

家畜のAspartate
Aminotransferase(GOT)およびAlanine
Aminotransferase(GPT)に関する臨床学的研究 : II
家畜の血清GOT活性の測定法

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-12-10 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 森園, 充, 山内, 達雄 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10232/1939

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

II 家畜の血清 GOT 活性の測定法

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

II. Method in Determination of Serum

GOT Activities in Domestic Animals

Mitsuru MORIZONO and Tatsuo YAMAUCHI

(Laboratory of Veterinary Medicine)

緒 言

血清中の aspartate aminotransferase (GOT) と alanine aminotransferase (GPT) の活性測定は肝機能診断および肝疾患の経過観察に欠くことのできない検査項目であり、近年獣医領域においても頻繁に利用されている。しかし、ブタ、ウシ、ウマにおける血清 GPT 活性の測定は、由来する GPT の臓器内分布が GOT に比べて極端に低く、特異的に濃存する臓器が見られず、さらに CCl_4 を投与して実験的に発症させた肝障害例において、血清 GPT 活性が上昇しない⁴⁾ ことからこれらの動物では血清 GPT 測定の臨床的意義は少なく、GOT 活性のみの測定によって十分臨床診断に活用できることが示唆された。

現在、血清トランスアミナーゼの測定は Wroblewski-Karmen 法⁷⁾ (以下 Karmen 法と略す) が標準的な方法であるが、試薬が高価で不安定であり、また特殊な紫外部の恒温分光光度計を必要とすることから普遍化していない。このため日常検査には Karmen 単位に換算できる Reitman-Frankel 法¹³⁾ (以下 R-F 法) が広く利用されている。本法は試薬が安価であり、特殊な器具を必要とせず、GOT と GPT が並行して測定できるなど実用的利点が多い。しかしその反面基質に加えてある α -Ketoglutarate がヒドロゾン化するために、盲検が高いこと、発色が温度の影響を受けやすいことなどから測定値にばらつきの生ずることが指摘されている。

1962年 Babson⁹⁾ らは GOT 反応の結果生成した oxaloacetate を発色させて GOT 活性を測定する方法を開発した。その後本法の改良が試みられ、感度の良い測定法として報告^{12) 5) 8) 10) 11)} されている。本法は試薬が安価であり、酵素反応時間が R-F 法の60分にくらべて20分と短かく、測定手技が簡便で、R-F 法より正確度が高い⁶⁾ 利点を有するが、GPT の測定ができないため、トランスアミナーゼ測定法としてはヒトの領域では一般性に欠け普及していない。

獣医領域においては、前述のごとく、イヌ、ネコを除く他の動物では血清 GOT 活性の測定のみで、臨床診断の目的を果たし得ることから、著者らは本 Babson 法に着目し、各動物に適した血清 GOT 活性の測定法を確立する目的で、イヌ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコについて測定条件を検討し、これらの動物に共通して応用できる血清 GOT 活性測定法を得たのでここに報告する。

材料および方法

1. 実験動物

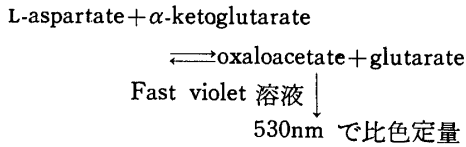
実験に供した動物は、イヌ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコの5種でいずれも成畜を使用し、測定の至適条件決定実験にはそれぞれ5例を用いた。また GOT 活性の正常域測定には、イヌ 30、ブタ 30、ウシ 31、ウマ 30、ネコ 8例をそれぞれ使用した。

2. 試薬

GOT 測定に用いた試薬は、L-aspartate (半井化学

薬品), α -ketoglutarate(和光純薬), polyvinylpyrrolidone (PVP)分子量 40,000(半井化学薬品), ethylenediamine tetraacetic acid-2Na salt (EDTA) (半井化学薬品), Fast violet B salt (Sigma), oxaloacetate (Sigma) である。

3. 測定法と測定器械



活性の測定原理は, Babson-Shapiro⁹⁾ らの上記の GOT 反応の結果生成した oxaloacetate を Fast violet 溶液で diazo 化し, 分光々度計 (Hitachi 101 型) を用いて 530nm の波長により比色定量した。

4. ミカエリス定数 (Km の算出)

酵素活性曲線より得た反応速度 (V: velocity) と基質濃度 (S: Substrate) の値を用いて, Lineweaver-Burk の図式法¹⁴⁾に従って, 両基質の Michaelis-constant (Km) を算出した。 α -ketoglutarate (以下 α -KG), L-aspartate (以下 L-Asp) の両基質濃度の最大反応速度 (Vmax) を Fig 11~20 より求めた。

5. 至適条件の決定

2種の基質に対するミカエリス定数, 血清量, pH, 色素量, 反応温度, 反応停止液の安定性を検討してイヌ, ブタ, ウシ, ウマ, ネコにおける測定時の至適条件を決定した。

6. 測定値の処理

実験により得られた数値については平均値, 標準偏差, 標準誤差, 相関係数, 回帰方程式, 変動係数を求めて統計処理を行なった。

実験成績

1. 酵素活性曲線

α -KG, L-Asp 両基質の各濃度に対する反応速度の関係を, Michaelis-Menten 模式に準拠し, 酵素活性曲線として作図した。

イヌ (Fig. 1, 2), ブタ (Fig. 3, 4), ウシ (Fig. 5, 6), ウマ (Fig. 7, 8), ネコ (Fig. 9, 10) において両基質に対する酵素活性曲線はほぼ共通していた。すなわち α -KG に対する反応型式は双曲線を描かず, イヌでは 0.7mM~1.6mM, ブタでは 0.15mM~0.5mM, ウシでは 0.3mM~0.75mM, ウマでは 0.3mM~0.7mM, ネコでは 0.2mM~1.0mM の濃度間でシグモイド形を示した。他の濃度では, イヌを除き濃度の増加

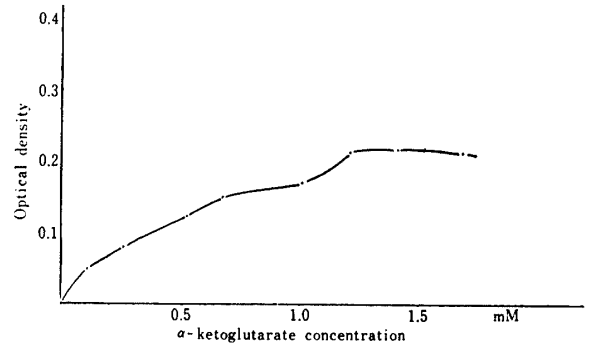


Fig. 1. Variation in rate of dog GOT reaction with change in α -ketoglutarate concentration.

