7. LDH と免疫グロブリンの結合様式*

桑 克彦・中山年正・北村元佐**

はじめに

LDH 結合免疫グロブリンの検索の報告は多数あるが、主に自己の LDH と結合するという特殊な免疫グロブリンの出現機序に興味をもたれ、自己免疫疾患との関連があるか否かが論じられている。¹⁻⁹⁾ これらのグロブリンは、特異的に LDH に結合し、その結合部位は酵素活性部位と異なり、またその結合様式は免疫複合体の生成によることが示されている。

一方 LDH は H(B), M(A) 2つのサブユニットからなる 4 量体で、LDH アイソザイムは 2つの同種サブユニットよりなる 2つのアイソザイムと異なるサブユニットよりなる 3つのアイソザイムからなる。従ってその組み合わせから H₄, H₃M, H₂M₂, HM₃, M₄ の 5つのアイソザイムに分かれることがよく知られているが、これらのアイソザイムと LDH 結合免疫グロブリンとの結合性を調べた報告は、我々の 10例の LDH アノマリーについて検索した報告^{10,11)}を除いてない。

ここでは今迄の知見をまとめ、LDH 結合グロブリンとヒトの 5つの LDH アイソザイム精製標品との結合性、LDH 結合グロブリン濃度と再構成との関係から考察したグロブリンと LDH との結合様式について報告する。

実験方法および材料

1. LDH 活性の測定は Hill 変法¹²⁾
2. LDH アイソザイムは、寒天ゲルを支持体にした吉田らの方法¹³⁾によった。寒天電気泳動は、0.04 M ベロナール緩衝液、pH 8.4 である。セルロースアセート膜による LDH アイソザイムは、セロゲルを支持体にした thiazolyl blue 染色法で、Schmidt らの方法¹³⁾で行なった。
3. 免疫電気泳動は、Scheidegger の方法¹⁴⁾により行なった。特異抗血清との反応で免疫沈降線を作成したの

ち、0.9% NaCl 加 1/15M リン酸緩衝液、pH 7.2 で 4°C、48時間洗浄した。沈降線上の LDH 活性の染色は、2の染色液を用いた。

4. LDH アイソザイムの精製純化は、ヒト肝臓および赤血球より Mosbach らの方法による affinity chromatography¹⁵⁾により行なった。赤血球溶血液 (1:10 v/v H₂O) 1,000 ml, または肝臓抽出液 (1:20 v/v H₂O homogenate) 100 ml を 0.1 M リン酸カリウム緩衝液、pH 7.2, 0.1 mM EDTA, 3 mM メルカプトエタノール含有に対し 12時間透析し、20,000 g, 20分遠心した上清を 5'-AMP Sepharose 4 B¹⁵⁾のカラム (1×3 cm) で吸着した。上記リン酸緩衝液 100 ml で洗浄後、リン酸緩衝液に 0.1 mM NADH を含む液で LDH を溶出した。溶出液は 3 mM メルカプトエタノール加 0.02 M トリス-塩酸緩衝液、pH 7.4 に対して 2時間透析したのち、イオン交換クロマトグラフィー (DEAE Sephadex A-50, 1×20 cm, 0~0.3 M NaCl による gradient elution) により分画した。得られた LDH 各分画は、0.01 M トリス-塩酸緩衝液、pH 7.4 に対し透析した。全ての操作は 0~4°C で行なった。

5. カラムゲル透過は 2本の Sephadex G-200 のカラムを用いた。一方は 1.5×100 cm, 0.1 M リン酸カリウム緩衝液、pH 7.2, 他方は 2.6×100 cm, 0.1 M グリシン-塩酸緩衝液、pH 3.4 である。薄層ゲル透過は厚さ 0.5 mm の装置 (硝英製作所), ゲルは Sephadex G-200 superfine または Bio-Gel P-300~400 mesh を用いた。活性帯の染色は次のようにして行なった。0.1 M リン酸緩衝液、pH 7.2 で室温下 4~5時間展開後、あらかじめ 0.06 M トリス-塩酸緩衝液、pH 7.4 で浸したのち乾燥した東洋沓紙 No. 50 をゲル面に約 5分間密着し 2に準じ活性染色を行なった。

6. LDH の結合の分析に供した患者血清中の結合蛋白質標品は次のようにして調整した。pH 3.4 のゲル透過 5で得た溶出液を試験管 4本ずつ集め (20 ml) 13の

* A study on the affinity of immunoglobulins from LDH anomaly for five human LDH isoenzymes.

