

15 マイクロプレート法による血清コリンエステラーゼ活性測定の見直し

中央家畜保健衛生所
横山 竜太

コリンエステラーゼ（以下 ChE）は、コリンエステルを加水分解する酵素である。血清 ChE は肝臓で生成されるため、人の臨床では肝機能検査の 1 つとして重要であり、また、他の検査項目に比べいち早く異常値を示すことが知られている¹⁾。一方、ChE 活性は、有機リン系薬剤やカーバメイト系薬剤により阻害されるため、これら中毒の重要な指標となり²⁾、病性鑑定マニュアル³⁾にも記載がある。

黒毛和種肥育牛におけるビタミン A 等血液生化学検査の意義は高く、同一血清を用いた新たな検査項目として ChE 活性に注目した。今回検討した事項として、1 つ目に、ChE 活性が肥育牛の生化学検査項目の評価のひとつとして活用可能か、月齢推移を調査し、他の生化学検査項目との相関を調査した。2 つ目に、ChE 活性が肝機能障害の指標として活用可能か、GOT 等との関係を調査した。3 つ目に、マイクロプレートを用いた多検体処理方法を検討を行った。

1 材料及び方法

材料は、令和 2 年 9 月から令和 3 年 3 月に採材された、黒毛和種肥育牛の 9 か月齢から 25 か月齢の血清 113 検体を用いた。

ChE 活性の測定は、Ellman 法⁴⁾で実施した。測定原理は、基質にアセチルチオコリンを用い、遊離したチオコリンを DTNB に反応させ、生成する黄色色素を 412nm の波長で経時的に測定し、得られた吸光値の変化量を求め算出する方法である（図-1）。

- ChE 活性の測定は、Ellman 法で実施
- 基質にアセチルチオコリンを用い、遊離したチオコリンを 5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸) に反応させ、生成する黄色色素を 412nm の波長で経時的に測定し、得られた吸光値の変化量を求め算出

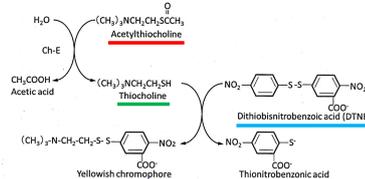


図-1 方法(測定原理)

2 成績

図-2 に肥育牛の月齢推移を示す。9 か月齢で平均 322U/L、15 か月齢で平均 496U/L となり、その後減少傾向で 25 か月齢で平均 216U/L であった。月齢とともに減少傾向がみられ、月齢と ChE は相関係数-0.26 と弱い負の相関が認められた。

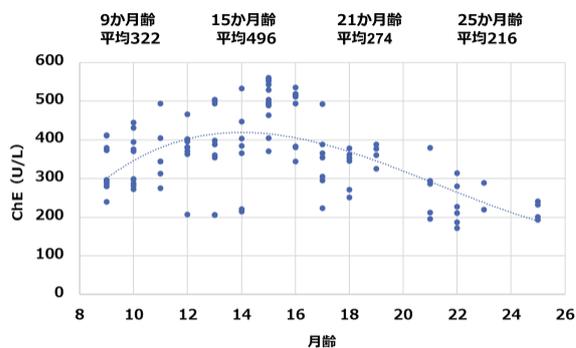


図-2 月齢推移(肥育牛)

得られた月齢推移を基に、基準値の検討を行った。血清 ChE 活性は平均値 363.2U/L、中央値 370.5U/L、尖度-0.9、歪度 0.1 と正規分布に近いヒストグラムができた（図-3 左）。

また、今回得られた数値の 95%が含まれる平

均± 2 SD の値を上限值または下限値とし、図-3 右のように、おおむねの標準範囲を設定した。

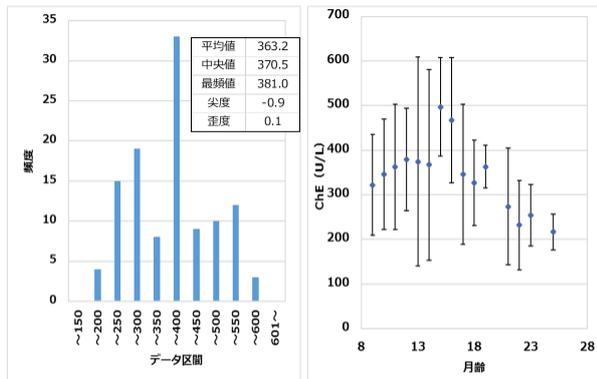


図-3 基準値の検討(肥育牛)

