〔原 著〕

アルブミンと特異的に結合する微量 IgG- κ 型 M-蛋白の免疫化学的特性

藤田清貴*・櫻林郁之介**・吉岡尚文***・西口隆偉†

寺邑能実††・河合 忠†††

SUMMARY

Polyclonally increase of immunoglobulins were detected by agarose gel electrophoresis or immunoelectrophoresis in the serum of a patient with autoimmune hepatitis. However, the precipitation line of albumin on immunoelectrophoresis in the patient serum was extended to gamma area. By gel filtration, small amount of albumin was eluted in the fraction of high molecular weight, and by Protein G affinity chromatography, slight amount of albumin was adsorbed by Protein G with IgG. Moreover, a IgG- κ type M-component was revealed in the sample obtained after ion exchanged chromatography. On immunoelectrophoresis, the precipitation line of albumin in the fraction containing the IgG- κ type M-protein was extended to gamma area as the patient's serum. The purified IgG from the patient's serum treated with an acid, was able to recombine with normal human serum albumin and bovine serum albumin. Localization of the binding activity on IgG molecule was proved in the Fab region. There is a possibility that the IgG- κ type M-protein can have antibody like activity to albumin.

Key words: albumin-IgG complex, IgG- κ type M-protein, autoimmune hepatitis, antibody activity, immunoelectrophoresis.

緒 言

近年、ヒト血清成分と免疫グロブリンとの結合がまれながら報告されている¹⁻⁵⁾。1964年松橋ら⁶⁾は多発性骨髄腫例においてヒト血清アルブミンと特異的に結合するIgG型M-蛋白を見だし報告しているが、その後、同様の報告例はみられない。

今回われわれは、原血清で明白なM-蛋白は観察されないが、血清アルブミンの沈降線が γ 領域まで尾を引く

一症例を経験した。検索の結果、polyclonal IgGのなかに微量のIgG- κ 型M-蛋白を見だし、そのM-蛋白がアルブミンに対する抗体様活性をもつため生じたまれな現象であることが推測されたので報告する。

材料および実験方法

1. 材 料

自己免疫性肝炎と診断された70歳、女性の血清を用いた。

Immunochemical properties of IgG- κ type M-protein bound to albumin in human serum.

* Kiyotaka Fujita; 花園病院研究検査科

** Ikunosuke Sakurabayashi; 自治医科大学大宮医療センター検査部

*** Naofumi Yoshioka; 秋田大学医学部法医学教室

† Takahide Nishiguchi; 国立大阪病院臨床検査科

†† Yoshimi Teramura; 花園病院内科

††† Tadashi Kawai; 自治医科大学臨床病理学教室

Correspondence address: Kiyotaka Fujita, Department of Clinical Laboratory, Hanazono Hospital, Akebono-cho, Omagari 014, Japan.

(受付 1991年12月9日, 受理 1992年2月6日)

(134) 生物物理化学

症例は某院にて急性肝炎の疑いで治療されていたが、症状悪化のため来院した患者である。入院時のおもな検査成績は以下のとおりである。T. Bil (11.4 mg/dl), AST (136 IU/l), ALT (94 IU/l) は異常高値を示し、抗核抗体、抗 DNA 抗体は陽性であった。セ・ア膜電気泳動では M-蛋白は認められず、 γ 分画の polyclonal な増加が観察された。血清総蛋白量 (7.8 g/dl) は正常範囲内であったが、免疫グロブリンの定量では IgG の増加 (3,430 mg/dl) が著明であった。

2. 方法

1) 免疫電気泳動

支持体は寒天ゲルフィルム (IEP フィルム, Ciba-Corning 社) を用い、pH 8.6, 0.06 mol/l ベロナール緩衝液にて 90 V, 45 分間電気泳動を行った。抗血清は抗ヒト全血清 (富士レビオ社), 抗アルブミン抗血清 (DAKO 社), 抗 γ 鎖抗血清 (DAKO 社), 抗 γ Fc 抗血清 (MBL 社), 抗 γ Fab 抗血清 (MBL 社), 抗 κ 鎖抗血清 (DAKO 社), 抗 λ 鎖抗血清 (DAKO 社) をそれぞれ用いた。また、必要に応じて、アガロースゲルフィルム (Universal フィルム, Ciba-Corning 社) を用いた。

