種々の抗血小板膜抗体の血小板機能におよぼす影響

平居 啓治* 吉岡 宗* 中沢まゆみ* 安永幸二郎*
橋本 誠** 寮 隆吉** 山口 延男** 白田 定和***

Effects of various types of anti-human platelet membrane antibody on platelet function

Keiji HIRAI*, Muneto YOSHIOKA*, Mayumi NAKAZAWA*,
Kojiro YASUNAGA*, Makoto HASHIMOTO**, Ryukichi RYO**,
Nobuo YAMAGUCHI** and Sadayuki USUDA***

Key words: platelet membrane, glycoprotein IIb/IIIa, platelet aggregation, crossed immunoelectrophoresis, immunoprecipitation, immunoblotting

Antibodies I and II (heterologous anti-human platelet membrane antisera) were produced in rabbit against human platelet membrane dissolved in 10 mM Tris/HCl buffer, pH 7.4, containing 1 % Triton X-100, 0.25 M sucrose, 2 mM CaCl₂, and in 38 mM Tris/HCl buffer, pH 8.6, containing 1 % Triton X-100, 0.1 M glycine, 5 mM EDTA, respectively. Antibody III (mouse monoclonal antibody) was raised against crude human platelet membrane of normal platelets. By crossed immunoelectrophoresis (CIE), it was shown that antibody I could bind to a single protein. Since the immunoprecipitate on CIE was not detectable by using platelets from a Glanzmann's thrombasthenic patient, antibody I was considered to be specific antibody against GP IIb/IIIa complex. Avidin biotin complex system (ABC)-immunoblot showed the strong binding of antibody II to electrophoretically separated GP IIb and GP IIIa. ABC-immunoblot revealed no binding of antibody III to platelet proteins after SDS-PAGE, but two immunoprecipitates were obtained with an apparent molecular weight of 130 K and 110 K

* 関西医科大学第一内科 [〒570 大阪府守口市文園町1], The First Department of Internal Medicine, Kansai Medical University, Osaka, Japan.

** 神戸大学医学部附属病院輸血部, Blood Transfusion Service, Kobe University Hospital, Hyogo, Japan.

*** 特殊免疫研究所, Institute of Immunology, Tochigi, Japan.

under reduced conditions by double antibody immunoprecipitate, thus indicating that antibody III was a monoclonal antibody against GP IIb/IIIa complex. Fluorescence flow cytometric analysis showed that the activity of antibody I to sensitize human platelets was less than that of antibody II. In contrast, antibody I was more potent in inhibiting ADP- and collagen-induced platelet aggregation than antibody II. Antibody III inhibited ADP- and collagen-induced aggregation in a dose dependent manner. The addition of $6.3 \mu\text{g/ml}$ of antibody III to platelets sensitized 68% of platelets, and caused complete inhibition of ADP-induced aggregation, while its addition of $3.1 \mu\text{g/ml}$ sensitized 50% of platelets, and caused complete inhibition of collagen-induced aggregation. The results give further support to the proposal that platelet GP IIb/IIIa complex, not dissociated GP IIb and GP IIIa, plays an important role in platelet aggregation.

緒 言

血小板膜には凝集能や粘着能などの機能発現に重要な働きをする glycoprotein (GP) が存在している。その中でも GP IIb/IIIa は complex を形成してはじめて凝集発現に中心的役割を果たすことが推定されている興味ある GP である¹⁾。そこで血小板膜 GP IIb/IIIa に比較的特異性のある各種の抗体を作製して、GP IIb/IIIa の凝集の際に果たす役割を検討したので報告する。

