抗アポ蛋白 (Apo) C-I モノクローナル抗体を用いた ラジオイムノアッセイ法による血中 Apo C-I 濃度の測定*

笈 田 耕 治** Gustav SCHONFELD*** 中 井 継 彦****

宮 保 進****

I. はじめに

アポ蛋白 (apo) C-I は VLDL, HDL を構成するアポ蛋白で, 57 個のアミノ酸からなる分子量 6,600 の最も小さいアポ蛋白である^{1,2)}. apo C-I の機能についてはいくつかの報告がある³⁻⁷⁾ が, 真の生理的役割は明らかでない. apo C-I はそのアミノ酸組成上チロジン残基を欠くために ¹²⁵I にによる標識が困難でありそのラジオイムノアッセイ (RIA) は報告がない. 今回, 抗 apo C-I モノクローナル抗体を作製し, 抗体の性状を明らかにするとともに標識した第 2 抗体による apo C-I RIA を開発した.

II. 方 法

抗 apo C-I モノクローナル抗体産生細胞はヒト VLDL で免疫した雌性 Balb/c マウスの spleen cell と SP 2-0/Ag 14 mouse myeloma cell を既報の方法⁸⁾ にて fusion, cloning し作製した. apo C-I は VLDL をエタノール・エーテルで脱脂したのち, 100 mM Tris, 6 M 尿素に溶解し, ファルマシア社製の FPLC システムに, 同システムにマッチする Mono Q[®] カラム (陰イオン交換カラム) を用いて分離, 精製した. protein transfer blotting

および immunoblot は Table 1 に示した方法⁹⁾ に行った. apo C-I RIA は 96 well microtiter plate を使用して以下のように行った. すなわち, 各 well を VLDL でコーティングし, 非特異的結合部位を 3% ウシ血清アルブミンでブロック, サンプルをモノクローナル抗体でインキュベート, 洗浄後 ¹²⁵I-標識 goat anti-mouse IgG と反応させ, 0.02% Tween 20 で洗浄, 各 well 内の放射活性を

Table 1 Protein transfer blotting

SDS-PAGE (4-20%) in a vertical slab gel apparatus (Bio-Rad).
↓
Wash in a transfer buffer (25 mM phosphate, pH 6.5) for 60 min.
↓
Electrophoretic transfer to nitrocellulose paper (0.45 μ , Schleicher and Schnull) at 27 V for 3 hr on the Trans-Blot Cell (Bio-Rad).
↓
Block non-specific binding sites with PBS-3% BSA plus 3% nonimmune rabbit serum for 1 hr.
↓
Incubate with antibody containing solution diluted in PBS-3% BSA overnight at 23°C.
↓
Wash three times with PBS for 20 min.
↓
Incubate with ¹²⁵ I-goat anti-mouse IgG (750,000 cpm/ml) in PBS-3% BSA at 23°C for 4 hr.
↓
Wash twice with PBS for 20 min, once with PBS containing 0.02% Tween 20 for 20 min, and twice with PBS for 20 min.
↓
Autoradiography at -70°C.

* 1986年1月, 日本動脈硬化学会 昭和60年度冬季大会において発表

** 公立小浜病院内科

*** Lipid Research Center, Washington University

**** 福井医科大学第三内科

Table 2 Specificities of monoclonal anti-VLDL antibodies. Immunoglobulin chain types were determined immunochemically by a enzyme-linked immunosorbent assay using isotype specific antisera

Hybridoma (Antibody)	Immunizing antigen	Isotype	Apoprotein specificity
1888 A3-1	VLDL	IgG ₁	apo C-I
1888 A3-4	VLDL	IgG ₁	apo C-I
1888 A5-1	VLDL	IgG ₃	apo C-I
1888 A5-6	VLDL	IgG ₃	apo C-I
1888 C7-3	VLDL	IgG ₁	apo C-I
1888 D2-6	VLDL	IgG ₁	apo C-I
1888 E2-5	VLDL	IgM	apo C-I
1888 E2-6	VLDL	IgM	apo C-I
1888 F4-6	VLDL	IgM	apo C-I
1889 E6-4	VLDL	IgG ₁	apo C-I
1888 C1-1	VLDL	IgG ₁	apo B
1888 C1-4	VLDL	IgG ₁	apo B
1888 D7-1	VLDL	IgG _{2b}	apo B
1888 D7-2	VLDL	IgG _{2b}	apo B

