

牛血清の保存温度と保存期間が乳酸脱水素酵素の活性 及びアイソザイムに及ぼす影響

吉田裕一¹⁾ 中村 誠²⁾ 澤田 浩³⁾ 新井鐘蔵^{3)†}

- 1) 兵庫県立農林水産技術総合センター北部農業技術センター
(〒669-5254 朝来市和田山町安井123)
- 2) 鹿児島県中央家畜保健衛生所 (〒899-2201 日置市東市来町湯田1678)
- 3) 国研農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門
(〒305-0856 つくば市観音台3-1-5)

(2019年6月26日受付・2019年9月5日受理)

要 約

牛血清の保存温度と保存期間がLDH総活性とアイソザイムに及ぼす影響について検討した。健康なホルスタイン種雌成牛及び黒毛和種雌成牛から得られた血清を各温度(4, -20, -80℃)で保存した。また、コントロールとしてヨークシャー種雌成豚の血清についても検討した。ホルスタイン種と黒毛和種における血清LDH総活性とアイソザイムは、-20℃保存及び-80℃保存で12カ月間、有意な変化は認められなかった。一方、豚における-20℃保存の血清総LDH活性は、1カ月後には有意に低下した($P < 0.05$)。豚血清のLDHアイソザイムのMサブユニット比は、牛血清に比べて高かった。牛血清は豚血清とは異なり、-20℃の冷凍保存でLDH総活性及びアイソザイムが12カ月間は安定することが示唆された。——キーワード：牛血清, LDH, 保存温度。

-----日獣会誌 73, 101~105 (2020)

乳酸脱水素酵素(LDH)は体内の各組織に広く分布しており、心肺疾患、血液疾患、肝疾患、腎疾患、皮膚筋炎などで逸脱して血清活性が上昇する[1, 2]。産業動物領域では、血清LDH総活性やアイソザイムの測定は牛の白血病や白筋症、豚の筋障害などの臨床検査に活用されている[3-5]。

LDHは、M型とH型の2種類のサブユニットから成る4量体で構成されているが、Mサブユニットは-10~-20℃で不安定になりやすいため、一般的には測定までの血清の保存温度は-80℃が推奨されている[1, 2]。人や馬、豚では-20℃で保存した血清はLDH総活性が低下するため、測定に適さないと報告されている[6-8]。

一方で、牛については、血清の保存温度を-20℃にした場合、3~4週間程度はLDH総活性が安定していたという報告[9, 10]もあり、動物種によって保存温度と活性の関係が異なる可能性もある。また、ホルスタイン種と黒毛和種では血清LDH総活性が異なることが報告[11]されているが、血清の長期保存性に品種間

差があるかは不明である。-20℃の冷凍庫は診療所や検査機関などで広く使用されており、日常的に利用できる牛血清の保存条件の確立は重要である。

そこで、本研究では牛血清の保存温度並びに動物種や品種の違いがLDH総活性とアイソザイムに及ぼす影響を明らかにするために、牛(ホルスタイン種、黒毛和種)及び豚血清を用いて長期間の保存性について比較検討した。

材料及び方法

供試サンプル：農研機構で飼養管理されている健康なホルスタイン種雌成牛6頭、黒毛和種雌成牛5頭、ヨークシャー種雌成豚4頭の頸静脈よりブレイン管(ペノジェクトII真空採血管, テルモ(株), 東京)に採血し、室温で一夜放置後、3,000回転で20分間の遠心分離を行い血清を得た。血清は溶血していないことを確認した後、同一個体ごとに収集して混和後分注した。

実験手順：採取した血清は各温度(4, -20, -80℃)で保存し、牛血清(ホルスタイン種、黒毛和種)につい

† 連絡責任者：新井鐘蔵(国研農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門)

〒305-0856 つくば市観音台3-1-5 ☎・FAX 029-838-7795 E-mail: sarai@affrc.go.jp

表 牛及び豚の0月血清（血清分離当日）におけるLDH総活性並びにH及びMサブユニット比

| 項目(単位) | 牛(ホルスタイン種) | 牛(黒毛和種) | 豚(ヨークシャー種) |
|---------------|------------------------|------------------------|---------------------|
| LDH総活性 (IU/l) | 1,004±101 ^a | 1,269±136 ^b | 481±54 ^c |
| Hサブユニット比 (%) | 75 | 73 | 56 |
| Mサブユニット比 (%) | 25 | 27 | 44 |

