

〔原 著〕

乳酸脱水素酵素に対する酵素結合性免疫グロブリン および抗サブユニット抗体の結合親和性

須藤加代子・前川真人・菅野剛史*

SUMMARY

Anti-native lactate dehydrogenase (LD) A₄ and B₄ antibodies were prepared from white male rabbits. Binding affinities of these antibodies for the five isoenzymes of LD were quantitated.

The equilibrium constants (K_{eq}) showed, anti-A antibody > anti-B antibody ≅ LD inhibitor (IgG) > anti-acetylated B antibody ≧ LD-linked-Ig.

Anti-A antibody formed complexes with LD-A subunit and the complexes were precipitated. Anti-B antibody also formed complexes with LD-B subunit and the complexes were precipitated, however, formed soluble complexes without inhibiting LD activity by diluting the antibody. LD-A₄ and B₄ showed the strongest affinity from antibody to A and B subunit, respectively.

On the other hand, LD-linked-Ig and anti-acetylated B antibody formed soluble complexes with LD isoenzymes without inhibiting LD activity, and showed the strongest affinity to LD-2,3 and LD-1,2,3 (almost the same affinity), respectively. From these results, both LD-linked-Ig and anti-acetylated B antibody demonstrated to recognize the structure of neither A nor B subunit.

Key words : soluble immune complexes, anti-lactate dehydrogenase A subunit antibody, anti-lactate dehydrogenase B subunit antibody, lactate dehydrogenase anomaly, equilibrium constant.

はじめに

乳酸脱水素酵素 (LD, EC 1.1.1.27) の B₄ (H₄) をアセチル化して家兎に免疫して作製した抗 LD-B サブユニット (B) 抗体は可溶性で活性阻害のない免疫複合体を作製する^{1,2)}。この性質はヒト血中に存在する LD 結合性免疫グロブリン (Ig) の性状と類似してい

る。従って、我々は抗アセチル化 LD-B 抗体を作製し LD の各アイソザイムに対する結合親和定数 (K_{eq}) を測定した²⁾。また LD 結合性 IgG の K_{eq} も測定し報告した³⁾。

一方、ヒト血中には LD と結合しその LD 活性を低下させる Ig の存在する症例 (いわゆる失活因子) も報告されている^{4,5)}。我々は LD 活性を低下させる IgG 例

Comparative study of binding affinity to Lactate dehydrogenase of enzyme-linked immunoglobulin and anti-subunit antibody

* Kayoko Sudo, (現: 慈恵医大臨床検査医学) Masato Maekawa and Takashi Kanno, 浜松医科大学附属病院検査部

Correspondence address: Kayoko Sudo, Department of Laboratory Medicine, Jikei University, School of Medicine, Minato-ku Tokyo 105, Japan.

(受付 1985年12月20日, 受理 1986年2月21日)

の2例についても各LDアイソザイムとのKegを測定した⁶⁾。

本稿では、新たにLDの非修飾B₄, A₄を家兎に免疫して得た抗B抗体, 抗A抗体, 並びに, 日常よく観察されるLD結合性IgA症例から部分精製したIgAの各LDアイソザイムに対するKegを測定し, かつ既報のLD結合性IgG症例⁹⁾, 抗アセチル化LD-B抗体²⁾, LD失活因子⁹⁾のKegと比較し, LDに対する認識部位の異質性について検討した。

材料および方法

1. ヒトLD-B₄, LD-A₄の精製

LD-B₄は期限切れの輸血用保存血液より, LD-A₄は剖検材料より得た骨格筋から五十嵐, 中山の方法⁹⁾に準じて精製した。

2. AおよびBサブユニットに対する抗体の作製

精製したLD-A₄, B₄をwhite male rabbitsにA₄はBurdら⁹⁾の, B₄はMalvanoら¹⁰⁾の免疫スケジュールに従い免疫し抗血清を得た。

3. ヒトLDの5種のアイソザイムの精製

I, II, III型はBurdら¹¹⁾の方法にてヒト赤血球より分取した。IV, V型はRyanの方法¹²⁾により子宮筋腫, 子宮頸癌のため全摘された子宮の残存正常組織の一部から部分精製した。

4. LD結合性IgAの部分精製

LD結合性IgAを含む血清1.5mlをpH3.4のカラムゲル濾過にてLD結合能をもつIgA分画を分取し濃縮して¹²⁾以後の実験に用いた。

5. 結合親和定数の求め方

Stewardの方法¹³⁾に従いtotal antibody binding site (Abt)と結合親和定数 (Keg)を求めた¹⁴⁾。

6. 症例 (LD結合性IgAの検出例)

