〔原 著〕

血清シアロプロテインの電気泳動による分画*

—— 特に M 蛋白血症例に関して ——

三宅洋左**・三浦隆雄**・宮本 京**

Summary

A simple method for fractionation and detection of serum sialoproteins is described. The method is based on the combination of cellulose acetate membrane electrophoresis and sialic acid staining using enzyme reactions of neuraminidase NANA-aldolase, pyruvate oxidase and peroxidase.

The results obtained are as follows:

1) Total serum sialic acid in 52 healthy Japanese ranged from 53 to 73 mg/dl, and serum sialoproteins were separated into fractions with α_1 -, α_2 - and β -globulin mobilities, the relative contents (mean $\pm$ 2SD) being 39 ± 14 , 40 ± 16 and $20 \pm 14\%$, respectively.

2) Another band of sialoprotein was found in position of the electrophoretic mobility of M-protein in some cases of M-proteinemia (IgG, IgA, IgM and B-J).

The method may be useful for screening test of qualitative analysis of serum sialoproteins.

Key words: serum sialic acid, serum sialoprotein, M-proteinemia.

はじめに

近年、血清シアル酸（以下 SA と略す）は、主に悪性腫瘍や急性炎症性疾患で増加することが知られ注目されている。血清中の SA は free SA¹⁾として少量存在するが、大部分は α_1 -acid glycoprotein, α_1 -antitrypsin, haptoglobin などの多くの糖蛋白と結合した形、すなわち、sialoprotein（以下 SP と略す）として存在している。したがって、血清中 SA を測定する事は、SP の増減をみることになる。著者らは、この SA のうちその大部分を占める SP を Sugahara²⁾らの血清中 total SA 測定のための酵素法と電気泳動法を組合せて、比較的簡便に分画、染色する方法を試みた。さらにこの方法を用いて、M 蛋白血症例のスクリーニングを行い、若干の興味ある成績を得たので報告する。

対象と方法

1. 対 象

国立東京第二病院に入院または、外来通院中の患者および供血者の血清を用いた。

2. 実験方法

1) 血清 total SA 量は Sugahara²⁾らの neuraminidase, NANA-aldolase, pyruvate oxidase, peroxidase の酵素系を用いた極東製薬、シアル酸テストを用いて測定した。

2) SP の分画染色法

材料および装置：電気泳動槽；ヘレナ社チャンバー、支持体；ヘレナ社タイタン III、イソ・ビス、試料の塗布；ヘレナ社サンプルウエルプレートおよびアプリーケーター、試料の濃縮；アミコン社ミニコン B-15、バッファライザー；ヘレナ社バッファライザー、定電流

* Fractionation of serum sialoproteins by electrophoresis — In relation to abnormal bands seen in M-proteinemia —

** Yosuke Miyake, Takao Miura, Kei Miyamoto, 国立東京第二病院臨床検査科
(受付 1984年3月6日, 受理 1984年4月9日)

定電圧装置; (株) 常光 PAV-50, デンシトメーター; ヘレナ社 Quick Scan II, インキュベーター; イスズ社 FR-BS.

試薬: 電気泳動槽用および支持体浸潤用バッファー; ヘレナ社, エレクトラ HR バッファー, 分画用バッファー; 5 mM $MgCl_2$ を含む 1 M リン酸バッファー (pH 5.2), 固定液; 21 mM N-ethyl-N-(β hydroxyl)-M-toluidine を含むリン酸 1 ナトリウム飽和溶液, 発色液; reagent A, 極東製薬 (neuraminidase, 4-aminoantipyrine を含む), reagent B, 極東製薬 (NANA-aldolase, pyruvate oxidase, peroxidase, thiamine pyrophosphate, flavin adenine dinucleotide を含む) を分画用バッファー 1.2 ml にて溶解した。

