

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月13日現在

機関番号：32525

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590620

研究課題名（和文） 測定試薬と反応する異常免疫グロブリンの構造解析および反応メカニズムの解明

研究課題名（英文） Reaction mechanisms and structural analysis of abnormal immunoglobulins that reacts with measuring reagent.

研究代表者

藤田 清貴 (FUJITA KIYOTAKA)

千葉科学大学・危機管理学部・教授

研究者番号：90313866

研究成果の概要（和文）：

臨床検査では、血中の異常蛋白質（特に免疫グロブリン）と測定試薬が反応し、病態を反映しない異常値を呈することが少なくない。今回、2例の異常検体を解析した結果、1例は免疫グロブリンのIgG分子の γ 鎖が寒天成分の硫酸基とイオン結合を起こしたためであることが判明した。もう1例は、免疫グロブリンのIgM分子の μ 鎖がビリルビン測定試薬成分の界面活性剤であるSDSと直鎖アルキル基で疎水結合を起こしたためであることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Routinely examination, there are many that show abnormal values not reflect the disease for measuring reagent to react with an abnormal protein (especially immunoglobulins). We analyzed the two cases of abnormal immunoglobulins, one case was found to be due to ionic bond with the sulfate group of an agar gel component and the patient γ chain of IgG molecules. Another case, it is due to hydrophobic bonding with a linear alkyl group of SDS that is included in the reagent for measuring bilirubin and the patient μ chain of IgM molecules was revealed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：免疫血清学・臨床化学・免疫グロブリン

1. 研究開始当初の背景

臨床検査では異常蛋白質（特に免疫グロブリン）と体液性成分との結合や相互作用、あるいは測定試薬（物質）との反応によって病態を反映しない異常値や奇妙な電気泳動パターンに遭遇し判断に迷うことが少なくない。これらの現象は一般に異常反応と呼ばれ

ているが、日頃の精度管理だけで解決できるものではなく、異常データを見出し、的確に対処できなければ誤診につながる可能性も高い。しかし、これらの異常反応の原因を解明・分析できる医療施設は国内でも極めて少ないのが現状である。

異常反応は主に、①生体内成分との結合や

相互作用に起因するもの、②測定試薬（物質）との反応（結合）に起因するもの、③異好性抗体に起因するもの、④抗体様活性に起因するもの、⑤サブクラスと抗血清との反応性の相違に起因するものなどに分類される。

我々は、これまで数多くの異常蛋白質について解析を行ってきた。これら解析技術・実績をもつ我々の研究室には、国内の医療施設から病態との関連性、および異常反応の解明を依頼する患者検体が数多く寄せられる。

測定試薬と反応する免疫グロブリンは、質的異常を示す M 蛋白例の報告が多いが、polyclonal な増加を示す高 γ グロブリン血症でも認められる。その免疫グロブリンのクラスは IgG, IgA, IgM のいずれかであるが共通性はなく、反応メカニズムについても全くわかっていないことから、異常反応を回避する方法は未だ確立されていない。異常免疫グロブリンの構造や性状が明らかになり、測定試薬との反応が疎水結合によるものであれば、界面活性剤の種類や濃度を調整することにより、異常反応を回避できる可能性もあることから、個々の異常検体の解析は重要であり、その研究の発展性も大である。

2. 研究の目的

異常免疫グロブリンが関与する異常反応の発生メカニズムを解明することで病態との関連性を明らかにし、さらに誤診につながる測定試薬成分との異常反応を阻止する方法を考案することを目的に、測定試薬との反応に起因する異常反応を示す 2 検体の異常免疫グロブリンについて構造解析、およびその反応メカニズムの解明を行った。

3. 研究の方法

(1) 対象

対象はインフォームドコンセントおよび信州大学医学部倫理委員会から承認を得た以下に示す 2 例の患者血清である。

① 異常検体-1

IgG 型多発性骨髄腫と診断された患者の血清である。セルローズ・アセテート（セ・ア）膜およびアガロースゲルを用いた蛋白電気泳動で、slow- γ 位に monoclonal IgG1 の M バンドを認めたが、寒天ゲルを支持体とした場合、M バンドが消失し矛盾した結果が得られた（図 1）。

