

各種血液疾患におけるLDH isozymeの解析

検査部 増田五美
大畑雅彦
川口貴子
井上孝司

〈はじめに〉

今日、血液疾患の中でも特に白血病を主体とした造血器腫瘍の診断は末梢血と骨髓所見によって決定される。また生化学的な病勢の指標として用いられているLDH、LDH isozymeも診断の一助とされている。そのLDH活性は種々の血液疾患でも高値を示すが、白血病においてLDH isozymeがII分画、III分画の上昇するいわゆる“Leukemic pattern”を示すことはよく知られている¹⁾しかし我々が日常検査を行っている上でLow percentage leukemiaにおけるLDH活性の低値や、isozymeがleukemic patternを示さない例を時として経験する。その要因は臨床的意義における問題点でもあるので、これらを明らかにするために、種々な血液疾患例を用いて種々検討を行ったので報告する。

〈対象と方法〉

1. 対象

健常人対象としては、肝機能障害を認めない21歳から56歳、平均37.8歳の当院職員及びドック受診者53名とした。

血液疾患は、昭和61年1月から平成元年3月までの当院受診者、計60名とし、全例初診時の血清の値を対象とした。その内訳は次の通りである。

急性リンパ性白血病 (ALL)	10例
急性骨髄性白血病 (AML)	14例
FAB分類: M1	1
M2	5
M3	1
M4	4
M5	1
M6	1
M7	1
慢性骨髄性白血病 (CML)	7例
(BC)	3例)

骨髓異形成症候群 (MDS)	4例
(AML移行)	3例)
悪性リンパ腫 (ML)	8例
多発性骨髄腫 (MM)	4例
伝染性単核症	4例
再生不良性貧血 (Aplasia)	4例
悪性貧血	2例
多血症	1例
多発性血小板減少性紫斑病 (ITP)	3例

2. 方法

1) LDH活性

自動分析機VS-700 (日本電子) を用いてUV-Rate法にて測定し単位はIU/lにて表示した。

2) LDH isozyme

LDH isozyme測定キット「LDH Isozyme Test Wako」(和光純薬)を用いてデンシトメトリー(570 nm)にて比色定量、分画%にて表示した。採取された血清は4°Cに保存し、少なくとも48時間以内に測定した。

3) ADA活性及びisozyme

「ADテスト オート マルホ」(マルホ)を用いCOBAS-MIRA (ロシュ)にて測定した。isozymeはEHNA (マルホ社提供)にてI分画を阻害し、同様の測定を行い、II分画を得た。単位はIU/lにて表示した。

3. 試料

白血病細胞のisozyme patternを明らかにするためにホモジナイザーINSONATOR 201 M (池本理化工業社製)を用いて粗精製液を作成した。粗精製液の作製において白血病細胞は約 10×10^6 /mlに調整し、150 W 10 min.ホモジナイズし、5000 rpm 15分遠心分離後の上清を用いた。

〈成績〉

1. 各種血液疾患のLDH活性 (図1)

健常人53名のLDH活性の $\bar{x} \pm SD$ は $310.0 \pm$

10.1でありその+2SDを正常値上限とした。ALL、AML、CMLの $\bar{x} \pm SD$ は、 1852.8 ± 2348.5 、 976.9 ± 529.8 、 1431.7 ± 880.0 であり、ALLに8408と著明な高値を示す一例が存在したが、LDH活性では特に疾患による有意な差は認められなかった。CMLの内、経過を観察し得た3例では、Case 1 (LDH活性初診時→BC時) 368→2897、Case 2、706→

1517、Case 3、2643→2355と2例においてBC時にLDH活性の著明な上昇がみられた。MDSはAML移行時に3例とも初診時よりも高値を示した。他の疾患では、造血器腫瘍の中ではML、及び良性疾患の内、悪性貧血で著明な高値を示す症例もみられた。伝染性単核症においても他に比べ中等度の高値を示した。