I. 方 法

抗体作製：正常人よりチトラート採血（3.8 %クエン酸ナトリウム1容：血液9容）した血液を300 g で8分間遠心して多血小板血漿（PRP）を得て、血小板を15% ACD 加 PBS（pH 7.4）で洗浄した。その血小板を Barber と Jamieson の方法²⁾に従って血小板膜分画を得て、それを1% Triton X-100, 0.25 mM sucrose, 2 mM CaCl_2 を含有する 10 mM Tris/HCl, pH 7.4 の緩衝液（I 群）と1% Triton X-100, 0.1 M glycine, 5 mM EDTA を含有する 38 mM Tris/HCl pH 8.6 の緩衝液（II 群）で溶解し、家兎を免疫して抗血小板膜抗体³⁾を、また Oi らの方法⁴⁾に準じて抗血小板膜モノクローナル抗体を得た（III 群）。家兎由来の抗血清は 56°C , 30分間非働化して、モノクローナル抗体は生食で 5 mg/ml の濃度に調整して以下の実験に供した。

抗体の性状：二次元交差免疫電気泳動 CIE 以下（C）法と略す）は Hagen らの方法⁵⁾に従い、抗血清を10%になるよう agarose に混じておこない、中間 gel は使用しなかった。抗原は上記の方法により得られた血小板膜、あるいは Glanzmann の血小板無力症（I 型）より得た血小板を15% ACD 加 PBS（pH 7.4）にて洗浄し、その血小板を1% Triton X-100, 100 mM glycine を含む 38 mM Tris/HCl, pH 8.7 の緩衝液に溶解して検索した。蛋白量は Bio Rad 社の protein assay kit I を用いて測定した。

Avidin biotin peroxidase complex (ABC) -immunoblotting (W) 法は、正常人より得た血小板を5 mM EDTA を含む PBS（pH 7.4）で洗浄し、その血小板（100 μg ）を Laemmli の方法⁶⁾に従って5% 2-mercaptoethanol を含む試料用緩衝液で溶解し 100°C 5分間煮沸後、5.5% SDS polyacrylamide gel (SDS-PAGE) で電気泳動後、Trans Blot Electrophoretic Blotting Apparatus (Bio Rad 社) を用いて nitrocellulose に転写⁷⁾し、その後抗血清を0.05% Tween 20 を含んだ PBS (TPBS) で希釈して nitrocellulose 上で抗原抗体反応をおこさせて、結合した IgG を Vectastain ABC kit (Vector 社) で同定した。分子量は HMW maker (Bio Rad 社) を用いて決定した。

Immunoprecipitate (I) 法は、Phillips らの方法⁸⁾に従い lactoperoxidase (Sigma 社) を用いて $1 \text{ mCi } ^{125}\text{I}$ (Amersham 社) で 1×10^9 個の正常人より得た血小板を標識した後、McGregor

Fig. 1 Analysis of antigen against antibody I

Platelet membrane (20 µL) from normal subjects and washed platelets (100 µg) from Glanzmann's thrombasthenia solubilized in lysis buffer (38 mM Tris/HCl buffer, pH 8.7, containing 1 % Triton X-100 and 100 mM glycine) were electrophoresed (left to right) in first dimension agarose gels containing 1 % Triton X-100, and then in the second dimension against 10% antibody I in the upper gel. The gels were washed, dried and the precipitates were stained by Coomassie brilliant blue.

A shows the immunoprecipitates of normal platelet membrane.

B shows the immunoprecipitates of Glanzmann's thrombasthenic platelets.

らの方法⁹⁾に準じて 2×10^8 個の ^{125}I -標識血小板を 0.15 M NaCl, 1 % Triton X-100, 0.1% SDS を含む 2 mM Tris/HCl, pH 7.2 の溶解液で溶解し, 各種濃度の抗体を反応させて, 家兎由来抗マウス Ig (Cappel 社) あるいはヤギ由来抗家兎 Ig (Cappel 社) を加えて, その抗原抗体複合体を 10% staphylococcus aureus Cowan I (科薬) で沈殿させて, Laemmli の 5 % mercaptoethanol を含む試料用緩衝液で溶解し, 5.5 % SDS-PAGE で電気泳動後, Kodak X Omat S film (Kodak 社) 用いて autoradiography を行ない検索した。

