☐ 内 科 学

原 著

飼育下霊長類のドライケミストリーによる CRP 測定の臨床診断への応用

村田 浩一

神戸市立王子動物園 〒657 神戸市灘区王子町3-1
(1996.11.27 受付, 1997.12.12 受理)

Assay of CRP Using Dry-chemistry as Clinical Diagnosis for Captive Non-human Primates

Koichi MURATA

Kobe Municipal Oji Zoo
Oji-cho 3-1, Nada-ku, Kobe 657, Japan

ABSTRACT. Non-human primate CRP (C-Reactive Protein) was analyzed using an auto blood analyzer with a commercially available immune multi-layered film sticking human CRP monoclonal antibody. Sixty seven serum or plasma samples analyzed for this study were collected from 47 captive primates belonging to 12 species of 6 genus. As CRP values from healthy primates belonging to the genus *Macaque*, *Cercopithecus*, *Hylobates* and *Pan* were below 1.0 mg/dl, it was suggested that 1 mg/dl should be the threshold for this method for these four genus. Assaying primate CRP with anti-human CRP antibody using an auto blood analyzer is fast and easy, and is useful as a clinical diagnostic tool for captive primates. However, some diseased primates suffering from enteritis, hepatitis and others showed low CRP values (<1.0 mg/dl). Baboons also showed over 1.0 mg/dl of CRP values in spite of being in good health. Therefore, attention and further investigation for each species or genus is needed before this method is put to practical use.

Key words : C-reactive protein, CRP, dry-chemistry, primates

Jpn. J. Zoo Wild. Med. 2(1) : 53-57, 1997

序 論

炎症時に著明に変動する血清学的臨床検査項目は一般に「炎症マーカー」と呼ばれ、疾病診断や経過観察に利用されるが、緊急検査の重要な一項目ともなっている [1,2]。その中で急性炎症の場合に増加するヒト急性期蛋白質の代表的なものとしてはC反応性蛋白質 (CRP) があり、ヒトで臨床診断指標として使用されている [1,2]。獣医領域でのCRP測定の臨床への応用は主にイヌで試みられ、抗イヌCRP抗体を用いた測定の報告では臨床診断指標としての

有用性が示唆された [2-4]。

CRPはCaイオンの存在下で肺炎球菌のC-多糖体と沈降反応を起こす物質であり、肺炎球菌感染の患者血清中に初めて発見された[2]。CRPはヒト以外の哺乳類や魚類、さらにはカブトガニ (*Limulus polyphemus*) から検出されており、それらのアミノ酸構造の比較などから進化的に共通の起源をもつものと考えられている [5,6]。アミノ酸配列に共通性をもつことから抗原性が交差する可能性があり、抗ヒトCRP抗体を用いて近縁種のCRP測定が可能であると推察される。

村田 浩一

表 1 供試検体

属	種 (学名)	個体数	件数
マカク	ベニガオザル (<i>Macaca arctoides</i>)	7	10
	カニクイザル (<i>Macaca fascicularis</i>)	2	2
	ニホンザル (<i>Macaca fuscata</i>)	1	1
	クロザル (<i>Macaca nigra</i>)	1	1
ヒヒ	マントヒヒ (<i>Papio hamadryas</i>)	7	7
オナガザル	ミドリザル (<i>Cercopithecus aethiops</i>)	1	1
	ブラッサゲノン (<i>Cercopithecus neglectus</i>)	6	6
	ショウハナジロゲノン (<i>Cercopithecus pataurista</i>)	1	3
コロブス	アビシニアコロブス (<i>Colobus guereza</i>)	1	3
テナガザル	シロテナガザル (<i>Hylobates lar</i>)	4	11
	フクロテナガザル (<i>Hylobates syndactylus</i>)	3	5
チンパンジー	チンパンジー (<i>Pan troglodytes</i>)	13	17
6 属	12 種	47 個体	67 検体

