〔シンポジウム：2次元電気泳動法の活用と問題点〕

2 D-CAME 法

戸田年総*・大橋望彦*・藤田敬子*・吉田光孝**・新保靖志**
櫻林郁之介***・藤田清貴†・山田博豊††

はじめに

臨床検査において血液の検査は必須であり，自動分析機によるルーチン化が進んでいる．その検査項目の一つとしてセ・ア膜電気泳動（CAME）による血清蛋白分画が位置づけられており，これまた自動化が進んでいる．そしてここ数年は複数の研究グループによりコンピュータによる分画パターン波形解析も試みられ，他の電気泳動に比べ必ずしも分離性能的に勝っているとはいいがたい5分画像から，できるだけ多くの情報を引き出そうとする努力が続けられている．これはセ・ア膜電気泳動がルーチン検査に適した簡便な方法であるからにほかならない．しかし，いかなるデータ処理を施そうとも，本来5分画法では分離されない微小な分子異型（microheterogenity）の分析は原理的に不可能である．

それに対し O'Farrell 法などのポリアクリルアミドゲル2次元電気泳動法は，分離性能の点で5分画法よりはるかに勝っているにもかかわらず，臨床検査ではほとんど利用されていない．その最大の原因は，O'Farrell 法の煩雑な操作性にあると思われる．

われわれが開発した2次元セ・ア膜電気泳動（2D-CAME）[1~3]は，セ・ア膜の簡便性と2次元電気泳動の高い分離性能を折衷させたものであり，従来の5分画法では分離が困難であった微小な分子異型を伴う患者血清蛋白に対し，今後の臨床応用に期待がもてる．

原　理

本大会のシンポジウムで取り上げられた2次元電気泳動の中で，他の五つの方法はゲルを支持体とするのに対し，本法の特徴はゲルをいっさい使用しない点にある．したがって，分子量の違いでは分離できない．それにもかかわらず敢えてセ・ア膜を支持体に選んだのは，2次元電気泳動の分解能を臨床検査に導入したいと考えたためである．それで第1次元目では，従来の5分画法の結果と対比しやすい『濃縮電気泳動』を，第2次元目では分離性能で勝る『等電点電気泳動』を実施することとした（図1）．

第1次元目の『濃縮電気泳動』は，プラスチックで裏付けされた帯状のセ・ア膜（10 mm 幅に切断されたタイタンⅢ）の上で実施される．図2-A に濃縮電気泳動装置の模式図と不連続緩衝液の配置を示す．濃縮段階は移動度の大きい塩素イオンを先導イオン（leading ion），移動度の小さいアルギニンイオンを終局イオン（terminating ion）とする等速電気泳動（isotachophoresis）である．この条件では，蛋白質は塩素イオンとアルギニンイオンの作る界面の位置に濃縮され，シャープなゾーンとなる（図1の A-1）．

次に，陰極槽と陰極側架橋濾紙をリン酸緩衝液を含むものに交換すると蛋白質の等速電気泳動状態は破られ，pH 7.5 のリン酸緩衝液系におけるゾーン電気泳動に移行する（図1の A-2）．それ以後は従来のセ・ア膜電気

Two-dimensional cellulose acetate electrophoresis.

* Tosifusa Toda, Mochihiko Ohashi, Toshiko Fujita；東京都老人総合研究所分子生物学部門
** Mitsutaka Yoshida, Yasushi Shinbo；東邦大学理学部
*** Ikunosuke Sakurabayashi；自治医科大学大宮医療センター検査部
† Kiyotaka Fujita；花園病院検査科
†† Hironori Yamada；名古屋掖済会病院内科
Correspondence address: Tosifusa Toda, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2, Sakae-cho, Itabashi-ku, Tokyo 173, Japan.

