

## リンゴ酸脱水素酵素のアイソザイムに関する研究

## 第 2 編

ヒト血清及び発育過程におけるラット臓器のリンゴ酸  
脱水素酵素アイソザイムについて

岡山大学医学部平木内科教室（主任：平木 潔教授）

大学院学生 高 安 正 雄

〔昭和42年3月28日受稿〕

## 内 容 目 次

第1章 緒 言	IV ラット新生仔及び成熟ラットの各種臓器の MDH アイソザイムの測定
第2章 実験材料並びに実験方法	第3章 実験成績
第一節 実験材料	第1節 血清 MDH 活性
I 血清 MDH 活性及びアイソザイムの測定	第2節 血清 MDH アイソザイム
II 諸条件下における血清“非特異因子”	第3節 諸条件下における血清“非特異因子”
III ラット新生仔及び成熟ラット各種臓器の MDH アイソザイムの測定	第4節 ラット新生仔及び成熟ラットの各種臓器 の MDH アイソザイム
第2節 実験方法	第4章 総括並びに考按
I 血清 MDH の活性測定法	第5章 結 語
II 血清 MDH アイソザイムの測定法	
III 諸条件下における血清“非特異因子”	

## 第1章 緒 言

近年の酵素化学の進展に伴ない多数の疾患の臓器  
或いは血液成分について各種の酵素活性が測定され、  
その臨床的有用性が確認されて以来、臨床診断学は  
一層精密なものとなつた。然し酵素活性の測定のみ  
では、酵素の臓器特異性の点において、個々の疾患  
の病状を判定することは可能であるが、疾患相互の  
鑑別は困難な場合が比較的多い。

1957年 Vesell 等<sup>20)</sup> により乳酸脱水素酵素（以下  
LDH と略す）が高圧濾紙電気泳動法により5分面  
に分れることが報告され、1959年 Markert, Møller<sup>1)</sup>  
によりアイソザイムの概念が導入されたが、その後  
の研究により、アイソザイムの臓器特異性が明らか  
にされた。それ以来臨床診断学に血清 LDH アイソ  
ザイムの測定が広く応用されるに至り、臨床酵素学  
は、量的分析のみでなく、質的分析をも行い得るよ  
うになり、一層の発展が期待されるようになった。

リンゴ酸脱水素酵素（以下 MDH と略す）の活性

については、既に数種の疾患について検討され、  
その測定に臨床的有用性を認める報告もあが、MDH  
アイソザイムに関する臨床応用を目的とした研究は  
未だ数少く、然もその成績はいづれも悲観的なもの  
であつた。

著者は前編において、臓器 MDH アイソザイムを  
測定し、その結果 MDH アイソザイムが、3グルー  
プに分類されることを見出し、またその病態生化学  
的応用の可能性を示唆した。

本編においては、血清中の MDH 活性及び MDH  
アイソザイムを測定し、その臨床的意義について検  
討した。

また、血清 MDH アイソザイムのザイモグラム作  
製において、染色液中より、基質及び補酵素を除い  
ても染色される peak が認められ、それを“非特異  
因子”と名付け、その本態を究明した。また、ザイ  
モグラム作製の際その非特異因子の影響を可及的除  
去する実験方法についても考案した。

更に発育過程における LDH 及び MDH アイソ

ザイムの変動を starchgel electrophoresis により追  
求した Wiggert 等<sup>29)</sup> の仕事があるが著者は寒天ゲ  
ル電気泳動法により、詳細にラット新生仔及び成熟  
ラットの各種臓器 MDH アイソザイムパターンの相  
違を追求した。

## 第2章 実験材料並びに実験方法

### 第1節 実験材料

#### I 血清 MDH 活性及びアイソザイムの測定

各種疾患々々の血清及び健常者の血清 MDH 活性  
並びにそのアイソザイムの測定を行なった。

#### II 諸条件下における血清“非特異因子”

血清“非特異因子”の測定には健常者の血清を使  
用した。染色には phenazine methosulfate(以下 PMS  
と略す)(Sigma 社製), NaCN. (和光特級) phosphate  
buffer (PH 7.0~8.0) 及び nitrotetrazolium blue (以  
下 NTB と略す)を使用した。NTB は国産ドータイ  
トと米国 Dajack 社製のものを用いた。

#### III ラット新生仔及び成熟ラットの各種臓器の MDH アイソザイム測定

ラット諸臓器の MDH アイソザイム測定には断頭  
後直ちに開胸及び開腹を行なつて、心、腎、肝、胃  
粘膜を取り出し、Ringer 氏液で洗滌したものを使用  
した。

又成熟ラットの諸臓器 MDH アイソザイムの測定  
にはエーテル麻酔後、直ちに開胸、開腹を行ない、  
心、腎、肝、胃粘膜を取り出し、Ringer 氏液でよく血  
液を洗い流したものを使用した。

