〔特別講演〕

親和電気泳動法について

——抗原抗体反応の解析を中心として——

竹 尾 和 典

親和電気泳動法の原理^{1,2)}

親和電気泳動法 (Affinity Electrophoresis: AEP) は泳動中に生物特異的な相互反応による反応物質の泳動速度、および、泳動像に選択的な変化を起因せしめ、その変化量から、その相互反応自身の解析、あるいは、反応物質の選択的分離を試みようとする電気泳動法である。その原理、目的、親和性の利用法にしたがって、次の2種の AEP に大別することができる。

(1) 定量的親和電気泳動法

親和性の測定等、相互反応の定量的分析のための AEP。この目的のためには泳動距離が正確に再現性よく計測できる電気泳動法が必要である。アクリルアミド・ゲルを支持体とする泳動法 (PAGE)、アガロース・ゲルを支持体とする泳動法等がその目的に利用されている。

(2) 定性的親和電気泳動法

親和性の高い相互反応を利用して微細不均一性 (microheterogeneity) の試料たんぱく質をそれぞれの亜平面に分離・同定するための AEP である。親和電気泳動法の出発点となった交叉泳動法、アルカリ・フォスファターゼ等の糖たんぱく質の亜平面の分離・同定によく利用されているレクチン・親和電気泳動法はこの範疇に属す泳動法である。

親和電気泳動法の理論：親和性
(解離定数) の測定

泳動支持体に添加する親和リガンドの濃度と泳動速度の変化との関係から、相互反応の解離定数 (K_d) は次式によって計測できる³⁾：

$$\frac{1}{(R_0 - r)} = \{1/(R_0 - R_c)\} \{1 + (K_d/c)\} \quad (1)$$

ここで、 R_0 は泳動支持体に親和リガンドを含まない場合の相対泳動距離、 R_c は親和リガンドの濃度が十分に高く、すべての試料たんぱく質が親和リガンドと複合体を形成した場合の相対泳動距離、 c は泳動ゲルに添加する親和リガンドの濃度 (全濃度)、 r は諸種の濃度の親和リガンドを含む泳動ゲルを用いた場合の相対泳動距離である。すなわち、諸種の濃度の親和リガンド (c) を含有する泳動ゲルを用いて泳動し、相対泳動距離 (R_0 と r) を計測し、 $1/(R_0 - r)$ を縦軸に、 $1/r$ を横軸にとってプロットすれば直線が得られ、その直線の横軸を切る点が $-1/K_d$ を与える。グリコーゲンのように親和リガンドの分子量が十分に大きく、泳動支持体の分子ふるい作用のため完全に非動化される場合には $R_c = 0$ となる。他方、マルトースのように親和リガンドの分子量が小さく、分子ふるい作用をまったく受けず、しかも荷電のない場合には、 $R_c = R_0$ となる。親和リガンドの分子量が十分に大きい場合は、上記のように、 $R_c = 0$ となり (1) 式は (2) 式⁴⁾に簡略化される：

$$1/r = (1/R_0) \{1 + (c/K_d)\} \quad (2)$$

フォスホリラーゼ、あるいは、レクチンに対する小糖類との相互反応のように、中性の低分子親和リガンドに対する親和性 (K_i) は (3) 式⁵⁾に示したように、グリコーゲンあるいはデキストランのような高分子親和リガンドによる泳動距離の減少を低分子親和リガンドが競争的に回復させることを利用して求めることができる。

$$\frac{1}{(R_0 - r)} = (K_d/c) \{1 + (i/K_i)\} \quad (3)$$

Affinity electrophoresis—Its application to analysis of antigen-antibody interactions.

Kazusuke Takeo; 山口県防府環境保健所

Correspondence address: Kazusuke Takeo, Hofu Public Health Center, Yamaguchi Prefectural Government, Eki-minami-machi 14-28, Hofu 747, Japan.

