血液保存の研究 (IV)

乳酸脱水素酵素の測定に及ぼす赤血球の妨害機作について

日赤輸血研究所 (所長 村上省三博士)

浅 沼 哲 雄

STUDIES ON THE PRESERVATION OF HUMAN BLOOD (IV) THE INHIBITORY ACTION OF RED BLOOD CELL FOR THE ESTIMATION OF LACTIC DEHYDROGENASE ACTIVITY

by

Tetsuo Asanuma

Japanese Red Cross Society Blood Transfusion Research Laboratory

(Director: Dr. Seizo Murakami)

Abstract

Lactic acid dehydrogenase (LDH) activity in whole blood or serum has been proved by various investigators. Most of their methods for the estimation of LDH activity were electrophotometric determination of the reduction of diphosphopyridine nucleotide.

The author tried to estimate LDH activity with the use triphenyl tetrazolium chloride (TTC). The reduction of TTC was, however, not observed at all.

The blood constituents were added to the reaction mixture in phosphate buffer containing TTC lactate and lactic dehydrogenase obtained from guinea pig liver,

Results indicated that TTC reduction was inhibited by the addition of red blood cell. the nature of inhibition were summarized as follows.

1. The inhibitory action of red blood cell could tolerate against the temperature of 58°C and survive 65°C for 5 minutes.

2. When the red blood cell was treated with acetone, the inhibitor was not found in the solution, and precipitated completely.

3. The inhibitory action was found in the blood of rabbit, guinea pig, sheep and also of human being.

4. The mechanism of this action was supposed to the substance contained in red blood cell, which inhibited hydrogen transfer from lactic acid to TTC.

緒 言

赤血球がACD液中に4~6°Cで保存されている間にいろいろの形態学的あるいは生化学的变化が現われてくる。この変化と赤血球の残存率との関係を調べることによつて保存有効期限を延長して輸血赤血球の生存率を高めることが出来る。

ACD液を使用し始めてから保存有効期限を延長しようとの試みには、Adenosine を添加する方法¹⁾²⁾³⁾⁴⁾、Inosine を添加する方法⁵⁾⁶⁾⁷⁾、Inosine 及び Adenine を添加する方法⁴⁾⁸⁾等がみられるが、これらの保存方法の有効期限判定のためには溶血度、電解質の変動、ブドウ糖、乳酸、リン酸化合物の動き等が用いられている⁹⁾⁻¹⁶⁾。

これらの解糖系産物の相互には酵素系が働いていることは勿論であつて、赤血球解糖系減退との関係をみることもまた必要と考えられるが、解糖系各酵素について測定する方法は困難のため余り報告されていない。

著者は解糖系酵素である乳酸脱水素酵素の活性度についてその消長を調べようと試みた。

赤血球中に乳酸脱水素酵素(LDH)活性測定法としては、これまでピルビン酸塩を基質として、助酵素DPNHの340mμ波長における吸光度の減少を観察することが行なわれているが¹⁷⁾⁻²¹⁾、

A.A. Ofodie 等は 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) の還元発色する性質を利用して、血清中のコハク酸脱水素酵素とリンゴ酸脱水素酵素の活性度を測定している²³⁾。このTTCを用いて赤血球中の乳酸脱水素活性を証明しようと、いろいろ条件を変えたのであるが、予期した結果が得られなかつたため、赤血球自身の中に何か妨害物質が存在して、TTCの環元発色を制止するであろうと考え、剔出したモルモット肝ホモジネート及びその精製したLDH液を用いて、嫌氣的条件下でTTCを還元発色する反応系を調整し、これに赤血球、ストローマ及びストローマ加工物を添加したところ、反応が妨害または制止されることを認め、この妨害の本態についてある程度分析が出来たものでここに報告する。

実験材料

1) 基質

0.2 M コハク酸ナトリウム：第一化学薬品。

0.2 M 乳酸リウマチ：同上。

いずれも再留水により溶解した。

2) 酵素系

(i) 肝ホモジネート

使用直前にモルモットを頸動脈より脱血させてから肝を摘出し、直ちに生理的食塩水に浸し、その一部を切りとり重さを秤量、乳鉢にて素速く摺りつぶし、ガーゼ1枚で濾過したものをリン酸緩衝液pH7.2より稀釈混合し、10w/v%, 20w/v%, 50w/v%とした。

(i) 乳酸脱水素酵素液²³⁾²⁵⁾ (LDH液)

原料モルモット肝を100g摘出後直ちに氷中につける。一方-10℃に冷却して置いたミキサー容器へ、0.5M NaCl 80 ml (0℃)と氷塊20gを投入、先の肝100gを追加し、0℃前後の下にホモジネートを作る。次に0.5M NaCl 100ml 0℃を追加混合し、magnetic stirrer にかける。30分間攪拌した後、-10℃としたエチルアルコール及び0.5M NaCl 等量混合液全量200mlを、1分間に9ml以下の割合に滴下しつつstirrerにかける。滴下終了後更に-5℃、30分間継続する。これを冷凍遠心器により800×G、120分間遠沈し、上清(S-1)を集めて、0.5M NaCl 200 ml (0℃)に対して36時間透析する。透析後全

