—ノ—ト—

(日本化学会誌, 1990, (3), p.331~333)

© 1990 The Chemical Society of Japan

グルタミン酸ナトリウムによる血漿中乳酸脱水素酵素の 冷凍貯蔵中失活の抑制

(1989年9月13日受理)

中島 滋*・田宮 徹**・松本重一郎**・土屋隆英**

1 序 論

臨床検査において、血漿(清)中のLDH活性およびLDHアイソザイム分布を測定し心臓病や肝臓病の診断をすることが近年盛んに行われている¹⁾。しかしながら、LDHは冷凍貯蔵により失活するために、凍結貯蔵した血漿(清)では正確な診断をすることができない²⁾³⁾。

精製されたLDHの冷凍貯蔵中の失活に対し、グリセリンが抑制効果を示すことがChilsonら⁴⁾により報告されている。また、近年、田宮ら⁵⁾および背黒ら⁶⁾⁷⁾によりグルタミン酸ナトリウムにその効果があることが報告された。一方、著者らはグルタミン酸ナトリウム、ショ糖、グリセリンがコイ筋肉中LDHの抽出操作中の失活を抑制すること⁸⁾、およびグルタミン酸ナトリウムがコイ筋肉中LDHの冷凍貯蔵中の失活を抑制すること⁹⁾を報告した。LDHの冷凍貯蔵による失活を抑制する働きのあるグルタミン酸ナトリウムとグリセリンおよびその働きが予測されるショ糖について抑制力を比較した結果、ほぼ同じ抑制効果があった。そこで本研究ではグルタミン酸ナトリウムを用い血漿中LDHの失活抑制効果を検討した。本研究の結果、0.1 mol・dm⁻³相当のグルタミン酸ナトリウムを添加して冷凍貯蔵した血漿ではLDHの失活は起こらず、冷凍貯蔵した血漿も、臨床検査におけるLDH活性測定用として用いることが可能であることが示唆された。

2 試料および実験法

2.1 LDH 試料

LDHはオリエンタル酵母社製のブタ心筋から精製されたH₂型LDH試料を用いた。LDH試料はタンパク質濃度が約0.07 (mg・cm⁻³)になるように様々な溶媒で300倍に希釈し、-40℃のフリーザーで凍結し、所定の期間貯蔵した後、4℃で解凍した。溶媒は、通常LDHの希釈に用いる0.01 mol・dm⁻³ NaClを対照とし、そのほかに、0.1 mol・dm⁻³ グルタミン酸ナトリウム、0.25 mol・dm⁻³ ショ糖、10% グリセリンを用いた。

2.2 血漿試料

10人の女性(19~20歳)から10 cm³ずつ採血し、ヘパリンを用いて凝固防止した後、遠心分離して血漿を得た。各血漿を1 cm³ずつ採取し、混合して血漿試料とした。血漿試料を二等分し、一方に0.1 mol・dm⁻³相当のグルタミン酸ナトリウムを添加した。無添加およびグルタミン酸ナトリウムを添加した血漿試料を-40℃のフリーザーで凍結し、所定の期間貯蔵した後、25℃の恒温槽中で解凍した。

2.3 LDH 活性測定法

LDH試料の活性は、ビルビン酸を基質とし、補酵素としてニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(以下NADHと略記する)を加え、pH 7.4での吸光度(340 nm)差から算出した¹⁰⁾。分光光度計はHITACHI 220 A型を用いた。反応溶液の組成は、10 mmol・dm⁻³ ビルビン酸 0.1 cm³, 2 mmol・dm⁻³ NADH 0.1 cm³, 30 mmol・dm⁻³ リン酸緩衝液 2.7 cm³, 酵素溶液 0.01 cm³ または血漿 0.1 cm³ とした。酵素試料は、1分間のNADHの吸光度の減少が0.05以内になるように0.01 mol・dm⁻³ NaCl溶液で希釈した。酵素溶液および血漿は活性測定の直前に反応溶液に加えた。酵素溶液では比活性値(units・mg⁻¹)、血漿では1 dm³あたりの国際単位(units・dm⁻³)を求めた。比活性値を計算するためのタンパク質濃度は、Lowryの方法¹¹⁾で測定した。

3 結 果

3.1 -40℃貯蔵によるLDHの失活に対する抑制剤の比較

LDHの冷凍貯蔵の失活に対するグルタミン酸ナトリウム、グリセリン、ショ糖の抑制効果を比較した。

冷凍貯蔵前の比活性値(130 units・mg⁻¹)を100%としたとき

聖カタリナ女子大学社会福祉学部, 799-24 北条市北条
** 上智大学理工学部化学科, 102 東京都千代田区紀尾井町

1) 屋形 稔, 杉田 収, "酵素の検査診断学", 宇宙堂八木書店(1984) p.61.

2) H. H. Kreutzer, W. H. S. Fennis, *Clin. Chim. Acta*, **9**, 64(1963).

3) D. D. Michie, R. W. Booth, M. Conley, H. J. McGuire, *Am. J. Clin. Pathol.*, **52**, 329(1969).

4) O. P. Chilson, L. A. Costello, N. O. Kaplan, *Fed. Pro.*, **24**, s 55(1965).

5) T. Tamiya, N. Okahashi, R. Sakuma, T. Aoyama, T. Akahane, J. J. Matsumoto, *Cryobiology*, **22**, 446(1985).

6) K. Seguro, T. Tamiya, T. Tsuchiya, J. J. Matsumoto, *ibid.*, **26**, 154(1989).

7) K. Seguro, T. Tamiya, T. Tsuchiya, J. J. Matsumoto, *Cryobiology*, In Press.

