

鶏の血漿中Aspartate-、Alanine-aminotransferase系アミノ基転移酵素の活性測定法について

誌名	日本獣医学雑誌 = The Japanese journal of veterinary science
ISSN	00215295
巻/号	335
掲載ページ	p. 237-249
発行年月	1971年10月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



鶏の血漿中 Aspartate-, Alanine-aminotransferase 系アミノ基 転移酵素の活性測定法について

山田 一彦

大阪府立大学農学部家畜生理飼養学教室

(昭和45年9月2日受付)

動物組織中では、心筋、肝、腎、脳などに豊富に存在する Aspartate-aminotransferase (GOT), Alanine-aminotransferase (GPT) は、人の肝炎、心筋梗塞などの場合に特異的な高活性を示し、臨床酵素学的にも意義の深いことが知られている。^{1-4, 9-11, 24} しかし可逆性をもつといわれる^{17, 20, 26} これらのアミノ基転移酵素 (T-ase) の、鶏血漿中における動向や活性については、今日まで、その活性測定法とともに、十分には知られていない。

そこでこれら T-ase のうち、Aspartate (Asp.) と α -Ketoglutarate (α -KG.) を基質として、Glutamate (Glut.) と Oxaloacetate (Ox.) を産生する系を触媒する T-ase を Forward (F)-GOT と名づけ、その Reverse (R) 系 T-ase を R-GOT と名づけた。また Alanine (Ala.) と α -KG. を基質として、Glut. と Pyruvate (Py.) を産生する系の触媒 T-ase を F-GPT, その R 系 T-ase を R-GPT と名づけて分類し、Reitman-Frankel (R-F) 法²¹ の一部変法を用いて、それらの鶏血漿中活性を測定した。

A. F系 T-ase の活性測定条件

1. 活性測定の方法

活性の測定原理は、REITMAN & Frankel²¹, DECKER,⁶ SCHWARTZ²² らの 2,4-Dinitrophenyl-hydrazine による α -ケト酸の Hydrazone 化合物 ($=CO + H_2N \cdot NHC_6H_5 \rightarrow =C=N \cdot NHC_6H_5 + H_2O$) の直接定量法に準ずるものである。ここでは、産生される Ox., または Py. の Hydrazone 化合物の μ Moles (μ M) によって、活性を表現する方法をとった。^{12, 20-28}

2. 基質濃度と添加酵素液量

添加酵素液として、Arbor Acres 種、90 日令、平均体重 2.5 kg の雄の頸静脈血を採取し、血液

1 ml あたりに二重蒸酸塩 2 mg を添加した後、700×g, 20 分の遠沈操作によって分離した血漿を用いた。本血漿は pH 7.9±0.1, 総蛋白質量 (TP) 3.5±0.4 g/dl である。

基質として、L-Asp. または L-Ala. と、 α -KG. とを、それぞれ (a) 50 μ M: 0.5 μ M, (b) 100 μ M: 1 μ M, (c) 200 μ M: 2 μ M 秤量し、そのおのおのを 0.1 M 磷酸緩衝液 (PBS) に溶解して 100 ml とし、終末 pH を 7.4 に調整したものをを用いた、これらの各基質に、分離血漿 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 ml をそれぞれ添加し、R-F 原法の反応条件を用いて活性を測定した。その結果、F-GOT 活性の発現は、いずれの基質と血漿量との組み合わせの場合にも認められたが、しかし F-GPT は、基質 (c) と添加血漿量 0.4, もしくは 0.5 ml との組み合わせで、ようやく活性を示し、両者のうちでは、とくに 0.5 ml 添加例に活性が大であった。そこで基質 (c) を用い、さらに添加血漿量を 0.6~1 ml まで増量して活性を測定したところ、それらは 0.5 ml 添加例の活性とほぼ同じか、もしくはそれより若干小さくなることがわかった。このことから、この場合の測定条件によれば、鶏血漿中 F-GPT の最大活性は、基質 (c)、血漿 0.5 ml 添加の組み合わせによって、引き出し得るものと考えられた。

すなわち、これらの結果は、REITMAN and FRANKEL の測定原理、ならびにその利点を活用して鶏血漿中 F-GOT, F-GPT の活性を同時に測定するためには、いずれも基質 (c) を用い、添加血漿量を 0.5 ml とする方法が最適であることを示している。なおこの条件は、鶏の日令、性別、個体による血漿蛋白質の含量差などを顧慮せずに、いずれの場合にも適用できることが、その後確認された。²⁶⁻²⁸

3. GOT, GPT の F 系基質から置換産生される Ox. および Py. の定量.

F 系基質からの Ox. または Py. と、置換されずに基質中に残存する α -KG. とが、合計 $2\mu\text{M}$ 以内に一定の割合に含まれる 5 種の溶液を調製した。そしてこれらの溶液を用い、実際のアミノ基転移反応時に基質中に含有される α -KG. の置換が起こった場合、それとともなって生成される Ox., または Py. の産生量と吸光度との関係を検討した。この場合に調製した α -ケト酸溶液中の Ox. または Py. (μM) と、 α -KG. (μM) との含量比は、 $0/2$, $0.2/1.8$, $0.4/1.6$, $0.6/1.4$, $0.8/1.2$ である。この合計 $2\mu\text{M}$ の各 α -ケト酸溶液に、Aq.-dest. 0.5 ml をそれぞれ添加して、型のごとく反応させ、BECKMAN DU Spectrophotometer Model 2400 を用い、 $505\text{ m}\mu$ で比色した。

