

LDH-H subunit variant の2家系について

日高 宏哉¹⁾ 齊藤 博²⁾ 藤森 芳史²⁾
石田 文宏²⁾ 太田 浩良¹⁾ 古田 精市²⁾
勝山 努³⁾ 金井 正光³⁾

1) 信州大学医学部附属病院中央検査部

2) 信州大学医学部第2内科学教室

3) 信州大学医学部臨床検査医学教室

A Study on Two Families with LDH-H Subunit Variants

Hiroya HIDAKA¹⁾, Hiroshi SAITO²⁾, Yoshifumi FUJIMORI²⁾
Fumihiro ISHIDA²⁾, Hiroyoshi OTA¹⁾, Seiichi FURUTA²⁾,
Tsutomu KATSUYAMA³⁾ and Masamitsu KANAI³⁾

1) *Central Clinical Laboratories, Shinshu University Hospital*

2) *Department of Internal Medicine, Shinshu University School of Medicine*

3) *Department of Laboratory Medicine, Shinshu University School of Medicine*

Two cases with LDH-H subunit variants are reported. The 1st case is a patient with acute megakaryoblastic leukemia (M7) and the 2nd is a normal person. On routine cellulose acetate electrophoresis (25min. at 180V), the serum LDH 1-4 isoenzymes from the 2 cases moved more slowly as wider separating bands compared with those of a control person. The LDH-1, 2, 3 and 4 isoenzyme fractions were separated into 5, 4, 3, and 2 subfractions respectively on longer electrophoresis (60~70 min.). The relative concentrations of the subfractions in each isoenzyme fraction corresponded to the binomial distribution pattern that the subfractions are composed of random tetrameric association of LDH-H (normal) or H' (variant subunit) and LDH-M subunit. With family study of the cases, the same LDH variants were observed for 3 generations in the family of an older sister of the 1st case and for 2 generations in the family of the 2nd case.

It was reported that the incidence of the LDH-H subunit variant is approximately 0.01% in Japan. We find much interest in having two LDH-H subunit variants with slightly different electrophoretic mobility and Km for lactate, though the families live in neighboring mountainous region in Shinshu District. *Shinshu Med. J.*, 37: 321-326, 1989

(Received for publication February 8, 1989)

Key words: LDH isoenzyme, subunit variant

LDH アイソザイム, ザブユニット変異

I はじめに

Lactate dehydrogenase (LDH: EC 1. 1. 1. 27)は、M-サブユニットとH-サブユニットからなる4量体で電気泳動法により5つのアイソザイム LDH 1 (H_4), LDH 2 (H_3M), LDH 3 (H_2M_2), LDH 4 (HM_3), LDH 5 (M_4) に分離される。M-サブユニット遺伝子はNo. 11染色体 (11p14-p12), H-サブユニット遺伝子はNo. 12染色体 (12p12.2-p12.1) に局在することが知られている。LDH サブユニット異常は1963年, Boyer ら¹⁾により赤血球を用いてヘモグロビン異常を検討中にLDH-H サブユニットバリエーションとして初めて見いだされ、さらに Nance ら²⁾により LDH-M サブユニットバリエーションが見いだされた。これらのサブユニットバリエーションについても異なる荷電を持つ変異種が存在し、電気泳動による移動度の違いにより8種類のタイプに分類されLDH サブユニットの遺伝子型としていくつか報告されている³⁾。わが国においても、1973年菅野ら⁴⁾により LDH-H サブユニットバリエーションが見いだされて以来数例報告されているが⁵⁾⁻⁹⁾症例数が少なくLDH バリエーションの構造異常や疾患との関連についての詳細は不明である。

今回我々はLDH アイソザイム像で通常のLDHの5分画像に比べてLDH 1, 2, 3, 4型の移動度が陰極側にずれ幅の広い活性帯を示したLDH-H サブユニットバリエーションの2症例を見いだしたので、これらvariant 症例のLDH ゼイモグラム, LDHの性状について検討を行い、さらに家系検索も行ったので報告する。

II 材料および方法

A 発端者

第1例(M. A.)は信州大学病院第2内科に受診し巨核芽球性白血病(M7)と診断された75歳男性でLDH アイソザイム検査により、第2例(H. O.)は健常者のLDH アイソザイムのスクリーニングにより見いだされた。両者ともに長野県で隣接する地域の出身であった。

B 材料

両発端者とその家族およびコントロールとして健常者より血液を採取し、3,000rpm, 10分遠心分離し血清を得た。また一部の血液は抗凝固剤EDTA-2Kを含む採血管に採取し200rpm, 10分遠心分離し上層のPRP (platelet rich plasma) を3,000rpm, 10分

