

家畜の血清 Cholinesterase に関する臨床学的研究

VI. -20°C 凍結保存による血清 Cholinesterase Isoenzyme の安定性について

森園 充・大前清武

(家畜内科学研究室)

昭和54年8月20日 受理

Clinical Studies on Serum-Cholinesterase in Domestic Animals

VI. Effect of Storage at -20°C on Isoenzymatic Activity of Serum-Cholinesterase

Mitsuru MORIZONO and Kiyotake ŌMAE

(Laboratory of Veterinary Medicine)

緒 言

血清 Cholinesterase (S-ChE) 活性値の長期凍結保存による安定性の検討については、ヒトで Sider ら¹⁾ や Per Juul ら²⁾ によって、また家畜では Mersmann ら³⁾ や Schindler ら¹⁰⁾ によって検討されており、著者らも第 II 報⁵⁾ において、ウマ、イヌ、ネコ、ブタ、ウシの5畜種について検討を行なったが、S-ChE iso-enzyme の分画活性値の長期保存による安定性については、ヒトで Per Juul²⁾ の報告がある以外は、家畜では皆無である。

そこで、著者らは、臨床的に家畜の S-ChE iso-enzyme の検出のため、保存血清の供試期間を調べる目的で、家畜の中で S-ChE 活性値の最も高いウマと、最も低いウシの2畜種について、血清分離後、 -20°C 、8週間の凍結保存による安定性について、isoenzyme 分画活性値の定量的な検討を行なった。

材料と方法

1. 実験動物

実験に使用した畜種はウマ、ウシの2種で、ウマは中央競馬会栗東トレーニングセンターの競争馬6検体(♂3, ♀3)である。品種はサラブレッド、年齢はすべて3才である。ウシは鹿児島県畜産試験場における10検体(♂5, ♀5)で、品種は黒毛和種、年齢は2-6才である。

2. 採血、血清分離および保存

ウマについては第 V 報⁷⁾ に準じて行なったが、ウシ

は頸静脈より採取した。採血後、約1時間、室温に放置後、3000 r.p.m で15分間、遠心分離を行ない、血清分離後、直ちに同一血清を9本の試験管に分け、その中の1本は分注後、S-ChE 活性値の測定および S-ChE isoenzyme の検出を行なった。残り8本は密栓して凍結保存し、実験の都度、1本ずつ取りだし、流水中で融解させて使用した。

3. S-ChE 活性値測定法と測定器械

S-ChE 活性値の測定は第 I 報⁴⁾ に述べた方法で、凍結前、凍結後1週から8週にかけて1週間ごとに測定した。ただし、ウマでは7週目、ウシでは1, 3, 5, 7週目の測定は省略した。測定器械は第 IV 報⁶⁾ で使用したのと同じである。

4. S-ChE isoenzyme の検出法

S-ChE isoenzyme の検出法は、第 IV 報⁶⁾ に述べた方法で行ない、検出は活性値の測定と同時に終わった。

結 果

ウマについては Fig. 1 に示すように8週の間、各分画の易動度は、凍結保存による影響は見られず、各分画の活性比も同様に新鮮時の活性比と著変は認められない (Fig. 2)。各分画の活性値 (S-ChE activity × 活性比/100) を Fig. 3 に示すが、同様に変化はなかった。

ウシについては、著者らの第 VII 報⁸⁾ の S-ChE 正常 zymogram の分類に基づくと、新鮮時には、10検体のうち7検体が Type I で、3検体が Type III であったが、保存実験を続ける間、同一検体での CC_2 分画

の易動度が fast, middle, slow の定位置間を週毎に交代移動し, Type I であった検体が Type III の zymogram パターンを示し, Type III であった検体が,

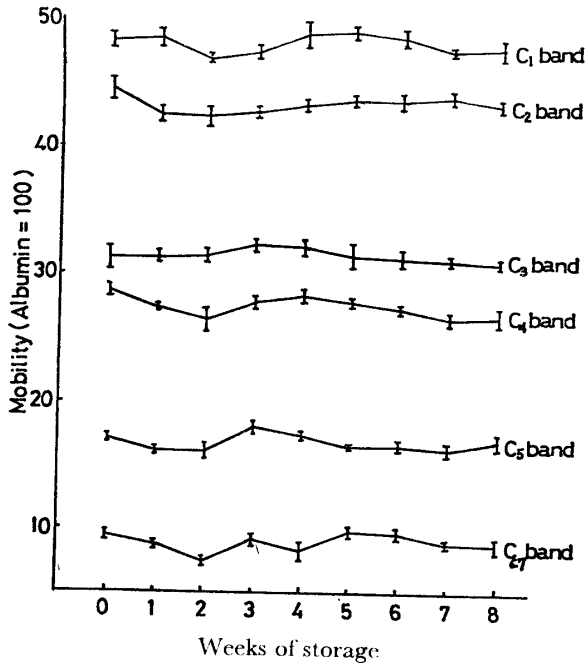


Fig. 1. Variation in the mobilities of horse serum cholinesterase isoenzymes after storage at -20°C . The vertical bars represent each standard error.