第43回電気泳動学会総会・特別講演

(142) 生物物理化学

すなわち、一定濃度の高分子親和リガンド (c) と諸種の濃度の低分子親和リガンド (i) を含むゲルを用いて泳動し、 $1/(R_0-r)$ を縦軸に、 i を横軸にとってプロットすれば、直線が得られ、その直線の横軸を切る点が $-K_i$ を与える。

(1) 式を一般親和式、(2) 式を基本親和式、(3) 式を阻害親和式と呼んでいる。

親和電気泳動法の定量化のための問題点

1. 正確な泳動位置の確定

免疫電気泳動法は寒天等の分子ふるい作用のほとんどない泳動支持体を利用しているので、泳動による分離は鮮鋭ではないが、泳動後、それぞれの分画を拡散を利用した抗原抗体反応によって生ずるアーク状の沈殿線として検出するために、各分画の同定は容易であり、確実である。しかし、各分画の正確な泳動位置の決定は不可能に近い。この点は同じ泳動原理を利用しているが、交差免疫泳動法⁶⁾ では電気泳動法によって分離された各分画を抗体を含むゲル中を 2 次元の方向に強制的に泳動させることによって沈降線を引き伸ばし、濃度分布曲線として同定するので、泳動位置の決定は容易となる。1973 年、Børg-Hansen によって考案された交差親和免疫電気泳動法 Crossed Affinity Immunoelectrophoresis⁷⁾ はこの原理にしたがって開発された定量的親和電気泳動法の一つである。

他方、Ornstein⁸⁾ と Davis⁹⁾ によって考案されたポリアクリルアミドゲルを支持体とするディスク電気泳動法は全く電気浸透現象を示さず、しかも、試料たんぱく分画を泳動分離する前に、等速電気泳動法の原理を利用して、予め鮮鋭なバンド (1/100 mm 幅以下) に収斂濃縮し、改めて、ポリアクリルゲルの持つ分子ふるい効果を利用して、拡散を最小限に制限した条件下で泳動するので、泳動像は鮮鋭であり、泳動距離を再現性よく正確に計測することができる。定量的親和電気泳動法に最適の泳動法である。

2. 温度の制御

親和性は温度依存の定数である。正確な親和性を測定するには恒温電気泳動装置の使用が必須である。教室では泳動ゲル管 (1 次元泳動用)¹⁰⁾ または泳動ゲル板 (2 次元泳動用)¹¹⁾ が完全に泳動緩衝液に浸たるように設計された泳動装置にガラス製コンデンサーを装着し、恒温水を循環させ、同時にマグネチック・スタラーで攪拌することによって温度誤差を 0.1°C 以内に留めることのできる簡便な恒温泳動装置を考案し利用している。ちなみに

に、コンカナバリン-A とデキストランとの相互反応の場合には解離定数¹⁰⁾ は 11°C で 0.39 mM, 50°C で 3.83 mM と 39°C の上昇によって約 10 倍大きく、換言すれば親和性は 1/10 に低下している。

性能のよい恒温泳動装置を利用すれば、ある相互反応の諸種の温度における解離定数を求め、得られた値から、その相互反応の熱力学的解析が可能となる。

3. 検出法の感度

親和電気泳動法の理論の項で述べたように、親和電気泳動法による解離定数の算出式は泳動ゲルに抱埋した親和リガンドの濃度 (全濃度、 c) が遊離の親和リガンド濃度と近似的に等しいという前提のもとに建てられている。すなわち、泳動ゲルに抱埋した親和リガンドの濃度が泳動されるたんぱく質のゲル内の濃度に比べ十分に高く保たれていることである。例えば、抗原・抗体反応のように親和性の極めて高い相互反応の場合に、色素染色法のような検出感度の低い検出法を利用すれば、使用抗体量は多くなり、上の前提を満たすためには泳動ゲルに抱埋する抗原濃度を高めなければならず、その結果、殆どすべての抗体は抗原と結合し、泳動速度がゼロに近づき、抗体の泳動速度を正確に計測することが不可能となる。他方、抱埋する抗原濃度を下げると、抗体の分離が不鮮明となるだけでなく、再現性のよい泳動像は得られない。このような場合には高感度検出法を利用して使用抗体量を可及的に低下させることが必要である。後述するように、このような配慮のもとで、抗原刺激によって生成した抗体を 2 次元親和電気泳動法と 2 重抗体検出法を利用することによって構成免疫グロブリン分画に完全分離¹²⁾ することに成功している。

親和電気泳動法の応用^{1,13)}

1. 酵素反応

AEP が最も多く利用されている領域である。酵素と基質、阻害剤、補酵素誘導体等との相互反応が報告されている。フォスホリラーゼとグリコーゲンとの相互反応の解析⁴⁾ (1970~1972) は AEP の出発点であり、この方法による解離定数の測定は電気泳動法によって求められた最初のものである。

2. レクチンと糖および糖たんぱく質との相互反応

AEP によるレクチンの糖結合特性の解明とアイソレクチンの検出・同定、特に、体液ならびに、組織抽出液中の異常糖たんぱく質の検出は臨床化学の領域で広く利用されている方法である。