寒天から陰イオン物質（アガロペクチン）を除去したものがアガロースであることから、アガロペクチンと monoclonal IgG1 との反応を推測し、寒天からアガロペクチンの主成分である硫酸塩を除去したゲル平板を用い monoclonal IgG1 の移動度の変化を確認したところ、消失した monoclonal IgG1 のバンドが明瞭に確認され硫酸基との反応が推測された例である。

支持体：アガロース

支持体：寒天

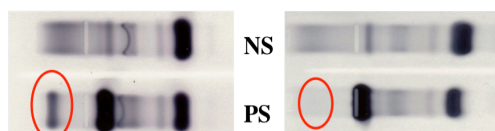


図 1. 支持体別の血清蛋白電気泳動像

② 異常検体-2

原因不明の溶血性貧血や腎障害など重度な臨床症状を呈し、原発性マクログロブリン血症と診断された患者の血清である。酵素法による総ビリルビン値がマイナス（ -0.67mg/dl ）で直接ビリルビン値（ 0.13mg/dl ）よりも低値を示した。酵素法測定試薬との反応性を確認したところ、反応タイムコースでの異常が観察され、monoclonal IgM が反応していることが確認された（図 2）。

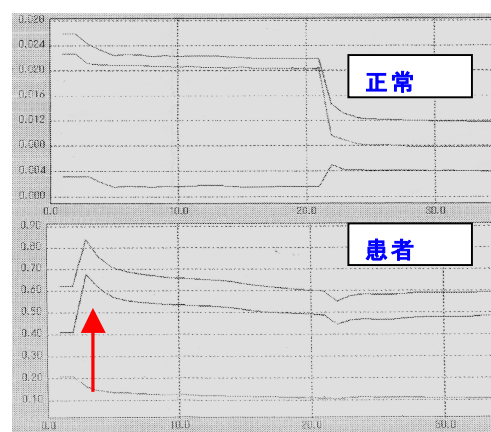


図 2. ビリルビン測定における反応タイムコース

(2) 実験方法

① 患者 monoclonal IgG1 の精製および硫酸基をもつ多糖類との反応性実験

Protein G-affinity カラム, DEAE-Sephacel イオン交換カラムにて患者 monoclonal IgG1, および対照の正常 IgG をそれぞれ精製し、アガロースに硫酸基を持つ多糖類を加えた場合でも、寒天と同様、monoclonal IgG1 の移動度に影響を与えるか否か、アガロースおよび泳動緩衝液中に硫酸基を有するヘパリン、コンドロイチン 6-硫酸をそれぞれ添加して濃度の異なるゲル平板を作製し、monoclonal IgG1 のバンドの移動の変化を確認した。

② Monoclonal IgG1 の硫酸基結合部位の検索

硫酸基結合部位を確認するため、パパイン処理により monoclonal IgG1 を γ Fab と γ Fc に分解した。さらに、monoclonal IgG1 を還元アルキル化後、 $\gamma 1$ 鎖と κ 鎖に分別した。その後、硫酸基との結合性を確認するため、

コンドロイチン 6-硫酸を含有させたアガロースゲルを用い、電気泳動によりそれぞれの fragment の移動度の変化を確認した。

③ *Monoclonal IgG1* の構造解析

精製した monoclonal IgG1 および正常 IgG をそれぞれ二次元電気泳動後、展開された γ 鎖および κ 鎖のスポットをそれぞれ比較し、分子構造の解析を行った。すなわち、精製 monoclonal IgG1 を IPG buffer にて蛋白濃度 $0.04 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ に希釈し、IPG Dry Strip (pH3-10) に 12 時間膨潤させ、1 次元目の等電点電気泳動を行った。2 次元目は 10% ポリアクリルアミドゲル (PAG) 均一ゲルを使用し、還元条件下で SDS-PAG 電気泳動を行った。

④ *Monoclonal IgG1* と硫酸基との結合解離実験

電気泳動で誤判定につながる寒天成分 (硫酸塩) との非特異反応を阻止するため、monoclonal IgG1 と硫酸基との結合解離実験を行った。すなわち、寒天平板および泳動緩衝液中の NaCl 濃度を 1mmol/L から 100mmol/L まで段階的に変化させ、monoclonal IgG1 と硫酸基との結合が解離しアガロースと同じ移動度に M バンドが出現する濃度を検討した。