### 第2節 実験方法

#### I 血清 MDH の活性測定法

活性測定には島津ベックマン型分光光度計を用い  
た。PH 7.4 の phosphate buffer 0.3 ml, 0.0015  
M-NADH<sub>2</sub> 液 0.1 ml, 0.0076 M オキサロ酢酸 (PH  
7.4) 0.1 ml, 蒸溜水 2.4 ml を上記の順に光路 1 cm  
のキュベットに入れ、25°C に温度を平衡し、血清  
0.1 ml を加え、反応をスタートする、1 単位は上記  
の条件で 340 m $\mu$  において、1 分間に 0.01 の吸光度  
の減少を来す酵素活性である。

#### II 血清 MDH アイソザイムの測定法

アイソザイムの分離には Wieme の寒天ゲル電気  
泳動法を用いた。泳動試料に血清を用いた他は泳動  
法も基質染色液組成も前編の組織 MDH アイソザイ  
ムの測定法の項に述べたものと同様のものを使用し  
た。

### III 諸条件下における血清“非特異因子”

非特異因子の血清蛋白との関係を明らかにするた  
め、同量の血清を同時に電気泳動した後、一方に蛋  
白染色をほどこし、他方に非特異因子の染色を行な  
つた後、比較した。続いて、耐熱性、酵素阻害剤に  
対する態度を検討した。即ち、無処置の血清、60°C  
30分間熱処理したもの、及び 1 mg/dl の parachlor-  
mercuribenzoate (以下 PCMB と略す) を加え、15°C  
6 時間放置したものに非特異因子の染色を行い、夫  
々のパターンのデンストメトリーにより、定量的に  
比較した。非特異因子の染色には下記の処方による  
染色液を用い、38°C、30分間染色した。

実験に使用した染色液組成

1) NTB	0.4mg/ml
2) PMS	0.2mg/ml
3) NaCN	10 $\mu$ M/ml
4) phosphate buffer (PH 7.4)	2.2ml
5) 蒸溜水	全量 15 ml とする。

次に染色液組成による非特異因子の変動をみるた  
めに PH=7.4、染色温度 38°C、染色時間を 30分と  
して、第一に PMS を 0.2mg/ml、CN<sup>-</sup> を 10 $\mu$ M/ml、  
として、NTB 濃度を 0~1.0mg/ml と変化させて、  
夫々の非特異因子をデンストメトリーにより定量し  
た。(単位 O.D.  $\times$  cm  $\times$  10<sup>-2</sup>) 第二に染色条件は一定  
にし、NTB=0.4mg/ml、CN<sup>-</sup>=10 $\mu$ M/ml とし、PMS  
を 0~0.6mg/ml と変化させ、夫々の非特異因子を  
測定した。第三に同様の条件下に NTB=0.4mg/ml、  
PMS=0.2mg/ml とし、CN<sup>-</sup>濃度を 0~20 $\mu$ M/ml と  
変化させ、夫々の場合の非特異因子を測定した。最  
後に染色条件を PH=7.4 染色温度 38°C、染色時間  
30分とし、PMS=0.2mg/ml、CN<sup>-</sup>=10 $\mu$ M/ml、NTB  
=0.4mg/ml として、NTB に国産ドータイトと、米  
国の Dajack 社製のものを使用した各場合の非特異  
因子を測定し、比較した。

更に染色条件の非特異因子に及ぼす影響を観察す  
るために、染色液中の NTB=0.4mg/ml、PMS=0.2  
mg/ml、CN<sup>-</sup>=10 $\mu$ M/ml とし、先づ、温度=38°C、  
染色時間=30分とし、PH を 7.0~8.0 として、PH  
の非特異因子に及ぼす影響を夫々の場合の非特異因  
子のデンストメトリーを行なうことにより測定し、  
次いで、PH=7.4、染色時間=30分とし、染色温度  
を 30°C~40°C として、染色温度による影響を検討  
した。最後に、PH=7.4、染色温度=38°C とし、  
染色時間を 15分~70分迄変化させ染色時間による影  
響を同様の方法で測定した。

その他染色後標本を PH 4.5 の醋酸々性液で洗滌した場合と単に水洗した場合、染色中の露光の影響についても検討を加えた。

II ラット新生仔及び成熟ラットの各種臓器の MDH アイソザイムの測定

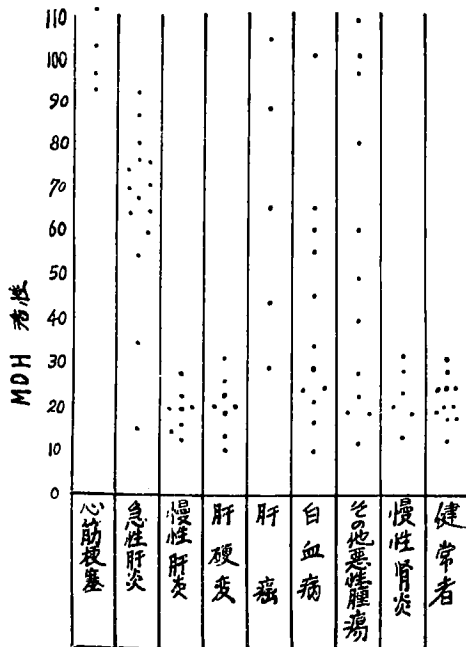
ラット新生仔、及び成熟ラットより得た心筋、腎、肝、胃粘膜等の組織を湿重量で5%となる様、0.25 M 蔗糖液にホモジネートし、前編に述べたと同様の方法で、MDH アイソザイムグラムを作製し、各分画の百分比を算定した。又超遠沈操作により、細胞分画をミトコンドリア及び可溶性分画に分け、夫々の MDH アイソザイムを測定した。

