〔原 著〕

LDH結合免疫グロブリンの性状：特に結合 免疫グロブリン産生の様式について

岡野こずえ*・天田栄治*・古旗敏文*

田中政彦**・鈴木輝彦**・三浦雅一***

松崎広子***・坂岸良克****・菰田二一****

SUMMARY

Reconstituted LDH-immunoglobulin properties of LDH linked immunoglobulin complexes found in sera of 6 cases were studied. It appeared that thier immunoglobulin reconstituted to all of purified LDH isozyme except for LDH 1.

On IgA cases of these, the LDH-immunoglobulin complexes are interacted clearly to 5'-AMP affinity column, whereas the abnormal isozyme pattern could not normalized by addition of NADH₂. On the other hand, IgG case, there was some of fractions having no affinity to 5'-AMP affinity column and normalization of the abnormal LDH isozyme pattern by addition of the NADH₂. From the results, it was suggested that the immunoglobulin binding sites on LDH molecule were different in IgA and IgG complexes to one another.

Key words : LDH linked immunoglobulin, reconstituted LDH-Ig, NADH₂ dissociation, affinity to 5'-AMP

はじめに

Lactate dehydrogenase (LDH, EC.1.1.1.27) の isozyme 分析をはじめて以来、当病院内でも1981年に isozyme anomaly が数例見出されている。現在 1例、それ以降日常検査において、いわゆる LDH isozyme anomaly の成因については、サブユニット欠

損^{1, 2)}、サブユニットの変異³⁾、腫瘍産生⁴⁾、不活化因子の存在^{5, 6)}、免疫グロブリン結合型高分子 LDH⁷⁾などに区別されている。

長嶺⁸⁾の集計に従えば、LDH 結合型の免疫グロブリン症例（以下 LDH-Ig と略す）は、高い頻度で見出されている。これらの主たる生化学的性状については、既に多くの研究者⁹⁻¹¹⁾によって明らかにされ、免疫グ

Some properties of LDH linked immunoglobulins : a possible mechanism for the linked immunoglobulin production.

* Kozue Okano, Eiji Amada and Toshifumi Furuhashi, 埼玉医科大学附属病院・中央検査部

** Masahiko Tanaka and Teruhiko Suzuki, 埼玉医科大学附属病院・第2内科

*** Masakazu Miura and Hiroko Matsuzaki, 東京警察病院・中央検査部第1部

**** Yoshikatsu Sakagishi and Kozue Okano, Central Clinical Laboratory, Tsugikazu Komoda 埼玉医科大学・生化学教室

Correspondence address : Saitama Medical School, Irima-gun, Saitama 350-04, Japan.

(受付 1985年12月23日, 受理 1986年1月28日)

ロブリンの Fab 部に LDH が結合することを井本ら¹²⁾が証明したことは、生体が LDH に対する自己抗体として免疫複合物を作り、結果として LDH-Ig が存在することが考えられる。もしそうであるなら、この抗体が polyantigenic な抗体か、それとも oligoantigenic なものかが重要なポイントとなると思われる。

今回我々は、従来から報告のある抗原認識説に沿って実験を行い、この免疫複合体の成因が LDH のサブユニットを認識していると思われる成績を得たのでここに報告する。

材料および方法

1) 試料に供した LDH isozyme anomaly 血清は埼玉医大の入院および外来患者の中で日常検査として行われている血清 LDH isozyme の成績の中から見出されたものである。

2) 血清 LDH の活性測定は、Technicon 社の SMAC III を用い、Lactate を基質とし、NAD の吸光度の減少から測定した¹³⁾。LDH isozyme の分画法と酵素染色は、コーニング社のアガロースフィルムを用い、和光純薬製の染色用キットで検出した。

3) LDH-Ig 複合体からの免疫グロブリンの解離は、菅野ら¹⁴⁾の方法に従って酸処理して LDH 活性を完全に失活させ、これを中和後、処理血清に精製 LDH を添加し、30℃、3 時間以上結合させ実験に供した。

4) LDH 1~LDH 4 については、ヒト赤血球を試料とし、赤血球の homogenate を 5'-AMP affinity chromatography, DEAE chromatography によって精製した¹⁵⁾。LDH 5 については、ヒト肝臓から精製し、