⑤ 患者 monoclonal IgM の精製および反応するビリルビン測定試薬成分の検索

患者 monoclonal IgM の精製は、Sephacryl S-300HR ゲル濾過カラム、DEAE-Sephacel イオン交換カラム、セラミックハイドロキシアパタイトカラムにて行った。ビリルビンの測定は BM-2250 型自動分析装置を用い、原理の異なる酵素法および酸化法の測定試薬にて、総ビリルビン、直接ビリルビン値をそれぞれ測定し、酸化法においても異常反応が起こるかどうか確認した。さらに、酵素法の測定第 1 試薬、および第 2 試薬 $500 \mu\text{l}$ にそれぞれ患者血清 $25 \mu\text{l}$ を添加し、 37°C 5 分間 incubate 後、反応性 (白濁) の有無を確認した。反応が認められた測定試薬については、個々の試薬成分の濃度を変化させ monoclonal IgM と反応する成分を同定した。

⑥ *Monoclonal IgM* の構造解析

精製した monoclonal IgM を二次元電気泳動後、展開された μ 鎖および κ 鎖のスポットについて分子構造の解析を行った。すなわち、精製 monoclonal IgM を IPG buffer にて希釈し、IPG Dry Strip (pH3-10) に 12 時間膨潤させ、1 次元目の等電点電気泳動を行った。2 次元目は 10% PAG 均一ゲルを使用し、還元条件下で SDS-PAG 電気泳動を行った。その後、PVDF 膜に電気転写後、一次抗体として、抗 IgM (μ 鎖) 抗血清、抗 κ 鎖抗血清を反応させた。さらに、二次抗体として、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG (Fab') 抗血清を反応させ、POD イムノステインによりそれぞれのスポットを発色させた。

4. 研究成果

(1) *Monoclonal IgG1* と硫酸基をもつ多糖類との反応性

アガロースに硫酸基を持つ多糖類 (ヘパリン、コンドロイチン 6-硫酸) を加えた場合でも、寒天ゲルと同様、monoclonal IgG1 の移動度が変化するか否か実験を行った。その結果、陽極側に移動度をもつ多糖類の濃度が高くなるほど monoclonal IgG1 のバンドは陽極側に大きく移動することが観察され硫酸基との反応性が確認された。(図 3)。

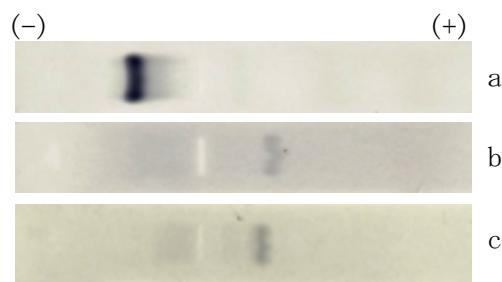


図 3. 酸性多糖類添加後の患者精製 monoclonal IgG1 の移動度の変化

- a: アガロース
- b: アガロース + ヘパリン 10mg/dl
- c: アガロース + コンドロイチン 6-硫酸 10mg/dl

2) *Monoclonal IgG1* の硫酸基結合部位

パパイン処理により monoclonal IgG1 を γ Fab と γ Fc に分解し、どちらに硫酸基との結合性があるのかを確認した。すなわち、コンドロイチン 6-硫酸を含有させたアガロース電気泳動により γ Fab および γ Fc の移動度の変化を観察した。その結果、 γ Fc バンドの移動度にほとんど変化を認めなかったが、 γ Fab バンドでは、コンドロイチン 6-硫酸添加濃度の増加とともに陽極側に大きくシフトし、monoclonal IgG1 の硫酸基結合部位は γ Fab 部であることが確認された (図 4)。