平均±標準偏差

a, b, c: 異符号間に有意差あり (P<0.05)

ては血清分離当日(0日), 6カ月後まで1カ月ごと, その後12カ月後にLDH総活性及びアイソザイムを測定した。豚血清については血清分離当日(0日), 6カ月後まで1カ月ごとにLDH総活性を測定した。また0日のアイソザイムを測定した。

血清総LDH活性測定: 血清総LDH活性の測定は, 自動分析装置(7020型自動分析装置, (株)日立ハイテクノロジーズ, 東京)を用いて実施した。

血清LDHアイソザイム測定: LDHアイソザイムの測定は, アガロースゲル電気泳動法で実施した。血清をアガロースゲル(クイックジェルLD, (株)ヘレナ研究所, 埼玉)に塗布し定電圧250Vで13分間電気泳動した後, 反応試薬(タイタンジェルS-LD試薬(QG), (株)ヘレナ研究所, 埼玉)を用いて37℃で30分間反応させ, 反応停止後に泳動像を得た。LDHアイソザイムの測定原理の概略は, 電気泳動によりLDHを各アイソザイムに分離した後, 反応試薬をアガロースゲルに含ませると, L乳酸を基質として生成されたNADH₂はジアホラーゼの存在下でNTBを還元し, ホルマザンを生成して青紫色に発色させる。アイソザイムは, デンシトメーター(DENSITRON CR-20, (株)常光, 東京)を用いて波長570nmで定量を行い, LDH1~5の各活性値とH及びMサブユニット比を算出した。

統計解析: 各試験群(4, -20, -80℃)における0日(血清分離当日)と保存経過月とのLDH総活性及びLDH1~5の各活性値の比較, 並びに品種間のLDH総活性の比較はStudent's-t検定を行った。危険率5%未満を有意な差とした。

成 績

血清分離当日(0日)のホルスタイン種の血清総LDH活性は, 1,004±101IU/l, 黒毛和種は1,269±136IU/lで黒毛和種のLDH活性が有意(P<0.05)に高かった(表)。

ホルスタイン種と黒毛和種の血清総LDH活性は, -20℃及び-80℃保存において, 12カ月間で有意な変化は認められなかった(図1)。一方, 4℃保存では両品種とも1カ月以降で0日に比べて有意(P<0.05)な低下を示した(図1)。

ホルスタイン種と黒毛和種の血清アイソザイムは,

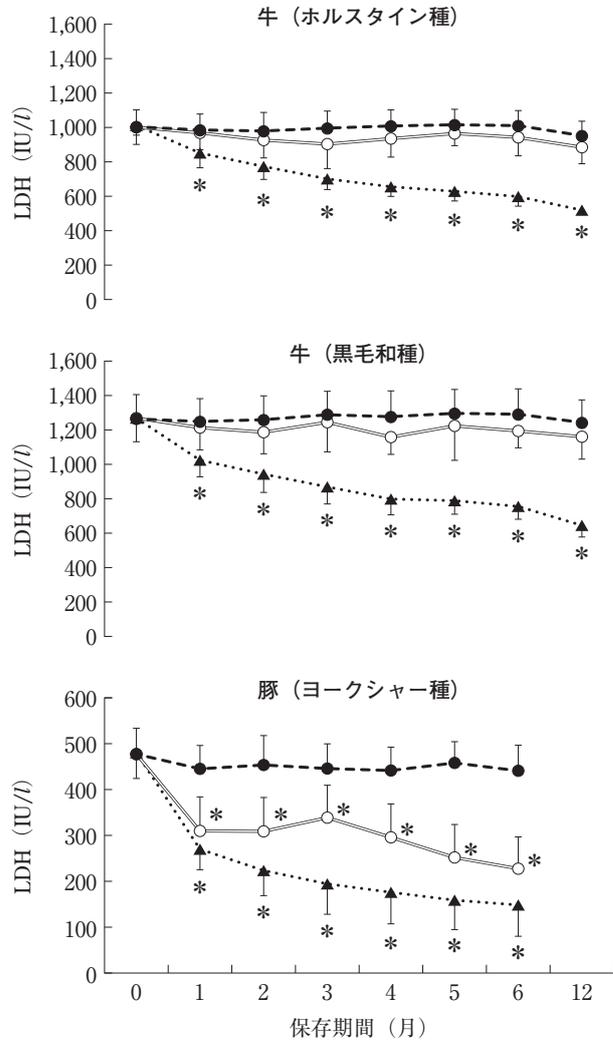


図1 牛及び豚における保存血清のLDH総活性の変化
保存条件: ▲ 4℃, ○ -20℃, ● -80℃
*: 各群において0月(血清分離当日)に比べて有意差あり (P<0.05)
平均±標準偏差