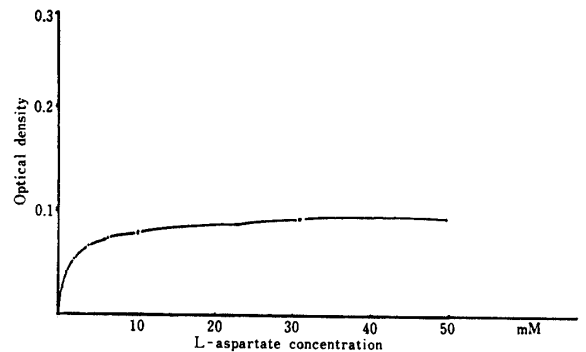


Fig. 2. Variation in rate of dog GOT reaction with change in L-aspartate concentration.

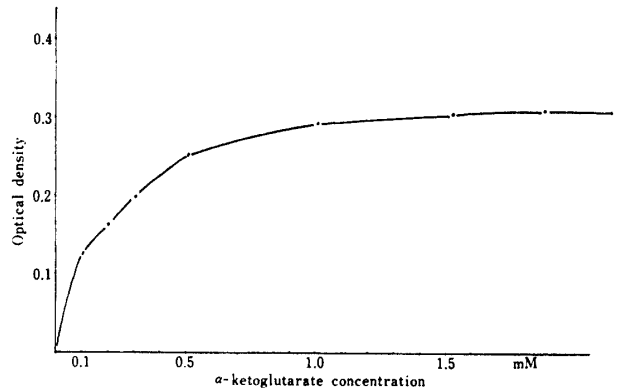


Fig. 3. Variation in rate of pig GOT reaction with change in α -ketoglutarate concentration.

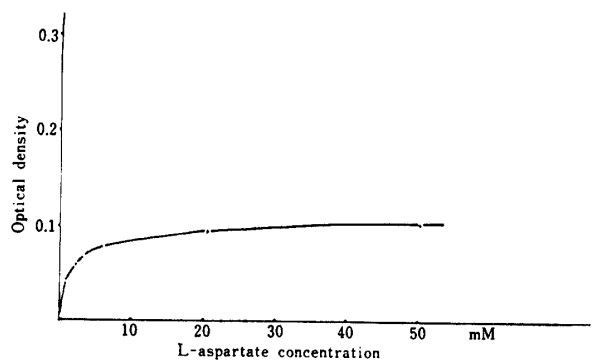


Fig. 4. Variation in rate of pig GOT reaction with change in L-aspartate concentration.

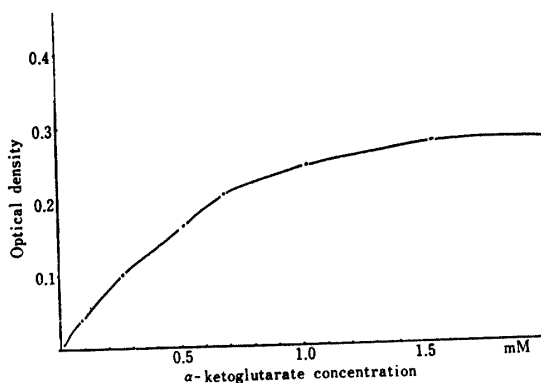


Fig. 5. variation in rate of cattle GOT reaction with change in α -ketoglutarate concentration.

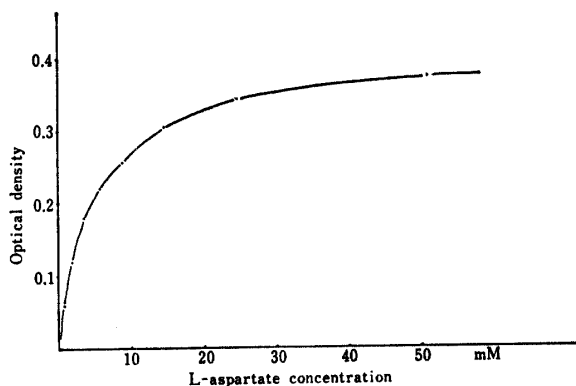


Fig. 8. Variation in rate of horse GOT reaction with change in L-aspartate concentration.

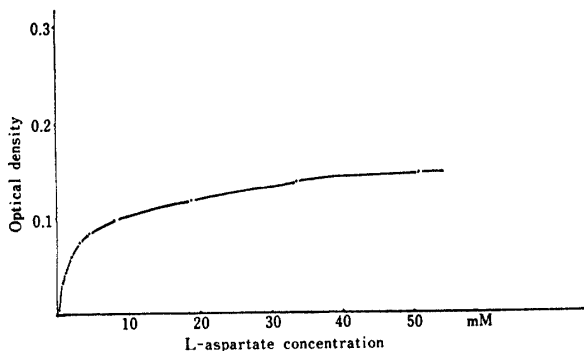


Fig. 6. Variation in rate of cattle GOT reaction with change in L-aspartate concentration.

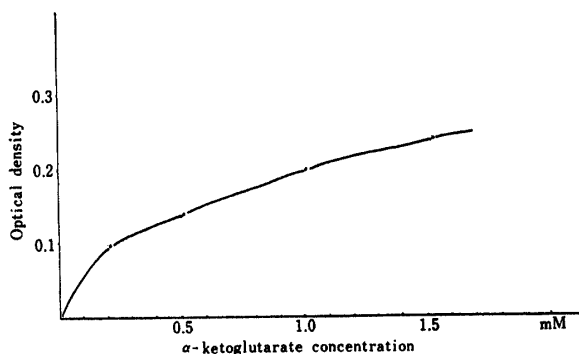


Fig. 9. Variation in rate of cat GOT reaction with change in α -ketoglutarate concentration.

