

THE RELATIONSHIP OF LACTIC DEHYDROGENASE ISOZYMES
TO THE METABOLISM OF CULTURED HUMAN LEUKOCYTES

培養ヒト白血球の代謝と乳酸脱水素酵素
アイソザイムとの関係

Approved 承認 14 April 1966

ARTHUR D. BLOOM, M.D.

TAKESHI WAJIMA, M.D. 和嶋 毅

HOWARD B. HAMILTON, M.D.



TECHNICAL REPORT SERIES

業 績 報 告 書 集

The ABCC Technical Reports provide the official bilingual statements required to meet the needs of Japanese and American staff members, consultants, advisory councils, and affiliated government and private organizations. The Technical Report Series is in no way intended to supplant regular journal publication.

ABCC 業績報告書は、ABCC の日本人および米人専門職員、顧問、評議会、政府ならびに民間の関係諸団体の要求に応じるための日英両語による記録である。業績報告書集は決して通例の誌上発表に代るものではない。

THE RELATIONSHIP OF LACTIC DEHYDROGENASE ISOZYMES TO THE METABOLISM OF CULTURED HUMAN LEUKOCYTES

培養ヒト白血球の代謝と乳酸脱水素酵素
アイソザイムとの関係

ARTHUR D. BLOOM, M.D.^{1†}

TAKESHI WAJIMA, M.D.² 和嶋 毅

HOWARD B. HAMILTON, M.D.¹



ATOMIC BOMB CASUALTY COMMISSION
HIROSHIMA AND NAGASAKI, JAPAN

A Cooperative Research Agency of
U.S.A. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES - NATIONAL RESEARCH COUNCIL
and
JAPANESE NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH OF THE MINISTRY OF HEALTH AND WELFARE
with funds provided by
U.S.A. ATOMIC ENERGY COMMISSION
JAPANESE NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH
U.S.A. PUBLIC HEALTH SERVICE

原 爆 傷 害 調 査 委 員 会

広島および長崎

米 国 学 士 院 - 学 術 会 議 と 厚 生 省 国 立 予 防 衛 生 研 究 所
と の 日 米 共 同 調 査 研 究 機 関

(米国原子力委員会、厚生省国立予防衛生研究所および米国公衆衛生局の研究費による)

ABCC Department of Clinical Laboratories¹ and Department of Clinical Pathology, Yamaguchi Medical College²

ABCC臨床検査部および山口県立医科大学臨床病理学教室

[†] Surgeon, US Public Health Service, Division of Radiological Health, Research Branch, assigned to ABCC

米国公衆衛生局放射線保健部研究部門所属医師でABCCへ派遣

CONTENTS

目 次

Introduction 緒 言	1
Methods and Materials 方法と材料	1
Results 結 果	2
Discussion 考 察	7
Summary 要 約	9
References 参考文献	9

TABLES

表

1. Percent distribution of LDH isozymes in noncultured leukocyte homogenates and after 72 hours of culture 白血球ホモジネートの培養前と培養72時間後におけるLDHアイソザイムの百分率分布	3
2. Percent distribution of LDH isozymes in oxygenated noncultured leukocytes, and in oxygenated 72-hour cultures 培養前と培養後72時間の酸素添加白血球におけるLDHアイソザイムの百分率分布	7

FIGURES

図

1. Agar-gel electrophoretic patterns and density tracings of LDH isozymes in noncultured and 72-hour cultured leukocytes 培養前と培養後72時間の白血球におけるLDHアイソザイムの寒天ゲル電気泳動像と吸光度測定	3
2. Percent distribution of H and M subunits in Case 1 during short-term leukocyte culture 第1例の短期白血球培養におけるHおよびMサブユニットの百分率分布	5
3. Oxygen and glucose curves from two sets of leukocyte culture, followed over a 72-hour period 2組の白血球の72時間培養における酸素およびブドウ糖曲線	5
4. Pyruvic and lactic acid curves from two sets of leukocyte cultures, followed over a 72-hour period 2組の白血球の72時間培養におけるピルビン酸および乳酸曲線	5
5. Electrophoretic patterns and density tracings of LDH isozymes in oxygenated noncultured leukocytes, and in an oxygenated 72-hour culture 培養前と培養後72時間の酸素添加白血球におけるLDHアイソザイムの電気泳動像と吸光度測定	6
6. Percent change in M subunits, normal and oxygenated cultures 通常培養と酸素添加培養におけるMサブユニットの百分率の変化	6

THE RELATIONSHIP OF LACTIC DEHYDROGENASE ISOZYMES TO THE METABOLISM OF CULTURED HUMAN LEUKOCYTES

培養ヒト白血球の代謝と乳酸脱水素酵素 アイソザイムとの関係

INTRODUCTION

Tissue specificity of the lactic dehydrogenase (LDH) isozymes has been demonstrated in man¹ and in other species.² Genetic control of the synthesis of the heart (H) and muscle (M) polypeptides has also been well documented.^{3,4}

It has been suggested that LDH-1 predominates in tissues in which aerobic conditions exist, while LDH-5 predominates under anaerobic conditions.⁵ The sensitivity of LDH-1, and the resistance of LDH-5, to pyruvic and lactic acids has been cited in support of this hypothesis. Vesell has recently demonstrated, however, that this differential sensitivity of purified LDH-1 and LDH-5 occurs at levels of pyruvate and lactate which are well above the physiologic range.⁶

In an attempt to investigate this problem in a living cell system with high metabolic activity, the changing patterns of LDH isozymes in primary cultures of rapidly dividing human leukocytes were examined. The cells were studied during dedifferentiation and transformation in vitro, and on entering into active mitosis. The relationship of the isozyme pattern to both cell metabolism and mitotic activity was investigated.

METHODS AND MATERIALS

Cell Culture Techniques Leukocytes were obtained from normal volunteers, and cultures were established after treatment of cells with Phytohemagglutinin M, according to the method of Moorehead.⁷ From 6.8×10^6 cells were inoculated into each culture using Tissue Culture Medium 199 of Difco, and a volume of fetal bovine serum equal to that of the cell suspension. A mixture of 10% CO₂ : 90% air was used to adjust the initial pH of the cultures to 6.8-6.9. Cultures were incubated at 37 C.

