

臨床検査シリーズ

電気泳動法を利用した血漿タンパクの分析： 免疫グロブリンの異常と解析方法について

井本真由美¹ 上 裕 俊 法^{1,2}

¹近畿大学医学部附属病院 中央臨床検査部 ²同 臨床検査医学部

はじめに

近畿大学医学部附属病院中央臨床検査部の第二臨床化学検査室では、尿検査、血中薬物濃度測定をはじめ、電気泳動法を利用したアイソザイム検査、脂質分析検査さらにセルロースアセテート膜電気泳動法による血清蛋白分画、M蛋白（単クローン性免疫グロブリン：monoclonal immunoglobulin）の同定を目的とする免疫電気泳動法および免疫固定法など種々の検査を行っている。今回、日常スクリーニング検査として有用な血清蛋白分画と、そこから検出されたM蛋白等の免疫グロブリンの異常と解析方法について検査学的にまとめた。さらに当検査室で発見された稀少例について紹介する。

■血清蛋白分画の目的と有用性¹⁻³

血漿（血清）中には80種類以上の蛋白が存在し、それぞれの生理機能を果たしながら、動的平衡により一定の濃度を維持している。血漿タンパクの主なものは、アルブミン、免疫グロブリン、リポ蛋白、糖タンパク、補体成分などであり微量成分としてホルモン、酵素などが含まれる。これらの血中濃度は病態に応じて変動を示すため、これらの変動を蛋白分画を用いて総合的に解析することにより、種々の病態を把握することが可能となる。血清蛋白分画の

利点は、病態を反映する蛋白の反応や変動を簡便に総合的にとらえることにより、病態の解析に有益な情報をもたらすことにある。血清蛋白分画は、セルロースアセテート膜（セ・ア膜）を支持体とし、血清蛋白をアルブミン、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 β および γ 分画の5分画に分離する。このピークが、病態に応じて特徴的なパターンを示す。血清蛋白分画の基準範囲を表1に示す。分画評価のポイントとして、%だけでなく蛋白濃度が重要な評価である。典型的な基本パターンを表2に示した。臨床的には、基本パターンを認識し、他の臨床所見、検査所見と併せて病態を鑑別することとなる。実際の典型的なパターンを図1に示す。この中でも血清蛋白分画でのみ検出可能なM蛋白をはじめとする免疫グロブリン異常症について論ずる。

表1 血清蛋白分画基準範囲

項目	蛋白分画値 (%)	蛋白分画濃度 (g/dl)
総蛋白		6.5-8.2
アルブミン分画	61.6-71.2	4.0-5.8
$\alpha 1$ 分画	1.9-3.0	0.12-0.25
$\alpha 2$ 分画	5.3-8.9	0.34-0.73
β 分画	6.9-10.9	0.45-0.89
γ 分画	10.8-19.6	0.70-1.60

表2 血清蛋白分画の基本パターン

血清蛋白分画パターン	総蛋白濃度	Alb 分画	$\alpha 1$ 分画	$\alpha 2$ 分画	β 分画	γ 分画
1. 蛋白不足型	↓↓	↓↓	N, ↑	N, ↓	↓	↓ (N)
2. ネフローゼ型	↓↓	↓↓		↑↑		↓ (N, ↑)
3. 汎発性急性肝障害型	↓, N	↓↓	↓	↓	↓	→
4. 肝硬変型	↓, N, ↑	↓↓		↓	β~γブリッジング	
5. 急性炎症型		↓	↑	↑		N
6. 慢性炎症型		↓	↑	↑		↑
7. γ 分画広域増加型	↑	↓				↑
8. M-蛋白血症				←	M-ピーク	→
9. B分画増加型				(↑)	↑	
10. 妊娠型	↓	↓			↑	