3. 核酸とたんぱく質の反応

DNA とヒストンとの反応などの DNA とたんぱく質の相互反応は結合親和性が非常に高く、生理的条件下で、その結合反応を AEP を用いて解析することは困難であるが、近年 Gel-Mobility-Shift Electrophoresis が開発され、DNA 結合たんぱく質の検出・分離に利用されている。

親和電気泳動法による抗原抗体反応の解析

1. 1 次元親和電気泳動法によるデキストラン結合性ミエローマたんぱく質の結合特性の検討¹⁴⁾

Balb/c マウスに誘導したミエローマにはデキストランと特異的に結合する免疫グロブリンを産生するものがある。これらのうち、IgA に属する QUPC 52 と W 3129 の 2 種のミエローマたんぱく質について諸種の糖鎖構造をもつデキストラン及びイソマルトース型小糖類に対する親和性をそれぞれ基本親和式及び阻害親和式を利用して計測した。

デキストラン等の高分子に対する親和性はこれまで方法論がなく報告されていなかったが、親和電気泳動法を利用し、基本親和式を用いれば、簡単に求めることができる。諸種の糖鎖構造を持つデキストランに対する親和性は W 3129 と QUPC 52 の間に大きな差はなく、結合定数 (K_a : 解離定数の逆数 $1/K_d$) として 10^4 ml/g オーダーのものであった。親和性は $\alpha(1\rightarrow6)$ D-グルコシッド結合 (イソマルトース型グルコシッド結合) を主体とするデキストランに対して特異的であって、 $\alpha(1\rightarrow4)$ D-グルコシッド結合を主体とするグリコーゲン、あるいは、 $\alpha(1\rightarrow4)$ D-と $\alpha(1\rightarrow6)$ D-グルコシッド結合を交互に持っているプルランに対しては全く親和性を示さなかった。

イソマルトース型小糖類に対して得られた親和性は透析平衡法¹⁵⁾で得られた値とよく一致した。すなわち、W 3129 では糖鎖数の増加につれて親和性は増強し、イソマルトペンタオース (IM₅) で最大 [結合定数 (解離定数の逆数) $6.72 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$] となり、糖鎖がそれより延長すると、親和性はかえって減弱した。QUPC 52 では親和性はイソマルトヘキサオース (IM₆) で極大 (結合定数 $1.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) に達し、それ以上に糖鎖が延長しても親和性は殆ど変化しなかった。すなわち、W 3129 と QUPC 52 は共にデキストラン結合性の免疫グロブリンであるが、抗原結合部位の構造に差異のあるミエローマたんぱく質であることが確認できた。

2. 2 次元親和電気泳動法によるうさぎ抗ハプテン抗体のハプテンに対する親和性の算出¹⁶⁾

抗原刺激によって生成し血清中に出現する抗体は高度に不均一である。単純な構造を持つハプテンに対する抗体であっても同様である。このような不均一抗体を夫々の均一抗体分画に分離することは抗体の最も特徴的な性状である不均一性の検索、すなわち、抗体産生の機構の解明、特に、抗体のたんぱく質構造および抗体構造の抗原結合親和性との関係を解明するために必要であるだけでなく、癌化等の病変の抗体産生に及ぼす影響を検索するためにも必要な事項である。

これまで抗体の分離のために等電点分画法や、いわゆる 2 次元電気泳動法の適用の報告はあるが、不均一抗体の分離は成功していない。そのため、抗体の不均一性の研究は主にハプテン結合性ミエローマたんぱく質、あるいは、細胞融合技術によって調製された単クローン性抗体の分析に負っている。しかし、これらの抗体試料は不均一抗体を構成する多クローン性免疫グロブリンの一部分を by chance に獲得して分析したのであって、そのような研究から抗体産生の全体像を明らかにすることは困難である。

抗体のように、ほぼ同一な分子量を持ったたんぱく質から構成された混合試料を分離する場合に、一般の 2 次元電気泳動法は無力である。それに対して、1 次元目に等電点分画法 (IEF)、2 次元目に親和電気泳動法 (AEP) を適用し、抗体分子を等電点と抗原結合親和性の両面から分離するのは有効である。この新しい 2 次元電気泳動法を 2 次元親和電気泳動法¹⁶⁾と呼び、その開発、応用につとめてきた。

