

LACTIC DEHYDROGENASE ACTIVITY AND THE METABOLISM OF
HUMAN LEUKOCYTES IN SEVEN-DAY CULTURES

7日間培養におけるヒト白血球の乳酸脱水素酵素活性と代謝

ARTHUR D. BLOOM, M.D.

TAKESHI WAJIMA, M.D. 和嶋 毅

MASANORI TSUCHIOKA, B.A. 土岡正法



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。

LACTIC DEHYDROGENASE ACTIVITY AND THE METABOLISM OF HUMAN LEUKOCYTES IN SEVEN-DAY CULTURES

7日間培養におけるヒト白血球の乳酸脱水素酵素活性と代謝

ARTHUR D. BLOOM, M.D.^{1†}

TAKESHI WAJIMA, M.D.^{2*} 和嶋 毅

MASANORI TSUCHIOKA, B.A.¹ 土岡正法

Approved 承認 21 July 1966



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

Department of Clinical Laboratories, ABCC¹ and Department of Clinical Pathology, Yamaguchi Medical College²

ABCC臨床検査部¹ および山口県立医科大学臨床病理教室²

† Surgeon, US Public Health Service, The National Center for Radiological Health, Population Studies Program, assigned to ABCC
米 国 公 衆 衛 生 局 放 射 線 保 健 セ ン タ ー 人 口 調 査 計 画 部 門 所 属 医 師 で ABCC へ 派 遣

* Visiting research associate to ABCC

ABCC客員研究員

LACTIC DEHYDROGENASE ACTIVITY AND THE METABOLISM OF
HUMAN LEUKOCYTES IN SEVEN-DAY CULTURES
七日間培養におけるヒト白血球の乳酸脱水素酵素活性と代謝

ACKNOWLEDGMENT

感謝のことば

Appreciation is extended to Dr. Warner F. Sheldon, former Chief of Research in Pathology, ABCC, for his assistance in evaluating cell morphology during culture.
培養細胞の形態の評価に援助をいただいた ABCC 病理部の前部長 Dr. Warner F. Sheldon に深く感謝する。

A paper based on this report has been accepted for publication by Science
本報告に基づく論文は Science に受理された

LACTIC DEHYDROGENASE ACTIVITY AND THE METABOLISM OF HUMAN LEUKOCYTES IN SEVEN-DAY CULTURES

7日間培養におけるヒト白血球の乳酸脱水素酵素活性と代謝

INTRODUCTION

Primary cultures of human leukocytes provide a rapidly dividing and metabolically active tissue for the investigation of isozyme synthesis. As described in a previous report,¹ leukocytes in short-term culture have been found to undergo a shift in their patterns of lactic dehydrogenase (LDH) activity from anodal dominance early in culture to increased cathodal activity at 72 hours. This shift occurred simultaneously with increased accumulations of pyruvic and lactic acids in the medium, continued glucose utilization by the cells, and maximum transformation and mitotic activity of lymphocytes in culture.

These findings tended to support the hypothesis that the cathodal-migrating bands of LDH are associated with conditions of relative anoxia, and anaerobic metabolism, while anodal isozymes predominate under conditions of higher oxygen tension and aerobic metabolism.² However, extension of the culture time and further observations of the metabolism of the cells on completion of dedifferentiation and mitosis now casts doubt upon the aerobic-anaerobic isozyme hypothesis of LDH synthesis, as applied to this system.

METHOD

Human leukocytes from normal volunteers were cultured under stimulation of phytohemagglutinin, in tissue culture medium 199, with a volume of fetal bovine serum equal to that of the cell suspension. From $6-8 \times 10^6$ cells were inoculated into each culture, and cultures were incubated at 37°C for 48, 72, 96, or 168 hours. Cells were harvested, washed three times in isotonic saline, and homogenized in 0.5 ml saline, at room temperature, at 2500 rpm, using a teflon Tri-R Stir-R tissue homogenizer.

