〔原 著〕

体液 LDH アイソザイムに関する研究 (I)*

寒天電気泳動法による LDH 分画測定法

吉 田 光 孝** 石 川 和 子*** 北 村 元 仕***

Summary

There have been difficulties in separating first and second fractions near the cathode in analysing serum lactate dehydrogenase (LDH) isozymes using conventional agar-gel electrophoretic methods. In order to obtain clear separation as well as reliable pattern of LDH isozymes, studies were performed by means of agar gel electrophoresis followed by the staining using nitroblue tetrazolium. The method for routine electrophoretic analysis of LDH isozymes for various body fluids or extracts was established.

1. Clear separation of LDH isozyme patterns could be obtained by improved cooling device as well as by the choice of proper electrophoretic and staining conditions.
2. It was found that the process for preparation of agar plate was important in order to obtain reproducible results.
3. Proper quantity of sample to use for LDH isozyme studies was examined using filter paper method by Ogita.
4. Ressler's staining condition was found to be most sensitive and reliable for our method.

はじめに

乳酸脱水素酵素 (LDH) は電気泳動によって通常 5 種のアイソザイムに分画され、そのパターンには臓器特異性のあることが知られている。したがってある病変によって組織に障害が起ると血流中に酵素の逸脱が起り、血清に特徴のある LDH パターンが認められるのでその診断的価値も注目されるようになってきた。しかし LDH アイソザイムはその測定条件によってかなり大幅な成績のずれを生ずるので、臨床的意義を論ずる前提に測定法の標準化が重要である事は論をまたない。電気泳動法による LDH アイソザイムの測定は他の方法に較べ手技が簡単で、比較的再現性が良く、微量で測定できる長所をもっているが、用いる支持体例えば紙類、デン粉、デン粉ゲル、ポリアクリルアミドゲル、寒天ゲル等その種類によっても測定条件や手技がかなり異なり、日常臨床検査法としては寒天ゲル泳動法が適切であると思われる。寒天ゲルを支持体とする方法は初め Wieme¹⁾ によって開発され、簡便な検出法である nitroblue tetrazolium 染色法も Van der Helm²⁾ によって導入されたが、従来の測定条件ではとくに低単位血清で陽極に近い第 1 分画と第 2 分画附近の分離が悪く、正しい分画比を求めることが

困難であった。われわれはこの解決を目標として基礎的検討を行ない、とくに泳動条件、検出条件を整えることにより鮮明な分画像が得られる測定法を組立てたので報告する。

実験材料

器 具

- 1) 電気泳動装置^{*1}: 図 1 に示したもの。
- 2) 整流器: 0~500V, 0~100mA 容量
- 3) 濃度計: ATAGO OZUMOR 7 型, 570m μ フィルター, スリット 0.5 $\times$ 5mm
- 4) フラン器: 37°C
- 5) 冷蔵庫 (4°C)
- 6) シャーレ: 内径 15cm, 深さ 3cm, 寒天板用
- 7) スライドグラス: 25 $\times$ 76 $\times$ 1mm, 寒天板用
- 8) マイクロピペット: キルク型 8 μ l, 試料添加用

試 薬

- 1) ベロナール-HCl 緩衝液, pH 8.4, $\mu=0.041$ ベロナールソーダ 8.5g を水にとかし, 1N-HCl を約 11.5ml 加えて pH を調整して 1l とする。
- 2) 寒天粉末: Difco 社 Special Noble

*1 富士理研から発売されている。

* Studies on Lactate Dehydrogenase Isozymes of Body Fluids (I), An Improved Method of Agar-gel Electrophoresis on Microscope Slides

** Terutaka Yoshida, 順天堂大学医学部生化学教室

*** Kazuko Ishikawa, Motoshi Kitamura, 虎の門病院生化学科

- 3) 石油エーテル (1 級)
- 4) Tris-HCl 緩衝液, pH 7.4: トリスヒドロキシメチルアミノメタン 7.2 g を水にとかし, 1N-HCl を約 50 ml 加え pH を調整し, 1 l とする。
- 5) 0.4 g/dl KCN: 4) の緩衝液にとかし。(冷所保存)
- 6) 2M 乳酸ソーダ: 市販品 (約 60% の DL 型, 特級) 約 30 ml を水にとかし 100 ml とする。
- 7) 20 mg/dl phenazine methosulfate: 4) の緩衝液にとかし。(冷暗所保存)
- 8) 基質染色液³⁾: 使用直前にその都度調製する。
トリス緩衝液 56 ml を褐色瓶にとり, シアン化カリ液 5 ml, 乳酸ソーダ 4 ml, phenazine methosulfate 5 ml を順次混和し, NAD⁺ 40 mg, Nitroblue tetrazolium⁸⁾ 30 mg を加えてとかし。
- 9) 固定脱色液²⁾: エタノール⁴⁾・水・氷酢酸⁴⁾ を 14: 5: 1 の割合に混和したもの。