肝臓の homogenate を 40~70% の硫酸で分画し、5'-AMP affinity chromatography, DEAE chromatography により精製した¹⁵⁾。精製した LDH isozyme 標品の比活性は、それぞれ LDH 1=509,942, LDH 2=835,347, LDH 3=613,810, LDH 4=30,880, および LDH 5=182,333.8 単位/mg タンパクで、使用時希釈して用いた。

5) 酵素免疫電気泳動は、コーニング社のアガロースフィルムを用い、泳動後の処理は、長嶺¹⁶⁾の方法に従って、和光純薬製の LDH 染色キットにて染色した。抗ヒト全血清、抗 IgG、抗 IgA、抗 IgM については、和光純薬製(綿羊)、抗 Kappa、抗 Lambda、抗 Secretory component は、Dako patts 社製、抗 C₃、抗 Clq については Hoechst 社製の標品を使用した。

6) 免疫グロブリンの定量は、レーザーネフェロメトリ法¹⁷⁾により測定した。

7) LDH-Ig の、5'-AMP/セファロースに対する親和性は、Broderius と Mosbach の方法¹⁸⁾に従った。

結 果

1. 血清 LDH isozyme の anomaly pattern

今回使用した LDH-Ig の LDH anomaly pattern は、Table 1 に示したように、症例 1, 2, 3, 5, 6, については、全て Heavy chain は IgA, Light chain は Kappa の免疫グロブリンと結合し、症例 4 については、Heavy chain は IgG, Light chain は Kappa および Lambda 両者に結合している症例であり、各々の LDH 総活性は、正常より若干高いものから中高値に分布していた。免疫グロブリンの各抗体価は、結合免疫グロブリンが IgG の症例 4 を除いてほぼ正常値で

Table 1 Cases with immunoglobulin-bound lactate dehydrogenases

Case	Age	Sex	Clinical diagnosis	LDH activity (U/ml)	Heavy chain	Light chain	Content (mg/100ml) of			
							IgG	IgA	IgM	
1	K.K.	34	F	SLE & Gastric ulcer	606	IgA	κ	1291	303	209
2	Y.S.	44	F	Healthy	468	IgA	κ	normal	normal	normal
3	Y.W.	54	M	Myocard infarction	438	IgA	κ	—	—	—
4	Y.M.	80	M	Gallstone	323	IgG	$\kappa \cdot \lambda$	2850	531	126
5	G.O.	65	M	Anemia	230	IgA	κ	1448	275	56
6	M.S.	48	M	Chronic hepatitis	300	IgA	κ	1824	442	118

Abbreviations: F, female; M, male; SLE, systemic lupus erythematosus.

あった。Fig. 1 (a)に示すように、LDH isozyme pattern は、症例1のK.K.の場合、LDH 3より移動度の遅いバンドを主画分としていて、LDH 2からLDH 4までに至る広く tailing したバンドが認められ、症例2のY.S.の場合は、Fig. 1 (b)に示すように、薄いLDH 1のバンドとLDH 2からLDH 4領域に広がる broad なバンド、その他図には示さないが、症例4のY.M.はLDH 2領域からLDH 5に広い範囲に広がる broad なバンドが見られた。なお、この症例4については、1981年から免疫グロブリンとの結合が認められていて、経過的には当初サブユニット欠損を思わせる、LDH 5領域のみに限局したバンドが、しだいにLDH 1領域にも isozyme 活性バンドが検出できるように、LDH anomaly pattern の変化が認められている。症例3, 5, 6もほとんどが他のIgA結合LDH例^{19, 20)}のような、LDH 2~LDH 4領域にLDH isozyme pattern の異常が見られた。

2. 再結合実験

本実験は、LDH-Ig complex を酸性下において解離し、中和後精製LDHと再結合させた。Fig.1(a)は、症例1のK.K.で、精製LDH添加後の isozyme pattern は、LDH 3領域に若干の tailing が観察されるのみで

あった。Fig. 1 (b) は症例2のY.S.で、同様にLDH 2およびLDH 3との結合に若干の移動度の違いと tailing 現象が認められた。ここで特に興味ある現象は、いずれの症例においてもLDH 5の酵素活性が患者由来免疫グロブリンの添加により著明に低下したことである。しかし、他の画分との再結合は、移動度の差異のみからは、判定し難いので、更にこのLDH isozyme との再結合を免疫電気泳動後の沈降線を酵素染色させることにより再確認した。Fig. 2 (a)からいずれの患者由来の免疫グロブリンもLDH 1とは結合が認められなかったが、LDH 2との結合は明らかに認められた。また、Fig. 2 (b)より、これらの症例の免疫グロブリンは、LDH 3との結合は認められ、LDH 4との結合では、4℃で1週間以上保存した検体では、沈降線の染色が困難であったが、2~3日保存の新しい検体では、Fig.2(c)のように明らかにLDH 4との結合が認められ、さらにLDH 5との結合も認められた。

