◆原 著◆

抗ヒト GP IIb/IIIa 複合体抗体のサル生体内での影響

鈴木正彦* 川勝俊宏* 永田博一*
岩田弘滋* 野村昌作* 粉川皓年*
安永幸二郎*

Effects of Monoclonal Antibody Against the Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Complex on Monkey Platelet In Vivo

Masahiko SUZUKI, Toshihiro KAWAKATSU, Hirokazu NAGATA,
Koji IWATA, Shosaku NOMURA, Terutoshi KOKAWA
and Kojiro YASUNAGA

Key words: monoclonal antibody, GP IIb/IIIa complex, intravenous injection,
monkey

To assess the effects of a monoclonal antibody against the human platelet glycoprotein (GP) IIb/IIIa complex in vivo, the murine monoclonal antibody NNKY 1-32 was injected into Japanese monkeys.

All of the IgG, F(ab')₂ and Fab fragments of NNKY 1-32 completely inhibited monkey platelet aggregation induced by ADP or collagen in vitro.

Four monkeys received 0.4 and 1.0 mg/kg of NNKY 1-32 F(ab')₂ or Fab fragments, while another four received 0.4 mg/kg of NNKY 1-32 IgG fragments. In two monkeys given the IgG fragments of the antibody, platelet counts decreased remarkably. And in two other monkeys, transient thrombocytopenia was observed. In all monkeys, bleeding time was prolonged, platelet aggregation was suppressed, and the antibodies were associated with the platelets for up to 72 hours. Compared with the Fab fragments of the antibody, the F(ab')₂ fragments strongly suppressed platelet function. In general, the time course and dose-dependence of the effects of the injected antibodies were correlated with bleeding time, platelet aggregation and platelet-bound antibody titers.

This study indicated that a murine monoclonal antibody that inhibits platelet aggregation in vitro could suppress platelet function in vivo without inducing spontaneous hemorrhage or marked thrombocytopenia.

* 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, 570 Japan. 受付: 1991.2.2, 受理: 1991.4.5

はじめに

モノクローナル抗体の応用により、血小板活性化の過程における血小板膜糖蛋白 (GP) の役割が明らかにされつつある^{1)~4)}。中でも、GP IIb/IIIa 複合体は種々のアゴニストの刺激によりフィブリノーゲンの結合部位を発現するとされており⁵⁾⁶⁾、血小板凝集にとって重要な役割を担っている。また、この抗原を認識するある種のモノクローナル抗体により、*in vitro* でフィブリノーゲンの血小板への結合を阻害し、血小板凝集を完全に抑制しうることが知られている^{1)7)~10)}。

近年、ヒト血小板に対するモノクローナル抗体の全身投与による影響も報告されているが^{11)~14)}、今回我々はヒトおよびサル双方の血小板と結合し凝集抑制作用を有するモノクローナル抗 GP IIb/IIIa 複合体抗体 NNKY 1-32 の IgG, F(ab')₂ および Fab 分画のサル生体内での影響を検討した。

I. 材料と方法

1. 実験動物

体重 3.0 ないし 6.0 kg のニホンザル 20 頭を用いた。

2. モノクローナル抗体

当教室でヒト血小板を免疫原として作製した抗 GP IIb/IIIa 複合体抗体 NNKY 1-32⁹⁾¹⁰⁾ を産生するハイブリドーマより得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 IgG 分画を得た。さらにこの IgG 分画をペプシン消化することにより F(ab')₂ 分画を、またパパイン消化することにより Fab 分画を作製し実験に用いた。なお、抗体の各分画を動物に投与する際には生理食塩液にて 1.0 mg/ml に希釈した。

3. NNKY 1-32 のサル血小板凝集に及ぼす影響 (*in vitro* 試験)

チトラート加血より得た多血小板血漿 (PRP) に NNKY 1-32 IgG, F(ab')₂ あるいは Fab 分画を加え 37°C で 5 分間 incubate し、ADP (10 μM) およびコラーゲン (4 μg/ml) による凝集曲線を血小板凝集計 (NKK Hemat-

racer 1) を用いて観察した。

4. NNKY 1-32 の生体内での影響

NNKY 1-32 IgG, F(ab')₂ および Fab 分画を後肢伏在静脈より投与し、経時的に対側の静脈より採血し、血小板数 (視算法)、出血時間 (Duke 法)、血小板凝集能 (ADP 10 μM およびコラーゲン 4 μg/ml)、血小板表面抗体量および血漿中抗体量を測定した。但し、血小板数が $8.0 \times 10^4/\mu l$ 以下に減少した例は除外した。血小板凝集能はチトラート加血より得た PRP を用いて血小板凝集計で測定し、抗体投与前に対する最大凝集率の百分率比で表した。血小板表面抗体量は既報の方法¹⁰⁾ で Flow cytometry を用いて測定し、下記のように定義される相対的蛍光強度 (SIGMA) で表した。

$$\text{SIGMA} = [\text{Mean channel of positive region} \times \text{Total platelet counts of positive region}] / 10^3$$

