

原 著

血清希釈にマイクロプレートを用いた 直接蛍光法によるレチノール測定の有用性

大山 貴行¹⁾, 八重畑みどり¹⁾, 佐藤 敦²⁾, 木戸口勝彰²⁾

要 約

血清レチノール濃度の把握は肥育牛の肉質を向上させる観点から有益である。通常は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法により測定されるが、迅速性、コスト面で改善の余地が残されている。今回、マイクロプレートを用いた直接蛍光法 (マイクロプレート法) を応用し、HPLC法と比較検討した。マイクロプレートとHPLC法によるレチノール濃度とレチノール結合蛋白との相関係数はそれぞれ0.875と0.867であった。マイクロプレート法の反復測定における変動率は3%未満であり、HPLC法と比べて処理時間は1/60に短縮し、試薬代も1/10に削減された。以上より、マイクロプレート法の精度・再現性の高さ、迅速性およびコスト面における有用性が確認された。

キーワード：肥育牛，直接蛍光法，マイクロプレート，レチノール血清

黒毛和種肥育牛の肉質向上，とくに脂肪交雑率を高める目的でビタミンAを制限する給餌方法が推奨されている [8]。一方，過度の制限給餌はビタミンA欠乏症を招き，筋間水腫等による生産性阻害要因にもなり得る [6, 7]。他県の肉牛生産地域と同様に，管内でも肥育牛の肉質を向上させる目的で代謝プロファイルテスト (MPT) を活用する農場がみられる。MPTにおいて生産者が最も知りたい情報は血清レチノール濃度であり，その測定には一般的に高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法が用いられる。HPLC法は精度の高い検査法であるが，検査に多くの時間と経費を要することから，多検体の検査への活用には難点を有する。

直接蛍光法はFutterman [2] により開発され，ヒト症例に実用化されている [2, 3]。

宮本ら [4]，森脇 [5] および山崎と山本 [9] は同法を牛症例に応用している。これらの応用はいずれも試験管で希釈された血清を測定する方法であるが，今回著者らは血清の希釈作業を効率的に行う目的で，96穴マイクロプレートを用いた。HPLC法と比較することより，マイクロプレート法の精度，再現性および実用性を検討した。

材料および方法

平成15年5月から12月にかけて管内11戸の黒毛和種肥育農場から295頭の血清あるいは血漿を得た。

マイクロプレート法ではマイクロプレートに被検血清10 μ lと0.1M塩化ナトリウム190 μ lを加え，試験管では被検血清0.1mlに0.1M塩化ナ

1) 岩手県中央家畜保健衛生所 2) 岩手県南家畜保健衛生所

トリウム1.9mlを加えて、それぞれ希釈した。マイクロプレート希釈血清あるいは試験管希釈血清はマイクロプレート1穴あたり200 μ lを、蛍光マイクロプレートリーダー^{a)}および解析ソフト^{b)}を用い、330nmの励起および465nmの蛍光波長の条件下で計測した。HPLC測定は外部検査機関に検査を依頼した。また、牛レチノール結合蛋白質 (RBP) の測定には市販キット^{c)}を使用した。

上記検査値をそれぞれ回帰分析し、HPLC法で得たレチノール濃度と蛍光強度値から検量線を作成し、マイクロプレート法によるレチノール濃度測定法を検討した。

再現性および実用性：レチノール濃度の異なる10検体を用いてマイクロプレート法により、それぞれ10回反復して蛍光強度を測定した。ま

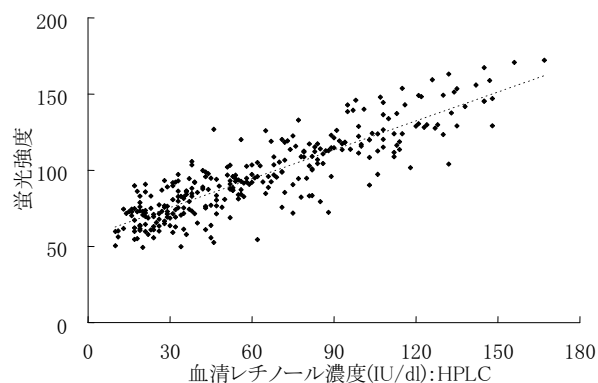


図1 HPLCとの相関

$$y = 0.634x + 56.404 \quad (n = 295, r = 0.875, p < 0.01)$$

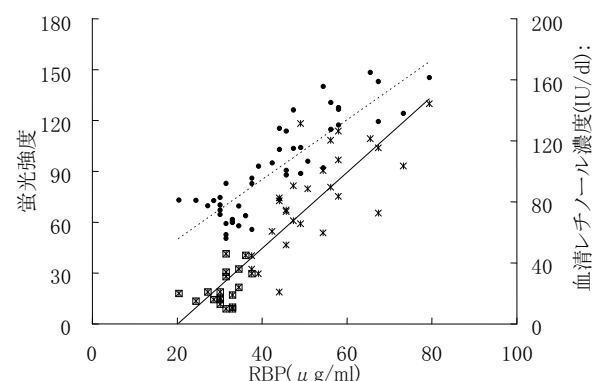


図2 RBPとの相関

● 蛍光強度 : $y = 1.780x + 14.230$ ($n = 46, r = 0.867, p < 0.01$)