実験方法

1. 寒天板の作製⁴⁾

- 1) 寒天粉末 0.8 g にペロナール緩衝液 100 ml の割合で混ぜ, 沸とう水浴中で完全に澄明液化するまで加熱する (約 40 分)。
- 2) つぎに比較的水平と思われる机上に内径 15 cm のシャーレを並べ約 50 ml の液化寒天を注入, 放置して固める。
- 3) その上に清浄にしたスライドグラスを約 3 mm 間隔を保って並べる。
- 4) さらにスライドグラス上に約 50°C になった液化寒天を約 40 ml⁵⁾ 宛重層し, 気泡があればつぶし, 蓋をわずかにずらし室温約 25°C 附近に静置して固める⁶⁾。

2. 寒天板への試料の添加

- 1) シャーレの中に固めた寒天板をナイフで切り取り, 黒い紙上にのせる。
 - 2) 冷蔵庫内に寒天板を約 3 分間程放置し, 表面をわずかに乾燥させたのち, 1.5×5 mm の汙紙片に試料をしみこませて, 寒天板の中央位置にのせ, 更に試料の活性値に応じて量を調節して汙紙上に追加する。血清量にして約 4~30 μ l の範囲となる。スライドグラス 1 枚に 2 試料添加できるので合計 8 試料を同時に泳動できる。
 - 3) 試料を添加したあと, 充分に寒天層に試料がしみこむように約 20 分間冷蔵庫内に放置する。
 - 4) 汙紙片をとり除き表面が乾いたら泳動に移る。
- ### 3. 電気泳動
- 1) 寒天板を泳動槽に入れ, 寒天板を上向きにして

設置する。

- 2) 寒天板と槽内寒天層を寒天ブリッジで連結し, 槽内寒天層上にも緩衝液を重層する。
- 3) 予め冷却した石油エーテルを緩衝液面より, やや高めになる位に注入する。
- 4) 冷却槽に氷水を入れ, 石油エーテル上に設置し, 液面の高さおよび温度を調整する。
- 5) 数分後, 液面の高さ調整用のコックを閉じ通電する。
- 6) 通電条件は 5.6 mA/cm の定電流方式とし, スライド 4 枚で 60 mA, 約 100 V, 通電時間は約 60 分。

4. 反応染色

- 1) 泳動終了後直ちに, 使用直前に調製した染色液⁷⁾ 70 ml に浸す。
- 2) フラン器中で 60 分間反応させる。

5. 固定脱色

染色後直ちに固定脱色液約 100 ml に 20 分間浸す (室温)。更に液をとりかえ 未反応色素の黄色調がなくなるまで浸す (約 40 分)。

6. 水洗

緩衝液の塩類や脱色液を除くため約 100 ml の水で 2 回 30 分間宛浸して水洗する。

7. 乾燥

水洗時, 寒天層はスライドグラスより離れるから, 予め湿潤セロファンで包んだガラス板上にのせかえ, 湿度を均一に保つために水を入れたシャーレをフラン器中に入れ, その中で乾燥させる。

8. デンシトメトリー

各試料のパターンを切りとりデンシトメーター 570 m μ 附近の波長を用いて分画比を測定する。

検討並びに考察

1. 寒天板の作り方

1) 寒天の品質

寒天は Agarose と Agaropectin から成っており, Agaropectin が多いと荷電の影響が起りやすいと云われているので⁸⁾, Agaropectin の少ない品質を対象とした。そこで Agarose 成分が多いといわれる Difco 社の Bact Agar

*2 Sigma 社製品。0°C 以下保存を要する。

*3 Sigma, ドータイト社製品のものが使用できる。

*4 一級品でよい。

*5 寒天板層の厚さは約 1.5 mm となる。約 1 週間は使用できる。

*6 寒天ブリッジ用として約 50 mm 重層のものを必要に応じて作る。

*7 内容積 9×15.5×5 (深さ) 位の遮光性の容器が必要。

と Special Noble を比較したが Special Noble の方が分離能においてすぐれていることを認めた。

2) 寒天の濃度

泳動に用いる寒天濃度は一般に高濃度になると試料の移動速度が小となり、低濃度になると移動速度が増すが、ここでは試料の各分画の分離度が問題になる。分離度は試料の種類や共存成分によって当然異なると考えられるが、人血清、臓器ホモジェネートを試料として、それぞれ 0.5 g/dl, 1.0 g/dl, および 1.5 g/dl の寒天板によって泳動を行ない、各分画の分離を観察したところ、1 g/dl のものが最も分離が良好であった。従って煮沸によって液量の減ることを考慮し、Wieme 等が用いているように寒天 0.8 g に 100 ml の緩衝液を混合することにした。