A.Y.は45才の女性で下腹部痛を主訴として昭和56年8月22日浜松医大附属病院を来院, X線, 内視鏡等の検査結果から急性胃炎と診断された。血液化学検査にてLDのみ582Wróblewski Unit (W.U.) (正常域170~340w.u.)と上昇していた。aspartate aminotransferaseは11Karmem Unit (K.U.) (5~23K.U.) alanine aminotransferaseは5 K.U. (2~16K.U.)と共に正常域でありLD上昇の原因検索のため, LDアイソザイム分析を実施した。そのデンストグラムをFig.1に示したが, III型ブロードのパターンであった。免疫固定後のLD活性染色により, IgA (Kappa)とLDの結合

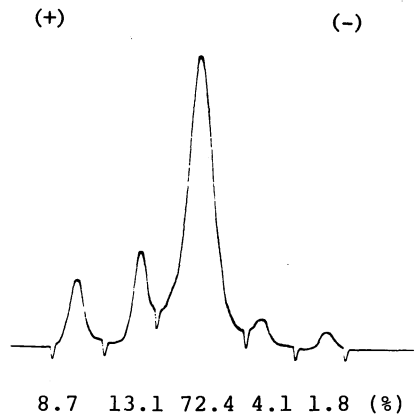


Fig.1. Densitometric tracing of LD isoenzyme pattern for patient's (A.Y.) serum.

していることが判明された。

結 果

1. 抗LD-A抗体の性質

Fig. 2 (A)には部分精製したLD-I (B₄), II (B₃A₁), III (B₂A₂), IV (B₁A₃), V (A₄)型の濃度を变化させ, 抗A抗体との反応性を調べた結果を示した。抗A抗血清を生理食塩水で21倍に希釈し, LDの5種のアイソザイム各々5濃度と10対1の割合で混和した後, 3,000 rpm上清のLD活性を抗A抗血清のかわりに生理食塩水と混和した結果とを比較した。IV型, V型は抗A抗体と反応し, LD活性が沈降していることが示された。この上清のLDアイソザイム分画像をFig. 2 (B)に示した。I型はいずれの濃度にも活性, 泳動像共に変化しなかった。このことは作製した抗A抗体がBサブユニットと交差反応をしないことを示している。I型以外のAサブユニットを含むアイソザイムはいずれも異常バンドが観察された。3,000rpm遠心上清中に抗A抗体と結合したLDが存在していることを示している。従ってデンストメトリーにて分画し, 抗体と結合していないfreeのLD活性を求めた (Fig. 2 (A))。この値を用いてKegを求めた結果をTable 1に示した。前述の様にI型 (B₄)は反応が観察されなかった。またIV型はboundとfreeの泳動位置が近似しているため定量的解析は不可能であった。

