

ワークショップ2

稀な血液の検査体制と供給体制

ワークショップ2

遺伝子組み換えによるモノクローナル抗体の作製

飛田隆太郎(日本赤十字社関東甲信越ブロック血液センター)

ハイブリドーマ細胞の中には培養中に抗体を產生しなくなる細胞が出てくるため、安定的に培養ができる細胞もある。そこで抗体產生ハイブリドーマの抗体遺伝子を取り出し、別の細胞で抗体を產生させるリコンビナント抗体の作製を行った。リコンビナント抗体にすることで安定的に培養できることが期待され、さらにハイブリドーマ細胞に比べ細胞の生育速度が速いため、短期間に大量培養が可能である。また、可変領域と定常領域の組み換えが可能となり、ヒトIgGからヒトIgM、マウスIgGからヒトIgGやヒトIgMの作製が可能となる。

○リコンビナント抗体作製

ハイブリドーマ細胞より抗体遺伝子を抽出し、H鎖、L鎖の可変領域と定常領域を合わせた全領域をPCRで増幅し、ベクターへ組み込み、配列を確認した。その後H鎖、L鎖をジヒドロ葉酸レダクターゼ(dhfr)とピューロマイシン耐性遺伝子が乗っている同一の発現ベクターに乗せ換え、dhfrが欠損したCHO細胞に導入した。発現ベクターを導入したCHO細胞はピューロマイシン耐性となるため、培地中にピューロマイシンを添加して培養すると、遺伝子が導入されていない細胞は死滅す

る。この原理を利用して遺伝子導入された抗体產生細胞をスクリーニングし、クローニングを行った。次の段階としてdhfrと競合関係にあるMTXを加えると細胞内でdhfrの増幅が起こり、それに伴いdhfrと同一ベクター上にある抗体の遺伝子も増幅する系を用いた。クローニングした抗体產生細胞にMTXを加えることで抗体遺伝子が増幅した細胞を得た。さらにスクリーニングとクローニングすることで最も抗体を產生している細胞株を樹立した。これまでの工程で得られた產生細胞を15cm dishで培養し、ハイパーフラスコ4個分で培養することで約2Lの抗体含有培養上清を取得した。この方法を用いて、7ロット分を製造してそれぞれハイブリドーマと比較した(表1)。1~5回目までは別々の担当者が培養したが、すべてのロットにおいてハイブリドーマより高い抗体値を示した。また、6、7回目は4L作製したが全ロットにおいて安定的にハイブリドーマより高いスコア値を示した。

○可変領域と定常領域の組み換えについて

分子サイズの小さいIgGでは簡便な食塩液法で赤血球は凝集しない。このため煩雑な間接抗グロブリン法が必要となり、反応後の赤血球洗浄や抗

表1 リコンビナント抗Cを7ロット製造した後、ハイブリドーマ抗Cと比較

R₁R₂血球を用いて食塩液法(試験管)で測定したリコンビナント抗Cの製造ロット間差

ロット(量)	2倍連続希釈								スコア値
	1	2	4	8	16	32	64	128	
1回目(2L)	4	4	4	4	4	3	w	0	73
2回目(2L)	4	4	4	4	4	3	w	0	73
3回目(2L)	4	4	4	4	3	2	1	0	71
4回目(2L)	4	4	4	4	3	2	1	0	71
5回目(2L)	4	4	4	4	3	2	1	0	71
6回目(4L)	4	4	4	4	3	1	0	0	63
7回目(4L)	4	4	4	4	4	2	w	0	71
ハイブリドーマ	4	4	4	2	1	0	0	0	49

グロブリン試薬を添加しなければならない。一方、IgMは食塩液法で凝集反応がおこるため、多検体処理や自動機器での使用や直接抗グロブリン試験陽性検体の検査が可能となる。そこでヒト IgG 抗体の IgM 化を試みた。IgM 化抗体作製の手順は、ハイブリドーマ細胞より抗体遺伝子を抽出し、H鎖、L鎖の可変領域と定常領域を合わせた全領域を PCR で增幅し、ベクターへ組み込み、配列を確認するところまでは、先ほどのリコンビナント抗体作製の時と同様の方法である。その後に H鎖の可変領域と IgG 定常領域を切断し、H鎖可変領域と IgM 定常領域を L鎖と共に発現ベクターに組み込み、CHO 細胞に導入した。今回はハイブリドーマ IgG 抗 D の HIRO-3 と HIRO-9 の IgM 化抗体を作製した。IgM 化抗体をハイブリドーマ IgG 抗体と比較したところ、ハイブリドーマ IgG 抗体では食塩液法では凝集反応は見られなかったが、IgM 化抗体では Hiro-3 で 512 倍、Hiro-9 で 128 倍の抗体価が得られた。カラム法を用いて D 陽性、D 陰性血球との反応性を確認した。両 IgM 化抗体とともに D 陽性血球 3 例と反応し、D 陰性血球 3 例とは反応せず、抗 D の特異性を確認した（図 1）。