緒言

人間¹ やその他の動物² における乳酸脱水素酵素(LDH)アイソザイムは、組織によって特異的な差異を示すことが認められている。また、心臓(H型)および筋肉(M型)のポリペプチド合成が遺伝的支配を受けることも十分実証されている。^{3,4}

LDH-1は好気性状態の組織に多く、一方、LDH-5は嫌気性状態のもとで多いといわれている。⁵ この仮説を支持する所見としては、ピルビン酸と乳酸に対してLDH-1は感受性を示し、LDH-5は耐性を示すことがあげられている。しかし、Vesellは最近、精製LDH-1とLDH-5の感受性の差は、ピルビン酸および乳酸の濃度が生理的な範囲をはるかにこえたときに現われることを示した。⁶

この問題を代謝の活発な生きた細胞系を用いて研究する目的で、細胞分裂が早いヒト白血球の1次培養を行ない、LDHアイソザイム・パターンの変化について調べた。試験管内において逆分化期、移行期、ならびに活発な細胞分裂が始まる時期にある細胞を調べた。細胞代謝および細胞分裂活動とアイソザイム・パターンの関係についても調査した。

方法と材料

組織培養法 正常供血者から白血球を入手し、Mooreheadの方法⁷により血球をファイトヘマグルチニンMで処理して、培養を行なった。各培養において、 $6 \sim 8 \times 10^6$ 個の血球をDifco製組織培養液199に加えて血球浮遊液を作り、これに同量のウシ胎児血清を添加した。空気90%とCO₂10%の混合により培養初期のpHを6.8-6.9に調整した。培養温度は37Cであった。

Five identical cultures were established on each subject, and analyses of isozymes and metabolites were performed prior to incubation, and at 24, 48, 60, and 72 hours of incubation.

Cells were harvested, washed three times in isotonic saline, and homogenized in 0.5 ml saline at room temperature, using a Tri-R Stir-R, with teflon pestle, at 2500 revolutions per minute.

Analyses of glucose, lactic and pyruvic acids, and oxygen content were performed on aliquots of the medium overlying the actively growing cell layer.

In studies on the effect of oxygen, 100% O₂ was bubbled into the cultures for 10 seconds, at a flow rate of less than 1 liter per minute, every 12 hours during incubation.

Analytical Procedures Agar-gel electrophoresis was done according to a modification of the Shibata-Iuchi technique.⁸ Between 5-6 microliters of cell homogenate was electrophoresed for 30 minutes at 4 C, 150 volts, and 50 milliamps. Agar strips were then placed in sodium lactate substrate solution for 1 hour at 37 C. Diphosphopyridine nucleotide (DPN) was used as coenzyme, and phenazine methosulfate as electron transporter. Nitro blue tetrazolium was reduced, in the presence of LDH, to formazan, producing a purple band at the sites of LDH activity. With this method, LDH-1 and LDH-2 migrated to the anode; LDH-3, LDH-4 and LDH-5 to the cathode. Density tracings were done on the agar strips using the Beckman/Spinco Analytrol. The percent distribution of each LDH band was calculated from these tracings, according to the area under the obtained density curves.

Glucose determinations were performed on tissue culture medium using a modification of Folin's micromethod.⁹ Oxygen content was done under oil, according to the Natelson and Menning technique.¹⁰ The 2, 4 dinitrophenyl hydrazone derivative of pyruvic acid was formed, and pyruvate levels were determined by the method of Friedemann and Haugen.¹¹ Lactic acid measurements were done using the Huckabee modification of Barker and Summerson's spectrophotometric technique.¹²

RESULTS

The patterns of LDH activity in these leukocyte cultures were found to vary with time, as seen in Figure 1. The relative amounts of each band prior to culture and at 72 hours, in four different sets of cultures, are recorded in Table 1.

各被検者につき同一条件で培養を5本行なった。培養前、培養後24, 48, 60, 72時間の時にアイソザイムと代謝産物の分析を行なった。

細胞を採取して等張食塩水で3回洗浄し、食塩水 0.5mlを加え、室温においてテフロン乳棒を装置した Tri-R Stir-R を使用して1分間2500回転で磨砕した。

活発に増殖する細胞層のすぐ上にある培養液を取って、ブドウ糖、乳酸およびビルビン酸、ならびに酸素濃度の分析を行なった。

酸素の効果を調べるため、培養12時間ごとに、100% O₂を1分間1リットル以内の割合で10秒間、培養液の中に送った。

分析方法 柴田-井内の方法の変法によって寒天ゲル電気泳動法を行なった。⁸ 血球ホモジネート5-6マイクロリットルについて、4 Cで、150 V, 50 mAを通電して30分間電気泳動を行なった。次いで寒天平板を37 Cで乳酸ナトリウム基質溶液に1時間浸漬した。補酵素としては、Diphosphopyridine nucleotide (DPN)を用い、電子伝達系としては phenazine methosulfate を使用した。LDHにより、Nitro blue tetrazolium は formazan に変化して、LDH活動部分は紫色を呈する。この方法によると LDH-1 と LDH-2 は陽極へ移動し、LDH-3, LDH-4 および LDH-5 は陰極へ移動する。Beckman / Spinco Analytrol を用いて寒天平板の吸光度測定を行なった。この測定によって求められた吸光曲線から下の面積を用いて各LDH帯の百分率分布を計算した。

Folin の微量定量法⁹ の変法によって組織培養液のグルコース定量を行なった。酸素濃度は Natelson および Menning の方法¹⁰ によって油中で測定した。ビルビン酸の2,4 デニトロフェニールヒドラジン誘導体を作り、Friedemann および Haugen の方法¹¹ によってビルビン酸を測定した。Barker および Summerson の分光光度測定法¹² の Huckabee の変法によって乳酸を測定した。