緒言

ヒト白血球の一次培養を行なって、細胞分裂の早い、代謝の活発な組織を、アインザイム合成の研究に利用した。先の報告¹で述べたとおり、白血球の短期培養における乳酸脱水素酵素(LDH)活性のパターンは、培養初期に陽極側が優勢であるが、培養72時間後に陰極側の活性に増強が認められた。この変化と同時に、培養液中のピルビン酸と乳酸蓄積量が増加し、細胞のブドウ糖利用が続くとともに培養リンパ球の移行および分裂活動は最高に達した。

上記の所見は、陰極側のLDH活性帯と酸素の相対的な欠乏状態および嫌気性代謝との間に関連があり、一方、陽極側のアインザイムは酸素圧の高い状態および好気性代謝状態の時に多いという仮説²を支持すると思われる。しかし、培養時間をさらに延長して、逆分化と細胞分裂の完了した細胞について、その代謝をさらに観察した結果、この系統に関する限り、LDH合成の好気性・嫌気性アインザイム仮説に疑問をいだくに至った。

方法

正常供血者から入手したヒト白血球をフェイトヘマグルチニンで処理して組織培養液199号に入れ、血球浮遊液と等量のウシ胎児血清を添加して培養した。各培養に $6-8 \times 10^6$ 個の細胞を接種し、37°Cで48, 72, 96ないし168時間培養を行なった。細胞を採取して等張食塩水で3回洗浄し、食塩水0.5 ml 加え、室温において、Tri-R Stir-R テフロンホモゲナイザーを用いて1分間2500回転で磨砕した。

Analyses of glucose, pyruvic and lactic acids, and alpha-ketoglutaric acid were performed on the medium, while agar gel electrophoresis, total lactic dehydrogenase activity, and total protein were performed on cell homogenates. Glucose was determined using a modification of Folin's micro-method;³ pyruvic acid, according to Friedemann and Haugen;⁴ and lactic acid, according to Huckabee.⁵ Alpha-ketoglutarate determinations were done on the basis of Shimizu's quantitative technique for extraction of the 2, 4 dinitrophenylhydrazine derivative into xylol.⁶ The assay for total LDH activity was adapted to cell homogenates from the procedure originally described by Wroblewski⁷ for reduction of pyruvic acid in the presence of NADH. Total protein determinations were done according to the Lowry technique.⁸ Agar gel electrophoresis was performed at 4°C on cell homogenates with sodium lactate as the substrate, NAD as coenzyme, and phenazine methosulfate as electron carrier. A purple band was produced at the sites of LDH activity, by reduction of nitro blue tetrazolium to formazan. The results presented here are derived from studies of 77 cultures from 13 subjects.

RESULTS

As previously described,¹ in the first 72 hours of culture, the levels of pyruvic and lactic acids rose, while glucose in the medium fell. From Figure 1, it is apparent that continued culturing of these leukocytes results in a further increase of lactic acid, with a precipitous decline in available glucose in the medium by 168 hours. Pyruvic acid, however, appeared to reach a plateau, after rising in the first 72 hours of culture.

In all cultures, total LDH activity increased during the period of maximal mitotic activity, while total protein decreased, reflecting degeneration of the largest cell population inoculated into culture, the granulocytes. Thus, the specific activity (Figure 2), defined as the number of units of LDH per milligram of protein, continued to rise throughout the 168-hour culture period, confirming the relative increase of LDH in, first, the dividing, and then the non-dividing cells.

The normally seen shift in isozyme pattern is shown in Figure 3, with the increase in LDH-3 and LDH-4 at 72 hours indicating a decrease in H subunit activity and an increase in M subunits.* While the decrease in H subunits, and therefore the rise in

培養液中のブドウ糖, ピルビン酸, 乳酸およびアルファ・ケトグルタル酸分析を行ない, 細胞ホモジネートについて寒天ゲル電気泳動法, 総LDH活性測定と総蛋白定量を行なった. ブドウ糖は Folin の微量定量法³ の変法; ピルビン酸は Friedemann および Haugen の方法;⁴ 乳酸は Huckabee の方法⁵ で測定した. アルファ・ケトグルタル酸定量は, 清水の定量法⁶ に基づいて, キシロールで 2, 4 ジニトロフェニルヒドラジン誘導体を抽出して行なった. 総LDH活性の測定に Wroblewski⁷ の報告した NADH によるピルビン酸還元の方法を血球ホモジネートに応用した. 総蛋白定量は, Lowry の技法⁸ で行なった. 血球ホモジネートの寒天ゲル電気泳動法は, 4°C で, 基質として乳酸ナトリウム, 補酵素として NAD, 電子伝達系として phenazine methosulfate を用いて行なった. LDH活性部分では, nitro blue tetrazolium が formazan に還元されて紫色を呈す. ここに報告した知見は, 13例 77本の培養の研究で求めた.

