血液型判定用抗 D モノクローナル抗体の作製

山野 孟¹⁾ 高橋 英夫¹⁾ 中出 亮¹⁾ 大久保康人¹⁾
山口 英夫¹⁾ 徳永 栄一²⁾ 小野 魁³⁾

大阪府赤十字血液センター¹⁾

日本赤十字社中央血液センター²⁾

日本大学医学部微生物学教室³⁾

(平成元年 6 月 1 日受付)

PRODUCTION OF MONOCLONAL ANTI-D FOR USE IN TYPING BLOOD GROUPS

Hajime Yamano, Hideo Takahashi, Toru Nakade, Yasuto Okubo and Hideo Yamaguchi

Osaka Red Cross Blood Center

Eiichi Tokunaga

Japanese Red Cross Central Blood Center

Yasushi Ono

Department of Microbiology, Nihon University School of Medicine

A monoclonal anti-D typing reagent was prepared in following ways.

The monoclonal anti-D was generated in hybridoma cell line (DBF-11) established by the use of "EBV-Hybridoma Technique", in which an Epstein-Barr Virus (EBV)-transformed monoclonal anti-D (IgG1, κ chain) producing human B-cell line (B2-1) was fused with non-immunoglobulin producing JMS-3 cell.

Mass culture of the cell line (DBF-11) was continued for the period of over 131 days, by using the continuous cell culturing apparatus (Bio-Pro) provided with "vitafiber".

Weight of the monoclonal anti-D obtained from 8.17 liters of the cultured supernatant fluid was 5.1 g expressed in terms of human IgG.

After being roughly purified with "hollowfiber", the IgG content was 4.4 g.

The Fc portion of the roughly purified IgG (40 μ g/ml) was bound with mouse anti-human IgG (Fc monospecific antibody: 32 μ g/ml) so that the monoclonal anti-D was rendered suitable for a blood typing reagent.

はじめに

Rho(D)抗原に特異的な抗 D モノクローナル抗体の作製については、1980年に Koskimies¹⁾, 同年 Boylston ら²⁾が抗 D 産生 B リンパ球に EBV (Epstein-Barr virus) をトランスフォームすることによって抗 D モノクローナル抗体産生株を樹立している。

その後、1984年に Bron ら³⁾は、抗 D 産生 EBV トランスフォーム細胞とヒトマウスヘテロミエロマ細胞の融合を報告し、1986年に Lowe ら⁴⁾は、抗 D 産生 EBV トランスフォーム細胞と

human lymphoblastoid cell line との融合によってそれぞれ安定な抗 D モノクローナル抗体産生株を樹立している。

我々は、1983年に日本大学医学部微生物学教室で開発された抗 D モノクローナル抗体産生株 B2-1細胞⁵⁾と JMS-3細胞の融合によって安定な抗 D モノクローナル抗体産生株を分離し、さらに 3 回のクローニングを行い抗 D モノクローナル抗体産生株 DBF-11を樹立した。

この細胞の大量培養は、連続細胞培養装置 "Bio-Pro" (アミコン製ヴィタファイバー-Vを内

装したグレースジャパン製)を使用した。

培養上清を精製した後、抗Dモノクローナル抗体IgGのFc部を架橋し、臨床検査に使用可能な抗D血液型判定用モノクローナル抗体〔商品名：抗D「日赤」〕の開発に成功した。

I. 材 料

1. 細胞

1) B2-1 (日本大学医学部小野教授から分与された抗D産生EBVトランスフォーム細胞)

2) 親細胞 JMS-3

〔HGPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) 欠損株, 日本大学医学部小野教授から分与〕

2. 培地および試薬

1) RPMI1640培地

組成

RPMI1640培地 (日水製薬)	1.04g
L-glutamin (片山化学)	30mg
リラシリン注射用 (武田製薬)	5mg
結晶ペニシリンGカリウム (明治製薬)	

5mg

硫酸ストレプトマイシン (明治製薬) 10mg

炭酸水素ナトリウム (片山化学) 160mg

純水 100ml

2) FBS (Fetal bovine serum) (Hyclone 製)

3) HOTD 選択培地 (HAT・Ouabain 培地)

組成

RPMI1640培地 1 リットルに最終濃度として次のものを添加する。

hypoxanthine (Sigma)	1×10^{-4} mol
aminopterin (Sigma)	1×10^{-5} mol
thymidine (Sigma)	4×10^{-5} mol
2'-deoxy cytidine (Sigma)	1×10^{-6} mol
ouabain (Sigma)	5×10^{-7} mol