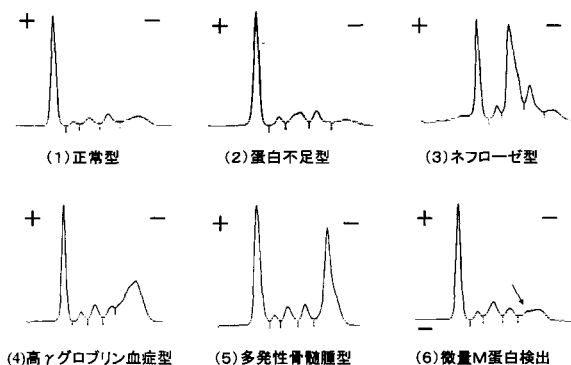


図1 種々の血清蛋白分画パターン

■免疫グロブリン異常とは

免疫グロブリン異常は量的異常と質的異常に分けて考えると臨床的に理解しやすい。

1. 量的異常

1) 多クローン性免疫グロブリン

多くの抗体産生細胞(多クローン: polyclonal)の増殖により免疫グロブリンが多クローン性に増加する。肝疾患, 感染症, 膠原病および悪性腫瘍などの基礎疾患が存在すると, 一般的に多クローン性の免疫グロブリン増加がみられる。組織の破壊産物による抗原刺激や免疫反応の異常により生じる。

2. 質的異常

1) 単クローン性(monoclonal)免疫グロブリン

特定の抗体産生細胞(単クローン)の増殖によって産生される免疫グロブリンでM蛋白(monoclonalの頭文字をとっている)と呼ばれる。M蛋白の出現をみる代表疾患には, 多発性骨髄腫やマクログロブリン血症などがあり, 本疾患でのM蛋白は, 悪性M蛋白とよばれる。一方, M蛋白を呈する疾患の中には, 基礎疾患(肝疾患, 心疾患, 悪性腫瘍および加齢等)が原因で出現するMGUS(monoclonal gammopathy of undetermined significance)があり, MGUSによるM蛋白は, 全体の3/4を占める。臨床検査医学上, 悪性M蛋白と診断する基準として, (1)M蛋白の著増, (2)M蛋白以外の他免疫グロブリンの著減, (3)ベンスジョーンズ蛋白(Bence-Jones protein: BJP)の存在, (4)比較的短期間のM蛋白の増加等があり, その他骨髄像検査所見や骨所見(骨抜き打ち像; punched out)を参考にす。現在までに確認されているM蛋白が出現する病態を表3に示した。M蛋白の量と臨床像は必ずしも相関がない場合もあり, M蛋白の分泌量が少ない非分泌型骨髄腫や骨髄腫初期の可能性も念頭においておく。通常M成分は1種類のことが大部分であるが, 稀に2種類以上のM成分が検出されることもある。L鎖型同定は, 免疫電気泳動法(immunoelectrophoresis: IEP)お

表3 M蛋白が出現する病態

- | | |
|--|---|
| 1) MGUS | <ul style="list-style-type: none"> • IgG型 • IgA型 • IgM型 |
| 2) 多発性骨髄腫および原発性マクログロブリン血症 | <ul style="list-style-type: none"> • IgG型 • IgA型 • IgM型(原発性マクログロブリン血症) • IgD型 • IgE型 • 半分子型免疫グロブリン(欠損のあるH鎖とL鎖からなる) • 半分子型IgG⁸ 半分子型IgA⁷ • 半分子型7S IgM⁹ |
| 3) H鎖病(欠損のあるH鎖からなる) | <ul style="list-style-type: none"> • γ鎖病⁵ • α鎖病 • μ鎖病⁶ |
| 4) L鎖病(delated light chain disease, 欠損のあるL鎖からなる) | <ul style="list-style-type: none"> • κ鎖病(症例の項で詳しく解説)¹¹ • λ鎖病 |
| 6) その他 | <ul style="list-style-type: none"> • 原発性アミロイドーシス(Bence-Jones Protein) • POEMS症候群(Crow-Fukase症候群, 高月病) • 形質細胞性白血病 |

よび免疫固定法(immunofixation electrophoresis: IFE)が適している。特にIFEは感度に優れているため, 微量M蛋白の同定に有用である。

2) 温度依存性蛋白

温度依存性蛋白とは, 温度変化に伴い, ゲル化や白濁を呈する蛋白の総称であり, BJP, クリオグロブリン, パイログロブリンなどがある。温度依存性蛋白の多くはM蛋白であるが, HCV抗体陽性血清においてもクリオグロブリンが陽性を示す場合があることが知られている⁴。質的異常を示すM蛋白について表4に示した。特に4)特異的な物質に結合能をもつM蛋白例では, 免疫グロブリン以外の臨床検査所見の異常値から発見されたものが多い。従って, 日頃から異常値が認められた時に対応し得る姿勢をもつことが重要である。

