



原著

乳酸脱水素酵素活性測定の精度管理 — アイソザイム LD1 測定を指標として —

吉国桂子* 谷島清郎** 鄒 紅** 山岸高由**

乳酸脱水素酵素 (LD) アイソザイムの多様性から生ずる活性測定値の試薬間差ないし方法間差を是正するため、部分精製した LD1 を管理物質として、試料中のアイソザイム LD1 活性を測定することを試みた。耐熱菌、ヒト赤血球、ラット心筋の LD 抽出液について性状を検討したところ、ラット LD1 が熱に安定であり、ヒト血清の LD1 と電気泳動易動度、 K_m 値などの物理化学的性状が近似しており、酵素標準物質として妥当であった。これを標準物質として各種試薬を用い、ヒト血清、管理用血清の総 LD 活性および LD1 活性を測定した。乳酸を基質とした試薬間での収束度は LD 総活性で 0.8~2.0%、LD1 活性で 0.2~3.6% となり、ピルビン酸を基質とした方法間での収束度は LD 総活性で 5.8~7.8%、LD1 活性で 0.7~6.3% となり、施設間差は正における指標としての LD1 活性測定の有用性が示された。

Key words : 乳酸脱水素酵素, 耐熱酵素, ラットアイソザイム LD1, 施設間差

1. 緒言

乳酸脱水素酵素 (EC1.1.1.27.LD) は、体内各組織に分布し、臓器によりアイソパターンが異なることから、悪性腫瘍、心疾患、肝疾患をはじめとした臨床検査に広く応用され、活性測定標準化も進んできている^{1,2)}。しかし、一方ではアイソザイムの多様性から測定値の施設間差が著しく、その是正が求められている³⁻⁶⁾。

そこで今回は、LD アイソザイム 1 (LD1) のみに注目し、その活性測定による精度管理を試みた。また、酵素標準物質として LD1 を用いることとし、耐熱性という観点から *Bacillus stearothermophilus*、ヒト赤血球、ラットから LD を抽出し、LD 管理物質としての有用性を検討したので報告する。

2. 材料と方法

2.1. 材料

ヒト赤血球は金沢大学教職員ならびに学生の有志より提供された血液を使用し、ラット臓器は金沢大学医学部動物施設より分与されたものを用いた。また、耐熱菌は理化学研究所微生物系統保存施設 (東京) より入手した。

2.2. 酵素精製法

耐熱菌の LD 精製は、ブレーンハートインフュージョン培地で 56°C 24 時間振とう培養した後に集菌し、2 倍容量のトリス緩衝液 (20 mmol/l, pH 7.4) に終濃度 1% の Triton X-100 を加えホモジナイズ後、1,000 g, 30 分遠心した上清を Sephadex G-200 により部分精製した。ラットの LD 精製は、ラット心筋の小片をトリス緩衝液 (20 mmol/l, pH 7.4) でホモジナイズ後、1,000 g, 15 分遠心した上清を 10,000 g, 30 分遠心し、Hsu らの方法⁷⁾ に従い QAE-Sephadex A-50 (Pharmacia Fine Chemical, Piscataway, NJ) でアイソザイムを分離した。

* 浅ノ川総合病院検査部

** 金沢大学医学部保健学科

2.3. アイソザイムの分析

電気泳動法による分析は、パラゴン（ベックマン社、USA）のアガロース泳動膜を用い、100 V、20 分間電気泳動を行い、L-乳酸リチウムを基質として試薬キットの説明書にしたがい活性染色を行った。

2.4. K_m 値

ピルビン酸濃度を 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.30, 0.60 mmol/l と変化させ試料中の LD 活性を測定し、Lineweaver-Burk プロット⁸⁾よりピルビン酸基質に対する K_m 値 ($\times 10^{-4}$ mol/l) を算出した。

2.5. 活性化エネルギー

測定温度を 25, 30, 35, 40, 45°C と変化させて、試料中の LD 活性を測定し、Arrhenius のプロット⁹⁾から活性化エネルギー (kJ/mol) を求めた。

