

T細胞依存性抗体産生の検査方法の検討—ELISA法とELISPOT法の比較—

山口敦美, 藤谷知子, 大橋則雄, 中江大, 小縣昭夫

T細胞依存性抗体産生の検査方法の検討—ELISA法とELISPOT法の比較—

山口敦美*, 藤谷知子*, 大橋則雄*, 中江大**, 小縣昭夫**

T細胞依存性抗体産生能を測定する系を確立した。測定法はELISA法とELISPOT法を、抗原は卵白アルブミン(OVA)とヘモシアニン(KLH)を、動物はICRマウスとBALB/cマウスを比較した。抗原投与8日目のマウスでは、ELISA法とELISPOT法とも同程度の感度で測定できた。しかし、ELISA法は少量の血液で測定できるため経時的に調べるには適していた。ICRマウスはOVA 100 µg, BALB/cマウスはKLH 20 µgの抗原で免疫し、6-8日目の血清で測定するのが最適であった。

キーワード : T細胞依存性抗体産生, ELISA法, ELISPOT法, ICRマウス, BALB/cマウス

はじめに

これまでに、我々は、ICRマウスを用いて様々な化学物質の毒性試験をおこなってきた。その中のいくつかは、胸腺の萎縮や脾臓の肥大など免疫系に関係のある臓器に影響する結果を得ている。化学物質が免疫毒性を持つ証拠の一つとして、化学物質が抗体産生に影響を及ぼしているかどうかを検査する必要がある。これまで抗体量は、血清中の抗体を測るELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)法や赤血球を抗原とする抗体産生細胞が赤血球と反応してプラークを作るPFC (plaque-forming cell)法で測定されてきた。ELISA法と類似した方法で血清中の抗体ではなく抗体産生細胞から産生される抗体を直接測定するELISPOT (enzyme-linked immunosorbent assay)法¹⁾がELISA法よりも高感度で検出できる方法として注目されている。

この論文では、抗原の選択とELISA法とELISPOT法を検討した。抗原は、高い抗原性を持ちT細胞依存性に抗体を産生する卵白アルブミン(OVA)及びkeyhole limpet hemocyanin (KLH)を比較した。また、免疫反応の評価にはBALB/cマウスが用いられていることが多いので、ICRマウスとBALB/cマウスの比較検討も行った。

実験方法

1. 材料および測定機器

OVA, KLH, ウシアルブミン(BSA)とcyclophosphamide (CYC)はSigma社, horseradish peroxidase (HRP)標識抗マウスIgM抗体はZymed社, HRP標識抗体の基質として3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) BioFX社, ABTS TabletsはRoche社より購入した。OVAは1 mg/ml OVAと9% AIK(SO₄)₂を1:1で混合しKOHでpH 6.5に調製し、PBSで3回洗浄して、0.5 mg/mlのOVA(+alum)溶液を作成し、免疫に用いた。KLHはPBSで0.5 mg/mlに調製して使用した。細胞培養液RPMI-1640, 牛胎児血清, 1M HEPES, 100 mM ピルビン酸ナトリウム, 200 mM L-グルタミン酸, ペニシリン-ストレプトマイシン, 2-メルカプトエタノール, 非必須アミノ酸はGIBCOより購入した。吸光度はマイクロプレートリーダー(サン

ライズリモート, 和光純薬工業社)を用いてOD405nmで測定した。

2. 血清と細胞の調製

8-10週齢の雌ICRマウスとBALB/cマウスに抗原として1匹あたり200 µlの20 µgか100 µgのOVA(+alum)あるいはKLHを腹腔内投与した。対照はPBSを投与した。投与前, 投与後3-8日に尾静脈から採血し、血清を分離して、測定するまで-80°Cで保存した。8日目には脾臓から細胞を調製した。脾臓の細胞は4 mlの0.5% BSAを含むPBS中で、脾臓を磨りの付いたスライドガラスの磨りの部分で磨り潰した後、径57 µmのナイロンメッシュでろ過した。1,200 rpm, 5 minで遠心して、さらに4mlの0.5% BSAを含むPBSを加えて再浮遊させ1,200 rpm, 5 minで洗浄した。4 mlの溶血液(0.173 M Tris-HCL (pH7.65): 0.83% NH₄Cl=1:9)を加えて、室温10 minで赤血球を溶血させた。4 mlの0.5% BSAを含むPBSで1,200 rpm, 5 minで2回洗浄して、1.5 x 10⁷/mlと5 x 10⁶/mlになるように培養液(RPMI-1640, 10% FCS, 1M HEPES (1% v/v), 100 mMピルビン酸ナトリウム (1% v/v), 200 mM L-グルタミン酸(1% v/v), ペニシリン-ストレプトマイシン (1% v/v), 2-メルカプトエタノール (0.1% v/v), 非必須アミノ酸(1% v/v))に再浮遊した。