結 果

以上の白血球培養で、LDH活動のパターンは、図1に示すように時間の経過につれて変化することが認められた。4組の培養で認めた培養前と培養後72時間の各活性帯の相対的な値を表1に示した。

FIGURE 1 AGAR-GEL ELECTROPHORETIC PATTERNS AND DENSITY TRACINGS OF LDH ISOZYMES IN NONCULTURED AND 72-HOUR CULTURED LEUKOCYTES

図1 培養前と培養後72時間の白血球におけるLDHアイソザイムの寒天ゲル電気泳動像と吸光度測定

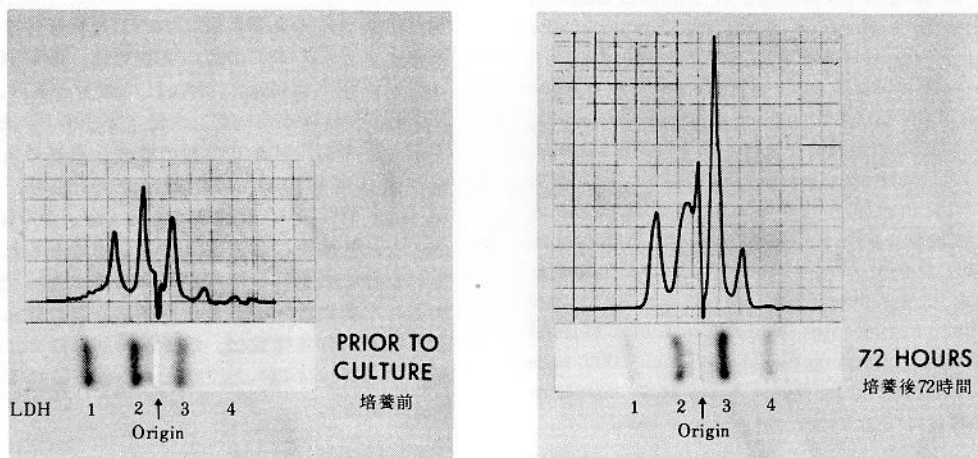


TABLE 1 PERCENT DISTRIBUTION OF LDH ISOZYMES IN NONCULTURED LEUKOCYTE HOMOGENATES, AND AFTER 72 HOURS OF CULTURE

表1 白血球ホモジネートの培養前と培養72時間後におけるLDHアイソザイムの百分率分布

Case 症例番号	Time 時間	LDH-1	LDH-2	LDH-3	LDH-4	LDH-5
1	Prior to Culture 培養前	47.8%	42.0%	10.2%	0.0%	0.0%
	72 Hours 培養72時間後	20.8	25.6	41.8	11.1	0.7
2	Prior to Culture 培養前	38.1	31.4	26.6	2.9	0.0
	72 Hours 培養72時間後	23.1	32.3	27.7	16.9	0.0
3	Prior to Culture 培養前	38.6	38.6	14.9	4.4	3.5
	72 Hours 培養72時間後	28.6	31.1	24.7	15.6	0.0
4	Prior to Culture 培養前	23.0	41.4	31.9	3.2	0.5
	72 Hours 培養72時間後	12.3	20.8	43.0	13.1	0.8

The anodal bands, LDH-1 and LDH-2, were initially the major components, with a significant, but variable, proportion of the total enzymatic activity appearing as LDH-3. This pattern was also seen in experiments with cell suspensions from which the granulocytes had been removed, using the iron-filing technique of Hastings et al.¹³

During the 24-48 hour culture period, when cellular transformation and early mitosis began, a shift toward the cathode was seen. This increase in cathodal band activity was centered about LDH-3 and LDH-4, with the most impressive changes being recorded at 72 hours of incubation, when mitotic activity was at its peak. Figure 2

最初は陽極側の活性帯，すなわちLDH-1とLDH-2が主要成分であったが，LDH-3も一定ではないにしても総酵素活性のうちのかなりの割合を占めていた．このパターンは，Hastingsら¹³のiron-filing法によって血球浮遊液から顆粒球を除去した実験でも認められた．

培養24～48時間に細胞の移行および初期細胞分裂が始まる時には陰極側への移動が認められた．この陰極側の活動帯の増強はLDH-3とLDH-4を中心として起こり，培養72時間で細胞分裂活動が頂点に達した時に最も著しい変化が認められた．図2は，4例の代表として，第1

illustrates the changing percentages of H and M subunits in Case 1, representative of the four cases presented, with a fall in the percent of H subunits from 84.0, seen prior to culture, to 64.0, at 72 hours, and an associated rise of 20% in M subunit activity.

This change in subunit proportions at different times in culture lead to an exploration of the metabolism of the leukocytes during the short-term culture period. As seen in Figure 3, there was a 40 mg/100 ml decrease in glucose concentration of the sampled medium in both experiments, and a minimal but consistent decline in oxygen content. Pyruvic acid accumulation was rapid, as shown in Figure 4, and between 48 and 72 hours, the maximal increase in lactic acid was noted, a 26.8 mg/100 ml increase in experiment 1, 20.0 mg/100 ml in experiment 2. This rise in lactic acid occurred at the time when mitotic activity of the cultures became most intense. The mitotic index, defined as the number of cells in active mitosis per 1000 cells examined, rose from 6 at 24 hours, to 26 at 48 hours, to 49 at 72 hours (average values for the four cases).

The pH of the medium in these cultures ranged from 6.8-7.0 at the beginning of culture, and fell to a low of 6.6-6.8 after 72 hours.

The effect of transiently increased oxygen tension on the isozyme pattern of the cells was studied, and the LDH patterns obtained prior to culture and at 72 hours are shown in Figure 5. Table 2 gives the percent distribution of the isozymes in four oxygen-supplemented sets of cultures. In two of the three cases (6 and 7) in which cell growth was adequate, there was a fall in the percent of LDH-3 by 72 hours. In Case 5, however, there was an increase of 12%, approximately the same as seen in non-oxygenated cultures.

