

# 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

森 園 充・椛 秀 人

(昭和 51 年 8 月 31 日 受理)

### Clinical Studies on Serum-Cholinesterase in Domestic Animals

#### IV The Method for Detection of Serum Cholinesterase Isoenzyme in Domestic Animals

Mitsuru MORIZONO and Hideto KABA

(Laboratory of Veterinary Medicine)

## 緒 言

著者らは第 1 報<sup>1)</sup>で, propionylthiocholine iodide (PTC), butyrylthiocholine iodide (BTC), および acetylthiocholine iodide (ATC) の 3 種の基質を使用し, 家畜の血清 Cholinesterase (S-ChE) の基質特異性について検討を行い, ウマ, イヌ, ネコは PTC に, ブタ, ウシでは ATC に至適性を有することを明らかにし, 併せて基質濃度, 血清希釈量の検討を行い, 家畜の S-ChE 活性値の新測定法を得た.

家畜の S-ChE の臨床的意義をより明らかにするためには, 活性値の測定と同時に isoenzyme レベルにおける診断法が究明されなければならない. しかしながら家畜の S-ChE isoenzyme は LDH や Alkaline Phosphatase isoenzyme と異なり, 臓器特異性がないとされていることや, ヒトの S-ChE isoenzyme 検出法を家畜全般に適用した場合, 基質特異性の著しく異なる動物種間では, その正常像が得られにくいことなどが, 獣医領域における臨床的研究を妨げているものと考えられる.

S-ChE isoenzyme の検出には,  $\alpha$ -naphthyl butyrate,  $\alpha$ -naphthyl acetate, carbonaphthoxycholine あるいは BTC などを基質として使用する色々な方法<sup>2)</sup>が行われている. これらの中で, 現在は BTC を基質とする thiocholine 法が最も鋭敏であるとされ, 広くヒトでは実施されている.

しかし上述のごとく, 家畜では PTC 乃至は ATC を至適基質とし, BTC はこれらに比べていづれも特異性が低いので, BTC を基質とする thiocholine 法は, 少なくとも家畜におおいては最善の検出法とは考えられない.

そこで本報においては, S-ChE の isoenzyme レベルにおける臨床的診断法的前提として, thiocholine 法に準拠し, 第 1 報で得られた基質及び基質濃度を S-ChE isoenzyme 検出法に導入し, 家畜別の検討を行った.

## 材料および方法

### 1. 実験動物

実験に使用した動物は, ウマ, イヌ, ネコ, ブタおよびウシの 5 種である. 各動物とも 3 検体を使用した.

### 2. S-ChE isoenzyme の検出

polyacrylamide ゲルを支持体とする disc 電気泳動法で血清蛋白の分離を行った. 泳動終了後, ゲルを縦に 2 等分してそれぞれ比較すべき 2 種の基質に一定時間作用させた後, isoenzyme 染色を行った. その後, isoenzyme 分画濃度を densitometer で測定し, その活性を吸光度で図中に示した.

#### [A] Disc 電気泳動法

1) 試薬: polyacrylamide ゲル作製用試薬および電気泳動用緩衝液の調製は, Per Juul<sup>3)</sup> の方法に従った.

2) ゲル作製法: ゲル作製法は Ornstein, Davis の原法に基づく中村<sup>4)</sup>の方法を一部修正して用いた. すなわち, 分離ゲルおよび中間ゲルの作製法は中村法と同様であるが, 試料ゲル作製法は次のように変更した.

添加血清量は, ウマおよびイヌで 8  $\mu$ l, ネコで 20  $\mu$ l, ブタおよびウシで 100  $\mu$ l とし, その血清を直接 column 内に注入した. その後, ウマ, イヌおよびネコの場合は原法どおりの試料ゲル溶液を加え, column

を静かに転倒して、血清とゲル溶液を混合する。ブタおよびウシの場合は、添加血清量が多いため、原法どおりでは試料層のゲル化が困難であった。そこで、試料ゲル溶液に sucrose を加えずにゲル作製を行った。

3) 通電：電気泳動槽はエムエス機器 KK のものを、定電圧定電流装置は東洋製作所のものを使用した。通電条件は Per Juul<sup>3)</sup> の方法に従い、column 1 本当たり 3 mA の定電流下で 2~2.5 hrs 通電した。

4) ゲル切開法：ゲルの縦割 2 分は著者ら<sup>5)</sup> の方法により行った。

#### [B] ゲルの S-ChE isoenzyme 染色法

S-ChE isoenzyme の染色は Per Juul<sup>3)</sup> の変法に従ったが、次のように一部変更した。すなわち、基質については propionylthiocholine iodide (PTC), butyrylthiocholine iodide (BTC) および acetylthiocholine iodide (ATC) の 3 種を使用し、基質濃度については第 I 報で得た各家畜の至適基質濃度で行った。すなわち、ウマ、イヌおよびネコは  $5 \times 10^{-3}$  M/l, ブタは  $3 \times 10^{-3}$  M/l および ウシは  $1 \times 10^{-3}$  M/l の基質濃度である。incubation 時間については、ウマ、イヌおよびネコは 1.5 時間、ブタおよびウシは 4 時間で行った。以下の操作は原法どおりである。