3. ELISA法

100 µg/ml (PBS) のOVAあるいはKLHを100 µlずつ96ウェルのプレート(FALCON)に加え、4°Cで一晩静置した後、0.05% Tween20を含むPBS (0.05TP)で6回洗浄後、150 µlの5% BSAを含むPBSで室温1時間ブロッキングした。希釈した100 µlの血清をウェルに加えて、室温2時間静置した後、0.05TPで6回洗浄後、HRP標識抗マウスIgM抗体を加え一時間静置、0.05TPで6回洗浄後、基質のABTSを加えて発色させ、OD 405 nmで測定した。有意差検定はt検定を用いた。

4. ELISPOT法

100 µg/ml (PBS)のOVAあるいはKLHを100 µlずつ96ウェルのプレートに加え、4°Cで一晩静置した後、PBSで6回洗浄後、

* 東京都健康安全研究センター環境保健部生体影響研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

** 東京都健康安全研究センター環境保健部 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

150 μ l 5 % BSAを含むPBSで室温1時間ブロッキングした。抗原投与後8日目の脾臓から調製した0.1 mlの細胞浮遊液(5 x 10⁵と1.5 x 10⁶細胞)をOVAあるいはKLHをコートしたウェルに加えて、5 % CO₂, 37 °Cで4時間培養した後PBSで6回洗浄後、HRP標識抗マウスIgM抗体を加え4 °Cで一晩静置した。PBSで6回洗浄後、基質であるTMBを加えて発色させた。脾臓細胞から産生された抗体が底面にコートしたOVAやKLHと反応してできたスポットを倒立顕微鏡で観察、CCDカメラで画像を取り込み、画像解析ソフトWin ROOF(三谷商事(株))でスポット数と面積を計測した。有意差検定はt検定を用いた。

5. Cyclophosphamideの抗体産生抑制作用

CYCはアルキル化剤で、DNA合成を阻害する作用を持つことから抗悪性腫瘍剤として、抗体産生を抑制することから免疫抑制剤として使用されている²⁻⁴⁾。ICRマウスに100 mg/kgのCYCを1, 3, 7, 11日目に腹腔内投与した。OVA(+alum)(100 μ g/匹)は7日目に腹腔内投与した。対照として、CYCの代わりにPBSを投与し、OVA(+alum)を投与した群を用いた。CYC投与前、投与後11, 14日目に採血し、ELISA法で抗体量を測定した。14日目には脾臓細胞を分離して、ELISPOT法で抗体産生量を測定した。

結果

1. ELISA法

図1にOVAを抗原とした時のICRマウス(A)とBALB/cマウス(B)での抗体産生量の経時変化を示す。ICRマウスとBALB/cマウスともOVAは投与量が20 μ gより100 μ gの方が抗体産生量は多かった。100 μ gでは投与6日目から抗体産生量が増加した。BALB/cマウスの方がICRマウスに比べて抗体産生量は多かった。図2にKLHを抗原とした時のICRマウス(A)とBALB/cマウス(B)での抗体産生量の経時変化を示す。KLHはICRマウスでは20, 100 μ gとも投与6-8日で投与前の約2倍に増加した。BALB/cマウスでは投与4日めで、20 μ gでは2倍、100 μ gでは3倍に増加し、8日目では20 μ gでは2.5倍、100 μ gでは4倍に増加した。すべてが統計的に有意ではないが、十分な抗体産生が観察された。

2. ELISPOT法

図3にOVAを抗原とした時のICRマウスとBALB/cマウスでの抗体産生のスポット数(A)と面積(B)を計算した結果を示す。ICRマウスは、OVAが20 μ gで細胞数1.5 x 10⁶の時に面積が増加した(p<0.05)。OVAが100 μ gで細胞数5 x 10⁵と1.5 x 10⁶の時、スポット数と面積が増加した。BALB/cマウスではOVAが100 μ gで細胞数1.5 x 10⁶の時のみスポット数と面積が増加した。

