

《原 著》

RI 標識モノクローナル抗体を用いる新しい 血栓診断法に関する研究

—第1編 ウサギならびにヒト血小板に対するモノクローナル抗体の作成—

中島 鉄夫* 遠藤 啓吾** 山本 和高** 阪原 晴海**
 小泉 満** 河村 泰孝** 太田 仁八** 国松美帆子**
 小西 淳二** 永田 博一*** 野村 昌作*** 粉川 晴年***
 安永幸二郎*** 松岡洋一郎**** 鳥塚 莞爾*****

要旨 動脈血栓症をイムノシンチグラフィの手法により描出する目的で、ウサギおよびヒトの血小板に対するモノクローナル抗体を作成しその性状の検討を行った。

ウサギ血小板に対して 12 種、ヒト血小板に対しては 2 種の抗体が確立された。これらはすべて血小板特異的で、血小板の凝集能に影響を及ぼすものが多かった。これらのなかでウサギ血小板を抗原として作られた 138-10 は $1.2 \times 10^9 M^{-1}$ の高い親和定数でウサギ血小板と結合し、ヒトの血小板に対して作られた抗体 1-19 の親和定数は $2.1 \times 10^9 M^{-1}$ であったが、ウサギの血小板ともほぼ同様の親和定数で結合した。また、これら二つの抗体はともに血小板の凝集能にほとんど影響を及ぼさなかった。

138-10 と 1-19 はその高い親和定数とウサギ血小板凝集能に影響を与えない特性から、ウサギを用いた血栓シンチグラフィの基礎検討に応用可能と思われた。

I. はじめに

核医学検査は血栓症において全身検索ならびに血栓の活動性の有無を同時に知ることのできる手段として着目され、これまで In-111 標識血小板¹⁾ や、I-125, Tc-99m, Ga-67 標識 フィブリノーゲン^{2,3)} 等が血栓症の診断に試みられてきたが、今なお臨床的に広く用いられるには至っていない。

1975 年ケーラーとミルスタインによりモノクローナル抗体の手法が確立された⁴⁾ が、われわれ

は、この手法を用い血栓の形成に関わる血小板に対するモノクローナル抗体を作成、それを放射性同位元素（以下 RI）で標識して血栓症の診断に応用することを考えた。その基礎的検討には、ヒトに類似した血小板を持つウサギ⁵⁾ を用いることが望ましいと思われたので、ウサギの血小板と反応するモノクローナル抗体の作成を試みた。本論文では、ウサギおよびヒト血小板で免疫して得られたモノクローナル抗体の性状につき述べる。

II. 材料および方法

1. 血 小 板

正常ウサギより 5% EDTA 液を容量比で 10% 加えて心臓採血した血液を直ちに $180 \times g$ で 10 分間遠心し、赤血球と白血球成分を沈殿させた後、上清中の血小板をさらに $1,800 \times g$ 10 分間の遠心により沈殿、PBS (-) 液（日本製薬社製）にて 3

* 福井医科大学放射線科, ***** 同 副学長

** 京都大学医学部核医学科

*** 関西医科大学第一内科

**** 三重大学医学部放射線科

受付：63 年 2 月 8 日

最終稿受付：63 年 5 月 11 日

別刷請求先：福井県吉田郡松岡町下合月 23 (〒910-11)

福井医科大学放射線科

中 島 鉄 夫

回洗浄後, PBS (-) 液にて再浮遊させ血小板浮遊液として使用に供した。

ヒト血小板も静脈血より同様の方法で調製した。

2. モノクローナル抗体の作成

マウス(BALB/C, メス, 8週齢)に, およそ 1×10^9 個の血小板を2週間隔で3回腹腔内投与, 1か月後に最終免疫を与え, その3日後にマウス脾細胞とマウス形質細胞腫株(NS-1)をポリエチレングリコール法⁶⁾ (ガスクロマトグラフィ用 #4000, Merck 社製, 西独)により細胞融合させて, ハイブリドーマを作成した。細胞融合後約2週間に培養上清をとり, ELISA 法により抗血小板抗体を産生するハイブリドーマを得た。すなわち 5×10^6 個/ウエルの血小板を固相化したマイクロタイタープレート⁷⁾ を用いた酵素抗体法(New England Nuclear 社製, 米国)による第1次スクリーニングを行い, 陽性ハイブリドーマを限界希釀法により2回クローニングした。得られたハイブリドーマを BALB/C マウスの腹腔内に移植, 約2週間後に腹水を得た。