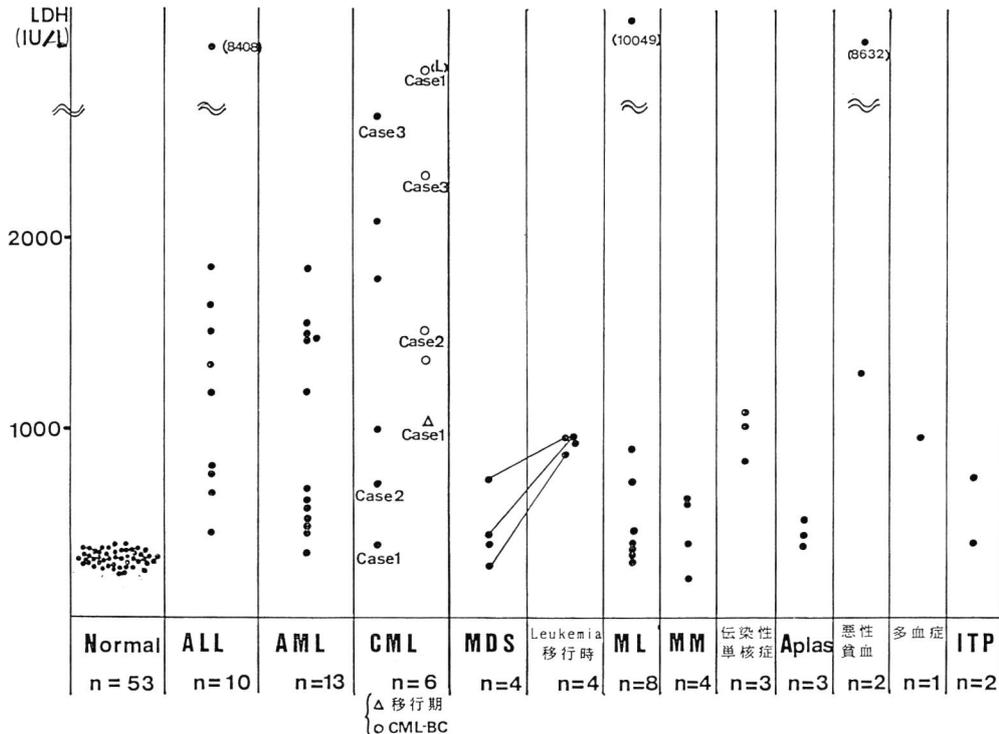


図1 各種血液疾患のLDH活性値

2. 各種血液疾患のLDH isozyme (図2)

LDH isozyme patternにおいて健常人の $\bar{x} \pm SD$ は、I 27.6±3.63、II 38.4±2.39、III 23.3±1.60、IV 6.0±1.43、V 5.6±1.83であった。

ALLとAMLは、各分画において有意差は認めなかった。急性白血病(ALL+AML)のisozyme patternは健常人と比較すると、I分画とIII分画でそれぞれ有意な差を認めた。(P<0.01) AML(M6)ではI、II分画が主体のpatternを示し、他との相違が見られた。CMLも急性白血病のisozyme patternと類似していたが特に初診時末梢血中の

Blast 著増例でその傾向が強かつま。

他の疾患では、悪性リンパ腫、伝染性単核症でI分画の低下とIIまたはIII分画の上昇を示したが、悪性貧血、多血症ではI、II分画の上昇を示した。

3. LDH isozymeとLDH活性の関係

急性白血病におけるisozyme patternを1) LDH<500 IU/l群、2) LDH≥500 IU/l群に分け、検索を行った。LDH活性500未満の群には白血病に特有なpatternはみられず、500以上の群にI分画とIII分画に有意の差を認めた。(図3)

