

## 〔一般演題〕

P 40. 高圧セルロースアセテート膜電気泳動による血清  $\alpha_1$ -酸性糖蛋白及び免疫抑制酸性蛋白分画とその臨床応用

○成瀬美華・飯島史朗・木村 都 (共立薬大・毒性研)  
 長 裕子・芝紀代子 (東医歯大・医)  
 戸田年総 (都老人研・分子生物学)  
 井上潤子・吉田 隆 (富士写真フイルム)

<はじめに>

$\alpha_1$ -酸性糖タンパク ( $\alpha_1$ -AG) は炎症、腫瘍等で血清中に増量する急性期相反応性タンパクである。 $\alpha_1$ -AGには、マイクロヘテロジェニティーがあり、その分析法及び臨床応用についての報告もなされ初めている。<sup>1)</sup>

我々は、高圧セルロースアセテート膜電気泳動法を用いて  $\alpha_1$ -AG ミクロヘテロジェニティーを分析するための基礎的実験を行ったところ鮮明なバンドの検出が可能となり、このことについて前回報告した<sup>2)</sup>。しかしながら、原血清のままセア膜に塗布したため、プロット後の酵素染色において、陰極側に非特異的なバンドも染色されてしまう。そこで今回我々は、血清を抗  $\alpha_1$ -AG 抗体と結合させたアフィニティークロマトグラフィーのカラムで前処理し、 $\alpha_1$ -AGのみを取り出した後、高圧セルロースアセテート膜電気泳動、イムノプロットング法を行ったところ非常に鮮明な  $\alpha_1$ -AG バンドのみをとらえることが出来た。同じく急性期相反応性タンパクであり抗原性を  $\alpha_1$ -AG と同一にする免疫抑制酸性タンパク (IAP) についても同様に実験を行い、若干の知見が得られたのでここに報告する。

<材料及び方法>

材料は医科歯科大学附属病院患者血清で検査済みのものと職員血清を用いた。

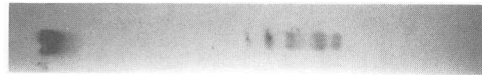
アフィニティークロマトグラフィーは我々の考案した方法により行った。即ちセパコールミニカラム (生化学工業、直径7mm) に抗体 (抗  $\alpha_1$ -AG 血清 ダコ社、抗 IAP 血清 細菌化学研究所提供) を結合させた Affi-Gel (バイオラット社) と血清 1ml を 1 夜、弱く攪拌しながら反応させた後、それを充填した。次にカラムを洗浄バッファー (10mM トリス-2M NaCl-0.05% Tween 20, pH 7.5) で洗い、溶出バッファー (0.1M グリシン, pH 2.6) を添加し  $\alpha_1$ -AG、IAP それぞれの分画を回収した。同時に、1M トリスにより溶出液を中和した。操作は全てコールドルームで行った。 $\alpha_1$ -AG の濃度は、抗  $\alpha_1$ -AG 血清 (ベーリンガー社) を用い、ネフェロメーター (ベーリンガー社) にて測定し、IAP 濃度は、サンテスト IAP-N (三光純薬社) を用い、COBAS FARA により測定した。

高圧セルロースアセテート膜電気泳動法は、前回報告した方法に準じたが、今回は両性担体には pH 3~4 のセルバライト (セルバ社) を用いた。試料は、溶出分画を濃縮し、1  $\mu$ l を 2 回塗布した。泳動は、セア膜を 2 枚重ねて行い、検出には、泳動後のセア膜を PVD F 膜に自然密着により転写させ、1 次抗体と 4°C で 1 夜反応させ、更にペルオキシダーゼ標識 2 次抗体と室温で 1 時間反応させ、過酸化水素を基質とするペルオキシダーゼ発色を施した。

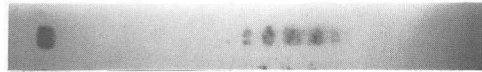
<結果及び考察>

血清をアフィニティークロマトグラフィーで前処理することにより非特異的なバンドはほぼ認められなくなった。また、ミニカラムを用いたため、1ml と少量の血清量で分析可能となった。その写真を示した。 $\alpha_1$ -AG、IAP は共に 6 本の同じマイクロヘテロジェニティーに分画されたが、バンドの濃度が異なるという興味ある知見が得られた。つまり、特定の疾患でマイクロヘテロジェニティーが変化することは  $\alpha_1$ -AG、IAP の糖鎖構造が、何らかの病態を反映している可能性を示しており、臨床的価値が高いと思われる。現在、症例を増やして検討中である。

I A P



$\alpha_1$  - A G



(-)

(+)

<文献>

- 1) Biou D. et al. Clin. Chem. Acta. 186, 59~66, 1989
- 2) 長 裕子, 他: 生物物理化学. 35, 265, 1992.