** Katsuhiko Kuwa, Toshimasa Nakayama, Motoshi Kitamura, 虎の門病院生化学科。

分画とし、それぞれを 0.1 M リン酸緩衝液, pH 7.2 に
 対し透析, コロジオンバッグで約20倍に濃縮した。

7. LDH と免疫グロブリンの再構成は, 6 で得た試
 料に 4 で得た精製 LDH 標品 1 ~ 5 分画をリン酸緩衝液
 で希釈し, それぞれ 1:1 の割合に混合し, 室温で 1 時間
 放置したのち, その一定量を寒天電気泳動などの分析に
 供した。

8. 血清試料はすべて当院の入院または外来患者より
 得た。

結 果

1. LDH ザイモグラム

10 例の患者の臨床検査データを Table 1 に, 寒天電気
 泳動による血清 LDH ザイモグラムを Fig. 1 にそれぞ
 れ示した。図に明らかのようにすべての症例で LDH 各
 分画の分離が不明瞭であり, いわゆる LDH アノマリー
 像を示した。

Case 1 は原点 (試料塗付点) すなわち 3, 4 分画の間
 に強く活性が残った。Case 2 から 6 までの 5 例は, LDH
 2, 3 分画が融合した形を示した。さらにこれら 5 例の
 LDH 総活性は大きく増加していたが, case 6 を除く 4
 例で, LDH 1, 4, 5 の 3 つの分画活性値は正常範囲内
 にあった。Case 10 ではほかと異なり, LHD 1 分画が全
 く認められなかった。

なお, 赤血球溶血液の LDH アイソザイムは全例とも
 異常を認めなかった。

2 Sephadex G-200 ゲル汙過

患者血清を pH 7.2 で溶出した Sephadex G-200 の
 カラムゲル汙過では, LDH 活性は A (albumin) と G
 (immunoglobulin) 分画および G と M (macroglobulin)

Fig. 1. Zymograms of LDH anomaly of ten cases.

Table 1. Diagnosis and laboratory data for ten cases.

Case No.	Patient	Sex	Age	Diagnosis	Total LDH (Hill unit)	Isoenzymes (percent)				
						H ₄	H ₃ M	H ₂ M ₂	HM ₃	M ₄
1	M. O.	M	71	Myocardial infarction	244	60	31	-10-	-	-
2	G. O.	M	66	Chronic kidney failure	499	4	-93-		2	1
3	S. A.	F	47	Healthy	328	15	-83-		1	2
4	T. A.	F	43	Chronic gastritis	499	6	-92-		2	-
5	M. Y.	M	68	Sigmoid carcinoma	353	11	-87-		-	-
6	K. T.	F	50	Mild diabetes mellitus	299	10	-73-		13	-
7	T. N.	M	63	Primary hepatoma	302	17	38	14	-31-	-
8	H. T.	M	56	Chronic alcoholism	204	11	19	-70-		-
9	M. A.	M	63	Esophagus carcinoma	176	31	50	16	2	1
10	Y. A.	M	54	Aspergillosis	237	-	-	-100-		-
Normal range*					126	21	36	23	1	0
					202	33	46	32	6	5

* Normal range of serum total LDH activity was calculated mean $\pm$ 2 S.D. of log-transformed LDH activity obtained from 200 normal subjects and normal range for percent distribution was obtained from 80 normal subjects.