第3章 実験成績

第1節 血清 MDH 活性

血清 MDH 活性は健常者では 15~30u であつた。心筋梗塞、急性肝炎で有意の上昇を認められた。慢性肝炎、肝硬変では正常値を示した。白血病 その他の悪性腫瘍では上昇を認めたものもあつた。慢性腎炎では正常値を超えるものは経験されなかつた。(図1)

図1 各種疾患における血清 MDH 活性



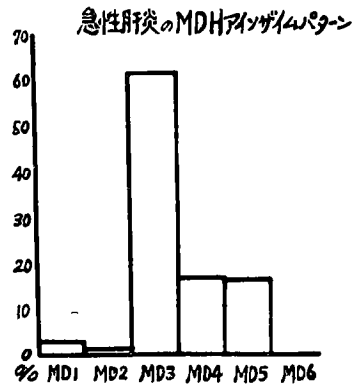
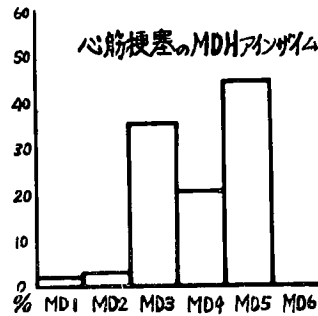
第2節 血清 MDH アイソザイム

正常ヒト血清 MDH アイソザイムは MD3 に相当する部分及び MD4, MD5 に一致する部分に peak が

認められたが、MD4, MD5 に一致する peak は基質染色液より基質及び補酵素を除いても染色された。(血清非特異因子として別項に検討)

心筋梗塞、急性肝炎の如く、血清 MDH 活性の上昇を来した疾患では図2に示す如く、MD1~MD5 の5分画を認め、夫々心筋、肝の MDH アイソザイムパターンに似たパターンを示したが、MD6 は認められなかつた。

図2 血清 MDH 活性上昇を来した疾患のアイソザイムパターン



第3節 諸条件下における血清非特異因子

血清非特異因子の電気泳動像は大小2つの peak よりなり、血清蛋白の Alb., α1, G1b. に夫々一致し、MDH アイソザイムでは MD4, MD5 に、LDH アイソザイムでは、LD4, LD5 に夫々一致する。(図3)

60°C, 30分間の熱処理を行なつた血清及び PCMB 処理を行つた血清について、非特異因子を測定し、無処置の血清で測定したものと比較したが、差は認められなかつた。(図4) 従つて本因子は熱及び酵素阻害剤に対して安定であることが確認された。

染色条件を一定とし、即ち PH=7.4, 染色温度=38°C, 染色時間=30分と定め、まづ、PMS=0.2

図3 非特異因子と血清蛋白及び血清 MDH, LDH  
アインザイムパターンとの比較

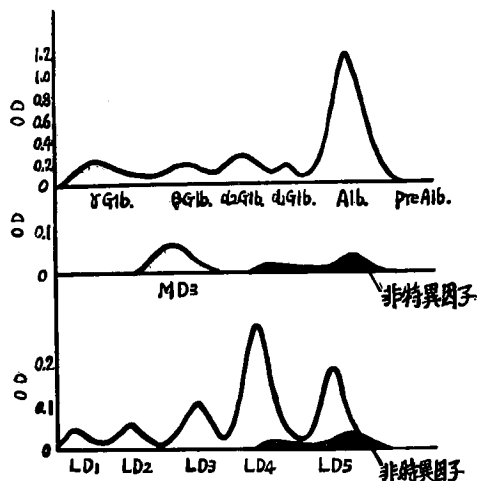
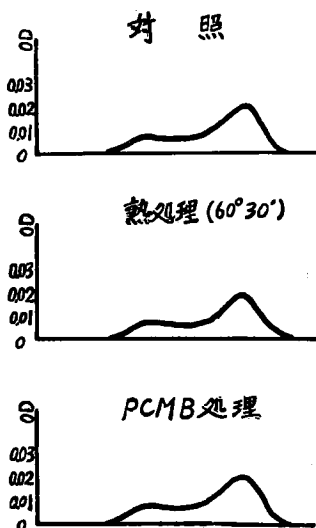


図4 熱及び PCMB に対する安定性



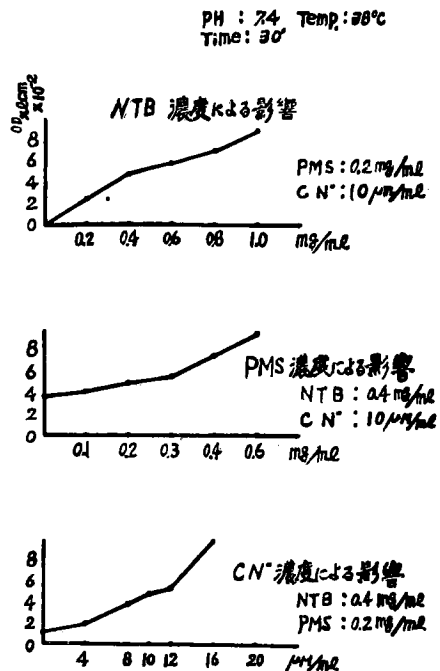
mg/ml, CN<sup>-</sup>=10μM/ml と一定にし, NTB 濃度を 0~1.0mg/ml と漸時増量すると非特異因子も濃くなることが明らかにされた。

