



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=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>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

## 【145】

氏名・(本籍)	ほん 本	だ 田	しげ 繁	のり 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ナー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・マウスヘテロ骨髄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、限界希釀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) HT 7 F および HT 8 C 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

HT 7 F あるいは HT 8 C 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) イムノプ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。HT 7 F 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、HT 8 C は、何れの血小板蛋白とも反応しなかった。

### 6) HT 7 F の $\alpha$ -アクチニンに対する反応

HT 7 F 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、HT 7 F との反応をドットイムノプ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、HT 7 F あるいはポリクローナル IgM を感作し、ABC 法にて判定した。HT 7 F 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、HT 8 C は  $\alpha$ -アクチニンと特異的な結合を認めなかった。

### 7) HT 7 F および HT 8 C のエピトープの差異

血小板固相プレートに HT 7 F あるいは HT 8 C 感作血小板を加え、同時に HT 7 F を加えて、固相血小板への HT 7 F 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。HT 7 F の固相血小板への結合は、HT 7 F 感作血小板添加時に比して未感作および HT 8 C 感作血小板添加時でより強く阻害され、HT 7 F と HT 8 C とはエピトープが異なることが示された。

### 8) HT 7 F および HT 8 C 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 HT 7 F および HT 8 C 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 (HT 7 F および HT 8 C )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) HT 7 F 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) およびイムノプ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 $\alpha$ -アクチ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。