

実験技術

抗原による B 細胞選択を用いた 高効率モノクローナル抗体作製法

三重大学工学部生物機能工学 富田昌弘
ミネソタ大学生物化学 Tian Yow Tsong

1975年に初めて Köhler と Milstein¹⁾によってその基本原理が報告されたモノクローナル抗体 (monoclonal antibody) 作製法は、現在、世界中の多くの科学者によって利用されている。モノクローナル抗体とは、抗原 (antigen) がもついくつかのエピトープ (抗原決定基) の中である特定のひとつのエピトープのみを認識する抗体を意味し、極めて特異性が高い。分子量が約 20,000 のタンパク質の場合、通常 4~5 個の異なるエピトープをもっていると考えられている。現在、モノクローナル抗体は、臨床診断、疾病治療、生体の機能解明等で広く利用されている。将来、その利用価値が益々高まることは間違いないと考えられる。

ところが、現在用いられているモノクローナル抗体作製法には大きな問題点がある。それは、ポリエチレングリコール等を用いた融合法に起因する^{1), 2)}。モノクローナル抗体を得るためには、脾臓 (spleen) に存在する目的の抗原特異的抗体産生細胞である B 細胞 (B cell) とミエローマ細胞 (myeloma cell = 骨髄腫細胞) とを生体外で融合させる必要がある。このようにして得られる融合細胞はハイブリドーマ細胞と呼ばれ、目的のモノクローナル抗体を永久に産生する夢の細胞となる。ところが、現在のポリエチレングリコールを用いた融合法は、非特異的な細胞間の融合をもたらし、目的の B 細胞とミエローマ細胞以外の融合をも引き起こす。そのため、抗原特異的なモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞を得るのに、多大な時間と労

力を要する。

そこで、本稿において、今までの方法とは異なり、抗原による B 細胞選択および電氣的融合法 (pulsed electric field 法 = PEF 法)^{3)~6)}を用いた高効率モノクローナル抗体作製法について紹介する。

PEG 法 (ポリエチレングリコール法) と PEF 法 (電氣的融合法) の比較

PEF 法 (電氣的融合法) の特徴は、①抗原を用いてその抗原特異的抗体産生 B 細胞を選択する。②アビジン (avidin, タンパク質の一種) とビオチン (biotin, ビタミン H) 間の強い親和力を利用して、抗原によって選択された B 細胞とミエローマ細胞間に架橋を形成させる。③架橋された B 細胞とミエローマ細胞を電気パルスにより選択的に融合させ、目的の抗原に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞を作製する点である。この方法によって得られるハイブリドーマ細胞を 1 個ずつ別々に増殖させれば、目的抗原の各エピトープに対するすべてのモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞を、一時に得ることができる訳である。つまり、理論的には、融合後、目的のハイブリドーマ細胞の選択をする必要がないことになる。一方、従来のポリエチレングリコール法 (polyethylene glycol 法 = PEG 法) においては、融合後、HAT 選択 (H = ヒポキサンチン, A = アミノプテリン, T = チミジン)、酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay 法 = ELISA 法) および限界希釈法 (limiting dilution 法) によるハイブリドーマ細胞の選別が必要になる。この操作に最低でも 1.5~2 ヶ月の時間を費やさなければならない。実験操作に必要な時間の対比も含め、従来の PEG 法とここで紹介する PEF 法の比較を Scheme 1 に示す。さらに、新規法 PEF 法の利点として、細胞毒性のあるポリエチレングリコールを用いない点も忘れてはならない。

PEF 法

1. Method I (図 1)⁷⁾

まず、1984年に Lo ら⁷⁾によって初めて報告された PEF 法について述べる。彼らの方法の特徴は、B 細胞選択のための抗原-アビジン複合体の作製をカラムを用いて行っている点にある。図 1a に示されるように、pH = 4 にて抗原-アビジン複合体をカラムより溶出させ、B 細胞選択を行っている。B 細胞は、抗原特異的抗体を産生するのみならず、その細胞表面に目印となる抗体分子をもっているため、目的の抗原と特異的に結合できる。次のステップとして、ミエローマ細胞に

Development in New Methodology on Selective Production of Hybridoma Cells by Antigen-Preselected B Lymphocytes

Masahiro TOMITA

Laboratory of Biological and Functional Chemistry, Department of Chemistry for Materials, Faculty of Engineering, Mie University

Tian yow TSONG

Department of Biochemistry, University of Minnesota, College of Biological Sciences, U. S. A.

