

〔原 著〕

乳酸脱水素酵素サブユニット欠損症の 臨床検査医学的および免疫学的研究

前 川 真 人*

SUMMARY

We examined a logic to detect lactate dehydrogenase (LDH) subunit deficiency heterozygote. From laboratory screening, simulation of subunit deficiency, and family analyses, subunit deficiency did not always show low serum LDH activity, however, showed a characteristically unusual serum LDH isozyme pattern.

By western blotting using anti-H subunit antibody, we tried to detect LDH isozyme I and II in red blood cells. The results were that there was no heterotetramer with normal H subunit in M subunit deficiency homozygote. Additionally, making a comparison between activity and protein concentration, there was no variant M subunit in M subunit deficiency heterozygote, while, there is variant H subunit in H subunit deficiency heterozygote.

Key Words : lactate dehydrogenase, lactate dehydrogenase isozyme, lactate dehydrogenase H subunit deficiency, lactate dehydrogenase M subunit deficiency, laboratory medicine

はじめに

乳酸脱水素酵素(LDH; EC 1. 1. 1. 27)はHとMの2種のサブユニットよりなる4量体であり、5種のアイソザイムの存在が知られている¹⁾。臓器ごとに含量, アイソザイムパターンに違いがあるため, それを利用して損傷臓器の診断の目的で日常検査に広く応用されている。

LDH H サブユニットの完全欠損例は1971年, 北村ら²⁾, Mサブユニット欠損は1980年, 菅野ら³⁾によって初めて報告され, その後, Mサブユニット欠損症は前川ら⁴⁾, 浮田ら⁵⁾によって, また最近, 北村らによってHサブユニット欠損症の第2家系の症例が報告され

た⁶⁾。また, 前川ら⁴⁾のマスクリーニングによって, これら両サブユニット欠損症の遺伝子の保因者ヘテロ接合体の頻度がほぼ同等であることが明らかにされている。

Hサブユニット欠損症は他の解糖系酵素異常とは異なり, 溶血性貧血をきたさないと報告されており⁷⁾, 特異的な臨床症状は明らかではない。一方, Mサブユニット欠損症はミオグロビン尿症⁸⁾, 分娩障害⁹⁾, 皮膚症状⁹⁾など臨床的意義が明らかとなりつつある。このような潜在性の危険性があるサブユニット欠損症ホモ接合体はいずれも検査データが発見の端緒となっていることが特徴的であり注目すべき点である。そこで日常検査データにおけるサブユニット欠損の特徴, 検出方

Laboratory and immunological assessment in lactate dehydrogenase subunit deficiency.

*Masato Maekawa; 浜松医科大学附属病院検査部

Correspondence address: Department of Laboratory Medicine, Hamamatsu University, School of Medicine, Hamamatsu-shi, Shizuoka 431-31, Japan.

(受付 1987年5月29日, 受理 1987年7月3日)

法について検討し、潜在性症候性遺伝性変異である LDH サブユニット欠損症の早期検出論理の確立を目指した。

また、この酵素活性としての欠損がはたして蛋白として欠失しているかどうかは遺伝学上興味あるところである。Hサブユニット欠損症においてはヘテロ接合体を対象として酵素活性を示さない変異サブユニットの存在が確認された^{10,11}。また、Mサブユニット欠損症では、蛋白として欠失している可能性が示された¹²。今回、我々の検査室ではいくつかの症例が蓄積されたのでサブユニット欠損症例の赤血球を用いて免疫学的に検索し、家系間の差異の有無についても併せて報告する。

方 法

1) LDHの活性測定ならびにアイソザイム分析

LDHは Wroblewski and LaDue¹³の方法に従い、日本電子 JEOL H6R もしくは島津 CL-20にて測定した。LDH アイソザイムは塩谷ら¹⁴の方法に準じてセロゲル膜 (Chemetron, Milan, Italy) を支持体として泳動し活性染色した。それを Cliniscan reflectance densitometer (ヘレナ社製) を用いて分画し得た各アイソザイムのパーセントからMサブユニット、Hサブユニットとしての活性を算出した。