分画の間に溶出された。Elution volume と分子量の関係から高分子 LDH の分子量を推定算出した。10例のうち case 2 から 6 までの 5 例で、case 2 は 300,000, case 3 は 290,000, case 4~6 は 310,000 で、これらはよく似た結果となった。

カラムゲル透過時の LDH 活性値の回収率は、大部分の症例は 75% 以上の回収を見たが、寒天泳動のザイモグラム上試料塗付点に残った case 1 では、回収率は最も少なく 67% にとどまった。この case 1 はさらに次のような特徴が見られた。すなわち、Sephadex G-200 のカラムクロマトグラフィーは他の症例と同様であり、回収率が悪くなる原因が考えられるような特殊な溶出パターンではなかった。しかし、Sephadex G-200 superfine による薄層ゲル透過を特に原点（試料塗付点）を含めて検出できるようにして行なったところ、AG 分画のほかに試料

Fig. 2. Thin-layer gel chromatograms of LDH activity from case 1 on Sephadex G-200 superfine.

Upper pattern is serum protein used as references: A, albumin; G, immunoglobulin G; M, macroglobulin.

Fig. 3. LDH isoenzyme patterns of the serum of case 1 after ultracentrifugation.

Samples were centrifuged in the RPS 50 rotor at 10,000 g for 2 hr at 4°C in the Hitachi 65 P ultracentrifuge.

塗付点に明らかな LDH 活性が認められた (Fig. 2)。そこで case 1 の採血日の異なる 3 種の血清を 100,000 g, 2 時間超遠心分離を行ない、上清と沈殿を原血清を対照にしてアイソザイムを行なったところ、原血清、上清および沈殿とも試料塗付点に活性が認められた (Fig. 3)。

以上、この case 1 の寒天泳動上試料塗付点に残る LDH 活性は、超遠心分離で完全に沈殿しないことから、細菌などの繁殖による artifact ではなく、Sephadex G-200 カラムクロマトグラフィーでカラムにとどまって回収率を悪くしており、この原因として著しい高分子成分の形成が考えられた。

3. 酵素免疫泳動

免疫グロブリンとの結合を明らかにするために免疫沈降線の酵素染色を行なった。免疫グロブリンの同定ができたのは IgA- κ 型 5 例、IgG- κ 型 3 例（その後の検索で同定された case 7 を含む）であったが、Fig. 4 に示したようにこの IgG- κ 型の 1 例 (case 1) は IgA ともわずかに反応した。またその他の 2 例では、免疫泳動はもちろんゲル内沈降反応においても抗体蛋白質の同定ができなかった。

4. LDH 複合体の再構成

pH 3.4 のゲル透過で得た免疫グロブリンを含む蛋白質と、精製 LDH アイソザイム 5 標品との再構成を行なった。Fig. 5 はその一部で case 4 についての電気泳動の結果を示したものである。LDH 2 分画との再構成の

Case 1

Fig. 4. Enzymo-immunoelectrophoregram of case 1.

LDH activity on the immunoelectrophoretic precipitin line against anti-IgG was stained and also against anti-IgA was slightly stained.

Fig. 5. The affinity of immunoglobulins from case 4 for five human LDH isoenzymes.

結果に示されているように、あたかもほかの分画が現われたように見えたり、あるいは活性の低下が見られたものを再構成されたと判定した。

Case 2 から 6 までの 5 例の IgA-κ 結合免疫グロブリンは、精製ヒト LDH アイソザイムの 2 分画 (H₃M) および 3 分画 (H₂M₂) に再構成が観察された。Case 3 は LDH 2 分画との結合が、また、case 6 は LDH 3 分画との結合が優位であった。しかし、これらの 5 例はいずれも LDH 1 分画 (H₄) と LDH 5 分画 (M₄) との再構成は全く起こらず、また LDH 4 分画 (H₂M₂) とは明瞭な結合は認められなかった。すなわち、この 5 例の IgA-κ は異なるサブユニットよりなる LDH アイソザイム (LDH 2, 3 分画, 4 分画不明) のみと明らかな結合が認められた。

IgG-κ と IgA-κ の両者が共に認められた case 1 と IgG-κ の case 7 および免疫グロブリンの同定ができなかった case 8 では、LDH 4 分画と LDH 5 分画に反応した。酵素免疫染色ができず結合免疫グロブリンが同定できなかった残り 1 例の case 9 では追求が不能であった。また case 10 は原血清で LDH 1 分画が認められなかった例であるが、分子量が明らかに大きくかつ再構成上明瞭な結果が得られなかった。なお case 10 は γ-glob が 50.2% と著明に増加していた。