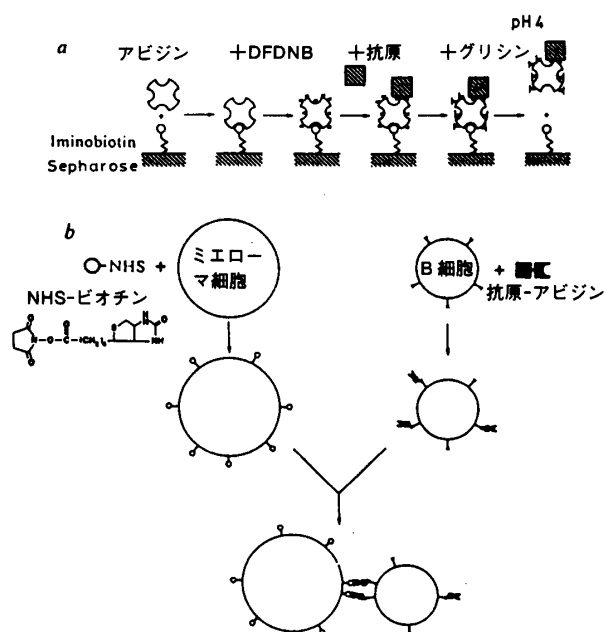


図1. PEF法 (Method I) による目的のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞の作製法⁷⁾
 DFDNB: 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene
 NHS: N-hydroxysuccinimide (M. M. S. Lo et al. *Nature (London)* 310, 792 (1984) より改写)

ビオチンを付加する。この目的は、抗原によって選択されたB細胞とミエローマ細胞をアビジンとビオチンの親和力を利用して結びつけ、B細胞-抗原-アビジン-ビオチン-ミエローマ細胞複合体を形成させるため

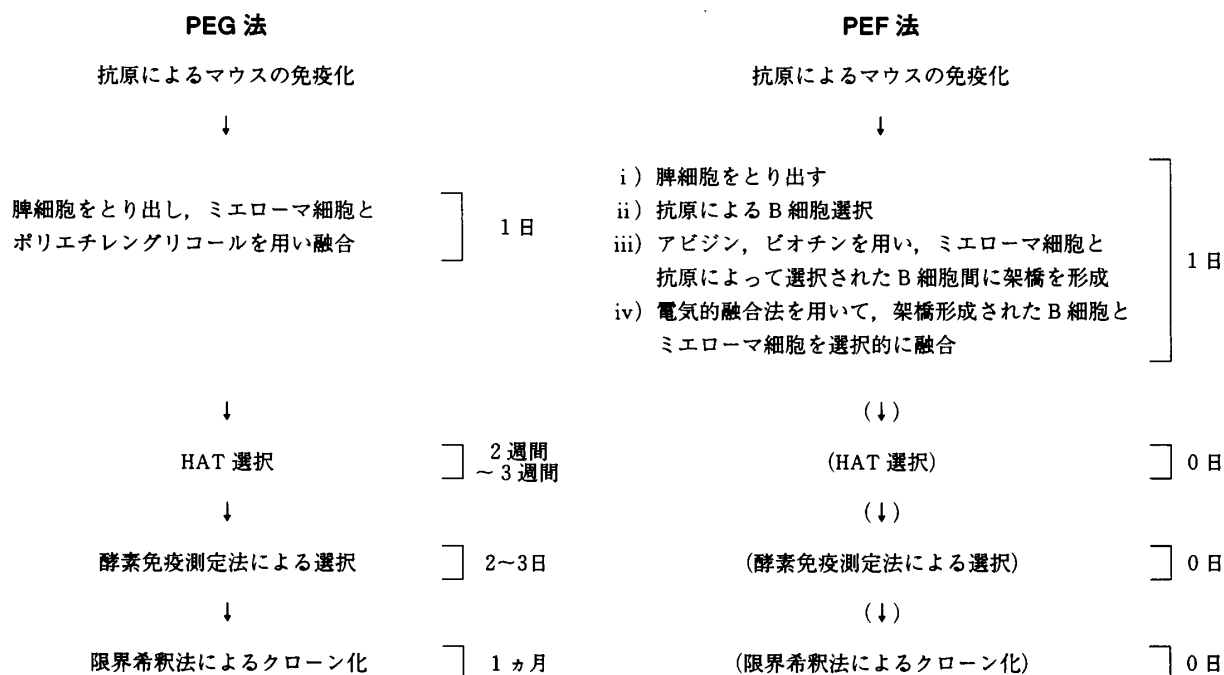
である。ここで、NHS基の役割であるが、生理的条件下 (pH=7~8) でアミノ酸の1つであるリシン (Lys) 残基を特異的に修飾する。最終的に、細胞間の非特異的接触を避けるため約 1×10^6 cells/ml の細胞濃度で、選択的に上記のB細胞-ミエローマ細胞複合体を電気融合する。融合後、重要なことは、直ちに融合細胞を“回復培地”中で⁸⁾、37°C、30分間の処理を行うことである。このねらいは、電気融合によって生じた細胞の損傷を最小限に食い止めるところにある^{5), 6), 8)-10)}。この処理をしないと融合細胞は、どんどん膨潤し、最終的には破裂する可能性がある。Loらの方法は、従来のPEG法と比べ、その理論、融合効率において群を抜いていた。ところが、彼らの方法には重大な問題があった。それは、カラムから溶出されてくる抗原-アビジン複合体の回収の再現性が非常に悪い点である。筆者らは、Loらの方法の基本線を守り、しかも、溶液中で行える方法の開発を試みた。

