

# ヒト protein S に対するモノクローナル抗体 NMC-PS/1 および NMC-PS/2 の免疫学的特性

奈良県立医科大学小児科学教室

奥 香 世

## CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST HUMAN PROTEIN S ; NMC-PS/1 AND NMC-PS/2

KAYO OKU

Department of Pediatrics, Nara Medical University

Received January 25, 1991

**Summary :** Two monoclonal antibodies against human protein S (PS) were obtained. One (NMC-PS/1) belonged to IgM and the other (NMC-PS/2) was IgG<sub>1</sub>. NMC-PS/1 did not interfere with the activity of PS but NMC-PS/2 did interfere. Both of the antibodies combined to PS, C<sub>4</sub>bp-PS, and thrombin modified PS with or without Ca and EDTA. But after SDS treatment they did not react with PS, C<sub>4</sub>bp-PS and thrombin-modified PS.

About 50ml of PS deficient plasma was made from pooled plasma by immuno-depletion using 3mg of NMC-PS/2.

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for total PS and PS antigen complexed with C<sub>4</sub>bp using NMC-PS/2 monoclonal antibodies were established. The detection limit was approximately 0.4U/dl.

Using ELISA method by NMC-PS/2, chronological changes of levels of total PS and C<sub>4</sub>bp-PS through the first 0-6 days of life were measured. On 0 day after birth the PS value was  $24.68 \pm 4.49$ U/dl and that of C<sub>4</sub>bp-PS antigen was  $16.55 \pm 14.02$ U/dl. Both antigens increased gradually day by day.

Plasma of neonatal melena were examined by the same method and no difference from plasma of normal neonates was found.

### Index Terms

protein S (PS), C<sub>4</sub>b-binding protein (C<sub>4</sub>bp), monoclonal antibody, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

### 緒 言

Protein S (PS) は DiScipio ら<sup>1)</sup> (1977) によって見出され純化された凝固阻止作用を有する血漿蛋白である。本因子は第3染色体 3p 11.1-p 11.2 上の遺伝子の支配下に肝でビタミンK存在のもとに合成される<sup>2)</sup>。分子量 80,000 で 635 のアミノ酸残基よりなり、N末端に 10 個

の  $\gamma$ -carboxyglutamic acid (Gla) を有する Gla ドメイン、ついでトロンビン感受性ドメイン、4 個の上皮成長因子ドメイン、COOH 末端ドメインの構造を示すことが知られるようになった<sup>3)-5)</sup>。PS は第 II, VII, IX, X, プロテインC などのビタミンK 依存性因子と異なり、セリンプロテアーゼ活性を持たず、血小板や血管内皮細胞上で活性化プロテインC (APC) のレセプターとして機能

し、APCによる活性化第V因子( $V_a$ )及び活性化第VIII因子( $VIII_a$ )の分解失活化反応を促進するコファクター蛋白として作用することが明らかにされている<sup>9)-9)</sup>。また、PSはヒト成人血漿中では50-60%が補体系の調節蛋白である $C_4b$ 結合蛋白( $C_4bp$ )と結合して存在し、残りの40-50%は遊離型PSとしてAPCの補助因子として抗凝固能を示すことが知られている<sup>10)-11)</sup>。

教室の杉本ら<sup>12)</sup>はヒト新鮮凍結血漿よりPSを純化し、マウスおよび家兎に免疫し、自家製抗ヒトPSマウス血清ならびに家兎血清を作製し、これらの抗体を用いてPS抗原のenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)を開発した<sup>13)</sup>。しかし、これらの抗体はポリクローナル抗体であり、PSの構造および機能解析に用いるためには限界があった。

そこで著者は、PSの単一エピトープを認識するモノクローナル抗体作製を試み、2種の抗体を得たのでその免疫学的特性ならびに若干の臨床応用例について検討した。

## 材料及び方法

1. 血漿：1/10容3.8%クエン酸Naを加えて採血したヒト全血を3000 rpm, 10分間遠心し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。正常プール血漿は健康人10人以上より得たものを混和し、用に臨むまで $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。また健康成人20例(男子10例, 女子10例), 先天性PS欠乏症3例<sup>14)</sup>, 正常満期産新生児20例(男児10例, 女児10例), 新生児メレナ12例より血漿サンプルを得た。

2. PS活性の測定：Suzuki et al<sup>15)</sup>の方法によった。後述の人工的PS欠乏血漿0.1 mlにサンプル血漿0.02 mlおよびProtac<sup>®</sup> (Pentapharm) (5U/ml) 0.01 mlを加え、 $37^{\circ}\text{C}$ で1分加温のち、Actin<sup>®</sup> (Dade) 0.1 mlを加え、さらに $37^{\circ}\text{C}$ で1分加温し、次に1/40容の $\text{CaCl}_2$  0.1 mlを加えて凝固時間を測定した。正常プール血漿希釈列による検量線より被検血漿の凝固活性値を読み取った。

3. 全PS抗原量の測定：自家製の特異的抗ヒトPS家兎血清を用いてelectroimmunoassay (EIA; Laurell法)<sup>16)</sup>を施行した。

4. ヒトPSの純化：杉本ら<sup>12)</sup>の方法に準じ、新鮮凍結血漿を、硫酸バリウム吸着、20-70%飽和硫酸洗滌、DEAE-sephacel 濾過、blue sepharose CL6B 濾過し、free PS純化物を得た。

5. 抗PSモノクローナル抗体の作製：Mishell & Shiigi ら<sup>17)</sup>の方法に準じた。上述した純化PSを等量の Freund complete adjuvant (Difco Laboratories) に懸

