◆原 著◆

サル血小板膜糖蛋白および凝集能に関する検討

鈴木正彦*, 川勝俊宏*, 永田博一*, 岩田弘滋*
 柳父睦政*, 曾我哲司*, 曾根尚明*, 野村昌作*
 粉川皓年*, 安永幸二郎*

Monkey Platelet Membrane Glycoproteins and Aggregation

Masahiko SUZUKI*, Toshihiro KAWAKATSU*, Hirokazu NAGATA*, Koji IWATA*
 Mutsumasa YANABU*, Tetsuji SOGA*, Naoaki SONE*, Shosaku NOMURA*
 Terutoshi KOKAWA* and Kojiro YASUNAGA*

Key words: human platelet, monkey platelet, glycoprotein, aggregation, monoclonal antibody

The monkey is classified as close to the human and is important as an experimental animal. The present study, a comparison of human and monkey platelet membrane glycoproteins and aggregation, was undertaken.

The major platelet membrane glycoprotein was similarly represented in humans and monkeys by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and PAS staining. Crossed immunoelectrophoresis showed that EDTA dissociated both human and monkey platelet GP IIb/IIIa complex. In monkey platelets, ADP-induced aggregation was slightly weaker than in humans. High concentrations of ristocetin were required to agglutinate monkey platelets. Human and monkey platelets were aggregated by collagen and thrombin in the same manner. Epinephrine did not induce aggregation in monkey platelets. All of five monoclonal antibodies against human platelet GP IIb/IIIa complex bound to monkey platelets, and inhibited monkey platelet aggregation induced by ADP and collagen. A monoclonal anti-human platelet GP Ib antibody which has no effect on either human platelet aggregation induced by thrombin or agglutination induced by ristocetin bound to monkey platelets. But an anti-GP Ib antibody which inhibits human platelet agglutination induced by ristocetin did not bind to monkey platelets. Both of two monoclonal antibodies against human CD9 antigen bound to monkey platelets and aggregated monkey platelets.

These results indicate that human and monkey platelets are similar in terms of antigenicity and function, especially GP IIb/IIIa complex. It is suggested that the monkey is a useful animal model for analysis of the effects of monoclonal antibody against human platelets in vivo.

* 関西医科大学第一内科〔〒570 大阪府守口市文園町1番地〕: The First Department of Internal Medicine, Kansai Medical University, Osaka, 570 Japan 受付 1990. 8. 10, 受理 1990. 1. 26.

はじめに

医学研究において実験に動物を用いる場合、ヒトにおけるさまざまな疾患や病態の解明あるいは治療法の検討が目的とされることが多い。実験動物の選択に際しては、その動物の入手方法や取り扱い方法が容易であるかどうかということも考慮されるが、目的とする臓器や細胞あるいはそれらを取りまく環境がヒトとどれだけ類似しているかということも重要な要素である。分類学上サルはヒトに最も近縁であり、形態学的にも生理学的にもあるいは生化学的にもヒトと類似している点が多いと言われている。しかし血小板研究の分野では、ブタ^{1)~5)}、イヌ^{6)~8)}、ウサギ^{9)~11)}などの血小板がよく用いられており、サル血小板に関する詳細な報告はない。そこで今回、サル血小板膜糖蛋白 (GP) および血小板凝集能に関し検討し、さらに抗ヒト血小板抗体のサル血小板に及ぼす影響についても検討した。

I. 材料および方法

1. 実験動物

実験動物として 2.5 ないし 6.0 kg のニホンザル 8 頭を用いた。

2. 抗ヒト血小板抗体

ヒト血小板抗体として、当教室で作製した 9 種のモノクローナル抗体を用いた。その内訳は、抗 GP IIb/IIIa 複合体抗体が 5 種類 (NNKY 1-32, 2-5, 2-6, 2-11 および 2-

