

## 乳酸脱水素酵素 (LD) アイソザイム測定の基礎的検討

永 瀬 澄 香

### A Basic Examination of the Lactate Dehydrogenase (LD) Isoenzyme

Sumika NAGASE

キーワード: 乳酸脱水素酵素, LD アイソザイム分画, 電気泳動法, 検体保存

#### 概 要

乳酸脱水素酵素 (LD) は生体内のあらゆる組織に広く分布している酵素である。LD には5種のアイソザイムが存在し、臓器特異性が知られており、臨床的意義を考えるうえで LD 総活性に加えて LD アイソザイムの測定が重要となっている。今回ベックマン社製パラゴン LD 試薬キットを用いて、電気泳動法による LD アイソザイムの基礎的検討を行った結果、LD アイソザイムの測定条件は、泳動時間25分、脱色時間2分、検体塗布量  $4\mu\text{l}$  が最適であると考えられた。本実験に用いたパラゴン LD 試薬による電気泳動法は、LD アイソザイム各分画の分離能も優れており、同時再現性も良く、島津 PC 9300 デンシトメーターによる分画測定も良好な結果が得られた。従って本法はアイソザイム測定法として学生実習にも導入し得る良法であるといえる。今回の実験において、LD アイソザイム測定に影響する要因を調べると、1) 溶血により LD<sup>1</sup>LD<sup>2</sup> 上昇を伴うことがわかった。2) 検体保存では、室温保存 (約20℃) の場合5日間までは総活性値および LD アイソザイム分画の活性値が比較的安定していることがわかった。3) 検体を長期保存する場合は冷凍-20℃保存が安定しており、さらに低温下の-80℃保存が最も望ましいと考えられた。また、4) アイソザイムのM型サブユニットを多く含む LD<sub>4</sub>, LD<sub>5</sub> は低温 (冷蔵4℃保存)、高温 (56℃) において不安定であることが示唆され、検体保存法に注意する必要があると考えられた。

#### 1. はじめに

乳酸脱水素酵素 (常用名 lactate dehydrogenase ; LD) は、体内組織中に広く分布し、可逆的に乳酸とピルビン酸との間の酸化還元反応を触媒する嫌気性解糖系酵素である。

LD 総活性の上昇は種々の疾患・病態で観察されるため、その病態ならびに臓器由来を考えるためには他の酵素検査データとの関連性ならびに LD アイソザイム分析の結果が重要である。通常アイソザイム分析は大きく分けて①電気泳動法、②イオン交換クロマトグラフィー法、③免疫化学的方法などがあり、現在広く検査室で普及しているのは電気泳動法である<sup>1)</sup>。

LD アイソザイムはアミノ酸組成の異なるH型とM型の2つのサブユニットが結合して4個のサブユニットから成る4量体を形成し、それぞれの組み合わせから

5種の形が存在する。電気泳動法では陽極側から LD<sub>1</sub> (H<sub>4</sub>), LD<sub>2</sub> (H<sub>3</sub>M<sub>1</sub>), LD<sub>3</sub> (H<sub>2</sub>M<sub>2</sub>), LD<sub>4</sub> (H<sub>1</sub>M<sub>3</sub>), LD<sub>5</sub> (M<sub>4</sub>) に分画される。心、腎、赤血球などは主として LD<sub>1</sub>, LD<sub>2</sub> を含み、肝、骨格筋は LD<sub>4</sub>, LD<sub>5</sub> を主成分とし、肺、副腎、甲状腺などは LD<sub>3</sub> の分画を多く含む。

LD 活性の上昇は、組織の損傷を示唆し、LD が遊出 (逸脱) していることを意味している。血清中の LD 総活性の上昇だけでは臓器特異性という面で有用性にやや欠けるが、この酵素の各臓器でのアイソザイムパターンは特徴があるため、LD アイソザイム分画の測定が、血液・肝疾患・筋疾患・腫瘍性疾患、心筋梗塞などの診断上欠かせないものとなっている。