量を秤量して、デシケーターに48時間乾燥させた硫酸を1ml当り0.353gを1分間1gの割合に添加溶解しつつ、0℃の下に攪拌しつつける。

全量溶解させて30分間そのままとしてから、冷凍遠心器にて800×G、120分間遠沈し、上清を棄て、沈澱物を(S-1)の1/10量のpH 7.2リン酸緩衝液により溶解し、0.03M NaCl 2000ml (0℃)に対し36時間透析し、この液は遠沈し、沈澱物を除き、0℃以下に保存、用に臨みLDH液として使用する。

この液はpH 5以下、あるいはpH 8.5以上の場合または0℃以上の場合には速やかに活性度が消失する。pH 6~8の間で0℃以下に保存する場合は大体一週間安定である。

3) 人の赤血球

新鮮血は健康人より採血し、0.25容量ACD加血液となし、これより血球を3回生理的食塩水で洗い、これに留水を加え溶血液として用いる。

保存血液は日赤輸血研究所製、0.25容量ACD加保存血を用いた。保存条件は厚生省基準B液50 mlに対し、全血200mlの割合に採血し、4~6℃の下に保存したものより無菌的に経日的に採取して赤血球を分離して用いた。

4) ストローマ、礎質(ghost 残影)

主に保存血液を用いて赤血球を分離し、3回生理的食塩水で洗い筒状セロファンに包み、24時間または48時間留水に対して透析する。

(0°~5℃)この透析溶血液を5~6回留水で洗い、淡紅色を帯びたストローマが得られる。この製法過程の温度は低温と室温の二通りの場合を試みた。

5) 動物の赤血球。

家兎、モルモット、緬羊の全血を0.25容量ACD加血液として、赤血球を生理的食塩水で3回洗って用いた。

6) 10g/dlトリクロール酢酸

特級試薬を用い再留水により溶解した。

7) 10g/dl タングステン酸ナトリウム。

8) 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC)

第一化学薬品のものを用い、0.1%にpH 7.2リン酸緩衝液により溶解した。

9) HCN液

0.1NHCl 8.5ml と 0.1N KCN 10ml を混合し、使用毎に調製した。

10) β -Diphosphopyridine nucleotide (DPN) Sigma Chemical Co. のものを用いた。純度98%，0℃以下に保存し、pH 7.2リン酸緩衝液を用い、主として $7.5 \times 10^{-5}M$ 溶液を作製、他に $7.5 \times 10^{-4}M$ ， $2.5 \times 10^{-4}M$ ， $1.0 \times 10^{-4}M$ を使用した。これらは0℃以下に保存した。

11) リン酸緩衝液

0.1M第2リン酸ナトリウム及び0.1M第1リン酸カリウムを必要とするpHに応じて混合比を変えて調製し²⁵⁾、Cambridge pH meter Stadie System を用いて点検した。

12) アセトン

蛋白変性剤としてストローマに加えたものは30, 40, 50, 60, 80v/v%に溜水で稀釈した。

実験方法及び結果

A.A. Ofodile 等は血清及び血漿中のコハク酸脱水素酵素とリンゴ酸脱水素酵素測定にTTCを用いた。²²⁾すなわち以下の通りに調製した。

コハク酸脱水素酵素測定系として

0.5% TTC	0.5ml
0.2M コハク酸ナトリウム	0.5ml
pH 7.8 リン酸緩衝液	1.0ml
血清または血漿	0.5ml

終末pH 7.7に調製

リンゴ酸脱水素酵素測定系として

0.5% TTC	0.5ml
0.4M リンゴ酸カリウム	0.5ml
pH 7.8 リン酸緩衝液	1.0ml
血清又は血漿	0.5ml
0.2% DPN	0.5ml

これらの混合液を Thunberg 管にとり6 mm Hg まで抜気、38℃温水浴、60～90分間後、7.5 ml アセトンを加え強く振盪、20～24時間 0.5℃、暗室に置き、TTCの還元によつて生じた水に不溶性のホルマゼンを485mμで Beckmann DU Spectrophotometer により比色し、ホルマ

ゼンの標準曲線によつてその活性度を求めた。

著者はこの方法を赤血球中のコハク酸及び乳酸脱水素活性測定に試してみたが、前述の通り、その活性は全くみられなかつた。次いでモルモットの肝ホモジネートをコハク酸及び乳酸の基質に働かせTTCを還元発色させる反応系を調製し、これに溶血液を添加させた。

1) モルモット肝ホモジネートと人溶血液
(a) 基質をコハク酸ナトリウムとした場合調製法

表1のようにAB二種の共栓試験管に調製する。肝ホモジネートを分注するときは先の広口メスピペットを用いる。調製後全量を3.5mlとする。添加物は2倍稀釈の入溶血液液0.5ml、基質は0.2Mコハク酸ナトリウム。