遠心し血小板を得た。また下層の血球層は生理食塩水で洗浄した後、3,000rpm, 10分遠心し血球境界面のbuffy layerの白血球層と赤血球層を分取した。分離した血清, 血小板, 白血球, 赤血球は使用するまで -70°C で保存した。

C 方法

1 臨床血液データはELT-8血球計数装置(オーソ社), 臨床化学データはSMAC system (テクニコン社), LDHの活性はCOBAS FARA (ロシュ社)を用いて測定した。

2 LDH ゼイモグラムはヘレナシステム(ヘレナ社)を用いて行った。通常分画像はセルロースアセテート膜(タイタンリポ用膜)により電極液としてトリス・バルビタール(pH8.6, $\mu=0.01$)を用いて冷却下に180V, 25分電気泳動を行った後ジホルマザン法によりLDH活性染色を行った。長時間泳動は塗付点を通常より陰極側にずらしてアセテート膜(タイタン Vis用)によりバルビタール緩衝液(pH8.6, $\mu=0.01$)を用いて冷却下に180V, 60~75分(マーカーが陽極端に達するまで)電気泳動を行い上記と同様にLDH活性染色を行った。活性帯は495nmでスキャンを行った。

3 LDL アイソザイム分画の精製はQAE-Sephadex A50カラムクロマトグラフィーを用いて分離した¹⁰⁾。QAE-Sephadex A50は0.02M Tris/HCl緩衝液(pH6.4)で懸濁しカラムにつめた後、同じ緩衝液で洗浄した。検体も同じ緩衝液で1晩透析した後カラムに添加した。緩衝液にNaCl濃度が0, 60, 100, 145, 240 mMになるように調製し段階的に溶出してLDH 5~1の分画を得た。

4 LDHの分子サイズはゲルろ過カラムクロマトグラフィー法により測定した。Sephacryl S-300ゲルを0.04Mリン酸緩衝液(0.15M NaCl, 0.01% EDTA 2Na, pH6.4)で懸濁しカラムにつめた後、同じ緩衝液で洗浄した。検体を添加した後、同じ緩衝液で溶出し各分画のLDH活性を測定した。

III 結果

A 臨床血液, 化学データ

発端者および家族の臨床血液, 化学データを表1に示した。

第1例(M. A.)は末血の赤血球が低値で若干貧血があったが白血球, 血小板の増加を認め、特に血小板はその後の経過でも著明な凝集塊を形成しており100-

LDH-H subunit variant の2家系について

表1 LDH-H subunit variant 症例の臨床検査データ

項目	正常値	第1家系					第2家系	
		M. A*. Y. A.	K. S.	N. A.	K. A.	H. O*. M. O.		
LDH	103-216 U/L	546	159	185	150	137	133	200
GOT	8- 38 K. U.	23	22	18	30	11	17	15
GPT	4- 44 K. U.	9	15	12	24	14	36	4
CK	30-272 U/L	20	64	108	54	75	102	147
血小板数	12.7-36.8 × 10 ⁴ /μl	>100	20.6	33.3	—	24.6	23.7	—
LDH isozyme	LD 1 19-33%	31.3	26.6	35.8	38.6	27.5	32.8	30.8
	LD 2 30-41%	45.6	31.2	36.4	28.1	30.9	32.8	30.8
	LD 3 20-28%	17.9	25.8	20.3	22.1	25.7	21.1	21.7
	LD 4 4-14%	4.1	9.4	4.0	6.7	9.5	2.3	5.1
	LD 5 2- 9%	1.1	7.0	3.5	4.5	6.4	3.3	5.4

* : 発端者, M : Male, F : Female

200万の高値であった。ALP, GOT, GPT, CK, γ -GTP などの血中酵素活性は正常であったが, LDH のみが500U/l 前後の高値を示していた。本例の末梢血中には芽球を認め, この細胞の電顕的血小板ペルオキシダーゼ (PPO) および細胞表面の GPIIb-IIIa 免疫染色の陽性所見により 巨核芽球性白血病 (FAB 分類 M7) と診断した。