濁し、生後8週のおス Balb/c マウス腹腔に注射し、ついで2週、6週後に同量の追加免疫を行った。マウス血清中の抗ヒトPS抗体陽体の有無をカウンター免疫電気泳動法で確認後、最終免疫として同量のPS分画を静注した。3日後、免疫脾細胞 $2.0 \times 10^8$ 個と、X 63 マウスミエローマ細胞 $7.0 \times 10^7$ 個とを42.5%ポリエチレングリコール # 4000 (和光純薬) 15%ジメチルスルホオキシサイド (林純薬) の存在下に2分間反応させ、細胞融合を行った。反応は、RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640, 日本製薬) の添加による希釈にて停止させた。融合後、細胞は計6枚の96穴マイクロタイタープレートに分注し、1日後よりhypoxanthine-aminopterin-thymidine (いずれもSigma) を含むRPMI培養液 (HAT培地)に変更し、求めるハイブリドーマを選択培養した。さらに8日後にHT培地に変更した。次に述べる抗体スクリーニングにより陽性を示した細胞をさらに選択培養し、得られたハイブリドーマを、プリスタン注射で前処置をした12週齢メスマウスの腹腔内に細胞数 $2-8 \times 10^6$ 個/1匹となるように注射し、1-2週間後に得られた腹水を遠心して不純物を取り除き、上清を非働化して抗体を得た。

6. 抗体スクリーニング：Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) によった。一次 coating 抗体として、前述した自家製特異的抗ヒトPS家兎血清を、0.05 M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) で1000倍に希釈してポリスチレン製96穴マイクロタイタープレートに0.2 ml/well ずつ添加し、 $4^{\circ}\text{C}$ 一昼夜静置して固相化させた。そののち、4% BSA を含む炭酸緩衝液 0.2 ml/well で $4^{\circ}\text{C}$ 一昼夜静置して blocking を行った。次いで0.05% Tween 20 加0.02 M PBS pH 7.2 (以下PBS/Tween) で2回洗浄後、抗原としてPSを含むプロトロンビン複合体製剤の Proplex<sup>®</sup> (Baxter) を4% BSA 加PBS/Tween で300倍希釈し、0.1 ml/well ずつ添加し、 $37^{\circ}\text{C}$  2時間静置した。PBS/Tween で2回洗浄後、二次抗体として各培養上清を0.1 ml/well 添加した。陽性対照としては4% BSA 加PBS/Tween で段階希釈した抗ヒトPSマウス血清を、陰性対照としては正常マウス血清を用いた。プレートは $37^{\circ}\text{C}$ で2時間静置した。PBS/Tween で2回洗浄後、4% BSA 加PBS/Tween で1500倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 家兎血清 (Sigma) 0.1 ml を加え、室温で1時間反応させた。PBS/Tween で5回洗浄後、0.2 M リン酸-クエン酸緩衝液 (pH 5.0) にて0.8%に溶解した。o-phenylene-diamine (OPD, Sigma) と0.25%  $\text{H}_2\text{O}_2$  混合液 0.1 ml を加えた。肉眼的に反応が進んだことを確認して、約10

-20 分後に 2.5 M  $H_2SO_4$  0.1 ml を加えて反応を停止させ、O. D. 492 nm における吸光度を測定した。

7. 抗 PS モノクローナル抗体の免疫グロブリンサブクラスの検定：クローン化した各ハイブリドーマ培養上清サンプルにつき、特異的マウス IgG<sub>1</sub>, G<sub>2a</sub>, G<sub>2b</sub>, G<sub>3</sub>, および IgM, IgA 抗体 (MILES-YEDA) を反応させて Ouchterlony 法を行った。

8. 抗 PS モノクローナル抗体の抗 PS 活性：正常血漿と、各モノクローナル抗体を含むマウス腹水を容量で 10:1 の割合で混合し 37°C で 1 時間 incubate したものを 0.1 ml, 人工的 PS 欠乏血漿 0.1 ml, Actin® 0.15 ml を混合し、37°C で 1 分間 incubate したのち、Protac® (0.5 U/ml) 0.05 ml を加え、さらに 37°C 1 分間 incubate し、50 mM CaCl<sub>2</sub> を 0.05 ml 加え、凝固時間を測定した。

9. 抗 PS モノクローナル抗体の PS 分画との結合性：自家製の PS 純化物、あるいは PS 純化物を  $\alpha$ -thrombin 25 U/mg と 37°C 2 時間反応させて得られた thrombin modified PS をマイクロタイプレートにそれぞれ固相化し、抗 PS モノクローナル抗体、ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG または抗マウス IgM 抗体、発色基質の順に加え、ELISA 法で結合能を測定した。

10. 人工的 PS 欠乏血漿の作製：抗 PS モノクローナル抗体 (NMC-PS/2) を含むマウス腹水より 45% 硫酸アンモニウム沈澱法で IgG 分画を得た。PBS で透析後、この IgG 3 mg を 1.0 g のシアン化プロマイド活性化セファロース 4 B (Pharmacia Fine Chemicals) に常法通りカップリングせしめ、0.2 M グリシン-トリス緩衝液 (pH 8.0) でブロックしてゲルを作製した。この抗 PS モノクローナル抗体 IgG セファロース 4 B ゲルを 0.38% クエン酸ナトリウム加生理的食塩水に懸濁し、脱気後 wet gel 1.5 ml を直径 1 cm のプラスチックカラムに充填した。新鮮正常ヒトクエン酸血漿を、ペリスタルポンプを用いて 5 ml/h の一定流速で添加し、1 ml ごとに採取した。血漿採取後、カラムを 3 M チオシアン酸ナトリウム加生理的食塩水で十分洗浄し、再使用に供した。

11. 抗 PS モノクローナル抗体を用いた ELISA 法による PS 抗原量の測定：抗体スクリーニングの項で前述したと同様にして、ELISA 法による PS 抗原量の測定法を開発した。一次抗体に 1000 倍希釈した NMC-PS/1 または 3000 倍希釈した NMC-PS/2 を用い、抗原は正常血漿を 40 倍-20480 倍まで 2 倍ずつ段階希釈したものをコントロールとし、サンプルは 80 倍-320 倍の間で希釈したものとした。二次抗体には 1000 倍希釈抗 PS 家

兎ポリクローナル抗体を用い、1500 倍希釈ペルオキシダーゼ標識抗家兎 IgG 抗体を加えたのち OPD にて発色、O. D. 492 nm で吸光度を測定した。