2.6. LD 活性測定法

2.6.1. LD 総活性

JSCC 常用基準法として、LDH HR II ワコー（和光純薬）、アクアオートカイノス LDH-J（カイノス）、イアトロク LQ LDH レート（ヤترون）、クイックオートネオ LD JS（シノテスト）および Wroblewski-La Due 法の L タイプワコー LDH（和光純薬）、GSCC；German Society of Clinical Chemistry 法のメルクオート LDH（関東化学）、SFBC；Societe de France Biologie Clinique 法のイアトロク LQ LDH レート（ヤترون）、SSCC；Scandinavian Society of Clinical Chemistry 法のエクデア L “栄研” LDH-S（栄研化学）の各試薬を使用し、自動分析機で測定した。

2.6.2. LD1 活性

Tanishima らの方法¹⁰⁾に従い、1,6-hexanediol で M サブユニットを阻害して、LD 総括性測定法に準じ測定した。

2.6.3. LD 活性の値づけ

JSCC（Japan Society of Clinical Chemistry）常用基準法¹⁾により、和光純薬株式会社研究所に依頼した。

3. 結果

3.1. 各種酵素の性状

3.1.1. アイソザイムの分析

B. stearothermophilus, ヒト赤血球, ラット心筋の LD 抽出液についてヒト血清を対照にして電気泳動法によるアイソザイムの分析を行った。その結果, *B. stearothermophilus* はヒト血清の LD2 に近い位置に単一のバンドを認めた。これに対し, ヒト赤血球, ラット心筋は血清と近似した 5 本のバンドを認めた。(図 1)。

3.1.2. 耐熱試験

B. stearothermophilus の精製 LD およびヒト赤血球溶血液とラット心筋抽出液の精製 LD1 (いずれも最終濃度 2% ウシアルブミンを添加, 375mosm) を 56°C に 10 分間加温後直に氷冷し, LD 活性を測定して残存活性を調べた。*B. stearothermophilus* では 100%, ヒト赤血球は 50%, ラット心筋は 92% の残存活性を示した。

3.1.3. K_m 値

B. stearothermophilus, ヒト LD1, ラット LD1, 対照としてヒト血清の K_m 値を調べた結果, ラット LD1 の K_m 値 (0.75×10^{-4} mol/l) はヒト血清の K_m 値 (0.57×10^{-4} mol/l) と近似していたが, *B. stearothermophilus* の K_m 値 (1.75×10^{-4} mol/l) とは近似性を認めなかった。

3.1.4. 活性化エネルギー

B. stearothermophilus, ヒト LD1, ラット LD1 ならびに対照としてヒト血清の活性化エネルギーを調べた結果, ラット LD1 の活性化エネルギー (28.4 kJ/mol) はヒト血清 (22.8 kJ/mol) およびヒト LD1 (36.9 kJ/mol) と近似していたが, *B. stearothermophilus* の活性化エネルギー (11.0 kJ/mol) はヒト血清や LD1 などに比べ小さい。

