

白血病および悪性リンパ腫における M成分に関する検討

第 1 編

螢光免疫電気泳動法による IgM 型微量 M成分の L 鎖型の判定

岡山大学第二内科（主任：木村郁郎教授）

藤 田 峯 治

（昭和54年11月26日受稿）

Key words : M成分, 悪性リンパ腫, 白血病

緒 言

M成分は、単 clone 性の免疫 globulin の増加によるものと考えられ、免疫電気泳動法では、電気泳動上均一な移動度を有する免疫 globulin の増加を示す所見、すなわち M-bow がみられるが、その L 鎖が均一であることが必要である。この L 鎖型の検討に際しては、抗 κ および抗 λ 鎖特異抗血清による免疫電気泳動法が用いられ、2つの型の抗血清のうち、一方のみとの反応において、M-bow が形成されることにより、その均一性が確認されてきた¹⁾。

M成分の screening 法としては、免疫電気泳動法および cellulose acetate 膜電気泳動法の併用が有用と考えられ、この2つの方法を平行して用いて、悪性リンパ腫および白血病における M成分の出現頻度を検討していたところ、寒天免疫電気泳動法により、IgM 型微量 M成分の存在を示唆する所見を極めて高頻度にとらえた。

一方、IgM は分子 size が巨大であり²⁾³⁾⁴⁾、euglobulin 的性格が多いため^{4),5)}、通常免疫電気泳動法の支持体内での拡散係数は、他の class の免疫 globulin に比べ、小さく、電気泳動位置も、IgG および IgA の分布範囲内にあり、量的にもこれらの免疫 globulin と比較すると、微量成分である。このため、IgM 型 M成分は、均一成分量が比較的多量で

あっても、抗 L 鎖血清による免疫電気泳動法では、他の class の免疫 globulin により抗体が消費され、L 鎖型の判定が困難であることがしばしば経験される。

このような症例の L 鎖型の判定に際しては、還元アルキル化により IgM の分子 size を小さくし、拡散を容易にする方法⁶⁾、あるいは IgM 分子 size の特性を利用して、他の class の免疫 globulin から分離する方法^{7),8)}が多く用いられてきた。しかし、これらの方法には、操作が複雑であること、一定量の資料を必要とすることなどの難点がある。さらに、今回の目的とする白血病および悪性リンパ腫にみとめられた IgM 沈降線の異常は、今迄の報告にはみられないような微量の M成分の存在を示し、従来の方法では、L 鎖型の判定は困難と考えられたので、より簡便な方法として、FITC 標識抗 L 鎖血清を用いた L 鎖型判定法、すなわち免疫電気泳動沈降線螢光抗体法（螢光免疫電気泳動法）を考案し、その有用性について報告する。

実験対象および方法

1 実験対象

1) L 鎖型既知の M 蛋白血症患者血清

IgG (κ) および (λ) 型の骨髄腫および良性 M 蛋白血症の各 1 例、IgA (κ) 型骨髄腫の 2 例、IgA (λ) 型骨髄腫および良性 M 蛋白血症の各 1 例、IgM (κ) 型良性 M 蛋

白血症 2 例, IgM (λ) 型 Macroglobulinemia Waldenström の 1 例, 計 11 例の血清について蛍光免疫電気泳動法を行った。骨髄腫または Macroglobulinemia Waldenström は、骨髄線像、血清蛋白所見、および細胞、組織学的所見により、診断が確定されている症例である。良性 M 蛋白血症の基礎疾患は、動脈硬化症 3 例、冠不全 1 例、肺線維症 1 例であった。以上の 11 例のうち、10 例は、抗 L 鎖血清による免疫電気泳動法のみにより、L 鎖型の判定が可能であったが、IgM (κ) 型良性 M 蛋白血症の 1 例では、cellulose acetate 膜電気泳動法には M 成分の所見はみられず、寒天免疫電気泳動法単独、あるいは 2 Mercaptoethanol 処理法の併用では L 鎖型は判定できず、Sephadex G200 を用いたゲル濾過法を併用することにより判定可能であった症例である。この症例の Mercaptoethanol 処理後の免疫電気泳動像を示す。(図 1)

は fast γ であった。一方、IgG (λ) 型骨髄腫では、各々 10.0 g/dl, 4.3 g/dl であり、M 成分は slow γ に位置した。

2) 正常人対照

輸血供血者 8 名の血清を使用した。これらの血清は、cellulose acetate 膜電気泳動法および抗 γ , 抗 α , 抗 μ 鎖特異抗血清による免疫電気泳動法のいずれにも M 成分の所見は呈さなかった。

蛍光免疫電気泳動法の L 鎖型判定可能範囲の検討に使用した正常人血清は、以上の 8 名以外のものであるが、同様に、cellulose acetate 膜電気泳動法および寒天免疫電気泳動法のいずれにも M 成分の所見はみとめられず、血清総蛋白量 7.0 g/dl, γ globulin 量 0.9 g/dl であった。

3) IgM 沈降線異常症例

白血病、悪性リンパ腫患者血清にみられた IgM 沈降線異常合併例 17 例中 7 例の血清を用いた。これら

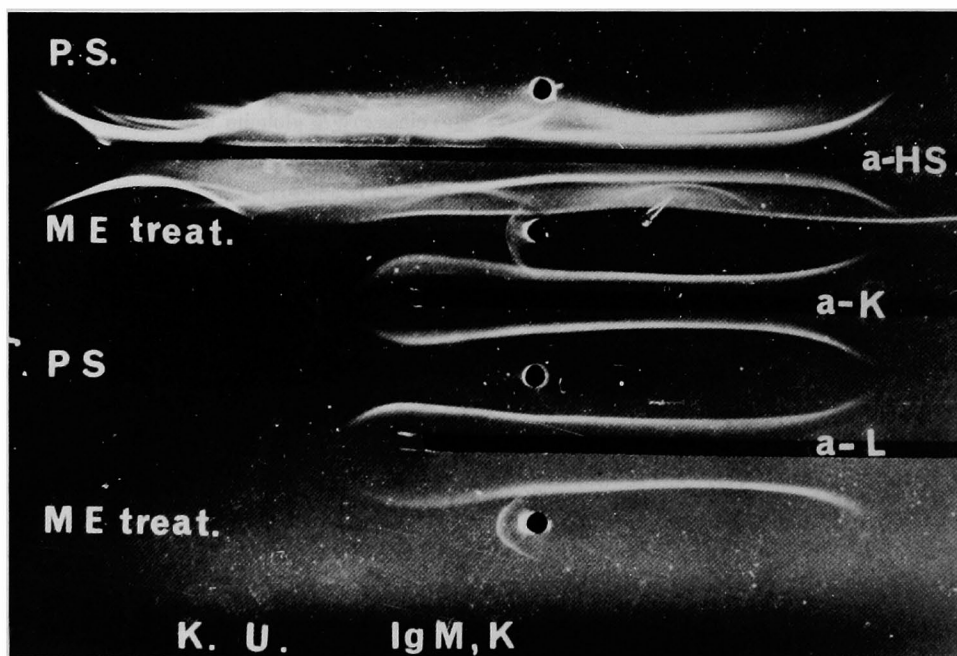


図 1. Mercaptoethanol 処理簡便法を行った IgM (κ) 型 M 成分の免疫電気泳動像

蛍光免疫電気泳動法の L 鎖型可能範囲の検討に際して、IgG (κ) および (λ) 型骨髄腫各 1 例の血清を使用した。IgG (λ) 型骨髄腫は上記の 11 例のうちの 1 例であり、(κ) 型はこれらの症例以外のものであった。IgG (κ) 型骨髄腫血清の総蛋白量は 9.0 g/dl, M 成分量は 4.4 g/dl であり、M 成分の泳動位置

の症例は、血液、細胞、組織学的に診断が確定されたものであり、IgM 沈降線の異常は、抗ヒト全血清、または抗ヒト免疫 globulin 血清および抗 μ 鎖鎖特異抗血清による免疫電気泳動法の 2 つの方法において、同様の変化がみられているが、cellulose acetate 膜電気泳動法には、M 成分の所見はみとめられなかった。

2 実験方法

1) cellulose acetate 膜電気泳動法

支持体には、長さ6cm、幅1.5cmのSeparax膜を用い、資料は、血清約0.4 μ lを陽極側より2.4cmの位置に均等に塗布した。緩衝液には、ペロナール緩衝液pH8.6、イオン強度0.05を用い、通電条件は、cellulose acetate 膜の幅1cmに対し、0.4mAの定電流とし、albuminが原点より約1.2cm位移動時に泳動を終了した。albuminの移動距離は、正常人血清に少量のPonseau 3Rを添加したものを同時に泳動し、色素の泳動距離により判定した。泳動終了後、直ちにPonseau 3R 0.8g、三塩化酢酸6.0g、蒸留水100mlの組成の染色液中で2～3分間染色し、1%酢酸溶液を使用して、back groundの色素が十分とり除かれるまで、数回脱色液をとりかえ、脱色を行った。この標本を室温にて乾燥し、異常bandの有無について、透過光および照射光の両者により検討した。M成分量あるいは γ globulin量は、染色標本をdecalineにより透明化後、densitometryにより百分率を算出し、総蛋白に対するg/dlとしてこれを求めた。

