

---

# 総 説

---

## モノクローナル抗体の作製と応用

森下 恵美, 成田 宏史

### Production and Application of Monoclonal Antibodies

Emi Morishita and Hiroshi Narita

#### I. はじめに

近年のバイオテクノロジーの発展には目を見張るものがある。これまで生命に対して受動的なアプローチを取らざるを得なかった人類は、今やバイオテクノロジーの手法を駆使して積極的に生命現象を解明しこれを利用し始めている。こうした成果を受け入れ利用するにしろ、批判し拒絶するにしろ(勿論無関心も結構であるが……), 今後我々はこの分野と直接的, 間接的に末長くおつきあいしていかなければならないことは必至であり, こうした学問領域に対して, 正しい理解を示すことが21世紀を生き延びてゆく, 支えてゆく, 築いてゆく原動力となるのではないかと考えられる。

現在, バイオテクノロジーの基礎となっているのが遺伝子工学的手法と動物細胞培養法である。ここに紹介するのは後者, 細胞融合法を利用した試験管内抗体作製法に関して, これまで我々が行って来た研究をまとめたものである。我々は直接遺伝子を扱ってはいない。しかし確かに新しい細胞を自ら作り出し利用している。本稿は, 自分達にもこんなことができるんだという感動と改めて抱く生命の妙に対する畏れ, そして努力の集積である。

#### II. 細胞融合とモノクローナル抗体

##### 1. 細胞融合法の応用

細胞融合とはウイルスやポリエチレングリコール等の作用によって, 性質の異なる2種類の細胞を融

合させることである。この技術を用いて単一クローンの抗体産生細胞がつくるモノクローナル抗体を得る方法を開発したのは Köhler と Milstein である<sup>1)</sup>。彼らは抗体を産生する正常なリンパ球とガン化したリンパ球を融合することによって, 抗原特異的な抗体を産生し続ける細胞を作ることができるのではないかと考えた。そして, ヒツジ赤血球で免疫したマウスの脾臓細胞と, マウス由来のミエロマ細胞を融合し, ヒツジ赤血球に対して特異的な抗体を分泌している細胞をクローン化した。こうして1975年, モノクローナル抗体を分泌する融合細胞(ハイブリドーマ)を培養維持することに成功したのである。以来, 彼らの手法を用いて多く研究室でモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが確立され, 医学, 生物学領域の研究の進展に極めて重要な役割を果たしてきた。彼らの優れた理論と応用の重要性が広く認識され, 1984年 Köhler と Milstein はノーベル医学生理学賞を受賞した。

本稿ではモノクローナル抗体作製の手法とそのもとなる原理の説明をしながら, モノクローナル抗体が何物であるのかを解説する。そして我々がこの4年間に手掛けたモノクローナル抗体を紹介し, 実際にモノクローナル抗体で何ができるのかについても述べたいと思っている。原理, 手法, 応用の話をする前に, その背景として免疫や抗体について少し触れておきたい。モノクローナル抗体を理解するには是非とも知っておきたい基礎的な事柄を, なるべく分かり易く説明出来れば, と思う。なお, 詳しくは成書<sup>2-5)</sup>を参考にされたい。

## 2. 免疫応答<sup>6~8)</sup>

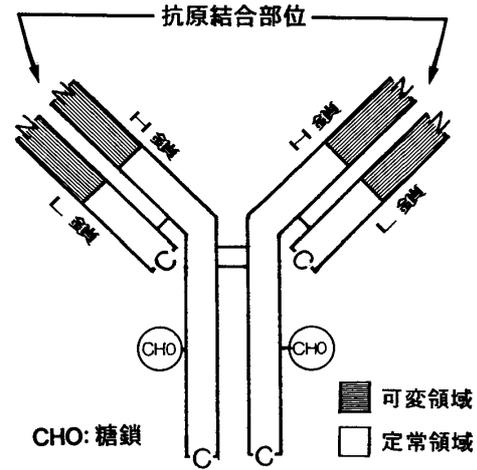
免疫系と呼ばれる脊椎動物の機能系は、からだの中に侵入してきた細菌やウイルスを排除してからだを守るように働く。一方、からだの中では絶えず細胞分裂が起こり、異常な細胞が出現する危険性がある。この異常な細胞を排除するためにも、免疫系が働いている。このように免疫系は外敵から身を守るための生体防御機構であるばかりか、個体の統一性を維持するための生体監視機構ともいえる。

免疫系は、自己の秩序を守るために厳密に自己と非自己を区別し、非自己を速やかに排除しなくてはならない。そのために細胞性免疫と体液性免疫と呼ばれる2つの機構を介して、非自己つまり抗原に対して様々な免疫応答を起こす。細胞性免疫は、抗原と選択的に反応するリンパ球の産生による免疫応答で、抗原にリンパ球が直接反応して抗原を除去する。免疫応答の主役が細胞であることから細胞性免疫と呼ばれる。一方、体液性免疫は、抗原に選択的に結合する抗体の産生を介して免疫応答を起こす。抗体自身は抗原を直接分解する機能をもっていないが、抗原に結合することで抗原の分解に関与する他の細胞や分子を活性化して、抗原を効率良く分解除去できるように働く。この免疫応答の主役である抗体が血液やリンパ液に存在するので、体液性免疫と呼ばれる。

免疫系を構成する中心的細胞は、主に骨髄、胸腺、脾臓、リンパ節、血液に存在しているリンパ球のT細胞とB細胞である。T細胞は細胞性免疫及び体液性免疫の制御に、B細胞は直接体液性免疫に関与し、自ら形質細胞へと分化して抗体を分泌する。

## 3. 抗体の種類と機能

1つ1つの抗体はそれを産生するB細胞クローン(クローン: 単一細胞に由来する細胞集団)の違いによってそれぞれ異なった抗原特異性を示す。しかし、蛋白質としては多くの共通した構造をもっている。もっとも基本となるのはアルファベットのY字の形をした単位である。このY単位は2本の長いポリペプチド鎖(Heavy Chain: H鎖)と2本の短いポリペプチド鎖(Light Chain: L鎖)の計4本からできている。抗体はH鎖の種類によって、5つのクラスに分類される。一方、L鎖は全クラス共通で、 $\kappa$ 、 $\lambda$ の2種類がある。図1に模式的に示したようにL鎖はH鎖のN末端側とY単位の腕の部分を作っていて、腕の先の部分は抗体を産生するクローンによってアミノ酸配列が異なるため可変領域、それ以外は



クラス	IgG	IgM	IgA	IgE	IgD
H鎖	$\gamma$	$\mu$	$\alpha$	$\epsilon$	$\delta$
L鎖		$\kappa$ or $\lambda$			
分子形モデル	Y		Y	Y	Y

図1 抗体の構造

クラスで共通しているので定常領域と呼ばれる。抗原と結合する抗原結合部位は可変領域にあり、この抗原結合部位のアミノ酸配列によりクローン間の抗原特異性の違いが現れる。1つの抗体分子の2本ずつのH、L鎖はそれぞれ同一のポリペプチド鎖であるため、IgGの場合1つの抗体は全く同じ腕を2つもっていることになり、1分子の抗体は2分子の抗原と結合することができる。一方、H鎖の定常領域は補体系の活性化やマクロファージとの結合などに重要な役割を果している。つまり抗体は抗原を認識して特異的に結合する機能と、抗原を分解する他の機能系を活性化して抗原を除去する機能の両方を持ち合わせている蛋白質であり、それぞれの役割を可変領域と定常領域で分担している。このように複雑かつ非常に洗練された機能をもつ抗体は、巧みにその産生を制御されている。

## 4. 抗体の産生機構

個体は生まれたときから、この先出会うであろう抗原に対して特異的な抗体を産生するように運命づけられたB細胞クローンを1通り揃えて準備しており、その数は哺乳類で  $10^6 \sim 10^8$  クローンと推定されている。1つのB細胞はその細胞表面にただ1つの抗原決定基(抗体によって認識される部位)との

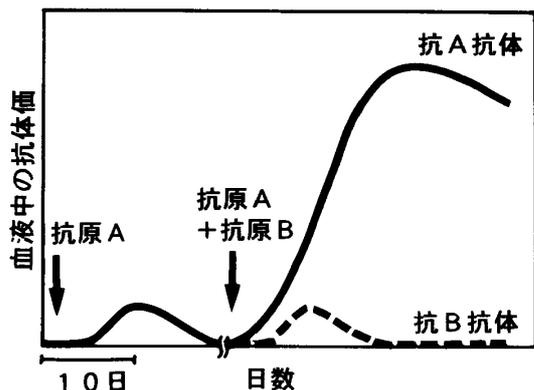


図2 一次免疫応答と二次免疫応答  
 抗原Aに対する免疫成立後、抗原A、Bを同時に投与すると、抗原Aに対しては二次応答が起こるが、抗原Bに対しては一次応答が起こる。

み選択的に結合する抗原レセプター(膜結合型抗体)をもっている。あるB細胞が対応する抗原に初めて出会うと、そのB細胞は抗原レセプターを介して抗原と結合し、活性化されて分化、増殖を開始する。そして親細胞の細胞表面のレセプターと同じ抗原特異性をもつ抗体(分泌型抗体)を分泌する抗体産生細胞となり、抗体が産生されるようになる。この過程は一次免疫応答と呼ばれ、抗体産生は抗原との結合から数日遅れて始まり、10日前後でピークとなり徐々に減少する。このとき活性化されたB細胞の一

部が記憶細胞として残っているため、再び同じ抗原に出会ったときは直ちに抗体が産生され、しかも一次免疫応答のときよりも大量の抗体が長期間にわたって産生される。これを二次免疫応答という(図2)。産生される抗体のクラスは、一次免疫応答の初期にはIgM、二次免疫応答では主にIgGである。

このように抗体産生機構は、抗原が多数のB細胞クローンの中から特異的に結合する抗原レセプターをもつクローンのみを選択的に増殖させて抗体を産生させるという Burnet のクローン選択説<sup>9)</sup>で説明される(図3)。体液性免疫は1冊のB細胞クローンの一覧表をもっていて、必要なページだけをコピーし、コピーしたページにはちゃんと印を付け、必要なときにすぐを開けるようになっている。

### 5. モノクローナル抗体と抗血清(ポリクローナル抗体)

図4に抗血清とモノクローナル抗体の違いを簡単に示した。モノクローナル抗体とは、細胞融合の手法を用いて抗体産生細胞に試験管内での増殖能を付加したハイブリドーマを、各クローンに分離することにより得られる抗体で、単一クローンに由来する均質な抗体である。モノクローナル抗体を作製する手法が開発されるまで、免疫学的な解析は専ら抗血清で行われていた。抗血清とは、ウサギなどの動物に抗原を数回にわたり注射し、免疫状態にした後採