## 成 績

1. 抗 PS モノクローナル抗体 NMC-PS/1 および NMC-PS/2 の免疫学的特性

ヒト血漿よりの PS 純化物を幼若 Balb/c マウスに免疫後、その脾細胞と X 63 マウスミエローマ細胞を融合せしめた後、得られたハイブリドーマを選択培養し、メスマウス腹腔内でクローン化された抗体陽性ハイブリドーマ 2 種を得た。これらの NMC-PS/1 と MNC-PS/2 について免疫学的特性について検討した。

1) 免疫グロブリンサブクラス：NMC-PS/1 は IgM, NMC-PS/2 は IgG<sub>1</sub> であった。

2) 抗 PS 活性作用：正常血漿と NMC-PS/1 あるいは NMC-PS/2 を 10:1 で混合後、PS 欠乏血漿を基質とし、PS 活性を測定した。NMC-PS/1 の凝固時間は 68 秒でコントロールの 65 秒に比し短縮効果は認められなかったが、NMC-PS/2 は 45 秒と短縮し、抗 PS 活性を示した。

3) PS, C<sub>4</sub>bp-PS およびトロンビン処理 PS に対する結合性：NMC-PS/1 および NMC-PS/2 を 1:1 から 1:10<sup>4</sup>まで希釈し、PS 純化物 (0.1  $\mu$ g/ml), C<sub>4</sub>bp-PS 純化物 (0.24  $\mu$ g/ml) およびトロンビン処理 PS ( $\alpha$ -thrombin 25 U/mg) にて処理した PS として 0.1  $\mu$ g/ml) との結合性について ELISA 法にて検討した。NMC-PS/1 では各抗原に対して 10<sup>3</sup>倍希釈、NMC-PS/2 では各抗原にたいして 10<sup>4</sup>倍希釈まで反応がみられた (Fig. 1)。

4) Ca. EDTA の影響：Ca イオンの存在、非存在下での抗体の結合性を検討する目的で buffer に PBS-Tween のかわりに 5 mM CaCl<sub>2</sub> 加 0.02 M Tris-HCl を使用した場合と、5 mM EDTA 加 PBS-Tween を使用した場合を施行した。抗原には PS 純化物 (0.1  $\mu$ g/ml), C<sub>4</sub>bp-PS 純物 (0.24  $\mu$ g/ml), トロンビン処理 PS ( $\alpha$ -thrombin 25U/ml) にて処理した PS として 0.1  $\mu$ g/ml) を使用し、0.1 ml/well 添加した。抗体の希釈は NMC-PS/1 は 1000 倍、NMC-PS/2 は 3000 倍とした。どちらも ELISA 法による結合性は変化せず、NMC-PS/1 も NMC-PS/2 も影響を受けなかった (Table 1)。

5) SDS による可溶化による結合能：2-メルカプトエタノールによ還元した、あるいは非還元の PS 純化物を蛋白量 10  $\mu$ g/lane 添加し、7.5% SDS-PAGE にて泳動し、ニトロセルロース膜に転写し、NMC-PS/1 ある

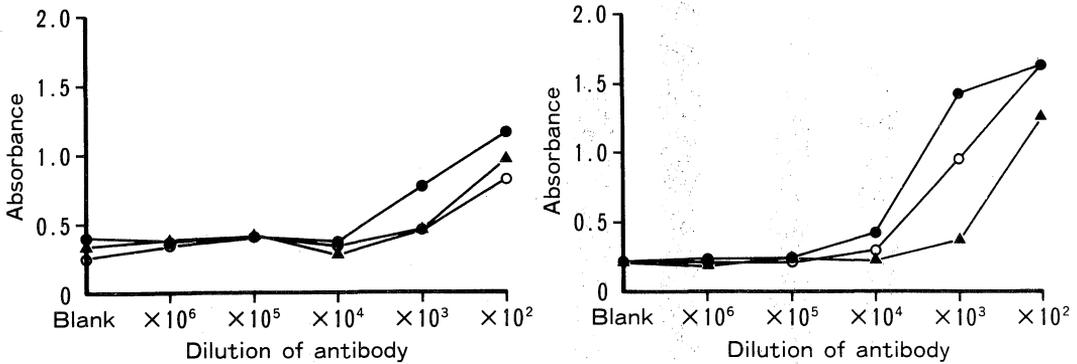


Fig. 1. Dose-response curves obtained with an ELISA for mouse anti-PS antibody (NMC-PC/1) (left) and mouse anti-PS antibody (NMC-PS/2) (right).  
● : PS, ▲ : C<sub>4</sub>bp-PS, ○ : Thrombin-modified PS

Table 1. Binding ability of monoclonal antibodies toward PS, thrombin-modified PS and C<sub>4</sub>bp-PS complex immobilized on microtitre-plate

Antigen	NMC-PC/1 (IgM) antibody		NMC-PC/2 (IgG <sub>1</sub> ) antibody	
	Ca <sup>2+</sup>	EDTA	Ca <sup>2+</sup>	EDTA
PS	×10 <sup>3</sup>	×10 <sup>3</sup>	×10 <sup>4</sup>	×10 <sup>4</sup>
Thrombin-modified PS	×10 <sup>3</sup>	×10 <sup>3</sup>	×10 <sup>4</sup>	×10 <sup>4</sup>
C <sub>4</sub> bp-PS	×10 <sup>3</sup>	×10 <sup>3</sup>	×10 <sup>4</sup>	×10 <sup>4</sup>

いはNMC-PS/2をそれぞれ200倍、1000倍にうすめたものを重層して反応させたものを、酵素標識の Immunoblotting 法 (ABC 法) により検討した。その際、SDS-PAGE 後 Sudan black 染色を行った染色バンドと比較した。SDS 存在下の各純化物は両抗体に対して Immunoblot 法では還元、非還元ともに染色性を示さなかった (Fig.2)。しかし、SDS 非存在下、すなわち可溶化されていない抗原をニトロセルロース膜に転写しておこなった Dot-blot 後の抗原に対しては陽性の反応をみた。

2. 抗 PS モノクローナル抗体の PS 吸着能 (PS 欠乏血漿の作製)