2) LDHサブユニット欠損症の検査データからの検出

浜松医科大学附属病院検査部に依頼された検体 (1980年より1987年3月まで) 約4万件の中で、血清 LDH 活性が140 WU (mean - 3 SD; reference range: 170-340 WU) 以下の症例を対象に我々の確立した赤血球の H/M 比⁹より、H、Mサブユニット欠損症ヘテロ接合体を同定した。また、可能な範囲で家系検索を行った。

3) 健常者の血清 LDH 活性からみたサブユニット欠損症の血清 LDH 活性の推定

浜松医科大学職員健康診断時に採取した血清110例の LDH 活性測定ならびにアイソザイム分析を行い、H、Mのサブユニットとしての活性を算出し、サブユニット欠損症ヘテロ接合体のモデルを想定して、そのサブユニット活性が半分となった場合の LDH 活性を求めた。

4) Western blotting 法を応用したH、Mサブユニット欠損症の免疫学的検索

Mサブユニット欠損症ホモ接合体 (完全欠損例)^{3,4}、

H、Mサブユニット欠損症ヘテロ接合体、正常対照から得た赤血球を生理食塩水で3回洗浄後、純水を加えて作製した溶血液を試料とし、セロゲル膜を支持体とした電気泳動¹⁴を行った。泳動終了後、酵素プリント法¹⁵を用いてデュラポアフィルター (ミリポア社製) に転写し、家兎に免疫して作製した抗Hサブユニット抗体¹²、ペルオキシダーゼラベルの抗ウサギ免疫グロブリン抗体 (Dako 社製) を用いて Western blotting 法^{16,17}を施行した。フィルターを風乾した後、495nmにて Cliniscan reflectance densitometer を用いて分画し、I型とII型の比を求めた。これを活性からえた I/II比と比較し、前者と後者の比として求めた。同様に、赤血球から Burd らの方法¹⁸により精製した LDH の I型とII型を5種の割合に混合した試料を用いて Western blotting 法を施行した。

結 果

1) 検査データから検出した LDH サブユニット欠損症の頻度

約4万人の母集団のうち126人の低 LDH 血症例 (140WU 以下) が存在し、赤血球のアイソザイム分析の結果、26人がHサブユニット欠損症ヘテロ接合体、6人がMサブユニット欠損症ヘテロ接合体であった。従って、低 LDH 血症例に占める割合はそれぞれ、20.63%、4.76%となった。また、母集団に対する割合として計算すると、0.065%、0.015%となった。

2) サブユニット欠損症の血清 LDH 活性

健診試料110例の血清 LDH 活性は165~342WU であり、そのヒストグラムを Fig. 1 に示した。また、これら110例のアイソザイムパターンよりシミュレーションによって算出したサブユニット欠損症ヘテロ接合体のモデルの LDH 活性のヒストグラムも示した。これらモデルのヒストグラムより140WU 以下の占める割合はHサブユニット欠損症は21例 (19.1%)、Mサブユニット欠損症は4例 (3.6%) であった。したがって、モデルのヒストグラムによれば、140WU 以下のみを LDH サブユニット欠損症の検出対象とした場合、上記の割合しか検出できないことになる。この結果は、健診試料のスクリーニングにより見いだされたサブユニット欠損症ヘテロ接合体例、更に家系検索によって判明したヘテロ接合体例の血清 LDH 活性の分布からも低 LDH 血症 (140WU 以下) をきたした例はHサブユニット欠損が1/6、Mサブユニット欠損が0/8であり、

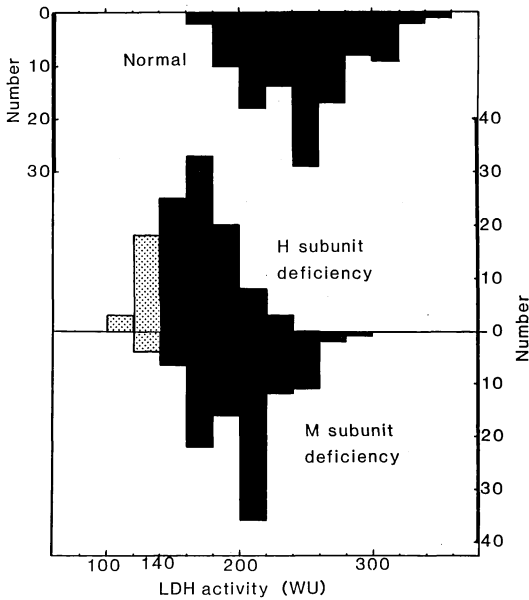


Fig. 1. Serum LDH activity of LDH subunit deficiency calculated by simulation.

