

テクニカルノート

細胞融合法によるモノクローナル抗体作製法

福本哲夫, 王 玉雪, 橋本紀子, 徳田信子, 沢田知夫

山口大学医学部 解剖学第一講座 宇部市小串1144 (〒755-8505)

Key words : モノクローナル抗体, 細胞融合, クローニング, 骨髓腫, 脾細胞

はじめに

細胞融合法によるモノクローナル抗体作製法は1975年にKöhler と Milsteinが発表した方法である。モノクローナル抗体作製の手技が確立されるに及んで従来の抗血清の持つ欠点が解消された。モノクローナル抗体産生細胞(抗体を作るBリンパ球と骨髓腫の細胞の融合細胞)を培養するだけで同じ特性をもつ抗体を無限に得ることが可能で, 融合細胞を凍結保存して, 必要に応じ同じ抗体を入手することもできる。このような意味においてモノクローナル抗体は一般試薬と等しい扱いを受けるようになったといえる。

原 理

無限には増殖できない特定の抗原反応性の抗体産生B細胞と, 増殖性を持つが免疫グロブリンの産生や分泌がない変異株骨髓腫細胞(ミエローマ細胞)をpolyethylene glycol (PEG)を用いて細胞融合させ, 特定抗原に反応する抗体を無限に作り出す方法である。また, 融合細胞と非融合細胞が混在した状態では目的とする抗体産生をする融合細胞

(hybridoma)の増殖に不都合であることから, hypoxanthine, aminoneterin, thymidineを混ぜた培養液(HAT培地)が用いられるように改良された。つまり, 用いられる8-azaguanine resistantの骨髓腫株では, hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT)が欠損しており, HAT培地では生育しないが, 正常な抗体産生細胞からHGPRTを得た融合細胞は増殖可能である。従ってHATを含む培地においては効率よく融合細胞だけを増殖させることができる。次に, 融合細胞の中から目的抗原に対する抗体産生細胞のみを選択し(screening), 更にその細胞株(クローン)だけを増殖させるためにクローニングを行う。このようにして得られた株は必要に応じて凍結する。あるいは, プリステンで誘導をかけたマウスの腹腔内に融合細胞株を注射し, 腹水型の抗体産生細胞を増殖させることにより, 培養上清に較べてはるかに力価の高いモノクローナル抗体を腹水中に作製することが可能である。

材 料

CO₂インキュベーター, クリーンベンチ, 液体チッソタンク, RPMI 1640, FCS, HEPES, PEG (Merk 4000など), ミエローマ細胞(通常NS-1など), HAT培地, BALB/c マウス。

方 法

①抗原感作

マウスを用いた場合を例として挙げる (図1).
 →目的抗原A溶液とadjuvant(Freund complete adjuvant) 溶液を等量混ぜ、連結管を用いてエマルジョンを作る.
 →BALB/c マウスの腹部を剃毛後上記混合液を皮下に4ヶ所位注射し、マウスを抗原Aで感作する.
 →2週後に再度感作する.

→2週後にマウスより採血し、抗原Aに対する血清抗体価 (反応性) を調べる.

→抗体価が十分に高ければ抗原Aのみを皮下または腹腔内に注射する.

→3日後に感作マウスの脾臓を摘出し脾細胞を得る.

②細胞融合

→脾臓細胞をRPMI 1640培地に浮遊させる.

→あらかじめ培養したNS-I細胞 (マウス骨髄腫細胞) の細胞数を調整.

→感作脾細胞 (10^6) と骨髄腫の細胞 (10^7) を混合.

