〔原 著〕

交差親和免疫電気泳動法による α_1 -antichymotrypsin の 基礎的検討と臨床応用

新井雅信*,**・中津雅美*・袖山信幸**・三條伸夫**・三谷雅人**
小林一成**・織茂智之**・芝紀代子***

SUMMARY

We investigated the heterogeneity of α_1 -antichymotrypsin (ACT) with crossed immunoaffino-electrophoresis (CIAE) moieties. Favourable electrophoretic conditions were obtained when the concentration of concanavalin A in gels of the first dimension was 0.1%, concentration of anti-ACT antibody in gels of the second dimension was 0.3%, and staining used 4-methoxy-1-naphthol. Several sera and cerebrospinal fluids from normal controls and patients of Parkinson's disease and dementia of Alzheimer type (DAT) were examined by this method. Similar four bands were observed, respectively. They were named ACT 1, ACT 2, ACT 3, and ACT 4 from the cathode side. Sera and cerebrospinal fluids of PD and DAT have some specific finding from those of normal controls. Serum ACT4 was increasing compared PD and DAT with normal controls and cerebrospinal fluid ACT 1, ACT 4 were decreasing compared DAT with normal controls. This method seems to be useful to study for low amounts of glycoproteins in body fluids.

Key words: α_1 -antichymotrypsin, cerebrospinal fluid, concanavalin A, crossed immunoaffinoelectrophoresis, dementia of Alzheimer type.

はじめに

α_1 -antichymotrypsin (ACT) はアルツハイマー型痴呆 (DAT) の病理学的特徴である老人斑の構成蛋白の一つで¹⁾, 臨床的に血清, 髄液中の総定量値が DAT の診断マーカーとなりうることが示唆されている²⁾. われわれの検討では血清, 髄液中の ACT の定量的検討で対

照群と DAT 群とで有意差がなかったが³⁾, 等電点電気泳動法による ACT の microheterogeneity (MH) についての検討では一部に差がみられた⁴⁾. それゆえ ACT の DAT における病態との関連性や診断マーカーとしての応用には, より詳細な検討が必要と思われる. そこで, 本論文では ACT の糖鎖の違いが疾患特異的に存在する可能性を検討する目的で, 交差親和免疫電気泳動

α_1 -Antichymotrypsin heterogeneity with crossed immunoaffinoelectrophoresis: basic investigation and clinical application.

* Masanobu Arai, Masami Nakatu; 関東通信病院第 2 研究部

** Nobuyuki Sodeyama, Nobuo Sanjou, Masato Mitani, Kazushige Kobayashi, Satoshi Orimo; 同, 神経内科

*** Kiyoko Shiba; 東京医科歯科大学医学部保健衛生学科

Correspondence address: Masanobu Arai, 2nd Department of Research Divisions, Kanto Teishin Hospital, 5-9-22, Higashi-Gotanda, Shinagawa-ku, Tokyo 141, Japan.

(受付 1993 年 10 月 18 日, 受理 1994 年 1 月 5 日)

Abbreviations: AGP, α_1 -acid glycoprotein; ACT, α_1 -antichymotrypsin, AFP, α -fetoprotein; Con A, concanavalin A; CIAE, crossed immunoaffinoelectrophoresis; DAT, dementia of Alzheimer type; HRP, horse radish peroxidase; α MG, methyl- α -D-glucopyranoside; PD, Parkinson's disease.

法 (CIAE) に着目し, ACT の臨床上への導入に関する基礎的検討を行うとともに血清, 髄液の数例について適用し, 臨床例での若干の知見を得たので報告する.

対象・方法

CIAE は石黒らの手法に準じた³⁾. 一部改良して ACT の MH として新たに検討した. 一次元, 二次元とも CIAE の支持体には 1% アガロース (Seaplaque, マリンコロイド社) を, 親和性リガンドにはコンカナバリン A (Con A, ホーネン) を, 泳動緩衝液には 1mM トリス・バルビタール (pH 8.6) を用いた.

