

家畜の Aspartate Aminotransferase (GOT) および Alanine Aminotransferase (GPT) に関する臨床学的研究

Ⅲ 家畜の血清 GOT Isoenzyme の Disc 電気泳動法による検出

森園 充・山内達雄

(家畜内科学研究室)

昭和53年8月31日 受理

Clinical Studies on Aspartate Aminotransferase (GOT) and Alanine Aminotransferase (GPT) in Domestic Animals

III. Detection of Serum GOT Isoenzyme by Disc Electrophoresis in Domestic Animals

Mitsuru MORIZONO and Tatsuo YAMAUCHI

(Laboratory of Veterinary Medicine)

緒 言

従来 aspartate aminotransferase (GOT) は均一と考えられていたが、1960年 Fleisher⁷⁾ らがイヌ心筋抽出液中には2種類の GOT isoenzyme が存在することを報告し、心筋障害における臨床診断への応用を示唆した。しかし、その後ヒトの領域においても isoenzyme level における臨床的報告は少く、僅かに肝疾患を中心とするものが散見⁸⁾⁹⁾¹¹⁾されるにすぎない。著者らは獣医臨床への応用の目的で動物の血清 GOT isoenzyme をポリアクリルアミドゲルディスク電気泳動法およびジアゾニウム染色法により検索し、活性の低い血清において、GOT_s 分画(細胞の原形質に存在する)を検出し、また実験的に肝障害を起こさせたイヌの病的血清において GOT_s 分画および GOT_m 分画(ミトコンドリアに密着して存在する)の検出を行ったので報告する。

材料および方法

1. 実験動物

実験には健康なイヌ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、各10例及び CCl₄ を投与し実験的に肝障害を起こさせた11例のイヌを使用した。

2. 採血、血清分離および四塩化炭素投与方法

採血、血清分離は前報に準じて行い、CCl₄ 投与量については、文献⁴⁾を参考にして、予備実験を行ない 0.2ml/kg (3例)、1.0ml/kg (3例)、2.0ml/kg (3例)

の3群にいずれも1回筋肉内投与して実験検討した結果、2.0ml/kg 投与では3例中2例が死亡し、0.2ml/kg 投与では肝障害発症程度が軽微なため、本実験では死亡例のなかった 1.0ml/kg の用量を筋肉内注射による1回投与で行なった。

3. GOT isoenzyme の検出法

ポリアクリルアミドゲルを支持体とするディスク電気泳動法により血清 GOT isoenzyme の分離検出を行なった。泳動終了後、ゲルを縦に2等分して、それぞれ以下に述べるような2種の基質に一定時間作用させた後、isoenzyme の染色を行なった。

(1) ディスク電気泳動法

(a) 試薬

ポリアクリルアミド(半井化学薬品)ゲル作製試薬および電気泳動用緩衝液の調整は、Orstein, Davis の原法に基づく中村の¹²⁾方法に従った。

(b) ゲル作製法

ゲル作製は、Orstein, Davis の原法に基づく中村の方法に従ったが、separation gel および spacer gel 調製時、蒸留水の代わりに40%サッカロース液を使用した。

(c) 通電

電気泳動槽(エムエス機器 KK)に column (エムエス機器 KK) を装着し、定電圧・定電流装置(東洋製作所)を用いて column 1本あたり 3mA の定電流下で1.5~2.5時間通電した。供試血清量は 0.02~0.06ml で、ゲルの column からの取り出しは Orstein, Davis¹³⁾の方法によった。

(2) ゲルの GOT isoenzyme 染色法

泳動後のゲルは縦に2分し、1つは aniline blue 2g/dl 溶液で蛋白染色を行なった。

GOT isoenzyme の染色は、Decker・Rau⁶⁾ の染色法を改良したもので行なった。試薬の調製は Table 1 に示す通りである。基質液と染色液は、寒天ゲルを使用した Decker・Rau⁶⁾ かと、Boyd²⁾ の報告では混合して用いているが、著者らが使用したポリアクリルアミドでは、混合するとバンド形成がみられなかったもので、両者を分けて使用した。即ち泳動の終わったゲルはあらかじめ 37°C に加温しておいた基質溶液に1時間浸しインキュベイトした後染色液に入れると、5分以内に赤紫色のバンドが出現する。これを7%酢酸で固定した。

Table 1. Modified Decker and Rau's procedure for staining zones of activities of GOT isoenzymes in Disc electrophoresis.