Serum LDH activity of normal population (N=110) was distributed from 165 WU to 342 WU. The histogram is located on the top of the Figure. LDH activity distribution of H or M subunit deficiency was calculated by that of normal population. The histograms of either H or M subunit deficiency are located on the mid and bottom. Shaded columns show population with low serum LDH activity (below 140 WU).

例数が少ないが、シミュレーションによるデータとともにサブユニット欠損は必ずしも低LDH血症を呈さないことを物語っている (Fig. 2(a)). また、Mサブユニット欠損ヘテロ接合体例で Fig. 2 中矢印で示した2例は慢性アルコール性肝疾患が基礎にあるための高値である。一方、日常検査データにおいて低LDH血症をきたしたサブユニット欠損例ならびにその家族は、概ね同様に LDH 活性は低く (Fig. 2(b)), 元来有する血清 LDH 活性は家系ごとの genetic control によるところが多いと考えられた。

3) LDH サブユニット欠損症の血清 LDH アイソザイムパターン

現在までに同定されたサブユニット欠損症ヘテロ接合体ならびに低LDH活性(140WU以下)の症例の血

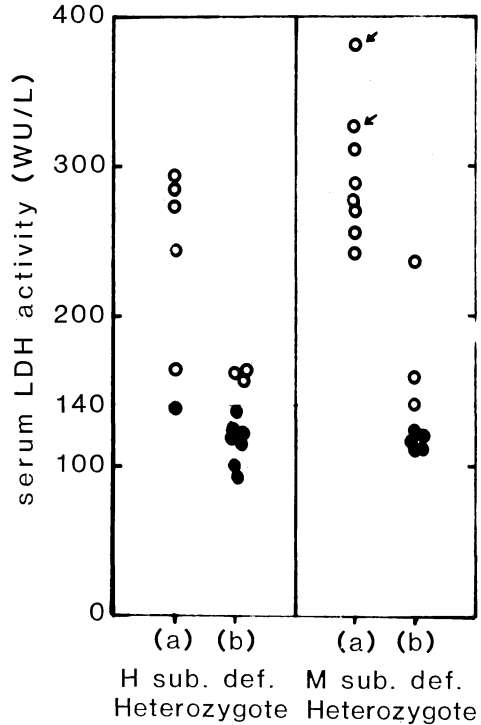


Fig. 2. LDH activity of heterozygous individuals with LDH subunit deficiency.

Propositus and its family members discovered by mass screening (a) and by laboratory screening (b) are shown. Closed circle and arrow indicate individuals showing low LDH activity (below 140WU) in serum and individuals with chronic alcoholic liver disease, respectively.

清LDHパターンをmean±SDで表した (Fig. 3 A). サブユニット欠損症でないと判明した血清LDH活性低値例のアイソザイムパターンは活性正常域の健康者群のアイソザイムパターンに近いものであった。一方、H、Mサブユニット欠損症ヘテロ接合体はいずれもそのサブユニットの欠失したパターンとして理解できるものであり、各臓器中のサブユニット欠損に起因すると考えられた。また同時に、血清LDHアイソザイムパターンから、サブユニット欠損を疑うことは可能であると考えられた。そこで、数量的に扱うため、3群のアイソザイムパターンから、特徴的であると考えられるI/II, II/III, I/IIIの比を求めプロットした (Fig. 3 B). それぞれ若干オーバーラップはあるものの、平均値のt検定によればいずれの比もサブユニッ