尚, 抗A抗血清の希釈実験にては320倍希釈までは沈降反応を示した。640倍希釈以上では活性に変化はな

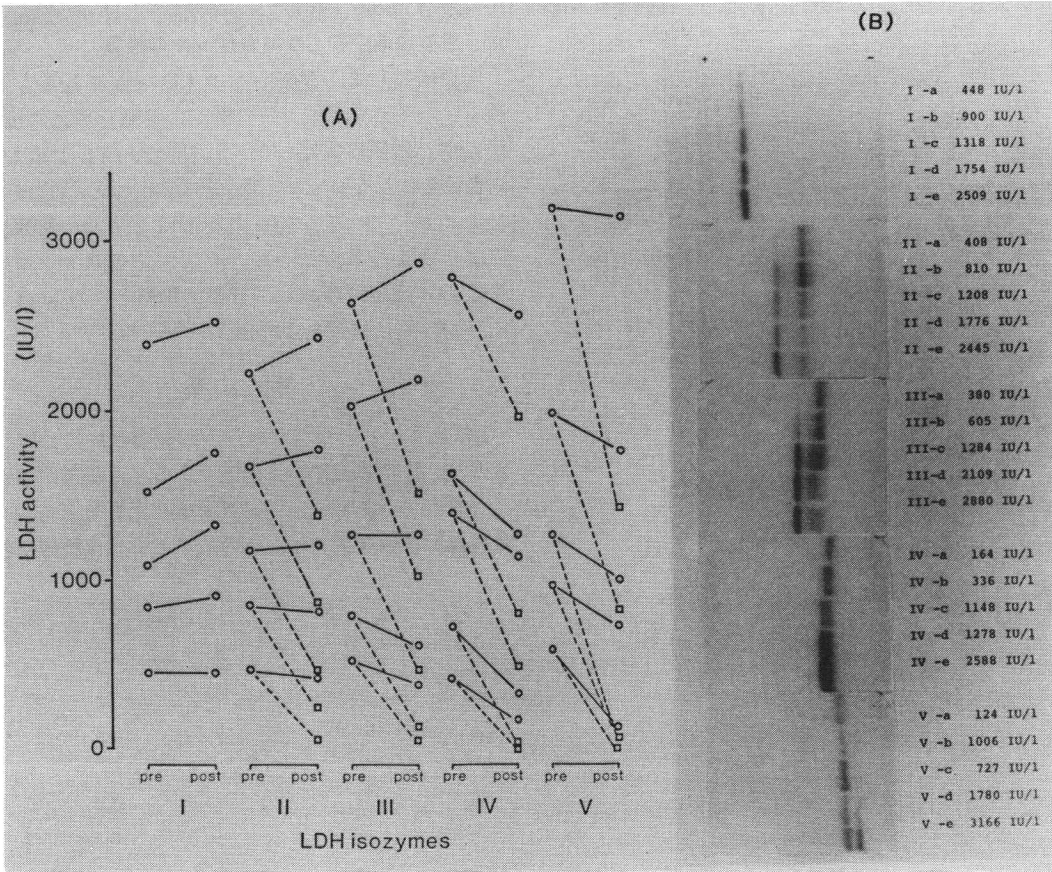


Fig.2. Reaction of anti-LD A subunit antibody with various LD isoenzymes.
 (A) LD activity in supernatant (3000rpm 10min.)
 pre(○) ; LD+saline
 post(○) ; LD+anti-LD A antiserum (diluted 21 times by saline)
 post(□) ; free LD activity in same supernatant (calculated with densitometric determination)
 (B) Electrophoretic analysis of anti-LD A antiserum complexes with different concentrations of LD isoenzymes on Cellogel membrane

く、また LD アイソザイム像にも変化が観察されなかった。従って、抗 A 抗血清にては可溶性複合体のみ、あるいは沈降する複合体のみを観察できる条件は見出されなかった。

II. 抗 LD-B 抗体の性質

同様に 5 種の LD アイソザイムと 21 倍希釈した抗 B 抗血清との混和実験の結果を Fig. 3 (A), (B) に示した。抗 B 抗体は抗アセチル化 B 抗体とは異なり、I 型との免疫複合体が沈降することが示された。この 3,000rpm 遠心上清の LD アイソザイム像を Fig. 3 (B) に示した。

I 型、II 型の上清 LD はすべて抗 B 抗体と複合体を作製し移動度が変化している。また V 型は LD 活性、移動度共に変化がなく作製した抗 B 抗体は A サブユニットとは交差反応しないことが示された。この抗 B 抗血清を生理食塩水で 1051 倍 (21×51 倍) に希釈し同様の実験を実施したところ 3,000rpm 上清中の活性はいずれのアイソザイムを用いても変化しなかった。この上清 LD アイソザイム像を Fig. 3 (C) に示した。この結果はデンシトメトリーにて free と bound が分画可能であることを示している。Keg の算出にはこのデータを

Table 1. Equilibrium constant (K_{eq}) for each Lactate dehydrogenase isoenzyme ($\times 10^9 \text{ M}^{-1}$)

	I	II	III	IV	V
Anti A	Neg.	3.311	20.89	N.D.	30.20
Anti B	2.21	1.73	N.D.	N.D.	Neg.
LD-linked IgA	Neg.	0.132	0.404	N.D.	Neg.
Anti acetylated B (Ref.2)	0.14	0.14	0.125	N.D.	Neg.
LD-inhibitor (Ref.6)					
case 1 (IgG)	0.37	1.69	5.82	0.94	2.18
case 2 (IgG)	Neg.	2.75	1.32	0.18	0.71
LD-linked Ig (Ref.3)					
case 3 (IgG)	0.0013	0.0003	0.0102	N.D.	0.00015
case 4 (IgG)	0.657	0.377	0.794	N.D.	0.0051
case 5 (IgG)	Neg.	0.132	0.404	N.D.	Neg.

N.D. not detectable
Neg. negligible

用いた (Table 1).

