抗M, 抗Nモノクローナル抗体の作製および特異性の検討

勝野 誠 岡本 宏明 立花 克己 今井 光信

自治医科大学予防生態

池 本 卯 典

自治医科大学人間生物学

(昭和61年7月15日受付)

MOUSE MONOCLONAL ANTIBODIES SPECIFIC FOR M AND N BLOOD GROUP-RELATED ANTIGENS

Makoto Katsuno, Hiroaki Okamoto, Katsumi Tachibana, Mitsunobu Imai
and Shigenori Ikemoto*

Immunology Division, Jichi Medical School, Tochigi

*Laboratory of Human Biology, Jichi Medical School, Tochigi

Eleven examples of mouse monoclonal antibodies were produced with specificities related to human blood group MN antigens. The eleven monoclonal antibodies, comprising eight which react with M antigen and three with N antigen, react in direct hemagglutination system, and their specificities were investigated by their reaction with panel and enzyme-modified red cells. The antibodies were used, in parallel with conventional polyclonal anti-M and anti-N sera, to type a series of random blood donors. The results obtained with the monoclonal antibodies and the polyclonal reagents were in perfect agreement. The monoclonal anti-M and anti-N antibodies could prove to be valuable alternatives to conventional reagents used currently for MN-blood grouping.

緒 言

ヒトのMN式血液型を判定する凝集反应用試薬として、古くからポリクローナル抗M, 抗N血清が広く用いられている。一般に、ポリクローナル抗血清は、ウサギなどの動物を免疫して作製されているため、血液型判定用試薬として使用する際には、ヒト赤血球に対する正常異種凝集素などを吸収操作により取り除く必要がある。それに対して、細胞融合法によって作製されるモノクローナル抗体は、単一の抗原決定基を認識しているため、複雑な吸収操作を必要とせず、常に均質な抗体として安定して入手することができる。

Fraserらは抗Mモノクローナル抗体を作製する目的で、MM型ヒト赤血球膜より抽出して得られたシアロ糖蛋白(グリコホリン)でマウスを免疫したが、ほとんどすべてのヒト赤血球膜上に存在するグリコホリンBのN型抗原に対する免疫応答として抗N抗体が得られ、抗M抗体は得られな

かったことを報告している¹⁾。著者らも、抗Nモノクローナル抗体は、MN型ヒト赤血球を免疫原とすることで容易に作製しえたが²⁾、抗Mモノクローナル抗体の作製にあたっては、簡便かつ効率よく株化できるように、免疫方法を工夫して行った。すなわち、B, MM型赤血球をトリプシン処理し、上清中に遊離したグリコホリンAを初回免疫に用い、A, MM型の未処理赤血球を追加免疫に用いることによって、選択的に多くの抗Mモノクローナル抗体を作製できた。

以上の抗Mおよび抗Nモノクローナル抗体の特異性を市販のポリクローナル抗M, 抗N血清と比較、検討した結果、これらが有用なモノクローナル抗M, 抗N凝集素であると考えられたので報告する。

材料と方法

1. モノクローナル抗体の作製
 - a) 抗Nモノクローナル抗体

生理的食塩水で十分に洗浄した表現型 B, MN のヒト成人赤血球(2×10^7 cells)を, 初回および 1 カ月後に BALB/c 雄マウス 1 匹の腹腔内に投与した。追加免疫としてさらに 1 カ月後に同量の B, MN 型赤血球を尾静脈内に投与した。

細胞融合は, Oi & Herzenberg³⁾の方法に従い, 50%ポリエチレングルコール1500 (和光純薬)を用いて, 追加免疫の3日後に摘出した脾細胞とマウス骨髓腫細胞(NS-1)とを細胞数比10:1で融合した。15%ウシ血清と HAT (hypoxanthine, aminopterin, thymidine)を含む RPMI-1640 培地で9日間培養の後, 免疫に用いた赤血球に対して凝集活性を有するハイブリドーマを選択した。