3.1.5 熱安定性試験

B. stearothermophilus, ヒト LD1, ラット LD1 (いずれも最終濃度 2% のウシアルブミンを添加, 375mosm) を 4°C に保存し, 1 週間ごとに 6 週間にわたり LD 活性を測定した。いずれも

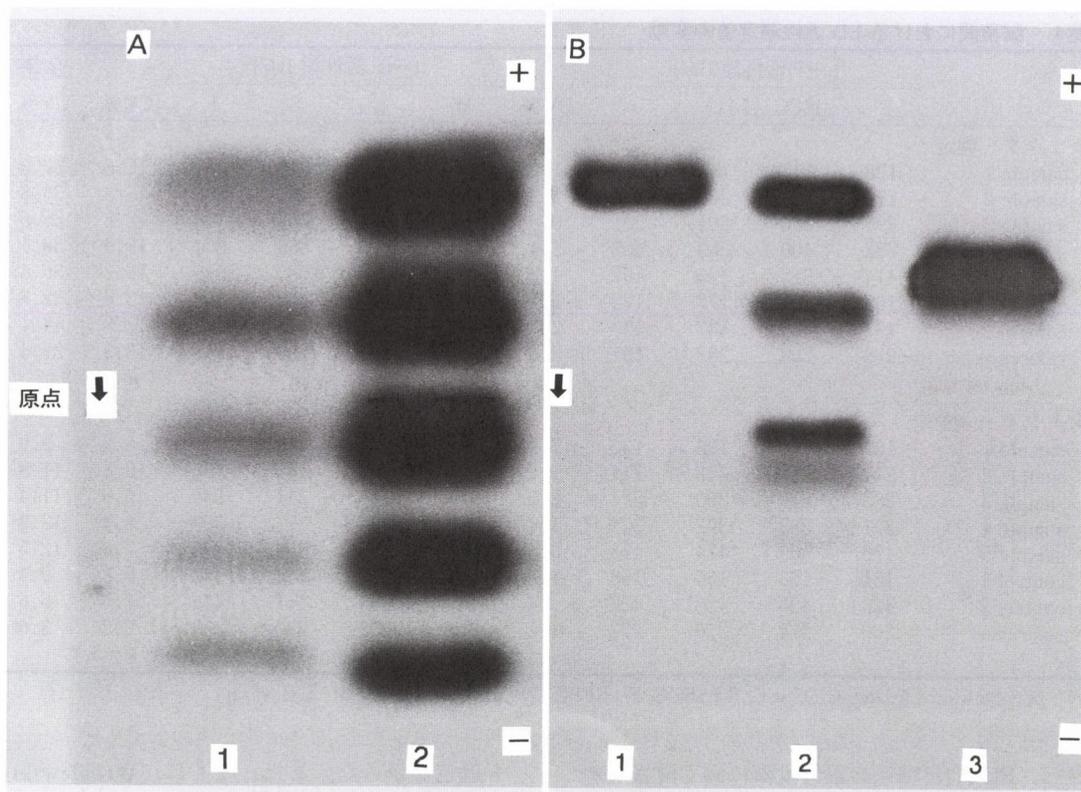


図1 LD アイソザイムの電気泳動

A: 1 ヒト血清, 2 ラット心筋

B: 1 ラット心筋 LD1, 2 ヒト赤血球, 3 耐熱菌

安定した活性を示し、ラット LD1 活性は 89%、ヒト LD1 活性は 94%、*B. stearothermophilus* LD 活性は 100% 残存活性を示した。

3.2. 精度管理への応用

3.2.1. 各種試薬間での LD 活性差

患者血清 5 例、管理用血清としてのコントロール血清 1,2 (和光純薬、ブタ心筋由来 LD)、酵素標準品としての酵素リファレンス (和光純薬、ヒト赤血球由来 LD) について JSCC、Wroblewski-La Due 法、GSCC、SFBC、SSCC の各測定法で LD 総活性ならびに LD1 活性を測定し、各試薬間における活性値の収束度を調べた。また、スタンダードとしてラット心筋 LD1 を使用し、値付けした活性値をパラメーターに組み入れ測定を行い、ファクター測定と収束度の比較も行った。

LD 総活性については、ファクター測定では乳酸基質よりピルビン酸基質を用いた試薬間でのばらつきが大きく、全試薬間差はさらに大きく平均 CV が 37.7% であった。スタンダード測定では乳酸基質、ピルビン酸基質のいずれの試薬間においてもばらつきは減少し、全試薬間差は平均 CV 10.4% に収束した (表 1)。

LD1 活性についてみると、ファクター測定、スタンダード測定において、平均 CV が 38.7% から 9.7% に収束し、LD 総活性と同様の傾向が認められたが、LD 総活性に比べてピルビン酸基質の試薬間でのばらつきが顕著に減少した (表 2)。