III. 患者血清中の LD 結合性 IgA の性質

部分精製し LD-free とした LD 結合性 IgA を 5 種の LD のアイソザイムとの再結合実験を前記の抗 LD 抗血清と同様に実施した。3,000rpm 遠心上清の LD 活性は変化しなかった。電気泳動後の LD 活性像のデンストメトリーにて free と bound を求め、逆数 plot により Abt を求めた (Fig. 4 (A)). この Abt を用いて Sips plot (Fig. 4 (B)) にて II 型、III 型とこの Ig A との K_{eq} を求めた結果を Table 1 に示した。

考 案

LD の A, B 両サブユニットは免疫学的に分画されるが、抗 B 抗体の作製は困難であるとの報告が古くからなされている^{9,15}。一方、アセチル化 B サブユニットは容易に抗体産生をし、この抗アセチル化抗体は非修

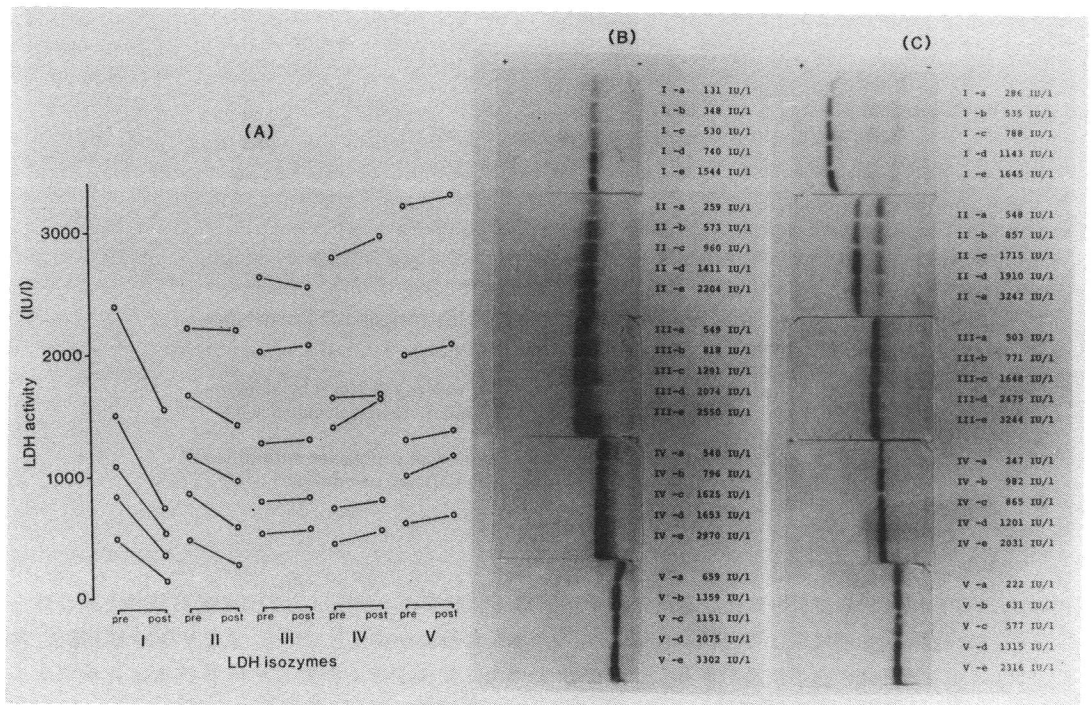


Fig.3. Reaction of anti-LD B subunit antibody with various LD isoenzymes.

(A) LD activity in supernatant (3,000rpm 10min.)

pre(O) ; LD+saline

post(O) ; LD+anti-LD B antiserum (diluted 21 times by saline)

(B) Electrophoretic analysis of anti-LD B antiserum (diluted 21 times by saline) complexes with different concentrations of LD isoenzymes on Cellogel membrane

(C) Electrophoretic analysis of anti-LD B antiserum (diluted 1071 times by saline) complexes with different concentrations of LD isoenzymes.