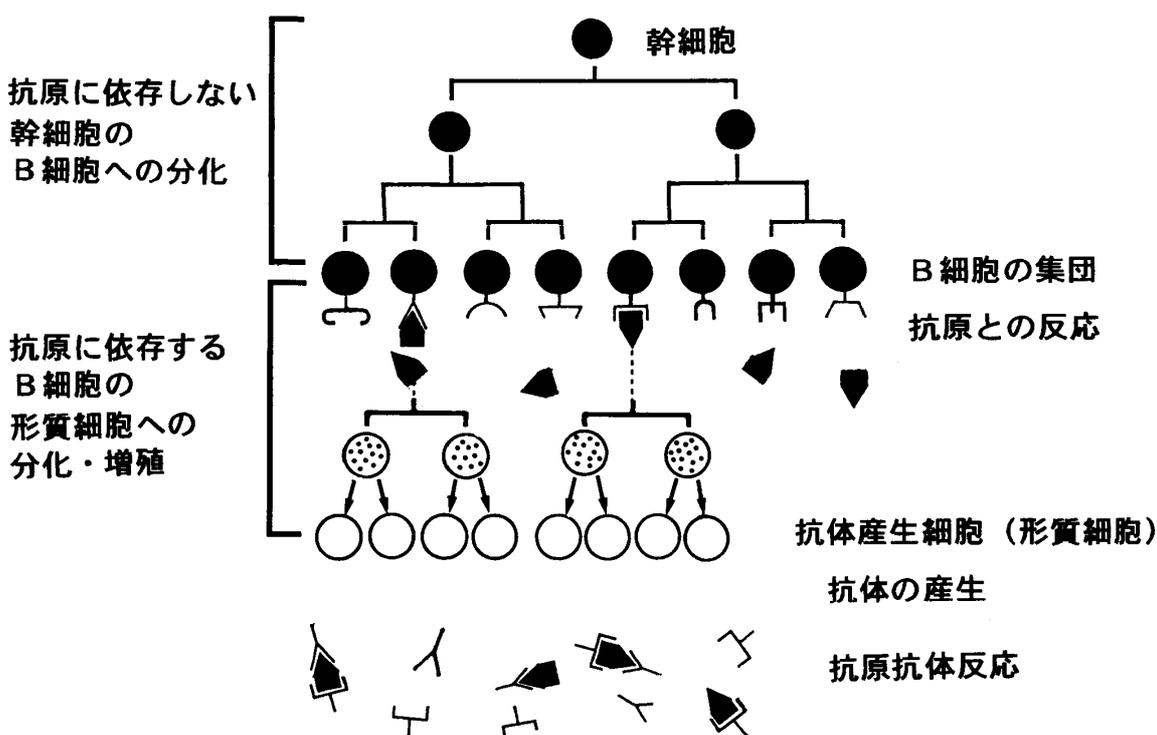


図3 Burnet のクローン選択説

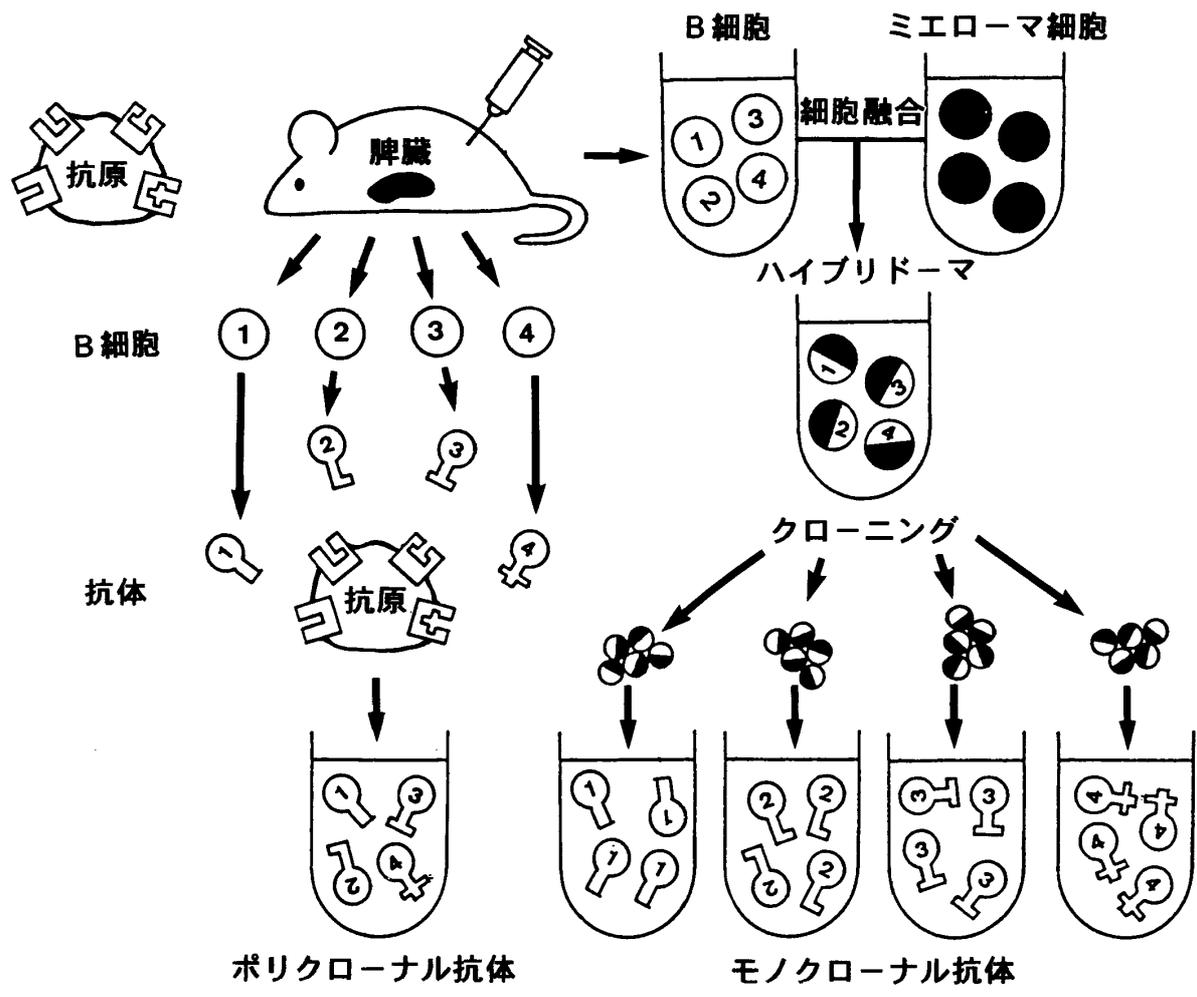


図4 抗血清とモノクローナル抗体

取した血清である。このような免疫動物の血清（抗血清）中には何種類かのB細胞クローンに由来する特異的抗体が含まれる。これは次のように説明される。

Burnet のクローン選択説で説明されるように、抗原は特異的に結合する抗原レセプターをもつB細胞クローンのみを活性化し、分化と増殖を促すが、その抗原によって活性化されるB細胞クローンはたった1種類という訳ではない。通常抗原は複数の抗原決定基を持つので、それぞれの抗原決定基に対して特異的なB細胞クローンを活性化し、抗体の産生を促す。抗原は様々な部位で部位特異的な抗体に認識される。砕けた例を挙げれば、講義中の先生（抗原）と大勢の学生（B細胞）。ある学生は先生の目を見ている。別の学生は先生の講義に耳を傾ける。又ある学生は板書する字、手、鼻、服装、ネクタイ、足音といったように（中には眠っている学生も…）。さらに同一の抗原決定基に対しても異なった親和性（学生に例えるならば彼らの集中力）をもつ

B細胞クローンが存在する為、活性化されるのは「抗原決定部位数」×「親和性の違い」となる。そしてその数だけの抗体分子種が合成される。

ここで、抗血清とモノクローナル抗体を特異性 (specificity) と親和性 (affinity) の2つの点で比較してみる。抗原ⅠはA、Bの抗原決定基をもち、抗原ⅡはA、Cの抗原決定基をもっているとする。抗原Ⅰに対する抗血清と抗原Ⅱを反応させると、抗血清中の抗A抗体は抗原Ⅱとも特異的に反応するため、抗原Ⅰと抗原Ⅱを容易に区別することができない。ところが抗B抗体は抗原Ⅱと反応しないし、抗C抗体は抗原Ⅰと反応しないので、これらの抗体単独であれば抗原Ⅰと抗原Ⅱを区別する事ができる。抗B抗体産生細胞や抗C抗体産生細胞を別々に選り出しモノクローナル抗体を手に入れば、それぞれの抗原を区別できるようになる。勿論共通の抗原決定基を認識する抗Aモノクローナル抗体の取得も可能である。また免疫に用いる動物がもともと何かほかの抗原に感作していたり抗原に不純物が含まれる場

合、抗血清中には当然のことながら目的ではない抗原に対する抗体が含まれることになる。不純物の方が抗原性が高い場合には、何に対する抗血清かわからなくなってしまう。その点モノクローナル抗体では、特異的でない抗体産生細胞はスクリーニングによって淘汰され、都合のよい抗体産生細胞だけが選別されている為、特異性ははっきりしている。

親和性に関して抗血清とモノクローナル抗体を比較する適当な例として沈降反応がある。IgG分子は同じ構造の抗原結合部位を2個(IgM抗体は10個)もつので、二分子の抗原の間を橋渡しするように結合する。モノクローナル抗体の場合には抗原に抗体の結合部位が通常1つしかないので、これ以上の結合は起こらない。ところが抗血清(ポリクローナル抗体)の場合には個々の抗原決定基に対応する抗体が結合しうるため、1つの抗原分子に複数の抗体が結合することになる。つまり、モノクローナル抗体と抗原の結合は平衡反応としてとらえることができるが、ポリクローナル抗体の場合には本質的に個々の結合は平衡反応であるにもかかわらず、全体としては常に抗原が抗体のどれかと結合している、言わば不可逆反応と言える。1つの抗原分子に複数の抗体が結合すると複雑な組成の抗原抗体複合体が生成し、高分子化することにより複合体は水溶性を失い沈殿する。これは抗体による抗原の沈降反応(抗原が赤血球のような粒子の場合、凝集反応)と言われ、抗血清に特徴的な反応である。こういった意味で、抗血清は抗原に対して非常に親和性または結合性が高い傾向にある。このように抗体と抗原の結合を考えるうえで、個々の部位における抗体の結合の強さを親和性、抗体全体の結合力の強さを結合性(avidity)と区別することがある。つまり、抗血清はavidityが高い。

抗血清とモノクローナル抗体を別の側面から見た大きな違いは、量と質の安定性にある。抗血清は有限であり、免疫の条件や個体によって性質が異なるし、同一個体でも採取する時期によって、性質に変動がある。つまり抗血清は全く同じものを二度と得ることはできない。一方モノクローナル抗体は、ハイブリドーマが生きている限り半永久的に均質な抗体を必要だけ得ることができる(ところが、モノクローナル抗体と言えども、培養条件によって糖鎖のつきかたが変わるといふ報告もあり、今後問題となる可能性がある<sup>10)</sup>。

