

クラゲコラーゲンの免疫調節活性に関する研究

要約

クラゲ可食部（外傘）の酸・熱水抽出物にハイブリドーマやヒト末梢血リンパ球の抗体産生、サイトカイン産生を非常に強く増強する効果が認められた。クラゲ抽出物のコラーゲナーゼ処理により、産生促進効果が消失した。このことから、活性本体はコラーゲンであることが確認された。ウシアキレス腱由来コラーゲンにも抗体産生促進効果は認められたもの、クラゲコラーゲンと比較すると、弱い活性しか示さなかった。これまでコラーゲンの免疫調節機能に関する報告はほとんど無く、特にクラゲコラーゲンの新規生理機能である。

1. 緒言

無血清培養下において、**クラゲ抽出物**がヒト型ハイブリドーマ細胞や末梢血リンパ球の抗体産生、あるいはサイトカイン産生を促進することが明らかとなった。そこで本報告では、クラゲ抽出物の**免疫調節活性**について報告する。

2. 実験方法

2.1 Materials

クラゲ

ホワイトタイプ (*Lobonema smithi*)

細胞

HB4C5細胞：ヒト型ハイブリドーマ細胞株
ヒト末梢血リンパ球 (hPBL)

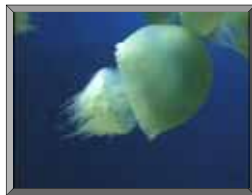
培地

インスリン、トランスフェリン、エタノールアミン、セレナイト含有ERDF培地 (ITES-ERDF)

2.2 Methods

クラゲ抽出物調製法

ホワイトタイプ (*Lobonema smithi*) クラゲの外傘 (Exumbrella) 部分を細かく刻み、**希塩酸 (pH=3) 中で12時間抽出**した後、**121、20分**の加熱抽出を行った。遠心後、得られた抽出液を10mMリン酸緩衝液 (pH=7.4) に対して透析した。



アッセイ法

HB4C5細胞、あるいはhPBLをクラゲ抽出物添加ITES-ERDF培地で培養し、培養上清中に分泌された抗体、あるいはサイトカイン量を酵素抗体法を用いて定量した。

3. 結果と考察

3.1 HB4C5細胞の抗体産生に及ぼすクラゲ抽出物の効果

ITES-ERDF培地にクラゲ抽出液を様々な濃度で添加し、HB4C5細胞を 5×10^4 cells/mlで6時間培養後、培養上清中に分泌されたIgM量をELISA法で測定した。



濃度依存的にIgM産生が促進され、タンパク質濃度として85 µg/mlの添加で産生量は130 ng/mlに達し、コントロールに対して産生量は**34倍促進**された。

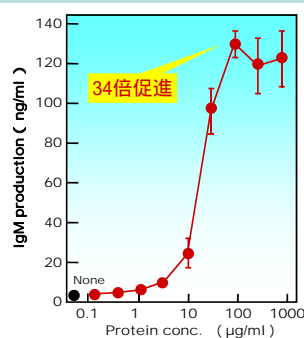


Fig. 1 HB4C5細胞の抗体産生に及ぼすクラゲ抽出物の効果

3.2 クラゲ抽出物のコラーゲナーゼ処理による活性への影響

抽出pHが3であること、121での熱水抽出であることからクラゲ抽出液中の活性物質はコラーゲンであることが予想された。そこで、コラーゲナーゼ処理によるクラゲ抽出液の活性の変化を検討した。クラゲ抽出物 (1.6mg/ml) を25 µg/ml、および250 µg/mlのコラーゲナーゼで37、10分間処理し、5分間の煮沸により酵素失活した後、抗体産生促進活性を測定した。

Table 1 クラゲ抽出物のコラーゲナーゼ処理による抗体産生促進活性への影響

	IgM production (ng/ml)	Activity (%)
None	14.8 ± 0.4	0
Intact	173.1 ± 4.9	100
Collagenase-treated		
25 (µg/ml)	88.8 ± 1.6	47
250 (µg/ml)	16.5 ± 0.2	1

表1に示したように、コラーゲナーゼ処理で活性が消失した。また、50 µg/mlのトリプシン処理でも抗体産生促進活性は消失した。以上のことから、クラゲ抽出物中の**活性因子はコラーゲン、あるいはゼラチンによるものである**ことが示唆された。

3.3 他種クラゲ抽出物、および他生物由来コラーゲンの活性

ホワイトタイプ以外のクラゲとして、セミチャイナタイプおよびキャノンボールタイプのクラゲ抽出物、およびウシアキレス腱由来コラーゲンの抗体産生促進活性を検討した。

Table 2 他種クラゲ抽出物、および他生物由来コラーゲンの抗体産生促進活性

	IgM production (ng/ml)
None	0.8 ± 0.0
Jellyfish	
White type	154.0 ± 18.3
Semichina type	151.0 ± 1.0
Canonball type	106.6 ± 18.5
Bovine Achilles tendon	25.5 ± 0.0

