免疫混合法によるアミラーゼ結合免疫グロブリンの同定*

戸沢 辰雄**・佐藤 仁美**

Summary

We developed a simple, reliable and sensitive method for the identification of the class and type of amylase-linked immunoglobulin in patients with macromylasemia. This method is based on the principles of immunoprecipitin reaction in free liquid media, thereby the class and type of amylase-linked immunoglobulin were easily identified from amylase activity in the immunoprecipitate.

Each specific antiserum and serum specimen were mixed at an optimum ratio. Free amylase admixed in the immunoprecipitate thus formed was completely removed by repeated washings with veronal buffer. To the washed immunoprecipitate a color reagent (suspension of Bluestarch polymer) was added directly. After incubation, absorbance of the supernatant was measured at 620 nm, to obtain the activity of amylase in the immunoprecipitate.

Of the 12 cases with macroamylasemia studied, only two cases permitted identification of both the H- and L-chain of amylase-linked immunoglobulin by an enzyme-immunoelectrophoresis technic, whereas, according to this method, both chains were identified in all of the cases.

Key words : amylase-linked immunoglobulin, immunoprecipitin reaction in free liquid media, macroamylasemia.

緒 言

実験材料と方法

Amylase 結合免疫 glob の同定には、従来より免疫吸収法¹⁾、免疫電気泳動法²⁾などが汎用されているが、さらに高感度な結合免疫 glob の同定法の開発が望まれている。著者らは、すでに免疫混合法による lactate dehydrogenase (LDH)³⁾ および alkaline phosphatase (ALP) 結合免疫 glob の同定法について報告した⁴⁾。LDH 結合免疫 glob は免疫電気泳動法では同定されなかった例でも、免疫混合法により全例について同定された³⁾。したがって、従来法で amylase 結合免疫 glob の同定されなかったマクロアミラーゼ血症患者の血清中にも、amylase 結合免疫 glob の存在する可能性が推定された。そこで今回、免疫混合法による高感度で信頼性の高い、amylase 結合免疫 glob の検出と同定法の開発を検討した。

1. 試 料

電気泳動によるアイソザイム像分析からマクロアミラーゼ血症の疑われる12例の患者血清と、対照としてマクロアミラーゼ血症でない14例の患者血清(総アミラーゼ活性が約 80~3,100 IU/l)を使用した。12例のマクロアミラーゼ血症患者の血清は、アイソザイムの異常像から3群に大別できた。第1群は P₁ から陽極側への長い tailing を示す症例(TM, AT, YK, IA, YI)。第2群は S₁ から陽極側への tailing を示す症例(KT, IT, IF, TS, BK, TI)。第3群は P₁ から陰極側への tailing を示す症例(KS)である。

Sephadex G-200 カラムゲルろ過法による高分子アミラーゼは、YI と BK では 19S glob の位置に、KS では 7S glob の位置に認められ、残りの9例では 7S と 19S glob 間に認められた。

2. 総アミラーゼ活性の測定

* Identification of amylase-linked immunoglobulin by immunoprecipitin reaction in free liquid media.

** Tatsuo Tozawa, Hitomi Satoh, 兵庫医科大学病院中央検査部。

(受付 1983年5月16日, 受理 1983年7月14日)

総アミラーゼ活性の測定は、アミラーゼ測定用キット（ネオ・アミラーゼテスト「第一」，ブルースターチ法，第一化学 K.K.）で反応させ，島津 CL-720 で比色した。

3. アミラーゼアイソザイム分析

支持体にはタイタンⅢ-リボ膜（ヘレナ社）を用い，支持体浸漬用緩衝液にはペロナール-ペロナール Na 緩衝液（pH 8.6， μ 0.05）を用いた。泳動用緩衝液には陽極側にトリス-ホウ酸緩衝液（pH 9.1， μ 0.42），陰極側にはペロナール-ペロナール Na 緩衝液（pH 8.6， μ 0.05）を用いて，氷冷下 300V で50分間電気泳動を行った。アイソザイム染色は，泳動後のタイタンⅢ膜をブルースターチ平板（1錠に 0.2g のブルースターチを含むブルースターチ錠の4錠を 6ml の精製水に懸濁させ，プラスチック板上に 76 mm×60 mm に展開させた。）に密着させ，ろ紙で余分の水分を吸いとり，37°C で 30 分間反応させた。

