

酵素結合性免疫グロブリン検出への免疫固定法の応用*

須藤加代子・菅野 剛史**

嵯峨実枝子・堀井 康司・加野象次郎***

大内 淳****

Summary

The combination of both the electrophoresis and the immunofixation and of the thin layer gel filtration and the immunofixation followed by enzyme activity staining on antigen-antibody complexes were applied to detect and identify the enzyme-linked immunoglobulins which were observed as macromolecular enzyme complexes in human sera. For any given antigen-antibody system, the optimum concentration of antigen in the serum to be analysed must be given experimentally. Moreover, removing of unreacted proteins must be carefully performed with the solution which will protect the activity of the enzyme to be detected.

In the cases of LDH- and amylase-linked immunoglobulins the detection of minimum enzyme activities on Cellogel membrane were limited by staining sensitivity. Thus, two to ten times concentration of commercially available antibodies was required to give the optimum concentration of antigen-antibody complexes. In the cases of alkaline-phosphatase-linked immunoglobulins, the detection of the enzyme activity was easily amplified by the elongation of the incubation period. Thus, the optimum concentration of antigen was given without concentration of commercial antibodies.

In the studies of macromolecular enzyme complexes in human sera, the immunoprecipitation technique and enzyme-immunoelectrophoresis were conventionally carried out to identify the enzyme-linked immunoglobulins. Some cases, however, still remain ambiguous because of unskilled and unstable techniques used for analysing these macromolecular enzyme complexes. Thus, these immunofixation techniques followed by enzyme activity staining (enzyme immunofixation), described in this paper can facilitate the detection and identification of such macromolecular complexes as enzyme-linked immunoglobulins.

Key words: immunofixation technique, enzyme-linked immunoglobulin, macroamylase, enzyme immunofixation, macromolecule enzyme.

ヒト血清中に存在する高分子酵素の1つである酵素結合性免疫 glob の検索は、従来 Sephadex などによるゲル濾過を用いた分子サイズの検討がなされ、結合蛋白質の検索として immunoprecipitation¹⁾により結合免疫 glob の確認がなされるか、寒天²⁻⁴⁾あるいは Cellogel 膜⁵⁻⁷⁾を用いた免疫電気泳動を実施し、その免疫沈降線を酵素活性染色する方法が用いられた。

電気泳動支持体上での免疫沈降線を染色する方法は、試料量および抗血清の量が比較的少なくてすむ優れた検

出方法であり、最近の酵素結合性免疫 glob の検出の報告はほとんどがこの方法に基づいている。しかし、ALP およびアミラーゼ結合性免疫 glob においては必ずしもこの方法が確実な検出法ではなく、ALP VI マクロアミラーゼの中には免疫 glob の結合が証明されずに、高分子酵素の血中での存在様式が不明のままに終わっている例が認められる。この問題は検出方法に基づくものと考えられ、より容易な確実な酵素結合性免疫 glob の検出法が望まれていると思われる。

* Application of immunofixation techniques for the detection of enzyme-linked immunoglobulin.

** Kayoko Sudo, Takashi Kanno, 浜松医科大学医学部附属病院検査部.

*** Mieko Saga, Kohji Horii, Shojiro Kano, 慶応義塾大学医学部附属病院中央臨床検査部.

**** Atsushi Ohuchi, スペシャルレファレンスラボラトリ.

(受付 1979年3月20日)

我々は、堀井ら⁹⁾により報告された immunofixation electrophoresis (IFE) をセルロースアセテート膜を支持体として実施する方法を用い、膜上に固定された蛋白質に酵素活性染色を実施し、血清中の微量の酵素結合性免疫 glob の確認を行った。この方法は酵素と結合した微量高分子複合体の検索に非常に有効な方法であると考えられたのでここに報告する。

試薬および方法

1. 抗血清

抗血清は Dakopatts 社製、抗 IgG, 抗 IgA, 抗 lambda (titre 500 $\mu\text{g/ml}$), 抗 kappa (titre 500 $\mu\text{g/ml}$) を用いた。

2. 電気泳動

支持体として Cellogel 膜 (Chametron 社, 生化学工業扱い), ペロナール緩衝液 pH 8.6 (μ 0.07) にて, 5 mA/cm 定電流にて約 45 分間電気泳動を行った。アミラーゼを対象とする場合に IFE にて結合免疫 glob の検出のみを目的とする場合は同様の緩衝液にても可能であるが、アイソザイムの易動度との対比を行いたい場合には既に報告した Kohn⁹⁾ の不連続緩衝液を用いるアミラーゼアイソザイム分析法¹⁰⁾と同様な泳動分析を行った。

