免疫電気泳動法とその臨床的応用*

右 田 俊 介**

はじめに

免疫電気泳動は血清蛋白の変動を検定する方法としては比較的簡便であり、装置も以前はアセテート膜電気泳動と共用して、特別な専用の装置はなくても実施していた。ただ、すぐれた抗血清があれば初心者でも数多くの沈降線を血清蛋白に認めることが出来て、これを分析すれば、能率的に多くの情報を得ることが出来る可能性がある。しかし、実際には沈降線の定性的な判読は容易ではなく、抗原の量的変動の評価がまた困難であって、最初に容易に数多くの沈降線を出現させた喜びも、何回か繰返すうちに失望に変わることが多い。これは同じ抗原と抗血清の組合せであっても毎回同一のパターンが得られるとは限らないゲル内反応の不安定性による。従って、免疫電気泳動を自信をもって行なうためには、装置、標準血清、抗血清の問題点、判読、半定量による表現などについて考慮した上、方法の改良と手技の熟練を心掛けるように願いたい。

I. 方法上の注意

1. 装置：免疫電気泳動を行なうにはアセテート膜泳動装置と兼用でも実施することはできる。しかし、それは可能であるというだけであって、再現性のある、数多くの分画の判読可能なパターンを得るには不十分である。装置として必要な条件は、1) 泳動の並行直進性、2) 展開距離がある程度大きいことなどである。1) のためには寒天板からの水分の蒸発が最少で、寒天板と電極槽とのブリッジが確実で、パターンの乱れやすい寒天板の辺縁は使わない方がよい。2) のためには pre より r_2 までの展開に 7.0 cm 位は必要で、ブリッジの接触に 1 cm、余裕を 0.5 cm とれば 10 cm の全長となる。歴史的には 20×30 cm のサイズが最初に用いられていたが、その後、顕微鏡のオブジェクトガラス 7.5×2.5 cm のマイクロ法となった。しかし、この大きさは小さすぎて、私

共は 10×13 cm のものを現在使用している。¹⁾ 図 1 は循環冷却水により温度を規制した一定条件による電気泳動装置であって、この装置を用いれば、泳動中一定温度を維持するために定電圧で、しかも定電流という電気泳動が可能になる。さらに直流発生装置であれば、ひとりでに終始一定条件の泳動となるので、高価な定電圧装置を用いる必要がなく、泳動装置は従来より高価になるが、電源装置は簡単になる。次にこの装置では吸水性のスポンジをブリッジに用いており、接触の不均一による泳動の乱れが殆んどおこななくなった。

図 1. 冷却槽付泳動槽。

2. 寒天：免疫電気泳動に用いる寒天はアガーよりもアガロースの方がよい。²⁾ 沈降線が明瞭であること、血清蛋白成分の吸着が少なく、tailing が少ないこと、透明性が良いことなどがその理由である。アガロースにもメーカーとロットによりゲル強度、凝固温度などがさまざまであるが、ゲル強度が高く、加熱により着色すること

* An improved method on immunoelectrophoresis and its clinical application.
昭和50年10月25日、第26回電気泳動学会総会（京都産業会館）における教育講演。
** Shunsuke Migita, 金沢大学がん研究所分子免疫部。

がなく、比較的安価である点で同仁アガロースⅡ（和光純薬）がすぐれている。しかし、原料が天然物で、天候によりテングサの糖の重合が vari, ロットにより品質が変るかもしれないので、良いロットに出会った際には、大量に同じロットのアガロースを購入して貯わえておいた方が、後でパターンを比較する場合に、同じ条件のパターンとなって都合がよい。