さらに D 陽性血球、D 陰性血球それぞれ 60 検体ずつ PK7300 で検査を行ったところ、現在日赤の

PK7300 で使用している抗 D と同様に D 陽性血球の SPC 値は陽性領域となり、D 陰性血球の SPC 値は陰性領域となった。次に partial D 血球を用い特異性の確認試験を行った。HIRO-3 から作製した IgM 化抗体はハイブリドーマと同様に使用した partial D 血球すべてと反応した。HIRO-9 から作製した IgM 化抗体は IVa, DFR, DCS と強く反応し、こちらもハイブリドーマと同様の特異性を示すことを確認した（表 2）。

○まとめ

ハイブリドーマ細胞から cDNA を作製し、これを元にリコンビナント抗体を作製することができた。得られたリコンビナント抗体はハイブリドーマ抗体と特異性が同じで、抗体価も高く、安定的に培養が可能な抗体の取得に成功した。また、IgG 抗体の IgM 化においてもハイブリドーマ抗体と特異性が同じ抗体の取得に成功した。今後は、既存の抗体を改変して PK7300 による抗原スクリーニングや、直接抗グロブリン試験陽性検体のタイプングに使用できる抗体を作製する。また、まれな血液型に対する新規抗体を取得し、得られた抗体は IgM 化し、PK7300 で使用できるリコンビナント抗体の作製を試みたい。

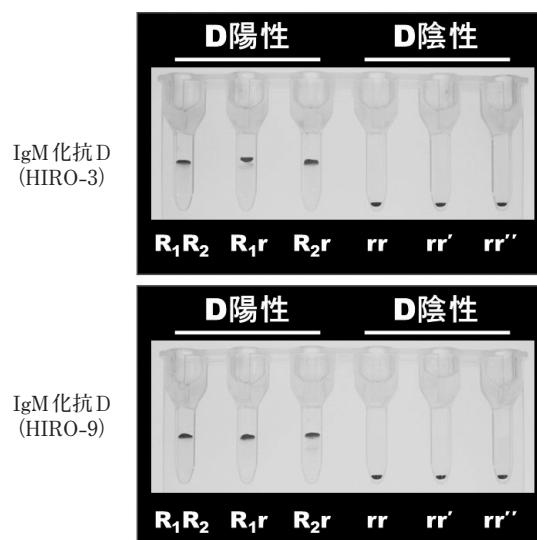


図 1 食塩液法用カラムを用いた IgM 化抗体の特異性確認

表2 IgM化抗体とPartial D血球との反応性

Partial D 血球	抗D (HIRO-3)		抗D (HIRO-9)	
	ハイブリドーマ (抗グロブリン法)	IgM化抗体 (食塩液法)	ハイブリドーマ (抗グロブリン法)	IgM化抗体 (食塩液法)
IVa	4+	4+	4+	4+
IVb	4+	4+	1+	2+
Va(Kou)	4+	4+	1+	w
Va(Hus)	4+	4+	3+	3s+
VI	4+	4+	0	0
DYO	4+	4+	0	0
DFR	4+	4+	4+	4+
DBT	4+	3+	0	0
DCS	4+	4+	4+	3+
R1r	4+	4+	4+	4+

ワークショップ2

稀な血液の検査体制の現状と課題

大橋 恒, 三浦佳乃, 今 絵未, 宮崎 孔, 佐藤進一郎, 加藤俊明, 紀野修一, 高本 滋
 (日本赤十字社北海道ブロック血液センター)
 池田久實, 山本 哲(北海道赤十字血液センター)

はじめに

日本赤十字社では、モノクローナル抗体の開発と自動血液型検査装置の導入によって、稀な血液型の大量スクリーニングを行い、その確保に努めてきた。現在は特殊血液調査事業として、稀な血液の円滑な供給確保を図るために調査、登録者と血液の確保および国内外への供給を目的に実施しているが、これらのデータと各ブロックの実施状況調査をもとに、検査体制の現状と課題について報告する。

1. 検査体制

稀な血液型は、抗原頻度によりⅠ群(41種)とⅡ群(5種)に分類されているが、各ブロック血液センターでは、登録者が少なく供給頻度の高い10～15種類について、新規・初回献血者を対象に自動輸血検査装置PK7300によるスクリーニングを実施している。新たに発見された稀な血液型の情報は、血液事業情報システムへ登録するとともに、献血者には登録要請を行い、献血された血液は赤血球液あるいは解凍赤血球液として供給される。