次に NTB=0.4mg/ml, CN<sup>-</sup>=10μM/ml, とし, PMS を 0~0.6mg/ml と変化させた場合の非特異因子を測定したところ, PMS=0 の場合も 3.900×cm×10<sup>-2</sup>となり, PMS を欠く場合も, 染色することが明らかになった。PMS の濃度を増すと, 非特異因子も濃染することが観察された。

次に NTB=0.4mg/ml, PMS=0.2mg/ml とし, CN<sup>-</sup>濃度を 0~20μM/ml と増加した場合, CN<sup>-</sup>=0 の場合も非特異因子は 0 とはならないが, CN<sup>-</sup>濃度の

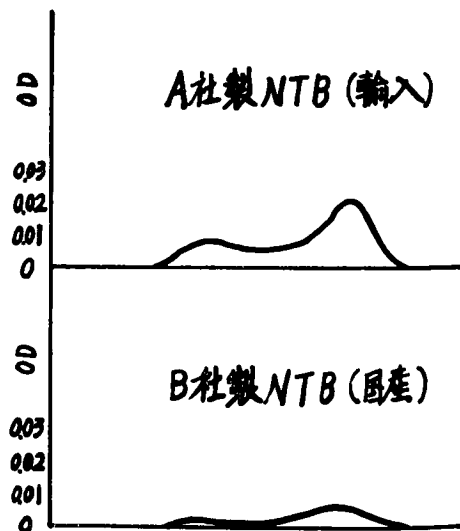
上昇により急に増量することが認められた。(図5)

図5 染色液組成による影響



染色条件は前述の如く一定とし, NTB に国産ドータイトと米国 Dajack の社製ものを夫々使用した場合の非特異因子を定量比較したところかなりの差が認められた。(図6)

図6 内外二社の NTB を使用した場合の非特異因子の比較



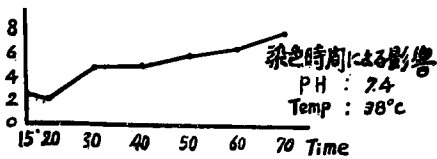
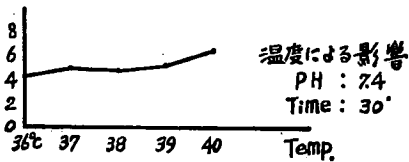
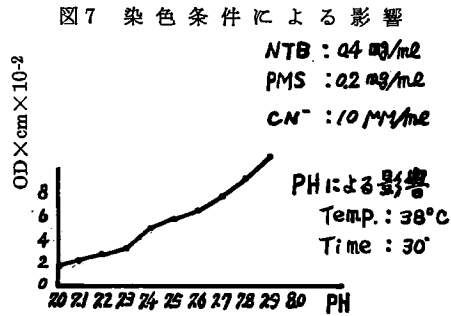
染色条件の非特異因子に及ぼす影響を観察するために, 染色液中の NTB=0.4mg/ml, PMS=0.2mg/

ml,  $CN^- = 10 \mu M/ml$  として、染色液組成を一定にし、染色液PH、染色温度、染色時間による影響を観察した。

液色温度 =  $38^\circ C$ 、染色時間 = 30分とし、 $PH = 7.0 \sim 8.0$  とすると、PHが上昇するにつれ非特異因子は急激に濃染度を増すことが明らかにされた。

$PH = 7.4$ 、染色時間 = 30分として、染色温度を  $36^\circ C \sim 40^\circ C$  とした場合、温度の上昇にともなつて濃染するが、 $36^\circ C$  と  $40^\circ C$  の間に著しい差は認められなかつた。

$PH = 7.4$ 、染色温度 =  $38^\circ C$  とした場合、染色時間を15分より70分と延長すると非特異因子の濃度は増加した。(図7)



染色後、PH 4.5 の醋酸酸性液で標本を洗滌した場合と、単に水染した場合の非特異因子を測定したところ、前者の場合には著明な低下が認められた。

染色中の露光については定量的実験を行なつていないが、非特異因子の濃染を促進することが観察された。

第4節 ラット新生仔及び成熟ラットの各種臓器の MDH アイソザイム

ラット新生仔及び成熟ラットの心筋、腎、肝、胃

粘膜の MDH アイソザイムは全例に陰極に泳動する分画と陽極に泳動する分画の2分画が認められた。

陰極に泳動する分画は主としてミトコンドリア分画に、陽極に泳動する分画は可溶性分画に認められ夫々 m-MDH, c-MDH として、各臓器について百分比を算定した。新生仔ラットの心筋では、m-MDH = 65%, c-MDH = 35% であつたが、成熟ラットでは m-MDH の比率が増加し、m-MDH = 85%, c-MDH = 15% が認められた。