ガンマーカウンターで測定した。apo C-I のシア
ンブロマイド (CNBr) によるフラグメンテーショ
ンは Jackson らの方法¹⁾ に準じて行い、2 分され
た apo C-I フラグメントの分離は Swank と
Munkres の方法¹⁰⁾ に準じたポリアクリルアミド
ゲル電気泳動にて行った。apo C-I の蛋白量はア
ミノ酸分析により測定した。

III. 結果と考察

2 回の fusion により得られたモノクローナル抗
体を Table 2 に示す。これらの抗体の抗原特異性
は主として immunoblot 法により確認した。その
代表的な結果を Fig. 1 に示す。10 種のすべての
抗 apo C-I モノクローナル抗体は図中の A3-4、
C7-3 抗体のように VLDL, HDL 中の分子量約
7,000 (=apo C-I) とのみに反応した。次いで、こ

Fig. 1 Assessment of apoprotein chain specificity.

A: VLDL was electrophoresed in 4-20% polyacrylamide gradient slab gels containing 0.1% SDS. On the left is a gel stained with Coomassie Brilliant Blue R-250 before electrophoretic transfer of the apoproteins to nitrocellulose. The remaining photographs are 1 hr autoradiographs of identical nitrocellulose paper transfers after incubation with the individual antibody-containing ascites fluids and ¹²⁵I-goat anti-mouse IgG. The A3-1, A5-1, A5-6, D2-6, E2-5, E2-6, F4-6 and E6-4 antibodies showed similar autoradiography to those obtained with antibodies A3-4 and C7-3 as shown here. The autoradiograph obtained by incubation with a monoclonal anti-apo B (C1-1) and a anti-apo E (1506A1-4) are shown for contrast.

B: Experimental conditions were the same as Figure 1A except HDL (20 μg) was electrophoresed and transferred. The autoradiograph obtained by incubation with a monoclonal anti-apo A-I (2451F3-6) is shown for contrast.

Table 3 Cross competition between anti-apo C-I antibodies. Competitive antibody binding assay using insolubilized VLDL and ¹²⁵I-labeled and unlabeled monoclonal anti-apo C-I antibodies as mutual competitors. Microtiter wells were coated with human VLDL. The unlabeled competitor antibodies were used in amounts of 0.1 ng to 10 μg/well. Results are expressed according to the extent of competition at the highest dose of the competitors 3+=>80% displacement of B₀ counts; 2+=60-80%; 1+=40-60%; ±=20-40%, -=<20%

Competitor	Radiolabeled antibody					
	A3-4	C7-3	D2-6	E2-5	F4-6	E6-4
1888 A3-4 (A3-I)	3+	1+	3+	±	1+	3+
1888 C7-3	±	3+	2+	-	-	2+
1888 D2-6	3+	1+	3+	1+	1+	3+
1888 E2-5 (E2-6)	3+	3+	3+	3+	2+	3+
1888 F4-6	3+	3+	3+	3+	3+	3+
1889 E6-4	1+	2+	2+	1+	±	3+