限界希釈法によりクローン化し, 抗N抗体を産生するクローンについては, あらかじめ0.5mlのプリスタンを投与した BALB/c マウスの腹腔内に 1×10^7 cellsを移植し, 約1~2週間後に貯留した腹水を採取した。得られた腹水は, 40%飽和硫酸アンモニウムで塩析し, 生理的食塩水で十分に透析して以後の検討に使用した。

b) 抗Mモノクローナル抗体

生理的食塩水で十分に洗浄した表現型 B, MM のヒト成人赤血球(packed cells) 3ml にトリプシン溶液 (Sigma, type XI) 3ml を加え, 37°Cで30分間加温した。トリプシン溶液は, トリプシンを0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.7) に8mg/ml となるよう溶解し, 使用した。トリプシン処理赤血球の浮遊液を2,000rpmで5分間遠心し, 分離した上清に, 残留トリプシンを不活化する目的で BALB/c マウス IgG 1mg を加えた。約10倍に濃縮した上記反応液を抗Mポリクローナル抗血清に加え, トリプシン処理により遊離したグリコホリンAがMM型赤血球の凝集反応を阻止することを確認した。グリコホリンA濃縮液の200 μ l を等量の Freund の完全アジュバントに混じ, BALB/c 雄マウス 1 匹の腹腔内に投与した。追加免疫として, 1 カ月後に表現型 A, MM のヒト成人赤血球 (4×10^8 cells) を尾静脈内に投与した。

細胞融合は, 抗Nモノクローナル抗体作製の場合と同様に行った。

また, 抗体のサブクラスとタイプは, Miles 社の

ウサギ抗マウスイムノグロブリン (IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgM, k, λ) パネル血清を用いた micro Ouchterlony 法によって判定した。

2. 酵素処理赤血球との反応性の検討

MM, MN および NN 型赤血球をそれぞれトリプシン, キモトリプシン (Sigma, type II), ノイラミダーゼ (Sigma, type V), パパイン (Sigma, type IV) 等の酵素で処理し, 抗Mおよび抗Nモノクローナル抗体との反応性を, 市販の抗Mおよび抗Nポリクローナル抗血清 (Ortho; MM513A, NN613A) と比較, 検討した。

トリプシンおよびキモトリプシンは0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.7) に, パパインは0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.2) にそれぞれ1mg/ml の濃度となるように溶解し, ノイラミダーゼは1U/ml となるように生理的食塩水に溶解して使用した。それぞれ, 生理的食塩水で十分に洗浄した赤血球 (packed cells) にその5倍量を加え, 37°Cで1時間加温振盪した。酵素処理後の赤血球は, 生理的食塩水で十分に洗浄し, 3%濃度となるように生理的食塩水に浮遊し, 以後の赤血球凝集反応に供した。

凝集反応はすべて試験管を用い, 室温で10分間感作した後1,000rpmで1分間遠心し, 肉眼的に観察して凝集の有無を判定した。なお, ポリクローナル抗血清およびモノクローナル抗体は, とともに抗体価を2倍から4倍に調製し, 凝集反応に使用した。

結 果

1. モノクローナル抗体の作製

a) 抗Nモノクローナル抗体

免疫抗原として用いた B, MN 型赤血球に対して凝集活性を示した79株(27.4%)のハイブリドーマのうち, 3株 (No. 5354, 5355, 5358) を抗N抗体産生株として選択した (表1)。

b) 抗Mモノクローナル抗体

追加免疫に用いた A, MM 型赤血球を凝集する抗体は, 960wells の培養液中315wells (32.8%)に認められた。そのうち A, NN 型赤血球と反応せず, A, MM 型赤血球とのみ凝集反応を示す抗体は, 160wells に認められたが, クローニング後,

表1 抗Mおよび抗Nモノクローナル抗体

モノクローナル抗体 (No.)	サブクラス/タイプ	抗体価 (腹水10mg/ml)		
		ヒト赤血球		
		MM 型	MN 型	NN 型
抗M	8017 IgG ₁ /k	×6400	×6400	≤×2
	8052 IgG ₁ /k	×3200	×3200	≤×2
	8006 IgG ₁ /k	×1600	×1600	≤×2
	8082 IgG ₁ /k	×1600	×1600	≤×2
	8088 IgG _{2b} /k	×1600	×1600	≤×2
	8001 IgG ₃ /k	× 800	× 800	≤×2
	8010 IgG ₃ /k	× 800	× 800	≤×2
	8070 IgG ₃ /k	× 800	× 800	≤×2
抗N	5354 IgG ₁ /k	× 640	×5120	×5120
	5355 IgG _{2a} /k	× 40	× 640	× 640
	5358 IgG ₁ /k	× 20	× 160	× 320

MM, MN 型赤血球との凝集力価が高く、10mg/ml の高い抗体濃度でも NN 型赤血球とはほとんど反応しない抗Mモノクローナル抗体産生株を8株 (No. 8001, 8006, 8010, 8017, 8052, 8070, 8082, 8088) 選択した (表1)。

