

牛の血清LDHおよびそのアイソザイムの変動と測定試料の保存条件について

誌名	畜産試験場研究報告 = Bulletin of the National Institute of Animal Industry
ISSN	0077488X
著者	秋田, 富士 渡辺, 昭三
巻/号	48号
掲載ページ	p. 17-27
発行年月	1988年10月

牛の血清LDH およびそのアイソザイムの変動と 測定試料の保存条件について

秋田富士・渡辺昭三

要 約

牛の血清 LDH 活性測定に及ぼす試料の保存条件の影響については、かなり早くから報告されているが、酵素の安定性に関する成績には不一致な点が多くみられる。牛の血清 LDH 活性及びアイソザイムパターン測定に適する保存法を確立するため、室温 (20~25°C)、冷蔵 (4°C) 及び凍結 (-20°C) の3条件で試料を保存して、LDH 活性及びアイソザイムパターンの安定性を検討した。凍結保存が LDH 活性を最もよく保ったが、保存2週間後には有意 ($P < 0.05$) な活性低下が確認された。室温保存では保存第1週の後半に LDH 活性が有意の上昇を示し、その後急激な減少に移った。冷蔵保存では保存開始直後から活性が低下過程に入り、第1日目で有意差が認められた。アイソザイムパターンも凍結保存が最も安定しており、保存4週間の間有意な変化が認められなかった。一方室温保存及び冷蔵保存では LDH₃ (%) が第3日目に有意な低下、LDH₁ (%) が21日目に有意な増加を示し、保存中のアイソザイムパターンの変化は M サブユニット活性の低下が反映していることが確認された。

本研究の結果から良好な保存条件として提案された凍結 (-20°C) 保存の試料について採取後10日間以内に LDH 活性とアイソザイムパターンを測定することにより、ホルスタイン子牛の発育過程、同泌乳牛、黒毛和種の種雄牛、繁殖雌牛、哺乳子牛、ホルスタイン種及び黒毛和種の肥育牛について LDH 活性とアイソザイムパターンが生理的意義を検討する目的を達し得ることが確かめられた。

緒 言

一般に畜産及び獣医領域における野外動物の血液成分分析においては、試料の採取に時間がかかり、かつ採取した試料を測定する実験室まで長距離輸送しなければならない。特に血清中の酵素については、酵素活性の解釈・意義づけに当たっての誤差を避けるために、取扱い中の安定性、試料の前処理の方法及び分析までの保存温度、

昭和63年6月27日受付

保存時間などについて、酵素が変性、失活しないように保存するための知識が必要である¹⁻³⁾。筆者らは実験室から遠隔地でかつ地形的に複雑な地域に少頭数ずつ飼育されている牛の LDH 活性及び LDH アイソザイムパターン測定の必要にせまられて本研究を実施した。

酵素活性についてはすでに多くの研究があるが、その報告するところは多様で一致をみないところも多い。特定の酵素についても動物の種属差、分析前の血液の取扱い、測定方法の違いなどが測定結果に影響を及ぼしていると思われる。

牛血清中の LDH 活性測定のための試料の保存条件として、室温、冷蔵及び凍結の3条件について、TOLLERSRUD (1969)⁴⁾、SPATE *et al.* (1970)⁵⁾ 及び戸井 (1973)⁶⁾ の報告がある。これらの報告では、冷蔵保存が LDH 活性の保持について室温保存及び凍結保存より不適であることは TOLLERSRUD と戸井で一致している。しかし、凍結については前二者が -10~-20°C で長期保存の可能性を支持しているけれども、戸井は -20°C までの凍結保存では保存後48時間において著しく活性が失われることを指摘している。また、室温保存の場合保存開始後1週間以内の酵素活性の変動については TOLLERSRUD と SPATE *et al.* の結果の間に不一致がみられる。

筆者らはこれらの不一致を確かめ、日常的に利用できる LDH 活性及びアイソザイム測定のための牛血清の保存法を確立するため、同一の牛血清試料を室温 (20~25°C)、冷蔵 (4°C) 及び凍結 (-20°C) の3条件で貯蔵して、LDH 活性及びアイソザイムパターンについて保存中の変化を調べた。そして野外の牛の調査も行ったので報告する。

実験材料および方法

1) 血清採取後の保存法と LDH 活性、アイソザイムパターンの測定法

実験用試料は当場繁養の黒毛和種 200 kg 程度の雄牛 3頭を用いた。頸静脈を露出した後放血した頸静脈血を用い、速やかに血清分離 (3000 r.p.m 15 分間) した後3頭の混合血清とした。混合血清は 2 ml 用の試験管

30本に分注した。

実験用試料の保存方法は、室温保存は20~25°Cの室温に2ml用試験管10本を放置し、冷蔵保存は4°Cの冷蔵庫に2ml用試験管10本を保存した。また、凍結保存は-20°Cの冷凍庫に2ml用試験管10本を保存した。

測定日は試料採取日を0日として1, 2, 3, 4, 5, 6, 14, 21および28日とした。測定日には各保存条件下において試料を1本ずつ取り出し測定試料として用い、その後の試料としては使用しなかった。凍結保存の解凍は室温解凍とした。

調査項目は、LDH活性とLDHアイソザイムパターンとした。1試料の測定回数はLDH活性では5反復、アイソザイムパターンでは3反復とし、測定値は平均値で示した。LDH活性の測定にはヤトロン製のLDH測定試薬Sのキットを使用し、単位はWróblewsky Unit (以下「WU」とする)である。アイソザイムパターンについては、和光純薬のLDHアイソザイムテストの寒天ゲルキットを使用した。LDHの各アイソザイムの百分比の測定には萱垣医理工業のプログラムデンストメーターADC-20SPを用いた。

