精巣腫瘍組織における乳酸脱水素酵素活性と 乳酸脱水酵素アイソザイム

榊 原 尚 行
 北海道大学医学部泌尿器科学教室
 (主任: 小柳知彦教授)
 坂 下 茂 夫
 小 柳 知 彦

TOTAL LDH ACTIVITIES AND LDH ISOZYME PATTERNS IN THE TISSUES OF TESTICULAR TUMORS

Naoyuki Sakakibara, Shigeo Sakashita and Tomohiko Koyanagi

Department of Urology, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo, Japan
(Director: Prof. T. Koyanagi)

The total LDH activities and LDH isozymes were measured in 6 normal testicular tissues and 11 seminoma tissues. The total LDH activities of seminoma tissues were 3778.4 ± 3674.7 W.U./mg protein (mean $\pm$ S.D.), significantly higher than those of normal testicular tissues (787.2 ± 502.4 W.U./mg protein) ($p < 0.05$). In normal testicular tissues, 5 isozymes (from LDH1 to 5) and LDHX were detected, but in seminoma tissues only 5 isozymes were detected and LDHX was not detected. In seminoma tissues, compared with normal tissues, LDH1 and LDH2 were elevated. Since it is widely accepted that LDHX appears in primary spermatocytes, these data suggest that the cells of seminoma are composed of less differentiated cells than spermatogonia.

要旨: 正常精巣組織 6 例と精上皮腫組織 11 例の LDH 活性値および LDH アイソザイム分布を測定した。精上皮腫組織の LDH 活性値は $3,778.4 \pm 3,674.7$ W.U./mg. protein (mean $\pm$ S.D., $n=11$) で正常精巣組織の LDH 活性値, 787.2 ± 502.4 W.U./mg. protein (mean $\pm$ S.D., $n=6$) に比して有意に高値であった ($p < .05$)。正常精巣組織には LDH1~LDH5 までの 5 つのアイソザイムと LDHX がみとめられたが, 精上皮腫組織では LDH1~LDH5 までの 5 のアイソザイムのみで LDHX はみられなかった。精上皮腫組織では正常精巣組織に比して LDH1 と LDH2 の 2 つのアイソザイムが上昇していた。LDHX は精巣に第 1 次精母細胞が出現する時期よりみられることより, 精上皮腫は第 1 次精母細胞より未分化な精細胞が癌化したものと考えられた。

緒 言

酵素化学領域では普遍的な酵素の 1 つにあげられる乳酸脱水素酵素 lactate dehydrogenase (以下 LDH と略す) は, 悪性腫瘍患者において血清 LDH 活性が上昇することより, 悪性腫瘍の非特異的マーカーとして臨床に広く用いられている。血清 LDH は電気泳動法で易動度の速いもの (陽極側) から順に, LDH1 から LDH5 までの 5 のアイソザイムがあることが知られている。Blanco ら¹⁾が最初に報告した LDHX は電気泳動法で LDH3 と LDH4 の間に泳動する酵素で, 思春期以降の精巣組織と精液にのみ認められ, それ以外の臓器, 体液中にはみとめられない。このことより LDHX

は精子生成に関与した特異な酵素と考えられ, 男子妊孕能と関連づけた研究が広く行なわれている。

この LDHX と分化した精細胞由来とされている精上皮腫との関連性について詳しい検討はされていない。LDHX と精上皮腫について研究することは精上皮腫の病因について考案する 1 つの手段となると考え, ヒト精上皮腫組織とヒト正常精巣組織を用いて LDH 活性および LDH アイソザイム分布測定を行なった。

対 象

ヒト正常精巣組織およびヒト精上皮腫組織を用いた。

1) 正常精巣組織: 除睾術を施行した前立腺癌症例

5 例（年齢63歳から87歳）の精巣組織と高位除率術を施行した精上皮腫症例（24歳）の正常組織部分の計 6 例を用いた。

2) 精上皮腫組織：高位除率術を施行した精上皮腫患者11症例（年齢21歳から48歳）の腫瘍組織を用いた。
なお組織は測定まで-70℃にて凍結保存とした。

方 法

正常精巣組織および精上皮腫組織は容量比 5 倍量の生食を加えたのち Potter 型 homogenizer で懸濁液を作成し、懸濁液を3,000rpm で遠沈して、その上清の LDH 活性、LDH アイソザイム分布、蛋白定量をそれぞれ測定した。

1) LDH 活性：LDH 活性は NADH に基質緩衝液を加えて LDH 測定液を作成した後、試験管にこの LDH 測定液2ml と組織懸濁液上清0.05ml を加えたときに試験管の内容を層長10mm のセルに移し、分光光度計で340nm の吸光度の減少をみることにより算出した。尚、測定に際しては同一のサンプルについて二度同様の操作をおこないその平均を LDH 活性とした。

