T 細胞の活性化を精密に制御している。そこで、抗 CD3ε抗体と抗 CD28 抗体を併用することで、より抗原に近い活性化刺激を T 細胞に導入できる。

しかしながら、実際の抗原提示では抗原提示細胞は、さらに多彩な刺激を T 細胞に導入すること、MHC 分子・抗原ペプチド・T 細胞レセプター間の結合のわずかな差異で T 細胞に導入される刺激の質・強度が大きく変わることなどから、これらの抗体でも抗原刺激を完全に再現しえないことは留意すべきである。

刺激に用いる抗 CD3ε抗体としては 145-2C11 モノクローナル抗体、抗 CD28 抗体としては 37.51 モノクローナル抗体がよく用いられている。これらは、BD バイオサイエンス、eBioscience、バイオレジェンドなど各試薬メーカーから入手できる。多くの製品が濃度を表示しているが、実際はメーカーやロットが異なると同じ濃度で刺激しても結果が異なることが多い。そのため、抗 CD3ε抗体は 0.5 µg/mL から 30 µg/mL、抗 CD28 抗体は最終濃度を 1 µg/mL から 5 µg/mL を目安として、予備検討によって入手した品の至適濃度を決定するとよい。培養試験にはアジ化ナトリウムなど細胞に有害な防腐剤を含まないグレードを使用する。近年は抗 CD3ε抗体と抗 CD28 抗体を表面に固定し、抗原提示細胞を模したマイクロビーズである Dynabeads T-Activator CD3/D28 (ベリタス社) のように簡便に、より抗原刺激に似た刺激を導入できる製品も入手できる。

抗体は保存にあたって希釈や凍結などせずに原液のまま冷蔵しなくてはならない。

## 3.実験動物

免疫応答に関わるハプロタイプなど遺伝子についての情報や、研究に必要な抗体が充実していることなどから、免疫学の研究では BALB/c、C57B6 などの近交系マウスがよく用いられる。BALB/c はアレルギーなどに重要な Th2 応答の観察に適し、C57B6 は高脂肪食で肥満しやすく、メタボリックシンドロームの研究によく使用されるなど、それぞれの系統には特徴がある。また、さまざまな病態モデルとして活用できる突然変異体や遺伝子改変動物も比較的入手しやすい。たとえば、ヌードマウスは Balb/c 由来の突然変異体で、T 細胞の産生に必須の器官である胸腺を欠いており、T 細胞をほとんど持たない免疫不全マウスである。他に、T 細胞と B 細

胞を共に持たない SCID マウス、T 細胞や B 細胞などは存在するが全身リンパ節を持たず免疫不全を発症する aly マウス、自己免疫疾患である全身性エリテマトーデスのモデルマウスである MRL/lpr マウス、アトピーに似た症状を自然発症する NC/Nga マウスなどもよく知られている。また先述した DO11.10 のような遺伝子を改変したマウスも近年は、比較的容易に日本クレア、日本チャールズリバーなどの実験動物販売業者から入手可能である。これらのマウスは系統によっては、入手に時間がかかることもあるため、在庫について業者にあらかじめ確認しておく必要がある。繁殖ライセンスを購入できる系統については、定められた基準を満たす飼育施設があれば、自力で維持・繁殖することを考えても良い。

細胞の応答性は、同じ系列のマウスでも週齢や性別で大きく異なることがあるため、実験の目的に適する条件のマウスを選択する。

### 【細胞実験プロトコール】

培養中の微生物のコンタミネーションを防ぐため、細胞を動物から採取し、培養インキュベータに入れるまでの操作は極力クリーンベンチ内で行う。採取した臓器・細胞の劣化を防ぐため、全工程において、使用する培地などは操作している時以外は、できるかぎりアイスボックスなどに保持することで低温に保つ。免疫研究に用いられる組織は、骨髄、各所リンパ節、腸管や気道などの粘膜組織、末梢血、肝臓、脾臓など多岐にわたるが、本稿では、特に、免疫細胞のバザールとも呼ばれ、全身性のさまざまな種類の免疫細胞が集積する代表的な免疫器官である脾臓の活用について述べる。脾臓は採取も比較的簡単な上、ほとんどの試験に必要な細胞を確保できる大きさを持つ。なお、すべての動物実験は、各研究機関において定められた動物実験委員会の承認を得た上で、実験ガイドラインに従い、実施しなくてはならない。