以上述べたようにモノクローナル抗体と抗血清は全く異なる試薬として考えても差し支えなく、両者

を合わせ持っていると非常に便利である。但し、次に述べるように、モノクローナル抗体を取得するためには、労力、時間、コストにおいて非常に大きな負担を負わなければならない(それでもモノクローナル抗体をとる価値は十分にあるし、モノクローナルでなければならない場合もある)。そして、モノクローナル抗体をより良く理解するためには、この独特な作製法を理解することが重要である。

### III. モノクローナル抗体作製法

図5に簡単ではあるが、モノクローナル抗体作製の全体的スケジュールをまとめた。このフローチャートをもとに、モノクローナル抗体作製法を説明して行こうと思う。

#### 1. 動物細胞培養

##### a) 設備・機器

モノクローナル抗体を作製するには、当然ながら細胞培養の技術が必要である。そのための設備・機器として、クリーンベンチ(無菌操作の為には必須である)、インキュベーター(気相は炭酸ガス5%、空気95%、かつ湿度100%、温度37°Cに設定されている)、倒立顕微鏡(培養容器の底に沈んでいる、または付着している細胞を下から観察する)は最低限必要となる。そのほかにも、低速遠心機(500~3000 rpm程度のもの)、液体窒素容器(凍結細胞の保存用)、冷凍冷蔵庫、超低温冷凍庫(細胞凍結用、抗体の長期保存用)、オートクレーブや乾熱滅菌器

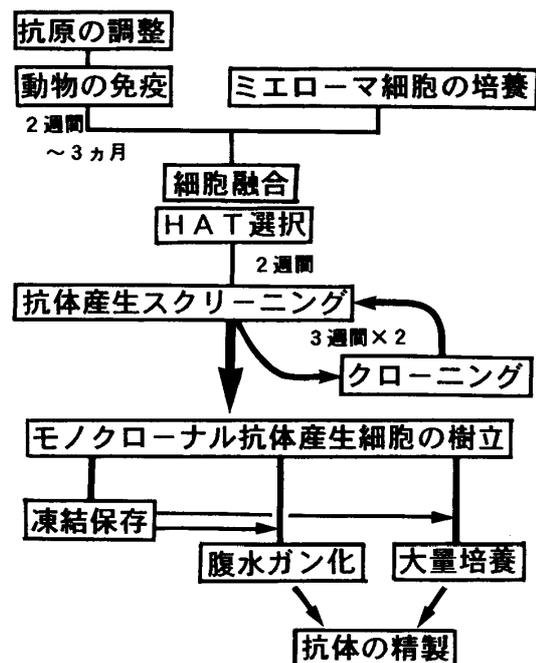


図5 モノクローナル抗体作製の手順

などが必要である。また、ピペット、培地ビン、培養容器（96穴・24穴プレート、フラスコ）、遠心チューブなどは、常に余裕を持って準備しておく必要がある。細胞培養で最も避けなければならないのは、微生物のコンタミネーションで、とにかく一度コンタミネーションが発生するとすべての面でのダメージは予想以上に大きい。

#### b) 培地

培地は pH や浸透圧のような生理的環境を備えると同時に、細胞の増殖に必要な栄養素や微量成分を含んでいる。常用されている培地は粉末で市販されているので、各成分を秤量して調製する必要はない。増殖培地：本研究室ではミエローマ細胞やハイブリドーマの増殖培地、また後述する HAT 培地と HT 培地の基本培地として、25 mM HEPES buffer の添加された RPMI1640 培地かダルベッコ改変 MEM 培地 (DMEM 培地) を使用している。市販の粉末培地を購入し、調製時にピルビン酸、炭酸水素ナトリウム、抗生物質（ペニシリン、ストレプトマイシン）を加え、吸引濾過滅菌する。さらに10～15%のウシ胎仔血清 (fetal bovine serum: FBS) を加え増殖培地とする。ハイブリドーマの増殖は使用する FBS のロットによって著しく異なるので、あらかじめロットチェックを行い、使用可能なロットを確保しておく必要がある。血清は 56°C で30分処理し、補体系の不活性化をする。

8AG 培地：親株であるミエローマ細胞の HGPRT 欠損株 (III. 5. a. 参照) を選択する為の培地で、増殖培地に 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の 8-azaguanine (8AG) を添加する。HGPRT を持つ細胞は 8AG を取り込むためこの培地中で死滅する。

HAT・HT 培地：HAT 培地はハイブリドーマの選択培地で、増殖培地にヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジンを添加する (III. 5. a. 参照)。HT 培地は HAT 培地から通常の増殖培地への移行時に用いる培地でアミノプテリンを含んでいない。濃縮溶液が市販されているので、使用時に増殖培地に必要量を加える。

#### c) 細胞の増殖と凍結保存

細胞融合に用いるミエローマ細胞は浮遊細胞で、培地中に浮遊しながら増殖する。対数増殖期には15～18時間に1回細胞分裂が起こる。細胞濃度が  $1 \times 10^6$  個/ml 以上になると急激に死細胞が増え始めるので、新しい増殖培地で10～15倍希釈し継代する。ハイブリドーマもほぼ同様の性質を示すが、特に高濃度域に弱いため増え過ぎないようにタイミングよ

く継代することが重要である。血球算定盤を用いて細胞濃度や細胞の調子を知ることができるが、慣れてくると培地の濁り具合や顕微鏡観察でおおよそを知ることができるようになる。一度細胞の調子が崩れると元に戻すには非常に苦勞するし、その後増殖してきた細胞は元の細胞と性質が異なっている可能性が高い。

細胞の凍結保存は、細胞を凍結溶液に浮遊させた状態で行う。凍結溶液には10%ジメチルスルホキシド (DMSO) を含む FBS を用いている。DMSO は細胞毒性があるので、操作は全て水中で行う。対数増殖期の細胞を遠心して回収し、 $1 \times 10^7$  個/ml となるように凍結溶液に浮遊させる。凍結用チューブに 0.5 ml ずつ分注した後、 $-80^\circ\text{C}$  の超低温冷凍庫中で一晩予備凍結し、翌日細胞を液体窒素中に移す。短期間であれば  $-80^\circ\text{C}$  で保存することもできるが、6カ月を越えると解凍後死細胞が著しく増えるので、液体窒素中で保存することが望ましい。貴重な細胞は数回に分けて凍結する、又は複数の人が凍結し、その一部を溶かして細胞の生存を確認しておくことが望ましい。

## 2. ミエローマ細胞と免疫動物の選択

ハイブリドーマを作製する際、ミエローマ細胞と細胞融合の相手となる脾臓細胞（つまり免疫動物）の動物種が異なると、いずれか一方の動物種由来の染色体が脱落する可能性が高いため、両細胞の動物種を一致させることが多い。細胞融合に用いられるミエローマ細胞（表1参照）は、核酸合成系のうち再生経路に関与する HGPRT もしくは TK を欠損している変異株である (III. 5. a. 参照)。免疫する動物は目的の抗原に対して強い免疫応答を起こす動物種、系統を検討し用いるべきだが、一般にはマウスを使用している研究室が多い。本研究室でも最も一般的な BALB/c マウス由来の NS-1 細胞を使用している。確立されたハイブリドーマは BALB/c マウスにとって自己であるため、BALB/c マウスの腹腔内で増殖させ、抗体を大量に含む腹水を調整することが可能である (III. 8. 参照)。抗原の性質上、目的の抗体を得るためには異種間の細胞融合となることもある。実際にラットマウスやヒトマウスのヘテロハイブリドーマも報告されている。ヒト型モノクローナル抗体は臨床薬として期待されているが、特異性の高いハイブリドーマを安定して得るためには、技術的にも問題が多く残されている。

表1 ハイブリドーマ作製に用いられる主な細胞株

細胞株	Igクラス	由来した細胞
mouse		
P3/X63-Ag8 (X63)	$\gamma_1, \kappa$	BALB/c myeloma MOPC-21
P3/NSI-1-Ag4-1 (NS-1)	$\kappa^*$	X63-Ag8
P3/X63-Ag. U1 (P3U 1)	$\kappa^*$	X63-Ag8
X63-Ag8-6.5.3. (X63.653)	none	X63-Ag8
SP2/O-Ag14 (SP2/O)	none	(X63-Ag8 × BALB/c) hybridoma
MPC11-45.6TG1.7 (45.6TG)	$\gamma_{2b}, \kappa$	MPC11
FO	none	SP2/O-Ag14
S194/5 XXO. BU. 1	none	BALB/c myeloma
rat		
210. RCY3. Ag1.2.3. (Y3)	$\kappa$	Lou Rat myeloma R210
human		
U-266 AR1 (SKO-007)	$\epsilon, \lambda$	U-266 IgE myeloma
GM1500 6TG A12 (GM1500)	$\gamma_2, \kappa$	GM-1500 B-LCL
UC729-6	$\mu, \kappa$	WIL-2 (B-LCL)
LICR-LON-HMy2 (HMy2)	$\gamma_1, \kappa$	ARH-77
8226 AR/NIP4-1 (NP4-1)	$\lambda$	RPMI-8226
HM2.0	none	(myeloma × plasmacytoma)

\* 分泌能なし

### 3. 動物の免疫方法

動物の免疫で留意すべき点は、目的の抗原が応答され易い状態で動物に投与されること、細胞融合時に応答したB細胞ができるだけ多く蓄積されていることである。これらの点を考慮して抗原量、アジュバントの必要性、免疫回数とその間隔、抗原投与経路などを設定する必要がある。目的とする抗原の性質、精製状態、動物の感受性などにより至適条件が異なり得るので、それぞれのケースについて検討を行う。抗原が精製されていると目的とするハイブリドーマが効率良く得られることが多く好都合であるが、必ずしもそうである必要はない。これはモノクローナル抗体であるが故の利点である。

a) 可溶性抗原：一般に可溶性抗原の場合、抗原が十分にあれば1回1匹当たり50~100  $\mu\text{g}$  を2週間の間隔で2~3回投与すればモノクローナル抗体の作製に必要な免疫が成立すると考えられているが、抗原量10  $\mu\text{g}$  以下の例も報告されている。アジュバントは抗原を少量ずつ体液中に供給する作用と、免疫系を非特異的に活性化する作用をもつと考えられている。フロイントのアジュバントには完全アジュバントと不完全アジュバントがあり、前者は後者に結核菌の死菌体が添加されている。このため、不完

