

〔原 著〕

正常人全唾液に見出される免疫グロブリン
結合LDHアイソザイムについて

柏原 芽美, 市田 篤郎

東日本学園大学歯学部口腔生化学講座

(主任: 市田 篤郎 教授)

Immunoglobulin Bound LDH Isozyme Detected
in Normal Human Whole Saliva

Memi KASHIWABARA, and Tokuro ICHIDA

Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry,
HIGASHI-NIPPON-GAKUEN UNIVERSITY

(Chief: Tokuro ICHIDA)

Abstract

An abnormal extra band of LDH isozyme was detected in normal human whole saliva between the LD4 and LD5 bands. This band is not found in parotid saliva which has relatively low LDH activity. By immunofixation techniques and thin layer gel chromatography, it was identified as a complex of IgA and LDH.

This abnormal immunoglobulin complex is commonly found in the sera of patients with severe destructive tissue ailments and the significance of the presence in normal human body fluids is considered.

Key words: IgA bound isozyme, normal saliva, immunofixation

緒 言

アイソザイムの異常パターンが臨床生化学上注目されていて種々なサーベイが行われている。森山ら¹⁾は約2,000例の正常人血清で見出され

るLDHアイソザイムのanomaly出現頻度は、0.1%程度であるが患者例では0.3~0.5%に及ぶことを報告している。従来注目された異常アイソザイム例の多くは組織破壊が著明な重篤な心筋梗塞²⁾、重篤な肝障害³⁾などで報告されて

本論文の要旨は、東日本学園大学歯学会第4回学術大会(昭和61年2月15日)において発表した。
受付: 昭和61年10月7日

きていて、組織の著しい破壊に伴って組織外に漏出した細胞成分に対する自己免疫との関わり合いも想定されてきたが正常例でも見出されることは、このような異常の成立に対する考え方をもう一度吟味する必要があると考えられる。

正常血清例ではしかしながら希にしか見出されないが、われわれが経験した範囲では、唾液では常に LD₄, LD₅ の領域に LDH アイソザイムの extra band が認められる。正常人唾液でこのようなバンドの出現することは、Liu ら⁴⁾ が報告しているところであるが、その性状については検討されていない。われわれはこの点について 2, 3 の実験を行ったので報告する。

材料ならびに方法

1. 全唾液および耳下腺唾液中の処理

全唾液、耳下腺唾液(検体)はすべて正常人から得た。全唾液は無刺激吐法により、耳下腺唾液は、ポリアクリル製の採唾装置を装着して採取した。これらをガーゼを用いて濾過した後、4℃のクールドルーム内でミニコン簡易濃縮器(AMICON CORPORATION, DANVERS, MA 01923 U.S.A)により、約20倍から100倍に濃縮した。濃縮に要した時間は約24時間から36時間であった。対照として正常人血清を用いた。

2. 電気泳動によるアイソザイムの検出法

緩衝液にはコーニング社のユニバーサルバルビタールバッファーを用いた(pH 8.6, 0.05M barbital EDTAを含む)。

支持体としてはアガロースフィルムを用い、設置されている検体溝の部分に検体を、LDH 総活性値に応じて 3 μ l 塗布した。対照として用いた血清も同じく 3 μ l 塗布した。アガロースフィルムを泳動槽カバーにセットし、泳動槽ベースにカバーをかぶせ、90Vで40分間泳動した。泳動中にLDH染色液を調製した。泳動終了後、フィルムを泳動槽カバーから外し、染色液(NBT,

m-PMS)を塗布して、インキュベータートレイの中にフィルムを入れて、37℃で30分間反応させた。反応終了後、蒸留水で約1時間程水洗いをし、60℃のオーブンで完全に乾くまで乾燥させた後、540nmでデンストメトリーした。

3. 電気泳動後の免疫固定法

検体を塗布し、脱蛋白時の目安として微量のBPBを検体に添加した。泳動槽にふたをし、冷却しながら90Vで40分間電気泳動を行った。泳動終了後、適当な大きさに切ったセルロースアセテート膜にDAKO社製抗ヒトIgAおよび抗ヒトIgGをそれぞれ2倍、4倍、8倍に希釈し浸み込ませたものをアガロースフィルム上に載せた。120分間固定反応を行い、あらかじめ冷却しておいた充分量の脱蛋白用緩衝液(0.05Mリン酸緩衝液, pH7.4)にアガロースフィルムを入れ、4℃のクールドルーム内に静置した。脱蛋白時間としては18時間が適当であった。アガロースフィルムを脱蛋白用緩衝液から取り、染色させ37℃で30分間反応させた。

