Comparative Studies on Lactate Dehydrogenase in Serum and Plasma of Rats

Toshihiro EMORI, Masakazu TAKAHASHI and Sumi NAGASE

Sasaki Institute, Surugadai, Chiyoda-ku Tokyo 101, Japan

(Received for publication : Oct. 12, 1977)

Values of serum and plasma LDH in rats were comparatively studied, and the following results were obtained: 1) The activity of LDH increased in serum with time during clotting, but no changes of LDH activity were found in plasma. 2) When platelet rich plasma (PRP) was recalcified and allowed to clot, LDH-release from platelets with a corresponding increase of serum LDH was observed, but addition of ADP or thrombin to PRP did not have an effect on LDH-release. 3) LDH-release from platelets by calcium was not inhibited by aspirin, and it was influenced by the quality of the test tube. 4) Values of serum and plasma LDH on experimentally induced liver-damaged or kidney-damaged rats and tumor-bearing rats were examined in relation to their tissue damages, revealing that plasma LDH activity represents the condition of a disease better than serum LDH activity.

ラット血清および血漿乳酸脱水素酵素の比較検討

江守利博・高橋正一・長瀬すみ

佐々木研究所

近年、毒性テストや疾患モデルに、実験動物としてラットが多く用いられ、またそれらの血液生化学的データの必要性が増加している。しかし、ヒトと同様の測定条件で得た結果には、種々問題点が残され、それらに関する検討が望まれている。特にラットの血清 LDH 活性が、人を含む他の動物種に比べ非常に高く、またバラツキも大であり、臓器の障害の程度との相関が必ずしも明確でない点などが指摘されてきた。また近年、FRIEDEL 等 [1] は、ヒト、イヌ、ウサギ、ラットを用いて数種の酵素に関して血清、血漿の活性値を比較し、特にラッ

トの血清 LDH 活性が採血から血清分離までの放置時間とともに増大すること、またその原因が血液凝固過程時に崩壊される血小板からの LDH の放出によるものであることを報告している。そこで我々はこの点をさらに詳細に検討するとともに、各種病態モデルを作成し、血清、血漿のいずれが病態の程度をより良く反映するかを検討し、若干の知見を得たので報告する。

材料および方法

1) 血清、血漿及び Platelet Rich Plasma (以下 PRP と略す) の分離: ラットをエーテル麻酔後、腹部大動脈より採血し、経時的実験以外は 1 時間室温放置後血清または血漿に分離した。なお血漿はヘパリン血 (25U/ml blood) より分離した。PRP は血液 9 に対し、3.8

略字の説明

ADP: Adenosine-5'-diphosphate

BUN: Blood Urea Nitrogen

LDH: Lactate Dehydrogenase

PRP: Platelet Rich Plasma

%クエン酸ナトリウム液を1の割合で加え、150×g、10分遠心により得た。また採血は、経時的実験を含む為、すべて非絶食の条件で行なった。

2) LDH 及び BUN の測定: LDH はベーリンガー社の測定キット (UV 法) を用い、LKB 8600 型にて測定した。BUN はジアセチルモノオキシム法により測定した。また LDH アイソザイムは、ヘレナ社の Titan III セルローズアセテート膜を用い、ペロナール緩衝液 (pH 8.6) で、180V、40分泳動後、フォルマザンの発色を行なった。

3) 四塩化炭素による急性肝障害: JCL-SD ラット、5週令、雄を各群5匹使用した。50%四塩化炭素 (オリブ油に溶解) を 4ml/kg 経口投与し、投与後、2, 4, 6, 24時間目に採血、血清または血漿に分離し LDH 活性を測定した。

4) 塩化第二水銀による急性腎障害: JCL-SD ラット、15週令、雄を各群5匹使用した。塩化第二水銀を 3mg/kg 筋肉内投与し、投与後2, 4, 6, 24時間目に採血、血清または血漿に分離し LDH 及び BUN を測定した。