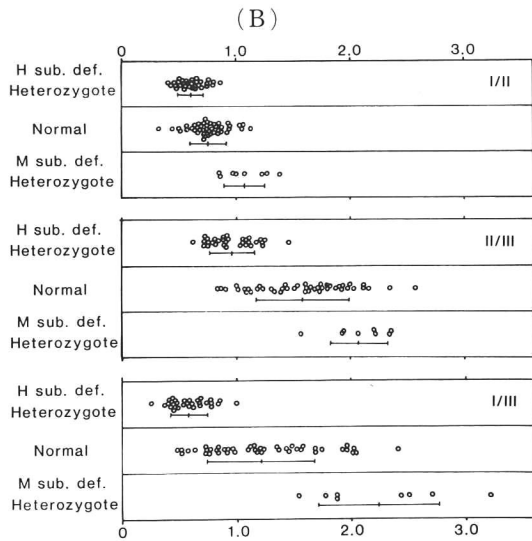
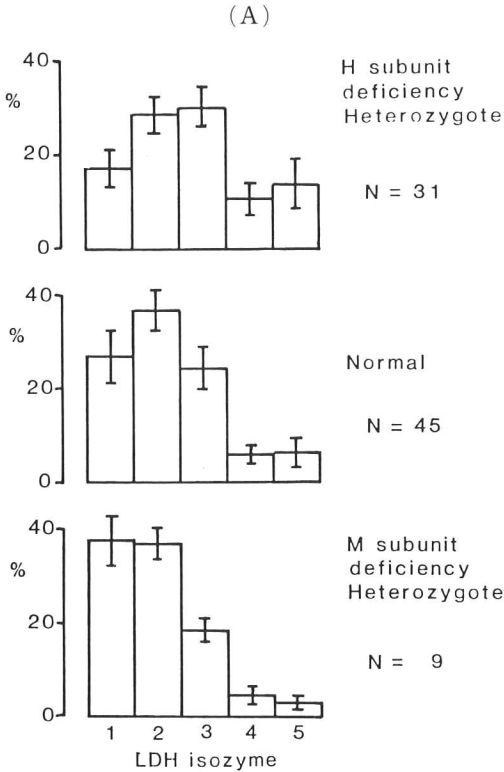


Fig. 3. LDH isozyme pattern (A) and isozyme ratios (I/II, II/III, I/III) (B) of low serum LDH activity with normal H/M ratio in red blood cell (N=45) and heterozygous individuals with H (N=31) or M (N=9) subunit deficiency.

Column and bar indicate mean and mean \pm standard deviation, respectively.

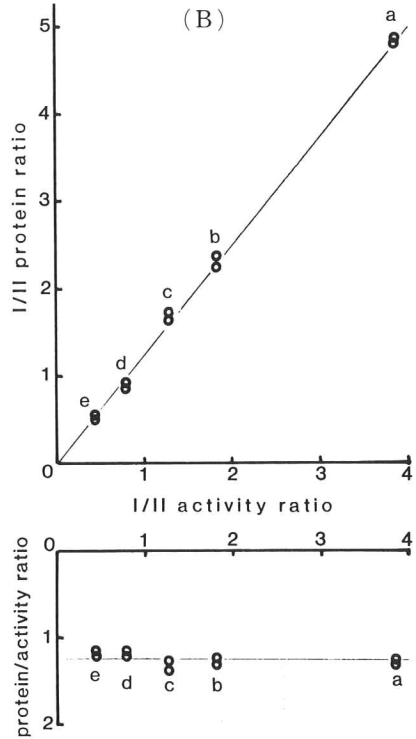
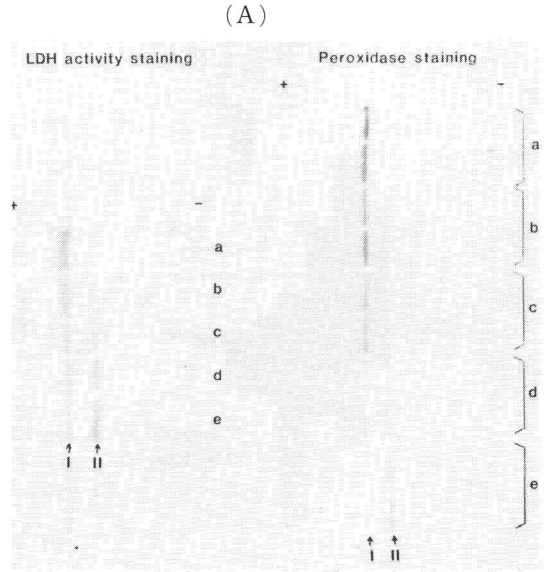


Fig. 4. (A) LDH zymogram of activity staining (left) and of peroxidase staining after blotting (right). Samples are mixtures of prepared LDH-I and II at five ratios (a-e).

