フォン・ウィレブランド因子 (vWF) に対する モノクローナル抗体の作製とその免疫学的特性

嶋 緑倫* 森本 純司* 今井 俊介*
螺良 義彦* 吉岡 章** 福井 弘**

Production and characterization of monoclonal antibodies against von Willebrand factor (vWF)

Midori SHIMA*[†], Junji MORIMOTO*, Shunsuke IMAI*,
Yoshihiko TSUBURA*, Akira YOSHIOKA** and Hiromu FUKUI**

Key words: factor VIII/von Willebrand Factor (FVIII/vWF),
ristocetin cofactor, ELISA, monoclonal antibody,
avidin-biotin system

Monoclonal antibodies against von Willebrand factor (vWF) were produced by immunization of BALB/C mice with FVIII/vWF fraction and fusion of spleen cells with NS-1 murine myeloma cells. Antibody producing hybridomas were detected by an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Five cloned monoclonal antibodies obtained in this method were all belonged to IgG₁ class, and inhibited platelet retention by glass beads (Bowie et al.). The inhibitory action was most remarkable in 3B11. The antibody titer against vWF: Ag ranged from 1×10^5 to 1×10^7 by an ELISA. 3B11 inhibited ristocetin induced platelet aggregation and ristocetin cofactor up to 1×10^4 . VIII protein and vWF protein were separately eluted from FVIII/vWF fraction by immunoabsorbent chromatography using monoclonal antibody. A new ELISA method was developed using each monoclonal antibody to quantitate vWF: Ag. The lower limit was 0.001 u/ml. In order to detect vWF: Ag in tissues immunoperoxidase staining by avidin-biotin system using monoclonal antibody was performed. Positive staining was obtained in the endothelial cells of the neonatal umbilical cord, washed platelets and megakaryocytes.

* 奈良県立医科大学第二病理〔〒634 奈良県橿原市四条町 840〕, The Second Department of Pathology, Nara Medical College, Nara, Japan.

** 同 小児科, Department of Pediatrics, Nara Medical College, Nara, Japan.

目 的

第Ⅷ因子複合体の構造と機能の解析を目的に、フォン・ウィレブランド因子(vWF)に対するモノクローナル抗体を作製し、その免疫学的特性について検討した。

I. 方 法

1. モノクローナル抗体の作製

第Ⅷ因子濃縮製剤を Sepharose 4B にてゲル濾過して得たFⅧ/vWF 分画(1 u/1回/1匹)を BALB/c マウス 腹腔内に隔週毎、3回注射した。ブースターとして同分画を静注。3日後に、脾細胞(1.5×10^8)と NS-1 マウスミエローマ細胞(3×10^7)とを PEG 1500 存在下に常法¹⁾どおり細胞融合を行なった。HAT 選択培養の後、2回の限界希釈によるクローニングを行ない、5種類の抗体陽性ハイブリドーマを得た。次いで BALB/c マウス腹腔内で増殖させ腹水を得た。

2. 抗体スクリーニング

ハイブリドーマ培養上清中の抗vWF:Ag活性は、自家製特異的抗ヒトvWF家兎血清をcoating 一次抗体としたELISAによった。

II. 結 果

1. 5種類の特性

抗体サブクラスは全て IgG₁、抗ⅧC作用は5種類とも陰性。ELISAによる抗vWF:Ag抗体活性は $1 \times 10^5 \sim 10^7$ 倍であった。正常PRPを用いた、終濃度1.25mg/mlのリストセチン添加血小板凝集能は、3B11のみにて抑制され

た(1×10^4 倍)。3B11の抗RC₀力価も 1×10^4 倍であった。血小板粘着能(Bowie法²⁾)に対する抑制作用については、いずれの抗体も正常血小板のガラスビース停滞率(76~83%)を低下せしめた。3B11では特に著明であった(表1)。