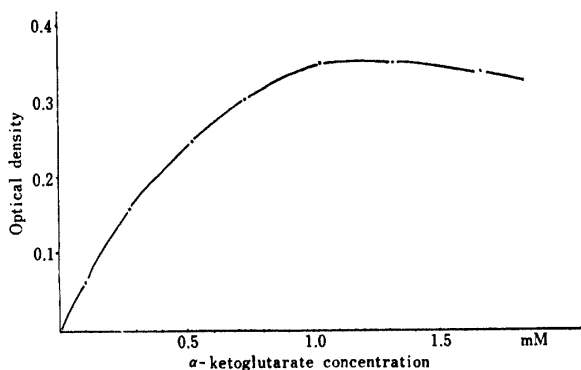


Fig. 7. Variation in rate of horse GOT reaction with change in α -ketoglutarate concentration.

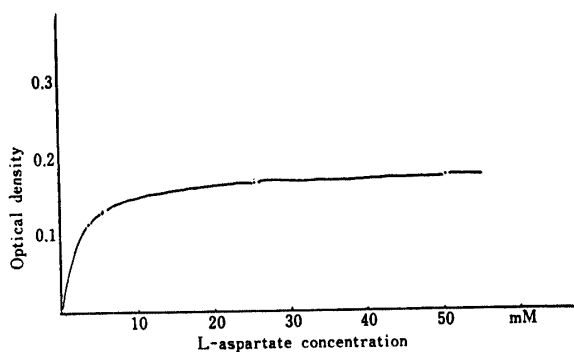


Fig. 10. Variation in rate of cat GOT reaction with change in L-aspartate concentration.

に応じほぼ順調に GOT 活性も増加したが、イヌでは 20mM 以上になると活性が低下する傾向が認められた。一方 L-Asp に対する反応型式は Michaelis-Menten 模式に従がう双曲線の基質飽和曲線として示された。

2. Lineweaver-Burk 図式による K_m , V_{max} 値。

(Fig. 11~20)

各動物の K_m , V_{max} 値は Table 1. に示すとおりである。すなわちブタ、ウシ、ウマ、ネコでは L-Asp の K_m よりも α -KG の K_m が小さいため α -KG に対して強い親和性が、一方イヌでは多少 L-Asp に対する親和性が強く認められた。 V_{max} はウマの L-Asp に対する値が他の動物よりも高く、一方ブタの α -KG に対する V_{max} が他の動物よりも高かった。

3. 至適条件の検討 (Fig. 21)

Table 1. Km values and Vmax values for GOT of domestic animals in two kinds of substrates.

substrate species	L-aspartate		α -ketoglutarate	
	Km (mM)	Vmax(10^{-2} mM)	Km (mM)	Vmax(10^{-2} mM)
Dog	$1.11^1 \pm 0.19^2$	8.7 ¹	$1.25^1 \pm 0.17^2$	35.1 ¹
Pig	1.72 ± 0.13	10.9	1.41 ± 0.12	94.3
Cattle	2.64 ± 0.25	14.8	0.91 ± 0.07	46.3
Horse	4.41 ± 0.35	45.5	0.87 ± 0.14	37.9
Cat	1.78 ± 0.05	17.2	1.37 ± 0.06	51.3

Km: Michaelis constant
 Vmax: Maximum velocity
¹: Mean ²: Standard deviation

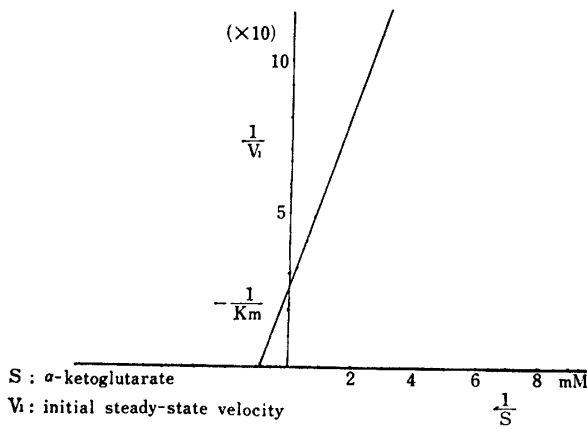


Fig. 11. Lineweaver-Burk's plot of dog GOT for α -ketoglutarate

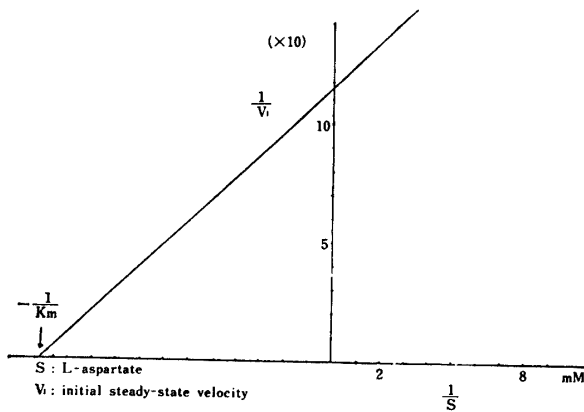


Fig. 12. Lineweaver-Burk's plot of dog GOT for L-aspartate.

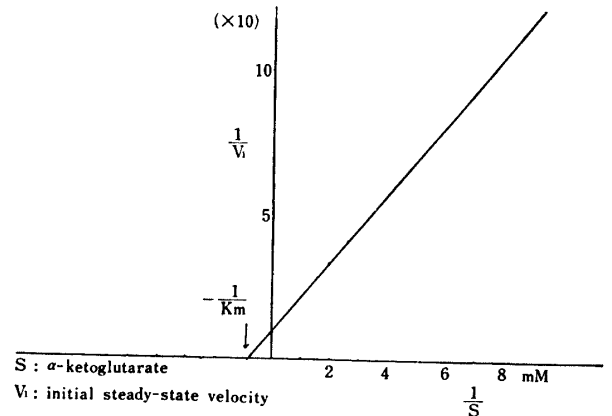


Fig. 13. Lineweaver-Burk's plot of pig GOT for α -ketoglutarate.