その結果、反応液中の Ox. または Py. と、 α -KG. との合計が $2\mu\text{M}$ で、両者の含量比が $0/2$

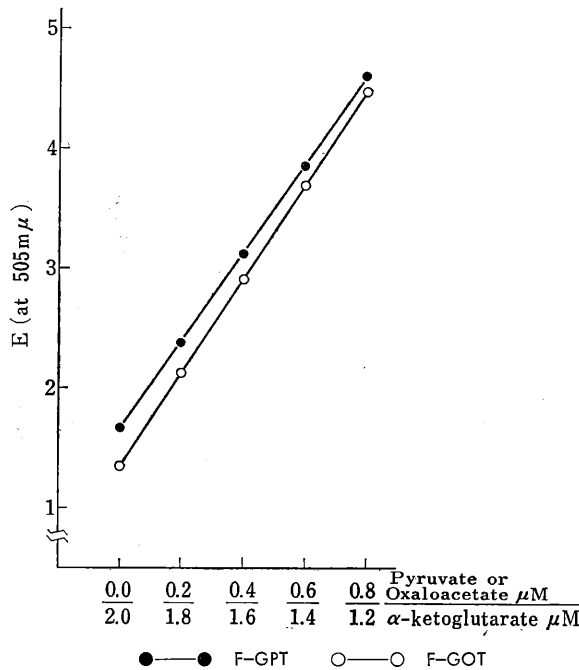
$\sim 0.8/1.2\mu\text{M}$ の範囲内では、Ox. または Py. の産生量に比例して、吸光度は増加し、常に直線関係を示すことを知った。このことは、血漿中 F-GOT, F-GPT によって置換産生される Ox. または Py. 量が、反応液中で $0.8\mu\text{M}$ 以上を示す場合は、一定比で血漿を希釈した後、活性を測定する操作が必要であることを示している。

なお、 $0.8\mu\text{M}$ 以下で、数段階に分けた同 μM 値の Ox., Py. を含む反応溶液で吸光度を比較したところ、Py. 含有液のそれは、Ox. 含有液より、常に、明らかに大であった。またこれらの関係については、 α -KG., Ox., Py. の各単一溶液を、それぞれ前述の要領で組み合わせ、反応させた場合にも同じ結果が得られている。

4. 基質 pH と活性との関係.

基質 (c) の pH を $6.8\sim 8.2$ 間で、 0.2 pH ずつの差で 8 段階に調整し、それらの各基質に、同一血漿試料を 0.5 ml ずつ添加し、基質 pH が

Fig. 1. Variation of Optical Density with Changes in the Content of Alpha-Ketoglutarate and Pyruvate or Oxaloacetate.



Remarks.

1. The optical density was determined at a wavelength of $505\text{ m}\mu$ with DU model 2400 Beckman spectrophotometer.
2. The result obtained is expressed by the mean of 40 experiments.

F-GOT, F-GPT 活性に与える影響を検討した。

その結果, F-GOT の Peak の活性は, 基質 pH 7.0~7.2 と 8.2 とに認められたが, 前者の活性は, 後者より明らかに大であった。これに対して F-GPT では, 基質 pH 7.2~7.4 と 7.8 とを Peak とする活性が認められたが, 前者の活性は後者より大で, F-GPT は, 強アルカリ側の基質に対しては, 著しく活性を減弱することが示された。

このように, F 系 T-ase の基質 pH 別の活性傾向は, pH 7.0~7.4 の弱アルカリ側において, いずれも著明な活性を示す点で共通しており, このうち F-GPT は, pH 7.2~7.4 に, F-GOT は, それよりわずかに弱アルカリ側の pH 7.0~7.2 に, それぞれかたよって活性を持っている。また F-GOT が, 弱酸側から強アルカリ側にかけて, 比較的広い範囲の基質に活性を示すのに対して, F-GPT は, 弱アルカリ側のかなり限定された pH の基質にのみ, 活性を発現することがわ

かる。

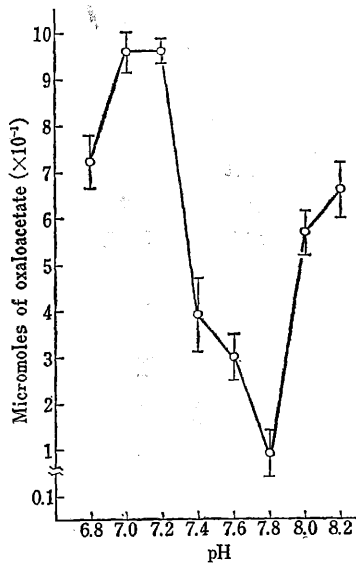
5. 反応至適温度と時間。

L 型アミノ酸 200 μ M および α -KG. 2 μ M を含む pH 7.2 の基質 F-GOT と, pH 7.4 の基質 F-GPT に, それぞれ 0.5 ml の血漿を添加し, 反応を進行させるために適当な, 温度条件と活性経過を経時的に検討した。温度条件として, 5~15°C 間を 5°C 間隔で, 20~50°C 間を 10°C 間隔で, 計 7 段階に区分した。反応時間については, 10 分間隔で 60 分を 6 段階に分け, それぞれの組み合わせの場合において, 両 T-ase の活性を測定した。

その結果, F-GOT の場合, 5~15°C 間では反応は進行しないが, 20~50°C 間ではいずれも反応が進行し, しかも経時的に活性の漸増が認められた。この時の各温度条件下の活性序列は, 50 > 40 > 30 > 20°C であった。このことは, F-GOT は高温下で反応をすすめるほど, 高い活性を表わすことを示している。これに対して, F-GPT の

Fig. 2 (A and B). Optimum pH Value of Substrate for Transamination Reaction.

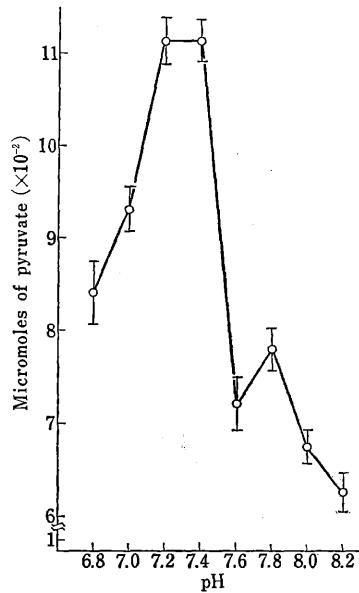
(A) A Case with F-GOT.



Remarks.

