電気浸透法による ALP 結合免疫グロブリンの検出*

戸沢 辰雄**・柴田 宏**

Summary

A simple and sensitive method is presented for detection of alkaline phosphatase (ALP)-linked immunoglobulin in human serum. This method is based on the empirical observation that ALP activity of ALP-linked IgG has been present on the anode side of IgG immunoprecipitin arc by immunoelectrophoresis.

The procedure is as follows; 3 μ l each of the serum sample and antiserum are applied on the commercial agarose gel film, and then electrosyneresis is carried out. After washing out free ALP in the gel film with saline solution containing 1.75 mM $MgCl_2$, the film is incubated with ALP staining reagents. ALP-linked immunoglobulin is detected by ALP activity on the immunoprecipitin line.

By this method, ALP-linked immunoglobulin was detectable even after ALP VI had disappeared by isoenzyme analysis. It was superior to conventional methods (enzyme-immunoelectrophoresis and enzyme-immunoprecipitin reaction in free liquid media) in sensitivity and simplicity of procedure. The present method was proved to be the most useful for the detection of ALP-linked immunoglobulin, especially for the screening test.

Key words; ALP-linked immunoglobulin, electrosyneresis.

緒 言

Alkaline phosphatase (ALP) 結合免疫グロブリン (免疫 glob) が血中に存在することを Nagamine & Ohkuma¹⁾ が初めて1975年に報告して以来、数多くの症例と研究が報告されている。ALP 結合免疫 glob は自己抗体の可能性が強く示唆されている²⁻⁵⁾が、まだ不明な点が多い。その中で、潰瘍性大腸炎との密接な関連性がすでに知られている。すなわち、Suzuki ら⁶⁾は潰瘍性大腸炎患者に特異なアイソザイム、ALP₆が高率に出現することを、三木ら⁷⁾は ALP₆が病期と関連して出現することを報告している。その後、加野ら⁸⁾は ALP₆が ALP と IgG の結合物であることを証明した。

ALP 結合免疫 glob の究明には、臨床面からの幅広い、詳細な研究が必要である。1982年の全国集計⁹⁾で、ALP 結合免疫 glob が検出された46例と同時に、疑われたが検出されなかった例が100例も報告されている。

この成績から、ALP 結合免疫 glob が検出できない例、または検索されていない例が、現実に数多く存在すると推定できる。

ALP 結合免疫 glob の検出には、免疫電気泳動法¹⁾が汎用されているが、他に免疫固定法¹⁰⁾、免疫混合法¹¹⁾、そして Protein A により IgG を結合させる方法¹²⁾も報告されている。これらの方法には一長一短があり、確実に簡便な方法が望まれる。

著者らは、免疫電気泳動法により検出された ALP 結合免疫 IgG の自験例、および報告例では、ALP 活性が IgG の免疫沈降線上の陽極側に限られて認められていることに着目した。そして、市販アガロースフィルムを用いて電気浸透法 (ES 法) による、ALP 結合免疫 glob の検出を試みた。その結果、この方法の簡便さと優れた検出感度を認めた。

* Detection of ALP-linked immunoglobulin by electrosyneresis.

** Tatsuo Tozawa, Hiroshi Shibata, 兵庫医科大学病院中央検査部。
(受付 1983年5月21日, 受理 1983年6月10日)

材 料

試料は, polyacrylamide gel (PAG) disc 法¹³⁾によるアイソザイム分析で ALP₆ と, Sephadex G-200 カラムゲル透過法で高分子化 ALP を認め, 寒天免疫電気泳動法で ALP 結合 IgG を検出した 6 例の患者血清を用いた. 対照には, ALP 結合免疫 glob が存在しない種々の患者血清を用いた.

試薬および方法

1. 抗血清および支持体

抗血清は Dakopatts の抗 γ (力価 1,200), 抗 α (力価 400), 抗 μ (力価 600), 抗 κ (力価 500), および抗 λ (力価 250) を用いた. 支持体は Corning 社の Agarose film, special を使用した.

2. ALP 染色

p-Toluidinum-5-bromo-3-indolyl phosphate を基質とした, 和光純薬工業社の ALP アイソザイム染色試薬を使用した.

3. ES 法による ALP 結合免疫 glob の検出

1) 電気泳動: アガロースフィルム上の陽極側に抗血清, 陰極側に被検血清を 6 mm 間隔で 3 μ l ずつ塗布し, ペロナル緩衝液 pH8.6, μ 0.06 を用い, 150V 定電圧で氷冷下, 30分間電気泳動した.

2) 夾雑 ALP の洗浄: 泳動後, アガロースフィルムを 1.75 mM の $MgCl_2$ を含む生理的食塩水に48時間浸して洗浄した.

