

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

森 園 充・椛 秀 人

(昭和 51 年 8 月 31 日受理)

Clinical Studies on Serum-Cholinesterase in Domestic Animals

II Effect of Storage at -20°C on Enzymatic Activity of Serum-Cholinesterase.

Mitsuru MORIZONO and Hideto KABA

(Laboratory of Veterinary Medicine)

緒 言

検査成績の迅速な報告と、血清成分の変化を避けるために、分離した血清はただちに測定に用いるべきであるが、再検査が必要となる場合、都合によりすぐ実施できない場合には、血清を保存する必要が起ってくる。

凍結により変性を起すリポ蛋白質などの検査を除いては、通常生化学検査に用いる材料は -20°C のディープフリーザー内に保存したものがよく使用されている。

そこで、家畜の血清 Cholinesterase (S-ChE) 活性が血清分離後、 -20°C 、9 週間の凍結保存によりどのように変化するかを調べる目的で本研究を行った。

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。ウマは本学家畜病院と本学馬術部で飼育されているもの、イヌは本学医学部付属実験動物施設で飼育されているもの、ネコは個人より譲り受けたもの、ブタおよびウシは鹿児島市食肉センターで屠殺されたものであり、各動物とも 10 検体を使用した。

2. 採血、血清分離および保存

採血には真空採血器具を用い、ウマ、イヌおよびネコは頸静脈より採血し、ブタおよびウシは心臓穿刺により放血されたものを直接遠心分離用試験管に採取した。血清分離は、採血後約 1 時間室温に放置後 2500 \sim 3000 r.p.m. で 15 分間遠心分離して行った。血清分離後、直ちに同一血清を 10 本の試験管に分け、その

中の 1 本は分注後測定した。残り 9 本は密栓して凍結保存し、測定の都度 1 本ずつ取り出し、流水中で融解させて使用した。

3. 測定法と測定器械

S-ChE 活性値の測定は著者らの方法¹⁾で凍結前、凍結後 1 週から 9 週にかけて 1 週間ごとに測定した。但しウマで 5, 6, 7 週目、イヌで 3, 6, 8 週目、ネコで 6, 7, 8 週目の測定は省略した。測定器械は第 1 報で使用したものと同一である。

4. 測定値の処理

各週における各検体の活性値は、最初の測定値を 100 とする百分率活性値で示した。

実験成績および考察

実験の結果は 5 つの図により示されるように、ウマおよびイヌにおいては 9 週間の間、失活なしに新鮮時の活性が維持され、ネコにおいては、4 週目より 5%

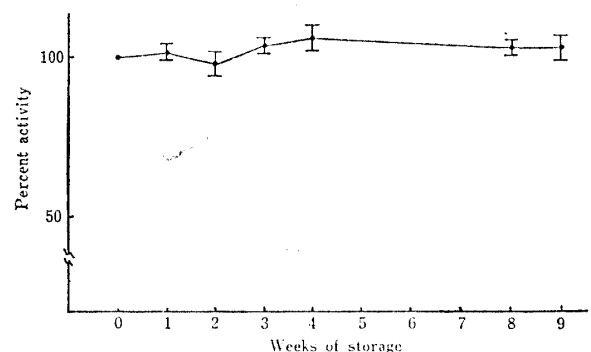


Fig. 1. Stability of horse serum cholinesterase after storage at -20°C .

The vertical bars represent each standard deviation.

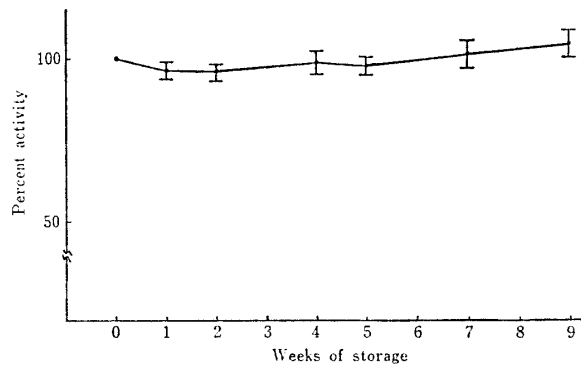


Fig. 2. Stability of dog serum cholinesterase after storage at -20°C

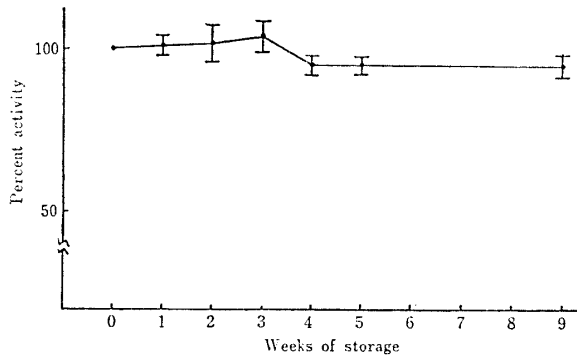


Fig. 3. Stability of cat serum cholinesterase after storage at -20°C .