2. 抗Mおよび抗Nモノクローナル抗体の特異性の検討

精製した腹水の抗体価を2ないし4倍に調整し、パネル血球 (Ortho; Lot RA 354) を用いて抗体比較同定試験を行った。その結果、表1に示した8000番台の8株のモノクローナル抗体はいずれも抗M凝集素としての、また、5300番台の3株のモノクローナル抗体は、抗N凝集素としての特異性を有していることが確認された。そこで、凝集素活性が一番高く、10mg/ml の抗体濃度で5,000ないし6,000倍の抗体価を示す抗Mモノクローナル抗体 (No. 8017) と抗Nモノクローナル抗体 (No. 5354) を選び、抗体価を2ないし4倍

に合わせて、以下の検討を行った。

ヒト成人赤血球263例を対象として、市販のポリクローナル抗血清による MN 式血液型判定結果との比較を行った。抗Mモノクローナル抗体 (No. 8017) は、MM 型85例、MN 型139例の赤血球を凝集したが、39例の NN 型赤血球を凝集しなかった。また、抗Nモノクローナル抗体 (No. 5354) は、MN 型139例、NN 型39例の赤血球を凝集したが、85例の MM 型赤血球を凝集しなかった。この結果は、抗Mおよび抗Nポリクローナル抗血清による判定結果と完全に一致した (表2)。

3. 酵素処理赤血球との反応性の検討

抗Mモノクローナル抗体および抗Mポリクローナル抗血清と、トリプシン処理 MM ないし MN 型赤血球との反応性は、酵素処理前と比較し低下した。抗Nモノクローナル抗体および抗Nポリクローナル抗血清と、トリプシン処理赤血球との反応性は上昇し、MM 型赤血球でも凝集反応が認められた。キモトリプシン処理赤血球と、抗 M, 抗 Nモノクローナル抗体および抗 M, 抗 Nポリクローナル抗血清との反応性は酵素処理前後で著変は認められなかった。一方、パパインで処理した赤血球と、抗 M, 抗 N抗体との反応性はモノクローナル抗体とポリクローナル抗血清とで一致しなかった。すなわち、抗Mおよび抗Nモノクローナル抗体とパパイン処理赤血球との反応性は低下したが、ポリクローナル抗血清ではその反応性の低下は認められず、抗Mポリクローナル抗血清は MM, MN 型のみならず NN 型赤血球を、抗Nポリクローナル抗血清は NN, MN 型のみならず MM 型赤血球をも凝集した。また、ノイラミニダーゼ処理赤血球と抗 M, 抗Nモノクローナル抗

表2 抗M, 抗Nモノクローナル抗体による赤血球凝集反応
—抗M, 抗Nポリクローナル抗血清との比較—

*MN 表現型	ヒト赤血球 検体数	抗Mモノクローナル抗体 (No. 8017)により 凝集した検体数	抗Nモノクローナル抗体 (No. 5354)により 凝集した検体数
MM	85	85(100%)	0(0%)
MN	139	139(100%)	139(100%)
NN	39	0(0%)	39(100%)

*：市販の抗Mポリクローナル抗血清 (Ortho; MM513A) 抗Nポリクローナル抗血清 (Ortho; NN613A) を用いて判定した

表3 モノクローナルおよびポリクローナル抗M, 抗N凝集素と蛋白分解酵素処理ヒト赤血球との反応性

MN 表現型	酵素処理	ポリクローナル		モノクローナル	
		抗M (Ortho)	抗N (Ortho)	抗M (No. 8017)	抗N (No. 5354)
MM	—	+++	—	+++	—
	トリプシン	+	+	—	+++
	キモトリプシン	+++	—	+++	—
	パパイン	+++	++	—	—
	ノイラミニダーゼ	++	+ ^w	—	—
MN	—	+++	+++	+++	+++
	トリプシン	+ ^w	++	—	+++
	キモトリプシン	++	+	+++	+++
	パパイン	+++	+++	—	—
	ノイラミニダーゼ	++	++	—	—
NN	—	—	+++	—	+++
	トリプシン	+ ^w	+	—	+++
	キモトリプシン	—	++	—	+++
	パパイン	+++	+++	—	—
	ノイラミニダーゼ	+	++	—	—

完全凝集を+++、陰性を—で示し、凝集反応を強い順に4段階(++, +, +^w)で表示した。抗体は凝集価を2ないし4倍に調製して使用した

体との反応性は低下し、MN 式血液型にかかわらず、いずれの赤血球でも凝集反応は認められなかった(表3)。

考 察

Köhler と Milstein は、ヒツジ赤血球で免疫したマウスの脾細胞とマウス骨髓腫細胞とを融合して得たハイブリドーマが、抗ヒツジ赤血球凝集素を産生分泌しながら増殖し続けることを明らかにした⁴⁾。これを契機として、細胞融合の技術は飛躍的な発展を遂げ、現在では免疫抗体作製の手法としてのみならず、その優れた特異性を利用して、臨床医学上の診断や治療にも応用されている。ヒト赤血球血液型抗原の ABO 式血液型や、MN 式血液型においても、それは例外ではない。