飾 B₄と反応し、その免疫複合体は活性阻害されず、かつ可溶性であることが知られていた^{1,2)}。我々はこの抗アセチル化抗体が LD 結合性 Ig の性状と類似していることから、この抗アセチル化 B 抗体を作製し、LD の各アイソザイムとの Keg を測定した²⁾。また 3 例の LD 結合性 IgG³⁾、2 例の失活因子 (IgG)⁶⁾ についてもその Keg を報告してきた (Table 1)。

Keg は抗体の抗原に対する親和性を数量的に表わしており、大きければ大きい程その抗原に対する親和性が強いことを示している。従って個々のアイソザイムに対する Keg を求めることにより、どのアイソザイムを本来の抗原としているのかが推定できる。サブユニットを認識しているのであれば、そのホモテトラマーに対する Keg が最大となるはずである。また抗原に対する親和性の強い認識部位の多い抗体であれば容易

に高分子複合体を作製し沈降する。逆に可溶性で活性阻害を示さない複合体の作製は、Keg の小さいことが推定できる。この観点から本研究にては非修飾 B₄、A₄ を家兎に免疫して作製した抗体の Keg を測定すると共に日常血清に最も多く見出されている LD 結合性 IgA の Keg も測定した。

抗 A 抗体の A₄ との Keg は $30.20 \times 10^9/M$ と我々の検討した抗体のうちで最大であり最も LD との結合親和性の強いことが示された。容易に免疫沈降反応を呈することとも一致する結果である。一方、抗 B 抗体も沈降反応を示した。その B₄ との Keg は $2.2 \times 10^9/M$ と抗 A 抗体の約 1/10 であった。抗 B 抗体は希釈することにより沈降反応が観察されないことから抗 A 抗体より LD に対する親和性の弱いことが推定された。抗アセチル化 B 抗体は抗 B 抗体よりさらに 1/10 以下

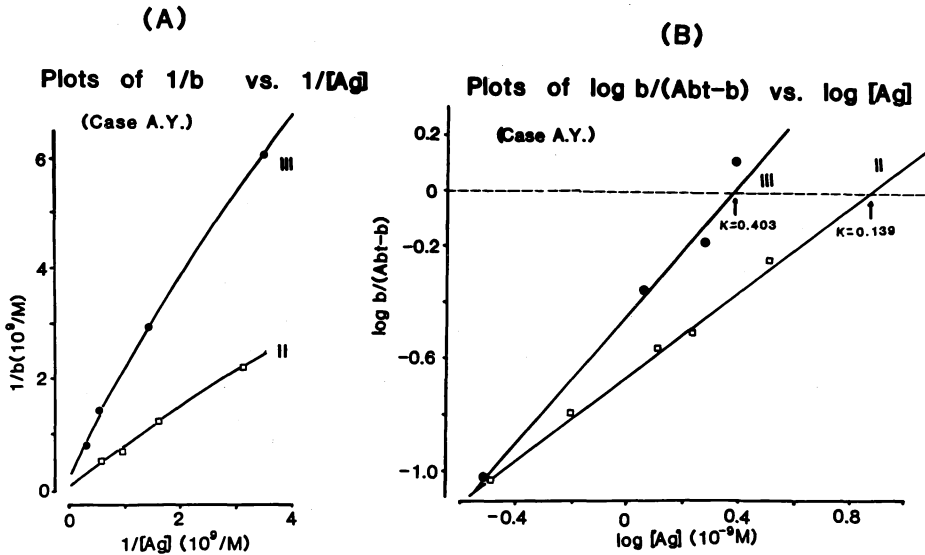


Fig.4.

(A) Determination of total antibody binding sites

Abscissa ; reciprocal of concentration of free LD. Ordinate ; reciprocal of the concentrations of LD bound by isolated IgA

$$1/b = [(1/Abt) \times (1/Keq) \times (1/[Ag])] + (1/Abt)$$

Where $b = [AbAg]$ = antibody-antigen complex concentration (LD, mol/L) ;

Abt = total antibody binding sites ;

[Ag] = free antigen concentration (LD, mol/L) ;

Keq = equilibrium constant.

When $1/[Ag] = 0$, $1/b = 1/Abt$

II indicates LD II (B1A3) and III indicates LD III (B2A2)

(B) Determination of equilibrium constant (Keq) for interaction of IgA from patient A.Y. with LD II and III

$$(a. \log Keq) + (a. \log [Ag]) = \log b/(Abt-b)$$

When $\log b/(Abt-b) = 0$, $Keq = 1/[Ag]$.

のKegであった(Table 1). 抗原抗体濃度を変化させてもその複合体が沈降しない事実とよく一致する結果である. 抗アセチル化B抗体はアセチル化B₄とは沈降する複合体を作製する¹⁾. しかし非修飾B₄とも可溶性の複合体を作製するが一種の交差反応とも考えられ親和性の弱いことから推定できる. またアイソザイム別のKegに注目すると抗B抗体はB₄, 抗A抗体はA₄に最も強い親和性を示し, 正にサブユニット抗体と考えられた. 一方, 抗アセチル化B抗体はB₄, B₃A₁, B₂A₂, の3種のアイソザイムとほぼ同様の親和性を示した. 抗原認識部位がサブユニットのみではない可能性も推定させる結果であり興味ある知見である.