表1 肝ホモジネート脱水素酵素のTTC活性測定系 (単位ml)

組 成	対 照	A	B
基 質	0.5	0.5	0.5
0.5% TTC	0.5	0.5	0.5
pH 8.4 リン酸緩衝液	1.5	1.0	1.0
HCN液	0.5	0.5	0.5
10W/V%肝ホモジネート	0.5	0.5	0.5
溜 水	—	0.5	—
添加物	—	—	0.5

終末pH7.72 (20℃)

実施：以上のように調製した共栓試験管を直射日光をさけて38℃、90分間温水浴、発色させ、アセトン10mlを加え強く振盪、30分間暗所に置き、残渣中のホルマゼンをアセトン層に移行抽出させ、これを遠沈し(800×G)、上清のアセトン溶液を比色用キューベットに移し、Colemann Junior Spectrophotometer Model 6Aにより波長490mμにおける吸光度(Ext.)を測定する。対照をBlankとする。

結果：表2の如く、2倍稀釈溶血液を添加したBにおいては、Aに比較して発色が妨害されている。

(b) 基質を乳酸リチウムとした場合
調製法：基質を0.2M乳酸リチウムとして、こ

表2 2倍溶血球添加

	Ext. 490mμ
A	0.610 0.550
B	0.300 0.405

Aは溶血球なし
Bは溶血球添加した反応系。
基質はコハク酸ナトリウム

表3 稀釈溶血球添加反応系

		Ext. 490mμ
A	1	0.240
	2	0.250
B	4×	0.082
	6×	0.142
	8×	0.150
	10×	0.162
	14×	0.179
	16×	0.110

基質は乳酸リチウム

の場合は (a) にくらべ発色が弱いので、20w/v %肝ホモジネートを用いる。Bには表3のように4×から16×倍数稀釈溶血球液の5通りを調製し各と0.5mlを加えた。

実施：
(a)と全く同じ。

結果：
肝ホモジネートの pipetting による誤差はもちろん考慮すべきだが、4×と6×においては明らかに溶血液の発色妨害を認める。この他の溜水に対して24時間透析した血液を添加しても同様の発色妨害をみた。

なお溶血液の遠沈後上清ヘモグロビン液の妨害作用は明らかでない。

2) 肝ホモジネートと血球除蛋白濾液

溶血液のTTC発色妨害作用が、蛋白質性のものか、あるいは除蛋白濾液中にあるものかを確かめるため、次の二通りの除蛋白濾液をそれぞれ添加してみた。

調製法：

(a) トリクロール酢酸除蛋白濾液

洗った赤血球1容に10g/dl トリクロール酢酸1容を振盪しながら滴下し、室温に30分間放置、東洋濾紙 No. 6 を用いて濾過する。この2倍濾液を0.1N NaOHによりフェノールフタレインを指示薬として中和する。

2倍除蛋白濾液 1.0ml
0.1N NaOH 0.65ml

これに溜水を加えて、全量2.0mlとし4倍濾液にして用う。pH7.45 (22℃)

(b) Folin-Wu 法除蛋白濾液

洗った赤血球 5.0ml
留水 35.0ml
10%タングステン酸ナトリウム 5.0ml
2/3NH₂SO₄ 5.0ml

これを30分間放置、東洋濾紙 No. 6により濾過する。この10倍除蛋白濾液10mlに対して0.1N NaOH 0.4mlを加えて中和する。

実施：基質は0.2M乳酸リチウムとした。(a)(b)ともに終末pH7.16 (22℃), 7.17 (20℃)に調製し、(1)と同様に実施した。

結果：ホモジネートの pipetting の誤差はみられるが、(a)(b)いずれの除蛋白濾液による妨害も明瞭でない。唯々 Folin-Wu法の除蛋白濾液中のタングステン酸ナトリウムは単独に添加しても軽度の妨害がみられるので濾液中の物質によるものとは考え難い。(表4, 5)

表4 血球トリクロール酢酸4倍濾液を添加した場合 (B)

	Ext. 490mμ
A	0.220
	0.270
B 4×濾液 添加	0.340
	0.250
	0.280

Aは対照

3) LDH液と溶血液

肝ホモジネートの pipetting は細心の注意を拂つても分注量の誤差を生じ、比色時にかなりのばらつきを伴うため、余程の発色妨害作用がなければ明確にならない。このため肝ホモジネート中の

表 5 血球タングステン酸ナトリウム10倍濾液と10倍溶血球添加との比較

		Ext. 490mμ
A		0.410
		0.370
		0.380
B	10×溶血液 添加	0.240
		0.160
	10×濾液 添加	0.300
		0.298
		0.280

Aは対照

LDHを精製し、半透明且均一の酵素液にして、誤差を相当程度迄除くことが出来た。このLDH液はTTCを添加したのみでは発色せず常にDPN溶液を加えて、Thunberg管を用い嫌氣的に反応させた。HCN法では発色は極く弱い。