LD 活性測定はよく測定される重要な検査項目であり、日本臨床化学会 (JSCC) が1990年に勧告法を示した<sup>2)</sup>。しかし、LD アイソザイム分画の標準となるべき検出法はまだ確定されていない。星野らは電気泳動法による6種類の LD アイソザイム試薬キットを検討し、JSCC 常用基準法で求めたアイソザイム分画 (%) と基本的に近似した成績がえられたことを報告している<sup>3)</sup>。

(平成12年9月7日受理)

川崎医療短期大学 臨床検査科

Department of Medical Technology, Kawasaki College of Allied Health Professions

そこで、現在アイソザイム検査で使用されている LD 検出用試薬の中で、JSCC 常用基準法の分画 (%) と基本的に近似していた試薬 (ベックマン社パラゴン LD) を使用して検討を行った。

血清 LD アイソザイム測定に用いる検体は、採血後新鮮なものをできるだけ速く分析することが望ましいが、その測定法は操作が煩雑なためやむをえず検体を保存し、後日まとめて検査を行う場合も多い。そのため検体をどのような形で保存するかその保存条件などが問題となってくる。

今回、学生実習に BECKMAN 社製・LD アイソザイム試薬キット Paragon LD による電気泳動法を導入するため、測定条件設定、溶血の影響、検体保存の安定性、高温処理による影響などについて基礎的検討を行ったので報告する。

## 2. 研究方法

### 【泳動原理】



NAD: ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド

NBT: p-ニトロブルー塩化テトラゾリウム

PMS: フェナジンメトサルフェート

各アイソザイムのバンド中にニトロブルーホルマゼン色素が生成される。分離された LD アイソザイムパターンはデンストメーターによって定量する。

### 【対象・方法】

#### 1) 対 象

低活性検体: 正常人新鮮血清 1 例

高活性検体: 異常管理血清ネスコール A (アズウェル社) 1 例

#### 2) 方 法

研究の前段階として、チバ・コーニング社製とベックマン社製の 2 つのキットについて、LD アイソザイム測定の比較検討を行った。チバ・コーニング社の LD アイソザイム試薬では、染色後のゲルのバックグラウンドがばやけ、バンドの分離度がやや不明瞭であった。特に低活性検体では LD<sub>4</sub>、LD<sub>5</sub> のバンドが見えにくく、島津 CS-9300 (PC) S デンストメーターによる定量分析が難しかった。それに比較して、ベックマン社の LD アイソザイム試薬による電気泳動法は、染色後ゲルのバックグラウンドがきれいにぬけ各分画が明瞭であり、LD<sub>1</sub> から LD<sub>5</sub> までの分離能が優れていたため、ベック

マン社製パラゴン LD アイソザイムキットを使用し以下の実験を行った。

LD 総活性は紫外部測定法 (NADH 減少法) を用いて測定した。

#### 3) 操 作 法

(1) 測定試薬: 泳動支持体: アガロースゲル

LD 緩衝溶液 (pH 8.2): 2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール 38mmol/l, アスパラギン酸 23mmol/l, N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン 25mmol/l, 5,5-ジエチルバルビツール酸ナトリウム 15mmol/l。