4) HAT 培地

組成

RPMI1640培地 1 リットルに最終濃度として次のものを添加する。

hypoxanthine (Sigma)	1×10^{-4} mol
aminopterin (Sigma)	1×10^{-5} mol
thymidine (Sigma)	4×10^{-5} mol

2'-deoxy cytidine (Sigma) 1×10^{-6} mol

5) HT 培地

組成

RPMI1640培地 1 リットルに最終濃度として次のものを添加する。

hypoxanthine (Sigma) 1×10^{-4} mol

thymidine (Sigma) 4×10^{-5} mol

2'-deoxy cytidine (Sigma) 1×10^{-6} mol

6) 50%PEG 液: polyethylene glycol (M.W.: 1,500, BDH 製)

1gを試験管に入れオートクレープで溶解後40~50℃に冷却し、1mlのRPMI1640培地を加えてよく混和する。

7) seaplaque agarose (FMC 製)

8) ラナプレート IgG-L (日本化薬製)

9) IgG subclass specific antisera (M1174 Janssen)

10) 0.5%フィシン処理 Rho (D) 陽性血球液: フィシン粉末1gをPBS (1/10M, pH: 7.3) 100mlに溶解し、室温で15分間攪拌後1,000G 5分間遠心後、上清1mlをPBSで10倍に希釈後、洗浄赤血球を2ml加え37℃15分間インキュベート後、生理食塩液で3回洗浄し、0.5V/V%血球浮遊液とする。

11) 0.5%プロメリン液: 0.5gのプロメリン粉末(Merck 製)を0.1%NaN₃を含むPBS(1/15M, pH: 5.5) 100mlに溶解する。

12) ウシアルブミン末 (Sigma 製)

13) 22%ウシアルブミン液 (オーソ製)

II. 方 法

1. B2-1細胞とJMS-3細胞の融合

B2-1細胞6.8ml (1×10^6 個/ml)とJMS-3細胞6.8ml (1×10^6 個/ml)をそれぞれRPMI1640培地で洗浄後モルトン管へ移し、混合後1,000r.p.m. 5分間遠心し上清を除去する。次に50%PEG液1mlをゆっくり30秒間で加え、さらに30秒間混合し、RPMI1640培地を1ml, 10mlの順に加え1,000r.p.m. 5分間遠心後上清を除去し20%FBS加RPMI1640培地6.8mlで細胞を分散し、マイクロプレート(住友ベークライトMS-3096F)に1well当り、親細胞数から換算して 5×10^4 個/100μl,

1×10^5 個/100 μ l の 2 種類に調製して分注し、37 $^{\circ}$ C、5 %CO $_2$ で培養後、翌日 HOTD 培地を100 μ l ずつ各 well に加え、以後 4 日毎に HOTD 培地で培養上清を半量交換する。3 週間経過後 4 日毎に HAT 培地で培養上清を半量交換、6 週間後 HT 培地で培養上清を半量交換し約 2 週間後培養液を 20%FBS 加 RPMI1640 培地に交換後、4 日毎に培地を交換し培養を継続する。

クローンの形成が認められた well の上清を Rho (D) 陽性血球を用いて、プロメリン法によって抗 D の有無をスクリーニングし、抗 D 産生クローンを検索する。

2. 軟寒天法によるクローニング

支持層は、0.5g のアガロースに 40ml の純水を加えオートクレーブで滅菌後、50 $\sim$ 55 $^{\circ}$ C に冷却し RPMI1640 培地 (2 倍濃度) 40ml、FBS 20ml を加え混合し、直径 6cm のシャーレ (LUX5220) に 4ml ずつ分注し 5 $^{\circ}$ C でゲル化する。

接種層は、0.2475g のアガロースに純水 30ml を加え滅菌後 50 $\sim$ 55 $^{\circ}$ C に冷却し、RPMI1640 培地 (2 倍濃度) 30ml に FBS 15ml を加え混合した後、3 等分しそれぞれに抗 D 産生融合細胞を 1×10^2 個/3ml、 2×10^2 個/3ml、 5×10^2 個/3ml に浮遊し、支持層上に 3ml を重層する。37 $^{\circ}$ C、5 %CO $_2$ の条件下で 3 $\sim$ 4 週間培養後にコロニーの形成が認

められ、このコロニー 1 個ずつをマイクロプレート (住友ベークライト MS3096F) に移し、増殖させ抗 D モノクローナル抗体産生単クローンを樹立した。

3. 大量培養

単クローン化した抗 D モノクローナル抗体産生融合細胞 (DBF-11) を 10%FBS 加 RPMI1640 培地に 2×10^5 個/ml 浮遊し、3 日間カルチャーボトルで培養した細胞 2×10^8 個を Bio-Pro (図 1) で長期間培養を行った。