抗 PS モノクローナル抗体 (NMC-PS/2)-セファロース 4 B ゲルカラム (抗体量約 3 mg, wet gel 3 ml) に新鮮正常ヒトクエン酸血漿をペリスタルポンプにより 5 ml/h の流速で添加し、5 ml ごとに採取した。採取各 tube について Laurell 法により PS 抗原測定を行ったところ 50 ml までの分画は PS 抗原量は測定限界の 5% 以下で、以後 PS 抗原が検出され 100 ml 溶出 tube では約 25% の抗原が検出させた (Fig.3)。従って、50 ml までの溶出分画を PS 欠乏血漿としてプールした。この PS 欠乏血漿中には、II, VII, IX, X, 及び Protein C 等のビタミン K 依存凝固因子をはじめ他の凝固因子活性は 100%

Table 2. Values of coagulation factors in normal human plasma after immunoabsorption of PS

Fibrinogen	220 mg/dl
Factor II	90 %
Factor V	100 %
Factor VII	105 %
Factor VIII	90 %
Factor IX	100 %
Factor X	95 %
Factor XI	100 %
Factor XII	110 %
Protein C	96 %
Protein S activity	< 5 %
Protein S antigen	< 10 %

前後保存されていた (Table 2)。

3. 抗 PS モノクローナル抗体を用いた ELISA 法による PS 抗原の測定

マイクロタイタープレート上一次抗体として NMC-PS/1 あるいは NMC-PS/2 を、二次抗体に抗 PS 家兎血清を用い、正常プール血漿の 40 倍希釈より順次倍数希釈したサンプルを PS 抗原とし、ELISA で dose-response curve を作製した。PS の検量線は NMC-PS/1 を用いた

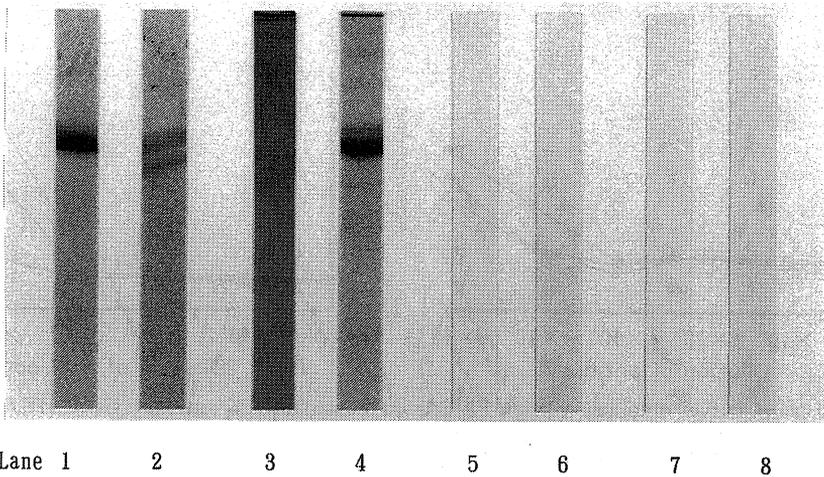


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel (7.5%) electrophoresis of PS and C<sub>4</sub>bp-PS. Lane 1-4 were stained with Sudan-black. Lane 5-8 were immunoblotted with NMC-PS/2 monoclonal antibody. Lanes 1 & 5: non reduced PS samples, Lanes 4 & 8: reduced C<sub>4</sub>bp-PS samples

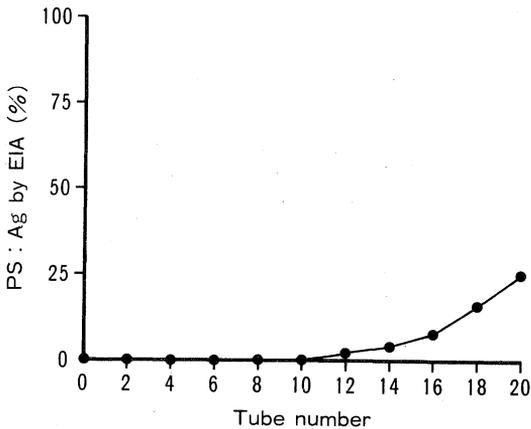


Fig. 3. Levels of PS: Ag by ELISA after absorption onto an anti-PS sepharose column. 5ml each was collected.

場合、血漿の 80 倍より 2560 倍までの間ほぼ直線関係を示し、NMC-PS/2 の場合、血漿の 80 倍より 20480 倍希釈ではほぼ直線関係を示した。抗 PS 家兎抗体アフィニティーカラムにより作製した工的 PS 欠乏血漿による検量線は NMC-PS/1 では 320 倍から 2560 倍まで、NMC-PS/2 では 320 倍から 20480 倍までの間、平坦であった。従って NMC-PS/1 を使用した場合の測定限界は 3 U/dl、NMC-PS/2 では 0.4 U/dl であった (Fig.4)。C<sub>4</sub>bp-PS complex 抗原について、一次抗体は前述と同様で二

次抗体として自家製の抗 C<sub>4</sub>bp 家兎血清を用いて、正常プール血漿の dose-response curve を作製したところ、検量線は NMC-PS/1 では 40 倍から 1280 倍の間、NMC-PS/2 では 160 倍から 40960 倍の間いずれもほぼ直線関係を示した。従って NMC-PS/1 を使用した場合の測定限界は 3 U/dl、NMC-PS/2 を使用した場合の測定限界は 0.4 U/dl であった (Fig.5)。

4. 健康成人、先天性 PS 欠乏症、成熟新生児および新生児メレナ血漿中の PS 抗原量

前述の如く、一次抗体として NMC-PS/1 を用いた場合の ELISA による測定限界は 3 U/dl で、NMC-PS/2 を用いた場合の 0.4 U/dl に比べて不良であった。従って数種臨床サンプルの ELISA による PS 抗原量の測定については一次抗体として NMC-PS/2 を用いたもので行った。健康成人 20 例の ELISA による PS 抗原量は 86.85 ± 15.22 U/dl で、また、自家製抗 PS 家兎血清を用いた EIA による PS 抗原量は 88.90 ± 23.23 U/dl で両者の相関は r=0.87 で良好であった。教室で観察した先天性 PS 欠乏症の 3 例では ELISA 法で 40, 40, 40 U/dl、EIA で 40, 40, 38 U/dl でいずれの方法でも著しく低下していた。