4. ゲルろ過

Sephadex G-200 カラム（0.9×60 cm）を使用し，0.15 M NaCl 加 0.1M 第1リン酸 Na-第2リン酸 Na 緩衝液（pH 7.0， μ 0.222）で溶出した（流速：3 ml/hr）。各フラクション中の蛋白濃度（280 nm の吸光度）とアミラーゼ活性を測定した。

5. 免疫 glob 定量

IgG は Hyland 社，IgA，IgM は Dade 社の平板内単純免疫拡散法（SRID）プレートを用いて定量した。

6. アミラーゼ結合免疫 glob の同定法

1) 免疫混合法

特異抗体として DAKO 社の抗 γ （力価 1,200），抗 α ，抗 μ ，抗 κ （力価 600），抗 λ （力価 500）抗血清を用いた。抗 λ 抗血清には家兎血清由来と推定される高アミラーゼ活性（1,790 IU/l）が認められた。これが測定系に支障をきたすため，pH 2.8 の塩酸-クエン酸カリウム緩衝液でアミラーゼ活性を失活させた後，再び pH 7.4 のリン酸緩衝液で pH を調整して使用した。

操作手順は Fig. 1 に示す。抗 γ ， α ， μ ， κ ， λ の各抗血清は，順にそれぞれ 500，400，300，1,000，300 μ l を用いた。被検血清を各抗血清に対する最適比で加えた。反応後，上清を除去し，ペロナール-ペロナール Na 緩衝液（pH 8.6， μ 0.05）を 2.5 ml 加えて混和した後，遠心して上清を除去した。最終沈降物に 0.8 ml のブルースターチ懸濁液（ブルースターチ 1錠を 4 ml の精製水に懸濁）を加えよく混和し，反応後遠心してえた上清の 620 nm における吸光度を測定して，沈降物中のアミラーゼ活性とした。比色計は日立 100-40，セルは液層 5 mm の石英セルを用いた。アミラーゼ結合免疫 glob の

Anti- λ ， α ， μ ， κ ，or λ -chain antibody + Sample serum
Incubation (4°C, overnight)

↓
Centrifugation (2,500 rpm, 5 min)

Sediment

↓ Veronal buffer (pH 8.6, 2.5 ml)

Three cycles of resuspension, centrifugation
(2,500 rpm, 5 min)

↓
Last sediment

↓ Bluestarch polymer (0.8 ml)*

Incubation (37°C, 3 hr)

↓ 0.5 N NaOH (0.2 ml)

Centrifugation (2,500 rpm, 5 min)

↓
Supernatant

Colorimetry at 620 nm

---

* Prepared by dissolving one tablet of Bluestarch with 4 ml of distilled water

Fig. 1. Diagram for the identification of class and type of amylase-linked immunoglobulin.

同定は，特異抗血清との免疫沈降物中のアミラーゼ活性の有無から行った。

2) 免疫電気泳動法

Chemetron-G Modena 社の Cellogel 膜を支持体として用い，電気泳動後，免疫混合法と同じ特異抗血清を用いて免疫沈降線を生成させた。共存蛋白を洗浄後，免疫沈降線上のアミラーゼ染色をブルースターチ平板に密着させて行った。

成 績

1. 免疫混合法による測定条件

1) 抗血清中のアミラーゼ活性

抗血清中のアミラーゼ活性は抗 γ ， α ， μ ， κ ， λ の順にそれぞれ 30，10，15，37，1,790 IU/l であった。これらのアミラーゼアイソザイムパターンは家兎血清由来のそれと酷似し，家兎血清由来アミラーゼと推定された。