2) 免疫固定電気泳動

アガロースゲルフィルムを用い、既報⁹⁾のごとく行った。

3) イオン交換クロマトグラフィー

DEAE-Sephacel (Pharmacia 社) を用い、開始緩衝液 (pH 8.0, 0.1 mol/l Tris-HCl buffer) にて平衡化したカラム (70×1.6 cm) に試料を添加し、NaCl 直線型勾配 (0~0.5 mol/l) にて行った。

4) Protein G affinity chromatography

Protein G は、Protein G Sepharose 4 Fast Flow (Pharmacia 社) を用いた。

開始緩衝液 (pH 7.2, 0.1 mol/l phosphate buffer) にて平衡化したカラム (15×0.9 cm) に患者血清を添加し、未吸着分画を溶出後、1.0 mol/l 酢酸 (pH 2.2) にて吸着分画を溶出させた。pH を補正後、PBS (pH 7.2, phosphate buffered saline) にて透析を行った。

5) カラムゲル濾過

Sephacryl S-300 superfine (Pharmacia 社) を用い、緩衝液 (0.2 mol/l NaCl を含む pH 8.0, 0.1 mol/l Tris-HCl buffer) で平衡化したカラム (95×2.6 cm) に患者血清を添加し行った。

6) 再結合実験

患者血清を用い、protein G affinity chromatography

を行い、吸着分画を溶出後、pH 2.7 glycine-HCl 緩衝液を用い、Sephacryl S-300 superfine カラムゲル濾過を行った。透析後、得られた IgG 分画に正常血清、あるいはウシ血清アルブミン (3.0 g/dl) を混和し免疫電気泳動を行い、アルブミンの沈降線の異常を観察した。

7) SDS-ポリアクリルアミドゲル (SDS-PAG) 電気泳動

4~20% と 10~20% の濃度勾配ゲルプレートを用い、Laemmli 法⁷⁾に従い行った。

分子量マーカーは分子量測定キット (Pharmacia 社) を用いた。

8) Papain による IgG の分解

Porter⁸⁾ によって示された条件下で患者 IgG を papain 分解後、既報⁹⁾のごとく、Fc, Fab fragment の精製を行った。

実験結果

1. 免疫電気泳動による検査成績

Fig. 1 に示したごとく、アルブミンと IgG の沈降線は α_2 領域で交差し、さらにアルブミンの沈降線が γ 領域まで尾を引いていることが確認された。アガロースゲルフィルムによっても、患者血清のアルブミンの沈降線異常が観察された。しかし、他の血清蛋白の沈降線にはとくに異常を認めず、免疫固定法においても M-band は検出されなかった。

2. Sephacryl S-300 superfine カラムゲル濾過分画の検査成績

高分子側から F₁, F₂, F₃, F₄, F₅ までのおおのを分画し、電気泳動した成績を Fig. 2 に示す。正常血清とは明らかに異なり、G 分画に相当する F₄ および G' 分画に相当する F₃ にもアルブミンの混入が観察された。とくに、より高分子側の F₃ に溶出されたアルブミンの沈降線は、 γ 領域まで尾を引いていることが確認された。

3. Protein G Sepharose 4 Fast Flow affinity chromatography での吸着、未吸着分画の検査成績

Protein G カラムにおける吸着分画は、正常血清では IgG のみであったが、患者血清では IgG の他にアルブミンの混入が認められた。そのアルブミンの沈降線は原血清と同様、 γ 領域まで尾を引いていることが確認された。一方、未吸着分画に溶出されたアルブミンは正常対照とほとんど変化なく、沈降線の異常も観察されなかった。

Fig. 1. Electrophoretic pattern of the patient serum revealed in Fig. 1a and immunoelectrophoretic pattern with antisera to human whole serum (AHS), γ -chain (A- γ), kappa light chain (A- κ), lambda light chain (A- λ) and albumin (A-Alb) in Fig. 1b.

PS, patient serum; NS, normal serum.
Anode is to the right in each panel.

