ブタ血小板膜糖蛋白 Ib および IIb/IIIa に
対するモノクローナル抗体の作製

高見 秀樹* 吉田 豊*
W.L. NICHOLS** E.J.W. BOWIE**

Monoclonal antibodies against porcine platelet
membrane glycoproteins Ib and IIb/IIIa

Hideki TAKAMI*, Yutaka YOSHIDA*,
W.L. NICHOLS** and E.J.W. BOWIE**

Key words: monoclonal antibody, porcine platelet,
platelet membrane glycoprotein

We have prepared murine monoclonal antibodies to porcine platelet glycoprotein (GP) Ib and GPIIb/IIIa for further study of the porcine hemostatic mechanism. One monoclonal antibody, designated PP3-4C, blocked ristocetin-induced platelet agglutination and caused 80% inhibition of ristocetin-induced ^{125}I -von Willebrand factor (vWF) binding to platelets at a concentration of 12 μg IgG/ml. Another monoclonal antibody, designated PP3-3A, completely inhibited ADP- or collagen-induced platelet aggregation at 6 μg IgG/ml. At a concentration of 10 μg IgG/ml PP3-3A completely inhibited binding either of ^{125}I -fibrinogen or of ^{125}I -vWF to ADP-stimulated platelets. Immunoaffinity chromatography of solubilized surface-radiolabeled porcine platelets and subsequent SDS-polyacrylamide gel electrophoresis demonstrated that PP3-4C recognized a glycoprotein with an apparent molecular weight of 160,000 (non-reduced), and 140,000 (reduced). PP3-3A recognized glycoproteins with apparent molecular weights of 130,000 and 80,000 (non-reduced), and 115,000 and 100,000 (reduced). These monoclonal antibodies to porcine platelet membrane glycoproteins which are structural and functional analogues of human GPIb and GPIIb/IIIa will be useful for *in vitro* and *in vivo* studies of the mammalian hemostatic mechanism.

* 弘前大学医学部第一内科 (〒036 弘前市在府町 5), First Department of Internal Medicine, Hirosaki University School of Medicine, Hirosaki, Japan.

** Hematology Research, Mayo Clinic, Rochester, U.S.A. 受付: 1988.1.20. 受理: 1988.3.3.

はじめに

ブタはその止血機構がヒトと類似しているため、止血血栓機序を研究する上で有用な動物モデルである。今回、われわれはブタ血小板膜糖蛋白 (glycoprotein, GP) Ib および IIb/IIIa に対するマウスモノクローナル抗体を作製し、それら GP のレセプターとしての機能について検討したので報告する。

I. 方 法

重症型 von Willebrand 病ブタ¹⁾の洗滌血小板を抗原とし、BALB/c 系マウスに腹腔内投与後、脾細胞を NS-1 系マウス myeloma cell と融合し、ハイブリドーマを培養した。培養上清を固相化ブタ血小板を用いた enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA)²⁾にてスクリーニングし、陽性抗体について、血小板凝集能、¹²⁵I-von Willebrand factor (vWF) 結合能、¹²⁵I-フィブリノーゲン結合能に対する影響を検討した。さらに血小板膜表面糖鎖をで ³H 標識したブタ血小板を用い、SDS-PAGE にて対応膜糖蛋白抗原を分析した。

II. 成 績

1) 抗 GPIb 抗体: 得られた抗体のうち、リストセチン凝集抑制効果の最も強いものを選択し、PP 3-4C と名付けた。本抗体 (IgG 1) は濃度依存性にブタ血小板のリストセチン凝集を抑制し (図 1), 12 μ g IgG/ml の濃度で ¹²⁵I-vWF のリストセチン刺激ブタ血小板への結合を約80%阻害した。PP 3-4C を用いたアフィニティークロマトグラフィーの結果、本抗体は還元下分子量 140K, 非還元下 160K の糖蛋白と結合する事が明らかとなり、この糖蛋白がブタ血小板膜 GPIb に相当すると考えられた。

2) 抗 GPIIb/IIIa 抗体: PP 3-3A と名付けた抗体 (IgG 1) は、濃度依存性に、ADP, コラーゲンおよびトロンビン凝集を抑制し (図 2), 10 μ g IgG/ml の濃度で ¹²⁵I-フィブリノーゲンの ADP 刺激ブタ血小板への結合をほぼ完全に阻害した。また本抗体は ADP 刺激血小板への ¹²⁵I-vWF の結合も完全に抑制した。ア

Fig. 1 Effect of PP3-4C IgG on ristocetin-induced platelet agglutination. Gel-filtered porcine platelets (390 μ L, 3×10^8 /mL in modified Tyrode's buffer, pH 7.4) and purified porcine vWF (10 μ L, 4.8 μ g/mL final concentration) were incubated with 50 μ L of control IgG (TB 5-2; monoclonal antibody specific for mycobacterial antigen) or PP3-4C IgG for 3 min at 37°C prior to the addition of ristocetin (50 μ L, 1.7 mg/mL final concentration), and the time course of change in light transmission was monitored in an aggregometer.

フィニティークロマトグラフィーの成績では、本抗体は還元下分子量 115K および 100K, 非還元下 130K および 80K の糖蛋白と結合する事が明らかになった。

III. 考察および結論

出血時間の延長を呈し、リストセチン凝集の欠如を認める von Willebrand 病ブタが存在するなど、ブタは止血・血栓研究において有用な動物モデルであるが、その血小板膜レセプターとしての GP に関する報告はない。今回のモノクローナル抗体を用いた実験の結果、ブタ血小板にもヒトと同様、vWF レセプターとしての GPIb, またフィブリノーゲンおよびvWF のレセプターとしての GPIIb/IIIa の存在が明らかとなった。これら GP はヒトと構造および機能が類似しており³⁾⁴⁾、今回報告した抗体を用いブタをモデルとして *in vitro* および *in vivo* での実験が可能である。今後、止血・血栓機構における血小板の役割を研究する上でこれらの

Fig. 2 Effect of PP3-3A IgG on platelet aggregation. PRP ($400\ \mu\text{L}$, $3 \times 10^8/\text{mL}$) was incubated with $50\ \mu\text{L}$ of control IgG (TB 5-2) or PP3-3A IgG for 3 min at 37°C followed by the addition of agonist ($50\ \mu\text{L}$). Thrombin-induced platelet aggregation was performed using gel-filtered platelets.

抗体は有用であると考えられる。

文 献

- 1) Bowie, E.J.W., Fass, D.N., Owen, C.A., Jr.: Hemostatic effect of transfused Willebrand factor in porcine von Willebrand's disease. *Haemostasis*, **9**; 352~360, 1980.
- 2) Nel, J. D., Stevens, K.: A New method for the simultaneous quantitation of platelet-bound immunoglobulin (IgG) and complement (C3) employing an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) procedure. *Br. J. Haematol.*, **44**; 281~290, 1980.
- 3) Collier, B.S., Peerschke, E.I., Scudder, L.E., Sullivan, C.A.: Studies with a murine monoclonal antibody that abolishes ristocetin-induced binding of von Willebrand factor to platelets: additional evidence in support of GPIb as a platelet receptor for von Willebrand factor. *Blood*, **61**; 99~110, 1983.
- 4) Collier, B.S., Peerschke, E.I., Scudder, L.E., Sullivan, C.A.: A murine monoclonal antibody that completely blocks the binding of fibrinogen to platelets produces a thrombasthenic-like state in normal platelets and binds to glycoproteins IIb and/or IIIa. *J. Clin. Invest.*, **72**; 325~338, 1983.