全アジュバントはB細胞活性化作用のみをもつのに対し、完全アジュバントはT細胞活性化作用をもっている。このことは、完全アジュバントを動物に投与し続けると菌体成分に対するB細胞の応答が生じるだけでなく、サプレッサーT細胞の活性化を促進し、B細胞の応答が抑制される可能性が高くなることを意味する。従って完全アジュバントは初回免疫だけに用いられている。最終免疫はアジュバントを用いず、溶液状態の抗原を50  $\mu\text{g}$  静脈内に直接投与する。細胞融合の3~4日前に最終免疫を行う例が多い。これは最終免疫の3~4日後に脾臓細胞内の感作リンパ球の数が最も多くなるためである。投与経路に関しても静脈注射が最も良い。

b) 細胞抗原：細胞浮遊液を調製し、1匹当たり $1 \times 10^7$  個腹腔内に投与する。異種の細胞であれば非常に抗原性が高いと考えられるので、アジュバントは必ずしも必要ではない。

c) 低分子の抗原：一般に低分子化合物は抗体と結合し得るが、免疫応答を誘導する作用はない。このような物質はハプテンと呼ばれ、免疫にはハプテンをヘモシアニンなどの免疫原性の高い高分子(キャリアー)に結合させたハプテン抗原を用いる必要がある。この場合、キャリアーに対する抗体も作られ

るが、同時に目的のハプテンに対する抗体も得られる。スクリーニングは、牛血清アルブミン (BSA) などの別のキャリアーに結合させたハプテン抗原に対して行い、ハプテンに対する抗体を作っている抗体産生細胞だけを選び出す。ハプテン抗原の場合、抗原のハプテン化の過程で分子自身が構造的な変化を起こすことが十分に考えられるので、遊離のハプテンに対する特異性を確認する必要がある (IV. 実験例 7 参照)。またキャリアーとの結合状態 (結合している方向) に特異的な抗体も得ることができる (IV. 実験例 8 参照)。

d) 他の免疫経路として、脾内免疫と試験管内免疫を簡単に紹介する。

脾内免疫とは抗原を吸着させたニトロセルロース膜等を粉砕し動物の脾臓へ直接注入する方法で、比較的 low molecular weight の水溶性物質にも応用できる。また未精製の抗原を SDS-PAGE で分離後、膜に転写し (ウェスタンブロッティング法: III. 5. b. 参照)、抗原に相当するバンドの部分を取り出し、免疫に用いることも可能である。

また上記のように生体を免疫する方法とは異なり、脾臓細胞を試験管内で抗原刺激する方法がある。この方法は、以下のような利点をもっている。

- ・少量の抗原で効率よく B 細胞を刺激できる
- ・生体にとって有害な抗原でも免疫できる (毒素など)
- ・抗体が生体にとって有害となる場合も免疫できる (自己成分など)
- ・免疫期間がはるかに短い

この方法では、未処理のマウスから無菌的に調製した脾臓細胞を抗原存在下で 4 日間培養する。培養液には、2-メルカプトエタノールとアジュバントとして N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (結核死菌体のアジュバントとしての有効成分は菌体膜のムラミルジペプチドであることが知られている) を加える。試験管内免疫法ではハイブリドーマの増殖率や陽性率が低く、また得られるモノクローナル抗体はほとんど IgM であるという問題が残されているが、この方法によってモノクローナル抗体の応用範囲が更に広がるであろうと期待される。

#### 4. 細胞融合

通常最終免疫の 3~4 日後に細胞融合を行う (このときマウスの抗血清を取っておくと後で便利である)。初期にはセンダイウイルスが用いられたが、入手が容易なこと、ロット間の差が少ないこと、安

価であることなどの理由からポリエチレングリコール (PEG1500~PEG4000) が用いられるようになり、現在も PEG による融合が主流である。PEG による細胞融合はある程度の技術が必要とされるが、電気融合法のように特別な装置を必要としないことも一般に用いられている大きな理由である。参考までに我々が行っている方法を簡単に述べる。マウス 1 匹から得られる脾臓細胞 ( $1 \times 10^8$  個) とミエローマ細胞 (NS-1)  $2 \times 10^7$  個を混合し、血清を含まない基本培地で洗浄後、遠心により細胞を回収する。得られた細胞ペレットをほぐした後、1 ml の PEG1500 溶液 (50%, W/V) を 1 分かけて徐々に加えていく。1 分間放置後、基本培地 20 ml で徐々に希釈し、遠心により細胞を回収する。HAT 培地 40 ml に再浮遊させ、96穴プレート 3 枚にまきこむ。脾臓細胞とミエローマ細胞の比は 10:1~2:1 が良いとされているが、はっきりとしたことはわからないので、我々は常に 1 匹当たり  $2 \times 10^7$  個 ( $5 \times 10^5$  個/ml の細胞濃度で 40 ml 分) のミエローマ細胞を用意している。また融合操作は時間にとらわれず、ゆっくりやるほうが良いようである。理由はわからないが、熟練者は安定して融合率が高い。PEG の細胞融合に及ぼす効果も、実際にはよくわかっていないが、細胞膜の脂質二重層に膜蛋白質を含まない部分を生じさせる作用をもち、隣接する 2 個の細胞はこのような部分で密接し、細胞膜の一部が融合すると考えられている。いずれにしても現在の細胞融合法では、融合はある程度の確率で偶然に起こる現象で、さらに目的とする抗原に対する抗体産生細胞がミエローマ細胞と融合するかどうかは、全く運まかせである。

#### 5. ハイブリドーマの選択方法

##### a) HAT 選択

PEG 処理等を行い細胞融合した直後は、融合した細胞と融合しなかった細胞が混在した状態であるため、脾臓細胞とミエローマ細胞が融合した細胞だけを選び出してなくてはならない。そこで、HAT 選択という巧妙な方法がとられている。融合に用いるミエローマ細胞は、試験管内で増殖の盛んな腫瘍細胞 (骨髄腫細胞) である。この腫瘍細胞は免疫グロブリンを産生する能力が極めて低く、また核酸合成系の 2 つの経路のうち再生経路の酵素ヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT) を欠損している。そのため、ミエローマ細胞は、再生経路の基質であるチミジン (T)、ヒポキサンチン (H) を加えても、もう一つの核酸

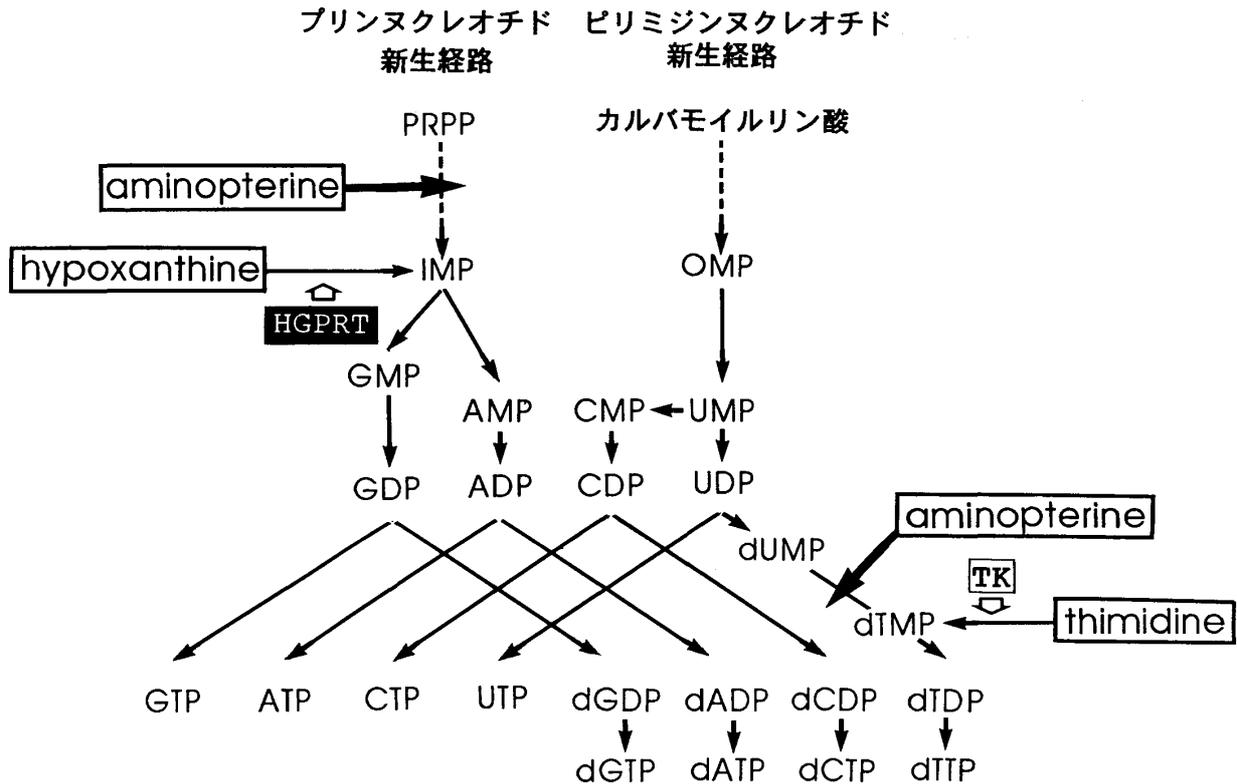


図6 核酸合成とアミノプテリンの作用部位

アミノプテリンはジヒドロ葉酸レダクターゼの阻害剤で、新生経路に必須のテトラヒドロ葉酸の供給を断つことによってこの経路を阻害する。HGPRT 欠損株はアミノプテリン存在下ではヌクレオチドの新生経路、再生経路ともに遮断されるため、核酸を合成できない。これは TK 欠損株でも同様である。

合成系（新生経路）の阻害剤であるアミノプテリン (A) を含んだ培養液中では、核酸を合成できず死滅する (図6)。しかし、正常細胞から HGPRT を獲得した融合細胞は、アミノプテリンが存在していても、再生経路を利用してチミジン、ヒポキサンチンから核酸を合成し増殖することができる。また、マウスの脾臓細胞は正常細胞であるため、試験管内で増殖することはできない。こうして、細胞融合後 96穴プレートにまき込まれた多数の細胞のうち、融合しなかった細胞、同種の細胞が融合した細胞は死滅し、腫瘍細胞と脾臓細胞が融合したハイブリドーマだけが生き延びる (図7)。細胞融合後、2~3日おきに培地の半交換 (ウェルの培地の半分をパスツールピペットで吸い取り、新しい HAT 培地を追加する) を続けると、1週間後にはセレクションがかけられ、肉眼でハイブリドーマのコロニーが確認できるようになる。

最近、HAT 培地を必要とする事なくハイブリドーマを選択することができる無血清培地が開発された。通常、培地には10%程度の牛胎仔血清を添加するが、この培地はインスリン、トランスフェリン

以外の蛋白を全く含んでいない。マウスミエローマ細胞はこの培地で増殖できないが、ハイブリドーマは生育することができる。ただし、ミエローマ細胞

脾臓細胞	ミエローマ細胞
HGPRT (+)	HGPRT (-)
抗体産生能 (+)	抗体産生能 (-)
試験管内増殖能 (-)	試験管内増殖能 (+)