5) 腹水肝癌移植: Donryu ラット、8週令、雄を各群5匹使用した。吉田肉腫細胞を1匹あたり 1×10^6 個腹腔内に移植し、移植後2, 4, 6, 7日目に採血、血清または血漿の LDH 活性を測定した。

6) アスピリンによる血小板凝集阻害: JCL-SD ラット、8週令、雌を各群15匹使用した。アスピリンを 50mg/kg 及び 100mg/kg 経口投与し、投与後90分に採血、血清または血漿の LDH 活性を測定した。

7) 血小板凝集時の LDH 放出: PRP 200 μ l に、各々、0.025M の CaCl_2 、 1×10^{-4} M の ADP (シグマ社)、2U/ml のトロンビン (ミドリ十字) の濃度に生理食塩液に溶解したものを 100 μ l 添加し、37°C で所定の時間それぞれインキュベーション後、2000×g、10分遠心し、その上清の LDH 活性を測定した。なお、PRP 中の血小板数は実験毎で異なるが、100~150万/mm³ の間で行なった。

成 績

JCL-SD ラット、5週令、雌を10匹使用し、血清 LDH 活性に及ぼす血清または血漿分離までの全血放置時間の影響を検討した。その結果、Fig. 1 に示すように、血清 LDH 活性は全血放置時間とともに上昇するのに対し、血漿の場合はほぼ一定値を保ち、1時間放置後分離した血清の LDH 活性値は血漿の約10~15倍の値を示した。

Fig. 1. Lactate dehydrogenase activity in serum and plasma of rats, variation with time between drawing of blood and preparation of serum and plasma.

Rats: Female JCL-SD rats of 5 weeks of age. Each value represents average of 5 rats with a standard deviation.

このようにラットの LDH 活性値は血清と血漿で著しく相違することを認めたので、次に各種病態モデルを作成し、血清、血漿のいずれが病態の程度をより良く反映するかを検討した。

まず、四塩化炭素による急性肝障害について検討した。その結果、Fig. 2, Table 1 に示すように血清の場合投与後24時間にならないと活性の上昇している個体が認められないが (4例中2例)、血漿では4時間で5例中3例、6時間以降では全例に活性の上昇を認めた。また同時に LDH アイソザイムを検討した結果、血清、血漿いずれも活性上昇を示したラットでV型 (肝型) の増加が認められた。

また塩化第二水銀による急性腎障害では、Fig. 3, Table 2 に示すように、血清の場合24時間でも活性の上昇している個体を認めず、血漿の場合でも5例中2例にとどまった。それに対し血清 BUN 値は24時間で全例において上昇を認めた (Fig. 4)。また LDH アイソザイムでは、24時間の血漿で活性上昇を示した2例 (No. 3, 5) で、血清、血漿いずれも I, II 型の出現が認めら

Fig. 2. Serum and plasma lactate dehydrogenase activity in rats with CCl_4 -induced acute hepatic damage.
Route of Administration: i. p.
Dose: 4.0ml/kg (The CCl_4 was a 50 % solution with olive oil)
Rats: Male JCL-SD rats of 5 weeks of age
* $P < 0.01$

Fig. 3. Serum and plasma lactate dehydrogenase activity in rats with HgCl_2 -induced acute renal damage.

Fig. 4. Serum blood urea nitrogen value in rats with HgCl_2 -induced acute renal damage.
Route of Administration: i. m.
Dose: 30mg/kg
Rats: Male JCL-SD rats of 15 weeks of age
* $P < 0.01$

れた。また2及び4時間の血漿で高値を示すものについては、24時間の場合と異なり、Ⅲ、Ⅳ型のアイソザイムが増加しており、注射部位の組織からの漏出と思われる。なお、コントロール群の最高値よりも高値のものを上昇していると判定した。