1. The substrate used contained 200 μ M of L-aspartate and 2 μ M of alpha-ketoglutarate.
2. The result obtained is expressed by the mean of 80 chickens (male, 3 months old).
3. The vertical bars indicate standard deviations.

(B) A Case with F-GPT.

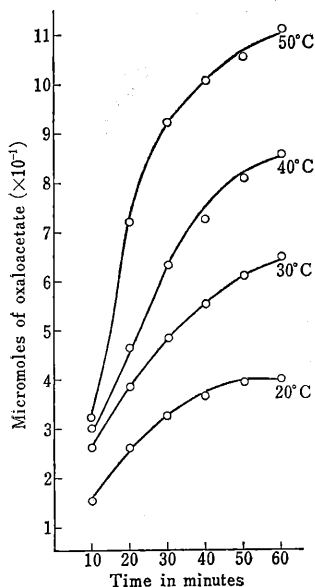


Remarks.

1. The substrate used contained 200 μ M of L-alanine and 2 μ M of alpha-ketoglutarate.
2. See items 2 and 3 of the remarks of Fig. 2 (A).

Fig. 3 (A and B). Variation of Activity with Changes in Temperature.

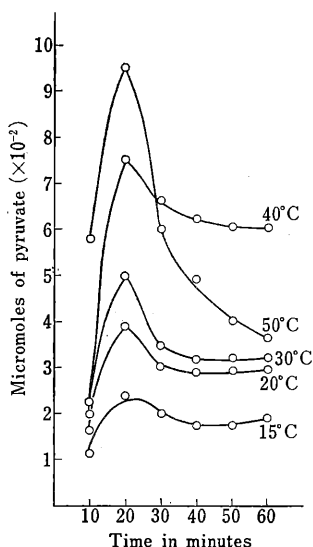
(A) A Case with F-GOT.



Remarks.

1. The substrate used contained 200 μM of L-aspartate and 2 μM of alpha-ketoglutarate.
2. The result obtained is expressed by the mean of 40 chickens (male, 3 months old).

(B) A Case with F-GPT.



Remarks.

1. The substrate used contained 200 μM of L-alanine and 2 μM of alpha-ketoglutarate.
2. See item 2 of the remarks of Fig. 3 (A).

場合は、5~10°C 間では反応がまったく進行しないが、その他の温度条件では、反応開始後20分経過時には活性が最高となった。この時の活性序列は、50>40>30>20>15°C の順である。しかしその後は、40°C 下の反応例を除き、失活傾向が著明である。

このように、鶏血漿中の F-GPT は、F-GOT の場合と比較して、明らかに異なる反応経過をたどることを知った。

以上の結果を参照し、F 系両 T-ase の活性測定のためには、反応実施温度を 40°C、反応時間は F-GOT を 60 分、F-GPT を 20 分と規定した。

6. 活性の経日変化。

鶏血漿を 4°C と 25°C 下で、1, 3, 5, 7, 10 および 15 日間静置し、それぞれの場合にみられる F 系両 T-ase の失活傾向を検討した。その結果、F-GOT は、いずれの温度の場合にも、放置 7 日目までは、活性に著変が認められなかったが、10~15 日以後はまったく失活した。これに対して、

F-GPT は、4°C では 5 日間、25°C 下では 24 時間、採取直後の血漿と同程度の活性を維持し、著しい差は認められなかったが、以後はまったく失活した。

7. 血漿および血清中の F 系両 T-ase の活性比較。

これらの活性には、差が認められない。

B. R 系 T-ase の活性測定条件

1. 活性測定の方法。

R 系 T-ase の活性測定に際しては、GOT、GPT の反応系が完全に可逆的である場合^{17,20,25)}を想定して、基質成分以外は、まったく対応する F 系 T-ase の活性測定条件に一致させた。

R-GOT 用基質としては、L-Glut. 200 μM および Ox. 2 μM を、0.1 M PBS 中に溶解して 100 ml とし、終末 pH を 7.2 に調整したものを用了。また R-GPT 用基質として、L-Glut. 200 μM および Py. 2 μM を、同じく 0.1 M PBS

中に溶解して 100 ml とし、終末 pH を 7.4 に調整したものをを用いた。この場合の R 系 T-ase の活性は、これらの基質から置換産生される α -KG. の Hydrzone 化合物の直接定量値 (μ M) をもって表現した。

2. GOT, GPT の R 系基質から置換産生される α -KG. の定量。

A-3 項における同じ要領で、 α -KG. 単一溶液と、Ox. または Py. を含む R 系基質を用いて、合計 2μ M の α -ケト酸を一定比で含む 9 種類の溶液を調製して、それぞれ反応させた。その結果、合計 2μ M の α -ケト酸中、Ox. または Py. が $2 \sim 1.2 \mu$ M に減少し、その差に相当する $0 \sim 0.8 \mu$ M の α -KG. が産生される場合、その反応液の吸光度は直線的に減少した。また R-GPT 基質から産生される α -KG. を含む反応液の吸光度は、R-GOT 基質から産生される、同じく α -KG. を含む反応液の吸光度より、常に大であった。これはまた Ox. または Py. の各単一溶液に、一定比で α -KG. 単一溶液を配して、同じ方法で吸光度

を測定した場合にも、まったく同様の結果を得ることができた。

これらのことは、R-F 法の一部変法を用いて、鶏血漿中 R 系 T-ase の活性を測定するためには、基質からの α -KG. 置換産生量を 0.8μ M 以内におさえる操作が必要であることを示している。