Fig. 1 は精製したうさぎ抗ジニトロフェニール (DNP-) 抗体の 2 次元親和電気泳動像である。1 次元目にポリアクリルアミド・ゲル平板式-IEF、2 次元目に可溶性アクリルアミド-アリアルアミン共重合体にジニトロフェニール基を導入したものを親和リガンドとして平板ゲルによる AEP を行った後、銀染色法で染色した場合の泳動像 (Fig. 1-B) である。対照として、2 次元目の泳動に親和リガンドを含まない場合の泳動像を 1-A に示した。図からわかるように、親和リガンドが存在しない場合には、この抗体は pH 4.7~8.3 の領域に pI を持つが、分子量はほぼ同一で横 1 本のブロードなバンドとして泳動する。これに対し、親和リガンドが存在する場合には抗体はゲル中に抱埋・非動化した親和リガンドと結合して泳動速度を減じる。親和性の高いものほど泳動速度の減少が著しい。すなわち、1-B の場合には、親和性はス

Fig. 1. Two-dimensional affinity electrophoresis of anti-DNP antibody.

A and B: Electrophoresis patterns obtained with the gels in the absence (A) and in the presence (B) of DNP-polyacrylamide conjugate at a concentration of 0.01 mM. Protein was stained by silver staining.

ポット $a < b < c$ の順に高い。抗体の分離が十分でなく構成成分を個々の独立したスポットに分離することは困難であるが、Fig. 1-A と 1-B とから基本親和式に従って計算した解離定数の指数 (pK_d) を縦軸に、デジトメトリーによって求めたたんぱく質濃度を横軸にしてプロットすれば Fig. 2 をうる。すなわち、この抗体は親和性に対する濃度分布は複数の極大を有する不規則なものであるが、解離定数が $10^{-4} \text{ M} \sim 10^{-6} \text{ M}$ の範囲にある高度に不均一な抗体であることが推測された。

3. 2次元親和電気泳動法の改良と抗ハプテン抗体の完全分離^{12,17)}

検出法の感度の項で述べたように、再現性のよい親和電気泳動像を得るためには試料たんぱく質に比べ親和リガンドが十分過剰に存在していることが必要である。Fig. 1 の泳動像における抗体の分離が十分でない理由はこの点にある。この問題を解決するために、1次元目の泳動を毛細管等電点分画法、2次元目の親和電気泳動法によって分離された抗体の検出法をニトロセルローズ膜へのプロットと、やぎ抗うさぎ-IgG・IgM 抗体とペルオキシダーゼ抱合うさぎ抗やぎ IgG-抗体を用いた2重

Fig. 2. Densitometric pattern of two-dimensional affinity electrophoresis in pK_a scale.

抗体検出法を改め、 $1 \sim 3 \mu\text{g}$ の微量の抗体試料を分離できる高感度2次元親和電気泳動法を開発した。Fig. 3 に結果の1例を示した。3-A は毛細管等電点分画法の泳動像、3-B は対照として2次元目の泳動を親和リガンドを含め泳動ゲルを用いた場合、3-C は2次元目の泳動を $250 \mu\text{m}$ の可溶性 DNP-アクリルアミド・アリアルアミン共重合体を親和リガンドとして用いた場合の泳動像である。

親和リガンドを含まない対照ゲル (Fig. 3-B) では、抗体の殆どは pH 5 から 8.5 にわたる領域にやや幅の広い1本のバンドとなって泳動している。ごく弱い IgM-スポットが陽極側のコーナーに検出されるが、殆どすべてのスポットは IgG クラスの免疫グロブリンである。一方、Fig. 3-C に見られるように、 $250 \mu\text{m}$ の親和リガンドを含む泳動ゲルの泳動像は特徴的であって、この抗 DNP-抗体は数百個の IgG-スポットに分離され、高度に不均一な標品であることを示している。これらのスポットは横一列に並んだ、すなわち、親和性は等しいが pI の異なる $5 \sim 8$ 個のスポットからなる多数の群 (family) に組分けすることができる。Fig. 3-C に示したように、明瞭に組分けられる群に $a \sim u$ の記号を付した。このように、ここに示した2次元親和電気泳動法の分離能は非常に高く、解離定数の差が 5% 程度の IgG-群を

Fig. 3. Two-dimensional affinity electrophoresis pattern of anti-DNP antibody.