-20℃及び-80℃保存においてLDH1~5のすべての活性値が12カ月間で有意な変化は認められなかった(図2)。一方, 4℃保存ではホルスタイン種及び黒毛和種ともにLDH2活性, LDH3活性及びLDH4活性が1カ月以降で有意な低下(P<0.05)を示した(図2)。

4℃保存のLDH5活性は, ホルスタイン種で5カ月以降, 黒毛和種では12カ月で有意な低下(P<0.05)を示

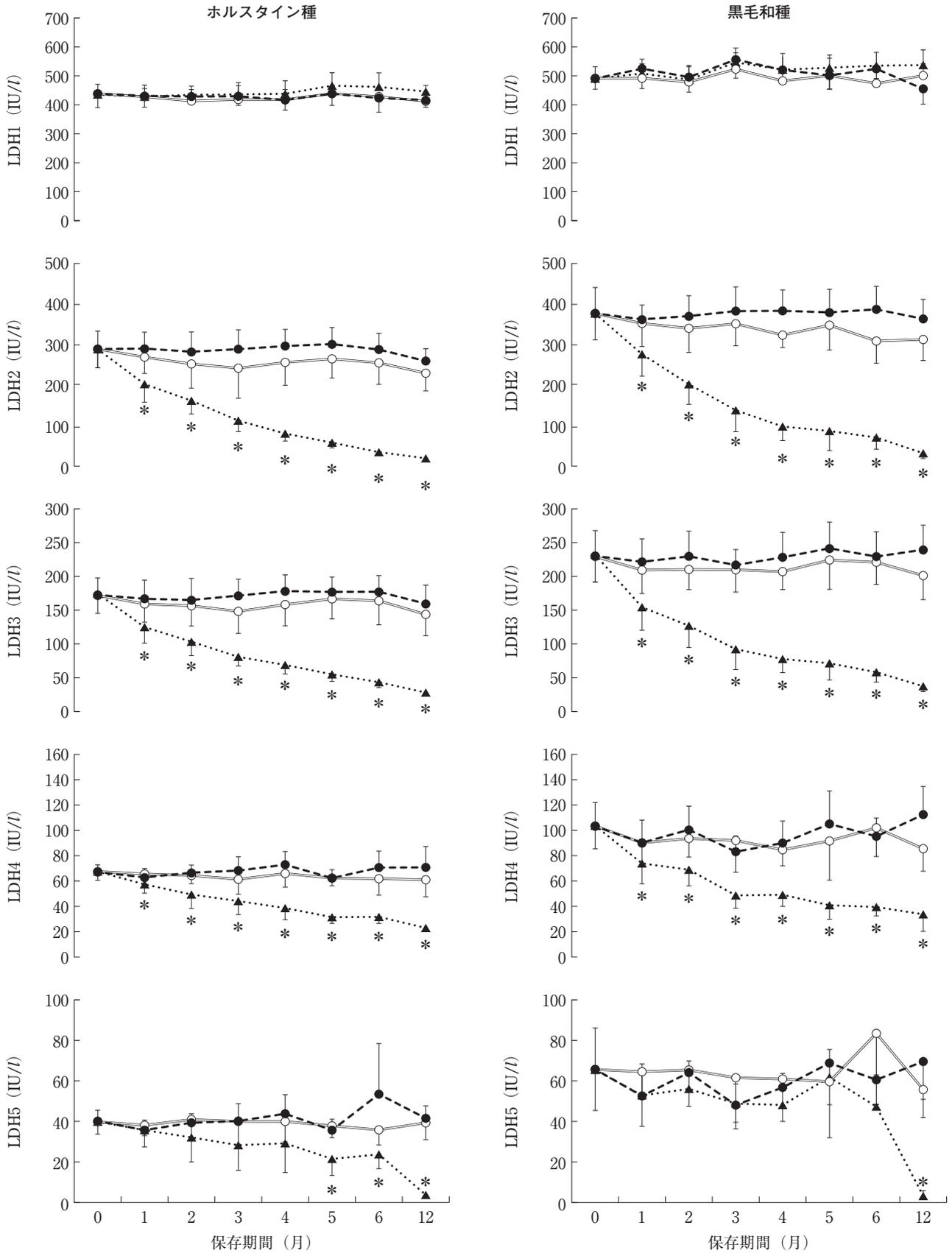


図2 ホルスタイン種及び黒毛和種における保存血清のLDHアイソザイム活性の変化
 保存条件：▲ 4℃，○ -20℃，● -80℃
 *：各群において0月（血清分離当日）に比べて有意差あり（ $P < 0.05$ ）
 平均±標準偏差

