

ヒト血清 M 蛋白の IgGH 鎖サブクラスの型判定について —高分解能アガロースゲル等電点電気泳動法の分離と検出のための条件設定—

一 村 光 子・唐 下 博 子・崎 山 順 子・中 田 安 成・遠 藤 浩

IgG Heavy-Chain Subclass Typing of Human Serum M-Protein —Optimal condition for the separation and the detection with high resolution of agarose gel isoelectrofocusing—

Mitsuko ICHIMURA, Hiroko TOHGE, Junko SAKIYAMA, Yasunari NAKATA and Hiroshi ENDO

IgG Heavy-Chain subclass typing of human serum M-protein were isoelectrofocussed (IEF) in agarose gel, and then the bands of IgG were detected with peroxidase-conjugated anti-human IgG1-4 monoclonal antibodies on the same isoelectrofocussed agarose gel plate.

This IEF enzyme immunodetection patterns were composed of four to eight discrete bands (The range of pI was 6.0 to 9.0).

These bands were dependent on immunofixation bands.

It was very specific and clear to detect the subclass of IgG Type M-protein in human serum using this method.

Key Words : IgG Subclass, M-Protein, Isoelectrofocusing, Monoclonal Antibodies

はじめに

ヒト免疫グロブリン (immunoglobulin: Ig) は、H鎖 (heavy chain) と L鎖 (light chain) よりなる蛋白で、その一次構造 H鎖の違いから、クラス別 Ig (IgA, IgM, IgG, IgD, IgE) に分類される。クラス別 Ig のなかには、さらにサブクラスとして分類される亜群があり、IgG には IgG 1, IgG 2, IgG 3, IgG 4 の 4 種類の存在が知られている¹⁾。

日常臨床検査では、電気泳動分析で M 蛋白 (monoclonal protein) が検出されると、M 蛋白の確認のため、M 成分のクラス別分類が行われるが、サブクラスの型判定は行われていない。これまで、臨床検査への導入を目的とした M 蛋白サブクラスの型判定の方法として、イムノプロット法²⁾や免疫吸収電気泳動法³⁾が報告されている。われわれはこれらの方法とは別に、通常電気泳動法とモノクローナル抗体の組み合わせによる検査室

で容易に実施できる方法を考案し報告したが⁴⁾、今回さらにこの簡易法を応用して、分離能に優れたアガロースゲル等電点電気泳動法による型判定法を試み、分離と検出のための条件設定を行った。

実験方法

1. 試料

免疫固定法で IgG 型 M 蛋白と同定された患者血清 1 μ l を等電点用アガロースゲルフィルム上に塗布した。

2. 等電点電気泳動法

1.0%アガロース液 (アイソゲル TM アガロース, Pharmacia LKB Biotechnology) 8.0ml にキャリアアンホライト (アンホライン, Pharmacia LKB Biotechnology) の pH3.5~10.5 0.7ml と pH 5~8 0.7ml とを添加混合し、ゲルフィルム (Agafix, 和光純薬工業) を用いて、0.5mm 厚ゲルプレート 110×125mm を作製後、ゲルプレ-

ト上に患者血清 1 μ l を塗布し、等電点電気泳動装置 (Multiphor II System, Pharmacia LKB Biotechnology) にセットし、200V 20分、300V 20分、400V 10分、500V 10分、600V 10分、700V 5分 計75分間通電した。

3. モノクローナル抗体によるサブクラス検出法
泳動終了後、ゲルプレートを固定液 (メタノール46ml と酢酸 8 ml に純水を加えて100ml とする) に20分間浸した後、0.05% Tween20加 TBS 液 (150mM NaCl 加 20mM Tris-HCl buffer, pH7.5) で5分間ずつ3回洗浄する。

IgG 1 (POD 標識抗ヒト IgG 1 抗体, Binding Site Ltd.), IgG 2 (POD 標識抗ヒト IgG 2 抗体, Binding Site Ltd.), IgG 3 (POD 標識抗ヒト IgG 3 抗体, ヤマサ醤油 KK), IgG 4 (POD 標識抗ヒト IgG 4 抗体, ヤマサ醤油 KK), それぞれ