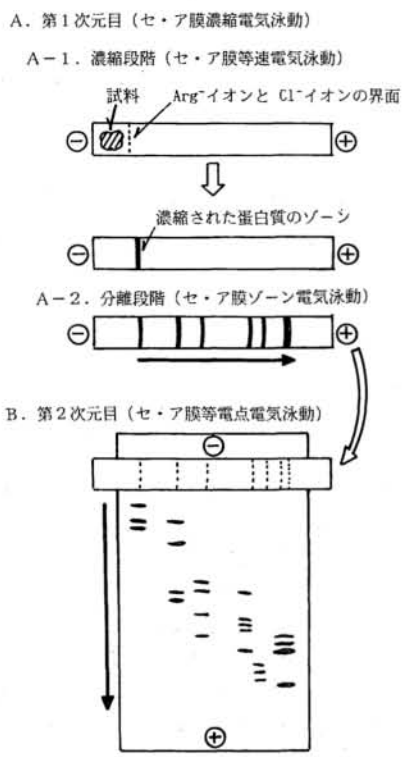

図 1. 2D-CAME 法の原理

泳動とほぼ同じ条件で分離される．したがって，5分画法データとの対比が容易である．

第2次元目では，電気浸透のないセパラックス EF 膜（60×110 mm）上で『等電点電気泳動』が実施される（図2のB）．第1次元目のタイタンⅢからセパラックス EF への蛋白質の転写は，単に膜面を密着させて通電するだけでよい．等電点電気泳動の原理は，すでによく知られているので詳しい説明は双書に譲るが，pH 7.5 ではほとんど同じ移動度を示すものの，わずかずつ等電点の異なる微小異型蛋白質（リン酸化や，シアル酸の付加，ポリアミンの結合などの場合に見られる）は，第2次元目の等電点電気泳動で初めて分離される（図1のB）．したがって，5分画法では同じ fast-γ に泳動される単クローン性の M-蛋白などを，さらに等電点異型としての観点から分析し直すこともできる．

方　法

初期の装置はわれわれで自作したが，現在は市販の装置（アオキ医理化製）を使用している．構造上重要な点は，濃縮電気泳動装置では，セ・ア膜上で不連続緩衝液境界が再現的に形成できることであり，等電点電気泳動装置においては高電圧条件下での電気泳動に耐える十分な冷却能と，外気を遮断できる密閉性である．試薬類の調製法や，操作手順については，新版電気泳動実験法（電気泳動学会編，文光堂，1989）に詳しく書かれてい

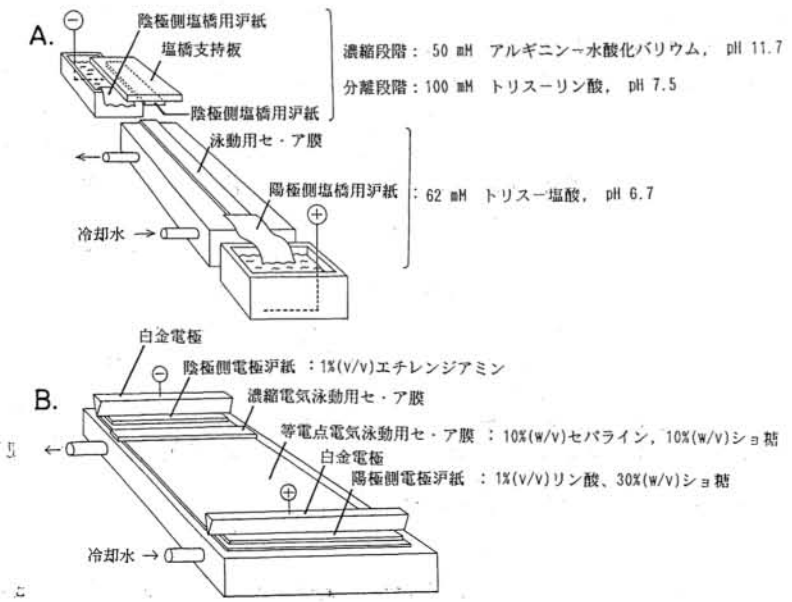

図 2. 2D-CAME 法に用いる装置の基本構造と緩衝液の配置

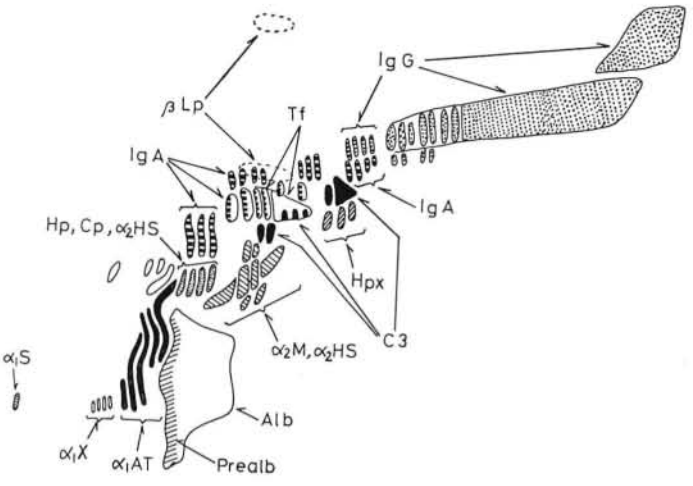

図 3. 2D-CAME 法による健常者血清蛋白質の標準パターン

るので省略する．ただし，第2次元目の通電は，『高圧セ・ア膜等電点電気泳動[4]』の条件，すなわち 300 V で 30 分，500 V で 30 分，1,500 V で 90 分に変更された．