図4にKLHを抗原とした時のICRマウスとBALB/cマウスでの

抗体産生をスポット数(A)と面積(B)で計算した結果を示した。KLHはばらつきが大きかったが、ICRマウスでは、KLHが100 μ gで細胞数5 x 10⁵の時にスポット数が増加し、細胞数1.5 x 10⁶の時にスポット面積が増加した。BALB/cマウスではKLHが20 μ gで細胞数1.5 x 10⁶でスポットの数と面積が増加し、KLHが100 μ gで細胞数5 x 10⁵, 1.5 x 10⁶の時にスポット面積が増加した。

3. Cyclophosphamideの抗体産生抑制作用

血清中の抗卵白アルブミン抗体の量をELISA法で測定した結果を図5に示した。投与前はODで0.22が、対照のPBS/OVAでは11日0.61に15日に0.40であったが、CYC/OVAではそれぞれ0.23と0.17と減少した。ELISPOT法では細胞数が5 x 10⁵の場合には効果が明らかではなかったが、細胞数が1.5 x 10⁶の時はCYC/OVAではスポット数は減少、スポットの面積も減少傾向を示した(図6)。

考察

T細胞依存性の抗体産生を評価する方法としてELISA法とELISPOT法を比較した。どちらの測定法でも、同程度に、抗原特異的IgM抗体の増加を観察できた。免疫抑制剤であるCYCの前投与で抗原特異的IgM抗体が減少したことから、T細胞依存性抗体産生を反映していることが確認された。ELISA法より、単一細胞レベルで検出可能であるELISPOT法の方が、感度が高いといわれているが、今回8日目のマウスだけの結果ではあるが、ELISPOT法がELISA法に比べて感度が著しく優れているという結果は得られなかった。抗体産生量は、ELISA法ではBALB/cマウスの方が高め、ELISPOT法ではICRマウスの方が高めであったが、理由は不明である。どちらの場合も、少なくとも6日以降に検査を行えば、抗体が測定できた。しかし、ELISA法は少量の血液で測定できるので、経時的に調べるのに適している。それゆえ、T細胞依存性抗体産生能の評価は、ICRマウスではOVA(+alum) 100 μ g、BALB/cマウスではKLH20 μ gの抗原で免疫して、6-8日目に採血してELISA法でおこなうのが最適であると考えられた。

文献

- 1) Sedgwick, J. D., C. Czerkinsky. *J. Immunol. Methods*, **150**, 159-175, 1992.
- 2) Botnick, L. E., E. C. Hannon, S. Hellman. *Nature*, **262**, 68-70, 1976.
- 3) Braciale, V. L., C. R. Parish. *Cell Immunol.*, **51**, 1-12, 1980.
- 4) Siena, S., H. Castro-Malaspina, S. C. Gulati, *et al.*: *Blood*, **65**, 655-662, 1985.

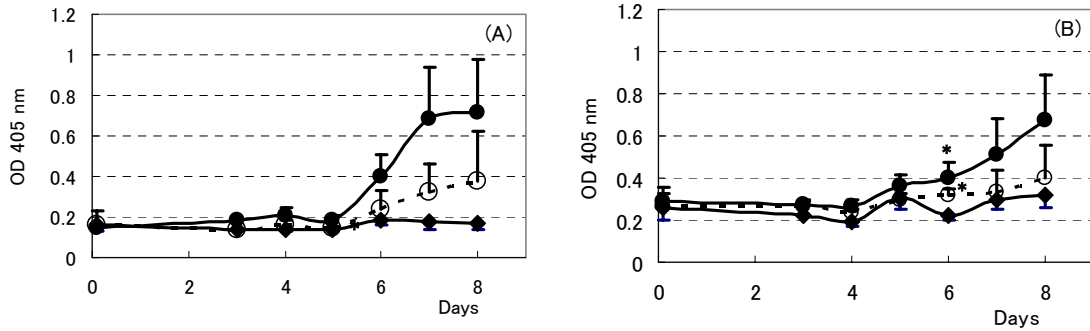


Fig. 1 Quantity of OVA specific antibody production by ELISA method

(A) ICR mice, n=2-5 (B) BALB/c mice, n=2-6, mean±SE, *p<0.05, ◆:PBS, ○:OVA 20 µg/mouse, ●:OVA 100 µg/mouse