稀な血液型スクリーニングには、モノクローナル抗体が必須であり、その多くが試薬製造センター(関東甲信越および近畿ブロック血液センター)から供給されているが、抗体試薬がない場合は遺伝子検査が有用となる。我々は融解曲線解析法によるDombrock遺伝子スクリーニングを行い、DOA/DOAの献血者をDo(b-)型として登録し、冷凍血液を確保した。

こうした稀な血液型スクリーニングなどにより、平成26年度にはⅠ群185件、Ⅱ群1,265件を検出した。

2. 供給数と登録者数

稀な血液型の血液供給数は増加傾向にあり、平

成25年度以降は2,000単位を超えており、また、平成21年度以降は赤血球液(RBC)の供給比率が解凍赤血球液(FTRC)に比べて大きく伸び、近年は90%を超える状況が続いている。Ⅱ群については、平成26年度の供給数は約1,000バッグで、RBCの比率は97%であった。さらに、登録者数も約10,000人と平成12年度から倍増しており(図1)，全国的な稀な血液型スクリーニングの強化と需給調整によって、比較的円滑な供給が図られている。

一方、Ⅰ群の供給数は年間30～70バッグ程度で、FTRCによる供給が多い傾向にある。また、平成26年度の登録者数は約800名で、平成12年度から約200名しか増加しておらず、円滑な供給には、さらなるスクリーニングが必要である(図2)。In(Lu)やD--, K_sは比較的多く見つかっており、平成26年度末では100名を超える登録者が確保されているが、BombayやP^kなどは数名に留まり、pでは減少傾向も認められることから、献血者の高齢化も考慮した上で、その確保に取り組むことが必要である(図3)。

3. 冷凍血液の製造と在庫

冷凍血液の製造は検査課または製剤課が判断しており、多くの施設では適正在庫や製造上限といった基準を設けて製造している。その理由は解凍赤血球液の供給が減少し、緊急時の対応として在庫していること、検査法や製造方法の変更によって在庫が整理減損されたこと、あるいは保管場所が少ない、ということであった。近年の解凍赤血球液の供給状況を考慮すると、効率的な保管方法や在庫の一元管理の検討が必要と思われる。

冷凍血液は平成12年度以降、Ⅰ群とⅡ群を合わせ5,000～7,000バッグが保管されていたが、平成24年度にⅡ群の保存前白血球除去が未実施の製剤とHBV感染既往の血液に係る安全対策の対象とな

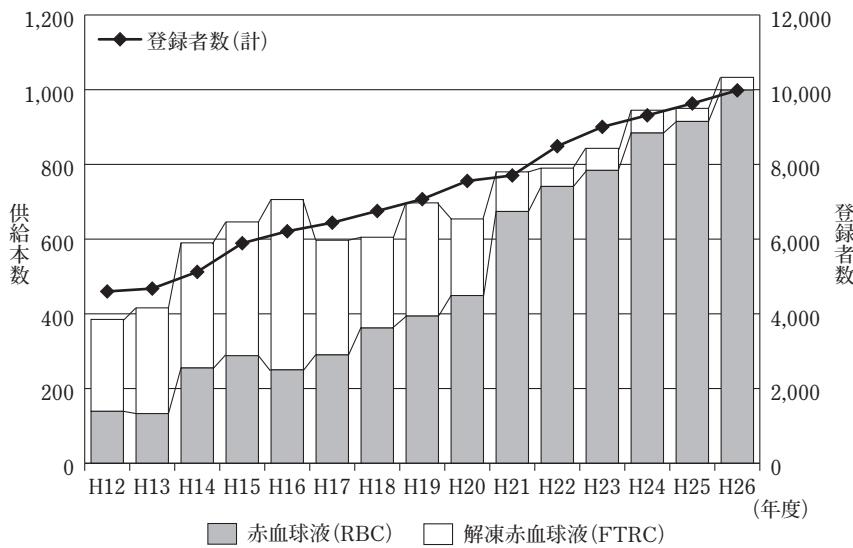


図1 製剤別供給数と登録者数の推移(Ⅱ群)