IgG の精製はマウス腹水より, プロテイン A-セファロース・クロマトグラフィ(Affigel®, Bio-Rad 社, 米国)を用いて行い, IgG 濃度は280 nmにおける吸光度により測定し, 各モノクローナル抗体の IgG サブクラスの決定は, マウス免疫グロブリンの各クラスに特異的なウサギ抗血清(Miles 社製, 米国)を用いる, オクタロニー法により行った。

3. 抗体の特異性および血小板との結合

各モノクローナル抗体の血小板との反応特異性は, 第1次スクリーニング陽性の47種のハイブリドーマ培養上清を用い, ウサギ各血球成分との反応性を酵素抗体法により検討した。すなわち, ウサギ全血をスライドグラス上に塗抹, 風乾の後メタノール固定し, 50 μl のハイブリドーマ上清を加え, 湿箱中にて室温1時間の第1インキュベーションを行った。これを PBS (-) 液で3回洗浄の後, 1% ウシ血清アルブミンを加えた PBS (-) 液で100倍希釀したペルオキシターゼ標識ウサギ抗マウス免疫グロブリン抗体(DAKO 社製, デン

マーク)を加え, 室温にて1時間第2インキュベーションを行い, PBS (-) 液にて3回洗浄の後, 基質液中に浸漬, 呈色反応を行った。基質液は, PBS (-) 液に溶解したジアミノベンジジン(同仁化学研究所製)0.01% 溶液に, 過酸化水素水を終濃度0.005% になるように使用直前に添加作成したものを使用した。

抗体のI-125 標識は, 抗体活性を損わないよう少量のクロラミン-Tを用いる方法により行い⁸⁾, およそ 5 mCi/mg の比放射能をもつ標識物を得た。なお, B/F 分離は Sephadex G50 (Pharmacia Fine Chemicals 社製, スウェーデン) を用いたカラムクロマトグラフィにて行い, 標識率はおよそ70% であった。

モノクローナル抗体と血小板との結合親和定数はラジオイムノアッセイによる結果を Scatchard Plot⁹⁾ により解析・算出した。すなわち I-125 標識抗体 50 μl (10,000 cpm) と非標識モノクローナル抗体溶液 50 μl に, 血小板浮遊液 100 μl を加え室温にて30分間インキュベート, 10,000×g にて3分間遠心, 上清を吸引除去後, 血小板に結合した放射活性をガンマカウンターにて測定し, Scatchard plot にて解析した。

4. 血小板機能検査

抗体の血小板凝集能に及ぼす影響は血小板濃厚血漿(PRSP) 100 μl と, 約 10 μg/ml の抗体を含むハイブリドーマの培養上清 100 μl を混合, 37°C にてインキュベート, 血小板凝集計(NKK Hematracr 1, 二光バイオサイエンス社製)を用いて検討した。さらに, ADP(Sigma 社製, 米国, 終濃度 10 μM/ml), コラーゲン(Hormon Chemie 社製, 西独, 終濃度 2 μg/ml) およびトロンビン(持田製薬社製, 終濃度 1 U/ml)により惹起される血小板凝集に, モノクローナル抗体が及ぼす影響についても観察した。

III. 結 果

ウサギ血小板で免疫して得られたモノクローナル抗体は2回の細胞融合実験の結果, 第1次スクリーニングの段階で約60個の抗体産生陽性ウエル

Table 1 Monoclonal antibodies against platelets

Designation	IgG subclass	Binding affinity (Ka; M ⁻¹)	Reactivity ¹⁾		Binding sites per platelet
			Rabbit plt.	Human plt.	
131-4	IgG 1	0.9×10 ⁸	++	-	1.6×10 ⁴
	IgG 2b	ND	++	+	ND
18	IgG 1	0.3×10 ⁹	++	-	0.9×10 ⁴
	IgG 1	0.1×10 ⁹	++	-	8.8×10 ⁴
24	IgG 1	0.6×10 ⁹	+	-	1.2×10 ⁴
	IgG ²⁾	ND	+	-	ND
5	IgG 1	ND	++	-	ND
	IgG 1	ND	+	-	ND
6	IgG 2a	0.5×10 ⁹	+	-	0.4×10 ⁴
	IgG 2b	0.9×10 ⁹	+	-	4.0×10 ⁴
10	IgG 1	1.2×10 ⁹	++	-	2.8×10 ⁴
	IgG 1	0.3×10 ⁹	+	-	3.5×10 ⁴
138-2	IgG 1	2.1×10 ⁹	++	++	3.5×10 ⁴
	IgG 1	ND	-	++	ND
1-19 ³⁾	IgG 1				
32 ³⁾	IgG 1				

¹⁾ Determined by ELISA²⁾ Subclass was not determined³⁾ Monoclonal antibodies produced by immunizing human platelets