A: Isoelectric focusing pattern after staining with Coomassie BBR-250. B and C: Two-dimensional affinity electrophoresis pattern in the absence (B) and in the presence (C) of DNP-polyacrylamide conjugate at a concentration of 0.25 mM. Protein was visualized by double antibody staining.

互いに明瞭に区別できる。これらの IgG-群を構成するスポットは次の理由からそれぞれ単一なクローンに由来する IgG であると考えられる。

(1) 親和性が同一であることは抗体の抗原結合部位の立体構造が同一であるためと考えられる。すなわち、IgG の可変領域のアミノ酸配列が同一であるためと考えられる。pI の差は転写生成以後の結合部位以外の部位のペプチド鎖の修飾(糖鎖の形成と成長, 脱アミド反応等)のため荷電が変化したことによると考えられる。

(2) 抗 DNP-抗体は DNP の同属体である TNP に対しても親和性を示す¹⁸⁾。しかし、一般には TNP (trinitrophenyl-基) に対してよりも DNP に対してより強い親和性を示すが、TNP に対してより強い親和性を示す IgG 群も見出されている。この場合、DNP と TNP とに対する親和性の強弱は IgG 群によってそれ

ぞれ異なっているが、同じ群に属する IgG スポットはすべて同一の泳動態度を示し、DNP と TNP とに対する親和性の比は同一である。

(3) 抗 dansyl 抗体 (dansyl: dimethylaminonaphthylsulfonyl-基)¹⁷⁾ もその 2 次元親和泳動像から抗 DNP-抗体と同様に多数の単クローン性抗体群に分離できる。興味あることは、その大部分の抗体群は DNP に対する親和性を示さないが、わずかの数の抗体群は DNP に対してかなり高い交差親和性を示すことである。この場合にも、かかる交差親和性を示す抗体群は pI は異なるが、親和性は同一の数個の IgG スポットからなる抗体群である。

(4) デキストランに対して特異的な親和性を示すマウス・ミエローマたんぱく質を 2 次元親和電気泳動法で分離すると¹⁹⁾、上記の抗ハプテン抗体の各抗体群と同様に pI は異なるが、デキストランに対する親和性は等しい数個の抗体スポットに分離される。

以上のように、2 次元親和電気泳動法は不均一抗体を構成している全ての抗体分画をそれぞれの単クローンに由来する抗体に分離できる方法である。換言すれば、2 次元親和電気泳動法は抗体の完全分離を可能にする分離技術である。

4. 2 次元親和電気泳動法の応用

2 次元親和電気泳動法は抗体の不均一性と抗体産生機構を解明するための有力な手段を与える。この方法によって抗体は均一な IgG スポットとして分離されるので、目的の単一抗体を分離するための調製法として利用できるだけでなく、1 枚の 2 次元親和電気泳動像から個々の IgG スポットのハプテンに対する解離定数を算出することができる。このような特性を持つ 2 次元親和電気泳動法は抗原刺激によって産生される多クローン性抗体の生成機構をたんぱく質化学のレベルでの解明の可能性を与えるものである。

親和電気泳動法の特徴

1) 試料を精製することなく混合試料のまま解析が可能である。一般の物理化学的分析法を利用する場合には、予め、試料たんぱく質を分離・精製する必要があるが、AEP の場合には、試料たんぱく分画を他のたんぱく分画から容易に区別できるので、試料を精製する必要がない。

2) 高分子間の相互反応の解離定数が算出可能である。生物学的試料の相互反応の解離定数の算出にあたっては、平衡透析法がよく利用されているが、抗体とハブ

(146) 生物物理化学

テンとの反応のように、小分子の親和リガンドとの反応には利用できるが、高分子間の相互反応には応用できない。これに対し、AEP は高分子、低分子いずれの親和リガンドに対しても利用できる方法である。

3) 解離定数の算出が簡便である。特に、抗-DNP-抗体の2次元親和電気泳動法によって抗体は数百のスポットからなる個々の IgG 分画に分離されるが、得られた泳動パターンから、直接、個々のスポットの DNP-ハプテンに対する解離定数を読み取ることができる。

本論文は第 43 回電気泳動学会総会における特別講演をまとめたものである。特別講演の機会を与えられたことに対して総会長大阪医科大学病態検査学 林泰三教授に心よりの謝意を表すとともに、1970 年に親和電気泳動法の開発を開始して以来今日まで、指導、協力を賜り、親和電気泳動法の発展のために尽力を頂いた先輩、同僚の方々に対してご芳名を記し、心からの感謝の意を表します。