As illustrated in Figure 6, the percent increase in M subunits in oxygenated cultures tended to be lower than that seen in normal cultures. For Case 7 this difference was clear, with only a 1% rise in M subunits over 72 hours. For both Case 5 and Case 6, however, there was an 8% increase, slightly less than the lowest value obtained in the nonoxygenated cultures (Case 3). The cells of Case 8 failed to grow under conditions of increased oxygen content. Since 5%-8% of the normal leukocyte cultures fail, it is difficult to say whether or not this was an effect of the added oxygen.

The mitotic indices and the percentages of transformed cells in the three oxygenated cultures with satisfactory growth were the same as in nonoxygenated cultures. Using these criteria of in vitro cell growth, the levels of increased oxygen used here were sufficient to inhibit

例におけるHおよびMサブユニットの変動率を示したもので、培養前に84.0であったHサブユニットの率が培養後72時間には64.0に低下したのにつれて、Mサブユニット活動は20%上昇した。

培養時間によってサブユニットの割合が変化するので、短期培養中の白血球代謝について研究を行なった。図3に示すように、この2組の実験では、培養液標本のグルコース濃度には40mg/100 mlの減少があり、酸素濃度には軽度ではあるが一貫した低下が認められた。また図4が示すように、ピルビン酸の蓄積は急速であり、乳酸の増加量は培養後48-72時間で最大となり、実験1では26.8mg/100 ml、実験2では20.0mg/100 mlの増加があった。乳酸値にこのような上昇が認められたのは、培養における細胞分裂活動が最も活発になった時である。検査した細胞数1000個あたり細胞分裂の盛んな細胞数で示した細胞分裂指数は、培養24時間には6、48時間には26、72時間には49へと上昇した(この値は4つの例の平均値である)。

これらの培養における培養液のpHは、培養の初めには6.8-7.0であったが、培養後72時間では6.6-6.8に下がった。

細胞のアイソザイム・パターンに対する一時的な酸素張力増強の影響について検討を行ない、培養前と培養後72時間のLDHパターンを図5に示した。表2は、酸素補充を行なった4組の培養におけるアイソザイムの百分率分布を示す。細胞増殖が十分であった3例のうち2例(第6例と第7例)では、LDH-3の率は培養後72時間までに低下した。しかし、第5例では、酸素添加を行わない培養の場合とほぼ同率の12%の増加を認めた。

図6に示すように、酸素添加を行なった培養におけるMサブユニットの増加率は、通常の培養で認められるものより低い傾向がある。第7例の場合はこの差異が明らかに認められ、72時間にMサブユニットはわずかに1%しか上昇していない。しかし、第5例および第6例では8%の上昇を認めたが、これは酸素添加を行わない培養で認めた最低の上昇率(第3例)よりもやや低い。第8例の細胞は、酸素濃度を増加した状態においては増殖しなかった。通常の白血球培養の5%-8%は失敗するので、これが酸素添加によるかどうかは断定しがたい。

細胞分裂指数および細胞移行率は、酸素添加によって増殖が十分に認められる3つの培養と酸素添加を行わない培養とでは同じであった。試験管内細胞増殖の評価に細胞分裂指数と細胞移行率を判定基準として用いるならば、この調査で使用した程度の酸素添加では、通常起こ