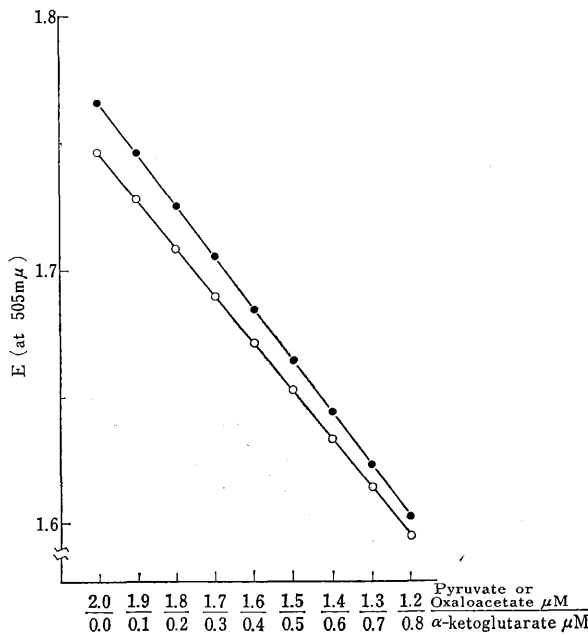
C. 鶏の血漿中 GOT, GPT の F, R 系 T-ase の活性測定

3 カ月令ヒナと 12 カ月令成鶏の各雄、雌から採取した血漿中の T-ase 活性を、活性表現上の問題点を吟味するために、次の二つの単位を用いて検討した。

1. 血漿 0.5 ml あたりの T-ase 活性。
 - a. 月令と活性との関係。

GOT の F, R 系 Tase の活性関係を、各産生 α -ケト酸の μ M で比較すると、ヒナ、成鶏とも、常に F-GOT > R-GOT である。ヒナおよび成鶏の各 F-GOT, R-GOT 活性値間には、著しい差

Fig. 4. Variation of Optical Density with Changes in the Content of Alpha-ketoglutarate and Pyruvate or Oxaloacetate.



Remarks.

1. See item 1 of the remarks of Fig. 1.
2. The result obtained is expressed by the mean of 40 experiments.

Table I (A and B). Some Relationships between Transaminase Activity and Difference in Age or Sex

(A) Transaminase Activity per 0.5 ml of Blood Plasma.

Transaminase	Chicks		Adult chickens	
	Male	Female	Male	Female
F-GOT	10.95±0.67	12.08±0.65	10.85±0.55	9.67±0.62
R-GOT	2.32±0.71	1.27±0.52	2.72±0.37	1.12±0.39
F-GPT	1.52±0.35	1.57±0.37	0.82±0.40	0.42±0.21
R-GPT	3.65±0.37	3.35±0.42	1.35±0.33	1.32±0.37

Remarks.

- The transaminase activity is expressed by the amount of hydrazone extracts of alpha-ketonic acid.
- The results obtained are expressed by the means and standard deviations of the following experiments.
 - Chicks
Male: 45 experiments.
Female: 45 experiments.
 - Adult chickens
Male: 50 experiments.
Female: 50 experiments.

(B) Transaminase Activity per mg of Protein N of Blood Plasma.

Transaminase	Chicks		Adult chickens	
	Male	Female	Male	Female
F-GOT	391.14 ±26.08	401.13 ±20.06	328.21 ±14.27	277.42 ±15.41
R-GOT	83.39 ±23.83	42.20 ±21.10	82.91 ±11.84	32.29 ±10.09
F-GPT	53.29 ±10.66	53.77 ±15.36	20.55 ±10.27	14.57 ±7.29
R-GPT	133.21 ±13.32	109.03 ±15.36	40.30 ±10.08	39.71 ±12.03

Remark.

See the remarks of Table I (A).

が認められない。

これに対して、GPTのF、R系T-aseの活性関係は、常にF-GPT<R-GPTのごとくで、この傾向は、ヒナ、成鶏に共通している。F-GPT、R-GPTそれぞれの活性は、ヒナ>成鶏の関係にある。

b. 性別と活性との関係。

ヒナのF-GOT活性は、明らかに雄>雌であるが、F-GPT活性は、雄≧雌の傾向にある。

これに対してR-GOTおよびR-GPTは、ともに雄>雌の活性関係を示す。このように、F系両T-aseがおおむね雄<雌の関係にあったのと比べて、R系両T-aseでは反対の傾向が認められる。

成鶏におけるGOTのF、R系T-aseは、いずれも明らかに雄>雌、GPTのF、R系T-aseは、いずれも雄≧雌の活性関係を示す。

以上のごとく、月令別または性別上認められる血漿TPの差を考慮せずに、血漿0.5mlを単位として、各T-ase活性を表現するとき、その活性は、おおむね、雄>雌の関係にある。

2. 血漿蛋白質N1mgあたりのT-ase活性。

a. 月令と活性との関係。

GOTのF、R系T-aseは、月令とは無関係に、F-GOT>R-GOTの活性関係を示した。これはC-1-a項で述べた0.5ml血漿量を単位とした場合の傾向と同じである。このように、活性値がきわめて高い場合には、単位のとり方のいかんを

問わずその傾向は一致することがわかる。

また F-GOT および R-GOT は、ともにヒナ > 成鶏の活性関係を示した。これは、C-1-a 項の場合にはヒナ、成鶏間で差が認められなかった点と比べて違っている。

これに対して、GPT の F, R 系 T-ase が、F-GPT < R-GPT の活性関係にあることは、ヒナおよび成鶏に共通している。また F-GPT および R-GPT が、いずれもヒナ > 成鶏の活性関係にある点は、C-1-a 項の場合と一致する傾向である。

b. 性別と活性との関係。

ヒナの F-GOT 活性は、雄 ≤ 雌で表現される。これは、C-1-b 項の場合に明らかに雄 > 雌として示された関係とは違っている。しかし F-GPT 活性は雄 ≤ 雌で、この点に関しては傾向が一致している。GOT, GPT の R 系 T-ase の雄 > 雌の活性関係は、C-1-b 項の場合と同じである。

成鶏の GOT の F, R 系 T-ase と F-GPT は、明らかに雄 > 雌で、R-GPT のみが雄 ≤ 雌の活性関係を示す。これは C-1-b 項の場合と、少し異なっている。

以上のように、血漿蛋白質 N の一定量を単位として活性を表現するとき、ヒナの F 系 T-ase が、一般に雄 ≤ 雌の活性関係にあるのに対して、R 系 T-ase は明らかに雄 > 雌の関係を示している。

