

23PO-am415

宿主細胞由来タンパク質 (HCP) 試験法に用いる抗 HCP 抗体の適格性評価法と技術的留意点

○日向 昌司¹, 池田 陽介², 小島 昌太³, 小紫 嘉一⁴, 佐藤 優次⁵, 塩入 優紀⁶,
富田 正浩⁷, 湊 雄一⁸, 多田 稔¹, 石井 明子¹ (国立衛研,²中外製薬工業,³持田製薬
⁴JCR ファーマ,⁵田辺三菱製薬,⁶第一三共,⁷免疫生物研究所,⁸協和発酵キリン)

【目的】 宿主細胞由来タンパク質(HCP)は、組換えタンパク質医薬品の製造工程由来不純物のひとつである。工程中間体や原薬の残留 HCP 量の管理を目的とした HCP 試験法として、サンドイッチ ELISA などの免疫学的測定法が用いられている。HCP 試験法では、HCP の構成タンパク質を網羅的に検出するポリクローナル抗体(抗 HCP 抗体)が必要で、抗 HCP 抗体の試薬としての適格性は、HCP 抗原の検出率(抗原カバー率)等で評価することができる。本研究では、抗 HCP 抗体の抗原カバー率測定法のひとつである二次元電気泳動法/ウエスタンブロット法を用いた検出スポット数測定法に注目し、標準的な実施条件と技術的留意点について検討した。

【方法】 1) CHO-DG44 細胞をモデル宿主細胞とし、培養上清を限外ろ過で濃縮したものを HCP 抗原としてウサギに免疫した。得られた抗 HCP 抗血清からプロテイン A カラムで抗 HCP 抗体を調製した。2) HCP 抗原を TCA 沈殿法等で脱塩したものを試料とし、二次元電気泳動した。泳動ゲルについて、SYPRO Ruby 等で全タンパク質を染色、あるいは、PVDF 膜へのブロッティング後、抗 HCP 抗体及び蛍光標識二次抗体もしくは HRP 標識二次抗体で染色した。染色したゲルや PVDF 膜について、蛍光スキャナーや CCD カメラ等で検出しスポットパターンを得た。3) スポットパターン解析ソフトを用いて、各スポットパターンのマッチング後、計測されたスポット数から抗原カバー率を算出した。

【結果・考察】 1) 試料の脱塩条件が、スポットの分離能に大きく影響すること、2) ウエスタンブロットの検出には、発光検出よりも蛍光検出が適していること、3) 画像の解析条件等で、抗原カバー率は変動しうることなどが明らかとなった。本検討結果を踏まえた標準的な実施条件と技術的留意点を示すとともに、他の抗原カバー率測定法も含め、測定の原理的な特徴や留意点についても考察したい。