Bio-Pro は、ヴィタファイバー V (分画分子量 30,000、アミコン製) を内装している。ヴィタファイバー V は中空ファイバーの数千本の束からなり、管腔は培地が還流し、ファイバー外腔は高密度の細胞を増殖させる機構を有している。本体装置は、加圧方式によって液体の流動を制御し、pH、DO 値 (溶存酸素) を CO $_2$ 、O $_2$ 、N $_2$ の各々のガスによってコントロールし、細胞の増殖を最適条件下に維持することができる。まず、本体コントローラのキーボードで培養条件、1) 庫内温度: 37 $^{\circ}$ C、2) 培地の pH: 6.80 $\sim$ 7.30、3) DO: 3.0 $\sim$ 4.0、4) 培地の移動方向 (左 $\rightleftharpoons$ 右)、5) 培地の攪拌子の回転数: 200r.p.m.、6) 培地の流速: 250 $\sim$ 350ml/分を入力後、ファイバーを装着し、RPMI1640 培地 2.8 リットルを 24 時間循環させ、翌日 10%FBS 加

図 1 連続細胞培養装置 Bio-Pro

RPMI1640培地量2.8リットルに交換後、循環させ、DBF-11細胞を 2×10^6 個/10ml 個ファイバーに接種する。培地の劣化の判断は、グルコース量が約20mg/dl 以下に低下すれば培地の交換を行う（1回の必要培地量は2.8リットル）。毎日培地を交換しなければならない場合は、時間設定による自動交換を行う。培地のFBS添加量は、培養初期から55日目まで10%、抗D抗体価が 8×10^4 倍に上昇した56日目から5%に減量、70日目以後はこの細胞の増殖限界である3%までに減量して131日目まで培養し、以後培養系に細菌のコンタミネーションが生じたため培養を中止した。

産生物は、ファイバーの外腔採取口から注射器で抗体価上昇後毎日平均80ml を採取した。

4. 産生物の精製および性状

産生物の精製はホローファイバーによる限外濾過によって濃縮精製した。

免疫グロブリンについては、免疫電気泳動法〔ペロナル緩衝液(pH 8.6, イオン強度0.05), 寒天(片山化学製) 1W/V%〕によって判定した。

IgG サブクラスについては、抗Dモノクローナル抗体感作血球〔精製抗Dモノクローナル抗体原液の1,000倍希釈液1容にRho(D)陽性血球(3%生理食塩液浮遊液)1容を加え37℃30分間加温後、生理食塩液で3回洗浄した血球液〕1滴にIgG subclass specific antisera (M1174 Janssen 製)の各抗体1滴を加え抗グロブリン試験によって判定した。

ヒトIgG量は、ラナプレートIgG-L(日本化薬製)を用いて定量した。

凝集価は、精製抗Dモノクローナル抗体を生理食塩液で100倍希釈した後、2倍連続希釈しRho(D)陽性血球を用いて、プロメリン法、抗グロブリン試験によって力価を求めた。

5. 抗Dモノクローナル抗体IgGの架橋

精製抗Dモノクローナル抗体(ヒトIgG)をリン酸緩衝食塩液(PBS: 0.013M, pH 7.0)を用いて、100 μ g/ml, 80 μ g/ml, 60 μ g/ml, 40 μ g/ml, 20 μ g/mlの希釈系列を作製後、各々の希釈液を100ml ずつ4本の容器に分注し、抗ヒトIgG Fc特異マウスモノクローナル抗体液(3.2mg/ml)の

1.0ml, 0.5ml, 0.25ml, 0.125mlの3段階液をそれぞれに加え混合した後、37℃で1時間反応させ、ヒトIgGの2分子間のFc部分を架橋した20種類を作製し、それぞれにウシアルブミン粉末を0.5W/V%になるように添加して調製した。この調製液について、食塩液凝集試験、アルブミン液凝集試験、凝集力試験(凝集開始時間)を実施して凝集価および感度の高い混合比を決定した。

III. 成 績

1. B2-1細胞とJMS-3細胞の融合

融合細胞を親細胞(JMS-3)数から換算し 1×10^6 個/well の場合のクローンの形成は、30well 中23well (76.7%)に認め、そのすべてに抗D活性を認めた。 5×10^4 個/well の場合は、36well 中21well (58.3%)にクローンを形成し、そのすべてに抗D活性を認めた(表1)。

このうち抗D活性が高く、細胞増殖の良いwell (植え込み細胞数 1×10^6 個/well のB-7, B-11, D-7, D-11の4well および植え込み細胞数 5×10^4 個/well のB-8, D-5の2well)の計6細胞(6well)株を分離した。