一方、LDH-Igの成因については、これ迄補体との結合性については、まだ報告されていない。そこで、我々は、この点について検討したところ、Fig.3に示したように、いずれの症例においても、C₃との結合がわずかではあるが、明らかに生ずることが確認されたが、

Fig.1. Isozyme patterns of the reconstituted LDH-Ig complex. The isozyme pattern of reconstituted LDH-Ig with acid treated patient's serum on agarose gel electrophoresis. (a) shows the case of K.K and (b) shows the case of Y. S.

Fig.2. The enzyme-immunoelectrophoretic patterns for the reconstituted LDH-Ig complex.
Enzyme-immunoelectrophoretograms of case K.K and case Y.S are shown.(Fig.2 (a))

Specific LDH staining of reconstituted LDH₂ to LDH₅ with acid treated patient's serum on the immunoelectrophoretic precipitin lines against anti-IgA, anti- κ and anti-secretory component were stained. No precipitin line was revealed in LDH₄ with 1 week old acid treated patient's serum (Fig.2(b)).
But LDH activity of LDH₄ with acid treated patient's serum on the immunoelectrophoretic precipitin lines are clearly revealed when we use fresh serum (Fig.2(c)).

Table 2 Other properties of immunoglobulin-bound LDH in 6 cases

Case	Secretory component	Complements		LDH-Ig complex dissociated by NADH ₂	Affinity to 5'-AMP/Sepharose
		C ₃	Clq		
1 K.K.	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
2 Y.S.	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
3 Y.W.	(±)	(+)	(-)	(-)	(+)
4 Y.M.	(-)	(+)	(-)	(+)	(±)
5 G.O.	(-)	(+)	(-)	(-)	—
6 M.S.	(±)	(+)	(-)	(-)	(+)

Abbreviation:LDH-Ig, immunoglobulin-bound LDH

Affinities to Clq, C₃ and secretory component were carried out as the same as immunoelectrophoresis for the immunoglobulin heavy and light chain to abnormal LDH serum.

Fig.3. Enzyme-immunoelectrophoresis pattern for the reconstituted LDH-complement complex.
In the 4 cases, LDH activity on the immunoelectrophoretic precipitin lines against anti-C₃ was stained.

Clq との結合は全く認められなかった。

また、NADH₂ 添加による LDH isozyme anomaly pattern の変化は、Table 2 に示したように、IgA 結合の症例では、全く正常化されなかったが、IgG 結合例では、Grous ら²¹⁾が報告しているように、NADH₂ 添加により isozyme pattern は明らかに正常化された。さらに本症例について、5'-AMP/セファロースに対する LDH-Ig 複合体の親和性は、Table 2 に示したように、IgA との結合例では、5'-AMP に結合したのに対し、IgG との結合例では、5'-AMP に結合しない画分も検出された。

考 察

LDH isozyme pattern の anomaly については、1965年に Kreutzer ら²²⁾が、5 例の LDH anomaly pattern を報告して以来、数多くの報告があり、免疫グロブリン結合 isozyme についても膨大な研究²³⁾がなされている。本院においても LDH isozyme anomaly pattern は、1981年にサブユニット欠損を思わせる最初の症例²⁴⁾以降、病棟よりの依頼検体の中から数例の LDH-Ig を見出すに至っている。過去の多くの報告例からも、IgA に結合している LDH anomaly pattern の多くは、LDH 2~LDH 4 領域に主として異常が認められ^{19, 20)}、また IgG 結合例の多くは LDH 3~LDH 5 の領域にその移動度の異常が見出されている²⁵⁾。我々の経験した症例もおおむね類似の結果が得られた。次に、LDH-Ig の成因機序については、既に桑ら²⁶⁾、杉田ら²⁷⁾が、LDH 分子中の 2 ないし 3 量体構造を認識しているという説があるが、今回の結果からは上記の説よりも LDH isozyme の 2, 3, 4, 5 型全てを認識しており、いわゆる M サブユニット全てに免疫グロブリンの再結合が認められたことから、単純に LDH 分子の M 型サブユニット構造に対する自己抗体であることも十分考えられる。なぜなら、我々の経験したいずれの症例 (Fig. 1 (a), Fig. 1 (b)) の免疫グロブリンも精製 LDH 5 活性を特異的に失活させている結果もこの予想を支持すると思われた。これは、Fujita ら²⁸⁾や、Wickus ら²⁹⁾が報告している IgG-IgM 混合型の高分子 LDH の IgG や IgM が、特異的に M サブユニットを失活させたという症例と似ており、この成績は結合免疫グロブリンの産生機序を知る上で重要視しなければならない点と思われる。