成鶏では、GOT および GPT の F, R 系 T-ase の各活性は、いずれも雄 > 雌の関係によって示される。

考 察

血清中 T-ase の活性測定のために、KARMEN (K) 法¹⁴⁾ とともに、今日広く利用されている R-F 法の基本原理は、基質から置換産生される α -ケト酸の Hydrazone 化合物を直接定量し、その μ M を K 単位に換算して活性を表現するもので、したがってこの R-F 法によれば K 法との比較上、その結果の解釈に便利であり、またこの方法では反応が確実で、最終産物の Hydrazone 化合物が安定していることから、測定値の精度や、再現性の点でも K 法に匹敵するといわれ、操作の簡便なこともあって、血清中 T-ase の活性測定のために、この方法は最良のものと考えられている。²⁾ し

かしながら、人の血清中 T-ase の活性測定においては賞用される本方法も、原法そのままを、人以外の哺乳動物や、本報告でとりあげた鶏の血漿中 T-ase の活性測定に応用した場合、常に再現性の高い結果が得られるかどうかははなはだ疑問であるといわなければならない。それは、動物の種属差によって、T-ase の臓器特異性や蛋白質化学的性質の特殊性の存在^{3,4)} などが考えられるためであるが、しかし、ここでは、これらの事柄とは別に、鶏の血漿中 T-ase 活性の測定に適した実験条件と、分類上 4 種の GOT, GPT の F, R 系 T-ase の活性表現上の問題点を中心に、考察してみる。

実験結果の各項でも述べたように、活性の低い鶏血漿中 F-GPT は、添加血漿量を増加することにより、その活性を R-F の基本原理 (A-1 項) の応用によって測定することが可能であり (A-2 項)、また F-GOT 活性、F-GPT 活性の同時測定においても、この手段は、活性値の再現性 (A-3 項) からも、十分価値のあることが証明されている。またこの方法は、基質のわずかな pH 変動に対しても影響を受ける血漿中 T-ase の活性関係を指示する (A-4 項) ことも可能である。さらに F-GOT では、比較的高温下で活性反応が維持されるのに対して、F-GPT では、かなり制限された温度条件下で、反応の発現と失活の経過を示す (A-5 項) 点の確認においても、有用であった。また T-ase の安定性の点でも、KARMEN らなど^{13,14,16)} の人での結果とかなり異なった性質をもっている点 (A-6, 7 項) を示すことが可能である。

しかしながら、このように鶏血漿中 T-ase の活性測定が、R-F 法の一部変法によって可能であるとしても、添加酵素量の量的修正のもたらす活性表現上の問題点が、改めてここに提起されてくる。また血漿中 T-ase の活性部分が、蛋白質部分にあると考えてみると、蛋白質含量において、人その他の哺乳動物と比較して大きな相違がある鶏血漿^{7,23)} 中 T-ase 活性の K 単位/血漿 ml の表現にも、疑問が感じられる。

人血清中 T-ase の活性表現に一般に用いられている K 単位は、R-F 値からも、K 単位換算表¹²⁾ の利用によって、その数値を出すことができ、これは、K 法で直接得られる値に一致すると

いわれ、研究者の大部分が、この方法による K 単位を活性として報告している。しかし鶏の場合には、R-F 法を一部改変する必要性から、その時得られる値を K 単位に換算して表現するためには、その前に、R-F 法で指示されている添加血漿相当量に、換算し得るかどうかを考えなければならない。この点、F-GOT の場合は、0.1~0.5 ml への血漿増量と、活性の増加は直線的であることや、また 0.5 ml 活性値を、0.2 ml の場合に換算して得られる活性値と、0.2 ml 血漿中 F-GOT 活性の直接測定値とは、まったく一致する²⁶⁻²⁸⁾などのことから、鶏血漿中 F-GOT の K 単位表現に矛盾はないと考えてよい。しかし F-GOT の場合は、R-F 法規定の 0.2 ml の血漿量の添加では活性の測定ができないことから、F-GOT の場合にならって、0.5 ml 活性値を 0.2 ml のそれに換算し、K 単位として表現する方法をとることは当然できない。さらにまた R-F 値の K 単位換算表は、F-GOT による Ox. および F-GPT による Py. の各 Hydrazone 化合物の量的変動を、K 単位で表現し得るように作られているものであるところから、著者が、R 系 T-ase の活性を示すために定量した α -KG. の Hydrazone 化合物の量的変動を K 単位に換算して表現することも、また当然できない。さらにまた、これら鶏血漿中 F, R 系 T-ase の活性関係には、相互に補償的な傾向が認められる²⁶⁻²⁸⁾ことから、F 系または R 系 T-ase のいずれかの活性値で、鶏血漿中におけるこれらの T-ase の動向を全面的に判定することも、勿論できない。

このように、鶏の場合、血漿中 F-GPT と R 系両 T-ase の活性を K 単位で表現することにはいくつかの問題点があるが、ここでは、F-GOT 活性の K 単位表現と対比する意味で、計算上得られる F-GPT の K 単位を記載してみると、次のとおりである。なお、他動物との比較のために、血漿 0.5 ml を実際に用いて活性を測定し、K 単位に換算したラットおよび犬の場合の値をあげ、他の報告者の K 単位とも比較してみた。

1. 鶏血漿中 F-GOT, F-GPT 活性の K 単位による表現。

以下、数字は、鶏血漿 0.2 ml 使用時に産生されると考えられる α -ケト酸 1 μ M から換算さ

れる K 単位を、かっこ内の数字は、血漿蛋白質 N 1 mg あたりの K 単位を、それぞれ示している。

(a) ヒナ (3 カ月令; TP, 雄 3.5 ± 0.5 g/dl, 雌 3.8 ± 0.5 g/dl)。

(i) 雄: F-GOT 69.35 ± 4.62 (61875.20 ± 4125.01)
F-GPT 12.05 ± 2.40 (10714.32 ± 2142.86)
F-GOT/F-GPT 比 5.76

(ii) 雌: F-GOT 76.22 ± 3.81 (62975.49 ± 3148.77)
F-GPT 12.95 ± 3.69 (10661.21 ± 3046.06)
F-GOT/F-GPT 比 5.89