2. クローニング

1) 初回クローニング(表2)

6細胞の各々のコロニー形成は、B-7が20シャーレ中47個(0.67%), B-11が21シャーレ中203個(3.03%), D-7が20シャーレ中178個(3.63%), D-11が30シャーレ中378個(4.73%), B-8が30シャーレ中490個(6.13%), D-5が20シャーレ中481個(8.02%)であった。これらのコロニー中増殖の良いB-7の35個(高橋ら⁶⁾, 星野ら⁷⁾の報告), B-11の87個, D-7の120個, D-11の98個, B-8の97個, D-5の100個をそれぞれマイクロブ

表1 B2-1細胞とJMS-3細胞の融合による抗D陽性株

Cells(JMS-3)/Well	Colonies/Well (%)	Frequencies of Positive Clone with Anti-D(%)
1×10^6	23/30 (76.7)	23/23 (100)
5×10^4	21/36 (58.3)	21/21 (100)

*抗D産生初代細胞6株の樹立: B-7, B-11, D-7, D-11, B-8, D-5

表2 初代融合細胞の軟寒天法によるクローニング

Clone Number	Cells/Plate	Colonies/Plate	Frequencies of Cell Growth in Microtiter Plate(%)	Frequencies of Positive Clone with Anti-D(%)
B-7	5×10^2 2×10^2	45/10 2/10	27/35 (77.1)	25/27 (92.6)
B-11	5×10^2 2×10^2 1×10^2	110/10 45/6 48/5	85/87 (97.7)	29/85 (34.1)
D-7	5×10^2 2×10^2 1×10^2	103/6 36/5 37/9	115/120(95.8)	57/115(49.6)
D-11	$5/10^2$ 2×10^2 1×10^2	233/10 96/10 49/10	98/98 (100)	88/98 (89.8)
B-8	5×10^2 2×10^2 1×10^2	318/10 135/10 37/10	97/97 (100)	83/97 (85.6)
D-5	5×10^2 1×10^2	443/10 38/10	99/100(99.0)	*65/99 (65.7)
Total			521/537(97.0)	347/521(66.6)

*抗D産生細胞65例中 B-9細胞株を樹立

レートに移し培養後、クローンを形成した well は、それぞれ27/35well (77.1%), 85/87well (99.7%), 115/120well (95.8%), 98/98well (100%), 97/97well (100%), 99/100well (99%) 総数537well 中521well (97%) であり、このうち抗 D 活性を認めた well は、それぞれ25/27well (92.6%), 29/85well (34.1%), 57/115well (49.6%), 88/98well (89.8%), 83/97well (85.6%), 65/99well (65.7%) 総数521well 中347 well (66.6%) であった。

D-5細胞のクローニングによって、単クローン化した65クローンのうち抗 D 活性(1,280倍)の高い1クローン (B-9細胞株) を分離した。

2) B-9細胞株のクローニング

表3に示すごとく、抗 D 活性を認めた well は、150well 中76well(50.7%) これらの中から抗 D 抗体価の高い6細胞株 (B-11, C-11, E-8, B-5, B-8, E-2) を分離した。

3) B-11細胞株のクローニング

表4に示すごとく、抗 D 活性を認めた well は、120well 中106well (88.3%) このうち3細胞株 (DBC-5, DBC-11, DBF-11) を分離し、抗 D 活性が高い(1,280倍) DBF-11細胞株樹立しこの細胞を大量に培養した。

表3 B-9細胞株のクローニング

Clone Number	Cells/Plate	Colonies/Plate	Frequencies of Positive Clone with Anti-D(%)
B-9	1×10^3 5×10^2 2.5×10^2	206/5 380/10 202/10	18/36 (60.0%) 24/54 (44.4%) 34/60 (56.7%)
Total			76/150(50.7%)

*抗D産生細胞樹立6株: B-11, C-11, E-8, B-5, B-8, E-2

表4 B-11細胞株のクローニング

Clone Number	Cells/Plate	Colonies/Plate	Frequencies of Positive Clone with Anti-D(%)
B-11	5×10^3 2.5×10^2	588/14 174/10	48/60 (80.0%) 58/60 (96.7%)
Total			106/120(88.3%)

*抗D産生細胞樹立3株: DBC-5, DBC-11, DBF-11

3. 大量培養および産生物の回収

Bio-Pro のファイバーに DBF-11細胞を接種後、初回の培地交換は、12日目まで1回の培地量2.8リットル必要とし、以後131日間で85回総培地量238リットル使用した。

