

QUIDEL®

「生物学的安全性試験」関連製品

～補体関連の免疫毒性の確認に有用なツール～

Specialty Products

MicroVue™ Complement

PRODUCTS FOR
BIOSAFETY TESTING



重松貿易株式会社 化学品部

Shigematsu & Co., Ltd.

<大阪本社>

〒541-0047 大阪市中央区淡路町 2 丁目 2 番 5 号
TEL : (06)6231-6146 FAX : (06)6231-6149

<つくばライフサイエンスオフィス>

〒300-2655 茨城県つくば市万博公園西 F26 街区 1 インプレス 103
TEL : (029)848-3220 FAX : (029)848-3221

WEB : www.shigematsu-bio.com/ Mail : info@shigematsu-bio.com



生物学的安全性試験 医療機器の生物学的評価について

生体適合性は^①「生体組織内で毒性反応や有害反応、免疫反応を引き起こさず生物学的に適合性があること」と定義されています。金属製ステントやプラスチックカテーテルをはじめ、リポソームを使ったナノ粒子や血液製剤までも含んだ、血液や生体組織との接触を伴う多くの医療機器はその評価を受けることが必要となっています。生体適合性試験には多数の判定基準が関与していますが、その中には補体系活性化の評価も含まれています。補体系は30以上の体液タンパクまたは膜結合型タンパクで構成されており、基本的には古典経路、代替経路、レクチン経路、ターミナル経路の4つの経路に分かれています。

ごくわずかな例外を除いて、^②補体タンパク C3 が分解切断を受けない限り、補体系には有意な活性化は見られません。従って、ある物質が補体を活性化するかどうかを測定する実質的な第一段階は、**MicroVue C3a Plus EIA キット (A031)**、または **MicroVue iC3b EIA キット (A006)** を使用し、C3 の活性化を検査することになります。その検査において有意な量の iC3b または C3a が測定されれば、測定に使用された生体材料は補体活性化因子です。

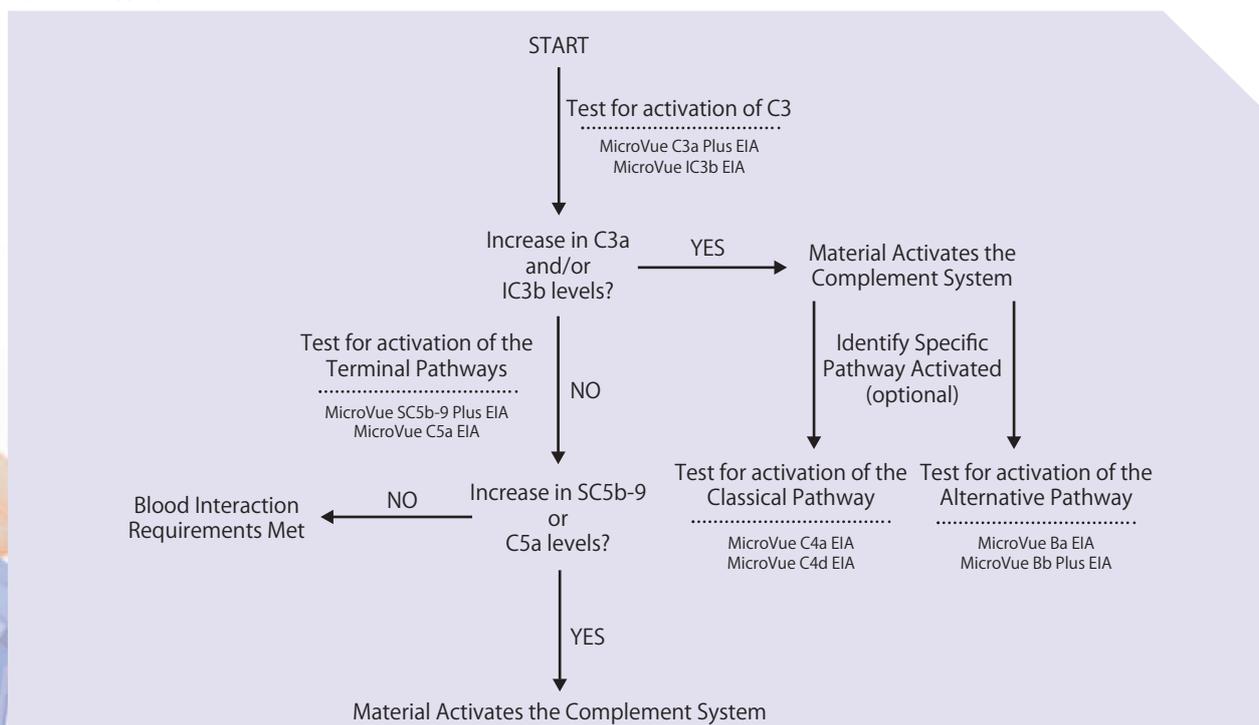
合成材料と C3a や C3b との相互作用によって試験結果が陰性となる場合があります。従って C3a と iC3b の検査結果が陰性となったとしても、**MicroVue SC5b-9 EIA キット (A020)** または **C5a EIA キット (A021)** を使用して、末端の経路が活性化されているかを追加検査し確認されることを推奨します。もしこの検査結果も陰性であれば、その生体材料が補体活性化因子である可能性は非常に低いとみなされます。

