〔原 著〕

Slow γ 位に泳動された LDH 結合性 免疫グロブリンの性状

星野 忠*・後藤はるみ*

須藤加代子**・内山克己**・井川幸雄**

SUMMARY

We have described a case of Lactate dehydrogenase (LDH) linked to IgG (kappa) immunoglobulin which LDH isoenzyme pattern shows as if six bands are present. Of these bands, one additional is located at slow gamma region and such an anomalous appearance has not previously reported. The serum contains monoclonal immunoglobulin G (kappa) of which electrophoretic mobility is at slow gamma region (same as for abnormal LDH).

From reconstitution experiments, we concluded that all five LDH isoenzymes could bind to IgG prepared from the patient and those mobilities of the linked LDHs changed to cathodic side; LDH1, tailed to cathodic side; LDH2, moved to cathodic side; LDH3, located at slow LDH4; LDH4 located at fast LDH5; LDH5, located it slow gamma region; respectively. The affinity constant of each LDH isoenzyme was estimated and the values obtained from LDH1 to 5 were 0.026, 0.079, 0.166, 3.715, and 0.218. ($\text{Keg} \times 10^9$ liters/mol) was respectively. LDH4 evoked the highest affinity, it suggests that the site of antigen recognition of LDH linked to IgG was not associated with the structure of individual LDH-H and LDH-M subunits.

Key words: lactate dehydrogenase linked immunoglobulin, affinity constant, isoenzyme.

はじめに

乳酸脱水素酵素 (LDH: EC1.1.1.27) アイソザイムの異常パターンの報告は1965年 Kreutzer ら¹⁾にはじまり, 免疫グロブリンとの結合例が数多く報告されている^{2,3)}. LDH 結合性免疫グロブリン (LDH-Ig) の多くは LDH3~5 型の間の異常バンドあるいは tailing 像であり, LDH5 型より陰極側の slow γ 位に異常 LDH 活性バンドを持つ症例の解析は報告されていない. この LDH-Ig の解析は結合免疫グロブリンの型同定⁴⁾だ

けでなく, 最近では再結合実験より結合様式の解析^{5,6)}更に定量的に評価できる結合親和定数^{7,8)}が求められている.

本報告にては slow γ 位に LDH 異常活性帯を持ち, またほぼ同位置の slow γ 位に M 蛋白を認める LDH-Ig の性状について解析した結果を報告する.

材料及び方法

1. 蛋白分画

セラフオー膜を支持体とした全自動電気泳動装置

Properties of IgG conjugated with LDH having slow γ mobility.

Tadashi Hoshino* and Harumi Goto*, 病体生理研究所

Kayoko Sudo**, Katumi Utiyama** and Satio Ikawa**, 東京慈恵会医科大学臨床検査医学

Correspondence address; Tadashi Hoshino, Byotai-Seiri Laboratory, Itabashi-ku Tokyo 173, Japan.

(受付 1987年10月19日, 受理 1987年11月10日)

COSMO FED-II (コスモ社製)を用いた。また染色液はボンソー 3R を使用した。

2. 免疫電気泳動

コーニング IEP 膜 (チバ・コーニング社製) を支持体とし、抗血清は抗ヒト全血清としてヘキスト社の (ウマ)、フジレビオ社の (ヤギ) の 2 種を用いた。また特異抗血清としての IgG, IgA, IgM (ヤギ), L 鎖 κ , L 鎖 λ (ウサギ) は MBL 社製を用いた。染色は 0.5% ニグロシンを用いた。

3. LDH isozyme

タイタン III Lipo (ヘレナ社製) を支持体とし、染色には Lactate を基質とし Diaphorase, NTB を用いたキット (ヘレナ社製) を使用した。

4. LDH-Ig の同定

免疫電気向流法、免疫混合法を実施した。抗血清は DAKO 社、及び MBL 社製を使用した。これら抗血清はあらかじめ LDH 活性のないことを確認した Lot. を用いた。

5. LDH-Ig の部分精製

LDH-Ig 複合体からの免疫グロブリンの解離は小網ら⁹⁾の方法に従い、pH3.4 の Sephadex G-200 ゲル濾過にて分取し、LDH 結合能を持つ分画を再結合実験により確認し濃縮して用いた。

