〔原 著〕

アイソザイム特異性がまれな LDH 結合性 IgG

戸沢 辰雄*・足立 香子**

SUMMARY

The immunoglobulins in LDH-immunoglobulin complexes differ in isoenzyme specificity, depending on the heavy chains and/or light chains. The specificities of IgA κ comprise two groups: 1) reactive against isoenzymes containing H₂M trimer, 2) only against H₂M₂ tetramer. Those of IgG comprise three groups: 1) reactive against both H and M subunits, 2) only against M subunit, and 3) against isoenzymes containing H₂ dimer. We studied seven patients with LDH-IgG complex and anomalous electrophoretic patterns of serum LDH isoenzymes, but different from those characteristic of usual LDH-IgG complexes. From reconstitution experiments, it appeared that isolated IgG from the patient was reactive against isoenzymes containing H₂ dimer in 3 cases, H₂M trimer in one case and H₂M₂ tetramer in 3 cases. The present study revealed that LDH-specific immunoglobulins have an affinity for LDH3 regardless of differences in isoenzyme specificity. The finding suggests that LDH-specific immunoglobulins are antibodies with varying specificities to different structures in LDH3 molecule.

Key words: lactate dehydrogenase-immunoglobulin complex, immunoglobulin G, lactate dehydrogenase isoenzyme, isoenzyme specificity.

ヒト血清中に出現する酵素-免疫グロブリン複合体は、非特異的な結合によるものと考えられる例もあるが¹⁾、総じて免疫複合体であると考えられている²⁻⁵⁾。この複合体を形成する免疫グロブリン(Ig)、つまり酵素結合性 Ig が結合するアイソザイムに納得できる特異性があることが免疫複合体と考える論拠の一つになっている⁶⁾。最も普遍的な酵素結合性 Ig: LDH 結合性 Ig, amylase 結合性 Ig, CK 結合性 Ig と ALP 結合性 Ig のうち、後 3 者のアイソザイム特異性(以降、特異性)は、それぞれの酵素に対する異種抗体のそれと一致し、容易に納得できるが、LDH 結合性 Ig の特異性の多彩さは既知の LDH に対する異種抗体からは説明できない⁷⁾。つまり LDH 結合性 Ig には、通常例だけで

も、全アイソザイム、LDH 2, 3, 4 と 5, LDH 3, 4 と 5, LDH 3 のみ、そして LDH 2 と 3 に結合するものがある。そして、これらの Ig は前 3 者が IgG に、後 2 者が IgA (ほとんどが κ タイプ) に特徴づけられている。一方、異種抗体には抗 LDH 1 抗体と抗 LDH 5 抗体が知られているが、両者とも LDH 2, 3 と 4 にも反応する^{8,9)}。

今回、これまでに知られていなかった LDH 1, 2 と 3 に結合する IgG の 3 例と、LDH 結合性 IgA κ に特徴的と考えられていた特異性をもつ LDH 結合性 IgG の 4 例を報告する。加えて、LDH 結合性 Ig の特異性について考察する。

Rare types of LDH specific immunoglobulin G to isoenzymes.

* Tatsuo Tozawa; 兵庫医科大学中央臨床検査部

** Kyoko Adachi; 同, 病院中央臨床検査部

Correspondence address: Tatsuo Tozawa, Department of Clinical Laboratories, Hyogo College of Medicine, 1-1, Mukogawa-cho, Nishinomiya 663, Japan.

(受付 1995 年 11 月 29 日, 受理 1996 年 1 月 19 日, 刊行 1996 年 4 月 15 日)

材料と方法

1. 対象血清と症例

LDH 結合性 IgG をもつが, LDH 結合性 IgG 例に特徴的とこれまで考えられてきた血清 LDH アイソザイム電気泳動的所見: LDH 5 の泳動異常像¹⁰⁾ を認めない 7 名の患者血清を対象にした。それぞれの LDH ア

Fig. 1. Anomalous LDH isoenzyme patterns in serum from the seven patients and compared with control serum.

C, control serum ; 1-7, serum of case 1-7.