FIGURE 2 PERCENT DISTRIBUTION OF H AND M SUBUNITS IN CASE 1 DURING SHORT-TERM LEUKOCYTE CULTURE

図2 第1例の短期白血球培養におけるHおよびMサブユニットの百分率分布

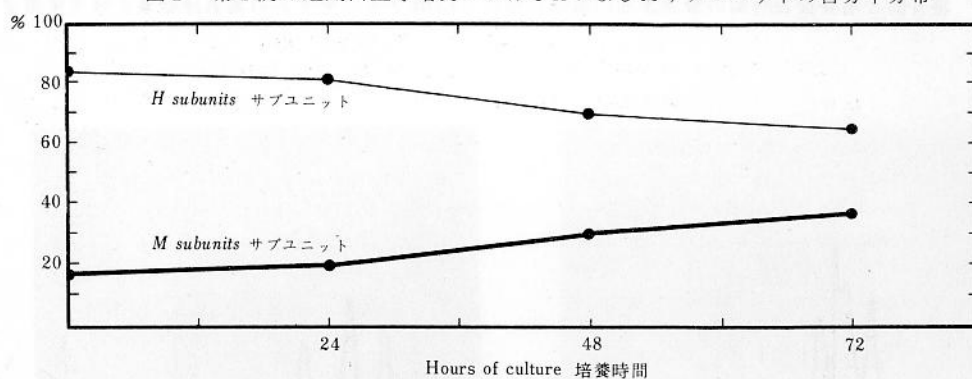


FIGURE 3 OXYGEN AND GLUCOSE CURVES FROM TWO SETS OF LEUKOCYTE CULTURES, FOLLOWED OVER A 72-HOUR PERIOD

図3 2組の白血球の72時間培養における酸素およびブドウ糖曲線

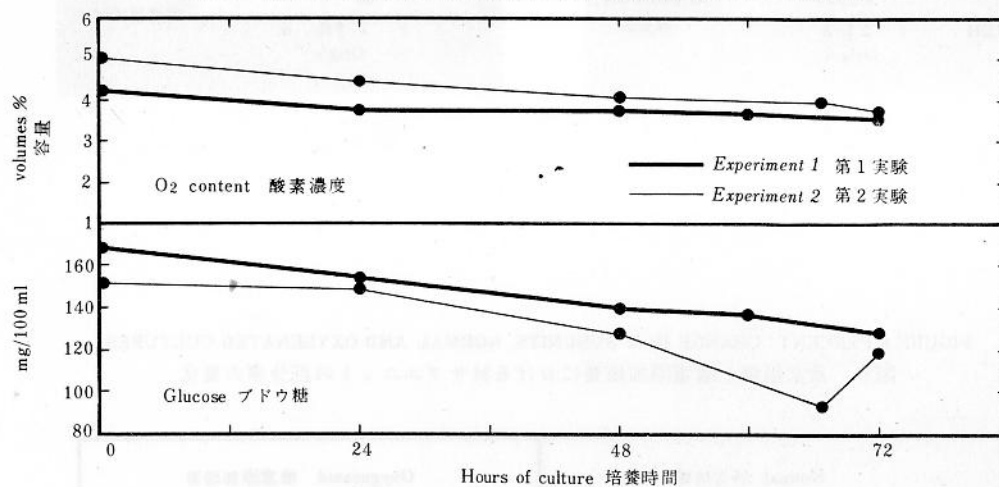


FIGURE 4 PYRUVIC AND LACTIC ACID CURVES FROM TWO SETS OF LEUKOCYTE CULTURES, FOLLOWED OVER A 72-HOUR PERIOD

図4 2組の白血球の72時間培養におけるピルビン酸および乳酸曲線

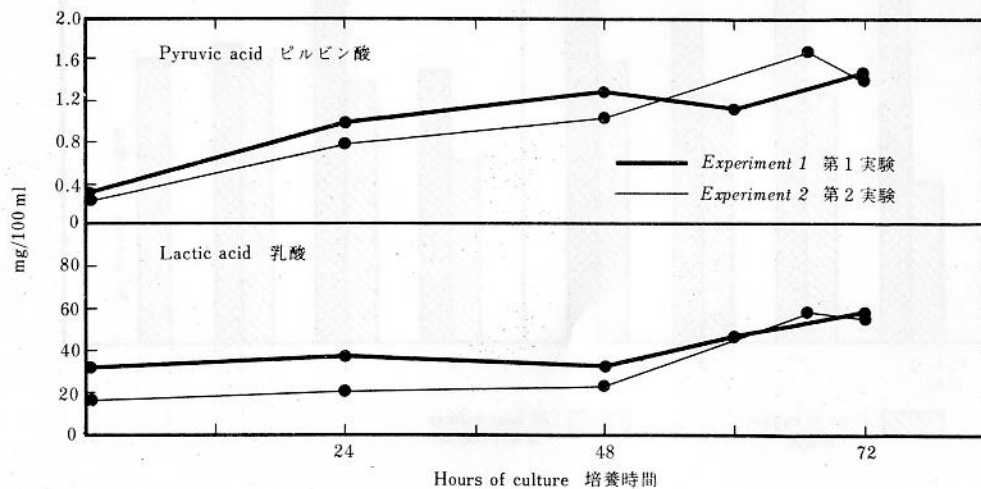


FIGURE 5 ELECTROPHORETIC PATTERNS AND DENSITY TRACINGS OF LDH ISOZYMES IN OXYGENATED NONCULTURED LEUKOCYTES, AND IN AN OXYGENATED 72-HOUR CULTURE