4. 薄層ゲルクロマトグラフィー

a) プレート作成

Sephacryl-S 300をpH 7.4リン酸緩衝液に浸した後、ガラス板上に絶縁テープをまいた真直ぐなガラス棒を用いて、Sephacryl-S 300プレートを自製した。

b) 展開

濃縮全唾液を塗布し、その上にDAKO社製抗ヒトIgAおよび抗ヒトIgGを各々2倍、4倍、8倍、16倍に希釈し塗布して、pH 7.4リン酸緩衝液により約15時間展開させた。

結 果

1. 電気泳動法によるアイソザイムの検出

正常人血清は、LD₁, LD₂, LD₃で著明に認められたのに対し、濃縮全唾液の活性は、LD₃, LD₄, LD₅の位置で著明であり、その他にLD₄とLD₅の間に異常バンドが認められた。20倍か

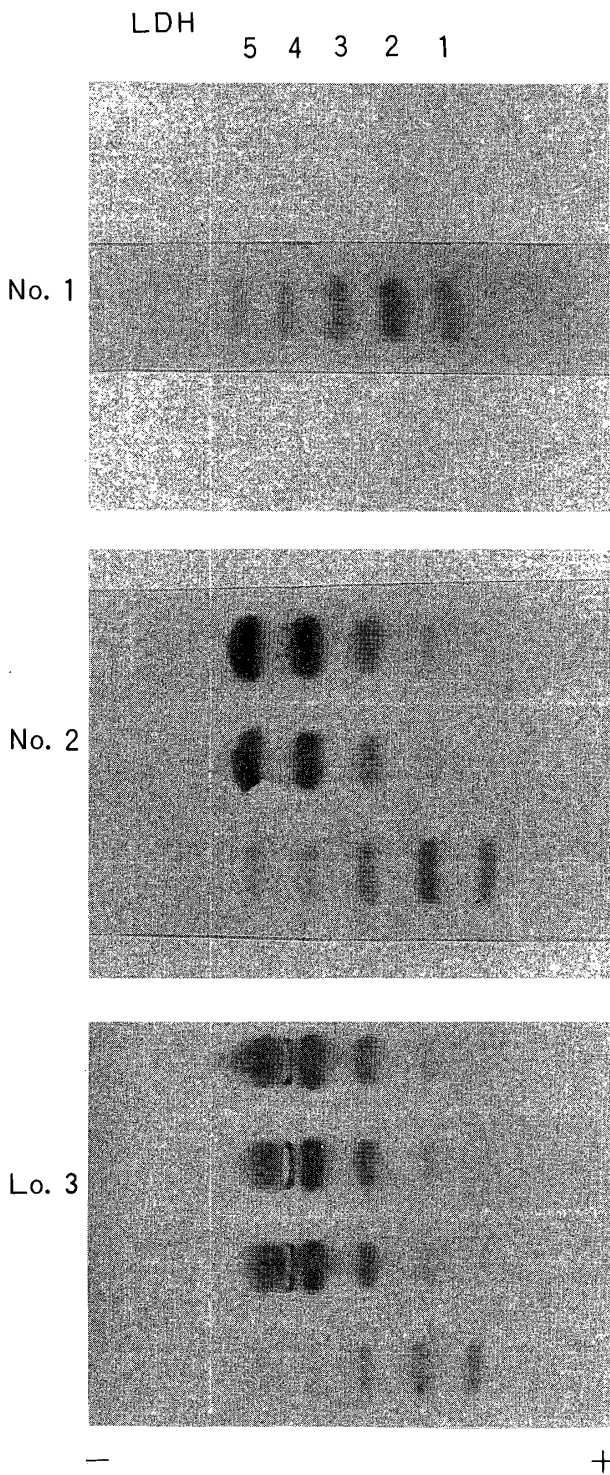


Fig. 1 1. LDH isozyme in normal serum.
 2. LDH isozyme in parotid saliva (top and middle) and normal human serum (bottom).
 3. LDH isozyme of whole saliva (top three) and normal human serum (bottom). This atypical isozyme locates between LD4 and LD5 with electrophoresis.