2) 寒天免疫電気泳動法

Difco社製special noble agar 0.6gおよび半井社製agarose 0.6gをpH8.6、イオン強度0.025のペロナール緩衝液100mlに湯煎、溶解せしめ、約15mlを10cm $\times$ 70cmのガラス板に均等に展開し、室温中でゲル化させたものを支持体として使用した。抗原孔の位置は、中央より7mm陰極であり、直径は約1.2mmであった。抗体溝の幅は1.2mm、抗原孔と抗体溝の距離は約4.5mmとし、資料は、血清約3 μ lを添加した。泳動槽の緩衝液には、ペロナール緩衝液、pH8.6、イオン強度0.05のものを用い、通電は、寒天板の幅1cmに対し、3mAの定電流により、albuminが原点より約4.5cm移動時に泳動を終了した。albuminの移動距離は、cellulose acetate 膜電気泳動法と同様の方法により判定した。泳動終了後、抗体溝に抗血清を充満し、水平の湿潤箱中で免疫反応を行った。各classの免疫globulinのうち、IgGおよびIgAについては、抗血清を添加後12～15時間、IgMは24～36時間後にM成分の有無を観察した。次に、生食中で3～5日間脱蛋白を行い、標本を乾燥し、amidoblack 10B 0.6g、水酢酸10ml、methanol 45ml、蒸留水45mlの染色液により染色し、5%酢酸溶液中でback-groundの色素を除去した標本について、免疫globulin沈降線の異常の有無を再度検討した。

3) 螢光免疫電気泳動法

螢光免疫電気泳動法は、以下の方法にしたがって実施した。

(1)2枚の寒天板を同一条件により作成し、検討予定のM成分の属しているclassの抗H鎖特異抗血清を用いて免疫電気泳動を行い、2枚の寒天板に形成された沈降線が同一であることを肉眼的に確認した。この場合には、2つの沈降線が、可能な限り、同一形態であることが必要であるので、寒天板の厚さ、組成、抗原量、抗体溝と抗原孔の距離抗体溝の幅および長さ、抗体溝の断面の角度、泳動距離、免疫反応の条件などが同一であるように、特に注意を払った。(2)前述の標本をPBS中に浸し、約7日間、静水の条件で脱蛋白を行った。PBSは1日2回とりかえた。(3)濾紙を使用して、抗体溝に貯留していたPBSを吸収除去し、一方の標本にFITC標識抗 κ 血清、他方に同じく抗 λ 血清を、免疫電気泳動時の抗体溝に注入し、反応させた。この免疫反応では、FITC標識抗血清が拡散し、沈降線に達することが必要であり、これはFITCの色調により観察可能であったが、約48時間を要した。この際の免疫反応は、暗室、水平の湿潤箱中で行った。FITC標識抗 λ 血清の使用量は、抗体溝の長さにより異なるが、IgG沈降線の場合は60 μ l、IgAおよびIgMは40 μ lを使用し、同一資料では、抗 κ と抗 λ 血清を等量使用するように特に注意した。

3)以上の反応を終了後、暗室条件で、免疫電気泳動の場合と同様に、PBSを用いて水洗、脱蛋白を行い、免疫反応にあずからなかったFITC標識抗 λ 血清を除去した。

(4)次に、日本光学社製の螢光顕微鏡よりのFITC特異螢光励起光を凸面鏡により反射し、上述のFITC標識抗 λ 血清を反応させた免疫電気泳動沈降線に照射し、 κ と λ の2つのFITC標識抗 λ 血清の反応間での、沈降線異常部分における特異螢光強度差を観察した。

4) 抗血清

抗ヒト全血清は、正常人10名のプール血清をFreund complete adjuvantにemulsionとし、2週間に1回、4回以上家兎に免疫し、得られた抗血清のうち、IgG、IgAおよびIgMの3つのclassの免疫globulinの沈降線が明瞭に形成されたものを使用した。抗ヒト免疫globulin血清は、カプリル酸を使用して免疫globulinを分画し、これを抗原として抗血清を作成し、この抗血清を用いて免疫電気泳動を行い、得られた免疫globulinの沈降線を抗原として、Freund complete adjuvantとともに家兎に免疫して

作成したものを用いた。抗 γ 、抗 α 、抗 μ 、抗 κ 、抗 λ 鎖特異抗血清、FITC 標識抗 κ および抗 λ 血清は、Behring Werke 社製の家兔血清を使用した。

5) 蛍光免疫電気泳動法におけるL鎖型判定可能範囲の検討

IgG(κ)型およびIgG(λ)型骨髄腫の各1例の患者血清を、正常人血清を用いて、40, 80, 160, 320, 640倍に各々稀釈し、cellulose acetate膜電気泳動法および抗 γ 鎖特異抗血清による寒天免疫電気泳動法において、M成分の所見がみとめられる範囲と蛍光免疫電気泳動法におけるL鎖型判定可能範囲の比較検討を行い、また、M成分の減少に際しての蛍光 pattern の変化についての検討も行った。

6) 正常人における蛍光免疫電気泳動所見の検討。

輸血供血者8名のIgG, IgA およびIgMについて、蛍光免疫電気泳動法を行い、蛍光 pattern の異常の有無を検討した。

7) FITC 標識抗L鎖血清の反応による沈降線の変化の検討。

輸血供血者8名のIgA沈降線では、FITC標識抗L鎖血清と反応前、後のものをamidoblackにより染色し、反応後の沈降線への蛋白の結合状態を検討した。また、11例のM蛋白血症患者の沈降線についても、同様の蛋白染色を行い、FITC標識抗 κ 、または抗 λ 血清を反応させた場合のMbow部分における蛋白結合状態の相異を検討した。

8) FITC 非標識抗L鎖血清による吸収試験

L鎖型判定可能範囲の検討に使用した80倍稀釈の骨髄腫血清を用いて、抗 γ 鎖特異抗血清による寒天免疫電気泳動を行い、この沈降線にFITC非標識抗 κ 、または抗 λ 血清をあらかじめ反応させた後、これと同型のFITC標識抗L鎖血清を反応させた場合のFITC特異蛍光強度を検討した。

9) IgM異常症例への蛍光免疫電気泳動法の応用

白血球および悪性リンパ腫にみとめられたIgM沈降線異常症例に蛍光免疫電気泳動法を応用し、これらの異常がM成分によるものか否かを検討すると同時に、蛍光免疫電気泳動法が、これらの症例のL鎖型の判定に際し、有用であるか否かを検討した。

実 験 成 績

1. L鎖型既知のM成分血清における蛍免疫電気泳動所見

IgG(κ)型および(λ)型の良性M蛋白血症の各1例でな、M成分のL鎖と同型のFITC標識抗L鎖血

清を反応させた場合のFITC特異蛍光は、Mbowの中心に近づくにしたがい、次第に増強していったが他の型のFITC標識抗L鎖血清との反応では、正常部分に比較してM-bow部分の特異蛍光の減弱がみられた。2例のIgG型骨髄腫も良性M蛋白血症と同様の所見を呈したが、IgG(κ)型骨髄腫の1例においては、2本のIgG沈降線のうち、1本は著明な抗原過剰の pattern を示し、この沈降線では、FITC標識抗 κ 血清を反応させた場合にも、M-bowの中心部分のFITC特異蛍光の増強はみられず、むしろ、減弱傾向を示した。しかし、FITC標識抗 κ および抗 λ 血清を反応させた場合のM-bow部分におけるFITC特異蛍光強度を比較すると、すべての症例において、M成分と同じL鎖型に対する抗血清を反応させた場合のFITC特異蛍光が、他の型の抗血清との反応にくらべて、明らかに強く、その相異は明瞭であった。(図2)

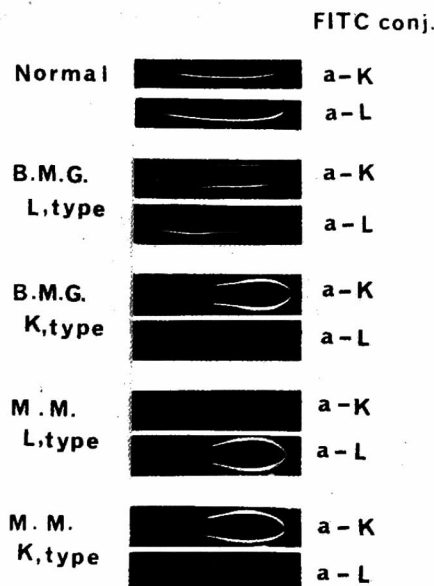


図2. IgG型M蛋白血症患者血清の蛍光免疫電気泳動像
M.M.; 多発性骨髄腫
B.M.G.; 良性M蛋白血症

IgA型のM蛋白血症患者血清もIgG型と同様の所見を呈した。(図3)

IgM(κ)型良性M蛋白血症の2例では、沈降線全体が、FITC標識抗 κ 血清との反応に際して、強い特異蛍光を示し、FITC標識抗 λ 血清と反応させた

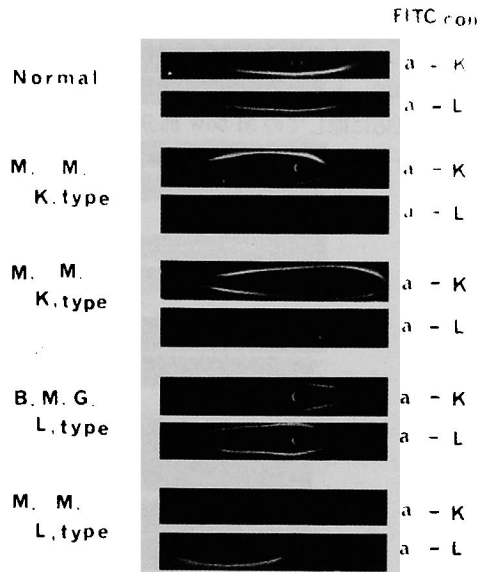


図3. IgA型M蛋白血症患者血清の蛍光免疫電気泳動像
M.M. ; 多発性骨髄腫
B.M.G.; 良性M蛋白血症

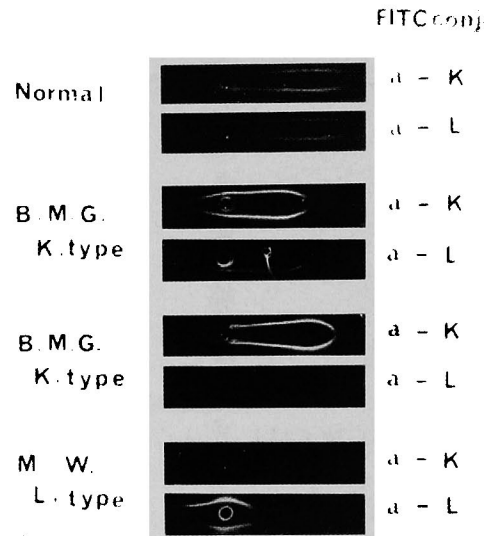


図4. IgM型M蛋白血症患者血清の蛍光免疫電気泳動像
M.W. ; Macroglobulinemia Waldenström
B.M.G.; 良性M蛋白血症

場合には、極めて弱い特異蛍光を示すのみであった。IgM(入)型 Macroglobulinemia Waldenström の1例では、FITC 標識抗入血清との反応に際して、強い特異蛍光がみられ、FITC 標識抗入血清を反応させたものは、ほとんど特異蛍光を示さなかった。(図4)