抗体の力価は Borne¹⁰⁾ の platelet suspension immunofluorescence test (PSIFT) で検討し, 蛍光強度を flow cytometry (Ortho Spectrum III)¹¹⁾ で測定した. non-immune のマウス腹水

の反応において蛍光を発する細胞が 1 % 以下になるよう条件設定し, 血小板上の蛍光強度を測定した。

血小板凝集能: Born の比濁法¹²⁾に従い Hematracer (二光バイオサイエンス社) を用いて測定した. 正常人より 3.8 % クエン酸ナトリウム 1/10 容で採血して 300 g, 8 分間遠心して得られた PRP 190 µL (4×10^6 血小板/µL) と 10 µL の各種濃度の抗体と 60 分間, 37°C で孵置した後, 4 µM ADP (Sigma 社) と 1 µg/ml あるいは 2 µg/ml collagen (Horm 社) を加えて凝集能を観察し, 最大凝集率を測定した. 凝集率は, そのとき用いた PRP の光の透過度を 0 % とし, 乏血小板血漿のそれを 100 % とした。

Fig. 2 Western blot showing the interaction between antibody II and electrophoretically separated GP IIb and GP IIIa of normal human platelets.

Samples (100 μ g) of reduced SDS soluble platelet proteins were separated by 5.5% acrylamide Laemmli SDS/acrylamide gel (SDS PAGE) and electrophoretically transferred to nitrocellulose membrane. Individual strips were incubated with antiserum diluted at various concentrations with PBS containing 0.05% Tween-20 (TPBS). Detection of IgG was performed using avidin biotin peroxidase complex method. Lane 1, 2, 3 and 4 show immunoblot with antibody II diluted as indicated.

II. 成 績

I 群の抗体は W 法や I 法では diffuse な抗原部位を認識したが、C 法では正常の血小板膜を抗原とすると単一の沈降線を形成し、血小板無力症患者から得られた血小板を抗原とすると消失するので、GP IIb/IIIa complex に特異性がある抗体と考えられた (図 1)。II 群の抗体は I 法では血小板膜に diffuse に反応して、特定の抗原部位を同定できなかったが、W 法で還元した血小板の 130 K と 110 K の部位に結合したので、解離した GP IIb と GP IIIa に対する比較的特異性のある抗体と考えられた (図 2)。C 法では、検索する血小板膜を EDTA で処理すると I 群の抗体では全く沈降線を形成しなかったが、II 群の抗体では 2 つの強い沈降線を形成したので、II 群の抗体が解離した GP IIb と GP IIIa に比較的特異性があることが確認された。III 群の抗体は W 法では結合部位は同

定できなかったが、I 法で GP IIb と GP IIIa に一致した分子量の抗原を沈殿させたので、GP IIb/IIIa complex に対するモノクローナル抗体と考えられた (図 3)。これらの抗体の力価と凝集阻害の関係を 3 名の正常人から得られた血小板を用いて検討した。図 4 はその代表的な例を示している。I 群の抗体は II 群の抗体より抗体力価が低いにもかかわらず、凝集の阻害の程度が強く、また、両抗体とも ADP より collagen 凝集をより強く抑制した。一方、III 群の抗体は感作された血小板が 68% で ADP 凝集を、50% で collagen 凝集を完全に抑制した。なお、他の 2 名も agonist による最大凝集率や抗体に対する反応性に違いが認められたが、抗体の力価と凝集阻害の関係は同じであった。

III. 考 案

各種の血小板抗体を用いて血小板機能発現の機序の解明がおこなわれている。そこで血小板

Fig. 3 Autoradiograms of ^{125}I -labelled platelet glycoproteins immunoprecipitated by monoclonal antibody III and Western blot.

