

研究課題：牛血中ハプトグロビン測定法の迅速化
(674201)

担当部署：根釧農試 研究部 乳牛繁殖科

協力分担：(独) 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所 生産病研究チーム

予算区分：外部資金 (JST)

研究期間：2008年度 (平成20年度)

1. 目的

牛の急性相蛋白であるハプトグロビン (Hp) は、子宮炎、乳房炎、蹄病および呼吸器病などで上昇することが報告され、これら炎症性疾患の診断あるいは治療方針の決定などを行うための指標の1つとして利用が可能と考えられている。そこで、Hpを安価、迅速かつ簡易に測定するために、血中Hpをヘモグロビン (Hb) と結合させ、その酵素活性を発色により測定するヘモグロビン結合アッセイ (HBA) 法 (従来法) の迅速化を図る。

2. 方法

1) HBA法の迅速化

Hpと結合しなかった (遊離) Hbの不活性化に使用する酸性緩衝液の種類、pH、反応時間およびHpとHbの結合のための反応時間について検討を行った。

2) 迅速HBA法の測定精度の検証

迅速HBA法と一般的な測定法である一元放射免疫拡散 (SRID) 法との相関性、再現性および希釈血清におけるHp濃度の直線性について検討するとともに、Hp濃度の陽性と陰性の境界値の解析を行った。また、Hp陰性血清および蒸留水のHp濃度 (ブランク値) の測定を行うとともに、Hp濃度の測定に及ぼす血液抗凝固剤の影響も検討した。

3. 成果の概要

1) 遊離Hbの不活性化に使用する酸性緩衝液として、pH3.6の条件で酢酸緩衝液およびクエン酸緩衝液それぞれの吸光度が安定するまでに要した反応時間を比較したところ、蒸留水では酢酸緩衝液は15分、クエン酸緩衝液は5分であった (図1)。同様に、クエン酸緩衝液のpHを比較したところ、pH3.2、3.4および3.6で5分、pH3.8で10分、pH4.0で20分であった。pH3.6のクエン酸緩衝液を用いた場合、HpとHbの結合に要した反応時間は0分であった (図2)。以上の結果と操作手順を考慮し、遊離Hbの不活性化のための酸性緩衝液としてpH3.6のクエン酸緩衝液を使用して遊離Hbの不活性化のための反応時間を15分とし、HpとHbの結合のための反応時間を3分にすることでHp濃度の測定時間を従来法の75分間から22分間に短縮できた (図5)。

2) 迅速HBA法とSRID法によるHp濃度の相関係数 (r) は0.98と高かった (図3)。同時再現性およびプレート間再現性試験における変動係数はそれぞれ2.17~3.28%および3.61~7.84%と良好であった (表1)。また、2~16倍に希釈した血清においても高い直線性が得られた。迅速HBA法によるHp濃度の陰性と陽性の境界値は152 μ g/mlであった (図4)。Hp陰性血清および蒸留水のHp濃度は37~127 μ g/ml および0~110 μ g/ml と152 μ g/ml未満であったので、バックグラウンド値として問題ない濃度と考えられた。また、測定材料として血清のほかヘパリン、EDTA血漿を使用できることが確かめられた。これらのことから、迅速HBA法は牛血中Hp濃度の測定に十分な精度と再現性を持つと考えられる。

以上の結果から、迅速HBA法は、従来法 (HBA法) と比較してHp濃度の測定時間が大幅に短縮 (75分間→22分間) され、牛血中Hp濃度の測定に十分な精度と再現性を持つことが示された。

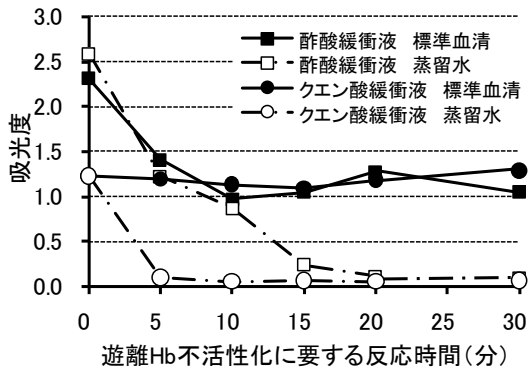


図 1. 酢酸緩衝液およびクエン酸緩衝液における吸光度の推移(緩衝液のpHは3.6)