図5にIgM(κ)型良性M蛋白血症においてみられたFITC 特異蛍光を示すが、黄緑色調を呈し、他の症例でも、特異蛍光は同様の色調であった。(図5)

2 蛍光免疫電気泳動法におけるL鎖型判定可能範囲の検討

cellulose acetate 膜電気泳動法および寒天免疫電気泳動法におけるM成分所見の判定可能範囲の検討を試みた結果、cellulose acetate 膜電気泳動法ではIgG(κ)および(入)型骨髄腫ともに40倍稀釈まで異常band がみとめられた。(図6)

抗γ鎖血清を用いた寒天免疫電気泳動法では、IgG(κ)型は160倍、λ型骨髄腫は80倍稀釈までM成分の所見がみられた。(図7)

蛍光免疫電気泳動法では、IgG(κ)型および(入)型骨髄腫ともに、160倍稀釈までL鎖型の判定が可能であった。骨髄腫患者血清を稀釈することにより、

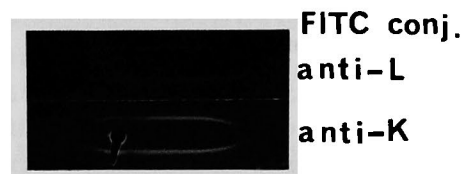


図5. 蛍光免疫電気泳動法のFITC 特異蛍光の色調

蛍光免疫電気泳動法における蛍光 pattern は次のように変化した。すなわち、40倍稀釈では、IgG(κ)およびλ型骨髄腫ともに、M成分のL鎖と同じ型に対するFITC 標識抗L鎖血清を反応させた場合には、M-bow 部分のFITC 特異蛍光は、正常部分にくらべて“強まり”を呈し、この結果、異常部分の沈降線の“ふくらみ”が、FITC 標識抗L鎖血清と反応前より、さらに明瞭になった。一方、他の型の抗血清を反応させた場合には、M-bow 部分の特異蛍光は“弱まり”を示し、沈降線の異常部分は、正常部分に比較して、“細まり”を呈した。40倍稀釈では、このような沈降線異常部分における“ふくらみ”の増強効果は減少し、M成分のL鎖とは異なる型に対するFITC 標識抗L鎖血清との反応に際してみとめられた沈降線の“細まり”は不明瞭になったが両者の差は明瞭であった。160倍稀釈では、M成分のL鎖と同じ

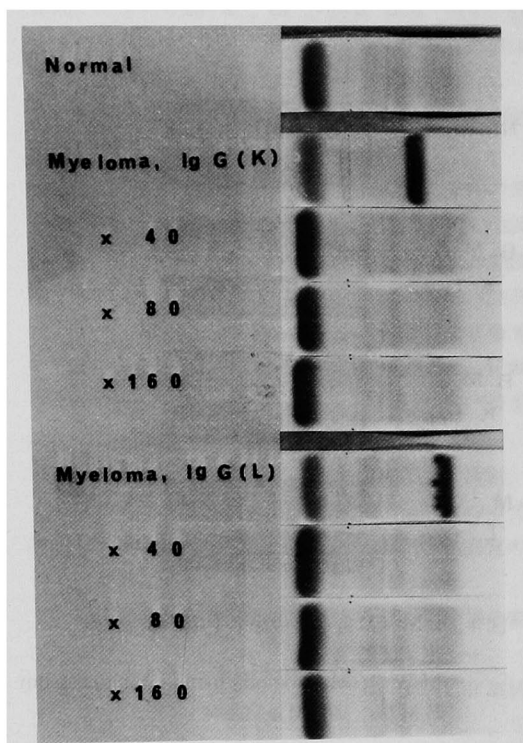


図6. 正常人血清により稀釈した骨髄腫患者血清の cellulose acetate 膜電気泳動像

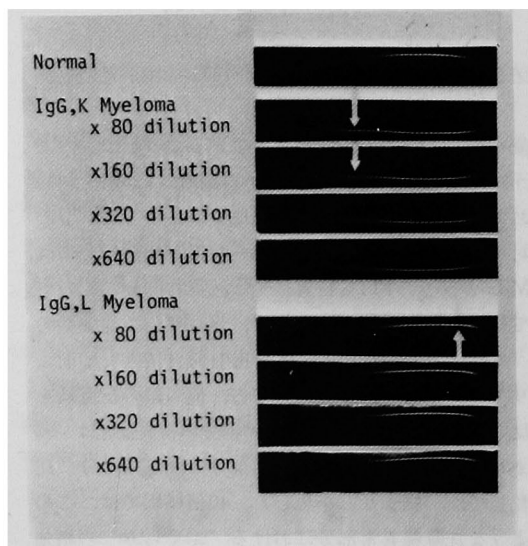


図7. 正常人血清により稀釈した骨髄腫患者血清の抗H鎖特異抗血清による寒天免疫電気泳動像

型に対する FITC 標識抗 L 鎖血清との反応に際しての M-bow 部分の FITC 特異蛍光の増強がみられるのみであり、前述の沈降線異常部分における“ふくらみ”の増強、あるいは他の型の FITC 標識抗 L 鎖血清との反応に際しての M-bow 部分における FITC 特異蛍光の“弱まり”はみとめられなかった。(図8)

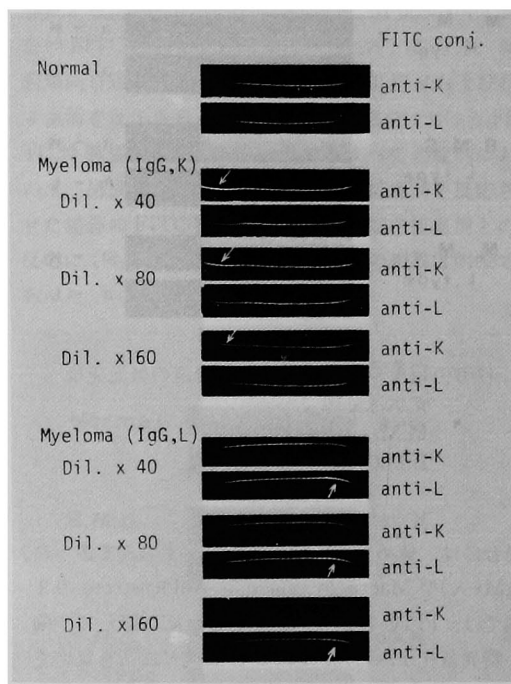


図8. 正常人血清により稀釈した骨髄腫患者血清の蛍光免疫電気泳動像

3. 正常人における蛍光免疫電気泳動所見の検討.

輸血供血者8名のIgGおよびIgMには異常はみられなかったが、1名に、IgA(κ)型M成分の存在を示す所見がみとめられ、この所見は、2回の蛍光免疫電気泳動法を行ったところ、常に同様であった。(図9)

4. FITC 標識抗 L 鎖血清の反応による沈降線への蛋白の結合.

輸血供血者8名のIgA沈降線のamidoblack染色では、FITC 標識抗 L 鎖血清を反応後のものは、反応前のものと比較して、沈降線が濃染し、FITC 標識抗 L 鎖血清を反応させることにより、何らかの蛋白が結合していることを示した。図10の最下段は、IgA(κ)型微量M成分の存在が考えられた症例であるが、

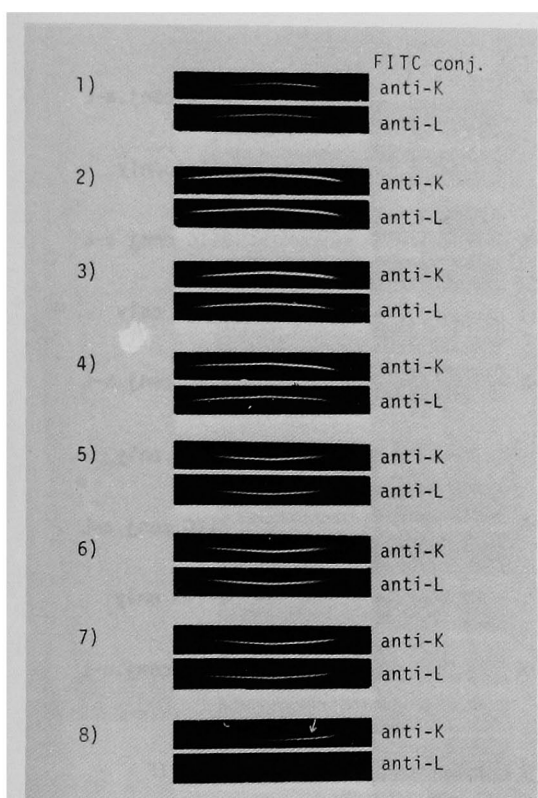


図9. 輸血供血者のIgA沈降線の蛍光免疫電気泳動像

FITC 標識抗λ血清を反応させたものは矢印の部分 amidoblack に濃染し、反応前および FITC 標識抗λ血清を反応させたものには、この所見はみとめられなかった。(図10)