■異常免疫グロブリン発見の糸口と解析方法

1. 血清蛋白分画

異常免疫グロブリン発見の糸口として, 最も頻度が高いのは, 血清蛋白分画の異常である。M蛋白帯は, 通常 α 2位から γ 位にかけて幅狭いシャープな蛋白帯として観察され, セ・ア膜では, 濃いバンド

表4 質的異常を示すM蛋白

1) 温度依存性蛋白 [thermoprotein]
・クリオグロブリン
・パイログロブリン
・BJP
2) 抗体活性が確認されたM蛋白
・ASO 活性をもつM蛋白
・RF 活性をもつM蛋白
・寒冷凝集素活性をもつM蛋白
・抗カルジオリピン抗体活性をもつM蛋白
3) 酵素を産生するM蛋白
・アミラーゼ産生腫瘍 ¹⁶
・アンモニア産生腫瘍
4) 特異的な物質に結合能をもつM蛋白
・ビリルビン結合M蛋白
・EDTA 結合M蛋白：偽性白血球増多症 ¹⁵
・フィブリノゲン結合M蛋白 ¹⁵
・アガロース結合M蛋白
・セ・ア膜と反応するM蛋白 ¹⁵
・リポ蛋白結合M蛋白
5) L鎖反応性が微弱なM蛋白 ¹²
6) その他

キーワード

○H鎖病：H鎖病蛋白は、N末端から90~220残基を欠くためにFab部が欠落しており、一部欠損部位をもつH鎖(Fc部)だけが分泌される。H鎖の種類で、 γ 鎖病、 α 鎖病および μ 鎖病が知られている。

○半分子型免疫グロブリン：H鎖とL鎖の結合部は、保存されているが、H鎖間のS-S結合部位の欠落があるため、HLダイマーにはならない稀少例。この場合、正常の免疫グロブリンの沈降線とスパーをつくる低分子蛋白が検出され、これらは、抗H鎖抗体と抗L鎖抗体と反応する点が、H鎖病と異なる。

○L鎖病 (deleted light chain disease)：本邦で、報告されているのはわれわれの1例のみであると思われるが、世界的には、数例報告されている。これは、L鎖のCL部の一部欠損や完全欠落を認める不完全L鎖が、単クローン性に増加する病態をいう。

○POEMS症候群：免疫グロブリン異常が基礎に存在し、多発ニューロパチーを必須とし、その他の臨床症状として1)多臓器腫大、2)内分泌異常、3)M-蛋白血症、4)皮膚症状、5)骨病変など多彩な症状を併存する症候群と定義する。

○microheterogeneity：微小不均一性。基本的には、同一である分子間での構造のわずかな相違、たとえば糖蛋白の糖部分でみられる。

○SDS-PAGE

蛋白質の荷電は、種類によって大きく異なるが、陰イオン系界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム(SDS)存在下では、SDS分子がタンパク質分子を変性させミセルを作るためタンパク質分子は全体として陰性に荷電し陽極方向に移動する。この方法がSDS-PAGEで分子量を反映した泳動結果が得られる。

○イムノブロット

SDS-PAGEやアガロース電氣泳動後のタンパク質をメンブレンに転写してから免疫染色を行う手法。

として検出される。疑わしいバンドが検出された場合は、免疫グロブリン定量や免疫電氣泳動法(IEP)を実施しL鎖の型同定を行う。しかし、BJP型M蛋白やH鎖病蛋白などでは通常M蛋白濃度は少なくM蛋白帯が不明瞭であり、セ・ア膜上での目視確認が不十分であると見逃されることがあるため、血清蛋白分画でM蛋白が検出されなくとも、臨床的に骨髄腫が疑わしい時は尿BJP定性試験等の尿による検索をお薦めする。なお、H鎖病の場合は、特定の免疫グロブリンの増加を認めるにもかかわらず、蛋白分画で明確なM蛋白帯がないことから気付かれることが多い。これは、H鎖病蛋白は通常のものより分子量が小さいため蛋白分画上M蛋白として検出されにくいためである。

2. 免疫電氣泳動法(IEP)、免疫固定法(IFE)