のモノクローナル抗体20 μ l を TBS 液20ml と混和し、ゲルプレート上に注ぎ 4 $^{\circ}$ C 一晩反応させる。反応終了後、ゲルプレートを0.05% Tween 加 TBS 液で5分間ずつ3回洗浄する。次にゲルプレートを発色液 (0.03% 4-Methoxy-1-Naphthol 加 TBS 液100ml と0.03ml H₂O₂ 加 メタノール 10ml の混和液) に浸し、発色バンドが確認できたら純水に移し、反応をとめるとともに十分に洗浄を行う。

4. 免疫固定法, たん白染色法

免疫固定法, たん白染色法, pI の測定は既報の方法に従った。⁵⁾

結 果

1. Fig. 1 にアガロースゲル等電点電気泳動法によるM蛋白患者血清 (No. 1 ~ 4), 健常者血清

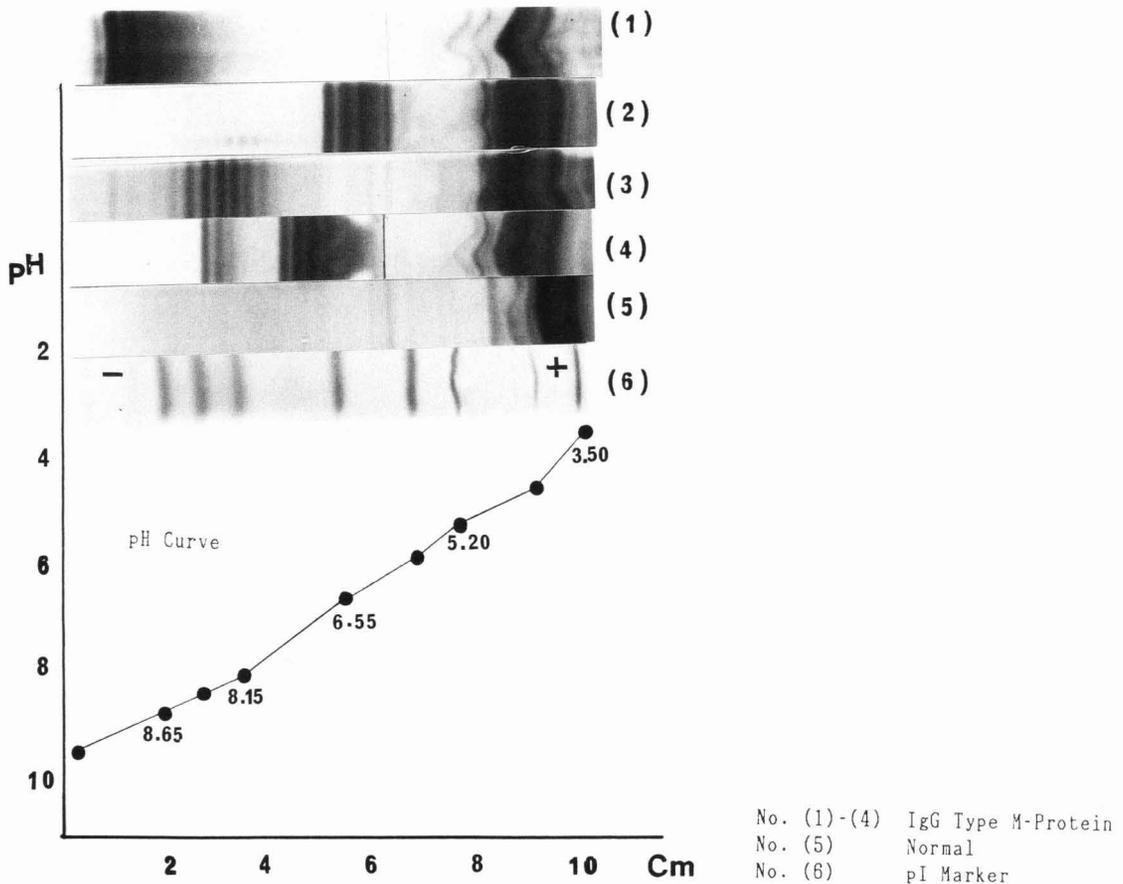


Fig. 1. M-Protein Pattern and pH Curve

(No. 5), pI マーカー (No. 6) の等電点電気泳動像を示す。グラフは pI マーカ (No. 6) に対応する pH gradient curve を示している。pH curve と泳動像 (No. 1 ~ 4) から, M 蛋白は pI6.0~9.0 の間に泳動されており, M 蛋白が 4 分画から 8 分画に分離されている (Fig. 1)。