3. Immunofixation (IF)

7×50 mm の Separax 片に抗血清をしみこませ、気泡が入らない様に泳動の終了した Cellogel 膜表面にこれを重ね、泳動箱内にて30~60分間反応させ、膜上に抗原抗体沈降物を固定した。

4. 未反応蛋白質の除去

反応終了後0.9%塩化ナトリウム水溶液中または1 mM MgCl₂などの酵素活性の賦活化剤を加えた溶液中で未反応蛋白質を洗い流すか、あるいは Cellogel 膜に未反応蛋白質を吸着させた。後述するがこの操作は免疫固定後の酵素活性染色に重要なものであり、充分に未反応蛋白質を除去する必要がある。

5. 酵素活性染色

ALP 活性は 1 mM の MgCl₂ を含む 2-methyl 1,3-propanediol, pH 9.5 の緩衝液にて naphthol AS MX phosphate 0.35 mM を基質とし、この溶液を 5×6 cm の2枚重ねの沓紙に含ませ Cellogel 膜を気泡の入らない様に重ね合せ、37℃にて保温後 fast blue RR salt を含む沓紙上にてジアゾ染色した。LDH およびアミラーゼの活性染色は isoenzyme と同様な条件で実施し、^{10,11)} 活性値により保温時間を調節した。

6. 薄層ゲル沓過後の immunofixation (IF)

通常の方法にて Sephadex G-200 superfine による薄

層ゲル沓過を行った後、2枚重ねの Separax 膜に展開蛋白質を吸着させ、その1枚に通常の酵素染色を行い、もう1枚は抗血清をしみ込ませた Separax 膜上に気泡の入らないように静かに重ね、免疫固定法を実施し4.の未反応蛋白質の除去および5.の酵素活性染色を行った。

結果および考察

1. 抗原抗体比の問題

1) Fig. 1 に5例のアミラーゼ結合性免疫 glob の Cellogel 膜の zymogram を示した。このように酵素結合性免疫 glob は、種々の異なった易動度を示すことから免疫固定を実施する場合にバックグラウンドに共存する免疫 glob の濃度が問題になる。IFE は免疫電気泳動に比して、抗血清に対する抗原の最適濃度幅が狭い。M蛋白質の検出の場合には抗血清の力価に応じて抗原の濃度を調節するが、⁸⁾ 酵素結合性免疫 glob の検出の場合には酵素活性の検出限界以上の試料が必要である。従って、抗血清の濃縮が必要になる場合もある。Fig. 1 の patient K. Su. は従来の enzyme immunoelectrophoresis にては heavy chain, light chain 共に検出されず、2-メルカプトエタノール処理で始めて light chain のみが検出された例である。⁷⁾ この例において抗原抗体比を考慮して

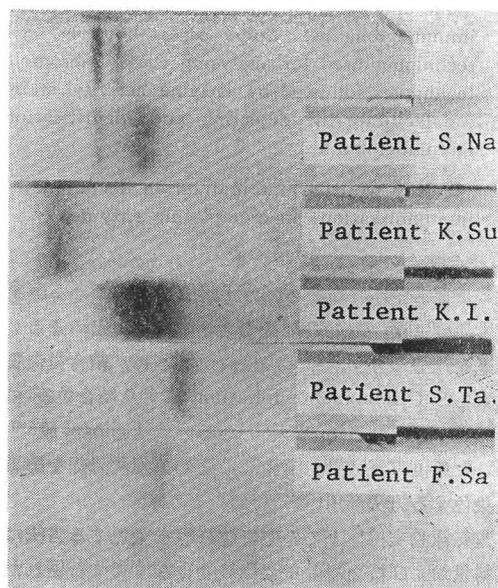


Fig. 1. Zymograms of amylase-linked immunoglobulins.

The main activity band of each patient has a different electromobilities in discontinuous buffer system.