結果

すでに報告したとおり,¹ 72時間培養では, 培養液中のピルビン酸と乳酸が増加し, ブドウ糖が減少した. 図1に示したように, 白血球培養をさらに続行すると, 乳酸の増加は続き, 培養液中のブドウ糖は培養168時間で非常に減少する. しかし, ピルビン酸は培養72時間で峠に達するようである.

いずれの培養でも, 最大の細胞分裂活動が認められる時期に総LDH活性の増加があり, 一方, 総蛋白量は減少した. これは, 培養血球の大部分を占める顆粒球の変性を反映した所見である. そこで, 蛋白1mg当たりのLDH単位数をもって表わした特異的活性(図2)をみると, 培養168時間を通じて上昇が続いたが, これは, LDHの相対的増加がまず分裂細胞に起こり, 次いで非分裂型細胞に起こることを確認する.

図3には, アインザイム像に通常認められる移動を示したが, 培養72時間後のLDH-3とLDH-4の増加は, Hサブユニット活性の低下とMサブユニットの増加を示す.* 初期の細胞分裂周期では, このHサブユニットの減少と

*H and M subunits refer to the heart and muscle polypeptides, respectively, of lactic dehydrogenase. These polypeptides comprise the two basic subunits of which each LDH tetramer is composed.

HおよびMサブユニットは, それぞれLDHの心臓型および筋肉型のポリペプチドである. このポリペプチドは各LDH四量体を構成する2つの基本的サブユニットである.

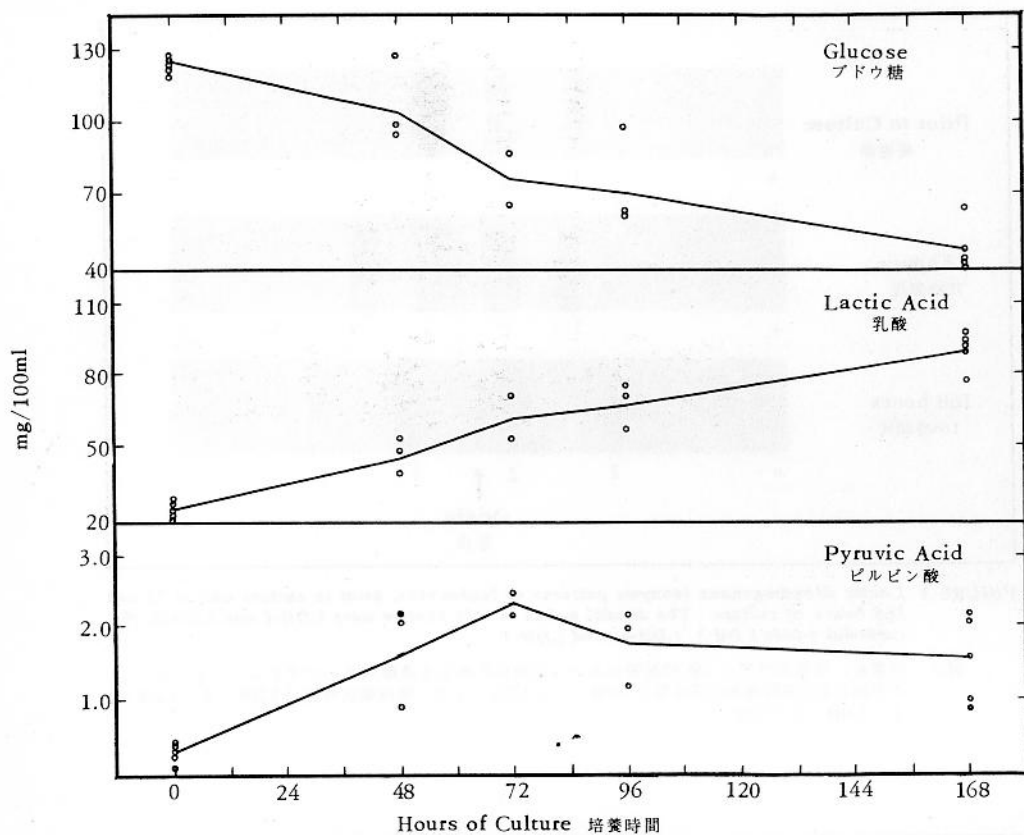


FIGURE 1 Glucose, lactic and pyruvic acids in the medium of leukocyte culture. Each point represents a single determination from a culture assayed at the indicated time. The curves were derived from plots of the mean value obtained.