IgG 型 4 例, IgA 型 4 例, IgM 型 3 例, 計11例の M 蛋白血症では、各々上段は FITC 標識抗λ血清、下段は同じく抗λ血清を反応させているが、同様の蛋白染色を行った。M 成分の L 鎖と同じ型に対する FITC 標識抗 L 鎖血清を反応させたものは、他の型の抗血清との反応の場合にくらべて、沈降線の M-bow 部分が強く染色された。(図11)

5. FITC 非標識の抗 L 鎖血清による吸収試験

FITC 非標識の抗 L 鎖血清をあらかじめ反応させることにより、その後、FITC 標識抗 L 鎖血清を反応させた際の FITC 特異蛍光は、著明に減少したが、極めて軽度の特異蛍光の残存がみとめられた。(図12)

FITC 標識抗 L 鎖血清を反応させない沈降線に FITC 特異蛍光励起光を照射すると、微弱な蛍光がみら

れたが、その色調は白色調であり、FITC 特異蛍光とは明らかに区別できるものであった。

6. 白血球および悪性リンパ腫にみられた IgM 沈降線異常症例における蛍光免疫電気泳動所見

N.K.例では、原点よりやや陰極、およびさらに陰極に 2 つの IgM 沈降線の異常がみられたが、前者、すなわち抗原孔側のものは FITC 標識抗λ、陰極側のものは FITC 標識抗κ血清を反応させた場合に FITC 特異蛍光が明らかに強いことから、2 つの M 成分の存在が示された。T.H.例では、沈降線の異常部分の FITC 特異蛍光は、FITC 標識抗λ血清との反応に強く、FITC 標識抗κ血清との反応では、この部分の特異蛍光はほとんどみとめられなかった。J.I.例および M.T.例では、異常部分の特異蛍光は、FITC 標識抗λ血清を反応させた場合に強く、FITC 標識抗κ血清を反応させた場合には、この部分の特異蛍光は、正常部分と比較して、減弱傾向を示した。Y.T.および T.T.例では、FITC 標識抗λ血清との反応に際して、沈降線異常部分の FITC 特異蛍光の増強がみられたが、FITC 標識抗κ血清との反応では、正常部分と同程度の特異蛍光がみとめられるのみであった。S.O.例では、FITC 標識抗κおよび抗λ血清の反応ともに、沈降線異常部分における FITC 特異蛍光は、正常部分と比較して、増強していたが、抗κ血清と抗λ血清の反応を比較すると、FITC 標識抗κ血清を反応させた場合の特異蛍光が明らかに強く、κ 型 M 成分と考えられた。(図13)

考 案

M 成分検出の screening 法としての cellulose acetate 膜電気泳動法と寒天免疫電気泳動法の併用の利点について。

cellulose acetate 膜電気泳動法は、操作が簡便であり、血清蛋白の分画比の算出が容易であることなどの利点があり、多くの施設で、M 成分を含む血清蛋白分析の screening 法として用いられている。しかし、この方法は、今回の比較成績でも明らかなように、寒天免疫電気泳動法にくらべて、M 成分の検出感度は劣っている。今回の実験に使用した 2 例の IgG 型骨髄腫のうち、(λ)型の 1 例では、M 成分は slow γ の位置に泳動され、この位置には、他の血清中の蛋白は存在しないので、IgG を単離して実験を行っても、優劣のない結果が得られるものと思われる。すなわち、単一 class の免疫 globulin についても、M 成分の検出感度は、寒天免疫電気泳動法が優

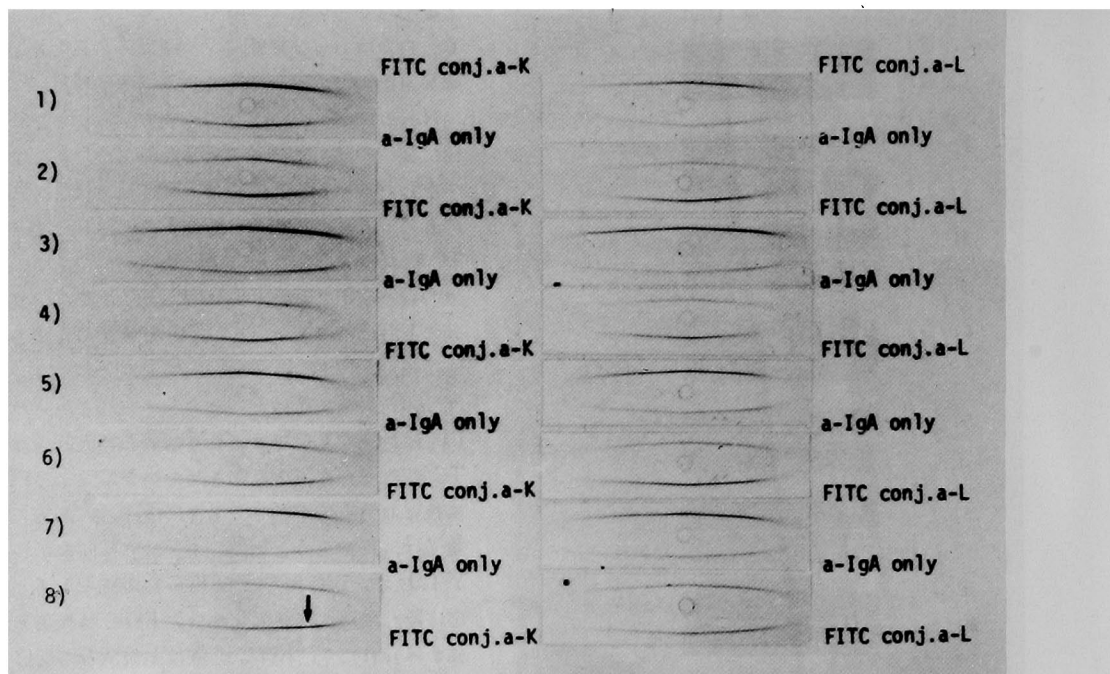


図10. 輸血供血者のIgA沈降線にFITC標識抗L鎖血清を反応前(a-IgA only)および反応後(FITC conj. a-K又はFITC conj a-L)の蛋白染色像

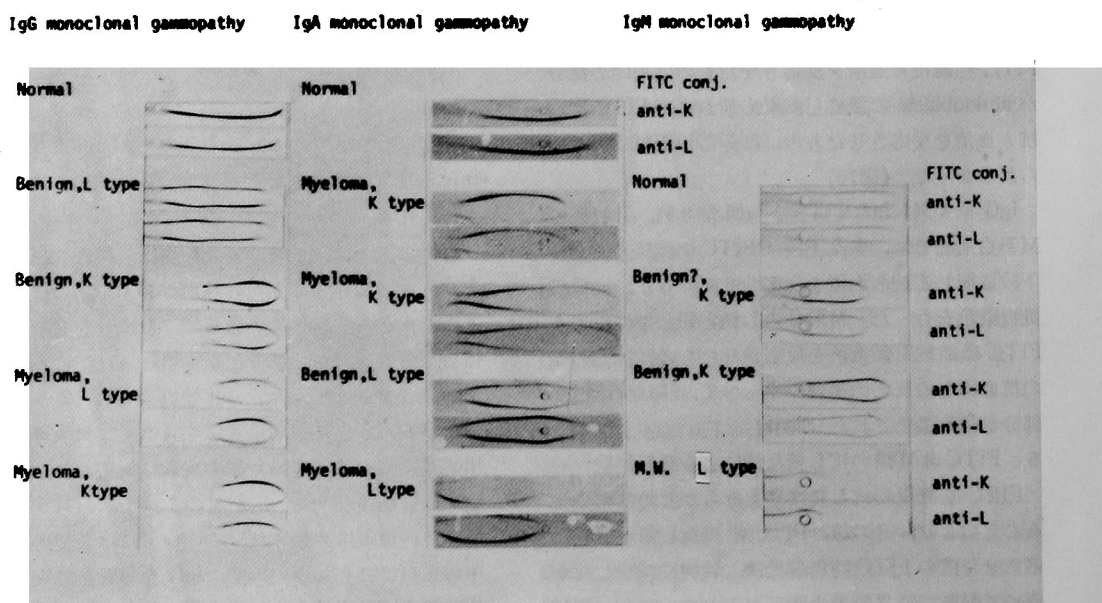


図11. M蛋白血症患者血清のM-bowにFITC標識抗L鎖血清を反応後の蛋白染色 (FITC標識抗K血清と抗L血清との比較)

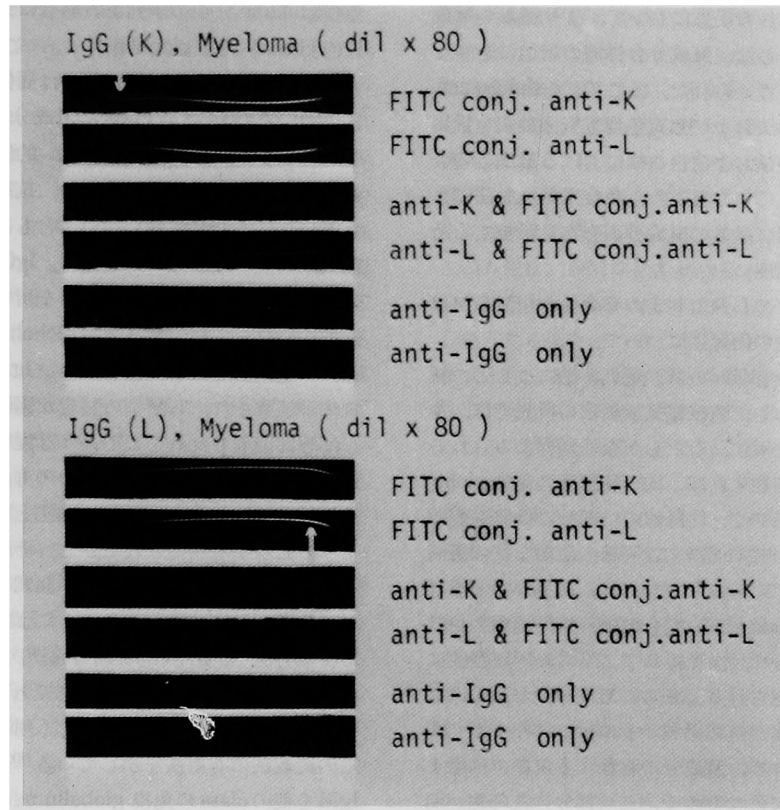


図12. FITC 非標識抗L鎖血清による吸収試験

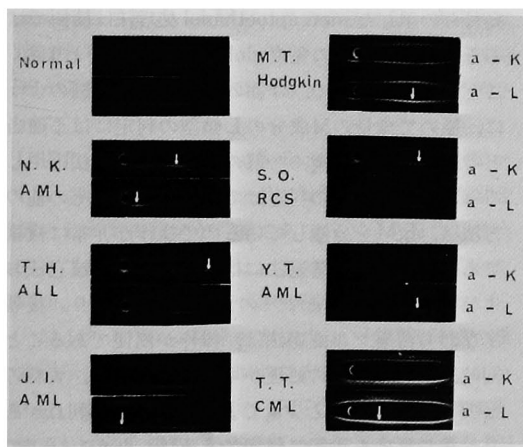


図13. 白血病および悪性リンパ腫にみられたIgM沈降線異常症例の蛍光免疫電気泳動像

れている。この他にも、cellulose acetate 膜電気泳動法と比較すると、免疫電気泳動法では、IgG, IgA およびIgMの3つのclassの免疫globulinが個別に