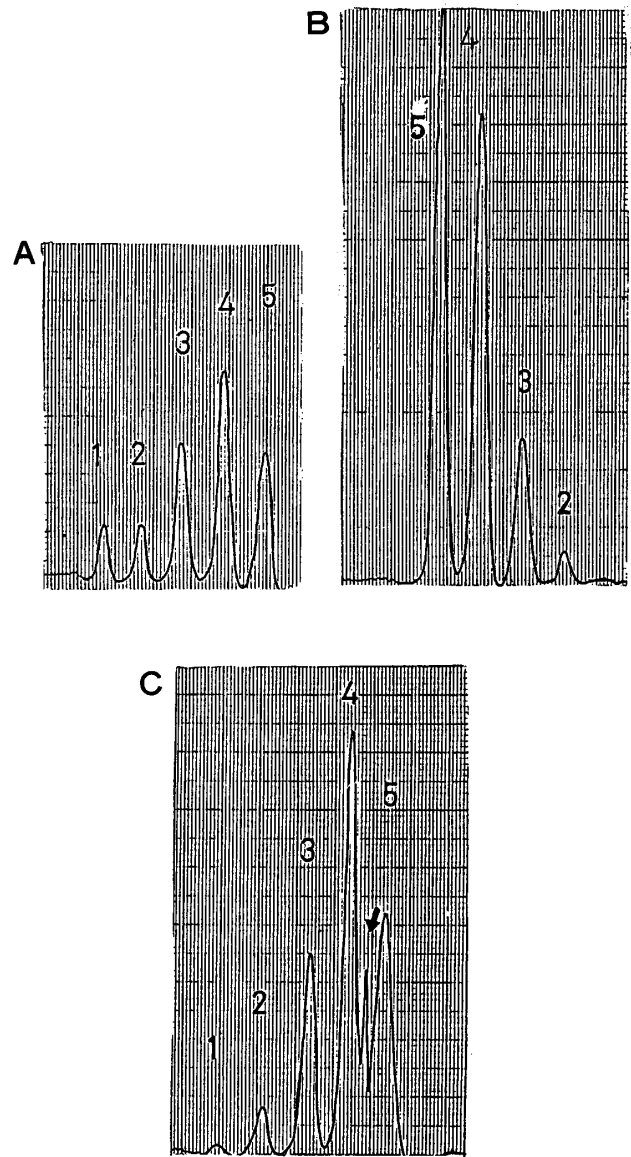


Fig. 2 Densitometer scanned LDH isozyme profiles.
 A. LDH isozyme pattern of normal human serum.
 B: LDH isozyme pattern of normal human parotid Saliva.
 C: LDH isozyme pattern of normal human whole saliva. The number at the top of each peak shows the relative location of the isozymes.

RABBIT ANTI-HUMAN

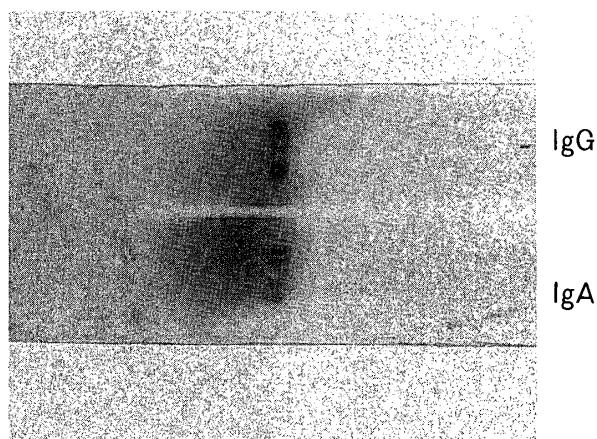


Fig. 3 LDH activity after immunofixation with anti human IgA or IgG.

ら100倍に濃縮したいずれの検体でも同様な異常バンドが認められた。濃縮耳下腺唾液においては、濃縮全唾液と同様LD₃, LD₄, LD₅に著明に認められたが、LD₄とLD₅の間に異常バンドは認められなかった (Fig. 1)。

デンストグラムを図1のA, B, Cに示した。この図においても濃縮全唾液のLD₄とLD₅に異常バンドが示される。濃縮耳下腺唾液では、異常バンドは認められなかった (Fig. 2)。

2. 電気泳動後の免疫固定

抗ヒトIgA及び抗ヒトIgGを共に、2倍、4倍、8倍に希釈したものと、全唾液を50倍に濃縮したものについて行ったところ、活性の固定が認められた。特に、2倍希釈した抗ヒトIgAによって固定される明瞭な活性が認められた (Fig. 3)。

