〔原 著〕

免疫電気泳動で2本の沈降線が認められた IgA₂m(1) 良性 M-蛋白症例

橋本寿美子*・星野 忠**・橋本正勝**・熊坂一成**・河野均也**

SUMMARY

Serum from 56 year-old male patient with moderately elevated β -fraction by cellulose acetate electrophoresis was investigated. Immunoelectrophoresis of the serum showed obvious M-bow formation with anti-IgA antibody and also found to have another faint precipitation line which showed spur formation with the M-protein. Single Radial Immunodiffusion method for quantitation of IgA showed double precipitation rings. Initially we speculated that the M-protein as the half molecular IgA. Although, Sephacryl S-300 gel filtration of the M-protein did not show any molecular aberrations. Also Jacalin, a lectin which is known to bound specifically to IgA₁ of the IgA subclass, could not absorb this M-protein. From those findings described above, the M-protein in this patient was thought to be IgA₂ type. In addition to this, SDS-PAGE under non-reducing condition showed discrete band at 45 K_d and thought to be dimetric free light chains of the immunoglobulin. Since it was known that IgA₂m(1) allotype easily release dimetric light chains from the IgA molecules in SDS-PAGE under non-reducing condition, we concluded that the M-protein in this patient as the IgA₂m(1) allotype.

Key words: IgA benign monoclonal gammopathy, IgA double precipitate line, IgA binding lectin (Jacalin), IgA₂ subclass, IgA₂m(1) allotype.

はじめに

セルロース・アセテート膜(セ・ア膜)電気泳動で β 分画がやや高値を示し、微量のM-蛋白血症が疑われた症例の免疫電気泳動を実施したところ、抗IgA抗体に対してspurを形成する2本の沈降線が観察された。このような所見は半分子IgA型骨髄腫やIgA₂型の骨髄腫例で報告されている。今回、われわれは比較的まれなIgA₂m(1)-lambda型良性M-蛋白血症例を経験したので検討結果を報告する。

症 例

症例: 56歳, 男性
病歴: 平成3年から脳梗塞の経過観察のため日大板橋病院・神経内科に通院中である。臨床的には脳梗塞の後遺症以外に特別な訴えはなく、骨の打ち抜き像やBence Jones蛋白の出現など骨髄腫を疑わせる所見も認められていない。

A case of IgA₂m(1) benign monoclonal gammopathy showed double IgA precipitate lines on immunoelectrophoresis.

* Sumiko Hashimoto; 日本大学板橋病院臨床検査部

** Tadaki Hoshino, Masakatu Hashimoto, Kazunari Kumasaka, Kinya Kawano; 同, 医学部臨床病理
Correspondence address: Sumiko Hashimoto, Department of Clinical Laboratory, Itabashi Hospital, Nihon University School of Medicine, 30-1 Ohyaguchi Kami-machi, Itabashi-ku, Tokyo 173, Japan.
(受付 1993年12月29日, 受理 1994年2月17日)

検討方法

1. 電気泳動法

セラフォー膜を支持体とする全自動電気泳動装置（コスモ FED-3200）にて血清蛋白分画を、免疫電気泳動法はチバ・コーニング製寒天免疫電気泳動用ゲル・キットを、免疫固定電気泳動は Beckman 社製 Paragon IFE・キットを用い、おのこの操作はキットの説明書に従って行った。抗血清は抗 IgG (γ 鎖), IgA (α 鎖), IgM (μ 鎖), lambda, kappa (いずれも Beckman 社製) を用いた。

2. 免疫グロブリン定量

① 免疫比濁法: Beckman 社製 Array protein system にて Beckman standard を用いて IgG, IgA, ならびに IgM の測定を行った。

② SRID 法: 抗 IgA (Beckman 社製) を 8% (v/v) の割合になるよう寒天ゲルを自家調製し、Beckman standard を用いて行った。

3. ゲル濾過法

Sephacyl-S-300 ゲルを充填した径 6.5×63cm のカラムを用い、患者血清 0.5 ml を 1/15 mol リン酸緩衝生理食塩液 pH 6.4 にて 10 倍希釈し、カラムに添加し、同緩衝液にて展開し分子量の検索を試みた。