(B) Relation between activity ratio and protein ratio of I/II.

The proportion of I and II is detected by densitometry.

ト欠損と正常の間に1%の危険率で有意差を認め、有意な指標として捉えることができた。特にその中でも、Hサブユニット欠損の検出はII/III比、I/III比が、またMサブユニット欠損の検出はI/II比、I/III比の効率が良いことが判明した。

4) Western blotting 法

精製したI型とII型の5種類の割合の混合液は、電気泳動後のLDH活性染色ならびにWestern blotting法によるペルオキシダーゼ発色によってI型とII型の2本のバンドが染色された(Fig. 4 A)。LDH活性でみた場合のI型とII型は同等に染色されるが、蛋白としてみるペルオキシダーゼ発色の系ではHサブユニットの多いI型の方が相対的に濃く染色されるはずである。従って、I/II比を活性量、蛋白量でそれぞれ計算し、Fig. 4 B上のグラフとして表した。その蛋白量と活性量の比率をFig. 4 B下に表したが、ほぼ1.2となり、蛋白量でみたとき、I型がII型より約1.2倍高くみえるで

あろうと推測された。

正常溶血液、H、Mサブユニット欠損ヘテロ接合体は抗Hサブユニット抗体を用いたWestern blotting法によるペルオキシダーゼ発色によって、I型、II型の2本のアイソザイムの存在が確認できた。Mサブユニット欠損症ホモ接合体においてはI型のみしか存在せず、heterotetramerは存在しないことが示された(Fig. 5 A)。そして、I/II比の蛋白量と活性量の比率をプロットすると(Fig. 5 B)、Mサブユニット欠損ヘテロ接合体は正常対照とほぼ同じであったのに対し、Hサブユニット欠損ヘテロ接合体は明らかに高値を示しており、平均値のt検定においても1%の危険率で有意差が確認された。そして、H、Mサブユニット欠損ヘテロ接合体と正常の活性量としてのI/II比、蛋白質としてのI/II比、それら両者の比率をプロットすると(Fig. 5 B右)、以下の3点の結果が得られた。