3. 薄層ゲルクロマトグラフィー

活性Rf値がLDHのみでは、0.020であり、LDH-IgA complexでは0.023であった分子量の大きなLDH-IgA complexが形成されていることが推定された。

考 察

正常唾液中に出現するLDH活性の起源については①唾液本来の成分、②唾液中の白血球または上皮由来、③唾液中の常在微生物由来などの可能性があるがLDHが多くの生物細胞の細

胞質内に普遍的に存在する酵素であり、細胞の僅かな傷害によって容易に逸脱することが知られているのでその起源を確定することは容易ではない。しかしながら、LDHは、十分に口腔内を洗浄した後に健康人より得た唾液中にも常に充分高い活性が認められるので広義の唾液の常在成分と見なすものと思われる。アイソザイムパターンよりも認められるように正常人血清のパターンとは明らかな差異を示し、血清成分の漏出である可能性は少ないであろう。すなわち唾液ではLD₁がほとんどみられず、むしろ筋肉型に類似のアイソザイム像を示している。

正常人唾液のアイソザイム像でとくに目立った相違は、われわれの観察したすべての例で、LD₄とLD₅の間に異常のアイソザイムが見出されることである。従来アイソザイムの異常バンドとして報告された例は、重度の組織破壊を伴う患者血清で見出されている。LD₁とLD₂あるいはLD₂, LD₃間に見出された食道癌⁵⁾、転移性肺癌患者血清の例^{5,6)}、重症肝疾患患者血清で報告されている^{3,5)}LD₄とLD₅間の例などがあり^{3,5)}心筋梗塞²⁾、白血病などでも報告されていて、LDとIgAまたはIgGとの複合体として同定されている。このことは組織破壊によって逸脱、部分変性した酵素に対する自己免疫的な機転の働いていることを想定させるものであるが、われわれが観察した唾液の例では全く正常な唾液中にほとんど常に見出される点に注目したい。但し、耳下腺唾液ではLDH活性が全唾液に比して低いこともあり、このような異常バンドを検出できなかった。

このような異常バンドが唾液中に見出されることについてはすでに報告もあるが⁴⁾この例ではその本態についての追及はなされていない。

われわれの実験でこの異常バンドが血清中にしばしば見出されるIgAとのcomplexであることがほぼ示された。唾液中の免疫グロブリンはIgAが大部分を占めているからIgAと結合し

たものの出現することは予想されるところである。森山ら¹⁾は最近、健康診断で得た正常人約2,000例の血清についての検索で0.1%の頻度でLD-Ig complexが認められ、その80%がIgA型であると報告している。すなわち重度の組織破壊を伴うことなしにLD-Ig complexの形成は起りうることになるが唾液の場合にはこのようなcomplex形成が容易に起りうるということであるのかも知れない。唾液中に存在する種々な酵素やムチンなどがLDHの部分変性を促進することは充分考えられるところであるが、それが抗体産生部位に到達しうるのかという疑問がある。物理化学的な凝集である可能性も全く否定はできない。これらを追及することは免疫化学的にも興味ある問題であると思われ、今後追及したい。

文 献

1. 森山隆則, 細川博道, 島沢宗乃子, 高橋裕之, 信岡学, 牧野幹男: 地域住民の集団検診で見出されたLDH anomaly, 第20回日本臨床病理学会北海道支部総会, 第66回北海道医学大会抄録集, p20, 1986.
2. Wickus, G. G. and Smith, M. J.: Rapid loss of lactate dehydrogenase isoenzyme activity in serum by cold-induced formation of immunoglobulin G-lactate dehydrogenase complex, Clin. Chem., 30(1); 11-17, 1984.
3. Labrano, T., Dietz, A. A. and Rubinstein, H. M.: Extra lactate dehydrogenase isoenzyme band in serum of patients with severe liver disease, Clin. Chem., 17; 882-885, 1971.
4. Liu, T. Z., Qawasmeh, A-R. I. and Mazbar, R. A.: A new variant of lactate dehydrogenase isoenzyme in human saliva, Enzyme., 32; 232-234, 1984.
5. Bhagavan, N.V., Darm, J.R. and Scottolini, A. G.: A sixth lactate dehydrogenase isoenzyme(LD6) and its significance, Arch. Pathol. Lab. Med., 106; 512-523, 1982.
6. Fujimoto, Y., Nazarian, I. and Wilkinson, J.: Lactate dehydrogenase isoenzyme polymorphism in a patient with a secondary carcinoma of liver, Enzymol. Biol. Clin., 9; 124-136, 1968.