#### [C] デンシトメトリー

S-ChE isoenzyme 染色を行ったゲルは densitometer によって各分画の濃度を記録した。本実験に使用した densitometer は明日香工業製 OZUMOR-82 型自記濃度計である。測定時の条件は slit 幅 0.2 mm, slit の長さ 4 mm, filter は No. 61 (610 nm), 試料送り速度は 20 mm/min である。測定するゲルは 7% 酢酸を満たした附属の液槽に入れ、染色されない透明なゲルの部分を blank として測定を行った。各 isoenzyme 分画は LaMotta ら<sup>6)</sup> の推奨により、移動度の大きい順に Che-1, Che-2…… と仮称した。

### 実験成績

家畜別にそれぞれ個体の異なる 3 検体について実験を行い、各検体のゲルは 2 分して、それぞれ基質の異なる isoenzyme 染色を施し、比較対照するために図示した。従って本成績での図において、同一番号の図では同じ個体の比較を示すが、同種家畜でも図番号が異なれば、個体が異なっていることを示す。さらにこの同種家畜間における 3 種基質に対する総活性の比較を容易にするために、最も高い特異性を有する基質の総活性を 100 とした指数で表し、isoenzyme 活性の比較は、それぞれの基質の総活性指数をデンシトメト

リーにより得られた吸光度の数値で比例配分して算出し、その程度をプラス・マイナスで示し、Table 1 に一括した。以下家畜別に実験成績について述べる。

#### 1. ウマ

PTC と BTC の比較は Fig. 1 に、PTC と ATC の比較は Fig. 2 に、BTC と ATC の比較は Fig. 3 に示すとおりである。すなわち、PTC および BTC に対してはともに 7 本のバンド (Che-1~Che-7) が

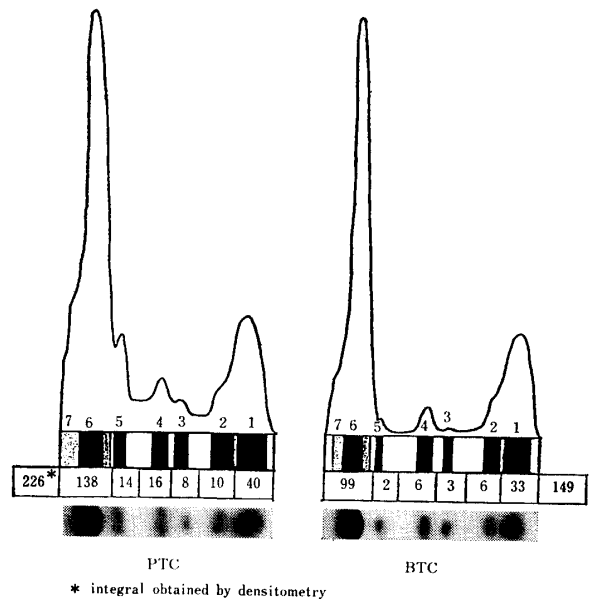


Fig. 1. Isoenzyme patterns of horse serum cholinesterase using PTC and BTC as the substrates.

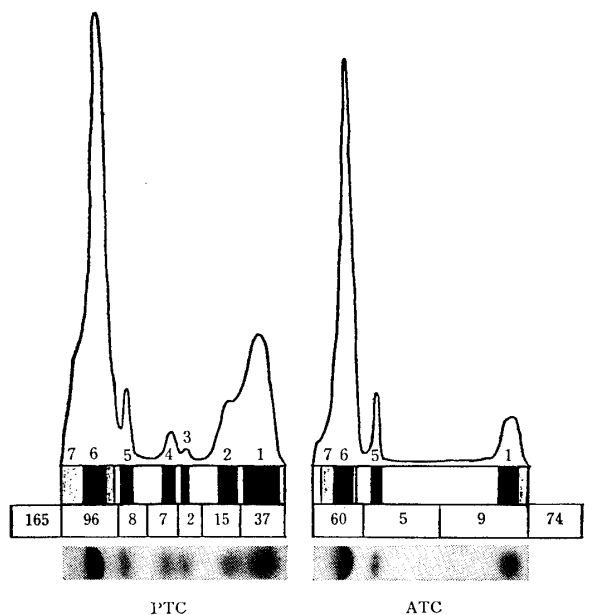


Fig. 2. Isoenzyme patterns of horse serum cholinesterase using PTC and ATC as the substrates.

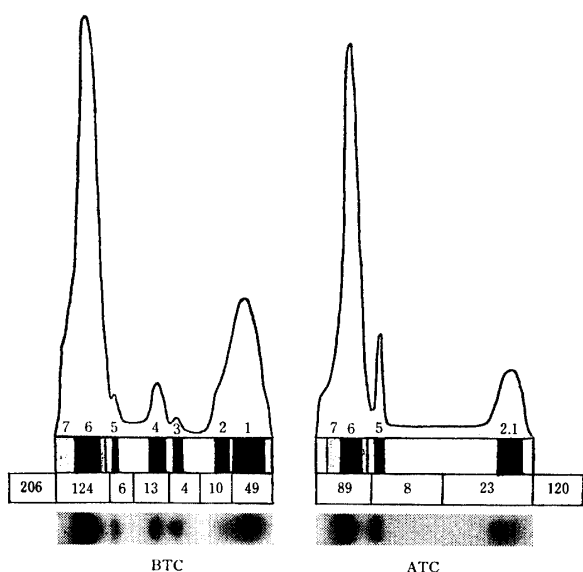


Fig. 3. Isoenzyme patterns of horse serum cholinesterase using BTC and ATC as the substrates.