SP 分画の測定は以下のごとく行った。すなわち, タイタン III, イソ-ピスを使用する 30 分以上前に浸潤用バッファーにて浸潤し, ミニコン B-15 にて 3 倍に濃縮した血清 0.6 μ l をサンプルウェルプレートとアプリケーションターにより塗布した。血清の濃縮を簡便に実施したい場合は, サンプルウェルプレート上で乾燥濃縮した血清も使用可能である。支持体 1 cm 当り 1 mA の電流をアイスノン冷却下で 30 分通電した。染色用トレイの中心付近に, 37°C に加温してある発色液 0.5 ml を滴下し, その約 1 cm 上から泳動後の支持体を落下させ, 試薬が均等に支持体にいきわたった後 (約 10 秒) 支持体を裏返し, トレイのふたをしたのち, 37°C で 15 分間インキュベートした。染色された支持体の余分の染色液を固定液で浸潤させた沓紙にて除去し, ドライヤーで直ちに乾燥した。デンシトメトリーは 545 nm で行った。保存は染色された支持体 2 枚を染色されている方を内側にして, セロテープにて空気を完全に遮断するように貼り合わせて, 暗所に保存した。

3) M 蛋白の定量はヘキスト社の抗 IgG-LN, 抗 IgA-LN, 抗 IgM-LN 血清を用いペーリング社のレーザーネフェロメーターにて測定した。

4) M-蛋白の分子量の推定は, 薄層ゲルろ過法によった。1 部はセファデックス G 200 カラムクロマトグラフィーにより 7 s 分画を採取し, 超遠心機 Hitachi 282 を用いた超遠心分析法により測定した。

結 果

健常者の SP 分画は, α_1 -, α_2 -, β -globulin 位の 3 本のバンドに分画され, それぞれを SA-1, SA-

2, SA-3 とした。M 蛋白血症例では, M 蛋白の易動度に一致して染色されるバンドが出現した (以下 SA-M と略す)。

Total SA 値 99 mg/dl の検体を 14 回測定した結果, 各分画の平均値, 標準偏差および変動係数は, SA-1 では 44%, 2.8%, 6.3%, SA-2 では 45%, 2.0%, 4.4%, SA-3 では 10%, 3.1%, 31% の成績であった。

Total SA 値が 53~73 mg/dl の範囲にあった健常人 52 名の SA-1, SA-2, SA-3 の平均値 $\pm 2 \times$ 標準偏差は, それぞれ 39 ± 14 , 40 ± 16 , 20 ± 14 % であった。

M 蛋白血症例での SP 分画像は Fig. 1 に IgA 1 例, IgG 2 例, IgM 1 例, B-J 1 例とコントロール 1 例の SP 分画像と蛋白分画像を示したごとく, case 5 の IgG と case 3 のコントロールを除いた 4 例は M 蛋白の易動度と一致して SA-M の出現がみられた。

検討した M 蛋白血症 30 例を多発性骨髄腫 (以下 MM と略す) と本態性 M 蛋白血症 (以下 EMP と略す) とに分けて SA-M バンドの出現例を Table 1 に示した。IgG の MM では 10 例中 1 例に SA-M が

Fig. 1. Electrophoretograms of normal and myeloma sera on cellulose acetate membrane.

Upper panel: sialic acid staining.

Lower panel: protein staining.

Table 1. Incidence of SA-M in multiple myeloma and essential M-proteinemia.

	SA-M positive (13 cases)	SA-M negative (17 cases)
MM	IgG 1	9
	IgA 5	1
	IgD+B-J 1	—
	IgA+B-J 1	—
	B-J —	1
EMP	IgG 2	2
	IgA —	2
	IgM 3	2

MM: multiple myeloma

EMP: essential M-proteinemia

Fig. 2. M-protein levels in various types of M-proteinemia.

Parentheses show that the data were based on the concentrations calculated from protein fractions.

Fig. 3. Ultracentrifugation patterns of IgG obtained by Sephadex G-200 chromatography in a case of IgG myeloma.

The photographs were taken after 9, 18 and 24 min at 50,000 rpm by Hitachi 282.

出現し、EMPで4例中2例、IgAのMMでは6例中5例にSA-Mが出現し、EMPでは2例とも出現がみられなかった。

M蛋白量とSA-M出現の関係はFig. 2に示したごとく、M蛋白量とSA-Mの出現頻度との間には特定の関係はなく、この結果はとくにIgGの場合に明瞭であった。

Total SAが98mg/dlのIgG MMでSA-Mが34%を占めた症例の血清をセファデックスG200カラムクロマトグラフィーで分画し、7s分画を採取、精製し

た試料につきIgGの分子量を超遠心法により測定した。この症例のIgGは、1ピークを示し、沈降定数6.8sで、分子量約16万と計算された。

また、Fig. 4のごとくtotal SAとSA-Mの間には、IgAの症例に多くみられたSA-Mの出現した例においても、明瞭な関係はみられなかった。

考 察

SPの分画操作において、酵素反応系を用いているため、発色の最適条件を得るのにpH調整の工夫が必

Fig. 4. Relationship between total SA and SA-M levels in M-proteinemia.