血清蛋白 2D-CAME パターンの読み方

図3に，血清蛋白 2D-CAME パターン（健常者の標準パターン）を示す．電気泳動学会では，O'Farrell 法を例に取って『右を塩基性等電点側，左を酸性等電点側，上を高分子量側，下を低分子量側』にするように提案しているため，われわれもそれにならって 2D-CAME パターンは，このように縦が第1次元目の濃縮電気泳動（上が陰極，下が陽極で，泳動方向は上から下），横が第2次元目の等電点電気泳動（右が塩基性等電点側，左が酸性等電点側で，泳動方向は右から左）となるように置くことにしている．ここに示されたおもな蛋白質の分布より明らかなように，第1次元目の分離は従来の5分画パターンに近い．したがって，自動電気泳動装置で検出された5分画パターン上での異常性を，さらに詳しく再検査する目的で本法を利用するとき，相互の位置関係を対比することができて便利である．

応 用 例

多発性骨髄腫患者の M-蛋白に見られる異常な IgG 分子の解析に本法が大変有効であり，特長がよく引き出されるので，以下に実際の応用例を紹介する．本症例は，腰痛を主訴として名古屋掖済会病院内科に来院した 53 歳の女性で，セ・ア膜による蛋白分画像で fast-γ 位に M-蛋白を認め（図4），細胞診の結果，多発性骨

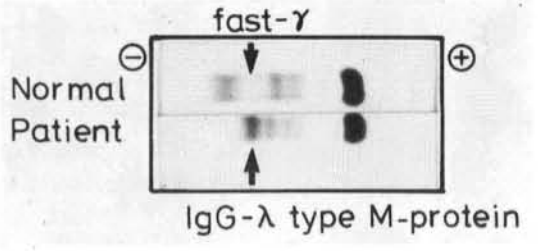

図 4. 健常者血清および骨髄腫患者血清蛋白質の1次元的セ・ア膜電気泳動パターン

髄腫と診断された症例である．その後，カラムクロマトグラフィーによる精製と免疫化学的分析によって，この M-蛋白は H 鎖の分子量が小さい異常分子 IgG であることが明らかにされた[5]．そこでわれわれは，この異常分子 IgG の分析に 2D-CAME を応用してみた．この症例のように，5分画法では均質に見えた M-蛋白も 2D-CAME では，広い範囲に等電点異型をもつヘテロな集団であることがわかる（図 5-A）．とくに正常な IgG には見られない酸性等電点領域（本来は正常な IgA が分布する領域）に数多くのスポットが存在した．その異常に低い等電点と，等間隔で連なった等電点異型性よりシアル酸の結合が強く示唆された（図 5-B）．本法では数枚のセ・ア膜を重ねて一度に泳動できるので，それぞれに対し種々の特異抗体を用いて免疫染色を施した結果，本症例の M-蛋白はすべて λ 型の IgG であると判定された（図6）．さらにノイラミニダーゼ処理を施した後で再度 2D-CAME を実施した結果，それらの酸性等電点スポットは消失し，代わって塩基性等電点側