6. ヒト LDH5 種のアイソザイムの部分精製

LDH1, 2, 3 はヒト赤血球より Burd ら¹⁰⁾の方法、LDH4, 5 はヒト子宮筋より Ryan ら¹¹⁾の方法により部分精製した。

7. 結合親和定数 (K_{eq})

Sudo ら⁷⁾の方法に従い、部分精製した 5 種のアイソ

ザイムを 5 濃度に調製し、分取した LDH-Ig と 1 : 1 に混合後、4℃にて一晚反応させた後 LDH isozyme 電気泳動を行った。デンストグラム像より bound と free の割合を算出し、Steward ら¹²⁾の方法に従い、total antibody binding sites (Abt) を求め、K_{eq} を算出した。なお、データは LDH の分子量を 140,000, specific activity を 700IU/mg¹³⁾ として計算しモル濃度で表示した。

8. 症例

73歳、男性、後縦靱帯骨化症にて昭和53年よりO病院整形外科に通院し、糖尿病も指摘されていた。昭和57年8月～11月まで結核性胸膜炎にて入院。昭和60年4月、胸部 X-P にて右下肺野に腫瘤状陰影が認められ

Fig.1. Densitogram and immunoelectrophoretic patterns of patient serum.

c : control serum
p : patient serum
WHS : anti-whole human serum
K : anti-light chain kappa
L : anti-light chain lambda

Table 1. Laboratory data

Items	Data	Normal ranges	Unit
TP	7.5	6.5~8.2	g/dl
Alb	58.5	60.5~71.6	%
α_1 -gl	3.5	2.1~3.4	%
α_2 -gl	10.0	4.9~8.9	%
β -gl	9.4	7.9~12.1	%
γ -gl	18.6	9.5~19.5	%
IgG	1583	585~1787	mg/dl
IgA	100	149~343	mg/dl
IgM	84	79~191	mg/dl
GOT	23	10~40	IU/1
GPT	13	5~35	IU/1
LDH	1232	120~500	IU/1

2回目の入院。諸検査の結果、肺小細胞癌、対側縦隔リンパ節転移を認め、計6回の化学療法を行ったが、肝、脳転移を伴い、入院後約8カ月にて死亡した。Table 1には入院時検査データの一部を示した。

Fig.2. LDH isoenzyme zymograms (A) LDH isoenzyme zymograms obtained from the immunoprecipitated supernatant with following antibodies and patient serum.

L : anti-light chain lambda-serum from rabbit
K : anti-light chain kappa-serum from rabbit
M : anti-IgM-serum from rabbit
A : anti-IgA-serum from rabbit
G : anti-IgG-serum from rabbit
O : LDH isoenzyme zymogram of patient serum

(B) Changes of electrophoretic mobilities of isolated LDH isoenzymes reacted with isolated IgG from the patient.

A : isolated IgG+isolated LDH5
B : isolated IgG+isolated LDH4
C : isolated IgG+isolated LDH3
D : isolated IgG+isolated LDH2
E : isolated IgG+isolated LDH1

(C) LDH isoenzyme densitogram and zymogram of patient serum.

con : control serum
o : patient serum
↓ 1 : LDH3-IgG complex
↓ 2 : LDH4-IgG complex
↓ 3 : LDH5-IgG complex

Fig.3. (A) Determination of total antibody binding sites of isolated IgG.

Abscissa ; reciprocal of the concentration of free LDH.

Ordinate ; reciprocal of concentration of LDH bound by isolated IgG.

$1/b = [(1/Abt) \times (1/Keq) \times (1/[Ag]) + (1/Abt)]$ Where $b = (AbAg)$ = antibody-antigen complex concentration (LDH, mol/L) ; Abt = total antibody binding sites ; $[Ag]$ = free antigen concentration (LDH, mol/L) ; Keq = equilibrium constant. When $1/[Ag] = 0$, $1/b = 1/Abt$. 1-5 refer to LDH isoenzymes 1-5, respectively. (B) Determination of equilibrium constant (Keq) for interaction of IgG from patient serum.