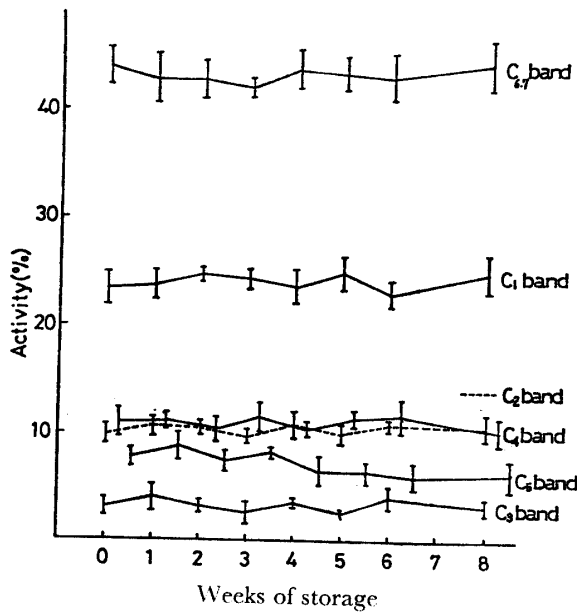


Fig. 2. Variation in the activities of horse serum cholinesterase isoenzymes after storage at -20°C . The vertical bars represent each standard error.

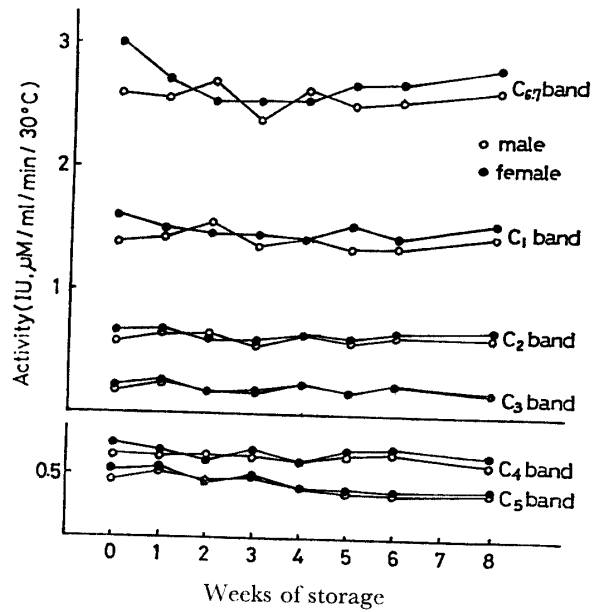


Fig. 3. Variation in the activities (IU) of horse serum cholinesterase isoenzymes after storage at -20°C .

Type II の zymogram パターンを示すなどの, Type の交代現象が見られた. 従って本実験では, 各週における isoenzyme を検出した時点で, Type の交代は無視して, fast, middle, slow の CC_2 分画の易動度の変化の観察のみに限定した. その結果を Fig. 4 に示すが 8 週間, 各分画の易動度には大きな変化は見られな

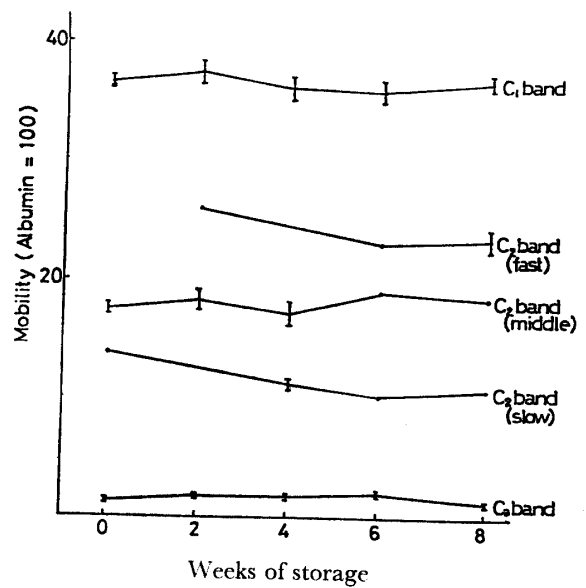


Fig. 4. Variation in the mobilities of cattle serum cholinesterase isoenzymes after storage at -20°C . The vertical bars represent each standard error.