出現したが、BTC における Che-5 バンドは痕跡程度であった。ATC に対しては Che-2, Che-3 および Che-4 バンドが現われず、4本のバンドしか出現しなかった。PTC における total 活性の指数を 100 とした時、BTC の指数は 66、ATC では 44 となり、基質の至適性は PTC>BTC>ATC の順位となった。家畜別各 isoenzyme 分画の基質特異性については、Table 1 に示すとおりであるが、ウマにおける Che-5 以外のバンドは PTC および BTC に対して、ほぼ同程度の特異性を示し、ATC はこれらに比べて低く、各バンドは概ね基質の至適性の順位に比例して低減している。しかし、Che-5 バンドのみは、この至適性に従わず PTC >ATC>BTC の順位になり、同一個体の中においても基質特異性の異なる isoenzyme が存在することを示す所見が得られた。基質の至適性と isoenzyme バンドの出現数との関係は、指数 100 の PTC で 6~7本、66 に低減する BTC では Che-5 バンドが土となり、至適性が PTC の半分以下の ATC では出現バンド数が明らかに減数し、わずかに Che-1, Che-5, Che-6 の 3本のバンドが認められた。

2. イヌ

PTC と BTC の比較は Fig. 4 に、PTC と ATC の比較は Fig. 5 に、BTC と ATC の比較は Fig. 6 に示すとおりである。各基質を通じていずれも 7本のバンドが出現したが、その程度は PTC における total 活性の指数を 100 とした時、BTC では 80、ATC では 56となり、基質の至適性は PTC>BTC

Table 1. Substrate specificity of individual isoenzyme.

| Species        | Isoenzyme      | Substrate |     |     |
|----------------|----------------|-----------|-----|-----|
|                |                | PTC       | BTC | ATC |
| Horse          | Che-1          | ++        | +   | +   |
|                | Che-2          | +         | +   | —   |
|                | Che-3          | +         | +   | —   |
|                | Che-4          | +         | +   | —   |
|                | Che-5          | +         | ±   | +   |
|                | Che-6,7        | +++       | +++ | ++  |
|                | total activity | 100       | 66  | 44  |
| Dog            | Che-1,2        | +         | +   | +   |
|                | Che-3          | +         | +   | +   |
|                | Che-4          | ++        | ++  | +   |
|                | Che-5          | +++       | +   | ++  |
|                | Che-6,7        | +++       | +++ | ++  |
|                | total activity | 100       | 80  | 56  |
| Cat            | Che-1          | +         | +   | +   |
|                | Che-2          | ++        | ++  | +   |
|                | Che-3          | ++        | ++  | +   |
|                | Che-4          | +++       | ++  | ++  |
|                | Che-5          | ++        | ±   | +   |
|                | Che-6          | ++        | ++  | ++  |
|                | Che-7          | +         | +   | +   |
| total activity | 100            | 72        | 50  |     |
| Pig            | Che-1          | ++        | —   | +++ |
|                | Che-2          | —         | —   | +   |
|                | Che-3          | +++       | —   | +++ |
|                | Che-4          | ±         | ±   | +   |
|                | Che-5          | +++       | +++ | +++ |
| total activity | 67             | 20        | 100 |     |
| Cattle         | Che-1          | —         | —   | +   |
|                | Che-2          | +++       | —   | +++ |
|                | Che-3          | —         | —   | +   |
| total activity | 49             | 0         | 100 |     |

\*0 ==— 2~10=+ 20~40=+++  
0~2 ==± 10~20=++ 40~ =+++

\*Percentage activity of individual isoenzyme in optimal substrate.

>ATC の順位となり、この関係はウマと同様であるが、3基質間の総活性の差はそれぞれ20%程度で、家畜の中で最も差が少い。各 isoenzyme 分画の基質特異性 (Table 1 参照) については、Che-1, Che-2 および Che-3 バンドは各基質に対してはほぼ同程度の特異性を示し、Che-4 および Che-6,7 バンドは PTC および BTC に対してほぼ同程度を呈するのに対し、ATC では低くなり、総体的に、概ね基質の至適性の順に従い低減しているが、Che-5 バンドはウマの Che-5 バンドと同様の結果が見られ、その至適性は PTC>ATC>BTC となり、イヌでも基質特異

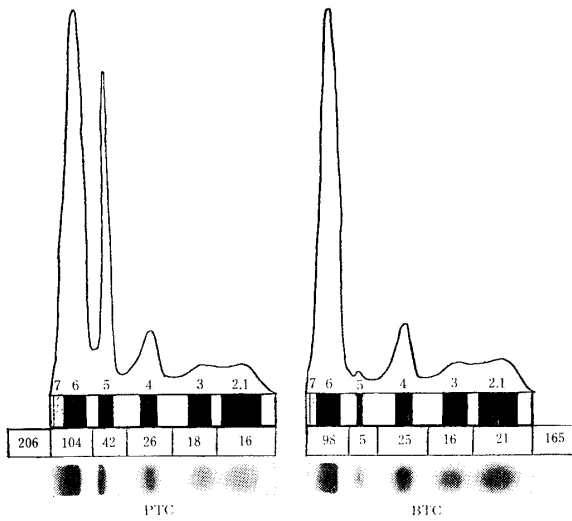


Fig. 4. Isoenzyme patterns of dog serum cholinesterase using PTC and BTC as the substrates.