免疫グロブリン異常では、量的、質的異常を正確

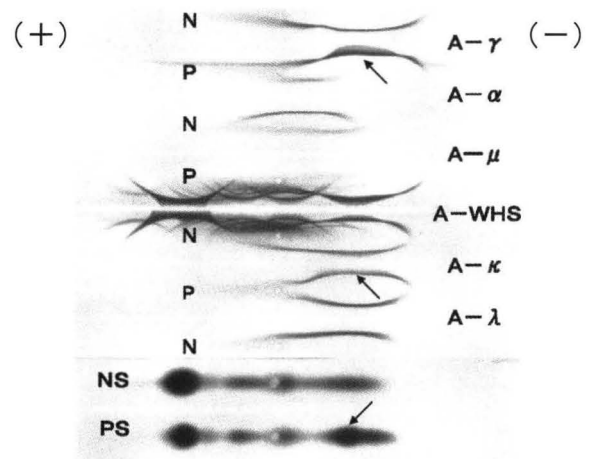


図2 免疫電氣泳動像(IgG- κ 型M蛋白検出)
N(NS)：正常血清、P(PS)：患者血清、A-WHS：抗全ヒト抗体、A- γ ：抗 γ 鎖抗体、A- α ：抗 α 鎖抗体、A- μ ：抗 μ 鎖抗体、A- κ ：抗 κ 鎖抗体、A- λ ：抗 λ 鎖抗体。
 γ 位に抗 γ 鎖抗体および抗 κ 鎖抗体と反応するM-bowを検出した。

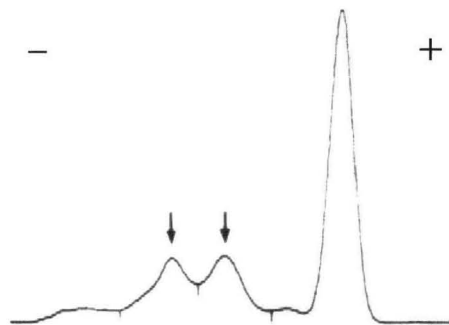


図3 μ 鎖病患者の血清蛋白分画像
 α_2 から β 位にかけてM蛋白帯を認めた(↓)。

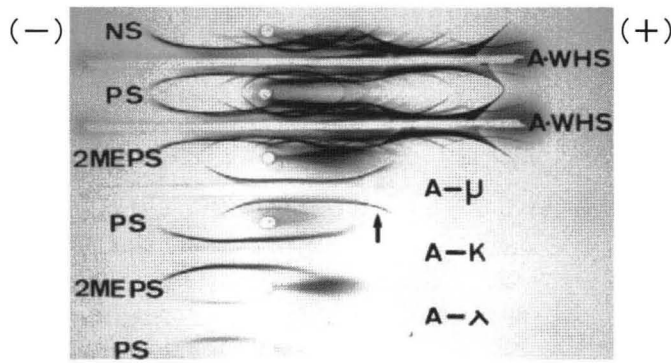


図4 μ鎖病患者血清の免疫電気泳動像
NS：正常血清，PS：患者血清，2MEPS：2ME処理後の患者血清，A-WHS：抗全ヒト抗体，A-μ：抗μ鎖抗体，A-K：抗κ鎖抗体，A-λ：抗λ鎖抗体。
抗μ鎖抗体で，抗L鎖抗体と反応せず陽極側に細長くのびる沈降線を認めた(↓)。

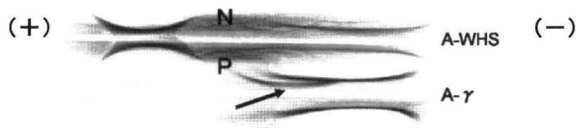


図5 半分子IgGの免疫電気泳動像
N：正常血清，P：患者血清，A-WHS：抗全ヒト抗体，A-γ：抗γ鎖抗体
患者血清において，抗γ鎖抗体と反応する沈降線の内側に弧を描く半分子IgGが疑われる沈降線を観察した(→)。