また、我々の経験した LDH-Ig 例は、全て C₃ との結合が認められ、Clq との結合が見られなかったことから、LDH-Ig の産生機序はいわゆる Alternative pathway を介した抗体産生が予想され、今後酵素結合免疫グロブリンの成因について考慮すべき点かも知れない。

最近マウスでは、LDH の M(A)サブユニットの一次構造が報告されたが³⁰⁾、この構造上には一次構造の N 端より、アデニン結合部位、NADH₂ 結合部位、基質結合部位 (酵素活性中心)、Negative ring、C 末端-tail などのドメイン構造があるといわれている。また、マウスの LDH-X (C) のサブユニットの抗原性については³¹⁾、アミノ酸配列で 12 残基以下のペプチドに抗原性があり、それぞれの抗原性部位は、前者の一次構造上に当てはめると、アデニン結合部位、NADH₂ 結合部位、基質結合部位、C 末端-tail に存在した。このことは、既に桑ら²⁶⁾や杉田ら²⁷⁾や Nagamine ら³²⁾が主張している。LDH-Ig の産生機序が、LDH 分子の 3 量体を認識しているという仮定のみから考えるとサブユニットの相互作用は、C 末端-tail に存在することが知られているので、LDH 分子の C 末端-tail のみを抗原として、LDH-Ig 抗体を産生することになり、我々の成績、Fujita ら²⁸⁾や、Wickus ら²⁹⁾の症例をうまく説明できない。勿論マウス LDH の抗原決定基の位置³¹⁾から考えて、桑ら²⁶⁾、杉田ら²⁷⁾、Nagamine ら³²⁾のいう LDH 分子の 2~3 量体抗原説、つまり、C 末端-tail が抗原決定基となり、LDH の抗体が産生されることも十分考えられるが、我々の症例で見出されたような、M サブユニット構造に対する自己抗体が LDH-Ig complex 出現の成因である可能性も当然考えられよう。

一方、IgG 結合例では、NADH₂ 添加による異常 LDH isozyme pattern の正常化作用と、IgA 結合型の症例ではこの正常化は起こらないこと、さらに IgA 結合型例では、全て 5'-AMP に親和性があるのに対し、IgG の症例では 5'-AMP に対して親和性がないものもある点に関しては、おそらく IgG 結合 LDH では、この結合免疫グロブリンが自己抗体と考えると、この抗体は LDH サブユニット上のアデニンまたは、NADH₂ 結合部位を抗原とする抗体と考えられ、アデニンまたは、NADH₂ 結合部位に抗体が結合すると、LDH isozyme pattern に異常が生じ、これに NADH₂ を添加するとこの抗体が LDH 分子よりはずれて isozyme pattern が正常化されるものと思われる。こ

のことは5'-AMPとの親和性に対する結果も同様と思われる。他方IgA結合LDHでは、NADH₂結合部以外の構造を抗原性として抗体を作る為か、NADH₂の添加によっても、isozyme patternの正常化は起こらず、又アデニン、NADH₂結合部位は免疫グロブリン(IgA)で埋められていない為か、5'-AMPとの結合はすべて認められた。このことは、IgGとIgA結合型のLDHは、LDHサブユニット上の異なる部位を抗原とする自己抗体産生と考えられ、両者がisozyme patternにおいても異なる領域で起こることは、この仮定をよく支持するものと思われる。さらに、Fujitaら²⁸⁾や、Wickusら²⁹⁾の、LDHと結合したIgMやIgGがLDH活性を失活させる点については、これらの患者が産生した免疫グロブリンは、おそらくLDHサブユニット上の酵素活性中心(基質結合部位)を抗原とする抗体と予想され、この抗体が活性中心を認識して、酵素活性を失活させるものと思われる。この証明には今後さらに他のLDH-Ig症例についても分析するだけでなく、他の免疫グロブリン結合型酵素についても、一次構造、立体構造をからめた解析を行うことが必要で、これらのデータの蓄積が免疫グロブリン結合型酵素産生機序の解明につながるものと著者らは考えている。