5. LDH 結合蛋白濃度の複合体生成への影響

LDH 結合が多いことが 4 の実験で確かめられた pH 3.4 のゲル濾過で得た蛋白分画をリン酸緩衝液で稀釈して、精製ヒト LDH の 5 つのアイソザイムとの再構成をそれぞれの患者で行なった。Fig. 6 は IgA 結合例と LDH 2 分画との結合性、および IgG 結合例と LDH 5 分画との結合性をセロゲルを支持体とする電気泳動を用いて行なったものの一部である。

図からも明らかのように再構成成分は、蛋白濃度を変

Fig. 6. The effect of the concentrations of LDH binding protein on the complex formation.

Fig. 7. Thin-layer gel chromatograms of serum LDH activity from IgA cases on Bio-Gel P-300.

えても電気泳動上 1 種類しか観察できなかった。また、患者血清中の LDH 複合体の形成を Sephadex G-200 superfine および Bio-Gel P-300 の 2 つの支持体を用いた薄層ゲル濾過法で検索した。Sephadex G-200 による薄層クロマトグラフィーでも、またさらに高分子領域まで篩効果のある Bio-Gel P-300 でも正常の LDH 分画で

ある AG 分画のほか、高分子分画である GM 分画に強い活性帯を1つ示したが、この1つの GM 分画のほかには、高分子の LDH 活性帯は観察できなかった。Fig. 7 はその一部で IgA における Bio-Gel P-300 の薄層クロマトグラムを示した。

考 察

LDH 結合免疫グロブリンと LDH アイソザイムとの結合の親和性の検索は、患者の血清 LDH や、他種族の LDH アイソザイムとの反応などが行なわれているにすぎない。これらの検索で IgA 結合例においては、H 型サブユニットに対して強い親和性をもつことが報告されている。^{7,8} しかし、これらの実験からは免疫グロブリンと LDH の結合様式を推定することはできない。

ここに報告した10例の患者の LDH 結合蛋白質は、その性状を比較することにより次のように3群に分類することができる (Table 2)。第1は case 1 における特殊性である。すなわち、LDH 結合免疫グロブリンとして、IgG と IgA の両者が観察されたこと、およびゲル透過、電気泳動の実験から著しい高分子複合体が一部生成していることが推定されたことである。この高分子量と推定される LDH 複合体の性状 (分子量および免疫複合体か否か) については今のところ明確ではない。

Biewenga ら⁹も LDH 複合体が IgA と IgG の2成分観察された症例を報告しているが、これら LDH 複合体の性状は明らかになっていない。

第2は case 2 から6までの IgA 結合の5例である。すなわち、患者血清の LDH アイソザイムパターンは、LDH 2、3 分画の融合形あるいは LDH 2 分画の欠損

という特徴ある電気泳動像を示していた。さらに血清 LDH の総活性は増加しているが、分画活性値 (分画 % × 総活性値) は、case 6 を除いて LDH の5つの分画のうち異常パターンを示さない LDH 1 分画と4、5 分画の3つの分画は正常値を示していた。再構成の実験においてもこれら5例の IgA-κ 型免疫グロブリンは、LDH 2 分画および3 分画アイソザイムなどの異なるサブユニットよりなる LDH アイソザイムとのみ結合した。また LDH 結合蛋白質濃度と LDH 2 分画アイソザイムとの複合体は、セロゲルを支持体とする電気泳動上も1成分のみであり、薄層クロマトグラフィーにおいても高分子分画は1種類のみしか認められなかった。この複合体の分子量は、Sephadex G-200 クロマトグラフィー上約300,000 と推定され、IgA-κ 1 分子に LDH が1 分子結合していることが考えられる。LDH に対する抗体は LDH の H、M サブユニットに特異的であること¹⁰を考慮してこれらの知見は、IgA 結合例における LDH の免疫グロブリンとの結合部位は、LDH の H または M のモノマーでなく、LDH テトラマーのうちの HM の2 量体または HHM の3 量体の立体の中のある特殊な位置が存在することを強く示唆するものである。

IgA 結合例における LDH アイソザイムとの反応で、LDH 4 分画との結合が明らかでなかったのは、今回行なったような実験のやり方では明確に現れないものと思われる。

第3は類似した case 7, 8 の例である。複合体の推定分子量は約250,000、ゲル透過による LDH 活性の回収率は97~99%とほぼ完全であった。結合蛋白質の同定は、その後の検索で case 7 は IgG-κ 型であったが、case 8 は

Table 2. Properties from ten cases of LDH anomaly.