4. 考察

乳酸脱水素酵素は生体のほとんどの組織に存

表1 試薬間における LD 活性測定値の変動

	L→P 活性値 IU/l				CV%	P→L 活性値 IU/l				CV%	全体 CV%
	JSCC (4社)					W	G	S	F		
ファクター測定											
sample 1	138	143	144	142	1.8	245	261	312	311	12.2	37.0
sample 2	219	226	223	224	1.3	376	364	485	488	15.8	36.8
sample 3	296	300	301	301	0.8	511	532	656	628	12.8	35.6
sample 4	382	400	389	402	2.4	656	640	863	844	15.9	36.1
sample 5	474	518	476	497	4.2	796	832	1088	1066	16.2	36.6
control 1	168	177	177	178	2.7	315	326	402	397	12.6	38.5
control 2	433	459	437	450	2.7	886	960	1170	1115	12.8	44.1
reference	273	298	283	191	3.8	485	530	630	641	13.3	37.4
					R=2.7					R=13.9	
スタンダード測定											
sample 1	133	131	136	130	1.9	101	114	115	117	6.2	9.9
sample 2	211	214	218	214	1.7	158	174	182	182	6.5	11.8
sample 3	283	277	290	284	2.0	208	241	241	238	6.8	11.4
sample 4	371	382	372	374	1.4	276	290	317	309	6.2	12.8
sample 5	476	469	474	473	0.8	340	374	456	399	7.8	12.5
control 1	161	166	166	165	1.3	126	145	144	147	6.8	9.4
control 2	420	430	428	423	1.1	367	398	441	406	7.5	5.6
reference	266	274	270	272	1.2	206	232	230	239	5.3	3.6
					R=1.5					R=6.7	

W : Wroblewski-La Due, G : GSCC, S : SSCC, F : SFBC, R=the square root of $\sum_{i=1}^n \sqrt{cv^2/n}$

在し、嫌氣的解糖系の最終段階に働く酵素である。H型およびM型の2種の異なるサブユニットよりなる四量体で、それぞれの組み合わせから5種類のアイソザイムが生じてくる。これらのアイソザイムは電気泳動易動度、基質に対する K_m 値、阻害剤に対する挙動などについて異なった性状を示す。物理化学的にもH型サブユニットは高温、低温に対する安定性にすぐれているが、M型のサブユニットは低温に不安定で耐熱性にも欠けているなどの種々の違いがみられる^{11,12)}。

こうしたアイソザイムの多様性を考慮した上で、酵素活性測定値の施設間差を少なくする目的から、今回は単一のアイソザイム LD1 を測定することを試みた。

ラット心筋の LD1 をスタンダードとして、各種血清試料の LD 総活性、LD1 活性における試薬間の収束度を見ると、いずれも活性値のばらつきはファクター測定より減少した。千葉、山内らはヒト酵素標品を用いて、酵素活性値の施設間差を報告している^{3,4)}が、その成績と

も遜色なかった。また、とくに、Wroblewski-La Due 法、GSCC 法、SFBC 法、SSCC 法などのようにピルビン酸基質を用い、測定条件が統一されていない試薬の場合に LD1 活性のばらつきの収束が著しかった。ヒト血清 LD はアイソザイムの構成により、測定条件による反応が多様であるため、その中の単一のアイソザイムを測定したことに起因するものと思われる。したがって、LD1 活性を指標として測定値の施設間差や試薬の違い、測定法による違いを比較することの妥当性が認められた。とくに温度に不安定な M 型サブユニットの含有量の多いアイソザイム LD3, LD4, LD5 の比率が高いサンプルにおける施設間差は正の指標として有用と考える。

ところで、LD1 標準物質としては温度に安定性の高い酵素が求められていることはいうまでもない。Tanishima らは好熱性幼虫 (*Stenotermes japonica*) の LD が耐熱性を備え、電気泳動上ではヒト LD1 に近似しており、 K_m 値、活性化エネルギーともにヒト血清 LD1 に