$(a \cdot \log Keq) + (a \cdot \log [Ag]) = \log b/(Abt-b)$. When $\log b/(Abt-b) = 0$, $Keq = 1/[Ag]$

結 果

1. 蛋白分画像の M 蛋白同定

Fig. 1 に示すように slow γ 位に M-peak を認め、免疫電気泳動により IgG- κ 型と同定された。

2. LDH-Ig の同定

LDH isozyme パターンは Fig. 2 o に示すように 6 バンドとして観察された。免疫混合法では抗 IgG 及び抗 L 鎖 κ との沈降物中に LDH 活性が認められた。また免疫混合法上清の泳動像を Fig. 2 (A) に示したが矢印に示すごとく、抗 IgG (Fig. 2 (A), G) 及び抗 L 鎖 κ (Fig. 2 (A), K) にて slow γ 分画の消失が観察された。なお、免疫電気向流法の結果にても IgG- κ 型との結合であった。

血清蛋白分画像で観察された M 蛋白が slow γ 位の LDH-Ig バンドとほぼ同位置に存在し、同定された免疫グロブリンの型も IgG- κ 型と一致していることは井本ら¹⁴⁾ 藤田ら¹⁵⁾ に次いで 3 例目の LDH-Ig が M 蛋白である例とも考えられるが、確証は得られていない。

3. 再結合実験から得た結合親和定数

Fig. 2 (B) に示すように、LDH1, 2 はわずかに陰極側に tailing が観察された。LDH3 は LDH4 の後、LDH4

は LDH5 の前、LDH5 は LDH5 の後に結合バンドが認められた。一定量の部分精製 LDH-Ig を LDH1~5 の 5 種のアイソザイム濃度と各々再結合させ bound と free を求め、逆数 plot により Abt を求めた (Fig. 3 (A))。次にこの Abt を用いて Sips plot (Fig. 3 (B)) にて Keq を求めた結果を Table 2 に既法の例と対比して示したが、LDH4 と親和性が最も強かった。また、LDH は LDH-Ig との結合により失活しなかった。

考 察

戸沢ら¹⁶⁾ は 46080 例という膨大な母集団のもとに LDH 結合性免疫グロブリンの出現頻度は 0.36% と報告している。また、anomaly 像のパターンを分類し、像の変化の方向には LDH1, 2, 3, 4 が陰極方向、LDH5 が陽極方向と規則性があることを指摘している。我々も過去 3 年 3 カ月間に検査依頼のあった 13907 件より anomaly 像を呈した 200 件の内、免疫電気向流法にて 151 件の LDH 結合性免疫グロブリン例を経験しているが、LDH5 よりも陰極側に anomaly バンドを持つ症例は本例が初めてである。

本報告の LDH-Ig 例は当初 slow γ 位に 6 バンドと観察したが、再結合実験の結果 LDH1~5 の全てと結

Table 2. Equilibrium constant (Keq) for each LDH isozyme ($\times 10^9$ l/M)

LDH isozyme	1	2	3	4	5
Patient IgG	0.026	0.079	0.166	3.715	0.218
LDH-linked Ig					
IgG (case 1) ⁷⁾	0.0013	0.003	0.0102	N. D.	0.00015
IgG (case 2) ⁷⁾	0.657	0.377	0.794	N. D.	0.0051
IgG (case 3) ⁷⁾	Neg.	0.132	0.404	N. D.	Neg.
IgG (case 4) ¹⁸⁾	0.158	1.222	0.226	0.515	Neg.
IgA (case 1) ¹⁷⁾	Neg.	0.132	0.404	N. D.	Neg.
IgA (case 2) ⁹⁾	Neg.	Neg.	2.1	Neg.	Neg.
LDH inhibitor					
IgG (case 1) ¹⁹⁾	0.37	1.69	5.82	0.94	2.18
IgG (case 2) ¹⁹⁾	Neg.	2.75	1.32	0.18	0.71
Anti-acetylated					
-H (B) sub. ²⁰⁾	0.14	0.14	0.125	N. D.	Neg.
Anti-H (B) sub. ¹⁷⁾	2.21	1.73	N. D.	N. D.	Neg.
Anti-M (A) sub. ¹⁷⁾	Neg.	3.311	20.89	N. D.	30.20