抗血清中のアミラーゼ活性の測定系への影響は，抗 λ 抗血清以外は認められなかった。抗 λ 抗血清を前処理せずに用いた場合，免疫沈降物のアミラーゼ活性は，対照血清でも吸光度で 0.100 以上の活性が認められ，結合免疫 glob の同定には使用できなかった。したがって，抗 λ 抗血清はアミラーゼ活性を 50 IU/l 以下に失活させて使用した。なお，抗 κ 抗血清にも高アミラーゼ活性の認められる製品があるので，使用前にチェックする必要がある。

2) 抗血清量と被検血清量

良好な検出成績を得るためには、抗原と抗体は最適比で混合されることが望ましい。したがって、あらかじめ被検血清中の IgG, A, M 濃度を知る必要がある。使用した各抗血清の力価から、抗血清量は抗 γ ; 500 μ l, 抗 α ; 400 μ l, 抗 μ ; 300 μ l, 抗 κ ; 1,000 μ l, 抗 λ ; 300 μ l とした。被検血清量は、被検血清の免疫 glob 濃度から、それぞれの抗血清に対する最適用量を用いた。

目安としての被検血清の添加量は、IgG; 1,200 mg/dl, IgA; 340 mg/dl, IgM; 170 mg/dl の被検血清では、上記量の抗血清に対してそれぞれ、50, 150, 150, 50, 100 μ l であった。

3) ブルースターチ量の検討 (Fig. 2)

アミラーゼ活性 1,620 IU/l の血清とその一連の希釈液の各々 200 μ l に、ブルースターチ懸濁液 (ブルースターチ 1 錠を精製水 4 ml に懸濁) を 4 ml, 1.6 ml, 0.8 ml, 0.4 ml 加え、37°C で 3 時間反応させ、それぞれのアミラーゼ活性 (吸光度) を調べた。ブルースターチ懸濁液が少ないほど、低活性域では高い吸光度を示した。しかし、0.4 ml は比色操作上量的に不充分であるので、0.8 ml を用いた。

Fig. 2. Effects of amount of Bluestarch suspension on coloration at various amylase activity.

4) 最適呈色反応時間 (Fig. 3)

アミラーゼ活性 1,610 IU/l の血清とその一連の希釈液に、ブルースターチ懸濁液 0.8 ml を加え、経時的に 620 nm における吸光度の変化を調べた。すべての試料で、吸光度は反応時間とともに上昇した。原血清では反応開始後 1 時間は急激に吸光度が上昇し、2~4 時間後にはほぼ一定になった。この成績より、最適反応時間は 3 時間と考えられた。

Fig. 3. Time course for the coloration at various amylase activity of sera.

5) 夾雑アミラーゼの洗浄回数の検討

高アミラーゼ活性 (2,784 IU/l) の対照血清を用いて、各抗血清による免疫沈降物を 2.5 ml のペロナル-ペロナル Na 緩衝液 (pH 8.6, μ 0.05) で洗浄を 6 回くり返し、上清中のアミラーゼ活性の減少から洗浄効果を調べた。免疫沈降物生成後の、最初の上清中のアミラーゼ活性は、各抗血清と被検血清の混合率が異なるために、抗 γ , α , μ , κ , λ の順に 158, 148, 319, 58, 640 IU/l であった。1 回洗浄時の上清では、それぞれ 0, 26, 4, 4, 10 IU/l と減少し、3 回洗浄時では全ての上清のアミラーゼ活性は認められなかった。したがって、免疫沈降物中の夾雑アミラーゼの洗浄は 3 回で充分であること

Table 1. Amylase activity in the immunoprecipitate from serum without macroamylase.