これらの抗体によって認識される apo C-I 上の epitope が同一か否かを検討するために cross competition study を行った。すなわち, well に抗原として VLDL をコーティングし, ¹²⁵I で標識されたあるモノクローナル抗体との結合が, 他の標識されていないモノクローナル抗体によりどの程度競合されるかを調べた。Table 3 は横に標識された抗体を示し, 縦に示す標識されていない抗体による競合度を指数化してまとめたものである。ここに示されたごとく, これらの10種の抗体を互いに apo C-I との結合に干渉し合わない明らかな2群に分けることはできず, これらの抗体によって認識される epitope(s) が近接し, 少なくとも一部は重複していると推察された。apo C-I 上の epitope の局在を明らかにするために, apo C-I を CNBr により CNBr I (アミノ酸 1~38 番の NH₂ 側フラグメント) と CNBr II (アミノ酸 39~57 番の COOH 側フラグメント) に2分し, 両者を PAGE

Fig. 2 Assignment of apo C-I epitopes. Isolated apo C-I (lane 3, 3 μg) and its cyanogen bromide cleavage fragments (lanes 1 and 2, 6 and 3 μg) were electrophoresed in 12.5% polyacrylamide (acrylamide : bisacrylamide=15 : 1) slab gels containing 0.1% SDS and 8 M urea. On the left is a photograph of a Coomassie Brilliant Blue R-250 stained gel before electrophoretic transfer of the peptides to nitrocellulose. The 3 photographs on the right are 1 hr autoradiographs of identical nitrocellulose paper transfers after incubation with the indicated antibody containing ascites fluid and ¹²⁵I-goat anti-mouse IgG. All 10 of the anti-apo C-I antibodies reacted with CNBr I (amino acids 1-38) as shown here. The negative autoradiograph obtained by incubation with a monoclonal anti-apo B (C1-1) is shown for contrast.

で分離し, immunoblot を行った. Fig. 2 に示す A3-4, E6-4 抗体のように, 10 種抗体はすべての CNBr I とのみ反応した.

以上のように, 明らかに epitope が異なる 2 種の抗体が得られなかったので, 感度や正確さの上で優れている¹¹⁾ とされる two-site immunometric

assay 法ではなく, 標識した第 2 抗体を用いる double antibody solid-phase immunoassay 法により apo C-I RIA を試みた. 本法は最初 Yorde ら¹²⁾ により enzyme immunoassay 法の一つとして報告されたもので, その原理は immobilize された抗原と抗体との結合に競合するサンプル内の抗原の

Fig. 3 Competition by the indicated lipoproteins and apoproteins for binding of anti-apo C-I antibody A3-4 to insolubilized VLDL. Binding of antibody A3-4 to insolubilized VLDL was detected with an ^{125}I -labeled goat anti-mouse IgG antibody.

Fig. 4 Competition by the indicated apo C-I/Intralipid complexes and plasma for binding of anti-apo C-I antibody A3-4 to insolubilized VLDL. Tween 20 was added to a final concentration of 0.3%.

量を、酵素基質と結合させた (あるいは ^{125}I で標識した) 第2抗体で pick up するものである。ここでは、抗原を含む VLDL を well にコーティングし、モノクローナル抗体との結合をサンプルで競合させ、次いで ^{125}I -goat anti-mouse IgG で well 上に結合した抗体を測定した。

まず、well にコーティングする VLDL および使用するモノクローナル抗体の至適濃度を検討した結果、VLDL は $30\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、抗体は A3-4 を使用し、その濃度として $0.5\text{ }\mu\text{g/ml}$ を選択した。以上の条件で apo C-I RIA を行った。Fig. 3 に示すように、他のアポ蛋白による競合はみとめられなかった。しかしながら、精製した apo C-I 自体にも競合性はほとんどみられず、apo C-I をリン脂質とトリグリセリドの人工的 emulsion である Intralipid® と反応させた後に著しい競合性を示した (Fig. 4)。このことはこの抗体によって認識される apo C-I 上の epitope の発現に脂質との結合による apo C-I の conformational change が強く関与していると推察される。Intralipid 単独あるいは、apo C-I 以外のアポ蛋白を Intralipid と反応させた後でも競合は全くみられなかった。競合曲線が、血漿の競合曲線と平行になる時の apo C-I と Intralipid の比率を標準曲線として血中の apo C-I 濃度を測定した結果、正脂血症者の平均値は $25.0 \pm 11.7\text{ mg/l}$ であった。また、血中 apo