基質溶液: L-乳酸, NAD に加えて発色溶液の NBT, PMS が加えられている。

脱色液: 5% 酢酸溶液を使用した。

(2) 電気泳動と染色法

- ① パラゴン電気泳動槽の陽極・陰極側にそれぞれ LD バッファ 45ml を注入する。
- ② LD ゲルを取り出し、ペーパータオルの上に置きゲルブロッター (薄い紙) をゲル上にのせ軽く乾燥させる。
- ③ サンプル塗布用テンプレートでゲルの上に置き穴に沿って検体を一定量 (4 μl) 注入し、5 分間おいて拡散させる。
- ④ 紙を用いて軽くぬぐって乾燥させ、ゲルの + 極と - 極が電極に一致するようにパラゴン電気泳動槽に入れ、出力を 100V で 25 分間泳動する。約 23mA が通電される。
- ⑤ 泳動完了後、LD 基質で飽和させたゲルブロッター (薄い紙) の上にゲルをのせ、インキュベーションボックスの中で 45℃、30 分間加温する。
- ⑥ 加温後、ゲルを 5% 酢酸溶液 I に 2 分間浸す。
- ⑦ ゲルの上に薄い紙と厚い紙を重ね、重石 (約 3.8kg) で 3 分間圧縮乾燥させる。
- ⑧ 乾燥の後、5% 酢酸溶液 II に 1 分間浸す。
- ⑨ 完全に乾燥させた後、デンストメーターを用いて 600nm でスキャンする。
- ⑩ LD 総活性から各分画 (%) の活性値を算出する。

## 3. 結果と考察

### 1. 泳動条件について

(1) 泳動時間

泳動時間を 20 分、25 分と変えて泳動し、その泳動距離を測定した。20 分泳動では、18mm (LD<sub>1</sub> ~ LD<sub>5</sub>) で、LD<sub>3</sub>・LD<sub>4</sub> のバンドに少し重なりがみられた。25 分の泳

動では、23～25mm (LD<sub>1</sub>～LD<sub>5</sub>) で、バンドがきれいに分離されていた。従って泳動時間は25分に決定した。

## (2) 脱色時間

脱色液 (5 %酢酸) に電気泳動したゲルを1分浸すと、バックグラウンドが十分にぬけなかった。2分浸すとバックグラウンドがきれいにぬけたため、脱色時間は2分とした。

## 2. 検体塗布量について

正常新鮮血清と、異常管理血清を1～5  $\mu$ lの5段階に塗布量を変えて泳動した。図1は、電気泳動像とLDアイソザイムのデンストメーター波形を示している。正常血清のLDアイソザイム分画の大きさはLD<sub>1</sub><LD<sub>2</sub>>LD<sub>3</sub>>LD<sub>4</sub>>LD<sub>5</sub>に順であった。異常管理血清の分画の大きさはLD<sub>4</sub>>LD<sub>2</sub>>LD<sub>1</sub>>LD<sub>3</sub>>LD<sub>5</sub>の順でLD<sub>4</sub>が高値を示していた。

血清量が1  $\mu$ lや2  $\mu$ lの時は塗布量が少ないため電気泳動像のバンドが少し薄かった。従って塗布量が3～5  $\mu$ lの範囲であれば適当だと思われる。今回は4  $\mu$ lを塗布量として検討を行った。ただし総活性が異常高値の場合は塗布量を活性値に応じて変えることが必要と思われる。

## 3. 同時再現性について

### (1) 島津CS-9300 (PC) S デンストメーターの同時再現性

同一検体の泳動パターンを10回連続して600nmで%

定量 (デンストメーター) した。そのときの同時再現性はLD<sub>1</sub>でCV:2.1%, LD<sub>2</sub>でCV:0.59%, LD<sub>3</sub>でCV:1.17%, LD<sub>4</sub>でCV:1.0%, LD<sub>5</sub>でCV:2.3%であり、良好な結果が得られた。

## (2) 電気泳動の同時再現性

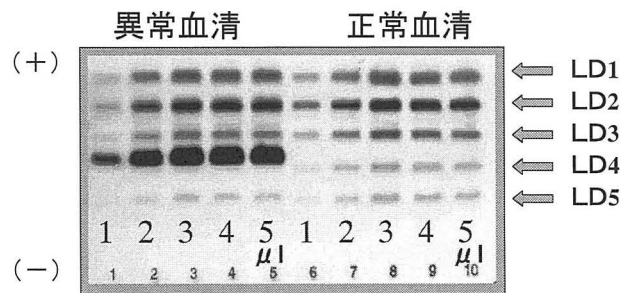
正常新鮮血清5回, 異常管理血清5回を電気泳動後、染色, 脱色, 固定し600nmで%定量 (デンストメーター) した場合のLD<sub>1</sub>からLD<sub>5</sub>の各分画の同時再現性はCV値で5.5%から7.8%であり、比較的良好な結果が得られた。