在胎 38-42 週、生下時体重 2501-4000 g の成熟新生児 20 例 (男児 10 例、女児 10 例) について日令 0 (生後 12 時間以内)、日令 1-6 まで経日的に PS 抗原量ならびに C<sub>4</sub>bp-PS complex 抗原量を ELISA 法で測定した。PS 抗原量は日令 3 で 38.35 ± 11.52 U/dl、日令 4 で 43.90 ±

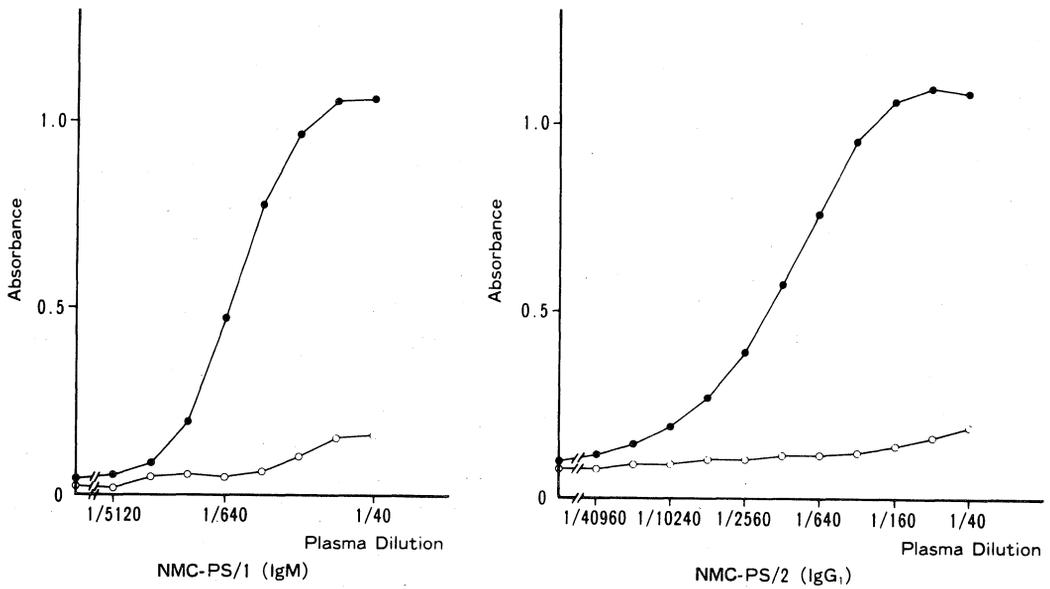


Fig. 4. Dose-response curve for measurement of protein S antigen using NMC-PS/1 and PS/2.

- Normal plasma
- Protein S-depleted plasma obtained by immunoaffinity chromatography with anti-PS rabbit serum immobilized on Sepharose 4B

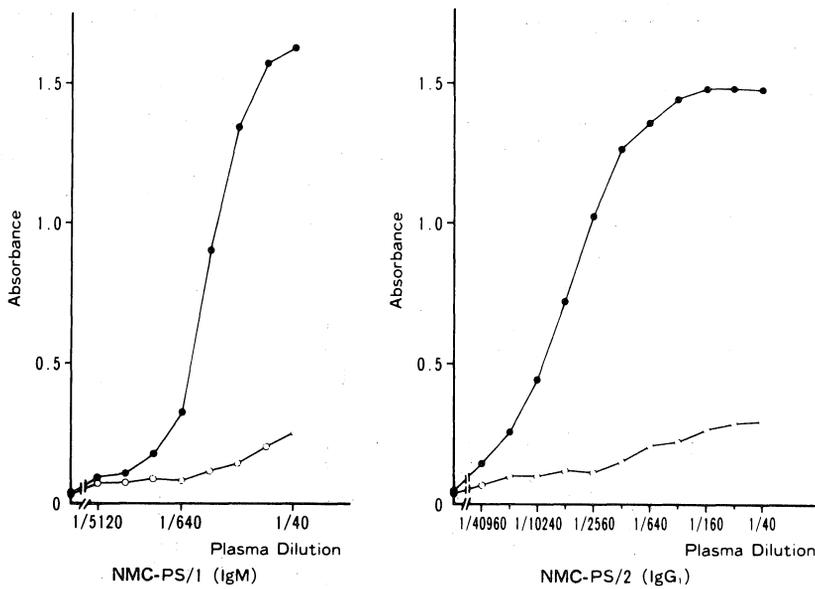


Fig. 5. Dose-response curve for measurement of  $C_4bp$ -PS complex using NMC-PS/1 and PS/2.

- Normal plasma
- Protein S-depleted plasma obtained by immunoaffinity chromatography with anti-PS rabbit serum immobilized on Sepharose 4B

19.39 U/dl, 日令 5 で 44.73±23.47 U/dl, 日令 6 で 49.00±20.62 U/dl であった。C<sub>4</sub>bp-PS complex 抗原量は日令 0 では 16.55±14.02 U/dl, 日令 1 では 20.65±9.35 U/dl, 日令 2 では 26.38±11.34 U/dl, 日令 3 では 32.13±16.62 U/dl, 日令 4 では 34.35±15.74 U/dl, 日令 5 では 38.23±17.88 U/dl, 日令 6 では 38.40±16.36 U/dl であった。

また新生児メレナ 12 例, すなわち生後 1 日-4 日で吐血を主訴とし, ヘパプラスチンテスト 10% 以下で, 周産期にビタミン K を投与されていない症例では Total PS 抗原量は 23.44±13.16, C<sub>4</sub>bp-PS 抗原量は 15.67±6.28 と正常範囲にあった (図省略)。