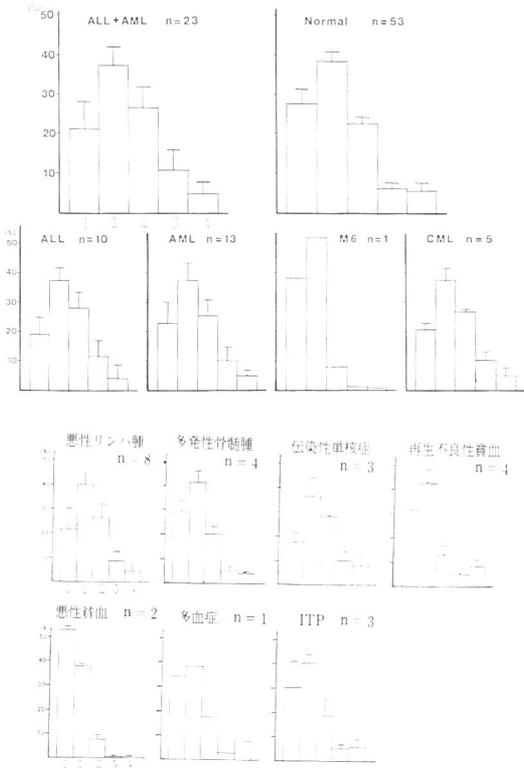


図 2

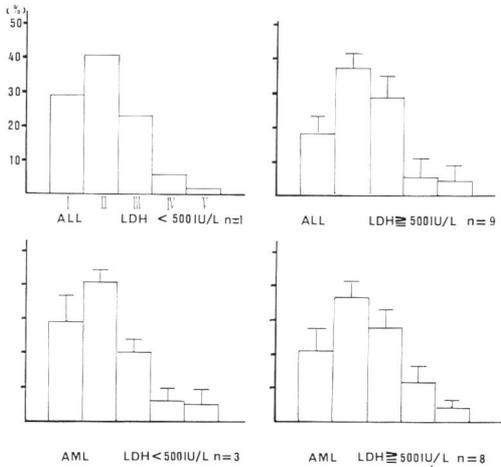


図 3 LDH 活性からみた Isozyme pattern

LDH 活性と I 分画との関係は $r = -0.56392$ ($P < 0.005$) で有意な相関を認めた。(図 4) また同様に III 分画との検索では $r = 0.469851$ ($P < 0.02$) であり正の相関を認めた。

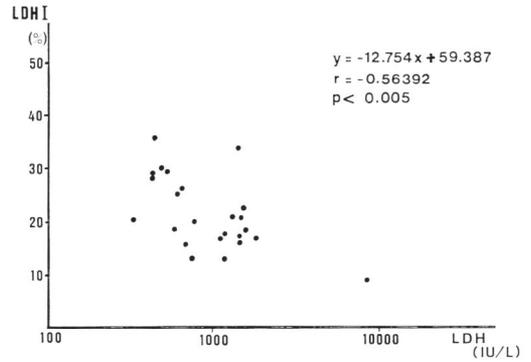


図 4 急性白血病における LDHI と LDH 活性値の関係

4. LDH 活性及び III/I 比と Blast 絶対数との関係
急性白血病の Blast の絶対数と LDH 活性値、また III/I 比との関係を検討した。

LDH 活性と Blast 絶対数とは $r = 0.442736$ ($P < 0.05$) で弱い相関を認めた。(図 5) III/I 比は Blast 絶対数と正の相関を認めた。(図 6) また同様に II/I 比においても正の相関を認めた。