3) ALP 染色: 洗浄を終えたアガロースフィルム上に基質染色液をしみこませた Separax 膜 (轉常光) をはりつけ, 37°C の湿潤箱中で4時間反応させた. 微量活性の場合は反応時間を適宜延長した. 反応後, アガロースフィルムを 1%酢酸水溶液に浸して反応を停止させた.

4) ALP 結合免疫 glob の判定: Separax 膜をはったまま観察した免疫沈降線上の ALP 染色の有無から結合免疫 glob を判定した.

4. 他の ALP 結合免疫 glob の検出法

免疫電気泳動法はアガロースフィルムを使用し, ALP 染色は方法 3-3) で行った.

免疫混合法は太子・戸沢の方法¹¹⁾で行った. Protein A に IgG を結合させる方法は Bauer ら¹²⁾に準じた方法¹¹⁾で行った.

5. アイソザイム分析

Davis ら¹³⁾の方法に従い, 7.5% の PAG を用いた disc 電気泳動法で行った. 直径 0.5 cm $\times$ 長さ 9.5 cm のゲル管を用い, 3 mA/ゲル管, 50分間通電し, 試薬 2

で ALP 染色した.

成 績

1. ALP 結合免疫 glob の電気的易動度

Fig. 1 は, 試料とした 6 例の ALP 結合 IgG 例の免疫電気泳動法による ALP 結合 IgG の検出成績である. ALP 染色は全例, 免疫沈降線上の fast- γ 位に局限して認められた.

Fig. 1. ALP staining on immunoprecipitin line by using patients sera (P1-P6).

A and B: immunoprecipitin lines stained for protein.

Fig. 2. Electrosynthesis on agarose gel film.

Serum sample and anti-serum were applied at different intervals of 6, 8, 10 and 12 mm. P: Protein staining. A: ALP staining.

2. ES 法による ALP 結合免疫 glob の検出条件の検討

1) 抗血清と被検血清の塗布間隔: Fig. 2 は, ALP 結合 IgG 例の患者血清と抗血清を異なる間隔で塗布し, 泳動後, 洗浄を終えたアガロースフィルム上の免疫沈降線の蛋白染色と ALP 染色である. 塗布間隔が長くなるにつれ, 免疫沈降物も ALP 活性も減少した. この成績から, 塗布間隔を 6 mm にした.

2) 夾雑 ALP の洗浄時間: Fig. 3 は, ALP 結合 IgG 例; P と対照例として, 正常域 ALP 活性 (1.7 BLU) の患者; N, ALP₂ が増加した高 ALP 活性 (20.8 BLU) の肝炎患者; H, および ALP₂ の増加, ALP_{1,5} と lipoprotein-X が出現した高 ALP 活性 (17.8 BLU) の閉塞性黄疸患者; O の血清を泳動したアガロースフィルムを, 異なる時間で洗浄した後, ALP 染色した成績である. 患者 P の ALP に患者 O の夾雑 ALP が重なっている.

患者 P と N では 2 時間の洗浄で, 患者 H では 48 時間の洗浄で夾雑 ALP は認められなくなった. 患者 O では 72 時間の洗浄でも血清塗布位置から免疫沈降線にわたる夾

雑 ALP が残っていた. 患者 P の IgG に結合する ALP は 72 時間の洗浄でも明瞭に染色され, その染色は免疫沈降線に完全に一致していた. IgG に結合する ALP と夾雑 ALP は染色の位置的な差から判別できた. また, 患者 O の ALP は 6 日間の洗浄でも残存し, 長時間の洗浄が ALP 結合免疫 glob の検出感度をよくする効果は少ないと考えた.

以上の成績から, 高度の閉塞性黄疸例を除く高 ALP 血症の夾雑 ALP を完全に除去できる 48 時間を洗浄時間と決めた.

3) ALP 染色の反応時間: 反応時間を変化させて染色した ALP 結合 IgG 例の ALP と対照例の閉塞性黄疸患者の洗浄し残った夾雑 ALP を観察した. ALP 結合 IgG 例では 1 時間の反応で明瞭な発色がみられ, 反応時間とともに発色は増強した. 対照例の夾雑 ALP も反応時間とともに発色が増強したが, 1 時間の反応では発色は微弱であった.

この成績から, 残存する夾雑 ALP の発色が微弱な 1 時間後に, ひとまず ALP 染色を観察し, 免疫沈降線上の ALP 染色から, ALP 結合免疫 glob を判定した.

Fig. 3. Effect of deproteinization period on demonstrating ALP activity on immunoprecipitin line.