図1 白血球培養液中のブドウ糖、乳酸とピルビン酸。各点は、その時に検査した各培養の個々の測定値である。その平均値を用いて曲線を描いた。

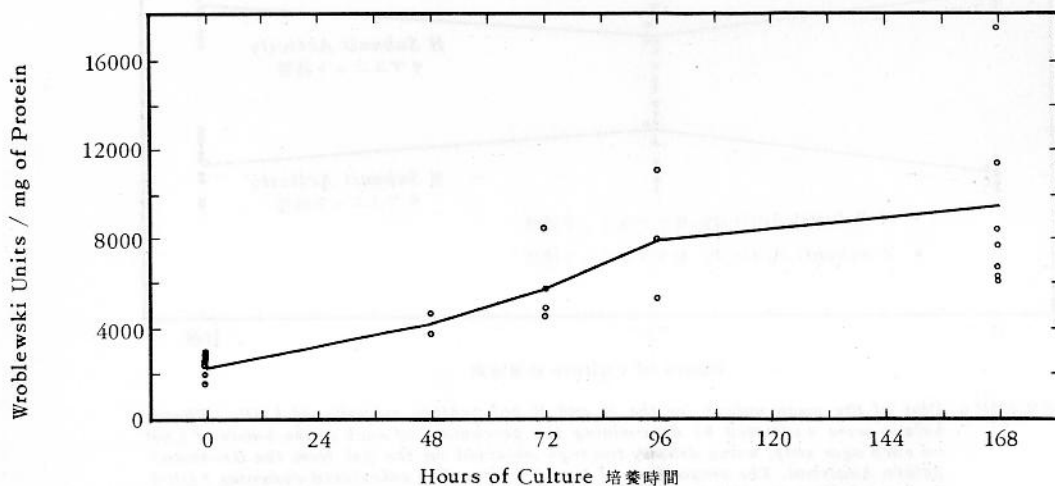


FIGURE 2 Specific activity of lactic dehydrogenase in cultured human leukocytes. With degeneration of the large granulocyte population, the fall in protein per milligram of cell homogenate and the concomitant rise in total LDH activity produce a marked increase in specific activity throughout cell culture.

図2 培養ヒト白血球の乳酸脱水素酵素の特異的活性。大きな顆粒球集落の変性につれて、血球ホモジネート1mg当たりの蛋白量が減少し、これに応じて総LDH活性の増加があるために、血球培養の全期間を通じて特異的活性の著しい増加があった。

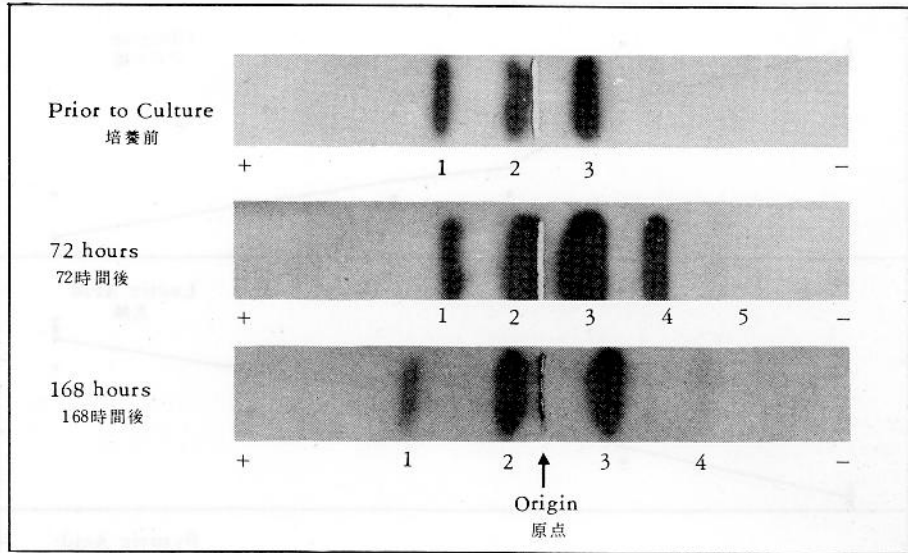


FIGURE 3 Lactic dehydrogenase isozyme patterns of leukocytes, prior to culture and at 72 and 168 hours of culture. The anodal bands in this system were LDH-1 and LDH-2, the cathodal bands LDH-3, LDH-4, and LDH-5.