補体活性化の要因を特定することも重要です。これにより化学修飾や生物工学的アプローチによって問題を回避するため見識を得ることができる可能性があります。**MicroVue C4a または C4d EIA キット** を使って古典経路の活性化を確認することができますし、**MicroVue Ba EIA キット** では代替経路の活性化を確認することができます。

検査において、補体のソースは非常に重要であり、活性化フラグメント量が低レベルの新鮮凍結血清でなければなりません。**Quidel 社の正常ヒト血清補体 (Normal Human Serum Complement)** は採血後補体活性を保持するよう処理されています。加えて、この血清は補体活性化フラグメントのレベルによって特徴づけられています。測定中は（処理が）適切にコントロールされていることも重要なことです。Quidel 社の**コブラ毒因子 (Cobra Venom Factor, CVF)** はコブラ毒から注種された無毒の補体活性化成分であり、優れたポジティブコントロールを結果として生じさせます。CVF は他の補体成分と複合体を形成し広範囲にわたる生物種の C3 を活性化することが可能です。

Quidel 社は^③ヒト血清中の補体活性化試験のための ISO ガイドラインで推奨されている検体検査用 ELISA キットや試薬を製造しています。

図 1. 生体材料試験決定のフローチャート



生物学的安全性試験

治療用抗体の生物学的評価について

④既に定義されている細胞表面の抗原に対する抗体は、がんやその他の病気の治療用として幅広く研究されてきています。
⑤更に臓器移植においては、臓器提供候補ドナーのヒト白血球抗原 (HLA) に直接働く抗体がレシピエント側の血清中に存在しないかを確認するための交差適合 (クロスマッチ) 試験を行う必要があります。⑥抗体が宿主に対する細胞致死機能を手に入れる既知のメカニズムは2つありますが、そのうちのひとつが補体依存性細胞傷害 (CDC: Complement-Dependent Cytotoxicity) です。

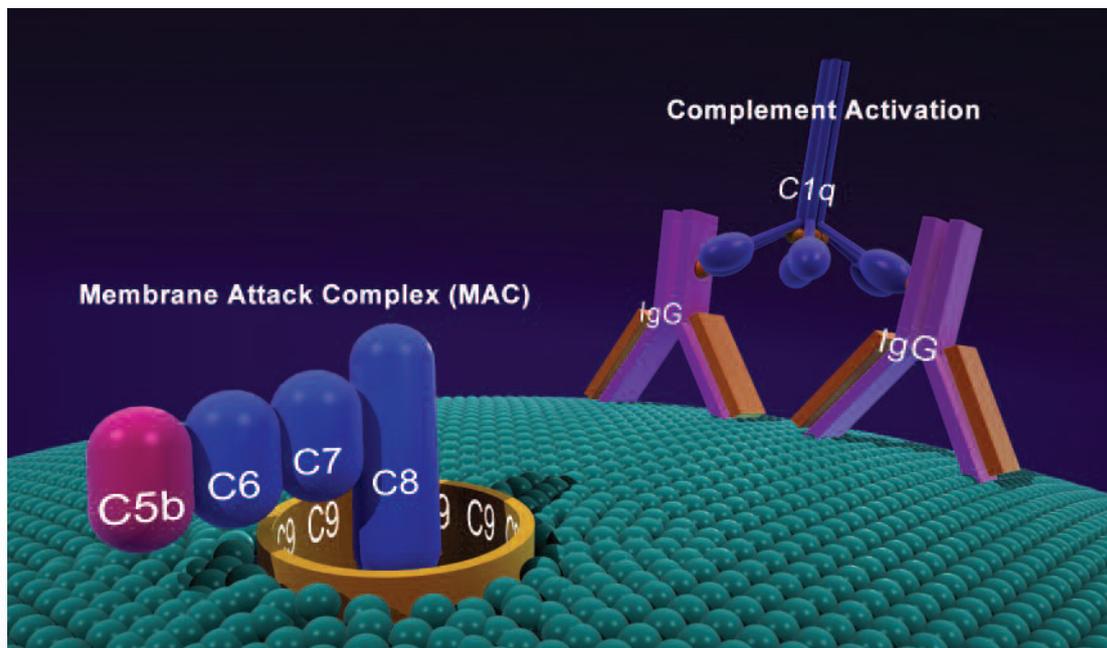
補体依存性細胞傷害とは補体タンパク C1q が抗体と結合して補体カスケードを誘導し、標的細胞の表面に膜侵襲複合体 (MAC) を形成することで細胞を殺すメカニズムです。この補体の古典経路活性化は標的細胞の溶解を引き起こします。