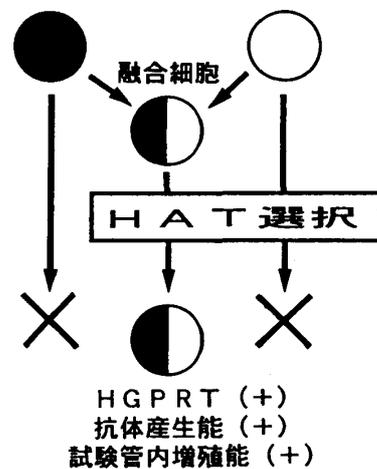


図7 HAT 選択

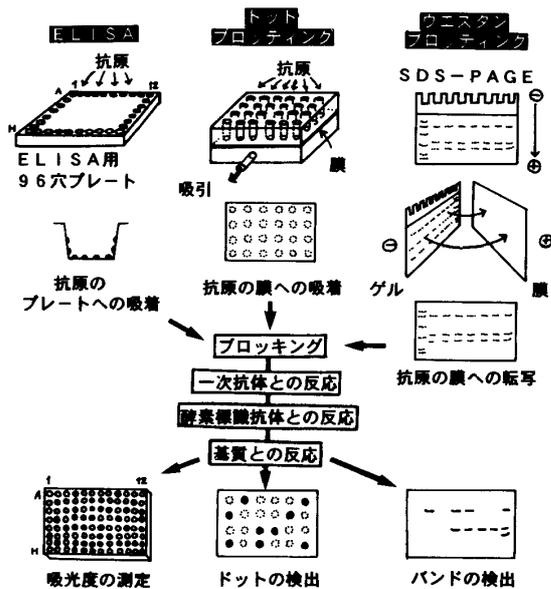


図8 ELISA, ドットブロッキング, ウェスタンブロッキングの概略図

でも TK 欠損株は HGPRT 欠損株とは異なり、この培地でも増殖することができる。このような無血清培地の選択性の理由については不明であるが、高価でロット間に差が見られる牛胎仔血清を使用しなくてもよいこと、ハイブリドーマの培養上清から抗体を回収する際、血清由来の混在蛋白がないため回収が容易であることなど、コスト、抗体の回収の両面において有望視されている。

b) スクリーニング (図8)

HAT 選択で生き残ったハイブリドーマのなかには、全く関係の無い抗原に対する抗体産生細胞も含まれている。そこでハイブリドーマの中から、目的とする抗原に対する抗体産生細胞だけを選び出す過程が必要となる。最も一般的な方法は、酵素標識抗体測定法<sup>12)</sup> (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: ELISA) で、この方法は抗原抗体反応の定量を酵素反応を介して行う酵素免疫測定法 (Enzyme ImmunoAssay: EIA, これに対し放射性同位元素を用いる方法は Radio ImmunoAssay: RIA という) の1つである。ELISA 法では、ELISA 用のマイクロプレート表面に固定された抗原 (固相化抗原) に対しハイブリドーマの培養上清を反応させ、結合した培養上清中の抗体を酵素で標識した抗イムノグロブリン抗体で検出する。酵素反応によって有色の可溶性生成物となる基質を用いて、その吸光度からハイブリドーマ培養上清中の抗体を定量化する。細胞性抗原の場合には、細胞をそのまま固相化することにより ELISA を行なうことができる。また、抗原を

吸着させた膜上で ELISA 法と同様の免疫反応を行う方法として、ドットブロッキング法、ウェスタンブロッキング法<sup>13)</sup>がある。ドットブロッキング法では、抗原溶液をニトロセルロース等のフィルターメンブレンに通して抗原を吸着させるのに対し、ウェスタンブロッキング法では電気泳動で分離した抗原をゲル面から垂直方向にそのまま膜上に電氣的に転写する。どちらの方法も、有色の不溶性生成物となる基質を用いて、抗原に反応したハイブリドーマ培養上清中の抗体をドットまたはバンドとして検出する。特殊な例として、抗原がなにか活性をもっている場合、例えば酵素やホルモン、生理活性物質に対する抗体では、抗原の活性中和を指標にしてスクリーニングすることも可能である。このようなスクリーニング法は、直接活性中和抗体を選び出すことができる。

以上のように、目的とする抗原の性質によって様々な方法があるが、ELISA 法は一度に多数の検体の測定が可能であること (ELISA 用のマイクロプレートも培養用と同型で1枚につき96個の検体を扱うことが可能である)、比較的短時間で測定ができること、少量の検体 (50 μl) で測定できること、放射性同位元素を用いないため取り扱いが容易であることなどから、抗体産生細胞の1次スクリーニングに汎用されている。ELISA で陽性の細胞に対して、他の方法で再度スクリーニングを行うと効率良く目的とする抗体産生細胞を選び出すことができる。いずれにしても、ハイブリドーマが増殖したら、なるべく早くスクリーニングを行いクローニングを開始しないと、目的の細胞を選び出すことが困難になる。抗体を産生しているハイブリドーマの方が増殖が遅いと考えられるからである。

6. クローニング

モノクローナル抗体はその名の示すとおり、単一クローンの細胞集団が産生する抗体である。従って、その細胞集団が1個の細胞から発生していることが確実でなくてはならない。そのためには少なくとも2回のクローニング操作が必須とされている。なお、クローニングには結果として安定な増殖能、抗体産生能をもつクローンを選び出すという重要な意味もある。

細胞をクローニングするには、軟寒天法と限界希釈法がある。軟寒天法は、0.25~0.3%のゲル溶液で調整した細胞浮遊液を培養用のディッシュにまきこむ方法で、細胞はゲルによって移動が制約される

ため増殖するとコロニーを形成する。その1個1個を分離して培養し、1個の細胞由来の細胞集団を得る。この方法は、ゲル溶液の硬度の調節が比較的難しいこと、ディッシュは細胞やカビの汚染が生じ易いこと、取り出したコロニーを液体培地中で培養してからでないとスクリーニングできないこと等が問題となる。

これに対し、限界希釈法は培養用の96穴プレートの1つのウェル(穴)に1個の細胞が入る限界まで細胞浮遊液を希釈して、その細胞浮遊液をプレートにまき込んで培養する方法で、ウェルにまき込まれた細胞は増殖して液体培地中でコロニーを形成する。このとき、1ウェルに1コロニーが形成されれば、その細胞集団は単一クローンである(実際には複数の細胞が同一のウェルに入らないように、96個のウェルに対して50個の細胞をまく)。コロニーが形成されウェルの1/4を占めるようになったら(まきこみ後10日から2週間)、培養上清の抗体価を測定して、陽性のものだけを選びだし、再度クローニングを行う。

クローニングで問題となるのは、細胞はある細胞濃度以下では増殖できないことである。そのため、細胞をまきこむ時に支持細胞として腹腔マクロファージや胸腺細胞を同時にまきこまなくてはならない。しかし、クローニングの度に支持細胞を調製するのは大変煩雑でコンタミの危険性が高くなることから、細胞増殖因子が市販されている。我々は、増殖培地にIGEN社のORIGENを10%添加して使用している。

#### 7. モノクローナル抗体のクラス・サブクラスの決定

目的とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが得られたら、クローニングが終わった段階でその免疫グロブリンのアイソタイプ(クラス・サブクラス)を決定する。この結果はその後の精製の方針などを決める重要な情報となる。市販キットを利用すれば、簡便迅速にアイソタイプを決定する事ができる。

#### 8. モノクローナル抗体の大量調製

モノクローナル抗体の最大の利点は、その抗原特異性にあるが、もうひとつは抗体を安定に手に入れることが可能なことである。株として樹立されたハイブリドーマは培養維持でき、その培地中にELISA法やウエスタンブロッティング法の解析の為に必要十分量の抗体を分泌する。さらに、腹水ガンを誘導した同系のマウスの腹腔内にハイブリド-

マを移植すると、大量のモノクローナル抗体を含む腹水が得られる。一般に、腹水中には1~10mg/mlの特異的抗体が含まれるが、マウス由来の無関係な抗体も微量に含まれる。このような抗体が問題にならない場合には腹水ガン化による抗体の調製は大変有効である。また無血清培地を用いて培養規模を2ℓ程度まで拡大するシステムも開発されているため、マウス由来の抗体や培地に添加されている血清由来の蛋白質を含まない純度の高い抗体を得ることができる。

#### 9. モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体は、抗原の検出等には培養上清や腹水の状態で使用することが多い。しかし、厳密に抗体の特異性や親和性を比較したり、抗体カラムを作製するためには精製されたモノクローナル抗体が必要になる。簡単に純度の高い抗体を得るためには、無血清培養した培養上清を濃縮後、硫酸アンモニウムによる塩析を行い、免疫グロブリン画分を調製する。腹水の場合はマウス由来の免疫グロブリンや他の蛋白質を多く含んでいる為、前処理として塩析を行い粗グロブリン画分を得た後、別の方法でさらに精製を行う。IgMの場合、その分子量の大きさを利用してゲル濾過で夾雑したIgGをほぼ除くことができる。IgGの場合、プロテインAやプロテインGに対する親和性を利用することができる。プロテインAは黄色ブドウ球菌の細胞壁に存在する分子量42,000の蛋白質で、ヒト、マウス、ウサギなどのIgGのFcフラグメントと特異的に結合する性質を持っている。ただし、サブクラスによって親和性が異なり、マウスIgG<sub>1</sub>、IgG<sub>3</sub>に対しては親和性が低い。一方、プロテインGはβ-溶血性連鎖球菌の細胞壁に存在する分子量30,000-35,000の蛋白質で、IgGのサブクラス全般にわたり高い親和性を持ち、最近注目され始めた。図9にプロテインAカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーの例を示す。

### IV. モノクローナル抗体の応用

表2に我々がこの4年間に手掛けたモノクローナル抗体をまとめた。以下に個々の例に関して得られた結果を説明することにより、モノクローナル抗体の特徴及びモノクローナル抗体を使って何ができるかを概説する。