* HPLC : $y = 2.503x - 50.614$ ($n = 46, r = 0.875, p < 0.01$)

た、測定に要する時間と試薬代を試算した。HPLC法については山崎らの報告 [9] を参考にし、100件体当たりの測定時間および経費を算出した。

成績

マイクロプレート法による蛍光強度とHPLC法により得たレチノール濃度の回帰分析により、0.875 ($n = 295, p < 0.01$) の相関係数が得られた (図1)。得られた検量線から次式により被検血清のレチノール濃度を算出した。

$$\text{レチノール濃度 (IU/dl)} = \frac{(\text{蛍光強度} - 56.404)}{0.634}$$

$$(\text{相関係数} 0.875, p < 0.01)$$

RBPとHPLC法によるレチノール濃度の相関係数は0.875 ($n = 46, p < 0.01$)、RBPとマイク

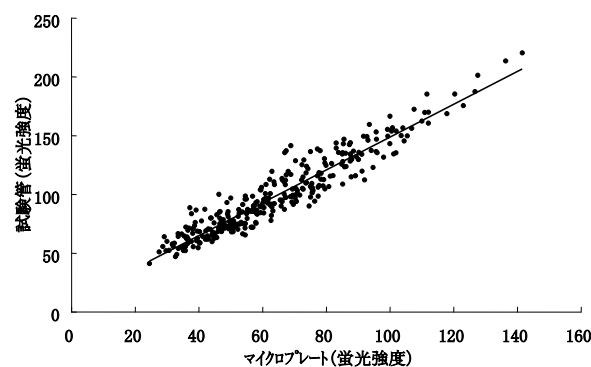


図3 希釈方法との相関

$$Y = 1.397X + 9.083 \quad (n = 295, r = 0.949, p < 0.01)$$

表1 再現試験 (反復測定)

番号	平均蛍光強度	標準偏差	CV(%)
1	53.505	1.51	2.81
2	61.706	1.14	1.85
3	62.533	1.15	1.83
4	94.985	1.37	1.44
5	96.324	1.80	1.87
6	108.360	1.73	1.60
7	118.516	2.00	1.69
8	126.013	1.57	1.25
9	138.132	1.28	0.93
10	151.764	1.28	0.85

同一検体を10日測定

a) GeminiXS, 日本モレキュラー・デバイス社, 東京. b) SOFTmaxPRO, 日本モレキュラー・デバイス社, 東京.
c) 牛レチノール結合蛋白SRID定量キット (単純放射状免疫拡散法), ㈱ヤガイ, 東京.

ロプレート法による蛍光強度との相関係数は0.867 (n=46, p<0.01) であり, RBPと両者間に高い正の相関が認められた (図2).

試験管による希釈とマイクロプレートによる希釈との検査値の相関係数は0.949 (p<0.01) であった (図3).

再現性および実用性: 得られた値の変動率 (CV) は, 0.85~2.81%であった (表1). HPLC法に要する時間は25~33時間であり, マイクロプレート法では30分であった. 経費はHPLC法の1,660円に対し, マイクロプレート法では147円であった.

検査値を生産者に還元するまでの日数は, HPLC法では外部検査機関に検査を依頼することから概ね3週間を要するが, 本法は家畜保健衛生所で多くの作業を行うことから, 2~3日で還元することができた. これにより, 早期治療等による欠乏症予防が可能となった.

考 察

直接蛍光法は紫外線照射により波長の長い蛍光を発するレチノールの特性を利用して, 供試材料が発する蛍光の強さ (蛍光強度) をレチノール濃度に換算する簡易法である [2]. 分光光度法とHPLC法は有機溶媒によるレチノールの抽出過程を要するが, 本法は水溶液中で蛋白と結合したレチノールを測定することから単体のレチノールに比べて約10倍強い蛍光強度が得られ, 抽出作業を必要としない [4]. 本法の牛症例への応用を宮本ら [4], 森脇 [5] および山崎と山本 [9] が報告しているが, 著者らは当該法を更に簡易化した. すなわち, これまでの報告では血清希釈を試験管で行っていたが, 今回, 96穴マイクロプレートに変更し, その有用性について検討した.