血液生化学検査項目との関連性は、TP と相関係数-0.20、ALB と相関係数-0.35 と弱い負の相関が認められた。一方、BUN、その他の項目とは相関係数が±0.2 未満で相関が認められなかった(表-1)。

表-1 血液生化学性状との相関

項目	相関係数	P値	検体数
STP	-0.20569*	0.049184	92
ALB	-0.35357**	0.000546	92
BUN	0.132656	0.064794	92
T-cho	-0.16241	0.085682	113
GOT	0.057222	0.547169	113
GGT	-0.0066	0.944707	113
Vit.A	0.104377	0.271238	113
Vit.E	-0.19195	0.052089	103

*: P<0.05, **: P<0.01

図-4、5にグラフを示す。TP と ALB で、弱い負の相関が認められたが、BUN と T-cho では相関は認められなかった。GOT、GGT、ビタミンA、ビタミンE とは相関は認められなかった。

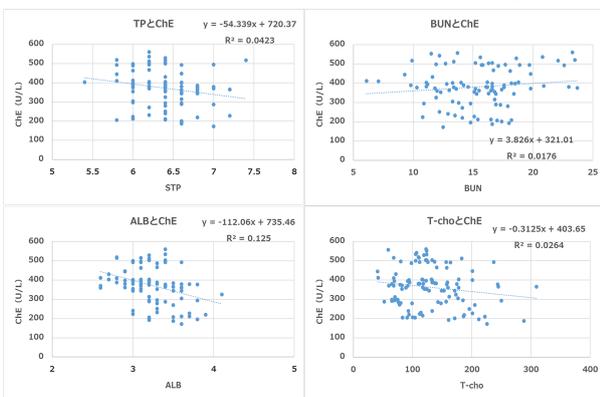


図-4 血液生化学性状との相関(1)



図-5 血液生化学性状との相関(2)

血清 ChE 活性が牛においても肝機能の指標として活用できないか検討した。

GOT が 80 未満と以上でグループ分けして解析したところ、GOT80 以上では 80 未満と比べ、ChE 活性の平均値に 30 程度の低い値を示したものの、有意差は認められなかった(図-6)。これは、GOT80 以上が 9 検体しかなかったことが原因であると考えられた。また、ビタミン A が欠乏値を示した個体も、4 検体と少なかった。

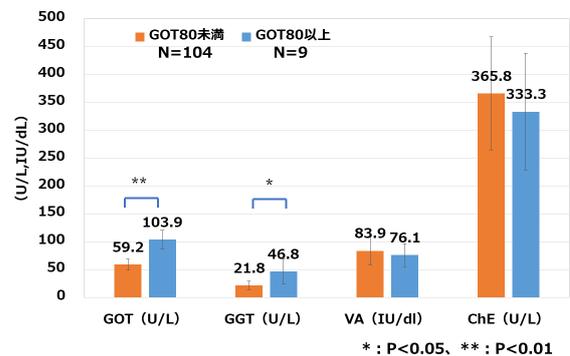


図-6 肝機能の指標の検討

マイクロプレートを用いた多検体処理方法を検討した。

従来の石英セルのキュベットを利用して行う方法をキュベット法とした。キュベット法では、調整した試薬を 30°C で 3 分インキュベートした後、血清を加え、石英セルのキュベットに移し、島津製作所の分光光度計の UV-1600 を使い、1 サンプルずつカイネティクスモードで吸光度を求め、算出する。検査時間は、1 サンプルにつき約 6 分かかった(図-7)。