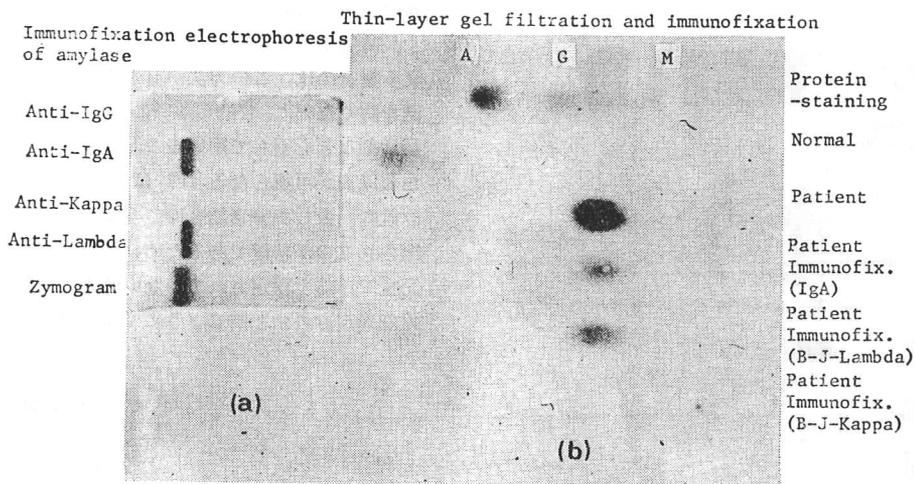


Fig. 2(a). Zymograms of amylase-linked immunoglobulin obtained immunofixation electrophoresis followed by amylase activity staining.

Amylase-linked immunoglobulin was fixed on the Cellogel membrane with anti-IgA and anti-lambda antibodies.

Fig. 2(b). Thin layer gel filtration zymograms of amylase-linked immunoglobulin.

The activity of the macromolecular amylase was fixed on Separax membrane with anti-IgA and anti-lambda antibodies.

抗 IgA を 3 倍に濃縮して IFE を実施すると, Fig. 2(a) に示す様に isoenzyme の易動度と同じ slow- γ 位にアミラーゼ結合性免疫 glob が固定された. Fig. 2(b) に示す薄層ゲル濾過後の IF にも抗 IgA, 抗 lambda の沈降物がアミラーゼ染色され, 抗 kappa との沈降物は染色されなかった.

Fig. 3 には抗原過剰のために最適比が得られず, 膜上の抗原濃度の高い部分で抜けが生じた例を示した. このような場合当然のことながら酵素活性は染色されず, 酵素結合性免疫 glob は証明されなかった. このように, アミラーゼ結合性免疫 glob の証明しにくいマクロアミラーゼの例においても, IFE にて抗原抗体比が適合していることを蛋白染色にてきちんと確認しつつ酵素染色することにより, 明確に免疫 glob の結合が証明できることが示された.

2) 抗原抗体比をあわせるためには, 抗血清の力価に応じて抗原の濃度を低くする必要がある. この場合に検出するものが酵素活性であるので, 酵素活性染色の検出感度を上げることにより, 抗原抗体比を合わせることが可能である. ALP, LAP, γ -GTP などでは, 濾紙に基質を充分しみこませ乾燥しない様に水を含んだスポンジなどを保温箱と一緒に入れ, 保温時間を長くすることにより長時間の酵素反応を行わせ検出感度を上げ, 抗血清の

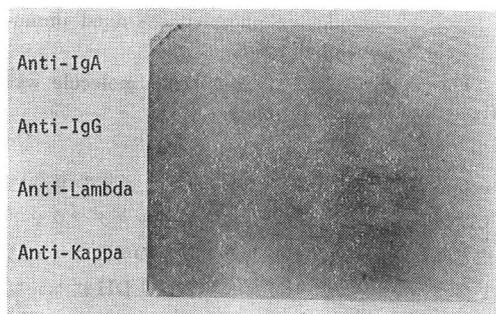


Fig. 3. Immunofixation electrophoregrams of excess antigen.

When commercially available antibodies were used without concentration, immunoglobulin-linked amylase having the same electrophoretic mobility with immunoglobulin A were not be fixed on the cellogel membrane by unmatched antigen-antibody concentration.