した(図2). LDH1活性はすべての保存温度(4, -20, -80℃)において, 12カ月間で有意な変化は認められなかった(図2).

豚血清のLDH総活性は, -80℃保存では6カ月間で有意な変化は認められないが, -20℃及び4℃保存では1カ月以降で0日に比べて有意($P<0.05$)な低下を示した(図1).

血清分離当日(0日)の血清LDHアイソザイムのH及びMサブユニット比は, ホルスタイン種ではそれぞれ75及び25%, 黒毛和種ではそれぞれ73及び27%と両品種とも, ほぼ同じ構成比であった(表). 一方, 豚血清のLDHアイソザイムのH及びMサブユニット比はそれぞれ56及び44%であり, 牛血清に比べてMサブユニット比が高かった(表).

考 察

ホルスタイン種と黒毛和種の血清総LDH活性とアイソザイムは, -20℃保存及び-80℃保存血清で12カ月間, 有意な変化は認められなかった. 一方, 豚では-20℃保存の血清LDH総活性は1カ月後には有意に低下しており, 既報と同様の結果が得られた[8]. Tollersrud[9]やSpateら[10]は, -20℃保存した牛血清のLDH総活性が3~4週間程度は保持されると報告しているが, 本研究ではより長期間保存した12カ月後においても, -20℃保存血清のLDH活性が-80℃保存と同様に安定することが示された.

LDHは, H型とM型の2種類のサブユニットから成る4量体で構成され, 両者の組み合わせから H_4 (LDH1), H_3M_1 (LDH2), H_2M_2 (LDH3), H_1M_3 (LDH4), M_4 (LDH5)の5種類のアイソザイムが存在する[2]. Mサブユニットは-10~-20℃において不安定で失活しやすいとされ, 一般的には血清の保存温度として-80℃が推奨されているが[1, 2], 本報の検討により動物種によって保存温度と活性の関係が異なる可能性が示唆された.

アイソザイム分画は動物種によって異なるため[12], H及びMサブユニット比は動物種によって異なる. 馬のMサブユニット比は48%で, 人では36%, 豚では38%, 牛では22%程度とされているが[2, 11], 本研究ではホルスタイン種のMサブユニット比は25%, 黒毛和種で27%, 豚で44%となっており, おおむね既報と同様の結果が得られた. 牛では-20℃保存の影響を受けやすいMサブユニット比が豚や馬, 人など他の動物種に比べて低く, Hサブユニット比が高い特徴があるため, -20℃保存の血清においてLDHが失活しにくい特性を持つ可能性が推察された.

ホルスタイン種と黒毛和種における4℃保存血清のLDHアイソザイム活性は, Mサブユニットを含まない

LDH1活性は12カ月間変化を示さず, Mサブユニットを含むLDH2~5の各活性値が有意に低下することから, 冷蔵温度(4℃)における牛のLDHの失活においてもMサブユニットの失活が大きく影響している可能性が示唆された.

本研究では, 黒毛和種のLDH活性はホルスタイン種に比べて有意に高く, 既報[11]と同様の結果が得られた. 黒毛和種は肝臓におけるエネルギー代謝が活発なため, ホルスタイン種に比べてLDH活性が高くなる可能性が指摘されている[11]. また, 牛血清の4℃保存並びに豚血清の4℃及び-20℃保存では, 血清LDH総活性の有意な低下が認められることから, これらの温度条件で保存された血清は, LDHの臨床的な検査の使用に不適であることが確認された.

以上のことから, ホルスタイン種と黒毛和種におけるLDH総活性とアイソザイムについては, 血清の-80℃保存に加えて, -20℃保存においても, 12カ月間ほぼ同様に安定する結果が得られた. 一方, 豚血清を保存する場合は, -80℃の冷凍保存が必要になることが示された.