高い精度が実証されているHPLC法により得た血清レチノール濃度とマイクロプレート法による蛍光強度とは, 相関係数が0.875の高い正の相関を示し, この相関係数は宮本ら [4],

山崎および山本 [9] による試験管法やHPLC法とほぼ同等であり, マイクロプレート法の精度の高さが確認された. また, RBPとHPLC法によるレチノール濃度との相関は0.875であり, RBPとマイクロプレート法の蛍光強度との相関は0.867であり, マイクロプレート法による蛍光強度とレチノール濃度との正の相関性を間接的にも裏付けられた. これらのことから検量線で得られたレチノール濃度は十分に評価できる値であると考えられた. 試験管による希釈とマイクロプレートによる希釈の蛍光強度の相関係数は0.949であり, 検査値は血清の希釈方法の相違により著しく影響されないことが示唆された.

レチノール濃度の異なる検体を反復測定した際の変動率は0.85~2.81%であり, 高い再現性が認められた.

実用性に関し, HPLC法との比較により, 測定に要する時間は概ね1/60に短縮され, 試薬代は概ね1/10に削減された. マイクロプレート法は短時間で多検体を処理することも可能であり, 迅速かつ頻回の検査を望む生産者のニーズに対応し得る実用性を有すると考えられた. マイクロプレート法の有効な活用法として, 個々の疾病診断としてではなく, 群管理の指標としての利用が考えられた. また精度を検証する目的で, 測定時毎にレチノール濃度既知血清を検体に組み入れて測定ことも必要である.

引用文献

- [1] Driskell W J: Clin.Chem., 32(5), 867-869 (1986)
- [2] Futterman S, Swanson D, Kalina RE.: Invest. Ophthalmol., ;14(2), 125-30 (1975)
- [3] John C S: J. Biochem., 253(18), 6432-6436 (1978)
- [4] 宮本亨, 太田洋一, 森脇俊輔, 高橋雄治, 大橋博: 第135回獣医学会学術集会要旨 (2003)

- [5] 森脇俊輔：平成15年度家畜衛生研修会抄録（生化学部門）
- [6] 関根貴司：獣畜新報, 50, 917-920(1997)
- [7] 甫立京子：家畜診療, 51(1), 5-17 (2004)

- [8] 甫立京子：獣畜新報, 52(3), 221-224 (1999)
- [9] 山崎政彦, 山本安則：第44北海道家畜保健衛生業績発表会抄録 (1996)

文献抄録

飼育羊と山羊におけるAAアミロイドーシスの病理学

Mensua C, Carrasco L, Bautista M J, Biescas E, Fernandez A, Murphy C L, Weiss D T, Solomon A and Lujan L (University of Zaragoza他 *Vet Pathol* 40 71-80, 2003)

我々は、AAアミロイドーシスに罹患した小型反芻獣における主な病理学的変化および傷害された蛋白の部分的なシーケンスを記述する。21頭の羊と1頭の山羊が全身性アミロイドーシスと一致する腎臓の肉眼病変を元を選別された。利用可能な組織材料は組織学的、免疫組織学的、超微形態学手法により検索された。腎臓は肉眼的に散在性、粟粒大の黄白色巣を伴った退色皮質表面と断面で直線状の黄白色線条の病変により特徴付けられた。壊疽性肺炎が21頭中16頭の羊（76.2%）に観察されたほか、他の慢性炎症も認められた。アミロイドはコンゴレッド染

色により全ての肉眼的罹患腎臓に検出された。最も顕著な病変は糸球体で、検索した動物の95.5%が罹患していた。コンゴレッド染色性沈着物は尿細管間質（68.2%）と髓質（57.1%）にも認められた。全てのアミロイド罹患動物は近位尿細管病変を示しており、腎肉眼病変を反映して直径の増大と硝子滴変性に特徴づけられた。組織学的にアミロイドは血管、脾臓、肝臓、リンパ節、消化管、副腎にもみられた。全てのアミロイド沈着物は、偏光で黄緑色の複屈折を示し、山羊アミロイド抽出物に対する抗血清は、羊と山羊の複屈折、コンゴレッド染色性沈着物に特異的に反応した。超微形態的に、これらの沈着物は直線で、枝分かれのない線維の塊を形成しており、糸球体毛細血管の基底膜とメサングウムに優勢に局在していた。羊と山羊における蛋白の部分的シーケンスは以前に報告された羊血清アミロイドAのシーケンスと高度相同性を示していた。

（岩手大学獣医病理学研究室）