表2 試薬間における LD1 活性測定値の変動

	L→P 活性値 IU/l				CV%	P→L 活性値 IU/l				CV%	全体 CV%
	JSCC (4社)					W	G	S	F		
ファクター測定											
sample 1	90	89	97	92	2.6	166	171	201	207	11.1	37.8
sample 2	141	134	142	136	1.3	256	276	313	326	11.1	38.1
sample 3	150	154	159	154	2.4	273	302	337	335	9.7	37.1
sample 4	228	230	233	227	1.1	378	429	486	484	11.6	35.5
sample 5	259	266	268	270	1.8	484	523	605	593	10.5	38.4
control 1	115	112	124	118	4.4	213	236	272	265	11.0	39.2
control 2	414	426	424	432	1.8	850	912	1137	1092	13.9	45.0
reference	213	224	217	225	2.6	377	427	487	507	13.1	38.4
					R=2.5					R=11.5	
スタンダード測定											
sample 1	94	92	97	92	2.5	74	84	77	79	3.2	10.4
sample 2	142	134	142	136	2.9	110	115	116	118	3.0	10.5
sample 3	172	164	178	168	3.6	138	143	144	141	2.0	10.4
sample 4	212	208	210	208	0.8	155	166	170	171	4.3	12.9
sample 5	250	245	246	240	1.8	199	207	205	210	2.3	9.6
control 1	122	126	125	122	2.1	99	105	104	106	3.1	9.7
control 2	405	407	406	403	0.2	361	380	419	395	6.3	4.6
reference	193	222	218	220	0.8	182	182	185	183	0.7	9.8
					R=2.1					R=3.5	

W : Wroblewski-La Due, G : GSCC, S : SSCC, F : SFBC, R=the square root of $\sum_{i=1}^n \sqrt{cv^2/n}$

近い値を示すことを報告している¹³⁾。

正確な酵素活性値を導くための酵素標準物質の特性として、中野は、1) ヒト血清中の酵素と互換性があること、2) 品質が均一であること、3) 温度に安定であることなどをあげている²⁾。

血清中の LD は不安定で冷蔵保存でも日々活性が低下すること、5 種のアイソザイムで構成されていることにより、均一な品質を保持することが困難である。そこで、まず耐熱性の観点から耐熱菌、ヒト赤血球、ラット心筋から抽出した LD を比較したが、いずれも遜色はなかった。しかし、ヒト血清中の LD との互換性という点では、電気泳動上、ラットの LD がほとんど同一のアイソザイムパターンを示した。 K_m 値、活性化エネルギーについても、ラット心筋からの LD1 がヒト血清の LD1 と近似していた。

以上、耐熱性であること、単一のアイソザイムであること、酵素の性状がヒト血清と近似していることからラット心筋からの LD1 を標準物質とした。

一方、ヒト由来酵素標品を用いることにより、

LD 活性のばらつきが収束され施設間差が是正されることが報告されている³⁻⁵⁾が、中野らはアイソザイムの多様性により方法間変換係数を用いたとしても正確に変換できないことを報告している⁶⁾。また、小川らは酵素標準物質中のアイソザイム構成比により活性値に差が生ずる問題点を報告しており¹⁴⁾、ヒト由来の酵素標準物質を使用したとしても、LD 活性の施設間差是正は問題が残ることを指摘した。

今後、耐熱性に優れる *B. stearothermophilus*, 好熱性幼虫の LD, ラット LD1 などの蛋白構造、遺伝子配列の検索を進めるとともに、耐熱性 LD の標準酵素としての有用性を検証したい。

乳酸脱水素酵素活性の値づけにご協力いただきました和光純薬株式会社に深謝いたします。

文献

- 1) 日本臨床化学会：ヒト血清酵素活性測定の報告法—LD, 臨床化学, 19 : 228-246, 1990.
- 2) 中野尚美：臨床検査の標準化, 医学検査, 41 : 1553-1560, 1992.