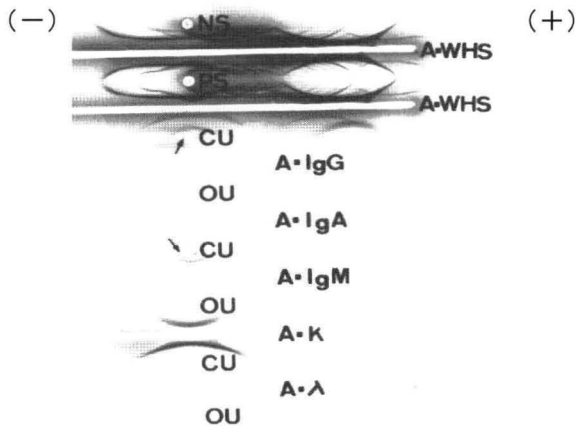


図6 原発性マクログロブリン血症患者血清および尿における免疫電気泳動像
NS：正常血清，PS：患者血清，CU：患者10倍濃縮尿，OU：患者原尿，A-WHS：抗全ヒト抗体，A-IgG：抗γ鎖抗体，A-IgA：抗α鎖抗体，A-IgM：抗μ鎖抗体，A-K：抗κ鎖抗体，A-λ：抗λ鎖抗体。
抗全ヒト抗体と抗μ鎖抗体にのみ反応する沈降線を認めた(↓)。通常IgMの分子量は90万と大きいため尿にはでない。

に知るために使用する。特にM蛋白ではH鎖とL鎖の同定に使用される。通常，全ヒト抗体と特異抗体(抗γ，抗α，抗μ，抗δ，抗ε，抗κおよび抗λ鎖抗体)を用い，M bowやM蛋白帯を観察し，M蛋白のL鎖の型を決定する。典型的なM蛋白について図2に示す。しかし稀に不可解な沈降線を検出するこ

とがある。たとえば，H鎖病蛋白⁵は抗H鎖抗体とのみ反応し，抗L鎖抗体と反応しないことから証明される。(図3，図4)にμ鎖病⁶の血清蛋白分画像とIEP像を示す。また，半分子型免疫グロブリンは，正常の免疫グロブリンの沈降線とspurを形成する低分子蛋白による沈降線が検出され(図5)^{7,8}，これらは抗H鎖抗体と抗L鎖抗体共に反応する点がH鎖病と異なる。我々は原発性マクログロブリン血症患者尿のIEPで，抗μ鎖抗体と反応する低分子蛋白を検出し(図6)，検索の結果，半分子型7S IgMであることを証明した⁹。また，近年HCV陽性患者尿のIFEで通常であれば検出しないIgM-κの反応を検出し検討の結果，通常のIgMの1/5の分子量(230kDa)の7S IgMであることを証明した¹⁰。その他，L鎖の一部欠損を認める不完全L鎖が単クローン性に増加するL鎖病¹¹，IEPやIFEでL鎖同定が不可能であったIgD型M蛋白の稀少例¹²などがある。このように，スクリーニング検査で通常とは異なる不可解な反応像を認めた場合，その原因が何かを根気良く追求することが稀少症例の発見につながる。

3. 温度依存性蛋白の検索

1) 尿BJP定性試験

多発性骨髄腫の補助診断として最も簡易的な方法には，尿中に出現しやすいモノクローナルなL鎖を検出する尿BJP定性試験がある。これは，多発性骨髄腫やマクログロブリン血症に出現するL鎖(BJP)が，56°Cで白濁沈殿し100°Cで再び溶解する性質を持っていることから，尿を56°Cで加温し，対照と濁度を比較するものである。BJPはの大部分はダイマー(二量体)で存在し，アルブミンの分子量67kDaに比して，分子量が23kDa~45kDaであるため尿中に排出されやすく，逆に血中では，M蛋白として検出されにくい見逃されやすい性質をもつ。図1-(6)に血清蛋白分画でかろうじて微量M蛋白としてとらえた像を示す。この症例はその後から血清IEP所見，尿IFE所見と骨髄所見からBJP型多発性骨髄腫と診断された。IgD型多発性骨髄腫では，われわれ

沈105 mm/hr, RBC 315×10⁴/μl, TP 11.7 g/dl, Alb 2.9 g/dl, 免疫グロブリン IgG 6960 mg/dl, IgA 16 mg/dl, IgM 22 mg/dl, 血清蛋白分画で, middle γ 位に M-蛋白帯 (49%, 5.7 g/dl) が出現し, 骨髓像では, plasma 様細胞を44.8%認めた. 血清 IEP で, IgG-λ 型 M 蛋白+λ 型 BJP を同定した. ところが, 後日依頼のあった尿 IEP では κ 型 BJP を検出し, 再検査を行ったが同様の結果であった.

3. 異常免疫グロブリンの検索

1) 免疫固定法の実施

IEP よりも, M蛋白の検出感度に優れている IFE を行った結果, IEP と同様の結果が得られた. 過去の経験から尿中 κ 型 BJP は, 通常よりも陽極側に泳動されたため, 過剰糖鎖付加が疑われ, シアリダーゼ処理を行った結果, 陰極側に移動し, microheterogeneity (微小変化) が証明された. なお, 尿中には λ 型 BJP も少量ではあるが検出された (図8).