2) LDH アイソザイム分布：LDH アイソザイムは寒天ゲルプレートにウルトラマイクロピペットを用いて組織懸濁液上清を塗布し、定電流 (30mA) で泳動時間 1 時間の電気泳動を行なったのち基質緩衝液を加えた発色剤 (LDH isozyme Wako) を寒天ゲルプレート表面に流し込み、37℃遮光孵卵器中で60分反応させた。反応終了後、未反応液をすて脱色固定液(エタノール：水：氷酢酸を14：5：1) に20分間浸漬し未反応色素がなくなるまでゆり動かしながら浸漬させたのち水道水で水洗した。この後、寒天ゲルプレートを乾燥させ、デンシトメーターにかけ LDH アイソザイム分布を測定した。波長は570nm で測定した。

3) 蛋白定量測定：組織懸濁液上清の蛋白定量は牛血清アルブミンを用い標準曲線を作成し、Lowry 法²⁾により測定した。

結 果

1) LDH 活性：正常精巣組織の LDH 活性値は 169.7~1,603.4W.U./mg. protein で、平均値±標準偏差値は (mean±S.D.) 787.2±502.4W.U./mg. protein であった。一方、精上皮腫組織の LDH 活性値は 1,363.7~107,533.0W.U./mg. protein で、mean±S.D.は3,778.4±3,674.7W.U./mg. protein であり、正常精巣組織の LDH 値に比して有意に高値であった (p<.05) (表 1)。

表 1 LDH 活性値

組 織	活 性 値 (W.U./mg. protein)
正常精巣組織 (n= 6)	787.2± 502.4
精 上 皮 腫 (n=11)	3778.4±3674.7

(p<0.05)

表 2 LDH アイソザイム分布

LDH isozyme(%)	1	2	3	X	4	5
正常精巣組織 (n=1)	4.6	15.5	19.7	24.4	27.6	8.2
精 上 皮 腫 (n=2)	39.1	30.2	19.5	0	10.0	1.2

図 1 精上皮腫組織を正常精巣組織の LDH アイソザイム
正常組織にみられる LDHX が精上皮腫組織では消失している。

2) LDH アイソザイム分布：正常精巣組織の LDH アイソザイム分布は 6 例全例、LDH1から LDH5までの 5 のアイソザイムと LDHX の 6 つのアイソザイムが認められたが、精上皮腫組織は11例全例とも LDH1から LDH5までの 5 のアイソザイムのみで LDHX は

認められなかった。このうち正常精巣組織1例と精上皮腫組織2例についてLDHアイソザイム分布をみた。正常精巣組織はLDH1 4.6%, LDH2 15.5%, LDH3 19.7%, LDHX 24.4%, LDH4 27.6%, LDH5 8.2%であった。精上皮腫組織2例の平均は、LDH1 39.1%, LDH2 30.2%, LDH3 19.5%, LDH4 10.0%, LDH5 1.2%でLDHXは認められなかった(表2, 図1)。

考 案

乳酸脱水素酵素アイソザイムXは、1963年Blancoら¹⁾により最初に報告された特異な酵素で、思春期以降の精巣組織と射精液中にのみ見られるとされている。精巣組織においては第一次精母細胞の出現と同時にみられるようになること、精子のLDH活性の100%がLDHXの活性であるともいわれている^{3,4)}ことから精子生成能の指標とされ研究されている。

精上皮腫は発生学的には分化した精細胞の癌化したものと考えられているが、他の精巣 germinal cell tumorにみられるようなAFP, HCGといった特異的マーカーはなく、血清LDH活性が高値となる症例が多いことと一部の症例で血中HCG値が高値となることが知られているのみで精上皮腫に特異的なマーカーはみられず診断および治療上病態の把握に苦慮する場合がある。この精上皮腫の組織レベルにおけるLDH活性値と精子生成に關与しているとされているLDHXの存在の有無についての研究はされていない。

精上皮腫症例の血清LDH活性値がしばしば高値をとることはよく知られているが、今回の検討においても正常精巣組織のLDH活性値が $787.2 \pm 502.4 \text{ W.U./mg. protein (mean} \pm \text{S.D.)}$ であったのに対し精上皮腫組織のLDH活性値は $3,778.4 \pm 3,674.7 \text{ W.U./mg. protein (mean} \pm \text{S.D.)}$ と正常精巣組織のLDH活性値に比して有意に高値を呈した($p < .05$)。このことは腫瘍細胞の解糖能の亢進を示しているものと思われる。また、精上皮腫の腫瘍重量は5~1,500gと幅広い分布を呈したが、腫瘍重量とLDH活性値、また病期とLDH活性値との間には相関は認めなかった。このうち24歳男子の精上皮腫症例の正常部および腫瘍部の組織中のLDH活性値はそれぞれ $567.3 \text{ W.U./mg. protein}$ 、 $3,381.3 \text{ mg. protein}$ で腫瘍部の組織の方が明らかにLDH活性値は高値であった。