- 3) 山内昭浩, 青木哲雄: ヒト由来酵素標品による血清酵素活性値の施設間差は正の実践的評価, 医学検査, **42**: 38-43, 1993.
- 4) 千葉正志: 東京都立関連施設における施設間差縮小の試み, 医学検査, **46**: 735-743, 1997.
- 5) 丸山博史, 坂口 司, 石原隆一: 熊本県における施設間差は正の試み, 医学検査, **41**: 983-989, 1992.
- 6) 中野幸弘, 入野博文, 吉田雅明, 土井真弓, 田端省三, 太子 馨, 渡辺和夫: 兵庫県における酵素活性測定値統一化への試み, 医学検査, **42**: 1898-1905, 1993.
- 7) Hsu M, Kohler M, Barolia L, Bondar L: Separation of five isoenzyme of serum lactate dehydrogenase by discontinuous gradient elution from a miniature ion-exchange, Clin Chem, **25**: 1453-1458, 1979.
- 8) 林 典夫, 廣野紀子: シンプル生化学, p72, 南江堂, 東京, 1994.
- 9) 青木芳和: 酵素の活性化エネルギー, 検査と技術, **14**: 216-220, 1986.
- 10) Tanishima K, Hayashi T, Matsushima M, Mochikawa Y: Activity of dehydrogenase isoenzymes LD1 and LD2 in serum as determined by using an inhibitor of the M-subunit, Clin Chem, **31**: 1175-1277, 1985.
- 11) 中村郁夫, 富田 博, 阿部美代子, 星 岩雄, 本多信治: 保存温度における血清 LDH 総活性値及びアイソザイムへの影響についての検討, 衛生検査, **32**: 1131-1134, 1983.
- 12) 加野象次郎, 嵯峨実枝子: LDH, 臨床検査, **25**: 661-667, 1981.
- 13) Tanishima K, Kojima S, Li Y, Sakai A, Shimada K, Tabuchi N: Evaluation of lactate dehydrogenase from the thermophilic *Brachycera* larva in a spa as a thermostable reference enzyme X VI Internat. Congr. Clin. Chem. 7- 12 July, 1996 London, UK.
- 14) 小川善資, 木村孝司, 牧瀬淳子, 山口但正, 池谷 均, 須郷秋恵, 斉藤奈々子, 伊藤啓: 常用酵素標準物質 (EMR), 臨床検査, **41**: 433-440, 1997.

受理日: 1997年10月21日
 受領日: 1998年3月17日

別刷請求先:

吉国桂子 浅ノ川総合病院検査部
 〒920-8621 金沢市小坂中 83

LD1 Isoenzyme as a Marker of the Quality of Lactate Dehydrogenase Measurements

Keiko Yoshikuni*, Kiyoh Tanishima**, Zou Hong**, Takayoshi Yamagishi**

* Division of Clinical Laboratory, Asanogawa General Hospital, Kanazawa

** School of Health Science, Faculty of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa

Summary

In order to reduce inter-assay variations in the measurement of the activities of lactate dehydrogenase (LD) in sera, we developed a technique to only measure isoenzyme LD1 in sample specimens using purified LD1 as an enzyme reference. We selected the rat LD1 isoenzyme as a reference enzyme after examining various thermostable enzymes, including those from tissue extracts of *B. stearothermophilus*, rat heart muscle, and human erythrocytes, and comparing their enzymic properties with human serum LD1. After measuring LD1 activities in 5 serum samples and 3 control sera using several commercially available LD assay systems as standards, we compared the coefficient of variation among the measured activity values. When we used LD assay systems with lactate as a substrate, we found that the inter-assay CV for the measurement of total LD and LD1 activities of these sera were 0.8-2.0% and 0.2-3.6%, respectively. When we used pyruvate as the substrate, the CV were 5.3-7.8% and 0.7-6.3%, respectively. The interassay CV for the measurement of LD1 activities in sera were significantly smaller than that for the total LD activities in sera.

Key words

lactate dehydrogenase, thermostable enzyme, rat isoenzyme LD1, control survey