第2例 (H. O.) は健康人であり臨床データは全て正常であった。

B 血清中 LDH ザイモグラム

第1症例のセルロースアセテート膜による通常電気泳動と長時間電気泳動による LDH ザイモグラムを図1に示した。

通常電気泳動による患者血清 LDH アイソザイムは LDH 2型が高値のパターン (LDH 1=31%, LDH 2=46%, LDH 3=18%, LDH 4=4%, LDH 5=1%) であり, 泳動像では LDH 1, 2, 3, 4が正常者に比べて陰極側にずれており, そのずれ方は LDH 4<3<2<1の順に大きくなっていった。また活性帯も LDH 4<3<2<1の順に幅広くなっていった。さらに長時間電気泳動による LDH ザイモグラムでは LDH 1が5本, LDH 2が4本, LDH 3が3本, LDH 2が2本, LDH 5が1本の活性帯に分離された。この LDH アイソザイムを 495nm でデンシトメトリーを行うと各アイソザイム中の亜分画の活性比率は, LDH 1では陽極側より6.9, 28.8, 39.3, 18.4, 6.4%, LDH 2では13.3, 39.2, 34.7, 12.8%, LDH 3では28.0, 49.6,

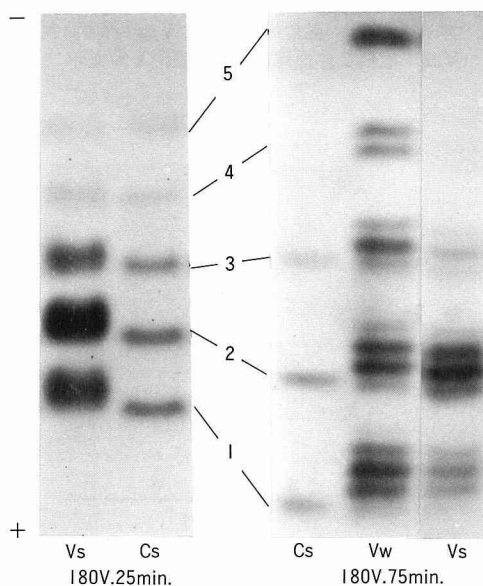


図1 セルロースアセテート膜通常電気泳動 (180V, 25min.) と長時間電気泳動 (180V, 75min.) による症例1 (M. A.) のLDH ザイモグラム。Cs : 正常対照血清, Vw : バリエント白血球, Vs : バリエント血清

22.4%, LDH 4では48.3, 51.7%であった。

第2症例の LDH ザイモグラムは第1症例と同様に通常電気泳動で LDH 1から4の各分画がいずれも陰極側にずれており, 長時間泳動においても明らかに

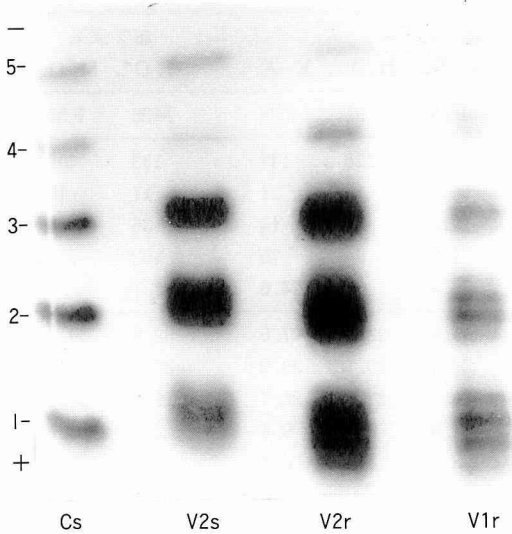


図2 セルロースアセテート膜長時間電気泳動(180V. 75min.)による症例2(H.O.)のLDH ザイモグラム。Cs: 正常対照血清, V2s: 症例2血清, V2r: 症例2赤血球, V1r: 症例1赤血球