## 4. 溶血の影響について

4種類のヘモグロビン濃度 (Hb, 0.1～0.4 g/dl) の溶血液を作成し, LDアイソザイム測定における溶血の影響について検討した。その結果, 図2に示すようにHb:0.4 g/dlの濃度ではコントロールと比較すると, LD<sub>1</sub>は61%, LD<sub>2</sub>は45%, LD<sub>3</sub>は51%増加しており, Hb濃度に比例してLD<sub>1</sub>, LD<sub>2</sub>, LD<sub>3</sub>の分画で増加が見られた。LD<sub>4</sub>, LD<sub>5</sub>の増加は見られなかった。

LDは血球内にも存在し, 赤血球内には血清に比較して約200倍のLD活性が存在するといわれている。LD<sub>1</sub>は特に赤血球に多く分布しているため溶血によって血球内LDの逸脱がおり, LDアイソザイム分画においては, 特に強度溶血によってLD<sub>1</sub>, LD<sub>2</sub> (H型) に著明な影響が現れることが示唆された。したがって肉眼でみえる程度以上の溶血検体はLDアイソザイム測

## 電気泳動像および島津CS-9300 デンストメーター波形



## アイソザイム分画 (異常)    アイソザイム分画 (正常)

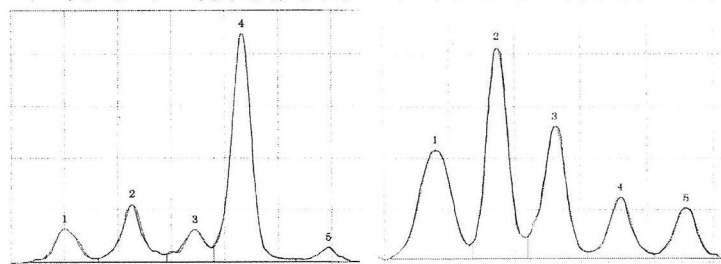


図1 LD 電気泳動像とデンストメーター波形

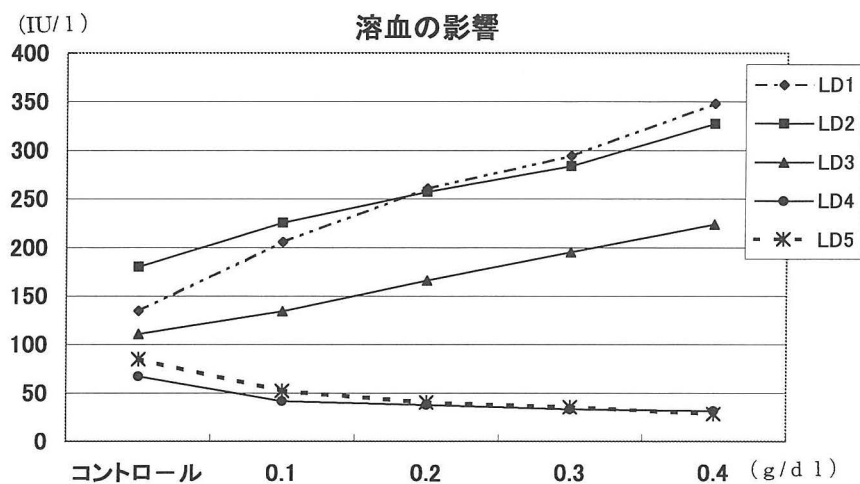


図2 溶血の活性と波形への影響について

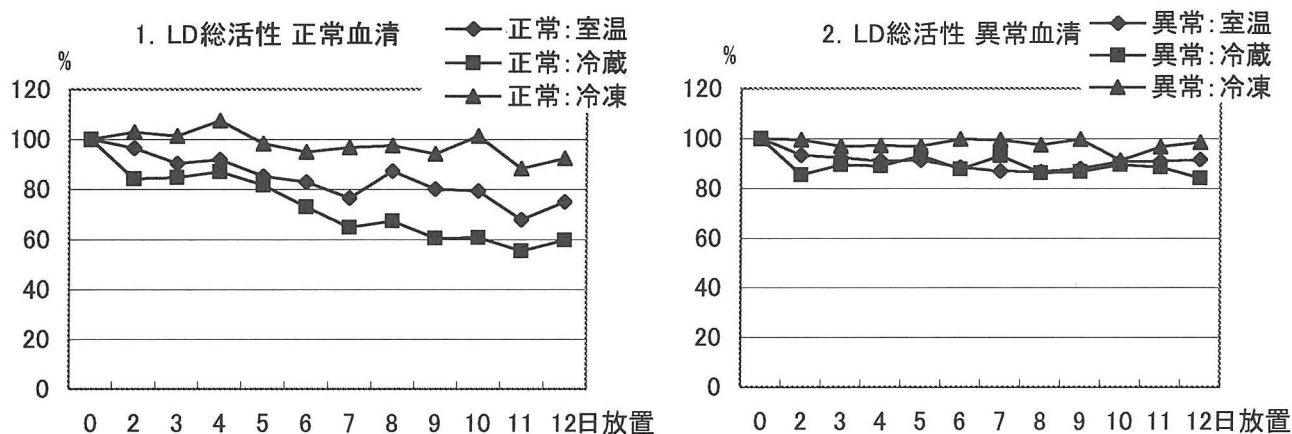


図3 LD 総活性の温度条件による経日的変化

定において不適であり採血して再検査する必要性がある。