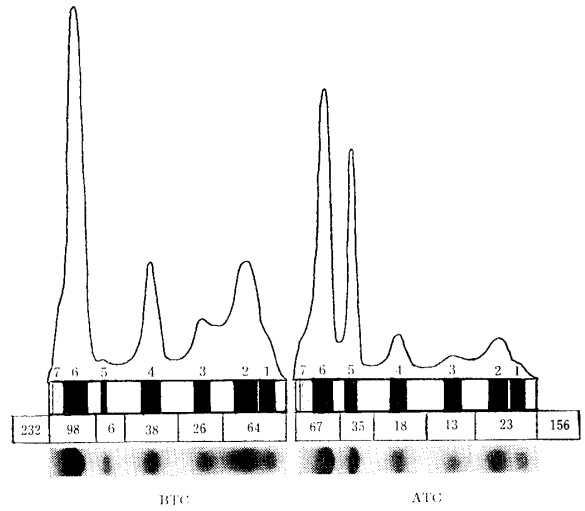


Fig. 6. Isoenzyme patterns of dog serum cholinesterase using BTC and ATC as the substrates.

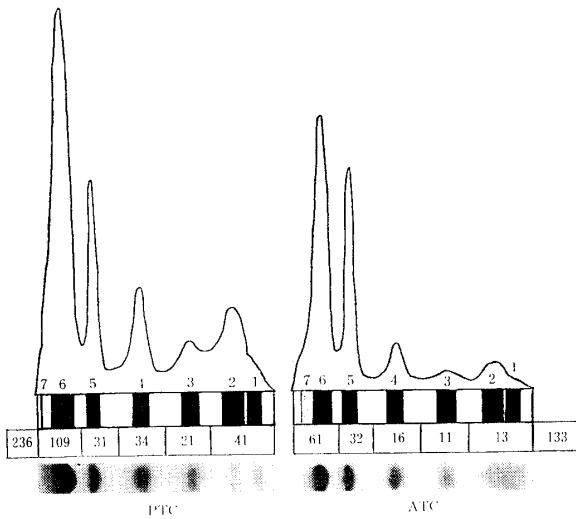


Fig. 5. Isoenzyme patterns of dog serum cholinesterase using PTC and ATC as the substrates.

性の異なるバンドの存在を示した。基質の至適性と出現バンド数との関係は、3基質間の総活性の差も少くバンド数に変化は認められなかった。

### 3. ネコ

PTC と BTC の比較は Fig. 7 に、PTC と ATC の比較は Fig. 8 に、BTC と ATC の比較は Fig. 9 に示すとおりである。各基質を通じて、いずれも7本のバンドが出現したが、BTC における Che-5 バンドは痕跡程度である。PTC における total 活性の指数を 100 とした時、BTC では 72、ATC では 50 となり、基質の至適性はウマ、イヌと同様に PTC > BTC > ATC となり、その差はイヌについて少差の所

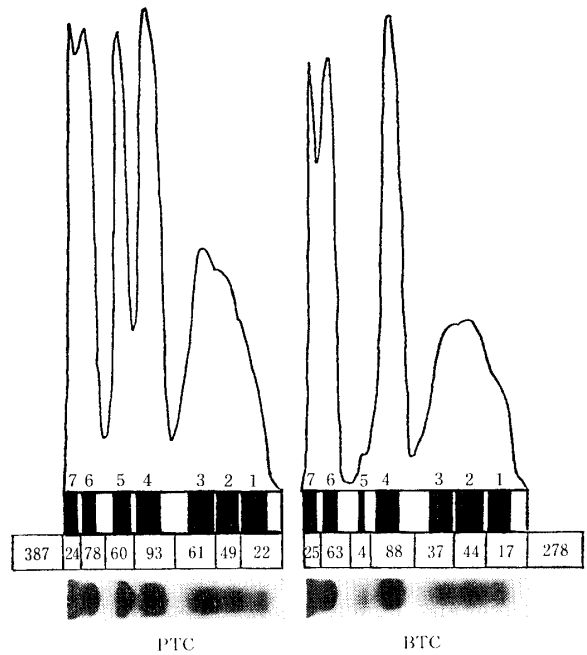


Fig. 7. Isoenzyme patterns of cat serum cholinesterase using PTC and BTC as the substrates.

見が認められた。各 isoenzyme 分画の基質特異性については (Table 1 参照)、Che-1 および Che-7 バンドは各基質に対してほぼ同程度であり、ATC に対しては低く、概ね基質の至適性の順位に従ったが、Che-5 バンドはウマおよびイヌの Che-5 バンドと同様の結果を示し、基質の至適性に比例せず、ネコでも基質特異性の異なる isoenzyme の存在を示す所見が認められた。基質の至適性と出現バンド数の関係では、イヌと同様に至適性の差が少いためか、BTC に

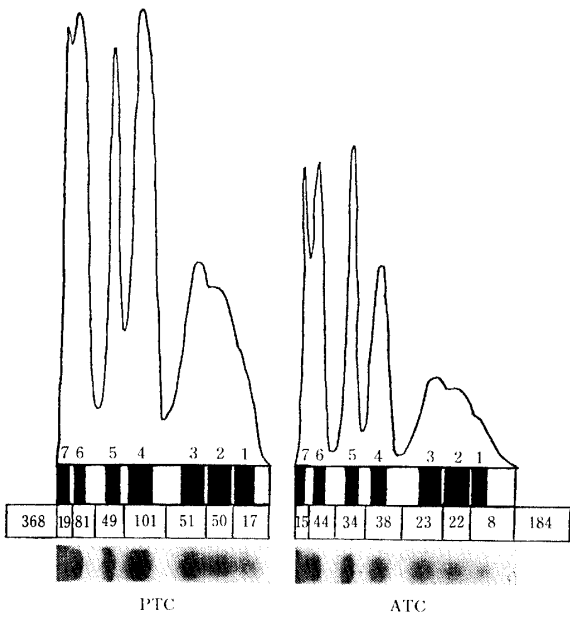


Fig. 8. Isoenzyme patterns of cat serum cholinesterase using PTC and ATC as the substrates.

