〔報 告〕

LDH isozyme 測定法における新しいセルロース・
アセテート膜 (T-02) とセロゲルとの比較検討

内山克己・嶋山泰文・須藤加代子・井川幸雄

はじめに

血清 Lactate dehydrogenase (LDH: EC 1.1.1.27) isozyme の測定は、損傷臓器の推定などにきわめて有用であり日常検査として広く用いられている。測定法はイオン交換クロマトグラフィ法^{1,2)}や免疫化学的方法^{3,4)}も知られているが、現在セルロース・アセテート膜 (セ・ア膜) を支持体とした電気泳動法が広く使われている。この中で、セロゲルを支持体とした LDH isozyme の測定法については、1966 年 Warburton and Waddecar⁵⁾ および 1970 年塩谷ら⁶⁾ によって検討された。

現在、セ・ア膜は数多く市販されているが、膜の種類によって試料の塗布位置が異なり泳動像にも特色ある変化がみられるため、分画値に相違がみられ問題となっている。今回、電気浸透現象が小さいとされる新しいセ・ア膜 T-02 (富士写真フイルム社) を支持体とした LDH isozyme の測定について、セロゲルを用いた方法と比較し検討した。

方 法

1. 支持体

① T-02 (富士写真フイルム社試作膜), 5×7 cm に切断して使用した。

② セロゲル (Chemetron, Milano, 生化学工業社扱い) 5×6 cm

2. 電気泳動法

T-02 はセロゲルと同様に泳動用緩衝液に浸した後、試料血清を塗布した。塗布位置は、T-02 では陰極側より

り 1.5 cm, セロゲルでは陰極側より 2 cm とし塗布量は原則として 1 μ l/cm とした。通電は、0.8 mA/cm とし 60 分泳動した。泳動用緩衝液はペロナール (pH 8.6, μ =0.06) を用いた。

3. 染色, 脱色

染色法は、塩谷ら⁶⁾の方法を用いた。染色時間は、37℃ のふ卵器の中で 30 分とした。染色終了後、両支持体とも 1% 酢酸液に入れ 30 分脱色した。脱色後、デンストメーター (Clini Scan: ヘレナ社製) にかけて LDH isozyme の分画値を求めた。

4. LDH 活性測定

ピルビン酸を基質, NADH (β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Reduced Form) を補酵素とした Wroblewski and LaDve⁷⁾の方法で, LKB 8600 (LKB 社製) を用いて 37℃ 340 nm で測定した (正常域: 282-498 U/l)。

結 果

1. 直線性

1 型および 5 型の LDH isozyme (Sigma 社製) を用いて 1 μ l/cm を塗布量とした活性染色の希釈直線性を検討した。Fig. 1 に示したごとく 1 型にては、セロゲルが 1,317 U/l, T-02 が 623 U/l まで直線性が得られた。また、5 型にては、セロゲルが 1,092 U/l, T-02 が 347 U/l まで直線性が得られ両支持体に差がみられた。

2. LDH 活性値と塗布量

LDH 1, 2 型の高い血清と 5 型の高い血清を混合して作製した血清 (1,501 U/l) を 5 段階 (1,501, 1,188,

Comparison between new cellulose acetate membrane (T-02) and cellogel on the method for lactate dehydrogenase isozyme analysis.

Katsumi Uchiyama, Yasufumi Shigiyama, Kayoko Sudo, Sachio Ikawa; 東京慈恵会医科大学臨床検査医学教室

Correspondence address: Katsumi Uchiyama, Department of Laboratory Medicine, Jikei University School of Medicine, Nishi-shinbashi, Minato-ku, Tokyo 105, Japan.

(受付 1988 年 9 月 14 日, 受理 1989 年 4 月 3 日)

Fig. 1. Linearity.

○: Cellogel, ●: T-02

638, 317, 168 U/l) に希釈し, それぞれの血清を両支持体に $1 \mu\text{l}/\text{cm}$ ずつ塗布して LDH isozyme 分画値の変化を調べた. 結果を Table 1 に示した. 活性が 1,501–638 U/l の血清では各分画値ともほぼ同一であったが, 317–168 U/l の血清では両支持体とも各分画値にばらつきがみられた. そこで 638 U/l, 317 U/l, 168 U/l の3種の血清については, 塗布量を $1 \mu\text{l}/\text{cm}$ から $3 \mu\text{l}/\text{cm}$ に変え同様に調べ, Table 1 に示した. その結果, T-02の方は $1 \mu\text{l}/\text{cm}$ の塗布量である 1,501 U/l, 1,188 U/l の血清の分画値に近似し, ばらつきがみられなくなった. しかし, セロゲルの方は $3 \mu\text{l}/\text{cm}$ に変えても各分画値にばらつきがみられた.