LDH測定に際して, -20℃保存の牛血清を活用できるとすれば検査の汎用性が広がるため, 各種疾病の検査への活用が期待される.

引用文献

- [1] 友田 勇: 臨床血液化学検査の考え方(X) V. 血清酵素 4. 乳酸脱水素酵素(LDH), 日獣会誌, 32, 281-292 (1979)
- [2] 大場康寛: 乳酸脱水素酵素, 臨床病理学第5巻臨床化学, 大場康寛編, 第1版, 190-195. 医歯薬出版, 東京 (1993)
- [3] 松本裕一, 佐藤敦子, 穂積愛美, 大西英高, 壁谷昌彦, 菅原 克, 高石英俊: 黒毛和種繁殖牛にみられたトリパノソーマ病と地方病性牛白血病の混合発症例, 日獣会誌, 64, 941-945 (2011)
- [4] 高橋良平, 一色貞之, 林 昌利, 三保玄城, 中川 浩, 武隈俊和, 佐藤勝典: 黒毛和種子牛における白筋症の発生例, 日獣会誌, 37, 779-783 (1984)
- [5] Moss BW, McMurray CH: The effect of the duration and type of stress on some serum enzyme levels in pigs, Res Vet Sci, 26, 1-6 (1979)
- [6] 中村郁夫, 富田 博, 阿部美代子, 星 岩雄, 本多信直: 保存温度における血清総LDH活性値及びアイソザイムへの影響についての検討, 衛生検査, 32, 1131-1134 (1982)
- [7] 池田正二, 山岡貞雄, 渡辺博正, 亀谷 勉: 馬の血清酵素活性について, 日競研報, 12号, 22-29 (1975)
- [8] 押田敏雄, 大野 惇, 深沢美紀, 田中享一, 盛 信博: 豚血清乳酸脱水素酵素の測定に関する検討, 日豚会誌, 25, 21-28 (1988)
- [9] Tollersrud S: Stability of some serum enzymes in sheep, cattle, and swine during storage at different temperatures, Acta Vet Scand, 10, 359-371 (1969)

- [10] Spate MP, Burks MF, Evans PS, Tumbleson ME : enzyme activities in plasma and leukocytes in dairy and beef cattle, *J Vet Med Sci*, 65, 1241-1243 (2003)
- [11] Arai T, Inoue A, Takeguchi A, Mizutani H, Shimoo M, Sako T, Yoshimura I, Kimura N : Comparison of
- [12] Kaneko JJ : Blood analytes in large animals, *Clinical biochemistry of domestic animals*, Kaneko JJ eds, 4th ed, 888-889, Academic Press, San Diego (1989)

Stability of Serum Lactate Dehydrogenase Activity and Isozyme Pattern in Cattle Based on Storage Time and Temperature

Yuichi YOSHIDA¹⁾, Makoto NAKAMURA²⁾, Hiroshi SAWADA³⁾ and Shozo ARAI^{3)†}

- 1) *Hokubu Agricultural Technology Institute, Hyogo Prefectural Technology Center for Agriculture, Forest and Fishery, 123 Yasui, Wadayamacho, Asago, 669-5254, Japan*
- 2) *Kagoshima Central Livestock Hygiene Service Center, 1678 Yuda, Higashiichiki, Hioki, 899-2201, Japan*
- 3) *National Institute of Animal Health, National Agricultural and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*

SUMMARY

This study aimed to assess the stability of serum lactate dehydrogenase (LDH) activity and isozyme pattern based on storage time and temperature in cattle. Serum from Holstein and Japanese black cattle was stored at a variety of temperatures (4, -20 and -80 °C). We also examined the serum of swine (Yorkshire) as a control. In Holstein and Japanese black cattle, there were no significant differences in serum LDH activity and isozyme pattern for 12 months at -20 and -80 °C. On the other hand, LDH activity of stored serum at -20 °C in swine decreased significantly ($P < 0.05$) after 1 month. The M subunit ratio of LDH in swine serum was high compared with bovine serum. It was suggested that LDH activity and isozyme pattern using the bovine serum stored at -20 °C was stabilized for 12 months. — Key words : Bovine serum, LDH, storage temperature.

† Correspondence to : Shozo ARAI (*National Institute of Animal Health, National Agricultural and Food Research Organization*)

3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan

TEL · FAX 029-838-7795 E-mail : sarai@affrc.go.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 73, 101 ~ 105 (2020)