4. 再結合実験

Fig. 3 にその結果を示した。患者 IgG においてのみアルブミンの異常沈降線が観察され、患者 IgG 側に明らかにアルブミンを結合する能力があることが確認された。

また、ウシ血清アルブミンを患者 IgG に添加した場合も同様な沈降線の異常が観察されたが、その形成された異常沈降線は、ヒトアルブミンと比較し弱いものであった。

5. アルブミンと結合する IgG の性状

患者 IgG のなかでどの IgG がアルブミンと結合する能力をもつか確認するため、Protein G カラムの吸着分画 (IgG 分画) を用い、イオン交換クロマトグラフィーを行い患者 IgG の細分画化を試みた。Fig. 4 はその溶出パターンであり、Fig. 5 はおのおのを分画し、電気泳動後、蛋白染色を行ったものである。F₁ から F₄ までは IgG のみであったが、F₅ は、アルブミンの他に微量ながら IgG の存在が確認された。その F₅ を用い、免疫固定

Fig. 2. Electrophoretic patterns in each fraction separated by Sephacryl S-300 superfine gel filtration.

NS, normal serum; PS, patient's serum.

を行ったところ、IgG- κ 型有意であることがわかった。

また、0 から 0.3 mol/l NaCl gradient で溶出されず、2.0 mol/l NaCl で溶出された F₅ には、アルブミンバンドのほか、幅狭いバンドが観察された。免疫固定を行ったところ、Fig. 6 に示したごとく、その蛋白は IgG- κ 型 M-蛋白であることが確認され、その分画におけるアルブミンの沈降線は、原血清と同様、 γ 領域まで尾を引いていることがわかった。

SDS-PAGE 電気泳動を行ったところ、その IgG- κ 型 M-蛋白は 2-mercaptoethanol 処理前で分子量約 150,000 であり、他の F₁ から F₄ までの IgG と比較しほぼ同じ分子量であることが確認された。

6. Papain 分解における所見

免疫電気泳動では、得られた fragment はいずれも Fab fragment のみであり、再度行っても同じ結果であった。しかも、papain 分解に用いた患者 IgG は、分解前、アルブミンの沈降線をまったく認めなかったが、分解後には、明らかにアルブミンの沈降線が認められるようになった。一方、対照に用いた正常 IgG では、患者 IgG と異なり Fc, Fab fragment が得られ、アルブミンの混入も観察されなかった。

Fig. 3. Electrophoretic pattern for the mixture of purified IgG and normal serum revealed in Fig. 3 a and immunoelectrophoretic pattern with antisera to human whole serum (AHS) and albumin (A-Alb) in Fig. 3 b.

P. IgG+NS, the purified patient IgG mixed with normal serum; N. IgG+NS, the purified normal IgG mixed with normal serum; NS, normal serum.

考 察

ヒト血清アルブミンは、血漿蛋白のなかで最も含量が多く、さまざまな物質を結合し運搬する作用がある¹⁰⁾.

Fig. 5. Electrophoretic patterns in each fraction separated by DEAE-Sepharcel ion-exchange chromatography.

NS, normal serum; PS, patient's serum.

今回われわれは、免疫電気泳動においてアルブミンの沈降線が、 γ 領域まで尾を引いている症例を見だし、その原因について検討を加えた。異常沈降線の出現するアルブミンは、protein G affinity chromatography, カラムゲル濾過法において IgG 分画に溶出され高分子であること、酸処理した患者 IgG を正常血清に添加して

Fig. 4. Elution profile for the Protein G bound fraction on DEAE-Sepharcel ion-exchange chromatography.

Fig. 6. Electrophoretic pattern of the F. 6 separated by DEAE-Sephacel ion-exchange chromatography revealed in Fig. 6a and immunofixation with antisera to human γ -chain (A- γ), albumin (A-Alb), kappa light chain (A- κ) and lambda light chain (A- λ) in Fig. 6b. NS, normal serum; F. 6, the fraction 6 separated by DEAE-Sephacel ion-exchange chromatography. The arrow ($\uparrow$) heads indicate M-protein.

電気泳動すると、正常血清のアルブミンに異常沈降線が出現することなどから、患者 IgG とアルブミンが complex を形成するため生じた、希な現象であることが示唆された。

本症例の原血清では、免疫電気泳動法、免疫固定法においても M-band は検出されなかった。しかしながら、患者 IgG を用いイオン交換クロマトグラフィーを行うことによって、微量の IgG- κ 型 M-蛋白が検出された。イオン交換クロマトグラフィーの溶出面積から、その M-蛋白量は、患者 IgG 濃度の 1% 以下であった。このような低濃度であったため、原血清では M-band として明確に観察されなかったものと推察される。