血漿中抗体量は既報の方法¹⁰⁾ で paraformaldehyde 固定した抗体投与前の血小板と各血漿を室温で 60 分間反応させ、これに結合した抗体量を Flow cytometry で測定し SIGMA で表した。

II. 結 果

1. NNKY 1-32 のサル血小板凝集に及ぼす影響 (*in vitro* 試験)

NNKY 1-32 IgG, F(ab')₂ および Fab 各分画はサル血小板の ADP およびコラーゲン凝集を完全に抑制した。図 1 に代表的な血小板凝集曲線を示したが、血小板凝集を完全に抑制するために要した抗体の終濃度は各分画間に差を認めず、また個体差も殆ど認めなかった。

2. NNKY 1-32 の生体内での影響

1) 血小板数 (表 1)

NNKY 1-32 IgG 分画 0.4 mg/kg の投与により、4 頭中 2 頭のサルに $8.0 \times 10^4/\mu l$ 以下の著明な血小板数減少を認めたため以後の検討から除外した。また他の 2 頭においても一過性の血小板数減少を認めた。F(ab')₂ 分画および Fab 分画の投与では血小板数に大きな変動をきたさなかった。

2) 出血時間 (表 2)

Fig. 1 Effects of NNKY 1-32 on monkey platelet aggregation (in vitro study)

Table 1 Effect of injected antibodies on platelet count

		Platelet count ($\times 10^4/\mu l$)						
Dose (mg/kg)	n	Pre	1hr	2hr	8hr	24hr	72hr	168hr
NNKY 1-32 IgG								
0.4	2	29.8*	13.6*	16.8*	15.9*	19.6*	37.1*	
NNKY 1-32 F(ab') ₂								
0.4	4	31.2± 7.8	29.4± 8.9	29.3± 7.2	30.8± 8.2	26.6± 6.3	30.2± 9.0	
1.0	4	30.3± 6.2	33.0± 5.4	33.3± 6.9	28.8± 6.8	33.9± 4.2	30.8± 5.1	29.7± 3.9
NNKY 1-32 Fab								
0.4	4	29.9± 6.6	32.2± 7.9	31.5± 5.9	27.3± 5.0	30.0± 6.0	29.9± 4.6	
1.0	4	33.9± 3.2	33.5± 4.0	32.5± 2.3	34.2± 4.4	30.0± 2.7	31.3± 3.4	34.7± 6.6

All values are mean $\pm$ SD unless otherwise indicated.

* Average of two observations.

NNKY 1-32 IgG, F(ab')₂ および Fab 分画はいずれも生体内で出血時間延長作用を示した。IgG 分画に関しては検討数が少ないため評価しがたいが、同量の抗体を投与した場合 Fab 分画に比して F(ab')₂ 分画の方がより強くかつ長期間出血時間延長作用を示す傾向にあった。

3) 血小板凝集能 (表 3・4 および図 2)

NNKY 1-32 IgG 分画 0.4 mg/kg の投与により 2 時間後まで ADP およびコラーゲン凝集は完全に抑制され、その後徐々に回復した。NNKY 1-32 F(ab')₂ 分画 0.4 mg/kg の投与により ADP 凝集は 2 時間後まで、コラーゲン凝集は 8 時間後まで完全に抑制された。

Table 2 Effect of injected antibodies on bleeding time

Dose (mg/kg)	Bleeding time (min)						
	Pre	1hr	2hr	8hr	24hr	72hr	168hr
NNKY 1-32 IgG							
0.4	3.5*	7.0*	7.3*	8.3*	7.5*	5.5*	
NNKY 1-32 F(ab') ₂							
0.4	3.0±0.5	5.5±1.3	7.5±1.3	4.2±0.3	3.7±1.3	4.2±0.8	
1.0	2.8±0.5	9.5±1.9	9.2±2.4	9.3±2.2	8.9±3.0	5.1±1.2	3.0±0.9
NNKY 1-32 Fab							
0.4	3.4±0.5	5.0±1.3	4.7±0.8	4.3±1.7	3.5±1.0	3.6±1.0	
1.0	3.4±0.6	8.4±0.9	8.1±0.9	9.0±3.0	6.4±1.5	3.8±1.3	3.9±1.1

All values are mean±SD in four animals unless otherwise indicated.