抗 D 抗体価の上昇は、細胞接種後3日目から5,120倍、4日目から12日目が10,240倍、13日目20,480倍、34日目から40,960倍、52日目から8.2×

10⁴倍に上昇し、56日目から培地に添加する FBS 量を 5%, 70日目から 3%に減少したが131日目までに約 8 × 10⁴倍の抗体価を維持した (図 2)。

産生物の回収量は、12日目から1日1回 (休日を除く) 80~90ml の採取量で101回採取し、総採取量 8.17リットル、ヒト IgG 量は、5.1g であった。(ラナプレート IgG-L キットで定量)

図 2 Bio-Pro による抗 D モノクローナル抗体の産生 (DBF-11細胞)

図 3 抗 D モノクローナル抗体 (DBF-11) の免疫電気泳動像
a, e, i, m: 正常ヒト血清, b: 抗ヒトウサギ血清,
c, g, k: 抗 D モノクローナル抗体 (DBF-11), d:
抗ヒト IgG ウサギ血清, f: 抗ヒト Fab (IgG) ヤギ
血清, h: 抗ヒト Fc (IgG) ヤギ血清, j: 抗ヒト κ ウ
サギ血清, l: 抗ヒト λ ウサギ血清

4. 産生物の精製および性状

産生物 8.17リットルをホローファイバーで 800 ml に濃縮精製し、ヒト IgG 量は、4.4g であった。

性状は、免疫電気泳動法により、図 3 に示すごとく、抗ヒトウサギ血清 (DAKO 製) との反応は、IgG の位置に沈降線を認め、抗ヒト IgG ウサギ血清 (MILES-YEDA 製) も同様なパターンを認めた。

抗ヒト Fab (IgG) ヤギ血清 (MILES-YEDA 製)、抗ヒト Fc (IgG) ヤギ血清 (MILES-YEDA 製)、に対しても特異な沈降線が認められた。抗ヒト κ , λ ウサギ血清 (MILES-YEDA 製) に対しては、 κ のみに沈降線を認め、 λ には認めなかった。

免疫グロブリン (IgG) のサブクラスは、表 5 に示したごとく、IgG subclass specific antisera (M1174 Janssen 社) を用いて、精製抗 D モノクローナル抗体感作血球に対し、抗 IgG1のみ抗グロブリン試験が陽性であった。

抗 D の活性は、表 6 に示すごとく、ブロメリン法で 4 × 10⁵ 倍、間接抗グロブリン試験で 8 × 10⁵ 倍あった。

5) 抗 D モノクローナル抗体 IgG の Fc 部分の架橋

精製した抗 D モノクローナル抗体 IgG の Fc 部分を抗ヒト IgG Fc 特異マウスモノクローナル抗体で架橋した 20 種類の凝集価、凝集力試験成績を表 7 に示した。

食塩液凝集試験では、抗 D モノクローナル抗体量が 40 μ g/ml 以上の場合に凝集価が 32 倍以上、20 μ g/ml では、8 倍以下であった。抗ヒト IgG モノクローナル抗体量 1.0ml の場合は、凝集価が 32 倍であったが 0.5ml 以下では、ほとんど 16 倍以下であった。凝集の強さが 4 プラスを示したのは抗 D モノクローナル抗体 60 μ g/ml に対し抗ヒト IgG

表 5 抗 D モノクローナル抗体 (IgG) サブクラス

			Rabbit Anti-human			
			IgG1	IgG2	IgG3	IgG4
Antiglobulin Test	Monoclonal Anti-D (DBF-11)	Red Cells (R ₁ R ₁)	⦿	—	—	—
	AB Serum		—	—	—	—

表 6 精製抗Dモノクローナル抗体の力価

	Monoclonal Anti-D(DBF-11)×100														
	(2 ⁿ)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Bromelin (R ₁ R ₁ 2% Cells)		4	4	4	4	4	3	3	3	2	2	1	—	—	—
Antiglobulin Test (R ₁ R ₁ 2% Cells)		4	4	4	4	4	4	3	3	3	2	2	1	1	—

表 7 抗Dモノクローナル抗体 IgG の Fc 部の架橋

Reactions of Anti-D(DBF-11)by Tube Test [2V/V% Red Cell(R ₁ R ₁)Suspensions in Saline]										
Fc Mono-specific Antibody (mouse) 3.2mg/ml	Monoclonal Anti-D(DBF-11)									
	100μg/ml・100ml		80μg/ml・100ml		60μg/ml・100ml		40μg/ml・100ml		20μg/ml・100ml	
	Avidity	Titer	Avidity	Titer	Avidity	Titer	Avidity	Titer	Avidity	Titer
1.0ml	3	32	3	32	4	32	4	64	2	4
0.6ml	2	16	3	16	3	16	4	32	3	8
0.25ml	2	8	2	8	3	16	3	16	3	8
0.125ml	2	8	2	8	3	8	3	16	2	8