2. Fig. 2-A に, 抗ヒト IgG 血清 (Dakopatts Co.Ltd.) による M 蛋白 (No. 1 ~ 4) と健常者 (No. 5) の免疫固定像を示す。これらの免疫固定像から, No. 1 ~ 4 の患者血清の M 蛋白の分離像は, IgG 型であることが証明された。Fig. 2-B は, ペルオキシダーゼ (POD) 標識モノクローナル抗体による IgG 1, IgG 2, IgG 3, IgG 4 の酵素免疫検出像を示す。IgG 型 M 蛋白 (Fig. 2-A) の pI 差に基づく IgG サブクラスの細分画が特異的に検出された。

3. 本泳動法分離後の POD 標識モノクローナル抗体を用いた酵素免疫検出法による, M 蛋白の IgG サブクラス 1 ~ 4 の検出感度について実験を行った。

症例 1 (血清中 IgG 濃度 3.24g/dl) では, 患者原血清を対照に 5 倍から 100 倍まで希釈し, それぞれの検出像を比較した。

本検出像 (Fig. 3, IgG 1) では, 60 倍希釈までは判定可能であるが, 40 倍希釈までが鮮明な泳動像となっている。

症例 2 (血清中 IgG 濃度 1.83g/dl) 症例 3 (血清

中 IgG 濃度 1.90g/dl) 症例 4 (血清中 IgG 濃度 1.11 g/dl) についても, IgG と同様に患者原血清を対照に希釈による検出感度の実験の結果, IgG 2 は 16 倍希釈, IgG 3 では 16 倍希釈, IgG 4 では 8 倍希釈までの希釈率において鮮明な検出像が得られた (Fig. 3)。これらの実験から, IgG 1 ~ IgG 4 の検出条件として IgG 濃度に換算すれば 0.1g/dl に相当することから, 血清中 IgG 濃度が 1.0g/dl 以上の M 蛋白であれば, 分画が 4 ~ 8 分画の細分画に分離されても, 患者血清 0 ~ 5 倍の希釈条件の範囲で, 鮮明な検出像が得られることが判った。