1. Gels incubated in the substrate solution at 37°C for one hour (Mixture of following reagents per one column)

Polyvinylpyrrolidone	0.75g
Ethylendiamine tetraacetic acid-4Na	5mg
Bovine albumin 30mg/ml	0.4ml
Phosphate buffer pH 8.0	5.3ml
Pyridoxal-5-phosphate 500 μ g/ml	0.2ml
α -ketoglutaric acid 25mM	0.7ml
L-aspartic acid 250mM	1.7ml

2. Gels incubated in dye solution at 37°C until band stained (29.4mg of Fast violet B solved in one ml of distilled water)

(3) 分画濃度測定

ゲルは GOT isoenzyme 染色および蛋白染色の後、デンストメーター（明日香工業 ozumor-82型自動濃度計）によって各分画の濃度を記録した。測定条件は slit 幅 0.2mm, slit の長さ 4mm, filter No. 500 (500 nm), 試料送り速度 40mm/min とし、ゲルの染色されていない透明な部分を blank として測定を行なった。移動度は、アルブミンの移動度を100とした相対移動度で示した。

実験成績

1. 各動物の GOT isoenzyme 検出

各動物共に α, β グロブリン域に、血清 GOT 活性が 20KU 以上で1本の分画が認められた。この分画は Boyd³⁾ らの報告を参考にして原点からの移動度をもって GOT_s 分画と同定した。

ウシ血清では全試料の50%において、この GOT_s 分

画の中に、さらに細かい分画 (GOT_{s-1}, GOT_{s-2} と仮称する) が出現した。

CCl₄ を筋肉内に1回投与したイヌでは全例の血清で、投与48時間後に、原点に近い γ -グロブリン域に GOT_s と異なる分画を認めた。この分画は γ -グロブリン域に存在し、GOT_s 分画よりも遅い移動度を示すことから、GOT_m 分画と考えられた。

CCl₄ 1回投与後、24時間後に死亡したイヌの血清で

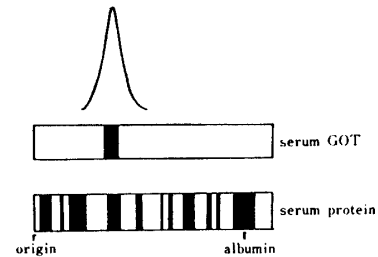


Fig. 1. Disc electrophoresis patterns of GOT isoenzyme in dog serum.

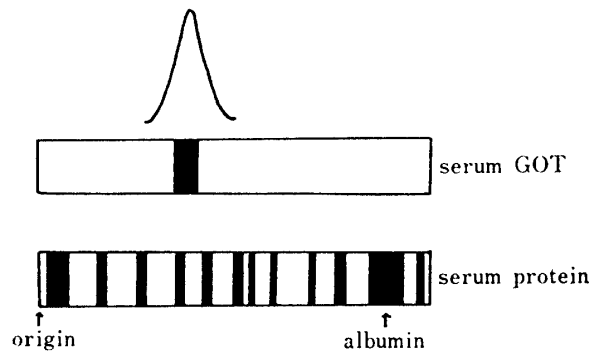


Fig. 2. Disc electrophoresis patterns of GOT isoenzyme in pig serum.

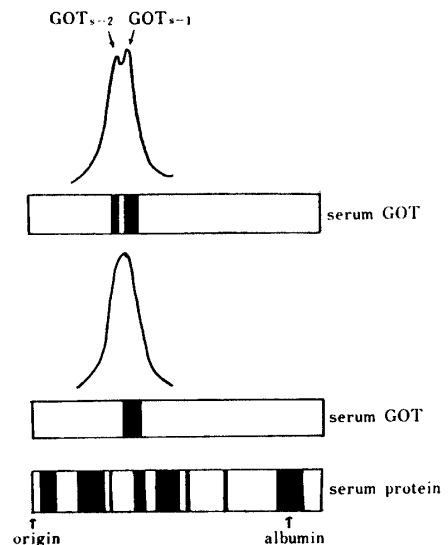


Fig. 3. Disc electrophoresis patterns of GOT isoenzyme in cattle serum.