## 5. 検体保存の安定性について

### 1) LD 総活性への影響

保存前の正常新鮮血清および異常管理血清の LD 総活性は218, 524IU/ℓであった。図3は、保存前0日を100%として正常血清(低活性検体)および異常血清(高活性検体)について2日から12日までの間の保存温度条件(室温約20℃, 冷蔵4℃, 冷凍-20℃)における経日的変化を示したものである。保存前0日に比較して2日放置では室温6.8%, 冷蔵14.7%, 冷凍0.6%の活性低下が見られた。3種類の温度条件での安定性を見ると、冷凍-20℃保存では活性低下が少なく、つづいて室温, 冷蔵の順であった。異常血清は1日毎の平均活性低下率は室温0.8%, 冷蔵1.5%, 冷凍0.1%であり、正常血清では室温2.3%, 冷蔵3.7%, 冷凍0.7%の低下が見られた。特に高活性検体に比べ、低活性検体

の活性低下が著しかった。LD 総活性は約5日間までの保存であれば、冷蔵より室温保存の方が安定していることが示唆された。また、-80℃保存の場合は正常血清, 異常血清共に活性変化はあまり認められず、一番安定した保存条件であった。

### 2) 血清 LD アイソザイム各分画の保存温度による影響

図4は、血清LDアイソザイム分画の保存温度による影響について活性値(IU/ℓ)で示したものである。室温では2, 4, 6, 8, 10, 12日保存のLD活性の変化を調べた。図5は、図4で表した2日保存を基準に各日数のLD活性の変化を%表示したものである。

室温保存の正常血清のアイソザイム分画では、7日以降LD<sub>3</sub>, LD<sub>4</sub>, LD<sub>5</sub>の活性値(%)が安定せず、減少傾向を示した。LD<sub>1</sub>, LD<sub>2</sub>には大きな減少が見られなかった(図4-1, 図5-1)。したがって、安定した条件でLDアイソザイムを測定するためには、室温保存の