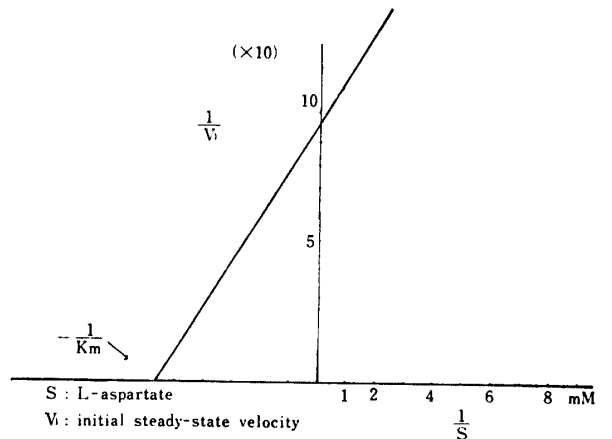


Fig. 14. Lineweaver-Burk's plot of pig GOT for L-aspartate.

(1) 基質濃度と血清量の関係についての検討

Km, Vmax 値を考慮し, 酵素活性に必要な最低条件を5種の動物間で求め, L-Asp. α -KG. の濃度をそれぞれ次の5群に分け,

- a. (4mM, 1.2mM) b. (8mM, 2.5mM)
- c. (20mM, 5mM) d. (250mM, 20mM)
- e. (200mM, 15mM)

とした. さらにその各々を 0.1% リン酸緩衝液に溶

解し, さらに全量に対して PVP を 1%, また EDTA を 0.1% の割合に加えた溶液を調整し, これらの5群の基質に各動物の血清を 0.2ml 添加して, GOT 活性を測定した. その結果を Fig. 21 に示した. GOT 活性発現はいずれの組成の緩衝液においても認められたが, 分光学的に透過率 30~70% の範囲に含まれている場合⁶⁾に反応が安定であることを目安とした場合, a の基質ではこの範囲からはずれるので適切でない

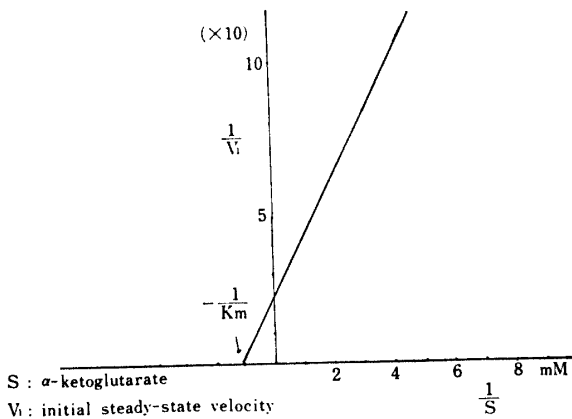


Fig. 15. Lineweaver-Burk's plot of cattle GOT for α -ketoglutarate.

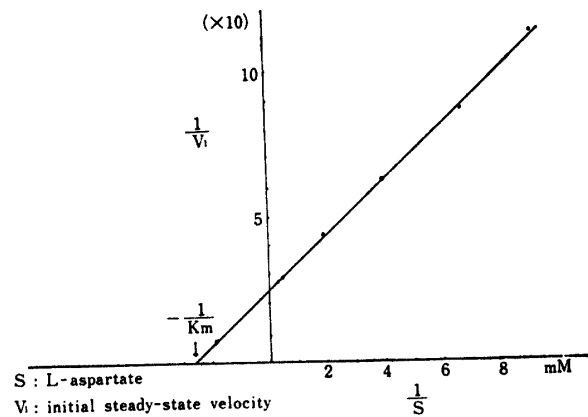


Fig. 18. Lineweaver-Burk's plot of horse GOT for L-aspartate.

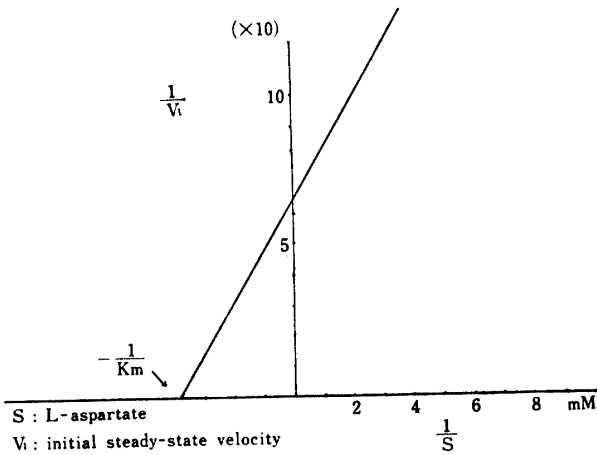


Fig. 16. Lineweaver-Burk's plot of cattle GOT for L-aspartate.

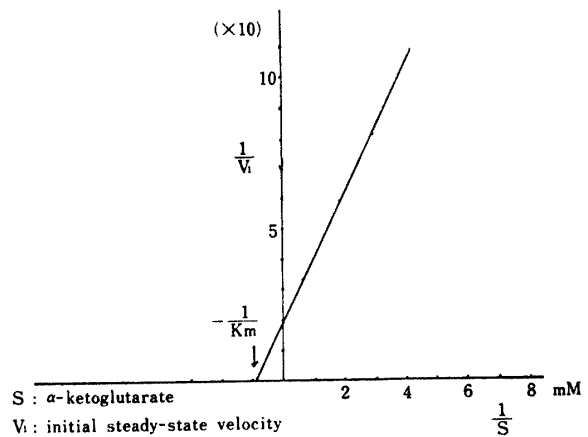


Fig. 19. Lineweaver-Burk's plot of cat GOT for α -ketoglutarate.

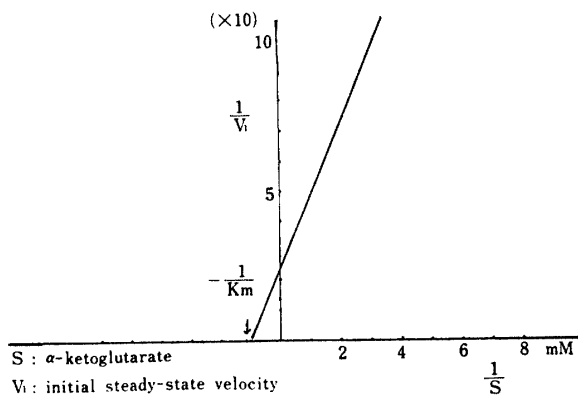


Fig. 17. Lineweaver-Burk's plot of horse GOT for α -ketoglutarate.

