The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Lactic Dehydrogenase (LDH) の耐熱性とその臨床応用
Author(s)	宮本, 純一
Citation	大阪大学, 1966, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/28899
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【53】

氏名・(本籍)	宮本純一（みやもとじゅんいち）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 909 号
学位授与の日付	昭和41年3月28日
学位授与の要件	医学研究科内科系 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**Lactic Dehydrogenase (LDH) の耐熱性とその臨床応用**
論文審査委員	(主査) 教授 西川 光夫 (副査) 教授 須田 正巳　教授 山村 雄一

論文内容の要旨

〔目　　的〕

1959年 Markert, Möller が isozyme なる言葉を提唱して以来，いわゆる酵素の isotope として isozyme の臨床への応用が強く叫ばれる様になっている。

LDH の isozyme は Neilands によって1952年牛心より見出されたが，その臨床応用は Vesell, Wrobléwski, Stranjord 等によって進められ，既に多くの知見が積まれてはいるものの，isozyme の分離の煩わしさも加わって，実地臨床面での活用は，未だ充分になされているとは言えない。

その為，著者は LDH の isozyme にみられる性状の差異に検討を加えて，isozyme 定量の簡素化を試みると共に，併せて本酵素で直面して来る実地臨床面での問題点を探ってみた。

〔方法並びに成績〕

1，血清 isozyme と組織 isozyme との対比

A：pattern での検討：血清を DEAE Sephadex A-50 column chromatography で，Fr. I (γ-globulin), Fr. II ($\beta+\alpha_2$ globulin), Fr. III (albumin), 及び Fr. IV (albumin$+\alpha_1$ globulin) に分画した。各分画中の LDH 活性を Kaplan 等の方法で測定してみると，正常人血清の場合には Fr.III に，肝炎血清では Fr. I, II, IV に，心筋梗塞血清では Fr. III, IV に主なる活性がみられた。（ろ紙電気泳動等での検討で，Fr. I の LDH は Wrobléwski 等の LDH_5 に，Fr. II は LDH_4 に Fr. III は LDH_{3+2} に，Fr. IV は LDH_1 にそれぞれ相応している）

ヒト肝及び心に，それぞれ10倍量の溜水を加えてホモヂナイズ後，その 10^4 rpm 遠沈上清を，上記 column で展開してみると，肝では Fr.I に，心では Fr. III, IV に活性がみられた。従って，心筋梗塞血清でみられた Fr. III, IV の LDH は心から，肝炎血清での Fr. I は肝から，それぞれ遊出して来たものと理解される。

B：熱抵抗性での検討： 65°C，30分加熱し，残る活性を血清での各分画でみてみると，Fr. I の LDH は熱に不安定，Fr. IV は安定で，Fr. III はその中間と，各々耐熱性が異なっていた。

ところが，組織抽出液での分画では，Fr. I, III は共に熱に不安定，Fr.IV の LDH でもその活性は18.3%，54.2%としか残らず，いずれの分画をとっても，血清とは異なり，著しく不安定となっていた。

然し，かゝる組織と血清での態度の矛盾は，組織分画液に血清蛋白を予め添加して後，熱処理を行なう事によって解かれる。即ちその蛋白が albumin の場合には，その失活は Fr.I, III, IV の順序で段階的な防止が惹起されたが，γ-globulin では保護作用は認められなかった。したがって，この性質を利用すれば，isozyme の定量が可能となろう。

2　isozyme の簡易測定法としての検討

A：純型 isozyme：ヒト心からは Reeves 等の方法で，ヒト骨核筋からは Nisselbaum 等の方法で，それぞれ超遠心で one peak 程度に精製を進めた酵素標品 LDH_5 (M_4) と LDH_1 (H_4) を，種々の割合に混合し，albumin 7mg/ml の共存下で，65°C 5分加熱すると，その残存活性（%）と，混在する H_4 含量との間には，直線関係が認められて来た。