かった。各分画の活性比については Fig. 5 に示すが、後半 CC₂ 分画の活性の増加が僅かに見られ、相対的に CC₁ 分画と CC₃ 分画の活性比が減少した。各分

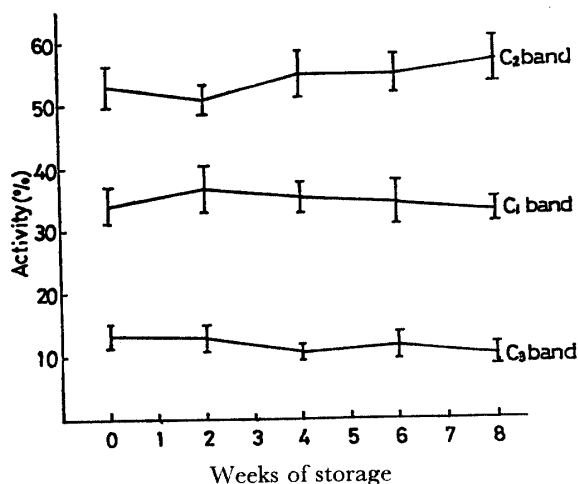


Fig. 5. Variation in the activities of cattle serum cholinesterase isoenzymes after storage at -20°C . The vertical bars represent each standard error.

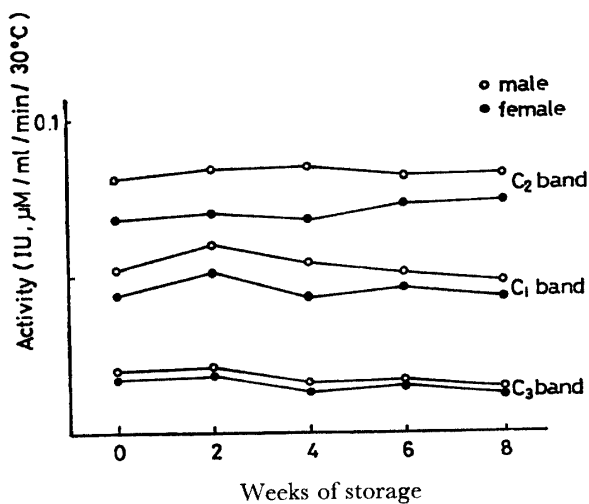


Fig. 6. Variation in the activities (IU) of cattle serum cholinesterase isoenzymes after storage at -20°C .

画の活性値については Fig. 6 に示すが、CC₂ 分画の活性値は8週間、まったく失活せず新鮮時の活性値が維持された。一方、CC₁ 分画および CC₃ 分画の活性値は、2週目ぐらいから若干、低下する傾向が見られた。

考 察

凍結保存による、S-ChE isoenzyme の安定性についてはヒトで Per Juul²⁾ が、 -20°C で30日間、凍結保存した血清において、易動度の遅い分画の活性比が増加したものが、一検体見られ、また凍結、解凍をすばやく10回くり返したものでは、zymogram パターンに変化は見られず、また -10°C で凍結保存した血清では C₀ 分画の活性がかなり高まったと報告している以外、報告例はなく、家畜では皆無である。

本実験では第 II 報⁵⁾ の結果に基づき、凍結保存による S-ChE 活性が最も安定しているウマと活性値が低く最も失活の割合が大きいウシについて isoenzyme レベルでの S-ChE の安定性について検討した。この種の検討を行なった文献は見当たらず、比較検討はできないが、凍結保存により、ウマの S-ChE 活性値が安定しているのと同様に、S-ChE isoenzyme についても、易動度、活性比、活性値が変化しないことが判明し、またウシについては、凍結保存により S-ChE 活性に若干の失活が見られるのは、ChE isoenzyme については CC₁、CC₃ 分画の活性比の低下によるものであり、CC₂ 分画の活性比は変化していない。また、CC₂ 分画の易動度に変化が見られ、Type の交代現象が見られた。isoenzyme の易動度が変化することについて Svensmark¹²⁾ はヒトの S-ChE は neuraminidase により遊離するシアル酸残基を含む glycoprotein であり、それ故神経病などでこの酸の残基が移動すると S-ChE isoenzyme の易動度が減少すると報告しているが、易動度の減少は全体的であり、何よりも神経病との関係が明らかである。正常なヒト、家畜において S-ChE isoenzyme の易動度の変化についての報告はない。LaMotta³⁾ らはヒトの S-ChE isoenzyme が実験条件により、相互交代しうるが、これは isoenzyme 構成単位蛋白が可逆的重合を起こすことによって生じたものであるとし、また Boutin と Brodeur¹⁾ は in vitro では相互交代しうるが in vivo ではおこりえないという可能性を認め、新鮮血清の ChE と種々の実験条件下にある血清の ChE とでは構成単位蛋白の集合の状態が違うのではないかと述べているが何れも推測の域を出ない。上述の見解に従えば、ウシの S-ChE 活性値は他畜種に比べ極端に低いために isoenzyme を構成する単位蛋白の重合の度合が不安定で可逆的重合を起こしやすいのではないかと、また凍結保存すると、活性の低いウシでは in vitro の状態に置かれることによって、ChE の構成単位蛋白の集合の状態に変化を生

じやすくなり, そのために CC_2 分画の易動度に変化を生じ, Type の交代現象が見られるのではないかとも思われる. しかし易動度の変化が CC_2 分画に限って見られ, しかもこれが fast, middle, slow の定位置間を移動する現象は興味ある所見と考える.