調製法：

基質を Thunberg 管の側管に他の 試薬をすべて主管にとって、表 6 の如く調製した。

表 6 乳酸脱水素酵素TTC活性測定系と妨害測定系

組 成	Blank	基質対照	酵素活性	妨害度
0.1% TTC	0.5	0.5	0.5	0.5
リン酸緩衝液pH 7.6	2.0	1.5	1.5	1.0
7.5×10^{-4} MDPN	0.5	0.5	0.5	0.5
0.2M乳酸リチウム	0.5	—	0.5	0.5
妨害物	—	0.5	—	0.5
酵素液	—	0.5	0.5	0.5

0.5終末pH7.20 (20℃)

実施：

側管の基質が主管に流れ込まぬ様密栓し、液表面から泡立つ迄 (6 mmHg), 抜気して、主管と側管の内容をよく混合し、38℃, 90分間温水浴し反応を起させてから、アセトン10ml を加え強く振盪し、30分間暗所に放置、密栓して遠沈、上清のアセトン抽出層をキューベツトに移し、波長490mμにおいて吸光度 (Ext.) を測定する。

結果：

(i) 人溶血球液の倍数稀釈液を加えた場合
妨害物として2×～6×までの倍数稀釈溶血球

液を添加したところ図1.の如き結果を得た。酵素活性を示す対照では一回毎に差を生じるが、これは酵素液が0℃以上になると不安定であり、活性度が減弱するためである。妨害は2×, 4×, 8×, まだ殆んど完全に認められ、16×, 32×, 稀釈溶血球液まで妨害している。

図 1 人倍数稀釈溶血球液を添加した場合

(ii) 家兎の溶血球液を加えた場合。

人溶血球液の場合と同様洗つた家兎血球を溜水によつて倍数稀釈したものを添加した。図 2, の如く64×～128×稀釈溶血球液添加まで妨害がみられ、人赤血球の場合よりも妨害作用が強いと思われる。

図 2 家兎溶血球を添加した場合

(iii) モルモットの溶血球液を加えた場合

この酵素液活性度はかなり減弱しているが、32倍稀釈溶血球液まで妨害著明である (図 3).

(iv) 細羊の溶血球液を加えた場合

16倍稀釈溶血球液まで妨害している。(図 4) この場合の基質対照は黄綠色を呈した。

(v) 人及び家兎血球混合液

人及び家兎のそれぞれの妨害作用を完全に示す稀釈度を比較すると大体4倍稀釈の差が認められ

図3 モルモット溶血球添加の場合

図4 綿羊の溶血球を加えた場合

るので、家兎血球と人血球の混合比を1：4の割にした溶血球液を添加した場合は、それぞれ単独に添加した場合の両妨害曲線の間をとると考えた。しかし実際には図1.の人溶血球のみ添加した場合の妨害曲線と殆んど変りない(図5). 但し16×以後の妨害度が急激に減少した状態を示す。

図5 人4及び家兎1の混合比の溶血球添加

次に混合比が 家兎：人＝1：2 A
 家兎：人＝1：1 BD
 家兎：人＝2：1 C

の如く調製したものを添加して図6.のABCDの各曲線を得た。

A曲線は人血球添加の場合と同型を示す。B、D曲線の妨害は16×前後のみで、2×、4×、溶

図6 人及び家兎溶血球を種々の混合比にした場合

血球添加では反対に発色促進を示している。C曲線はBDと同型を示すが、家兎血球の多い方が発色を促進するような結果を得た。

4) ストローマの妨害作用

人保存血より作製したストローマをオストワルドピペットにより 0.5ml 反応系に添加したところ、DPNの濃度によつて妨害を示さない場合がある。

調製法及び実施ともに3)の場合に同じである。
結果：

(i) DPN濃度との関係

図7.の如く、6通りのDPN濃度を作成し、各濃度の対照を置き比色した結果、 $7.5 \times 10^{-4}M$ では殆んど妨害を示さないが、 $2.5 \times 10^{-4}M$ 以下ではかなりの妨害作用を示す。 $1.5 \times 10^{-5}M$ 以下では対照自身の発色も抑制される。従つて以下ス

図7 DPN濃度とストローマ妨害度

トローマについての妨害実験ではすべて 7.5×10^{-5} MDPNを使用した。

(ii) 熱処理をしたストローマを添加した場合
ストローマを作製する場合は室温と0℃以下の低温と両者を比較した結果、変りがないので、熱処理を加えてどの位の温度まで妨害物質がその作用を保持するかをみた。すなわち58℃, 65℃, 80℃, 100℃の4通りの温水浴5分間処理を加えたが、 7.5×10^{-5} MDPN濃度では、58℃, 65℃処理のストローマにはいまだ妨害作用がある(表7)。これに反して、80℃, 100℃処理ではストローマの色が茶褐色に変り、凝固し、妨害作用は認められない。