3. 緩衝液: pH 8.6 のペロナール緩衝液が通常用いられる。私共はその組成を検討し、乳酸カルシウムを加えたペロナール緩衝液と 0.05 M のトリシン緩衝液では、血清蛋白の易動度が相違するので、各分画が等間隔に分布する理想的条件として、両者の混合により中間の易動度が得られることをみいだした。³⁾ pH が同じであってもその組成によって血清蛋白、各分画の易動度が変る理由は、各分画の荷電アミノ酸の存在状態、水和性などの相違によると思われるが、その操作は経験的なものの組合せであって、例えば α_1 AT を alb からはずして、重ならないようにするには、緩衝液のイオン強度を高め、0.025 から 0.05, 0.075 にして、2 mm の乳酸カルシウムを加える。⁴⁾ これは血清中には 3 mm の Ca イオンがあるが、電気泳動支持体に全く Ca イオンを含まないと、分画によっては不安定になり、易動度が変るのであろう。イオン強度も血清では 0.15 であって、緩衝液では 0.05 ~ 0.075 程度であれば、オイグロブリンは不安定な状況で泳動されることになる。しかし、一方イオン強度を高めるとジュール熱も大きくなるので、温度的に安定な状態で泳動することが困難になる。冷却式の泳動装置はジュール熱を吸収するために是非必要であって、冷却しない装置ではイオン強度を 0.025 に下げて電気泳動することが通常であったが、冷却により改善された。また、寒天や装置によっても易動度は変わる。その人がどの分画に重点をおくかによって緩衝液を変えることも可能である。³⁾ 図 2 は、その参考になるだろう。現在私共の用いている緩衝液の組成は

ペロナールソーダ	6.86 g
ペロナール	1.23 g
トリシン (Tris hydroxymethyl) methylglycine	1.66 g
苛性ソーダ	0.30 g
乳酸カルシウム	0.30 g
蒸留水	ad 1,000 ml
pH 8.6, μ 0.05	

4. 標準血清: 免疫電気泳動においては、沈降線の定おおよび半定量を行なう場合の基礎として、毎回同一の正常標準血清を対照に、試料と並列に泳動することが必要である。1 回に使用する量は少量でよいので、私共は

図 2. 寒天電気泳動用緩衝液の組成とヒト血清蛋白分画の易動度。

1 % アガロースに pH 8.6 の各種緩衝液を用いた各分画の中心の移動距離を示す。最上段は各分画が等間隔に分離した理想分離像、下半分はトリシン緩衝液とペロナール緩衝液の混合により両者の中間値のパターンとなり、T 33 : V 66 の混合比は理想分離像に近くなる。 α_1 , α_2 の中間にも 2 分画を識別出来た。

新鮮正常ブール血清をホールプレートに分注して、凍結乾燥し、低温に保存しておいて、必要時に 1 ホールずつ切りとり蒸留水を加えて再構成し、標準血清として使用する方法を考案した。⁵⁾ 血清に加える保存剤として EDTA, 窒化ソーダ, グリシン, グルタミン酸ソーダを用い、血清 53 μ l に保存剤を加えた 100 μ l ずつ、プラスチックのホールプレートに分注し、凍結乾燥した。これに 50 μ l の蒸留水を加えると 53 μ l の血清試料が再構成された。保存試験においては室温で 1 週間、4°C で 4 週間、-20°C で 6 か月で一部に変性を認めることがあるが、-80°C では 1 年以上保存しても各成分に殆んど変性は認められなかった。この場合に変性しやすい α リボ, β リボ蛋白, C3, Cp にはむしろ変化が少なく、alb には一部重合がおこり、pre β リボ, β_2 糖蛋白Ⅲの易動度が変化する傾向があった。変性の少ないことは少量ずつ分注し、短時間に凍結乾燥して、保存剤と共に低温にしておくためであろう。保存条件に留意すれば、全分画を保存した正常日本人血清として使用に耐えることが判明した。⁶⁾

この標準血清の開発により、毎回同一の対照血清と抗ヒト血清を用いることによって、電気泳動装置の改善を加えれば、毎回同一の免疫電気泳動パターンを得ることが可能になった。この標準血清はバイアルを用いて自作することも可能であるが、近く H 社より市販される予定である。

5. 市販抗ヒト血清の比較: 免疫電気泳動に用いる抗ヒト血清は数多くの蛋白分画に対する抗体を、過不足なく含み、1 回の免疫電気泳動において、明瞭な沈降線を

図3. 市販抗ヒト血清の比較.

抗血清: Be; ペーリング研, Hy; ハイランド社, Da; ダーコパッツ社.

試料: s; 標準ヒト血清, n; 正常個人血清 (Hp 1-1),

0.5; 試料 0.5 μ l, 3; 試料 3 μ l.