The platelets were iodinated by the lactoperoxidase technique. Detergent extracts of ^{125}I -labelled platelets (2×10^8) were incubated with monoclonal antibody III (16, 32 or $64 \mu\text{g}/\text{ml}$), and $10 \mu\text{l}$ of rabbit anti-mouse IgG antibody was added. After incubation, $200 \mu\text{l}$ of 10% of staphylococcus aureus Cowan I was added. The bound antigens were eluted with SDS reducing buffer, and separated on 5.5% SDS-PAGE. Lanes 1, 2 and 3 show autoradiograms obtained with 16, 32, and $64 \mu\text{g}/\text{ml}$, respectively, of antibody III. Samples ($100 \mu\text{g}$) of reduced SDS soluble platelet proteins were separated by SDS PAGE, and electrophoretically transferred to nitrocellulose membrane. The strip was incubated with monoclonal antibody III diluted to $12.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ with TPBS for 1h. Detection of bound IgG on the strip was done using the avidin biotin complex peroxidase method. Lane 4 shows no binding of antibody III to electrophoretically separated GP IIb and GP IIIa.

膜とくに GP IIb/IIIa に対する三種の抗体を作製して、これらの抗体の凝集能におよぼす影響を観察した。血小板を EDTA 非存在下あるいは存在下で Triton X-100 で可溶化すると Nurdén ら¹³⁾の報告したように EDTA 存在下では血小板膜の GP IIb/IIIa complex は消失する。血小板膜を EDTA 存在下と非存在下で処理して家兎を免疫すると、興味あることに性状の異なった抗血清が得られた。いずれの抗血清も血小板膜という crude な抗原を用いたので I 法では血小板膜に diffuse に反応することが認められたが、CIE の成績から EDTA 非存在下

の抗血清は GP IIb/IIIa complex に比較的特異性のある抗体であり、一方、EDTA 存在下の抗血清は ABC-immunoblotting 法で解離した血小板膜 GP IIb と GP IIIa を比較強く認識することが明らかとなった。これは、EDTA が Ca 依存性の血小板膜 GP IIb/IIIa complex を解離したために後者の抗血清が、解離した GP IIb と GP IIIa に特異性を有するようになったためと考えられる。そこでこの二つの抗体を用いて ADP と collagen 凝集の阻害の態度を観察すると GP IIb/IIIa complex に比較的特異性のある膜抗体は、解離した GP IIb と GP

Fig. 4 Relationship between inhibition of platelet aggregation in the presence of antibody and the numbers of antibody-sensitized platelets.

Rabbit anti-human platelet membrane antibodies (antibody I and antibody II) and IgG of mouse anti-human platelet GP IIb/IIIa complex monoclonal antibody (antibody III) were incubated with normal human PRP prior to the addition of ADP and collagen ($4 \mu\text{M}$ ADP and $1.0 \mu\text{g/ml}$ collagen were used for platelet aggregation in the presence of antibody I and II, $4 \mu\text{M}$ ADP and $2 \mu\text{g/ml}$ collagen were used for platelet aggregation in the presence of antibody III). The maximal aggregation is expressed as a percentage of aggregation 5 min after the addition of ADP (△) and collagen (▲). The formalin-fixed platelets were incubated with varying dilutions of antibodies, then incubated with the fluorescein labelled second antibody. The fluorescence histograms were analyzed on flow cytometry, and the percentage of platelets with positive fluorescence is indicated (○).

A, B and C show the effects of antibodies I, II, III, respectively.