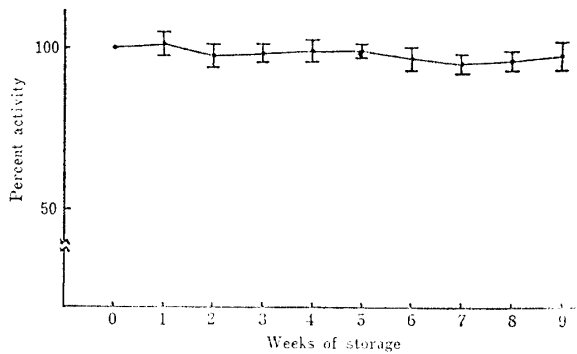


Fig. 4. Stability of pig serum cholinesterase after storage at -20°C .

程度の失活があり、ブタ血清では後半 2～3%程度の失活が認められた。ウシでは 3～4 週目より 3～4%程度の失活が観察された。

血清の凍結保存が S-ChE 活性値に及ぼす影響について、Mersmann ら²⁾ は家畜の血漿 ChE は -17°C で少なくとも 3 週間は安定であったとし、Schindler ら³⁾ はウマ S-ChE は -17°C で 8 週間安定であり、87%の活性が維持されたが、その後失活し、12 週目には 50%の活性しか維持されなかったと報告している。

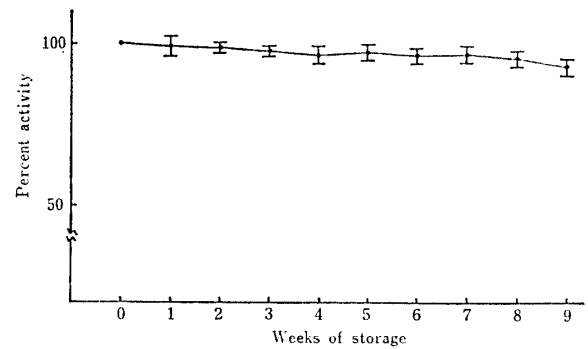


Fig. 5. Stability of cattle serum cholinesterase after storage at -20°C

一方、Sider ら⁴⁾ はヒト S-ChE で -20°C 、3 ヶ月間の保存でも 3%以下の活性変化しかないと報告している。

本実験では、ウマおよびイヌは 9 週間の間失活なしに活性が維持され、終始安定した成績を示すのに対し、ネコ、ブタおよびウシは後半 2～5%程度の活性の低下が観察され、大要においては、Mersmann ら及び Schindler らと一致しているが、多少の差異は採血後、血清分離から凍結、融解および測定へと至る間の条件の違いにより生じたものと考えられる。

文献的にヒト血清が家畜の血清よりも保存に堪える傾向が見られるが、本実験においても家畜の中で正常活性値が高いウマ、イヌでは保存性が長く、正常活性値の低いネコ、ウシ、ブタでは保存性が短いことが観察されていることは興味ある所見といえよう。

血清凍結保存に関する一般論として、西風ら⁵⁾ は、血清を凍結させるときも、溶かすときも、時間をかけると部分的な凍結解凍のくり返しが起って変性を起しやすくする。溶かす際に氷片の残った状態で振盪することも同様に変性の原因となる。泡をたてると、泡と空気との界面における変性が起るなどの諸点を指摘していることから、著者らの血清分封凍結保存法と流水中での自然解凍法は西風らの問題点に抵触せず合理的なものと考ええる。

いずれにせよ家畜の凍結保存による血清中の ChE 活性の持続性は動物種により多少の差はあるものの、9 週間という期間においては、過度の失活なしに活性が維持されていることから、臨床的に充分供試できるものと考ええる。

要 約

-20°C 、9 週間の凍結保存血清について、S-ChE 活性値を測定した結果

1. ウマおよびイヌでは失活なしに活性が維持され

た。

2. ネコ、ブタおよびウシでは後半2~5%程度の失活が観察された。

3. -20°C 、9週間の凍結保存下における家畜のS-ChEは過度の失活もなく、臨床的に十分活性値測定に供し得ることがわかった。

文 献

- 1) 森園 充・権 秀人：鹿大農学術報告，**27**，61-67 (1976)
- 2) 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)

- 3) Schindler, R. L. and Kruckenberg, S. M. : Changes in cholinesterase activity in stored equine blood samples. *Am. J. Vet. Res.*, **33**, 1893-1894 (1972)

- 4) Siders, D. B., Batsakis, J. G. and Stiles, D. E. : Serum cholinesterase activity. *Am. J. Clin. Path.*, **50**, 344-350 (1968)

- 5) 西風 脩・市田篤郎：血清の保存。臨床検査，**15**，66-69 (1971)

Summary

The effect of storage on the serum-cholinesterase determination was examined.

The data indicate that enzymatic activity of serum was not to be affected under the condition of -20°C for 9 weeks in horse and dog, while slight diminution of activity (95~98%) was pointed out in cat, pig and cattle in the latter part of the period.

These results suggest that the frozen serum at -20°C is still fit for a diagnostic sample until 9 weeks have passed.