図3 培養前、培養72時間と168時間後における白血球乳酸脱水素酵素アイソザイム・パターン。この系統における陽極側の活性帯はLDH-1とLDH-2で、陰極側活性帯はLDH-3、LDH-4とLDH-5である。

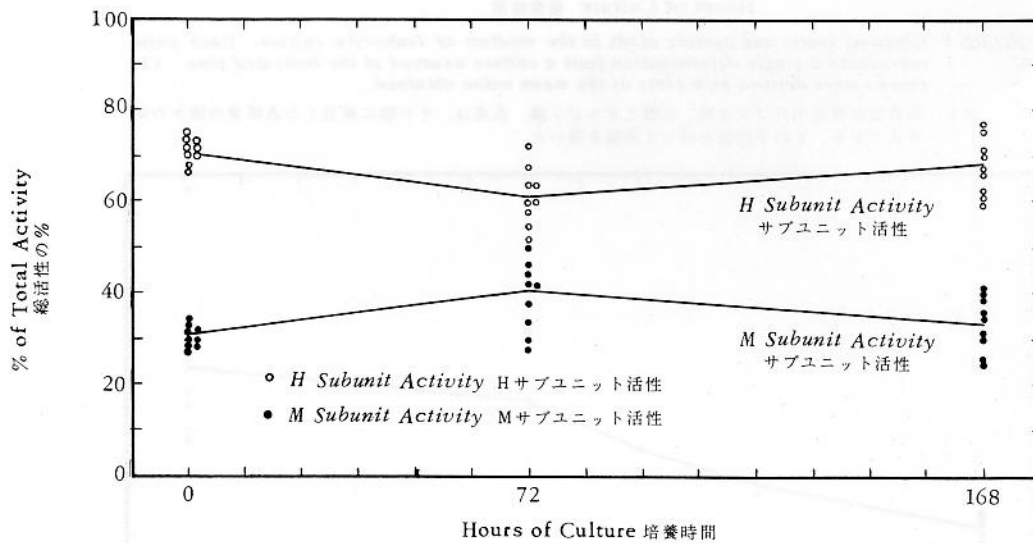


FIGURE 4 Plot of the mean values for the H and M polypeptide subunits of LDH. These values were estimated by determining the percentage of each of the bands of LDH on each agar strip, using density tracings obtained on the gel from the Beckman/Spinco Analytrol. The proportions of H and M were then calculated assuming LDH-1 to consist of 4 H subunits; LDH-2, HHHM; LDH-3, HHMM; LDH-4, HMMM; and LDH-5, MMMM.

図4 LDHのHおよびMポリペプチドサブユニットの平均値の図。この数値は、各寒天平板上の各LDH帯について Beckman / Spinco Analytrol で吸光度測定を行なって求めた百分率に基づいて推定した。HとMの割合の計算は、LDH-1の構成が4個のHサブユニット、LDH-2がHHHM、LDH-3がHHMM、LDH-4がHMMM、LDH-5がMMMMであると仮定して行なった。

M subunits, was consistent for all cultures during the initial mitotic cycles, at 168 hours there was some variation. Three of the nine cultures studied at 168 hours showed a continued decrease, of 1%-5%, in H subunit activity, when compared to the 72-hour values, while the remaining six showed increases of 6%-22%. As seen in Figure 4, the mean values for H subunit activity were 70.4% prior to culture, 60.1% at 72 hours of culture, and 67.3% at 168 hours.

The mitotic characteristics of the cell population in culture also were changing. In the first 24 hours of culture, the number of cells in active division was less than 5 per 1000 cells examined. This figure rose to a peak of 70-80 at 72 hours, and subsequently fell to 20 or less at 168 hours. As also evidenced by the continued metabolic activity of the cells, the histologic appearance at 168 hours was that of intact, viable cells. There was no evidence of degeneration, such as vacuolization of the cytoplasm or nuclear pyknosis. Two types of cells were seen in the colonies: centrally, small cells with densely stained nuclei; and in the periphery, larger cells with more cytoplasm, and less darkly stained nuclei. The former may represent well differentiated small lymphocytes, the latter the so-called transformed, or blast, cells of leukocyte culture.