18)^{12)~14)}、抗 GP Ib 抗体が 2 種類 (NNKY 5-4 および 5-5)¹²⁾¹⁴⁾、CD 9 抗体が 2 種類 (NNKY 1-19 および MALL 13)¹⁵⁾¹⁶⁾である。実験に際しては、各モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマより得られたマウス腹水を硫酸塩析法およびイオン交換法により精製して用いた。また一部の抗体は、精製した IgG 分画をペプシン消化することにより F(ab')₂ 分画を、またパパイニン消化することにより Fab 分画を作製し実験に用いた。

3. SDS-PAGE

チトラート加血より得た多血小板血漿 (PRP) を ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)-phosphate buffered saline (PBS) (一) で 2 回洗浄後、reduced sample buffer にて溶解した。引き続き、Laemmli¹⁷⁾ の方法にて SDS-PAGE を行い、Fairbanks ら¹⁸⁾の方法にて PAS 染色し、Shimadzu CS-930 にてスキャンした。

4. 交差免疫電気泳動

交差免疫電気泳動 (CIE) による解析は Hagen ら¹⁹⁾の方法に準じて行った。二次元の抗体はヒト全血小板で免疫して得られた家兎抗血清を用いた。泳動後の沈降線は Fairbanks ら¹⁸⁾の方法で Coomassie brilliant blue 染色を行い観察した。さらに、5 mM EDTA にて処理した血小板についても同様の解析を行った。

5. Flow cytometry

Nomura ら¹⁴⁾の方法により、Flow cytometry を用いて、当教室で作製したヒト

Fig. 1 Densitometric profile of human and monkey platelet glycoproteins after SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and PAS staining.

Fig. 2 Crossed immunoelectrophoresis of human and monkey platelet membranes. (A) human platelet without EDTA. (B) human platelet incubated with 5 mM EDTA for 30 min at 37°C. (C) monkey platelet without EDTA. (D) monkey platelet incubated with 5 mM EDTA for 30 min at 37°C. 1: fibrinogen, 2: GP IIb/IIIa complex, 3: GP Ib, 4: GP IIb, 5: GP IIIa.

血小板に対する9種のモノクローナル抗体のサル血小板に対する結合性を検討した。

6. 血小板凝集能

ADP, コラーゲン, エピネフリンおよびリストセチン凝集は PRP を用いて血小板凝集計 (NKK Hematracer 1) で測定した。トロンビン凝集は, PRP を $1\mu\text{M}$ PGE_1 を含む Hepes-Tyrode buffer で2回洗浄し, Hepes-Tyrode buffer に再浮遊させ $30 \times 10^4/\mu\text{l}$ に調整し, 同じく血小板凝集計で測定した。さらに, Flow

cytometry にてサル血小板と結合性を示した抗ヒト血小板抗体の, サル血小板凝集に及ぼす影響を検討した。

II. 結 果

1. SDS-PAGE

主要な GP である Ib・IIb・IIIa はヒトおよびサル血小板において, ほぼ同様の PAS 染色パターンを示した (図1)。

Fig. 3 Fluorescence histogram of monoclonal anti human platelet antibodies for monkey platelets

2. CIE

ヒトおよびサル血小板の CIE 像は、ほぼ同様の沈降線を示し (図 2A, C), また 5 mM EDTA 添加により, 双方の GP IIb/IIIa 複合体は解離した (図 2B, D)。

3. Flow cytometry

サル血小板は, 5 種の抗ヒト GP IIb/IIIa 複合体抗体すべてと良好な結合性を示した。ヒト GP Ib に対するモノクローナル抗体のうち NNKY 5-4 と結合したが, NNKY 5-5 とは結合しなかった。2 種の CD 9 抗体に対しては良好な結合性を示した (図 3)。