2) 野外材料の測定

(1) 出生時から5カ月齢までの子牛の発育にともなう酵素の変遷

供試材料は当场繋養のホルスタイン種の雌子牛26頭で、血液は頸静脈より採取した。採血は出生直後1, 3, 7, 10, 14, 21日齢と満1, 2, 3, 4及び5カ月齢に行った。血清は-20°Cに凍結保存し、LDH活性及びアイソザイムを1週間以内に測定した。

(2) 泌乳牛における酵素の動態

供試材料は当场繋養のホルスタイン種15頭で、血液は朝の飼付け2時間後に頸静脈より採取した。採血は分娩を中心にして経時的に分娩予定日前2カ月と1カ月、分娩日、分娩後1, 2, 4, 6及び8カ月に行った。血清の保存と酵素活性の測定は(1)と同様に行った。

(3) 黒毛和種雄牛、繁殖雌牛及び哺乳子牛のLDH活性とアイソザイムパターン

供試材料は西日本某県のN町に飼育されている黒毛和種の親子対、当時特発性の心筋疾患で子牛を失った母牛及びそれらの母牛と血統的に関係のある東日本某県の種雄牛8頭、関係のない種雄牛7頭計15頭で、頸静脈より採血した。

(4) 去勢雄牛肥育牛の酵素の動態

供試材料は岐阜県種畜場(A)及び長野県畜産試験場(B)繋養のホルスタイン肥育牛と岐阜県種畜場繋養の

黒毛和種肥育牛の正常牛及び1例の尿結石牛の治療前と治療20日後の試料を採取した。

(5) 去勢雄牛肥育牛の安静時血と屠殺放血の比較

供試材料は岐阜県種畜場繋養のホルスタイン種12頭で、安静時に頸静脈より採取した血液を安静時血、同牛の屠殺放血時に採取した血液を屠殺放血とした。

LDH活性値とLDHアイソザイムパターン百分比は正規分布をしないため統計的取扱いに際しては、LDH活性はlog変換をLDHアイソザイムパターンはarcsin変換を行った。

実験結果

1. LDH活性の保存中の変化

LDH活性に対する室温(20~25°C)、冷蔵(4°C)及び凍結(-20°C)保存の影響は図1のとおりである。供試材料の採取当日の活性は1740±18(S.E.)WU、変動係数(C.V.)は2.1%であった。活性の変化(Y)の保存経過日数(X)に対する回帰を求めると表1のとおりである。

1) 保存第1週までの変化

最初の1週間の活性についてみると、室温保存では第6日目に向って10%程度の上昇を示し、 $Y=1724+32X$ の回帰式で示された。冷蔵保存では活性は第1日目から減少し、第6日目には87%に低下し、 $Y=1713-31X$ の回帰式が得られ、室温保存と対称的な変化を示した。凍結保存では第1週はほとんど活性の変化がみられず、わずかに上昇傾向を示すが有意ではなかった。回

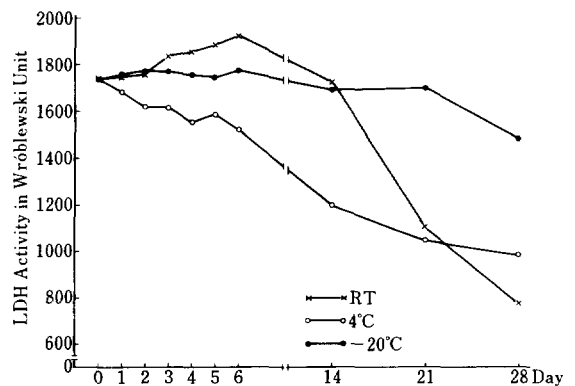


Fig. 1. Stability of LDH activities in serum stored at room (20~25°C), refrigerator (4°C) or deep freeze (-20°C) temperatures RT: at room temperature, 20~25°C, 4°C: at refrigerator temperature, -20°C: at deep freeze temperature.

Table 1. Regression equations of LDH activities in Wroblewski unit on storage time in days at room(20-25°C), refrigerator(4°C) or deep freeze(-20°C) temperatures

Day of Storage	Correlation Coefficient	Regression Equation	
0~6	RT	0.977**	$Y=1724+32X$
	4°C	-0.953**	$Y=1713-31X$
	-20°C	0.412	$Y=1751+3X$
6~28	RT	-0.978*	$Y=2333-55X$
	4°C	-0.956*	$Y=1610-25X$
	-20°C	-0.881	$Y=1864-12X$

** P<0.01, *P<0.05

RT: at room temperature(20-25°C), 4°C: at refrigerator temperature, -20°C: at deep freeze temperature.

帰式は $Y=1751+3X$ であった。

2) 保存第2週から第4週の間の変化

室温保存では第2週以後急速な減少過程に入り、第3週で63%、第4週で44%に活性は低下した。回帰式は第1週と同様にして、 $Y=2333-55X$ で示された。測定の変動については第2週まではC.V.に変化がなかったが、第3、4週ではC.V.が高くなった。冷蔵保存では第1週と同様に第2週以後も減少を続け第2週で68%、第3週で60%、第4週で56%に低下した。回帰式 $Y=1610-25X$ が得られた。C.V.は室温保存よりわずかに低い、第3、4週に増大する傾向があった。凍結保存では第2、3週でも第1週と比べてわずかな活性の低下しかみられず、97%の活性を保持し、 $Y=1864-12X$ の回帰式が得られた。C.V.は前二者と比較して小さい傾向がみられた。なお、採取当日の活性に対して5%水準で有意差が認められた保存経過日数は、室温保存で3日、冷蔵保存で1日、凍結保存で14日であった。