考 按

Köler & Milstein (1975)<sup>18)</sup> によって確立されたハイブリドーマ産生技術は従来のポリクローナル抗体と比べ、より抗原特異性の強い、単一の抗原エпитープに対応するモノクローナル抗体の作製を可能にした。モノクローナル抗体は血漿蛋白, 細胞表面抗原および細胞内物質, 微量活性物質, 微生物抗原などの免疫学的測定, 精製などに広く応用されている。血液凝固因子についても各種のモノクローナル抗体が作製され, 各因子の純化, 高感度微量測定法に利用され, 又各因子の機能と構造の解明にも有用な手段として用いられている<sup>19)-21)</sup>。教室でも von Willebrand 因子, 第 VIII 因子, 第 IX 因子, 第 X 因子に対するそれぞれ数種のモノクローナル抗体を作製し, その免疫学的特性および臨床応用についての報告を行ってきた<sup>22)-29)</sup>。Protein S のモノクローナル抗体の作製については Litwiller et al<sup>30)</sup>, Mitchell et al<sup>31)</sup>, 鈴木ら<sup>32)</sup>の報告があるにすぎない。著者は今回, 2 種の抗 PS モノクローナル抗体を作製した。そのうち NMC-PS/1 は IgM に属し, NMC-PS/2 は IgG<sub>1</sub> に属していた。ELISA 法による NMC-PS/1 の純化 PS に対する結合力は 1×10<sup>3</sup> 倍で, NMC-PS/2 の 1×10<sup>4</sup> 倍に比し弱かった。2 種の抗体はそれぞれ, PS 純化物, C<sub>4</sub>bp-PS 純化物, トロンビン処理 PS 純化物に対して, 同様の結合性を示した。また Ca, EDTA の存在による電気的影響や構造変化に対しての反応をみるために buffer に Ca, EDTA を入れて行った ELISA 法でも力価は NMC-PS/1 では 1×10<sup>3</sup> 倍, NMC-PS/2 では 1×10<sup>4</sup> 倍と同様の結果を得た。従って両抗体とも PS, C<sub>4</sub>bp-PS, トロンビン処理 PS に対し同じように結合し, また Ca, EDTA の存在にも影響されないことより, これらの抗体は C<sub>4</sub>bp との結合により影

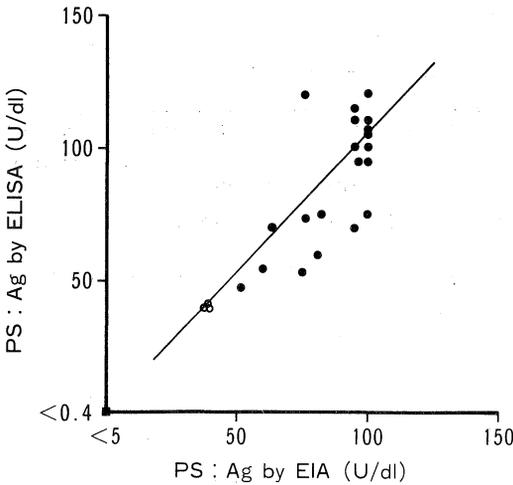


Fig. 6. Relationship between PS: Ag by ELISA using NMC-PS/2 and PS: Ag by EIA.  
● : Normal  
○ : Congenital PS deficiency  
■ : PS depleted plasma

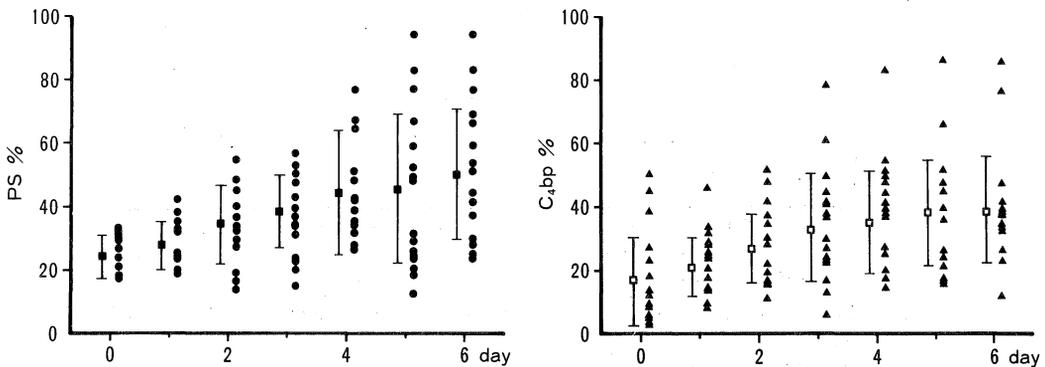


Fig. 7. The levels of Total PS: Ag and C<sub>4</sub>bp-PS: Ag in new born children.  
● : PS: Ag, ■ : mean of PS: Ag, ▲ : C<sub>4</sub>bp-PS: Ag, □ : mean of C<sub>4</sub>bp-PS: Ag

響される領域とは異なる部位を認識し、またトロンビンによる切断は、Gla-domain内であることより、Gla-domainよりC末端側を認識している可能性が強いと考えられた。またNMC-PS/2はAPC-cofactor活性作用を阻害することより、PSのAPCとのinteractionに重要な領域を認識することが推定されるので、より詳細な解析のため、SDS-PAGE後、ニトロセルロース膜に転写したPSに対する結合性をみたが、両抗体とも結合せず、PSのSDSによる可溶化により、結合性を失うものと考えられた。

Litwillerら<sup>30)</sup>はCa, EDTAの存在が結合に影響する抗体を作製し、それらを用いてPSの純化を試みている。Mitchellら<sup>31)</sup>はIgG<sub>1</sub>に属するモノクローナル抗体を用いてアフィニティークラムによりPSの純化を試みたが、作製できたのはPSにAPC-independentな抗凝固作用が加わったmodified form PSであったと報告している。鈴木ら<sup>32)</sup>は、12種の抗PSモノクローナル抗体を作製し、その免疫学的特性について検討している。そのうちSDS-PAGE後にニトロセルロース膜に転写された還元および非還元PSに結合せず、Ca, EDTAの存在に影響されず、APCの補酵素活性を阻害するというわれわれの作製したNMC-PS/2と類似した抗体についての報告もされている。