8) S. Nakajima, T. Tamiya, A. Akahane, J. J. Matsumoto, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **49**, 1265(1983).

9) S. Nakajima, T. Tamiya, T. Akahane, T. Tsuchiya, J. J. Matsumoto, *ibid.*, **55**, 1119(1989).

10) F. Kubowitz, P. Ott, *Biochem. Z.*, **314**, 94(1942).

11) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951).

Fig. 1 Comparison of preventive effects of additives on inactivation of LDH during frozen storage (-40°C)

LDH was diluted to 300 times with various media (protein concentration was $0.07\text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$).

The symbols in figure specify the used diluting media as follows: ○, $0.01\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaCl; ■, $0.1\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ sodium glutamate; ▲, $0.25\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ sucrose; ▼, 10% glycerol.

LDH samples were frozen at -40°C .

After stored various periods, LDH samples were thawed at 4°C .

Each sample was diluted prior to determining the activity with $0.01\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaCl.

The activity was determined by the absorbance change measurement at 340 nm for 1 minute at 25°C according to Kubowitz's method¹⁰⁾.

の冷凍貯蔵後の各試料の残存活性を図1に示した。対照として用いた $0.01\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ NaCl を溶媒とした LDH 試料とくらべると、 $0.1\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ グルタミン酸ナトリウム、 $0.25\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ シュ糖、10% グリセリンを溶媒とした LDH 試料の残存活性はいずれも高く、ほぼ同程度の抑制効果が認められた。

3.2 -40°C 貯蔵によるヒト血漿中 LDH の失活に対するグルタミン酸ナトリウムの抑制効果

LDH 試料の冷凍貯蔵による失活を抑制するグルタミン酸ナトリウム、グリセリン、シュ糖のうち、最も低濃度で効果のあったグルタミン酸ナトリウムを用い、血漿中 LDH の冷凍貯蔵中の失活の抑制を試みた。

血漿試料を -40°C のフリーザーで凍結し、8日目に 25°C の恒温槽中で解凍して LDH 活性を測定した。無添加の血漿(対照)

Table 1 Effect of sodium glutamate on the inactivation of LDH contained in human plasma during frozen storage

Storage period (day)	LDH activity ($\text{units}\cdot\text{dm}^{-3}$)	
	Sample A ^{a)}	Sample B ^{b)}
0	29	29
8	26	29
10	21 ^{c)}	29 ^{c)}

Samples were stored at -40°C during storage period and thawed at 25°C .

a) Human plasma (Obtained from 10 women).

b) Human plasma contained sodium glutamate ($0.1\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$).

c) After activity measurement at 8th day, samples refroze at -40°C .

の場合、血漿中 LDH の活性は、貯蔵前の 89% に減少したが、 $0.1\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ 相当のグルタミン酸ナトリウムを添加した血漿の場合は、血漿中 LDH の活性は減少しなかった。また、活性測定後、再凍結して、10日目に解凍し活性を測定した。その結果、対照の場合、血漿中 LDH の活性は、初日の 72% にまで減少していた。一方、 $0.1\text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ 相当のグルタミン酸ナトリウムを添加した血漿の場合、血漿中 LDH の活性はまったく減少せず、初日の値と同じであった。したがって、血漿中 LDH の冷凍貯蔵および凍結解凍のくり返しによる失活は、グルタミン酸ナトリウムの添加により抑制でき、臨床検査において凍結貯蔵した血漿でも LDH 活性測定用の試料として用いることができることが示された。

4 考 察

血漿にグルタミン酸ナトリウムを添加すると、冷凍貯蔵および凍結と解凍のくり返しによる LDH の失活は抑制された。臨床検査において、血漿(清)中 LDH 活性の測定は、心臓病や肝臓病の診断を行うための重要な測定項目の一つである¹⁾。しかしながら、LDH は冷凍貯蔵により失活してしまうので、未凍結の血漿(清)を用いて測定しないと正確な診断を下すことができない²⁾³⁾。自動分析機などの普及により、迅速な測定ができるようになってきたものの、採血後一週間位は血漿(清)を貯蔵できることが望ましい。そのためには、冷凍貯蔵する必要がある。グルタミン酸ナトリウムを添加することにより冷凍貯蔵した血漿でも LDH 活性測定用の試料として用いることができるので、臨床検査における血漿(清)中 LDH 活性測定の利用価値はますます高まるものと思われる。

Prevention of Freeze Inactivation of Plasma Lactate Dehydrogenase with Sodium Glutamate

Shigeru NAKAJIMA*, Toru TAMIYA**, Juichiro J. MATSUMOTO**
and Takahide TSUCHIYA**

St. Catherine Women's College ; Hojo-shi 799-24 Japan

*** Department of Chemistry, Sophia University ; Kioi, Chiyoda-ku,
Tokyo 102 Japan*

Lactate dehydrogenase (LDH) activity in human plasma provides useful information for diagnoses of liver and heart diseases. However, LDH in human plasma inactivates during frozen storage. Therefore it is important to use fresh plasma for diagnosis. Sodium glutamate and glycerol are known to exert a cryoprotective effect on purified LDH. These cryoprotectants and sucrose also prevent the inactivation of LDH during extraction and purification processes. This paper deals with the effects of sodium glutamate to prevent the inactivation of LDH in human plasma during frozen storage. Sodium glutamate, glycerol and sucrose were almost equally successful in preventing the inactivation of purified LDH during frozen storage. Sodium glutamate prevented the inactivation of LDH in human plasma during frozen storage at -40°C and during cyclic freeze-thawing. Thus, for diagnosis of liver or heart diseases, it will be possible to store human plasma in a freezer after the addition of sodium glutamate.