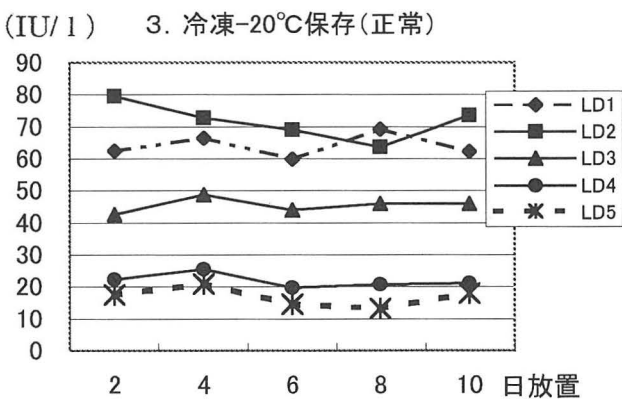
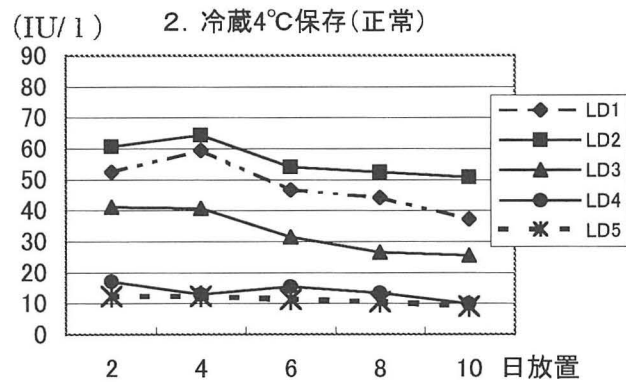
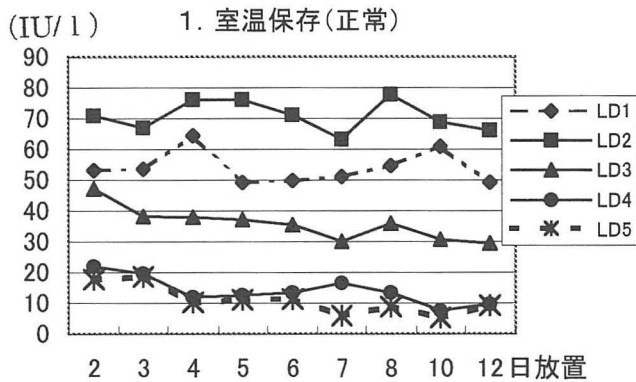


図4 血清 LD アイソザイム分画の保存温度による影響

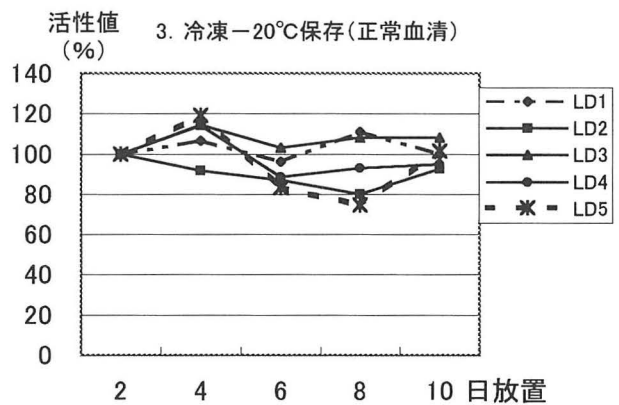
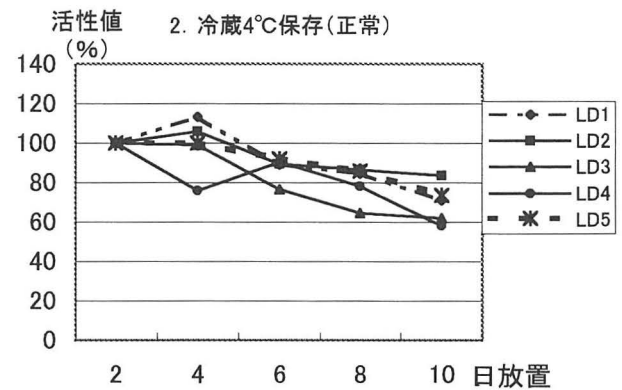
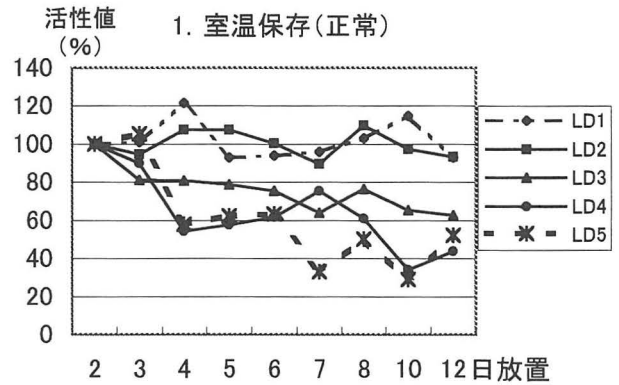