3. 同時再現性, 日差再現性

LDH isozyme のコントロール血清 (オーソ・ダイアグノステック・システムズ社) を用いて 10 回同時に泳動し, 同時再現性について検討した. 結果を Table 2 a) に示した. T-02 および () 内に示すセロゲルの各 isozyme 分画値における変動係数は, それぞれ 1 型 4.87% (7.98%), 2 型 3.47% (7.02%), 3 型 2.21% (13.02%), 4 型 11.59% (31.26%), 5 型 7.65% (14.33%) であり, いずれも T-02 のほうが良好であった. また, 同じコントロール血清を用いて 7 日間連続して泳動し, 日差再現性の結果について Table 2 b) に示した. 同じく各 isozyme 分画値における変動係数は, 1 型 6.18%

Table 1. Relation between LDH activity and applied amount on each membranes.

a) Cellogel

	Applied amount (μ l/cm)	LDH activity (U/l)	LDH isozyme (%)				
			1501	1188	638	317	168
LDH 1	1		30.3	32.5	34.8	32.9	34.7
	3				35.4	37.1	39.9
LDH 2	1		26.9	27.8	29.0	26.9	29.9
	3				26.8	23.9	29.9
LDH 3	1		8.3	7.0	6.8	7.2	10.4
	3				6.5	4.2	4.5
LDH 4	1		3.2	2.9	2.3	3.5	4.0
	3				2.7	2.4	1.3
LDH 5	1		31.3	29.8	27.1	29.4	21.1
	3				28.6	32.4	24.3

b) T-02

	Applied amount (μ l/cm)	LDH activity (U/l)	LDH isozyme (%)				
			1501	1188	638	317	168
LDH 1	1		25.8	25.7	25.6	21.6	17.8
	3				25.4	25.4	24.3
LDH 2	1		26.9	25.6	23.9	20.9	21.5
	3				25.7	23.5	22.0
LDH 3	1		11.0	10.3	9.4	15.8	13.7
	3				10.4	9.6	12.1
LDH 4	1		4.9	4.8	5.6	9.2	10.8
	3				5.8	6.5	7.4
LDH 5	1		31.4	33.7	35.5	32.5	36.1
	3				32.7	34.9	34.1

(2.66%), 2型 3.38% (4.16%), 3型 4.91% (14.95%), 4型 14.29% (15.95%), 5型 10.50% (13.66%) であり, 1型以外はすべてセロゲルに比較し T-02 のほうが良好であった。

4. 共存物質の影響

血清中の共存物質であるヘモグロビン, ビリルビン, カイロミクロンの影響について, それぞれ濃度を変えて検討した。結果を Fig. 2 に示した。ヘモグロビンは, 精製水に血球を加え作製した溶血液を 5'-AMP-Sepharose (Pharmacia 社製) に通して LDH を除去させたものを用いた。ビリルビンは, 高ビリルビン血清を 5'-AMP-Sepharose に通したのものを用いた。カイロミクロンは, 著者らが高脂肪食 (バター) を多量に摂取し, 採血後血清を超遠心処理して集めた。なお, 採取した共存物質最終液の LDH 活性が検出されないことを確かめた。セロゲルを支持体とした場合, ヘモグロビンの影響

は 69 mg/dl の濃度の共存でも 3 型が高値となり, 275 mg/dl の濃度の共存ではヘモグロビンを含まないときの 2 倍も高い 3 型の分画値となった。一方, T-02 を支持体とした場合, 275 mg/dl の濃度の共存で 3 型がやや高くなり影響がみられたが, それ以下の濃度ではほとんど影響はみられなかった。ビリルビンとカイロミクロンの影響は, 両支持体ともあまりみられなかった。

5. T-02 とセロゲルの相関

LDH 1, 2 型, 2, 3 型, 4, 5 型の高い血清を含む種々の患者血清および健康人血清計 26 件を用いて, LDH isozyme 分画値の T-02 とセロゲルの相関を検討した。相関係数 (r), 回帰式 ($y=T-02, x=セロゲル$) は, それぞれ 1 型 $r=0.97, y=0.96x-2.13$, 2 型 $r=0.84, y=0.71x+8.80$, 3 型 $r=0.86, y=0.74x+7.63$, 4 型 $r=0.92, y=0.93x+0.96$, 5 型 $r=0.98, y=0.90x+1.34$ であった。

Table 2. Precision.

a) Within-run precision ($n=10$)

LDH isozyme	Membrane					
	Cellogel			T-02		
	m (%)	SD (%)	CV (%)	m (%)	SD (%)	CV (%)
LDH 1	39.00	3.11	7.98	32.68	1.59	4.87
LDH 2	26.24	1.85	7.02	25.87	0.90	3.47
LDH 3	11.92	1.55	13.02	14.80	0.33	2.21
LDH 4	5.07	1.58	31.26	6.43	0.75	11.59
LDH 5	17.79	2.55	14.33	19.98	1.53	7.65

b) Between-run precision ($n=7$)