(b) 成鶏 (12 カ月令; TP, 雄 4.2 ± 0.5 g/dl, 雌 4.4 ± 0.6 g/dl)。

(i) 雄: F-GOT 68.64 ± 2.98 (51578.97 ± 2242.56)
F-GPT 5.55 ± 2.75 (4135.34 ± 2067.67)
F-GOT/F-GPT 比 12.37

(ii) 雌: F-GOT 61.12 ± 3.39 (31494.61 ± 1749.70)
F-GPT 4.11 ± 2.05 (2113.39 ± 1056.69)
F-GOT/F-GPT 比 14.87

2. 著者法で得られたラットおよび犬の血漿中 T-ase の活性。

(a) ラット (雄; TP, 6.0 ± 0.2 g/dl)
F-GOT 80.54 ± 8.05 (42367.96 ± 2824.53)
F-GPT 54.95 ± 10.98 (28894.42 ± 1444.72)
F-GOT/F-GPT 比 1.47

(b) 犬 (雄; TP, 7.2 ± 0.3 g/dl)
F-GOT 24.05 ± 1.60 (10434.72 ± 1052.45)
F-GPT 11.42 ± 0.57 (4956.49 ± 991.30)
F-GOT/F-GPT 比 2.11

ここで鶏と、ラットおよび犬との活性傾向を、F-GOT/F-GPT 比から比較してみると、鶏では、ヒナ 5.8~5.9, 成鶏 12.4~14.9 で、ラットでは 1.5, 犬では 2.1 である。これらからも明らかのように、両 T-ase の活性が、常に F-GOT > F-GPT である傾向は、三者に共通している。しか

し、このうち、鶏の F-GOT/F-GPT 比は、ヒナ、成鶏とも、ラットや犬よりはるかに大きい。これは、鶏血漿中の F-GOT 活性は、ラットの約 0.9 倍であるが、犬と比較すると約 3 倍に相当するのに対して、鶏の F-GPT 活性は、ラットおよび犬に対して、それぞれ約 1/15, 約 1/4 の活性を持つにすぎないことから明らかなように、鶏では、F-GOT 活性に比べて、F-GPT 活性が著しく低いことによるものである。

3. 他の報告例にみられる人その他の哺乳動物の T-ase 活性との比較。

(a) 人。

黒田ら¹⁵⁾は、2,4-Dinitrophenylhydrazine による比色定量法と、黒田のガラス毛细管法とを組み合わせ、血清および血球中 T-ase の微量測定法を案出し、この方法で得た人血清中 F-GOT 活性は 141.0 ± 39.7 単位/g 血清、F-GPT 活性は 140 ± 51.1 単位/g 血清であると報告している。そこで、これを人血清の比重を 1.0265 とし⁸⁾、単位としている“g 血清”を ml 血清に換算し、R-F 法の場合の K 表を用いて、K 単位を求めてみると、血清 F-GOT は 28.2 ± 7.9 、F-GPT は 28.0 ± 10.2 単位に相当する。これは、そのほか、LA DUE & WROBLEWSKI¹⁶⁾ の F-GOT 5~40 単位 (平均 22 ± 7 単位)、F-GPT 5~35 単位 (平均 16 ± 9 単位)、原田ら⁹⁻¹¹⁾ の F-GOT 6~23 単位 (平均 14 ± 4 単位)、F-GPT 3~9 単位 (平均 6 ± 2 単位)、および小川ら¹⁹⁾ の F-GOT 8~40 単位、F-GPT 5~35 単位という報告値ともほぼ一致している。これらの結果から、人の血清中 F-GOT は、おおむね 10~40 単位、F-GPT は 5~35 単位と考えられ、F-GOT/F-GPT 比は 1.1~2.0 にあると思われる。

(b) 馬その他の哺乳動物の T-ase 活性。

- (i) 馬 (F-GOT 16.5 ± 33.8 ,⁵⁾ 140~200¹⁹⁾
F-GPT 11.0 ± 3.8 ,⁵⁾ 1~4)¹⁹⁾
- (ii) 牛 (F-GOT 43.8 ± 5.7 (牝)⁵⁾, 23.6 ± 3.7 (犏)⁵⁾
F-GPT 19.7 ± 1.26 (牝),⁵⁾ 7.8 ± 3.2 (犏)⁵⁾)
- (iii) 豚 (F-GOT 31.1 ± 14.1 ,⁵⁾ 53.06 ± 16.92 ¹⁸⁾
F-GPT 27.3 ± 7.8 ,⁵⁾ 30.34 ± 6.80)¹⁸⁾

- (iv) 犬 (F-GOT 22.7 ± 5.4 ,⁵⁾ 10~40¹⁹⁾
F-GPT 21.8 ± 6.2 ,⁵⁾ 7~40)¹⁹⁾
- (v) 家兎 (F-GOT 20~70,¹⁹⁾ F-GPT 20~70)¹⁹⁾
- (vi) モルモット
(F-GOT 30~100,¹⁹⁾ F-GPT 10~50)¹⁹⁾
- (vii) ラット
(F-GOT 106,^{2,9-11)} F-GPT 47^{2,9-11)})

ここでこれらの各哺乳動物での報告値と、著者がヒナおよび成鶏で得た血漿中 T-ase の活性値とを比較し、その関係をもとめてみると次のとおりである。すなわち、F-GOT > F-GPT の活性関係は、人、その他の哺乳動物、鶏のいずれにも共通した傾向として認められる。鶏の血漿中 F-GOT の 61~76 単位は、家兎、モルモット、ラットとはほぼ同じ値を示すが、馬以外の牛、豚、犬などよりは、やや高い活性値を持つことがわかる。