C-I 濃度は血中 TG 値と有意な正の相関を示した ($n=93$, $r=0.833$, $p<0.001$) (Fig. 5)。血中 apo C-I 濃度は従来 radial immunodiffusion 法、p-nitrophenylphosphate—apo C-I を用いた enzyme immunoassay 法が報告されているが¹³⁻¹⁵⁾、それらの報告にみられる血中 apo C-I 濃度に比し、今回の値はその約 40% である。この理由については、蛋白量測定の問題、標準曲線の選定の問題等、若干検討を加える必要があると思われる。

IV. ま と め

1. ヒト VLDL をマウスに免疫して 10 種の抗 apo C-I モノクローナル抗体を作製した。
2. これらの抗体によって認識される epitopes は apo C-I の NH_2 側フラグメント (アミノ酸 1~38 番) 内に存在し、かつ互いにその epitope は近接、一部は重複していると推察された。
3. これらの抗体と apo C-I の結合は apo C-I が脂質と結合することによる立体構造上の変化に依存していた。
4. これらの抗体の 1 つを用い、double antibody solid-phase immunoassay による apo C-I 測定の RIA を開発した。

文 献

- 1) Jackson, R. L., Sparrow, J. T., Baker, H. N., Morrisett, J. D., Taunton, O. D. and Gotto, A. M.: The primary structure of apolipoprotein-serine. *J. Biol. Chem.*, **249**: 5308-5313 (1974).
- 2) Shulman, R. S., Herbert, P. N., Wehrly, K. and Fredrickson, D. S.: The complete amino acid sequence of C-I (apoLp-Ser), an apolipoprotein from human very low density lipoproteins. *J. Biol. Chem.*, **250**: 182-190 (1975).
- 3) Soutar, A. K., Garner, C. W., Baker, H. N., Sparrow, J. T., Jackson, R. L., Gotto, A. M. and Smith, L. C.: Effect of human plasma apolipoproteins and phosphatidylcholine acyl donor on activity of lecithin: cholesterol acyltransferase. *Biochemistry*, **14**: 3057-3064 (1975).
- 4) Albers, J. J.: Effect of human plasma apolipoproteins on the activity of purified lecithin: cholesterol acyltransferase. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **150**: 48-52 (1978).
- 5) Kinnunen, P. K. J. and Ehnholm, C.: Effect of serum and C-apoproteins from very low density lipoproteins on human postheparin plasma hepatic lipase. *F.E.B.S. Lett.*, **65**: 354-357 (1976).

Fig. 5 Correlation between plasma apo C-I concentration and plasma triglyceride concentration in 93 subjects.

- 6) Jahn, C. E., Osborne, J. C., Schaefer, E. J., and Brewer, H. B.: Activation of the enzymic activity of hepatic lipase by apolipoprotein A-II. Characterization of major component in vitro. *Eur. J. Biochem.*, **131**: 25-29 (1983).
- 7) Tournier, J. F., Bayard, F. and Tauber, J. P.: Rapid purification and activity of apolipoprotein C on the proliferation of bovine vascular endothelial cells in vitro. *Biochim. Biophys. Acta*, **804**: 216-220 (1984).
- 8) Tikkanen, M. J., Dargar, R., Pfleger, B., Gonen, B., Davie, J. M. and Schonfeld, G.: Antigenic mapping of human low density lipoprotein with monoclonal antibodies. *J. Lipid Res.*, **23**: 1032-1038 (1982).
- 9) Towbin, H., Staehlin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets—procedure and some application. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**: 4350-4354 (1979).
- 10) Swank, R. T. and Munkres, K. D.: Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Anal. Biochem.*, **39**: 462-477 (1971).
- 11) Sevier, E. D., David, G. S., Martins, J., Desmond, W. J., Bartholomew, R. M. and Wang, R.: Monoclonal antibodies in clinical immunology (review). **27**: 1797-1806 (1981).
- 12) Yorde, D. E., Sasse, E. A., Wang, T. Y., Hussa, R. O. and Garancis, J. C.: Competitive enzyme-linked immunoassay with use of soluble enzyme/antibody immune complexes for labeling. 1. Measurement of human choriogonadotropin. *Clin. Chem.*, **22**: 1372-1377 (1976).
- 13) Curry, M. D., McConathy, W. J., Fesmire, J. D. and Alaupovic, P.: Quantitative determination of apolipoprotein C-I and C-II in human plasma by separate electroimmunoassays. *Clin. Chem.*, **27**: 543-548 (1981).
- 14) Carlson, L. A. and Holmquist, L.: Concentration of apolipoproteins B, C-I, C-II, C-III and E in sera from normal men and their relation to serum lipoprotein levels. *Clin. Chim. Acta*, **124**: 163-178 (1982).
- 15) Holmquist, L.: Quantitation of human serum very low density apolipoproteins C-I, C-II, C-III and E by enzyme immunoassay. *J. Immunol. Methods*, **34**: 243-251 (1979).