#### 1. 脾臓細胞の調整

- 1) あらかじめ、消毒済の器具類や培地を入れたディッシュやチューブなどはクリーンベンチ内に用意しておく。
- 2) マウスを頸椎脱臼などで安楽死させた後、消毒用エタノールにより屠体を十分に濡らして消毒し、頭部を左、左側面を上にして、解剖台に乗せる。
- 3) 大きめのピンセットで腹部中央の皮をつまみ、持ち上げながら、皮にはさみを入れ、皮を剥ぎ取りながら切開し、薄い皮筋を露出させる。多くの場合、この時点で皮筋を透かして赤黒い脾臓が見える。
- 4) 皮筋を眼科手術用はさみで切開し、切開した周辺でマウスの体毛が付着しないように注意しながら、脾臓を眼科用先曲がりピンセットで引き出す。
- 5) 脂肪組織が付着していれば取り除き、脾臓を摘出する。
- 6) 摘出した脾臓を 35mm カルチャーディッシュに入れた 2mL の基本培地に浸す。
- 7) 滅菌ディスポーザブルシリンジのピストンなどで脾臓をよく摩砕し、細胞が懸濁された培地をスポイトなどで回収する。この際、脂肪組織や摩砕しきれなかった組織片を回収しないようにする。15mL コニカルチューブに入れた 6mL の基本培地に合わせて 8mL とする。
- 8) よく懸濁し、1 分間静置する。

- 9) 残渣が堆積しているチューブ底部の 1mL を残して、浮遊細胞が含まれる 7mL をスポイトなどで回収し、別の 15mL コニカルチューブに移す。
- 1 0) 細胞の入ったコニカルチューブを 4° C で 300G 前後で遠心分離にかけ、浮遊細胞をペレット状にする。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を残して除去する。
- 1 1) ペレットをピペッティングでほぐしながら FCS を含む培養用培地 4mL で再懸濁し、サンプルとする。
- 1 2) サンプルから少量 (5~10  $\mu$ L 程度) とり、トリパンプルーで 40 倍程度に懸濁し、顕微鏡下で細胞計数板を用いて計数する。脾臓の大きさによるが 1 匹あたりおおむね  $3 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$  個程度の細胞が得られる。試験に用いる細胞濃度に培養用培地で希釈する。

## 2. 脾臓細胞の刺激

得られる細胞の数や使用する試薬の濃度などはマウスの個体差や実験環境などに依存するため、予備検討により目的に適した試験条件を定める必要がある。96 ウェルの培養プレートを用いる場合、脾臓細胞は 1 ウェルあたり  $0.5 \sim 5 \times 10^5$  個、培養培地の総量はプレートの仕様によるが 200~300  $\mu$ L 程度を目安とすると良い。炭酸ガスインキュベーターで 37°C、CO<sub>2</sub> 5% の条件で培養する。回収した培養上清は -30°C 程度で凍結保存し、測定直前に解凍する。劣化を防ぐために、サンプルは凍結解凍を繰り返してはならない。

### 1) 抗原による刺激

脾臓には樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞や抗体を産生する B 細胞が含まれるため、あらかじめ抗原感作した動物や DO11.10 のような T 細胞レセプター遺伝子を導入したマウスから得た脾臓細胞の培養中に可溶性の抗原を添加すれば、抗体産生までの免疫応答を誘導できる。T 細胞の応答のみを観察する場合は、X 線照射処理などで抗原提示機能を維持しながらタンパク質の新生を阻害した脾臓細胞に、あらかじめ単離した T 細胞と抗原を添加すれば、より自然に近い抗原刺激による応答を観察できる。