Case No.	M. W. of complex	LDH* activity recovered	Binding protein	Affinity for LDH isoenzyme				
				H ₄	H ₃ M	H ₂ M ₂	HM ₃	M ₄
1	35 × 10 ⁴	67 %	{ IgG-κ IgA-κ	—	—	—	+	+
2	30	88	IgA-κ	—	+	+	—	—
3	29	99	IgA-κ	—	+	?	—	—
4	31	76	IgA-κ	—	+	+	—	—
5	31	82	IgA-κ	—	+	+	—	—
6	31	86	IgA-κ	—	?	+	—	—
7	26	99	IgG-κ	—	—	—	+	+
8	25	97	?	—	—	—	+	?
9	35	90	?	—	—	—	—	—
10	48	75	IgG-κ	—	+	—	?	+

* Recovery of LDH activity from Sephadex G-200 chromatography.

同定できなかった。LDH アイソザイムとの再構成は、いずれも LDH 4 分画と 5 分画に認められた。薄層ゲル洳過による複合体の形成は 1 種類であり、結合蛋白濃度を変えても再構成成分は 1 種類だった。以上のことから IgG 結合例における LDH の免疫グロブリンとの結合部位を推定すると、LDH の M モノマーとの反応も考えられるが、MM の 2 量体または MMM の 3 量体の立体で起こることも考えられる。

免疫泳動法により IgG の同定を行なう場合は、特に泳動中に蛋白質が失活したりあるいは結合から離れたりする現象が起こることが考えられるため、これらの同定法の実験条件には多少問題があるように思われる。

これまでの実験結果では、免疫グロブリンと LDH の結合様式を完全には説明できない。IgG 結合例ではそのサブクラスによっても LDH との結合部位が異なることも考えられる。今後、抗体蛋白質同定の実験条件や、結合グロブリンと LDH アイソザイムとの再構成の方法などを検討し、さらに追求していきたい。

本研究にあたり御指導をいただいた慶応大学中検臨床化学加野象次郎先生に深く感謝します。

参 考 文 献

- 1) Ganrot, P.O. : *Experientia*, **23** : 593, 1967.
- 2) Biewenga, J. and Thijs, L. G. : *Clin. Chim. Acta*, **27** : 293, 1970.
- 3) Nagamine, M. : *Clin. Chim. Acta*, **36** : 139, 1972.
- 4) Biewenga, J. : *Clin. Chim. Acta*, **40** : 407, 1972.
- 5) 井本 勉他 : 医学のあゆみ, **84** : 310, 1973.
- 6) Markel, S.F. and Janich, S.L. : *Am. J. Clin. Pathol.*, **61** : 328, 1974.
- 7) 加野象次郎他 : 生物物理化学, **19** : 47, 1974.
- 8) Biewenga, J. and Feltkamp, T. E. W. : *Clin. Chim. Acta*, **58** : 239, 1975.
- 9) Biewenga, J. and Feltkamp, T. E. W. : *Clin. Chim. Acta*, **64** : 101, 1975.
- 10) 桑 克彦, 中山年正 : 臨床病理, **23** 補冊 : 240, 1975.
- 11) 桑 克彦, 中山年正 : 生物物理化学, **20** : 340, 1977.
- 12) 北村元仕編著 : 実践臨床化学, 医歯薬出版, 1974, p. 346.
- 13) Schmidt, D.M. et al. : *Am. J. Med. Technol.*, **35** : 153, 1969.
- 14) Scheidegger, J. J. : *Intern. Arch. Allergy*, **7** : 103, 1955.
- 15) Guilford, H. et al. : *Chemica Scripta*, **2** : 165, 1972.
- 16) Rajewsky, K. et al. : *J. Exp. Med.*, **126** : 581, 1967.