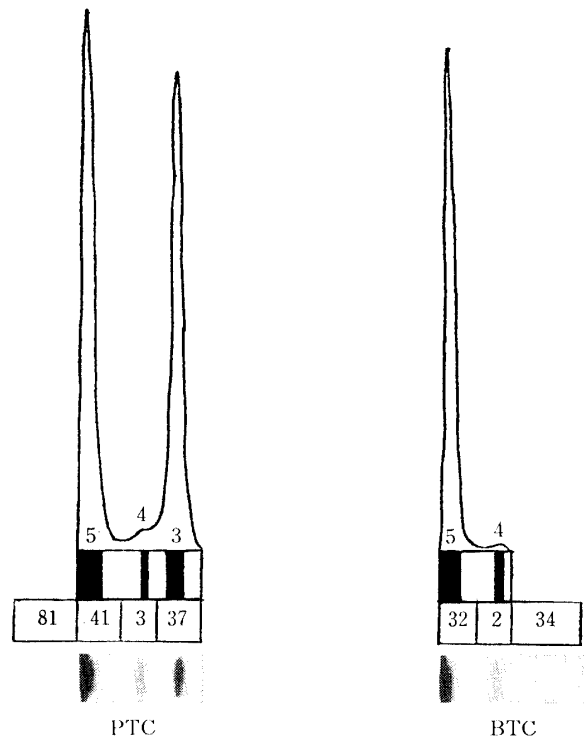


Fig. 10. Isoenzyme patterns of pig serum cholinesterase using PTC and BTC as the substrates.

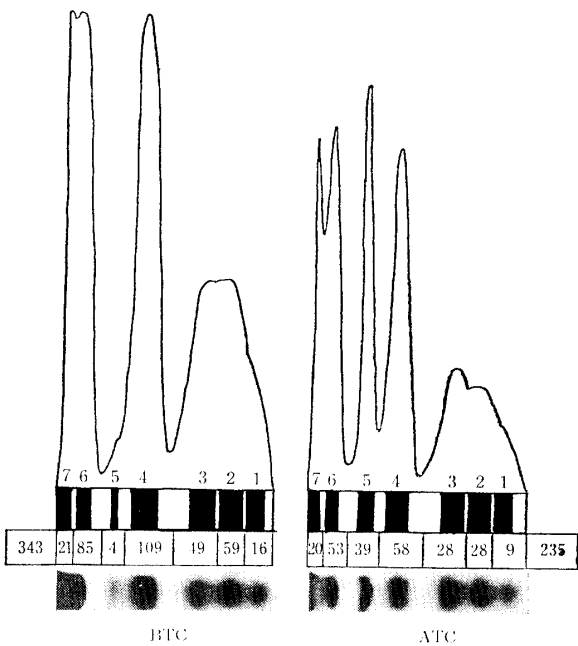


Fig. 9. Isoenzyme patterns of cat serum cholinesterase using BTC and ATC as the substrates.

における Che-5 バンドの痕跡程度を除けば、バンド出現の変化は認められなかった。

#### 4. フタ

PTC と BTC の比較は Fig. 10 に、PTC と ATC の比較は Fig. 11 に、BTC と ATC の比較は Fig. 12 に、それぞれ示すとおりである。ATC に対しては 4 本乃至 5 本のバンドが出現する。PTC に対して

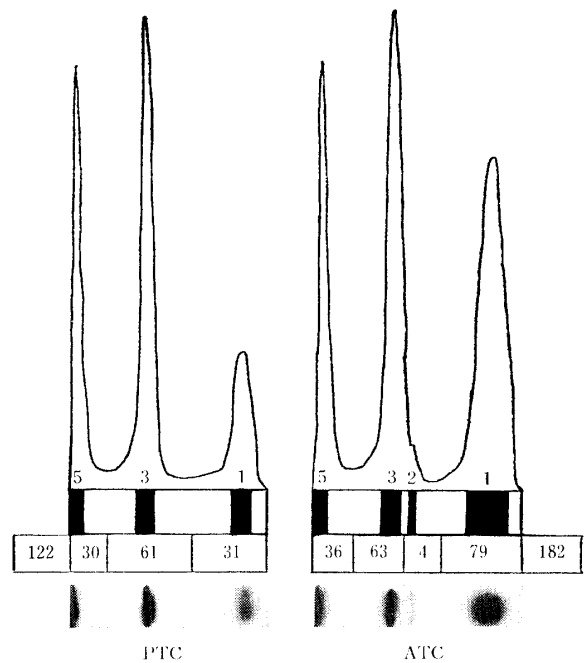


Fig. 11. Isoenzyme patterns of pig serum cholinesterase using PTC and ATC as the substrates.