2. モノクローナル抗体(2G8)を用いたFⅧ/vWFの免疫吸着

IgG分画200mgを固相化した50mlのCNBr Sepharose 4BゲルにFⅧ/vWF分画(ⅧC活性200u, vWF:Ag 600u)を吸着させ、0.25M CaCl₂加Trisバッファーにて溶出した。計100u(ピーク値:ⅧC 21u/ml, Ⅷ:Ag 40u/ml, vWF:Ag 0.02u/ml)のⅧC蛋白が得られた。次いで3MNaSCNにより計50uのvWF蛋白が溶出された。

3. ELISAによるvWF Ag測定系

モノクローナル抗体を一次coating抗体としたELISAによるvWF:Ag測定系を確立した。測定下限は0.001u/ml。

4. vWF:Agのimmunoperoxidase染色

臍帯血管と洗浄血小板について、モノクローナル抗体を用いたavidin-biotinシステムにより染色し、血管内皮細胞と血小板内部の陽性所見を得た。

III. 考察と結論

本モノクローナル抗体はvWF:Agの免疫学的測定や免疫組織学的検索に利用できるのみならず、種々の抗体活性を有することから、FⅧ/vWFの構造と機能の解析に有用であると考えられた。

Table 1 Characterization of monoclonal antibodies

Hybridoma	IgG class	Anti-VIII C	Anti-vWF:Ag*	Anti-ristocetin cofactor	Platelet retention
2B7	IgG ₁	(—)	1×10^6	(—)	30% (76%)**
2D6	IgG ₁	(—)	1×10^6	(—)	39% (76%)
2G8	IgG ₁	(—)	1×10^6	(—)	51% (83%)
3B11	IgG ₁	(—)	1×10^7	1×10^4	22% (83%)
4F2	IgG ₁	(—)	1×10^6	(—)	49% (83%)

*by ELISA

**control

文 献

- 1) Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, **256**; 495~497,

1975.

- 2) Bowie, E.T.W., Owen, C.A., Thompson, J. H. and Didisheim, P. : Platelet adhesiveness in von Willebrand's disease. *Am. J. Clin. Pathol.*, **52**; 69~77, 1969.

●自分で実際にやれる手術書！

植田小児外科

大阪市立保健センター外科 植田 隆著
B5判 364頁 図207 表18 定価9,800円(〒350円)

知識として知っていることと、自分で実際巧くやれるということには随分開きがあるものである。僅かの小児外科の訓練をうけただけの一般外科医が、どんな症例なら自分でこなせるか、どんな症例なら専門医に転送しなければならないか、記述の重点を診療の実践面におき、高名なる著者が実地臨床に役立つことを念じて執筆した名著である。

●内容：〔総論〕1.新生児、乳幼児手術の術前、術中、術後管理、2.乳児手術の一般的注意、3.胃瘻造設の適応と手術法、4.結腸瘻造設の適応と手術法、5.新生児、乳児手術の死亡要因、〔各論〕1.新生児期手術概説、2.先天性食道閉鎖症、3.先天性食道狭窄症、4.噴門痙攣症、食道無弛緩症、5.横隔膜ヘルニア、6.直腸肛門奇形、7.後天性肛門疾患、8.ヒルシュスプリング病、9.臍帯ヘルニアまたは内臓脱出症、10.新生児腸閉塞症概説、11.十二指腸閉鎖および十二指腸狭窄、12.輪状腸、13.腸回転異常症または腸回転不全症、14.小腸閉鎖、15.胎便性イレウス、16.胎便栓塞症候群、17.腹膜炎および消化管穿孔、18.先天性肥厚性幽門狭窄症、19.腸重積症、20.消化管重複症、21.メッケル憩室、22.消化管のポリープ、23.低血糖症、脾島細胞腫、24.脾の胎生的遺残物、25.脾ヘルニア、26.鼠径ヘルニア、27.陰嚢水腫、28.停留嚢丸、29.先天性胆道閉鎖症、30.胆管嚢腫、31.漏斗胸、32.皮膚面に開口する種々なる先天性瘻、33.半陰陽、34.小児の悪性腫瘍、35.中枢神経系の奇形。