2) 分子量の測定

さらに BJP の分子量測定を試みた. 尿をバッファ交換後, SDS-PAGE とイムノプロット法を利用し, 尿中 BJP の分子量を測定した. その結果, 正常分子量 (30 kDa) 以外に低分子量 κ 鎖を認めたため, 低分子蛋白を精製して同様に調べた結果, 14~20 kDa の間に5本のバンドが出現し, さらにこれらのバンドはシアリダーゼ処理により15 kDa と16 kDa の2本のバンドに集約した (図9).

3) N-末端アミノ酸シークエンスの解析

この2本のバンド (15 kDa, 16 kDa) について, N-末端アミノ酸シークエンスを解析した. その結果, 既知の κ 鎖 (constant region) の先端に既知の報告にはないアミノ酸残基が, 4 から15残基結合しており, κ 鎖の variable region が完全欠落していた (図10).

4) 骨髓細胞中免疫グロブリンの検索¹⁷

患者は治療後であったが, 骨髓細胞中の免疫グロブリンを調べた. 即ち, 骨髓細胞をホモジネートし, 超遠心で上清をとりイムノプロット法で検出した. その結果, 骨髓細胞中からも低分子 κ 鎖が検出された.

4. 考察

以上の結果から, 患者尿中に出現した低分子 κ 鎖は, 産生異常であることが示唆された. 分子量が小さいことから血中にとどまる時間が少なく, 血中では検出できなかったことが推定される. λ 型 BJP に関しては, 血中での分子量の測定からポリマーを形成していることが判明し, 分子量が大きくなってい

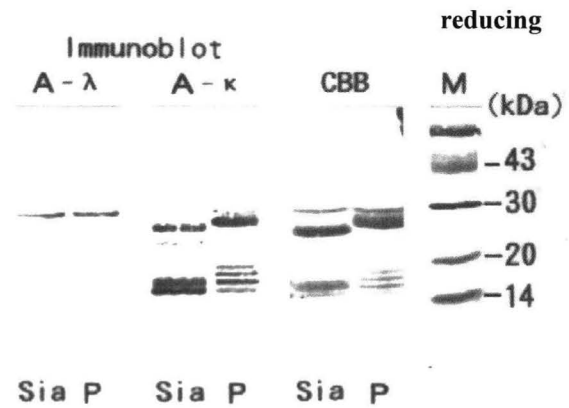


図9 低分子 κ 鎖の還元処理下で SDS-PAGE 分析像
M: 分子量マーカー, reducing: 還元処理, CBB: 蛋白染色, A-κ: 抗 κ 鎖抗体, A-λ: 抗 λ 鎖抗体, P: 患者血清, Sia: シアリダーゼ処理後患者血清

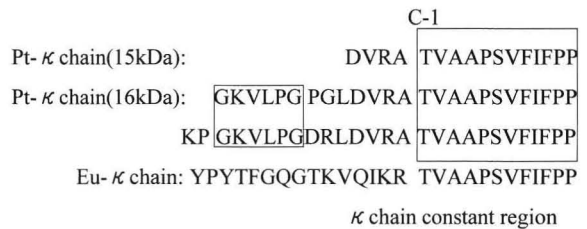


図10 低分子 κ 鎖の N-末端アミノ酸シークエンス
Pt-κ chain (15 kDa), (16 kDa): シアリダーゼ処理後の15 kDa と16 kDa の蛋白の N-末端アミノ酸シークエンス, Eu-κ chain: 既知の κ 鎖の不変部領域のアミノ酸シークエンス, C-1: 不変部 (constant region) 1 番目のアミノ酸をさす.



図11 低分子 κ 鎖の推定構造
VL: L 鎖可変部, CL: L 鎖不変部
低分子 κ 鎖は, L 鎖可変部が, 完全欠落していた.

るために, 尿中には排出され難くなっていたことが推定された. 本低分子 κ 鎖について, 異常構造の模式図を図11に示した.