出来るだけ多く示す抗血清が望ましい. このような抗血清を自作することは困難であるので, 市販の抗ヒト血清を利用することが多い. しかし, 市販品もロットにより性質が異なり, ヒト血清に含まれる主成分に対しても, 必ず抗体を含んでいるとは限らない. 抗ヒト血清が何と何に対する抗体を含んでいるかをしらべるには, 各々に対する特異抗血清と抗ヒト血清に対する沈降線を向い合せて配置して判定する必要がある. これは本来は抗血清を市販している業者が行なって, 抗ヒト血清には何, 何を含むと明示すべきであるが, 一方では抗体を含むか, 含まないかは厳密には量的な問題で困難な点もある. 図3には4. にのべた標準血清と新鮮ヒト血清 (1個人由来) の比較免疫電気泳動を, 試料血清 3 μ l と 0.5 μ l ずつ

について行なったパターンを示す. 抗血清の添加量は, いずれも1溝あたり 0.08 ml であって, ヘキスト, ハイランド, ダーコパッツの市販抗ヒト血清で, それぞれ, ウマ, ウマ, ウサギ由来, ロット番号は 2024 BB, 8040 $\times$ 004A1, 100SF, 沈降線の詳細は図3からは読みとれず, アート紙にでも大きく引伸さないとも無理であるから, 詳細は省略するが, 抗血清によって沈降線の数に差があり, 初心者にとっては, 沈降線の数があまり多くない方が, 判定に迷うことがなくていいとも言えるが, そうであれば尚さら, そこに見える沈降線は何と何であるのかを明示しないと, Cp の見えないパターンで, Hp を Cp と誤ったり, 試料血清中に著しい変動があっても, 沈降線の少ない抗血清を用いておれば, 見逃す可能性があっ

て、困ったことになる。標準血清と一定ロットの抗血清を用いれば、毎回同じ沈降線のパターンが得られるわけで、その同定法を習得すれば、沈降線は多い方が情報量も多いので、それを混乱しないように読みとるための対策に努力すべきである。

6. 沈降線の同定：抗血清もいいロットがあれば20 ml 以上を一時に購入して保存した方がよい。それと凍結乾燥した標準血清の組合せにより、あらわれる沈降線を一度全部確かめておく事が、患者血清を分析する以前に必要である。これには特異抗血清を30種類位用意しなくてはならないが、20万円を要し、しかも無駄が多い。1種ずつの必要量は溝を短く切れば毎回0.04 ml 程度であるので、ヘマトクリット管に分注した特異抗血清が1本200円程度で市販されることが望ましい。抗ヒト血清と特異抗血清を向い合った溝に入れて、7日間湿室に置くと沈降線が長くなるので、融合するか、融合しなくても対応関係が明らかになるまで待つ。沈降線は脱蛋白後に乾燥して、アミドブラックにより染色すると、沈降線の両端が更に長く明瞭になるので、対応がつけやすい。大型の寒天板を使って展開を広くとる、抗原量を加減する、緩衝液を工夫するなど、それぞれの易動度が重ならないようにしたパターンを引伸機で大きく引伸ばすことにより、判読しやすくなるが、実際には沈降線の溝からの距離、彎曲などにより、一度同定すれば、抗血清の同じロットを使う限り、そのパターンを参考に使える。用意する特異抗血清の数が少なれば未同定の数が多くなる。その場合には各自で仮の名をつけておいて、後にそれが何であるか判明した際に遡って判定できるようにプレートを保存しておく必要がある。沈降線を同定する写真の