新生仔ラットの肝では、m-MDH = 90%, c-MDH = 10% であつたが、成熟ラットでは、c-MDH が著明に増加し、m-MDH = 52%, c-MDH = 48% が認められた。

新生仔ラットの腎では、m-MDH = 87%, c-MDH = 13%, 成熟ラットでは m-MDH = 85%, c-MDH = 15% でアイソザイムパターンの変化は殆んどみられなかつた。

新生仔ラットの胃粘膜では m-MDH = 80%, c-MDH = 20% であるが、成熟ラットでは、m-MDH = 66%, c-MDH = 34% で、c-MDH の増加がみられた。(図10)

図10 ラット新生仔及び成熟ラットの各臓器の MDH アイソザイムパターン

	ラット新生仔	成熟ラット
心筋		
肝		
腎		
胃粘膜		

## 第4章 総括並びに考按

MDH は殆んどすべての臓器に分布し、ことに心筋に多量に含まれ、肝、骨筋、胃粘膜、腎、脾等の順に含まれていることが前編の実験成績より明らかにされた。血清の MDH 活性はこうした臓器に疾患のある場合に上昇が予想される。Siegal<sup>30)</sup> Bing<sup>31)</sup> 小出<sup>32)</sup> によると、血清 MDH 活性は心筋梗塞で著明な上昇が認められた。著者も心筋梗塞において血清 MDH 活性の著しい上昇を認めているが、心筋に MDH 活性が著しく高いことを考えると興味深い。

肝疾患の場合 Bing<sup>31)</sup> 等は血清 MDH の増加を認めているが、急性肝炎のときが最高であることを示した。又血清 MDH は慢性肝炎では正常域、肝癌で急性肝炎にまさる増加をみた例もあると報告された<sup>33)</sup>。著者の実験成績によると、急性肝炎では血清 MDH 活性の上昇がみられるが、心筋梗塞に比較するとやや低く、慢性肝炎、肝硬変では上昇が認められず、肝癌では症例により著しい差が認められた。

Merten 等<sup>34)</sup> によると TCA サイクルの酵素の中、MDH のみが悪性腫瘍で正常より増加しているが、炎症性疾患に比べるとその上昇は著しくない。著者も同様の事実を認めた。

慢性腎炎においては活性の上昇は認められなかつた。

以上の事実より、血清 MDH 活性の上昇は組織細胞の急激な損傷による細胞内 MDH の血清中への逸脱に基づくものと推論される。急激な組織細胞の損傷が MDH 活性を有する臓器に広範囲に起れば活性上昇も著しいものと考えられる。しかるに急激な組織細胞の損傷を来たす原因には血管の梗塞、炎症、悪性腫瘍等があげられる。従つて、MDH 活性の高い臓器に上記の機転で急激な細胞損傷が起きれば、血清 MDH 活性は上昇するが、逆に活性の上昇から原因臓器及び疾患臓器を推定することは不可能と考えられる。こうしたことは、他の酵素活性の上昇を論ずる場合にもいえることであるが、アイソザイムの発見により解決の糸口が見出された。

MDH アイソザイムは1958年 Vesell 等<sup>21)</sup> によりヒト血清中に発見された、それによると starchgel electrophoresis により正常ヒト血清中では3分画が認められ、46%は  $\gamma$ Glb. 26%は  $\alpha_3$ Glb., 28%は  $\alpha_1$ Glb. と Alb. の間に存在し、心筋梗塞のとき血清 MDH 活性の上昇と共に、5分画が出現し、 $\alpha_1$  peak の活性が、著明に上昇するといわれる。

一方寒天ゲル電気泳動法により測定した Yakulis<sup>18)</sup> 等は血清 MDH アイソザイムパターンの変動を認めていない。

著者は、血清 MDH 活性の著明な上昇をみた心筋梗塞及び急性肝炎患者の血清に、寒天ゲル電気泳動法フォルマザン発色法により、MD<sub>1</sub>~MD<sub>5</sub> 5分画を認め、夫々心筋、肝の MDH アイソザイムパターンに似たパターンを呈し、臨床的意義を認めた。

前編の成績より、MD<sub>1</sub>~MD<sub>5</sub> は m-MDH, MD<sub>6</sub> は c-MDH と推定され、c-MDH は可溶性分画に存在し、m-MDH はミトコンドリア分画に存在する。m-MDH は血清中に到達する迄には細胞膜とミトコンドリアの構造という二重の障壁があるのに対し、c-MDH は細胞膜のみであるから、血清中に逸脱し易いと考えられるが<sup>35)</sup>、この様に MDH アイソザイムグラム上に出現しないのは次の理由によるものと推定される。

即ち、Kaplan による成績<sup>20)</sup> 及び著者が前編において行なつた実験において、c-MDH は基質リンゴ酸の濃度が上昇すると、阻害を受けるのに対し、m-MDH は阻害されないことを認めているが、ザイモグラム作製にリンゴ酸を使用することより、この基質阻害の問題が或る程度関与することも考えられ、又c-MDH は m-MDH より不安定で失活し易い(熱、PC MB 等に対し) こと等より考え、血中より速やかに消失し易いという特性によるものと推論することも出来るが、決定的な原因は不明である。