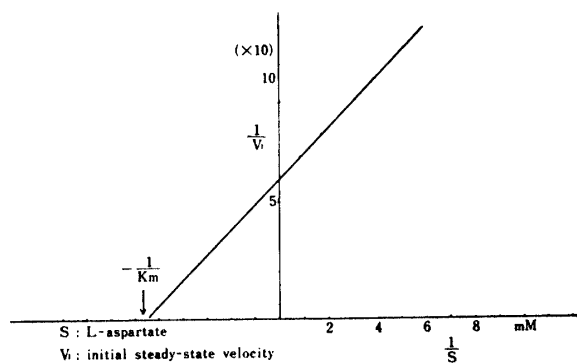


Fig. 20. Lineweaver-Burk's plot of cat GOT for L-aspartate.

考えられる。さらにどの動物でもほぼこの範囲に含まれる b,c,d,e について比較した場合、e はその条件を最も満たしている点で5群中で最適である。

次にウマの血清を用いて、その 0.05, 0.1, 0.15, 0.2ml を上記の最適であった濃度 (L-Asp 200mM, α -KG 15mM) の基質中に添加したところ酵素反応を示す活性曲線は直線性が得られた。(Fig. 22) これは原

法と一致したので原法通り血清添加量は 0.2ml とした。

(2) 基質 pH の検討 (Fig. 23)

α -KG 15mM, L-Asp 200mM の基質混合液の pH を 6.8~9.4 間に調整し、それらの各基質にイヌ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコの血清 0.2ml を加え、GOT 活性を

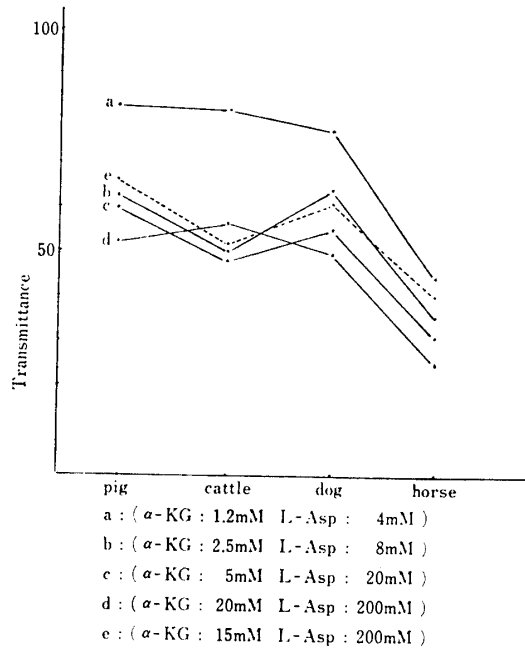


Fig. 21. Relationship between substrate mixtures and transmittance of GOT activity in domestic animals.

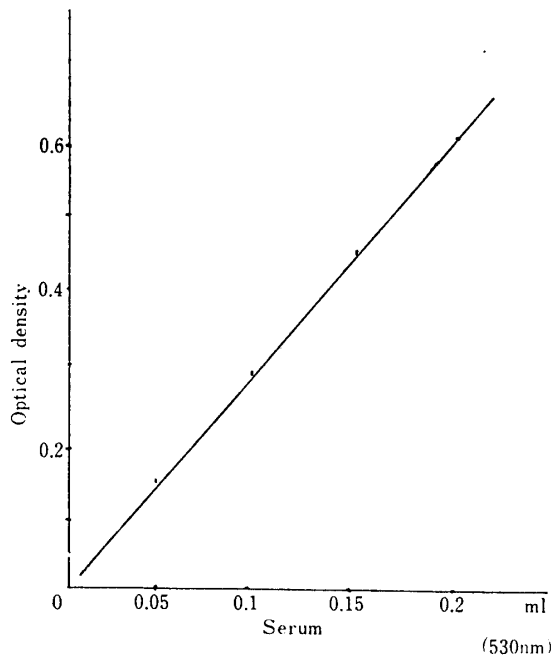


Fig. 22. Correlation between GOT activities and amounts of horse serum.

測定した。その結果、pH 値の増加と共に活性値の増加が見られた。しかしグラフに示すように pH 8.0 で各動物共通してほぼ活性値の増加は鈍化し、pH 8.8 を頂点としてこれ以上の pH では活性値の増加はみられなくなるため、pH 8.0 を採用した。

(3) 発色液の色素量の検討 (Fig. 24)

発色液としての Fast violet 溶液の至適濃度をを知る

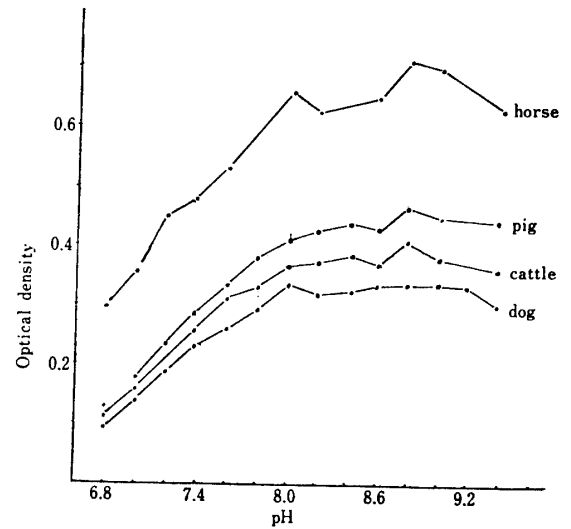


Fig. 23. Variation of GOT activities with pH.

