

19


(別紙様式第3号)

論 文 要 旨

論 文 題 目

A Monoclonal Antibody Against Bovine Thrombin Reacting  
to the C-Terminal Side of Thrombin

(トロンビンのC-末端に反応する牛トロンビンのモノクローナル抗体)

氏名 森山朝江 

[ 目 的 ]	PTCR	後	に	生	じ	る	血	管	再	狭	窄	は	、	血	管				
内	に	発	生	し	た	ト	ロ	ン	ビ	ン	と	そ	の	活	性	の	持	続	が
原	因	で	あ	ろ	う	と	推	察	さ	れ	る	。	物	理	的	破	碎	に	よ
っ	て	フ	ィ	ブ	リ	ン	ク	ロ	ッ	ト	内	か	ら	血	管	内	に	放	出
さ	れ	た	ト	ロ	ン	ビ	ン	は	、	そ	の	再	狭	窄	に	関	与	す	る
可	能	性	が	あ	る	と	考	え	ら	れ	る	。	そ	こ	で	、	血	管	内
に	出	現	し	た	ト	ロ	ン	ビ	ン	を	定	性	的	に	検	出	す	る	方
法	や	定	量	的	に	測	定	で	き	る	方	法	を	開	発	す	る	こ	と
は	、	血	管	再	狭	窄	の	原	因	追	究	や	阻	止	方	法	を	開	発
す	る	う	え	に	有	用	で	あ	る	。	本	研	究	で	は	、	循	環	血
中	に	出	現	し	た	ト	ロ	ン	ビ	ン	の	検	出	や	定	量	方	法	の
開	発	を	目	的	と	し	て	ト	ロ	ン	ビ	ン	の	抗	体	を	作	製	し
た	。	さ	ら	に	そ	の	抗	体	の	抗	原	特	異	性	お	よ	び	抗	原
認	識	部	位	を	同	定	し	、	ト	ロ	ン	ビ	ン	量	の	定	量	法	す
な	わ	ち	、	ELISA double-sandwich	法	の	開	発	を	目	的	と	し	た	。				
[ 方 法 ]	牛	ト	ロ	ン	ビ	ン	と	フ	ロ	イ	ン	ド	完	全	ア	ジ			
ュ	バ	ン	ト	を	用	い	て	BALB/c	マ	ウ	ス	の	腹	腔	へ	感	作	し	
た	。	感	作	後	マ	ウ	ス	の	脾	細	胞	と	マ	ウ	ス	ミ	エ	ロ	ー
マ	細	胞	(	P3U1	)	を	用	い	て	細	胞	融	合	を	行	っ	た	。	
細	胞	融	合	後	、	抗	体	産	生	の	強	い	細	胞	を	選	択	し	、

ハイブリドーマ細胞として確立した。抗体の精製は、Protein A-Sepharose CL-4Bを用いて行った。トロロンビンに対するポリクローナル抗体は、ラットを用いて作製した。作製したトロロンビンのモノクローナル抗体の抗原特異性は、ELISA法を用いて検討した。次に、作製したモノクローナル抗体とポリクローナル抗体を用いて、ELISA double-sandwich法を開発した。




[結果] 作製したトロロンビンのモノクローナル抗体のサブクラスは、マウスIgG<sub>1</sub>、κ-chainであった。重炭酸緩衝液を用いてwellに固相したトロロンビンは、そのモノクローナル抗体と反応を示さなかった。Poly-L-Lysineとグルタルアルデヒドを用いて、トロロンビンのN末端(アミノ末端)側をwellに固相化した場合には、トロロンビンの濃度依存性に吸光度の上昇が見られた。すなわち、作製したモノクローナル抗体は、トロロンビンのC末端側を認識しているのが示唆された。また、作製したモノクローナル抗体は、人と牛トロロンビンとは同程度の反

応を示したが、トロロンビン様酵素ハプトビンとの反応性は見られなかった。このモノクローナル抗体は、トロロンビンとアンチトロロンビン III ( AT-III ) の複合体を認識しなかった。しかしながら、脱フィブリノーゲン血漿を希釈し、AT-III 活性を 5 % 以下に調整した溶液に添加したトロロンビン量の測定は可能であった。さらにフィブリン塊内に取り込まれたトロロンビン ( Postclotting thrombin ) の測定も可能であった。