力価に応じた抗原濃度での免疫固定が可能である. Fig. 4(a) は ALP VI の例であるが, 保温時間を 58 時間にすることによりはっきりと検出できた例である. ALP VI は従来から高分子であること¹²⁾は示されていたが, 免疫 glob との結合が証明されにくく判定が困難であったが, この方法を用いることにより明確に証明できるものと考え

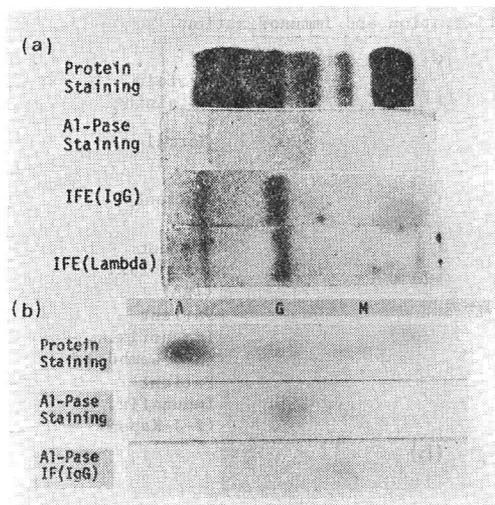


Fig. 4 (a). Zymograms of alkaline phosphatase-linked immunoglobulin and of immunofixation electrophoresis followed by alkaline phosphatase activity staining.

Alkaline phosphatase-linked immunoglobulin was fixed on the Cellogel membrane with anti-IgG and anti-lambda antibodies.

Fig. 4 (b). Thin layer gel filtration zymograms of alkaline phosphatase-linked immunoglobulin.

The activity band of the large molecule was fixed by anti-IgG antibody.

える。ところがアミラーゼにおいては通常の染色法¹⁰⁾にては保温時間をあまり長くするとバックグラウンドが染色されたり、唾液その他からの微量のアミラーゼ汚染により膜が染色されてしまう。同様に LDH においても MTT, PMS 系を用いて染色¹¹⁾している場合、バックグラウンドが染色されてきてしまうのであまり長い保温はできない。又、保温時間延長によつての検出感度の上昇にも限界があることが示され、これらの酵素で検出感度を上昇させる方法の必要性が認められる。

2. 未反応蛋白質の除去

微量の酵素蛋白質の検出を目的としているために保温時間を長くしているので、未反応蛋白質の除去は充分に行われなくてはならない。生理食塩水 1~2l 中に Cellogel 膜を入れ、よく攪拌しながら時々溶液を変え、1 昼夜以上未反応蛋白質の除去を行う。また別法として、Cellogel 膜よりひとまわり小さい Separax 膜に未反応蛋白質を吸着させる方法も有効である。この場合、20回から30回位 Separax 膜をとりかえることにより短時間に未反応蛋白質

質の除去が可能となる。ALP など生理食塩水中にてあまり長時間未反応蛋白質の除去を行うと酵素が失活してしまふ場合には、この方法が有効である。また、酵素の失活を防ぐために、目的の酵素に応じた MgCl₂ などの酵素賦活剤などを選んで用いることにより長時間の未反応蛋白質除去が可能となる。IFE は isoenzyme で泳動された位置に一致して酵素結合性免疫 glob が免疫固定され、検出されるのが特徴であるため、未反応蛋白質の除去が不完全であると固定されていない酵素蛋白質が染色され、免疫固定されたと同じようにいわゆる isoenzyme を検

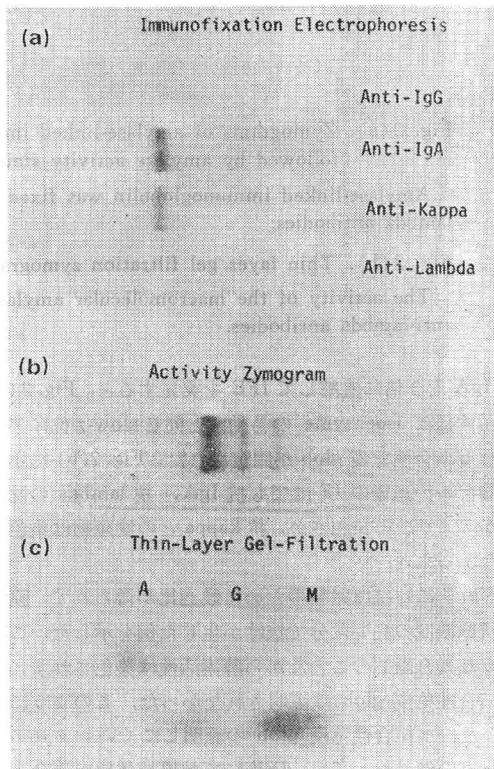


Fig. 5 (a). Zymograms of LDH-linked immunoglobulin obtained by immunofixation electrophoresis followed by LDH activity staining.

LDH-linked immunoglobulin was fixed by anti-IgA and anti-kappa antibodies.

Fig. 5 (b). Zymograms of LDH-linked immunoglobulin.