Reactions of Anti-D(DBF-11)by Tube Test [2V/V% Red Cell(R ₁ R ₁)Suspensions in 20W/V% Albumin]										
Fc Mono-specific Antibody (mouse) 3.2mg/ml	Monoclonal Anti-D(DBF-11)									
	100μg/ml・100ml		80μg/ml・100ml		60μg/ml・100ml		40μg/ml・100ml		20μg/ml・100ml	
	Avidity	Titer	Avidity	Titer	Avidity	Titer	Avidity	Titer	Avidity	Titer
1.0ml	3	512	3	1024	3	1024	4	512	3	128
0.5ml	2	512	3	1024	3	512	4	512	3	256
0.25ml	2	512	3	512	3	512	3	512	3	128
0.125ml	2	512	3	512	3	512	3	512	8	128

Reactions of Anti-D(DBF-11)by Slide Test [40V/V% Red Cell(R ₁ R ₁)Suspensions in 6~8W/V% Albumin and Saline]										
Fc Mono-specific Antibody (mouse) 3.2mg/ml	Monoclonal Anti-D(DBF-11)									
	100μg/ml・100ml		80μg/ml・100ml		60μg/ml・100ml		40μg/ml・100ml		20μg/ml・100ml	
	Albumin (S)	Saline (S)	Albumin (S)	Saline (S)	Albumin (S)	Saline (S)	Albumin (S)	Saline (S)	Albumin (S)	Saline (S)
1.0ml	10	9	11	10	10	10	12	11	15	15
0.5ml	11	11	11	11	11	11	13	12	13	14
0.25ml	12	12	12	12	13	13	14	13	14	14
0.125ml	14	14	13	13	13	13	15	14	16	15

(S) : Second

モノクローナル抗体1.0mlの場合および抗Dモノクローナル抗体40 μ g/mlに対し抗ヒトIgGモノクローナル抗体1.0ml, 0.5mlの場合計3種であった。

アルブミン凝集試験では、抗Dモノクローナル抗体20 μ g/mlの場合を除き他は凝集価が512倍以上であった。

凝集の強さは抗Dモノクローナル抗体40 μ g/mlの場合4プラスであった。

凝集開始時間は、抗Dモノクローナル抗体及び抗ヒトIgGのいずれの濃度も高い場合に9～12秒と速く、いずれの濃度も低い場合は13～16秒と遅くなった。

IV. 考 察

安定な抗Dモノクローナル抗体産生株の樹立は、抗D産生EBVトランスフォームB2-1細胞とJMS-3細胞の融合、いわゆる“EBV-ハイブリドーマ法”を用いた。

融合効率は、1well当りの植え込み細胞数1 $\times$ 10⁵個の場合と5 $\times$ 10⁴個の場合、それぞれ23/30well (76.7%), 21/36well (58.3%)であり、両者間に有意な差は認めなかった。

各クローンには、それぞれ23/23well (100%), 21/21well (100%)のすべてに抗Dの産生を認めた。

単クローン化は、各クローンのうち抗D抗体価の高い6well (B-7, B-11, D-7, D-11, B-8, D-5)の細胞について、各々クローニングを行なったところ、総数537well中521well (97.0%)に増殖を認め、このうち374well (66.6%)に抗Dの活性を認めた。

D-5細胞のクローニングによって分離した65well中の単クローンの中で抗D活性の高いB-9細胞を再クローニングし、B-11, C-11, E-8, B-5, B-8, E-2の6種の細胞株を分離し、そのうちB-11細胞の再クローニングによってDBC-5, DBC-11, DBF-11の3種の細胞株を分離した。

これらの細胞株のうちDBF-11細胞株(培養上清:抗D抗体価1,280倍, ヒトIgG量40 μ g/ml)を抗Dモノクローナル抗体産生細胞として確立した。

Bio-Proによる大量の連続培養は、機械に装着したヴィタファイバーVにDBF-11細胞を2 $\times$ 10⁸個接種して10%FBS加RPMI1640培地を循環させ、細胞注入日から、12日目(抗D抗体価が10,240倍)に生成物の最初の回収を行った。

培地中のFBS濃度を初期の10%から、抗D抗体価の上昇(細胞の増殖)に伴って5%に減じ、細胞の増殖がプラトーに達した時点で3%に減じても抗D抗体価がプロメリン法で4万～8万を維持した。