2. LDH アイソザイムパターンの保存中の変化

LDH アイソザイムパターンに対する室温(20~25°C)、冷蔵(4°C)及び凍結(-20°C)保存の影響は表2のとおりである。

(1) LDH₁:LDH₁(%)の採取当日の値は41.7±2.4で、第1週の変化は3保存条件とも微増の傾向にあった。変化の範囲は室温保存が最も少なく、冷蔵保存が最も大きく、凍結保存が中間であった。LDH₁(%)の変化(Y)の保存経過日数(X)に対する回帰式を求

めると、室温保存では $Y=43.9+0.3X$ で示され、同じく冷蔵保存では $Y=40.5+2.9X$ が得られ、凍結保存では $Y=39.7+1.2X$ が得られた。

LDH₁(%)の第2週以後の変化では、室温保存と冷蔵保存がほぼ同様な変化で明らかな増加を示し、凍結保存ではほとんど変化がなかった。それぞれ $Y=25.2+1.9X$, $Y=43.7+1.6X$ 及び $Y=44.0+0.1X$ の回帰式が得られた。なお、LDH₁(%)が採取当日に対して5%水準で有意な変化を示すのは室温保存と冷蔵保存で21日目であったが、凍結保存では保存期間中有意な変化はみられなかった。

(2) LDH₂:LDH₂(%)の採取当日の値は38.2±1.0で第1週の変化は、LDH₁同様顕著ではなかった。室温保存が回帰式 $Y=37.1+0.1X$ でほとんど変化を示していないが、冷蔵保存及び凍結保存ではLDH₂(%)は減少傾向を示し、それぞれ $Y=36.7-1.5X$, $Y=37.3-0.3X$ の回帰式が得られた。第2週以後ではLDH₂(%)は3保存条件とも減少傾向を示し、それぞれ $Y=45.7-1.0X$, $Y=35.3-1.1X$, $Y=37.7-0.2X$ の回帰式が得られた。なお、採取当日に対して5%水準で有意差がみられた経過日数は室温保存で21日、冷蔵保存で4日であったが、凍結保存では全期間中有意差がみられなかった。

(3) LDH₃:LDH₃(%)の採取当日の値は15.7±1.4であるが、第1週の変化は、室温、冷蔵、凍結の3保存条件とも減少を示し、それぞれ $Y=14.3-0.4X$, $Y=15.4-1.1X$, $Y=16.7-0.8X$ の回帰式が得られた。採取当日に対して5%水準で有意の変化がみられたのは室温保存で3日、冷蔵保存でも7日であった。凍結保存では全期間中有意差がみられなかった。第2週以後においては室温と冷蔵保存が減少を示し、それぞれ回帰式は $Y=19.7-0.6X$, $Y=13.8-0.4X$ が得られたが、凍結保存では微増を示し、 $Y=12.4+0.1X$ の回帰式が得られた。

(4) LDH₄:LDH₄(%)はLDH₁~LDH₃に比べて採取当日の値が3.4±0.7と小さいので、測定値の相対変動が大きい。第1週の変化は、室温、冷蔵、凍結保存とも減少傾向を示し、それぞれ $Y=3.1-0.1X$, $Y=4.1-0.2X$, $Y=4.3-0.3X$ の回帰式が得られた。第2週以後については、室温と冷蔵保存で減少傾向を示し、凍結保存ではほぼ維持の傾向を示した。回帰式はそれぞれ $Y=5.2-0.2X$, $Y=4.5-0.1X$ 及び $Y=2.8+0.02X$ が得られた。しかし、測定値の相対変動が大きくなるため、採取当日の値に対する5%水準での有意差がみられなかった。

Table 2. Stability of LDH isozyme patterns in serum stored at room (20–25°C), refrigerator (4°C) or deep freeze (–20°C) temperatures (%)

		0	1	2	3	4	5	6	14	21	28
LDH ₁	RT		43.2 (8.0)	44.6 (2.3)	49.5 (2.0)	47.0 (0.4)	43.4 (1.2)	43.2 (0.2)	42.3 (1.5)	65.3 (0.3)	83.0 (0.3)
	4°C	41.7 (2.4)	41.4 (4.6)	41.0 (2.1)	56.4 (2.7)	54.4 (6.6)	51.0 (0.9)	57.6 (1.1)	57.3 (1.5)	80.6 (2.2)	88.8 (1.2)
	–20°C	39.2 (3.2)	36.7 (3.2)	48.6 (2.7)	45.7 (1.3)	45.1 (1.8)	46.0 (1.6)	45.2 (1.8)	45.5 (0.6)	49.6 (3.8)	
LDH ₂	RT		37.1 (2.6)	36.0 (0.4)	37.5 (3.3)	35.5 (0.9)	38.2 (0.4)	38.2 (1.3)	33.1 (2.0)	28.6 (1.4)	15.9 (0.8)
	4°C	38.2 (1.0)	35.4 (2.8)	32.5 (1.5)	32.3 (1.3)	27.8 (2.3)	31.0 (0.8)	29.1 (3.3)	22.0 (2.6)	9.7 (0.6)	7.6 (0.8)
	–20°C	36.8 (2.0)	35.3 (1.4)	37.7 (1.7)	34.8 (1.1)	35.7 (1.9)	36.4 (1.9)	34.6 (1.0)	34.1 (0.3)	31.6 (4.6)	
LDH ₃	RT		14.8 (3.1)	13.9 (0.4)	8.2 (0.9)	12.7 (0.2)	13.6 (0.6)	13.5 (1.3)	15.1 (1.4)	5.7 (1.1)	1.0 (1.0)
	4°C	15.7 (1.4)	15.1 (0.6)	14.5 (1.0)	8.4 (1.0)	10.8 (2.5)	11.8 (1.0)	9.3 (1.1)	12.3 (1.4)	6.1 (0.4)	2.3 (0.2)
	–20°C	16.8 (1.8)	17.9 (1.6)	10.9 (1.3)	13.0 (1.0)	13.3 (0.5)	12.2 (0.5)	15.6 (0.2)	15.2 (0.2)	15.3 (0.8)	
LDH ₄	RT		3.2 (0.9)	3.0 (0.4)	2.4 (0.4)	3.0 (0.4)	3.1 (0.3)	3.4 (0.1)	5.2 (0.7)	0 (0)	0 (0)
	4°C	3.4 (0.7)	4.4 (1.1)	5.4 (1.3)	1.4 (0.8)	3.9 (1.1)	3.6 (0.4)	2.7 (0.3)	5.0 (0.8)	3.0 (0.7)	1.1 (0.1)
	–20°C	4.5 (0.5)	5.6 (1.9)	1.8 (0.7)	3.5 (0.5)	3.1 (0.6)	2.7 (0.3)	3.0 (1.5)	3.8 (0.2)	2.9 (0.1)	
LDH ₅	RT		1.6 (1.4)	2.2 (1.4)	2.1 (1.8)	1.4 (0.3)	1.4 (0.8)	1.6 (0.3)	4.2 (2.8)	0 (0)	0 (0)
	4°C	0.9 (0.2)	3.6 (0.2)	6.3 (2.0)	1.2 (0.6)	2.9 (1.2)	2.3 (0.7)	1.1 (0.6)	3.3 (1.9)	0.5 (0.5)	0 (0)
	–20°C	2.6 (0.3)	4.2 (1.2)	0.8 (0.6)	2.9 (1.0)	2.6 (1.6)	2.3 (0.2)	1.5 (1.5)	1.3 (0.1)	0.4 (0.1)	