2. Method II (図2)^{11), 12)}

筆者らによるこの改良法の特徴は、複雑なカラム操作を用いず直接抗原にビオチンを付加する点にある。

もう1つの特徴は、アビジンのかわりにストレプトアビジン (streptavidin) を用いる点である。従来用いられてきたアビジンでは等電点が塩基性 (pI=10) にあり、中性溶液中では正に帯電しているため、通常負に帯電している細胞にも非特異的に結合してしまう。ところが、ストレプトアビジンを用いると、等電点は、

Scheme 1 PEG法とPEF法の比較



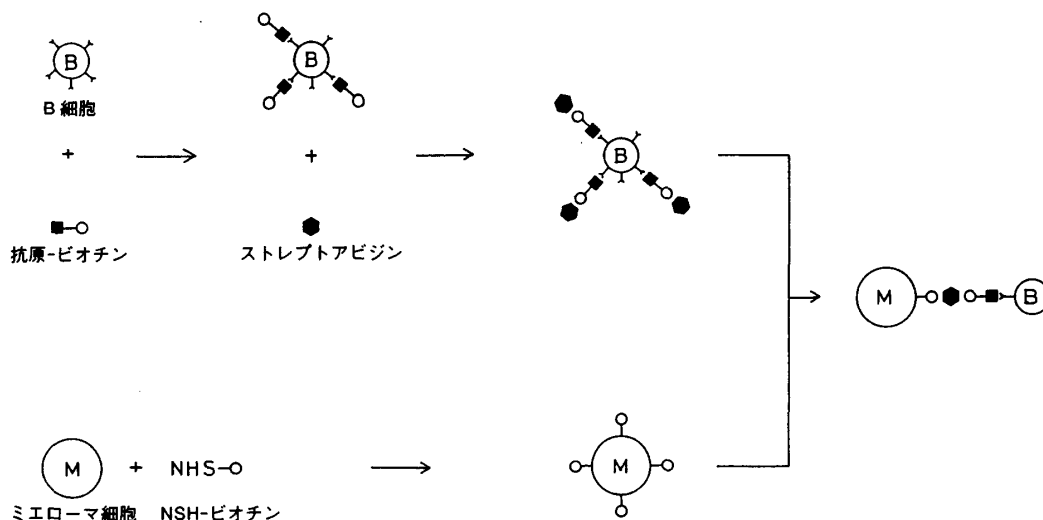


図2. PEF法 (Method II) による目的のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞の作製法^{11), 12)}

B: B細胞, M: ミエローマ細胞, NHS: N-hydroxysuccinimide [M. Tomita and T. Y. Tsong, *Biochim. Biophys. Acta* 1055, 199 (1990) より改写]