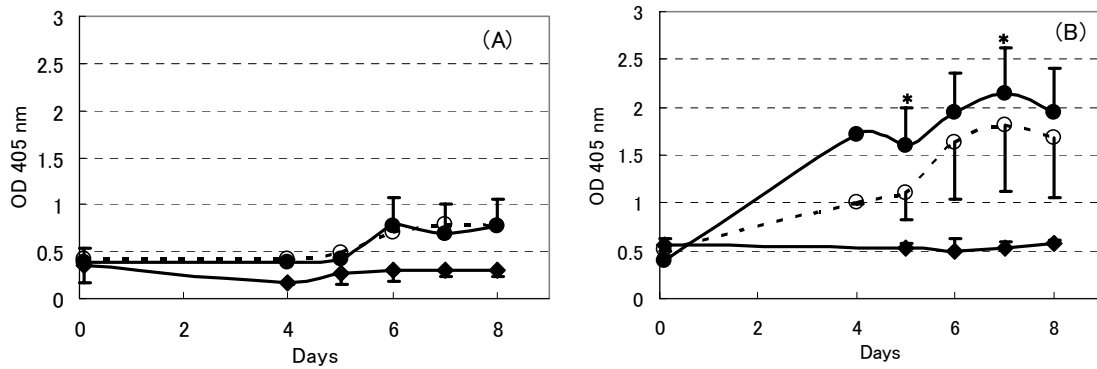


Fig. 2 Quantity of KLH specific antibody production by ELISA method

(A) ICR mice, n=2-5 (B) BALB/c mice, n=2-6, mean±SE, *p<0.05, ◆:PBS, ○: KLH 20 µg/mouse, ●: KLH 100 µg/mouse

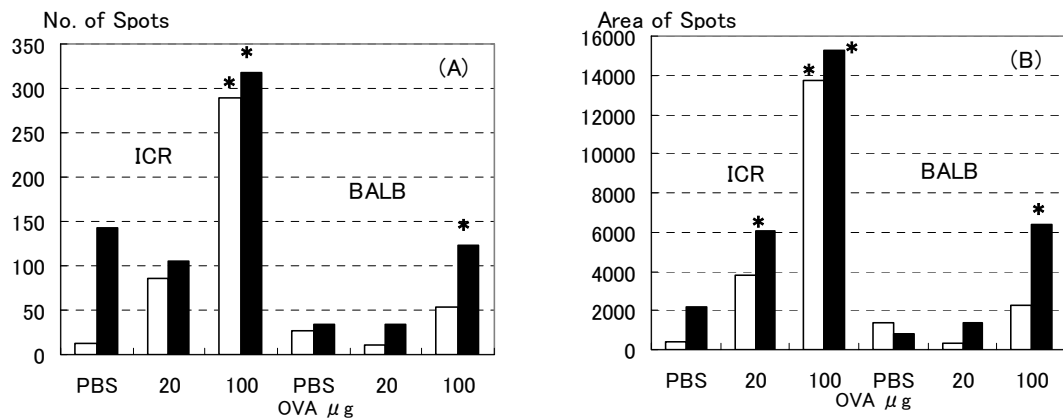


Fig. 3 Quantity of OVA specific antibody production by ELISPOT method

(A) Number of spots, n=6 (B) Area of spots, n=6, mean±SE, *p<0.05, □: 5 x 10⁵ cells, ■: 1.5 x 10⁶ cells

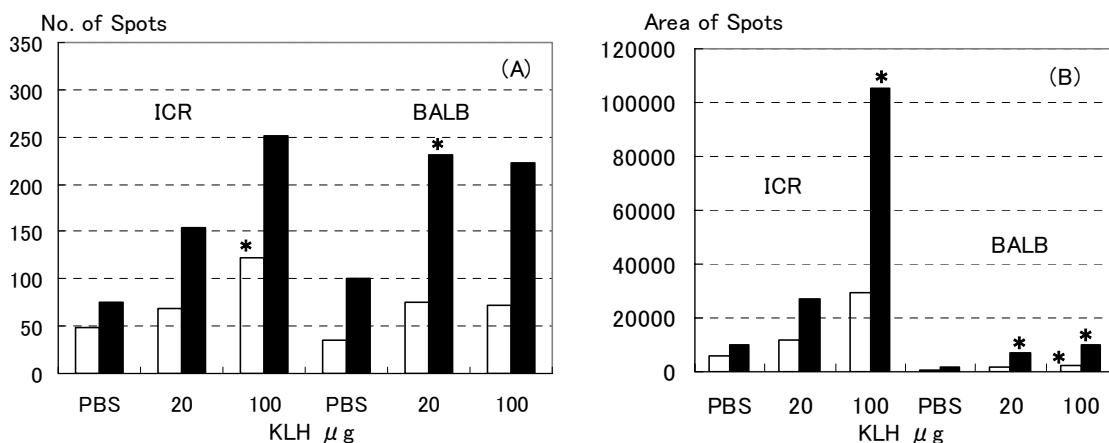


Fig. 4 Quantity of KLH specific antibody production by ELISPOT method
 (A) Number of spots, n=6 (B) Area of spots, n=6, mean+SE, * p<0.05, □: 5 x 10⁵ cells, ■: 1.5 x 10⁶ cells