3) 寒天の液化および固化の条件

1) 寒天の液化

寒天の液化時間は品質、濃度と煮沸条件によって影響をうけると考えられるが、我々の条件では澄清液化するには沸とう水浴中で約 30 分を必要とした。液化してからあまり長く煮沸していると濃縮して濃度が変わるばかりでなく、分離度に影響を及ぼし、分離不良、分離像のむらなどを起こす。したがって我々は煮沸時間を 40 分と規定した。

2) 寒天の固化

液化した寒天をゲル化して寒天層を作るときの温度を 4°C の冷蔵庫、25°C の低温恒温器、37°C のフラン器に入れて比較してみると、25°C の低温恒温器のものが最も分離がよく再現性も良いので 25°C で固める条件とした。また 25°C の恒温器と 25°±5°C の室温で行なう条件とでは殆んど差がみられないので 25°±5°C を許容範囲と考えた。上記のように寒天の液化条件、固化条件によっても分離度は異なるので、LDH アイソザイムの分離は単に泳動条件によってのみ左右されるだけでなく、ゲルの構造が関与していると考えられた。

2. 試料の添加法と添加量

試料の添加法には溝をつくる方法⁶⁾と試料をよく吸収するようなものを寒天層の定位置にのせる方法⁶⁾がある。前者は比較的多量の試料を一度に添加できる長所があるが溝の作り方で泳動像に影響を与えやすく、溝と分画が少しでも重なると乾燥時に溝がゆがみやすいため分離像がゆがんだりする原因ともなり、デンストメトリーの際の分画比に影響しやすい難点がある。一方寒天層にしみこませるものには濾紙類や糸類などをのせる方法がある。^{5,6)} なかでも濾紙をのせる方法は試料を活性値に応じ、しみこませながら添加するので低単位活性値の試料の場合は多少時間がかかるが、均一で確実な zymo-

gram を作ることができる点がすぐれている。即ちデンストメトリーの際に最も重要な要素である一様性のある zymogram が得られる。したがって我々は少し厚手の濾紙である東洋濾紙 No. 2 の 1.5×5 mm のものを用いた。実際の添加法は実施にのべたが予め試料をつけてから寒天層にのせるのは寒天層上の水分の吸収を防ぐためである。

3. 泳動条件の検討

1) 通電条件と温度

一般に電位勾配が低い場合は泳動時間が長びくため拡散が起りやすく、とくに陽極からの第 1, 第 2 分画の分離像が不鮮明になる傾向がみられる。我々は電位勾配が 13~15 V/cm, 電流が 5.5~6.0 mA/cm となるような負荷電圧にすることによって拡散を最小限度におさえ鮮明な酵素活性の分離像を得ることができた。理論的にはこのように電位勾配をあげるほど泳動時間は短縮され分離像は鮮明になる⁶⁾ 筈であるが、二次的に発生するジュール熱のため温度の上昇が局部的に起ってくる。したがってジュール熱の除去を行なわない条件で泳動を行なうとこえって分離像は悪くなり、泳動像のみだれが観察される。ここにジュール熱をとり除く工夫が必要になってくる。ジュール熱の発生をおさえるために緩衝液のイオン強度を低くすればよいわけであるが、そうすると泳動像が不鮮明になるからイオン強度をある程度低めに ($\mu=0.04$) 保ちながら発生するジュール熱を除去することを考えた。また LDH の分画の中には比較的熱に弱い分画があることが指摘されており、⁷⁻⁹⁾ その変質を十分に防ぐためにも適切な低温を保つことが大切である。我々の用いた方式は、冷媒に Wieme 等の石油エーテルを採用し、冷媒が常時冷やされるように上部から氷水の入った冷却槽を設置した。(図 1)

このように附属冷却槽を取付けることによって試料を添加した寒天層の附近の温度を 5~15°C に保つことができる。但しあまり低温に近づけると緩衝液やゲルが部分的に凍ったり、通電に時間がかかる結果となるので 10°C 前後で通電し泳動させるのが適切であると思われる。また電位勾配は 13~15 V/cm が適当であるが、通電方式としては定電流方式を用いた方が槽内寒天の取替え等の影響を少なくすることができ、通電条件を一定にすることができるので、15 V/cm に相当する 5.6 mA/cm の条件即ちスライド 4 板で 60 mA, 約 100 V となる条件で通電を行なうことにした。通電時間は血清試料の場合 60~70 分が適当である。