Summary

Production of Conformation-Dependent Monoclonal Antibodies against Human Apolipoprotein C-I and their Application to a Competitive Solid-Phase Radioimmunoassay

Koji OIDA*, Tsuguhiko NAKAI**, Susumu MIYABO**
and Gustav SCHONFELD***

*Obama Public Hospital

**Third Department of Internal Medicine, Fukui Medical School

***Lipid Research Center, Departments of Preventive Medicine and Medicine,
Washington University School of Medicine

Fourteen mouse monoclonal antibodies were produced in two fusions using holo-human VLDL as antigen. On immunoblotting first with human VLDL and then with isolated human apo C-I, ten of the antibodies representing three isotypes, manifested specificity for apoprotein (apo) C-I. To assess whether the 10 antibodies were directed against the same or distinctively different epitopes of apo C-I, cross competition assays were performed wherein ^{125}I -monoclonal antibodies were made to compete vs. unlabeled antibodies for occupancy on immobilized VLDL-associated apo C-I. All antibodies cross competed to varying extents implying that they were directed against closely spaced epitopes. On immunoblotting with CNBr fragments, all of the epitopes were assigned to the CNBr I fragment of human apo C-I (amino acids 1–38).

A competitive solid-phase radioimmunoassay (RIA) was developed employing one of the anti-apo C-I antibodies. VLDL was adsorbed to plastic microtiter wells, and a limiting amount of the antibody was reacted with the adsorbed VLDL. The amount of monoclonal antibody that bound to the immobilized VLDL-apo C-I was determined

with a ^{125}I -labeled goat anti-mouse IgG antibody. The addition of competitor apo C-I complexed with lipids resulted in reduced binding of the anti-apo C-I antibody to the immobilized VLDL-apo C-I. Competitor complexes consisted of an artificial lipid emulsion (Intralipid[®]) incubated with apo C-I to yield phospholipid/apo C-I ratios of 1:1 to 75:1 (w/w). Increasing amounts of these complexes yielded competitive displacement curves of changing slopes, while isolated lipid-free apo C-I competed very poorly, suggesting that a conformation-dependent epitope was being probed. Other apoproteins (C-II, C-III, A-I, A-II and E) whether lipid-free or complexed with lipids did not compete.

The 40:1 (w/w) complex of Intralipid phospholipid/apo C-I was used as the primary assay standard because its displacement curve paralleled the curves obtained with whole plasma or isolated lipoproteins. Mean plasma concentration of apo C-I of 48 normolipidemic subjects was 25.0 ± 11.7 (SD) mg/l. Plasma apo C-I contents correlated significantly with plasma triglyceride concentrations ($n=93$, $r=+0.833$, $p<0.001$).

Key words: monoclonal antibodies, apo C-I radioimmunoassay.