4. SDS-PAGE の Immunoblot 法による分子量測定

ゲル濾過後の試料を非還元下で 7.5% SDS-PAGE にて 18mA, 1 時間電気泳動後、ニトロセルロース膜に 80 mA, 1 時間 blotting し、第一抗体としてウサギ抗ヒト IgA (α 鎖) 抗体、ならびにウサギ抗ヒト λ 抗体 (ともに Dako 社製) と反応させ、第 2 抗体として POD 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Dako 社製) を用いる酵素抗体法にて IgA (α 鎖) と λ を染色し、分子量の検索を行った。

5. IgA 結合レクチンとの検討

パンの木の種子から抽出したレクチンの一種である Jacalin が IgA₁ と親和性を示す性質を利用し、右田ら¹⁾の方法にしたがい、Jacalin 塗布チップ (富士薬品 (株) 製) を用いてマイクロペットで 10 μ l の患者血清を吸引し、IgA₁ を吸収させるため数秒間放置し、血清を試験管に排出させた。吸収後の血清について免疫電気泳動を行った。

6. 抗 IgA₂ モノクローナル抗体との反応性の検討

抗 IgA₂ モノクローナル抗体 (Zymed Laboratories 社製) と患者血清との間の反応を Ouchterlony 法を用

いて検討を行った。

成績

1. 電気泳動における検査所見

セ・ア膜電気泳動法: 総蛋白 7.8 g/dl で β 分画が 20.8% とやや高値を示した。

免疫電気泳動法: 抗 IgA 抗体と反応する沈降線が 2 本 fast- γ 位に認められ、そのうちの 1 本は明らかに M-bow を形成し、他の内側の沈降線と陰極寄りの部分で spur を形成しているのが観察された (Fig. 1)。

免疫固定電気泳動: 本症例の免疫固定電気泳動の結果、抗 IgA ならびに抗 λ 抗体でのおのこの 2 本ずつ同じ位置に蛋白帯が形成され、 α 鎖病は否定された (Fig. 2)。

2. 免疫グロブリン定量法

免疫比濁法にて測定した各免疫グロブリンは IgG 785 mg/dl, IgA 750 mg/dl, IgM 41 mg/dl と IgA の高値が認められた。SRID 法では IgA の測定に際し 2 重リングの形成が認められた。

3. ゲル濾過法 (Fig. 3)

コントロール血清の IgA が観察される部分に、本症

Fig. 1. Agar gel immunoelectrophoretic pattern of patient's serum.

Fig. 2. Agarose gel immunofixation electrophoretic pattern of patient's serum.

Fig. 3. Elution profile for patient's and control serum on Sephacryl-S-300 gel filtration.

Fig. 4. Immunoblotting of 7.5% SDS-PAGE under non-reducing condition F-1, F-2, F-3 fraction on Sephacryl-S-300 gel filtration.

C: control, M: marker proteins.

例では多量の蛋白が認められ、そのほとんどが IgA で占められていた。

4. SDS-PAGE の Immunoblot 法による分子量測定 (Fig. 4)

ゲル濾過で分取した分画について、非還元下 SDS-PAGE の immunoblot 法を行い、抗 IgA (α 鎖) 抗体との反応を検討したところ、およそ 24 万付近から 16 万にかけてスミアなバンドがみられた。抗 λ 抗体との間には、約 4.5 万に明瞭なバンドが認められ、 λ の 2 量体である可能性が考えられた。

Fig. 5. Reactivity of patient's serum with anti IgA₂ on double immunodiffusion method.

C₁~C₅: IgA monoclonal gammopathies, P: Patient's serum.

5. IgA 結合レクチンとの検討

レクチン (Jacalin) にて吸収後、免疫電気泳動を実施した結果、陰極寄りの部分で spur を形成していた内側の沈降線は Jacalin に吸収され、吸収されず残った IgA₂ の沈降線のみが認められた。

6. 抗 IgA₂ モノクローナル抗体を用いたオクタロニー法による検討

本患者血清と他の IgA 型 M-蛋白血症患者について抗 IgA₂ モノクローナル抗体を用いたオクタロニー法を行ったところ、本患者血清と抗 IgA₂ と反応する沈降線を認めた (Fig. 5)。