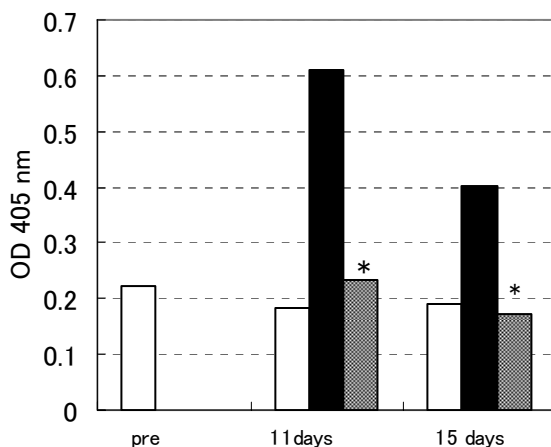


Fig. 5 The inhibitory effect of the antibody production by the cyclophosphamide administration (ELISA method)
 *p<0.01 □:no treat, ■:PBS/OVA, ▨:CYC/OVA

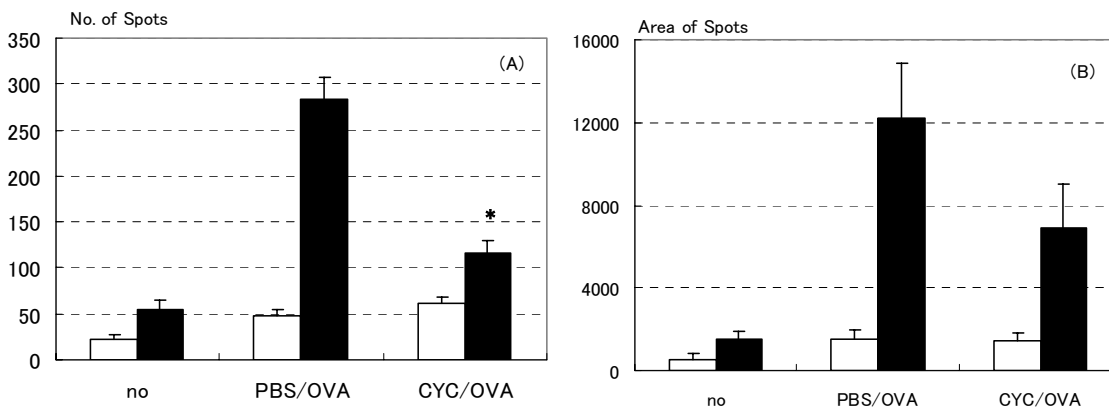


Fig. 6 The inhibitory effect of the antibody production by the cyclophosphamide administration (ELISPOT method)
 (A) No. of spots (B) Area of spots *p<0.01, □: 5 x 10⁵ cells, ■: 1.5 x 10⁶ cells

Investigation of T-cell Mediated Antibody Production- Comparison of ELISA and ELISPOT

Atsumi Yamaguchi, Tomoko Fujitani, Norio Ohashi, Dai Nakae and Akio Ogata

We have previously tested the toxicities of various chemicals using ICR mice. Some of the chemicals affected organs involved in the immune system, such as thymic atrophy and the hypertrophy of the spleen. It is necessary to examine whether a chemical has an influence on antibody production to determine that a chemical has immunotoxic properties. There are two methods for antibody detection, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), a method that measures the concentration of antibody in the serum, and the PFC (plaque-forming cell) method, which measures the number of IgM plaque-forming cells. Recently, the ELISPOT (enzyme-linked immunospot assay) method¹⁾ has attracted a great deal of attention because it directly measures antibody forming cells and is considered to be more sensitive than the ELISA method.

In this paper, we compared with the ELISA and ELISPOT methods using two antigens, keyhole limpet hemocyanin (KLH) and ovalbumin (OVA), which both have high antigenicity in T-cell mediated antibody production. We also conducted a comparison between ICR mice and BALB/c mice because BALB/c mice are typically used for immunoreactive evaluations.

Keywords: T-cell mediated antibody production, ELISA method, ELISPOT method, BALB/c mice, ICR mice