図5 培養前と培養後72時間の酸素添加白血球におけるLDHアイソザイムの電気泳動像と吸光度測定

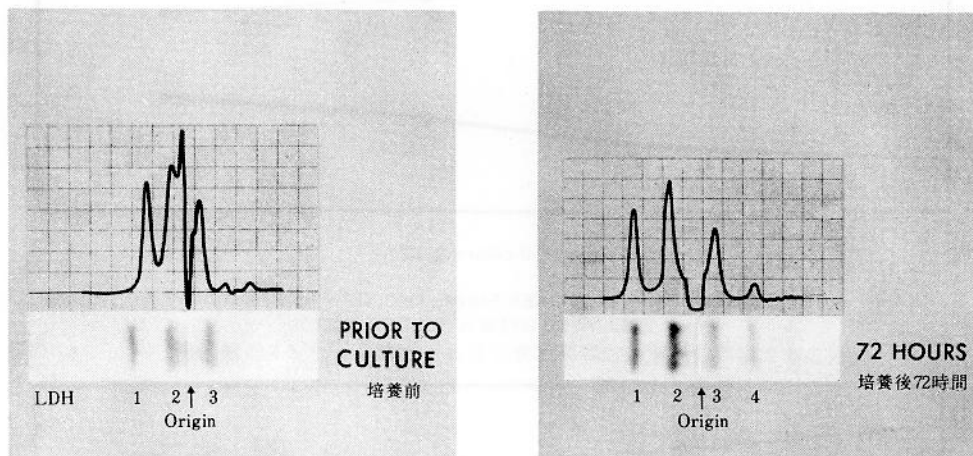


FIGURE 6 PERCENT CHANGE IN M SUBUNITS, NORMAL AND OXYGENATED CULTURES

図6 通常培養と酸素添加培養におけるMサブユニットの百分率の変化

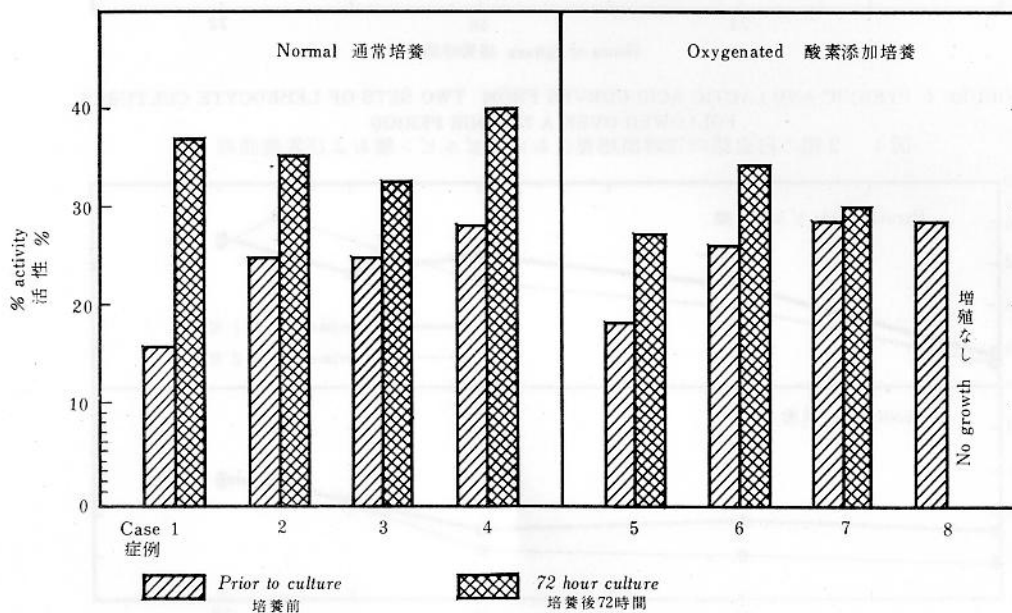


TABLE 2 PERCENT DISTRIBUTION OF LDH ISOZYMES IN OXYGENATED NONCULTURED LEUKOCYTES, AND IN OXYGENATED 72-HOUR CULTURES

表2 培養前と培養後72時間の酸素添加白血球におけるLDHアイソザイムの百分率分布

Case 症例番号	Time 培養時間	LDH-1	LDH-2	LDH-3	LDH-4	LDH-5
5	Prior to Culture 培養前..	41.8%	43.7%	14.5%	0.0%	0.0%
	72 Hours 培養後72時間...	27.9	41.6	26.3	4.2	0.0
6	Prior to Culture. 培養前...	32.9	37.3	26.9	2.2	0.7
	72 Hours. 培養後72時間...	30.4	32.2	18.0	12.4	6.9
7	Prior to Culture 培養前...	29.5	35.9	28.2	5.1	1.3
	72 Hours. 培養後72時間...	34.8	36.0	12.4	9.0	7.8
8	Prior to Culture. 培養前...	31.0	38.3	24.7	5.9	0.1
	72 Hours 培養後72時間..	No Growth 増殖しない				

significantly the normally occurring rise in M subunits in one of three cases, and only minimally, if at all, in the other two.

The pH range of the oxygenated cultures was 6.8-7.0, as recorded at 24-hour intervals during incubations. This was slightly higher than, but essentially the same as, in normal cultures (6.6-6.8).

DISCUSSION

Sequential in vivo and in vitro alterations in LDH isozyme patterns during differentiation have been shown for several species, including man.¹⁴ In general, during embryogenesis and in tissue culture, a tissue specific shift in the isozyme pattern is seen.¹⁵ This alteration may be related to the development of different cell types within a given tissue, or to a change in the function of already existing cells. The available evidence suggests that the oxygen supply to an actively dividing cell system, whether a fetus in utero or a cell line in culture, may be one of the few environmental factors capable of modifying the pattern of isozyme activity.¹⁶

In the transformed and dividing leukocytes studied here the shift toward the cathode correlates well with the observed peak in mitotic activity, and may reflect a normal readjustment in the metabolism of these cells.

Short-term tissue culture of human leukocytes has been shown to follow a rapid, orderly sequence in which cells of the granulocytic series degenerate within the first 24 hours.¹⁷ Cells of the lymphocytic series dedifferentiate, transform into blasts and prolymphocytes, and enter mitosis sometime after the first 40-50 hours of culture.¹⁸ Quaglini et al¹⁹ demonstrated that early in culture the

るMサブユニットの上昇が3例中の1例において有意に抑制されたが、残りの2例では抑制されたとしてもごくわずかであった。

酸素添加を行なった培養の pH は、培養中24時間ごとの記録によると 6.8-7.0の範囲であった。これは、通常の培養における値 (6.6-6.8) よりもやや高いが、本質的には同じであった。

考 察

人間その他数種の動物では、生体内および試験管内において細胞が分化する時にLDHアイソザイム・パターンに一連の変化が起こることが認められている。¹⁴ 概して、胎児発生時および組織培養において、アイソザイム・パターンに各組織特有の変化が認められる。¹⁵ この変化は、ある組織内での種類の異なる細胞の発生、またはすでに存在していた細胞の機能の変化と関連があるかもしれない。現在までの知見によると、活発に分裂している細胞系、すなわち胎児または培養中の細胞系に対する酸素添加は、アイソザイム活動のパターンを変更しうる数少ない環境要因¹⁶ の1つであることを示唆している。

移行中の白血球および分裂中の白血球に対する今回の研究では、陰極への移動と、細胞分裂活動が最大に達する時期との間に十分な相関が認められるが、このことはこれらの細胞の代謝における正常な再調整を反映するものかもしれない。

短期間のヒト白血球組織培養では、急速かつ規則正しい一連の変化があって、培養後24時間以内には顆粒球系細胞は変性することが認められている。¹⁷ リンパ球系細胞は逆分化し、芽球および前リンパ球に移行し、培養後40-50時間のころに細胞分裂を始める。¹⁸ Quaglini ら¹⁹ は、

lymphocytes are glycogen-rich, staining heavily with periodic acid Schiff stain. Late in culture, the cells are glycogen-depleted.

The findings in the present study support the idea that glycogen serves as the major energy source by which lymphocytes undergo transformation in culture. Throughout the 72-hour culture period, the concentrations of glucose and oxygen fell, while pyruvic acid levels increased. The sharp rise in lactic acid, seen between 48 and 72 hours, suggests that a shift to anaerobic glycolysis may have taken place at that time. The increase in M subunit synthesis with an associated increase in pyruvate and lactate concentrations, and a decreasing oxygen content, is consistent with this hypothesis.

The levels of pyruvic and lactic acids found in this system were less than those described by Vesell⁶ as inhibitory to purified LDH-1 in vitro. However, concentrations not inhibitory to the pure enzyme form may affect the rates of synthesis or release of enzyme in complex living cell systems, thus altering the observed patterns of isozyme activity.

The rapid division time of these cells in tissue culture, and the considerable energy which must be utilized for mitosis might reasonably require a form of LDH which is more resistant to increased pyruvic acid than that seen in the mature, non-dividing leukocytes used to initiate the cultures. This adaptation of LDH to the metabolic needs of the tissue in which it is functioning has been demonstrated by Wilson et al²⁰ for the LDH isozymes of the breast muscle of birds with different flight characteristics.