中性に存在するため、細胞への非特異的結合を防げる訳である。図2を簡単に説明すると、抗原-ビオチン複合体で目的のB細胞を選択し、ストレプトアビジンを加え、B細胞-抗原-ビオチン-ストレプトアビジン複合体を作製する。この時、注意することは、ストレプトアビジンをB細胞-抗原-ビオチン複合体に対して5-10倍のモル比で加えることである。それは、過剰のストレプトアビジンでビオチンを素早くブロックすることにより、副産物であるB細胞-抗原-ビオチン-ストレプトアビジン-ビオチン-抗原-B細胞 (B細胞-B細胞)

複合体の産生を防ぐためである。Method IIを用いると、従来のPEG法と比べ、ほぼ1桁高い効率で、目的の抗原に対する抗体産生ハイブリドーマ細胞が得られる¹¹⁾。確かにこの方法は、Loら⁷⁾の方法と比べカラムを使用しない点、抗原複体の回収率がよい点、また、操作が簡単な点で優れているが、まだ問題点がある。抗原にビオチンを付加する際、抗原のLys残基が修飾されるため抗原の溶解性を低下させるおそれがある。また、電荷をもつアミノ酸が抗原決定基に関与している可能性が示唆されているた

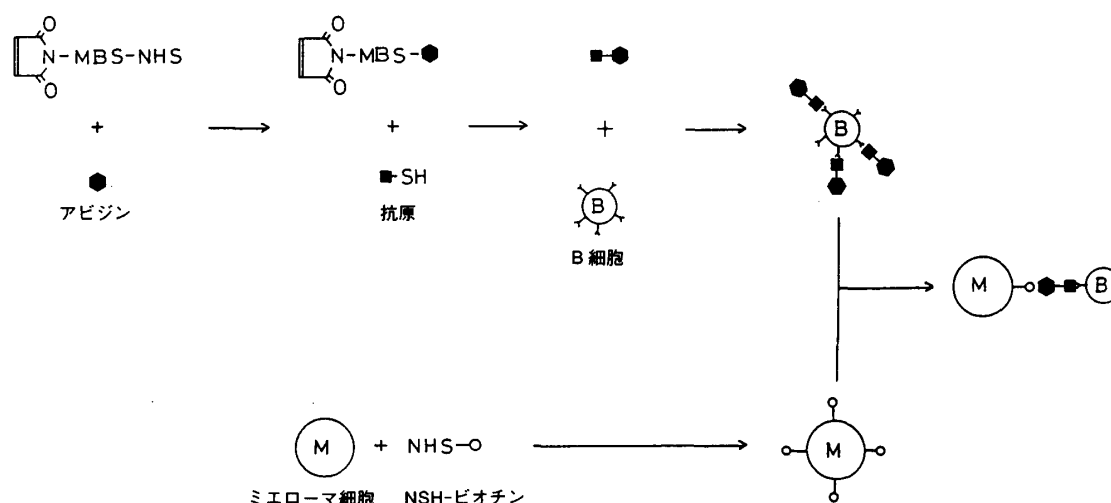


図3. PEF法 (Method III) による目的のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞の作製法^{11), 12)}

B: B細胞, M: ミエローマ細胞, NHS: N-hydroxysuccinimide, $\text{N}^{\text{C}}\text{-MBS-NHS}$ (=MBS): m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide, ■-SH : freeのCys残基をもつ抗原 [M. Tomita and T. Y. Tsong, *Biochim. Biophys. Acta* 1055, 199 (1990) より改写]

め^{13),14)}, 抗原性の低下も考えられる。さらに, ストレプトアビジンのモル比を増しても, B 細胞同士の架橋が形成される可能性も残されている。

Method III (図 3)^{11),12)}

そこで, 上記の欠点を是正するため, 筆者らは, Lys 残基とシステイン (Cys) 残基に対して各々, 別々に結合できる bifunctional cross-linker である MBS (m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide)¹⁵⁾, SPDP (N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate)¹⁶⁾ を用いる方法を開発した。MBS を例にとって説明すると, まず, 初めに, アビジン-MBS 複合体の作製を行う。幸運なことに MBS との結合に関与するのはアビジンの Lys 残基のみで, Cys 残基は関与しない。何故なら, アビジンの Cys 残基は, 分子内でジスルフィド結合を形成しているからである¹⁷⁾。さらに, 都合のよいことに, アビジンの Lys 残基が修飾されるため, 等電点が塩基性側より中性側にシフトし, 非特異的結合を避けることができる。

