

ワークショップ2

輸血検査に有用な抗体開発のための遺伝子組換え技術

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)

○はじめに

抗体産生リンパ球をEBウイルスでトランスフォームさせ、ミエローマ細胞と融合することにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞株(以下、ハイブリドーマ)を樹立する方法は古くから用いられてきた。当血液センターでも300種を超える赤血球抗原に対する抗体を産生する細胞株を保有している。しかし、樹立されたハイブリドーマの中には長期にわたる培養期間中に抗体を産生しなくなる細胞が出てくることがあり、重要な問題であった。近年、遺伝子工学的手法の発展により、遺伝子組換え抗体(リコンビナント抗体)が作製できるようになり、抗体医薬品や診断薬が開発されると同時に、純度の高い抗体医薬品を大量に作製する方法が多く開発されてきた。我々は、ハイブリドーマから抽出した抗体遺伝子情報を増殖能力の高い細胞株へ遺伝子導入することにより簡便で大量にリコンビナント抗体を産生する細胞株を樹立し、その培養法として抗体医薬品製造に用いられている技術を応用した。さらに、輸血検査の簡便化を目指し、組換え技術を用いIgG型抗体から直接凝集法に利用可能なリコンビナントIgM抗体の作製を試みた。また赤血球同士を架橋できるIgG抗体の作製を目指し、一本鎖(scFv)に

改変した可変領域を、Linkerを用いてIgG定常領域と結合させた抗体を作製した。

○モノクローナル抗体の安定的な大量培養法の検討

赤血球抗原に対する抗Cと抗eの2種類のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを用いてリコンビナント抗体を作製し、安定的に大量培養を可能とする技術を検討した。まず、ハイブリドーマから抗体遺伝子情報を取り出し、増殖能の高い細胞株(CHO細胞)に発現ベクターを用いて遺伝子導入することで、リコンビナント抗体産生細胞株を樹立した。CHO細胞から産生されるリコンビナント抗体は元のハイブリドーマ抗体と同程度の抗体価を示した。この抗体産生株を用いて、ハイパーフラスコとインテグラセルラインを安定的な培養法として大量培養への可能性について検討した(図1)。

関東甲信越ブロックエリアに1回供給するために必要な量は約2Lの培養上清であるが、ハイパーフラスコ4本を同時培養することにより、約10日で作製することができる。一方、インテグラセルラインを用いた場合、約30日で製造となるが、連続的に抗体を回収できるため、培養が安定すれば長期に渡り抗体の回収が可能である。このよう



	ハイパーフラスコ	インテグラセルライン
メリット	一度に大量に回収できる	安定すれば作業が少ない
デメリット	製造費用が高い	一度に回収できる量が少ない
回収量	約500mL/10日 約70mg/L	約15mL/7日 約80mg/L

図1 リコンビナント抗体の培養法の検討

に、インテグラセルラインを用いた長期製造計画を立て、偶発的な対応にハイパーフラスコを用いることにより、効率的な抗体製造が可能と考えている。

○IgG型モノクローナル抗体の直接凝集法への利用

輸血検査に用いられている生理食塩液法(生食法)は、抗体が赤血球同士を架橋することにより赤血球を凝集させ、凝集反応を判定して抗原・抗体の有無を判断するものである。検査には、生食液に浮遊した赤血球を用いるため、赤血球膜上に電気の二重層が発生し赤血球同士がお互いに反発しあい、IgG型抗体では凝集は起こらない。IgM型抗体は大きな分子であることから、このような条件下でも赤血球凝集を引き起こすことができる。IgG型抗体を直接凝集反応を示す抗体に改変できれば、自動輸血検査機器での使用が可能となり、多検体処理に用いることが可能となる。

そこで、ハイブリドーマ由来のIgG型抗Dを用いて生食法で凝集を示す組換え抗体の作製を目指して、2種類の改変を試みた。まずIgM型抗体は赤血球凝集を示すことが知られていることから、抗D可変領域をIgMの定常領域に組換えたIgM型抗Dを作製した。次いで、可変領域が柔軟でかつ、ある程度の長さを有すればIgG型抗体でもIgM型抗体同様に赤血球凝集を示すことができると考え、