次に抗PSモノクローナル抗体の臨床的応用の一つとして、まずPSとの結合性の強いNMC-PS/2を使用し、免疫吸着法を用いたPS欠乏血漿の作製を試みた。抗体IgG分画3mgを用いて1回に約50mlのPS欠乏血漿を得ることができた。欠乏血漿中のPS:Agは5%以下であった。先天性PS欠乏症血漿の入手は制限されるので、この免疫吸着法による人工的PS欠乏症血漿はPS活性の測定に基質として日常ルーチンに使用されうる利点をもっている。なお著者は吸着カラムより3M-NaSCNにて蛋白を溶出し、ゲル濾過にてPSの精製を試みたが、ELISA法で測定したところ、C<sub>4</sub>bp-PSと考えられる分画は検出できた。一方、free-PSと考えられる分画は検出できなかった。これは、Mitchellらの報告したようなPSのmodified formが関係している可能性が推察されるが、明らかではない。

PS抗原量の測定には、従来ポリクローナル抗体を用いてLaurellの免疫電気泳動法(EIA)<sup>10)</sup>が用いられてきた。教室の杉本らは抗PS家兎ポリクローナル抗体を用いてenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)について報告した<sup>13)</sup>。著者は、一次抗体にモノクローナル抗体、二次抗体に抗PS家兎ポリクローナル抗体を用いてELISA systemを開発した。NMC-PS/1, NMC-PS

/2ともに使用可能であったが、結合強度のより強いNMC-PS/2を3000倍希釈して使用した。二次抗体、標識抗体などの条件はポリクローナル抗体を用いたELISA法に準じた。本法による測定限界は0.4 U/dlで従来の方法に比してより高感度の測定系と考えられた。正常血漿についてのELISA法とLaurell法の相関は相関係数0.87と良好であった。さらに抗PS家兎抗体より得られた人工的PS欠乏血漿、ならびに先天性PS欠乏症家系の3例も測定可能であった。また、抗PS家兎抗体のかわりに抗C<sub>4</sub>bp家兎抗体を使用することによりC<sub>4</sub>bp-PSの測定も可能であった。

正常新生児のPS, C<sub>4</sub>bp-PS抗原量については、当教室の橋本<sup>33)</sup>をはじめとして数カ所からの報告があるが<sup>34)-35)</sup>、いずれも出生時はtotal-PSは20-50%程度と成人よりやや低値なのに比べ、C<sub>4</sub>bp-PSは10-30%とより低値であり、そのため相対的にfree-PSが優位となっているとしている。今回の著者の測定した20例においても同様の傾向がみられ、日令が大きくなるにつれて漸増していくことが観察された。新生児メレナのPS, C<sub>4</sub>bp-PS抗原量については当教室の三上<sup>36)</sup>の報告があるが、今回の著者の成績もそれと類似しており、total-PS, C<sub>4</sub>bp-PS抗原量ともに同時期の新生児の正常範囲にあった。

以上の如く、著者の作製した抗PSモノクローナル抗体は人工的PS欠乏症血漿を容易に作製することができ、PS活性の測定基質として利用しえるのみならず、又、PS抗原量の測定に極めて有用な試剤であった。

## 結 語

ヒトprotein Sに対するマウスモノクローナル抗体を2種作製した。(NMC-PS/1, 及びNMC-PS/2)

1. NMC-PS/1はIgMに属し、PS活性を阻害しなかったが、NMC-PS/2はIgG<sub>1</sub>に属し、抗PS活性を示した。
2. NMC-PS/1, NMC-PS/2ともにPS, C<sub>4</sub>bp-PS, トロンビン処理PSすべてに結合した。Ca, EDTAの存在には影響されなかったが、SDSによる可溶化により結合性は失われた。
3. NMC-PS/2を用いた免疫吸着法により、抗体量3mgで約50mlのPS欠乏血漿を作製した。
4. NMC-PS/2を用いてELISAによるPS抗原測定法を確立した。測定下限は0.4 u/dlであった。
5. ELISA法による正常新生児(日令0-6)のtotal PS抗原量は日令0で24.68±4.49 U/dl, C<sub>4</sub>bp-PS抗原量は16.55±14.02 U/dlで以後漸増していた。新生児メ

レナでは total PS 抗原量は  $23.44 \pm 13.16$  U/dl, C<sub>4</sub>bp-PS 抗原量は  $15.67 \pm 6.28$  と正常児とほぼ差がなかった。