4. 染色条件の設定

1) 検出方法の選択

寒天ゲルで分画された LDH を検出する方法には大別

図1 泳動装置の構造

- 1 支持体 (寒天)
- 2 寒天ブリッジ
- 3 //
- 4 スライド・ガラス
- 5 寒剤入れ (特型冷却槽)
- 6 冷 媒
- 7 緩 衝 液
- 8 寒 剤 (水)
- 9 温 度 計 (冷媒用)
- 10 端 子
- 11 冷媒入出口
- 12 液圧調整及び緩衝液の排出管
- 13 (+) (-) 絶縁仕切
- 14 白金電極

して紫外部測定法と tetrazolium 還元による発色法があげられる。紫外部法は分画を行なった寒天ゲルプレート

の上に還元型 NAD, 緩衝剤, ビルビン酸ナトリウムを加えたもう1枚の寒天ゲルのプレートを重ねて30分間放置して酵素反応を起こさせ, スリットを通して順次 340 mμ における吸光度を測定する方法であり, tetrazolium 発色法は次式に見られるように LDH 反応をおこさせ, 乳酸から離脱した水素を phenazine methosulfate (PMS) に渡すことによって迅速に tetrazolium 塩を還元して発色させる方法である。

LDH

この発色法は初め Dewey¹⁰⁾ らがデン粉ゲル上の LDH の証明のために Nitroblue tetrazolium (NBT) を応用したが, のち同様な方式を Van der Helm が寒天上の LDH の検出に導入した²⁾。NBT は neotetrazolium の還元のように嫌気的条件を必要とせず, また還元によって生じたフォルマザンが空気によって再酸化されない¹¹⁾ 点や紫外部法に較べ簡便である特長をもっていることなどから NBT 発色法を用いることにした。

2) 検出感度と染色液の安定性

NBT 発色法にはいくつかの方法があり, 感度, 基質染色液の安定性等が異なることを知ったので, その主なものについて比較検討を行なってみた。Van der Helm²⁾, Ressler³⁾, Yakulis¹²⁾ 等の処方にしたがって染色液を作り, Veronal buffer pH 8.4, μ=0.05 で泳動を行なった同一試料について1時間染色してみると, 染色性の感度は図2にみられるように Ressler > Yakulis > Van der Helm の順で組成により大巾の染色能の違いが明らかで

図2 反応染色液の比較 (1時間後)

あった。また染色液の安定性につき染色液の黄色から緑色に変わる色調の変化と不溶性色素の析出を指標として定性的に観察したが Ressler > Van der Helm > Yakulis の順で安定性があり、Yakulis は 1 時間後すでに不溶性色素の析出が著しかった。しらべた 3 種の染色液の組成は、基質(乳酸)および NBT には大差ないが、NAD および Phenazine methosulphate 濃度に大巾な差があり、Ressler の処方をもっとも至適条件に近いことが判明した。

5. 定量性について

アイソザイムで分画比を論ずる際には各分画の酵素量と染色度が比例関係にあることが前提となる。この条件をみたすためには、まず酵素反応の条件を決め、染色反応の直線性、デンストメトリーでできる許容範囲を求めればよい。酵素反応は酵素量と時間、温度によって反応条件が変わるので、温度を生体温度と同じ 37°C とし、反応時間は理想的には初速度をみるべきであるが、日常臨床検査としては、簡便な色素による染色を利用する事が実用的である。しかしこの場合、短時間では染色がうすく再現性がえられないので、デンストメーターで充分測定できる染色時間として 60 分を採用した。温度を 37°C、反応時間を 60 分として、500~1200 単位をもつ各種血清について血清量(酵素量)を変え、各々についてアイソザイムのパターンを求めデンストメーターにて酵素量と積算数との直線性を調べた。(図 3) また一方デンストメーター自身の定量性の検定は電気泳動学会の検定法¹³⁾

に基づき吸光度と積算数が直線性をもつ範囲、即ち積算数 20~170 (吸光度目盛にして 0.1~1.2) を決め上記 Beer の法則に従う範囲とデンストメーター 定量範囲の両方の条件を満足する範囲を求めた。図 3 に例示したように、本法の条件では各分画とも 5~10 単位/ml (Hill 変法単位: $\Delta E \times 1,000/30 \text{ min}/0.01 \text{ ml}$) の範囲で定量性が保持されていることが推定されたので、試料は初めに LDH 総活性値を測定し、活性値がこの条件をみたすように添加血清量を加減すべきことが結論される。添付量はもちろん各分画の構成比によって左右され、また汚紙から寒天層への移行の割合も問題であるから、これらを考慮して定められなければならない。表 1 は試料の総活性値と添付量の関係を示したものである。低活性値の試