近年、ヒト CRP 測定に免疫多層フィルムを用いた自動分析法 (ドライケミストリー) が開発され、迅速および簡便な検査が可能となっている [7]。動物園では多種類の霊長目の動物を診療する機会が多いが、個々の種について見た場合に参考となる臨床検査情報は意外と少ない。CRP 測定を飼育下霊長類の臨床に応用できれば、炎症性疾患の早期発見に役立てることができる。しかし、サル CRP に関する報告はきわめて少なく [8]、知る限りにおいて霊長類臨床診断への CRP 測定の応用に関する報告はない。そこで、抗ヒト CRP モノクローナル抗体を用いた自動分析法によるサル CRP 測定を検討した。

材料と方法

検査試料

神戸市立王子動物園で飼育された霊長目 6 属 12 種 47 個体を用いた (表 1)。個体の性比は 25:22 (雄:雌) であった。採血は健康および疾病個体では小伏在静脈もしくは大腿静脈から行い、一部はヘパリンを加えた。死亡個体では可能な限り死後短時間内に心臓採血した。試料は血清もしくは血漿として凍結保存 (-85°C) し、検査直前に室温解

凍した。健康個体および疾病個体 (疾病により死亡した個体を含める) から採取された試料数はそれぞれ 27 と 40 であった。種属の近縁度により抗ヒト CRP 抗体への親和性が異なることが推測されたため、健康時と疾病時の CRP 値の比較を属内で行った。

外科手術前後の CRP 動態をみるために、アビシニアコロブス (*Colobus guereza*) およびショウハナジロゲノン (*Cercopithecus pataurista*) 各 1 頭の手術個体について、術中 1 回と術後 2 回の採血を行った。ベニガオザル (*Macaca arctoides*) については術後 2 回の採血を行った。手術内容はそれぞれ咬傷部縫合、骨折部創内固定、帝王切開であった。

検査方法

CRP 測定にはヒト CRP 測定用免疫多層フィルム (富士ドライケムスライド CRP-S, 富士写真フィルム) および富士ドライケム 5500 V (富士写真フィルム) を用いた。本法は枯草菌アミラーゼ標識抗ヒト CRP モノクローナル抗体 (マウス) を用いた多層フィルム法による酵素免疫測定法を測定原理としている [7]。検体 10 μ l を専用希釈液で 21 倍に希釈した後フィルムに点着し測定した。測定上限値 (10

霊長類のCRP測定

表2 属別の健康個体および疾病個体のCRP値

属	診断	CRP 値 (平均±標準偏差 (mg/dl))	陽性数 (≥1.0 mg/dl)	陰性数 (<1.0 mg/dl)	Fisher's Exact P-Value
オナガザル (<i>Cercopithecus</i>)	健康	0.7±0.15	0	3	0.0333
	疾病	8.0±12.06	6	1	
ヒヒ (<i>Papio</i>)	健康	1.8±0.50	5	0	1.0000
	疾病	1.4±0.14	2	0	
マカク (<i>Macaque</i>)	健康	0.5±0.00	0	4	0.0350
	疾病	3.6±3.36	7	3	
テナガザル (<i>Hylobates</i>)	健康	0.6±0.13	0	5	0.0577
	疾病	1.6±1.64	6	5	
チンパンジー (<i>Pan</i>)	健康	0.6±0.16	0	10	0.0001
	疾病	11.0±15.60	7	0	

mg/dl)を超えた検体は適宜希釈して検査に供した。本法によるヒトCRP測定下限値は0.5 mg/dlであるため、これ以下の値を0.5 mg/dlとして扱った。ヘパリンによる測定値への影響は本法では認められていない[7]。なお、サルCRP標準血清を用いた確認は行わなかったため、検査値の単位(mg/dl)は便宜的なものとして表示した。

同時再現性

異なった濃度3種(低, 中, 高濃度)の各10検体を連続10回測定し再現性をみた。検体は低濃度(0.7 mg/dl)がベニガオザル, 中濃度(9.2 mg/dl)および高濃度(21.0 mg/dl)がチンパンジー(*Pan troglodytes*)のものであった。