各因子は終濃度25 µg/mlで培地に添加

すべての**クラゲ抽出物に促進活性**を認めた (表2)。また、ウシアキレス腱由来コラーゲンも活性を示した。この結果より、クラゲ抽出物中の**コラーゲンが活性本体**であり、**ウシ由来コラーゲンよりも活性が強い**ことが確認された。

3.4 hPBLの抗体産生に及ぼすクラゲコラーゲンの効果

ホワイトタイプクラゲ由来コラーゲンのhPBLのIgM、およびIgG産生に及ぼす効果を検討した。hPBLを 1×10^6 cells/mlでITES-ERDF培地に接種し、種々の濃度のクラゲ抽出液を添加し、3日間培養後の培養上清中のIgMとIgG産生量を測定した。

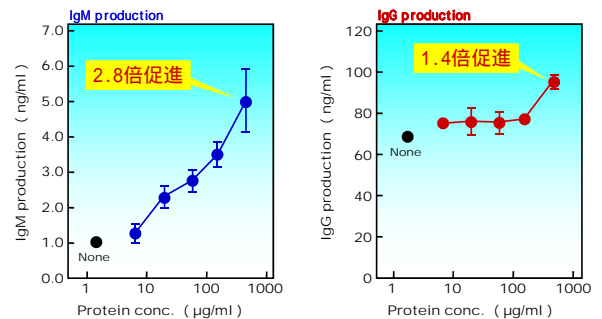


Fig. 2 hPBLの抗体産生に及ぼすクラゲコラーゲンの効果

図2に示したようにヒト末梢血リンパ球の抗体産生はクラゲコラーゲンの濃度に依存的に産生促進され、450 µg/mlの添加で**IgM産生量は2.8倍**となった。一方、**IgG産生は1.4倍**に促進された。

3.5 hPBLのIFN-γ産生に及ぼすクラゲコラーゲンの効果

ホワイトタイプクラゲコラーゲンのhPBLのIFN-γ産生に及ぼす効果を検討した。hPBLを 1×10^6 cells/mlでITES-ERDF培地に接種し、種々の濃度のクラゲ抽出液を添加し、10 µg/mlのリボポリサッカライド (LPS) の共存下で3日間培養後、培養上清中のIFN-γ産生量を測定した。

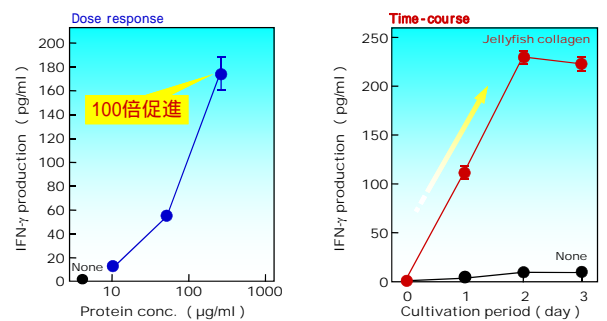


Fig. 3 hPBLのIFN-γ産生に及ぼすクラゲコラーゲンの効果

図3に示したようにIFN-γ産生はクラゲコラーゲンにより濃度依存的に産生促進され、250 µg/mlの添加で**産生量は100倍促進**された。また、産生蓄積量の経時変化を検討したところ、培養初期から著しい産生促進効果を示し、培養2日目まで蓄積量は**経時的に増加**した。

3.6 hPBLのTNF-α産生に及ぼすクラゲコラーゲンの効果

ホワイトタイプクラゲコラーゲンのhPBLのTNF-α産生に及ぼす効果を検討した。hPBLを 1×10^6 cells/mlでITES-ERDF培地に接種し、種々の濃度のクラゲ抽出液を添加し、10 µg/mlのLPSの共存下で培養後、培養上清中のTNF-α産生量を経時的に測定した。

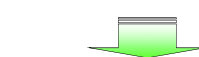


図4に示したように、TNF-α産生はクラゲコラーゲンにより**17倍促進**された。

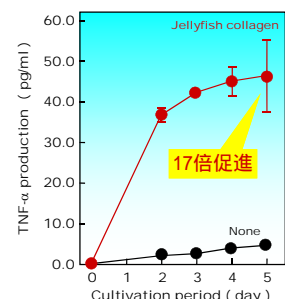


Fig. 4 hPBLのTNF-α産生に及ぼすクラゲコラーゲンの効果