LDHアイソザイム分布については内島⁵⁾は正常精巣組織9例を検討し、LDH1 $3.9 \pm 1.5\%$, LDH2 $20.2 \pm 2.6\%$, LDH3 $33.8 \pm 4.3\%$, LDHX $18.7 \pm$

7.3% , LDH4 $20.3 \pm 3.5\%$, LDH5 $2.9 \pm 2.3\%$ (mean $\pm$ S.D.)であったとしている報告と本検討の正常精巣組織のLDHアイソザイム分布はほぼ同様の傾向であった。一方、精上皮腫組織2例のLDHアイソザイム分布はLDH1 39.1%, LDH2 30.2%, LDH3 19.7%, LDH4 10.0%, LDH5 1.2%でLDHXはみられなかった。Zondagら⁶⁾は精巣および卵巣腫瘍症例(精上皮腫9例を含む)の血清LDH活性と血清LDHアイソザイム分布を検討し、総血清LDH活性値の上昇および血清LDH分布においてLDH1のみあるいはLDH1とLDH2が上昇しているものが15例中13例にみられたと報告している。精上皮腫の組織中のLDHアイソザイム分布についての詳しい検討はされていない。本検討においては精上皮腫組織において、総LDH活性値の上昇が認められ、2例と症例数は少ないがLDHアイソザイム分布においてはLDH1およびLDH2が上昇することが示唆された。精巣腫瘍組織においてLDHXがみられないことはHoagら⁷⁾が精巣胎児性癌組織1例のLDHアイソザイム分布を測定し報告している。しかしながら、精上皮腫組織を用いてLDHXの有無について検討された報告はみられない。本検討において精子生成能に關与し、第1次精母細胞出現と同時にみられるようになるLDHXが精上皮腫では消失していた。このことは分化した精母細胞由来とされている精上皮腫の発生源は第1次精母細胞より未分化な段階であろうと推測される。LDHXの消失の機序は不明であるが、精巣腫瘍患者は治療前すでに妊孕能が低下していること⁸⁾、妊孕能が低下しているとされている停留睾丸に腫瘍の発生頻度が高いことなどを考え合わせていくと、LDHXの機能的役割の解明がすすむとともに明らかになっていくものとおもわれる。しかしながら、癌化によりLDHXの電荷性が変化し他のアイソザイムと同じ様な電気易動性となったためにLDHXが消失している様にみえたことも考えられ、さらに詳細な検討が必要とおもわれた。

結 語

正常精巣組織6例、精上皮腫組織11例を用いてLDH活性値およびLDHアイソザイム分布を測定した。

1) LDH活性値は、正常精巣組織では $787.2 \pm 3,674.7 \text{ W.U./mg. protein (mean} \pm \text{S.D., n=6)}$ で、精上皮腫組織では $3,778.4 \pm 3,674.7$ (mean $\pm$ S.D., n=11)であり、精上皮腫組織のLDH活性は正常精巣組織のLDH活性に比して有意に高値であった

($p < .05$).

2) LDH アイソザイム分布は、正常精巣組織では LDH1~LDH5までの5つのアイソザイムと LDHX がみられたが、精上皮腫組織では LDH1~LDH5までの5のアイソザイムのみで LDHX はみられなかった。また精上皮腫組織では LDH1と LDH2のアイソザイムが正常精巣組織に比して上昇していた。

3) 精上皮腫組織において LDHX が消失していることより精上皮腫は第1次精母細胞以前の段階の精細胞の癌化したものと推測された。

文 献

- 1) Blanco, A. and Zinkham, W.H.: Lactate dehydrogenase in human testes. *Science*, 139, 601-602, 1963.
- 2) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
- 3) Clausen, J. and Ovlisen, B.: Lactate dehydrogenase isozymes of human semen. *Biochem. J.*, 97, 513-517, 1965.
- 4) Clausen, J.: Lactate dehydrogenase isozymes of sperm cells and testes. *Biochem. J.*, 111, 207-218, 1969.
- 5) 内島 豊: ヒト射精液中の乳酸脱水素酵素とそのアイソザイム. *日泌尿会誌*, 72, 643-661, 1981.
- 6) Zondag, H.A. and Klein, F.: Clinical applications of lactate dehydrogenase isoenzymes: Alternations in malignancy. *N.Y. Acad. Sci.*, 151, 578, 1968.
- 7) Hoag, G., Amies, D.R. and Colquhoun, B.D.P.: The production of creatine kinase isozyme BB in sera of a patient with prostatic carcinoma and in tumor homogenates. *Clin. Biochem.*, 11, 38-41, 1978.
- 8) 古畑哲彦, 小川勝明, 穂坂正彦, 菅原敏道: 睾丸腫瘍患者の治療後の睾丸機能に関する研究—第1編. 治療前後の妊孕性について—. *日泌尿会誌*, 76, 1022-1088, 1985.

(昭和61年4月5日受付)