次のステップとして, アビジン-MBS 複合体と抗原の Cys 残基を反応させ, 抗原-MBS-アビジン複合体を形成させる。ここで 1 つ問題となるのが, 抗原が Cys 残基をもたない場合である。この時は, 抗原の Lys 残基とアビジンの Cys 残基 (ジスルフィド結合を還元剤で開裂させ, free の Cys 残基とする) を MBS と反応させるしかない。この際, 抗原の溶解性および抗原性の低下が懸念されるが, 実際には Method II とほぼ同じになり PEG 法に比べ, 必ず高い融合効率をもたらす。B 細胞-抗原-MBS-アビジン-ビオチン-ミエローマ細胞複合体の作製効率を蛍光ラベルで調べたところ, 10^{-2} (通常の 100~1000 倍の) と非常に高い値を示した¹¹⁾。

以上 PEF 法の Method I から Method III の特徴, 改良点を簡単に紹介したが, PEF 法を用いたモノクローナル抗体作製法は, 選択的かつ高効率膜融合を可能にするため, 免疫化の時間を短縮しても有効であると考えられる。この方法と Boss¹⁸⁾によって報告されている生体外免疫法を組み合わせれば, 非常に短時間で目的のモノクローナル抗体が作製できると思われる。また, PEF 法を用いたヒト細胞との膜融合も興味が

もたれる。この方法の益々の発展が期待される。

最後になりましたが, 執筆の機会を与えていただきました三重大学教育学部 田中晶善先生に深謝致します。

文 献

- 1) Köhler, G., Milstein, C. (1975) *Nature*, **256**, 495-497.
- 2) De St. Groth, S. F., Scheidegger, D. (1980) *J. Immunol. Meth.*, **35**, 1-21.
- 3) Zimmermann, U., Pilwat, G. (1978) *Sixth Int. Biophys. Congr.*, Kyoto, Abstr. **IV-19(H)**, pp. 140.
- 4) Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., Hofschneider, P. H. (1982) *EMBO J.*, **1**, 841-845.
- 5) Teissie, J., Knutson, V. P., Tsong, T. Y., Lane, M. D. (1982) *Science*, **216**, 537-538.
- 6) Tsong, T. Y. (1983) *Biosci. Rep.* **3**, 487-505.
- 7) Lo, M. M. S., Tsong, T. Y., Conrad, M. K., Strittmatter, S. M., Hester, L. D., Snyder, S. H. (1984) *Nature*, **310**, 792-794.
- 8) Tsong, T. Y., Tomita, M., Lo, M. M. S. (1988) *Molecular Mechanisms of Membrane Fusion* (Ohki, S., Doyle, D., Flanagan, T. D., Hui, S. W., Mayhew, E., eds.) pp. 223-236, Plenum, New York.
- 9) Kinoshita, K., Jr., Tsong, T. Y. (1977) *Nature*, **268**, 438-441.
- 10) Kinoshita, K., Jr., Tsong, T. Y. (1978) *Nature*, **272**, 258-260.
- 11) Tomita, M., Tsong, T. Y. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, **1055**, 199-206.
- 12) Tsong, T. Y., Tomita, M. (1993) *Methods Enzymol.* **220**, 238-246.
- 13) Hopp, T. P., Woods, K. R. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **78**, 3824-3828.
- 14) Geysen, H. M., Tainer, J. A., Rodda, S. J., Mason, T. J., Alexander, H., Getzoff, E. D., Lerner, R. A. (1987) *Science*, **235**, 1184-1190.
- 15) Kitagawa, T., Fujiwara, K., Tomonoh, S., Takahashi, K., Koida, M. (1983) *J. Biochem.*, **94**, 1165-1172.
- 16) Carlsson, J., Drevin, H., Axén, R. (1978) *Biochem. J.*, **173**, 723-737.
- 17) De Lange, R. J., Huang, T.-S. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 698-709.
- 18) Boss, B. D. (1986) *Methods Enzymol.* **121**, 27-33.