血中のLD結合性Igは抗A抗体, 抗B抗体等のサブユニット抗体とは異なり, ヘテロテトラマーであるB₃A₁, B₂A₂に強い親和性を示した. この結果は, 桑ら¹⁰⁾杉田ら¹⁷⁾がLD結合IgA例で立体構造を認識しているとの報告と類似しているとも考えられた. しかし, 定量性が観察されず, 抗アセチル化B抗体の結果と考え合わせると, 立体構造よりむしろ変性抗原に対する抗体と考えた方が妥当なかもしれない. LD結合性Igのうち失活因子とも表現されているIgGと結合することによりLD活性が阻害される例にては2例共に抗B抗体と類似のKegであった. 一方, LDアノマリーと表現されている活性阻害の観察されないLD結合Igは共に抗アセチル化B抗体と同様, あるいはさらに弱い親和性であった.

LDとの免疫複合体が沈降する例, 活性阻害される場合, そして活性阻害がなくかつ可溶性の場合, の順にIgのLDとのKegは小さくなる(親和性が弱くなる)ことが示された. またLDの各アイソザイムとのKegはアイソザイム別の親和性の程度を示しており, サブユニットに対する抗体であるか否かを推定する上で重要な所見であることが判明した.

謝 辞

本研究の一部は文部省科学研究費補助金(No. 59570998)によった.

結 論

乳酸脱水素酵素(LD)のA₄, B₄を各々家兎に免疫し抗A抗体, 抗B抗体を作製した. 抗A抗体の免疫複合体は沈降し, A₄に最も強い結合親和性を示した. 抗B抗体もB₄と沈降反応を示したが希釈により活性阻

害のない可溶性の免疫複合体を作製した. また, B₄に最も親和性を示したが結合定数(Keg)は抗A抗体の約1/10であった. すでに報告した抗アセチル化B抗体のKegはこの抗B抗体の1/10であり, B₄, B₃A₁, B₂A₂のKegはほぼ同じであったことが非修飾LDに対する抗体と異なった. LD結合免疫グロブリン(Ig)のうち, 結合しLD活性を失活させるIgGのKegは抗B抗体のそれと同じオーダーであった. 一方, 活性阻害のないLD結合IgA, IgGは抗アセチル化B抗体と同じかむしろ小さいKegであった. また, いずれのLD結合IgもB₃A₁, B₂A₂に強い親和性を示した事実は非修飾LDのサブユニットを認識した抗体と異なることを強く示唆した.

文 献

- 1) Burd, J.F. and Usategui-Gomez, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **310**: 238, 1973.
- 2) 須藤加代子, 他: *生物物理化学*, **28**: 177, 1984.
- 3) Sudo, K. et al.: *Clin. Chem.*, **31**: 1178, 1985.
- 4) Nagamine, M.: *Clin. Chim. Acta*, **50**: 173, 1974.
- 5) Wickus, G.G. and Smith, M.J.: *Clin. Chem.*, **30**: 11, 1984.
- 6) Maekawa, M. et al.: *Clin. Chem.*, in press
- 7) 長嶺光隆: *臨床病理, 特集*, **60**: 90, 1984.
- 8) 五十嵐富三男, 中山年正: *臨床化学*, **11**: 115, 1982.
- 9) Burd, J.F. et al.: *Clin. Chim. Acta*, **46**: 205, 1973.
- 10) Malvano, R. et al.: *Eur. J. Nucl. Med.*, **4**: 379, 1979.
- 11) Ryan, L.D. and Vestling, C.S.: *Arch. Biochim. Biophys.*, **160**: 279, 1974.
- 12) Maekawa, M. et al.: *Clin. Chim. Acta*, **150**: 185, 1985.
- 13) Steward, M. W. and Petty, R.E.: *Immunology*, **22**: 747, 1972.
- 14) 須藤加代子: *臨床病理, 特集*, **60**: 68, 1984.
- 15) Rajewsky, K.: *Biochim. Biophys. Acta*, **121**: 51, 1966.
- 16) 桑 克彦, 他: *生物物理化学*, **21**: 209, 1977.
- 17) 杉田 収, 屋形 稔: *生物物理化学*, **22**: 151, 1978.