尚、使用したLDH-IgAは、全てsecretory componentと結合していたのでdimerと考えられ、抗体産生上または血中分泌上興味深い。

ま と め

6症例の血清中に見出されたLDH結合免疫グロブリンからの再構成LDH-免疫グロブリンの性質について調べた。

LDH 1以外全ての精製LDH isozymeとこの免疫グロブリンの結合が認められた。

このうちIgA症例のLDH-Ig複合物は、5'-AMPカラムに明らかに結合したが、NADH₂の添加では異常isozyme patternの正常化はなされなかった。他方、IgG症例では、5'-AMPアフィニティーカラムに対する親和性のない成分もあり、NADH₂添加によりこの異常LDH isozyme patternは正常化された。この結果から、LDH分子上の免疫グロブリン結合部位は、IgAとIgGでは互いに異なるものと推定された。

参考文献

- 1) Kitamura, M. et al. : Clin. Chim. Acta. **34** : 419, 1971.
- 2) Kanno, T. et al. : Clin. Chim. Acta. **108** : 267, 1980.
- 3) Boyer, H. and Fainer, D.C. : Science. **141** : 642, 1963.
- 4) Tanaka, F. et al. : Clin. Chim. Acta, **68** : 235, 1976.
- 5) Nagamine, M. : Clin. Chim. Acta, **50** : 173, 1974.
- 6) 中山年正, 他 : 医学のあゆみ, **90** : 85, 1974.
- 7) Ganrot, P.O. : Experientia., **23** : 593, 1967.
- 8) 長嶺光隆 : 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, 57年度 p.10.
- 9) 加野象次郎 : 生物物理化学, **21** : 201, 1977.
- 10) 園田 啓, 他 : 生物物理化学, **23** : 271, 1979.
- 11) Weijers, R.N.M. et al. : Clin. Chim., **29** : 272, 1983.
- 12) 井本 勉, 他 : 日本消化器病理学会雑誌, **71** : 1249, 1974.
- 13) Morgensterns, S. et al. : 1972 International Congresses vol. 1. Tarrytown, New York, Mediad., pp27, 1973.
- 14) Kohno, H. et al. : Clin. Chim. Acta, **135** : 41, 1983.
- 15) Pettit, S.M. et al. : Clin. Chim. Acta, **27** : 88, 1981.
- 16) 長嶺光隆 : 臨床検査, **21** : 703~, 1977.
- 17) 大竹皓子 : 検査と技術, **6** : 32, 1978.
- 18) Broderius, P. and Mosbach, K. : FEBS. Letters., **35** : 223, 1973.
- 19) Biewenga, J. and Feltkap, T.E.W. : Clin. Chim. Acta, **58** : 239, 1975.
- 20) 戸沢辰雄 : 生物物理化学, **28** : 409, 1984.
- 21) Grous, F. et al. : Clin. Chem., **28** : 236, 1982.
- 22) Kreutzer, H. et al. : Clin. Chim. Acta., **11** : 159, 1965.
- 23) 平井秀松, 他 : “酵素結合性免疫グロブリンの検出と病態” 臨床病理, 特集号60, 1984.
- 24) 岡野こずえ, 塚本聖一 : 埼臨技会誌, **31** : 102, 1984.
- 25) Biewenga, J. and Feltkap, T.E.W. : Clin. Chim. Acta., **64** : 101, 1975.

(222) 生物物理化学

- 26) 桑 克彦, 他 : 生物物理化学, **21** : 209, 1977.
- 27) 杉田 収, 屋形 稔 : 生物物理学, **22** : 151, 1978.
- 28) Fujita, K. et al. : Clin. Chim. Acta, **140** : 183, 1984.
- 29) Wickus, G.G. and Smith, M.J. : Chin. Chem., **30** : 11, 1984.
- 30) Li, S.S.L. et al. : Eur. J. Biochem., **149** : 215, 1985.
- 31) Wheat, T.E. and Goldberg, E. : Mol. Immunol., **22** : 643, 1985.
- 32) Nagamine, M. and Okochi, K. : Clin. Chim. Acta, **140** : 47, 1984.