イソザイムパターンは次のようであった: 症例 1 では LDH 3 と LDH 4 間に tailing する活性があり, LDH 4 位の陽極側に幅広い異常活性帯を伴っていた。LDH 1, 2, 5 には異常はなかった。症例 2, 3 では陰極側へ幅広化した LDH 3 を認めたが, LDH 1, 2, 4, 5 に異常はなかった。症例 4 では LDH 2, 3 がともに陰極側へ幅広化し, LDH 2 と LDH 4 間に連続する微活性があった。LDH 1, 5 に異常を認めなかった。症例 5 では LDH 1, 2, 3 のそれぞれの移動度が遅くなっていたが, LDH 4, 5 に異常を認めなかった。症例 6 では LDH 3 を挟んで, その両極側に微活性の異常帯があり, その陰極側の活性帯と LDH 1 間に連続する微活性があった。LDH 4, 5 には異常はなかった。症例 7 では LDH 4 の陰極側に異常活性帯があり, LDH 3 からその異常まで連続する微活性があった。LDH 1, 2, 5 に異常を認めなかった。症例 3 のアイソザイムパターンは経過を追えた 3 年間に変化がなかった。症例 4 のアイソザイムパターンは 10 年間に変化はなかったが, 続く 3 年間は正常パターン化している。この 3 年間は LDH 結合性 IgG も検出されなかった。残り 5 例の経過は追えなかった。全症例の性, 年齢と疾患, LDH 結合性 IgG の light 鎖のタイプ, アイソザイムパターンの異常発見時の血清 LDH 活性値を Table 1 に示す。

2. LDH 結合性 IgG の分取

1/10 M グリシン-塩酸緩衝液, pH 3.4 にて緩衝化した患者血清の 200 μ l を同緩衝液で平衡化した Sephadex G-200 ゲルカラム (0.9 $\times$ 60 cm) に充填し, 同緩衝液を用いて 2.1 ml/h の流速で溶出し, 0.9 ml のフラクションサイズで分取した。そして, IgG を含むフラクションを集め, それをリン酸緩衝液 (pH 7.4) にて再緩衝化し, 最終的に 100 μ l に濃縮し, これを IgG 分画液とした。

3. LDH アイソザイムの分取

複数の高 LDH 血症の患者血清 (LDH 結合性 Ig を含まない) の混合血清を材料にし, 杉田の方法¹¹⁾ に準じて, 3 $\times$ 60 cm の DEAE-Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィーを用いて各 LDH アイソザイムを分取した。そして各 LDH アイソザイム溶液中の LDH 活性を 100~200 U/l に調整した。

4. LDH-IgG 複合体の再構成とその同定

各 LDH アイソザイム溶液と IgG 分画液を等量混合し, 1 夜 4 $^{\circ}$ C 下で反応させた後, その混合液をアガロース (チバコーニング) ないしはタイタン板 (ヘレナ) 電気泳動法により通常の条件下で LDH アイソザイム分析した。症例 1, 2, 3 は前者の, 残りの症例は後者

Table 1. Clinical and laboratory data for the patients.

Case No.	Age, Sex	Ig linked to LDH	S-LDH (U/l)*	Diagnosis
1	22 f	IgG λ	324	Healthy
2	40 m	IgG λ	328	Chronic renal failure
3	73 m	IgG λ	391	Lung cancer
4	64 f	IgG λ	1047	Acute myocardial infarction
5	38 m	IgG λ	287	Ulcerative colitis
6	61 m	IgG κ	462	Diabetes mellitus
7	90 m	IgG κ λ	914	Acute myocardial infarction

* Reference interval: 200-450.

の電気泳動法を用いた。同時に試験管内沈降反応法⁴⁾により混合液中の LDH-Ig 複合体を検索した。この方法では 20 μ l の混合液を試料とした。抗体には抗 γ 鎖、抗 κ 鎖または抗 λ 鎖抗体(ダコ)を、LDH 染色試薬にはキット: LDH ネオ D (栄研化学)を用いた。