LDH isozyme	Membrane					
	Cellogel			T-02		
	m (%)	SD (%)	CV (%)	m (%)	SD (%)	CV (%)
LDH 1	44.31	1.18	2.66	35.57	2.20	6.18
LDH 2	27.86	1.16	4.16	26.37	0.89	3.38
LDH 3	10.77	1.61	14.95	14.86	0.73	4.91
LDH 4	3.51	0.56	15.95	5.46	0.78	14.29
LDH 5	13.69	1.87	13.66	17.90	1.88	10.50

m: mean

SD: Standard deviation

CV: Coefficient of variation

6. 正常値の検討

慈恵医大病院に健康診断の目的で来院しとくに異常を指摘されなかった健康人 100 人 (平均年齢 39.05 歳, 男 86 人, 女 14 人) を対象に, T-02 を支持体とした LDH isozyme の各分画値の $\text{mean} \pm 2\text{SD}$ を求めた. 1 型 $19.5 \pm 8.2\%$, 2 型 $35.0 \pm 7.8\%$, 3 型 $25.6 \pm 6.8\%$, 4 型 $8.6 \pm 4.4\%$, 5 型 $11.3 \pm 7.4\%$ であった.

考 察

電気浸透現象が小さいとされるセ・ア膜を用いた蛋白電気泳動に関する報告は, これまでいくつか知られている⁸⁻¹⁰⁾. しかし, これらのセ・ア膜を用いた LDH isozyme に関する報告は文献上みられず, 今回新しいセ・ア膜 T-02 を LDH isozyme の支持体として用い検討した.

LDH 1 型および 5 型 isozyme を希釈した直線性試験の結果では, T-02 よりもセロゲルのほうがより高活性まで直線性が得られ, 異常高活性値についての正確度ではセロゲルのほうが良好であった. しかし T-02 を支持体として実際の患者血清を測定する場合には問題ない結果と思われた. LDH 活性値と塗布量の検討の結果, 317

U/l 以下の低活性の場合に, T-02 では塗布量を $3 \mu\text{l}/\text{cm}$ にすることによって分画値の測定が可能であるという結果となった. すなわち低活性の血清では, T-02 のほうがセロゲルよりも少ない塗布量で isozyme の分画が可能であることを示した. 同時および日差再現性の結果では, セロゲルよりも T-02 のほうが良好であった. これまで血中共存物質の支持体への影響についてはあまり報告されていない. ヘモグロビン, ビリルビン, カイロミクロンの 3 種の共存物質について影響を検討した結果, セロゲルを支持体としたときのヘモグロビンが LDH 3 型の分画値に大きく影響した. しかし, T-02 のほうは 183 mg/dl 以下のヘモグロビン濃度ではあまり影響せず, セロゲルにくらべヘモグロビンの影響は少ないと思われた. T-02 とセロゲルの各 LDH isozyme 分画値の相関は, 良好であった. 回帰式より, T-02 はセロゲルよりも 1 型がやや低く, 2, 3 型がやや高いという結果であったが, 塗布位置に近い 4, 5 型の相違はあまりみられなかった.

以上の検討より, 試作膜 T-02 は LDH isozyme 測定の支持体としても有用であり, 今後同様の性質を持った膜が市販されることが期待される.

Fig. 2. Effect of interfering substances.

●: LDH 1, ○: LDH 2, ▲: LDH 3,
△: LDH 4, ■: LDH 5

謝 辞

試作膜 T-02 をご提供いただいた富士写真フイルム株式会社に深謝いたします。

文 献

- 1) Paul, J. K.: Clin. Chem., 22: 471, 1976.
- 2) Menon, M. P. et al.: Anal. Chem., 55: 1385, 1983.
- 3) Nace, G. W.: Ann. N. Y. Acad. Sci., 103: 980, 1963.
- 4) Usategui-Gomez, M. et al.: Clin. Chem. 25: 729, 1979.
- 5) Warburton, F. G. and Waddecar, J.: J. Clin. Pathol., 19: 517, 1966.
- 6) 塩谷実枝子, 他: 臨床病理, 19: 469, 1971.
- 7) Wroblewski, F. and LaDve, J. S.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 90: 210, 1955.
- 8) 橋本寿美子, 河野均也: 生物物理化学, 30: 83, 1986.
- 9) 堀井 隆, 林 康之: 機器・試薬, 9: 692, 1986.
- 10) 飯田八知代, 他: 生物物理化学, 32: 78, 1988.