オキシダーゼ法による反芻獣の血清セルロプラスミン

印牧信行* 清水達丈* 近藤 伸* 内藤博之* 杉浦邦紀*

(昭和 59 年 10 月 19 日受理)

Serum Ceruloplasmin in Ruminants as Estimated
from Its Oxidase Activity
NOBUYUKI KANEMAKI, et al. (School of Veterinary Medicine,
Azabu University, Sagamihara, Kanagawa 229)

SUMMARY

Serum and blood samples were collected from 40 steers of 1, 3, 6 or 12 months old and two male newborn goats. Ceruloplasmin was measured with its oxidase activity as an indicator. In the steers, serum ceruloplasmin increased with growth and was correlated significantly ($p < 0.01$) with serum copper, iron, total protein and hemoglobin. In the goats, serum ceruloplasmin increased gradually after birth for 32 days of observation.

要 約

育成雄子牛における血清セルロプラスミン (Cp) の加齢変動を追求し、また血清 Cp の血清銅、血清鉄、血清総蛋白ならびにヘモグロビンとの関連について検討した。供試血清および全血は、1 カ月齢、3 カ月齢、6 カ月齢および 12 カ月齢の雄子牛各 10 頭より採取した。また、出生日より 32 日齢まで雄子山羊 2 頭について血清 Cp の変動を観察した。血清 Cp 定量法については、oxidase 法を用いた。その結果、雄子牛では、血清 Cp は加齢にともない漸増し、また血清銅、血清鉄、血清総蛋白およびヘモグロビンとの間に、危険率 1% で相関が認められた。また、子山羊では血清 Cp は緩慢ながら漸増傾向を示した。

セルロプラスミン (Cp) は、肝臓で合成される血清蛋白で、銅の運搬、貯蔵鉄動員作用を有することが知られ、さらに鉄代謝、過酸化物の処理、造血への関与といった生理作用が解明されてきた⁷⁾が、家畜における報告例は少ない^{2,9)}。そこで著者らは、簡便かつ容易に、また短時間で操作可能な oxidase 活性を利用した Cp 測定法^{4,6)}を用い、育成雄子牛における血清 Cp の加齢変動と、Cp と関連ある血液因子との関係を検討した。また雄山羊の出生後の Cp 変動についても測定した。

1. 材料および方法

1) 供 試 材 料

栃木県下の某育成牧場で肥育されている 1 カ月齢、3 カ月齢、6 カ月齢および 12 カ月齢各 10 頭、計 40 頭のホルスタイン種雄子牛の頸静脈より 20 ml 宛採血し、血清および全血試料とした。また、当研究室で継代繁殖している山羊より出生した雄子山羊 2 頭について出生日

より 32 日齢まで連日頸静脈より 2 ml 宛採取し、血清試料とした。

2) Cp 測 定 法

Oxidase 法によって測定した^{4,6)}。すなわち、1.5 M-酢酸緩衝液 pH 5.2 (エチレンジアミン四酢酸 2 ナトリウム : EDTA・2Na 15 mg/l を含む) 1 l 中に p-フェニレンジアミン・2 塩酸塩が 0.1% になるように調整した基質液 1 ml を 37℃ 5 分間加温した後、被検血清 0.1 ml を加え、37℃ 15 分間加温し、反応停止液として、0.02% 窒化ナトリウム液 5 ml を加え、血清ブランクに対し 540 nm で吸光度を測定した。

しかし、被検血清として牛血清を用い測定した場合、Cp 値が著しく低値を示すので、測定法について、緩衝液中の EDTA・2Na 濃度および緩衝液の pH と Cp-oxidase 活性値との関係を検討し、若干の修正を加えて Cp の測定をした。

測定吸光度の単位への換算は、Rice の方法⁹⁾にしたがった。すなわち、Bandrowski's base (Research Organics 社製) の検量線 (図 1) を作成し、これより血清 1 l に

* 麻布大学獣医学部 (神奈川県相模原市淵野辺 1-17-71)

つき、毎分当たり形成される $1\mu\text{M}$ の Bandrowski's base 量を 1 単位 (mU/ml) として、単位への換算を行った。分光光度計は、CL-720 型島津マイクロフロー分光光度計 (島津製作所製) を使用した。

3) 血中諸因子の測定

血清銅は、Cu-Test (和光純薬製) で測定し、血清鉄、血清総蛋白およびヘモグロビンは、RaBA-Super System

図1 Bandrowski's Base による検量線

図2 血清セルロプラスミン・オキシダーゼ活性の EDTA-2Na 濃度に対する影響

(中外製薬製) を用いて測定した。

2. 成績

1) Cp 測定法の検討

緩衝液中の EDTA・2Na 濃度に対する牛血清 Cp-oxidase 活性の変化と各ブランク値を図2に示した。Cp-oxidase 活性は、0~1.5 mg/l の濃度間でほぼ一定の値を示し、それぞれの希釈段階間には、統計学的有意差は認められなかった。これに対し、15 および 150 mg/l の濃度の場合では、明らかに Cp-oxidase 活性に対して抑制作用がみられた。いっぽう、ブランク値は 0~1.5 mg/l

図3 血清セルロプラスミン・オキシダーゼ活性の緩衝液 pH に対する影響

図4 血清希釈系列におけるセルロプラスミン・オキシダーゼ活性の反応性

図5 子牛血清セルロプラスミンの加齢変動

図6 子山羊血清セルロプラスミンの出生後の変化

図7 血清セルロプラスミンの血清銅、血清鉄、ヘモグロビンならびに血清総蛋白との相関性

の濃度間で漸次減少する傾向がみられたものの、1.5～150 mg/l の濃度間でほぼ一定の値を示した。以上より、緩衝液中の EDTA・2Na の濃度を 1.5 mg/l として測定した。