表7 ストローマの熱処理後の妨害度

	Ext. 490mμ
対照	0.162
	0.040
58℃	0.048
	0.072
65℃	0.070

加熱5分間

(iii) アセトン処理をしたストローマ
次に保存血液より作製したストローマにアセトン処理を加えた場合の影響をみた。
ストローマ10ml に対し、30%, 40%, 50%, 60%, 80%, 100%にそれぞれ留水により稀釈したアセトン液を40ml 加えて、30分間振盪器にかけ、東洋濾紙 No. 6 で濾過、残渣は濾紙上に拡げ、アセトンを蒸発させpH 7.2リン酸緩衝液に浮遊させて、全量を5ml にしたものを用いた。

一方濾液は約35~40ml を得るが、これを減圧蒸留して濃縮し、全量5ml として使用する。

(a) 濾液
全濾液を濃縮して5ml としたものを0.5ml 添加した場合は、図8.の如く殆んど妨害を示さない。

(b) 残渣
pH 7.2リン酸緩衝液の浮遊液0.5ml を添加すると図9.の如くで発色妨害を示す。しかしながら

図8 ストローマのアセトン処理濾液の妨害度

図9 ストローマのアセトン処理残渣の妨害度

図10 ストローマのアセトン処理残渣の妨害度

アセトン濃度による特徴は示していない。対照の酵素活性を考慮に入れ各濃度とも一定の妨害を示していると考えられる。

(c) 残渣の浮遊液について

(b) における緩衝液の浮遊液を2～3時間静置すると、上清と沈澱層に別れるが、この上清と沈澱とのそれぞれを添加した場合の妨害度は、図10、の如くアセトン濃度の低い程、上清に妨害物質が存在し、アセトン濃度の高い程、沈澱に含まれている。従つて妨害性物質はアセトンに不溶性のものであると云える。

図11 赤血球解糖系 (J. Appl. Physiol. 7: 168, 1954)

考 察

血清のLDH活性について正常及び二、三の疾患の場合の測定²⁶⁾²⁷⁾²⁸⁾、血清蛋白の沈澱性及び血清蛋白分画との関連性²⁹⁾³⁰⁾³¹⁾等の報告があるが、これらLDH活性の測定法はいづれもピルビン酸塩を基質とし、DPNHを助酵素として波長 340 mμにおける吸光度の減少を比色測定するものである。

M.C. Blanchaer 等はACD保存血のLDH活性について、同じくDPNHを用いてその吸光度によって測定し、LDH活性は40日間殆ど変化がないからピルビン酸塩の蓄積の原因にならないとしている¹⁷⁾。

F.Wroblewski 等はDPNHを用い0°～5℃で1週間保存の血清LDHに著変がないという結果を出して居り¹⁸⁾、また O.Bodansky 等は6-methylpurine を投与した際の Rat の赤血球及びその他の組織についてLDH活性を測定し、赤血球については殆んど一定であり、血漿のLDH活性は7日目及び19日目において増加する¹⁹⁾。

E.S. Vesell 等は血清及び溶血球液のLDH活性とリンゴ酸脱水素酵素活性と、それらに対する蛋白分画像との関係を調べ、溶血液は電気泳動的に分けて、血清でみられると同じようにα2分画に一致した最大の活性ピークが得られた。

また P.G.W. Plageman, F.Wroblewski 等はDPNHを用いて溶血球液蛋白分画像とLDH活性度を比較して居り、その活性度は80単位を示し、Rat の赤血球に類似していると述べている。

J.L. Koppel 等は人血小板について数種類の脱水素酵素とともにLDH活性をTTC, DPNを用いて測定し、SH基を有する Cystein 及び還元 glutathione により活性化されることを報告している。波長 485mμにおいて比色測定し、吸光度が基質の種類によつて異なり、Succinate と glycerophosphate では 0.160, l-malate 及び glucose では 0.125, lactate では 0.080 を示している³²⁾。

A.A. Ofodile 等はTTCを用いて、血清中及び血漿中のコハク酸ならびにリンゴ酸脱水素酵素活性を調べ、両者とも低活性であると報告している。

TTC(2,3,5-triphenyltetrazolium Chloride)は種々の植物種子の発芽能力検査などに用いられ、その変色する理由について研究されていたが³³⁾R. Kuhn 等はいくつかの体組織ホモジネートによるコハク酸脱水素酵素活性測定のためにTTCを利用した³⁴⁾。組織切片及びホモジネートの脱水素作用により水素受容体であるTTCが用いられ、その還元して無色から紅色に変色したFormazanを抽出し、比色計により波長 485mμにおいて測定された³⁵⁾³⁶⁾³⁷⁾。

このTTCを使用しての赤血球のLDH活性度

測定に成功しなかつたが、その原因についてモルモット肝ホモジネートによる原因追究を試みた。肝ホモジネートにはLDHの他に多くの脱水素酵素が含まれているが、そのうちの多くはTTCに水素を授与するものであるため、それが盲値となつて現われる。