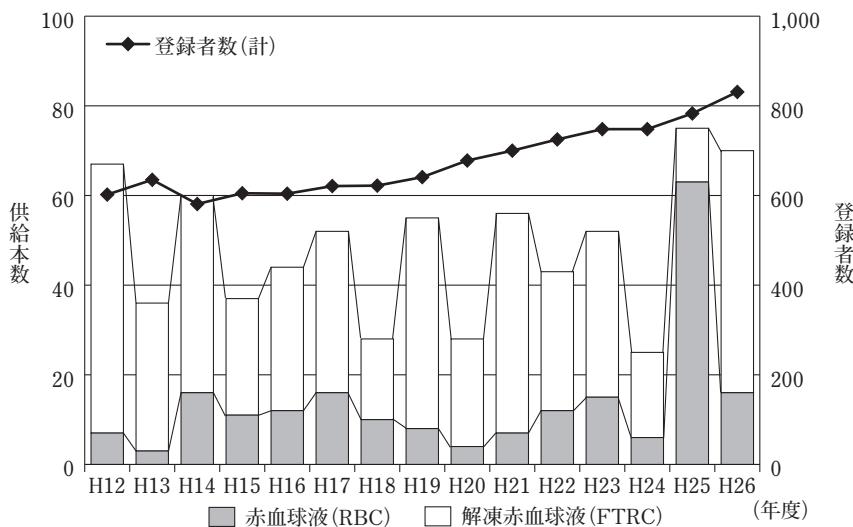


図2 製剤別供給数と登録者数の推移(Ⅰ群)

った製剤が減損され、在庫数は半減した。平成27年9月末現在の在庫数はI群が白血球除去未実施製剤を含め約2,600バッグ、II群が約1,600バッグであるが、II群の緊急対応としての在庫は、全国的には確保できていると思われる。

I群では稀な血液型の種類によって100バッグ

以上の在庫があるが、中には数パックというものもあり、これらの確保に向けた取り組みが必要である。I群の15年間の累計供給状況はD--やpなど、ほぼ毎年供給されるものがある一方、数年ごとあるいは15年で1回というものもあるが、適正在庫を定めて確保しておくことが望まれる。とくに、p,

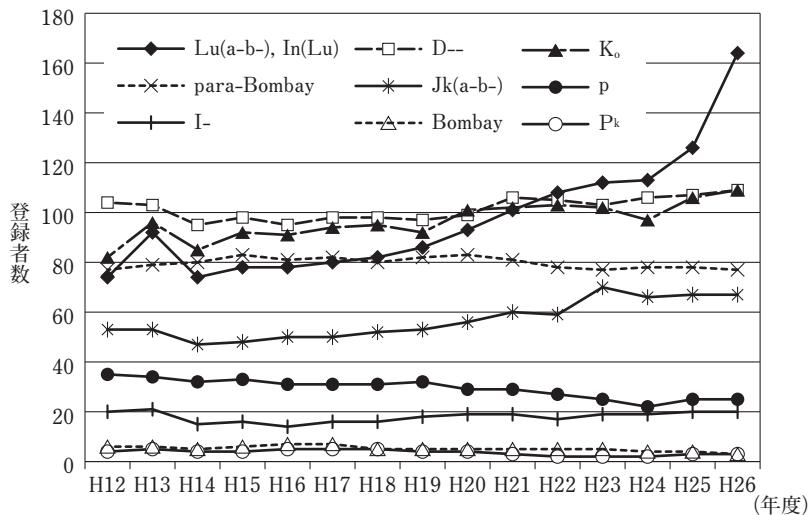


図3 稀な血液型別登録者数の推移(I群)

I-, Bombayは、さらなるスクリーニングとともに、登録者への献血要請による在庫確保を優先的に行う必要がある。

4. 課題と今後の対応

稀な血液型スクリーニングには、モノクローナル抗体と自動分析装置が必須であるが、試薬製造センターによる新たな抗体の樹立と大量培養など、継続的な取り組みに期待したい。自動分析装置はPK7300を使用しているが、今後の原料血液検査における分析装置の更新時には、どのような装置を選定するのか、また、遺伝子検査の併用も視野に入れて考えておくことが必要である。さらに、通知文やカード発行などの関連業務を統一化し、システムを充実させることも望まれる。

冷凍血液については、日赤全体としての適正在庫を定め、保管施設の集約なども、運用や危機管

理面も含めて考える必要がある。また、登録者や在庫といった情報の参照は、現行システムでは限定的であるため、これらをタイムリーに一元的に管理し、それらに基づいてスクリーニングを強化したり、血液を確保したりするような仕組みが必要であろう。

まとめ

各ブロック血液センターでは、積極的な稀な血液型スクリーニングが実施されており、II群の多くは赤血球液主体で供給され、円滑な供給に寄与していると考えられる。一方、登録者や冷凍血液の在庫が少ないI群の血液については、さらなるスクリーニングと血液の確保が必要であり、関連する業務の統一運用とシステムの充実、関連部門の連携とともに、それらをコントロールする統括部門の設置が望まれる。