さらに吉田肉腫を移植した場合 Fig.5に示したように、血清では7日目の末期のみ著しい活性上昇が認められたのに対して、血漿では6日目の時点でコントロール（非移植）に対し平均値で約2倍の活性上昇を示し、7日目では血清と同程度の活性の上昇が認められた。以上の実験結果により、血清よりも血漿の方が早期に病態を反映すると思われる。

次に Friedel [1] 等が指摘するように、血清 LDH 活性の上昇が血液凝固時の血小板の崩壊によるのであれば、血小板機能に影響を及ぼす薬物を投与した場合、血清 LDH 活性に何らかの影響を及ぼすことが考えられる。そこで血小板凝集を阻害する薬物としてよく知られているアスピリンを投与した。その結果、Fig.6に示したように、50mg/kg 及び 100mg/kg 投与群のいずれの場合にも、血清、血漿の LDH 活性にコントロール群との有意な差を認めなかった。

このようにアスピリンにより血小板凝集を阻害した場合でも血清 LDH 活性に影響を及ぼさないことから、血液凝固過程時の血小板からの LDH 放出のメカニズムについて若干の検討を行ないたいと考え、PRP に血小板凝集あるいは凝固作用を有する物質を加えた際の血小板からのLDH放出について検討した。その結果、Fig.7に示したように、単独では血小板凝集能を持たず凝固作用

Table 1. Serum and plasma lactate dehydrogenase activity in rats with CCl₄-induced acute hepatic damage

	Animal No.	2 hours		4 hours		6 hours		24 hours	
		Serum	Plasma	Serum	Plasma	Serum	Plasma	Serum	Plasma
Control	1	2433	108	2284	101	2011	108	1596	93
	2	2476	104	2214	110	2109	131	2778	137
	3	1848	97	2990	—	759	102	—	144
	4	1955	150	—	84	1589	91	3176	—
	5	1843	182	2734	199	1520	111	2274	122
	Mean	2111	128	2605	123	1597	108	2456	124
	S. D.	283	33	280	45	479	17	590	19
CCl ₄	1	3172	130	2748	307	2542	444	3600	497
	2	2214	113	2175	152	1391	—	2642	297
	3	2081	131	2990	166	2413	294	—	—
	4	1898	118	1710	224	931	297	4578	734
	5	2142	133	1952	273	1781	373	2170	615
	Mean	2301	125	2294	224	1811	352	3247	536
	S. D.	501	9	489	61	609	61	926	186

Table 2. Serum and plasma lactate dehydrogenase activity in rats with HgCl₂-induced acute renal damage

	Animal No.	2 hours		4 hours		6 hours		24 hours	
		Serum	Plasma	Serum	Plasma	Serum	Plasma	Serum	Plasma
Control	1	1177	184	2454	110	1116	177	1518	112
	2	1668	95	1102	153	2546	124	1125	135
	3	1523	129	1710	126	1590	169	1555	121
	4	2213	164	1884	107	1394	107	1489	111
	5	2761	142	1575	110	1354	138	1197	116
	Mean	1868	143	1745	121	1600	143	1377	119
	S. D.	557	30	439	17	496	30	179	9
HgCl ₂	1	1897	493	2705	310	2228	144	2332	166
	2	1851	175	2142	205	—	—	954	153
	3	1621	125	1395	148	2074	123	1163	447
	4	1667	211	1196	295	1363	116	825	144
	5	2137	347	1899	158	1556	156	1747	870
	Mean	1834	270	1867	223	1805	135	1404	356
	S. D.	184	134	539	68	357	16	561	281

のみを有するカルシウムを添加した場合、経時的に LDH の放出が認められ、60分ではほぼ血清 LDH 活性（1時間放置後分離した血清）と同程度の活性が認められた。それに対して血小板凝集能のみを有する ADP では軽度にしかな放出が認められなかった。さらに血小板凝集と凝固作用の両作用を有するトロンビンでは、可視的に非常