正常ヒト血清 MDH アイソザイムは MD<sub>3</sub> に相当する部分及び MD<sub>4</sub>, MD<sub>5</sub> に一致する部分に peak が認められたが、実験成績の項でも述べた如く、MD<sub>4</sub>, MD<sub>5</sub> に一致する peak は基質染色液より、基質、補酵素を除いても、染色するので、MDH 及び他の酵素の影響はきわめて少ないものと考えて、“非特異因子”と名付けた。この非特異因子は MD<sub>4</sub>, MD<sub>5</sub> に重なるため、この2分画の測定は不可能で、正常ヒト血清 MDH アイソザイムパターンを決定することは出来なかつた。

この血清非特異因子は血清 MDH アイソザイムグラムのみならず、血清 LDH アイソザイムグラムにも出現し、LD<sub>4</sub> 及び LD<sub>5</sub> に重なるため、これ等の分画の測定精度に影響を与えるので、この本態を究明し、その影響を除去し得る方法を追求検討した。

血清非特異因子は 60°C, 30分間の熱処理に対しても、PCMB 処理に対しても安定で、この条件では酵素活性の大部分が失活することから、酵素以外の

ものと考えられた。

血清非特異因子の電気泳動像を観察すると、血清蛋白の  $\alpha_1\text{Glb.} \sim \text{Alb.}$  に類似し、同時泳動による比較でも一致した。従つて本因子は血清蛋白と密接な関係を有することが推定された。

染色条件、即ち、PH、染色温度、染色時間を一定とし、NTB濃度、PMS濃度、CN-濃度による影響を検討したところ、NTB濃度が上昇すると濃染、PMS、CN-の濃度は0でも染色するが、これ等の液中濃度が上昇すると急激に濃染することが明らかになった。

又、NTBの製品によつても非特異因子に差のあることが判明した。

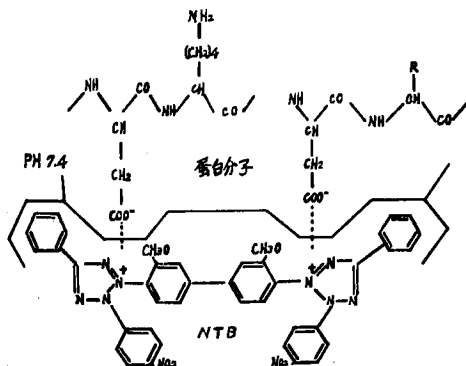
次に染色液組成を一定とし、染色条件を変化させ夫々の非特異因子に対する影響を検討したが、これによると、PHが大きくなり、染色温度が上昇し、染色時間が延長すると、いずれも、非特異因子が増強することが観察された、特にPHの影響が著しく、アルカリ側に傾むくと寒天板全体が紫色に帯色した。

又染色後、PH4.5の醋酸性液で標本を洗滌すると、非特異因子の低下が認められ、染色中に露光すると、非特異因子の増強することが認められた。

以上の実験成績より、非特異因子の染色は血清蛋白と密接な関係を有し、NTBの存在を必要とすることが明らかにされた。

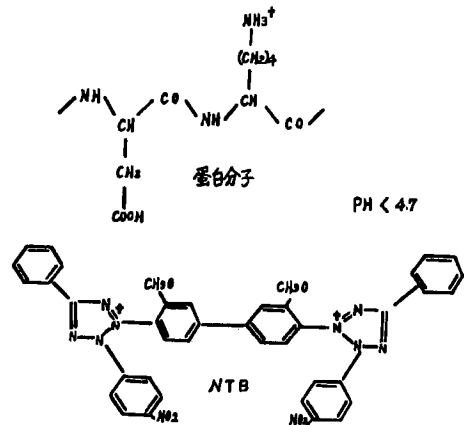
染色液のPH7.4附近では血清  $\text{Alb.} \sim \alpha_1\text{Glb.}$  は等電点がPH7.4より小さいため、負に帯電し、NTB色素は正に帯電している、従つて、血清ザイモグラム染色中、NTB色素は電気的に  $\text{Alb.} \sim \alpha_1\text{Glb.}$  に吸着され、NTBの還元電位が低いため、蛋白分子中のSH基等により、非特異的に還元されることも十分に考えられる。(図8)

図8 蛋白分子に吸着された NTB



PH<4.7では、 $\alpha_1\text{Glb.} \sim \text{Alb.}$  は正に帯電し、吸着された NTB は解離され、非特異因子の出現は抑制されたものと考えられる。(図9)

図9 蛋白分子より解離した NTB



このように  $\alpha_1\text{Glb.} \sim \text{Alb.}$  に吸着された NTB のSH基等による非特異的還元は、NTB濃度、PMS濃度、CN-濃度、染色液のPH、染色温度、染色時間により影響を受け、染色中の露光等によつても促進されることが経験された。

Barnett等<sup>36)</sup>は組織化学研究において、NTBが、NADとPMSの存在下に基質なく還元される現象を認め“Nothing dehydrogenese”と名付けたが、その後、沢木等<sup>37)</sup>の研究により、この本態が、LDHである可能性が指摘された。本編の非特異因子はこれとは別個の非酵素性のものであることが本因子の酵素阻害剤、熱に対し安定であることより知られる。