アガロースゲルプレート上での患者血清と

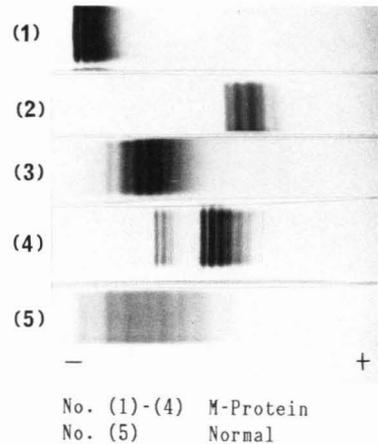


Fig. 2-A. Immunofixation pattern

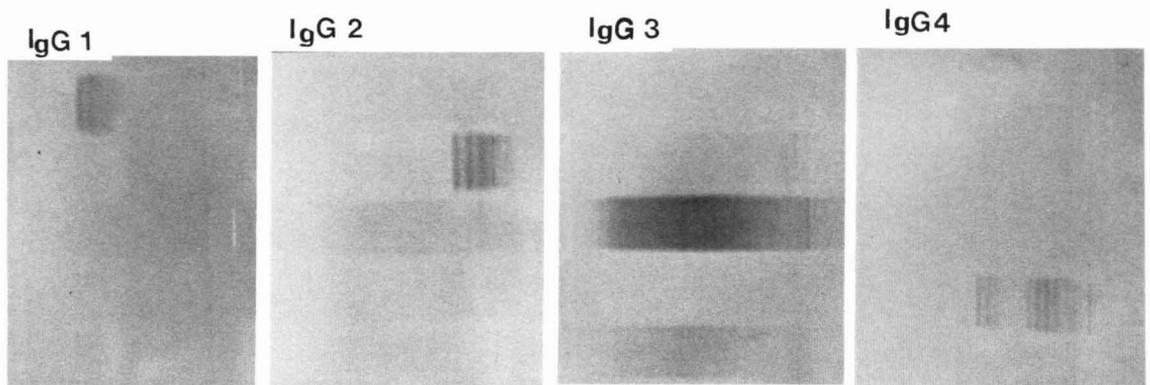


Fig. 2-B. Enzyme immuno detection pattern

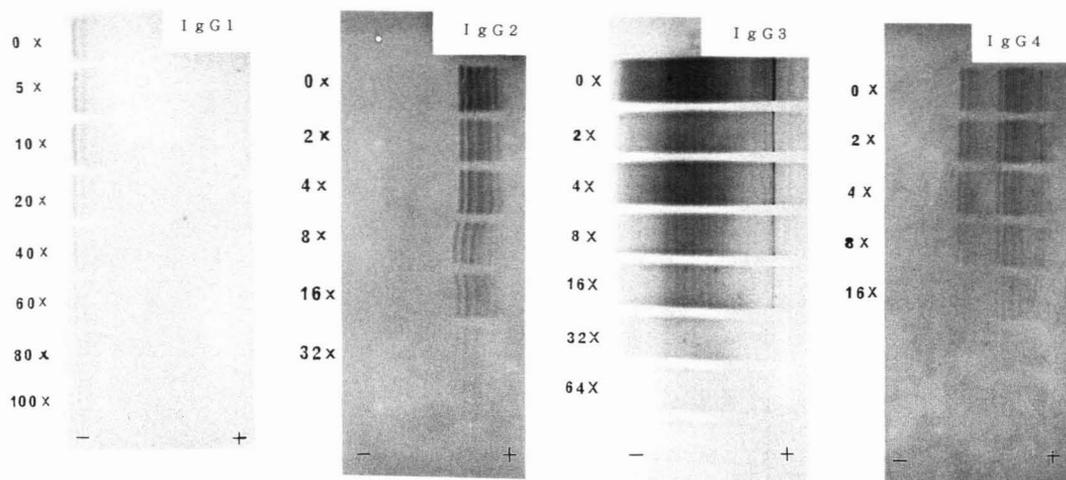


Fig. 3. Sensitivity for detection of IgG subclass

POD 標識モノクローナル抗体との反応時間は、1時間、4時間、6時間、一晚と反応を行ったところ、4時間以上であれば各分画の判定は可能であるが、一晚反応させた方がより鮮明な検出像となったことから、本法では一晚の反応時間とした。

抗体については、500倍から2000倍希釈の濃度について検討を行った。500倍希釈では発色時間は短い、バックグラウンドが濃染した。2000倍希釈ではバックグラウンドは着色されないが、分画が確認されるまでの時間が長いことから本法では1000倍希釈を選んだ。使用した抗ヒトPOD標識モノクローナル抗体はBinding Site Co. Ltd. (BDS社、イギリス)とヤマサ醤油株式会社(日本)両社の抗血清を用いた。ただし、IgG 1とIgG 2については、BDS社のみを使用した。

考 察

免疫固定法によって同定されたIgG型M蛋白の等電点電気泳動法によるサブクラスの型判定法を試みた。本法は通常アガロースゲル電気泳動法とモノクローナル抗体を組み合わせた簡易法を、高分解能を有するアガロースゲル等電点電気泳動法に応用した方法である。通常電気泳動法では、IgG型M蛋白は1分画として分離されるが、本泳動法はpI差の原理に基づく分離方法であるため、