表 1 試料の総活性値と血清添付量

総 LDH 活性値	血清添付量
200 単位以下	~ 30 μl
200 ~ 400	30 ~ 20
400 ~ 800	20 ~ 10
800 ~ 1000	10 ~ 8
1000 ~ 2000	8 ~ 4

料の場合 30 μl 以上を短小の汚紙片を通じて添付することは技術的に煩雑である。この点については、今後 LDH の変質なく試料を濃縮する技術を工夫導入すべきであろう。

ま と め

1. 寒天泳動において従来の条件では、とくに低単位の血清で陽極からの第 1 分画と第 2 分画附近の分離が困難であったが、主として冷却部を改良し、測定条件を整えることにより鮮明な分画像が得られるようになった。
2. 寒天板の作り方では寒天の品質および液化や固化させる条件によって分画される状態が異なることがわかった。
3. 試料の添加法は汚紙片を用いる荻田の方法に準じたが、更に定量性をもたせるため、各々 LDH 活性値に対する試料の添加量を検討した。
4. この方法における反応染色液では Ressler に基づく処方が感度および安定性にすぐれていることがわかった。

以上の検討の結果、各種の体液や抽出液に応用でき、各分画の分離が良好で日常検査法としての条件をそなえた分画測定法を組立てた。

図 3 試料添加定量性の検討
(LDH 活性 708 単位血清, 第 4・第 5 分画省略)

終りに、本研究について御指導を賜った関根隆光教授に深謝する。

この論文の要旨は日本臨床病理学会，第11回総会（昭和39年11月，東京）において発表した。

文 献

- 1) Wieme, R. J. : Clin. Chim. Acta **4**, 317 (1959)
- 2) Van der Helm, H. J. : Clin. Chim. Acta **7**, 124 (1962)
- 3) Ressler, N., Joseph, R. and Schulz, J. : J. Lab. and clin. Med. **60**, 349 (1962)
- 4) 柴田 進, 井内岩夫 : 最新医学 **15**, 2567 (1962)
- 5) 萩田善一 : 核と細胞質 No. 5, 7 (1963)
- 6) 古川秀男, 萩田善一 : 化学 **18**, 1 (1963)
- 7) Wroblewski, F. : Proceedings of the second international symposium on enzymes in clinical chemistry. Ghent, Belgium, 1961 (Enzymes of clinical chemistry p-385)
- 8) Kamarýt, J. and Zázvorka, Z. : Science tools **10**, 21 (1963) (Sweden L. K. B instrument journal)
- 9) Plagemann, P. G. W., Gregory, K. F., and Wroblewski, F. : Biochem. Zeit. **334**, 37 (1961)
- 10) Dewey, M. M. and Conklin, J. L. : Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **105**, 492 (1960)
- 11) Lison, L. 今泉 正訳 : 組織化学および細胞化学増訂版 p-242 (1960) 白水社
- 12) Yakulis, V. J., Gibson, C. W. and Heller, P. : Am. J. clin. Path. **38**, 378 (1962)
- 13) 鳥尾和男 : 電気泳動実験法 p-125, 137 (1963) 文光堂

No. G-690A

エルマ寒天電気泳動装置

AE-3

G-690 B-b 電源装置V型

G-690 B-a 泳動キャビネット

濾紙電気泳動に比べ本器による寒天電気泳動装置は次の長所があげられる

- 1) 比較的低電圧 (150V位) 短時間 (30~60分) で分離が出来ること。
- 2) 寒天ゲル自体が濾紙と比べて電氣的抵抗が少なくて相俟って本器では電極槽と寒天膜との接続に寒天を用いるために、この部分の電圧降下が少なく有効電圧の利得が大きいこと。
- 3) 泳動中の寒天が熱により悪影響を及ぼさないように冷却剤 (石油エーテル) を用いられること。
- 4) Wiliam-Graber の創始した免疫泳動法である電気泳動により、成分分割をさせた後溝へ試料に対する抗血清を入れて自然拡散させると翌日には試料の各成分に対応する、弧状の白濁帯を生じ、試料中の成分数、異常成分不純物などを容易に検出出来るのである。又逆に既知試料を用いて血清中の抗体の否を検知する方法も有力な応用法である。

発売元 エルマ光学株式会社

東京都千代田区神田鍛冶町2の4
電話 東京 256局 0911 代表