は18, 24時間後に GOT_m 分画が出現した。

2. 各動物の GOT isoenzyme のパターン

イヌ, ブタ, ウシ, ウマ, ネコの正常血清および CCl₄ 投与したイヌの血清 GOT isoenzyme のパターンを Fig. 1~6 に示した。ウシにおいては GOT_s が2本に分離するものが, 半数の例に見られたが, 他の動物では GOT_s は1本で特に異なるパターンは認められなかった。

3. 各動物の GOT_s および GOT_m の移動度

各動物の GOT_s 分画の移動度 (mobility) は Fig. 7 に示した通りで, ブタが最も早く, ネコとウシがほぼ同程度で他の動物より遅かった。また GOT_m 分画は CCl₄ を投与したイヌで認められ, GOT_s 分画より移動度が遅く認められた。(Fig. 8 参照)

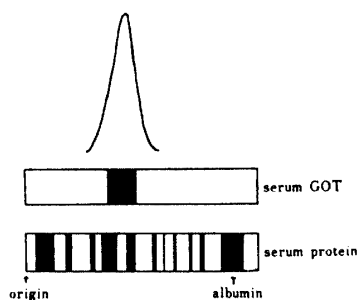


Fig. 4. Disc electrophoresis patterns of GOT isoenzyme in horse serum.

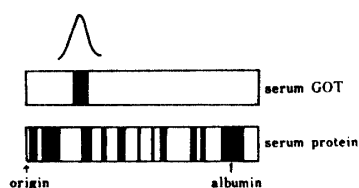


Fig. 5. Disc electrophoresis patterns of GOT isoenzyme in cat serum.

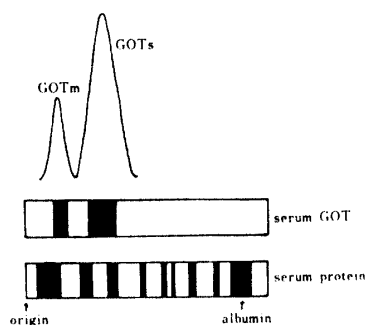


Fig. 6. Disc electrophoresis patterns of GOT isoenzymes (GOT_s, GOT_m) in serum of a treated intramuscularly with CCl₄.

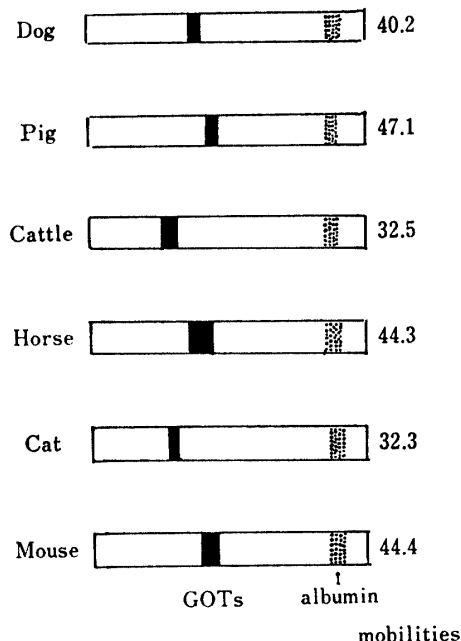


Fig. 7. Mobilities of serum GOT isoenzyme (GOT_s) in animals.

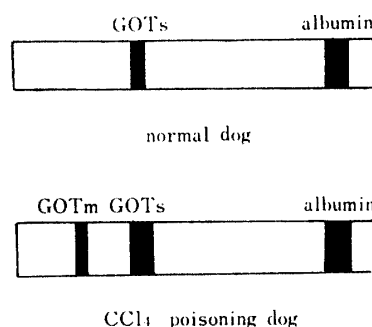


Fig. 8. Mobilities of serum GOT isoenzyme (GOT_s, GOT_m) in normal dog and CCl₄ poisoning dog.