サイトカインの定量には脾臓細胞を刺激して 12~96 時間後に回収した培養上清を用いる。培養時間は、IL-2、IL-4、IL-5 などは 12~48 時間、IL-6、IL-10、IL-12、IFN- $\gamma$  などは 48~72 時間を目安として予備検討し、決定すると良い。また細胞増殖の測定には 48~72 時間の培養時間を目安とすると良い。抗体産生の定量には刺激して 1 週間後を目安として回収した培養上清を用いると良い。

### 2) マイトージェンによる刺激

最終濃度が、ConA ならば  $0.5 \sim 4 \mu\text{g/mL}$ 、LPS ならば  $0.5 \sim 2 \mu\text{g/mL}$  を目安に脾臓細胞の培養中に添加する。サイトカインや細胞増殖の測定に必要な培養時間の目安は抗原刺激試験に準じる。LPS は B 細胞を直接刺激し、抗体産生を誘導できるため、1 週間程度の培養で抗体産生を観察できる。マウスの B 細胞は LPS の刺激によってアレルギーに関与する IgE 抗体も産生するが、この応答はヒトの B 細胞では起こらないので試験結果の解釈には留意する。

### 3) 抗体による刺激

細胞調整の前日に、滅菌した PBS で希釈した抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体を細胞培養用プレートに各ウェルに 50 ~100  $\mu$ L を目安として撒き、冷蔵庫などで 4°C で一晩維持し、抗体をプレート底面に固定（固相化）する。脾臓から単離した T 細胞を撒く直前に、アスピレーターで抗体希釈液を除去し、滅菌 PBS や培養用の培地などで 3 回洗浄し、固相化しなかった抗体を完全に除く。より多くの抗体を必要とするが、固相化せずに培地で希釈した抗体を培養中に添加して細胞を刺激することや、先述した Dynabeads T-Activator CD3/D28 などの使用も、試験の目的によっては検討する。サイトカインや細胞増殖の測定に必要な培養時間の目安は抗原刺激試験に準じる。

### 4) 培養中に添加するサンプル

水溶性が高ければ、PBS などに溶解し、0.22  $\mu$ m 口径の滅菌フィルターに通して滅菌するが、フィルターの素材はサンプルの物性に依りて選択するように注意する。水溶性が高くないものの希釈にはジメチルスルホキシド（DMSO）やメタノール等の溶媒が良く使用される。ただし試験によっては、これらの溶媒そのものが生理活性や毒性を示すことがあるため、対照区とは溶媒の最終濃度を合わせるように注意する。DMSO は最終濃度 0.1%以下とすることが一般的であるが、それにとらわれることなく、自ら予備検討によって試験に影響しない濃度を確認し、試験を実施することが重要である。

## 3.各種免疫応答の測定法

免疫応答は多岐にわたるが、活性評価には、定量性の高い細胞の増殖活性、及びサイトカイン、抗体などの液性因子が好適である。以下にこれらの測定法を示す。

### 1) 細胞増殖活性

#### (1)細胞の酵素活性を測定するアッセイ

テトラゾリウム塩は生細胞数の指標となる細胞内ミトコンドリアの酵素によってホルマザンに還元され、非水溶性の結晶として沈殿する。これを DMSO などの溶媒で溶解し、溶液の吸光度により定量することで、生細胞数を評価できる。テトラゾリウム塩としてメチルチアゾールテトラゾリウム（MTT）がよく用いられてきたが、近年は、可溶化を必要としない水溶性ホルマザンを生成する、より簡便で、検出感度・細胞毒性も改善された XTT、WST、MTS などの代替化合物が試薬メーカー各社から入手できる。培養中に添加し、数時間後、指定された吸収波長で吸光度を測定することで評価する。プレートリーダーを活用すれば、同時多検体処理も可能である。具体的な使用法は製品の使用説明書に準じ、試験に供する細胞の種類・数、試験に最適な培養時間などは自ら予備試験によって決定する必要がある。ミトコンドリアの活性は細胞数と強い相関があるが、評価したいサンプルが細胞の代謝系自体に影響を及ぼす場合などでは、不正確となる可能性がある。また、細胞増殖を評価するにあたっては、免疫した動物から得た細胞の抗原特異的な応答などのように、生細胞のうちで増殖する細胞が非常に少ない場合では、増殖していない生細胞のシグナルの中に増殖したわずか