Fig. 5 (c). Thin layer gel filtration zymograms of LDH-linked immunoglobulin.

The large molecular LDH activity was observed between GM region.

出してしまうことになる。この未反応蛋白質の除去の操作を充分に行うことは当然であるが、さらにその確認のため必ずブランク反応を実施する必要がある。すなわち、染色されているという確認だけでなく、他の抗血清にては固定染色されないことを確認する必要がある。Fig. 5に LDH 結合性免疫 glob の検出例を示した。いわゆる III 型ブロードの LDH isoenzyme パターンを示す例であるが、IFE により抗 IgA, 抗 kappa との沈降物が III 型の位置に LDH 活性染色された。そして抗 IgG, 抗 lambda との沈降物は酵素活性が染色されていない。この免疫沈降反応を利用した方法には一般的であるかも知れないが、この様に他の特異抗血清では反応しないという盲検に相当する操作が重要であると思われる。このように膜上で拡散を行わず、その免疫 glob の泳動された位置を確認できることは、今後酵素結合性免疫 glob の分離、再結合などの実験において、免疫 glob あるいは酵素と結合している状態での免疫 glob の易動度の確認が可能であり、これらの研究に有効な情報を与える方法であると考えられる。

3. 抗血清中の酵素の問題

抗血清中には動物由来と思われる種々の酵素が混合している。ロットによっては 400~1,000 Somogyi unit のアミラーゼの混入している抗血清も認められた。これらの酵素も抗原抗体反応後は未反応蛋白質に含まれるので、未反応蛋白質の除去をより充分にすることによりこの干渉は除去できる。この操作が不充分であると、抗血清をしみ込ませた Separax 片と同じ型に酵素活性が染色されてしまうことになる。

4. 薄層ゲル泳過後の IF

Fig. 2(b) および Fig. 4(b) に薄層ゲル泳過 (TLGC) 後に IF を実施し、アミラーゼおよび ALP 活性染色を行った例を示した。この方法によって展開された 2 つの ALP のうち高分子の ALP が免疫 glob と結合していることが証明された。酵素結合性免疫 glob は TLGC にては glob のみより高分子位置へ展開されるため、バックグラウンドの glob 濃度が減少し、抗原抗体比を適合させることが容易となる。又、分子サイズと結合免疫 glob の固定が同時に確認できるという特徴を持っており、アミ

ラーゼ結合性免疫 glob の検索等にこの方法を用いることはさらに解析が容易となることが考えられる。この場合、結果 1, 2, 3 に述べた問題はすべて同様であり細心の注意が必要である。

ま と め

1. 酵素結合性免疫 glob の検出が免疫固定法を用いることにより、確実に実施できることを示した。
2. M 蛋白質においての免疫固定と同様に抗原抗体比を適合させることが重要である。このために抗体の濃縮または酵素活性検出限界の上昇による抗原の微量化のいずれかの方法が必要である。
3. IF 後の未反応蛋白質の除去は充分に行う必要がある。
4. この方法はそのまま薄層ゲル泳過後の IF にも適応可能である。
5. これらの方法は、酵素と結合した微量の高分子複合体の検出に非常に有効な方法であると考えられる。

本論文の一部は第28回電気泳動学会春季大会にて報告した。

文 献

- 1) Levitt, M. D. and Cooperband, S. R. : N. Eng. J. Med., **278** : 474, 1968.
- 2) Ganrot, P. O. : Experimentia, **23** : 593, 1967.
- 3) Biewenga, J. and Feltkamp, T. E. W. : Clin. Chim. Acta, **64** : 101, 1975.
- 4) Nagamine, M. and Ohkuma, S. : Clin. Chim. Acta, **65** : 39, 1975.
- 5) 菅野剛史他 : 生物物理化学, **19** : 65, 1975.
- 6) 菅野剛史他 : 生物物理化学, **19** : 361, 1975.
- 7) Kanno, T. and Sudo, K. : Clin. Chim. Acta, **76** : 67, 1977.
- 8) 堀井康司, 菅野剛史 : 臨床検査, **22** : 1455, 1978.
- 9) Kohn, J. : J. Clin. Path., **22** : 109, 1969.
- 10) 須藤加代子他 : 臨床化学, **3** : 209, 1974.
- 11) 塩谷実枝子他 : 臨床病理, **19** : 469, 1971.
- 12) 三木一正他 : 日消誌, **73** : 162, 1976.