Patient	Serum amylase (I.U./l)	Amylase activity in immunoprecipitate (Absorbance at 620 nm)				
		γ	α	μ	κ	λ
M. S	3,100	0.000	0.016	0.005	0.000	0.024
Y. K	1,666	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000
T. R	1,611	0.015	0.028	0.013	0.007	0.014
K. D	1,390	0.000	0.017	0.003	0.001	0.000
H. Y	1,310	0.000	0.004	0.000	0.003	0.000
T. K	746	0.017	0.012	0.008	0.017	0.012
K. W	680	0.000	0.003	0.000	0.000	0.002
M. N	326	0.000	0.014	0.000	0.013	0.000
F. J	323	0.009	0.020	0.000	0.003	0.007
N. K	266	0.003	0.004	0.010	0.000	0.010
H. R	231	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000
T. K	225	0.017	0.004	0.006	0.002	0.000
I. N	180	0.023	0.024	0.019	0.027	0.022
A. R	80	0.013	0.000	0.006	0.003	0.011

Table 2. Amylase activity in the immunoprecipitate and identification of class and type of amylase-linked immunoglobulin in sera with macroamylase.

Patient	Age/ Sex	Diagnosis	Serum amylase (I. U./l)	Molecu- lar size of macro- amylase	Amylase activity in immuno- precipitate (Absorbance at 620 nm)					Identification of class-type of immunoglobulin	
					γ	α	μ	κ	λ	Present method	EIP
T. M	38/ f	Uterine myoma	1,344	7-19 S	0.146	0.897	0.017	1.739	0.330	GA- $\kappa\lambda$	A
K. T	64/m	Pericarditis +Pyothorax	254	7-19 S	0.180	0.314	0.026	0.191	0.287	GA- $\kappa\lambda$	neg.
I. T	71/m	Laryngeal car.	230	7-19 S	0.010	0.496	0.010	0.012	0.238	A- λ	neg.
A. T	49/m	Post transfusion hepatitis	1,193	7-19 S	0.029	0.340	0.028	0.033	0.853	A- λ	A
Y. K	58/m	Healthy	1,028	7-19 S	0.018	2.370	0.008	0.115	0.818	A- $\kappa\lambda$	A
I. F	32/ f	IgA nephritis	515	7-19 S	0.005	0.917	0.015	1.363	0.017	A- κ	A
I. A	50/m	ALL	1,521	7-19 S	0.015	1.185	0.015	1.081	0.010	A- κ	neg.
T. S	93/ f	Cerebral infarction	430	7-19 S	0.002	0.577	0.024	0.129	0.010	A- κ	A- κ
Y. I	58/m	Chro. hepatitis	716	19 S	0.022	0.104	0.017	0.489	0.023	A- κ	A
B. K	26/ f	Unknown fever	905	19 S	0.009	1.497	0.000	0.397	0.012	A- κ	A
T. I	73/m	Malig. Lymphoma	1,474	7-19 S	0.000	0.460	0.027	0.399	0.020	A- κ	neg.
K. S	66/m	Lung car. +Liver cirrhosis	499	7 S	0.317	0.014	0.020	0.256	0.009	G- κ	G- κ

EIP ; enzyme immunoelectrophoresis, neg ; not identified

がわかった。

2. 免疫混合法による同定成績

Table 1 に対照血清の免疫沈降物中のアミラーゼ活性 (吸光度) を示す。各特異抗血清による免疫沈降物中の

最大アミラーゼ活性は、抗 γ , α , μ , κ , λ の順にそれぞれ、0.023, 0.028, 0.019, 0.027, 0.024 と、すべて低値であり、総活性に関係なく沈降物中のアミラーゼは洗浄された。

Table 2 に 12 例のマクロアミラーゼ血症患者血清の各免疫沈降物中のアミラーゼ活性と、結合免疫 glob の同定成績を示す。酵素免疫電気泳動法では、結合免疫 glob の H 鎖、L 鎖とも同定できたのは 2 例、H 鎖のみ同定できたのは 6 例、残り 4 例は両鎖とも同定できなかった。一方、免疫混合法では全例で、両鎖とも容易に同定できた。症例 AT の抗 γ , μ , κ 抗血清による免疫沈降物中のアミラーゼ活性はそれぞれ、対照血清での最大値よりわずかに高値であったが、各抗血清による免疫沈降物間のアミラーゼ活性の相互判断から、アミラーゼ結合免疫 glob はないと判定した。