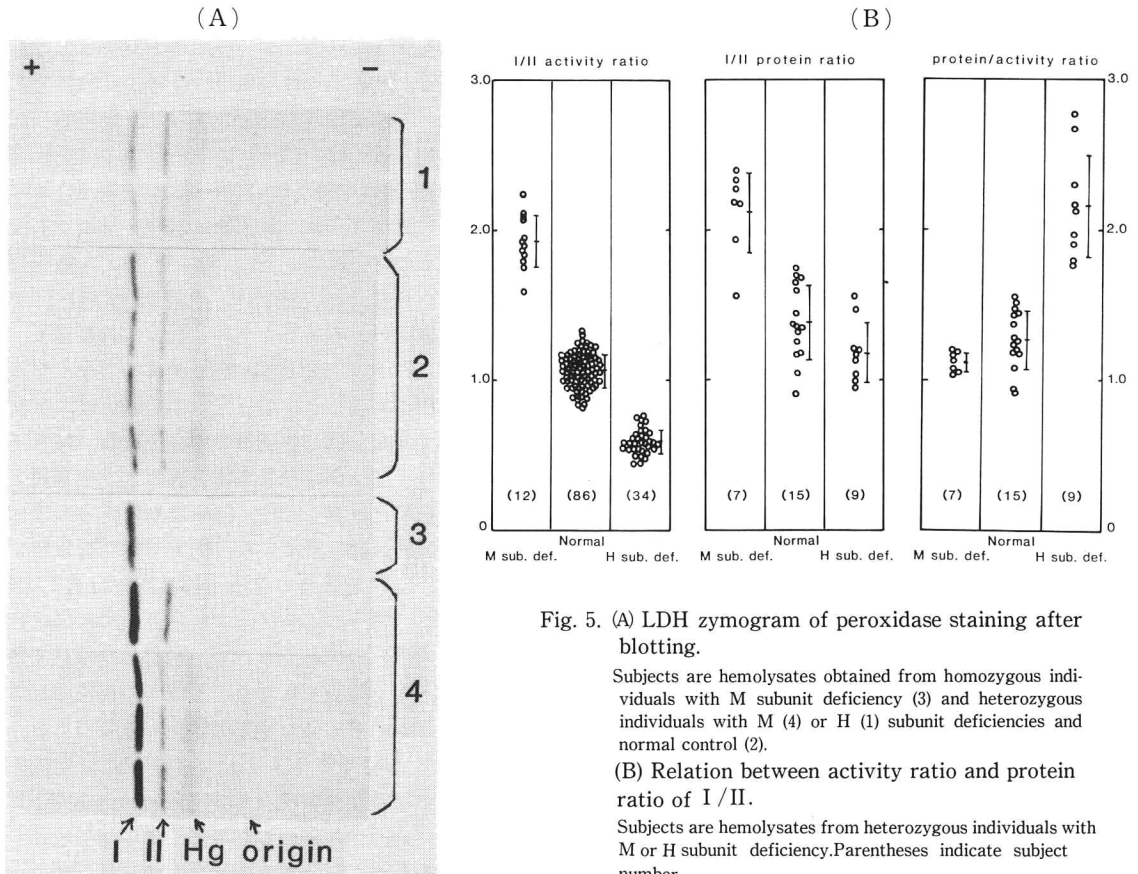


Fig. 5. (A) LDH zymogram of peroxidase staining after blotting.

Subjects are hemolysates obtained from homozygous individuals with M subunit deficiency (3) and heterozygous individuals with M (4) or H (1) subunit deficiencies and normal control (2).

(B) Relation between activity ratio and protein ratio of I/II.

Subjects are hemolysates from heterozygous individuals with M or H subunit deficiency. Parentheses indicate subject number.

(1)活性としてのI/II比はサブユニット欠損の判定に最も簡便な検出方法である。(これは、既に報告したH/M比⁵⁾と並んで効率が良いと考えられる。)

(2)タンパク量としてのI/II比はMサブユニット欠損では高く($p < 0.01$)、また、Hサブユニット欠損では正常とほぼ同じレベルである。

(3)同じ活性を示す蛋白量として捉えた蛋白量と活性量とのI/II比の比率は、Mサブユニット欠損では正常とほぼ同じレベル、Hサブユニット欠損では正常よりも有意に高い($p < 0.01$)。すなわち、Mサブユニット欠損では活性としてのI/II比が高いのは蛋白としてI型がII型より高いためであって、Hサブユニット欠損では活性としてのI/II比が低いが、蛋白量としてはI型はII型と同じくらい生成されていると解釈できる。また、検索されたHサブユニット欠損ヘテロ接合体の家系間の差異は特に認められず、Hサブユニット欠損例はこれまでの結果では不活性サブユニットの産生と考えられる例が全てであった。

考 察

日常検査データにおいて、LDH活性は増加することに主に診断的意義が見いだされている。しかしながら、サブユニット欠損症をはじめとして、サブユニット変異症^{19,20)}、LDHに対する失活因子(主に免疫グロブリン)^{21,22)}、その他種々の病態で低LDH活性を呈することがある。浜松医科大学附属病院検査部に依頼のあった検体約4万のうち0.315%が健常者集団で求められたmean-3SDである140WU以下を示していたことは、統計学的に得られる数値より高い。患者群という特殊な集団を対象にしているため、平均値の移動のみならず分散の拡大が生じているためと思われるが、それによってサブユニット欠損ヘテロ接合体の検出率も高くなっている可能性も生じると考えられる。H、Mサブユニット欠損症ヘテロ接合体の頻度が、それぞれ、0.065%、0.015%であり、サブユニット欠損のモデルを用いたシミュレーションにより得られた低LDH活性の占める割合を考慮し、隠れている部分も加えた全体を計算すると、Hサブユニット欠損が0.340%、Mサブユニット欠損が0.417%となり、以前健診者のスクリーニングによって得られた頻度⁹⁾0.159%、0.185%に比べてそれぞれ、2.1倍、2.3倍高いものとなった。この結果は、シミュレーションで健常者群を基準にして計算しているためか、もしくはサブユニット