表2では2倍溶血球液により強く妨害するのが認められるが、何が妨害または制止するかを分析するに当り、酵素作用に妨害が起るのか、あるいはFormazanの抽出過程に影響があるのか、いづれであるのか問題となる。

始めに乳酸リチウムを用いて実験したところ、トリクロール酢酸濾液には妨害物質が認められず、またFolin-Wu法による除蛋白濾液では軽度には妨害を認めたが、これはタングステン酸ナトリウムそのものに抑制作用があることが判明したので、濾液中の物質による妨害ではないと考えられる。

そこで赤血球中の酵素作用の検出に対する妨害物質の存在の探究目的で精製したLDHに、肝ホモジネートよりえたものを用いることにしたが、この場合生の肝ホモジネートを用いた場合と違って表6にみるようにDPNを添加しないとTTCは発色しない。

この反応系に対して人の倍数稀釈溶血球液を添加した場合は、図1の如く著明な妨害を認める。また家兎、モルモット、緬羊の溶血球液を添加してもやはり図2.3.4の如く妨害を示す。殊に家兎の赤血球は同じ稀釈度でも他の種の赤血球よりも強く妨害する。この種による差の原因についてはまだ分析を進めていない。

図3.4の対照の活性度は低値を示しているが、LDH液は肝100gより精製して約50mlしか得られず、0℃以上では容易に活性消失するために実験のつど活性度が異なり、かつ日が経つと低活性を示す。この低活性となつた場合に、高活性度の酵素液を用いた反応系に対して添加する妨害物と同一量を加えるため、低活性度の割には妨害度が強く現われる。すなわち対照の活性度と妨害稀釈濃度との間には一定の相関関係があるように思

われる。

人及び家兎の赤血球混合液については図5及び図6に示す通りで、図5では人4、家兎1の混合割合で16倍稀釈以上において急激に妨害度が減少する。これは人血球のみの妨害曲線と家兎血球による妨害曲線との中間位をとるであろうとの予測にたつて行なつたものであるが、むしろ人血球のみの混合に近い傾向を示す。これに反して図6では人1、家兎1または2つの混合割合の場合には妨害でなく促進を示している。この原因として考えられるものは、更に実験したところによると使用した家兎はCoombs用血清をとるため、人O型血清で免疫してあるものと、していないものがあり、前者の血球を24時間25℃以上の室温に放置したり、24時間孵卵器に置いたものを添加した場合に促進を示した。免疫していないものでは25℃以上の室温に放置しても妨害を示した。発色妨害でなく促進を示した家兎血球を、基質を除いた反応系に添加し温水浴すると発色する。

従つて放置する間に家兎赤血球において反応が起り基質となるべき物質が遊離したのではないかと考えられる。しかしながらこの家兎赤血球の態度については更に実験を必要とする。

人赤血球を一晝夜留水に対して透析してから約10倍の留水を加えて溶血させ、遠沈によりヘモグロビン液と沈渣のストローマに分離し、ヘモグロビン液を減圧濃縮して $1/10$ となつたものを添加したところ僅かに妨害を示すと思われた。

赤血球を分離して洗い溶血させた後、留水で数回洗つたストローマの妨害度は溶血液そのまゝに比較し、かなり減弱して居りDPN濃度が $7.5 \times 10^{-4}M$ 以上であると殆んど妨害を示さなくなる(図7)。DPN濃度が $2.5 \times 10^{-4}M$ 以下になると対照活性も減弱していくが、これに対して添加されるストローマは一定量であつて、妨害度もDPN濃度に関係がないようで、60~70%程度の妨害を示している。

S.G.A. Alivisatos等は血中のLDH活性度とストローマ有無との関係についてWarburgフラスコを用いて調べ、ストローマを除いた溶血球液

の方がLDH活性度が高いとしており、これは赤血球表面にあるDPN-aseによると報告している。

次にストローマに熱処理を加えた場合には表7の如く、58°C、65°C 5分間では妨害度が残存し、前者の方が強く妨害作用が残っており、80°C、100°C 5分間では妨害を示さない。この事は加熱による蛋白質の変性に類似している。

アセトン処理を行なった場合には図8の如く濾液による妨害は殆んど示さないが、沈澱物をpH 7.2リン酸緩衝液に浮遊させたものを添加した場合は妨害を示す。アセトン濃度の差に依ると思われる結果は得ていない。従つてアセトンに不溶性の物質が妨害を示すと考えられる。この緩衝浮遊液を更に1時間静置して、上清と沈澱物とに分けて添加したところ沈澱物の方に妨害作用を認めた。

以上ストローマの妨害性について分析したが酵素に対するいわゆる阻害剤とは異なるものであり、またLDHの免疫化学的な酵素の抗体による妨害とは考えられず^{39)~42)}、従つてLDHの活性は赤血球の保存によつて決められるものでなく、LDHの定量がTTC法に依る場合にのみ、ストローマに由来する妨害物によつてTTCへの水素転移が妨害をうけていることが明らかにされた。