Deproteinization was performed with saline solution containing 1.75 mM Mg Cl₂. O: control patient with lipoprotein-X, P: patient with ALP-linked IgG, N: normal control, H: control patient with high ALP activity.

Fig. 4. Effect of ALP-staining period on demonstrating ALP activity on immunoprecipitin line.

Patient with ALP-linked IgG (κ, λ) and control patient with lipoprotein-X.

その後、さらに反応を続け反応開始後4時間目に再度、ALP 染色を観察し、1時間の反応では発色が明白でなかった微量活性の ALP 結合免疫 glob を判定した。

3. 抗原抗体容量比

優れた検出感度をえるには、被検血清と抗血清を最適比の容量で塗布することが好ましい。しかし、塗布量には限界があり、塗布間隔を 6 mm とする条件では 5 μ l が最大であった。

実際には、被検血清と抗血清を 3 μ l ずつ塗布した場合、最適比をはずれても ALP 結合免疫 glob を検出できた。ALP 結合 IgG- κ , λ 例 (IgG; 1,670 mg/dl, 総免疫 glob; 2,880 mg/dl) の血清と 128 倍までの希釈血清の免疫沈降線上の ALP 染色は、IgG で 64 倍希釈血清 (IgG; 26 mg/dl) まで、 κ および λ では 32 倍希釈血清 (総免疫 glob; 90 mg/dl) まで認められた。また、多クローン性高免疫 glob 血症 (IgG; 3,200 mg/dl, IgA; 1,200 mg/dl, IgM; 540 mg/dl, 総免疫 glob; 4,940 mg/dl) の患者血清と一連の希釈血清の免疫沈降線は、IgG が 128 倍希釈血清 (IgG; 25 mg/dl) から、IgA が 128 倍希釈血清 (IgA; 9 mg/dl) から、IgM が 16 倍希釈血清 (IgM; 34 mg/dl) から原血清まで、 κ , λ が 64 倍から 2 倍希釈血清まで (総免疫 glob; 77~2,500 mg/dl), 明白に認められた。

以上の成績から、免疫沈降線の形成があれば、ALP 結合免疫 glob の検出は可能と考えられた。そして、極端に高または低免疫 glob 濃度でない限り、被検血清ないしは抗血清の希釈や濃縮、または塗布量の増量は特に必要ないと考えられた。

4. 検出感度

Table 1 は、病状経過中に ALP₆ が漸減し、そして消失した潰瘍性大腸炎患者の血清中の ALP 結合 IgG を、7~14 病日ごとに、種々の方法で検出した成績である。ALP₆ が認められていた10月14日までは、全ての方法で ALP 結合 IgG を検出できた。ALP₆ が消失した10月21日には免疫電気泳動法で、11月4日には免疫混合法で検出できなくなった。12月22日には ES 法でも検出できなくなったが、Protein A 法では翌年1月5日まで検出できた。

ALP 結合 IgG の検出感度は Protein A 法が最も優れていたが、Protein A に結合する免疫 glob は IgG_{1,2,4} に限られ¹⁴⁾、この方法では IgG のタイプも同定できない。

したがって、ALP 結合免疫 glob の同定法としては、ES 法の検出感度が最も優れていた。

Table 1. Results of serial detection of ALP-linked IgG in serum of a patient with ulcerative colitis by various techniques.

Date	ALP 6 isoenzyme (PAG- DISC)	Detection for ALP-linked IgG			
		IEP	IPR	Protein A	ES
81/ 7/11	+	+	+	+	+
81/ 9/26	+	+	+	+	+
81/10/14	+	+	+	+	+
81/10/21	-	-	+	+	+
81/10/26	-	-	+	+	+
81/11/ 4	-	-	-	+	+
81/11/11	-	-	-	+	+
81/11/25	-	-	-	+	+
81/12/22	-	-	-	+	-
82/ 1/ 5	-	-	-	+	-
82/ 2/ 2	-	-	-	-	-

IEP: immunoelectrophoresis, Protein A: immunosorbent by using Protein A-Sepharose CL-4 B, IPR: immunoprecipitin reaction in free liquid media and ES: electrosynthesis.
+ : detected, - : not detected.