[ 考察 ] 作製したモノクローナル抗体を用いて、AT-III と複合体を形成していないトロロンビンの検出・定量が可能となった。未反応遊離トロロンビンの定量ばかりでなく、循環血中の Postclotting thrombin ( Bound thrombin ) のようなフィブリノーゲン・フィブリン断片と結合しているトロロンビンの定量も原理的には可能となった。本論文にて開発された ELISA double-sandwich 法をさらに改良し臨床場面から得られる各種検体のトロロンビンや、Postclotting thrombin の定量法の確立を現在進めている。

## 論文審査結果の要旨

(1)

報告番号	課程博 * 論文博	第 号	氏名	森山朝江
論文審査委員	平成 15 年 2 月 24 日			
	主査教授	田中勇悦		
	副査教授	山根誠久		
	副査教授	植田真一郎		
(論文題目)				
A Monoclonal Antibody Against Bovine Thrombin Reacting to the C-Terminal Side of Thrombin (トロンビンのC-末端に反応する牛トロンビンのモノクローナル抗体)				
(論文審査結果の要旨)				
上記論文に対して、研究に至る背景と目的、論文の内容、特に実験方法、手技と学術的水準、研究の成果とその意義について慎重に審査し、以下の審査結果を得た。				
1. 研究の背景と目的				
血管、とりわけ冠動脈の狭窄を生じる疾患に対する治療法として冠動脈内血栓溶解療法、経皮的冠動脈形成術 (PTCA、PTCR) が施行されているが、施行後6ヶ月以内に血管の再狭窄の出現が30~40%の頻度に認められている。このような再狭窄には、血管内膜障害により生じる壁内血栓、中膜平滑筋の遊走増殖による新生内膜肥厚、外膜由来の筋線維芽細胞の増殖が複合的に作用することが明らかにされてきた。トロンビンは、血液凝固の活性化、血小板の活性化、内皮細胞への収縮作用、血管平滑筋細胞や線維芽細胞への増殖作用などの生理機能を持つことから、PTCR などによる血管壁への物理的刺激によってフィブリンクロット内から血管内に放出されたトロンビン (postclotting トロンビン) が、再狭窄の原因を引き起こす可能性があると考えられる。そこで、血管内に出現したトロンビンの測定方法の開発は、血管再狭窄の原因追究や阻止方法を開発するうえで有用であると考えられる。本論文では、トロンビンの免疫学的定量方法の開発を目的として抗トロンビン抗体を作製し、トロンビン定量法の構築を試みている。				

- 備考 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書とすること。
- 2 要旨は800字~1200字以内にまとめること。
- 3 \*印は記入しないこと。

## 論文審査結果の要旨

(2)

### 2. 論文の方法と内容

- 1) 精製トロンビン (牛) で BALB/c マウスを免疫し、感作脾細胞とマウスミエローマ細胞 (P3U1) をポリエチレングリコールを用いて融合後、HAT 選択、限界希釈法を用いて抗トロンビンモノクローナル IgG<sub>1</sub> 抗体 (MAb) を産生するハイブリドーマ細胞を樹立した。また同抗原でラットを免疫し抗トロンビンポリクローナル抗体を作製した。
- 2) 精製した MAb は、重炭酸緩衝液を用いて非特異的に固相化したトロンビンには反応しなかった。そこで、poly-L-lysine とグルタルアルデヒドを用いて、トロンビンの N 末端を介して固相化を行った結果、トロンビンの濃度依存性に抗体結合の上昇がみられた。これらの結果から、この MAb がトロンビンの C 末端と反応すると推定した。また、この MAb はヒトトロンビンとも反応することが分かった。
- 3) 抗トロンビンポリクローナル抗体は、血清より硫酸分画法により精製した。
- 4) 作製したこれら2種類の抗トロンビン抗体を用いてトロンビン定量を目的とするサンドイッチ ELISA 法を組み立てた。この方法は antithrombin III (AT-III) と複合体を形成していないトロンビンを 1 µg/ml の検出感度で定量的に測定した。また、試験管内で調製した postclotting トロンビンをもこのサンドイッチ ELISA 法を用いることにより定量された。

### 3. 研究成果

本論文では、1) ヒトトロンビンと交叉反応性を示す抗牛トロンビン MAb と抗牛トロンビンラットポリクローナル抗体を作製し、サンドイッチ ELISA 法を新たに確立した。2) この方法は、AT-III 非存在下のトロンビンの定量、および血管の再狭窄の原因と予想されるフィブリン内に取り込まれたトロンビン、すなわち postclotting トロンビン定量に応用可能であることが示された。本研究の成果は、循環血中の postclotting トロンビン量の推移と再狭窄の発生頻度の関係を明らかにし、新たな視点から血管の再狭窄の原因を追求するための基盤形成に寄与するものであり、本研究は学位授与に値する内容であると判断された。