結 語

1. 保存赤血球中のLDH活性はTTC法によつては証明されない。
2. この原因については赤血球自身がモルモット肝ホモジネートの反応系に対して発色妨害を示すことが明らかとなつた。
3. 赤血球中の妨害物質は58°C、65°C 5分間の加熱処理に耐えるが、80°C、100°C 5分間では妨害能を失う。
4. アセトン処理を加えた場合、濾液中には妨害物質はなく、沈澱物中に存在する。
5. トリクロール酢酸及びタングステン酸ナトリウム除蛋白濾液中にも妨害能は存在しない。
6. 人赤血球以外の家兎、モルモット、緬羊の赤血球も妨害を示す。なお人と家兎血球混合液を添加した場合は反対に促進することがある。

7. 以上の機作としてLDHからTTCへの水素転移を妨害する能力が赤血球中に含まれるものと考えた。

本論文の要旨は第9回日本輸血学会総会において報告した。

なお摺筆にのぞみ御指導、御校閲を賜つた東京女子医科大学松村義寛教授ならびに終始御援助、御鞭撻をいただいた日赤輸血研究所々長村上省三博士および同研究部長徳永栄一博士の諸先生に心からの感謝を捧げると共に研究の機会を与えられた日赤中央病院外科部長幕内精一先生ならびに研究所の皆さんに対し厚く御礼申上げる。

文 献

- 1) Gabrio, B.W., Hennessey, M., Thomasson, J., & Finch, C.A.: Erythrocyte preservation. IV. In vitro reversibility of the storage lesion. J.B.C., 215 : 357—367, 1955.
- 2) Gabrio, B.W., Donohue, D.M. & Finch, C.A.: Erythrocyte preservation. V. Relationship between chemical changes and viability of stored blood treated with adenosine. J. Clin. Invest., 34 : 1509—1512, 1955.
- 3) Donohue, D.M., Finch, C.A., & Gabrio, B.W.: Erythrocyte preservation. VI. The storage of blood with purine nucleosides. J. Clin. Invest., 35 : 562—567, 1956.
- 4) Gabrio, B.W., Finch, C.A. & Huennekens, F.M.: Erythrocyte preservation, a topic in molecular biochemistry. Blood, 11 : 103—113, 1956.
- 5) Bartlett, G.R. & Barnet, H.N.: Changes in the phosphate compound of the human red blood cell during blood bank storage. J. Clin. Invest., 39 : 56—61, 1960.
- 6) Shafer, A.W. & Bartlett, G.R.: Phosphorylated carbohydrate intermediates of the human erythrocyte during storage in acid citrate Dextrose. I. Effect of the addition of inosine at the beginning of storage. J. Clin. Invest., 40 : 1178—1184, 1961.
- 7) Bartlett, G.R. & Shafer, A.W.: Phosphorylated carbohydrate intermediates of human erythrocyte during storage in acid citrate dextrose. II. Effect of the addition of inosine late in storage. J. Clin. Invest., 40 : 1185—1193, 1961.
- 8) Nakao, M., Nakao, T., Tatibana, M., & Yoshikawa, H.: Phosphorus metabolism in human erythrocyte. III. Regeneration of adenosine triphosphate in long-stored ery-