一次元目のゲルは, 自家製の 100×100×0.5 mm のテンプレートを用いて, 0.1% Con A を含有したゲルを注入して作製し, 150 V の定電圧で 60 分泳動した. 泳動後, 各レーンを切り離して抗ヒト ACT ウサギ血清 (ダコ社) を含んだ二次元ゲルに重層し, CIAE を行った. 二次元目のゲルは 115×120×0.5 mm のプレートに 1% アガロース, 抗 ACT 血清, 2% の methyl- α -D-glucopyranoside (α MG, シグマ社) を溶解後注入固化し, 120 V の定電圧で一晩泳動した. 二次元目の泳動終了後, 1/15M リン酸緩衝液 (pH 7.2) で 3 回洗浄し, 0.5% の HRP 標識 Protein A (ザイメット社) で 30 分間室温で反応させ, 再びリン酸緩衝液で 3 回洗浄, 沈降線上の HRP を染色した. 基礎的検討にはあらかじめ ACT 濃度がわかっている標準血清を希釈して行った. 本法による臨床応用の試みとして, 対照群, DAT, パーキンソン病 (PD) の血清, 髄液を使用した.

結 果

1. 一次元ゲル中の Con A の有無による血清 ACT 泳動像

Fig. 1 A は Con A を添加していない ACT の泳動像である. ピークは一つしか確認されなかった. Fig. 1B は一次元目に 1mg/ml の割合で Con A を含んだゲルで泳動したものである. Con A との相互作用の結果, ACT の糖鎖の heterogeneity に基づく四つのピークが認められた.

2. 一次元ゲル中の Con A 濃度による血清 ACT 泳動像

0.025% と低濃度の Fig. 2 A において ACT のピー

Fig. 1. Effect of concanavalin A on serum ACT patterns.

(A) concanavalin A was omitted, (B) 0.1% concanavalin A was added.

Fig. 2. Effect of the different concentration of concanavalin A on serum ACT patterns.

(A) 0.025%, (B) 0.05%, (C) 0.1%, (D) 0.2%.

クは1本の幅広いバンドとしてしか認められなかった。Bの0.05%では4本のピークが認められたが、そのピークは不鮮明であった。Cは0.1%、Dは0.2%のCon A濃度での泳動パターンだが、いずれも4本の鮮明なピークがみられ、C、Dの泳動像には明らかな差が認められなかった。レクチン濃度が低いほど泳動時間が短くてすみ、かつ泳動時の発熱が少なく抑えられることから、今回の条件では0.1% Con A濃度が最適であると思われた。

3. 二次元ゲル中の抗 ACT 濃度による血清 ACT 泳動像

二次元目の抗 ACT 濃度の至適条件を検討した。髄液中の ACT 濃度は0.1~0.3 mg/dl の範囲である。髄液は採取量に限界があり、検体としては少ないほどよいが、そのままの検体では目的とする ACT の MH が検出できず、10 倍濃縮で検出可能であることが予備実験でわかった。そこで約 10 倍濃縮してこれに近い 1 mg/dl 程度にしたサンプルを用いて抗 ACT 血清の至適濃度を調べた。

Fig. 3 は抗 ACT 血清を 0.1, 0.2, 0.3, 0.4% の濃度で作製したゲルの泳動像である。各濃度における左の泳動パターンの ACT 濃度は 1.4 mg/dl、右は 2.7 mg/dl である。抗 ACT 濃度が高くなるほど沈降線の高さは低くなった。0.1, 0.2% 濃度では沈降線の高さとして

Fig. 3. Effect of the different concentration of anti-ACT antibody on serum ACT patterns.

(A) 0.1%, (B) 0.2%, (C) 0.3%, (D) 0.4%.

Serum ACT concentration of the left pattern was 1.4 mg/dl and ACT concentration of right pattern was 2.7 mg/dl.

適当だが、その沈降線を染色するとき、沈降線が弱いと染色できにくい。その点 0.3%, および 0.4% では沈降線が強いため明確に染色された。0.4% では 0.3% に比べピークが低くなっているのは、抗体過剰のためと考えられる。より沈降線がみやすいということから 0.3% を採用した。

4. 染色法の選択

抗原・抗体複合物として出現した沈降線を Protein A と結合させ、Protein A にラベルされている HRP を染色する方法を採用した。そして転写膜上の HRP の染色法として diaminobenzidine 法、3-amino-9-ethylcarbazole 法、コニカイムノステイン HRP (コニカ)、4-methoxy-1-naphthol 法について検討したところ、4-methoxy-1-naphthol 法がきわめて鮮明な泳動像が得られたのでこの方法を染色法として採用した。