1枚を図4に示した。各分画の相当易動度および同定の写真は文献¹⁷⁾に拡大して示しているので参考にしたい。

7. 比較免疫電気泳動¹⁷⁾：免疫電気泳動により、患者血清または未知試料を分析する場合には、標準血清と並べて泳動するのがふつうである。この場合に溝をへだてて並べるのではなく、2本の溝の間に2試料を近接して置いて電気泳動する(図5)。標準血清を上、患者血清を下に置けば、標準血清は上側の溝、患者血清は下側の溝の抗血清と反応して、作られた沈降線が正中線で融合するために、患者側の沈降線の同定が容易である。これは標準血清と抗ヒト血清の間の沈降線は全部同定がついていることを前提としているが、上下対称性のわるい沈降線が正常からのずれの大きい分画を示すことになる。私共は2試料を並べる時でも、0.5 μ l ずつと3 μ l ずつ入れ、さらに上下両端にはそれぞれを単独で3 μ l ずつ入れて比較免疫電気泳動を行なっている。0.5 μ l ずつ入れたところでは alb, α_1 AT, Hp, Tf, IgG など、量の多い成分の変動を比べ、3 μ l ずつのところでは、それ以外の比較的微量成分の増減をしらべる。ただ、注意を要するのはもし、一方に欠損した分画があれば、その側には沈降線が欠損するのではなく、他方の欠損しない分画が拡散して来て、やはり沈降線が作られてしまう。しかし、その場合には、沈降線の正中線に対する対称性は著しく片寄ったものとなる。つまり、減少した場合と、欠損した場合の区別が、つきにくいわけである。その時は上下両端のそれぞれを単独で電気泳動したところを見れば、減少と欠損の区別はつく筈である。この方法では通常の免疫電気泳動を両端で行ない、そのパターンの判読に必

図4. 免疫電気泳動の沈降線の同定法。
上：Gc, 下： α_2 HS, 試料：標準ヒト血清。

図5. 比較免疫電気泳動パターン.

AHS: ウマ抗ヒト血清 80 μ l, s: 標準血清,
p: 患者血清 (重症筋無力症), 3: 3 μ l, 0.5: 0.5 μ l.

要な操作を中央で行なって、免疫電気泳動に伴う誤読、推測を少なくすると共に、両端のパターンを判読する自己訓練とすることが出来る。従来行なわれている免疫電気泳動にルーチンに特異抗血清を何種類も用いて、患者血清の各分画の増減をしらべる方法は、1) 特異抗血清では、単一の沈降線しか出ないのであるから Ouchterlony で十分であり、前もって電気泳動する意味がない、2) 溝が2試料の中央に正確に切られないか、電気泳動方向による偏りがあれば誤った判定となる、3) 特異抗血清を多く必要とする、などの点から賛成出来ない。

8. 半定量: 免疫電気泳動によって半定量を行なうためには、沈降線の明瞭さ、溝からの距離、弧の曲率半径、比較免疫電気泳動においては角度 Y^D などが規準になるが、いずれの場合も試料孔と溝、電気泳動の方向、注入抗原、抗血清量、反応の場の水平など基本的な条件はすべて安定していることが前提になる。これは操作の熟練に依存することが多く、従って、免疫電気泳動が安易であると最初に思った人は、この段階で矛盾が多くなっていきづまることになる。寒天ゲルに溝を正確に切って定量的に抗血清を注入し、あふれないようにする操作だけでも、相当に困難であって、方法をもっと改良する必要もあるが、練習して熟練する必要もある。

さらに、半定量の規準について考えると、沈降線の明瞭さは抗原量に比例するとは限らず pre などでは抗原過剰でウマ抗ヒト血清を使った場合には、沈降線が希薄になることが多い。沈降線の溝からの距離が抗原量に反比例するのは、沈降線の外側の縁であって、内側ではない。従って、alb などでは溝に落こんだ沈降線の外縁を延長

して計測する必要がある。曲率半径を比較するには透明板に同心円を5mm 間隔に書いたものを拡大した沈降線にあてて見てもよい。角度 Y については先に記した Y^D さらに、つけ加えれば、1元免疫拡散法と類似にとって沈降線の鎌形の面積を比較してもよい。これらの総合により増減は判明する。比較免疫電気泳動では3か所で同じ分画の増減を確かめることが出来る。しかし、これらによって判明するのは半定量であって、しかも3か所くらべると矛盾した解答が得られたりすることもある。そのためにも3か所で判定できることは有利であって、結果は一、±、+、++、+++程度の増減と、易動度の変化、沈降線の形状の変化による質的变化の判定としてあらわされる。

II. 免疫電気泳動の診断的意義

血清蛋白の免疫電気泳動によって、ミエローマ蛋白の型の判定、蛋白分画の遺伝的欠損症の発見などに果す役割は、今迄にも数多くのべられてきているので省略し、通常に遭遇するパターンからどのような点を読みとるかについてのべる。これは私共の行なっている微量1元免疫拡散法、免疫電気泳動と同時に進行する寒天電気泳動法などとの比較により確かめたことで、免疫電気泳動単独であっても注意すれば気付くことである。