RT: at room temperature (20–25°C), 4°C: at refrigerator temperature, –20°C: at deep freeze temperature. Figures in parentheses indicate standard errors.

(5) LDH₅: LDH₅ (%) は LDH₄ (%) に比べて採取当日の値が 0.9 ± 0.2 と更に小さいので、第1週目の相対変動も一層大きい。従って、回帰係数の符号も正負が混在した。室温、冷蔵、凍結保存に対し、それぞれ $Y = 1.5 + 0.03X$, $Y = 3.2 - 0.2X$, $Y = 2.0 + 0.1X$ の回帰式が得られた。採取当日の値に対して、5%水準で有意差がみられたのは、冷蔵保存の2日目だけであった。第2週以後の LDH₅ (%) の変化は、室温、冷蔵及び凍結保存とも減少傾向を示し、それぞれ $Y = 3.5 - 0.1X$, $Y = 2.6 - 0.1X$ 及び $Y = 2.8 - 0.1X$ の回帰式が得られた。

(6) 保存期間中の H 及び M サブユニットの活性の変化: 採取当日の M/H の値は 26.5 であったが、保存期間中 M サブユニットが減少するので M/H の値は室

温、冷蔵、凍結保存とも表3のようになり、3保存法とも減少するが、第1~2週の減少は比較的少ない。そして、第3週以後については室温と冷蔵保存で急激な減少を示し、第4週の M/H の値で凍結保存が 22.4 と小さな減少であったのに対し、室温と冷蔵保存ではそれぞれ 4.8, 4.2 と大きな減少を示した。

3. 野外の牛の血清 LDH 活性及び LDH アイソザイムパターン

1) 出生直後から5カ月齢までの LDH 活性及び LDH アイソザイムパターンの変遷

子牛の出生直後から5カ月齢に至る間の LDH 活性及び LDH アイソザイムパターンの変遷は図2のとおりである。活性は出生時に比べて生後第1日目に上昇を示すが第3日目には減少し、以後5カ月齢に向って漸増

する。LDH アイソザイムパターンは、生後 24 時間に若干の変化 (LDH₁, LDH₂ の減少, LDH₃, LDH₄, LDH₅ の増加) を示すが以後 5 カ月齢に向って、特別

の変化がみられない。

2) 泌乳牛の酵素の動態

ホルスタイン種泌乳牛の LDH 活性及びアイソザイムパターンを表 4 に示す。LDH 活性は分娩後 1 カ月及び 2 カ月の泌乳最盛期で、分娩前及び泌乳 4 カ月以降に比べて高い値を示した。アイソザイムパターンでは、分娩時は分娩前に比べて LDH₁ (%) が減少し LDH₃ (%) が増加した。分娩後 2 カ月には LDH₁ (%) が有

Table 3. Stability of the ratio of the activity of M subunit to H subunit during storage at room(20-25°C), refrigerator(4°C) or deep freeze (-20°C) temperatures

Day of Storage	RT	4°C	-20°C
0	26.5	26.5	26.5
1	26.2	30.5	31.0
2	26.1	35.2	36.0
3	21.5	17.4	20.8
4	23.9	22.5	26.3
5	25.6	23.4	26.1
6	25.9	18.0	24.9
14	31.6	23.2	25.5
21	11.3	9.1	25.6
28	4.8	4.2	22.4

RT : at room temperature(20-25°C), 4°C : at refrigerator temperature, -20°C : at deep freeze temperature.

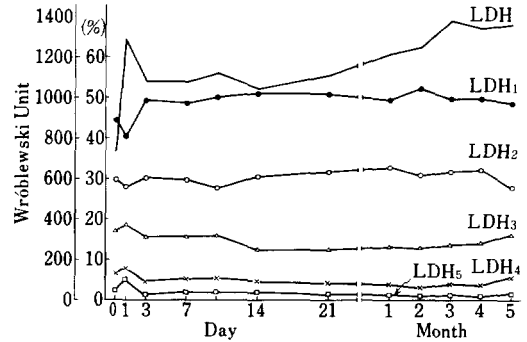


Fig. 2. Changes of LDH activity and isozyme pattern during the first five months of life in Holstein calves.