#### 1. 蛋白性抗原

最も一般的な例として、純化あるいはかなり精製された蛋白質を抗原とする場合が考えられる。この

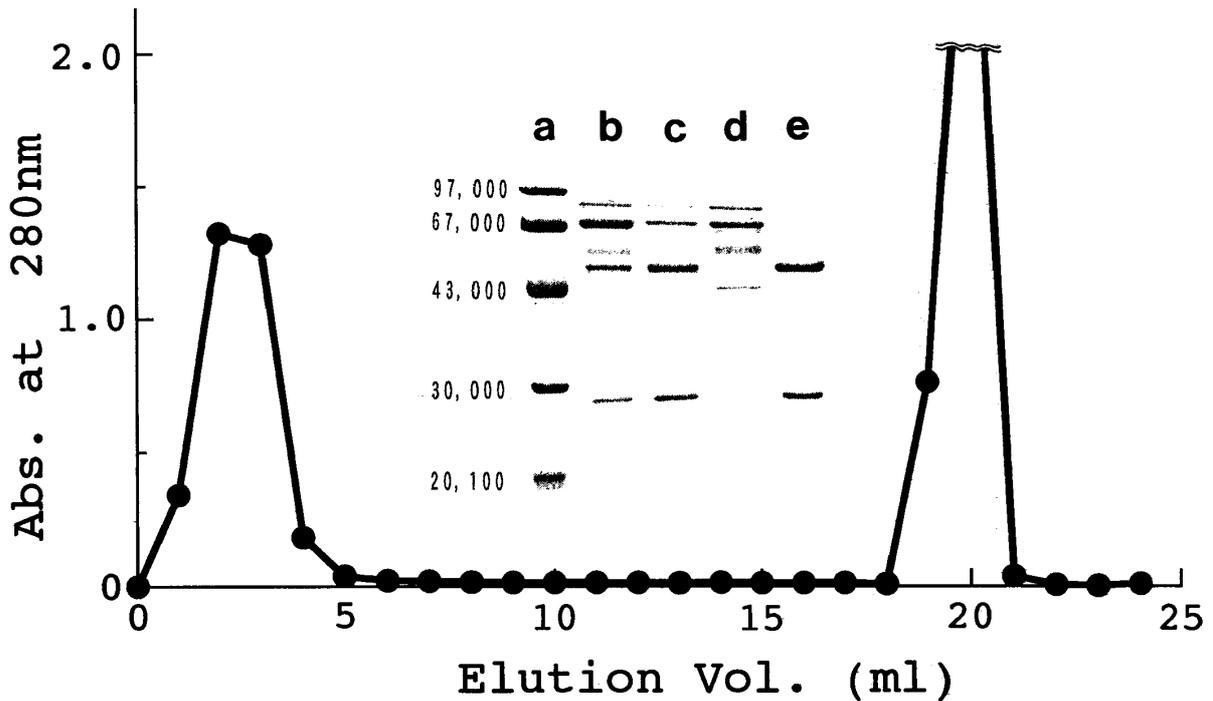


図9 プロテインAによるIgGの精製<sup>14)</sup>

抗 VMOI 抗体28番の硫酸処理した腹水を 3 MNaCl, 1.5 M グリシン, pH 9.0 に対して透析後カラムにかけ, 0.1 M クエン酸, pH 3.0 で溶出した。溶出液は直ちに 1 M トリスで中和した。挿入電気泳動図: 各画分の SDS-PAGE のタンパク染色

- a. 分子量マーカー      b. 腹水 (未処理)
- c. 腹水 (硫酸処理)      d. スルー画分
- e. IgG 画分: 上のバンドはH鎖, 下のバンドはL鎖

場合まず得られた抗体が確かに抗原に対して特異的かどうか, 抗体の認識している部位が未変性か否か, 高次構造か一次構造か, あるいは糖蛋白質の場合糖鎖であるのか蛋白質部分であるのかなどが問題となってくる。これらの特異性に関する情報により, 得られたモノクローナル抗体の使い道もおのずと決まってくる。

表2 得られたモノクローナル抗体の一覧

1. 蛋白性抗原
鶏卵卵黄膜蛋白質 (VMOI)
卵白アルブミン (OVA)
オボトランスフェリン (OTF)
タバコ培養細胞分泌性ペルオキシダーゼ
エリスロポエチン受容体 (EPO-R)
アラビノガラクトタンパク質 (AGP)
2. 複合抗原
ウシ精子
ラット精巣
神経細胞接合部位
3. 低分子抗原
ピロキノリンキノン (PQQ)
トリヒドロキシフェニルアラニン (TOPA)
オキアミ蛋白質由来の血圧調節ペプチド (LKY)
κ-カゼイン由来の血圧調節ペプチド (CXC)

[実験例1]<sup>15)</sup>

VMOI (vitelline membrane outer I) は鶏卵卵黄膜に存在する分子量17,000の単純蛋白質で, α-ヘリックスをほとんど持たないという特徴的な高次構造をとっている<sup>16)</sup>。図10は VMOI に対してとられたモ

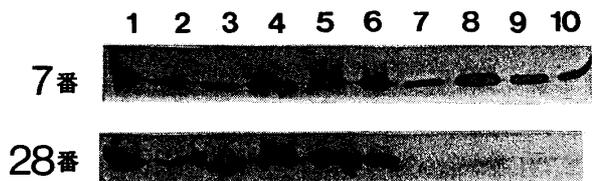


図10 各種鳥卵卵黄膜蛋白質のウエスタンブロッティングによる解析

各種鳥卵卵黄膜から調製した蛋白質を図8に示したように SDS-PAGE により分離後, PVDF 膜に転写し, 抗 VMOI 抗体7番, 28番と反応させた。抗体により認識された蛋白質は, バンドとして検出される。図には, VMOI に相当する部分のみを示してある。

1~6: ニワトリ系 (左からキジ, ホロホロ, ウズラ, ウコッケイ, コジャモ, ニワトリ)

7~10: アヒル系 (左からカーキキャンベル, アヒル, マガモ, バリケン)

ノクローナル抗体7番と28番の、各種鳥卵から調製した卵黄膜蛋白質との反応性を示している。7番はニワトリ系(1~6)にもアヒル系(7~10)にも反応したが、28番はニワトリ系にしか反応しなかった。VMOI様の蛋白質はニワトリ系、アヒル系に共通して存在しているが、構造の一部が異なっていると推察される。また、進化の合目的性から察すると7番の抗体が認識する部位はVMOIの生理機能上重要であると思われる。このように特異性の異なるモノクローナル抗体をセットで入手することにより、抗原の微細な変化に関する情報が得られる。

#### [実験例2]<sup>17)</sup>

卵白アルブミン(OVA)は80°C、1時間の熱処理でモルテングロビュールと呼ばれる半変性状態をとることが知られている<sup>18)</sup>。この状態のOVAを抗原としてモノクローナル抗体を作製したところ、変性OVAにのみ反応する5つの抗体が得られた。これらの抗体の認識部位はOVAのC末端側に集中しており、OVAの熱変性に偏りのあることが明らかとなった。このようにモノクローナル抗体は抗原分子の局部を認識するため、蛋白質の高次構造の変化に関するローカルな情報を与えてくれるプローブとしても利用価値が高い。

#### [実験例3]<sup>19)</sup>

タバコ培養細胞の培地には、分子量40,000, 38,000, 34,000の3種類の塩基性ペルオキシダーゼ(それぞれ40K, 38K, 34K)が分泌されている。これらの異同を解析するために40Kを抗原としてモノクローナル抗体を作製した。得られた15種類の抗体は、40Kのみに反応するA群、40K, 38Kに反応するB群、すべてに反応するC群の3つに分類された。40Kと38KはN末端10残基の配列が同じであるが、34Kは異なることから、A群はC末端側の40Kにユニークな部分を、B群はN末端側の40Kと38Kに共通な部分を、C群は中央の3つとも共通な

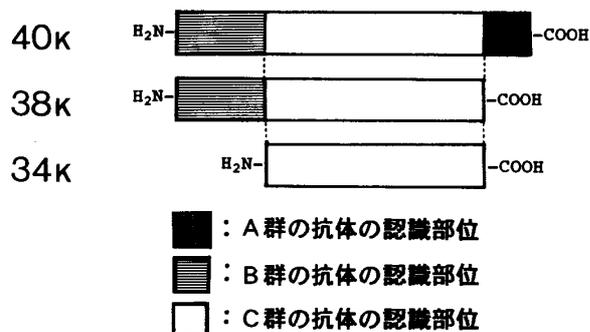


図11 モノクローナル抗体の反応性から推測される40K, 38K, 34Kの一次構造の相関図

部分を認識していることが示唆された(図11)。

B群に属する10番の抗体はウエスタンブロッティングで陰性であり、高次構造を認識しているものと考えられた。さらにこの抗体の存在下で40Kのペルオキシダーゼ活性を測定すると、抗体の用量依存的に約50%まで活性が中和され、遠心上清でも同程度の活性中和しか起こらなかったことから、この抗体は活性中心またはその近傍を認識していることが示唆された。100%の活性中和が起こらないのは、モノクローナル抗体と抗原の結合が可逆反応であるためと考えられる。このことは活性部位を認識しているしていないに関わらず不可逆的な沈降反応を起こし、遠心上清の活性を完全に消失させるポリクローナル抗体との大きな違いである。ただし、認識部位の異なる複数のモノクローナル抗体を混ぜ合わせると、試験管内でポリクローナル抗体を作ることができる。

現在は、これらの抗体を樹脂に固定して抗体カラムを作製し、精製の簡略化、高収率、高純度化を目指している。

#### [実験例4]<sup>20)</sup>

造血ホルモン、エリスロポエチン(EPO)<sup>21)</sup>は標的細胞表面に存在するEPO受容体(EPO-R)<sup>22)</sup>と結合することにより、その分化増殖活性を発現する。このようなホルモン・ホルモン受容体は存在量が少ない為、精製が極めて困難であることが多い。モノクローナル抗体は未精製抗原でも特異的な抗体が得られることから、まずヒト尿から部分精製したEPOを用いて抗EPOモノクローナル抗体を取り、これを樹脂に固定した抗体カラムを用いてヒトEPOが精製された。更にヒトとラットEPOの類似性を利用して抗ヒトEPOカラムからラットEPOが精製され、遺伝子配列が決定された<sup>23)</sup>。このようにモノクローナル抗体は精製が困難な抗原のアフィニティー精製用リガンドとして用いられる。カラムからの溶出は低pH(pH3以下)が一般的であったが、失活が問題となるため最近では高MgCl<sub>2</sub>溶出等も考案されている。

更に、認識部位の異なる2つのモノクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法の開発(図12)により最高2pg(6×10<sup>-17</sup>mol)のEPOを定量することが可能となっている。ただし、免疫学的定量法では活性のない抗原分子もあわせて定量している可能性があることに留意する必要がある。

現在我々は、EPOに対してとられたストラテジーをEPO-R研究に導入すべく、抗EPO-Rモノクロー

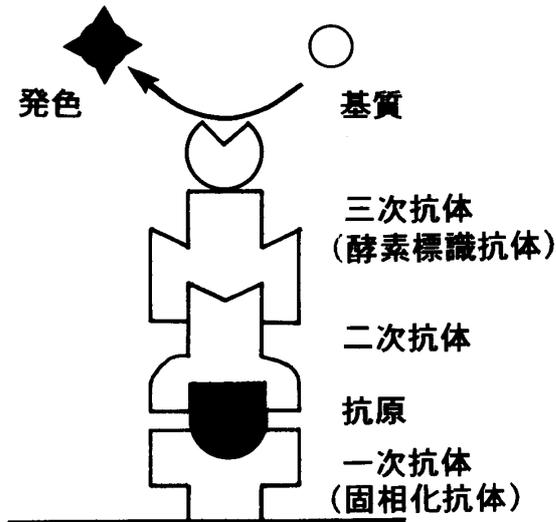


図12 サンドイッチ ELISA の模式図

抗原をはさんでいる一次抗体（固相化抗体）と二次抗体の動物種が異なる場合、二次抗体のみを認識する市販の標識抗体を三次抗体として利用することができる。しかし、一次抗体（固相化抗体）と二次抗体が同じ動物種から得られたものの場合、二次抗体自身を酵素標識して用いる必要がある。