4. 血小板凝集能

サル血小板は低濃度の ADP によりヒト血小

板と同様の一次凝集を示した。8 頭中 3 頭のサル血小板で $4 \mu\text{M}$ ADP により一次凝集のみが観察され, 二次凝集を惹起させるためには $10 \mu\text{M}$ の ADP を要した。コラーゲンおよびトロンビンにより, ヒト血小板と同様の凝集曲線が観察された。エピネフリン凝集はいずれのサル血小板においても認めなかった。終濃度 1.5 mg/ml のリストセチンでは凝集は惹起されず, 2.4 mg/ml のリストセチンによりヒト血小板と同様の凝集曲線が観察された (図 4)。この時, フィブリノーゲンの沈降はみられなかった。

5. 抗ヒト血小板抗体のサル血小板凝集に及ぼす影響 (表 1)

抗ヒト GP IIb/IIIa 複合体抗体 NNKY 1-32

Fig. 4 Monkey platelet aggregation curves

Table 1 Effects of monoclonal anti human platelet antibodies on monkey platelet aggregation

Monoclonal antibody	Epitopeba	Induction of platelet aggregation	Inhibition of platelet aggregation				
			ADP	Collagen	Thrombin	Ristocetin	MALL13
NNKY 1-32	GP IIa/IIIb complex	—	++	++	+	+	++
NNKY 2-5	GP IIb/IIIa complex	—	++	++	+	+	++
NNKY 2-6	GP IIb/IIIa complex	—	+	+	+	+	+
NNKY 2-11	GP IIb/IIIa complex	—	+	+	+	—	+
NNKY 2-18	GP IIb/IIIa complex	—	+	+	+	—	+
NNKY 5-4	GP I b	—	—	—	—	—	—
NNKY 1-19	CD9 antigen	—~↑*	—	—	—	—	/
MALL 13	CD9 antigen	↑	—	—	—	—	/

↑ : Platelet aggregation, ++ : complete inhibition, + : partial inhibition, — : no effect,

* : NNKY 1-19 induced four of eight monkeys platelet aggregation.

および2-5は、サル血小板のADPおよびコラーゲン凝集を完全に、トロンビンおよびリストセチン凝集を部分的に抑制した(図5)。抗ヒトGP IIb/IIIa複合体抗体NNKY 2-6、2-11および2-18は、サル血小板のADPおよびコラーゲン凝集に対して部分的抑制を示した。

抗ヒトGP Ib抗体NNKY 5-4は、サル血小板のトロンビンおよびリストセチン凝集に対して影響を与えなかった。

CD9抗体NNKY 1-19は8頭中4頭のサル血小板を凝集させた。CD9抗体MALL 13

はすべてのサル血小板に対して凝集惹起作用を示した。またCD9抗体によるサル血小板凝集は、NNKY 1-32および2-5により完全に、NNKY 2-6、2-11および2-18により部分的に抑制された(図6)。

NNKY 1-32はF(ab')₂分画やFab分画でもIaG分画と同様に、サル血小板のADP、コラーゲンおよびCD9抗体による凝集を完全に、トロンビンおよびリストセチン凝集を部分的に抑制した。

Fig. 5 Effects of NNKY 1-32 on monkey platelet aggregation

III. 考 案

サルは哺乳類の中でも特にヒトに近い種であり実験動物として貴重な存在である。血小板研究の分野でサルを用いる場合、ヒト血小板との類似性や相違点を明らかにすることは重要であろう。そこで今回、サル血小板の抗原性や凝集能をヒト血小板と比較検討した。

SDS-PAGE や CIE による分析では、ヒト血小板において主要な役割をはたす GPIIb・IIIa は、サル血小板においてもほぼ同様の検査成績を示した。また、EDTA 処理による GP IIb/IIIa 複合体の解離は、ヒト血小板と同様にサル血小板においても観察された。

今回、抗ヒト GP IIb/IIIa 複合体抗体として用いた5種類のモノクローナル抗体のうち、NNKY1-32, 2-5 および 2-6 は、ヒト血小板の ADP, コラーゲンおよびエピネフリン凝集を完全に抑制する¹⁴⁾ことから、GP IIb/IIIa 複合体上のフィブリノーゲン結合部位もしくはそのご