- throcyte by incubation with inosine and adenine. *J. Biochem.*, 47 : 661—671, 1960.
- 9) Rapoport, S.: Dimensional, osmotic and chemical changes of erythrocytes in stored blood. I. Blood preserved in sodium citrate, neutral, and acid citrate-glucose (ACD) mixtures. *J. Clin. Invest.*, 26 : 591—654, 1947.
 - 10) Strumia, M.M. & Blake, A.D. et al.: The preservation of whole blood. *J. Clin. Invest.*, 26 : 667—677, 1947.
 - 11) Ross, J.F. & Finch, C.A.: The in vitro preservation and posttransfusion survival of stored blood. *J. Clin. Invest.*, 26 : 687—703, 1947.
 - 12) Gabrio, B.W. & Finch, C.A.: Erythrocyte preservation. I. The relation of the strage lesion to in vivo erythrocytes enescence. *J. Clin. Invest.*, 33 : 242—246, 1954.
 - 13) Gabrio, B.W., Finch, C.A. & Stevens, A.R.: Erythrocyte preservation. II. A study of extra-erythrocyte factors in the storage of blood in acid-citrate-dextrose. *J. Clin. Invest.*, 33 : 247—251, 1954.
 - 14) Gabrio, B.W., Stevens, A.R. & Finch, C.A.: Erythrocyte preservation. III. The reversibility of the stroage lesion. *J. Clin. Invest.*, 33 : 252—256, 1954.
 - 15) Gray, S.J. & Sterling, K.: Determination of circulating red cell volume by radioactive chromium. *Science*, 112 : 179—180, 1950.
 - 16) Yoshikawa, H., Nakao, M., Miyamoto, K. & Tatibana, M.: Phosphorus metabolism in human erythrocyte. II. Separation of acid-soluble phosphorus compounds incorporating P^{32} by column chromatograpy with ion exchange resin. *J. Biochem.*, 47 : 635—648, 1960.
 - 17) Blanchaer, M.C. & Baldwin, S.L.: Pyruvate accumulation in preserved blood. *J. Appl. Physiology*, 6 : 8—14, 1953.
 - 18) Wroblewski, F. & LaDue, J.S.: Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 90 : 210—213, 1955.
 - 19) Bodansky, O., Philips, F.S., Scholler, J. & Sternberg, S.S.: Effect of 6-Methylpurine on phosphohexose isomerase and lactic dehydrogenase activity of plasma, erythrocytes, liver, and skeletal muscle. *Cancer Research*, 18 : 687—691, 1958.
 - 20) Vesell, E.S. & Bearn, A.G.: Observations on the heterogeneity of malic and lactic dehydrogenase in human serum and red cells. *J. Clin. Invest.*, 37 : 672—677, 1958.
 - 21) Plagemann, P.G., Gregory, K.F. & Wróblewski, F.: The electrophoretically distinct forms of mammalian lactic dehydrogenase. I. Distribution of lactic dehydrogenase in rabbit and human tissues. *J.B.C.*, 235 : 2282—2287, 1960.
 - 22) Ofodile, A.A., Raynolds, M.D. & Walke, B. S.: Succinic and malic dehydrogenase in serum. *Am. J. Clin. Path.*, 26 : 765—770, 1956.
 - 23) Gibson, D.M., Davisson, E.O., Backhawatt, B.K., Ray, B.R. & Vesting, C.S.: Rat liver lactic dehydrogenase. I. Isolation and chemical properties of the crystalline enzyme, *J.B.C.*, 203 : 397—409, 1953.
 - 24) 赤堀四郎編：酵素研究法Ⅱ，400，1958.
 - 25) 藤田秋治著：pH 測定の理論と実際，1949.
 - 26) Hill, B.R.: Some properties of serum lactic dehydrogenase. *Cancer Research*, 16 : 460—467, 1956.
 - 27) Rapp, R.D. & Bell, E.R.: Normal values for serum lactic dehydrogenase. *Am. J. Clin. Path.*, 35 : 116—117, 1961.
 - 28) Zimmerman, H.J. & Weistein, H.G.: Lactic dehydrogenase activity in human serum. *J. Lab. Clin. Med.*, 48 : 607—616, 1956.
 - 29) Hill, B.R., Kuff, E.L. & Hogeboom, G.H.: Sedimentation behavior of serum lactic dehydrogenase. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 92 : 430—433, 1956.
 - 30) Vesell, E.S. & Bearn, A.G.: Localization of lactic acid dehydrogenase activity in serum. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 94 : 96—99, 1957.
 - 31) Sayre, F.W. & Hill, B.R.: Fractionation of serum lactic dehydrogenase by salt concentration gradient elution and paper electrophoresis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 96 : 695—697, 1957.
 - 32) Koppel, J.L. & Olwin, J. H.: Dehydrogenase activity of human platets. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 86 : 641—645, 1954.
 - 33) Smith, F.E.: Tetrazolium salt. *Science*, 113 : 751—754, 1951.
 - 34) Kun, E. & Abood, L.G.: Colorimetric estimation of succinic dehydrogenase by TTC. *Science*. 109 : 144—146, 1949.
 - 35) Black, M.M. & Kleiner, I.S.: The use of triphenyltetrazolium chloride for the study of respiration of tissue slices. *Science*, 110 : 660—661, 1949.
 - 36) Black, M.M., Zeifach, B.W. & Speer, F.D.: Tetrazolium salts, a new tool in general

- and experimental pathology. *Am. J. Clin. Path.*, 23 : 332—339, 1953.
- 37) Sugimura, T. & Ono, T.: Further studies on the reduction of TTC by the succinic dehydrogenase complex. *Gann*, 48 : 169—180, 1957.
- 38) Alivisatos, S.G.A. & Denstedt, O.F.: Lactic dehydrogenase and DPN-ase activity of blood. *Science*, 114 : 281—283, 1951.
- 39) Plagemann, P.G.W., Gregory, K.F. & Wróblewski, F.: The electrophoretically distinct forms of mammalian lactic dehydrogenase isozymes. II. Properties and interrelationships of rabbit and human lactic dehydrogenase isozymes. *J.B.C.*, 235 : 2288—2293, 1960.
- 40) Nisselbaum, J.S. & Bodansky, O.: Reactions of human tissue lactic dehydrogenases with antisera to human heart and liver lactic dehydrogenases. *J.B.C.*, 236 : 401—404, 1961.
- 41) Nisselbaum, J.S. & Bodansky, O.: Reactions of lactic dehydrogenase from various rabbit organs with antirabbit muscle lactic dehydrogenase. *J.B.C.*, 234 : 3276—3280, 1959.
-