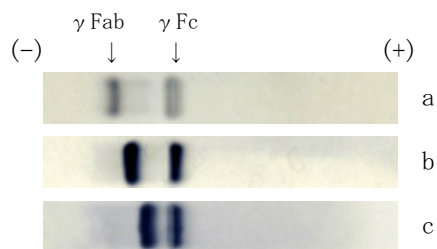


図 4. コンドロイチン 6-硫酸添加後の γ Fab および γ Fc の移動度変化

- a: アガロース
- b: アガロース + コンドロイチン 6-硫酸 0.5mg/dl
- c: アガロース + コンドロイチン 6-硫酸 1mg/dl

さらに、患者 monoclonal IgG1 を構成する $\gamma 1$ 鎖と κ 鎖のどちらに硫酸基との結合性があるのかを確認するため、還元アルキル化後、 $\gamma 1$ 鎖と κ 鎖に分別し、同様にコンドロイチン 6-硫酸含有アガロースを用いた免疫電気泳動法によりそれぞれのバンドの移動度の変化を観察した。その結果、 $\gamma 1$ 鎖のみが陽極側にシフトすることが確認され、硫酸基との結合は γ Fab 部の H 鎖のみであることが判明した (図 5)。これらの結果から、患者 monoclonal IgG1 の硫酸基結合部位は γ Fab 領域であるが、その結合には H 鎖の $\gamma 1$ 鎖のみが関与し、抗原抗体反応による結合ではないことが明らかとなった。

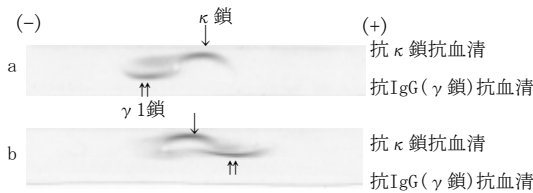


図 5. コンドロイチン6-硫酸添加後の $\gamma 1$ 鎖および κ 鎖の移動度変化

- a: アガロース
- b: アガロース +コンドロイチン 6-硫酸 1mg/dl

(3) 患者 monoclonal IgG の分子性状

分子を構成する $\gamma 1$ 鎖は pI 9.4、分子質量 54kDa、 κ 鎖は pI 5.3、分子質量 26kDa のスポットとして観察され、 κ 鎖は等電点、分子質量とも正常 κ 鎖と相違がみられなかった。しかし、 $\gamma 1$ 鎖は正常 $\gamma 1$ 鎖とほぼ同じ分子質量であるにも関わらず、等電点はかなり塩基性に傾いていることが確認された (図 6)。

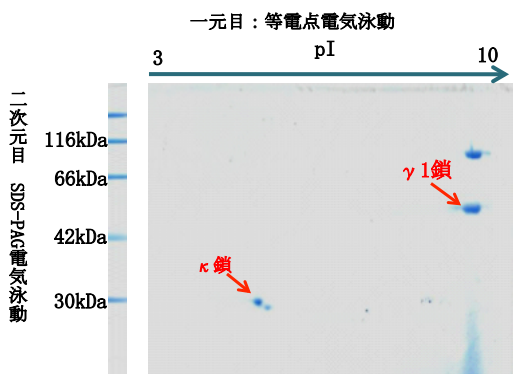


図 6. 患者精製 monoclonal IgG1 の二次元電気泳動像

(4) 患者 monoclonal IgG と硫酸基との結合様式および阻止法の確立

寒天ゲル平板および泳動緩衝液中の NaCl 濃度を段階的に調製し電気泳動により結合解離の有無を確認した。その結果、NaCl 濃度 5mmol/L までは M バンドを観察することができなかったが、8mmol/L 以上で monoclonal IgG1 は明瞭な単一バンドとして確認される

ことが判明した (図 7)。

これらの結果から、異常検体-1 の monoclonal IgG1 と硫酸基の結合様式はイオン結合であり、NaCl 濃度添加によりその結合は阻止できることが確認された。



図 7. NaCl 添加濃度による患者精製 monoclonal IgG1 の移動度変化

- a: 寒天ゲル
- b: 寒天ゲル + NaCl 5mmol/L
- c: 寒天ゲル + NaCl 8mmol/L

(5) 患者 monoclonal IgM と反応するビリルビン測定試薬成分の検索

総ビリルビン測定において、酵素法でマイナスの値を示したのに対し、酸化法では 0.22mg/dl とプラスの値を示したことから、酵素法による総ビリルビン測定試薬成分と患者血清成分との反応が示唆された。

測定試薬との反応性を確認したところ、患者血清に第 1 試薬 (0.2% SDS、および 0.2% コール酸ナトリウムを含むリン酸緩衝液) を添加した場合にのみ白濁現象を認め、免疫電気泳動によりその異常蛋白質は monoclonal IgM であることが確認された。そこで、monoclonal IgM を精製し、個々の試薬成分について添加実験を行った。その結果、0.2% SDS