ND: not done

が確認された。しかし、2回の限界希釈法によるクローニングの後も、抗体産生を続ける安定したハイブリドーマは、Table 1 に示す12種であった。すべて IgG で、サブクラスは IgG 1 が最も多かった。1回目の細胞融合の第1次スクリーニングで陽性を示した培養上清とウサギ各血球成分との反応性を酵素抗体法にてみたところ、検討した47種の培養上清のうちただ1種のみが血小板のみならず白血球とも反応し、残り46種の培養上清は血小板とのみ反応した。しかし、この白血球にも反応したモノクローナル抗体は安定したハイブリドーマとして樹立し得なかった。そこで第2回目の細胞融合の際、抗原特異性の検討は樹立し得たハイブリドーマのみに対して行ったが、いずれも血小板のみに反応するモノクローナル抗体であることが確かめられた。同様の方法により、ヒト血小板との反応性を検討したところ、抗体 131-7 のみが、ヒト血小板とも弱い反応性を有したが、他の抗体はいずれも陰性であった。

ヒト血小板で免疫したマウスより2種類のモノクローナル抗体 1-19, 1-32 が得られた。抗体 1-19

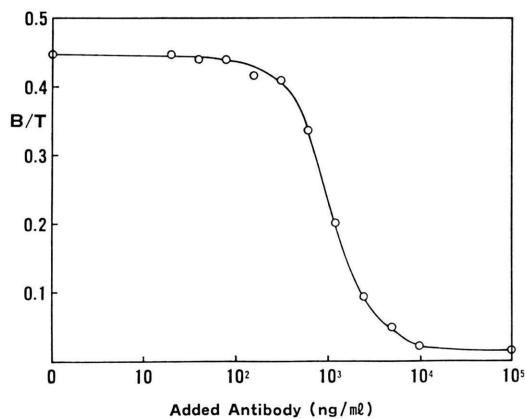


Fig. 1 Binding of I-125 labeled monoclonal antibody 138-10 to rabbit platelets. Its binding was inhibited dose-dependently by the addition of increasing concentrations of unlabeled antibodies.

は、ヒトのみならずウサギ血小板とも反応したのに対し、抗体 1-32 はヒト血小板と強く反応したにもかかわらず、ウサギ血小板とは交叉が見られなかった。

Table 2 Effects of monoclonal antibodies on rabbit platelet aggregation¹⁾

Monoclonal antibodies	Induction of aggregation	Inhibition of aggregation induced by:		
		ADP ²⁾	Collagen ³⁾	Thrombin ⁴⁾
131-4	+	+	±	+
7	-	-	-	-
18	+	+	+	+
20	++	±	±	++
24	++	+	+	++
138-2	-	-	-	-
5	++	-	+	-
6	±	-	-	-
8	±	-	±	-
9	-	-	-	-
10	±	±	+	±
11	+	+	+	++
1-19 ⁵⁾	±	±	±	±
32	-	-	-	-

¹⁾ Measured by NKK Hematracer 1 (Nikoh Bioscience Co.)²⁾ 10 μM/ml (in final concentrations)³⁾ 2 μg/ml (in final concentrations)⁴⁾ 1 U/ml (in final concentrations)⁵⁾ Monoclonal antibodies produced against human platelets

I-125 標識モノクローナル抗体はウサギ血小板と結合し、その結合は非標識抗体を大量に添加することによりほぼ完全に抑制された。ウサギ血小板との結合を Scatchard Plot を用いて検討した (Fig. 1) ところ、ウサギ血小板に対する結合親和定数は、 $0.9 \times 10^8 M^{-1}$ から $2.1 \times 10^9 M^{-1}$ の間に幅広く分布し、血小板 1 個あたりの結合部位数はおよそ 4,000～90,000 個と計算された。検討したモノクローナル抗体のうち抗体 1-19 がウサギ血小板と最も高い結合親和定数 ($2.1 \times 10^9 M^{-1}$) を示し、ついで抗体 138-10, 138-9, 131-24 が高い結合親和定数を示したが、ウサギ血小板への結合親和定数と結合部位数との間には、明らかな相関関係が見られなかった。

各モノクローナル抗体の血小板凝集能に及ぼす影響を Table 2 に示す。ウサギ血小板に対して得られたモノクローナル抗体 12 種のうち、9 種類の抗体は、終濃度 5 μg/ml にて、ウサギ血小板を速やかに凝集させた。しかしその他の 3 種類の抗体はそれ自体のみの添加で血小板を凝集せず、ADP, コラーゲン, トロンビンによる血小板凝集