く近傍を認識していると考えられる。一方、NNKY2-11 および 2-18 は、ヒト血小板の ADP, コラーゲンおよびエピネフリン凝集に対し部分抑制を示すことから、GP IIb/IIIa 複合体上のフィブリノーゲン結合部位からわずかに離れた位置を認識していると考えられる。これらの抗体すべてが、サル血小板と良好な結合性を示し、さらにサル血小板凝集に対してもヒト血小板凝集に対してとほぼ同様の抑制作用を示したことから、血小板凝集において重要な役割をはたす GP IIb/IIIa 複合体上のフィブリノーゲン結合部位およびその近傍には、構造的にも機能的にもヒトとサルの間に多くの共通点があることが推測された。

2 種類のヒト GP Ib に対するモノクローナル抗体のうち、サル血小板と結合した NNKY5-4 は、ヒト血小板のトロンビン凝集にもリストセチン凝集にも影響を与えないが¹⁴⁾、サル血小板と結合しなかった NNKY5-5 はヒト血小板のリストセチン凝集を完全に抑制する¹⁴⁾。また、

Fig. 6 MALL13 induced monkey platelet aggregation and its inhibition by NNKY 1-32

サル血小板は2.4 mg/ml と高濃度のリストセチンによりはじめて凝集する。このことから、サル von Willebrand 因子 (vWF) に関しては検討していないが、ヒト血小板とサル血小板のvWF 結合部位には、構造的あるいは機能的な相違があることが推測された。なお、高濃度のリストセチンをサル PRP に加えた際に観察された凝集は、ヒト血小板のリストセチン凝集と同様に、肉眼的に大きな凝集塊がみられフィブリノーゲンの沈降を認めなかったこと、および、抗 GP IIb/IIIa 複合体抗体により部分的抑制を受けることより、非特異的な反応ではなくvWF と GP Ib の結合により惹起された agglutination であると推測される。

今回用いた CD9 抗体のうち、NNKY1-19 はヒト血小板を免疫原としており、ヒト血小板に対しては凝集惹起作用を有している¹⁵⁾が、サル血小板に対する凝集惹起作用は半数のサルについてのみ認められた。一方、MALL13 はヒト ALL 細胞を免疫原としており、ヒト血小板に対しては破壊的に作用する特異な抗体である¹⁶⁾が、サル血小板に対しては凝集惹起作用を示し

た。この2種類の抗体が、ヒトあるいはサル血小板に対して異なった作用を示す機序に関しては今後検討していかなければならないが、MALL13 の方がより強く血小板活性化に働くのではないかと推測される。いずれにしても、サル血小板もヒト血小板と同様に、ある種の CD9 抗体により活性化されることが示された。

今回の成績から、サル血小板は構造的にも機能的にもヒト血小板と多くの共通点を持つことが確認され、またヒト血小板凝集に影響を及ぼすモノクローナル抗体がサル血小板に対しても同様の効果をきたしうることが明らかになった。このことから、血小板研究の分野において、特に *in vivo* でモノクローナル抗体が血小板に及ぼす影響を検討する際にサルは実験動物として有用であると考えられた。

本論文の要旨は、第12回日本血栓止血学会(平成元年12月 大阪)において発表した。

文 献

- 1) Owen C.A., Bowie E.J.W., Zollman P.E., Fass D. N. and Gordon H.: Carrier of porcine von Willebrand's disease. *Amer. J. Vet. Res.*, **35**: 245~248, 1971.
- 2) Daniels T.M., Fass D.N., White J.G. and Bowie J. W.: Platelet storage pool deficiency in pins. *Blood*, **67**: 1043~1047, 1986.
- 3) Fukuoka, Y. and Hugli, T.E.: Demonstration of a specific C3a receptor on guinea pig platelets. *J. Immunol.*, **140**: 3496~3501, 1988.
- 4) Takami H., Nichols W L., Kaese S.E., Miller R. S., Katzmman J.A. and Bowie E.J.W.: Monoclonal antibodies against porcine platelet membrane glycoproteins Ib and IIb/IIIa. *Blood*, **72**: 1740~1747, 1988.
- 5) Bochner F., Siebert D.M., Rodgers S.E., McIntosh G.H., James M.J. and Lloyd J.V.: Measurement of aspirin concentration in portal and systemic blood in pigs: effect on platelet aggregation, thromboxane and prostacyclin production. *Thromb. Haemost.*, **61**: 211~216, 1989.
- 6) Collier B.S. and Scudder L.E.: Inhibition of dog platelet function by *in vivo* infusion of F(ab')₂ fragments of a monoclonal antibody to the

- platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor. *Blood*, **66**: 1456~1459, 1985.
- 7) Collier B.S., Folts J.D., Scudder L.E. and Smith S. R.: Antithrombotic effect of a monoclonal antibody to the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in an experimental animal model. *Blood*, **68**: 783~786, 1986.
- 8) 曾根尚明, 山口和之, 鈴木正彦, 柳父睦政, 曾我哲司, 野村昌作, 永田博一, 粉川皓年, 安永幸二郎: イヌ血小板との共通抗原を認識する抗ヒト血小板モノクローナル抗体について. *日栓会誌*, **1**: 482~488, 1990.
- 9) Silver M.J., Hoch W., Kocsis J.J., Ingberman C.M. and Smith J.B.: Arachidonic acid causes sudden death in rabbits. *Science*, **183**: 1085~1087, 1974.
- 10) Harfenist E.J., Packham M.A. and Mustard J.F.: Expression of fibrinogen on the surface of ADP-stimulated platelets: Comparison of human and rabbit platelets. *Thromb. Haemost.*, **59**: 319~322, 1988.
- 11) 鈴木正彦, 永田博一, 柳父睦政, 曾我哲司, 大賀成敏, 曾根尚明, 野村昌作, 粉川皓年, 安永幸二郎: CD9 抗体の家兎への全身投与の影響. *日血会誌*, **53**: 1222~1228, 1990.
- 12) 野村昌作, 永田博一, 北田親穂, 曾根尚明, 織田一弘, 粉川皓年, 安永幸二郎, 中島鉄夫, 遠藤啓吾: Flow Cytometry を用いた血小板無力症及び Bernard-Soulier 症候群の解析. *臨床血液*, **28**: 377~385, 1987.
- 13) Nomura S., Nagata H., Oda K., Kokawa T. and Yasunaga K.: Effects of EDTA on the membrane glycoprotein IIb-IIIa complex —analysis using flow cytometry—. *Thromb. Res.*, **47**: 47~58, 1987.
- 14) Nomura S., Nagata H., Sone N., Oda K., Kokawa T. and Yasunaga K.: Analysis of platelet antigen for antiplatelet antibodies in idiopathic thrombocytopenic purpura using flow cytometry. *Acta Haematol. Jpn.*, **51**: 118~129, 1988.
- 15) 永田博一, 野村昌作, 曾根尚明, 北田親穂, 平居啓治, 橋爪 誠, 織田一弘, 粉川皓年, 安永幸二郎: CD9 (p24) 抗原の機能的役割について. *血液と脈管*, **18**: 336~339, 1987.
- 16) Nagata H., Nomura S., Sone N., Suzuki M., Kokawa T. and Yasunaga K.: A new monoclonal antibody, MALL13, which induces platelet activation and cytolysis. *Acta Haematol. Jpn.*, **53**: 1156~1171, 1990.
- 17) Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680~685, 1970.
- 18) Fairbanks G., Steck T.L., Wallach D.F.H.: Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. Deposition of the major proteins in isolated erythrocyte membrane. Proteolytic dissection. *Biochemistry*, **10**: 2606~2624, 1971.
- 19) Hagen I., Bjerrum O.J., Solum N.O.: Characterization of human platelet proteins solubilized with Triton X-100 and examined by crossed immunoelectrophoresis. *Eur. J. Biochem.*, **99**: 9~22, 1979.