



Title	Demonstration of the heterogeneity of epitopes of the platelet-specific alloantigen, Baka
Author(s)	武, 弘典
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37369
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・（本籍）	たけ 武	ひろ 弘	のり 典
学位の種類	医	学	博　士
学位記番号	第	9 4 8 9	号
学位授与の日付	平 成	3 年	2 月 4 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当		
学位論文題目	Demonstration of the heterogeneity of epitopes of the platelet-specific alloantigen, Bak ^a (血小板特異抗原 Bak ^a のエピトープのheterogeneityに関する検討)		
論文審査委員	(主査) 教 授 垂井清一郎	(副査) 教 授 木谷 照夫	教 授 谷口 直之

論文内容の要旨

【目 的】

Bak^a 抗原は、1980年 von dem Borne らにより初めて報告された血小板特異抗原で、その対立抗原の Bak^b とともに血小板膜糖蛋白 (GP) II b α 鎖に局在することが知られている。血小板特異抗原は、その不適合が新生児血小板減少性紫斑病、輸血後紫斑病および血小板輸血不応状態を引き起こすため、臨床上重要な抗原と考えられている。

近年、Bak^a 抗原と Bak^b 抗原では、GP II b α 鎖の 843 位のアミノ酸の異なることが報告されたが、実際に同種免疫を引き起こす Bak^a および Bak^b 抗原のエピトープについてはほとんど知られていない。

本研究では、Bak^a 抗原のエピトープを免疫化学的に解析する目的で、4 種類の抗 Bak^a 血清と GP II b/IIIa 複合体、SDS 処理 GP II b およびノイラミニダーゼ処理 GP II b との反応性を検討した。

【方 法】

使用した抗 Bak^a 血清は、Yam, Lin, Kl および MO の 4 種類で、すべて IgG 型の抗 Bak^a 抗体を含み、Kl のみが抗 HLA 抗体も含んでいた。免疫沈降法は¹³¹I 標識した血小板に抗血清感作後、可溶化し、Staphylococcus aureus にて沈降させた蛋白を SDS-PAGE にて解析した。Flow cytometry は、洗浄血小板に抗血清感作後、FITC 標識抗ヒト IgG 血清を反応させ、FACS にて解析した。イムノブロッティングは、可溶化した血小板蛋白を非還元あるいは還元下で SDS-PAGE にて展開後、ニトロセルロース (NC) 膜に転写し、抗 Bak^a 血清およびビオチン化抗ヒト IgG 血清を反応させ、ABC 法で発色した。ノイラミニダーゼ処理は、NC 膜上の血小板蛋白の処理 (0.2 U / ml 室温, 18 時間)、精製 GP II b/IIIa 複合体および洗浄血小板の処理 (0.5 U / ml, 37 °C, 3 時間) の 3 通りを施行し、イムノ

ブロッティングあるいは flow cytometry にて解析した。

【成績】

- 1) GPIIb/IIIa 複合体との反応：各抗 Bak^a 血清と血小板膜上の GPIIb/IIIa 複合体との反応性を免疫沈降法および flow cytometry にて検討した。免疫沈降法では、4 種類の抗 Bak^a 血清すべてが、非還元下では分子量 145 kD の GPIIb と 90 kD の GPIIIa を、還元下では 125 kD の GPIIb α と 100 kD の GPIIIa を沈降させたが、各血清により沈降した GPIIb と GPIIIa の比率が異なり、Yam では GPIIIa に比べ GPIIb が著明に沈降した。この成績より各抗血清と GPIIb/IIIa 複合体との反応性は同一ではなく、各抗 Bak^a 血清の認識するエピトープが異なることが示唆された。また flow cytometry により各抗 Bak^a 血清の titer を検討した結果、Lin が最も強い titer を示し、以下 Yam, MO の順であった (Yam:Lin:MO = 8:32:1)。
- 2) SDS 処理 GPIIb との反応：イムノブロッティングを用いて各抗 Bak^a 血清と SDS 処理 GPIIb との反応性を検討した結果、非還元、還元下とも Yam, Lin および KI は GPIIb と結合したが MO は GPIIb と結合しなかった。また、flow cytometry による成績と異なり、この系では Yam が Lin の 16 倍以上の非常に強い titer を示した。この成績からも Bak^a 抗原のエピトープには heterogeneity の存在することが示唆された。
- 3) ノイラミニダーゼ処理 GPIIb との反応：Bak^a 抗原のエピトープにおけるシアル酸の関与を明らかにするため、抗 Bak^a 血清とノイラミニダーゼ処理 GPIIb との反応性を検討した。NC 膜上に転写した GPIIb をノイラミニダーゼ処理した結果、Yam と Lin は GPIIb に結合しなくなったが、KI は結合した。次にシアル酸の除去を確認するため、まず精製 GPIIb/IIIa 複合体をノイラミニダーゼ処理し、その後イムノブロッティングを施行した。GPIIb の分子量は 145 kD から 138 kD に減少したが、Yam はノイラミニダーゼ処理 GPIIb とは結合せず、KI は結合した。また洗浄血小板をノイラミニダーゼ処理した結果も同様であった。さらに SDS の影響を除くため、ノイラミニダーゼ処理した血小板との反応性を flow cytometry にて検討したが、Yam, Lin はシアル酸除去血小板とは結合しなかった。以上の成績より、Bak^a 抗原のエピトープにはシアル酸を含むものと含まないものがあり、heterogeneity の存在することが明らかになった。

【総括】

4 種類の抗 Bak^a 血清と GPIIb/IIIa 複合体、SDS 処理 GPIIb およびノイラミニダーゼ処理 GPIIb との反応性は各抗血清により異なった。すなわち Bak^a 抗原のエピトープには heterogeneity の存在することが示された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、Bak^a 抗原のエピトープを詳細に解析することを目的としている。分析方法として、免疫沈降法、flow cytometry およびイムノブロッティングを用い、4 種類の抗 Bak^a 血清と種々の条件下で

のGPIIbとの反応性を検討した。

その結果、GPIIb/IIIa 複合体、SDS処理GPIIbおよびノイラミダーゼ処理GPIIbに対する反応性は、4種類の抗Bak^a血清間で異なり、Bak^a抗原のエピトープにはheterogeneityの存在することが示された。またBak^a抗原のエピトープはGPIIbのアミノ酸の一次構造だけで決定されるのではなく、シアル酸を含めた糖鎖もそのエピトープに関与することが示された。

以上の成績は、従来知られていなかった新知見であり、本研究は学位に値すると考える。