他法との比較

チンパンジーの10検体を用いて免疫比濁法との相関を調べた。試薬はヒト用CRP-HAテストワコー(和光純薬工業)を用い自動分析装置(日立7150)で測定した。

統計的検定

CRP陽性値を境界とした場合の健康個体と疾病個体の差の検定には、フィッシャーの直接確率計算法(Fisher's exact probability test)を用いた。

結 果

CRP測定値

ヒヒ属を除いて健康個体のCRP値はすべて1.0 mg/dl未満であった。1.0 mg/dlを境界値とした場合、ヒヒ属とテナガザル属以外の3属では健康と疾病の間に有意な差がみ

られ、とくにチンパンジーで著明であった(表2)。ヒヒ属では健康個体が疾病個体よりも高値を示した。

疾病個体でCRP値1.0 mg/dl以下のものがマカク属で2個体, オナガザル属で1個体, テナガザル属で3個体認められた。それぞれの診断名とCRP値は、マカク属ニホンザル(*Macaca fuscata*)成雄の陰嚢ヘルニア(0.5 mg/dl)とベニガオザル成雌の妊娠(0.8 mg/dl), オナガザル属ブラッサゲノン(*Cercopithecus aethiops*)の若雄の肝炎(0.6 mg/dl), テナガザル属シロテナガザル(*Hylobates lar*)成雌の膣乳頭腫(0.5 mg/dl)と慢性下痢症(0.8 mg/dl)とフクロテナガザル(*Hylobates syndactylus*)の細菌性腸炎(0.5 mg/dl)であった。

アビシニアコロブスとショウハナジログネンに対して行った外科手術後のCRP値は増加し、術創の治癒とともに減少した。ベニガオザルでは帝王切開手術後に一時CRP値が上昇した後、減少が認められた(図1)。

同時再現性

再現性をみるために連続10回測定したCRP値の平均値±標準誤差および変動係数は、低濃度では1.1±0.21 mg/dlで19.2%, 中濃度では5.1±0.37 mg/dlで7.2%, 高濃度では9.0±0.55 mg/dlで6.1%と概ね良好であった。

他法との比較

チンパンジーにおける免疫比濁法と本法による測定値の相関はCRPが高濃度の場合、相関係数0.995であり、低濃

図1 3種のサルにおける術後のCRP値動態

度から中濃度では0.964であり、概ね良好であった。

考 察

野生動物は外見から病状を把握することが難しく、診断に要する医療情報はかなりの種で欠落している。これらのことが野生動物疾病の早期発見や経過観察を困難にしており、各種野生動物の疾病診断のための安全で確実な臨床検査の開発が求められている。今回試みた抗ヒトCRPモノクローナル抗体の免疫多層フィルム法によるサルCRP測定は、いくつかの問題点と限界を考慮さえすれば炎症性疾患を表す臨床指標として利用することが可能である。とくに、ヒトに近縁なチンパンジーの炎症性疾患とはよく対応しており、本属の臨床診断には有用であると考えた。自動分析機器を用いた本法は簡便かつ迅速であり、動物園医療に役立つものとなる。

ヒヒ属を除いた健康個体のCRP値はすべて1.0 mg/dl以下であった。このため、4属のサルに関する限り本法によるCRP陽性値を1.0 mg/dl以上とすることがほぼ適当であると考えた。しかし、テナガザル属でみられたような腸炎や腫瘍性疾患などでは1.0 mg/dl未満の値のものがああり、その判断には注意を要する。外見上健康な個体にもCRP高値が認められたヒヒ属については、健康時にもCRP値が高いか、ヒトCRP抗体との親和性が他属と異なることが推察された。本種の診療に対して本法を用いるには問題がある。

イヌでは手術の4時間後にCRPが検出され、24時間後にピークに達することが報告されている[2-4]。3種のサルで調べた術後のCRP値変化も病態の変化によく対応していた。アビシニアコロブスとショウハナジロゲノンでは骨折と咬傷のために術前からすでにCRPが高かったことが推察され、外傷の治癒とともに減少が認められた。ベニガオザルでは術前に炎症がみられなかったため、帝王切開手術後に一時増加してから減少した。これらのことから、CRP測定は手術後の経過観察に役立てることができると考える。