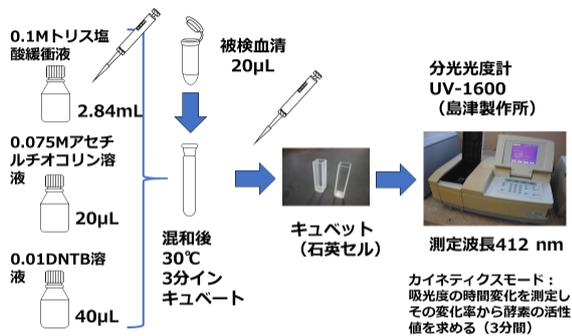


図-7 方法(キュベット法)

96 穴のマイクロプレートを利用する方法をマイクロプレート法とした。マイクロプレート法では、ディープウェルを用い試薬を反応させた後、マイクロプレートに移し、サーモフィッシャーのマルチマイクロプレートリーダーを用い、カイネティクスモードで吸光度を求め、算出する (図-8)。

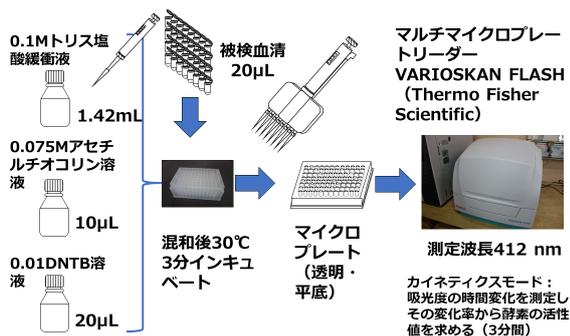


図-8 方法(マイクロプレート法)

キュベット法とマイクロプレート法の相関です。キュベット法がマイクロプレート法よりやや高い値を示したが、相関係数が 0.9992 で良好な相関が認められた (図-9)。

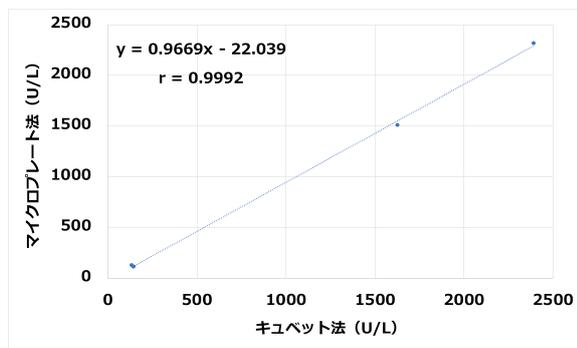


図-9 マイクロプレート法とキュベット法の相関

血清を段階的に希釈したときの吸光度の検量線は表のとおりで、相関係数は 0.9946 で、低い希釈倍率でややぶれたが、概ね良好であった (図-10)。

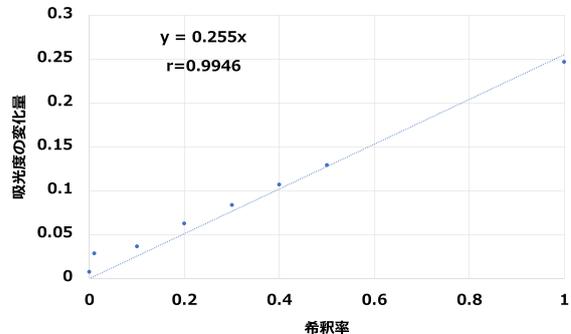


図-10 マイクロプレート法の検量線

異なる血清 3 検体の 8 回同時再現性は、変動係数 4.6%~7.3%であった。変動係数 10%未満で良好な再現性が得られた (表-2)。

表-2 再現性

	No.1	No.2	No.3
平均 (U/L)	1510.0	2317.5	127.8
標準偏差	110.4	156.1	5.9
変動係数 (%)	7.3	6.7	4.6

有機リン系薬剤による中毒では、コリンエステラーゼ活性を阻害することが知られている。そこで、有機リン系の薬剤である、フェンチオン (MMP) およびトリクロルホン (DEP) を血清に添加した時の活性阻害を調べた。

血清に MMP 及び DEP をそれぞれ最終濃度で 1、10、16、28、50 μg/ml をそれぞれ添加したとき、MMP では 28 μg/ml 添加で 24%、DEP では 10 μg/ml 添加で 30%の阻害率を示した (図-11)。