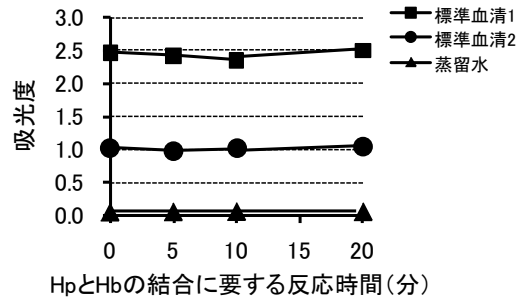


図 2. Hp と Hb の結合に要する反応時間が吸光度に及ぼす影響

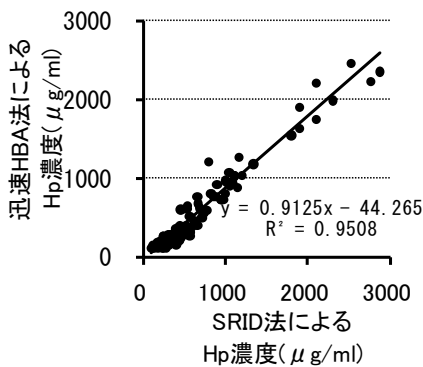


図 3. 迅速 HBA 法と SRID 法による Hp 濃度の相関 (n=99)

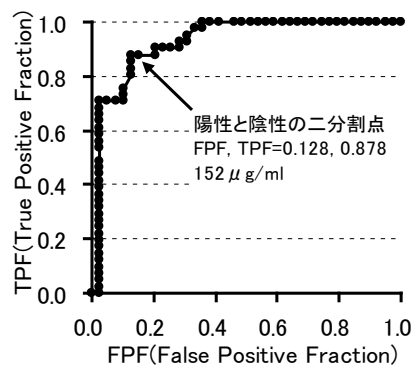


図 4. 迅速 HBA 法による Hp 濃度の ROC 解析結果

表 1. 迅速HBA法の再現性

	Hp濃度の平均(μg/ml)	標準偏差	変動係数
同時再現性(1標本同時10回測定)			
血清1	327	10.7	3.28
血清2	565	18.3	3.23
血清3	1075	23.3	2.17
プレート間再現性(12枚測定)			
血清1	352	27.6	7.84
血清2	545	33.0	6.05
血清3	1022	36.8	3.61

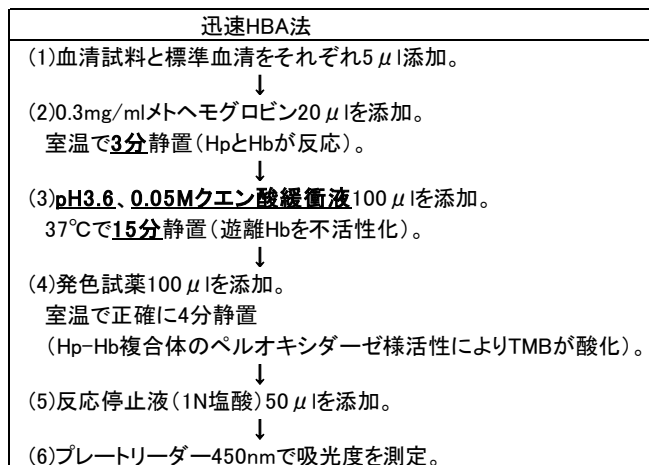


図 5. 迅速 HBA 法の操作手順の概要
測定は2重測定とする。

* 太字下線が検討した箇所(従来法→迅速 HBA 法;
10分→3分、酢酸緩衝液→クエン酸緩衝液、60分→15分)
多くのプレートリーダーに対応するため反応停止液を使用した。
それにより発色試薬の静置時間が5分から4分となった。

4. 成果の活用面と留意点

- 1) 迅速 HBA 法は、疾病罹患牛における Hp の動態解明などに利用できる。
- 2) 標準血清や Hb 試薬等を自作する必要があるため、それが可能な機関での使用に限られる。

5. 残された問題とその対応

乳牛の炎症性疾患における診断および治療方針の決定などの一助とするため、健康牛における Hp 濃度の基準値を作成するとともに、疾病罹患牛における Hp の動態を解明する。