また、アルブミンと IgG が結合したこの症例では、Porter⁸⁾ の従来の条件で papain 分解しても Fc fragment を得ることは困難であった。しかしながら、Fab fragment は明らかに得られ、その fragment にアルブミンの沈降線が認められること、アルブミンを伴って溶出された IgG は、 κ 型 M-蛋白であることなどからすると、この IgG- κ 型 M-蛋白は、アルブミンに対して抗体様活性を有している可能性が高い。

肝疾患患者では、さまざまな抗原に対する抗体の存

在が報告されており、これらが免疫複合体を形成する一つの要因として、食事性蛋白の存在が挙げられている^{11,12)}。Tamura ら¹²⁾は、各種肝疾患の患者血清について、ヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、卵白アルブミンに対する抗体価を調べ、健常人に比較し肝疾患患者では、これらの抗体が高頻度に検出されることを明らかにした。しかも、ヒト血清アルブミンや卵白アルブミンよりもウシ血清アルブミンに対する抗体価が高いことを報告している。本症例においても、患者 IgG はウシ血清アルブミンと反応し異常沈降線が形成された。しかしながら、その形成された異常沈降線はヒト血清アルブミンと比較し弱いこと、ヒト血清アルブミンとウシ血清アルブミンとは抗原性に共通部分が存在することなどから、今回われわれが見いだしたアルブミンと結合する IgG- κ 型 M-蛋白は、経口的に摂取されたウシ血清アルブミンに対する抗体というよりも、ヒト血清アルブミンに対する抗体である可能性が高い。

今回、各種アルブミンに対する抗体力価を測定することはできなかったが、免疫電気泳動においてアルブミンの沈降線が γ 領域まで明瞭に尾を引いている場合は、アルブミンに対する抗体力価が非常に高いことを意味しているのかもしれない。いずれにしても、アルブミンと特異的に結合する M-蛋白例の報告は世界でまだ 1 例のみであり、臨床的意義を解明するうえでも貴重な症例と思われる。

本論文の要旨は第 41 回電気泳動学会春季大会において発表した。

本研究に際し、ご指導、ご協力くださいました金沢大学がん研究所の右田俊介先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Freedman, M. et al.: *Immunochemistry*, **13**: 193, 1976.
- 2) Fujita, K. et al.: *Clin. Chim. Acta.*, **140**: 183, 1984.
- 3) Fujita, K. et al.: *Clin. Chim. Acta.*, **149**: 205, 1985.
- 4) Sawada, S. et al.: *J. Clin. Lab. Immunol.*, **19**: 31, 1986.
- 5) 藤田清貴, 他: *生物物理化学*, **34**: 217, 1990.
- 6) 松橋 直, 他: *医学のあゆみ*, **51**: 56, 1964.
- 7) Laemmli, U. K.: *Nature*, **227**: 680, 1970.
- 8) Porter, R. R.: *Biochem. J.*, **73**: 119, 1956.
- 9) Fujita, K. et al.: *Clin. Chem.*, **33**: 1478, 1987.
- 10) 河合 忠編: *血漿蛋白—その基礎と臨床*, 初版, 医学書院, 東京, 1977, p. 127.

- 11) Hirayama, C. et al.: Immunol. Commun., 10: 401, 1981.
- 12) Tamura, N. et al.: Gastroenterol. Jpn., 10: 469, 1982.

要 旨

免疫電気泳動において、アルブミンの沈降線が γ 領域まで尾を引いている症例を見だし検討を加えた。異常沈降線の出現するアルブミンは、ゲル濾過法にて高分子の G' 分画に溶出された。酸処理した患者 IgG に正常血清、ウシ血清アルブミンを添加すると、原血清と同様

なアルブミンの異常沈降線が観察された。イオン交換クロマトグラフィーを行うことによって微量の IgG- κ 型 M-蛋白が検出され、その分画には異常沈降線を形成するアルブミンを認めた。患者 IgG を papain 分解することにより、Fab fragment にアルブミンの沈降線が観察された。再結合実験において形成された異常沈降線は、ウシ血清アルブミンよりもヒト血清アルブミンの方が強いこと、ヒト血清アルブミンとウシ血清アルブミンとは抗原性に共通部分が存在することなどから、アルブミンと結合する IgG- κ 型 M-蛋白は、ヒト血清アルブミンに対する抗体である可能性が高い。