は Che-1 バンドは出現する検体と出現しない検体があり、Che-2 バンドは出現せず、痕跡程度の Che-4 バンドを含めて 4 本のバンド (Che-1, Che-3, Che

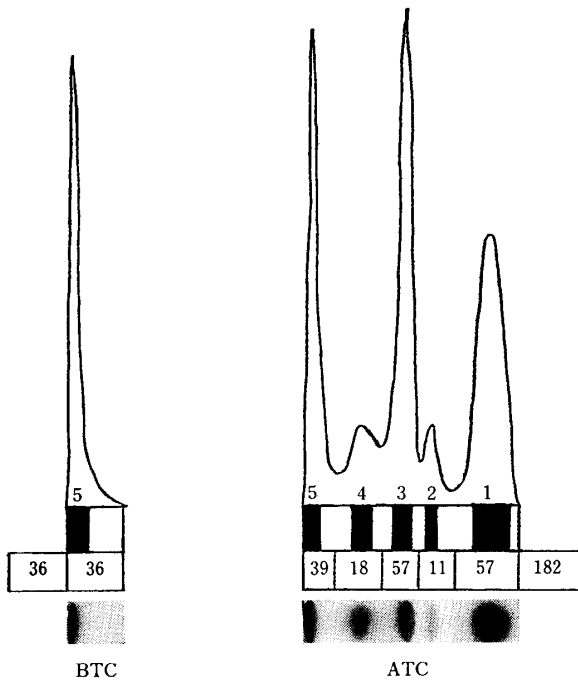


Fig. 12. Isoenzyme patterns of pig serum cholinesterase using BTC and ATC as the substrates.

-4 および Che-5) が出現した。BTC に対しては、Che-1, Che-2 および Che-3 バンド出現せず、痕跡程度の Che-4 バンドを含めて 2 本のバンド (Che-4 および Che-5) しか出現しなかった。ブタでは、ウマ、イヌ、ネコと異り ATC が至適基質であることが判った。ATC における total 活性の指数を 100 とした時、PTC では 67, BTC では 20 となり、3 基質間の至適性の差はウマ、イヌ、ネコに比べて著しく大きく、基質の至適性は  $ATC > PTC > BTC$  の順位に明らかに区分される。各 isoenzyme 分画の基質特異性については (Table 1 参照), Che-1 バンドは  $ATC > PTC > BTC$  の順位を示すが、BTC ではバンドは出現しない。Che-2 バンドは ATC のみに出現し、PTC および BTC ではバンドは出現しない。Che-3 バンドは ATC と PTC において鮮明な出現が見られるのに対し、BTC では全く認められず、Che-4 バンドは ATC で認められ、PTC と BTC においては痕跡程度の出現が認められた。Che-5 バンドは各基質に対してほぼ同程度の特異性を有し、明らかなバンドの出現が認められた。以上の所見より、ブタにおいては各基質間の総活性指数の差が、ウマ、イヌ、ネコに比べて著しく大きいにも拘らず各 isoenzyme 分画の基質特異性は、概ね基質の至適性に比例した所見が認められた。しかし基質の至適性と出現バンド数の関係では、基質間の大差が如実に現れ、

ATC の 4~5 本に対して、PTC の 3~4 本、BTC では 2 本と明らかに減数し、ATC の至適性が示された。

### 5. ウシ

BTC を基質とした時には、バンドの出現は見られなかったため、ATC と BTC, PTC と BTC の比較はできず、この 2 検体は除外した。PTC と ATC の比較は Fig. 13 に示すとおりである。ATC に対しては、3 本のバンドが出現するが、PTC で Che-2 バンドのみであった。ブタ同様、ウシでも ATC が至適基質であることが判るが、ATC における total 活性の指数を 100 とした時、PTC では 49, BTC では 0 という関係になり、基質の至適性は  $ATC > PTC$  となり、S-ChE isoenzyme 検出に BTC を基質と

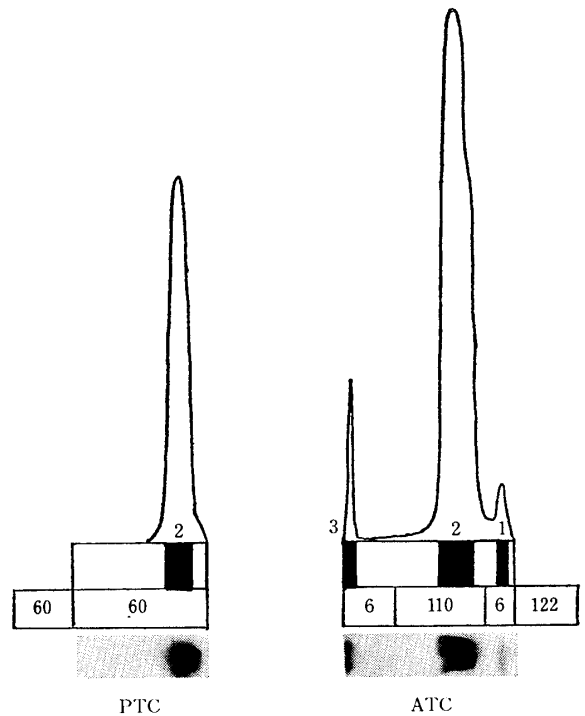


Fig. 13. Isoenzyme patterns of cattle serum cholinesterase using PTC and ATC as the substrates.