欠損のモデルとして活性を半分と仮定したためかによって、サブユニット欠損症の中で低LDH活性を呈する群の割合が過小評価されたためであるかもしれないが、先に述べたごとく患者群という分散の拡大が生じた集団からのサブユニット欠損の検出率が高くなっているためとも考えられる。いずれにせよ、Fig. 2の実際にスクリーニングで得られたサブユニット欠損例の分布より、シミュレーションで得たサブユニット欠損の血清LDH活性の分布は十分信頼できると考えられる。従って逆に、サブユニット欠損はHもMも必ずしも低LDH血症を呈するとは限らないという結論を導くことができた。

LDHサブユニット欠損症ヘテロ接合体は、Hにおいては赤血球溶血液のLDHアイソザイムパターンによるH/M比の低いこと、ヘモグロビンもしくは赤血球あたりの活性が低いことによって判明し、Mにおいては、H/M比の高いことであつた⁴⁾。しかし、サブユニット欠損は遺伝的なものであり全身のあらゆる臓器、細胞にまで及んでいると考えられるため、その総和からなる血清LDHにサブユニット欠損は反映していると考えられる。そこで、日常検査で分析する検体である血清を用いた検出論理を検討してみた。先に示したように総活性のみでは一部分しかひろうことはできない。血清LDHアイソザイムパターンは、Fig. 3, 4に示したようにHサブユニット欠損、Mサブユニット欠損、ともにそのサブユニットの少ないと考えられるパターンが得られた。この結果は、血清LDH総活性が種々の細胞破壊のある病態で上昇し難いのみならず、アイソザイムパターンの変化が疾患特異的でなくなるという危険性があることを示している。例えば、Hサブユニット欠損症では心筋梗塞や溶血性貧血、Mサブユニット欠損症では肝炎や骨格筋障害のような病態で疾患特異性が得られなくなり、臨床診断に思わぬ落とし穴となる危険性をはらんでいる。一方、健常な状態ではサブユニットが足りないという特徴的な血清LDHアイソザイムパターンはサブユニット欠損の検出に有効であり、判別しやすい。そこで、判明した時点で緊急時の検査過誤を防止するためにも個人の属性としておくことが個人のためにも検査医学上も重要である。

今回検索したMサブユニット欠損症^{3,4)}には抗体と反応する蛋白は存在せず¹²⁾、また、heterotetramerの形成もないため、活性基のみならず、4量体形成基も欠失している極めて不完全な断片的な変異サブユニッ

Table 1. Characteristics of LDH subunit deficiencies

Origin of Decision		
	from routine laboratory data	Clinical symptoms
	not low serum LDH activity	myoglobinuria
homozygote	only one isozyme (I)	disturbance of delivery skin lesions
M	low serum LDH activity (1/20*)	no clinical symptoms
heterozygote	serum LDH isozyme: ratios of I/II, II/III, and I/III increase.	laboratory pitfalls (hepatitis, muscle damage, etc.)
	low serum LDH activity	no clinical symptoms
homozygote	only one isozyme (V)	
H	low serum LDH activity (1/5*)	no clinical symptoms
heterozygote	serum LDH isoenzyme: ratios of I/II, II/III, and I/III decrease.	laboratory pitfalls (hemolysis, myocardial infarction, etc.)

* an approximate frequency

トが存在しているか、もしくは全く合成されていないかのいずれかであることが改めて認識された。また、ヘテロ接合体（ホモ接合体^{3,4}の家系内およびヘテロ接合体しか見いだされていない家系）の Western blotting 法による結果よりも、Hサブユニットと4量体を形成する変異MサブユニットはMサブユニット欠損症の家系全例で存在しないことが判明した。一方、Hサブユニット欠損症は、ヘテロ接合体の Western blotting 法の結果より蛋白量と活性とに解離がみられ、今回分析したヘテロ接合体の家系は全て、変異サブユニット蛋白が存在し、家系間の差異は特に認められなかった。この結果は、以前報告した結果^{10,11}と合致するものである。これは、パナマやコスタリカのインディアンに遺伝的多型としてみられる LDH_BGUA-1^{23,24}がそれ自身だけでは活性を有しないが、正常のMまたはHサブユニットと4量体を形成すると活性をもつことと対照的で興味深い知見である。いずれにせよ、今回検索したHサブユニット欠損症も LDH_BGUA-1も4量体形成基には異常はないが、活性基に異常を生じる変異であろう。