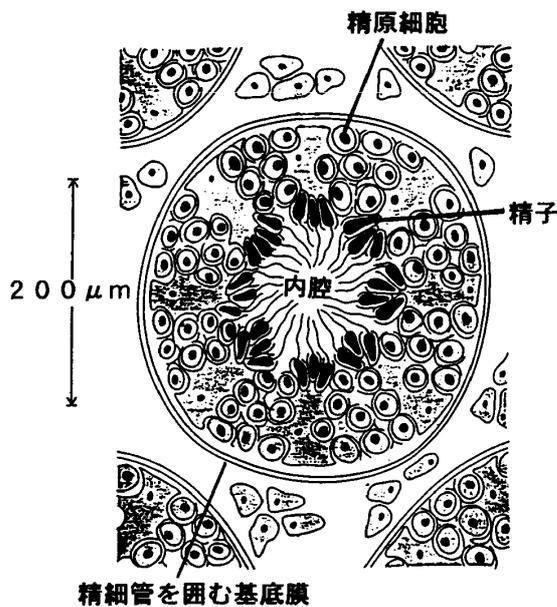
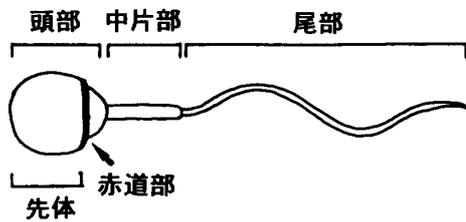


図13 精子・精細管の模式図

ナル抗体を作製中である。この場合、本来 EPO-R を発現していないマウス由来細胞に、ヒト EPO-R 遺伝子を取り込ませヒト EPO-R を増幅して発現するようにした細胞を抗原として用いている。つまりマウスにとって非自己はヒト EPO-R のみである。

[実験例5]

特異性の高い抗体を効率よく得るためにはできる限り抗原の純度が高い方が良いことは先に述べた。しかし、分離した抗原を故意に混合して用いた場合もある。アラビノガラクトタンプロテイン (AGP) は、アラビノース、ガラクトースから成る糖鎖をもつ植物性蛋白質であり、キャベツには、A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub> の2種類の AGP が存在している<sup>24)</sup>。我々は部分精製により分画された A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub> を1:1に混合したものを抗原として免疫、細胞融合を行い、A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub> 単独でスクリーニングすることにより各々に特異的な抗体を得た。これにより、時間、操作の大幅な短縮が可能であった。

結果として AGP に対して17種類のモノクローナル抗体が取れたが、このうち4つが通常の免疫方法では得られる確率の低い IgE であった。これらは異なるマウス由来であることから、兄弟クローンの産物ではない。IgE はアレルギーと関連している抗体であり、AGP が IgE 誘導能が高いことが事実であれば興味深い知見である。

2. 複合抗原

これまでは興味の対象である既知の抗原に対するモノクローナル抗体を取った例を示した。しかし、モノクローナル抗体を取得することによって未知の興味ある抗原を検索することも可能である。いわばショットガン方式である。例えばある機能を持った細胞を抗原とした場合、その細胞表面に存在している多数の抗原に対するモノクローナル抗体が取れてくる。このうち抗原として用いた細胞の機能に影響を与える抗体が取れば、その抗体が認識する抗原は細胞の機能に関係している可能性がある。また細胞の表面抗原に対するモノクローナル抗体は、リンパ球の分類やガン細胞の検出に利用されている。

[実験例6]<sup>25)</sup>

生殖細胞の分化・成熟過程あるいは受精に関与する蛋白質の検索を目的として、ウシ、ラットの精子あるいは精巣細胞を抗原としてモノクローナル抗体を作製した。図13に示したように、精子形成の過程は精巣の精細管外側（基底膜側）から内側（内腔側）に向かって進行するため、分化の進んだ精子は精細

管の内側に見られる。精子は独特の形態をとっており、先体は受精時の卵への侵入、赤道部は卵への特異的接着、尾部は運動といったように各部位はそれぞれ独自の機能を持っている。

現在、我々はこれら精子の部位特異的に結合する抗体、あるいは動物の種を越えて精子特異的に反応する抗体を得ている。一方、我々が得た抗体の中には、分化段階の初期のみ、あるいは後期の細胞のみを認識する抗体が含まれていた<sup>26)</sup>。これらの抗体が認識している抗原分子の同定が今後の課題である。

このほか、超遠心分離法により調製された神経細胞と神経細胞の接合部位に対する抗体も作製中である。細胞あるいは細胞の膜画分が抗原の場合、蛋白質だけでなく糖脂質に対する抗体も含まれている可能性が高いため、薄層クロマトグラフィーに免疫学的な検出を応用させた TLC イムノステイニングの条件検討を行っている。

### 3. ハプテン抗原

ハプテン抗原に対する抗体の作製は、主にその化合物の免疫学的定量法の確立を目的として行われる。特に最近では、遺伝子操作により塩基配列から予測されたアミノ酸配列を元に合成されたペプチド

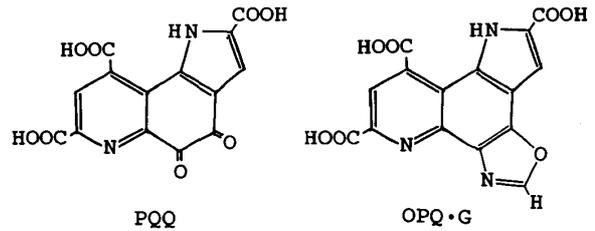


図14 PQQ, OPQ・G の構造

に対してモノクローナル抗体を作製し、目的とする蛋白質の存在様式や機能を明らかにしていく手法が用いられるようになってきている。

[実験例7]<sup>27)</sup>

ピロロキノリンキノン (PQQ) は、新しいタイプの補酵素あるいはビタミンとして注目されている分子量330のアミノ酸誘導体である<sup>28)</sup>(図14)。PQQの微量定量法の確立、PQQを共有結合的に含んでいる蛋白質(キノプロテイン)の検索を目的として、PQQに対するモノクローナル抗体を作製した。まずカルボジイミドを用いてPQQをヘモシアニンに結合させ、これを抗原としてマウスを免疫した。スクリーニングにはPQQをBSAに結合させたものを用い、キャリアーに対する抗体を除外した。最終

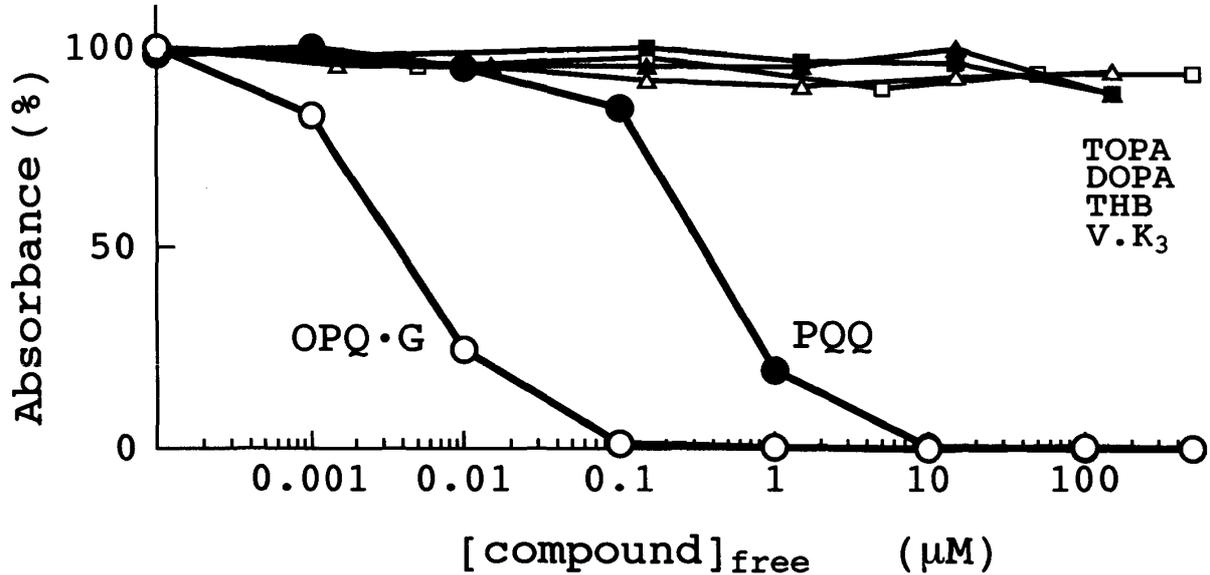


図15 競合 ELISA による PQQ, OPQ・G の定量

BSAに結合させたPQQを固相抗原とし、図8に示したようにELISAを行った。ただし、一次抗体との反応時に各々の化合物を共存させ、固相PQQとの競合の濃度依存性を調べた。

- PQQ:ピロロキノリンキノン
- OPQ・G:ピロロキノリンキノンのグリシン付加体
- TOPA:トリヒドロキシフェニルアラニン
- DOPA:ジヒドロキシフェニルアラニン
- THB:トリヒドロキシベンゼン
- V.K<sub>3</sub>: ビタミン K<sub>3</sub>

的に5つの抗体が得られ、そのうちの2つ（2番、9番）がIgG、残りの3つはIgMであった。

低分子に対して同時に複数の抗体が結合することは困難であるため、サンドイッチ ELISA 法は不可能である。そこで、低分子の定量には競合 ELISA 法が用いられる。競合 ELISA 法は、通常の ELISA の一次抗体反応時に遊離の抗原低分子化合物を共存させ、固相抗原と遊離抗原の間で一次抗体への結合を競合させる方法である。IgM は価数が多いためか阻害がかからないことが多く、この場合にも阻害がかかったのは IgG である 2 番と 9 番であった。図15に 2 番の抗体を用いた場合の競合 ELISA の結果を示す。遊離抗原の濃度の増加に伴って阻害が強くなっている。発色を50%阻害する遊離抗原の濃度は IC<sub>50</sub> と呼ばれ、この値が低いほど、親和性の高い抗体であることを示す。この曲線を検量線として用いることにより、20 nM~20 μM の範囲で PQQ の定量が可能である。