It must be noted that in the short-term leukocyte culture cells in all stages of pre-mitosis and mitosis may be seen. This undoubtedly leads to a variety of metabolic differences within the cell population, and the isozyme patterns, therefore, reflect only the general picture of cell metabolism. Thus, H subunits are still dominant at 72 hours of culture, indicating either that aerobic glycolysis is still the major pathway, or that for this cell system, there is a limit to its capacity to synthesize the M polypeptide.

The suggestive oxygen effect demonstrated here was also noted by Cahn²¹ who raised the percentage of H subunits in embryonic chick heart cells grown in culture by adding 95% O₂. If, under aerobic conditions, the normally observed tendency toward anaerobic glycolysis can be reversed, with energy production continuing via the Krebs cycle, then the need for adjusting polypeptide synthesis would be obviated, and little increase in M subunit synthesis would be expected.

培養初期のリンパ球はグリコゲンに富み、過ヨウ素酸 Schiff 染色に濃染することを証明した。しかし、培養後期になると細胞にはグリコゲンが欠乏する。

今回の調査の所見は、グリコゲンが培養におけるリンパ球移行の主要なエネルギー源の役割を果たすという見解を支持するものである。72時間の培養を通して、ブドウ糖と酸素の濃度は低下し、ピルビン酸は増加した。培養後48～72時間にみられる乳酸値の急上昇は、その期間に嫌気性解糖への移動があったのではないかとすることを示唆する。Mサブユニット合成の増加と、それに伴ってピルビン酸と乳酸の濃度の上昇、および酸素濃度の低下が起こっていることは、この仮説と一致している。

この系統に認められたピルビン酸と乳酸の値は、試験管内における精製LDH-1が抑制される値として Vesell⁶が報告したものよりも低かった。しかし、純粋な酵素を抑制しない程度の濃度でも、複雑な生きている細胞系における酵素の合成率または放出率に影響を与えてアイソザイム活動のパターンに変化をもたらすことがあるかもしれない。

組織培養ではこれらの細胞の分裂時間が早く、また細胞分裂には多量のエネルギーを必要とするので、培養の開始に用いられた細胞分裂をしない成熟白血球におけるLDHよりも、ピルビン酸の増加に対して耐性の強いLDHが必要ではないかと考えられる。LDHが作用している組織の代謝上の必要条件に応じてLDHが順応することを、Wilsonらが、飛翔状態の異なる鳥類の胸筋におけるLDHアイソザイムについて証明している。²⁰

短期白血球培養では、細胞分裂前期および細胞分裂の各段階にある細胞が認められるという点に注目する必要がある。これによって細胞集落内に代謝の差があることは明らかであり、したがって、われわれの認めたアイソザイム・パターンは単に細胞代謝の全般的な様相を反映しているにすぎない。このように、培養72時間後においてHサブユニットがいぜんとして最も多いことは、好気性解糖作用がいぜんとして主要な経路であるか、あるいはこの細胞系のMポリペプチド合成能力に限度があるか、のいずれかを示すものである。

今回の調査で酸素の効果が示唆されたが、Cahn²¹も同様の所見を認めており、ニワトリ胎児の心臓細胞の培養で95% O₂を補充してHサブユニットの百分率を上昇させた。もし、好気性状態のもとにおいて、通常認められる嫌気性解糖作用の傾向を逆転し、Krebsサイクルを経てエネルギー生産を続けることができれば、ポリペプチド合成を調整する必要もなくなり、Mサブユニット合成の増加もあまり起こらないであろうと期待される。

The contribution of degenerating granulocytes to the early patterns of LDH activity is difficult to evaluate. The possibility of enzyme leakage from these cells is considerable.²² Removal of granulocytes from the original leukocyte suspensions and culturing of the remaining cells, largely lymphocytes, produced LDH patterns similar to those seen in the cultures of whole leukocyte suspensions.

The effect of different substrates on LDH patterns of cultured cells requires further investigation to elucidate the more intimate relationship of isozyme patterns to metabolic sequences. The short-term leukocyte culture appears to be a useful system for this purpose: dedifferentiation is rapid, mitotic activity is high, and the metabolic requirements for growth are easily met. With clarification of the patterns of metabolic activity in normal cultures, selective alteration of the medium is now feasible.

SUMMARY

The changing patterns of LDH activity in primary cultures of human leukocytes were related to cell metabolism and mitotic activity. The dominance of LDH-1 and LDH-2 seen in noncultured leukocyte suspensions and after the first 24 hours of culture was followed by a shift at 48-72 hours to a pattern in which LDH-3 and LDH-4 significantly increased. The rise in M subunits occurred at the same time as increased numbers of transformed cells and of cells in active mitosis appeared in culture.

The level of glucose in the medium fell throughout culture, while the levels of pyruvic and lactic acids maximally increased in the 48-72 hour period. Together with the gradual decrease found in oxygen content, these changes suggest that the major energy source early in culture is from aerobic metabolism, while anaerobic glycolysis appears to be the dominant metabolic process late in culture, when the shift to the cathodal bands takes place. The variable response of these cultures to oxygen supplementation is presented.

変性した顆粒球が初期のLDH活性のパターンにどの程度影響しているかは評価しがたい。これらの細胞から酵素が漏れる可能性が相当ある。²² 最初の白血球浮遊液から顆粒球を除去し、残りの細胞（大部分はリンパ球）を培養した結果は、全白血球浮遊液の培養で認めたものと同様のLDHパターンを認めた。

基質の差が培養細胞のLDHパターンに及ぼす影響については、代謝順序とアイソザイム・パターンとの関係により詳細に解明する調査をさらに行なう必要がある。この手段としては短期の白血球培養が有利なように思われる。すなわち、逆分化は早く、細胞分裂活動も活発で、増殖に必要な代謝条件が満たされやすいからである。通常の培養における代謝活動のパターンを明らかにしたので、現在では培地を選択的に変更して研究することも可能である。