に対しても影響を及ぼさなかった。一方、血小板を凝集させた 9 種類の抗体のうち 138-6 を除いた 8 種類の抗体は ADP, コラーゲン, トロンビンにより惹起される血小板凝集に対して何らかの抑制効果を示した。抗体 1-19 はウサギ血小板をごく弱く凝集させたが、抗体 1-32 はウサギ血小板凝集に何ら影響を及ぼさなかった。

一方、これらの抗ヒト血小板抗体 1-19 および 1-32 とヒト血小板との反応性を見たところ (結果略)，抗体 1-19 はそれ自身でヒト血小板を凝集させないが、ADP による血小板凝集を強く抑制した。これに対し、1-32 は抗体自身に強いヒト血小板凝集能が見られ、二つの抗体の性状はヒト血小板に対し著しく異なった態度を示した。

IV. 考 案

血小板に対するモノクローナル抗体を用いた血栓シンチグラムの基礎検討を行う目的で、ウサギおよびヒト血小板でマウスを免疫し、細胞融合法により 14 種類のモノクローナル抗体を作成した。

これまでヒト血小板に対するモノクローナル抗

体の報告は多いが^{10~14)}、われわれの知るかぎりウサギ血小板に対するモノクローナル抗体に関する報告は未だない。しかし、1) ウサギとヒトの血小板はその抗原性が類似しているとされていること⁵⁾、2) 血栓シンチグラムの動物実験にはウサギが価格、体形とも手頃で扱いやすいこと、3)これまで RI 標識血小板やフィブリノーゲンを用いる血栓シンチグラムの動物実験はウサギを扱った研究が多く比較検討しやすいこと³⁾、などの理由で血栓シンチグラフィの基礎的検討にはウサギが実験動物として最も適していると判断した。実際、モノクローナル抗体 131-7, 1-19 は免疫源の血小板が異種にもかかわらず、ウサギおよびヒトの血小板とともに反応し、ヒトとウサギ血小板の抗原性の類似を示唆していると思われる。

最近ヒト血小板に関する研究の進歩はめざましい。抗体 1-19 は、それ自身では血小板を凝集させないが、ADP による血小板凝集を強く抑制し、IIb/IIIa 蛋白上のフィブリノーゲンレセプターに近い部位に結合すると考えられる。一方、抗体 1-32 は抗体自身に強いヒト血小板凝集能があり血小板 Ib 蛋白に対する抗体と思われる。それぞれこれまで報告されているヒト血小板に対するモノクローナル抗体と類似した抗原を認識していることが示唆された^{14,15)}。ただウサギ血小板表面蛋白の性状に関しては、研究がヒト血小板ほど進んでいないこともあり、われわれの作製した抗体の認識する抗原の性状は今後さらに研究が必要である。

I-125 で標識したモノクローナル抗体は、実際に試験管内で高い結合親和定数で血小板と特異的に結合することが確かめられた。モノクローナル抗体は試験管内ののみならず、生体内でも対応する抗原と特異的に結合するものと期待される。

イムノシンチグラフィは RI 標識抗体の体内分布を映像化し、その抗原特異的な局在を診断、治療に役立てようとするものである¹⁶⁾が、使用される抗体が血小板表面蛋白 IIb/IIIa のような細胞表面の機能性蛋白を認識している場合、投与された抗体の生体に及ぼす影響が懸念される。われわれ

は、血栓のシンチグラフィを行うには、血小板機能に影響しない抗体が適しているのではないかと考え、ウサギ血小板との結合親和定数が高く、かつ血小板機能に及ぼす影響が少ない 138-10, 1-19 抗体をイムノシンチグラフィ用抗体として選択した。第 2 編には、I-131 で標識したこれらの抗体を用い、ウサギに作製した血栓にイムノシンチグラフィを応用した検討結果について述べる。

V. まとめ

血栓症の RI 診断に使用する目的で、ウサギおよびヒトの血小板に対するモノクローナル抗体を作成し、その性状を検討した。14種類のモノクローナル抗体の性状はそれぞれ異なり、ウサギとヒトの血小板とともに反応する抗体や、ウサギ、ヒトの血小板どちらかにしか反応しない抗体、血小板に強く結合するが、血小板凝集能にはあまり影響を及ぼさない抗体などが作成された。これらの抗体は、血小板と特異的に高い結合親和定数で結合するため、RI 標識モノクローナル抗体を用いる血栓症のシンチグラフィへの応用が期待される。