観察できることが利点と考えられる。とくに、IgM型M成分のように、M成分の属しているclassの免疫globulinが微量成分である場合には、cellulose acetate 膜電気泳動法のように、免疫globulin全体に対する均一成分量の濃度比によって、M成分を検出する方法では、検出しえない程度の微量M成分であっても、免疫電気泳動法では、これを検出することができることも考えられる。このように、免疫電気泳動法は、M成分の検出感度に優れているが、反面、抗原の拡散不良、あるいは抗血清中に目的とする物質に対する抗体が含まれていない場合には、M成分の検出はできない。免疫電気泳動法とcellulose acetate 膜電気泳動法の併用は、これらの両者の欠点を補い、良好な結果が期待できるscreening法と考えられる。

一方、造血臓器の悪性腫瘍、特に白血病では、M成分に関する報告の多くは症例報告であり^{9)~17)}、その出現機序あるいは意義については、一定の見解が得られていない。この原因のひとつには、多数のM

成分合併例についての検討が行われていないことが考えられ、これらの疾患において、より微量のM成分を検出することは、M成分合併例の増加にもつながり、有意義と考えられた。そこで、cellulose acetate 膜電気泳動法および寒天免疫電気泳動法を併用し、悪性リンパ腫および白血病におけるM成分の合併頻度を検討していたところ、免疫電気泳動法により、IgM沈降線に微量のM成分の存在を示唆する所見を極めて高頻度にとらえた。

2. 微量M成分のL鎖型判定の必要性とIgM型M成分のL鎖型判定の困難性について。

正常人の免疫 globulin は、電気泳動によると、幅広い範囲に分布し、免疫電気泳動法の所見では、ゆるやかな湾曲を示す、なだらかな沈降線がみられるが、M成分が存在すれば、均一移動度の免疫 globulin の増加があるので、沈降線の一部に抗原過剰の pattern を呈し、この部分の沈降線の急激な抗体溝側への突出と“ふくらみ”がみられ、M-bow と称されている。M成分量が少い場合には、抗原過剰の pattern は軽度であり、沈降線の“ふくらみ”は軽度になるものと考えられる。さらにM成分量が微量になり、沈降線全体が抗体過剰の pattern であれば、M-bow は形成されず、M成分の存在する位置の抗原1抗体比が適正に近づくので、この部分の沈降線が明瞭になるのみであることが予測される。白血病または悪性リンパ腫にみられたIgM沈降線の異常では、異常部分における沈降線の“ふくらみ”はわずかであり、抗体溝側への軽度の沈降線の突出、あるいは沈降線の強まりがみられるのみであった。

通常のM成分では、均一移動度の免疫 globulin の増加を示す所見の存在と同時に、単 clone 性であることを確認するために、増加した免疫 globulin のL鎖が κ 型、あるいは λ 型のいずれか一方のみにより構成されていることを証明する必要がある。白血病および悪性リンパ腫にみられたIgM沈降線異常のような微細な変化は、M成分以外にも、抗体溝間の距離の不均等、支持体の性状の不均一性などの技術的過失、あるいは分子形態の異なる免疫 globulin の混在などの原因により生じる可能性も考えられる。今回の目的としているIgM沈降線の異常は、2回以上の検索で常に同様の所見が得られているので、技術的過誤によるものとは考えられないが、このような症例では、L鎖型の検討が特に必要とされることは容易に理解されよう。

一方、IgM型M成分のL鎖型の判定が困難である

ことはよく知られている。すなわち、IgMは5つの免疫 globulin 分子の鎖間S-S結合により構成され、他のclassの免疫 globulin にくらべて、分子sizeが大きく、拡散係数が小さいことは周知の通りである^{2),3),4)}。その上、このclassのM成分はsia test陽性を呈することが多く⁵⁾、euglobulin 的性格が強いので、通常の寒天免疫電気泳動法では、抗原孔にM成分が沈着し、ほとんど拡散しないこともある。しかも、電気泳動上のIgMの移動位置は、IgGおよびIgAの分布範囲内にあり、抗L鎖血清を用いて、免疫電気泳動法を行っても、血清免疫 globulin の大部分を占め、拡散係数も大きいIgGおよびIgAのL鎖により、抗体が消費され、L鎖型の判定が困難であることがしばしば経験される。このような症例のL鎖型の判定に際しては、従来より、2つの方法が用いられ、抗L鎖血清による免疫電気泳動法と併用することにより、L鎖型が判定されてきた。そのひとつは、還元アルキル化により、IgM分子鎖間S-S結合を解離し、分子sizeを小さくすることにより、拡散を容易にする方法で、mercaptoethanol⁶⁾、cysteine²⁾、dithiothreitol²⁾などによる処理法であるが、一般的にはmercaptoethanol処理法がよく用いられ、高月はこの簡便法の有用性を示している¹⁸⁾。他のひとつは、IgMを他のclassの免疫 globulin から分離する方法で、分子sizeの特徴を利用したゲル濾過法^{7),8),19)}、²⁰⁾、euglobulin 的性格を利用する沈澱法などである。高月らの示したmercaptoethanol処理法は簡便ではあるが、IgM以外の免疫 globulin の影響をとり除くことはできないので、今回の目的とする症例のように、極めて微量のM成分のL鎖型の判定には不適当と考えられた。事実、一部の症例にこの方法応用してみたが、L鎖型の判定はできなかった。その他の方法は、IgMを分離しているので操作が非常に複雑である。次のゲル濾過法には、カラムゲル濾過法および薄層ゲル濾過法^{19),20)}の2つの方法があり、後者、すなわち薄層ゲル濾過法は、操作が簡便であること、同時に多数の検体の処理が可能であること、資料の必要量が3~5 μ lと少量でよいことなどの利点があり、免疫反応も手軽に併用できる²⁰⁾。しかし、この場合の免疫反応は、分子sizeにより分画された成分全体についての検討であり、同一class内の正常免疫 globulin による影響があり、IgM沈降線異常のように、微量M成分で、しかも正常免疫 globulin がよく保たれているものには不適当と考えられた。白血病および悪性リンパ腫にみとめられたIgM沈降線の異

常は免疫電気泳動法により、はじめて検出されたものであり、しかも、M成分量は極めて微量である。したがって、このようなM成分のL鎖型は、電気泳動法が加味された方法によらなければ判定しえないことが予測されるが、カラムゲル濾過法は、得られた分画を濃縮することにより、これを免疫電気泳動法の資料とすることができるので、適当な方法といえる。しかし、この方法では、同時に2つ以上の検体の処理は難しく、操作も複雑であり、資料も多量を要する。その上、ゲル濾過法の共通の欠点としては、一回のみの操作では、IgGあるいはIgAの混入をさげえないことがあげられる。すなわち、IgM沈降線の異常は極めて微量のM成分の存在を意味しているので、L鎖型を判定されるためには、IgG、IgAなどの他のclassの免疫globulinの混入は、できるかぎり少くする必要があるが、IgAは血清中で分子重合する傾向があり、IgMの分画に混入し易く、一回の操作のみではIgGの混入をさけることさえ困難であることが多く経験される。これらの方法以外にもeuglobulinの性質を利用して、IgMを分離する方法もあるが、今回検出されたIgM沈降線の異常は、原点よりの移動もよく、免疫電気泳動時の原点への蛋白の沈着をみられていないので、この性質は弱いものと考えられた。

微量の資料によるM成分のL鎖型の判定法としては、さらに抗体含有寒天板を使用した免疫電気泳動法が報告されている²¹⁾が、この方法では、寒天板に含まれる抗血清により形成される沈降線とIgM沈降線が近接し、L鎖型判定の障害となることが予測された。

近年、松橋²²⁾らはstaphylococcus aureusを用い、IgGを吸着することにより、IgMまたはIgA型M成分のL鎖型の判定が可能であったことを報告している。この方法に関しては、十分な検討を行っていないが、一度試みられるべき方法と考えられる。

以上のように、従来の方法では、IgM沈降線の異常を示した症例のL鎖型の判定は困難と考えられたので、新しい方法として、FITC標識抗L鎖血清を使用するL鎖型(免疫電気泳動沈降線蛍光抗体法)すなわち蛍光免疫電気泳動法を考案した。

3. 蛍光免疫電気泳動法の原理と実施方法について。

免疫globulinはH鎖とL鎖より構成され、両者の間には抗原性の相違があるので、抗H鎖特異抗血清により形成された免疫globulin沈降線には、あらたに、抗L鎖抗体が結合しえることが考えられる。蛍光免疫