要 約

ヒト白血球の1次培養で認められるLDH活性の変化と細胞代謝および細胞分裂活動との関係を調べた。培養前の白血球浮遊液と培養24時間後の白血球では、主としてLDH-1とLDH-2が認められたが、培養48-72時間後にはパターンが移動があって、LDH-3とLDH-4が非常に増加した。Mアイソザイムの増加は、培養で移行型細胞と活発な細胞分裂が現われる時期に一致した。

培養基中のグルコース値は、全培養期間を通じて下降を続けたが、ビルビン酸と乳酸の増加は、培養48-72時間の時に最大であった。酸素濃度が次第に減少したことと、このような変化があったことは、培養初期における主要エネルギー源が好気性代謝であり、陰極側への移動が生ずる培養後期では、嫌気性解糖が主要代謝過程であるように思われる。培養で酸素添加を行なった時の種々の反応について報告した。

REFERENCES

参考文献

1. VESELL ES, BEARN AG: Isozymes of lactic dehydrogenase in human tissues. *J Clin Invest* 40:586, 1961
(ヒト組織における乳酸脱水素酵素のアイソザイム)
2. MARKERT CL, URSprung H: The ontogeny of isozyme patterns of lactate dehydrogenase in the mouse. *Develop Biol* 5:363, 1962
(マウスにおける乳酸脱水素酵素アイソザイム・パターンの個体発生学)
3. SHAW CR, BARTO E: Genetic evidence for the subunit structure of lactic dehydrogenase isozymes. *Proc Nat Acad Sci* 50:211, 1963
(乳酸脱水素酵素アイソザイムのサブユニット構造における遺伝的徴候)

4. KRAUS AP, NEELY CL, Jr: Human erythrocyte lactate dehydrogenase. Four genetically determined variants. *Science* 145:595, 1964
(ヒト赤血球の乳酸脱水素酵素. 遺伝学的支配を受ける4変種)
5. CAHN RD, KAPLAN NO, et al: Nature and development of lactic dehydrogenase. *Science* 136:962, 1962
(乳酸脱水素酵素の性質と発現)
6. VESELL E: Lactate dehydrogenase isozymes: Substrate inhibition in various human tissues. *Science* 150:1590, 1965
(乳酸脱水素酵素アイソザイム. 各種ヒト組織における基質抑制)
7. MOOREHEAD PS, NOWELL PC, et al: Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exper Cell Res* 20:613, 1960
(ヒト末梢血液培養による白血球染色体標本)
8. 柴田 進, 井内岩夫: 異常血色素. 最新医学15: 2567-78, 1960年
(SHIBATA S, IUCHI I: Abnormal hemoglobin. *Saishin Igaku-Mod Med*)
9. FOLIN O, MALMROS H: An improved form of Folin's micro method for blood sugar determinations. *J Biol Chem* 83:115, 1929
(Folin の血糖微量定量法の改良)
10. NATELSON S, MENNING CM: Improved methods of analysis for oxygen, carbon monoxide, and iron on finger-tip blood. *Clin Chem* 1:165, 1955
(指先血液中の酸素, 一酸化炭素, および鉄の分析法の改良)
11. FRIEDEMANN TE, HAUGEN GE: Pyruvic acid. 2. Determination of keto acids in blood and urine. *J Biol Chem* 147:415, 1943
(ピルビン酸. 2. 血液および尿中のケト酸の測定)
12. HUCKABEE WE: Control of concentration gradients of pyruvate and lactate across cell membranes in blood. *J Appl Physiol* 9:163, 1956
(血液におけるピルビン酸および乳酸の濃度勾配の細胞膜透過の調制)
13. HASTINGS J, FREEDMAN S, et al: Culture of human white cells using differential leukocyte separation. *Nature* 192:1214, 1961
(白血球分離法によるヒト白血球の培養)
14. PHILIP J, VESELL ES: Sequential alterations of lactic dehydrogenase isozymes during embryonic development and in tissue culture. *Proc Soc Exp Med* 110:582, 1962
(胎児の発育期間および組織培養における乳酸脱水素酵素アイソザイムの一連の変化)
15. ZINKHAM WH, BLANCO A, KUPCHYK L: Isozymes: Biological and clinical significance. *Pediatrics* 37:120, 1966
(アイソザイム: その生物学的臨床的意義)
16. KAPLAN NO: Lactate Dehydrogenase - Structure and Function. *Brookhaven Symposia in Biology*, No. 17, Subunit Structure of Proteins, 131, 1964
(乳酸脱水素酵素—その構造と機能)
17. MACKKINNEY AA, STOHLMAN F, Jr, BRECHER G: Kinetics of cell proliferation in cultures of human peripheral blood. *Blood* 19:349, 1962
(ヒト末梢血液培養における細胞増殖の力学)
18. TANAKA Y, EPSTEIN LB, et al: Transformation of lymphocytes in cultures of human peripheral blood. *Blood* 22:614, 1963
(ヒト末梢血液培養におけるリンパ球の移行)
19. QUAGLINO D, HAYHOE FGJ, FLEMANS RJ: Cytochemical observations on the effect of phytohaemagglutinin in short-term cultures. *Nature* 196:338, 1962
(短期培養におけるファイトヘマグルチニンの影響に関する細胞化学的観察)
20. WILSON AC, CAHN RD, KAPLAN NO: Functions of the two forms of lactic dehydrogenase in the breast muscle of birds. *Nature* 197: 331, 1963
(鳥の胸筋における2種類の乳酸脱水素酵素の機能)
21. CAHN RD: Developmental changes in embryonic enzyme patterns: The effect of oxidative substrates on lactic dehydrogenase in beating chick embryonic heart cell cultures. *Develop Biol* 9:327, 1964
(胎児の発育に伴って起こる酵素パターンの変化: ニワトリ胎児の搏動心臓細胞の培養中, 乳酸脱水素酵素に及ぼす酸化性基質の影響)
22. DANES BS, PAUL J: Environmental factors influencing respiration of strain L cells. *Exp Cell Res* 24:344, 1961
(L系統細胞の呼吸に影響を与える環境要因)