要であった。すなわち、pH 5.2 のリン酸バッファーで溶解した酵素試薬を pH 8.6~9.0 の支持体上に添加することにより、反応系の至適 pH 7.2 に調整することができた。また、最終的な発色物質が水溶性の赤紫色キノン色素であるため、発色後は、色素が拡散しない乾燥固定する必要があった。

分画の再現性について見ると、SA-1, SA-2, SA-3 の標準偏差はそれぞれ 2.8, 2.0, 3.1% と比較的良好であったが、SA-3 の変動係数が大であった原因は、その濃度が 10% と低値であったためと考えられる。

Schultze³⁾ らは γ -glob の SA 含有量は、IgG 0.3%, IgA 1.8%, IgM 1.3% と相当大きな値を報告しているが、免疫 glob は、その不均一性のために、 γ 位に広く泳動され本分画法では SA の検出ができなかったものと思われる。一方、逆に M 蛋白血症例では、M 蛋白が狭い範囲に集束しているため、SA-M として出現する場合があると考えられる。

大谷⁴⁾ らが報告しているように IgA は、 α_1 -antitrypsin と高率に結合しているため、IgA に出現した SA-M は α_1 -antitrypsin である可能性が大きい。そのため、IgA 自体の SA に関しては測定できず、今後の課題とした。IgG 例において、SA-M が顕著に出現した例に遭遇したので、特別な IgG であるか否かをみるため、超遠心法により分子量を測定したところ、6.8s の IgG

であり、他の蛋白との結合により染色されたことは否定され、SA 含有量の多い IgG と思われた。

松崎⁵⁾ らは、肝硬変症群の total SA は、正常群のみではなく脂肪肝群、慢性肝炎群に有意に低値であり、これは SP の産生力低下を意味するとした。Bordas⁶⁾ らは radial immunodiffusion と electroimmunodiffusion により、肝硬変症において α_1 -acid glycoprotein に著しい脱シアル化がおこっていることを報告している。一方、M 蛋白については、脱シアル化されたものか否かは不明であるが、上原⁷⁾ らは SA の少ない IgG が MM にみられることを報告しており、著者らの実施した SP 分画法でも Table 1 で示したごとく、IgG においては MM における SA-M 出現は 10 例中 1 例で同様の傾向があった。さらに、少数例ではあったが、B-J, IgM にも SA の少ない例があったこと。Fig. 2 で示したごとく、M 蛋白量と SA-M との間に一定の関係がなかったことにより、SA の少ない免疫 glob が存在していることが示唆された。

結 論

血清シアロプロティン分画を電気泳動で分離し、酵素反応系を用いて染色することができた。健常者のシアロプロティン分画は、 α_1 -, α_2 -, β 位にそれぞれ SA-1, SA-2, SA-3 と三つの分画に分離されたが、その他に M 蛋白血症例中に M 蛋白が染色されるものが IgG, IgA, IgM, B-J の各々に見出された。

この方法は、比較的簡単に実施することができるので、シアル酸の質的検索のためのスクリーニング法として有用であると思われる。

文 献

- 1) Hammond, K.S. Papemaster, D.S.: Anal. Biochem. **74**: 2, 1976.
- 2) Sugahara, K. et al.: Clin. Chim. Acta, **108**: 3, 1980.
- 3) Shultze, H.E., Hermans, J.F.: Molecular Biology of Human Proteins. Vol. 1. Elsevier, Amsterdam, 1966, p.176~p.232.
- 4) 大谷英樹他: 生物物理化学, **19**: 5, 1975.
- 5) 松崎松平他: 日本消化器病学会, **78**: 12, 1981.
- 6) Bordas, M.C. et al.: Clin. Chim. Acta, **125**: 3, 1982.
- 7) 上原一之他: 生物物理化学, **26**: 4, 1982.