図 8. 0.2% SDS と反応した沈殿物

のみにて白濁沈殿物の形成を認めたことから、monoclonal IgM と反応する試薬成分は SDS であることが確認された (図 8, 9)。

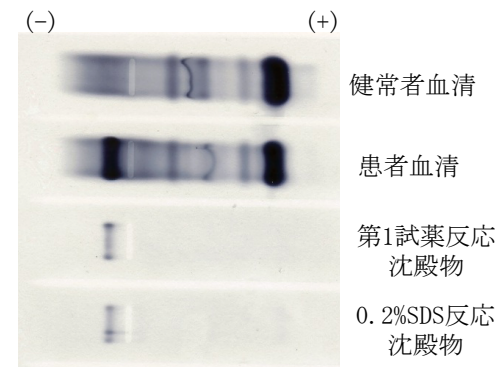


図 9. 反応沈殿物の蛋白電気泳動像

(6) SDS類似物質と患者 monoclonal IgM との反応性および結合メカニズム

SDS は陰イオン性の界面活性剤であり、疎水性部分の直鎖アルキル基と親水性部分の硫酸エステル塩から構成される。硫酸エステル塩と化学構造が類似するドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、ベンゼンスルホン酸ナトリウム、およびメタンスルホン酸ナトリウムについてもその反応性実験を行った。その結果、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムとのみ反応し同様な白色沈殿物が形成された。すなわち、図 10 の示した如く、患者 monoclonal IgM と反応するのは、疎水性を示す直鎖アルキル基であり、この部分ではミセル状の疎水結合を形成しやすいことが知られていることから、患者 monoclonal IgM 分子内のポリペプチド鎖と SDS 分子内の直鎖アルキル基がミセル状の疎水結合を形成することで、白色沈殿物を生じたものと示唆される。

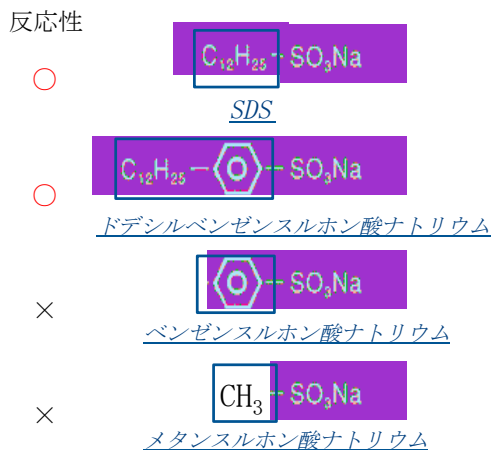


図10. SDS類似物質の化学構造とその反応性

(7) 患者 monoclonal IgM の分子性状

患者精製 monoclonal IgM を用い、二次元電気泳動法により分子性状解析を行った。その結果、L 鎖(κ 鎖)と考えられる pI8.2, 27.9kDa のスポットの他に、H 鎖(μ 鎖)と思われる pI4.5~5.2 の分離ゲル最上端部に泳動されずに残った蛋白質が確認された(図 11)。これは、一次元目の等電点電気泳動によって患者 monoclonal IgM は個々の pI 値に泳動されたが、二次元目の SDS-PAG 電気泳動では、ゲル中に 0.1%濃度の SDS が存在するため、SDS と反応した蛋白質が泳動されずにゲル最上端部に留まったものと考えられる。したがって、SDS との反応性を有するのは、患者 monoclonal IgM 分子中の μ 鎖である可能性が高い。