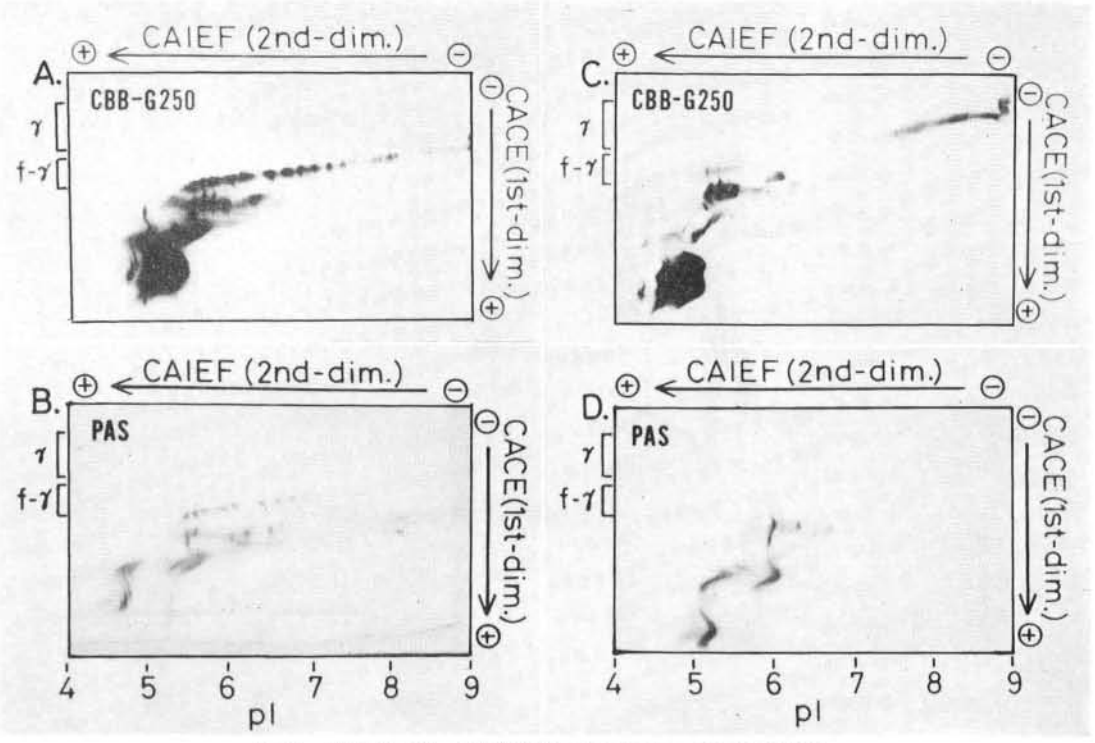

図 5. 骨髄腫患者および健常者血清蛋白質の 2D-CAME 像
A, B：患者血清，C, D：健常者血清．A, C：クマジー染色，
B, D：PAS 染色．

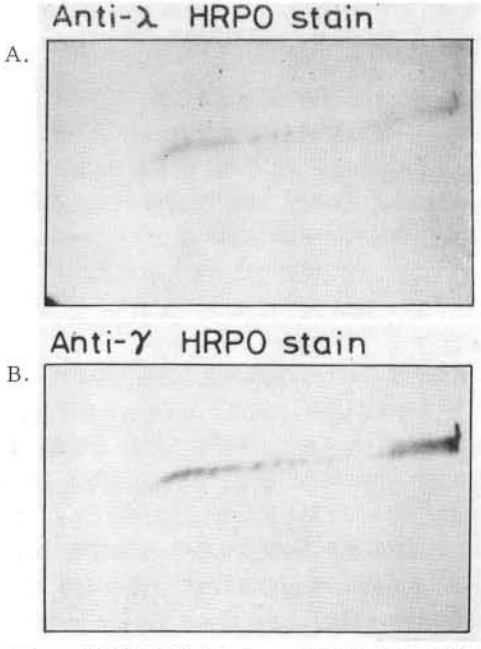

図 6. 2D-CAME 後のセ・ア膜に対する直接免疫染色による λ 鎖および γ 鎖の検出

に新たな一群のスポットが出現した（図7）．このことより，本患者血清の M-蛋白が fast-γ 位に出現した理由は IgG の等電点が酸性化したからであり，それは，おもにシアル酸の結合によるものと判定された．

すでに藤田ら[5]は，本 M-蛋白が異常分子 IgG であり，γ 鎖の CH2 ドメイン欠損例である可能性の高いことを報告している．しかしその一方，細胞診などの結果では多発性であると診断されており，この分子量異常がすべての等電点異型スポットに共通する性質であるか否かは，発癌の過程を考える上で大変に興味深い．そこで本 2D-CAME 法を用いて，この問題の解析を試みた．2次元電気泳動後，2枚の膜を常法どおりクマジー染色し，図 8-A の1から 11 の等電点異型 IgG スポットをメスで切り取った．これを 2-メルカプトエタノールを含む SDS-試料処理液中に5秒間浸してからミクロ遠心チューブに移し，沸騰水浴中で1分間インキュベート後，既製の SDS-PAGE 用ミニスラブゲル（第一化学製など）2枚の試料溝に膜切片ごと投入して SDS-電気泳動した．1枚はそのまま銀染色し（図 8-B），もう1枚はニトロセルロース膜に転写後，HRPO 標識抗ヒ