非特異因子の影響を最少限にとどめるためにはこうした促進因子の除去が望ましいが、染色条件は酵素の至適条件、反応様式を考慮すると自づからPH7.4染色温度=38°C、染色時間30分となるので、NTB濃度、PMS濃度、CN-濃度を最少限に抑え、染色中遮光に留意し、染色後標本をPH4.5の醋酸性液で洗滌することが望ましいと考えられた。染色に使用する薬品には純度の高いものを用いるべきは当然である。

著者はPH=7.4、染色温度=38°C、染色時間=30分、NTB(ドータイト)=0.4mg/ml、PMS=0.2mg/dl(Sigma)CN-=10μM/mlの条件で染色中は完全に遮光して、染色後はPH4.5の醋酸の性液で3時間洗滌後、一夜水染し、非特異因子の少いザイモグラムを得ている。

MDH アイソザイムにミトコンドリア由来の m-

MDH と可溶性分画由来の c-MDH があり、これについては前編で詳細に論じたが、本編では個体の発育過程における両者間の変動を追求した。

心筋では発育に伴って、m-MDH の比率に増加が認められたが、m-MDH が TCA サイクルに直結した酵素であり、発育に伴ない、心筋の仕事量も増加し、TCA サイクルの回転も活潑になるものと考えられるので、その間の関係を無理なく説明出来る。

肝では逆に発育に伴って、c-MDH の比率の上昇がみられた。これは肝では物質相互の代謝が活潑で前編に述べたミトコンドリアと細胞質間の shuttle を通じて、エネルギーが有効に使用されているものと推定され、発育に伴ないその傾向が強まるために、c-MDH が m-MDH に近い活性をもつに至るものと思われる。

腎では m-MDH, c-MDH の比率は新生仔においても成熟体においてもほぼ変動なく一定であるが、これは発育途上、MDH の関与する代謝には余り著明な変動がないものと推論される。

胃粘膜では発育に伴ない、c-MDH の増加がみられるが、胃粘膜でも肝と同様、塩酸、消化酵素の合成等物質相互間の代謝が発育に伴ない、活潑化するものと考えられる。(図10)

以上の如く、m-MDH 及び c-MDH の発育に伴なう変動を追求することにより、MDH の関与する代謝調節機構の一端を明らかにし得たものと考ええる。

## 第5章 結 語

- 1) 血清 MDH 活性は心筋梗塞、急性肝炎、肝癌の一部に上昇がみられた。白血病その他の悪性腫瘍でも一部に活性の上昇が認められた。
- 2) 血清 MDH アイソザイムは、血清 MDH 活性に

上昇をみた心筋梗塞及び急性肝炎で特徴的パターンが認められ、その測定は臨床上有意義なものと考えられた。

3) ヒト血清中の脱水素酵素の寒天ゲル電気泳動法フォルマザン発色法によるザイモグラムを作製中、基質補酵素を除いても染色する分画が認められ、血清“非特異因子”と名付けた。これは、PH 7.4 で負に帯電した血清蛋白中の Alb.  $\sim \alpha_1$ Glb. に、正に帯電した NTB が吸着され、蛋白分子中の SH 基等により、非特異的に還元され、フォルマザンを形成したものと考えられ、これは染色液の PH、温度の上昇、染色時間の延長、染色中の露光により、又 NTB, PMS, CN<sup>-</sup> の濃度上昇により促進されることが確認された。

従って、酵素至適条件、反応速度を考慮しつつ NTB, PMS, CN<sup>-</sup> 濃度を最少限にとどめ、染色後 PH 4.5 (PH < 4.7) の醋酸性液で洗滌することにより非特異因子の少いザイモグラムを得ることが出来た。

4) ラットの心筋、肝、腎、胃粘膜の MDH アイソザイムの発育による変動を追求した。

ラットの臓器 MDH アイソザイムには、m-MDH, c-MDH の 2 分画が検出され、心筋では発育により m-MDH の比率に、肝では c-MDH の比率に増加が認められた。腎では発育に伴なう変動はみられなかった。胃粘膜では発育に伴って、c-MDH が増加した。

拙筆するに当たり終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜わった恩師平木教授、並びに浅野講師に深甚の謝意を表します。

(本論文の要旨は第23回臨床病理学会総会において発表した。)

## 参 考 文 献

- 1) Markert, C. L. & Møller, F.: *Proced. Nat. Acad. Sc.*, **45**: 753, 1959.
- 2) Vesell, E. S. & Bearn, A. G.: *Ann. New York Acad. Sc.*, **75**: 286, 1958.
- 3) Wieme, R. J.: *Clin. Chim. Acta.* **14**: 313, 1959.
- 5) Hogeboom, G. H., Schneider, W. G., & Palade, G. E.: *J. Biol. Chem.*, **172**: 619, 1948.
- 5) Batelli, F. & Stern, L.: *C. R. Soc. Biol. Paris* **162**: 11, 552, 1956.
- 6) Thurnberg, T.: *Skand. Arch. Physiol.* **124**: 23, 1911.
- 7) Wolfe, R. G. & Neiland, T. B.: *J. Biol. Chem.*, **221**: 61, 1956.
- 8) Davies, D. D. & E. Kun: *Biochem. J.*, **66**: 307, 1957.
- 9) Batelli, F. & Stern, L.: *Biochem. Z.* **31**: 478, 1911.
- 10) Lowenthal, A., Van Sande, M., Karcher, D.:



- Ann. New York Acad. Sc. 94 : 988, 1961.
- 11) Delbrück, A., Schimassek, H., Bartsch, K. und Bücher, T. H. : Biochem. Z. 331 : 297, 1959.
  - 12) Thorne, C. J. P. : Biochem. Biophys. Acta., 42 : 175, 1960.
  - 13) Siegel, L. : Biochem. Biophys. Acta., 64 : 101, 1963.
  - 14) Siegel, L. : Biochem. Biophys. Acta., 54 : 67, 1961.
  - 15) England, S. & Breiger, H. H. : Biochem. Biophys. Acta., 56 : 571, 1962.
  - 16) Thorne, C. J. R., Grossman, L. I. & Kaplan, N. O. Biochem. Biophys. Acta., 73 : 193, 1963.
  - 17) Kaplan, N. O. : Regulatory effects of enzyme action p247—255, Pergamo Press, Oxford., 1961.
  - 18) Vincent, J Yakulis, Bs., Coutlas, W. Gibson, B, S., and Paul Heiler, MD. : Am. J. Clin. Path. 38 : 378, 1962.
  - 19) Drysdale, G. R. & Lardy, H. A. : J. Biol. chem., 202 : 119, 1953.
  - 20) Kaplan, N. O. : Bacteriol. Revs., 27 : 155, 1963.
  - 21) Green, D. E. Lester, R. L. & Ziegel D. M. : Biochem. Biophys. Acta., 23 : 516, 1957.
  - 22) Palade, G. E. : Anat. Rec., 114 : 427, 1952.
  - 23) Chapman, G. B. : J. Morphol., 95 : 237, 1956.
  - 24) Dalton, A. J., Felix, M. D. : Symp. Soc. Exp. Biol, 10 : 148, 1957.
  - 25) 弓狩康三 : 臨床科学, 1 : 786, 1965.
  - 26) 須田正己 : 蛋白質, 核酸酵素, 10 : 565, 1965.
  - 27) Vinuela, E., Salas, M., Sols, A. : J. Biol. Chem., 238 : pc 1177, 1963.
  - 28) Vesell, E. S., & Bearn, A. G. : Proc. Soc. Expr. Biol. & Med., 94 : 96, 1957.
  - 29) Wiggert, B. O. : J. Biol. chem., 239 : 444, 1964.
  - 30) Siegel, A. & Bing, R. J. : Proc. Soc. Expl. Biol. Med., 91 : 604, 1956.
  - 31) Bing, R. J., Castellano, S. A., Siegal, A., & Ala, B. : JAMA. 164 : 647, 1957.
  - 32) 小出輝 : 東京医誌, 68 : 115, 1960.
  - 33) 高杉年男 : 日内誌, 50 : 544, 1961.
  - 34) Merten, R. & Solbach, H. G. : Klin. Wschr., 39 : 222, 1961.
  - 35) 和田, 森野 : 総合臨床. 13 : 758, 1964.
  - 36) Barnett : Nature, 199 : 437, 1963.
  - 37) 山田, 沢木他 4 名 : 日本消化器病学会第52回総会
-

## Studies on Malic Dehydrogenese Isozyme

## Part II.

A Study on Malic Dehydrogenese Isozymes of Human Serum  
and Rat organs during Development

By

Masao TAKAYASU

Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director: Prof. Kiyoshi Hiraki)

Malic dehydrogenese (MDH) activities in human serum of various diseases were studied. Elevation of MDH activities were observed in myocardial infarction, acute hepatitis, and some malignant tumors.

Characteristic MDH isozyme patterns were obtained from serum of patients with myocardial infarction and acute hepatitis showing marked elevation of MDH activities.

During the tetrazolium procedure for staining of electrophoretically separated serum malic or lactic dehydrogenese isozymes on agargel, without substrate and co-enzyme, two peaks were noticed and named serum "non-specific factor". These peaks were considered a kind of non specific reactions which resulted from a reduction of the tetrazolium salt electrostatically adsorbed on Alb.  $\sim\alpha_1$ , Glb. by SH-groups of these serum proteins.

These reactions were accelerated by the elavation of PH or the temperature, exposure during staining and the prolonged staining time, as well as the rise of concentrations of NTB, PMS and CN<sup>-</sup> in the staining medium. Considering of optimal conditions of enzyme reaction, the minimum use of NTB, PMS and Na CN, washing stained agargels with PH 4.5 acetic acid Sol., and complete shading during procedure could minimize the influence of this factor.

Two MDH isozymes were demonstrated in agargel isozymograms of rat organs, one migrating towards the cathod and the other toward the anode. The cathodal fraction was considered mitochondrial MDH (m-MDH), and the anodal one cytoplasmic MDH (c-MDH), respectively.

During development, m-MDH showed marked increase in heart muscle. In contrast to this, cMDH of liver and gastric mucosa increased in procedure of development. On the other hand the ratio of m-MDH and c-MDH in kidney remained constant through development.

---