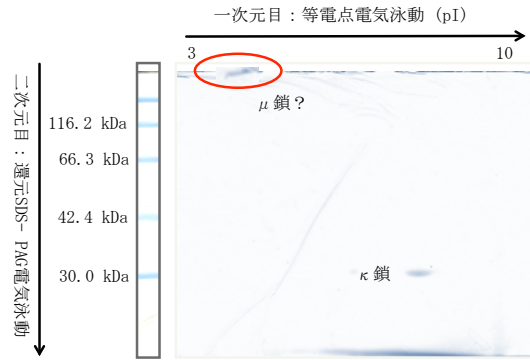


図11. 患者精製 monoclonal IgM の二次元電気泳動像

(8) 異常反応回避におけるカオトロープの有用性

カオトロープは疎水結合を破壊する作用を有する物質またはイオンの総称であり、それぞれの物質またはイオンが持つ至適濃度の条件下では最大限にその作用を発揮する。その中でも過塩素酸イオン(ClO_4^-)およびヨウ化物イオン(I^-)は、カオトロピック効果が強力で、かつ蛋白質への変性作用が比較的小さいことが知られている。そこで、この2種類のカオトロープを用い、0.2%SDS 溶液に添加したところ、これまでに見られた白色沈殿物は形成されなかった(図 12)。また、透析にて溶液中のカオトロープを除去すると、再び白色沈殿物の形成が認められた。このことから、カオトロープには本測定系の異常反応を阻止する作用を有することが確認された。

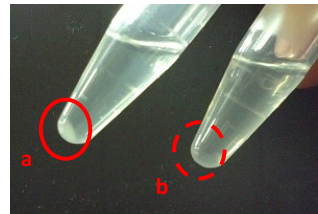


図12. 過塩素酸添加前(a)後(b)の白色沈殿物形成の有無

(9) 患者 monoclonal IgM のヒト赤血球に対する反応性

異常検体-2 では、原因不明の溶血性貧血が認められたことから、洗浄した正常ヒト赤血球膜を PVDF 膜に電気転写し、膜上で患者 monoclonal IgM と反応させ、洗浄後、POD 標識抗 IgM 抗体により赤血球膜蛋白成分との反応性を確認した。しかしながら、いずれの蛋白質バンドとも反応性を示さなかった。

以上、平成 21 年度~23 年度の期間で「測定試薬と反応する異常免疫グロブリンの構造解析および反応メカニズムの解明」について、年度ごとの研究はほぼ計画通り実施することができた。しかし、異常検体-1 の寒天成分と反応する monoclonal IgG1 については、IgG1 分子の $\gamma 1$ 鎖に異常があるところまでは

解明できたが、硫酸基と結合するアミノ酸残基の配列分析は患者試料（血清）の不足により明らかにすることができなかった。同様に、異常検体-2 のビリルビン測定に影響を及ぼす monoclonal IgM についても、測定試薬成分の SDS と IgM 分子の μ 鎖との反応に起因するところまでは解明できたが、monoclonal IgM を精製しトリプシン処理後に行うペプチドマップの反応実験は、患者試料（血清）の不足により実施することができなかった。今後、このような限られた少ない患者試料から、どのような分離分析法で多くの情報を引き出すことができるか、分離分析法の活用法や新解析技術法の開発に取り組みたい。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計2件）

- ① 藤田清貴. 血清蛋白分画とデータの判読. 検査と技術. 査読無. 39 巻. 2011. 161-167.
- ② 藤田清貴. セ・ア膜電気泳動で何がわかるかー判読の仕方ー. 医療と検査機器・試薬. 査読無. 35 巻. 2012. 53-59.

〔学会発表〕（計3件）

- ① 藤田清貴. 免疫学的検査における異常反応. 日本臨床検査自動化学会第 42 回大会. 2010 年 10 月 9 日. 山梨
- ② 藤田清貴. 分離分析技術によって解明される異常免疫グロブリン. 第 50 回日本臨床化学会年次学術集会. 2010 年 9 月 24 日. 山梨
- ③ 藤田清貴. 測定系に影響を及ぼす免疫グロブリンの性状. 第 56 回日本臨床検査医学会学術集会. 2009 年 8 月 29 日. 札幌

〔図書〕（計1件）

- ① 藤田清貴. 医歯薬出版. 臨床検査で遭遇する異常蛋白質 -基礎から発見・解析法まで. 2010 年. 154

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 清貴 (FUJITA KIYOTAKA)
千葉科学大学・危機管理学部・教授
研究者番号：90313866

(2) 研究分担者

亀子 文子 (KAMEKO FUMIKO)
信州大学・医学部・助教
研究者番号：60126670

(3) 研究協力者

石垣 宏尚 (ISHIGAKI HIRONAO)
名古屋掖済会病院・検査部・臨床検査技師

阿部 雅仁 (ABE MASAHIRO)
栄研化学・マーケティング推進室・臨床検査技師