Table 4. Changes of LDH activity and isozyme pattern during the dry and lactating periods in Holstein cows

Animal Group	n		LDH (Wróblewski. U)	LDH ₁	LDH ₂	LDH ₃	LDH ₄	LDH ₅
				(%)				
Two months before parturition	15	M	1314 ^{ab}	57.0 ^a	28.6 ^a	11.9 ^a	2.1 ^a	0.4 ^a
		S.E.	10	0.4	0.2	0.2	0.1	0.1
One month before parturition	15	M	1269 ^b	57.0 ^a	29.1 ^a	11.9 ^a	1.6 ^a	0.4 ^a
		S.E.	8	0.3	0.2	0.2	0.1	0.03
At parturition	16	M	1336 ^{ab}	51.7 ^b	30.0 ^a	14.6 ^b	2.8 ^{ab}	1.0 ^{ab}
		S.E.	14	0.3	0.2	0.2	0.1	0.1
One month after parturition (23.2 kg)*	16	M	1585 ^a	58.2 ^a	28.3 ^a	11.6 ^a	1.9 ^a	0.1 ^a
		S.E.	27	0.3	0.2	0.1	0.1	0.03
Two months after parturition (24.9 kg)	14	M	1613 ^a	66.8 ^c	24.4 ^b	9.2 ^c	1.4 ^a	0.2 ^a
		S.E.	38	0.3	0.2	0.1	0.1	0.03
Four months after parturition (22.2 kg)	14	M	1334 ^{ab}	62.7 ^d	22.0 ^b	10.9 ^a	2.9 ^b	1.5 ^b
		S.E.	24	0.3	0.2	0.1	0.1	0.1
Six months after parturition (19.6 kg)	11	M	1320 ^{ab}	59.5 ^{ad}	23.9 ^b	11.6 ^a	3.5 ^b	1.5 ^b
		S.E.	11	0.5	0.2	0.2	0.1	0.1
Eight months after parturition (14.2 kg)	9	M	1515	46.6 ^e	27.0 ^a	16.1 ^b	6.6 ^c	3.7 ^c
		S.E.	13	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1

* Mean milk yield for ten days in which the blood sample was taken on the fifth day.

a-e : Means with different superscripts differ significantly (P<0.05).

意に増加し、LDH₂ (%) と LDH₃ (%) が有意に減少した。このパターンは分娩後4~6カ月でもみられた。分娩後8カ月になるとアイソザイムパターンはLDH₂ (%) と LDH₃ (%) が回復し、LDH₁ (%) が減少して乾乳期のパターンに近づいた。なお、分娩後8カ月のLDH活性の増加とLDH₁ (%) の急激な減少理由については、生理的要因によるのか、または環境要因によるのかは不明である。

3) 黒毛和種雄牛、繁殖雌牛及び哺乳子牛の酵素の動態

黒毛和種の正常母牛群、異常母牛群、正常哺乳子牛群及び種雄牛群のLDH活性及びアイソザイムパターンの測定値は表5のとおりである。異常母牛群とはそれらの子牛が生後間もなく特発性の心筋疾患により急死した母牛群であり、医学の分野においてLDH活性及びア

イソザイムパターンと心筋疾患との間に関係のあることが報告されているので測定を行ったものである。しかし、これらの異常母牛の測定値は正常母牛と差がなかった。また、種雄牛ではこれらの母牛との間に血縁関係の有無による差が認められなかった。全体として哺乳子牛のLDH活性が成牛に比べて有意に低く、かつアイソザイムパターンでもLDH₁ (%) が有意に低く、LDH₃~LDH₅のMサブユニットを有するものが有意に多いことが示された。種雄牛ではLDH₁ (%) が多く、LDH₂ が少なく、健康な雄のパターンが示唆されている。

4) 肥育牛の酵素の動態

ホルスタイン種去勢雄牛の肥育牛A、B2群及び同黒毛和種1群のLDH活性をみると表6のとおりであり、それぞれ1928±135 WU、2218±107 WU及び2361±272 WUで、前述のホルスタイン種泌乳牛及び黒毛和種

Table 5. LDH activities and LDH isozyme patterns of Japanese black bulls, breeding cows and suckling calves in relation to the occurrence of idiopathic cardiomyopathy

Animal Group			LDH (Wróblewski, U)	LDH ₁	LDH ₂	LDH ₃	LDH ₄	LDH ₅
				(%)				
Normal cow	(n=90)	M	1520 ^a	50.2 ^a	32.2 ^a	12.5 ^a	3.3 ^a	1.8 ^a
		S.E.	33	0.6	0.4	0.3	0.2	0.2
Abnormal cow	(n=50)	M	1581 ^a	50.6 ^a	31.4 ^a	11.9 ^a	3.6 ^a	2.4 ^a
		S.E.	46	1.0	0.6	0.4	0.3	0.3
Suckling calves	(n=88)	M	1232 ^b	36.9 ^b	32.3 ^a	19.3 ^b	7.7 ^b	3.8 ^b
		S.E.	23	0.8	0.4	0.5	0.4	0.4
Bull	(n=15)	M	1580 ^a	54.6 ^c	28.8 ^b	12.2 ^a	3.3 ^a	0.9 ^c
		S.E.	59	1.7	0.3	0.8	0.6	0.3

a, b, c : Means with different superscripts differ significantly (P<0.05).