文 献

- 1) Moser KM, Fedullo PF: Imaging of venous thromboemboli with labeled platelets. *Semin Nucl Med* **14**: 188-197, 1984
- 2) Kaufman HH, Woo J, Anderson JH, et al: Radio-iodinated fibrinogen for clot detection in a canine model of cervical carotid thrombosis. *J Nucl Med* **19**: 370-376, 1978
- 3) Ohmomo Y, Yokoyama A, Suzuki J, et al: ⁶⁷Ga-labeled human fibrinogen: a new promising thrombus imaging agent. *Eur J Nucl Med* **7**: 458-461, 1982
- 4) Kohler G, Milestein C: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature (Lond)* **256**: 495-497, 1975
- 5) Miescher P, Vorlaender KO: Immunopathologie in Klinik und Vorschung. Gieorge Theme Verlag, p. 320, 1957
- 6) Gefter ML, Margulies HM, Scharff MC: A simple method for polyethylene glycol promoted hybridization of mouse myeloma cells. *Somat Cell Genet* **3**: 231-236, 1977
- 7) Stocker JW, Heusser CH: Methods for binding

- cells to plastic: application to a solid-phase radioimmunoassay for cell-surface antigens. *J Immunol Method* **26**: 87-95, 1979
- 8) 阪原晴海, 遠藤啓吾, 中島鉄夫, 他: 標識抗ヒト α -fetoprotein 抗体を用いる腫瘍イメージングの基礎的検討: 第1編 ヨード標識による抗体活性の変化. 核医学 **21**: 805-813, 1984
 - 9) Scatchard G: The attraction of protein for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* **51**: 660-672, 1949
 - 10) Deng C, Terasaki PI, Iwaki Y, et al: A monoclonal antibody cross-reactive with human platelets, megakaryocytes, and common acute lymphocytic leukemia cells. *Blood* **61**: 759-764, 1983
 - 11) Coller BS, Peeschke EI, Scudder LE, et al: Studies with a murine monoclonal antibody that abolishes ristocetin-induced binding of von Willebrand factor to platelets: Additional evidence in support of GPIb as a platelet receptor for von Willebrand factor. *Blood* **61**: 99-110, 1983
 - 12) McEver RP, Bennet EM, Martin MN, et al: Identification of two structurally and functionally distinct sites on human platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa using monoclonal antibodies. *J Biol Chem* **258**: 5269-5275, 1983
 - 13) Thurlow PJ, Barlow B, Connellan JM, et al: Detection of glycoprotein IIb and IIIa by monoclonal antibodies. *Brit J Haemat* **55**: 123-134, 1983
 - 14) Nomura S, Nagata H, Oda K, et al: Effects of EDTA on the membrane glycoproteins IIb-IIIa complex—analysis using flow cytometry. *Thromb Res* **47**: 47-58, 1987
 - 15) 野村昌作, 永田博一, 北田親穂, 他: 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
 - 16) Larson SM: Radiolabeled monoclonal anti-tumor antibodies in diagnosis and therapy. *J Nucl Med* **26**: 538-545, 1985

Summary

Thrombus Scintigraphy Using Radiolabeled Monoclonal Antibodies to Platelets: (I) Development of Monoclonal Antibodies Reactive with Rabbit and Human Platelets

Tetsuo NAKASHIMA*, Keigo ENDO**, Kazutaka YAMAMOTO**,
Harumi SAKAHARA**, Mitsuru KOIZUMI**, Yasutaka KAWAMURA**,
Hitoya OOTA**, Mihoko KUNIMATSU**, Junji KONISHI**, Hirokazu NAGATA***,
Syousaku NOMURA***, Hirotoshi KOKAWA***, Koujiro YASUNAGA***,
Youichiro MATSUOKA**** and Kanji TORIZUKA*

*Department of Radiology, Fukui Medical School

**Department of Nuclear Medicine, Kyoto University School of Medicine

***The First Department of Internal Medicine, Kansai Medical University

****Department of Radiology, Mie University School of Medicine

Intending to use for the immunoscintigraphy (IS) of arterial thrombosis, we have generated monoclonal antibodies reactive with rabbit and human platelets. Twelve monoclonal antibodies were established by the immunization of rabbit platelets and two by human platelets. All antibodies were specific for platelets, but some recognized both human and rabbit platelets. Antibody, designated 138-10, bound only to rabbit platelets with a high association constant of $1.2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ and

showed little effect on the aggregation of platelets. Another antibody 1-19 was produced by the immunization of human platelets but cross-reacted with rabbit platelets. As far as we know, this is the first report describing about monoclonal antibodies reactive with rabbit platelets, and these radiolabeled monoclonal antibodies will be of great use for the study of thrombus scintigraphy.

Key words: Thrombus scintigraphy, Immuno-scintigraphy, Monoclonal antibody, Platelet.