131日間の培養で生成物の総回収量は、8.17リットル、その抗D抗体価は4万、ヒトIgG量として5.1g回収できた。

図4は、24wellマイクロプレートでDBF-11細胞を7日間培養の細胞増殖曲線を示している。培養後4日目には、培養上清中の抗D抗体価が1,280倍、ヒトIgG量として40 μ g/mlの産生を認め、今回Bio-Proに使用した総培地量238リットルから産生するヒトIgG量は、計算上の回収可能なヒトIgG量は、9.52g(40 μ g/ $\times$ 2.38 $\times$ 10⁵ $\times$ 10⁻⁶)と推定されることから、回収率は53.6%(5.1/9.52g)と低値であった。

ヴィタファイバーから濾出して循環培地中に移行した産生物を40%飽和硫酸アンモニウムで塩析し、ヒトIgG量として約2.8g回収できた。したがって、ヴィタファイバー中で産生した総IgG量は、約7.9gとなり、推定値9.52gの約83%が産生

図4 24well マイクロプレートによる培養 (DBF-11細胞)

したことになる。精製過程の塩析による消失分を加算すると実際には、8.7~9.0g 産生したことになり、循環培地の FBS 量を通常の培養条件(10% FBS 添加)に比して約1/3量(3%)に減じても抗 D モノクローナル抗体の産生量が多く、ヴィタファイバー表面における栄養素の交換が効率良く行われていることが確認できた。

この方法によれば、融合細胞(DBF-11)から産生する抗 D モノクローナル抗体(IgG)量は、培地 1ml 当り 37~38 μ g であり、別の実験によると図 4 に示すごとくマイクロプレートによる培養では、5 日目の培養上清中の IgG 量が 40 μ g/ml であることと比較して、IgG 産生量に殆ど差が認められなかった。

欠点は、ヴィタファイバーから循環培養液中に産生物が濾出することであり、これを改善する為にヴィタファイバーの分画分子量の平均ポアサイズ 30,000 を 20,000 のサイズに小さくすればある程度回収率が改善されると考えられるが細胞増殖に要する栄養素等の補給、代謝産物の除去等の効率について今後検討をする必要がある。

産生物 8.17 リットル(ヒト IgG 量 5.1g)の精製は、ホローファイバーを用いた限外濾過で 800ml に精製濃縮し、ヒト IgG 量として 4.4g 回収した。

回収率は 86.3% であった。

免疫グロブリンの性状は、免疫電気泳動法によって、IgG, κ 型(L 鎖)であり、サブクラスは凝集反応によって IgG1 と判定した。

抗 D 活性は、プロメリン法で 4×10^5 倍、間接抗グロブリン試験で 8×10^5 倍であった。諸外国で市販されている血液型判定用抗 D モノクローナル抗体は、免疫グロブリンクラスで分類すると IgG, IgM タイプの 2 種であり、前者はアルブミン液法、後者は生理食塩液法と用法が異なっている。

我々の確立した細胞(DBF-11)が産生する抗 D モノクローナル抗体も IgG タイプであり、外国で使用されているアルブミン液法用に該当するが、各種の検査法に使用可能な血液型判定用試薬とするため、精製抗 D モノクローナル抗体(ヒト IgG) 40 μ g/ml に対し、抗ヒト IgG (Fc 特異)マウスモノクローナル抗体(マウス IgG) 32 μ g/ml の混合比で抗 D モノクローナル抗体 IgG の Fc 部を架橋することによって凝集反応系の諸条件(生理食塩液法、アルブミン液法、蛋白分解酵素法、抗グロブリン法)のいずれの方法を用いても Rho (D) 血液型の判定を可能とし、同時に感度も上昇した。

この抗 D 血液型判定用モノクローナル抗体〔商品名：抗 D 「日赤」、施設記号：OSK3〕の特異性

表 8 抗 D 抗体を保有する Pho (D) 陽性血球に対する反応

Red Blood Cells of Category	Reactions of Anti-D Made by People with Red Cells of Category											Monoclonal Anti-D(DBF-11, OSK3)				
	II			III			IV			V			VI		S	P
	a	b	c	a	a	b	a	b	c	i	ii					
II	—	+	+	+	+	+	w	+	+	w	+	+	nt	nt		
III a	+	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
b	+	—	—	—	+	+	+	w	+	+	+	+	nt	nt		
c	+	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+w	+w		
IV a	—	w	+	—	—	—	—	+	+	—	+	+	+	+		
b	—	w	+	w	—	—	—	—	+	w	+	—	w	+		
V a	+	—	+	—	+	w	+	—	w	—	+	—	—/+	+		
b	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	nt	nt		
c	+	—	+	—	w	—	w	—	—	—	+	—	nt	nt		
VI	—	—	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—		
Rh33												—	—			