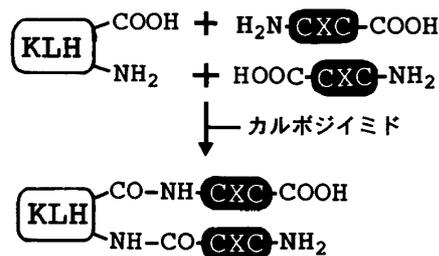
また、反応性の高い化合物の場合、キャリアーへの結合の際に化学的変化を起こしてしまうことがある。蛋白性抗原の場合でも ELISA プレートへの固相化により吸着変性が起きることがある。したがって抗体の特異性を論ずる場合には競合 ELISA 法において本来の構造をもった遊離抗原で阻害がかかることが非常に重要である。逆に言えば、類似体には反応しないことも重要である。図15にも示したように、2 番は、TOPA, DOPA, THB, VK<sub>3</sub> などの構造類似体には反応しなかった。ただし、2 番の抗体は PQQ にグリシンが結合した化合物（グリシン付加体：OPQ・G）に対して PQQ より100倍近く親和性が高いことが明らかとなった。我々はこの性質を利用して、PQQ を 10 mM グリシン緩衝液 pH 9.9 で 50°C 4 時間前処理してグリシン化し、IC<sub>50</sub> を 250 nM から 3 nM に下げ、定量の高感度化に成功した<sup>29)</sup>。この方法は現在報告されている PQQ の定量法の中で最も高感度でありかつ特異性においても優れた方法である。

さらに、これらの抗体はこれまでキノプロテインと考えられていたモノアミノキシダーゼ、アミンデヒドロゲナーゼとは反応しなかった。したがって、これらの酵素の補欠分子が PQQ ではないか、あるいは抗体が認識できないような形で PQQ が結合しているものと考えられる<sup>30)</sup>。

[実験例 8]<sup>31)</sup>

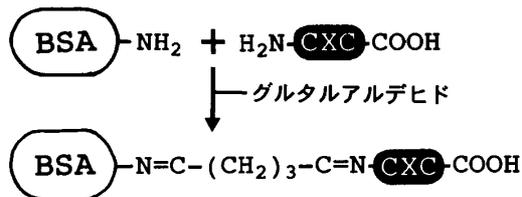
カゾキシニン C (CXC) は牛乳 κ カゼインのトリプシン分解物から単離された YIPIQYVLSR なるアミ

1) 免疫



2) スクリーニング

a : C末端法



b : N末端法

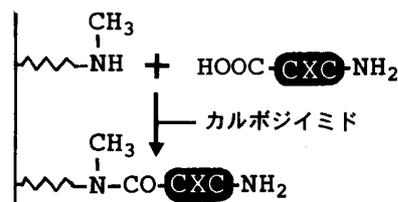


図16 N末端C末端認識抗体作製のためのストラテジー

ノ酸配列を持ったデカペプチドであり、抗オピオイド活性（神経伝達調節作用）、平滑筋収縮作用、アンジオテンシン転換酵素阻害活性（血圧調節作用）をもつ食品由来の多機能性生理活性ペプチドである<sup>32)</sup>。図16に示したように CXC をカルボジイミドを用いてヘモシアニンに結合させ、これを抗原として免疫を行った。ただし、スクリーニングは BSA にグルタルアルデヒドで結合させた CXC を固相抗原とした ELISA 法（C末端法）と 2 級アミンをもったポリスチレンのプレート固相に直接カルボジイミドを用いて結合させた ELISA 法（N末端法）の 2 種類で行った。このようなスクリーニングを行うことによって、CXC をその C 末端側から認識する抗体と N 末端側から認識する抗体を分別することができるのではないかと考えたのである。事実 C 末端法で選ばれた 7 番の抗体は C 末端アルギニンを除去した CXC に対して結合能が低下し、N 末端法で選ばれた 2 番と 8 番の抗体は N 末端側のチロシン、イソロイシンの 2 残基を除去した CXC には結合しなかった。

さらに、2, 7, 8 番の抗体を抗原にしてポリクローナル抗体を作製したところ、7 番の抗体に対す

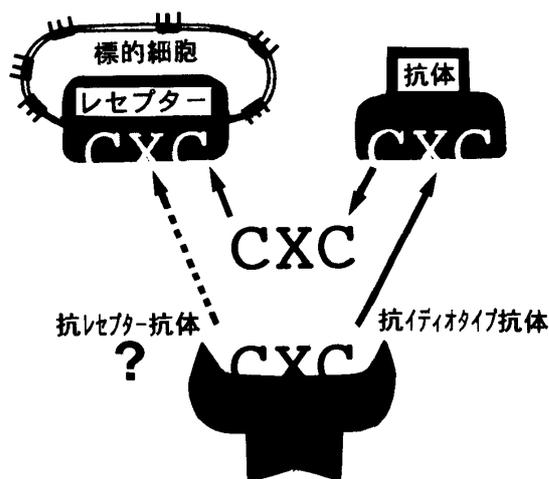


図17 イディオタイプックルートによるCXC受容体に対する抗体の作製

る抗体だけがCXCの持つ平滑筋収縮活性を阻害した。このことは、「あるリガンド(結合子)に対する抗体の結合部位とそのリガンドの生理的受容体の結合部位の高次構造が類似する場合には、その抗体に対する抗体が受容体に対して親和性を持つ」ことを利用してレセプター抗体を調製した例である(図17)。この系は、イディオタイプックルートによる抗レセプター抗体の作製と呼ばれる。CXCの平滑筋収縮活性にはC末端アルギニンが必須であることと7番だけがこのアルギニンを認識していることと良く一致している。

以上、当研究室で実際に行っている研究例を列挙したが、このほかにもモノクローナル抗体を利用した興味深い例がある。例えば、ガン細胞特異的モノクローナル抗体に制がん剤を結合させ、正常細胞にダメージを与えずに制がん剤を局所的に投与するミサイル療法が臨床応用され始めている。また炭酸エステルの加水分解の遷移状態アナログに対して作製したモノクローナル抗体が、元のエステルの分解活性を示すことが報告されている<sup>32)</sup>。これはCatalytic Antibody またはアブザイムと呼ばれ、人工酵素の先駆けとして期待されている。このようにモノクローナル抗体の応用例を挙げれば枚挙に暇がなく、今後この技術はさらに基礎・応用研究の発展に大きく貢献して行くものと思われる。

## V. おわりに

10<sup>8</sup>個の脾臓細胞から、最終的に数クローンのモノクローナル抗体が得られるまで早くて3カ月、抗原によっては半年以上にわたる長い道程である。IV章で紹介した実験例は、共に実験に携わった11

名の卒業生と5名の現卒研究生たちが、1年という限られた期間の中で苦勞し積み上げてきた成果である。今後これらの研究をまとめあげると共に、更に発展させて行くことを約束し、彼女達の努力に対する感謝の意と、紙面の都合上すべてのテーマを取り上げられなかったことに対するお詫びの言葉としたい。

最後になりましたが、本研究を遂行するにあたり多大なるご助言とご協力をいただいた大井龍夫先生を初めとする本学家政学部食物学科の諸先生方、並びに佐々木隆造先生をはじめとする京都大学農学部食品工学科食品化学研究室の皆様へ感謝の意を表します。また貴重な試料を抗原として提供していただき、試料に関する多くの情報を与えていただいた共同研究者の方々のご厚意に感謝致します。

## 文 献

- 1) G. Köhler and C. Milstein: *Nature*, **265**, 495-497 (1975)
- 2) E. Harlow and D. Lane: *Antibodies*, Cold Spring Harbor Lab. (1988)
- 3) 富山朔二, 安藤民衛 編: 単クローン抗体実験マニュアル, 講談社サイエンティフィック (1987)
- 4) 谷口 克 編: モノクローナル抗体, 実験医学, **6** (10), (1988)
- 5) 安藤民衛, 千葉 丈: 単クローン抗体実験操作入門, 講談社サイエンティフィック (1991)
- 6) J. D. Watson *et al* Eds.: *Molecular Biology of The Cell* (2nd Ed.), (1989)
- 7) 小山次郎, 大沢利昭: 免疫学の基礎, 東京化学同人 (1989)
- 8) 山村雄一, R. A. Good, 石坂公成 編: 岩波講座, 免疫科学 **1**~**10** (1983~1986)
- 9) F. M. Burnet: *Aust. J. Sci.*, **20**, 67-69 (1957)
- 10) R. Parekh: *Technical Bulletin of Oxford GlycoSystems*, **TB. 9** (1991)
- 11) 黒木登志夫, 瀬野悍二, 西村 暹 編: 新生化学実験講座(日本生化学会編) vol. **18** 東京化学同人 (1990)
- 12) P. Tijssen 著, 石川栄治 監訳: エンザイムイムノアッセイ, 東京化学同人 (1989)
- 13) 口野嘉幸, 平井久丸, 櫻林郁之介 編: 実験操作プロット法, ソフトサイエンス社 (1990)
- 14) 成田宏史, 木戸詔子, 土居幸雄: 食に関する助成研究調査報告書, (財)すかいらーくフード

- サイエンス研究所 (1991)
- 15) 木戸詔子, 成田宏史, 土居幸雄, 謝名堂昌信, 大井龍夫: 生化学, **63** (8), 956 (1992)
  - 16) E. Morishita, T. Ohkubo, S. Kido, Y. Doi, H. Narita and T. Ooi: submitted
  - 17) K. Ikura, F. Higashiguchi, N. Kitabatake, E. Doi, H. Narita, and R. Sasaki: *J. Food Sci.*, **57** (3), 635-639 (1992)
  - 18) 後藤祐児, 高木俊夫: 蛋白質 核酸 酵素, **37** (4), 772-780 (1992)
  - 19) 松本晋也, 伊倉宏司, 毎田道子, 成田宏史, 平輪美奈子, 佐々木隆造: 日本農芸化学会誌, **66** (03), 480 (1992)
  - 20) 佐々木隆造, 上田正次: 新生化学実験講座 (日本生化学会編) vol. 7, pp. 74-85, 東京化学同人 (1991)
  - 21) 佐々木隆造, 上田正次: 蛋白質 核酸 酵素, **33** (13), 2345-2356 (1988)
  - 22) 増田誠司, 佐々木隆造: 生化学, **63** (1), 28-32 (1991)
  - 23) M. Nagao, H. Suga, M. Okano, S. Masuda, H. Narita, K. Ikura and R. Sasaki: *Biochim. Biophys. Acta*, in press
  - 24) H. Yasufuku, J. Azuma, S. Kido and T. Koshijima: *Agric. Biol. Chem.* **49** (12), 3429-3435 (1985)
  - 25) 成田宏史, 伊倉宏司, 佐々木隆造, 三宅正史, 内海恭三, 入谷 明: 生化学, **62** (7), 586 (1990)
  - 26) H. Narita, K. Ikura, R. Sasaki: Abstract of The Third Annual Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology, 68 (1990)
  - 27) 成田宏史, 森下恵美: バイオサイエンスとインダストリー, 印刷中
  - 28) 松下信一, 足立収生: 生化学, **63** (3), 218-221 (1991)
  - 29) 成田宏史, 浦上貞治: 特許申請中
  - 30) E. Morishita, H. Narita: submitted
  - 31) 成田宏史, 中万貴子, 塩田 明, 吉川正明: 日本農芸化学会誌, **65** (03), 520 (1991)
  - 32) H. Chiba, F. Tani and M. Yoshikawa: *J. Dairy Res.*, **56**, 363-366 (1989)
  - 33) S. S. Pollack, S. W. Jacobs and P. G. Schultz: *Science*. **234**, 1570 (1986)