5. 臨床応用

Fig. 4 の A, B は器質的疾患のない対照群である。A の症例 M.E. は 31 歳・女性、筋収縮性頭痛の患者で ACT 濃度は髄液 0.18 mg/dl、血清 26.9 mg/dl、B の症例 T.T. は 51 歳・男性、左上肢のしびれ感を主訴とした高脂血症の患者で、ACT 濃度は髄液 0.16 mg/dl、血清 25.2 mg/dl である。いずれもかなり類似したパターンを示した。ACT の各ピークを陰極側から便宜的に ACT 1, ACT 2, ACT 3, ACT 4 とすると、髄液、血清ともにピークの高さは ACT 1, ACT 3, ACT 4, ACT 2 の順となった。よく観察してみるといずれの症例も ACT 4 において血清に比べ髄液のほうが高い傾向がみられた。

Fig. 4 C, D は PD の患者で、C の症例 I.S. は 70 歳・女性、罹病期間 1 年 2 カ月の軽度例で、ACT 濃度は髄液 0.40 mg/dl、血清 36.4 mg/dl、D の症例 T.H. は 59 歳・男性、罹病期間約 6 年の中等度の患者で ACT の定量値は髄液 0.33 mg/dl、血清 23.7 mg/dl であった。パターンをみると血清において ACT 4 が対照群に比べ高値であった。また髄液では D の中等度の症例で ACT 4 が低下傾向にあることが注目された。

Fig. 4 E, F は DAT 患者で、E の症例 S.T. は 77 歳・女性、罹病期間約 1 年の軽度例で ACT 濃度は髄液 0.34 mg/dl、血清 41.2 mg/dl、F の症例 S.Y. は 72 歳・女性、罹病期間約 3 年の中等度例で ACT 濃度は髄液 0.31 mg/dl、血清 39.0 mg/dl である。その泳動像をみると髄液においては ACT 1, ACT 4 が減少し、ACT 2 の増加が観察された。血清では PD 患者同様、ACT 4 が増加する傾向を示した。

Fig. 4. Electrophoretic patterns of serum ACT and cerebrospinal fluid ACT. Normal controls (A, B), patients of Parkinson's disease (C, D) and dementia of Alzheimer type (E, F). CIAE patterns of cerebrospinal fluids are on the left and those of sera are on the right, respectively.

考 察

ACT は急性期炎症蛋白として知られ、免疫応答の調節においては killer T cell の作用と抗体依存性の細胞障害を抑制し、抗体の反応を増強する機能をもっている。CIAE による糖蛋白の解析に関しては α -fetoprotein (AFP) や α_1 -acid glycoprotein (AGP) とともに ACT についても試みられており、またその臨床応用がなされている⁶⁻⁸⁾。報告例はすべて血清を測定している。Pawlowski らはリウマチ性多発筋痛症/巨細胞性動脈炎と多発筋炎/皮膚筋炎との鑑別は AGP, ACT の定量値, CIAE での AGP, ACT の MH のレクチンとの親和性成分の比率から可能であると報告している⁹⁾。さらに, Hachulla らは血清の ACT を Con A を用いて CIAE で検討し, Con A と反応しない成分は敗血症のような急性炎症では減少し, 慢性炎症では不変, 膠原病のような慢性炎症に急性悪化をきたす病態では増加することを報告している⁸⁾。われわれが調べた限りでは, CIAE による ACT の MH を DAT, PD などの神経変性疾患に適用した報告はなかった。血清, 髄液中の ACT が DAT の診断マーカーになる可能性については松原らにより報告されたが²⁾, その信頼性については異論がある⁹⁾。事実われわれが検討したところ DAT では ACT が高値傾向を示す症例は多かったが, 対照群との間に有意差は認められなかった³⁾。しかし, ACT の DAT の病態における重要性を考えると, ACT の詳細な検討は必要と思われる。今回少数例での検討ではあるが対照群, PD, DAT の患者の血清, 髄液において CIAE を用いた ACT の MH のパターンについてみたところ差異が認められた。血清においては対照群に比べ, PD, DAT とともに ACT 4 が増加傾向にあった。髄液においては対照群に比べ, DAT では ACT 4 が明らかに減少した。この結果はさらに診断上への応用に利用されうる価値があると思われる。Lampereave らは AFP, AGP や fetuin, transferrin, α_1 -antitrypsin の五つの糖蛋白の glycosylation のパターンの変化を CIAE で Con A との親和度からその MH を検討し, 生体内の糖蛋白の機能の解明に CIAE が有用と述べている¹⁰⁾。