電気泳動法は、抗H鎖特異抗血清による免疫電気泳動沈降線にFITC標識抗L鎖および抗入血清を反応させ、この両者の反応間での沈降線異常部分におけるFITC特異蛍光強度差により、M成分のL鎖型を判定するものである。この方法の最大の利点は、抗H鎖特異抗血清により、容易に単一classの免疫globulinを分離することができることであるが、この際には電気泳動法による分画操作も行われている。したがって、この方法は、IgM型微量M成分のように、L鎖型の判定に際して、単一classの免疫globulinの分離を必要とする場合に、特に有用と思われる。その他の利点としては、検体(血清)の必要量が3~5 μ lと少量であること、同時に多数の検体の処理が可能であること、特殊な装置を必要としないことなどがあげられるが、欠点は、次にのべるように、約2週間以上と長期間を要することである。

蛍光免疫電気泳動法は、抗H鎖特異抗血清により形成された免疫電気泳動の沈降線を水洗、脱蛋白することにより、純粋な抗原抗体complexが得られることを前提条件としている。白井²³⁾らは、寒天板を支持体とした免疫反応の沈降線を生食中で十分水洗し、これを抗原として免疫することにより、良質の抗血清が得られることを示し、この結果からも、水洗、蛋白により、純粋な抗原抗体complexが得られるものと考えられた。ここで問題になることは、抗H鎖特異抗血清により形成された沈降線には、抗原抗体complex以外に、資料中の他の蛋白あるいは抗血清の吸収の目的で使用された免疫globulinなどが混在する可能性であるが、このような物質の存在は、蛍光免疫電気泳動法の結果に重大な影響をおよぼすものと考えられる。したがって、十分な水洗が必要とされるが、抗原抗体反応の結合は可逆的であり、酸、アルカリ、イオン強度の変化などの種々の化学的条件により解離する^{24),25),26)}ことが知られ、さらに流水中に長期間放すると沈降線が消失することもある。一方、蛍光免疫電気泳動法では抗H鎖特異抗血清による免疫電気泳動沈降線が安定していることが望ましいので、今回の実験では、水洗にはPBSを使用し、静水中で長時間をかけて、脱蛋白を行った。次に、FITC標識抗L鎖血清を反応後の水洗の条件であるが、この場合には、沈降線におけるFITC特異蛍光をより明瞭にするために、back groundの蛍光を除去する必要があり、十分な水洗が必要とされる。しかし、沈降線に結合したFITC標識抗L鎖抗体が解離してはならないので、前述の条件と同様にPBSを用い、

静水中で長時間をかけて、脱蛋白を行った。また、FITC は紫外線中に長期間放置されると、特異蛍光が減弱することが知られ、FITC 標識抗 L 鎖血清の反応およびその後の水洗は、暗室条件で実施した。

M 蛋白血症患者血清について、抗 L 鎖血清を用いての免疫電気泳動を行うと、抗 κ あるいは抗 λ 血清のいずれか一方のみとの反応において、M-bow を形成するが、他の型の抗 L 鎖血清による沈降線は M-bow 部分で消失することはほとんどない。したがって、抗 H 鎖特異抗血清による沈降線は、たとえ M-bow の中心といえども、 κ 型および λ 型の 2 つの L 鎖型の免疫 globulin により構成され、その濃度比が異なるのみであることが考えられる。このため、蛍光免疫電気泳動による L 鎖型の判定は、FITC 標識抗 κ および抗 λ 血清の反応間での M-bow 部分における FITC 特異蛍光強度差によらなければならない。そして、L 鎖型既知の M 蛋白血症患者血清に蛍光免疫電気泳動法を応用したところ、IgG(κ) 型骨髄腫の 1 例では、同一検体であるにもかかわらず、免疫電気泳動の際の沈降線の pattern が 2 本の沈降線間で相違していたため、蛍光 pattern も明らかに異っていた。すなわち、図 2, 11, の IgG(κ) 型骨髄腫の 1 例であるが、上段の沈降線と比較して、下段の沈降線は著明な抗原過剰の pattern を呈していたが、この沈降線に FITC 標識抗 κ 血清を反応させると上段の沈降線では、M-bow の中心に近づくにしたがって、FITC 特異蛍光は次第に強くなり、下段の沈降線では FITC 特異蛍光は M-bow の中心部分では、むしろ減弱傾向を示した。下段の沈降線は、抗原過剰のため、M-bow の中心部分では、抗 γ 鎖特異抗血清による免疫電気泳動沈降線が消失しかかっていたため、このような蛍光 pattern を呈したものと考えられた。以上のように、免疫電気泳動の際の沈降線の pattern と蛍光 pattern は密接な関係にあり、FITC 標識抗 κ および抗 λ 血清を反応させるための 2 本の沈降線はできるかぎり同一であることが要求される。この点については、泳動条件、免疫反応などの条件を一定にするように、特に注意を払い、FITC 標識抗 L 鎖血清を反応させる前に、免疫電気泳動法により得られた 2 本の沈降線が、同一であることを肉眼的に確認している。

4) 蛍光免疫電気泳動法の有用性と L 鎖型判定可能範囲について。

蛍光免疫電気泳動法は、新しい方法であるので、この方法による M 成分の L 鎖型の判定結果と従来の

方法による成績が一致しなければならない。11 例の M 蛋白血症患者血清について、蛍光免疫電気泳動法を応用したところ、すべての症例において、他の型の抗血清との反応にくらべ、M 成分の L 鎖と同じ型に対する FITC 標識抗 L 鎖血清を反応させた場合に、M-bow 部分における FITC 特異蛍光が強く、従来の方法による判定結果とよく一致した。一方、M 成分でないものを M 成分と判定する可能性については、輸血供血者 8 名の IgG, IgA, IgM の 3 つの class の免疫 globulin 沈降線に FITC 標識抗 L 鎖血清を反応させ、これを検討した。1 名の IgA 沈降線に (κ) 型 M 成分の存在を示す所見がみられたが、他の沈降線には異常はみられず、これを過失によるものとしても、過剰診断率は約 4 % である。しかし、以上の IgA(κ) 型 M 成分の所見は通常の免疫電気泳動法ではみとめられなかったが、本法による 2 回の検索で常に同様であり、蛋白染色所見からも、むしろ、本法の鋭敏性を示すものと考えられた。

このように、通常の M 成分については、蛍光免疫電気泳動法による L 鎖型の判定は可能であったが、この方法は微量 M 成分の L 鎖型を判定する目的で考案されたものであるので、L 鎖型判定の可能限界が問題となる。L 鎖型既知の M 蛋白血症 11 例のうち、IgM(κ) 型良性 M 蛋白血症の 1 例では、cellulose acetate 膜電気泳動法には M 成分の所見はみられず、Mercaptoethanol 処理簡便法を行っても L 鎖型の判定は困難であった。このような症例に対して、蛍光免疫電気泳動法が有効であったことは、IgM 型微量 M 成分の L 鎖型の判定に際しての、この方法の有用性の一端を示している。2 例の IgG 型骨髄腫患者血清を正常人血清を用いて希釈し、cellulose acetate 膜電気泳動法、抗 γ 鎖血清による寒天免疫電気泳動法および蛍光免疫電気泳動法における M 成分の所見の検出可能限界を比較検討したが、蛍光免疫電気泳動法は cellulose acetate 膜電気泳動法にくらべて、明らかに鋭敏であり、寒天免疫電気泳動法により M 成分の所見のみとめられる範囲、あるいはそれ以上の希釈倍率であっても、L 鎖型の判定は可能であった。IgM は IgG に比較して分子 size が大きく、拡散係数が小さいため、免疫電気泳動法において、M 成分の所見が出現し得る最小の M 成分濃度は、必ずしも IgG 型 M 成分と同一といえないが、今回の比較成績は、IgM 型微量 M 成分に対しての蛍光免疫電気泳動法の有用性を期待されるものである。すなわち、抗 H 鎖特異抗血清による寒天免疫電気泳動法において、沈

降線にM成分の所見のみとめられる範囲では、蛍光免疫電気泳動法によるL鎖型の判定が可能であり、白血球および悪性リンパ腫にみとめられたIgM沈降線の異常は、寒天免疫電気泳動法により、検出されたものであるため、この範囲内にあるものと考えられる。

蛍光免疫電気泳動法の鋭敏性は、 λ 型に比し、 κ 型のM成分がやや劣っていた。一方、正常人の免疫globulinのL鎖の比率は κ 型が λ 型より優位であることが示され、このために、 κ 型M成分の検出感度が劣っていたことも考えられるが、今回の実験に使用した2例の骨髄腫のM成分は、一方はslow γ 、他方はfast γ に泳動され、この2つの移動度では、正常免疫globulinの濃度にも相異があり、この影響を考えられるので、さらに症例を重ねての検討が必要と思われる。

5) FITC 標識抗L鎖血清の反応に際しての非特異反応および非特異蛍光について。

一般的に、蛍光抗体法を用いた実験では、非特異反応あるいは非特異蛍光の存在について、厳密なcheckが必要とされている。一方、蛍光免疫電気泳動法では、抗H鎖特異抗血清により形成された沈降線に、FITC 標識抗 κ および抗 λ 血清を反応させ、M-bow 部分における2つの反応間でのFITC 特異蛍光強度差により、L鎖型の判定を行っているため、この差を明らかにするためには、飽和以上のFITC 標識抗体が必要と考えられ、高濃度のFITC 標識抗L鎖血清を使用している。この結果、非特異反応によるFITC 特異蛍光の存在はさけることができず、FITC 非標識抗L鎖血清による吸収試験においても、軽度のFITC 特異蛍光の残存がみとめられている。さらに、FITC 標識抗L鎖血清と反応前の沈降線には、白色調の非特異蛍光がみられたが、これは色調の相違により、FITC 特異蛍光とは明らかに区別できるものであった。一般的には、FITC 標識抗血清は、定性の目的で使用され、蛍光抗体法は感度が鋭敏であるところから、非特異反応および非特異蛍光の存在に関して、特に注意が払われている。しかし、蛍光免疫電気泳動法では、抗 κ および抗 λ 血清の反応に際しての沈降線の異常部分に結合した抗体量の差を、FITC 特異蛍光強度差により観察するために使用されている。すなわち、定量的検討の目的で用いられているため、非特異反応が存在しても、微量であれば、それ程重大な障害にはならないものと考えられた。但し、この非特異反応を完全に除去する