* Average of two observations.

Table 3 Extent of ADP-induced platelet aggregation after antibody injection

Dose (mg/kg)	Percent of maximum light transmission (Tmax) ADP (10 μM)						
	Pre	1hr	2hr	8hr	24hr	72hr	168hr
NNKY 1–32 IgG							
0.4	100*	0*	0*	10*	39*	88*	
NNKY 1–32 F(ab') ₂							
0.4	100	0	0	3±2	28±13	84±19	
1.0	100	0	0	0	0	34±22	86±19
NNKY 1–32 Fab							
0.4	100	5±3	45±27	64±23	81±14	95±7	
1.0	100	0	0	12±8	23±14	97±7	99±4

All values are mean±SD in four animals unless otherwise indicated.

* Average of two observations.

Table 4 Extent of collagen-induced platelet aggregation after antibody injection

Dose (mg/kg)	Percent of maximum lighth transmission (Tmax) Collagen (4μg/ml)						
	Pre	1hr	2hr	8hr	24hr	72hr	168hr
NNKY 1-32 IgG							
0.4	100*	0*	0*	4*	27*	74*	
NNKY 1-32 F(ab') ₂							
0.4	100	0	0	0	6±5	53±29	
1.0	100	0	0	0	0	6±4	52±39
NNKY 1-32 Fab							
0.4	100	0	0	6±4	36±21	95±11	
1.0	100	0	0	0	0	54±24	94±10

All values are mean±SD in four animals unless otherwise indicated.

* Average of two observations.

NNKY 1-32 F(ab')₂ 分画 1.0 mg/kg の投与により ADP 凝集, コラーゲン凝集ともに 24 時間後まで完全抑制を受けた。NNKY 1-32 Fab 分画 0.4 mg/kg の投与では, ADP 凝集は 1 時間後でもわずかに認めたが, コラーゲン凝

集は 2 時間後まで完全に抑制された。NNKY 1-32 Fab 分画 1.0 mg/kg の投与により, ADP 凝集は 2 時間後まで, コラーゲン凝集は 24 時間後まで完全に抑制された。

4) 血小板表面抗体量 (表 5 および図 2)

Fig. 2 Typical aggregation curves (upper panel) and fluorescence histogram of platelet-bound antibody (lower panel) from monkeys given 1.0 mg/kg NNKY 1-32 Fab fragments

Table 5 Platelet-bound antibody titer after antibody injection

Dose (mg/kg)	Platelet-bound antibody titer (SIGMA)						
	Pre	1hr	2hr	8hr	24hr	72hr	168hr
NNKY 1-32 IgG							
0.4	30*	1031*	995*	846*	540*	160*	
NNKY 1-32 F(ab') ₂							
0.4	28±14	965±43	834±80	634±194	520±268	311±91	
1.0	39±18	1201±138	1199±148	1269±201	1009±99	902±67	57±21
NNKY 1-32 Fab							
0.4	53±40	716±201	680±241	623±238	302±114	203±131	
1.0	40±21	1188±129	1166±51	1048±115	938±57	694±194	65±22

All values are mean±SD in four animals unless otherwise indicated.

* Average of two observations.

NNKY 1-32 IgG, F(ab')₂ および Fab のいずれの分画も抗体投与 72 時間後まで血小板表面に検出されたが, Fab 分画に比して F(ab')₂ 分画の方が長期間高いタイターを保つ傾向にあった。

5) 血漿中抗体量 (表 6)

NNKY 1-32 IgG 分画 0.4 mg/kg の投与に

おいては 2 時間後まで血漿中抗体量は高値を示したが, 以後急速に減少した。NNKY 1-32 F(ab')₂ 分画 0.4 mg/kg の投与においては 2 時間後まで, 同じく F(ab')₂ 分画 1.0 mg/kg の投与では 8 時間後まで血漿中抗体量は高値を示した。NNKY 1-32 Fab 分画 0.4 mg/kg の投与により 1 時間後まで, 同じく Fab 分画 1.0

Table 6 Circulating antibody titer after antibody injection

Dose (mg/kg)	Circulating antibody titer (SIGMA)						
	Pre	1hr	2hr	8hr	24hr	72hr	168hr
NNKY 1-32 IgG							
0.4	44*	1038*	997*	295*	153*	59*	
NNKY 1-32 F(ab') ₂							
0.4	31±11	877±126	722±152	114±83	55±16	39±18	
1.0	42±21	1197±180	1063±214	965±134	92±23	53±28	44±31
NNKY 1-32 Fab							
0.4	55±29	838±186	203±57	182±96	129±102	72±41	
1.0	44±20	917±289	764±184	211±73	80±37	82±43	35±14

All values are mean±SD in four animals unless otherwise indicated.