IgG型M蛋白は数分画に分離される。また、血清中に溶存するM蛋白濃度も、個体により不均一であり、本法による型判定法は分離と検出のための厳密な条件設定が必要である。分離については、アガロースゲル濃度と両性担体の混合割合と通電条件について実験を行った。モノクローナル抗体による検出については、抗原となる患者血清と抗体の希釈により検出感度の実験を行った。すなわちアガロース濃度は通常1.0%から0.9%が用いられるが本実験では高分子IgG分離のため0.8%の低濃度とした。キャリアアンホライトはIgG免疫固定分画像がpI curveのアルカリ側に泳動されたことから2種類の異なるpIの混合液(pH 3.5~10.5, pH 5~8)とし、電圧は200Vから700Vの低電圧から高電圧に徐々に電圧を上げ通電時間は70分間とし、安定したpH curveとなるようにした。試料は血清1μlを使用、モノクローナル抗体は1000倍希釈とした。これらの本実験で設定した最適条件下では、免疫固定分画像をそのまま反映したIgGサブクラス分画像を得ることが出来た。

これまで、等電点分画のIgG型M蛋白サブクラスタイピング法として、ポリアクリルアミドゲル(PAG)を支持体とした泳動法が報告されている⁹⁾。患者血清をPAG等電点電気泳動法で分離

し、ニトロセルロース膜に転写後、イムノブロット法でサブクラスの型判定を行う方法である。われわれはPAGの代わりに、PAGよりも高分子蛋白の分離に優れた特性を持つ高分解能アガロースゲル⁷⁾を支持体として、等電点電気泳動法の実験を行った。患者血清を泳動後、泳動に用いた同一のアガロースゲルプレート上で、直接モノクローナル抗体を反応させる方法である。本法は分離能に優れていること、泳動に用いた支持体から別の支持体への転写を必要としないことなどにおいて優れている。しかしモノクローナル抗体との反応時間が長いこと、抗体と患者血清との反応が常に最適であるかなどに問題があり、今後多数例での検討が必要である。

IgG サブクラス型判定の臨床的意義についてはモノクローナル抗体を用いて、悪性M蛋白血症のIgG 1～4の定量⁹⁾や二峰性M蛋白血症のサブクラスの型判定^{9,10)}などが報告され、その治療、予後との関係について検討されている。本法のpI差に基づく分画像のIgG サブクラス型判定法は、患者血清が集中する臨床検査室での、詳細な免疫学的解析のための一手法として有用であると考えられる。

文 献

- 1) Frangione, B., Milstein, C., Pink, J.R. L.: Structural studies of immunoglobulin G. *Nature* 221 : 145-148, 1969.
- 2) 右田俊介, 広橋 憲: 免疫吸収電気泳動法(抄). *生物物理化学* 29 : 144, 1987.
- 3) Hamilton, R. G.: Isoelectric focusing affinity immunoblot analysis of mouse monoclonal antibodies to the four human IgG subclasses. *Electrophoresis* 8 : 127-134, 1987.
- 4) 一村光子, 唐下博子, 崎山順子, 大井治昭, 栗原満枝, 野坂正剛: IgG 型M蛋白のサブクラスの型判定について—アガロースゲル電気泳動とモノクローナル抗体を用いて—. *医学検査* 42 : 1374-1377, 1993.
- 5) Ritchie, J. F., Smith, B.: Immunofixation. 1. General principles and application to agarose gel electrophoresis. *Clin. Chem.* 22 : 497-499, 1976.
- 6) Frank, J. F., Herbert A., Liu, F. J., Hamilton, R. G.: IgG Heavy-Chain subclass typing of myeloma paraproteins by isoelectric focusing immunoblot analysis. *Clin. Chem.* 35 : 364~368, 1989.
- 7) Saravis, C. A., O'Brien, M., Zamcheck, N.: Direct tissue isoelectric focusing in agarose. *J. Immunol. Method.* 29 : 97-100, 1979.
- 8) Djurup, R. B.: IgG subclass concentrations in sera from 200 normal adults and IgG subclass determination of 106 myeloma protein: an interlaboratory study. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 48 : 77-83, 1988.
- 9) 奥村次郎, 長原三輝雄, 水上勇治, 橋本琢磨, 松原藤継, 右田俊介: Fc領域の相違によると思われる二峰性Mたん白血症の免疫化学的分析. *臨床病理* 39 : 263-268, 1991.
- 10) 尾林 博, 加納 正, 島崎千尋, 堀池重夫, 中村正一, 福井 巖: Double gammopathy 13例の検討. *臨床病理* 39 : 661-665, 1991.