それに伴うMサブユニットの増加が、すべての培養に一樣に認められたが、培養168時間後には若干の差が認められるようになった。培養168時間後に検査を行なった9本中3本のHサブユニット活性は、72時間値と比べて、1%-5%の減少が続いていたが、残りの6本では6%-22%の増加があった。図4にみられるように、Hサブユニット活性の平均値は、培養前に70.4%、培養72時間後に60.1%、168時間後に67.3%であった。

培養における血球集団の細胞分裂特性も変化した。培養24時間後では、分裂活動を示す細胞の数は、被検細胞1000個当たり5個以下であった。72時間では、最高の70-80個に達し、その後、168時間では20以下になった。培養168時間後の細胞は、引き続き代謝活動を示すとともに、組織学的にも異常はなかった。細胞質の空胞形成あるいは核濃縮など、変性の形跡は認められなかった。細胞群に2種類の細胞を認めた。すなわち、中心部には、濃染する核をもつ小さな細胞があり、周辺部には、細胞質に富み、核が薄く染まる大きな細胞がある。前者は、よく分化した小リンパ球である。後者は、白血球培養におけるいわゆる移行型細胞、すなわち、芽球であろう。

TABLE 1 ALPHA-KETOGLUTARATE DETERMINATIONS IN MEDIUM OF CULTURED LEUKOCYTES

表1 白血球培養液中のアルファケトグルタル酸測定

Patient Number 症例番号	Prior to Culture 培養前	72 hours 72時間後	168 hours 168時間後
1	0.1 mg/100ml	1.4	0.8
2	0.2	1.0	0.7
3	0.1	1.5	1.5
4	0.1	1.5	1.5

The markedly increased levels of pyruvic and lactic acids found at 72 hours raised the possibility of a shift in the metabolic processes of the cells toward anaerobic glycolysis with increasing time in culture. The assays of alpha-ketoglutaric acid in the medium (Table 1) showed a 5-15 fold increase in the first 72 hours of culture. However, between 72 and 168 hours the levels either decreased or remained constant, suggesting, as supported by the continuing rise in lactate, that anaerobic glycolysis had become a significant energy source.

The effect of increased concentrations of pyruvic or lactic acids early in culture were then evaluated to determine whether these substrates alone could induce cathodal band formation. Concentrations of

培養72時間後にピルビン酸と乳酸の著しい増加が認められたことは、培養時間の延長とともに細胞代謝が嫌気性解糖に移行するのではないかという可能性が考えられる。培養液中のアルファ・ケトグルタル酸測定の結果(表1)、培養72時間後に5-15倍の増加が認められた。しかし、72時間から168時間までの間では、測定値が減少する場合も、一定である場合もあったことは、嫌気性解糖が主要エネルギー源となったことを示すと思われ、乳酸の増加が続くことはこの考えを支持するものである。

次に、培養初期に認められたピルビン酸および乳酸濃度上昇の影響を調べて、これらの基質のみでも陰極側活性帯が生ずるか否かを見た。1リットル当たり0.14-1.44 mM

0.14-1.44 mM per liter of pyruvic acid were added to these cultures in single or multiple doses, at 24-hour intervals, for the first 3 days. This range encompassed maximal pyruvate concentrations found in the leukocyte cultures. Similarly, 3.0-12.0 mM per liter of sodium lactate were added to other cultures, and as with the pyruvic acid addition, no alteration in the normal sequence of isozyme synthesis was produced. At concentrations above these, cell viability was impaired, and the cultures failed.

CONCLUSION

These results suggest that the synthesis of a particular isozyme by a tissue, or population of cells, may depend less on the biochemical environment than on the functional activities of the cells. The relative autonomy of isozyme synthesis in living cell systems is attested to by the difficulty in altering the pattern of LDH synthesis in a given tissue.⁹ The invariably increased cathodal band activity of these cells at 72 hours of culture may reflect the intense mitotic activity of the cell population and the activation, or de-repression, of the genetic locus responsible for M subunit synthesis, rather than representing an effect induced by the high levels of pyruvic or lactic acids. With the observed decline in cell division at 168 hours, this locus may again become inactive, the isozymes tending to return toward the premitotic pattern. Thus, in the leukocyte in vitro, anaerobic metabolism, and the metabolic products of this metabolism, do not appear to determine the pattern of LDH synthesis.