考 察

1960年, Flisher⁷⁾ ら, Rosenthal⁸⁾ らは濾紙電気泳動で, イヌの心筋抽出液に2種の GOT isoenzyme が存在することを証明した。その後続いて Boyd, Augustinsson¹⁶⁾ らおよび勝沼⁹⁾ らも証明したが, 正常血清中にみられる細胞上清中の GOT_s 分画は, 陽性荷電を持ち, またミトコンドリアの内部構造に密に結合してなかなか細胞外に漏出しないといわれる GOT_m 分画は, 陰性荷電をもつことが確認された。その後, 電気泳動による GOT_s, GOT_m 分画の検出法の改良が進み, Schwartz¹⁴⁾ らはジアゾニウム法で容易に染色検出できることを示唆している。

従来 GOT_m 分画は, 酵素反応により生成した oxalacetate によって著しく阻害され²⁾¹⁵⁾, また GOT_m

分画は γ -グロブリン域に出現し、Disc 電気泳動では γ -グロブリン域が spacer gel と separation gel とに及ぶ範囲にあり、通常の泳動条件では、その全容を検出し難い面を有することなどから、その検出は容易でないとされるが、著者らは Disc gel の GOT_m 及び GOT_s 分画の検出に Decker・Rau らのジアゾニウム液を使用した。寒天ゲルによる原法と異なり、本実験においては基質液の一部試薬の濃度を変更し、さらに基質液と染色液を分けて使用することにより鮮明な分画を検出することができた。

また本実験において、GOT_s 分画の移動度に動物種による差異が認められたが、これはそれぞれの GOT_s の分子量が異なることを示し、本酵素の血清中への逸脱のメカニズムも多少は種により異なるものと考えられる。

Boyd¹⁰⁾ らは、CCl₄ 中毒ウシ血清の澱粉ゲル電気泳動により GOT_s 分画内の細分画を報告し、Ansary¹¹⁾ らもウシ臓器抽出液の Cellogel 膜電気泳動法により同様な報告を行っている。著者らは健康と思われるウシ血清の50%に、GOT_s 分画内の2本の細分画を認めた。この細分画が先天的な素質によるものか、或は性差乃至は健康状態の差によるものかについては今後さらに例数を重ねて検討したい。

ヒトの肝疾患の血清を用いた電気泳動に関する報告⁵⁾⁹⁾¹¹⁾⁸⁾の中で、勝沼⁸⁾らは Zone 電気泳動法で検索し、GOT isoenzyme は GOT_s 分画がほとんどであり、GOT_m 分画は数%以下であると報告し、川口らの CCl₄ 中毒ラット血清の澱粉ゲル電気泳動においては、48時間後に GOT_s 分画の顕著な増大と共に、GOT_m 分画の出現があったと報告している。

著者らのイヌの実験的肝障害例においては GOT_s と GOT_m の検出の比率の検討は行っていないが、大筋においては勝沼らのヒトの報告と同じ傾向にあり、実験途中において死亡した1例を除いては、すべて川口らのマウスの所見同様に48時間後に GOT_m の出現を観察している。只死亡した1例については CCl₄ 投与18~24時間後にすでに GOT_m が検出されている。本例は生存している他の肝障害犬に比べて特に血清 GOT 活性値が高いわけではなく、最も活性値の高いイヌでも48時間後に GOT_m 分画が出現していることから GOT_m 分画の出現は必ずしも血清 GOT 活性の多寡とは一致せず、障害の重篤さとの相関性を示唆しているものと考ええる。

このように GOT_m 分画の検出は少くともイヌについては肝細胞性疾患の診断並びに病勢判定に意義を有

するものとする。

要 約

ディスク電気泳動法により、健康なイヌ、ネコ、ブタ、ウシ、ウマの血清及び CCl₄ 投与により実験的に肝障害を発症させたイヌの病的血清について、血清 GOT isoenzyme の検出を行った結果、次の知見が得られた。

1. 健康な血清においては、各動物全例に GOT_s 分画が検出されたが、GOT_m 分画は認められなかった。
2. 健康なウシ血清において、GOT_s 分画をさらに細分する2つの分画 GOT_{s-1}、GOT_{s-2} と仮称を有するものが10例中5例に検出された。
3. CCl₄ を投与した病的イヌ血清において、GOT_s 分画のほか、GOT_m 分画が投与48時間後から全例に検出された。
4. ディスクゲルにおけるアルブミン分画の位置を100とした場合の GOT_s 分画の相対移動度は、イヌ40.2、ネコ32.3、ブタ47.1、ウシ32.5、ウマ44.3で、動物種によりそれぞれ異なることが判った。