■おわりに

今回, 電気泳動法を利用した臨床検査ということで, スクリーニング検査として有用な血清蛋白分画と免疫電気泳動法さらに詳細な分析法について紹介した. 今回紹介した症例は, 大部分が院内での症例

である。当院ほど免疫グロブリン異常症例が検出されている検査室は他にない。異常蛋白は、初診時や無治療時に検出され、治療が進むと減少、消失する。よって、異常蛋白が検出された場合、手際よく検討を進めることが大切である。臨床科の先生方が異常蛋白症を適切に診断し、検査部に適切な検体を提出していただける事、臨床科と検査部連携がよいことの証であると考え。

文 献

1. 米川 修(1996)血清蛋白電気泳動の解析のしかた。検と技 24: 415-426
2. 河合武子(1999)セルロースアセテート膜電気泳動法 最新電気泳動実験法 日本電気泳動学会編集 医試薬出版: 21-40
3. 河合 忠(1969)血漿蛋白。医学書院
4. 杉崎徹三(2001)クリオグロブリンの多様性と検出法。Med Technol 29: 709-712
5. 井本真由美, 山本和彦, 櫻林郁之介, 篠原兵庫, 竹中清悟, 大場康寛, 尾鼻康朗, 古田 格, 堀内 篤(1992)免疫芽球形リンパ節症に出現した異常 γ 鎖の免疫化学的特性。生物物理化学 36: 229-234
6. 井本真由美, 山本和彦, 櫻林郁之介, 篠原兵庫, 吉田浩二, 竹中清悟, 大場康寛, 尾鼻康朗, 古田 格, 前田裕弘, 堀内篤(1991)形質細胞異常症に出現した μ 鎖の免疫化学的特性。生物物理化学 35: 33-38
7. Sakurabayashi I, Kin K, Kawai T (1979) Human IgA1 half-molecules: clinical and immunologic features in a patient with multiple myeloma. Blood 53: 269-278
8. 井本真由美, 嶋村 純, 前田和成, 古田 格, 佐野徹明, 前田裕弘, 金丸昭久, 吉田浩二, 篠原兵庫, 櫻林郁之介(2005)形質細胞腫患者に認められた半分子IgGの免疫化学的特性。臨病理 Vol.53補冊 P175
9. Imoto M, Ishikawa K, Yamamoto K, Sinohara H, Irimajiri K, Kubo N, Sakurabayashi I, Horiuchi A, Akiyama T, Ohba Y, Furuta I. (1998) Occurrence of heavy chain of 7S IgM half-molecule whose NH₂-terminal sequence is identical with that of κ light chain sequence in patients with Waldenstrom macroglobulinemia. Clin Chim Acta 282: 77-88
10. 井本真由美, 古垣内美智子, 森嶋祥之, 内藤昭智, 上碓俊法, 田中裕滋, 豊増麻美, 塩山実章, 楠 進, 鯨島謙一, 船内正憲, 櫻林郁之介(2008)血中および尿中に低分子IgMが出現した混合型クリオグロブリン血症の1例。臨病理 Vol.56補冊 P149
11. Imoto M, Ishikawa K, Yamamoto K, Sinohara H, Sakurabayashi I, Matsuura K, Koyama A, Horiuchi A, Akiyama T, Ohba Y, Furuta I. (1998) A case of multiple myeloma IgG(λ) type with low molecular weight κ light chain. Clin Chim Acta 277: 99-105
12. Imoto M, Sinohara H, Sakurabayashi I, Yamamoto K, Akiyama T, Yamazumi T, Obana Y, Furuta I. (2000) Association of myeloma protein with IgG and its poor reactivity against anti-human λ antibodies: a case of IgD(λ)-type multiple myeloma. 生物物理化学 44: 9-14
13. 井本真由美, 山本和彦, 櫻林郁之介, 篠原兵庫, 秋山利行, 竹中清悟, 大場康寛, 尾鼻康朗, 古田 格, 椿 和央, 堀内篤(1995)他 過粘稠度症候群を呈した異常IgAの免疫化学的特性。生物物理化学 39: 5-12
14. Imoto M, Sinohara H, Sakurabayashi I, Akiyama T, Furuta I, Sasaki T (2003) A new type of temperature-dependent serum M protein: a case of IgG lambda type multiple myeloma Clin Chim Acta 334: 153-156
15. 藤田清貴(1995)検査室でできるM蛋白分析法。Med Technol 23: 297-304
16. 高月 清, 松崎博充(1993): 骨髄腫によるS型アミラーゼ産生。生物物理化学 37: 31-34
17. 櫻林郁之介, 荒川正明(1984)Western blotting法による抗原および抗体の分析。生物物理化学 28: 369-373