次いで、緩衝液の pH の影響を図 3 に示した。pH 4.8～5.6 の範囲のうち、pH 4.8～5.2 にかけて漸次活性値の上昇傾向がみられたが、pH 5.2～5.6 の間では、酵素活性値がプラトーに達した。このように活性値間に統計学的有意差は認められなかった。したがって、緩衝液の pH は 5.2 とした。本測定法における実測上の酵素反応は直線性を示した (図 4)。

2) 牛および山羊血清 Cp 値の加齢変動

牛血清 Cp 値の加齢変動を図 5 に示した。Cp 値は加齢にともない漸増し、統計学的には 1 カ月齢と 6 カ月齢および 12 カ月齢の間、3 カ月齢と 12 カ月齢の間、6 カ月齢と 12 カ月齢の間に危険率 1% で有意な増加が見られた。いっぽう、雄子山羊 2 頭について出生日より 32 日齢まで連日、Cp 値を測定した結果 (図 6)、多少増減があるものの経時的には、漸増傾向がみられた。

3) 牛の血清 Cp と血液諸因子との関係

血清 Cp は、血清銅をはじめ、血清鉄、血清総蛋白およびヘモグロビンとの間に、それぞれ危険率 1% で正の相関が認められた (図 7)。

3. 考 察

測定した牛血清 Cp-oxidase 活性値が抑制された原因は、緩衝液中の EDTA・2Na 濃度の不適当によるものであることが本実験によって判明した。RICE⁵⁾ によれば、EDTA・2Na の添加理由は、主に第 2 銅イオンの痕跡に基づく基質の非酵素的酸化作用を抑制することにあるという。本実験でも種々の EDTA・2Na 濃度に基づくブランク値より、基質の非酵素的酸化の抑制効果が、EDTA・2Na にあることを得たが、この EDTA・2Na の作用は、その濃度によって血清 Cp-oxidase 活性自体にも影響する結果を得た。本実験は、この EDTA・2Na の最適濃度を定めるとともに、牛と山羊の血清 Cp の測定が可能になった。

人の血清 Cp 値は、初生時に低く、以後経時的に漸増する⁷⁾ が、羊では加齢にともない様な傾向はみられないことが報告されている²⁾。しかし、本実験から牛と山羊の血清 Cp は、加齢にともない漸増することが明らかになった。いっぽう、人新生児では成人に比べ、Cp に対するアポ Cp の割合は高いと報告されている⁸⁾。ちな

みに、アポ Cp は oxidase 活性を持たず、しかも銅を含有しないものの、免疫学的に Cp と共通の抗原を持つことが知られ、概して免疫学的測定法による Cp 値は、Cp とアポ Cp の和として得られる^{2,7)}。Cp は血清中で唯一の oxidase 活性を持つ血清蛋白であることから、本実験は Cp のみを測定したものと推察される。

血清 Cp は、血清銅と強い相互依存性があることが知られ^{3,4)}、本実験でも血清 Cp と血清銅との間に有意な正の相関が得られた。血清銅は、血液試料の採取・保存・輸送に際し、銅混入への注意を払わねばならない点で、また測定時に除蛋白操作が入るなどの時間を要する点で問題があるが、いっぽう血清 Cp-oxidase 活性は、冷蔵庫内で少なくとも 1 週間は安定であること、また血清銅値と血清 Cp 値の間に正の相関があることを勘案すれば、むしろ血清 Cp 測定の方が、銅欠乏症に対する臨床診断法として応用価値は大であると考えられる。

最近、Cp の鉄代謝への関与が明らかにされつつあり、たとえば、長期間銅欠乏食を与えた豚では、低 Cp 血症とともに低鉄血症を引き起こし、この動物に無機銅を与えれば、血清 Cp 上昇にともなって血清鉄が上昇することが報告されている⁹⁾。本実験でも血清鉄およびヘモグロビンは、いずれも Cp との間に正の相関が認められ、Cp の鉄代謝との関連が示唆された。また、本実験から Cp は血清総蛋白とも関連することが示唆されたものの、その意義は明らかではない。

文 献

- 1) KASPER, C. B. and DEUTSCH, H. F.: *J. Biol. Chem.*, 238, 2343～2350 (1963).
- 2) LORENTZ, P. P. and GIBB, F. M.: *N. Z. Vet. J.*, 23, 1～3 (1975).
- 3) RICE, E. W.: *Clin. Chem. Acta*, 5, 632～636 (1960).
- 4) RICE, E. W.: *Anal. Biochem.*, 3, 452～456 (1962).
- 5) ROESER, H. P., LEE, G. R., NACHT, S., et al.: *J. Clin. Invest.*, 49, 2408～2417 (1970).
- 6) 桜林郁之介: 臨床検査アニマル化学編, 茂手木皓喜編, 初版, 182～183, テクノ (1979).
- 7) 清水盈行: 血漿蛋白と免疫グロブリン, 新版日本血液学全書刊行委員会編, 新版, 47～70, 丸善 (1981).
- 8) SHOKEIR, M. H. K.: *Clin. Genet.*, 2, 223～227 (1971).
- 9) SRIVASTAVA, K. B. and DWARAKNATH, P. K.: *Indian J. Anim. Sci.*, 41, 1044～1046 (1971).