文 献

- 1) Ansary, M. and Hanset, R.: Soluble glutamic oxaloacetic transaminase polymorphism in cattle. *Anim. Blood. Grps. Biochem. Genet.*, **3**, 163-168 (1972)
- 2) Boyd, J.W.: Glutamic oxaloacetic transaminase isoenzymes in rat serum. *Clin. Chim. Acta.*, **7**, 424-431 (1962)
- 3) Boyd, J.W.: Intracellular distribution latency and electrophoretic mobility of L-glutamic oxaloacetic transaminase from rat liver. *Biochem. J.*, **81**, 434-441 (1961)
- 4) Cornelius, C.E. and Kaneko, J.J.: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 225-301, Academic Press. New York and London (1963)
- 5) Davidson, R.G., Cortner, J.A. and Rattazzi, M.C.: Genetic polymorphisms of human mitochondrial glutamic oxaloacetic transaminase. *Science*, **169**, 391-392 (1972)
- 6) Decker, L.E. and Rau, E.M.: Multiple forms of glutamic oxaloacetic transaminases. *Proc. Soc. Exp. Biol. NY* **112**, 144-149 (1963)
- 7) Fleisher, G.A., Potter, C.S. and Wakim, K.G.: Separation of 2 glutamic oxaloacetic transaminases by paper electrophoresis. *Proc. Soc. Exp. and Biol. Med.*, **103**, 229-230 (1960)
- 8) 藤井節郎・山村雄一・勝沼信彦：酵素測定法とその意義。臨床酵素学必携，p.368-372，南山堂，東京（1966）
- 9) 金山正明・坂岸良克：Cellogel 膜電気泳動による GOT zymogram. 生物物理化学，**11**，212-213（1966）
- 10) 川口正光・佐野良英・高木新：Transaminase に関する研究。日内誌，**54**，10-20（1966）
- 11) Maltines-Carrion, M. and Tiemeier, D.: Mitochondrial glutamate aspartate transaminase. I. Structural comparison with the supernatant isoenzyme. *Biochemistry*, **6**, 1715-1722 (1970)

- 12) 中村正二郎：ディスク電気泳動法・臨床病理，特11，77-93
- 13) Ornstein, L. and Davis, B.J.: Disc electrophoresis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **121**, 321, 404-407 (1964)
- 14) Schwartz, M. K., Nisselbaum, J. S. and Bodansky, O.: Procedure for staining zones of activity of glutamic oxaloacetic transaminase following electrophoresis with starch gel. *Amer. J. Clin. Path.*, **40**, 103-106 (1963)
- 15) 手島格・中山年正：トランスアミナーゼ。臨床化学分析 IV 酵素 p.227-258 (1970)
- 16) Wilkinson J.H. 守屋寛・吉田光孝・藤本幸男訳：イソ酵素アイソザイム。p.114-124 丸善株式会社，東京 (1969)

Summary

GOT isoenzymes were detected with electrophoresis in the sera of normal dogs, cats, pigs, cattles and horses, as well as in the sera of dogs noted after a single intramuscular administration (1ml/kg body weight) of carbon tetrachloride (CCl_4).

1. Cytoplasmic aspartate aminotransferase (GOT_c) was separated by Disc electrophoresis with polyacrylamide gels in the normal animals, but mitochondrial aspartate aminotransferase (GOT_m) was not separated in them.

2. GOT_c band of cattle was sometimes divided into two sub-bands. These small bands were detectable in the sera of five among the ten cattles examined.

3. GOT_m was detectable together with GOT_c only in the sera of dogs, 48 hours after the administration of CCl_4 .

4. The relative electrophoretic mobilities of GOT_c isoenzyme were 40.2 in dogs; 32.3 in cats; 47.1 in pigs; 32.5 in cattles and 44.3 in horses, respectively, to the albumin fraction mobility of 100.