一方、鶏血漿中 F-GPT 活性は、ヒナがほぼ 12 単位で、これは、さきに記載した動物のうちでは、馬、犬、モルモットと活性値が似通っている。これに対して成鶏の F-GPT は、ヒナよりさらに低い 4~6 単位の活性を示すのみで、引用例中でも最も低い範囲にはいる活性しか持っていないことがわかる。このことは、F-GOT/F-GPT 比の比較からも明らかで、人^{2,10,11,15,16,19)} (1.01, 1.38, 2.33, 1.14~1.60)、馬^{5,19)} (15, 50~140)、牛⁵⁾ (牝 2.22, 犏 3.03)、豚^{5,18)} (1.14, 1.75)、犬^{5,19)} (1.04, 1~1.43, 2.11)、家兎¹⁹⁾ (1)、モルモット¹⁹⁾ (2~3)、ラット^{2,9-11)} (2.26, 1.47)、鶏²⁰⁻²⁸⁾ (ヒナ 5.8~5.9, 成鶏 12.4~14.9) などのように、大部分の動物の血清または血漿中 F-GOT/F-GPT 比は 1~3 の範囲にある。これに対して、例外的に、馬および鶏の比率は非常に大きく、他の動物と異なっていることが示されている。しかし F-GOT/F-GPT 比の大きい馬や鶏も、F-GOT、F-GPT それぞれの活性単位には、かなりの差があり、たとえば、馬の血清中 F-GOT は、他の動物と比べて著しく高い。これに対して F-GPT は、豚や家兎には及ばないが、その他の牛、ラット、犬とはほぼ同じ活性を持っている。このように F-GOT/F-GPT の比率が高い原因は、馬の場合には、F-GOT の著しい高活性にあるといつてよい。

一方、鶏の血漿中 F-GOT は、家兎、モルモット、豚と同程度で、比較的高い活性を持っているが、しかし対応する F-GPT は、他の動物と比較して、著しく活性が近い。そのために、この相互関係が、F-GOT/F-GPT 比にみられる高い数値の原因になっているものと考えられる。

以上、(1)、(2)、(3) で述べてきたように、各動物間は勿論、同一種属の動物の T-ase 活性でも、各報告者によって相違が認められるにもかかわらず、これらの動物種属間の活性比較を、単に K 単位のみによって表現することが、はたして妥当なのかという点は、本考察において、常につきまとう疑問であった。その理由は、活性測定のための実験条件にいくぶん相違はあっても、同一術式に準拠して、ほぼ同じ操作が実施されているものと考えてみると、もし問題となる点があるとするれば、これらの報告が、蛋白質含量の異なる血清、または血漿を用いながら、すべてをその ml 当たりの活性で表現する方法をとっている点にあると考えるためである。とくに鶏血漿試料の特殊性から、これを測定対象とする場合には、さきに述べた理由から、R-F 原法、またはその変法のいずれを用いるにしても、一定の血漿蛋白質量あたりで置換産生される α -ケト酸の μM で、直接的に活性を表現する手段をとり、各 T-ase の活性範囲を明確にすべきであると考えられる。

要 約

A. 鶏血漿中 Aspartate-および alanine-amino-transferase (GOT および GPT とそれぞれ略記する) の Forward (F), Reverse (R) 系 T-ase の活性は、REITMAN & FRANKEL (R-F) 変法によって、測定することができる。

B. 鶏血漿中 GOT, GPT の F, R 系 Transaminase (T-ase) 活性を、産生 α -ケト酸の Hydrazone 化合物量で比較してみると、F-GOT > R-GOT, F-GPT < R-GPT の関係にある。これら F, R 系 T-ase の活性は、相互に補償的で、これは日令や性別とは無関係に、鶏に共通する傾向である。

これら 4 種の T-ase の活性序列を、用いた血漿の蛋白質量を単位として比較すると、一般に F-GOT > R-GPT \geq R-GOT > F-GPT である場合

が多い。

また、本報告で用いた 3 カ月令ヒナ、および 12 カ月令成鶏の、各血漿中、4 種の T-ase 活性を、同じく、その蛋白質 N 量を単位として比較すると、いずれの T-ase 活性も、ヒナ > 成鶏の関係を示す。

さらに、性別上から活性関係を比べてみると、ヒナの場合には、GOT, GPT の F 系 T-ase は、雄 \leq 雌であるが、R 系 T-ase は明らかに雄 > 雌である。これに対して成鶏の場合には、F, R 系 T-ase はともに雄 > 雌である。

C. 本報告で用いた 3 カ月令ヒナおよび 12 カ月令成鶏の F-GOT/F-GPT 比は、ヒナの雄 7.34 ± 0.82 , 雌 7.46 ± 1.37 , 成鶏の雄 15.97 ± 4.86 , 雌 19.04 ± 5.64 である。これに対応する R-GOT/R-GPT 比は、ヒナの雄 0.63 ± 0.10 , 雌 0.39 ± 0.12 , 成鶏の雄 2.06 ± 0.18 , 雌 0.81 ± 0.01 である。

文 献

- 1) 赤堀, 水島(編) (1957): 蛋白質化学, 3, 527~528 頁. 東京, 共立出版.
- 2) 赤堀, 水島(編) (1961): 酵素研究法, 4, 733~740 頁. 東京, 朝倉書店.
- 3) 赤堀(監) (1966): 酵素ハンドブック, 274~277 頁. 東京, 朝倉書店.
- 4) 赤堀(監) (1966): 酵素ハンドブック, 583~584 頁. 東京, 朝倉書店.
- 5) CORNELIUS, C. E. and KANEKO, J. J. (1963): In Clinical Biochemistry of Domestic Animals. New York and London, Academic Press, Inc.
- 6) DECKER, L. E. and RAU, E. M. (1963): Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 112, 144~149.
- 7) ERLENBACH, F. (1938): Z. Vgl. Physiol., 26, 121~122.
- 8) 藤井, 操 (1953): 臨床医学検査法 (上), 235~239 頁. 東京, 南山堂.
- 9) 原田 (1958): 日消病誌, 55, 591~593.
- 10) 原田, 常岡, 青柳 (1958): 内科, 1, 825~839.
- 11) 原田, 常岡 (1958): 最新医学, 13, 191~204.
- 12) 金井 (1964): 臨床検査法提要改訂増補 21~23 版, VII, 71~74 頁. 東京, 金原出版.
- 13) KARMEN, A., WROBLEWSKI, F. and LA DUE, J. S. (1955): J. Clin. Invest., 34, 126~129.