T. C. Bøg-Hansen	E. A. Kabat
桑原 亮	中村和行
中村和行	鈴木亮輔
田中経彦	三村雄輔
三村雄輔	藤本正憲
山下勝之	渡木邦彦
渡木邦彦	鈴木 公
高尾 明	矢壁昭人
矢壁昭人	広田正幸
成松昭夫	田中隆穂
田中隆穂	富松 健
井上信一	斉藤 剛
斉藤 剛	柏木史郎

文 献

- 1) Takeo K. Affinity electrophoresis. In: Chrambach A, Dunn MJ, Radola BJ, editors. *Advances in electrophoresis* Vol. 1. New York: VCH, 1987: 229-279.
- 2) 竹尾和典. 親和電気泳動法の展望. 生物物理化学 1990; 34: 161-3.
- 3) Bøg-Hansen TC, Takeo K. Determination of dissociation constants by affinity electrophoresis: Complexes between human serum proteins and concanavalin A. *Electrophoresis* 1980; 1: 67-71.
- 4) Takeo K, Nakamura S. Dissociation constants of glucan phosphorylases of rabbit tissues studied by polyacrylamide gel disc electrophoresis. *Arch Biochem Biophys* 1972; 153: 1-7.
- 5) Takeo K, Nakamura S. Dissociation constants of phosphorylases to oligo- and polyglucans studied by the affinity electrophoresis. In: Hoffmann-Ostenhof O, et al, editors. *Affinity chromatography*. Oxford and New York: Pergamon, 1977: 67-70.
- 6) Laurell CB. Antigen-antibody crossed electrophoresis. *Anal Biochem* 1965; 10: 358-61.
- 7) Bøg-Hansen TC. Crossed immuno-affinoelectrophoresis. *Anal Biochem* 1973; 56: 480-8.
- 8) Ornstein L. Disc electrophoresis—I Background and theory. *Ann NY Acad Sci* 1964; 121: 321-49.
- 9) Davis BJ. Disc electrophoresis—II Method and application to human serum proteins. *Ann NY Acad Sci* 1964; 121: 404-27.
- 10) 竹尾和典, 鈴木亮輔, 藤本正憲, 桑原 亮, 中村和行. 高温ディスク電気泳動装置: コンカナバリン A の糖結合反応の熱力学的解析への応用. 生物物理化学 1982; 26: 173-7.
- 11) 竹尾和典, 中村和行, 鈴木亮輔, 田中経彦, 三村雄輔. 2次元親和電気泳動法. 生物物理化学 1991; 35: 1-10.
- 12) Takeo K, Suzuno R, Tanaka T, Nakamura K. Complete separation of antihapten antibodies by two-dimensional affinity electrophoresis. *Electrophoresis* 1989; 10: 813-8.
- 13) 竹尾和典. 電気泳動学会編, 親和電気泳動法. 東京: 文光堂, 1989: 448-465.
- 14) Takeo K, Kabat EA. Binding constants of dextrans and isomaltose oligosaccharides to dextran-specific myeloma proteins determined by affinity electrophoresis. *J Immunol* 1978; 121: 2305-10.
- 15) Cisar J, Kabat EA, Dorner MM, Liao J. Binding properties of immunoglobulin combining sites specific for terminal or nonterminal antigenic determinants in dextran. *J Exp Med* 1975; 142: 435-59.
- 16) Takeo K, Suzuno R, Fujimoto M, Tanaka T, Kuwahara A. Studies on heterogeneity of anti-DNP antibody by means of two-dimensional affinity electrophoresis. In: Stathakos D, editor. *Electrophoresis '82*, Berlin-New York: Walter de Gruyter, 1983: 277-283.
- 17) Takeo K, Tanaka T, Nakamura K, Suzuno R. Studies on the heterogeneity of anti-hapten antibodies by means of two-dimensional affinity electrophoresis. *Electrophoresis* 1989; 10: 813-18.
- 18) Takeo K, Suzuno R, Tanaka T, Fujimoto M, Kuwahara A, Nakamura K. Two-dimensional affinity electrophoresis: its application to separation of individual immunoglobulins from heterogeneous antibodies. *Proteides Biol Fluids* 1984; 32: 969-72.
- 19) Mimura Y, Nakamura K, Takeo K. Analysis of the interaction between an α (1→6) dextran specific mouse hybridoma antibody and dextran B₅₁₂ by affinity electrophoresis. *J Chromatogr* 1992; 597: 345-50.