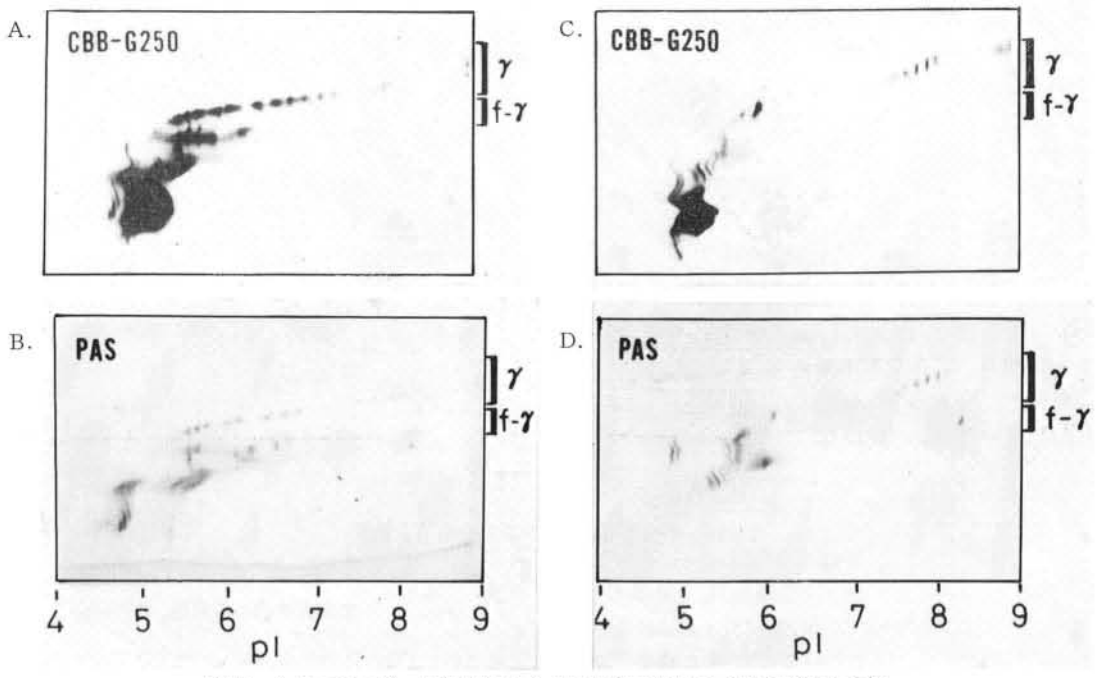

図 7. ノイラミニダーゼ処理による M-蛋白の変化の 2D-CAME 分析
A, B: 処理前, C, D: 処理後

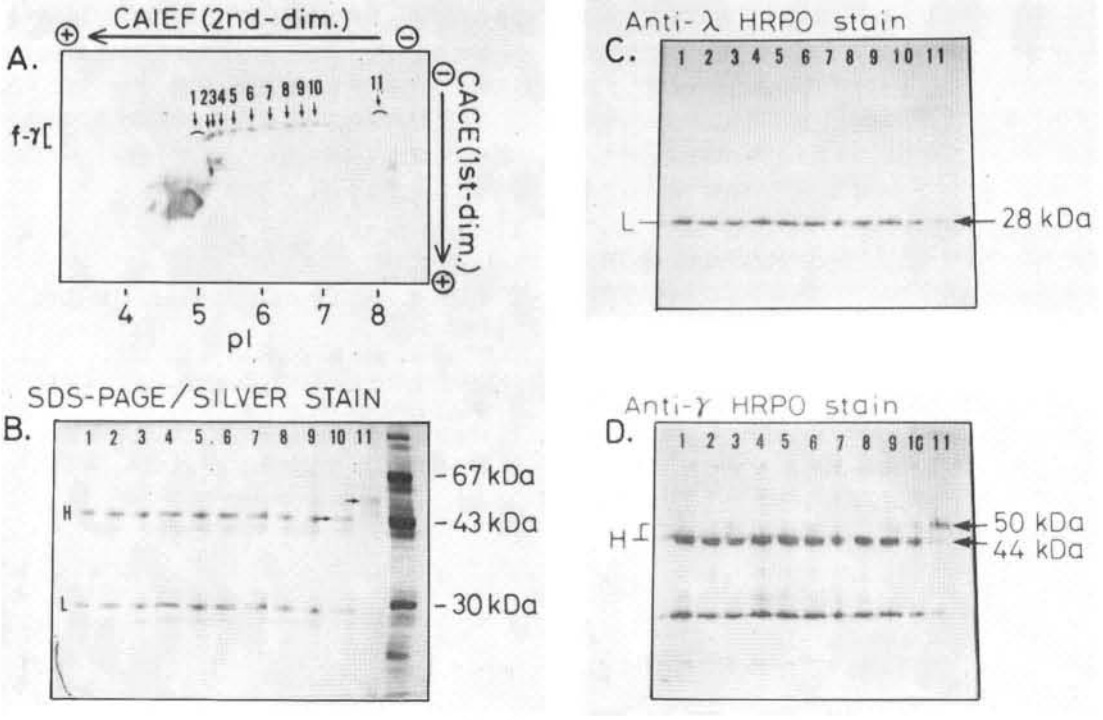

図 8. 2D-CAME 後の等電点異型 IgG スポットの SDS-PAGE
B：銀染色にて全蛋白質を検出. C, D：Western blot にて λ 鎖および γ 鎖を特異的に検出.

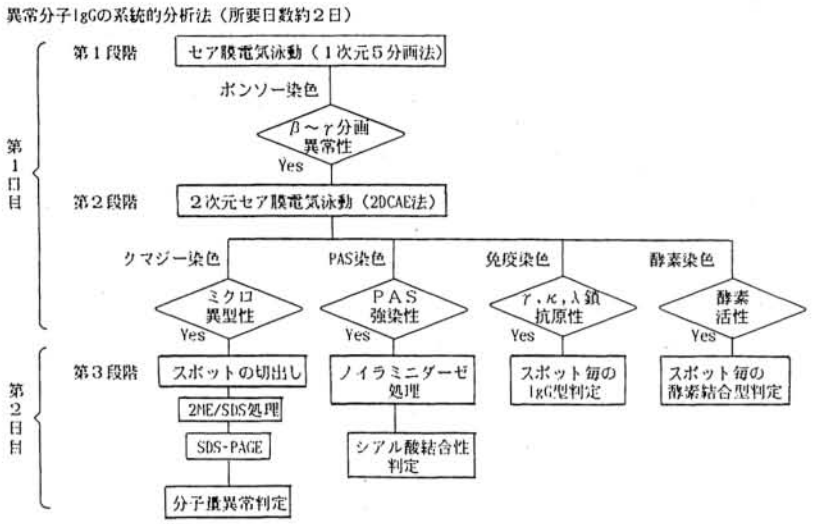

図 9. 異常分子 IgG の系統的分析（流れ図）

トλ鎖抗体を用いてλ鎖を特異的に検出し（図 8-C），続いて同じ膜に対し HRPO 標識抗ヒトγ鎖抗体を用いてγ鎖を特異的に検出した（図 8-D）．その結果，等電点が高く，γ位に分布する IgG は正常な分子量(50 kDa)のγ鎖をもつのに対し，等電点が低く，fast-γ位に分布する IgG はすべてγ鎖の分子量が約 44 kDa とやや小さいことが，明らかとなった．この結果は，本患者は正常な（少なくとも分子量や PAS-染色性の点で）γ鎖を産生する正常な形質細胞と，分子量および PAS-染色性の点で異常なγ鎖を産生する形質細胞癌を合わせてもっており，この異常性の獲得が癌化の過程で起こったものである可能性が高い．