成 績

1. 電気泳動法

症例 1, 2, 3 では LDH 3 が陰極へ幅広化し、試料孔から LDH 3 に至る tailing 活性を伴っていた。他の LDH は異常がなかった。この 3 例の代表として症例 2 の成績を Fig. 2 に示した。症例 4 では LDH 2 と LDH 3 が幅広化し、陰極側へ tailing 活性を伴っていた。その他の LDH には異常はなかった (Fig. 3-left)。症例 5, 6, 7 では LDH 1, LDH 2 と LDH 3 は正常位活性帯から、それぞれ、LDH 3 位、LDH 3~4 の中間と LDH 4 位におよぶ tailing する活性を形成した。症例 6, 7 ではそれらの tailing 活性の陰極側に異常活性帯を伴っていた。これらの 3 症例の LDH 4 と LDH 5 には異常がなかった。この 3 例の代表として症例 6 の成績を (Fig. 3-right) に示した。これらの成績から結合するアイソザイムは、症例 1, 2, 3 が LDH 3, 症例 4 が LDH 2, 3, そして症例 5, 6, 7 が LDH 1, 2, 3, と判定した。

2. 試験管内免疫沈降法

症例の各混合液からの各抗体による沈降物の LDH 活性を Table 2 に示した。なお、正常者 10 名からえた各沈降物中の活性の最大は 0.038 であったことから、カットオフ値を 0.038 とした。各症例の結合アイソザイムの判定結果は電気泳動分析の結果と一致した。

考 察

酵素結合性 Ig のアイソザイム特異性は患者血清 Ig と各アイソザイムとの反応によるアイソザイム-Ig 複

Fig. 2. Electrophoretic analysis of reaction of isolated IgG from case 2 with LDH isoenzymes on an agarose gel film.

C, control serum; P, the patient's serum; 1, 2, 3, 4 and 5, mixtures of the isolated IgG with LDH1, LDH2, LDH3, LDH4 and LDH5, respectively. Arrow indicates application site of sample.

合体の再構成実験から判定される。その複合体の検出法には電気泳動、ゲルろ過または免疫沈降反応を応用する方法があるが、LDH-Ig 複合体は電気泳動中でもゲル濾過中でも連続的に解離するために¹²⁾、これらの技術を使った LDH-Ig 複合体の検出法の信頼度は低い¹³⁾。したがって、検出法にゲルろ過または免疫電気泳

Fig. 3. Electrophoretic analysis of reaction of isolated IgG from case 4 (left) and case 6 (right) with LDH isoenzymes upon TAITAN III plates.
C, control serum; 1, 2, 3, 4 and 5; mixtures of the isolated IgG with LDH1, LDH2, LDH3, LDH4 and LDH5, respectively. Arrows indicate application site of sample.

Table 2. LDH activities in precipitates of mixtures from the seven cases after precipitation with anti γ chain, anti κ chain or anti λ chain antiserum.

		LDH activity, absorbance at 570 nm					LDH activity, absorbance at 570 nm		
		anti- γ	anti- κ	anti- λ			anti- γ	anti- κ	anti- λ
Case 1	LDH1	0.014		0.016	Case 5	LDH1	0.116		0.088
	LDH2	0.014		0.022		LDH2	0.080		0.057
	LDH3	0.049		0.164		LDH3	0.050		0.045
	LDH4	0.028		0.028		LDH4	0.022		0.027
	LDH5	0.029		0.028		LDH5	0.022		0.030
Case 2	LDH1	0.019		0.029	Case 6	LDH1	0.304	0.181	
	LDH2	0.012		0.031		LDH2	0.369	0.232	
	LDH3	0.107		0.235		LDH3	0.213	0.122	
	LDH4	0.012		0.020		LDH4	0.031	0.024	
	LDH5	0.013		0.024		LDH5	0.022	0.020	
Case 3	LDH1	0.021		0.026	Case 7	LDH1	0.199	0.079	0.118
	LDH2	0.030		0.017		LDH2	0.291	0.092	0.174
	LDH3	0.228		0.192		LDH3	0.430	0.137	0.273
	LDH4	0.032		0.021		LDH4	0.034	0.021	0.032
	LDH5	0.034		0.025		LDH5	0.035	0.025	0.031
Case 4	LDH1	0.030	0.024						
	LDH2	0.116	0.056						
	LDH3	0.107	0.050						
	LDH4	0.024	0.018						
	LDH5	0.024	0.025						

動を用いた当初には、LDH 結合性 IgA は LDH 2, 3 に、そして LDH 結合性 IgG は主として LDH 4, 5 に結合するとされたが^{11,14)}、信頼性の高い検出法：試験管内免疫沈降法とサンドイッチ電気泳動免疫固定法¹⁵⁾が開発されてからは特異性の多彩さがわかり、逆に LDH 4, 5 結合例の報告がなくなった。