抗D可変領域をscFvに変えLinkerでヒトIgG定常領域と結合させることで柔軟性と抗体の腕の長さを調整したscFv型抗Dを作製した。実際、IgG3のHinge部のジスルフィド結合を欠損した抗体は、凝集反応を示すことが報告されている。これらの抗体遺伝子をCHO細胞に導入し、IgM型抗DとscFv型抗Dを作製した。

新たに作製したIgM型抗D、およびscFv型抗Dの赤血球凝集能を検討のため、元のハイブリドーマ由来のIgG型抗Dと比較したところ、コントロールのIgG型抗Dは生食法で凝集反応を示さなかったが、IgM型抗Dでは512倍、scFv型抗Dでは128倍の抗体価で凝集能が確認された。また、カラム法で特異性を確認したところ、IgM型抗D、scFv型抗D共に、D抗原陽性血球では凝集を認め、D抗原陰性血球では凝集を認めないという結果が得られ、元のハイブリドーマ抗Dと同等の特異性が確認された。IgM型抗D、およびscFv型抗Dを通常の製品検査で用いられているwako社製抗Dをコントロールとして、D抗原陽性、およびD抗原陰性検体をそれぞれ65本ずつ自動輸血検査機器PK7300で測定した結果、IgM型抗D、scFv型抗Dともにwako社製の抗Dと同様、D抗原陽性検体では陽性領域に、D抗原陰性検体では陰性領域の結果を示し、PK7300にも応用可能であることを確認した(図2)。

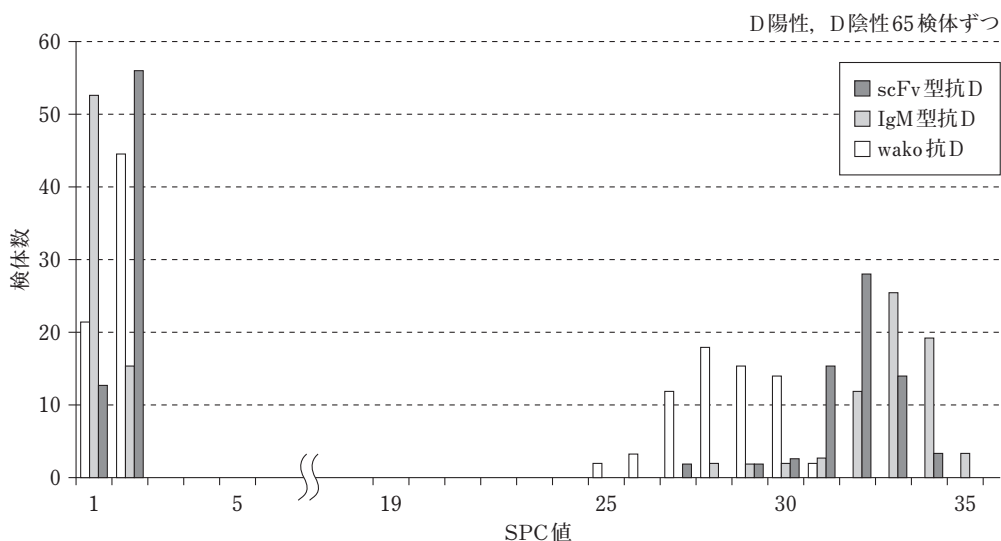


図2 PK7300を用いた作製した抗Dとwako社製抗Dの比較

○結 語

抗体医薬の製造プロセスを模倣することで効率的な抗体供給が安定的にできる培養技術を確認した。また、遺伝子組換え抗体技術を用いることで、

生食法でも凝集反応を示す抗体の作製に成功した。今後は、これらの技術を用いてさらに輸血検査に有用な抗体試薬を作製していきたいと考えている。