考 察

現在、多くの血中酵素が免疫 glob との結合により、高分子化して血中に存在することが知られている。それらのうち、アミラーゼ結合免疫 glob が最初に報告された⁵⁾。

Berk ら⁶⁾によって高分子化した血中アミラーゼはマクロアミラーゼと命名され、さらに多様なマクロアミラーゼの存在が報告されている。例えば 7S から 19S glob 間にわたる種々の分子サイズが認められ、その成因も免疫 glob との結合、免疫 glob 以外の血清蛋白や多糖体との結合、さらに酵素自身のポリマーも考えられている。

アミラーゼ結合免疫 glob の検出には、はじめて IgA と同定した Levitt ら⁷⁾は免疫吸収法を用いた。そして、しばらくこの方法が汎用された。この方法は、アミラーゼ結合免疫 glob を抗原減量法により免疫吸収させ、残存酵素活性の差から判定するが、添加血清量による補正が必要であり、酵素活性の差が小さい低活性のアミラーゼ結合免疫 glob の検出は困難であった。

微量試料で分析できる、酵素免疫電気泳動法による酵素結合免疫 glob の同定法は、アミラーゼより後に発見された LDH 結合免疫 glob の同定法として、すでに汎用されていた。アミラーゼ結合免疫 glob の同定にも、Cello gel 膜を支持体とした酵素免疫電気泳動法の有効さを菅野⁸⁾が報告して以来、この方法が主流となった。

しかし、酵素免疫電気泳動法でも結合免疫 glob が検出できない例が存在する。酵素免疫電気泳動法による今回の成績でも、H 鎖、L 鎖とも同定できなかった例が 4

例、L 鎖のみ同定できなかった例が 6 例も存在したが、免疫混合法では、全例の両鎖が同定できた。

免疫混合法の優れた成績は、大量の免疫沈降物を用い、夾雑アミラーゼの洗浄が完全で、感度のよい比色法により低活性の検出が容易にできることによると考えられる。

酵素結合免疫 glob の本態を究明していく上で、より多くのアミラーゼ結合免疫 glob 例の集積と解析が必要である。全国集計による屋形⁹⁾の報告に見られるように、結合免疫 glob の同定できなかった例の出現率は 9%と予想されているのに対し、実際には 230 例のマクロアミラーゼを疑われた例で結合免疫 glob が同定されたのは 67 例にすぎず、数多くの症例のマクロアミラーゼの結合様式が解析されていない。

少なくとも、7S 以上の大きな分子サイズのマクロアミラーゼについては、結合免疫 glob が検出できないことが他の成因を考える基点となり、ひいてはマクロアミラーゼの結合様式の多様性を考える根拠になっていると推測される。そのため、アミラーゼ結合免疫 glob の信頼性の高い検出法が必要である。

これらの点から、確実に、しかも手技的に容易な免疫混合法の有用性が大いに期待できる。

本論文の要旨は、第 33 回電気泳動学会総会で報告した。

文 献

- 1) Levitt, M.D. and Cooperband, S.R. : New Eng. J. Med., **278** : 474, 1968.
- 2) 菅野剛史他 : 生物物理化学, **19** : 361, 1975.
- 3) 戸沢辰雄, 太子 馨 : 生物物理化学, **26** : 243, 1982.
- 4) 太子 馨, 戸沢辰雄 : 臨床化学, **12** : 30, 1983.
- 5) Wilding, P., et al. : Ann. Int. Med., **60** : 1053, 1964.
- 6) Berk, J.E., et al. : New Eng. J. Med., **227** : 941, 1967.
- 7) Levitt, M.D., et al. : Ann. Intern. Med., **71** : 919, 1969.
- 8) 屋形 稔 : 酵素結合性免疫グロブリンの我が国での発症頻度ならびに分布に関する研究報告書 (昭和56年度) 文部省総合研究。菅野剛史班編 : 10, 1982.