すなわち、LDH 結合性 IgA では、LDH 2, 3 結合例よりも LDH 3 結合例が多く、まれに LDH 2, 3, 4 結合例と LDH 4 結合例がある¹⁶⁾。LDH 結合性 IgG では、全 LDH アイソザイム結合例、LDH 2, 3, 4, 5 結合例、LDH 3, 4, 5 結合例⁷⁾、LDH 1, 2, 3, 5 結合例、LDH 2, 3, 4 結合例¹⁷⁾に今回新たに、LDH 1, 2, 3 結合例、LDH 3 結合例と LDH 2, 3 結合例が加わった。LDH 結合性 IgG 例のうち全アイソザイム結合例が最も多く、次いで LDH 2, 3, 4, 5 結合例と LDH 3, 4, 5 結合例が多い⁷⁾。残りは、著者が LDH 結合性 IgG の特異性を調査した一定期間に 1 例も遭遇しなかったことから、少数ないしはまれと考えられる。

Kanemitsu¹⁸⁾は全アイソザイム結合例、LDH 2, 3, 4, 5 結合例、LDH 3, 4, 5 結合例、LDH 3 結合例と LDH 2, 3 結合例を示し、それぞれの LDH 結合性 Ig が H と M サブユニットの共通構造、M サブユニット、M₂2 量体、H₂M₁3 量体と H₂M₂4 量体を認識するモノクローナル抗体と推定した。これに従えば、LDH 1, 2, 3 結合性 Ig は H₂2 量体を、LDH 4 結合性 Ig は H₁M₃4 量体を、そして LDH 2, 3, 4 結合性 Ig は H₁M₁2 量体を認識する抗体と推定されるが、Sudo ら¹⁷⁾が報告した LDH 1, 2, 3, 5 結合性 IgG が認識する分子構造は推定できない。

一方、LDH 結合性 Ig に対する LDH アイソザイムの結合定数から、Sudo ら¹⁷⁾は LDH 結合性 IgG が、そして Weijers ら¹⁹⁾は LDH 結合性 IgA が、LDH 3 に対する抗体であると結論している。しかし、Sudo らの分析した 3 症例の LDH 結合性 IgG の特異性はどれもまれなものである。また、Weijers らの結論も 1 例の LDH 結合性 IgA から導かれている。LDH 結合性 Ig の特異性の多彩さを考えれば、すべての LDH 結合性 Ig が LDH 3 に対する抗体であると結論するのは尚早の感がするが、LDH 結合性 Ig が総じて LDH 3 に対する抗体である可能性は高い。なぜならば、1 例の例外 (LDH 4 結合性 IgA 例¹⁰⁾)を除けば、すべての LDH 結合性 Ig は LDH 3 に親和性をもっている。

LDH 3 に対する異種抗体を調べる必要があるが、そのような抗体は得られていない。異種抗体としては抗 LDH 1 (H₁) 抗体と抗 LDH 5 (M₁) 抗体が知られて

いるが、両者ともハイブリッド 4 量体である LDH 2, 3, 4 とも反応する^{8,9)}。これから納得できる LDH 結合性 Ig の特異性は LDH 2, 3, 4, 5 結合だけである。しかし、未だ得られていない抗ハイブリッド LDH 抗体もその LDH の分子構造を認識する免疫分子を含むことを示す成績がある。つまり、LDH 1, 2, 3 を含む標品に対する抗体が LDH 5 と結合する⁹⁾という成績は、抗 LDH 1 抗体が LDH 5 と反応しないので、抗 LDH 2 抗体、抗 LDH 3 抗体またはその両者が M サブユニットを、ないしは抗 LDH 3 抗体が M₂2 量体を認識する免疫分子を含むことを示している。

これまでの成績は LDH 結合性 Ig が LDH 3 の分子構造を認識するモノクローナル抗体である可能性を示唆している。今後、特異性を異にする多彩な LDH 結合性 Ig の LDH アイソザイムに対する結合定数の分析が望まれる。