本法は生体で重要な機能を果たしている多くの糖蛋白の詳細な解析にも応用可能でありまた, 髄液などの蛋白濃度が低い体液にも導入できることからきわめて有用と思われた。

文 献

- 1) Abraham CR, Selkoe DJ, Potter H. Immunochemical identification of serine protease inhibitor α_1 -antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Cell* 1988; 52: 487-501.
- 2) 松原悦郎, 甘利雅邦, 東海林幹夫, 針谷康夫, 山口晴保, 岡本幸市, 平井俊策. アルツハイマー型老年痴呆における血清 α_1 -antichymotrypsin 測定の意義. *医学のあゆみ* 1988; 145: 907-8.
- 3) 新井雅信, 石田和之, 下川雅文, 沖山亮一, 織茂智之, 冷牟田英三, 中山智子, 中津雅美, 芝紀代子. 痴呆性疾患における血清 α_1 -アンチキモトリプシンとその microheterogeneity. *生物物理化学* 1990; 34: 263.
- 4) 新井雅信, 中津雅美, 塩尻俊明, 三苫 博, 沖山亮一, 織茂智之, 玉城允之, 芝紀代子. 神経疾患における血清, 髄液の α_1 -アンチキモトリプシンとその microheterogeneity. *生物物理化学* 1991; 35: 359.
- 5) 石黒達也. レクチン吸着交叉免疫電気泳動法. *医学のあゆみ* 1987; 38: 432-4.
- 6) 石黒達也, 坂口日出男, 福井正憲, 杉立市兵衛. 新しい高感度レクチン吸着交叉免疫電気泳動内部標準システム—本法による α -フェトプロテイン (AFP) 低産生肝癌患者の血清 AFP 分画に関する成績—. *医学のあゆみ* 1984; 131: 384-8.
- 7) Pawlowski T, Aeschlimann A, Kahn MF, Vaith P, Mackiewicz SH, and Mueller W. Microheterogeneity of acute phase proteins in the differentiation of polymyalgia rheumatica from polymyositis. *J Rheumatol* 1990; 17: 1187-92.
- 8) Hachulla E, Hayem A. α_1 -antichymotrypsin microheterogeneity in crossed immunoaffino-electrophoresis with free Concanavalin A: a useful tool in inflammatory syndrome. *Clin Chem* 1988; 34: 911-5.
- 9) 眞重文子, 三上恵世, 大久保滋夫, 和田博夫, 飯島 節, 清水輝夫, 星野信広, 大久保昭行. アルツハイマー型痴呆およびその他の脳神経疾患における血清および髄液の急性期反応物質—とくに α_1 -アンチキモトリプシンの変動について. *生物物理化学* 1992; 36: 119-24.
- 10) Lampereave F, Alava MA, Pineiro A. Concanavalin A crossed affinoimmunoelectrophoretic analysis of the major pig serum proteins during fetal development. *Electrophoresis* 1993; 14: 214-9.

要 旨

著者らは α_1 -antichymotrypsin (ACT) の糖鎖の違いが疾患特異的に存在するか否かを検討する目的で, 交差

親和免疫電気泳動法 (CIAE) に着目した。CIAE は一次元、二次元とも支持体に 1% アガロース、親和性リガンドにはコンカナバリン A (Con A) を用いた。基礎的検討から一次元ゲルの Con A 濃度は 0.1%, 二次元ゲルの抗 ACT 抗体濃度は 0.3%, 染色法は 4-methoxy-1-naphthol 法が最も優れていることが判明した。数例の対照群, アルツハイマー型痴呆 (DAT) 患者, パーキ

ンソン病 (PD) 患者の血清, 髄液を本法に適用した。いずれのサンプルも類似した 4 本より構成されるピークが認められたので, 最も陰極側のピークから ACT1~4 と名づけた。血清 ACT4 は対照群に比べ, PD, DAT では増加傾向を示し, 髄液 ACT1, ACT4 では対照群に比べ DAT で低下傾向を示した。本法は蛋白濃度の低い体液の糖蛋白の検討に有用と思われた。