図5 血清 LD アイソザイム分画の保存温度による影響 (%表示)

場合、遅くとも数日以内に測定する必要があると考えられる。それ以後特にサブユニットM型を多く含むLD (LD<sub>4</sub>, LD<sub>5</sub>) が失活しやすいということがわかった。1週間以上室温に保存する場合は、細菌汚染なども考慮し冷凍保存を考えるべきである。

異常血清においても6日以降LD<sub>5</sub>の活性低下が見られた。

冷蔵4℃保存では、正常血清はLD総活性が4日目以降から減少し、LD<sub>1</sub>からLD<sub>5</sub>の全ての分画において、4日目以降活性の低下傾向が見られた(図4-2, 図5-2)。特に2日保存と比較して6日保存ではLD<sub>1</sub>: 11%, LD<sub>2</sub>: 11%, LD<sub>3</sub>: 24%, LD<sub>4</sub>: 10%, LD<sub>5</sub>: 8%

それぞれ低下し、10日保存では、LD<sub>1</sub>: 29%, LD<sub>2</sub>: 16%, LD<sub>3</sub>: 38%, LD<sub>4</sub>: 42%, LD<sub>5</sub>: 27%の低下が見られた。肉眼で見ても明らかに低活性であるLD<sub>3</sub>, LD<sub>4</sub>, LD<sub>5</sub>の分画が薄くなっており、M型は特に冷蔵保存で不安定であると考えられる。従ってこの実験結果から、4℃保存では1日約2%から4%の活性低下があることが示唆された。異常血清では、特にLD<sub>5</sub>の活性が不安定であった。他のLDアイソザイム分画においては大きな変化は見られなかった。

冷凍-20℃保存では、高活性値の異常血清、低活性値の正常新鮮血清ともに、室温保存、4℃保存の結果と比較し安定していた。今回の実験では、LDアイソ

ザイム分画に対する影響を見ると10日間保存において各分画の著明な活性低下は見られなかった(図4-3, 図5-3)。

冷凍 $-80^{\circ}\text{C}$ 保存では, 高活性値の異常管理血清, 低活性値である正常新鮮血清ともに,  $\text{LD}_4$ ・ $\text{LD}_5$ の著明な活性低下もなく1番安定していた。したがって, 長期検体保存の場合, 最も適した温度条件ということが示唆された。

高温下でのLDアイソザイムの影響を調べるために,  $56^{\circ}\text{C}$ の高温槽で検体を10分から90分まで10分おきに不活化を行ったところ, 高活性値の異常血清は,  $\text{LD}_5$ が不活化開始直後から低下し, 不活化40分後からバンドが消失した。低活性値の正常血清は,  $\text{LD}_4$ ・ $\text{LD}_5$ が不活化開始直後から低下し始め,  $\text{LD}_4$ は不活化60分後から,  $\text{LD}_5$ は不活化50分後からバンドが消失した。よって, M型を多く含む $\text{LD}_4$ ,  $\text{LD}_5$ は $56^{\circ}\text{C}$ の高温においても不安定だということが証明された。