文 献

- 1) Fujita K, Sakurabayashi I, Kusanagi M, Kawai T. A lactate dehydrogenase-immunoglobulin G1 complex, not blocked by anti-idiotypic antibody, in a patient with IgG1- λ type M-proteinemia. *Clin Chem* 1987; 33: 1478-83.
- 2) 菅野剛史. 酵素結合性免疫グロブリンに関する研究. *生物物理化学* 1977; 27: 1-5.
- 3) Remaley AT, Wilding P. Macroenzymes: biochemical characterization, clinical significance and laboratory detection. *Clin Chem* 1989; 35: 2261-70.
- 4) Tozawa T. Enzyme-linked immunoglobulins and their clinical significance. *Electrophoresis* 1989; 10: 640-4.
- 5) Rasalki SB. Monoclonal antibodies to enzymes. *Clin Chim Acta* 1989; 183: 45-58.
- 6) 前川真人. 酵素結合性免疫グロブリン. 日本臨床病理学会編. 臨床病理臨時増刊 75 号. 臨床検査から病因病態解析へ. 東京: 臨床病理刊行会, 1987: 53-63.
- 7) 戸沢辰雄. 酵素の分子多様性発現のメカニズム, 酵素結合性免疫グロブリンによる分子修飾. *日本臨牀* 1995; 53: 50-6.
- 8) Markert CL, Appella E. Immunochemical properties of lactate dehydrogenase isoenzymes. *Ann NY Acad Sci* 1963; 103: 915-29.
- 9) Burd JF, Usategui-gomez M. Immunochemical studies on lactate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 1973; 310: 238-47.
- 10) 戸沢辰雄. LDH 結合性免疫グロブリンによる LDH anomaly パターンの分類と記号化. *生物物理化学* 1984; 28: 409-13.

- 11) 杉田 収. LDH 結合性免疫グロブリンに関する研究. 新潟医学会誌 1983; 97: 246-61.
- 12) Biewenga J. Complexes of lactate dehydrogenase and immunoglobulin G in human serum. Clin Chim Acta 1973; 47: 139-47.
- 13) Tozawa T. Electrophoretic analysis of enzyme-linked immunoglobulins and their clinical significance. J Chromatogr 1991; 569: 347-65.
- 14) 桑 克彦, 中山年正, 北村元仕. LDH と免疫グロブリンの結合様式. 生物物理化学 1977; 21: 209-14.
- 15) Kanemitsu F, Okigaki T. Sandwich electroimmunofixation (SEIF) for the assessment of isoenzyme specificities of immunoglobulins isolated from enzymeimmunoglobulin complexes. Clin Chim Acta 1986; 160: 27-35.
- 16) 戸沢辰雄, 内田恵理子. LDH 結合性 IgA- κ に結合する LDH アイソザイム. 生物物理化学 1986; 30: 35-42.
- 17) Sudo K, Maekawa M, Kanno K. Immunochemical properties of immunoglobulin G conjugated with lactate dehydrogenase. Clin Chem 1985; 31: 1178-81.
- 18) Kanemitsu F. Isoenzyme specificities of immunoglobulins isolated from lactate dehydrogenase-immunoglobulin complexes. Clin Chim Acta 1987; 167: 147-54.
- 19) Weijers RNM, Oude Eleferink DPJ, Mulder J,

Kruijswijk H. Characterization of immunoglobulin A κ autoantibodies to human lactate dehydrogenase isoenzyme-3. Clin Immunol Immunopathol 1987; 42: 110-22.

要 旨

LDH 結合性免疫グロブリン (Ig) のクラスは例外を除いて IgG か IgA である. これらの Ig のアイソザイム特異性は多彩であり, この特異性に Ig のクラスとタイプによる特徴がある. この特異性 LDH 分子が H と M サブユニットからなる 4 量体であることから, 通常例の LDH 結合性 IgG は H と M サブユニットの共通構造, M サブユニットと M₂2 量体を, そして LDH 結合性 IgA κ は H₂M₃ 量体と H₂M₂4 量体をそれぞれ認識する抗体と推定されている. 今回得られた IgA κ の特異性をもつ IgG と新たな特異性 (LDH 1, 2, 3 結合) をもつ IgG は特異性の多彩さを増し, これまでいわれてきた Ig のクラスとタイプによる特異性の特徴を不鮮明にしたが, 稀少例を含めた多彩な特異性の中にある共通性: すべての LDH 結合性 Ig は LDH 3 に親和性をもつ, を明白化した. つまり, LDH 結合性 Ig が LDH 3 分子上の種々の構造を認識する多彩な抗体であることを推定させる.