ことができれば、back groundの蛍光が消失し、微量のM成分のL鎖型の判定に有利であることは容易に想像できる。

M蛋白血症におけるFITC 特異蛍光強度差が、FITC 標識抗L鎖抗体のM-bow 部分への結合量の差を示していることは、amidoblackによる蛋白染色の所見から明らかである。すなわち、輸血供血者8名のIgA 沈降線では、FITC 標識抗L鎖血清を反応後のものは、反応前にくらべ、軽度ながら沈降線が濃染し、FITC 標識抗L鎖血清を反応させることにより、免疫電気泳動の沈降線に何らかの蛋白が結合したことを示している。次に、L鎖型既知のM蛋白血症患者血清の免疫電気泳動沈降線にFITC 標識抗 κ および抗 λ 血清を反応させ、同様の蛋白染色を行った。この成績では、 κ 型のM成分の場合にはFITC 標識抗 κ 血清、 λ 型のM成分はFITC 標識抗 λ 血清を反応させた際の沈降線のM-bow 部分が、他の型のFITC 標識抗L鎖血清を反応させたものに比較して、強く染色され、沈降線に結合した蛋白は抗L鎖抗体であることを示している。

6) 白血球および悪性リンパ腫にみられたIgM沈降線異常症例への蛍光免疫電気泳動法の応用とその所見について。

IgM型微量M成分の存在が考えられた症例は本論文第2編に示すように、白血球165例中11例、悪性リンパ腫64例中6例であった。このうち、7例に蛍光免疫電気泳動法を応用したところ、そのすべてにおいて、沈降線の異常部分におけるFITC 標識抗 κ と抗 λ 血清の反応間のFITC 特異蛍光強度差が明らかであった。すなわち、蛍光免疫電気泳動法は、このような微量のIgM型M成分のL鎖型の判定に有用であると同時に、白血球および悪性リンパ腫にみとめられたIgM沈降線の異常はM成分に起因するものと考えられた。

IgM沈降線異常症例のL鎖型は、 κ 型および λ 型の2つのM成分を有するものが1例、 κ 型が2例、 λ 型が4例であった。従来の成績によると、Macroglobulinemia Waldenströmを中心とするIgM型M成分には、 κ 型が多いことが示され、今回の成績とは一致しない。しかし、沼田^{27),28)}らは、正常人IgMのL鎖は、欧米では κ 型が優位とされているのに対して、本邦では λ 型が多いことを報告しているため、入型のIgM型M成分が多くてもよいものと思われる。いずれにしても、現在のところ、検討した症例数が少く、この点に関しては、さらに症例数を増して検

討する必要があるものと考えられる。

7) M成分量と蛍光免疫電気泳動所見の関係について。

11例のM蛋白血症、骨髄腫患者血清の正常人血清による稀釈例、あるいは白血球および悪性リンパ腫にみられたIgM型微量M成分合併例における蛍光免疫電気泳動所見は次のように分類される。(表1)

って、FITC 特異蛍光の“強まり”がみられ、他の型の抗血清との反応では、正常部分にくらべて、M-bow 部分の特異蛍光は“弱まり”を呈した。この際の免疫電気泳動沈降線は全体的に sharp であり、M-bow の存在する部分は軽度の“ふくらみ”と抗体溝側への突出を示していた。

表1. 蛍光免疫電気泳動法における蛍光所見の分類

	FITC 特異蛍光所見		疾患 その他
	M-成分と同じ型のL鎖に対するFITC標識抗血清との反応	M-成分とは異なる型のL鎖に対するFITC標識抗血清との反応	
I a型	M-bow の中心に近づくに従い、特異蛍光は減弱の傾向。	沈降線全体に特異蛍光はほとんどない。	骨髄腫の一部
I b型	沈降線全体に強い特異蛍光。	沈降線全体に特異蛍光はほとんどなし。	Macroglobulinemia Waldenström IgM 型良性M-蛋白血症の一部
II a型	M-bow の中心に近づくに従い、特異蛍光は増強。	M-bow の中心に近づくに従い、特異蛍光は減弱。	骨髄腫の一部、良性M-蛋白血症 骨髄腫血清の40~80倍稀釈 IgM 異常症例の一部
II b型	M-bow の中心に近づくに従い、特異蛍光は増強。	正常人と同様の pattern.	骨髄腫血清の160倍稀釈 IgM 異常症例の一部
III 型	M-bow の中心に近づくに従い、特異蛍光は増強。	M-bow の中心に近づくに従い、特異蛍光は増強。	IgM 異常症例の1例

I a型は骨髄腫にしばしばみられ、M成分のL鎖と同じ型に対する FITC 標識抗L鎖血清との反応時に、M-bow 中心部分における FITC 特異蛍光の“弱まり”がみられるが、他の型の抗血清との反応では、FITC 特異蛍光はほとんどみとめられないのが特徴であり、抗H鎖特異抗血清による免疫電気泳動の沈降線は、著明な抗原過剰の pattern を呈し、M-bow の中心部分では、沈降線はほとんど消失しかかっていた。

I b型は Macroglobulinemia Waldenström およびその他のIgM 型M蛋白血症にみられた pattern である。この場合には、M成分のL鎖と同じ型に対するFITC 標識抗L鎖血清を反応させると、沈降線全体に強い FITC 特異蛍光がみられ、他の型の抗血清との反応では、FITC 特異蛍光はほとんどみとめられなかった。免疫電気泳動の沈降線は抗原過剰の pattern は著明ではなく、M-bow の中心部分における沈降線の減弱傾向もみられなかった。

II a型は IgG および IgA 型良性M蛋白血症、IgM 沈降線異常症例の一部、骨髄腫患者血清の80~40倍稀釈時にみられた pattern である。この場合には、M-bow のL鎖と同じ型に対する FITC 標識抗L鎖血清との反応では、M-bow の中心部分に近づくにしたが

II b型は骨髄腫患者血清の160倍稀釈およびIgM 沈降線異常症例の一部にみられ、M成分のL鎖と同じ型に対する FITC 標識抗L鎖血清との反応では、蛍光 pattern はII aと同様であったが、他の型の抗血清を反応させた場合には、沈降線異常部分における FITC 特異蛍光の“弱まり”はみとめられなかった。この際の免疫電気泳動沈降線では、異常部分の“ふくらみ”は不明瞭であった。

III型はIgM 沈降線異常を示した細網細胞肉腫の1例にみられた pattern である。この症例では、沈降線全体が抗体過剰の pattern を呈し、異常部分における FITC 特異蛍光は、FITC 標識抗κおよび抗λ血清の反応とともに、正常部分と比較して“強まり”を示したが、抗κ血清との反応に際しての FITC 特異蛍光が明らかに強く、κ型のM成分と考えられた。

I 型群は、骨髄腫あるいは Macroglobulinemia Waldenström などのM成分量が多く、正常免疫 globulin の減少が高度の疾患にみとめた pattern であり、M成分量と正常免疫 globulin の関係をよく示している。I b型は IgM 型M成分にしばしばみとめられたが、IgMは拡散係数が小さく、M成分量が多くても、その沈降線は抗原過剰の pattern を呈しにくいので、

このような蛍光 pattern を示したものと考えられる。一方、IgM 型良性M蛋白血症の2例においてIb型がみられたことは、cellulose acetate 膜電気泳動法により検出しえる程度のIgM型のM成分は、同一class内の正常免疫globulin に対してのM成分の占める割合が大きい症例であることを示している。そして、白血球および悪性リンパ腫にみられたIgM沈降線異常症例ではII型群あるいはIII型の蛍光 pattern がみられることが多く、通常のIgM型M成分とは異なり、微量のM成分であることが示唆されている。

II型群は、I型群よりM成分量が少く、正常免疫globulinの減少は軽度である症例の pattern と考えられ、特にIIa型ではL鎖型の判定が容易であった。そして、IIb型を呈した場合にも、正常部分と沈降線異常部分のFITC 特異蛍光強度の相違を観察することができるので、I型群にくらべ、II型群はL鎖型の判定が容易な pattern といえる。一方、前に述べたように、IgM 沈降線異常症例では、IIa型あるいはIIb型を呈する症例が大部分であり、この点からも、蛍光免疫電気泳動法はIgM型微量M成分の判定に適した方法といえよう。

Ia, Ib, IIa, IIb型の4つの pattern はM蛋白血症および骨髄腫患者血清の稀釈に際してみとめられているので、このような蛍光所見がみられれば、M成分と考えてさしつかえないが、III型はこれまでの観察では確認されていないので、直ちにこれをM成分とすることはできない。しかし、蛍光免疫電気泳動法における蛍光 pattern は、抗H鎖特異抗血清による免疫電気泳動の沈降線の pattern により強く影響されることおよびFITC 標識抗L鎖血清を反応させた場合の非特異反応がさけられないことを考慮すれば、III型のような pattern が存在することは容易に想像できる。すなわち、免疫電気泳動法では、抗体過剰の場合には不鮮明な沈降線がみられるが、これにM成分が存在すれば、その位置で沈降線が突然の“強まり”を呈する。一方、FITC 標識抗L鎖血清を反応させた場合には、非特異反応により沈降線に結合する物質は、沈降線の強い部分により多量であることが考えられ、このような沈降線にFITC 標識抗L鎖血清を反応させると、正常部分の沈降線が弱く、M成分量が微量であるので、正常部分と異常部分のFITC 特異蛍光強度の差は、主として非特異反応による結合物質量の差により表現され、III型に相当する pattern を示したものと考えられる。