MN 式血液型判定血清として、古くからヒト赤血球でウサギなどを免疫して作製した抗血清が用いられてきた。このポリクローナル抗血清は正常異種凝集素などを含んでいるため、それらを吸収除去しなければ、血液型判定用の特異的な抗体として使用できず、その操作は極めて繁雑である。それに対して細胞融合法によって作製されるモノクローナル抗体では、その必要はなく、特異性は

極めて高い。

Fraser らは1982年、抗Mモノクローナル抗体を作製することを目的とし、MM 型赤血球膜のグリコホリン抽出物でマウスを免疫したが、グリコホリンBのN型抗原(δ^N)に対する免疫応答の結果、抗Nモノクローナル抗体が得られ、抗Mモノクローナル抗体は得られなかったことを報告した¹⁾。その後、Bigbee ら⁵⁾、Nichols ら⁶⁾は、それぞれ、MM 型ヒト赤血球由来の精製グリコホリンA、MM 型ヒト赤血球を免疫原として、2株ずつ抗Mモノクローナル抗体を作製し、Fraser らもMM 型ヒト赤血球のグリコホリン分画およびMM 型赤血球でマウスを免疫し、4株の抗Mモノクローナル抗体を作製した⁷⁾。著者らは、抗Nモノクローナル抗体については、MN 型の未処理赤血球を免疫原とすることで3株作製することができたが、その際、抗Mモノクローナル抗体は得られなかったため、簡便かつ効率よく抗Mモノクローナル抗体を作製できるように免疫方法を工夫して行った。

ヒト赤血球のMおよびN型抗原は、赤血球膜上の2種類のシアロ糖蛋白(グリコホリンAおよび

B)に存在することが知られている⁸⁾。グリコホリンA (α シアロ糖蛋白)はTomitaらによりペプチドの全一次構造が決定され⁹⁾、1分子中131個のアミノ酸を含み、N末端より70個のアミノ酸残基は、細胞外に、C末端の約40個のアミノ酸残基は細胞質内に存在し、糖鎖はすべて細胞外に局在していることが知られている。そのアミノ酸配列はMN型に依存して異なる部分があり、MM型赤血球由来のものではN末端と5番目がセリンとグリシンであり、NN型赤血球由来のものでは、ロイシンとグルタミン酸である。また、グリコホリンB (δ シアロ糖蛋白)のアミノ酸配列は、MN式血液型の表現型によらず、N型赤血球由来のグリコホリンAのN末端から26番目までと全く同一であるとされている。これらのM型およびN型抗原活性は、種々の蛋白分解酵素の修飾をうけ、トリプシン処理を行うと、MまたはN型抗原活性(α^M , α^N)をもつペプチド鎖(30ないし40アミノ酸残基)がグリコホリンAから遊離し、グリコホリンBのN型抗原活性(δ^N)は赤血球膜上にそのまま残ることが知られている¹⁰⁾。

そこで、著者らは抗Mモノクローナル抗体の作製にあたって、B, MM型ヒト赤血球をトリプシン処理して上清中に遊離したグリコホリンAを初回免疫に用い、追加免疫には未処理のA, MM型赤血球を用いることで、極めて効率よく抗Mモノクローナル抗体を作製することができた。凝集素活性を有する抗体は960wells中315wells (32.8%)に認められ、そのうち51%の抗体はA, NN型赤血球と反応せず、A, MM型赤血球のみを凝集した。それらの抗体のなかには、濃度を高くすることにより、NN型赤血球と交叉反応性を示すものも含まれていたが、上記の免疫方法によって抗Mモノクローナル抗体として特異性に優れた抗体を8株作製しえた。酵素処理赤血球との反応性を検討すると、8株の抗Mモノクローナル抗体はいずれも、ノイラミニダーゼ処理により、凝集素活性が失われたことから、シアロ糖鎖を含む抗原決定基を認識しているものと考えられる。3株の抗Nモノクローナル抗体も同様、ノイラミニダーゼ処理後、凝集反応を示さなくなったこと

