

抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞検出法の実用化に向けた試み

研究分担者 桑名 正隆 日本医科大学アレルギー膠原病内科 教授

研究要旨

特発性血小板減少性紫斑病（ITP）の診断には、いまだ血小板減少をきたす他疾患の除外に主眼を置いた基準が用いられている。平成16年度に本研究班がITPに感度または特異度の高い臨床検査を組み合わせた診断基準案を提唱したが、含まれる項目の多くが保険診療上測定できない。そこで、すでにキット化に成功している抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞測定法の体外診断薬としての承認申請を目指した検討を進めている。昨年度までに、陽性コントロールや標準化のために必須な校正用基準物質としてヒトGPIIb/IIIaに対するキメラ抗体産生細胞および陽性・陰性コントロールビーズの作成に成功した。そこで、本年度はキットとしての構成内容を確定するための製品仕様の改良、製造安定性の確保、ユーザビリティの向上に向けた取り組みを実施した。さらに、新たな校正用基準物質として患者で産生される自己抗体と同様にGPIIb/IIIaの高次構造を認識するキメラ抗体産生細胞株の樹立、キットに含める試薬のReady-to-use化を行い、保存性や安定性など詳細な最終条件設定を行うプレ臨床試験の実施に向けた準備が完了した。来年度は血小板減少症患者を対象とした本キットの有用性を検証する多施設臨床試験の実施を予定している。

A. 研究目的

我が国では1990年に厚生省研究班により作成された特発性血小板減少性紫斑病（ITP）の診断基準が現状も用いられている。この基準では、出血症状と血小板減少症があり骨髓検査で巨核球の減少や他系統に異型性がなく、血小板減少をきたしうる他疾患の除外が診断根拠となる。血小板減少をきたす全ての疾患を診療で除外することは現実的に不可能で、そのために数多くの検査を行うことは医療経済上好ましくない。そこで、平成16年度に本研究班で多施設前向き研究を実施し、ITPに感度、特異度の高い臨床検査を組み合わせて積極的にITPを診断する基準案を作成した。本基準は侵襲性の低い血液検査のみで迅速に結果が得られ、感度93%、特異度75%と良好な結果を示した。

しかしながら、項目に含まれる抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞、血小板関連抗GPIIb/IIIa抗体、網血小板比率、血漿トロンボポエチンは現状では保険診療で測定できない。抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞、網血小板比率、血漿トロンボポエチンは研究目的での受託測定が可能になったが、検査費用が発生することから一般診療で普及していない。これら問題点を解決するためには再現性・汎用性の高い臨床検査キットの作成およびその体外診断用医薬品としての承認が不可欠である。そこで、すでにキット化に成功している抗GPIIb/IIIa抗体産生B細胞（ITP-ELISPOT; MBL社）を診断用医薬品に求められる基本性能を満たし、世界標準規格であるISO13485に準拠するレベルまで質を高めることを目的とした検討

を進めてきた。体外診断用医薬品として申請するために必要な事項を医薬品医療機器総合機構による承認申請に係わる関連通知

(<http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/taigai.html>)に照らし合わせ、キット仕様の確定、校正用基準物質の設定、品質管理の確立、測定範囲の決定の4項目に絞り込んだ。昨年度までに陽性コントロールや標準化のために必須な校正用基準物質としてヒト GPIIb/IIIa に対するキメラ抗体産生細胞および陽性・陰性コントロールビーズの作成に成功している。本年度は、キットとしての構成内容を確定するための製品仕様の改良、製造安定性の確保、ユーザビリティの向上に向けた取り組みを実施し、品質管理法を確立した。

B. 研究方法

校正用基準物質として陽性および陰性の管理検体が必要であるため、ヒト GPIIb/IIIa に対するヒト型 IgG 抗体産生細胞および対照として GPIIb/IIIa 以外と反応するヒト型 IgG 抗体産生細胞を作成した。ITP 患者における自己抗体と同様に GPIIb/IIIa の高次構造を認識するマウスモノクローナル抗体のうち、CDR 領域の塩基配列が公開されている2つの株 (OPG2、PAC1) の Fc 部分をヒト IgG に置換したキメラ型モノクローナル抗体を作成し、CHO 細胞への導入、浮遊細胞化した。以前作成したキメラ型抗 GPIIIa 抗体産生細胞 (#33 キメラ株) を陽性コントロールとして用いて、OPG2、PAC1-IgG キメラ株の ELISPOT での固相化 GPIIb/IIIa に対する結合親和性を、2 価イオンキレート剤の存在および非存在下で調べた。ま

た、2 次抗体として用いる酵素標識抗ヒト IgG 抗体、酵素発色試薬の ready-to-use 化についても検討した。

(倫理面に対する配慮)