本論文要旨は第 30 回日本臨床血液学会総会で発表した。

## 文 献

- 1) DiScipio, R. G., Hermodson, M. A., Yates, S. G. and Davie, E. W.: A comparison of human prothrombin, factor IX (Christmas factor), factor X (Stuart factor), and protein S. *Biochemistry* **16**: 698-706, 1977.
- 2) 清水信義: ヒト染色体の遺伝子マッピング. *日本臨牀* **47**: 20-58, 1989.
- 3) Lundwall, A., Dackowski, W., Cohen, E., Shaffer, M., Mahr, A., Dahlback, B., Stenflo, J. and Wydro, R.: Isolation and sequence of the cDNA for human protein S. a regulator of blood coagulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 6716-6720, 1986.
- 4) Dahlback, B., Lundwall, A. and Stenflo, J.: Primary structure of bovine vitamin K-dependent protein S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 4199-4203, 1986.
- 5) Dahlback, B., Lundwall, A. and Stenflo, J.: Localization of Thrombin cleavage sites in the amino-terminal region of bovine protein S. *J. Biol. Chem.* **261**: 5111-5115, 1986.
- 6) Walker, F. J.: Regulation of activated protein C by a new protein. *Biol. Chem.* **255**: 5521-5524, 1980.
- 7) Walker, F. J.: Protein S and the regulation of activated protein C. *Semin Thromb. Hemostasis* **10**: 131-138, 1984.
- 8) Suzuki, K., Nishioka, J., Matsuda, M., Murayama, H. and Hashimoto, S.: Protein S is essential for the activated protein C-catalyzed inactivation of platelet-associated factor V. *J. Biochem.* **96**: 455-460, 1984.
- 9) Walker, F. J.: Regulation of activated Protein C by protein S. *J. Biol. Chem.* **256**: 11128-11131, 1981.
- 10) Dahlback, B. and Stenflo, J.: High molecular weight complex in human plasma between vitamin K-dependent protein S and complement component C<sub>4</sub>b-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 2512-2516, 1981.
- 11) Suzuki, K., Nishioka, J. and Hashimoto, S.: Regulation of activated protein C by thrombin-modified protein S. *J. Biochem.* **94**: 699-705, 1983.
- 12) 杉本充彦, 橋本憲治, 奥 香世, 金廣昭美, 今中康文, 三上貞昭: ヒト Protein S および C<sub>4</sub>b binding protein-Protein S complex の純化. *奈医誌*. **37**: 295-300, 1986.
- 13) Sugimoto, M., Mikami, S., Hashimoto, K., Kanehiro, T., Oku, K., Imanaka, Y., Imai, S., Tsubura, Y. and Fukui, H.: Enzyme-linked immunosorbent assays for total protein S antigen and for protein S antigen complexed with C<sub>4</sub>b-binding protein-determination of free protein S antigen in plasma. *奈医誌*. **38**: 593-599, 1987.
- 14) 杉本充彦, 今井俊介, 螺良義彦, 橋本憲治, 今中康文, 奥 香世, 松岡宏明, 新家 興, 三上貞昭, 福井 弘, 星田 徹, 塚本政志, 岡崎孜雄: 脳硬塞症を呈した先天性プロテインS欠乏症の1家系3症例. *臨床血液* **29**: 855-861, 1988.
- 15) Suzuki, K. and Nishioka, J.: Plasma protein S activity measured using protac, a snake venom derived activator of protein C. *Thromb. Reserch.* **49**: 241-251, 1988.
- 16) Laurell, C. B.: Quantitative estimation of proteins S by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. *Analyt. Biochem.* **15**: 45-52, 1966.
- 17) Mishell, B. B. and Shiigi, S. M.: Selection method in cellular immunology. Mishell, B. B. and Shiigi S. M. and Freeman, W. H. Company, San Francisco, 1980.
- 18) Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**: 495-497, 1975.
- 19) 小嶋哲人, 齊藤英彦: 凝固因子に対するモノクローナル抗体——その種類と応用. *Immunohematology* **8**: 154-158, 1986.
- 20) Goodall, A. H., Kemble, G., O'Brien, D. P., Rawlings, E., Rotblat, F., Russell, G. C., Janossy, G. and Tuddenham, E. G. D.: Preparation of factor IX deficient human plasma by immunoaffinity chromatography using a monoclonal antibody. *Blood* **59**: 664-670, 1982.
- 21) Saito, H., Ishihara, T., Suzuki, H. and

- Watanabe, T.:** Production and characterization of a murine monoclonal antibody against a heavy chain of hageman Factor (Factor X II). *Blood* **65**: 1263-1268, 1985.
- 22) 嶋 緑倫, 森本純司, 今井俊介, 螺良義彦, 吉岡章, 福井 弘: von Willebrand 因子 (vWF) に対するモノクローナル抗体の作製とその免疫学的特性. *奈医誌*. **36**: 662-669, 1985.
- 23) 嶋 緑倫, 森本純司, 今井俊介, 螺良義彦, 吉岡章, 福井 弘: フォン・ウィレブランド因子 (vWF) に対するモノクローナル抗体の作製とその免疫学的特性. *血液と脈管* **16**: 205-207, 1985.
- 24) 吉岡 章, 嶋 緑倫: 第VIII因子/フォン・ウィレブランド因子 (F. VIII/vWF) 複合体に対するモノクローナル抗体. *日血誌*. **50**: 681-687, 1987.
- 25) **Tanaka I.:** A new solid-phase factor VIII coagulant activity assay using a monoclonal antibody. *奈医誌*. **38**: 113-123, 1987.
- 26) 吉岡 章, 大久保芳明, 西野正人, 阪井利幸, 杉本充彦, 西村拓也, 田中一郎, 福井 弘: 抗第IX因子モノクローナル抗体の作製とその免疫学的特性の検討. *臨床血液* **26**: 153-158, 1985.
- 27) 西村拓也, 大久保芳明, 西野正人, 阪井利幸, 澤井遵, 田中一郎, 高宮 脩, 吉岡 章: 抗ヒト第IX因子モノクローナル抗体 (3A6) を用いた免疫吸着法による第IX因子欠乏血漿の作製と応用. *臨床病理* **34**: 469-474, 1986.
- 28) **Okubo, Y., Shima, M., Sugimoto, M., Kanehiro, T., Oku, K., Tanaka, I., Yoshioka, A. and Fukui, H.:** The production and characterization of four monoclonal antibodies to human factor X. *奈医誌*. **38**: 20-28, 1987.
- 29) **金廣昭美:** ヒト第X因子の測定 I. 抗X因子活性と抗原量の同時測定法. *奈医誌*. **38**: 744-752, 1987.
- 30) **Litwiller, R. D., Jenny, R. J., Katzmann, J. A., Miller, R. S. and Mann, K. G.:** Monoclonal antibodies to human vitamin K-dependent protein S. *Blood* **67**: 1583-1590, 1986.
- 31) **Mitchell, C. A., Delemen, S. M. and Salem, H. H.:** The anticoagulant properties of a modified form of protein S. *Thromb. Haemost.* **60**: 298-304, 1988.
- 32) 西岡淳二, 出屋敷喜宏, 林 辰弥, 鈴木宏治: モノクローナル抗プロテインS抗体を用いたプロテインSの構造・機能相関の解析. *日血誌*. (抄録)**51**: 339, 1988.
- 33) 橋本憲治: 新生児期, 乳児期におけるプロテインSの推移. *奈医誌*. **40**: 421-434, 1989.
- 34) **Melissari, E., Nicolaides, K. H., Scully, M. F. and Kakkar, V. V.:** Protein S and C<sub>4</sub>b-binding protein in fetal and neonatal blood. *Brit. J. Haematol.* **70**: 199-203, 1988.
- 35) **Schwarz, H. P., Muntean W., Watzke, H., Richter, B. and Griffin, J. H.:** Low total protein S antigen but high protein S activity due to decreased C<sub>4</sub>b-binding protein in neonates. *Blood* **71**: 562-565, 1988.
- 36) 三上貞昭, 上田直子, 今中康文, 杉本充彦, 橋本憲治, 高宮 脩: 新生児メレナにおけるPIVKA-プロテインCおよび PIVKA-プロテインS. *産婦血液* **13**: 87-92, 1989.