より、それらの認識する抗原決定基にはシアロ糖鎖が含まれるものと推測された。

著者らの抗Mモノクローナル抗体はいずれも、Fraserら、Allenら¹¹⁾の作製した抗体と同様、抗体濃度を高くすることにより、MM型赤血球をも凝集した。この現象はキモトリプシン処理MM型赤血球では消失することから、これらの抗体が、グリコホリンAのN型抗原(α^N)のみならず、殆ど全てのヒト赤血球が共通にもつグリコホリンBのN型抗原(δ^N)とも反応しうるためと考えられる。従って、抗Nモノクローナル抗体を血液型判定用試薬として用いる場合には、抗Nポリクローナル抗血清と同様、MM型赤血球を凝集しないような抗体価に調整する必要がある。

ポリクローナル抗血清では非特異凝集素を吸収除去する必要があるが、常に均質なものを得ることは容易ではない。また、ヒト赤血球をノイラミニダーゼあるいはパパインで処理することにより、ポリクローナル抗血清は、酵素処理前には凝集しなかった赤血球を凝集するようになったことから、通常の血液型判定には問題とならない程度ではあるが、抗Mあるいは抗N抗体以外の非特異抗体が少量混入しているものと思われる。それに対して、抗Mおよび抗Nモノクローナル抗体では、確立された抗体産生株より安定して入手でき、複雑な吸収操作を必要としない。また、イヌ、ウマ、ウシ、ブタ、ニワトリ、ガチョウなどの動物赤血球とも交叉反応性を示さなかった。従って、今回作製した抗Mおよび抗Nモノクローナル抗体は、特異性に優れ、血液型判定用試薬として有用であると同時に、MN式血液型の抗原構造を免疫学的に解明するうえでも、重要な役割を果たし得るものと期待される。

結 論

細胞融合法により、MN式血液型抗原に対する抗体として抗Mマウスモノクローナル抗体を8株、抗Nマウスモノクローナル抗体を3株作製した。いずれもIgGクラスの抗体であったが、凝集反応にはクームス血清を必要とせず、精製腹水(抗体蛋白濃度10mg/ml)で5,000ないし6,000倍の凝集価を示す抗M(No. 8017)、抗N(No. 5354)抗

体が得られた。これらの抗体は特異性に優れ、常に安定して入手可能であることから、MN 式血液型判定用試薬として有用であると考えられた。

文 献

- 1) Fraser, R.H., Munro, A.C., Williamson, A.R., Barrie, E.K., Hamilton, E.A. and Mitchell, R.: Mouse monoclonal anti-N. I. Production and serological characterization. *J. Immunogenet.*, 9: 295—301, 1982.
- 2) 岡本宏明, 白田定和, 立花克己, 田中栄司, 池本卯典: モノクロナール抗 N 凝集素の作製および特異性の検討. *医学と生物学*, 110: 149—154, 1985.
- 3) Oi, V.T. and Herzenberg, L.A.: Selected methods in cellular immunology. Freeman, W. H. & Co, San Francisco, 1980, pp. 351—372.
- 4) Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256: 495—497, 1975.
- 5) Bigbee, W.L., Vanderlaan, M., Fong, S.S.N. and Jensen, R.H.: Monoclonal antibodies specific for the M- and N-forms of human glycophorin A. *Mol. Immunol.*, 20: 1353—1362, 1983.
- 6) Nichols, M.E., Rosenfield, R.E. and Rubinstein, P.: Two blood group M epitopes disclosed by monoclonal antibodies. *Vox. Sang.*, 49: 138—148, 1985.
- 7) Fraser, R.H., Inglis, G., Mackie, A., Munro, A. C., Allan, E.K., Mitchell, R., Sonnenborn, H.H. and Uthemann, H.: Mouse monoclonal antibodies reacting with M blood group-related antigens. *Transfusion*, 25: 261—266, 1985.
- 8) Furthmayr, H.: Structural comparison of glycophorins and immunochemical analysis of genetic variants. *Nature*, 271: 519—524, 1978.
- 9) Tomita, M. and Marchesi, V.T.: Amino-acid sequence and oligosaccharide attachment sites of human erythrocyte glycophorin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 72: 2964—2968, 1975.
- 10) Anstee, D.J. and Edwards, P.A.W.: Monoclonal antibodies to human erythrocytes. *Eur. J. Immunol.*, 12: 228—232, 1982.
- 11) Allen, R.W., Nunley, N., Kimmeth, M.E., Wallhermfecht, M. and Vangelen-Tylor, V.: Isolation and serological characterization of a monoclonal antibody recognizing the N blood group antigen. *Transfusion*, 24: 136—140, 1984.