本研究ではヒト検体を使用しないことから、倫理審査を必要とするいかなる指針にも合致しない。

C. 研究結果

キットの品質管理には校正用基準物質としてヒト抗 GPIIb/IIIa 抗体を産生する細胞が必要である。昨年度作成に成功した #33 キメラ株は抗 GPIIIa 抗体であり、固相化 GPIIb/IIIa に結合するものの、ITP 患者で産生される GPIIb/IIIa の高次構造を認識する自己抗体と抗原反応性が異なる。そのため、ITP 患者で産生される抗 GPIIb/IIIa 抗体により近い抗原特異性を有する2つの新たなキメラ型抗 GPIIb/IIIa 抗体産生株を作成した。OPG2 キメラ、PAC1-IgG キメラとともに固相化 GPIIb/IIIa に結合し、2 価イオンキレート剤存在下での高値構造の修飾により結合親和性が低下した。2 価イオンキレート剤非存在の条件で、PAC1-IgG キメラは #33 キメラとほぼ同等の結合を示したにもかかわらず、OPG2 キメラの結合活性は低かった。そこで、校正用基準物質として用いるヒト型抗 GPIIb/IIIa 抗体産生細胞として、PAC1-IgG キメラ株と #33 キメラ株の両者を用い、対照として GPIIb/IIIa 以外と反応するキメラ型抗体を産生する CHO 細胞を使用することとした。

ユーザビリティ向上のため、従来は使用直前に試薬の希釈や混合を求めていた2次抗体液(酵素標識抗ヒト IgG 抗体) 酵素発色液について、様々な条件設定を

用いて長期保存性を向上することで ready-to-use 化に成功した。昨年度作成した陽性、陰性コントロールビーズに加えて最終的なキット構成仕様を確定した（図1）。

D. 考察

抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞測定キットを診断用医薬品として構成する際の品質管理に用いる較正用基準物質として 2 つの異なる結合特異性を有するキメラ型抗 GPIIb/IIIa 抗体産生細胞株 (PAC1-IgG、#33) の作成に成功した。PAC1-IgG キメラ株は ITP 患者末梢血中の自己抗体産生 B 細胞が持つ抗原結合特異性に近い特性を有する。これら細胞株を用いることで、製造したキットの感度、正確性、同時再現性が確認でき、またキットの検出感度や測定範囲を設定するためにも応用することができる。

キット毎に必要な B 細胞の生存性確認方法、陽性・陰性コントロールビーズの設定、キット構成品の ready-to-use 化を完了したことから、最終的なキット構成仕様も確定することができた。今後は ITP 患者や健常人末梢血などヒト検体を用いて至適な測定条件(検体量、保存安定性、抗凝固薬の影響など)やカットオフを設

定する必要がある。その結果に基づき最終仕様を確定し、多施設での臨床性能試験を実施する予定である。

E. 結論

抗 GPIIb/IIIa 抗体産生 B 細胞測定キットを診断用医薬品として承認申請するために必要なキット構成仕様を確立した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

該当なし

学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

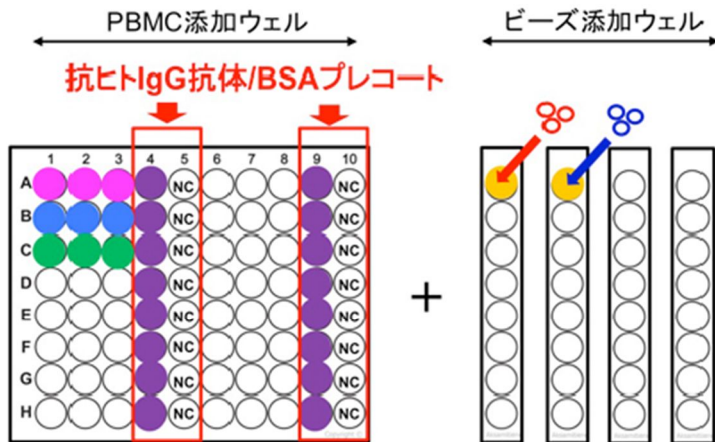
該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし



- | | | | |
|---------------------------------|--------------|--|--|
| 検体Aに使用するGP II b-III a抗原固相ウェル: | 陽性コントロールビーズ: | | |
| 検体Bに使用するGP II b-III a抗原固相ウェル: | 陰性コントロールビーズ: | | |
| 検体Cに使用するGP II b-III a抗原固相ウェル: | 抗ヒトIgG抗体固相 | | |
| コントロールビーズ用GP II b-III a抗原固相ウェル: | BSA固相 | | |