考 察

セ・ア膜電気泳動による血清蛋白分画像で、 β 分画に出現した極微小な M-蛋白を免疫電気泳動法により検索した結果、抗 IgA 抗体と反応し、正常 IgA の沈降線と spur を形成するもう 1 本の沈降線が観察される症例を経験した。さらに、本例においては SRID 法による IgA の定量を試みたところ、2 重リングの形成を認め、しかもセ・ア膜電気泳動上の M-蛋白量との間に大きな乖離がみられた。

免疫電気泳動上、正常 IgA と spur を形成する異常 IgA を認めた症例として Sakurabayashi ら²⁾ により本邦第 1 例目の半分子 IgA 型多発性骨髄腫が報告されている。同様の所見を呈する半分子 IgA 症例は Itoh ら³⁾ や Biewenge ら⁴⁾ によっても報告されており、spur 形成の要因は半分子 IgA と正常 IgA の分子量の違いによ

るものと説明されている。分子量の違いにより拡散速度が異なることにより2本の沈降線が形成されるとすれば light chain を欠き、 α 鎖のみが病的に産生される α 鎖病である可能性も考慮する必要がある。しかし、これまでに報告された α 鎖病は、われわれの経験⁹⁾を含めていずれも M-蛋白の出現を認めておらず、 α 鎖病蛋白の電気的移動度も $\alpha_1 \sim \alpha_2$ 分画にその大部分が存在し、今回のわれわれの症例とは所見を異にしている。

当初われわれは、本例の M-蛋白が heavy chain (α 鎖) と light chain (λ 鎖) をともに保有していることを免疫電気泳動上確認したことから、半分子 IgA の1例として第39回日本臨床病理学会総会に報告したものである。しかし、その際、小林邦彦教授より IgA₂ 型 M-蛋白の可能性を指摘されたためさらに検討を進めた。その結果、SDS-PAGE の immunoblot 法による分子量測定結果から、出現した IgA- λ 型の M-蛋白は分子量約16万が大部分であり正常の IgA と変わらないことが確かめられた。また、IgA のサブクラスについての検索では、レクチンの一種である Jacalin が IgA₁ サブクラスがもつムチン型糖鎖を認識し結合するが、IgA₂ サブクラスはこの糖鎖が欠如しているため反応しないことを利用して、Jacalin を用いた吸収試験を行った。その結果、本例の IgA 型 M-蛋白は Jacalin で吸収されず、内側の沈降線のみが吸収された。免疫電気泳動上の IgA 二重沈降線形成については福嶋ら⁶⁾は polyclonal IgA 抗血清は、IgA₁ と一部抗原性を異にする IgA₂ に対する抗体を含み、共通抗原の α 鎖 Fc 部分において、多量にある α_2 Fc と、少量の α_1 Fc が抗原抗体反応し、 α_2 と最適比に至ったところで溝側に沈降線ができ、少量の α_1 は抗原側に沈降線ができるために二重沈降線が形成されると述べている。本症例の Jacalin 吸収試験の結果、二重沈降線の内側の沈降線が消失したことから、内側の沈降線は IgA₁ と思われた。また、SRID 法での二重リングについてもまったく同様に説明することができる。IgA のサブクラスである IgA₂ に対する特異モノクロナール抗体を用いたオクタロニー法の結果、出現した M-蛋白は IgA₂ であることが改めて確認された。これまでに IgA₂ 型の多発性骨髄腫は福嶋ら⁶⁾ならびに渡部⁷⁾らにより報告され、正常ヒト血清中 IgA の IgA₁ と IgA₂ の構成比が 93:7 と圧倒的に IgA₁ が多く、IgA₂ 型 M-蛋白の発現率は非常に低いものであると述べている。IgA₂ のサブクラスは A_{2m}(1) と A_{2m}(2) との二つのアロタイプからなり、両者は構造上おおきな違いがあり⁸⁾、A_{2m}(1) は H 鎖と L 鎖の間に S-S 結合がなく、