することはウシでは全く不適なことが示され、またウマ、イヌ、ネコ、ブタに比べて 3 基質間の総活性の差が最も大きいことが判った。各 isoenzyme 分画の基質特異性については (Table 1 参照), Che-1 バンドは ATC に対して最も高く、PTC および BTC に対しては、バンドが出現せず特異性が低い。Che-2 バンドは ATC に対して最も高く、ついで PTC に特異性を示し、BTC ではバンドが出現せず特異性が低い。Che-3 バンドは ATC に対して最も高く、PTC

および BTC に対してはバンドが出現せず、特異性が低い。各 isoenzyme 分画の基質特異性は、概して ATC>PTC の至適性の順に比例している。基質の至適性と出現バンド数の関係では、ATC の3本に対して、PTC では1本、BTC では零と、明らかに減数し、ブタと同様 ATC の至適性が示された。

## 考 察

デンブングル及びポリアクリルアミドゲル電気泳動法における ChE isoenzyme の染色に繁用されている Per Juul の変法<sup>9)</sup>は BTC を基質とする thiocholine 法に属する。これは S-ChE により遊離した thiocholine が試薬中の Cu<sup>++</sup> と結合してできた Cu-thiocholine 複合体に、さらに dithiooxamide を作用させ最終的に S-ChE isoenzyme を Cu-dithiooxamide に置換して発色させるもので、その発色の程度は、S-ChE isoenzyme の活性に比例することになっている。

本実験においては、この方法に準じて、原法の基質 BTC の他に ATC, PTC を使用して家畜別に S-ChE isoenzyme 検出法の検討を行った。

家畜の S-ChE isoenzyme 検出における基質について詳細に検討したものは少く、わずかに Ecobichon らの報告<sup>7)</sup>にその一端が見られる程度である。Ecobichon らは thiocholine 法に基づいて、11種の哺乳動物のデンブングル電気泳動による S-ChE isoenzyme パターンを報告し、ウマで3本、イヌで4本、ネコで5本そしてブタで2本のバンドを検出しているが、基質にウマ、イヌおよびネコにおいては BTC を、ブタにおいては ATC を使用し、ウシの成績については報告していない。

著者らの本実験で使用した家畜別の例数はわずかに3検体にすぎず、基質別に得られた本実験での zymogram は家畜別の正常なパターンの全貌を示すものではないが、少くとも本実験を通して、ウマ、イヌ及びネコにおいては、PTC を至適基質とし、ウシ、ブタにおいては ATC を至適基質とする成績が得られ、第1報での著者らの成績と完全に一致したことは両実験の信頼性と家畜における S-ChE の基質特異性の異なる存在を端的に示し、さらに使用する基質の特異性が高いほど、出現する isoenzyme のバンド数が多く、基質の特異性が低いほど出現するバンド数が少いという傾向が明らかにされたものと考えられる。従って家畜の S-ChE isoenzyme レベルの研究に当っては、先づその検出の段階において、家畜別に最適の基質が選択

されることが必須の条件であるといえる。

上述の Ecobichon らの成績中、著者らの至適基質と共通するブタにおいて、isoenzyme 分画が著者らの4~5本に対して、わずかに2本しか出現していないが、これは支持体、個体差などの相異も当然のことながら、正常活性値の低い家畜においては、単に基質だけではなく、基質濃度や使用血清量などの条件も無視できないことを示唆し、本実験で得られた家畜別の至適基質、基質濃度および血清使用量での検出法は、出現バンド数も多く、識別が明瞭なことから今後の家畜における S-ChE isoenzyme の研究の進展に寄与し得るものと考えられる。

Per Juul<sup>9)</sup>はヒト S-ChE isoenzyme パターンにおける BTC と ATC の比較で、ATC での分析は BTC と同様の zymogram が得られ、その色度は BTC の平均 67% であり、すべてのバンドが BTC より低い活性を示し、isoenzyme 百分率に何ら有意の変化は観察されなかったと報告している。

しかし、著者らの家畜における本実験においては、ウマ、イヌおよびネコの Che-5 バンドにおいて見られたように、同一個体の中でも isoenzyme によって明らかに異った基質特異性を示したことは家畜の S-ChE isoenzyme 研究上極めて興味ある所見であり、これはさらに第1報で得たウマ S-ChE の PTC に対する酵素活性曲線、イヌ S-ChE の BTC と PTC に対する酵素活性曲線およびネコ S-ChE の BTC と PTC に対する酵素活性曲線が Michaelis-Menten の式に従わず、Lineweaver-Burk プロットにおいて hyperbolic-type curve を示したことを裏付ける重要な所見でもあると考える。

ネコにおいて、第1報で得られた3位の BTC と2位の ATC の順位が本実験では逆転しているが、その原因としては 1) 基質の pH が 7.6 であるのに対し、本実験では 6.1 であること、2) incubation 時間が 30 分であるのに対し、本実験では 90 分であることなどの相異点があげられ、明確なことは判らない。しかし、両実験を通じて基質特異性についてはネコにおけるこのわずかな逆転を除けば第1報での結果と一致している。

Per Juul<sup>9)</sup>はヒトの新鮮血清と3ヶ月間保存した血清との S-ChE isoenzyme パターンの比較において、保存血清が新鮮血清に比べて移動度の小さいバンド(9~12分画)における活性の増加を観察している。本実験で保存血清を使用したネコ検体で最も移動度の小さい Che-7 バンドが新鮮血清を使用したウ

マ、イヌに比較し（ネコの新鮮血清ではウマ、イヌと類似の泳動パターンを示す）、かなり高濃度に見られたことは、上述のヒトの場合と一致した現象であり、その原因については明らかではないが、凍結保存血清が比較的長い間使用できる S-ChE 総活性値測定の場合とは異なり、S-ChE isoenzyme の検出には可及的新鮮血清の供試が前提であることを示唆し、臨床的に応用する場合看過出来ない問題である。従って家畜の S-ChE isoenzyme と保存血清との関係、とりわけ、保存血清の供試許容期間については今後を検討を行いたい。