疾病個体であってもCRP上昇がみられないものがあった。ヒトでは免疫不全患者や潰瘍性大腸炎およびウイルス感染などの疾患においてCRP増加のみられないことが知られており[1]、同様の現象はイヌにも認められている[2]。類似疾患を示したサルのCRPの低値がもし同じ原因によるものであれば、炎症性・非炎症性疾患の鑑別診断に利用することが可能かもしれない。

ヒト以外の動物のCRP測定については、主にイヌを用いて試みられ、臨床応用の可能性に関する報告がいくつかある[3,4]。しかし、抗ヒトCRP抗体を用いた場合は交差性が非常に弱いことから、その応用には十分な注意が必要であることも示唆されている[2]。異種の動物に対する免疫反応の違いは、ヒト用臨床試薬を動物臨床に应用する場合たえず問題となる。免疫比濁法と本法との相関で低値に若干のばらつきが認められたのも、2法で使用された抗ヒトCRP抗体のチンパンジーCRPに対する結合能の異同が原因と考えられる。本報では示さなかったが、抗ヒトCRPウサギ抗体を使用した毛細管法と免疫比濁法との相関は本法(マウスで抗体作製)との相関よりも良好であり、このことから抗体種類の影響が大きいが分かる。診断にあたっては他の検査項目との併用が当然のことながら大切であると考ええる。

今回、本法を検討できた霊長類の種は限られていた。他種における臨床応用には、種別により多くの試料を用いた検討が今後の課題となる。

要 約

抗ヒトCRPモノクローナル抗体による免疫多層フィルム法でサルCRP値の測定を試みた。試料として飼育下の霊長目6属12種47個体から採取した血清もしくは血漿

霊長類のCRP測定

67 検体を用いた。マカク属, オナガザル属, テナガザル属およびチンパンジー属の健康個体はすべて 1.0 mg/dl を示した。よって, この境界値を本法による CRP 陽性値とするのが適当と考えた。抗ヒト CRP 抗体を用いた本法による CRP 測定は簡便かつ迅速であり, 霊長目の動物の臨床診断に利用できる。しかし, 腸炎や肝炎などを呈した疾病個体に 1.0 mg/dl 以下の値のものが認められ, ヒヒ属では健康個体にも関わらず CRP 高値を示していた。本法による診断と応用については, 動物種もしくは属別の検討が必要である。

キーワード: C 反応性蛋白, CRP, ドライケミストリー, 霊長類

謝 辞

CRP 測定について技術的指導を賜った富士メディカルシステムの寺田昭子様はじめ富士写真フィルム株式会社朝霞研究所の皆様に感謝いたします。

引用文献

1. 河合 忠, 玄番昭夫, 屋形 稔 編. 1991. 異常値の出るメカニズム, 第 2 版, 医学書院, 東京.
2. 藤瀬 浩. 1992. 家畜の急性相蛋白の臨床診断指標としての有用性—犬の C-反応性蛋白を中心に—. 日獣会誌 45:731-737.
3. Conner JG, Eckersall PD, Ferguson J, Douglas TA. 1988. Acute phase response in the dog following surgical trauma. *Res Vet Sci* 45:107-110.
4. Capsi D, Baltz ML, Snel F, Gruys E, Niv D, Batt RM, Munn EA, Buttress N, Pepys MB. 1984. Isolation and characterization of C-reactive protein from the dog. *Immunology* 53:307-313.
5. Kuschner I. 1986. How C-reactive protein has evolved. *Prot Biol Fluid* 34:259-262.
6. Oliveira EB, Gotschlich EC, Liu TY. 1977. Primary structure of human C-reactive protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:3148-3151.
7. 小作節子, 丸岡悦子, 今鷹耕二, 仁科甫啓. 1992. 富士ドライケムによる CRP 測定の基礎的研究. *JJCLA* 17, 656-659.
8. Riley RF, Coleman MK. 1970. Isolation of C-reactive proteins of man monkey, rabbit and dog by affinity chromatography on phosphorylated cellulose. *Clin Chim Acta* 30:483-496.