2本の L 鎖間での S-S 結合により、2量体を形成する構造をもつ。したがって、IgA_{2m}(1) は非還元下 SDS-PAGE で容易に light chain の2量体を遊離する性質がある。アロタイプ抗原決定基は hinge 部直前にある galactosamine や galactose を含んだムチン型糖鎖でありその抗体の作製は不可能である。したがって、アロタイプは SDS-PAGE の成績で判定されている。本症の IgA も非還元下 SDS-PAGE で4.5万のバンドつまり light chain の2量体を遊離し、IgA_{2m}(1) の性状と一致した。IgA_{2m}(1) は白人系に、IgA_{2m}(2) はモンゴル系に比較的多いとされており、日本人における IgA_{2m}(1) の出現頻度は非常に低いと考えられている。以上、IgA_{2m}(1) の良性 M-蛋白血症の検討結果を報告した。

結 語

今回、われわれは比較的にまれにしか発現しないと考えられる IgA_{2m}(1) アロタイプ- λ 型良性 M-蛋白血症の一例を経験し報告した。本例は当初免疫電気泳動法上、抗 IgA (α 鎖) 抗体との間に2本の spur 形成を示す沈降線を認め、SRID 法による IgA の定量でも2重沈降線を認めたため、半分子 IgA を疑われたものである。IgA には構成比の著しく異なる IgA₁ と IgA₂ の二つのサブクラスがあり、IgA 型 M-蛋白を免疫電気泳動法によって検索するに当たって IgA に spur 形成を示す2本の沈降線が認められる場合、正常ではごく微量にしか存在しない IgA₂ 型 M-蛋白の可能性を考えて検討を進めるべきであると考えられた。

文 献

- 1) 石田俊介, 竹上美也子, 奥村次郎, 永井康雄, 橋本寿美子, 大竹皓子, 芝紀代子, 小西奎子, 瀬崎達雄. 親和吸収と自動電気泳動による M 成分 416 検体の同定. 生物物理化学 1992; 36: 387-94.
- 2) Sakurabayashi I, Kin K, Kawai T. Human IgA₁ half-molecules: Clinical and immunologic features in a patient with multiple myeloma. Blood 1979; 53: 269-78.
- 3) Itoh Y, Ohtaki H, Ono T, Mori N, Kawaoi A, Kawai T. A case of lymphoma-type alpha-chain disease. Acta Haematol 1991; 86: 107-10.
- 4) Biewenge J, Vanloghem E. IgA₁ half molecules in human multiple myeloma and in vitro production of similar fragments from intact IgA 1 molecules. Clin Exp Immunol 1983; 51: 395-400.
- 5) 河野均也, 猿田栄助. α 鎖病. 臨床血液 1976; 8: 817-23.

- 6) 福嶋博文, 江畑浩之, 南野隆一, 向坂彰太郎, 益子直巳, 原田美佐, 中嶋文行, 平井賢治, 久保保彦, 下川 泰, 谷川久一, 横山三男, 萩原啓二, 小林邦彦. 二重沈降線を形成した IgA₂m(2) 多発骨髓腫. 臨床血液 1984; 25: 1103-8.
- 7) 渡部照代, 高橋智哉, 与田一男, 大本晃裕, 真船直樹, 小林邦彦. α_2 位に 2 本のバンドを示した IgA₂, A₂m(1) 型骨髓腫蛋白. 生物物理化学 1992; 36: 381-5.
- 8) 小林邦彦. IgA サブクラス. 日本臨床化学会年会記録 1987; 27: 75-9.

要 旨

56 歳の男性. セルロース・アセテート膜電気泳動上微量の M-蛋白を検出し, 免疫電気泳動を実施したとこ

ろ, 抗 α 鎖抗体と反応して spur を形成する 2 本の沈降線が観察された. SRID 法による IgA の定量でも 2 重沈降輪を認めたため, 半分子 IgA を疑い検索を進めたが, ゲル濾過法上 IgA の分子量には異常を認めなかった. また, 本例の M-蛋白は IgA₁ と結合するレクチン (Jacalin) と反応しなかったことから IgA₂ M-蛋白と推察された. この M-蛋白を非還元下 SDS-PAGE で分析したところ L 鎖の 2 量体の遊離が認められた. IgA₂ のアロタイプのうち IgA₂m(1) は H 鎖-L 鎖間の S-S 結合を欠き, L 鎖間が S-S 結合しているため, L 鎖の 2 量体が容易に遊離する, このため本例の M-蛋白は IgA₂m(1) アロタイプと判定した. 以上, 比較的まれにしか認められない IgA₂m(1) アロタイプの良性 M-蛋白血症の一例について検討した結果を報告した.