- 14) KARMEN, A. (1955): *J. Clin. Invest.*, **34**, 131~132.
- 15) 黒田, 吉川, 中尾, 脇坂(編)(1963): 血液化学, 130~131 頁. 東京, 朝倉書店.
- 16) LA DUE, J.S. and WROBLEWSKI, F. (1955): *Circulation*, **11**, 871~874.
- 17) MEISTER, A. (1962): *Enzymes*, **6**, 193.
- 18) 野田(周), 堀江, 野村, 大西, 秋山, 野田(亮) (1968): 日獣会誌, **21**, 150~152.
- 19) 小川, 杉山, 真鍋, 藤田, 古泉, 深野 (1969): 日獣誌, **61** 回講演要旨, p. 61.
- 20) RADHAKRISHNAN, A.N. and MEISTER, A. (1957): *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 5828~5832.
- 21) REITMAN, S. and FRANKEL, S. (1957): *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**, 56~63.
- 22) SCHWARTZ, M.K., NISSELBAUM, J.S. and BODANSKY, O. (1963): *Am. J. Clin. Pathol.*, **40**, 103~109.
- 23) 島尾, 紺野(編)(1965): 生化学データ, 398 頁. 東京, 医学書院.
- 24) 上田, 太田, 原田 (1964): 臨床酵素学, 411 頁. 東京, 朝倉書店.
- 25) WOOD, J.L., COOLEY, S.L. and KELLY, I.M. (1950): *J. Biol. Chem.*, **186**, 64~66.
- 26) 山田 (1967): 日獣学会誌(学会号), **29**, 136.
- 27) 山田 (1968): 日獣学会誌(学会号), **30**, 38~39.
- 28) 山田 (1969): *Bull. Univ. Osaka Pref.*, **21**, Series B, 343~345.

METHODS FOR ESTIMATION OF ASPARTATE AND ALANINE-AMINOTRANSFERASE ACTIVITIES IN FOWL BLOOD PLASMA AND THEIR APPLICATION

Kazuhiko YAMADA

*Department of Animal Physiology and Feeding, College of Agriculture,
University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka*

(Received for Publication September 2, 1970)

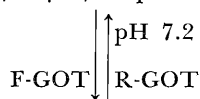
In man, the presence of aspartate-aminotransferase (GOT) and alanine-aminotransferase (GPT), which are commonly known as the transaminases, is valued as a clue for the rapid diagnosis of myocarditis and hepatitis. The reversible transamination reactions by these transaminases, generally known in the replacement of $=C=O$ with NH_2 , are essential for the utilization of nitrogen in living materials.

So far as the author is aware, no detailed investigations have been conducted on the activities of GOT and GPT which are contained in the fowl blood plasma.

For the purpose of studying this problem, the author tried to classify the above-mentioned transaminases into categories bearing such terms as forward-GOT (F-GOT), reverse-GOT (R-GOT), forward-GPT (F-GPT), and reverse-GPT (R-GPT). Their activities were estimated by the author's method, which was the same in principle as that reported by REITMAN and FRANKEL.

The systems which are catalyzed by these transaminases are as follows.

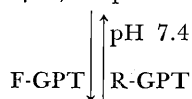
(A) L-Aspartate (200 μ M) + alpha-Ketoglutarate (2 μ M)



L-Glutamate (200 μ M) + Oxaloacetate (2 μ M)

pH 7.2

(B) L-Alanine (200 μ M) + alpha-Ketoglutarate (2 μ M)

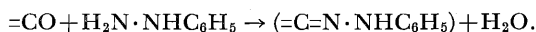


L-Glutamate (200 μ M) + Pyruvate (2 μ M)

pH 7.4

I. Method for estimating the activity.

In REITMAN and FRANKEL's method modified by the author, the activities are expressed as the amounts of hydrazone extracts of alpha-ketonic acids which have been produced with 2,4-dinitrophenylhydrazine. The structural formula of this extract is:



In the determination of the transaminase activity, the above-mentioned substrate modified by the addition of 0.5 ml of fowl blood plasma was used.

Hydrazone extracts which were produced 20 minutes (F-GPT and R-GPT) and 60 minutes (F-GOT and R-GOT) after materials were placed in a water bath maintained at 40°C, were scanned spectrophotometrically at 505 $m\mu$ by means of BECKMAN model DU spectrophotometer.

II. Transaminase activity per mg of protein N of blood plasma.

A. Decreasing order of transaminase activity.

(1) Chickens 3 months old.

(a) Male: F-GOT > R-GPT > R-GOT > F-GPT

(b) Female: F-GOT > R-GPT > R-GOT \geq F-GPT

(2) Chickens 12 months old.

(a) Male: F-GOT > R-GOT > R-GPT > F-GPT

(b) Female: F-GOT > R-GPT \geq R-GOT > F-GPT

B. Relationship between transaminase activity and difference in age or sex.

(1) Chickens 3 months old.

(a) F-GOT: male \leq female

(b) R-GOT: male > female

(c) F-GPT: male \leq female

(d) R-GPT: male \geq female

(2) Chickens 12 months old.

(a) F-GOT: male > female

(b) R-GOT: male > female

(c) F-GPT: male > female

(d) R-GPT: male \geq female

C. GOT/GPT ratio of fowl blood plasma.

(1) F-GOT/F-GPT ratio.

(a) Chickens 3 months old.

(i) Male: 7.34 ± 0.82

- (ii) Female: 7.46 ± 1.37
- (b) Chickens 12 months old.
 - (i) Male: 15.97 ± 4.86
 - (ii) Female: 19.04 ± 5.64
- (2) R-GOT/R-GPT ratio.
 - (a) Chickens 3 months old.
 - (i) Male: 0.63 ± 0.10
 - (ii) Female: 0.39 ± 0.12
 - (b) Chickens 12 months old.
 - (i) Male: 2.06 ± 0.18
 - (ii) Female: 0.81 ± 0.01