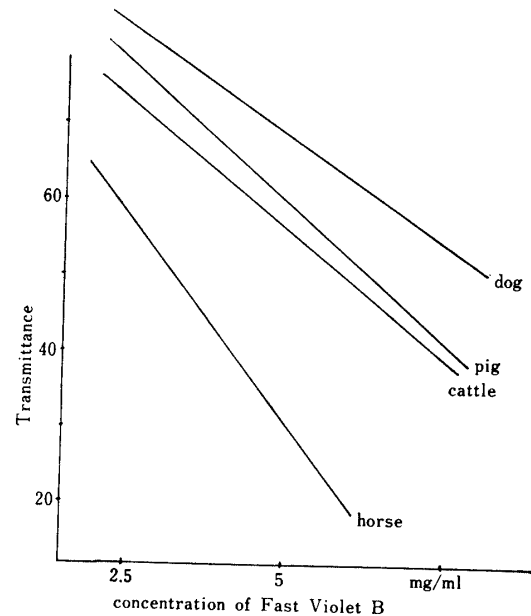


Fig. 24. Effect of Fast Violet B on GOT reaction

ため、発色液濃度を変えて反応させ、吸光度を測定した。結果は Fig. 24 に示したように、分光学的に安定な透過率 30~70% の範囲に含まれるのは 5mg/ml であるため、この量が最適と考えられた。

(4) 反応温度の検討 (Fig. 25)

α -KG 15mM, L-Asp 200mM を含み、pH 8.0 に調整した基質液に、各動物の血清 0.2ml を添加して反応温度の変化に伴う活性の変化を検討した。温度は 19°C, 25°C, 37°C, 45°C, 60°C に設定した。結果は Fig 25 に示したように、45°C までは温度 1°C 上昇すると活性値が 6.4% 増加するのが認められた。しかし 60°C では発色液添加後、濃い沈澱物を生じ、活性進行の停滞が認められた。分光学的に安定な透過率 30~70% の範囲に含まれるのは各動物共に上記の条

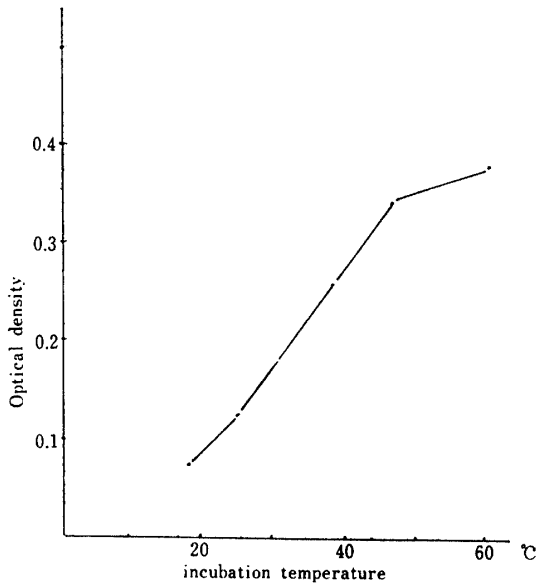


Fig. 25. Correlation between GOT activities and incubation temperature in cattle.

件下では 30~40°C が最適と考えられる。このため、設定しやすいことも考慮して 37°C を採用した。

(5) 反応停止液の安定性

反応停止液として、蒸留水²³⁾、エタノール¹⁰⁾、1N 硫酸⁹⁾、高濃度硫酸⁹⁾などの報告があり、各々を用いて比較したが、いずれもほとんど差がなかったため、最も簡便な蒸留水を使用した。しかし反応停止液の安定度はいずれの停止液を用いてもあまりよくなく、反応停止 1 時間後には活性値が平均 12% 上昇した。このため反応停止液注入後はできるだけ速く測定することが望ましい。

4. 動物血清 GOT 活性の測定法 (Babson 改良法)

上記の実験結果から各動物の至適条件が明らかとなり、その至適条件を Babson 原法に導入して基質溶液および発色液を次のように改良した。

(1) 基質溶液

K₂HPO₄ 6.70g, KH₂PO₄ 0.20g, α-KG 0.4383g, L-Asp. 5.324g, PVP 2.0g, EDTA 0.2g

これらを蒸留水に溶かして 200ml とし、pH を 8.0 に調整したものを基質溶液とする。

(2) 発色液

蒸留水 100ml に Fast violet B salt を 0.5g 溶解して発色液とする。

5. Babson 改良法による動物血清 GOT 活性値

著者らの考案した Babson 改良法の基質条件で、測定方法は Babson 原法に準拠し (Table 2)、イヌ 30、ブタ 30、ウシ 31、ウマ 30、ネコ 8 例を用いて血清

Table 2. Procedure for assay.

Substrate	1ml
	preincubate at 37°C
Serum	0.2ml
	20min at 37°C
BMTD solution	1ml
	10min at 37°C
Distilled water	10ml
	Read the absorbance at 530nm

Table 3. Serum GOT activities in domestic animals. (Modified Babson's method)

Species	No. tested	\bar{X}	SD	M
Dog	30	43.8	4.18	39.6~48.0
Pig	30	52.6	11.44	41.2~64.0
Cattle	31	60.7	11.88	48.8~72.6
Horse	30	172.9	30.47	142.4~203.4
Cat	8	37.8	4.6	33.2~42.4

\bar{X} : mean value

SD: standard deviation

M: $X \pm SD$

GOT 活性を測定した。その平均値を Table 3 に示した。すなわちウマの血清活性値が最も高く、ネコが最も低くイヌ、ブタ、ウシはこの間に含まれた。

6. 標準法である Karmen 法と著者らの用いた Babson 改良法との相関々係をみるためにウマ血清を同時に両方法で測定し相関係数および回帰方程式を求めたが (Fig. 26)、相関係数は 0.87 で両者の間にかなり強い相関々係を認めた。

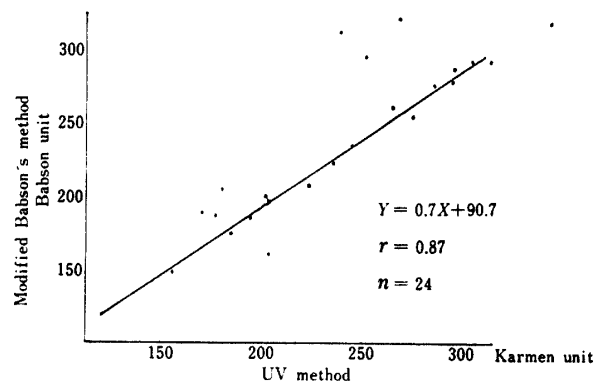


Fig. 26. Correlation and regression between the modified Babson's method and the UV method in horse GOT.