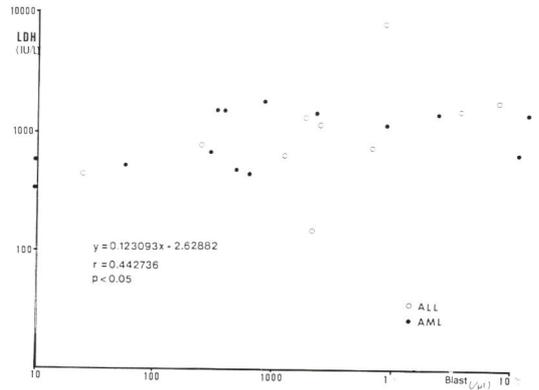


図 5 急性白血病における Blast 絶対数と LDH 活性値の関係

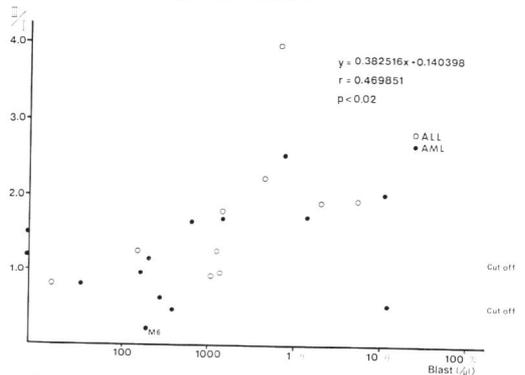


図 6 急性白血病における Blast 絶対数と III/I 比の関係

5. MDS の isozyme pattern の変化 (図7)

経過を観察し得た MDS 時と AML 移行時の isozyme pattern は、I $36.8 \pm 3.66 \rightarrow 27.8 \pm 4.21$ 、III $14.9 \pm 1.63 \rightarrow 21.8 \pm 2.75$ と I 分画の低下と III 分画の上昇を認めた。

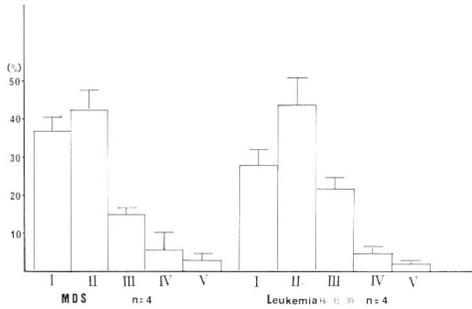


図7 LDH isozyme pattern の推移 (MDS 時 → AML 移行時)

6. 白血病細胞の LDH isozyme (図8)

白血病細胞の LDH isozyme は① ALL 初診時、② MDS から M4 への移行時③ CML-BC (Meg-K) を対象とした。

個々の症例によって isozyme pattern に若干の相違はみられるものの、主活性は III 分画であった。血清中 isozyme pattern と対比して観察すると比較的 isozyme pattern の類似がみられた。

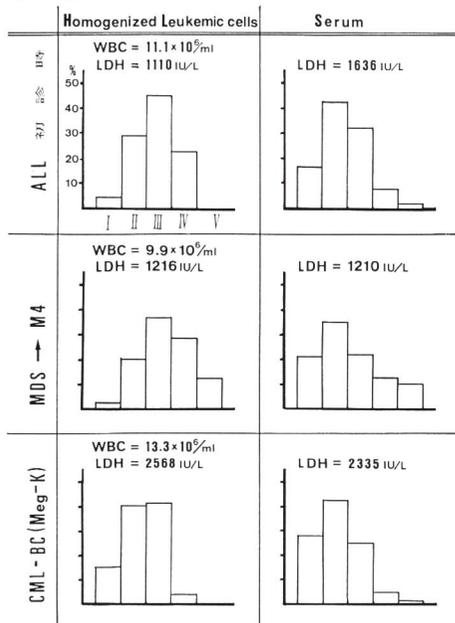


図8 白血病細胞と血清 isozyme pattern の対比

7. LDH、ADA と isozyme の異常値出現率 (表1)

LDH 活性、ADA 活性とその isozyme を同時に測定し得た ALL 6 例、AML 9 例、CML 3 例を対象に検討を行った。

各疾患群での個々のマーカーの異常値出現率は、LDH 活性 90~100%、LDH 活性 33.3~50%、ADA 活性 80~100%であった。LDH 活性、ADA 活性共にその異常値出現率は高いが LDH isozyme に関しては低い傾向がみられた。ALL では LDH isozyme が leukemic pattern を示したのは LDH 活性が高値の群だけであった。CML に関しては Blast の percentage が高値を呈した一例では leukemic pattern を呈した。ADA では ADA I は ALL、CML に、ADA I/II 比は ALL において異常値率 100%を示した。

以上、各疾患についての LDH、ADA 等、解析の比較検討を行ったが、症例を用いた検索は次の如くである。

8. 症例提示 (図9)