* Average of two observations.

mg/kg の投与では2時間後まで血漿中抗体量は高値を示し、以後急速に減少した。

III. 考 案

サルは分類学上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。また、ニホンザルは血栓止血機構がヒトと非常に類似していることが報告されている¹⁵⁾¹⁶⁾。特に我々が既に報告しているように、ヒト血小板の GP Ib, GP IIb/IIIa 複合体あるいは CD9 抗原を認識するモノクローナル抗体がニホンザル血小板にも結合し、これらのモノクローナル抗体が血小板凝集に与える影響にはヒトとニホンザルの間に多くの共通点が存在する¹⁶⁾。このことから、ヒト血小板に対するモノクローナル抗体の生体内での影響を検討する際にニホンザルは有用な実験動物になりうると考えられた。

NNKY 1-32 F(ab')₂ 分画あるいは Fab 分画の投与を受けた動物においては血小板数に大きな変動を認めなかったが、IgG 分画の投与により4頭中2頭に著明な血小板数減少を、他の2頭にも一過性の血小板数減少を認めた。ヒト GP IIb/IIIa 複合体に対するモノクローナル抗体の生体内での影響に関してはこれまでに Collier ら¹¹⁾¹²⁾ および Hanson ら¹³⁾ の報告がある。いずれの報告においても抗体が生体内でも強い抗血小板作用を示すという点では一致しているが、血小板数に与える影響に関しては異なった結果が報告されている。そこで IgG 分画

や F(ab')₂ 分画だけでなく Fab 分画に関しても検討したところ、抗体や実験動物の種類は異なるが、我々の成績からは抗体の Fc 部分を介した網内系による貪食が抗血小板抗体投与による血小板数減少において重要な役割を果たしていると考えられた。

出血時間は血小板機能の評価法としてはあまり鋭敏な検査方法ではない。しかし、他の検査法は採血時の刺激や抗凝固剤の添加などの影響により必ずしも生理的な状態を反映しているとは言えず、また血小板凝集能の検査に今回のように比濁法を用いると遠心操作やスターリングなどの非生理的な刺激が加わり、もし血漿中に抗体が残存しておればさらに血小板と結合し検査結果を不正確にする可能性もある。ところが今回の成績をみると、出血時間と血小板凝集能および血小板表面抗体量はよく相関しており、これらの検査がモノクローナル抗 GP IIb/IIIa 複合体抗体の生体内での効果を良く反映していると考えられた。

NNKY 1-32 IgG, F(ab')₂ あるいは Fab 分画のいずれも生体内でも強い血小板凝集抑制作用を短時間内に表した。NNKY 1-32 IgG 分画の場合は血小板凝集能を測定できた例でもある程度の血小板数減少を伴っておりまた検討数も少ないため他の分画との比較は困難であるが、Fab 分画と比較すると F(ab')₂ 分画はより強くかつ長期間血小板凝集抑制作用を示した。in vitro の検討ではサル血小板凝集を完全に抑制するために要した抗体の終濃度には IgG 分画、

F(ab')₂ 分画および Fab 分画の間に差は認められなかったことから, in vivo での抗体各分画のサル血小板に対する親和力に関しては不明ではあるが, 生体内での血小板凝集抑制作用における F(ab')₂ 分画と Fab 分画の間の差は主として抗体が血漿中にとどまる時間に影響されると考えられる。また, 抗体が血漿中から除去されるまでの時間差は抗体の分子量の違いによると推測される。

近年, 抗 GP IIb/IIIa 複合体抗体の生体内においても強力かつ迅速に効果を発現する抗血小板作用が注目されている^{11)~13)17)~19)}。今回我々が用いた NNKY 1-32 を含めてこれらの抗体はすべてマウス由来であり単純に臨床応用を考えるわけにはいかず, またサルやイヌなどの実験動物にとっても異種蛋白であり抗体そのものが抗原性をもちうるであろう。この点を考慮すると, 今後さらにこれらの抗体の生体内での抗血小板作用を検討していくためには, 著明な血小板数減少をきたしうる IgG 分画はもちろん F(ab')₂ 分画よりも, 分子量も小さく血漿からすばやく除去される Fab 分画の方が有用であると考えられた。

結 語

in vitro で血小板凝集抑制作用を持つモノクローナル抗 GP IIb/IIIa 複合体抗体 NNKY 1-32 は in vivo でも強い抗血小板作用を示した。