Table 6. LDH activities and LDH isozyme patterns in Holstein and Japanese black fattening steers with a case of urinary calculi

Animal Group			LDH (Wróblewski, U)	LDH ₁	LDH ₂	LDH ₃	LDH ₄	LDH ₅
				(%)				
Holstein								
Group A		M	1928 ^a	59.3 ^a	26.7 ^a	11.9 ^a	1.5 ^a	0.6 ^a
		S.E.	135	1.0	0.5	0.4	0.1	0.1
Group B		M	2218 ^b	54.5 ^a	26.0 ^a	16.7 ^b	2.1 ^b	0.6 ^a
		S.E.	107	2.1	1.9	0.6	0.1	0.1
Japanese black								
Normal steer		M	2361 ^b	54.9 ^a	24.7 ^a	14.8 ^b	3.3 ^c	2.3 ^b
		S.E.	272	1.3	1.1	0.6	0.1	0.1
Steer with urinary calculi								
In treatment			2721	46.8	20.5	14.4	5.1	13.7
20 days after treatment			2442	56.2	24.6	13.6	4.0	1.6

a, b, c : Means with different superscripts differ significantly (P<0.05).

Table 7. Difference of LDH activities and LDH isozyme patterns between the resting period and the time of slaughter in Holstein fattening steers

Time of blood collection		LDH (Wróblewski. U)	LDH ₁	LDH ₂	LDH ₃	LDH ₄	LDH ₅
			(%)				
In resting period (n=12)	M	1928	59.3	26.7	11.9	1.5	0.6
	S. E.	135	1.0	0.5	0.4	0.1	0.1
At slaughter (n=12)	M	2365	57.8	27.0	12.3	1.9	1.0
	S. E.	266	1.0	0.5	0.7	0.1	0.1
		N.S.	*	N.S.	N.S.	**	*

** P<0.01, * P<0.05

の成雄牛、成雌牛、哺乳子牛よりも高い値を示している。LDH アイソザイムパターンについては、ホルスタイン種の A 群で LDH₁ (%) の高いのが目立つが、全体として類似したパターンを示した。

黒毛和種肥育牛群でたまたま尿結石発症中の個体が得られたが、その LDH 活性が 2721 WU で明らかに上昇していると思われた。アイソザイムパターンでは牛の種属としての正常牛は LDH₅ (%) が 2~3% 程度であるのに対し、13.7% と著しく増加し、また LDH₄ (%) も 5.1% で増加傾向を示し、LDH₁ (%), LDH₂ (%) が減少し、M サブユニットが増加している様相を顕著に示している。治療後 20 日では、LDH 活性も 2442 WU に低下し、アイソザイムパターンも正常値に戻った。

5) 肥育牛の安静時血液と屠殺時放血の比較

ホルスタイン種去勢雄肥育牛の安静時血と屠殺放血を比較すると表 7 のとおりである。LDH 活性は安静時血に比べ屠殺血が高いが有意ではなかった。アイソザイムパターンでは屠殺血が LDH₁ (%) でわずかに減少し、LDH₄ (%) と LDH₅ (%) がわずかに増加して、それぞれ有意な変化を示している。

考 察

1. LDH 活性及びアイソザイムパターン測定のための試料の保存条件について

1) LDH 活性に及ぼす保存条件の影響

保存中の酵素の安定性に影響する因子は多く、極端な pH、熱、凍結と融解、有機溶媒とデタージェント、特異的な酵素阻害物質と微生物の活動など諸々である。特定の酵素活性に注目しても複雑で多くの因子に依存しており、これらの因子について一部にはまだ不明なものも残っている³⁾。通常、酵素は血漿や血清、組織抽出物などのような、より自然な媒質の中に存在するとき、不安定化がより少ないと信じられている⁷⁾。本研究では牛の

LDH について検討し、その測定用試料として血清を選んだ。

保存条件が牛の LDH 活性に及ぼす影響について、本試験の動機となった先行する報告の不一致な点については緒言において指摘した。本試験の結果、凍結保存 (-20°C) については TOLLERSRUD⁴⁾ 及び SPATE *et al.*⁵⁾ と全く一致しており、戸井⁶⁾ の保存後 48 時間で著しく活性が失われると指摘した危惧は必要ないものと考えられる。凍結状態において少くとも 5% 水準で有意の活性低下が起るのは筆者らの成績では 2 週間であり、一方、TOLLERSRUD は 4~5 週間安定であることを示し、SPATE *et al.* でも 4 週間十分安定していることを示している。種々の酵素測定法が開発され畜産・獣医の分野に多く導入されるようになったが、その臨床的意義の正確な解釈のためには、測定過程の酵素の安定性について、さらにいくつかの重要な疑問点を解明しなければならないことを JONES (1985)⁸⁾ は指摘し、牛の血液中の 11 酵素について系統的に再検討しているが、LDH 活性について、-20°C で 21 日まで活性の低下が起らないことを示した。これらの報告は筆者らの結果を裏づけている。

室温保存では、筆者らの成績は基本的には TOLLERSRUD⁴⁾ の結果を支持するが、TOLLERSRUD は第 1 週の活性の変化 (増加の傾向) を $Y=1617.1+0.1X$ で示し、筆者らの $Y=1724+32X$ に比べて貯蔵中の増加率が低くなっている。JONES は、室温保存では採取当日の活性に対して 5% 水準での有意差が 2 日目に認められることを指摘し、筆者らの 3 日目と似かよっている。

冷蔵保存の場合、筆者らの成績では活性低下が直ちに起り、 $Y=1713-31X$ の回帰式が得られたが、TOLLERSRUD は $Y=1700.7-54.3X$ の回帰式を示し、TOLLERSRUD の方が活性低下が早いと基本的には一致している。SPATE *et al.* 及び戸井も明らかに活性低下を示し、筆者らの結果と一致している。JONES⁸⁾ は有意の活

性低下が第2日目にみられるといっているが、筆者らの結果では第1日目で有意の低下が認められる。冷蔵保存が第1週のLDH活性の安定性に対して、室温保存より不利なことは確実と思われる。