(文献14)

S: Agglutination of Cells in Saline Suspension

P: Agglutination of Papain-treated Cells

については、著者らが献血者603例に対する試験で確認している⁸⁾。

臨床検査用試薬としては、十字ら⁹⁾、中田ら¹⁰⁾、田村ら¹¹⁾、大久保ら¹²⁾によって特異性、凝集力、相関性等について良い評価を得ており、臨床検査に十分使用できることが確認できた。

Tippett と Sanger ら¹³⁾によって分類された Rho (D) 陽性でかつ抗 D 抗体をもつ赤血球 (カテゴリー II～VI) に対する反応性については、英国 MRC の Dr. Tippett に確認を依頼し、その試験結果を表 8¹⁴⁾に示した。カテゴリー III, IV, V には凝集し、VI には凝集せず、Rh33 にも凝集しなかった。

一方、Lowe ら⁴⁾の作製した抗 D モノクローナル抗体 (HD7) は、III, V, VI に凝集し、IV に凝集せず、Rh33 にも凝集しなかったと報告し、Paire ら¹⁵⁾が作製した 2 クローンの抗 D モノクローナル抗体は、1 クローン Coll 8.8 が III, IV, V, VI のすべてに凝集し、もう一つのクローン Coll 7.12 は、III のみに凝集し、IV, V, VI に凝集せず、Rh33 とは 2 クローンとも凝集しなかったと報告している。

我々の作製した抗 D 血液型判定用モノクローナル抗体 (DBF-11) は、Rho (D) variant に対する反応性が Lowe ら (HD7)、Paire ら (Coll 8.8, Coll 7.12) が報告した抗 D モノクローナル抗体と一部異なることが分かった。

これら種々の抗 D モノクローナル抗体は、今後の Rho (D) 抗原の variant を分類する上で有用であると考えられる。

今回、我々は各種の検査方法を用いて Rho (D) 血液型の判定が可能な抗 D 血液型判定用モノクローナル抗体の開発に国内で初めて成功した。

文 献

- 1) Koskimies, S.: Human lymphoblastoid cell

- line producing specific antibody against Rh-antigen D. *Scand. J. Immunol.*, 11: 73—77, 1980.
- 2) Boylston, A.W., et al.: Production of human IgM anti-D in tissue culture by EB-virus-transformed lymphocytes. *Scand. J. Immunol.*, 12: 355—358, 1980.
- 3) Bron, D., et al.: Production of human monoclonal IgG antibodies against Rhesus (D) antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81: 3214—3217, 1984.
- 4) Lowe, A.D., et al.: A human-human monoclonal anti-D by direct fusion with a lymphoblastoid line. *Vox Sang.*, 51: 212—216, 1986.
- 5) 宇野成恒, 他: 単クローン性抗 Rh (D) 抗体を産生するヒト細胞株の樹立. 第13回日本免疫学会総会記録, 416—417, 1983.
- 6) 高橋英夫, 他: 細胞融合による単クローン性ヒト抗 Rh₀(D) 抗体の産生について. *日輸血会誌*, 32: 253, 1986.
- 7) 星野眞由美, 他: 単クローン性ヒト抗 Rh₀(D) 抗体の血清学的検討について. *日輸血会誌*, 32: 253, 1986.
- 8) 山野 孟, 他: 抗 D 血液型判定用モノクローナル抗体の評価. *機器・試薬*, 11(3): 370—371, 1988.
- 9) 十字猛夫, 堀江登志子: 抗 D 血液型判定用モノクローナル抗体の評価. *機器・試薬*, 11(3): 355—357, 1988.
- 10) 中田 弘, 大河内一雄: 抗 D 血液型判定用モノクローナル抗体の評価. *機器・試薬*, 11(3): 358—361, 1988.
- 11) 田村 眞, 他: 抗 D 血液型判定用モノクローナル抗体の評価. *機器・試薬*, 11(3): 362—366, 1988.
- 12) 大久保進, 他: 抗 D 血液型判定用モノクローナル抗体の評価. *機器・試薬*, 11(3): 368—369, 1988.
- 13) Tippett, P. and Sanger, R.: Observations on subdivisions of the Rh antigen D. *Vox. Sang.*, 7: 9—13, 1962.
- 14) Tippett, P.: 私信.
- 15) Paire, J., et al.: Establishment of human cell lines producing anti-D monoclonal antibodies: Identification of rhesus D antigen. *Immunology Letters*, 13: 137—141, 1986.