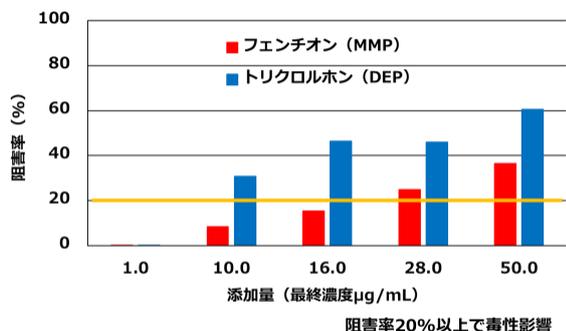


図-11 阻害率

検査時間を表-3に示す。キュベット法では、1検体ずつ操作を行うので、8検体では48分、96検体では576分かかる。一方マイクロプレート法では、一度で96検体分の処理ができるため時間短縮され、回答までの迅速化が図られる。

また、試薬のコストを1検体あたりで計算すると、キュベット法では1.71円、マイクロプレート法では0.86円となった。しかし、実際には、用事調整なので、1回分がコストとしてかかる(表-4)。

表-3 検査時間の比較

	キュベット法	マイクロプレート法
1検体	約6分	約6分
8検体	約48分	約6分
96検体	約576分 (10時間)	約6分

表-4 試薬のコスト

	1本	1回分	1検体あたり (キュベット法)	1検体あたり (マイクロプレート法)
Trizma base	3,000円 (100g)	36円 (90mL)	1.13円 (32検体分)	0.57円 (64検体)
ヨウ化アセチルチオコリン	23,100円 (25g)	200円 (10mL)	0.4円 (500検体)	0.2円 (1000検体)
5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)	27,000円 (25g)	43円 (10mL)	0.18円 (250検体)	0.09円 (500検体)
合計	53,100円	279円	1.71円	0.86円

3 まとめ及び考察

1つ目の検討事項の、ChE活性が肥育牛の評価方法のひとつとして活用可能かについては、肥育牛の月齢推移をみると、月齢とともに減少傾向で、TP、ALBと弱い負の相関が認められた。一方、GGT、GOT及びビタミンA、ビタミンEとは相関が認められなかったため、今後は、さらに検体数を増やし他の生化学検査項目との関連を調査するとともに、産肉成績等の関連も調査したい。

2つ目の検討事項として、ChE活性が肝機能障

害の指標として活用可能かについては、GOTが80以上と未満でグループ分けして解析したところ、有意差はなかったものの、ChE活性の平均値に30程度の差が認められた。有意差が認められなかった原因として、GGT、GOTの高値及びビタミンAの欠乏値を示した個体が少なかったことが考えられ、GGT等異常値を示す検体の検査数を増やした追加分析し、他の肝酵素より精度の高い指標としての可能性を検討したい。

マイクロプレート法によるChE活性の測定の検討では、キュベット法と良好な相関が認められ、検量線、再現性も良好であり、安価で多検体処理により短時間で測定が可能となり、検査系として充分利用できると思われた。また、検査時間の短縮により迅速化が図られる。

有機リン系薬剤の添加によりChE活性の阻害が認められ、中毒疑い事例のときの補助診断として有用であることが確認された。

今後、多検体処理が可能なマイクロプレート法を利用し、中毒のスクリーニング検査はもちろん、乳用牛の代謝プロファイルテストなど様々な検査を実施してデータを蓄積し、病性鑑定に活用したい。

4 参考文献

- (1) 楠文代ほか：蛍光法による血清コリンエステラーゼの活性測定. BUNSEKI KAGAKU, 39巻, 115-121 (1990)
- (2) 木村良男ほか：子牛の有機リン系殺虫剤中毒の発生例. 日本獣医師会雑誌, 41巻, 6号, 412-415 (1988)
- (3) 家畜衛生職員会：病性鑑定マニュアル第4版, 564 - 565 (2016)
- (4) George L. Ellman : A NEW AND RAPID COLORIMETRIC DETERMINATION OF ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY. Biochemical Pharmacology, Vol. 7, 88-95 (1961)