IIIa に対する膜抗体に比較して、ADP と collagen 凝集をより強く抑制した。これは GP IIb/IIIa complex を形成してはじめて凝集能発現に中心的な役割を果たすという従来の見解¹⁴⁾を支持する成績と考えられた。また、自家製の GP IIb/IIIa complex モノクローナル抗体も $6.3 \mu\text{g/ml}$ で ADP 凝集を、 $3.1 \mu\text{g/ml}$ で collagen 凝集を完全に阻害し、GP IIb/IIIa complex が凝集

をつかさどる膜 GP であることが確認された。興味あることにこの際、血小板への抗体の結合を flow cytometry で検討すると 68% と 50% であり、GP IIb/IIIa complex が抗体によって完全におおわれていなくても、凝集の発現が阻止された。血小板膜 GP IIb/IIIa complex の数と凝集能の強さの関係を検討すると、凝集能発現の際の GP IIb/IIIa complex の役割が一層明ら

かになると考えられた。今回用いた種々の抗体はいずれも ADP より collagen 凝集を強く阻害した。これは各抗体が, collagen によって血小板から放出される ADP による凝集を阻止するためか, receptor を介する阻害かについては今後の課題である。

文 献

- 1) Clemetson, K.J.: Glycoprotein of the platelet plasma membrane. (George, J.N., Nurden, A. I., and Phillips, D.R.: Platelet Membrane Glycoproteins), Plenum Press, New York, 1985, pp. 51~86.
- 2) Barbet, A. J. and Jamieson, G. A.: Isolation and characterization of plasma membrane from human blood platelets. *J. Biol. Chem.*, **245**; 6357~6365, 1970.
- 3) 中沢まゆみ, 寮 隆吉: 抗血小板膜抗体の作製—とくに glycoprotein IIb と IIIa について—. 投稿中
- 4) Oi, V. T. and Herzenberg, L. A.: Immunoglobulin producing hybrid cell lines. (Mishell, B.B. and Shiigi, S.M.: Selected Methods in Cellular Immunology.), Freeman Press, San Francisco, 1980, pp. 351~572.
- 5) Hagen, I., Bjerrum, O.J. and Solum, N.O.: Characterization of human platelet proteins solubilized with Triton X-100 and examined by crossed immunoelectrophoresis. Reference patterns of extracts from whole platelets and isolated membranes. *Eur. J. Biochem.*, **99**; 9~22, 1979.
- 6) Laemmli, V.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature*, **227**; 680~685, 1970.
- 7) Devine, D.V. and Rosse, W.F.: Identification of platelet proteins that bind alloantibodies and autoantibodies. *Blood*, **64**; 1240~1245, 1984.
- 8) Phillips, D.R. and Agin, P.P.: Platelet plasma membrane glycoproteins. Evidence for the presence of nonequivalent disulfide bonds using nonreduced-reduced two-dimensional gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **252**; 2121~2126, 1977.
- 9) McGregor, J.L., Brochier, J., Wild, F., Follea, G., Trzeciak, M.C., James, E., Dechavanne, M., McGregor, L. and Clemetson, K., J.: Monoclonal antibodies against platelet membrane glycoproteins. *Eur. J. Biochem.*, **131**; 427~436, 1983.
- 10) von dem Borne, A.E.G.K., Verheugt, F.W. A., Oosterhof, F. von, Riesz, E., Brutel de la Riviere, A. and Engelfriet, C.P.: A simple immunofluorescence test for the detection of platelet antibodies. *Br. J. Haematol.*, **39**; 195~207, 1978.
- 11) 西郷勝康, 中谷洋子, 山口延男, 橋本 誠, 寮隆吉: 抗血小板抗体の in vivoでの巨核球への結合. 血液と脈管, **16**; 187~190, 1985.
- 12) Born, G.V.R.: Aggregation of blood platelet by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*, **194**; 927~929, 1962.
- 13) Rosa, J.-P., Kieffer, N., Didry, D., Pidard D., Kunicki, T. and Nurden, A. T.: The human platelet membrane glycoprotein complex GP IIb-IIIa express antigen sites not exposed on the dissociated glycoproteins. *Blood*, **64**; 1246~1253, 1984.
- 14) Nachman, R.L. and Leung, L.L.: Complex formation of platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa with fibrinogen. *J. Clin. Invest.*, **69**; 263~299, 1982.