抗体の Fc 部分を除去することにより抗血小板抗体による血小板数減少を防ぐことができた。

NNKY 1-32 F(ab')₂ 分画は Fab 分画に比してより強いまた長期間続く抗血小板作用を示した。

文 献

- McEver R.P., Baenziger M.L., Majerus P.W.: Isolation and quantitation of the platelet membrane glycoprotein deficient in thrombathenia using a monoclonal hybridoma antibody. *J. Clin. Invest.*, **66**: 1311~1318, 1980.
- Montgomery R.R., Kunicki T.J., Taves C., Pidad D., Corcoran M.: Diagnosis of Bernard-Soulier syndrome and Glanzmann's thrombathenia with a monoclonal assay on whole blood. *J. Clin. Invest.*, **71**: 385~389, 1983.
- Mickelson A.D., Barnard M.R.: Thrombin-induced changes in platelet membrane glycoproteins Ib, IX, and IIb-IIIa complex. *Blood*, **70**: 1673~1678, 1987.
- 野村昌作, 永田博一, 柳父睦政, 鈴木正彦, 曾我哲司, 大賀成敏, 近藤晃司, 曾根尚明, 北田親穂, 北島弘之, 粉川皓年, 安永幸二郎: トロンビン凝集における血小板表面構造の検討. *日血会誌*, **52**: 895~905, 1989.
- Nachman R.L., Leung L.L.K.: Complex formation of platelet membrane glycoprotein IIb and IIIa with fibrinogen. *J. Clin. Invest.*, **69**: 263~269, 1982.
- Gogstad G.O., Brosstad F., Krutnes M-B., Hagen I., Solum N.O.: Fibrinogen binding protein of the human platelet glycoprotein IIb-IIIa complex: A study using crossed radio immunoelectrophoresis. *Blood*, **60**: 663~671, 1982.
- Coller B.S., Peerschke E.I., 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**: 325~328, 1983.
- Pidard P., Montgomery R.R., Bennett J.S., Kunicki T.J.: Interaction of AP-2, a monoclonal antibody specific for the human platelet glycoprotein IIb/IIIa complex with intact platelets. *J. Biol. Chem.*, **258**: 12582~12586, 1983.
- Nomura S., Nagata H., Oda K., Kokawa T., Yasunaga K.: Effects of EDTA on the membrane glycoproteins IIb-IIIa complex—Analysis using flow cytometry—. *Thromb. Res.*, **47**: 47~58, 1987.
- Nomura S., Nagata H., Sone N., Oda K., Kokawa T., Yasunaga K.: Analysis of platelet antigen for anti-platelet antibodies in idiopathic thrombocytopenic purpura using flow cytometry. *Acta. Haematol. Jpn.*, **51**: 118~129, 1988.
- Coller B.S., 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.
- Coller B.S., Folts J.D., Scudder L.E., 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.
- Hanson S.R., Pareti F.I., Ruggeri Z.M., Marzec

- U.M., Kunicki T.J., Montgomery R.R., Zimmerman T.S., Harker L.A.: Effects of monoclonal antibodies against the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex on thrombosis and hemostasis in the baboon. *J. Clin. Invest.*, **81**: 149~158, 1988.
- 14) 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.
- 15) Suzuki K., Egawa H., Hashimoto S.: Comparative studies of coagulative and fibrinolytic faculties between the japanese monkey and the human. *Thrombos. Haemostas.*, **37**: 233~242, 1977.
- 16) 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: サル血小板膜糖蛋白および凝集能に関する検討. *日栓会誌*, **2**: 128~135, 1991.
- 17) Yasuda T., Gold H.K., Fallon J.T., Leinbach R. C., Guerrero J.L., Scudder L.E., Kanke M., Shealy D., Ross M.J., Collen D., Collier B.S.: Monoclonal antibody against the platelet glycoprotein (GP) IIb/IIIa receptor prevents coronary artery reocclusion after reperfusion with recombinant tissue-type plasminogen activator in dogs. *J. Clin. Invest.*, **81**: 1284~1291, 1988.
- 18) Mickelson J.K., Simpson P.J., Cronin M., Homeister J.W., Laywell E., Kitzen J., Lucchesi B.R.: Anti-platelet antibody (7E3F(ab')₂) prevents thrombosis after recombinant tissue-type plasminogen activator-induced coronary artery thrombolysis in a canine model. *Circulation*, **81**: 617~627, 1990.
- 19) Collier B.S., Scudder L.E., Berger H.J., Iulucci J. D.: Inhibition of human platelet function in vivo with a monoclonal antibody with observation on the newly dead as experimental subjects. *Ann. Intern. Med.*, **15**: 635~638, 1988.
-