この他，本 2D-CAME 法では酵素活性や，蛋白質分子間の会合状態を維持したまま泳動することができるので，酵素結合性免疫グロブリンの分析も可能である．以上の特長を加味し，われわれは図 9 に示すような『系統的な異常分子 IgG の分析法』を考案した．今後さらに，骨髄腫患者の形質細胞の定性分析手段として利用できるか否かを検討する予定である．

本法の欠点と将来性

本 2D-CAME 法の特長はセ・ア膜を用いるので簡便である点にあるが，すでに述べたように『分子量では分けられない』という欠点もある．しかし上述のように，得られたスポットを切り抜いて SDS-PAGE にかけることができるので，さほど重大な欠点とはならない．むしろ第 1 次元目の分離が従来の 5 分画パターンによく似ていることは臨床応用を進める上で便利であり，将来このような等電点異型蛋白質の分子異常を分析するための有効な手法となりうるものと考える．

文　献

1) Toda, T. et al.: Anal. Biochem., 119: 1167, 1982.
2) 戸田年総，他：臨床化学，11：18，1987.
3) 電気泳動学会編：電気泳動実験法，新版，文光堂，東京，1989，p. 98.
4) 戸田年総，他：生物物理化学，31：435，1987.
5) 藤田清貴，他：生物物理化学，34：19，1990.