S-ChE isoenzyme には LDH や ALP に見られるような臓器特異性はないといわれ、S-ChE isoenzyme パターンの臨床的研究に関する報告は少い。鶴田<sup>8)</sup> はイヌにおいて有機燐中毒の疑いのある 1 実験例において Che-2 バンドがほとんど消失したことを認め、また、強肝剤 (Y-8323, 吉富製薬) を投与した健康なイヌ 6 例中 2 例に著明な S-ChE 活性値の上昇と、S-ChE isoenzyme の Che-1 バンドの増加を認めた。この現象は有機燐剤により Che-2 バンドが特異的に阻害されたものなのか、逆に強肝剤により Che-1 バンドの肝での産生が促進されたものか、あるいは、LaMotta ら<sup>2)</sup> のいう恒常的生理的調節もしくは isoenzyme 相互の平衡関係がこれらの薬物により、失調を来したものかについては現段階での断定は困難である。

いずれにしても、臓器特異性がないとされる S-ChE の isoenzyme レベルにおける臨床的研究については、今後、各家畜の正常 zymogram を明らかにし、次で実験的ならびに症例的研究をかさねることによって、S-ChE 活性および S-ChE isoenzyme パターンの質的あるいは量的変化に及ぼす疾病との関係を追求することが必要であり、本研究成果は、その基礎的役割を十分果し得るものと考えらる。

## 要 約

disc 電気泳動法による家畜の S-ChE isoenzyme 検出法を Per Juul の方法に準拠して、3 種の基質 (PTC, BTC および ATC) を用いて、定量的に比較検討した結果、次の知見が得られた。

1. S-ChE isoenzyme 検出法は、家畜別に下記の基質と条件がより効果的である。

a) ウマ、イヌおよびネコでは原法の基質 BTC に替えて、濃度  $5 \times 10^{-3}$  M/l の PTC を使用し、incubation 1.5 時間、添加血清量は、ウマ、イヌで 8  $\mu$ l、ネコで 20  $\mu$ l とする。

b) ブタでは  $3 \times 10^{-3}$  M/l、ウシで  $1 \times 10^{-3}$  M/l の濃度の ATC を使用し、incubation 時間 4 時間、添加血清量はいずれも 100  $\mu$ l とする。

2. 同一個体の S-ChE isoenzyme 分画においても、基質特異性を異にする分画が明らかに存在する。

3. 3 種基質間における家畜別特異性は、ウマ、イヌ、ネコでは PTC > BTC > ATC、ブタ、ウシでは ATC > PTC > BTC の順位を示し、これらの家畜別 isoenzyme 総括性百分率は、ウマ 100: 66: 44、イヌ 100: 80: 56、ネコ 100: 72: 50、ブタ 100: 67: 20、ウシ 100: 49: 0 となった。

4. 基質特異性の低下に伴い、isoenzyme 分画数 (バンド数) の減少が観察された。

5. 本実験により、著者らの改良した家畜の S-ChE 活性値の測定法の信頼性が立証された。

## 文 献

- 1) 森園 充・梶 秀人：鹿大農学術報告，27，61-67 (1976)
- 2) 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)
- 3) Juul, P.: Human plasma cholinesterase isoenzymes. *Clin. Chim. Acta.*, **19**, 205-213 (1968)
- 4) 中村正二郎：Disc 電気泳動法。臨床病理，特 **11**，72-83 (1967)
- 5) 森園 充・仮屋喜弘・西山実光：鹿大農学術報告，23，257-266 (1973)
- 6) LaMotta, R. V., and Woronick, C. L.: Molecular heterogeneity of human serum cholinesterase. *Clin. Chem.*, **17**, 135-144 (1971)
- 7) Ecobichon, D. J., and Comeau, A. M.: Pseudocholinesterase of mammalian plasma. Physicochemical properties and organophosphate inhibition in eleven species. **24**, 92-100 (1973)
- 8) 鶴田 剛：鹿児島大学院農学研究科獣医学専攻修士論文 (1974)



### Summary

Per Juul's serum-cholinesterase detecting method was carefully compared, using the three substrates PTC\*<sup>1</sup>, BTC\*<sup>2</sup>, ATC\*<sup>3</sup> and various animal sera in an attempt to disclose the optimal substrate, its working concentration, serum amount for the test and incubation time etc.

In horse, dog and cat,  $5 \times 10^{-3}$  M/l of PTC, instead of BTC in original method, gave the best result under the condition of 1.5 hour incubation with 8  $\mu$ l of serum in horse and dog, but 20  $\mu$ l in cat.

ATC gave the best result in three, under the condition of  $3 \times 10^{-3}$  M/l and  $1 \times 10^{-3}$  M/l of concentration, in pig and cattle, 4 hour incubation 100  $\mu$ l of serum.

It was also demonstrated that there was substrate specific isoenzyme fraction even in the same serum.

The sensitivity of these three substrates in each animal serum stand in the following order that PTC, BTC, ATC in horse, dog and cat and ATC, PTC, BTC in pig and cattle, from high to low.

The total isoenzyme activities of the respective species shown in percent were 100:66:44 in horse, 100:80:56 in dog, 100:72:50 in cat, 100:67:20 in pig, 100:49:0 in cattle.

It was observed that, in accordance with the decrease of substrate specificity of isoenzyme the number of isoenzyme band also decreased.

The data confirmed that our method which makes it a point to consider the animal specific factors in measuring serum-cholinesterase in various domestic animals is highly reliable.

\*<sup>1</sup> PTC: propionylthiocholine iodide.

\*<sup>2</sup> BTC: butyrylthiocholine iodide.

\*<sup>3</sup> ATC: acetylthiocholine iodide.