7. 繁用されている R-F 法と著者らの用いた Babson 改良法との相関々係をみるためイヌ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ血清を同時に両方法で測定し、相関係数および回帰方程式を求めたが (Fig. 27~31) それぞれ強い

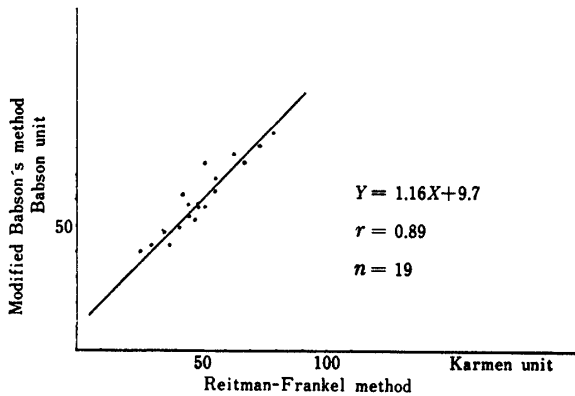


Fig. 27. Correlation and regression between the modified Babson's and the Reitman-Frankel-method in dog GOT.

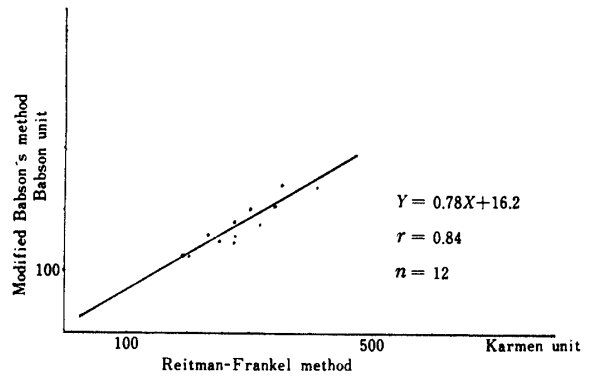


Fig. 30. Correlation and regression between the modified Babson's and the Reitman-Frankel method in horse GOT.

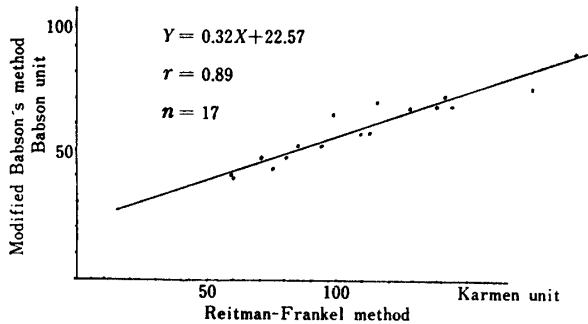


Fig. 28. Correlation and regression between the modified Babson's and the Reitman-Frankel method in pig GOT.

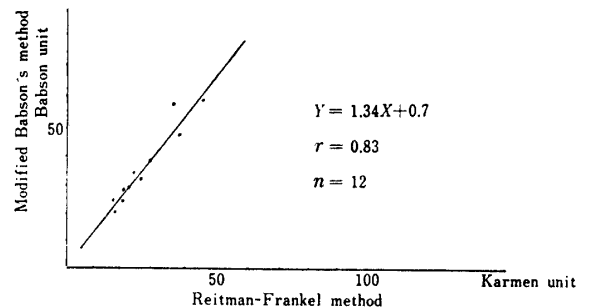


Fig. 31. Correlation and regression between the modified Babson's and the Reitman-Frankel method in cat GOT.

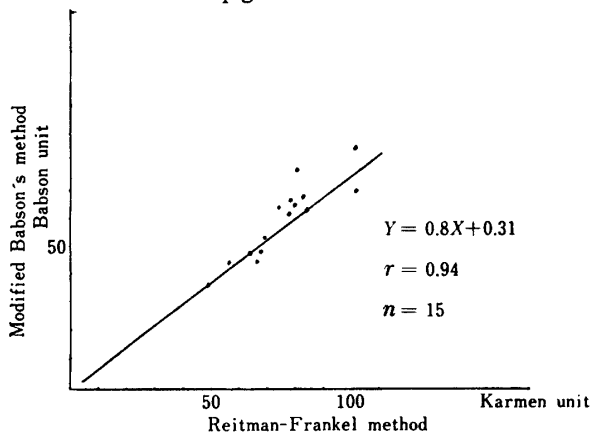


Fig. 29. Correlation and regression between the modified Babson's and the Reitman-Frankel method in cattle GOT.

相関々係が認められた。

8. 本測定法の再現精度をみるため、同一のブタ血清を10回反復して測定した結果、変動係数 (CV) は 2.43% であった。

考 察

日常検査に最もよく使用される R-F 法では生成した oxaloacetate とだけでなく、基質の α -KG とも呈

色するため基質濃度を十分に上げることができない。このため病的に高い酵素活性では反応が完全ではなく、正確な活性値を表現できないという難点を有する。一方、Babson 法における diazonium 試薬では α -KG とほとんど反応しないため、高い基質濃度の使用も可能となる。

一般に基質量を K_m 値の 2 倍以上にしないと酵素量に対する基質量の不足がおけるといわれるが、Babson 法では上述のごとく、基質濃度に制約をうけないので、反応を完全に行える条件に設定することができる。このため高単位血清でも希釈せずに測定できるという長所がある。実際に Babson 法を R-F 法と比較した報告¹²⁾では、かなり高単位まで血清を希釈せずに測定でき、正確さも R-F 法よりまさっているとしている。

基質液については、著者らが算定した K_m 値から R-F 法および Babson 原法共に高活性を示す病的な動物の血清 GOT 活性の測定においては基質量が不足し、このことが酵素反応における rate limiting となることが考えられたため本 Babson 改良法においては基質濃度を増加した。著者らの考案した Babson 改良