いずれにせよウマにおいては凍結保存により, S-ChE 活性値のみならず, isoenzyme についても, 易動度, 活性比, 活性値が新鮮時と変わらず, またウシにおいては凍結保存により, S-ChE 活性値同様, isoenzyme についても易動度はともかく, 活性比, 活性値に過度の変化が見られなかったことは, 今後の S-ChE isoenzyme の, 臨床的研究域を広め, S-ChE 研究の発展に寄与し得るものと考え.

要 約

-20°C, 8週間の凍結保存血清について, S-ChE isoenzyme 分画を定量的に検討した結果, 次のような知見が得られた.

1. ウマでは各分画の易動度, 活性比および活性値は新鮮時と変わらなかった.
2. ウシでは C_2 分画の易動度に著明な変化がみられ, fast, middle, slow の各 Type の交代現象がみられた.
3. ウシの C_1, C_2 分画の易動度は新鮮時と大差はなく, 後半, これらの活性値に若干の低下が認められた.

文 献

1) Boutin, D. and Brodeur, J.: Human serum pseudocholinesterase: molecular weight estimation of a subunit structure. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 777-779 (1971)

- 2) Juul, P.: Human plasma cholinesterase isoenzymes. *Clin. Chim. Acta.*, 19, 205-213 (1968)
- 3) LaMotta, R. V., McComb, R. B., Noll, C. R., Jr., Wetstone, H. J. and Reinfrank, R. F.: Multiple forms of serum cholinesterase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 124, 299-305 (1968)
- 4) 森園 充・桃 秀人: 家畜の血清 Cholinesterase に関する臨床学的研究 I. 家畜の血清 Cholinesterase 活性値の測定法. 鹿大農学術報告, 27, 115-121 (1977)
- 5) 森園 充・桃 秀人: 家畜の血清 Cholinesterase に関する臨床学的研究 II. -20°C 凍結保存による酵素の安定性. 鹿大農学術報告, 27, 123-125 (1977)
- 6) 森園 充・桃 秀人: 家畜の血清 Cholinesterase に関する臨床学的研究 IV. 家畜の血清 Cholinesterase isoenzyme の検出法. 鹿大農学術報告, 27, 131-139 (1977)
- 7) 森園 充・大前清武・岩月妙子: 家畜の血清 Cholinesterase に関する臨床学的研究 V. 著者らの測定法による家畜の血清 Cholinesterase (S-ChE) の正常活性値の検討と子ウシの S-ChE 活性値の性差出現時期について. 鹿大農学術報告, 30, 173-179 (1980)
- 8) 森園充・大前清武: 家畜の血清 Cholinesterase に関する臨床学的研究 VII. 著者らの検出法による家畜の血清 Cholinesterase 正常 Zymogram の定量的検討. 鹿大農学術報告, 30, 185-191 (1980)
- 9) Mersmann, H. J. and Sanguinetti, M. C.: Automated determination of plasma and erythrocyte cholinesterase in various species. *Am. J. Vet. Res.*, 35, 579-583 (1974)
- 10) Schindler, R. L. and Kruckenberg, S. M.: Changes in cholinesterase activity in stored equine blood samples. *Am. J. Vet. Res.*, 33, 1893-1894 (1972)
- 11) Siders, D. B. Batsakis and Stiles, D. E.: Serum cholinesterase activity. *Am. J. Clin. Path.*, 50, 344-350 (1968)
- 12) Svensmark, Dan.: Effect of sialidase on the electrophoretic properties of human serum cholinesterase. *Med. Bull.*, 8, 28 (1961)

Summary

In respect to the serum ChE-isoenzyme fraction, the serum stored at -20°C for eight weeks was compared with the fresh one.

1. In horses, there was no difference between the two kinds of serum concerning mobility, activity ratio and absolute activity in each of the isoenzyme fraction.
2. In cattle, mobility of C_2 fraction showed remarkable change and the mobility types in C_2 fraction, (fast, middle and slow) were altered during the eight weeks.
3. In cattle, there was no difference between the fresh and stored sera in the mobilities of C_1 and C_3 fractions, but the absolute activity showed a slight decrease in the stored serum.