

Title	Two human monoclonal antiplatelet autoantibodies established from patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura
Author(s)	本田, 繁則
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37381">https://hdl.handle.net/11094/37381</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

【145】

氏名・(本籍)	ほん だ しげ のり 本 田 繁 則
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 9 4 9 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	Two human monoclonal antiplatelet autoantibodies established from patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (慢性 ITP におけるヒト型抗血小板モノクローナル抗体の作製と対応抗原の解析)
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 濱岡 利之

## 論文内容の要旨

### 【目 的】

特発性血小板減少性紫斑病 (ITP) は、抗血小板自己抗体により血小板が早期に破壊される自己免疫患者と考えられている。抗血小板自己抗体の対応抗原については、これまで患者血清を用いて解析され、血小板膜糖蛋白 (GP) IIb, IIIa あるいは Ib が明らかにされてきた。しかし、血清を用いた方法では対応抗原を検出し得ない症例も少なくなく、十分に解明されたとは言い難い。本研究は、治療のため摘脾を受けた ITP 患者の脾細胞を用いてヒト型抗血小板モノクローナル (MoAb) を作製し、その対応抗原と生物活性を解析する事により ITP の病態の一端を明らかにする事を目的とした。

### 【方法ならびに成績】

#### 1) ヒト型 MoAb の作製

ITP 患者脾細胞とヒト・マウスヘテロ骨髓腫細胞をポリエチレングリコールを用いて融合し、HAT (hypoxanthine, aminopterin, thymidine)・ouadain 培養液で選択した。血小板抗体のスクリーニングは O 型プール血小板固相マイクロプレートに培養上清を加え、次に ALP 標識抗ヒト IgG あるいは IgM 抗体を用いた Enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) によった。2 症例の脾細胞につき細胞融合を行ったところ、血小板抗体陽性ウェルは平均 2.9% で、いずれも IgM 型のみであった。次に吸光度の最も高い抗体陽性ウェルの細胞を、限界希釈法によりクローニングし、それぞれの症例につき 1 つの MoAb (HT7F および HT8C) 産生株を樹立した。

#### 2) HT7F および HT8C の自己血小板と単球除去単核細胞に対する反応

両 MoAb の固相血小板および単球除去単核細胞 (リンパ球) への結合を ELISA で検討した。両

MoAb は、濃度依存性に固相自己血小板とリンパ球に結合し自己抗体であることが示された。

3) HT7FおよびHT8Cの新鮮血小板に対する反応

血小板固相プレートに新鮮血小板あるいは赤血球を加え同時に MoAb を加えて固相血小板と浮遊血球の間で competitive ELISA を行った。両 MoAb とも浮遊血小板との間に競合反応を認めたが、赤血球では見られず新鮮血小板との特異的結合が確認された。

4) 吸着解離 MoAb の自己血球に対する反応

HT7FあるいはHT8C感作血小板より抗体をエーテルで解離し、その抗体の固相自己血小板とリンパ球への結合をELISAで検討した。解離された両 MoAb は血小板、リンパ球と結合した。結合の程度は血小板でより強く認められた。

5) イムノブロットによる対応抗原の同定

血小板 lysate を 7.5% SDS-PAGE にて展開し、ナイロン膜に転写後、両 MoAb と反応させた。HT7F は非還元および還元下で分子量 105 kD 血小板蛋白と反応した。

一方、HT8C は、何れの血小板蛋白とも反応しなかった。

6) HT7F の  $\alpha$ -アクチニンに対する反応

HT7F が反応した 105 kD 血小板蛋白の同定を進めた。分子量が類似し、かつ非還元および還元下で分子量の変わらない細胞骨格蛋白  $\alpha$ -アクチニンに着目し、HT7F との反応をドットイムノブロットにて検討した。ナイロン膜に  $\alpha$ -アクチニンあるいは牛血清アルブミンを結合させた後、HT7F あるいはポリクローナル IgM を感作し、ABC法にて判定した。HT7F は  $\alpha$ -アクチニンと特異的に結合し、対応抗原であることが示された。なお、HT8C は  $\alpha$ -アクチニンと特異的な結合を認めなかった。

7) HT7F および HT8C のエピトープの差異

血小板固相プレートに HT7F あるいは HT8C 感作血小板を加え、同時に HT7F を加えて、固相血小板への HT7F の結合が加えた MoAb 感作血小板により阻害されるか否かを ELISA にて検討した。HT7F の固相血小板への結合は、HT7F 感作血小板添加時に比して未感作および HT8C 感作血小板添加時でより強く阻害され、HT7F と HT8C とはエピトープが異なることが示された。

8) HT7F および HT8C の補体活性化能の検討

固相血小板に MoAb を感作し、補体として新鮮血清を反応させた後、血小板に結合した C3 量を ELISA にて測定した。血小板への C3 の結合は HT7F および HT8C を感作すると、それぞれのコントロールに比して 2~3 倍に増加し、両 MoAb が補体活性化能を有することが確認された。

**【総括】**

- 1) 慢性 ITP 2 症例の脾細胞を用いて、2 種類のヒト型抗血小板モノクローナル抗体 (HT7F および HT8C) を作製した。
- 2) 両抗体は自己血小板と結合し、さらに補体活性化能を有することから、血小板減少の病態に関与していることが示唆された。
- 3) HT7F の対応抗原は、これまで報告のない  $\alpha$ -アクチニンであることが示された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）患者よりヒト型抗血小板モノクローナル抗体を作製し、その対応抗原を解析する事を目的としている。方法として、治療のため摘脾を受けた慢性ITP患者の脾細胞を用いてヒト型抗血小板モノクローナル抗体を作製し、主としてEnzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）およびイムノブロットを用いてその対応抗原と生物活性の有無につき検討している。その成績によると、慢性ITP 2症例から2種類のヒト型抗血小板モノクローナル抗体（HT7FおよびHT8C）産生株を樹立したが、その抗体は自己血小板と結合し、補体活性化能を有する事より、産生された抗体は血小板減少の病態に関与している事が強く示唆された。さらに、本研究はHT7Fの対応抗原がこれまで報告のない $\alpha$ -アクトニンである事を証明した。

以上の成績はITPの病態解析に関する新知見であり学位に値すると考える。