N.D. : not detectable

Neg. : negligible

合していることが判明し、血清の LDH isozyme 泳動像からの推定では不十分であることが示された。すなわち、アイソザイム別の定量的添加実験の結果, Fig. 2 (C)の矢印 1 は 3 型との結合, 矢印 2 は 5 型ではなく 4 型との結合, そしてその陰極側に 5 型が泳動され更に slow γ 位 (矢印 3) が 5 型との結合 LDH であることが判明した。

また, Keq の測定によりその親和性は LDH-M サブユニットに対する抗体¹⁷⁾より小さく, Sudo ら⁷⁾及び Weijers ら⁸⁾が血清中より見出した LDH-Ig の値と近似していた。しかし, そのアイソザイム別の親和性は 4 型に最も強く, 次いで 5, 3 型, 更に 2, 1 型は非常に弱い親和性を示し, 従来の報告とは異なるパターンであったが, 今後 Keq を求める方法が定着し, データを蓄積していくことにより現状とは異なった評価が展開されるかもしれない。

本論文の要旨は第34回日本臨床病理学会総会 (1987 年10月, 東京) に於いて発表した。

ま と め

LDH アイソザイムパターンが 6 バンドと観察された IgG- κ 型免疫グロブリン結合 LDH の症例を報告した。この 6 バンドのうちの 1 本は slow γ 位に LDH 活性を持つが, 今までにこのような anomaly 像が観察された報告例はない。また, 血清中には slow γ 位に IgG- κ 型の M 蛋白が存在していたが, LDH 異常バンドとはほぼ同位置であった。再結合実験により患者血清より部分精製された IgG は血清 LDH isozyme 像から推定された結果とは異なり, LDH1~5 の全てと結合能力を持っていた。そしてその易動度は LDH1, 2 は陰極側に tailing しており, LDH3 は LDH4 の後に, LDH4 は LDH5 の前に, LDH5 は LDH5 の後にシャープなバンドとして観察された。結合親和定数 (Keq) は LDH1~5 においてそれぞれ 0.026, 0.079, 0.166, 3.715, 0.218 (10^3 /M) と求められ, LDH4 との親和

性が最も強かった。この結果は LDH-H サブユニット及び M-サブユニットに対する抗体とは性質が異なることを示している。

文 献

- 1) Kreutzer, H. H. et al.: Clin. Chim. Acta, **11**: 159, 1965.
- 2) 桑 克彦, 他: 生物物理化学, **21**: 209, 1977.
- 3) 杉田 収, 屋形 稔: 生物物理化学, **22**: 151, 1978.
- 4) 長嶺光隆: 臨床病理, 特集**60**: 90, 1984.
- 5) 森山隆則, 他: 生物物理化学, **29**: 197, 1985.
- 6) 戸沢辰雄, 内田恵理子: 生物物理化学, **30**: 185, 1986.
- 7) Sudo, K. et al.: Clin. Chim., **31**: 1178, 1985.
- 8) Weijers, R. N. M. et al.: Clin. Immunol. Immunopathol., **42**: 110, 1987.
- 9) 小網悦子, 他: 臨床化学, **1**: 192, 1972.
- 10) Burd, J. F. and Usategui-Gomez, M.: Biochem. Biophys. Acta, **310**: 238, 1973.
- 11) Ryan, L. D. and Vestling, C. S.: Arch. Biochim. Biophys., **160**: 279, 1974.
- 12) Steward, M. W. and Petty, R. E.: Immunology, **22**: 747, 1972.
- 13) 五十嵐富三男, 中山年正: 臨床化学, **11**: 115, 1982.
- 14) 井本 勉, 他: 日本消化器病学会雑誌, **71**: 1249, 1974.
- 15) 藤田清貴, 他: 生物物理化学, **29**: 131, 1985.
- 16) 戸沢辰雄: 生物物理化学, **30**: 379, 1986.
- 17) 須藤加代子, 他: 生物物理化学, **30**: 223, 1986.
- 18) 池田清子, 他: 生物物理化学, **31**: 87, 1987.
- 19) Maekawa, M. et al.: Clin. Chim., **32**: 1347, 1986.
- 20) 須藤加代子, 他: 生物物理化学, **28**: 177, 1984.