な細胞のシグナルが埋もれてしまい、検出が難しくなることは注意すべきである。

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ようにする。

## (2)複製された DNA を測定するアッセイ

細胞増殖の際にはゲノム DNA が複製されるため、DNA 複製を測定することで細胞増殖を定量的に評価できる。生細胞数を一様に測定するテトラゾリウム塩法では不可能な、増殖した細胞のみの評価が可能である。一方で、増殖しない生細胞数の評価はできず、たとえば DNA 複製直後に細胞が死んでも反映されない。DNA の複製を測定するにはトリチウム標識したチミジン 0.5~1 $\mu$ Ci を培養中に添加して、複製中の DNA に取り込ませることで放射標識し、液体シンチレーションカウンターで測定する。チミジンの最適な添加時間は試験や試験対象となる細胞の種によって異なるため、予備検討を行う。

トリチウム化チミジンアッセイは、高感度であるが、放射性物質の管理などの困難がある。そのため、近年は、チミジンのアナログである臭素化デオキシウリジン(BrdU)をとりこませ、それを 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・ダイアグノスティックスやタカラなどからキットとして入手できる。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

細胞が産生するサイトカインの種類と量は免疫応答の強さと質の重要な指標となる。たとえば抗アレルギー活性の評価には IL-2、IL-4、IFN- $\gamma$ などがよく用いられる。IL-2 は T 細胞の活性化に強く関わり、T 増殖の増殖を誘導するサイトカインであり、IL-4 は抗体産生を誘導しアレルギーの増悪につながる Th2 型、IFN- $\gamma$ は Th2 免疫応答と拮抗するとともに、細胞性免疫を誘導する Th1 型の代表的なサイトカインである。抗炎症活性の評価には、LPS によって活性化されたマクロファージや樹状細胞など自然免疫系細胞の増殖や IL-12、IL-17、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-6 など炎症性サイトカインの産生量によって評価することがよく行われる。

細胞から産生されるサイトカインは多くの場合、産生量が pg/mL レベルと微量であり、質量分析計などの高感度分析装置を用いても定量は容易でないが、サイトカインに対する抗体が入手できれば、抗体を用いた免疫学的測定法（イムノアッセイ）によって測定できる。サイトカインなどの液性因子の測定にはサンドイッチ ELISA 法がよく用いられる。サンドイッチ ELISA 法は測定対象のタンパク質に特異的に結合する二種類のモノクローナル抗体とそれに結合する酵素、酵素に反応して発色する基質から成るが、これらを同梱してキット化したものが ebioscience、bioleged、日本 BD などの試薬メーカーから入手できる。製品ごとに感度、測定範囲、操作が異なるため、サンプルに含まれるサイトカインに応じて製品を選択、サンプルを希釈し、測定結果が検量線にのるようにする。適当な製品が入手できない場合は、抗体や酵素、基質を入手、条件検討し、自ら系を作成する。



### 3) 抗体

培養上清中の抗体も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、各試薬メーカーから抗体のクラス、サブクラス・動物の種ごとにキットが入手できる。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製品ごとに感度や前処理方法が異なるため、培養上清の希釈倍率など予備検討が必要である。

サンプルの抗アレルギー性を評価するにあたり、測定すべき抗体は、Th1 型抗体として IgG2a、Th2 型抗体として IgG1、IgE が代表的とされる。

#### 【おわりに】

動物から採取した初代細胞を用いる試験は培養細胞株試験と動物試験の利点を併せ持つ評価法であるが、採取時の動物の健康状態、細胞の取り扱いの熟練度、培養環境によって細胞の応答性が大きく異なる。そのため、統計的に意味のあるデータを得るためには、最低でも 3 匹以上から細胞を調整し、さらに再試験も行い、試験の信頼性を高めることが必要である。また試験環境の違いが、結果に大きく影響するため、予備検討を入念に行い、試験条件を自ら設定することが非常に重要である。