41 歳男性。common ALL。LDH 活性、isozyme pattern、II/I 比、III/I 比、ADA 活性とその isozyme を示す。初診時 LDH isozyme は leukemic pattern を示し、治療後 5 日で Blast の消失に先行して LDH isozyme pattern の変化を認めた。II/I 比はゆるやかな低下を示すが III/I 比は LDH 活性と平行して変動していた。また肝機能障害を認めた時期でも II/I 比、III/I 比の変動は、比較的軽微であった。ADA 活性及び ADA I/II 比は初診時著明な高値であり、LDH 活性よりもやや遅れて低下するがその変動は急峻であった。

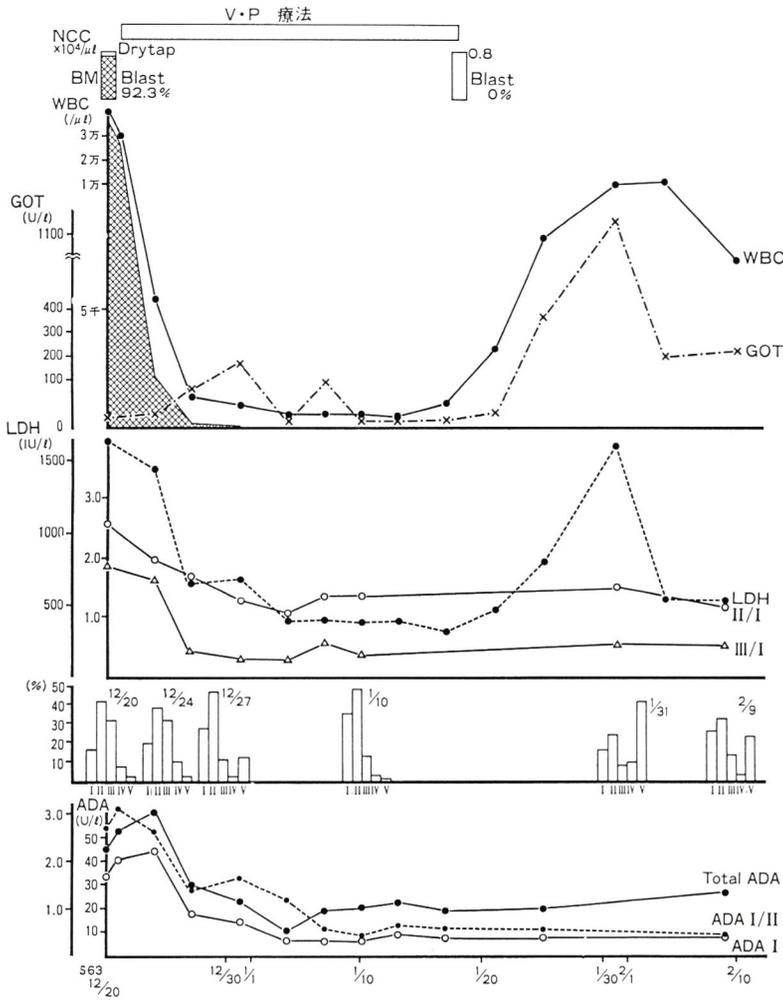


図9 H.N. (M・41y) common ALL (L1)

〈考 案〉

血液疾患、特に白血病の血清 LDH 活性に関しては、1956 年の Zimmerman らの報告²⁾以来、多数の報告がみられる^{1)3)~8)}白血病症例の LDH 異常値率については、AML 及び AMoL で 67~100%、ALL 60~100%、CML 60~90%であるといわれる¹⁾³⁾⁴⁾今回の検討では AML 90%、ALL 100%、CML 100%でありほぼ諸家の報告と一致した。一般に LDH 活性において急性白血病は慢性白血病よりも、また骨髄性はリンパ性よりも活性が高いといわれる³⁾⁵⁾しかし逆に ALL が AML よりも高値を呈するという報告もある⁹⁾今回の成績では ALL と AML の LDH 活性はそれぞれのばらつきが大き