以上に示したようなMサブユニット欠損症とHサブユニット欠損症の相違は、今後の RNA, DNA のレベルでの解析に興味深い疑問を投げかけてくれる。また、サブユニット欠損の遺伝子の起源についても興味あるところである。

最後に、今回対象としたH, Mサブユニット欠損症ホモ接合体、ヘテロ接合体についての種々な観点からの特徴を Table 1としてまとめた。現時点では臨床的にはHサブユニット欠損症のホモ接合体、ヘテロ接合体、Mサブユニット欠損症は検査データの落とし穴としての色合いが強く、Mサブユニット欠損症ホモ接合体のみ激しい運動後のミオグロビン尿症、分娩時のトラブル、皮膚症状といった臨床症状を呈すると考えられる。

まとめ

乳酸脱水素酵素 (LDH) サブユニット欠損症ヘテロ接合体の検出論理について検討した。サブユニット欠損症は、検査データからのスクリーニング、シミュレーション、家系検索の結果から、必ずしも低LDH血症

を示すとは限らず、一部分に過ぎないことが判明した。しかし、その血清 LDH アイソザイムパターンは特徴的であった。

抗Hサブユニット抗体を用いたウェスタンブロッティング法により、赤血球を試料としてI、II型の検出を試みたところ、Mサブユニット欠損症ホモ接合体にはII型は存在せず、正常Hサブユニットとのheterotetramerは存在しないことが判明した。また、ヘテロ接合体は、I/II比の活性量、蛋白量での比較により、Mサブユニット欠損は、変異サブユニット蛋白は存在せず、Hサブユニット欠損は、活性のない変異サブユニット蛋白が存在すると推定された。

謝 辞

本研究の御助言、御校閲を賜りました浜松医科大学検査部、菅野剛史教授ならびに東京慈恵会医科大学臨床検査医学、須藤加代子講師に深謝いたします。

本研究の一部は文部省科学研究費補助金(No62771983)によった。

文 献

- 1) Markert, C.L. and Moller, F. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **45** : 753, 1959.
- 2) Kitamura, M. et al. : Clin. Chim. Acta, **34** : 419, 1971.
- 3) Kanno, T. et al. : Clin. Chim. Acta, **108** : 267, 1980.
- 4) Maekawa, M. et al. : Am.J.Hum. Genet., **36** : 1204, 1984.
- 5) 浮田 実, 他 : 東京医科大学雑誌, **43** : 1140, 1985.
- 6) 北村元仕 : 日本臨床病理学会第3回特別例会要旨集 : 20, 1987.
- 7) Miwa, S. et al. : Acta Haematol. Jap., **34** : 228, 1971.
- 8) 小林 浩, 他 : 日産婦誌, **36** : 1725, 1984.
- 9) Yoshikuni, K. et al. : Arch. Dermatol., **122** : 1420, 1986.
- 10) Maekawa, M. et al. : Clin. Chem., **32** : 116, 1986.
- 11) Sudo, K. et al. : Biochem. Genet., **24** : 625, 1986.
- 12) Maekawa, M. et al. : Am.J.Hum. Genet., **39** : 232, 1986.
- 13) Wroblewski, F. and LaDue, J.S. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **90** : 210, 1955.
- 14) 塩谷美枝子, 他 : 臨床病理, **19** : 469, 1971.
- 15) 中村和行, 竹尾和典 : 生物物理化学, **30** : 139, 1986.
- 16) Towbin, H. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76** : 4350, 1979.
- 17) 桜林郁之介 : 生物物理化学, **28** : 369, 1984.
- 18) Burd, J.F. and Gomez, M.U. : Biochim. Biophys. Acta, **310** : 238, 1973.
- 19) Boyer, S.H. and Fainer, D.C. : Science, **141** : 642, 1963.
- 20) Nance, W.E. et al. : Science, **142** : 1075, 1963.
- 21) Nagamine, M. : Clin. Chim. Acta, **50** : 173, 1974.
- 22) Maekawa, M. et al. : Clin. Chem., **32** : 1347, 1986.
- 23) Tanis, R.J. et al. : Am.J.Hum. Genet., **29** : 419, 1977.
- 24) Mohrenweiser, H.W. and Novotny, J.E. : Biochim. Biophys. Acta, **702** : 90, 1982.