モノクローナル抗体の補体依存性細胞傷害性の検査は、標的細胞をプレートに乗せ段階的に希釈された抗体で処理します。細胞にはヒト通常血清補体も補体の適切なソースとして加えられます。インキュベーション後に細胞の溶解が測定され、毒性を計算するために使用されます。細胞溶解が10%以下の場合抗体は細胞毒性を示しません。

ヒト白血球型抗原 (HLA) の交差適合 (クロスマッチ) 試験はドナーの血清からリンパ球を分離し、当分量のレシピエントの血清と非ヒト血清由来の補体 (例えば Quidel 社製モルモット血清由来補体) と共にインキュベーションします。インキュベーション後に細胞の溶解が測定され、毒性を計算するために使用されます。抗体の場合と同様に、細胞溶解が10%以下の場合、レシピエントの血清には細胞毒性を示す可能性がある抗体は含まれていないことを意味します。

Quidel 社は補体依存性細胞傷害性試験とヒト白血球型抗原 (HLA) 交差適合試験で使用される試薬を製造しています。

図 2. C1q と抗体の結合による補体カスケードの活性化と膜侵襲複合体 (MAC) 形成



References

- ①Dorland' s Illustrated Medical Directory, 32nd Edition (2011).
- ②Liszewicki, MK and Atkinson, JP. The Complement System. In: Fundamental Immunology, 3rd Edition, Paul, WE (ed.) (1993).
- ③International Organization for Standardization. ISO 10993-4: Biological evaluation of medical devices . Part 4: Selection of tests for interactions with blood. Second Edition, pg. 9 (2002).
- ④Idusogie, EE et al. Mapping of the C1q binding site on Rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. J. Immunol 164:4178-4184 (2000).
- ⑤Lebeck, KL and Garovoy, MR. Histocompatibility testing and organ sharing. In: Immunogenetics Laboratory Manual, 3rd Edition, Chapter 8 (1997).
- ⑥Ragupathi, G. et al. Antibodies against tumor cell glycolipids and proteins, but not mucins, mediate complement-dependent Cytotoxicity. J. Immunol 174:5706-5712 (2005).
- ⑦International Organization for Standardization. ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices . Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Second Edition (2002).

● 補体活性化試験用 EIA キット

血清・血漿やその他の体液を検体として、主要な補体タンパクまたは特定経路の活性化分析にご利用頂けます。

カタログ #	容量	製品名
A006	1 kit	MicroVue iC3b EIA (For C3 activation)
A008	1 kit	MicroVue C4d Fragment EIA (For C4 and classical pathway)
A020	1 kit	MicroVue SC5b-9 Plus EIA (For MAC assembly, TCC, C5 and terminal pathway activation)
A021	1 kit	MicroVue C5a EIA
A031	1 kit	MicroVue C3a Plus EIA
A033	1 kit	MicroVue Ba Fragment EIA
A035	1 kit	MicroVue C4a Fragment EIA

● 補体関連試薬

カタログ #	容量	製品名
A112	2.5 mL	Normal Human Serum Complement
A113	5.0 mL	Normal Human Serum Complement
A114	0.2 mL	Complement Activator (heat aggregated gamma globulin)
A115	1 Panel	Complement Sample Panel (10 Samples x 25 μ L)
A119	5.0 mL	Guinea Pig Serum Complement
A600	1.0 mg	CVF, Cobra Venom Factor (Naja naja kaouthia)*

* ≥ 350 units/mL

※すべての製品は研究用であり、診断、治療用ではありません。



QUIDEL®



重松貿易株式会社 化学品部

Shigematsu & Co., Ltd.

<大阪本社>

〒541-0047 大阪市中央区淡路町 2 丁目 2 番 5 号
TEL : (06)6231-6146 FAX : (06)6231-6149

<つくばライフサイエンスオフィス>

〒300-2655 茨城県つくば市万博公園西 F26 街区 1 インプレス 103
TEL : (029)848-3220 FAX : (029)848-3221

WEB : www.shigematsu-bio.com/ Mail : info@shigematsu-bio.com