

牛の炎症指標である血中ハプトグロビンを簡易・迅速・安価に測定する方法 (牛血中ハプトグロビン測定法の迅速化)

乳牛繁殖科 中村正明

(E-mail: nakamura-masaaki@hro.or.jp)

1. 背景・ねらい

炎症性疾患を診断するために白血球数などの血液検査が行われています。近年、牛の急性相蛋白であるハプトグロビン (Hp) が、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、白血球数検査に加え、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Hpの利用が可能と考えられています。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) の迅速化を検討しました。

2. 技術内容と効果

測定法に関する条件のうち、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い、測定の迅速化を検討しました。

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分でした (図1)。

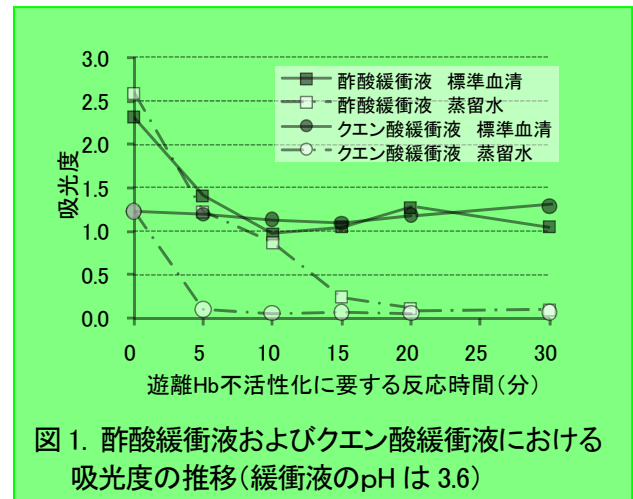


図1. 酢酸緩衝液およびクエン酸緩衝液における吸光度の推移 (緩衝液のpHは3.6)

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分でした。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分でした (図2)。

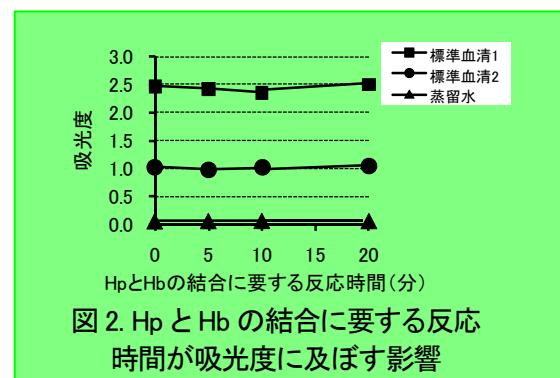
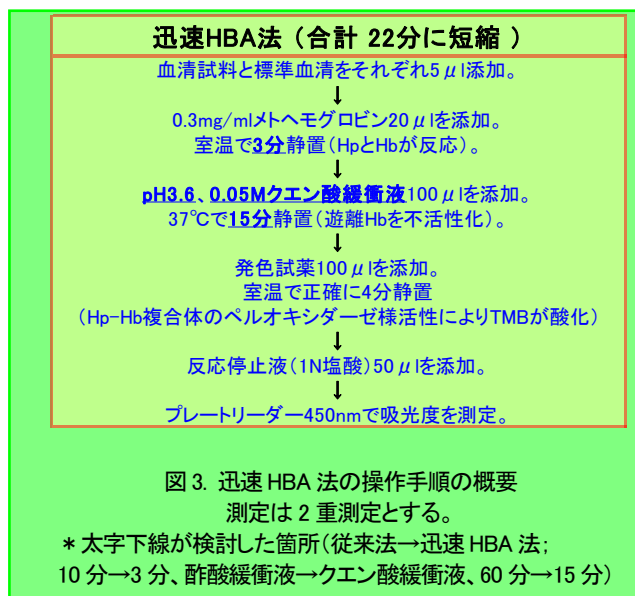


図2. HpとHbの結合に要する反応時間が吸光度に及ぼす影響

以上の試験結果と操作手順を考慮して、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分にするこゝで、従来法のHp濃度の測定時間を75分間から22分間に短縮できました(図3)。



また、迅速化した測定法の測定精度の検証を行うために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いました。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ました。

迅速HBA法とSRID法によるHp濃度の相関係数(r)は0.98と高く(図4)、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%と良好でした(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ました。迅速HBA法によるHp濃度の陰性と陽性の境界値は152μg/mlでした。Hp陰性血清および蒸留水のHp濃度は37~127μg/mlおよび0~110μg/mlと152μg/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ました。また、HbAの測定材料には血清のほかヘパリン、EDTA血漿は使用可能で、血糖管血漿は不適であることが確かめられました。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ました。

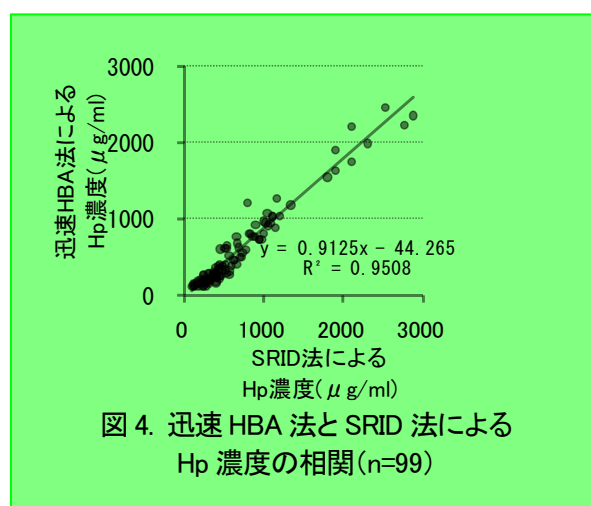


表1. 迅速HbA法の再現性

	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

3. 留意点

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ます。また、標準血清やHb試薬等を自作する必要があり、それが可能な機関での使用に限られます。