1. Alb 分画: pre, alb は悪性腫瘍、肝疾患で減少するのが常であるが、pre の変動がより鋭敏であり、減少も alb より早くおこり、恢復する場合も早い。ただ、腎炎では alb は減少するが、pre は増加して変動が解離する。

2. α_1 分画: α_1 AT, α_1 AG, α_1 X が急性期蛋白として相伴って変動し, 手術後, 炎症, 悪性腫瘍で α_1 分画の増加となる. しかし, α_1 X は免疫電気泳動では確認しにくく, α_1 AG もでにくい抗ヒト血清があるので注意を要する. これらの増加に解離があるのは白血病 (AML) では α_1 AT 以外が増加して, α_1 AT は増加せず, 前立腺癌では α_1 AT のみが増加する. AML も治療により寛解すると α_1 AT が増加してくる. 急性期蛋白には, この外に α_2 の Hp も含まれるが, これらの増加の著しい場合は悪性腫瘍の腹膜, 肺転移など食細胞の活性化を伴うことが多い. 急性期蛋白は, 胃癌, 腎癌などの根治手術によって1か月後には正常化するので, 疾患に反応性が増加していることが判明する. しかし, 姑息手術や再発では増加がつづき, 経過の判定に利用される.

3. α_2 分画: Hp の遺伝型の識別は新鮮血清では易動度により容易である.⁹⁾ 減少する場合に溶血性貧血, 肝疾患, 遺伝的減少があるが, 他分画の動きにより, その中のどれか推定できる. 一方, 増加は急性期蛋白として顕著にみられる. Cp は前立腺癌の時高値, AML で低値となり, α_1 AT と類似した変動を示す. α_2 M は若年者と女子が高値となり, 疾患時変動は著しくない. α_2 HS は増加は希で, 疾患時には減少するだけである点は alb に似る.

4. β_1 分画: Tf の増加は慢性骨髄性白血病には見られるが, 腎疾患, 悪性腫瘍では減少する. 生産の余力の少ない蛋白である Hx とは逆の動きになることが多い. C4 は SLE, AHA では発作時に減少し, 古典経路の活性化が判明する. 悪性腫瘍で増加が多い.

5. β_2 分画: C3 は造血系細胞の腫瘍の時増加しやすく, SLE, ページェット病, 肝硬変などでは減少する. C3PA は悪性腫瘍の時変動があるが, 増加と減少とさま

ざまであって, 別経路による活性化が関与していることがうかがわれる. 量の増減だけでなく, ページェット病の時は, 新鮮血清でも C3PA (GBG) から C3A (GGG) への変換がおこっていることを, 免疫電気泳動により認める場合があるという.⁹⁾

6. γ 分画: 多クローン型の免疫 glob の増減は沈降線の中だけでなく, 長さ, 彎曲の相違によっても見ることが出来るが, 判定の意義づけは未解決である.

おわりに

免疫電気泳動は血清蛋白の総合分析法として, 生体の機質の変化ではなく, 機能的状態を捉えるにも拘らず, 半定量的表現になる点が欠点であるが, 同時に多分画の分析を行なえる点に長所がある. 従って, スクリーニングとしての意味は大きく, 他の分析法と協力して, 現在未知の分画の機能も, 疾患時変動から判明してくると思われる. 一方, 実施者にとっては, パターンを得るだけで, 解読者は別という分業が成立ちにくいことを, この方法については考えるべきである.

文 献

- 1) 右田俊介: 感染・炎症・免疫, **2**: 374, 1972.
- 2) Leise, E.M. and Evans, C.G.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **120**: 310, 1965.
- 3) 右田俊介他: 日本免疫学会総会記録, **3**: 122, 1973.
- 4) 右田俊介他: 生物物理化学, **16**: 230, 1972.
- 5) 右田俊介他: 生物物理化学, **19**: 18, 1974.
- 6) 広橋 憲他: 生物物理化学, **20**: 164, 1976.
- 7) 右田俊介: ヘキスト Immunoreview 表紙, **10**: No. 1, No. 3, 1975, **11**: No. 2, 1976.
- 8) 右田俊介: ヘキスト Immunoreview 表紙, **10**: No. 5, 1975.
- 9) 小暮美津子: 日本医師会雑誌, **12**: 1477, 1975.