図1
細胞融合の方法

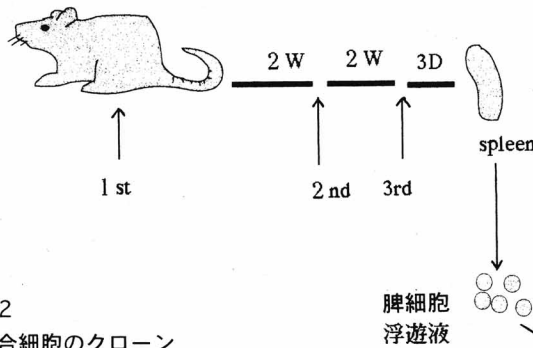


図2
融合細胞のクローン

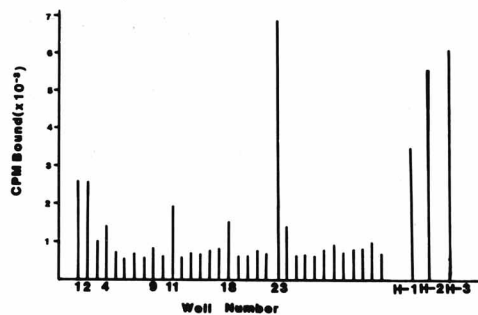
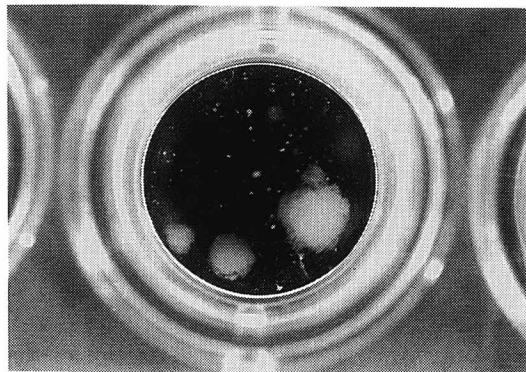
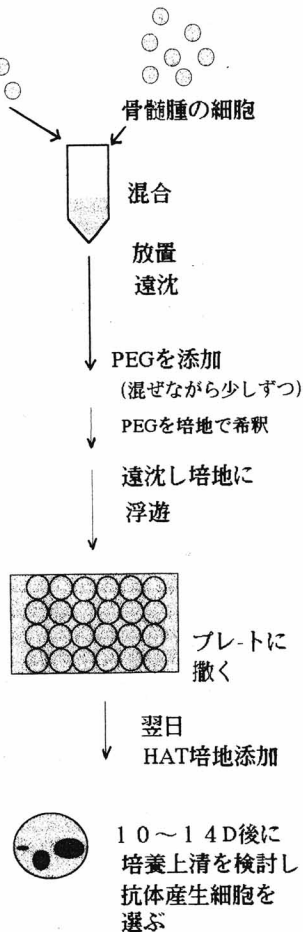


図3
抗体産生融合細胞のスクリーニング

ラディオイムノアッセイ (RIA) を用いた抗体価の検討
 23番目のウェルに抗体を強く産生している細胞があることを示す。H-1, H-2, H-3: positive control



→5分放置後遠沈

→よくほぐした後, ゆっくり攪拌しつつ1~1.5mlの50%PEGを少しずつ加える(約1分間).

→10%HEPESを含むRPMI1640を10ml用意し, まず1mlとって1分かけて前述の細胞に滴下し, PEGを希釈する(2回繰り返す). その後残りの8mlを2~3分かけて同様に加える.

→遠沈後ほぐし, 脾細胞 5×10^7 あたり25mlの培地に浮遊させた後24穴培養ウェルに1mlずつ撒く.

③HAT選択

→翌日1mlのHAT培地を各ウェルに添加する.

④スクリーニング

10~14日位で各ウェルに融合細胞の増殖したコロニーが見出される(図2)のでウェルの上清を少量とりその抗体活性を確認(図3).

⑤クローニング

融合細胞を各種濃度に希釈し, あらかじめfeeder cells(胸腺細胞)を撒いた96穴プレートに撒き培養. 1個のウェルの中に1個の細胞株(コロニー)が生え, その細胞が抗体産生細胞であるようになるまでクローニングを繰り返す.

⑥抗体産生細胞株を増殖させ, 一部は液体チッソタンクに保存する.

モノクローナル抗体の作製方法などを記述したものは今では多くあるので詳しくは他書を参照されたい²⁾.

有用性と考察

モノクローナル抗体の応用範囲は多岐にわたる.

- ①自然界の各種免疫原が使用できる³⁻⁵⁾.
- ②ペプチドの各エピトープに対しても作製可能であるので, 分子構造の決定に有用である³⁾.
- ③アフィニティークロマトグラフィーとの併用で, 複合体より単独のタンパク質の同定, 純化が可能となる⁶⁾.
- ④マウス以外にも, ラットやヒトのhybridomaも用いられる.
- ⑤ホルモンや生理活性ペプチドの血中濃度の測定など, 実験用や診断用としても応用できる⁷⁻⁸⁾.
- ⑥生体への投与で特定物質の特定機能を阻止でき, 医学的治療に役立つ.
- ⑦癌細胞に対するモノクローナル抗体IgGに毒素を

結合させると癌細胞を特異的に殺すことができる(癌のミサイル療法).

参考文献

- 1) Köhler G and Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975; **256**: 495-497.
- 2) 安東民衛, 千葉 大: 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.
- 3) Sugiyama H, Yamashita A and Fukumoto T: Characterization of monoclonal antibodies against acetylcholine receptors from *Narke japonica*. *J. Biochem.* 1984; **96**: 1217-1221.
- 4) Okita K., et al. An antigen specific to hyperplastic liver nodules defined with monoclonal antibody: A new marker for preneoplastic cells in rat chemical hepatocarcinogenesis. *Tumor Biol.* 1988; **9**: 170-177.
- 5) Li. X., et al. Recognition of a special membrane antigen of squamous cell carcinoma in rats with a monoclonal antibody UB23. *Tumor Biol.* 1997; **18**: 350-355.
- 6) Fukumoto T., et al. Purification and characterization of MHC Class I antigen from rat liver with monoclonal antibody. *Int. J. Biochem.* 1986; **18**: 971-977.
- 7) Maeda R., et al. Production of monoclonal antibodies against placenta-type alkaline phosphatase. *Agric. Biol. Chem.* 1985; **49**: 2233-2235.
- 8) 福本哲夫, 藤倉 義久, 国木弘道: 細胞融合法によるモノクローナル抗体作製とその応用 山口県医学会誌, 1988; **22**: 5-11.