B：混合型 isozyme： Markert の方法で，LDH_4 (HM_3)，LDH_{3+2} ($H_2M_2+H_3M$) を作製した。即ち上記の H_4 と M_4 を，それぞれ同じ活性だけ試験管に加え，1M NaCl と albumin 1mg/ml の共存下に，一夜凍結を行なうと，その chromatogram には，最初に加えた筈の Fr.I (M_4) と Fr. IV (H_4) は殆んど消失し，Fr. III ($H_2M_2+H_3M$) に，高い活性が現われて来る。

そこで，こゝで得られる各試験管液について，上記条件下（2. A.）で熱処理を行ない，残る活性（%）を測定して行くと，やはり溶出量（H subunit の量）と熱抵抗性の間に，直線的な関係が得られた。

所で，熱処理後の〝いわゆる活性が50%低下している〟Fr.Ⅲ の溶液を，更に rechromatography にかけてみても，活性は Fr. I, IV には現われて来ず，Fr.III にのみ存在しているので，この場合 LDH は H_2M_2 の型のまゝで，50%の失活が生じているものであろうと理解されよう。

以上熱処理を用いる事により，理論的には LDH の H量，M 量を測定出来る事が示されたが，それは実地面でも活用し得る事が確められた。

3，診断面からみた血清 chromatogram と上記検査法

chromatogram（上記の方法による）からは，ヒト主要臓器は3群に大別しうるものの，各群中での相互の特徴は求めがたい。また臓器によっては，どの部位をとるかで，異なった Pattern が認められて来るので傷害臓器の血清への投影は，2，3の急性疾患に限られ，もちろん慢性疾患では，血清でその特徴は摑め得なかった。その際どちらの subunit が増量して来るかが知り得る上記検査法は，より容易に疾患の追跡を可能となし得よう。

〔総　　括〕

① 組織中の LDH が血清中へ移行した場合，特定の血液蛋白と interaction を持ち得る isozyme が，熱抵抗性を有することが知られた。

② ある条件で，LDH に dissociation-association が起るので，生理的意味はその chromato-

gram より subunit の量にある。 isozyme の耐熱性は H-subunit に起因し，その量は albumin 存在下での65°C，5分の熱を加えて残る活性として求められる。

③ 事実 chromatogram によっても，主要臓器は3群にしか分割され得ず，従ってそれが投影される血清の level での検討には，上記の定量法は chromatogram に代用され得るであろう。

論文の審査結果の要旨

1959年 Markert, Möller が Isozyme なる言葉を提唱して以来，いわゆる酵素の Isotope として，Isozyme の臨床への応用が強く叫ばれる様になっている。LDH を用いたこの種の研究は，既に数多くなされて来ているが，5つの Isozyme の量比にその意味をもたせようとしたものが多い。

しかし LDH が二種のペプタイド (H, M Subunit) で構成された四量体として存在することが示されている現在，問題とされるべきはその二種のペプタイドの量である点を，更に著者は耐熱性の差異が，それぞれの Isozyme に含有されている H Subunit に基因していると言う新知見を加えて，本論文で主張している。

即ち著者は，まず臓器 Homogenate の遠心上清 (10^4rpm,20分) 及び血清から，それぞれ DEAE-Sephadex A-50 column chromatography を用いて，いわゆる血清 Isozyme と組織 Isozyme をとりその耐熱性を比較検討している内に，Isozyme の耐熱性がアルブミン関与のもとに荷電の強さに応じて段階的に高まって来る事に気付いている。

そしてこの様な差異は，ヒト心，ヒト筋から精製した H_4,M_4,更にこの両者から Markert の方法で人工的に作った Hybrid type (H_3M_1, H_2M_2, H_1M_2) らを被検材料としても，やはり認められて来る事を確かめている。

この結果はつまるところ，LDH は Isozyme として5種に区別出来ても，それは実質耐熱性をもつ H と，もたない M subunit の構成物に他ならないことを意味し，従ってこれを応用しての定量法は，実地臨床面での著者の成績の示す如く，chromatogram より有意義であるものと考える