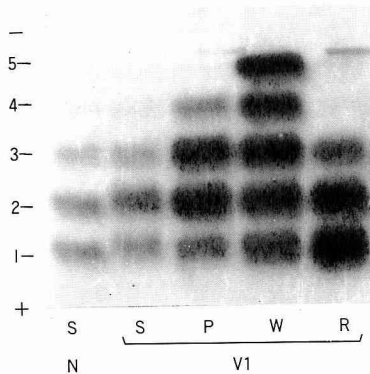


図3 症例1の血球中のLDH ザイモグラム。N: 正常人, V1: 症例1, S=血清, P: 血小板, W: 白血球, R: 赤血球

LDH バリエーション像を認めた(図2)。しかし第1症例に比べ各画の移動度のずれは全体的に小さく、画分画の分離も鮮明でなかった。

C 各種血球中のLDH ザイモグラム

両症例ともに赤血球, 白血球, 血小板中のLDH アイソザイムは血清LDHと同様にLDH 1-4の各分画が陰極側にずれた幅の広い活性帯を示し(図3), 長時

間泳動でもLDH 1-4は5~2本の活性帯に分離された(図1, 2)。

D LDH バリエーションの性質

LDH バリエーションの性質について検討を行った。分子サイズはSephacryl S-300によるゲル濾過クロマトグラフィー法により正常者およびIgG結合LDH含有患者血清と比較した。IgG結合LDHでは分子量約30万で正常LDHに比べ大きな分子サイズを示すが, 2例のLDHは正常LDHと同様に分子サイズが約14万程度であった。また赤血球溶血液中LDHの熱安定性を55°Cと60°Cの湯浴中で5~30分インキュベートし活性の失活率を検討した。両症例とも正常溶血液とはほぼ同様に55°Cではほとんど変化はなく, 60°C 15分で, 10~13%の失活がみられた(図4)。さらに, 乳酸に対する見かけのKm値は各濃度の基質を用い

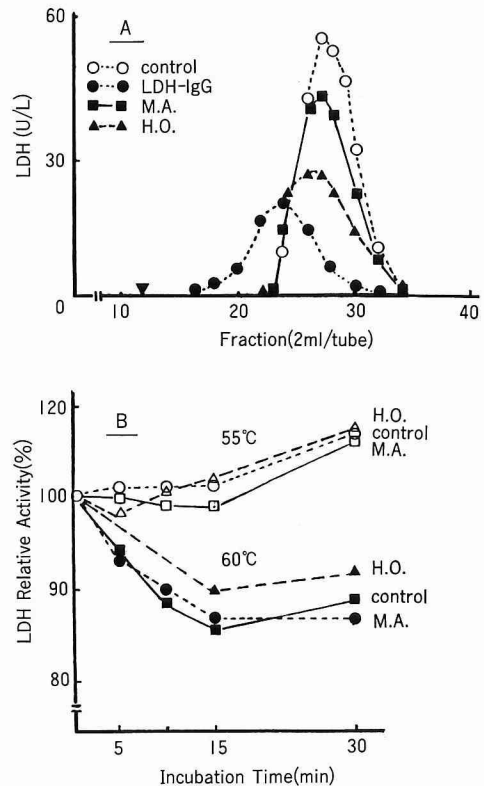


図4 Sephacryl S-300 gel filtrationによるLDHの分子サイズ(A)と赤血球溶血液中LDH活性の55°Cと60°Cにおける熱安定性(B)。M.A.: 症例1, H.O.: 症例2, LDH-IgG: IgG結合LDH症例, control: 正常人対照

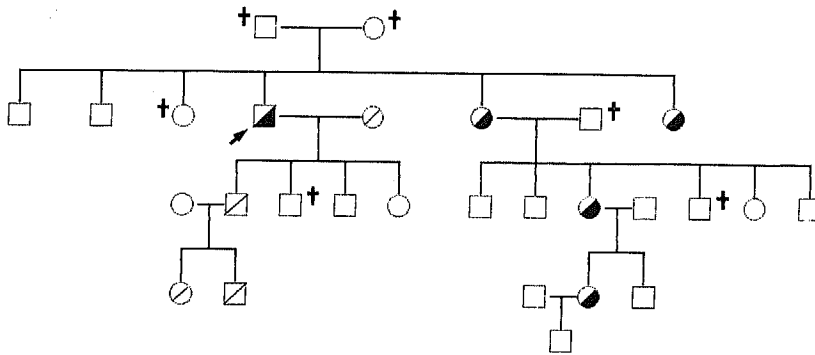


図5 症例1(M.A.)の家系

➤：発端者，■●：variant LDH，□○：正常 LDH，その他は未検査

て活性を測定し検討した。症例1とコントロールの LDH 1 はともに $1.07 \times 10^{-2} M$ であったが、症例2では $1.62 \times 10^{-2} M$ と若干大きな Km 値を示した。

E 家系検索

図5に第1症例の家系図を示した。臨床データは発端者を除きほとんど全て正常であった(表1)。LDH ザイモグラムは発端者の息子および孫では正常であったが発端者の姉2人が発端者と同様の LDH ザイモグラムを示し、長時間泳動においても同様に LDH 1~4 が5本から2本の活性帯を示した。また、赤血球中の LDH アイソザイムも同様であった。また1人の姉の家族では娘、孫と3代にわたり同様のバリエントが認められた(図5)。

第2症例の家系調査はまだ不十分であるが、母親にまったく同様のバリエントを認めたものの妹は正常であった。なお、2家系は長野県中信地区の隣同志の山村の居住者であるが、親族関係は認められなかった。