く、有意差は認められなかった。
 従来より白血病患者の LDH 活性は末梢白血球、特に幼若白血球に由来すると考えられ末梢白血球（特に幼若白血球）と血清 LDH 活性は相関するという報告は多い³⁾⁷⁾我々の検討でも LDH 活性と末梢血 Blast の絶対数との間に弱い相関を認めた。つまり LDH は逸脱酵素であり、流血中の Blast の増殖と破壊の速度を反映していると思われる。
 現在、leukemic pattern といわれる LDH isozyme は II、III 分画の上昇を特徴とし、それが白血病細胞に由来するという事は良く知られている。しかし、LDH isozyme について LDH 活性との関連を検討した結果、LDH 活性 500 IU/l 未満の群では正常 pattern に類似し、500 以上の異常値群において

のみ leukemic pattern が観察されることが明らかになった。また、ALL と AML の間には isozyme pattern においても有意差を認めず、白血病の type における鑑別は不可能と考えられ、この点が表 1 でも明らかな様に同じ逸脱酵素である ADA 及び ADA isozyme と異なる点であると思われた。また、Blast 絶対数と III/ I 比は正の相関が認められた。これらの所見より LDH isozyme の問題点として① low percentage leukemia すなわち LDH 低活性の症例では leukemic pattern を示す頻度が少ない事②白血病の type を鑑別する事は不可能である事と解明された。

MDS と LDH isozyme に関して、立花ら⁸⁾は前白血病状態といえる再生不良性貧血の 3 症例において leukemic pattern を認めた事を報告し、白血病発症以前の異常クローンの発生増殖によるものと推察している。実際我々も MDS 4 症例で isozyme pattern

を検討したが、MDS 時にはむしろ I 型優位の pattern を示し、白血病移行時に I 分画の低下と III 分画の上昇をきたした。これは立花らの報告とは異なるが、対象群の違いによるものと思われる。我々の呈示した 4 症例は RAEB (RA with excess of blasts) であり、全例骨髓中で赤芽球の過形成を伴っていた。MDS 時 isozyme pattern が I 型優位であったのは、特に赤芽球系の無効造血を示す所見と思われた。MDS の各病型と白血病の鑑別は種々の細胞の異型性の他は現在主に末梢血及び骨髓の Blast の percentage に依存するため、末梢血中の Blast 絶対数の差が isozyme pattern に表れているものと思われる。白血病細胞を単離し、ホモジナイズした粗精製液の isozyme pattern を検討したが全例で主活性は III 型であり血清 isozyme patterns との類似がみられた。この事は血清 LDH isozyme が白血病細胞由来である事を示唆する十分な所見である。

表 1 初診時の血液学的所見及びLDH、ADA活性とそのisozyme

Case	臨床診断	WBC (/ui)	Blast (%)	LDH (IU/L)	Leukemic pattern	Total ADA (IU/L)	ADA I (IU/L)	ADA II (IU/L)	ADA I / ADA II	
ALL	1	L1 再発	7600	77	499	—	24.6	13.5	11.1	1.22
	2	L1	4900	5	790	+	24.7	13.9	10.8	1.29
	3	L1	3600	35	650	—	28.7	20.0	8.7	2.30
	4	L1	20800	39	8408	+	139.8	114.6	25.2	4.55
	5	L1	2400	1	441	—	23.6	13.0	10.6	1.23
	6	L1	39200	92	1636	+	44.9	12.2	32.7	2.68
AML	7	M1	175800	97	1468	—	43.7	27.3	14.5	1.88
	8	M1	2000	70	394	—	9.6	4.7	4.9	0.96
	9	M2	2300	0	582	+	11.3	5.3	6.0	0.88
	10	M2	5100	49	1474	+	33.4	17.6	15.8	1.11
	11	M3	800	7	525	—	20.0	9.2	10.8	0.85
	12	M4	42000	21	1199	+	32.3	12.3	20.0	0.62
	13	M5b	29300	1	620	—	18.2	2.3	15.9	0.14
	14	M6	3800	9	1524	—	30.2	5.4	24.8	0.22
	15	M7	3700	22	1836	+	36.2	11.3	24.9	0.45
16	MDS→M2	29900	88	939	—	29.5	5.4	24.1	0.22	
CML	17		149000	7	2643	—	47.3	28.9	18.4	1.57
	18		282100	5.8	2088	—	30.3	11.0	19.3	0.57
	19		25000	46	997	+	19.1	10.2	8.9	1.30
Cut off				≥ 420	{ I ≤ 20.6 III ≥ 25.5	≥ 18.0	≥ 6.1	≥ 13.9	≥ 0.82	