法と標準法である Karmen 法および最も頻繁に使われる R-F 法との間にかなり強い相関々係があり、正確さにおいて Karmen 法、R-F 法と匹敵する測定法であることが認められた。

また Babson 法の反応停止液は、種々あるが、いずれも停止後の安定性に欠けていた。従って厳密にはこの反応停止液の面では改良の余地が残されているといえるが、しかし反応停止後測定を迅速に行えば、比較的小さな変動係数が得られたことから、現時点では本改良法による活性値の変動を少く、再現性のよいものにするためには反応停止後の測定操作を速かに行うことが必要である。また本法の測定所要時間は R-F 法の $\frac{1}{3}$ に短縮され、操作も極めて簡単なことから、今後獣医領域における動物の臨床検査に利用できるものとする。

要 約

Babson 法による家畜の血清 GOT 測定法を検討した結果、血清 GOT 活性新測定法(実験成績参照)と次の知見が得られた。

1. 各動物の L-aspartate に対する Km (ミカエリス定数) と Vmax (最大反応速度) はそれぞれイヌで 1.11mM と 0.087mM, ブタで 1.72mM と 0.109mM, ウシで 2.64mM と 0.148mM, ウマで 4.41mM と 0.455mM, ネコで 1.78mM と 0.172mM であった。

2. 各動物の α -ketoglutarate に対する Km と Vmax はそれぞれイヌで 1.25mM と 0.351mM, ブタで 1.41mM と 0.943mM, ウシで 0.91mM と 0.463mM, ウマで 0.87mM と 0.379mM, ネコで 1.37mM と 0.513mM であった。

3. 著者らの考案した Babson 改良法による動物の血清 GOT 活性の正常値は、イヌ (n=30) 39.6~48.0, ブタ (n=30) 41.2~64.0, ウシ (n=31) 48.8~72.6, ウマ (n=30) 142.4~203.4, ネコ (n=8) 33.2~42.4 unit/l であった。

4. 本 Babson 改良法と Karmen 法および R-F 法による測定値の間には、かなり強い相関々係が得られ

た。また本法による測定値には、良好な再現性(CV=2.43%)が認められた。

文 献

- 1) Babson, A.L. and Phillips, G.E.: An improved colorimetric transaminase assay. *Clin. Chem.*, **11**, 533-534 (1965)
- 2) Babson, A.L. and Shapiro, P.O.: A note on the colorimetric assay for transaminase in serum. *Clin. Chim. Acta.*, **8**, 326-327 (1963)
- 3) Babson, A.L., Shapiro, P.O., Williams, P.A.R. and Phillips, G.E.: The use of a Diazonium salt for the determination of GOT in serum. *Clin. Chim. Acta.*, **7**, 199-205 (1962)
- 4) Cornelius, C.E. and Kaneko, J.J.: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 225-301, Academic Press. New York (1963)
- 5) Furuno, M. and Shiina, A.: Adaptation of Babson's method for the determination of serum GOT in the clinical laboratory. *Clin. Chem.*, **11**, 23-27 (1965)
- 6) 広田穰: 実験技術に関連した諸問題. 紫外, 可視スペクトルの解釈, p. 95-115 共立出版 東京 (1967)
- 7) Karmen, A.: A note on the spectrophotometric assay of glutamic transaminase in human blood serum. *J. Clin. Invest.*, **34**, 131-135 (1955)
- 8) 勝沼信彦・西井易穂: 血清 GOT および MDH 活性のジアゾニウム塩を用いる新簡易定量法. *ビタミン*, **13**, 72-77 (1965)
- 9) 松沢健夫・西野穂積・勝沼信彦・西井易穂・安藤宗八: ジアゾニウム塩による GOT, GPT, LDH の簡易測定キットについて, *臨床病理*, **15**, 539-543 (1963)
- 10) 松沢健夫・鈴木訓子・勝沼信彦: Diazonium 亜鉛塩による GOT, GPT, LDH および MDH の新簡易測定法. *臨床病理*, **14**, 421-425 (1966)
- 11) 百瀬隆: 血清 GOT, GPT の新簡易定量法に関して. 第6回臨床化学分析研究会より集録, **3**, (1969)
- 12) Nakamura, R.M., Magsaysay, R. and Kunitake, G.M.: Comparison of two current colorimetric procedures for determination of serum GOT. *Clin. Chem.*, **11**, 864-854 (1965)
- 13) Reitman, S. and Frankel, S. A colorimetric method for the determination of serum GOT and GPT. *Am J. Clin. Path.*, **28**, 56-57 (1957)
- 14) 佐竹一夫: 酵素. 一般生物化学, p. 211-239 (1965)
- 15) 山村雄一・勝沼信彦・藤井節郎: 酵素測定法とその臨床的意義. *臨床酵素学必携*, p. 360-386 南山堂, 東京 (1966)

Summary

1. Amount of substrate and pH in the reactive solution, serum volume, incubation temperature, amount of dye in solution and stability of stop solution were examined to perform an accurate measurement of serum GOT activities, using Babson's method, a method shorter in reaction time and more sensitive, than other method.

2. Michaelis constant and maximum velocity (Vmax) of L-aspartate to the variable animal's sera were 1.11

mM, 0.087mM in dogs; 1.72mM, 0.109mM in pigs; 2.64mM, 0.148mM in cattles; 4.41mM, 0.455mM in horses; 1.78mM, 0.172mM in cats, respectively.

3. Michaelis constant and maximum velocity of α -ketoglutarate for the variable animals' sera were 1.25mM, 0.351mM in dogs; 1.41mM 0.943mM in pigs; 0.91mM, 0.463mM in cattles; 0.87mM, 0.379mM in horses; 1.37mM, 0.513mM in cats, respectively.

4. Normal serum-GOT activities (Babson U/l) by the determination of author's modified Babson's method were 39.6—48.0 in dogs; 41.2—64.0 in pigs; 48.8—72.6 in cattles; 142.4—203.4 in horses; 32.2—42.4 in cats, respectively.

5. The correlation coefficients between the author's modified Babson's method and the Reitman-Frankel method were 0.89 in dogs; 0.89 in pigs; 0.94 in cattles; 0.84 in horses and 0.83 in cats, respectively.