考 察

ALP 結合免疫 glob と自己免疫機序が濃厚に関与している潰瘍性大腸炎の関連性は、ALP 結合免疫 glob の高い出現頻度⁹⁾と病期と関連した消長⁷⁾が知られている。著者ら¹⁵⁾は、偽ポリボーグス型の潰瘍性大腸炎患者に ALP 結合 IgG が検出されるという、臨床病型との関連性も見出した。潰瘍性大腸炎には LDH 結合免疫 glob も高率に出現すること^{16,17)}、さらに、CK 結合 IgG が検出された例¹⁸⁾も報告され、潰瘍性大腸炎は酵素結合免疫 glob の研究に最適の疾患である。そして、潰瘍性大腸炎と関連する酵素結合免疫 glob の中で関連性が最も高い ALP 結合免疫 glob の研究は、酵素結合免疫 glob の全体の究明の端緒になることが期待できる。そのためには、簡便で確実な ALP 結合免疫 glob の検出法が望まれる。

ALP 結合免疫 glob の検出には免疫電気泳動法が一般的である。微量活性の検出には免疫固定法¹⁰⁾と免疫混合法¹¹⁾が報告されているが、免疫固定法には簡便性に、免疫混合法には経済性に欠点があった。ES 法には、両法の欠点もなく、検出感度は免疫混合法より優れていた。

ES 法の長所は、①優れた検出感度、②被検血清と抗血清の必要量が少量、③簡便性、④後述する理由からマススクリーニング法として最適であること。短所は、洗浄しきれない夾雑 ALP が残り、判定しにくい例があることである。夾雑 ALP は免疫沈降線に一致する染色でないことから判別できるが、夾雑 ALP に共存する微量活性の ALP 結合免疫 glob の検出は不可能である。これは支持体を使う方法で共通する問題であり、完全な夾雑 ALP の洗浄が今後の課題である。

この様な例での検出は、支持体を使わない免疫混合法と Protein A 法が有効であるが、Protein A 法は同定法としては完全でない。

著者らは、ES 法により、10,000 例のスクリーニングから 30 例 (0.3%) の ALP 結合免疫 glob (IgG 例; 26, IgA 例; 4) を検出した。従来、ALP 結合免疫 glob のスクリーニングはアイソザイム分析で行なわれている。そして、その出現頻度は 0.1% 前後とされることから、ES 法の高い検出感度が証明された。また、ALP 結合 IgA は ALP₀ を形成せず ALP₃ と重複し、アイソザイム分析では検出が困難なことが判明した。

ES 法では、陰極側にだけ泳動される ALP 結合免疫 glob があれば、検出できない。ES 法の根本的な条件である、ALP 結合免疫 glob は陽極側に泳動されるという経験的な事実を確かめるために、ES 法とアイソザイム法で、前記 10,000 例とは別の 1,500 例について ALP 結合免疫 glob を検索した。ES 法で IgG、IgA 例を各 1 例ずつ検出したが、アイソザイム法では ES 法で検出した IgG 例を検出したただけであった。この成績から、陰極側に泳動される ALP 結合免疫 glob は存在しても極く少ないと推定したが、今後とも検討すべき課題である。

結 語

市販アガロースフィルムを用いた電気浸透法による

ALP 結合免疫 glob の検出・同定法を検討した。この方法は簡便で、微量試料および抗血清で高い検出感度がえられる優れた方法である。

本論文の要旨は第32回電気泳動学会春季大会で報告した。

文 献

- 1) Nagamine, M. and Ohkuma, S.: Clin. Chim. Acta, **65**: 39, 1975.
- 2) 菅野剛史: 生物物理化学, **21**: 1, 1977.
- 3) De Broe, M.E., et al.: Ann. Int. Med., **90**: 30, 1979.
- 4) Crofton, P.M., et al.: Clin. Chim. Acta, **111**: 257, 1981.
- 5) Crofton, P.M.: Clin. Chim. Acta, **112**: 33, 1981.
- 6) Suzuki, H., et al.: Ann. N.Y. Acad. Sci., **166**: 811, 1969.
- 7) 三木一正他: 日消誌, **73**: 162, 1976.
- 8) 加野象次郎他: 生物物理化学, **20**: 325, 1977.
- 9) 加野象次郎: 生物物理化学, **26**: 423, 1982.
- 10) 須藤加代子他: 生物物理化学, **23**: 145, 1979.
- 11) 太子 馨, 戸沢辰雄: 臨床化学, **12**: 30, 1983.
- 12) Bauer, K., et al.: Clin. Chem., **26**: 297, 1980.
- 13) Davis, B.J.: Ann. N.Y. Acad. Sci., **121**: 404, 1964.
- 14) Kronvall, G. and Williams, R.C.: J. Immun., **103**: 828, 1969.
- 15) 戸沢辰雄他: 第24回日本消化器病学会秋季大会講演予報集, 281; 1982.
- 16) Leroux-Roels, G.G., et al.: J. Lab. Clin. Med., **97**: 316, 1981.
- 17) 戸沢辰雄他: 日消誌, **78**: 132, 1981.
- 18) 西村恵子他: 生物物理化学, **26**: 288, 1982.