IV 考 察

今回我々は、M7と診断された白血病患者の LDH アイソザイムの検査と健康人の LDH アイソザイムのスクリーニングにより2例の LDH サブユニットバリエントを見いだした。

両症例は LDH ザイモグラムの LDH 1-4 の移動度が通常に比べ陰極側にずれ、活性帯が幅広い異常バンドとして見いだされた。その程度は $LDH\ 4 < 3 < 2 < 1$ の順に大きくなることから H-サブユニットの異常が考えられた。さらに長時間電気泳動法により LDH 1 が5本、LDH 2 が4本、LDH 3 が3本、LDH 4 が2本の活性帯に分離され、その移動度から第1例は

LDH-H サブユニットバリエント slower type、第2例は slow type であることが確認された。第1例は白血球、血小板が高値を示し、特に血小板は100万以上で末血の染色像では血小板が凝集塊を形成しており血清中の LDH 活性の高値は血小板由来の可能性が考えられた。また赤血球、白血球、血小板中の LDH アイソザイムも同様なバリエントを示し、分子サイズも正常とほぼ同一であったことからこのバリエントは生合成時に生じたもので血漿中でグロブリンなどによる修飾を受けたものではなかった。またこれらの物理化学的性質も正常 LDH とほぼ同様であった。

各アイソザイムのバリエントの活性比率については、Boyer ら¹⁾は通常の H サブユニットと突然変異の H' サブユニットが at random に結合して4量体を形成したときの各アイソザイム亜分画の量的比率は二項比を示し、LDH 1型の5亜分画は1:4:6:4:1、LDH 2型の4亜分画は1:3:3:1、LDH 3型の3亜分画は1:2:1、LDH 4型の亜分画は1:1となるとしているが、第1症例のパターンもこれとほぼ一致した。

また家系調査から第1例の姉の家系では3代にわたり同様のバリエントが認められており、従来から報告されているように優性遺伝形式をとっていた。これらの LDH-H サブユニットバリエントの出現率は0.01%程度とされている¹¹⁾が、2つの若干性質の異なるタイプのバリエントが隣接する地域の2家系から見いだされたことは興味深い。

LDH-H サブユニットバリエントと疾患との関連は明らかでなく、その生理的機能についても不明である。今後さらに蛋白分子レベルおよび遺伝子レベルの解析が必要と考えられる。

文 献

- 1) Boyer, S.H., Fainer, D.C. and Watson-Williams, E. J. : Lactate dehydrogenase variant from human blood : Evidence for molecular subunits. *Science*, 141 : 642-643, 1963
- 2) Nance, W.E., Clafin, A. and Smithies, D. : Lactic dehydrogenase : Genetic control in man. *Science*, 142 : 1075-1077, 1963
- 3) Kraus, A.P. and Neely, Jr. C.L. : Human erythrocyte lactate dehydrogenase : Four genetically determined variants. *Science*, 145 : 595-597, 1964
- 4) 菅野剛史, 加野象次郎, 嵯峨実枝子, 入 久巳, 岩垣浩之, 野崎 豊 : 乳酸脱水素酵素 (LDH) の H-subunit 変異の 1 家系. *医学のあゆみ*, 87 : 621-623, 1973
- 5) 嵯峨実枝子, 菅野剛史 : 乳酸脱水素酵素 H-subunit 変異の 4 家系について. *医学のあゆみ*, 100 : 862-864, 1977
- 6) 嵯峨実枝子 : H型LDH 変異症. *生物物理化学*, 21 : 31-35, 1977
- 7) 嵯峨実枝子 : LDH-H, Mサブユニットバリエーション. *臨床病理*, 34 : 396-398, 1986
- 8) 川崎理一, 塚田敏彦, 中山年正, 北村元仕 : バリエーション異常を示した LD アノマリーの 1 例. *生物物理化学*, 30 : 106, 1986
- 9) 川崎理一, 塚田敏彦, 中山年正, 北村元仕 : 安定型, 不安定型を示した fast type LD B variant 2 例の比較検討. *生物物理化学*, 29 : 134, 1985
- 10) Mei-Yung Hsu, Kohler, M.M., Barolia, L. and Bonder, R. J.L. : Separation of five isoenzymes of serum lactate dehydrogenase by discontinuous gradient elution from a miniature ion-exchange column. *Clin Chem*, 25 : 1453-1458, 1979
- 11) 嵯峨実枝子 : LDH H subunit variant との出会い. *臨床検査*, 22 : 289-293, 1978

(1. 2. 8 受稿)