The application of this study to in vivo cell functioning is unclear. The activity of genes under the stimulus of a potent mitotic agent (PHA), and in the presence of a synthetic medium for support of cell division and growth, precludes direct comparison with cells in the soma. However, it seems reasonable to conclude that isozyme synthesis does not purely indicate an adaptation of cells to a changing biochemical environment, or a changing metabolic pathway. Something more intrinsic in the genetic control of protein synthesis during differentiation and cell division appears to regulate the formation of different molecular forms of the same enzyme.

SUMMARY

The normally seen increase in the cathodal band activity of lactic dehydrogenase isozymes at 72 hours of leukocyte culture is accompanied by intense mitotic activity and transformation of lymphocytes into blast-like forms. The increased levels of lactic acid by 168 hours of culture, together with the

濃度のピルビン酸を、最初の3日間、24時間ごとに1回あるいは数回、培養に添加した。白血球培養中に認められたピルビン酸最高濃度は、この範囲内である。別の培養に、1リットル当たり3.0-12.0 mMの乳酸ナトリウムを、同様の方法で、添加した。いずれの場合も、アイソザイム合成の正常な過程に変化は生じなかった。濃度をこれ以上にすると、細胞の生命力が阻害され、培養は失敗する。

結 語

上記の結果から、ある組織または細胞集団によるある特定のアイソザイムの合成が、生化学的環境よりは、むしろ、細胞の機能活動によって左右されるのではないかと考えられる。生きている細胞系統におけるアイソザイム合成が、比較的自律的に行なわれるということは、ある組織におけるLDH合成のパターンの変更が困難であることからでもわかる。⁹ 培養72時間後に常に認められた陰極側活性帯の増強は、高濃度のピルビン酸または乳酸の影響というよりは、むしろ、細胞集団の活発な細胞分裂活動ならびにMサブユニット合成を支配する遺伝子座の賦活あるいは抑制解除を反映しているかもしれない。培養168時間では、細胞分裂の下降が認められ、この座位が再び非活動性となって、アイソザイムが細胞分裂前のパターンにもどる傾向を示す。かくて、試験管内における白血球のLDH合成のパターンは、嫌気性代謝およびその代謝産物の影響を受けないようである。

今回の研究の結果が、生体内における細胞の機能にいかん当てはまるかは不明である。強力な細胞分裂誘発剤(PHA)の刺激のもとで、しかも、細胞増殖に人工的な培養液を用いた場合の遺伝子活動を、生体内の場合と直接比較できない。しかし、アイソザイム合成は、生化学的環境の変化に対する単なる細胞の適応あるいは代謝経路の変化のみを反映するのではないと結論しても不合理ではないと思われる。細胞の分化と細胞分裂の際における蛋白合成の遺伝的制御には、これ以外にもっと本質的な何ものかが作用して、同一酵素の中で異なる分子構造を有するものの形成を調節するのであろう。

要 約

白血球の培養72時間目において通常認められる乳酸脱水素酵素アイソザイムの陰極側活性帯の増強は、活発な細胞分裂活動とリンパ球の芽球様細胞への移行を伴う。培養168時間で乳酸値の上昇があることと、その時期にMサブユニット合成に変化がみられることは、この系統に

variation in M subunit synthesis at that time, suggest that isozyme synthesis in this system is related less to the aerobic-anaerobic metabolic pathways of the cells than to mitosis and the state of differentiation in vitro.

おけるアイソザイム合成が、細胞の好気性・嫌気性代謝経路よりは、むしろ試験管内で認められる細胞分裂および分化現象との関係が深いことを示唆する。

REFERENCES

参考文献

1. 和嶋 毅 (WAJIMA T), BLOOM AD , HAMILTON HB : 培養ヒト白血球細胞の lactic dehydrogenase isozyme. 医学と生物学 73: 206-10, 1966年
(Lactic dehydrogenase isozyme in cultured human leukocytes Igaku to Seibutsugaku-Med Biol)
2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. 清水泰二: 血液及び尿中 α -Keto 酸. 1. 焦性ブドウ酸及び α -Ketoglutar -酸定量法. 医学と生物学 17: 102, 1950年
(SHIMIZU T: Quantitative determination of pyruvic acid and α ketoglutaric acid. Igaku to Seibutsugaku-Med and Biol)
7. WROBLEWSKI F, LADUE JS: Lactic dehydrogenase activity in blood. Proc Soc Exp Med Biol 90:210, 1955
(血液における乳酸脱水素酵素活性)
8. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, et al: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265, 1951
(Folin のフェノール試薬による蛋白定量)
9. 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)