また、保存第1週のLDH活性の動態について、TOLLERSRUDと筆者らは室温について単純な上昇を確認している。一方SPATE *et al.* は冷蔵試料について、保存第1日目に一過性の著しい活性の上昇が起ることを指摘している。しかし、この現象は他の研究者には確認されていない。JONES⁸⁾ は血漿と血清を同一条件で比較し、血漿の方が血清よりLDH活性が明らかに安定であることを示している。また、BLINCOE *et al.* (1985)⁹⁾ は全血を4°Cで3日及び1週間保存後血漿分離すると有意の活性低下をみないことを報告している。なお保存中に酵素活性が上昇する例として、アルカリ性ホスファターゼでは保存第1週後半に持続して活性が上昇することが報告されている⁵⁾。以上のことから牛の血清LDH活性測定のための試料の保存は、採取後できるだけ早く凍結(-20°C)し、測定は後述のアイソザイムパターンの変化と合せて2~3週間以内に実施することが必要である。

2) LDH アイソザイムパターンに及ぼす保存条件の影響

試料保存中のLDHアイソザイムの変化に関し、牛血清については報告が見当たらない。前項に述べたように、保存中活性を失いながらアイソザイムパターンも変化していくものと推測される。貯蔵中にLDHアイソザイムのMサブユニットがHサブユニットより不安定であることはすでに豚で報告されている⁷⁾。LDHアイソザイムパターンの血清試料保存中の変化は、このMサブユニットの相対的消失がアイソザイムパターンの変化を特徴づけるものと考えられる。筆者らの成績において、保存第1週及び第2週以後とも全体活性にしろLDH₁の相対比率は、室温、冷蔵、凍結とも正の回帰係数をもち、常に増加する傾向を示している。また、LDH₂~LDH₅の相対比率は一部の例外はあるが、保存第1週及び第2週以後においても大部分が負の回帰係数をもち、Mサブユニットを持つアイソザイム活性は常に低下し続けていることを示している。保存法別にみると、活性保持の最もよい凍結ではLDH₁~LDH₅の各アイソザイムが、試料採取日に対して有意な変化を示すことがなかった。したがって、アイソザイム測定に対しても凍結が最もよい保存条件であることを示している。LDH₁では室温及び冷蔵で、保存21日目に5%水準で有意な増加が認められる。したがって、LDH₂~LDH₅アイソザイム

でMサブユニットが減少したことを示している。LDH₂では室温で21日目に有意な低下が、冷蔵では6日目に同様の低下が認められる。百分比が10%以上ありMサブユニットを1/2保有するLDH₃では室温及び冷蔵とも保存3日目に有意な減少がみられ、Mサブユニットの活性消失を裏づけている。

以上牛血清のアイソザイム測定立場からも、凍結が適していることを示しており、活性が有効な測定範囲であれば、アイソザイムパターンも保持されていると結論されよう。

3. 野外の牛血清LDH活性及びアイソザイムパターンの測定について

前節で記述した方法に従い血清凍結試料について、10日間以内にLDH活性及びアイソザイムパターンを測定した。それぞれの測定例は、血清LDH活性及びアイソザイムパターンの測定が十分に生理的意義のあることを示していると思われる。すなわち、生後の発育にともなう変化では、LDH活性は一過性の出生時変化を示した後、成長するにつれてPRASSE (1969)¹⁰⁾の報告と同様に血清中の活性が漸増すること、アイソザイムパターンは、成長するにつれて子牛期のMサブユニットが減少してLDH₁が増加することが示された。ホルスタイン種の泌乳牛では、泌乳最盛期にLDH活性及びLDH₁が有意に高いことが示されたが、このことは生体の代謝活性の上昇を反映しているものと思われる。

黒毛和種の種雄牛、成雌牛、哺乳子牛群の測定では、哺乳子牛のLDH活性が成牛より低く、アイソザイムパターンでは乳用子牛と同様LDH₁が低く、Mサブユニットを持つLDH₃~LDH₅が成牛に比べて有意に多いことを示し、子牛生理の特性を示しているものと思われる。なお、本調査群の中に、特発性の心筋疾患¹¹⁻¹⁴⁾で生後間もなく子牛を失った母牛が含まれているが、酵素の測定結果では正常母牛と全く差が認められなかった。また、種雄牛でもこれらの母牛との間の血縁関係の有無による差が認められなかった。これについては、すでに文献¹²⁻¹⁴⁾に示されているような発症個体のLDH測定ではないので、所見が得られなかったものと思われる。

ホルスタイン種去勢雄子牛、黒毛和種去勢雄子牛の肥育牛ではLDH活性が、黒毛和種繁殖雌牛、同種雌牛及びホルスタイン種泌乳牛よりも明らかに高かったが、このことは肥育牛の代謝の特性を示しているものと思われる。黒毛和種肥育牛のなかに尿結石の1症例があったが、発症治療中にLDH₅が確実に上昇しており、治療後に正常値に戻っているため、臨床診断上意義があると思われる。

ホルスタイン種去勢雄子牛の肥育牛で、屠殺前の安静時血と屠殺血中の LDH 活性とアイソザイムパターンを比較すると、屠殺血の LDH 活性は有意ではないが上昇を示し、同時に LDH₁ の有意な減少、LDH₄ と LDH₅ の有意な上昇を示し、屠殺時に生体の受けるストレスを示唆していると思われる¹⁵⁾。

LDH アイソザイムパターンは生体の各組織で特徴があり、その組織に異常があるときはその組織のアイソザイムが血中に漏出して、当該組織異常の診断が可能になるために¹⁶⁻¹⁸⁾、臨床生化学で注目されているが、この