に強い凝縮塊を形成するにもかかわらず、ほとんど LDH の放出が認められなかった。なおデータには示さないが、カルシウム、ADP 及びトロンビンは、実験に使用した濃度では LDH 活性に影響を与えないことを確認している。

さらに、このカルシウムによる LDH の放出に対し、

Fig. 5. Serum and plasma lactate dehydrogenase activity in rats Transplanted with Yoshida sarcoma.
Yoshida Sarcoma were transplanted intraperitoneally in a number of 1×10^6 cells per one body.
Rats: Male Donryu rats of 8 weeks of age
* $P < 0.01$

Fig. 6. Effect of aspirin on serum and plasma lactate dehydrogenase activity in rats.
Route of Administration: p. o.
Dose: 50mg/kg or 100mg/kg
Rats: Female JCL-SD rats of 8 weeks of age

Fig. 7. Lactate dehydrogenase of platelet rich plasma before and after clotting. 0.025M CaCl_2 , 1×10^{-4} M Adenosine-5'-diphosphate, 2U/ml Thrombin and Saline as a control were added to PRP. Each sample was incubated for 0, 15, 30, 45, 60min. at 37°C . After incubation, the reaction was stopped in a ice bath and then centrifuged at $1500 \times g$ for 15 min. LDH activity in the supernatant was measured.

Fig. 8. Effect of aspirin on LDH-release from platelets during PRP Clotting by Calcium. $100 \mu\text{l}$ of 0.025M CaCl_2 containing 1×10^{-3} M or 1×10^{-5} M Aspirin was added to $200 \mu\text{l}$ of PRP. The samples were incubated for 0, 15, 30, 45, 60min. at 37°C . After incubation, the reaction was stopped in a ice bath and then centrifuged at $1500 \times g$ for 10 min. LDH activity in the supernatant was measured.

Fig. 9. Lactate dehydrogenase activity after PRP clotting by calcium using different kinds of test Tube. LDH activity was measured at 60 min. after addition of 0.025M CaCl_2 . C. V. : Coefficient of variation (n=10).

Fig. 10. A picture of fibrin clot in the PRP after clotting by addition of calcium.
Right : New plastic tube
Left : Old plastic tube

in vitroでのアスピリンの効果を検討したところ、 10^{-4} M 及び 10^{-5} M でも影響が認められなかった (Fig. 8)。

また、このカルシウムによる LDH の放出が、用いる容器の材質により大きく左右されることを偶然見出したので、その点について検討した。その結果、カルシウム添加後60分の時点で、Fig. 9 に示すように古いプラスチック試験管に比べ、新しいプラスチック試験管、あるいはガラス試験管及びシリコン処理した試験管では LDH の放出が少ないことを認めた。さらにプラスチック試験管に比べ、ガラスやシリコン処理したものでは変動係数からも明らかのようにバラツキが大きいという結果が得られた。なお Fig. 7 及び Fig. 8 の実験は古いプラスチック試験管を使用した結果である。

また Fig. 10 に示したように、古いプラスチック試験管に比べ新しいプラスチック試験管の場合、強く小さい凝縮塊を形成し、ガラスやシリコン処理した試験管、あるいはトロンビン添加時にも同様の強い凝縮塊を認め、強く小さい凝縮塊の方が LDH の放出が少ないという傾向が認められた。

なお、新しいプラスチック試験管として、市販の滅菌済の製品を洗滌しないで使用し、古いプラスチック試験管として、10回以上洗滌したものを使用した。

考 察

最初に述べたように、FRIEDEL 等はラットの血清 LDH 活性が血清分離までの放置時間とともに増大することを報告しており、我々も今回それを追試したところ、同様の結果を得た。すなわち血漿では放置時間に関係なく一定値を示すが、血清の場合、血液放置時間が LDH 活性値に大きく影響し、従来指摘されていた LDH のバラツキの大きな原因をなしていたと考えられる。