結 論

1. IgM型微量M成分のL鎖型を判定する目的で、蛍光免疫電気泳動法を考察した。この方法は、抗H鎖特異抗血清による免疫電気泳動沈降線にFITC 標識抗 κ および抗 λ 血清を反応させ、両者の反応間での沈降線異常部分におけるFITC 特異蛍光強度差により、M成分のL鎖型を判定するもので、最大の利点は、簡単な操作により単一classの免疫globulinを分離しえることである。
2. L鎖型既知のM蛋白血症患者血清11例に蛍光免疫電気泳動法を応用し、すべての症例においてL鎖型の判定が可能であった。
3. 輸血供血者8名のIgG, IgA およびIgMについて、通常の免疫電気泳動法では異常はみとめなかったが、蛍光免疫電気泳動法では、1例のIgA 沈降線に(κ)型M成分の存在を示す所見がみられ、この他には異常はみられなかった。このM成分の所見は2回の検索で常に同様であった。
4. FITC 標識抗L鎖血清を反応前後の免疫電気泳動沈降線、およびM成分患者血清の免疫電気泳動沈降線にFITC 標識抗 κ および抗 λ 血清を反応させた場合の沈降線について、amidoblack による蛋白染色を行った。これらの比較成績から、抗H鎖特異抗血清による免疫電気泳動沈降線にはFITC 標識抗L鎖抗体が結合し、蛍光免疫電気泳動に際してのM-bow部分におけるFITC 特異蛍光強度差は、この沈降線に結合した抗L鎖抗体量の差を示すものと考えられた。
5. 蛍光免疫電気泳動法のL鎖型判定可能範囲について、cellulose acetate 膜電気泳動法および抗H鎖特異抗血清による免疫電気泳動法との比較を行った。蛍光免疫電気泳動法はcellulose acetate 膜電気泳動法より鋭敏であり、寒天免疫電気泳動法においてM成分の所見のみられる範囲では、L鎖型の判定は可能であった。
6. 白血球および悪性リンパ腫においてIgM型微量M成分の存在が示唆された症例のうち、7例に蛍光免疫電気泳動法を応用したところ、そのすべてにおいて、沈降線異常部分におけるL鎖型の片寄りが証明された。判定結果は、 κ 型および λ 型の2つのM成分を有するもの1例、 κ 型2例、 λ 型4例であった。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った木村郁郎教授に深甚の謝意を表します。また、終始、御指導、

御援助いただきました国立岡山病院瀬崎達雄博士に感謝いたします。

本論文の要旨は第26回および27回日本電気泳動学会総会において報告した。

文 献

1. 松橋直, 白井美津子: 免疫電気泳動法. 電気泳動実験法 (電気泳動学会編集) 文光堂, pp333-378, 東京, 1969.
2. Miller F. and Metzger H: Characterization of a human macroglobulin. *J Biol Chem* **240**, 4740-4745, 1965.
3. Chesbro, B., Bloth, B. and Svehang S.E.: The ultrastructure of normal and pathological IgM immunoglobulins. *J Exp. Med.* **127**, 399-409, 1968.
4. 清水章: IgMの構造と機能. 最新医学, **33**, 420-426, 1977.
5. Laurell, C.-B. and Waldenström, J.: Studies on "abnormal" serum globulins (M-components) in myeloma, macroglobulinemia and related diseases: sera with exceptional appearance and euglobulin reaction as screen test. *Acta Med. Scand.* **170** (suppl 367), 97-100, 1961.
6. Deutsch H.F. and Morton J.I.: Dissociation of human serum macroglobulin. *Science* **125**, 600-601, 1957.
7. Foldin, P. and Killander, J.: Fractionation of human serum protein by gel filtration. *Biochim. Biophys. Acta* **63**, 403-410, 1962.
8. Fireman, P., Vannier, W.E. and Goodman, H.C.: Immunological studies of human serum fractionated by gel filtration with Sephadex G-200 (29054). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **115**, 845-849, 1964.
9. Burkett, L.L., Fields, M.L. and Diggs L.W.: A possible immune reaction producing spontaneous remission in leukemia. *Blood* **25**, 541-547, 1965.
10. Ritzman, S.E., Stoufflet, E.J., Houston, E.W. and Levin, W.C.: Coexistent chronic myelocytic leukemia, monoclonal gammopathy and multiple chromosomal abnormalities. *Am. J. Med.* **41**, 981-989, 1966.
11. Stoop, J.W., Zegers, B.J.M. Heiden, C.V.D. and Ballieux, R.E.: Monoclonal gammopathy in a child with leukemia. *Blood* **32**, 774-786, 1968.
12. Poulik, M.D. Berman, L. and Prasad, A.S.: "Myeloma protein" in a patient with monocytic leukemia. *Blood* **33**, 746-758, 1969.
13. Lindqvist, K.J., Ragab, A.H. and Osterland, C.K.: Paraproteinemia in a child with leukemia. *Blood* **35**, 213-221, 1970.
14. Thijs, L.G., Hijmans, W., Leene, W., Muntinghe, O.G., Pietersz, R.N.I. and Poley, J.E.: Blast cell leukemia associated with IgA paraproteinemia and Bence Jones protein. *Br. J. Haematol* **19**, 485-492, 1970.
15. Constantoulakis, M., Phocas, E. and Theodoropoulos, G.: Atypical leukemia of long duration with monoclonal hypergammaglobulinemia. *J Clin Pathol* **23**, 150-160, 1970.
16. Cejka, J., Bollinger, R.O., Schuit, H.R.E., Lusher, J.M. Chang, C.H. and Zuelzer, W.W.: Macroglobulinemia in a child with acute leukemia. *Blood* **43**, 191-199, 1974.
17. Vodopick, H., Chakes, S.J., Solomon, A. and Stewart, J.A.: Transient monoclonal gammopathy associated with cytomegalovirus infection. *Blood* **44**, 189-195, 1974.
18. 高月清: Paraproteinの免疫学的同定法. 医化学実験法講座4. 免疫化学 (右田俊介編集) 中山書店, pp 392-407, 東京, 1972.
19. Bergström, K.: A thin layer gel-filtration technique for proteins, a simple clinical method for measuring serum macroglobulins. *Acta Med. Scand.* **179** (suppl 445), 127-131, 1966.
20. 河合忠: 血漿蛋白分画定量法—最近の進歩. 日本臨床 **28**, 33-37, 1970.

21. Rádl, J.: Light chain typing of immunoglobulins in small samples of biological material. *Immunology* 19, 137-149, 1970.
22. 松橋直, 福山民夫, 中村雅行, 瀬戸幸子: IgM. IgA-M成分のL鎖簡易同定法—Staphylococcus aureus Cowan I 株菌体によるIgGの吸収とProtein Aに結合するIgM-M成分—生物物理化学27, 326, 1978.
23. 白井美津子, 成内秀雄, 松橋直: 免疫原の作成. 医化学実験法講座4. 免疫化学(石田俊介編集)中山書店, pp45-46, 東京, 1972.
24. Dandliker, W.B., Alonso, R.A., Saussure, V.A., Kirszenbaum, F., Levinson, S.A. and Schapiro, H.C.: The effect of chaotropic ions on the dissociation of antigen-antibody complexes. *Biochemistry* 6, 1460-1467, 1967.
25. Solbin L.E. and Sela, M.: Use of urea in the purification of antibodies. *Biochim. Biophys. Acta* 107, 593-596, 1965.
26. 佐々木實: 免疫学的同定法. 生化学実験法講座1. タンパク質の化学工. 分離精製(日本生化学会編集)東京化学同人, pp313-351, 東京, 1976.
27. 沼田幸子, 渋谷和彦, 小坂昌明, 三好和夫: 免疫グロブリン κ/λ 比とその意義, 総合臨床 22, 1589-1595, 1973.
28. 三好和夫, 沼田幸子, 小坂昌明, 田村隆一, 白神嶸: 単クローン性免疫グロブリン血症の鑑別診断と臨床的意義. 臨床科学 11, 411-419, 1975.

Studies on M component in leukemia and malignant lymphoma

Part I. Application of an immunofluorescent method with FITC labelled anti L chain sera for determination of low amount M component with IgM type

Mineji FUJITA

The Second Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director : Prof. I. Kimura)

In our observation of leukemia and malignant lymphoma, many cases with slight changes in the IgM precipitation line ("abnormal IgM"), suggestive of small amounts of M-component, were detected by immunoelectrophoretic analysis. In these cases, determination of the light chain type seemed necessary for the diagnosis of M-component. However, typing was difficult by conventional methods because of the low amount of M-component. In this report, a new method for typing of the light chain of the IgM type of M-component, using FITC labelled anti-light chain specific antisera, is discussed. With this method, the light chain type of M-component was determined by the difference in strength of FITC specific fluorescence between the reaction of FITC conjugated anti-kappa and -lambda chain sera at the abnormal parts of the immune precipitation, which were prepared by agar immunoelectrophoresis using anti-heavy chain specific antisera. This method was applied to 11 cases with usual M-component, in which the light chain types were determined only by agar immunoelectrophoresis utilizing anti-light chain specific antisera or by combination with gel-filtration. In all cases, the types were determined in agreement with previous methods. Compared with cellulose acetate electrophoresis or agar immunoelectrophoresis using anti-heavy chain specific antisera, the immunofluorescent method had a sensitivity similar to agar immunoelectrophoresis and more sensitive than cellulose acetate electrophoresis. This method was applied to 7 cases with "abnormal IgM" which were found in leukemia and malignant lymphoma. In all 7 cases, differences in the strength of FITC specific fluorescence at the abnormal parts of the precipitation line were observed. As a result, 1 case with both kappa and lambda types, 2 cases with the kappa type and 4 cases with the lambda type of M-component were found.

These results indicate the usefulness of this method for light chain typing of low amounts of M-component with IgM type. It seems likely that the slight changes in the IgM precipitation line, detected in leukemia and malignant lymphoma, result from M-components.