他個体の生理的狀態を把握する立場からも、今回筆者らの提案する血清の保存法及び活性、アイソザイムパターンの分析法で、充分その目的を達成し得るものと結論される。

謝 辞

試料の採取にあたっては各試験場各位に、また當場動物第1管理室室員各位に、試料の分析にあたっては當場育種部旧育種第2研究室深山喜三郎技官に心から感謝する。

引用文献

- 1) KRAMER, J.W.: Clinical enzymology, In *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Third Edition, Edited by KANEKO, J.J., 175—199, Academic Press, New York, 1980
- 2) KANEKO, J.J.: Appendixes, In *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Third Edition, Edited by KANEKO, J.J., 785—797, Academic Press, New York, 1980
- 3) GUDER, W. and A.-W. WAHLEFELD: Specimens and samples in clinical laboratory sciences, In *Methods of Enzymatic Analysis*, Third Edition, Edited by BERGMAYER, H.U., Vol. II Samples, Reagents, Assessment of Results, 2—20, Verlag Chemie, Weinheim, Federal Republic of Germany, 1983
- 4) TOLLERSRUD, S.: Stability of some serum enzymes in sheep, cattle, and swine during storage at different temperatures, *Acta vet. scand.*, **10**, 359—371, 1969
- 5) SPATE, M.P., M.F. BURKS, P.S. EVANS and M.E. TUMBLESON: Concentrations and activities of bovine serum biochemic constituents as a function of storage time and temperature, *Clin. Biochem.*, **3**, 137—149, 1970
- 6) 戸井建三：ウシ血清乳酸脱水素酵素の凍結保存による影響，医学と生物学，**87**，67—71，1973
- 7) HYLDGAARD-JENSEN, J.F.: *Lactate Dehydrogenase in Pigs*, Munksgaard, Copenhagen, 1971
- 8) JONES, D.G.: Stability and storage characteristics of enzymes in cattle blood, *Res. Vet. Sci.*, **38**, 301—306, 1985
- 9) BLINCOE, C. and D.W. MARBLE: Storage stability of some bovine plasma enzymes, *Am. J. Vet. Res.*, **46**, 1242—1244, 1985
- 10) PRASSE, K.W.: Lactic dehydrogenase activity and isozyme distribution in serum of normal cattle, *Am. J. Vet. Res.*, **30**, 2181—2184, 1969
- 11) WATANABE, S., T. AKITA, C. ITAKURA and M. GOTO: Evidence for a new lethal gene causing cardiomyopathy in Japanese black calves, *J. Hered.*, **70**, 255—258, 1979
- 12) WARBURTON, F.G., E. ALLAN and G.S. LAING: Increased lactate dehydrogenase 3 in serum after myocardial infarction, *Nature*, **215**, 287—289, 1967
- 13) D.M. GOLDBERG and D.A. WINFIELD: Diagnostic accuracy of serum enzyme assays for myocardial infarction in a general hospital population, *Br. Heart J.*, **34**, 597—604, 1972
- 14) WOLFSON, S., L.I. ROSE, J.E. BOUSSER, A.F. PARISI, A.E. ACOSTA, K.H. COOPER and E. SCHECHTER: Serum enzyme levels during exercise in patients with coronary heart disease: Effects of training, *Am. Heart J.*, **84**, 478—483, 1972
- 15) 渡辺昭三・秋田富士・三上仁志・瑞穂 当・神部昌行：MHS の実験動物としての豚集団の情報，麻酔と蘇生，**13**，通巻第 50 冊記念号別冊，109—118，1977
- 16) PAULSON, G.D., A.L. POPE and C.A. BAUMANN: Lactic dehydrogenase isoenzymes in tissue

- and serum of normal and dystrophic lambs, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **122**, 321—324, 1966
- 17) KELLER, P. und T.A. STANBRIDGE: Die Verteilung der Lactat-Dehydrogenase-Isoenzyme in einigen Rinderorganen, *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, **115**, 35—48, 1973
- 18) KELLER, P.: Lactate dehydrogenase isoenzymes in normal bovine serum and during experimental liver and muscle damage, *Res. vet. Sci.*, **17**, 49—58, 1974

Stability of Serum Lactate Dehydrogenase Activity and Isozyme Pattern in Cattle during Storage at Different Temperatures

Tomiji AKITA and Shozo WATANABE

Summary

Although numerous reports and reviews on the effects of different storage procedures on the activity of serum lactate dehydrogenase (LDH) have appeared in the literature, answers to key questions, concerning how long and under what conditions they are stable, remain ambiguous and often controversial. The present study was undertaken to establish an optimum storage procedure for the determination of bovine serum LDH activity and LDH isozymes by comparing the stabilities of the serum enzyme stored at room (20–25°C), refrigerator (4°C) or deep freeze (–20°C) temperatures.

The deep freeze procedure was the most favorable for keeping the stability of the enzyme and maintained the activity for two weeks until the statistically significant decrease of the activity at the $P < 0.05$ level was recognized. At room temperature, the LDH activity increased from the third to sixth day of storage and then decreased rapidly. At refrigerator temperature, the activity began to decrease immediately after the start of storage and the significant loss of activity ($P < 0.05$) was observed on the first day of storage.

LDH isozymes, also, were most stable at deep freeze temperature and no significant changes of isozyme pattern ($P < 0.05$) were recognized during four weeks of storage. At room and refrigerator temperatures, significant decrease of LDH₃ isozyme (%) was observed on the third day of storage, on the other hand, LDH₁ isozyme (%) increased significantly ($P < 0.05$) on the 21st day of storage. It can be concluded that the change of isozyme pattern during the storage reflect the loss of the activity of M subunit of LDH.

Determinations of LDH activity and LDH isozyme pattern in the serum stored at deep freeze (–20°C) temperature were conducted within a week of storage with Holstein calves through the first five months of life, lactating Holstein cows, Japanese black bulls, breeding cows and suckling calves, and Holstein and Japanese black fattening steers and physiological meaning of the enzyme determination was positively confirmed.