また、FRIEDEL 等はこの血清 LDH 活性の上昇の原因として、PRP 及び血漿にカルシウムを加え凝固させた場合、血漿では変化せず、PRP の場合に LDH 活性が上昇することから、血小板の崩壊によるとしており、我々もカルシウムを添加したところ同様の結果を得た。しかし ADP により血小板凝集のみを起こさせた結果、あるいはアスピリンによる in vivo, in vitro で血小板凝集を阻害した場合の実験結果から明らかのように、血小板からの LDH の放出は凝集過程には直接関係せず、凝固過程に関係していることが示唆された。しかし凝固過程に関係するとしても、トロンビンによる凝固時にはほとんど放出されず、またカルシウムによる放出も用い

る容器の材質により大きく影響される結果を得た。この様に凝固時の血小板からの LDH 放出のメカニズムに関してはなお検討の余地が残されている。しかし強く小さい凝縮塊を形成した場合に放出が少ないことから、フィブリン網に LDH 分子がトラップされる可能性が示唆され、血液の場合には赤血球が多数存在する為、PRP の場合のように強く小さい凝縮塊を形成することができず、フィブリン網がゆるくなる結果、LDH 分子が血清中に遊離すると考えることもできる。なお血小板の LDH アイソザイムは血清、血漿と同じ V 型であった。さらに、このような血小板からの LDH 放出が、なぜラットに著明に生ずるのかという点に関しては今のところ不明であり、ラット血小板の特殊性についても今後検討の必要があると考えられる。

また我々は各種病態モデルを作成し、血清、血漿のいづれがより良く病態を反映するかを検討したところ、我々の行なった実験範囲では血漿の方が早期に病態を反映する結果を得た。

以上のことから、毒性テスト等において、ラットの LDH 活性を測定する場合、血清では採血後分離までの時間を一定にしなければならず、また血漿の方が病態の程度を早期に反映すること、及び凝固時の血小板からの LDH 放出に多くの要因が働きバラツキの原因となること等を考慮すれば、血漿で行なう方が良いと考えられる。今後、血小板からの LDH 放出に凝固過程が関係することから、凝固機能の異常の際の血清、血漿の LDH 活性について検討するとともに、LDH 以外の項目についても検索を行なう予定である。なお血小板以外の血球、すなわち赤血球、白血球からの LDH の放出の可能性については、赤血球からはほとんど放出されないことを確認しているが、白血球については、白血球のみを単離することが困難であるため検討できなかった。

ヒトの日常の臨床検査業務の範囲においては、特殊検査を除き、血清を使用するのが常であるが、ラットのみならず他の実験動物に関しても、よりよいパラメーターを得、動物実験で得た成績を我々人類に活かすために、この方面の検討をさらに多項目について行なう必要があるものと思われる。

要 約

疾患モデルや毒性テストに多くのラットが用いられ、それらの生化学的データが要求される事が多いが、それらに関しての問題点は多く、早急の解決が迫られてい

る。バラツキの多いラット血清 LDH の原因究明の一端として、血清及び血漿 LDH について比較検討を行ない次の結果を得た。

- 1) 血清 LDH 活性は血清分離までの血液放置時間とともに増大するが、血漿では一定値を保った。
- 2) PRP にカルシウムを添加することにより、血清 LDH 活性の上昇を説明しうる血小板からの LDH 放出を認めたが、ADP、トロンビンでは認められなかった。
- 3) このカルシウムによる血小板からの LDH 放出はアスピリンによって阻害されなかったが、使用する容器の

材質により大きく影響を受けた。

- 4) 種々の病態モデルを作成し、血清または血漿の LDH 活性を検討したところ、血漿の方が早期に病態を反映する成績を得た。

文 献

- 1) Fridel R. and Mattenheimer H. (1970): Release of metabolic enzymes from platelets during blood clotting of man, dog, rabbit and rat. Clin. Chim. Acta. 30. 37-46.