以上の実験結果より, 正確にLDアイソザイムを分析するためにはいろいろな温度条件による検体保存の影響を把握することが大切であると思われる。LDアイソザイム測定検体は, 約5日間までの保存であれば室温保存も可能であり, 総活性値および各分画の分離能も比較的安定していることがわかった。しかし, 1週間以上室温( $20^{\circ}\text{C}$ )に保存することについては細菌による汚染等が考えられるため, 長期保存の場合は $-20^{\circ}\text{C}$ あるいはそれ以下の冷凍保存( $-80^{\circ}\text{C}$ )が一番望ましいと考えられる。

冷蔵保存( $4^{\circ}\text{C}$ )については測定前と比較して2日保存で総活性値は約16%の低下が見られた。LDアイソザイム各分画は4日以降徐々に低下する傾向が見られたため, やむを得ず冷蔵 $4^{\circ}\text{C}$ に保存する場合はなるべく3日以内にアイソザイム測定をすることが妥当と考える。

血清LDアイソザイム測定においては, 肝疾患や胃癌, 甲状腺癌など各種悪性腫瘍で $\text{LD}_4$ ,  $\text{LD}_5$ の分画が上昇すると報告されている。ある疾患においては特徴的なアイソザイムパターンを示すことから, 総活性だけでなく, 同時にLDアイソザイムを測定する意義が

高まっている<sup>4-6)</sup>。それだけに, 温度条件の影響を極めて受けやすい $\text{LD}_4$ や $\text{LD}_5$ の上昇をともしう疾患において, LDアイソザイム測定をする場合には検体保存の安定性を考慮すべきである。現在の電気泳動法は, さまざまなLDアイソザイム検出試薬の開発により操作性が向上し, 以前より簡単にアイソザイム測定ができるようになってきたといえよう。

一方, LDアイソザイム測定の温度条件による経日の検体保存の影響などに関してはくわしい報告例が少なく, 今回LDアイソザイム測定の基礎的検討を行ったことは意義深いことであると思われる。本実験で用いたパラゴンLD測定試薬による電気泳動法は, 操作が比較的簡単で同時再現性も良好であり, またゲルの分離能が優れており, 島津デンストメーターの分析も良好な結果が得られた。現在臨床検査科では新しいカリキュラムによる講義実習がスタートしている。新課程の生物化学分析検査学実習において, 学生がさらに疾患との関連を考えながら実習するためには, 酵素検査項目としてLD総活性測定に加えて, LDアイソザイム分析が重要であると考えている。従って, 今回検討したパラゴンLD電気泳動法は, 学生のLDアイソザイム実習の導入にあたり, 十分適した方法であると思う。

## 文 献

- 1) 野末三紗子: LDH アイソザイム, Medical Technology 14(13): 1281-1288, 1986.
- 2) 日本臨床化学会: ヒト血清中酵素活性測定の勧告法, 臨床化学19: 232-246, 1990.
- 3) 星野 忠 他: 乳酸脱水素酵素(LD)アイソザイム分画測定における市販検出用試薬の感度の差異, 臨床検査38: 607-610, 1994.
- 4) 森山隆則, 池田久實: アイソザイム検査の実際とその解釈, Medical Technology 25(1): 45-51, 1997.
- 5) 坂本 聖 他: 甲状腺疾患患者の組織および血清におけるLDH アイソザイムのパターンとその活性値, 医学検査45(10): 1512-1517, 1996.
- 6) 浅木信一郎 他: 胃癌手術後の血清LDH アイソザイムにみられた術中マイトマイシン大量投与の影響: 日本癌治療学会23(7): 51-59, 1988.