	LDH	LDH isozyme	Total ADA	ADA I	ADA II	ADA I / ADA II
ALL	6/6 (100)	3/6 (50)	6/6 (100)	6/6 (100)	2/6 (33.3)	6/6 (100)
AML	9/10 (90)	4/10 (40)	8/10 (80)	5/10 (50)	7/10 (70)	5/10 (50)
CML	3/3 (100)	1/3 (33.3)	3/3 (100)	3/3 (100)	2/3 (66.7)	2/3 (66.7)
Acute Leukemia	15/16 (93.8)	7/16 (43.8)	14/16 (87.5)	11/16 (68.8)	9/16 (56.3)	11/16 (68.8)
Total	18/19 (94.7)	8/19 (42.1)	17/19 (89.5)	14/19 (73.7)	11/19 (57.9)	13/19 (68.4)

(%)

以上のことから、LDH isozyme pattern を初診時の診断の一助とするには、LDH 活性、末梢白血球数、Blast の percentage を充分考慮に入れる必要があると考えられる。AML において、表 1 に示す様に leukemic pattern と末梢白血球数、Blast 数、LDH 活性に一定の傾向がみられないことから、なお isozyme pattern に影響をおよぼす因子の存在が示唆され、II/I 比、III/I 比を用いる事により Blast 絶対数に相関する指数を得ることができた。経過を観察し得た症例においても LDH 活性よりも、病態病勢をよく反映し、肝機能障害など諸因子に左右されにくい事から、経過観察の上で非常に有用な指標となり得ると考えられる。

くま と め

- 1) 急性白血病における LDH isozyme は III 分画の上昇、I 分画の低下を示すが、isozyme pattern による ALL と AML の鑑別は不可能であった。
- 2) LDH 活性の低値、Blast 絶対数の低値である白血病例で leukemic pattern を示す頻度は低い。
- 3) 血清中 LDH isozyme は白血病細胞の isozyme pattern をよく反映していた。
- 4) MDS において白血病移行時に LDH isozyme の白血病型変化を観察した。
- 5) II/I 比、III/I 比は Blast 絶対数に相関し肝機能障害に影響を受けない事を確認した。
- 6) LDH isozyme は白血病における経過観察の上で有用な指標となると考えられた。

本論文の要旨は第 38 回日本臨床衛生検査学会(福島)において発表した。

〈文 献〉

- 1) 三輪史朗, 他: 血液疾患患者の血清および血球乳酸脱水素酵素アイソザイムに関する研究. 日血会誌 30: 834, 1967
- 2) Zimmerman, H.J. and Weinstein, B.S.: Lactic dehydrogenase activity in human serum. J. Lab. Clin. Med., 48: 607-616, 1956
- 3) 浅野健夫, 他: 血液疾患における血清乳酸脱水素酵素とそのアイソザイムの臨床的意義について. 臨床血液, 5: 326-332, 1964
- 4) 樋上昌男, 他: 白血病の酵素診断. 最新医学, 29: 1784-1791, 1974
- 5) 片山昌子: 白血病児の血清および白血球の酵素的な研究. 第 1 編. 白血病児の血清乳酸脱水素酵素活性値とその Isozyme について. 日児誌, 76: 625-631, 1972
- 6) Kornberg, A. and polliack, A.: Serum lactic dehydrogenase (LDH) levels in acute leukemia: Marked elevations in lymphoblastic leukemia. Blood, 56: 351-355, 1980
- 7) 吉田康子: 血清病及び 2~3 の血液疾患における血清 LDH およびアイソザイムの研究. 小児科紀要, 12: 8-19, 1966
- 8) 立花直樹: 小児の各種血液疾患および悪性腫瘍における末梢血清および骨髓血 LDH isozyme の変動. 日本小児科学会雑誌, 87: 75-83, 1983